

杜氏盐藻叶绿体 ATP 合酶 α 亚单位基因启动子的克隆及初步功能分析

谷辉辉¹, 冯书营², 潘卫东³, 李 杰¹, 薛乐勋¹

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南科技大学 医学技术与工程学院, 河南 洛阳 471003; 3. 郑州大学 基础医学院, 河南 郑州 450052)

摘要: 采用 *Dra* I, *Eco*R V, *Pvu* II, *Sca* I, *Sma* I 和 *Stu* I 六种内切酶消化杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)叶绿体基因组 DNA, 与相应 DNA 接头连接, 构建成无载体连接的盐藻叶绿体 GenomeWalker DNA 文库。利用长距离 PCR(long distance-polymerase chain reaction, LD-PCR)技术从该文库中克隆得到 ATP 合酶 α 亚单位(atpA)基因上游序列 1 347bp。启动子特征分析显示该序列具有一般启动子的保守序列特征, 根据这些特征设计引物, 扩增 4 个 5'端系列缺失的启动子片段, 并用绿色荧光蛋白基因作为报告基因, 构建启动子 5'端系列缺失重组质粒, 以期鉴定不同启动子片段的驱动报告基因转录的活性。基因枪转化结果显示, 启动子长度约 1 000 bp 的重组载体转化盐藻后, 其转化株中有黄绿色的盐藻细胞出现。说明克隆的序列具有启动子活性, 能驱动绿色荧光蛋白基因在杜氏盐藻中有效表达, 为建立盐藻叶绿体转化系统奠定了工作基础。

关键词: 杜氏盐藻(*Dunaliella salina*); 叶绿体转化; ATP 合酶 α 亚单位基因启动子

中图分类号: Q244; Q782

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)09-0018-06

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*, 以下简称盐藻)是一种耐盐性单细胞绿藻, 因其自身具有许多优点, 目前已被开发作为一种新型的生物反应器, 以期生产多种药用蛋白、抗体和人/兽用口服型疫苗等。目前, 已经利用盐藻的核转化系统表达了一些外源基因如 *gus*、*bar* 和 *gfp* 基因等^[1], 但前期的研究发现, 外源基因在细胞核转化时容易发生基因沉默、表达量低等现象, 为此, 有研究者进行了转化盐藻叶绿体的尝试^[2]。叶绿体转化与核转化相比具有许多优势: 其一, 外源基因更易通过同源重组机制定点整合到叶绿体基因组中, 有利于人为地控制外源基因的插入位点。其二, 叶绿体 DNA 分子有多个拷贝, 达到同质化后能保障外源基因在叶绿体中的高效表达。另外, 叶绿体基因组具备原核系统性质, 可以将多个外源基因采取“多顺反子”的原核表达形式同时引入, 并受共同的启动子控制, 既方便操作又可避免了“共沉默”现象的发生^[3]。因此, 建立盐藻叶绿体转化体系具有十分重要的研究和应用价值。

在建立盐藻叶绿体转化体系时, 需要构建一个高效稳定的叶绿体表达载体。而在表达载体构建时, 选择一个高效的启动子是至关重要的。就目前而言,

在藻类叶绿体转化研究中所用到的有 *atpA*、*16S*、*psbA*、*psbD*、*rbcL* 和 *chlL* 启动子等^[4-7], 而编码叶绿体 ATP 合酶 α 亚单位(*atpA*)基因的启动子被认为是一个较强的启动子^[4,8]。但是, 目前有关盐藻叶绿体启动子方面的研究未见报道。为此, 本文力在克隆盐藻的内源性 *atpA* 启动子, 将其与外源基因连接构建不同的重组表达载体, 通过基因枪转化盐藻后对其活性进行鉴定分析, 最终建立转化盐藻叶绿体表达体系, 为盐藻叶绿体转化系统的研发奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 材料

盐藻(*D. salina*, UTEX-LB-1644)购自美国德州大学藻种中心。培养基为改良的 Ben-Amotz 盐藻培养基^[9]; 培养条件: 温度 26℃, 光暗比 12/12, 光照强度 4 500 lx。

