

模式生物衣藻及其研究进展

谢传晓, 韩伟, 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所 中国科学院离子束生物工程学重点实验室, 合肥 1126 信箱 230031)

摘要:单细胞衣藻(*Chlamydomonas*)由于其生活周期简单,培养方法简便,易于分离得到系列的突变体,并已建立了分子遗传学研究技术与遗传分析系统,成为植物光合作用、鞭毛组装与功能、细胞周期及节律、细胞信号传导与光感受、细胞识别等重要生物学过程研究的模式生物体。本文对模式生物衣藻及其相关生物学途径的研究进展作一综述。

关键词:衣藻; 模式生物

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)03-0350-05

Progress of *Chlamydomonas* as A Model Organism

XIE Chuan-Xiao, HAN Wei, YU Zeng-Liang

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031 China)

Abstract: The unicellular alga *Chlamydomonas* offers a simple life cycle, easy culture and isolation of series of mutants, established the techniques and tool kit for molecular genetics and genetics analysis. It is now becoming the model organism for studies on photosynthesis in plant, flagellar assembly and function, cell cycle and circadian rhythms, signal transduction, light perception and cell recognition. It is summarized the progress of study on *Chlamydomonas* as a model organism in this paper.

Key words: *Chlamydomonas*; model organism

Pascher 等人在 1916 至 1918 年间两次提出衣藻是非常合适的遗传分析物种,并指出有性过程中减数分裂产生的各种配子可以分别进行分析,即现在所说的四分子(体)分析(tetrad analysis)^[1]。后来的研究证实,这种简单的生活周期在实验室里可以得到很好的控制,目前学术界对衣藻的兴趣越来越浓厚。其另外一个重要的研究价值是容易分离得到突变体,1930 年 Moiwus 报道的分离突变体工作非常引人注目。到 20 世纪 40 年代至 50 年代, Lewin, Ruth, Sager 以及一些其他人把衣藻的几个种,特别是 *C. reinhardtii* 与 *C. eugametos* 发展成为实验生物体。经过多家实验室的筛选,已经建立了许多株系,其中研究最为广泛是莱哈衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*),国内有简称之为莱氏衣藻、莱茵衣藻)属的一些株系,衣藻基因组计划(包括全基因组计划及 EST 计划)选择的也是这种衣藻。现在,全球 100 多家著名实验室已建立了衣藻实验生物学研究体系及多个研究主题和相应的遗传系统^[2],奠定了衣藻的学术地位。

衣藻是一种单细胞真核绿藻,素有“绿色酵母”(green yeast)之称^[1-3]。衣藻与酵母有许多共同之处,如生长周期简单,生长快,世代时间短,可以在平板上形成单克隆,也能进行液体培养,以单倍体与二倍体两种形式生长,能对其配子的发育过程进行四分子分析。当然,衣藻也有其独特之处:光照和黑暗条件下均能生长,且能把外界提供的碳源与光合成的碳物质分开;是目前惟一能特异地对线粒体、叶绿体与核分别建立转化系统的生物;显然,在酵母已经奠定了其模式生物的角色以后,再选择一个“绿色”的酵母来作为植物的模式生物,可谓之应运而生,因为许多细胞学问题不可能在酵母中实现^[1],如:光合成(photosynthesis)的途径、生物的机动性(motility)、趋光性(phototaxis)与感光(light perception)、鞭毛(flagella)、中心粒(centrioles)、轴丝(axoneme)与基体(basal bodies)、植物细胞周期的调控与细胞识别、叶绿体的生物发生(chloroplast biogenesis)及其遗传(inheritance)、植物细胞的凋亡、叶绿体的转化,以及叶绿体 DNA 的损伤与修复等。

收稿日期:2002-04-04;修回日期:2002-07-11

基金项目:国家自然科学基金重大项目(19890300)资助

作者简介:谢传晓(1972-),男,在读博士生,专业:生物物理学

通讯作者:余增亮(1944-),研究员,博导。E-mail: zlyu@mail.ipp.ac.cn, Tel: 0551-5591382(办)

