

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00865

利用抑制差减杂交技术分离三角褐指藻在缺氮条件下上调表达的基因

唐建新^{1,2}, 陈卓^{1,2}, 胡晗华¹

1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 为了阐明硅藻利用氮源的分子机制, 以三角褐指藻为材料, 利用抑制差减杂交技术, 分离鉴定了16个在缺氮诱导条件下上调表达的基因片段。其中, 与已知功能基因具有较高相似性的有7种, 都是跟氮源的吸收利用相关的。Northern blotting 验证其中5个基因, 包括硝酸盐转运蛋白基因、铁氧化还原蛋白亚硝酸还原酶基因、铵盐转运蛋白基因、结合ATP盒的转运蛋白基因和嘌呤透过酶基因, 在缺氮诱导条件下转录水平有明显上调。

关键词: 三角褐指藻; 抑制性差减杂交; 缺氮

Separation of the up-regulated genes under nitrogen starvation from *Phaeodactylum tricornutum* by suppression subtractive hybridization technology

TANG Jian-Xin^{1,2}, CHEN Zhuo^{1,2}, HU Han-Hua¹

1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Sixteen cDNA fragments of *Phaeodactylum tricornutum* were isolated and identified to be up-regulated under nitrogen starvation by suppression subtractive hybridization (SSH) technology in order to elucidate the molecular mechanism of the diatom nitrogen utilization. Seven of them have high similarity with the functional genes related to the utilization of nitrogen. Northern blotting analysis indicated that 5 genes, nitrate transporter gene (*nrt*), nitrite reductase gene (*nir*), ammonium transporter gene (*amt*), ATP-binding cassette transporter gene (*abc*), and purine permease gene (*pup*), were significantly up-regulated under nitrogen starvation.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*; suppression subtractive hybridization; nitrogen starvation

氮源是控制海洋浮游植物生长的一个重要因素^[1]。氮源的利用包括氮源的吸收、储存、还原和氨基酸的合成等过程。其中, 氮源的吸收可由特异的氮源转运相关的蛋白来完成。作为海洋中重要的

初级生产力^[2], 硅藻具有一系列高亲和力的与氮源转运相关的蛋白^[3, 4], 可以有效的利用多种形式的氮源^[3, 5]。液泡占据硅藻细胞体积的40%, 可储存氮源^[6]。真核微藻硝酸盐的还原经历了以下过程: 首先,

收稿日期: 2009-02-13; 修回日期: 2009-05-25

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(编号: KSCX2-YW-G-060)资助

作者简介: 唐建新(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 藻类分子遗传学。E-mail: tangjianxin104@126.com

通讯作者: 胡晗华(1971-), 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 藻类学。Tel: 027-68780527; E-mail: hanhuahu@ihb.ac.cn

由硝酸还原酶将 NO_3^- 还原为 NO_2^- , NO_2^- 经亚硝酸盐转运蛋白转入质体中^[7], 再由亚硝酸还原酶还原为 NH_4^+ 后进入氨基酸的合成代谢。

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)是羽纹硅藻(Pennate)的一种, 其细胞壁硅质化程度不高, 可以在缺硅的环境中生长^[8]。它作为硅藻生物学研究的一个模式种, 具有生长世代短、易遗传转化等优点^[9, 10]。另外, 三角褐指藻全基因组测序已经完成^[11], 同时, 网上还有 EST 数据库(<http://www.biologie.ens.fr/diatomics/EST3/>)^[12], 更方便对三角褐指藻细胞内信号转导、形态转变的基因调控和进化等方面进行研究。

目前, 硅藻对氮源吸收利用的研究多侧重在生理生化方面, 而在分子机制方面的研究较少。本研究借助抑制差减杂交技术分离三角褐指藻在缺氮诱导条件下上调表达的基因, 以便于进一步阐明硅藻利用氮源的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料与培养

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)来源于中国科学院海洋研究所。将少量对数生长期的藻细胞接入盛 1 L f/2 液体培养基^[13] 的 2 L 的三角瓶中, 通入过滤空气, 置于温度为 22 °C、光强为 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、连续光照的植物培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 缺氮处理