收稿日期: 2010-07-10; 修回日期: 2010-11-05

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2007DFA01240); 国家自然科学基金项目(30700014)

作者简介: 谷辉辉(1982-), 男, 硕士, 主要从事藻类基因工程研究, E-mail: hhgu@zzu.edu.cn; 薛乐勋, 通信作者, E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn

载体和宿主菌: pMD-18T 载体购自大连宝生物工程公司; PSP71-PCatpA -GFP 质粒由本实验室构建; 宿主菌 JM109 为作者所在的实验室保存。

主要的试剂和仪器: 各种限制性内切酶和工具酶购自大连宝生物(*TaKaRa*)公司, DNA 回收、纯化及质粒提取试剂盒均购自杭州爱思进(*Axygen*)生物公司。荧光显微镜为 Nikon ECLIPSE 50i; 基因枪及配套材料均购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 叶绿体基因组的提取及叶绿体 Genome-Walker DNA 文库的构建

取 500 mL 对数生长期的盐藻, 离心收集细胞, 参照 Arun Goyal 法^[10]进行叶绿体的分离纯化。并采用 SDS-蛋白酶 K/酚/氯仿方案对叶绿体基因组进行提取^[11]。采用 *Dra* , *EcoR* , *Pvu* , *Sca* , *Sma* I 和 *Stu* 6 种平端酶酶切叶绿体基因组 DNA, 参照 GenomeWalker™ Universal Kit User Manual 的方法, 与 DNA 接头连接, 构建成无载体连接的盐藻叶绿体 GenomeWalker DNA 文库。

1.2.2 盐藻 *atpA* 基因启动子序列的克隆

根据本实验室前期已经克隆的 *atpA* 基因编码区的序列(GenBank number: AY435096), 设计用于扩增 *atpA* 基因 5'上游序列的外侧和内侧引物 GSP1 (5'CGTTCTAATCCATAAACACGAGCGATA3') 和内侧引物 GSP2(5'ACGAGCGATACCGTCACCTACTTGA3')。以构建的叶绿体 GenomeWalker DNA 文库为模板, 以外侧引物 GSP1 和人工接头外侧引物 AP1(GTAATACGACTCACTATAGGGC3') 进行第一轮 PCR。随后, 取 1 μL PCR 产物稀释 50 倍后作为模板, 用内侧引物 GSP2 和人工接头内侧引物 AP2(5'ACTATAGGGCACGCGTGGT3') 进行第二轮 PCR, 扩增得到 *atpA* 基因编码区上游的全序列。PCR 反应参数参照 GenomeWalker™ Universal Kit User Manual 说明。PCR 结束后, 回收 PCR 产物, 克隆到 pMD-18T 载体上, 由北京博尚生物技术公司测序。

1.2.3 盐藻 *atpA* 启动子 5'系列缺失片段的克隆

根据克隆得到的盐藻叶绿体 *atpA* 启动子序列, 分别设计四个上游引物: UP150 *EcoR* : 5'-GAGG GATATCTAGATAAGGGTATGAATGAC-3'; UP490 *EcoR* : 5'-ATGTGATATCTGGAAGAGTGATAGGAGGTA-3'; UP840 *EcoR* : 5'-GCCCCGATATCAAAATAACTCATAAACCTA-3'; UP1280 *EcoR* : 5'-CGCAGATATCACTAAAGCCAATTCAAAGAC-3';

引入 *EcoRV* 酶切位点(GATATC); 阴影部分为保护碱基。在下游设计一个接头引物: Down *NcoI*: 5'-ACTA CCATGGACATCTTTACTTCTGGTGTAT-3', 引入 *NcoI* 酶切位点(CCATGG); 阴影部分为保护碱基, 保证读码框对齐。以含 *atpA* 启动子全长序列的质粒为模板, PCR 扩增 4 个不同长度的启动子序列, PCR 反应条件: 94 30 s, 52 40 s, 72 90s。PCR 结束后, 对其产物进行 *EcoRV* 和 *NcoI* 双酶切, 并纯化回收四个 P*DatpA* 片断。