1 主要分类特征与莱哈衣藻实验室株系

通常意义上的分类特征都是基于形态学建立的^[4]。单细胞绿藻门的分类依据是:菌体前端的两个鞭毛(flagella),一个或多个淀粉核或蛋白核(pyrenoid)位于一个基部叶绿体周围,一个明显的细胞壁。属内种的分类以细胞大小与形状、叶绿体与淀粉核的形状及位置、鞭毛的长度、收缩泡(contractile vacuoles)在胞内的位置及数目,以及其他可以在光学显微镜下可以分辨的结构特征来区分。

经过几十年的研究,莱哈衣藻(*C. reinhardtii*)成为衣藻实验生物学中最为突出的一种,它可以在无光合的条件下以乙酸盐为唯一的碳源生长。这种特性对于莱哈衣藻叶绿体生物合成及光合成研究很有意义,因为这种碳源可以与光合生成的含碳物质分开。当然,还有一些其他种也有其存在一些独特的研究价值。如,有些研究者通过对*C. eugametos*与*C. moewusii*种内或种间可交配型来研究衣藻的有性过程;当前另一个热点是研究*C. eugametos*与*C. moewusii*磷脂介导的细胞信号传导^[5]。莱哈衣藻属最原始的菌株是1945年由Smith等人从土壤中分离得到的。现在被选作衣藻基因组计划测序菌株——Sager的21gr菌株(衣藻遗传信息中心菌株CC1690, The Chlamydomonas Genetics Center strain CC1690, Duke University)也来源于Smith的菌株。目前,公开数据库里拥有大量的EST数据菌株则是衣藻遗传与信息中心菌株C9^[6]。此外,1988年Gross等分离的菌株S1 D2可用的EST数据也相当多,其基因组与21gr菌株存在共线性(colinearity)与同线性(synety),但实验已证明两者之间存在的多态性非常多,特别是基因组中的非编码序列^[4]。

2 衣藻细胞构造与功能系统研究进展

2.1 细胞壁

野生型莱哈衣藻间期细胞直径大小约为10 μ m,但细胞周期时相不同细胞的大小也相差很大。细胞通常都由富含羟脯氨酸的糖蛋白组成的细胞壁包裹,与植物细胞壁的伸展蛋白(extensin)很类似。一些细胞壁组分相关的基因已从相应的突变体成功分离得到并进行了测序与功能鉴定,这些细胞壁生物合成缺陷的突变体为这些基因的研究提供了很好的研究基础。从植物或植物的突变体出发,很难开展相应的研究,而莱哈衣藻不同,相应突变体丰富,容易分离,并可以通过系列缺陷型的菌株相对简单地从事下游研究。再者,系列细胞壁组分缺陷突变体的分离^[7],为外源基因转化研究及细胞感受态过程中外源基因穿壁的机制研究提供了基础。

2.2 线粒体

莱哈衣藻线粒体分散位于细胞基质中,有时还可以在电镜下看见拉伸与分枝状的线粒体。对线粒体进行细胞学分析时难以从抽提组分中剔除叶绿体的成分,这限制了对莱哈衣藻线粒体研究进程。但纯化活性线粒体的方法最近已经

建立起来。莱哈衣藻线粒体基因组为大小15.8kb的线状分子,其中只含有编码COB、COXI、线粒体NADH脱氢酶的5个亚基、线粒体rRNA、3个tRNA等的几个基因以及一个类似于反转录酶基因的可读框(详见GenBank接受号:U03843)。研究发现cob基因缺失的突变体^[8]不能在黑暗条件下以乙酸盐为惟一碳源生长,但可以在有光条件下行光合作用生长,对cob基因进行点突变的突变体、呼吸作用核基因缺陷型突变体以及其他黑暗条件下死亡的突变体已经分离获得,将可依此开展下一步的研究。