藻生长至 $OD_{750 \text{ nm}}$ 约为 0.3 时, 离心收集藻细胞(2 000 g, 8 min)。用人工海水洗涤 4 次, 再用少量人工海水将细胞重悬。随后, 将悬浮细胞液分成两份, 一份置于正常培养基中, 即正常组; 另一份用缺少硝酸盐的培养基培养, 即缺氮组, 缺氮处理时间为 36 h。

1.2.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

用 Trizol RNA 提取试剂盒(Invitrogen)提取正常组和缺氮组三角褐指藻的总 RNA; mRNA 的纯化方法按照 PolyA Tract mRNA Isolation System(Promega)操作手册进行。

1.2.3 抑制差减杂交

依据 Clontech PCR-Select™ cDNA Subtractive Kit(Clontech)说明书所述实验步骤进行操作。先将纯化的 mRNA 反转录成双链 cDNA, 然后, 以缺氮组三角褐指藻的 cDNA 作为检测组(Tester), 以正常组 cDNA 作为驱动组(Driver)做抑制差减杂交。选用管家基因 $\beta\text{-tubulin}$ 为内标基因检测差减效率, 并根据 GenBank 中 AY729821.1 的序列, 设计特异引物: F: 5'-GAGGTAAGACCCTTTGGTGTG-3'; R: 5'-TCTCCTGCGATACCGTGCTC-3'。理论上所设计的引物应扩增出长度为 390 bp 的片段。

1.2.4 差减 cDNA 文库的构建

将抑制差减杂交第二次 PCR 的扩增产物直接连接到 pMD18-T 载体, 然后化学转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。从文库中随机挑取 400 个克隆在 LB 平板上(内含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp)划线, 4 °C 保存。用菌落 PCR 的方法筛选阳性克隆, 检测文库的插入率及插入片段的大小。

1.2.5 点杂交筛选阳性克隆

首先, 制备差减 cDNA 文库探针和对照文库探针: 将差减 cDNA 片段及未差减 cDNA 片段的第二轮 PCR 产物用 *Rsa*I 完全酶切后纯化; 然后按照 Roche 公司 DIG High Prime Labeling & Detection Starter Kit 说明书制备点杂交时所需要的探针。

其次, 点杂交筛选阳性克隆: (1)取 3 μL 阳性克隆 PCR 产物, 与 3 μL 新鲜配制的 0.6 mol/L NaOH 混匀变性, 在两张尼龙膜上相同的位置各点 1 μL 混合液; (2)两张膜全部点完后, 在 0.5 mol/L Tris(pH 7.5)润湿的滤纸上放置 5 min, 然后在双蒸水润湿的滤纸上放置 5 min, 自然晾干; (3)紫外线照射固定 5 min; (4)杂交、显色实验步骤依据 Roche 公司 DIG High Prime Labeling & Detection Starter Kit 说明书进行; (5)最后比较两张膜, 据两者对应位置显色的差异, 选取杂交信号仅在用差减 cDNA 文库探针杂交时出现、或信号强度明显高于用对照 cDNA 文库探针的为阳性克隆; (6)再做第二轮点杂交验证, 以剔除假阳性, 方法同上。

1.2.6 序列相似性比对分析

经两轮点杂交筛选出的阳性克隆由北京奥科公

司测序, 所获得的序列在三角褐指藻全基因组序列网站上(<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>)进行查找, 并在 GenBank 中进行比对。

1.2.7 Northern blotting 分析

取正常和缺氮培养条件下三角褐指藻的总 RNA 各 20 μ g 做 Northern 杂交, 选取 18S rRNA 为内参。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳、转膜实验方案参照《Molecular Cloning》^[14], 杂交实验步骤依据 Roche 公司 DIG High Prime Labeling & Detection Starter Kit 说明书进行。