1.2.4 重组表达载体的构建

将载体 PSP71-PCatpA-GFP 用 *EcoRV* 和 *NcoI* 双酶切, 采用 DNA 纯化试剂盒对载体片段 PSP71-GFP 纯化回收。在 T4DNA 连接酶的作用下, 分别和已纯化回收的四个 P*DatpA* 片断相连接。将连接体系转化感受态细菌 JM109, 挑取阳性克隆进行质粒的大量提取和酶切鉴定。将酶切鉴定正确的克隆进一步送测序公司测序。

1.2.5 基因枪法转化盐藻

取 1.5 mL 处于对数生长后期的杜氏盐藻细胞, 4 000 g 离心 3 min, 倾去上清, 用 200~300 μL 新鲜培养基重悬盐藻, 之后均匀涂于平皿中的固体培养基上。按此方法制作四个平皿(每个平皿对应一种重组载体), 静置 15 min, 以备轰击。基因枪子弹制备及转化程序按照仪器说明书进行。轰击后的平皿置于 26 °C, 300 lx 的弱光照条件下过渡培养 8~12 h, 然后分别用 1 mL 液体培养基将盐藻洗至试管中, 在正常的培养条件下连续培养 2~3 d, 置于荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 LD-PCR 扩增 *atpA* 启动子区

利用 *LA-Taq* 酶, 经过巢式 PCR 扩增得到约 1.5 kb 的特异性片段(图 1)。该片段经过测序显示, 其全长为 1 470 bp, 其中 3'端序列(序列中阴影标注部分)与已知序列是完全一致的, 5'端起始序列为引入的 *StuI* 酶切位点。结果说明, 成功克隆得到 *atpA* 基因启动子序列。

同时, 借助于 Softberry 工具(<http://www.softberry.com/>)对克隆得到的基因序列进行分析, 结果显示该序列包含有四个具有启动子特征的片段, 分别位于 ATG 上游的-150, -490, -840 和-1280 位置附近。其中, 位于-1 280 位置的特征片段距翻译起始密码子较远, 并在其下游存在一个比较保守的小 RNA

基因, 推测其为 *atpA* 基因启动子的可能性较小(图 2, 图 3)。为此, 在下述实验中, 利用其他三个特征性区域进行载体构建工作。

2.2 分段扩增启动子特征区域

通过设计的不同引物对 *atpA* 基因上游启动子区进行 PCR 扩增, 结果如图 4 所示, 通过四组 PCR 分别扩增得到约为 250 bp、600 bp、800 bp 和 1000 bp 特异性片段。