2.3 细胞核与核基因组

通过对莱哈衣藻进行横切面发现间期细胞有完整的细胞核及核仁结构,核膜与内质网膜相通且形成内膜系统,有1至4个高尔基体位于近旁。光镜下,仅可见8个明显的可分辨的染色体,电镜与遗传分析的方法已证实其基因组实际含有17个连锁群(单倍体生活周期细胞)^[9]。核基因组大小估计为1 \times 10⁸bp。变性研究表明其全基因组水平富含GC碱基对,总体达62%,已测序部分的序列分析也给出了相似的结果。对其进行的PCR反应要求引物GC含量大都定在45%~50%,且在PCR反应体系中要加入c7dGTP进行优化以提高扩增效率。

2.4 菌内渗透压调节

两个收缩泡(contractile vacuole)位于莱哈衣藻的前端。高渗透压下存活与盐敏感突变体的分离可以为收缩泡的结构与功能研究提供其遗传控制研究基础。而且盐敏感突变体的分离^[10]也可应用于胞内跨膜离子运输研究。

2.5 鞭毛、基体(basal body)及有关细胞信号传导

衣藻两个鞭毛着生于细胞的前端,长度约12 μ m,突伸到细胞壁内部。可以对莱哈衣藻进行大量培养后于酸性环境下,使鞭毛从细胞上脱落收集,从而进行细致的生化分析。双向电泳表明,其鞭毛的蛋白质组分多达250种。莱哈衣藻是研究鞭毛功能与组装最好的生物体,Kozminski等人,1993年^[11]报道了鞭毛的组装与维持依赖于鞭毛内的运输(intraflagellar transport,IFT)。目前,已经分离得到游动性丧失的突变体及其他更精细水平突变的突变体。鞭毛轴丝中基本组分已通过相关的突变体确定下来,超过75个遗传基因座与鞭毛的组装与功能有关,其中有40个以上的基因已被克隆与测序,有些基因已经证实与动物精子和纤毛有关功能相关^[12],动物中已发现其同源蛋白或基因。通过不同交配型的突变体的交配形成合子,单个突变体之间可以通过互补作用来研究突变体非等位突变基因座的功能^[13],这为莱哈衣藻鞭毛的放射辐(radial spokes)、中心对(central pair)等其他更精细结构层次上的复合体蛋白质功能研究,以及其相应的基因鉴定提供了最好的遗传分析系统。此外,通过获得特定突变体的抑制型突变,为鞭毛发育精细的调控研究奠定了基础。

鞭毛着生在细胞的基体上,基体则正好位于细胞核的顶

上,且有细胞内纤维与核相连,基体通过体内的 4 套微管延伸于细胞的顶部。切片显示基体与动物细胞中心体一样具有一系列轮状构造,可见其微管结构为 9+2 型。三元微管的组装需要包括一个远端纤维 20kDa 的收缩蛋白 centrin 与 α 微管蛋白。用弱的有机酸、肥大(细胞)脱粒肽(mastoparan)、钙调蛋白拮抗剂、去垢剂等不同的刺激物处理衣藻细胞,会使鞭毛发育局限于基体与鞭毛轴丝间的过渡水平。通过对此现象的研究揭示了衣藻细胞内的一种信号传导途径。对鞭毛刺激剂不敏感的突变体研究表明,两个基因座控制刺激的应激反应,由于它们是钙激活反应缺陷型的突变体,引起了细胞内基体到鞭毛之间钙调蛋白介导的细胞信号传导途径失灵^[14]。这两个基因座之一的产物是一个 17kDa, N 端含有一个超螺旋化结构域和三个 Ca^{2+} ——钙调蛋白相结合的结构域。

2.6 叶绿体与光合成研究

莱哈衣藻细胞内的叶绿体呈一个杯形结构,占据着细胞近三分之二的内部表面积。莱哈衣藻叶绿体基因组测序工作已接近完成,总长为 196kb。叶绿体基因组中含有一个与大多数陆地植物相似的反向重复(inverted repeat)结构,但是基因的排列的顺序与其他植物却大相径庭,很难用任何重排、倒位等机制来解释^[4]。然而,叶绿体基因组编码的基因

序列除了少数几个差异很大之外,其余大部分都非常相似,这使得莱哈衣藻很适合进行叶绿体基因结构与功能研究。笔者认为,叶绿体基因组与其他陆地植物叶绿体基因组的组织方式不大相同,但行使具体功能的基因,受到功能上的选择压力,保留了原有的结构。