2 结果与分析

2.1 差减 cDNA 文库差减效率的检测

以三角褐指藻的管家基因 β -tubulin 为内标, 比较该基因在经过差减和未经差减杂交的 cDNA 中丰度的相差倍数, 借此估计差减杂交效率。经电泳检测发现, 以没有经过差减的 cDNA 为模板, PCR 扩增 30 个循环后, 即可扩增出 β -tubulin 的目的条带, 35 个循环后可扩增较亮的目的条带; 而在以经过差减的 cDNA 为模板的扩增体系中, 直到 35 个循环后, 仍看不到目的条带(图 1)。因此, 差减杂交使在驱动组和检测组中转录本丰度相同的基因得到有效的抑制。

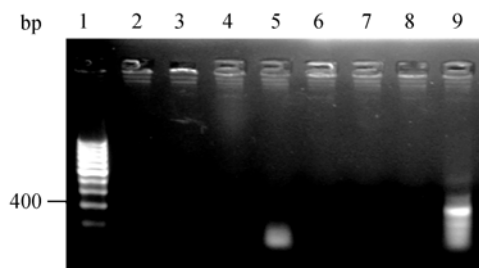


图 1 以 β -tubulin 为内标 PCR 检测文库的差减效率
1: 200 bp marker; 2~5: 以差减的 cDNA 为模板 PCR 扩增结果; 6~9: 以未经差减的 cDNA 为模板 PCR 扩增结果。2 和 6 为 20 个循环; 3 和 7 为 25 个循环; 4 和 8 为 30 个循环; 5 和 9 为 35 个循环。

2.2 差减 cDNA 克隆的筛选

以 Nested Primer1 和 Nested Primer2R 为引物, PCR 扩增文库插入片段。弃去阴性及 PCR 产物为多条带的克隆, 选取 PCR 产物为单一条带的克隆作进一步的点杂交筛选。经两轮点杂交筛选, 选取在两

张膜上杂交信号存在明显差异的克隆, 共得到阳性克隆 39 个(图 2)。

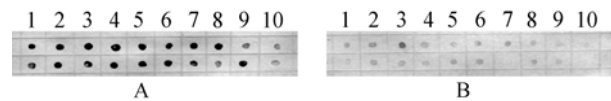


图 2 文库的第二轮点杂交筛选的部分结果
A、B 两张膜上相同位置上点同一单克隆的 PCR 产物。A 膜用文库差减的 cDNA 探针做杂交, B 膜用未经差减的 cDNA 探针做杂交。

2.3 阳性克隆 cDNA 片段测序及序列分析

对 39 个阳性克隆进行测序, 所获得的序列进行序列查找和相似性比对, 最后对 16 个阳性克隆序列进行归类分析(表 1)。其中, 与已知功能基因具有较高相似性的差异表达克隆共有 7 种, 分别是: 硝酸盐转运蛋白基因、硝酸还原酶基因、亚硝酸还原酶基因、铵盐转运蛋白基因、结合 ATP 盒的转运蛋白基因、嘌呤透过酶基因和谷氨酸脱氢酶基因。

2.4 差异表达基因的 Northern blotting 检测

用 18S rRNA 作为内标, 选取与已知功能基因具有较高相似性的 7 种基因片段进行 Northern 杂交。结果显示: 硝酸盐转运蛋白基因(*nrt*)、亚硝酸还原酶基因(*nir*)、铵盐转运蛋白基因(*amt*)、结合 ATP 盒的转运蛋白基因(*abc*)和嘌呤透过酶基因(*pup*)在缺氮诱导条件下的转录水平明显上调(图 3), 其转录本大小与网上预测的 cDNA 全长大小均一致。

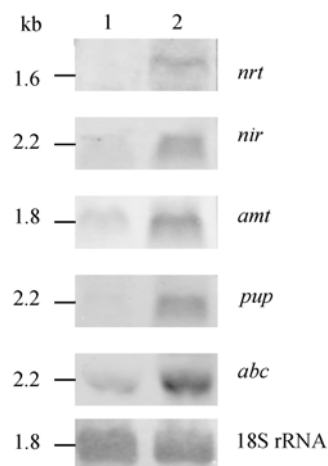


图 3 Northern blotting 验证差异表达的基因
1: 正常组; 2: 缺氮组。nrt: 硝酸盐转运蛋白基因; nir: 亚硝酸还原酶基因; amt: 铵盐转运蛋白基因; pup: 嘌呤透过酶基因; abc: 结合 ATP 盒的转运蛋白基因; 18S rRNA: 18S rRNA 基因。