2.3 重组表达载体构建

通过对 4 个表达载体进行 *EcoRV* 和 *NcoI* 双酶切鉴定, 分别得到了大小约 250 bp、600 bp、800 bp 和

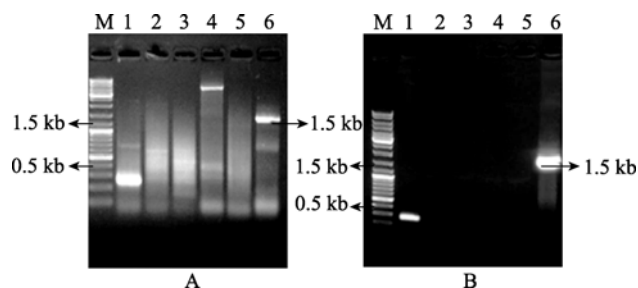


图 1 LD-PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification products of LD-PCR
A. La-PCR 第一轮扩增结果; B. La-PCR 第二轮扩增结果; M 为分子重量 marker(10 000), 1~6 为在 *Dra*, *EcoR*, *Pvu*, *Sca*, *SmaI* 和 *Stu* 六文库中扩增的结果
A. results of 1st PCR; B. results of 2nd PCR
M. DNA ladder markers (10 000); 1~6. PCR products of Genome-Walker DNA Libraries

```

CCTTAGGAAAACTTAGGGTTTTTCCGGCAGAATTTTTTTTACTATATATATATATC[ITCG]
[AACTTTATTTACTAGATTATATATAAT]AATATAAGCGTTTAAATTTTTTGATTATTTAATAAA
CATTGACATTAATCAAATTTTATTGTATATATATATAGATGTACATTAGTACATATCTATATA
GACGCGTTACATACATACTAAATATACGTAATATTTGGTATATTACGTATATAACACGTTTA
TGATAAAGTTAAATAATAATATACGTCCTTAGTTCAGTCGGTAGAACGCAGGTCTCCAAAACC
TGATGTCGTGGGTTTCGAGTCCTACAGGGCGTGATTTTGCAAAATAAAGTTTAGGTTAGTTT
GTTTAAAAAATTTTTGGTATTATTATTTAATAATAATATTATACTGAACGCGCAAGCACAA
CTAAAGCCAATTCAAAGACTTCTATTGAAATAAAATATATATATAATTTATACCAAATTTT
UP1280 5' → 3'
TTTTGTTC[TTTACAAAAAGAACAATATTTTGATTAT]TAAAAAAAAAAAAATAAATAAACT
TATTTTTTTAACAACCTTATTTTAGTATTCTTAAAAGAAACGAAAAAATTATACAAAAAG
TATGCACTTAATCTTTAGTTTAAAGAAAATTTTATAGTAATAGTTTTCTTTAAACTAAAAA
TAAACTCATAAACCTAGAAAATAGTCTAGGTTTTTAGATTATTAAAAAAAATCTAAC
UP840 5' → 3'
TAGAATGAAAAAATTTTTCAAAAAAACTTAATGAATTTTCAAGATAAACTCTTTCAA
ATTTAAAGTTTAATTTTAATTGAAAAAACTTTGGAAAGAGTGATAGGAGGTATTTTTTT
UP490 5' → 3'
[TAGCTAATATTAATTTAAATAATAT]TGTTATTTATTAATAGGTGGTGTCAATTTACGCCACC
AAAGCGCGCACAAGCGCGGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
TGATCTCTCCGGAATATATAGATAATAACAAATTCAGAAGAAATTTTATAGAGTTTAA
TATCCTAAAGAATATTTAAATCTTCTAAAATTTGTTATCTATTTATAACAATTTATCGGT
TTTTTAGAAAAAATAAAGTATCTCCTAAATTAATAATGAAAAATTCTTAGATAAGGGT
UP150 3' → 3'
ATGAATGACGACCTTACTTATTTTTTCCTTAGGTCG[TTAAAAATACAGCAAATAGAATAA
TATATT]TAAAAATATAAAGTGTTTCGTTTACGACGGAAAGTATAAATTTTAAATATATTAT
TAAACAATAGTTTATAAGTTATAAACTATTTGTTTCTATCATATCCCTTTAACAAGAAAAA
AAATTTTTTTATGGAATGCGCACACCTGAAGAATTAAGTAATCTAATTAAAGATTTAAT
TGAAGAATATACACCAGAAGTAAAGATGGTGGACTTTGGTATCGTTTTTCCAAGTAGGT
3' ← 5' Down
GACGGTATCGCTCGT