对于研究光合作用和细胞核——叶绿体相互作用,衣藻有独特的优点,能够行光养生长和异养生长。衣藻靠光或碳源(通常是乙酸盐)生长,且能区分这两种途径获得的碳物质,所以易于分离和保存光合作用和叶绿体功能突变体,这在高等植物上难以实现。莱哈衣藻是研究叶绿体光合作用与叶绿体生物发生的最好的模式生物。例如衣藻 *yl* 突变体,不能合成叶绿素,在乙酸盐培养基上黑暗条件下培养只能形成一些退化的前质体,但暴露在光下 8 小时之后,叶绿体结构又能形成。显而易见,*yl* 突变体的返绿,为光合成与光复合体的组装研究提供了很好的切入点,同时也是研究核与叶绿体基因在光复合体组装与功能中,承担角色研究的突破口。

目前,衣藻在叶绿体与光合成方面的研究成果最为丰富,利用物理与化学方法筛选、分子遗传学与基因工程手段(如缺失、插入、转座子等方法)创造了大量的有关的突变体,开展了相关的研究,具体内容见表 1^[4,15,16]。

表 1 已分离的与叶绿体有关的莱哈衣藻突变体种类与数目及研究内容

Table 1 The list of isolated *Chlamydomonas* mutants in chloroplast and the related researchs

叶绿体内的复合体或生物过程	突变体数目	主要研究方向
光系统 II 反应中心	~26	<i>psbA</i> 、 <i>psbB</i> 、 <i>psbC</i> 、 <i>psbD</i> 、 <i>psbE</i> 、 <i>psbH</i> 、 <i>psbI</i> 、 <i>psbK</i> 、 <i>psbO</i> 基因与 OEE2 等蛋白质功能
细胞色素 b6 / f 复合体	~14	<i>PetA</i> 、 <i>petB</i> 、 <i>petC</i> 、 <i>petD</i> 、 <i>petE</i> 、 <i>petG</i> 、 <i>ycf5</i> 、 <i>ycf7</i> 、 <i>petO</i> 基因功能及稳定性研究
光系统 I 反应中心	~25	<i>psaA</i> 剪接(顺、反式)与功能, <i>psaB</i> 、 <i>psaC</i> 、 <i>psaF</i> 、 <i>ycf3</i> 、 <i>ycf4</i> 、 <i>crd1</i> 等基因功能
叶黄素循环与光保护	~10	叶黄素循环受阻突变体与高光强耐受性突变体研究
光合磷酸化	~20	<i>atpA</i> 、 <i>atpB</i> 、 <i>atpC</i> 、 <i>atpE</i> 、 <i>atpI</i> 、 <i>atpH</i> 等基因的功能与表达鉴定研究
CO ₂ 吸收	~7	CAH3 基因及 <i>ycf10</i> 基因对 CO ₂ 吸收作用
碳固定	~2	<i>rbcL</i> 基因的功能
叶绿素合成	~4	叶绿体基因组 <i>chlB</i> 、 <i>chlL</i> 、 <i>chlN</i> 基因功能及复合体组装
叶绿体蛋白质合成转运	~7	16S、23S 叶绿体 rRNA 加工和 LHC 复合体组装

2.7 眼点(eyespot, stigma)与趋光性

眼点位于细胞中部,其类胡萝卜素含量较高,在光镜下显橙色。现在对其中的物质分离鉴定表明其中含有视紫物质(rhodopsin)同源物。缺少眼点的突变体趋光性明显下降,但因体内还有光受体存在,还有一定的光感。对眼点组装缺陷突变体进行分析,可以把此种功能缺陷划分为 6 种互补型;另外,信号传导型失败引起的趋光性缺陷突变体也得到了分离^[17],莱哈衣藻的趋光性,分为几个阶段,通过眼点等的感光,再通过信号传导,由一个钙依赖型的“全”或“无”电子开关,导致鞭毛膜去极化作用,尔后,鞭毛转动,产生推力与运动。这中间,光受体作用、信号传导途径、鞭毛的运动等一系列途径,都可以通过相应的突变体或多个突变体之间