表 1 三角褐指藻缺氮诱导表达的基因及在 GenBank 中相似性比较的结果

克隆	片段大小 (bp)	GenBank 序列号	相似基因的物种	相似基因片段编码的蛋白	相似基因在 GenBank 序列号	相似性 (aa/aa)	E 值
F28	330	GO787083	-	未知功能	-	-	-
F42	245	GO787084	-	未知功能	-	-	-
F141	261	GO787085	-	未知功能	-	-	-
F161	269	GO787086	-	未知功能	-	-	-
F163	213	GO787087	-	未知功能	-	-	-
F252	112	GO787088	-	未知功能	-	-	-
F294	137	GO787089	-	未知功能	-	-	-
F357	162	GO787090	-	未知功能	-	-	-
F43	315	GO787091	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	硝酸还原酶	AY579336.1	104/104 (100%)	3e-55
F46	273	GO787092	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	硝酸盐转运蛋白	AAD49571.1	63/88 (71%)	2e-21
F47	495	GO787093	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	NADPH 亚硝酸还原酶	EED95108.1	120/164 (73%)	2e-66
F132	283	GO787094	<i>Ostreococcus tauri</i>	结合 ATP 盒的转运蛋白	CAL55318.1	41/94 (43%)	2e-16
F151	702	GO787095	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	铁氧化还原蛋白亚硝酸还原酶	EED92802.1	132/170 (77%)	2e-65
F221	326	GO787096	<i>P. tricornutum</i>	嘌呤透过酶	EEC43913.1	82/85(96%)	9e-42
F281	199	GO787097	<i>C. fusiformis</i>	铵盐转运蛋白	AAV70490.1	49/65 (75%)	4e-15
F339	297	GO787098	<i>T. pseudonana</i>	NADP 特异的谷氨酸脱氢酶	EED86525.1	50/98 (51%)	3e-23

3 讨论

通常情况下, 转运蛋白基因除了可以被其转运的底物在短期内诱导上调表达, 还可以在缺少底物时高表达^[15-18]。本实验得到的转运蛋白基因在缺少氮源时高表达, 与前人研究的结果一致。通过构建差减文库, 本实验获得了一些三角褐指藻在缺氮诱导条件下上调表达的 cDNA 片段, 根据功能的不同划分为六类:

(1) 硝酸盐转运蛋白基因(*nrt*)

硝酸盐转运蛋白负责将外源的 NO₃⁻转移至细胞内。*nrt* 与纺锤细筒藻(*Cylindrotheca fusiformis*)的硝酸盐转运蛋白基因 *NAT1* 同源, 其编码产物属于硝酸盐及亚硝酸盐转运蛋白家族^[19], 可能属于诱导型高亲和吸收系统^[20]。研究表明: *nrt* 表达受氮源调控, 如受 NO₃⁻短期内诱导^[21], 被 NH₄⁺抑制^[22]。此外, 细胞周期和光照等因素也会影响到其表达^[21, 23-25]。通过 RNA 酶保护实验来测定在不同氮源培养基中纺锤细筒藻 *NAT1* 转录本的丰度, 发现 *NAT1* 在 NO₃⁻培养基中转录本的丰度最高, 其次是在缺氮培养基中^[21]。本研究发现三角褐指藻 *nrt* 在缺氮培养基中转录水平远高出其在含 NO₃⁻的培养基中, 结果的差异可能是由于缺氮处理的时间长短不同造成的。

(2) 铁氧化还原蛋白亚硝酸还原酶基因(*nir*)

nir 与伪矮海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)的铁氧化还原蛋白亚硝酸还原酶基因 *nir* 同源。铁氧化还原蛋白亚硝酸还原酶负责将 NO₂⁻还原为 NH₄⁺^[26]。研究表明: *nir* 表达受 NO₃⁻诱导^[26], 另外, 胞内氮源、碳源、光和激素等对其表达也有影响^[23-25]。本研究发现三角褐指藻 *nir* 在缺氮诱导时转录水平较在 NO₃⁻培养基中高。