```

图 2 盐藻叶绿体 *atpA* 基因启动子序列分析及启动子 5'系列缺失片段所用引物位置

Fig.2 Sequence analysis of the *atpA* gene promoter and the positions of primers

AAATATAT 等阴影标注的为已知序列, 末尾划线处为引物 GSP2; [ITCGAA]等加框的为具有启动子特征的序列; ATG 为起始密码子; 斜体部分为 BLAST 分析时同源性较高的小 tRNA 片段; 双下划线分别为 4 个上游引物和一个下游引物, 其下标注的为引物名称及方向
AAATATAT shadow tagged sequences are known sequences; the lineation sequence of the end is primer GSP2;
Framed sequence as [ITCGAA] is promoter characteristic sequences; ATG is initiation codon; italic sequence is high homology of small tRNA fragments by BLAST analysis; double underline sequences are 4 upstream primer and a downstream primer respectively, with label of primer name and direction

```
> test sequence
Length of sequence-      1347
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      4
Promoter Pos:      539 LDF- 12.01
-10 box at pos.      524 TTGTATTAT Score      73
-35 box at pos.      504 TTTACA      Score      47
Promoter Pos:      886 LDF- 11.37
-10 box at pos.      871 AAATAATAT Score      42
-35 box at pos.      851 TTTTAA      Score      26
Promoter Pos:      93 LDF- 10.35
-10 box at pos.      80 ATATATAAT Score      70
-35 box at pos.      58 TTCGAA      Score      12
Promoter Pos:      1228 LDF- 5.50
-10 box at pos.      1213 TAATATATT Score      48
-35 box at pos.      1192 TTAAAA      Score      37
```

图 3 启动子位置预测结果

Fig. 3 Promoter prediction by softberry

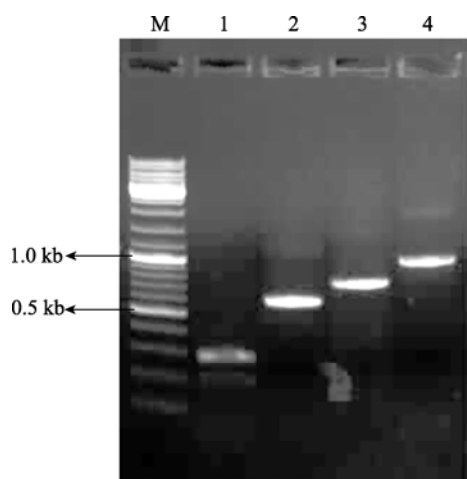


图 4 PCR 结果电泳图

Fig. 4 PCR products of 5'-deleted promoter fragments of the *atpA* gene

M 为分子量 marker(10k); 1~4 为利用四对引物进行 PCR 的结果
M. DNA ladder markers (10kb); 1~4. PCR products using the four upstream and one down stream primers

1 000 bp 的启动子区片段和 3.5 kb 的载体片段, 与预期的酶切结果相符(图 5), 测序结果也显示扩增的四个特征性片段成功连接到 PSP71-GFP 表达载体上。将酶切和测序鉴定正确的 4 个重组表达载体分别命名为 p250、p600、p800 和 p1000。

2.4 表达载体转化盐藻的 GFP 检测

分别取 50 μ L 转化后培养 2~3 d 的盐藻滴片, 置于荧光显微镜下观察。结果显示, 启动子长度约 1000 bp 的重组载体 p1000 转化盐藻后, 其转化株中有黄绿色的盐藻细胞出现(图 6)。这是因为盐藻细胞叶绿

体中含有大量的叶绿素, 在蓝色荧光激发下呈红色, 而 GFP 的绿色荧光与红色叠加之后便呈现黄绿色。结果表明, GFP 在盐藻叶绿体中得到了表达。其他 3 个重组载体转化盐藻后未见明显的黄绿色细胞出现。