的对比研究,对复杂的过程,给出了合理的机制。

3 分子遗传学研究工具^[4]

转化体系:现已建立了对莱哈衣藻核^[18]、叶绿体、线粒体的转化系统,转化的方法在细胞器与核转化方面都是相同的,可以是电转化法、基因枪法、玻璃珠法等。但叶绿体、线粒体转化的外源 DNA 整合是通过同源置换进行的,这一点对基因功能鉴定研究相当有意义。研究叶绿体与线粒体的转化的初衷,是通过同源置换使其替代野生型,来研究基因的功能以及作为生物反应器导入外源基因,已取得了很好的结果。在体外对多个光合作用复合体等组分和特定的线粒体基因分别进行定点诱变,后导入细胞,同源置换其野生

型基因,鉴定了多个基因座的功能。对核的外源基因转化研究则依据序列同源重组进行转化。为了提高转化效率,可选用无壁的突变体进行研究,这相当于对植物原生质体进行转化和培养,很容易在实验室实现。除了通常所用的抗生素抗性筛选标记外,有些标记则是赋予野生型细胞抑制抗性达到筛选的目的,如:CRY1 标记是从莱哈衣藻抗吐根碱(emetine)突变体中分离得到的内源基因,用这种从突变体中分离得到的对特定的化学物质有抗性的基因,也可以作为其核转化的筛选标记^[19]。从转化方法上来说,玻璃珠法往往比基因枪法获得的拷贝数少,研究功能时,有时需要考虑其拷贝数,以鉴定基因的功能。而且,衣藻核基因组转化后,会引起其基因组 10~20kb 范围缺失或无义突变。这是其核转化的一个缺点,但同时也可以作为非必要基因(nonessential gene)功能鉴定研究的工具。对于莱哈衣藻转化,有时外源基因不能获得可观的表达量,这方面的机制也已有相当的研究。目前认为这个机制主要是与转录后水平的沉默(posttranscriptional gene silencing)、密码子的偏倚性(codon bias)、以及不完全的启动子、增强子与其他调控序列有关。

插入突变(insertional mutagenesis):通常选用含相应的野生型基因的硝酸还原酶或精氨酸琥珀酸裂解酶缺陷型的突变体作为研究材料,然后以硝酸根为唯一氮源(NIT1)或在淡薄培养基(ARG7)来筛选转化子,研究插入后的表型,以确定其功能。

3.1 转座子标签法(transposon tagging)

转座子标签法也是莱哈衣藻克隆基因的一种策略,其中所用的筛选标记也是用硝酸还原酶或精氨酸琥珀酸裂解酶缺陷型标记。

3.2 其他

在莱哈衣藻分子研究中,芳基硫酸酯酶(arylsulfatase)基因,可以在培养基硫饥饿时诱导表达可作为启动子功能研究的报道基因,进行酶学检测法也方便易行。基于此,Haring 与 Beck 等人,已建立了启动子捕获(promoter trap)系统,与拟南芥等植物上相应的一系列捕获系统有异曲同工之妙。对于一些在表型上无选择型的基因的研究,现在通过 BAC 库或 cosmid 库大片段直接转化来挽救(rescue)恢复野生表型,以进行功能鉴定研究。但与水稻等植物上相类似的方法比较,衣藻研究因缺乏很好的同源序列来构建转化子,这方面的应用还受到一定的限制。此外,图位法克隆基因,以及图谱的构建已有许多成功的报道。现在的分子图谱中标记数约为 240 个,标记间的平均物理距离是 400~500kb,所有的这些分子标记分布于 17 个连锁群。诸如此类的研究进展,可以从下述的衣藻信息中心获得更全面的信息。

4 信息与种质资源

Chlamy DB(<http://www.biology.duke.edu/chlamy>)是全球最大的衣藻中心,提供衣藻各野生型株系,以及突变体

的收藏、保存并向全球合作者提供,可提供衣藻方面最为全面的信息及其它有关单位的超链接,也是 Duke 大学的衣藻遗传信息中心的网址^[20]。其他几家衣藻中心是英国的 Culture Centre of Algae and Protozoa (CCAP; <http://wiua.nwi.ac.uk/ccap/ccaphome.html>),东京大学应用微生物学研究所、德克萨斯大学藻类收藏中心(University of Texas Algae Collection)、多伦多大学植物学系培养中心(University of Toronto Culture Collection)。