(3) 铵盐转运蛋白基因(*amt*)

amt 与纺锤细筒藻的铵盐转运蛋白基因 *AMT2* 同源。铵盐转运蛋白可以使细胞从环境中吸收 NH₄⁺。由于 NH₄⁺在细胞内不经过还原过程, 即可直接合成谷氨酰胺, 进入氨基酸的合成代谢^[27], 所以, 一般情况下, 当外界存在各种形式的氮源时, 细胞会优先利用 NH₄⁺^[28]。研究表明: *amt* 的表达受 NH₄⁺诱导, 但被谷氨酰胺抑制^[27]; *amt* 的表达还受到光周期的调节^[29, 30]。另外, *amt* mRNA 周转较快^[28], 这也是其表达调控的一种机制。RNA 酶保护实验及定量 PCR 测定在不同氮源培养基中纺锤细筒藻 *AMT2* 转录本的丰度, 发现它在缺氮培养基中转录水平较在 NO₃⁻培养基中高^[28], 与本实验结果一致。

(4) 结合 ATP 盒的转运蛋白基因(*abc*)

abc 与 *Ostreococcus tauri* 的结合 ATP 盒的转运

蛋白基因 *abc* 同源。ABC 转运蛋白是生物体内最大的高度保守的蛋白家族之一。此类蛋白最大特点是序列上含有 ATP 盒, 它通过与 ATP 的结合和解离来调节物质的跨膜运输。真核生物大部分 ABC 转运蛋白位于质膜上, 负责细胞内物质的外排; 少部分位于细胞器膜上, 调控外源物质的进入, 可以转运一系列底物^[31]。有报道人的 *hABCG1* 受胆固醇、羟化胆固醇和视黄酸共同诱导^[32]。本实验分离得到的 ABC 转运蛋白可能与氮源或胆固醇的转运相关。

(5) 嘌呤透过酶基因(*pup*)

嘌呤透过酶是一类高亲和力的转运蛋白, 转运核酸碱基及其衍生物^[33]。*pup* 片段的分离表明: 硅藻除了可以利用无机氮源, 还可以利用有机氮源^[3]。

(6) 未知功能基因

未知功能基因可能与氮源的感应和同化等有关。

除此之外, 本实验还发现: 在缺氮诱导时, 三角褐指藻谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)上调表达但不明显; 硝酸还原酶基因(*nr*)和 NADPH 亚硝酸还原酶基因(*nir*)Northern 杂交没有获得信号, 推测可能是因为二者转录本较大(*nr* 的转录本为 2.8 kb; 全基因组序列网站上预测 *nir* 的转录本为 3.2 kb), 未能转到膜上; 但相关报道利用 RT-PCR 方法检测到纺锤细筒藻^[34]和伪矮海链藻^[35]的 *nr* 在缺氮环境中转录水平明显上调。

结合 KEGG 网站中氮源的代谢通路^[36]、伪矮海链藻^[3]和三角褐指藻^[11]全基因组序列分析结果, 总结三角褐指藻对氮源的吸收利用如下: 在硝酸盐培养基中, 硝酸盐转运蛋白将 NO_3^- 转运至细胞内, 接着 NO_3^- 在硝酸还原酶的作用下被还原为 NO_2^- , NO_2^- 经亚硝酸盐转运蛋白转入质体中, 再由亚硝酸还原酶还原为 NH_4^+ , 之后合成谷氨酰胺, 进入氨基酸的合成代谢;

当外界环境中存在 NH_4^+ 时, 一般情况下, 细胞会借助铵盐转运蛋白优先利用 NH_4^+ , 由 NH_4^+ 合成谷氨酰胺直接进入到氨基酸的合成代谢中^[28]。另外, 硅藻除了可以利用无机氮源, 包括硝酸盐和铵盐, 还可以利用有机氮源, 如尿素、嘌呤和氨基酸等^[3]。在缺氮条件下, 细胞感知外界环境, 一方面, *nrt*、*nir*、*pup*、*amt* 和 *abc* 等与氮源转运相关的基因表达上调; 另一方面, 液泡内存储的氮源^[6](以 NO_3^- 为主)释放, 以便于短期内维持细胞的生命活动。