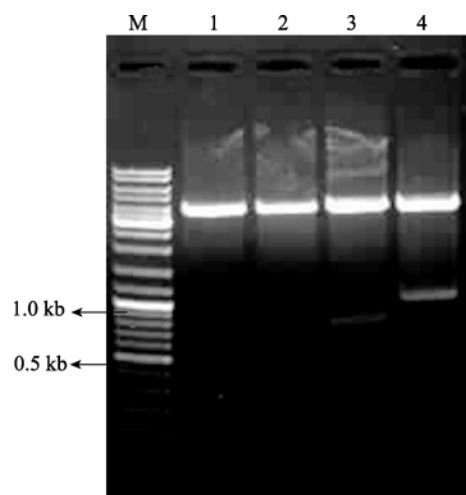


图 5 4 种表达载体的双酶切鉴定

Fig. 5 The 4 recombinant vectors after digestions by *EcoRV* and *NcoI*

M. 分子量 marker(10 000); 1~4.4 种载体 *EcoRV* 和 *NcoI* 双酶切结果

M. Marker (10000); 1~4. four vectors digested by both *EcoRV* and *NcoI*

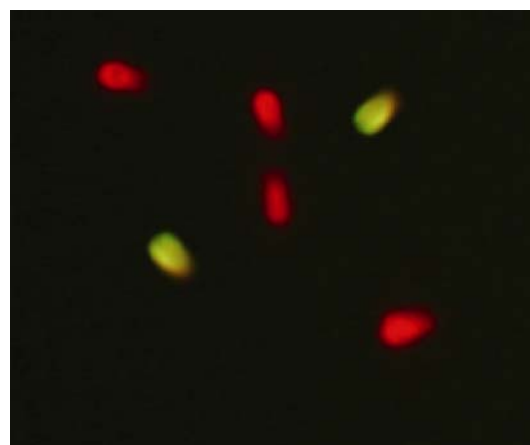


图 6 荧光显微镜下 GFP 转化盐藻结果(400 $\times$)

Fig. 6 *D. salina* with transformed GFP observed by fluorescence microscopy (400 $\times$)

3 讨论

盐藻作为开发的一种新型生物反应器, 越来越受到诸多分子生物学研究者和藻类研究人员的关注。在利用盐藻反应器进行外源性基因表达时, 盐藻

的叶绿体转化是其较为重要的一个方面。在叶绿体转化中, 构建一个稳定高效的表达载体是较为关键的一个环节。而启动子作为一个调控基因表达的元件, 其对表达载体的构建是至关重要的。目前, 在盐藻转化中常用的启动子分为两类, 即组成型启动子和诱导型启动子。在核转化中为避免产物过量积累而对生物体造成伤害, 一般常用诱导型启动子^[12]。而在叶绿体系统对表达产物的积累有较强的承受能力, 通常用强组成型启动子。atpA 基因启动子属于一个强组成型启动子, 研究表明, 在莱茵衣藻中 atpA 基因簇(包括 atpA, psbI, cemA 和 atpH 四个基因)共用一个启动子, 这个强启动子位于 atpA 基因的上游^[4], 它可以作为叶绿体载体表达系统的必要元件。本实验室曾采用莱茵衣藻叶绿体 atpA 基因启动子作为盐藻叶绿体转化系统的启动子, 虽然也有转录起始活性, 但表达效率不高^[2]。本研究克隆的盐藻内源性的 atpA 基因启动子将对盐藻叶绿体转化具有重要意义。

基因组步行法特异性强, 是克隆已知序列侧翼未知序列的较好方法, 常用来扩增未知启动子以及其他调控序列。为此, 本研究利用该方法, 对 atpA 基因上游启动子区进行克隆, 并成功得到了 1470 bp 的序列。Softberry 分析显示, 得分最高的启动子位置在 ATG 上游约 840 bp 的区域。该区域中, 所预测的 -10 box 和 -35box 之间的距离正好是 17 bp, 符合强启动子的特征^[13]。而在用该工具分析莱茵衣藻叶绿体 atpA 启动子时也显示得分最高的启动子位置 -10 box 与 -35box 之间的距离也恰好是 17 bp。这说明 -840 位置的这个启动子区域极有可能就是活性最强的启动子区。本研究通过 5' 系列缺失的方法来鉴定不同长度的启动子功能, 结果显示, 仅有长度约为 1000bp 的启动子片段能够驱动绿色荧光蛋白(GFP) 基因的表达, 而其他三个启动子片段不能有效驱动 GFP 基因的表达, 可能的原因这三个片段分别缺失了不同的启动子元件, 也提示 ATG 上游 914~675 之间的 239bp 序列是启动子活性所必需的, 包含着可能的关键调控元件, 这与上述预测的结果也一致。

综上所述, 本研究成功克隆得到了盐藻叶绿体 atpA 基因启动子, 并在此基础上构建了四个转化盐藻叶绿体的重组表达载体, 用基因枪法对盐藻进行转化, 结果表明克隆得到的 atpA 基因上游序列具有启动子活性, 为建立盐藻叶绿体转化系统奠定了前期工作基础。

致谢: 本工作在河南省分子医学重点学科开放实验室完成, 特别表示感谢!