5 国内研究及本室正在开展的工作

国内已有多家研究单位报道了莱哈衣藻实验生物学的研究工作。如,中国农业科学院范国昌等^[21]通过构建的甲型肝炎病毒 VP3P1 区和丙型肝炎病毒 C 区融合抗原基因的衣藻叶绿体转化载体 pACIII,用基因枪法将其导入衣藻叶绿体内,用衣藻叶绿体表达体系表达外源融合基因,得到了正确的转录与翻译。南京农业大学于 2000 年报道了 pH 值对莱哈衣藻胞外碳酸酐酶活性的影响。

张中林等用 PCR 方法从丙型肝炎病毒(HCV)cDNA 文库中克隆了两段 DNA 片段,即 HCV 基因组非结构 NS~₃ 区抗原基因(约 0.7kb)和核心抗原 C 区抗原基因(约 0.6kb)的 cDNA 片段。在两段 cDNA 间加入连接肽 Ser-Pro-Gly-Ser 的密码子序列,构建成融合抗原基因 NS~₃-C。将该融合基因与衣藻叶绿体基因 *atpA* 的启动子和 *rbcL* 基因的 3' 末端连接,得到丙肝病毒融合抗原基因 NS~₃-C 表达盒,再将该表达盒与选择标记基因 *aadA* 表达盒和衣藻叶绿体基因组同源片段连接,构建成衣藻叶绿体转化载体 pSS6。基因枪法转化衣藻叶绿体,经壮观霉素筛选获得转化再生的单藻落,对转基因衣藻的 PCR 和 Southern 杂交分析表明,融合抗原基因 NS~₃-C 已整合到衣藻叶绿体基因组中^[22]。吾甫尔·米吉提等通过将莱茵衣藻回复合成叶绿素 b 能力的 14 种回复突变株和野生型杂交并对其后代进行四分体分析与随机分析,发现导致回复突变的抑制基因 *sub* 位于第一染色体,并根据其连锁程度的不同初步鉴定出 5 个同功能的非等位 *sub* 基因。杂交分析表明 *sub* 基因不具有等位专一性,以及在促使 *cbn I* 基因重新获得合成叶绿素 b 能力的过程中具有单一基因决定性状的特点,不同的 *sub* 基因具有其独立的表型效应。*sub/Sub* 杂合二倍体的表型分析证明 *sub* 基因是显性突变基因。多个非等位 *sub* 基因的存在及其上述特点,都显示出叶绿素 b 的生物合成,可能存在多种途径或多种调控方式^[23]。

作者所在的中科院离子束生物工程学重点实验室(编号:249101030)正在建立莱哈衣藻实验生物学体系,开展低能离子束突变体筛选、衣藻细胞凋亡以及低能离子束引起的核基因组与叶绿体基因组 DNA 损伤与修复机制的研究。目前,在低能离子束引起的衣藻细胞凋亡及诱发电离辐射敏感与耐受性的突变体方面已取得了较好的结果,正在进行深

入的研究,初步有关结果正在整理,该研究得到国家自然科学基金重大项目(No. 19890300)资助。

参 考 文 献 (References):

- [1] Harris E H. The *Chlamydomonas* sourcebook[H]. San Diego: Academic, 1989, 780.
- [2] Urban, Fischer Verlag. Meeting Report: 9th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* [J]. Protist, 2000, 151: 193~199.
- [3] Baymann F, Zito F, Kuras R, et al. Functional characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in cytochrome f maturation[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 22957~22967.
- [4] Elizabeth H Harris. *Chlamydomonas* as a model organism[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2001, 52: 363~406.
- [5] Munnik T, Van Himbergen J A J, et al. Detailed analysis of the turnover of polyphosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipases C and D in *Chlamydomonas* cells treated with non-permeabilizing concentrations of masoparan [J]. Planta, 1998, 207: 133~145.
- [6] Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, et al. A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*; Generation of 3343 non-redundant expressed sequence tags[J]. DNA Res, 1999, 6: 369~373.
- [7] Voigt J, Hinklemann B, Harris E H. Production of cell wall polypeptides by different cell wall mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Microbiol Res, 1997, 152: 189~198.
- [8] Duby F, Matagne R F. Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *cob*, *nda4*, and the 3' end of *nda5* [J]. Plant Cell, 1999, 11: 115~125.
- [9] Hails T, Jobling M, Day A. Large arrays of tandemly repeated DNA sequences in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Chromosoma, 1993, 102: 500~507.
- [10] Prieto R, Pardo J M, Niu X M, et al. Salt-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* isolated after insertional tagging[J]. Plant Physiol, 1996, 112: 99~104.
- [11] Kozminski K G, Johnson K A, Forscher P, Rodenbaum J L. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 5519~5523.
- [12] Cole D G. Kinesin—II, coming and going[J]. J Cell Biol, 1999, 147: 463~466.
- [13] Asleson C M, Lefebvre P A. Genetics analysis of flagellar length control in *Chlamydomonas reinhardtii*: a new long flagella locus and extragenic suppressor mutations[J]. Genetics, 1998, 148: 693~702.
- [14] Finst R J, Kim P J, Griffis E R, Quarmby L M. Falp is a 171kDa protein essential for axonemal microtubule severing in *Chlamydomonas* [J]. J Cell Sci, 2000, 113: 1963~1971.
- [15] Boudreau E, Takahashi Y, Lemieux C, et al. The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex[J]. EMBO J, 1997, 16: 6095~104.
- [16] Cahoon A B, Timki M P. yellow—in—the—dark mutants of *Chlamydomonas* lack the CHLL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase [J]. Plant Cell, 2000, 12: 559~568.
- [17] Matsuda A, Yoshimura K, et al. Isolation and characterization of novel *Chlamydomonas* mutants that display phototaxis but not photophobic response [J]. Cell Motil Cytoskel, 1998, 41: 353~362.
- [18] Kindle K L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Methods Enzymol, 1998, 297: 27~38.
- [19] Funke R P, Kovar J L, Logsdon J M, et al. Nucleus-encoded, plastid-targeted acetolactate synthase genes in two closely related chlorophytes, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Volvox carteri*: phylogenetic origins and recent insertion of introns [J]. Mol Gen Genet, 1999, 262: 12~21.
- [20] 王金发, 陈中健, 杨琳, 等译. TIG 遗传命名指南 (Trends in Genetics Genetics Nomenclature Guide) [M]. 北京: 科学出版社, 2000, 27~30.
- [21] 范国昌, 苏宁, 张中林, 吴祥甫, 沈桂芳. 衣藻叶绿体表达体系的建立 [J]. 科学通报, 1999, 44: 1301~1306.
- [22] ZHANG Zhong-lin, SHAN Song, CHEN Xi, SU Ning, WU Xiang-fu, QIAN Kai-xian, SHEN Gui-fang. NS3—C Chimeric Antigen Gene of HEpatitis C Virus was Introduced Sitespecifically into Chloroplast Genome of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. HEREDITAS (Beijing), 1999, 21(6): 1~6.
张中林, 山松, 陈曦, 苏宁, 吴祥甫, 钱凯先, 沈桂芳. 丙肝病毒融合抗原基因 NS~3—C 定点整合入衣藻叶绿体基因组的研究 [J]. 遗传, 1999, 21(6): 1~6.
- [23] G Mijit, E Rahman, K V Nikulina, Z Boladhan, A S Chunev, W Rudiger. Genetic Characterization of sub Λ *cbnI* Genes of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(8): 734~741.
吾甫尔·米吉提, 艾尔肯·热合曼, K V Nikulina, Z Boladhan, A S Chunaev, W Rudiger. 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) sub *cbn I* 基因的遗传学性质分析 [J]. 遗传学报, 2000, 27(8): 734~741.