参考文献:

- [1] Li J, Xue LX, Yan HX, et al. Inducible EGFP expression under the control of the nitrate reductase gene promoter in transgenic *Dunaliella salina*[J]. J Appl Phycol, 2008, 20: 137-145.
- [2] 潘卫东, 袁保梅, 谢华等. 杜氏盐藻叶绿体转化载体 pDS16S-CAT 的构建[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(1): 25-28.
- [3] Bogorad L. Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products[J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(6): 257.
- [4] Drapier D, Suzuki H, Levy H. The chloroplast atpA gene cluster in *Chlamydomonas Reinhardtii* Function analysis of polycistronic transcription unit [J]. Plant Physiol, 1998, 117: 629-641.
- [5] Mayfield SP, Schultz J. Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. Plant J, 2004, 37: 449-458.
- [6] Klein U, Salvador ML, Bogorad L. Activity of the *Chlamydomonas* chloroplast rbcL gene promoter is enhanced by a remote sequence element[J]. Proc Natl Acad Sci, USA 1994, 91: 10819-10823.
- [7] Klein U, De Camp J D, Bogorad L. Two types of chloroplast gene promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 3453-3457.
- [8] Barnes D, Franklin S, Schultz J, et al. Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes[J]. Mol Gen Genomics, 2005, 274: 625-636.
- [9] Ben-A. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella* [J]. Trends Biotechnol, 1990, 8(5): 121-126.
- [10] Arun G, Thomas B, Tolbert NE, et al. Isolation of intact chloroplasts from *Dunaliella tertiolecta* [J]. Plant Physiol, 1988, 88: 543-546.
- [11] 马学军, 舒跃龙译. 精编分子生物学实验指南[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2005: 44.
- [12] Li J, Xue L, Yan H, Wang L, et al, The nitrate reductase gene-switch: a system for regulated expression in transformed cells of *Dunaliella salina* [J]. Gene, 2007, 403: 132-142.
- [13] 孙乃恩, 孙东旭, 朱德煦. 分子遗传学[M]. 1 版, 南京: 南京大学出版社, 2003: 192.

Cloning and preliminary functional analysis of ATPase alpha subunit gene promoter from *Dunaliella salina*

GU Hui-hui¹, FENG Shu-ying², PAN Wei-dong³, LI Jie¹, XUE Le-xun¹

(1. Department of bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. College of Engineering and Medical Technology of Henan Science and Technology University, Luoyang 471003, China; 3. Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Received: Jul., 10, 2010

Key words: *Dunaliella salina* ; chloroplast transformation; ATPase alpha subunit gene promoter

Abstract: To clone and identify the function of the promoter of the ATPase alpha subunit (atpA) gene from *Dunaliella salina*, a chloroplast GenomeWalker DNA Library from *D. salina* was constructed, from which the 1 347 bp upstream fragment of atpA gene was cloned by long distance-polymerase chain reaction (LD-PCR). According to the positions of the different promoter elements predicted by bioinformatics tools, 5'-deleted series primers were designed to amplify different promoter fragments. Series 5'-deleted expression vector containing the GFP gene was constructed and then transformed to cells of *D. salina* by particle bombardment. The transformed cells with p1000 recombinant vector produced green fluorescence, but not in other transformation groups, suggesting that the cloned region had the activity of the promoter and may drive the effective expression of the GFP gene in *D.salina*. Our results have layed a foundation for the chloroplast transformation system of *D.salina*.

(本文编辑: 张培新)