本实验中并没有差减得到三角褐指藻在缺氮时下调表达的基因, 推测可能是由于分离得到的 mRNA

的量偏低或者是下调的基因表达丰度不高造成的。另外, 有报道显示, 硅藻在氮限制培养条件下会积累油脂^[37], 本实验中也观测到这一现象, 但并没有筛选到与积累油脂相关的上调表达的基因, 可能是积累油脂相关的基因转录本丰度较低, 未能筛选到此类基因, 或者积累油脂相关的基因并没有上调表达。

本研究中筛选出了 5 个三角褐指藻在缺氮诱导条件下上调表达的基因, 为进一步阐明硅藻利用氮源的分子机制提供便利。另外, 在实践应用方面, 克隆它们的侧翼区构建诱导型表达载体来转化三角褐指藻, 通过施加不同的氮源, 可以适时控制目的基因的表达及表达量, 这对于开展基因功能的研究也具有重要意义。

参考文献(References):

- [1] Ryther JH, Dunstan WM. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 1971, 171(3975): 1008–1013.
- [2] Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 1998, 281(5374): 200–206.
- [3] Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kröger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 2004, 306(5693): 79–86.
- [4] Lopez PJ, Descles J, Allen AE, Bowler C. Prospects in diatom research. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(2): 180–186.
- [5] Hu H, Zhang X. Nitrite utilization by *Chaetoceros muelleri* under elevated CO_2 concentration. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(6): 891–894.
- [6] Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJR. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 2004, 305(5682): 354–360.
- [7] Rexach J, Fernández E, Galván A. The *Chlamydomonas reinhardtii nar1* gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *Plant Cell*, 2000, 12(8): 1441–1453.
- [8] Scala S, Bowler C. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(11):

- 1666–1673.
- [9] Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mol Gen Genet*, 1996, 252(5): 572–579.
- [10] Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C. Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. *Mar Biotechnol*, 1999, 1(3): 239–251.
- [11] Bowler C, Allen AE, Badger JH, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 2008, 456(7219): 239–244.
- [12] Maheswari U, Montsant A, Goll J, Krishnasamy S, Rajyashri KR, Patell VM, Bowler C. The diatom EST database. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 344–347.
- [13] Harrison PJ, Waters RE, Taylor FJR. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J Phycol*, 1980, 16(1): 28–35.
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] Walker PS, Donovan JA, Van Ness BG, Fellows RE, Pessin JE. Glucose-dependent regulation of glucose transport activity, protein, and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells. *J Biol Chem*, 1988, 263(30): 15594–15601.
- [16] Hole DJ, Emran AM, Fares Y, Drew MC. Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiol*, 1990, 93(2): 642–647.
- [17] Shimogawara K, Usuda H. Uptake of inorganic phosphate by suspension-cultured tobacco cells: kinetics and regulation by Pi starvation. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36(2): 341–351.
- [18] Hildebrand M, Volcani BE, Gassmann W, Schroeder JI. A gene family of silicon transporters. *Nature*, 1997, 385(6618): 688–689.
- [19] Forde BG. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465(1–2): 219–235.
- [20] Glass ADM, Siddiqi MY. Nitrogen absorption by plant roots. In: Srivastava HS, Singh RP eds. Nitrogen nutrition in higher plants. New Delhi: Associated Publishing Co, 1995: 21–56.
- [21] Hildebrand M, Dahlin K. Nitrate transporter genes from the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae): mRNA levels controlled by nitrogen source and by the cell cycle. *J Phycol*, 2000, 36(4): 702–713.
- [22] Dortch Q. Effects of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three diatoms. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1982, 61(3): 242–264.
- [23] Crawford NM. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 859–868.
- [24] Trueman LJ, Richardson A, Forde BG. Molecular cloning of higher plant homologues of the high affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 1996, 175(1–2): 223–231.
- [25] Quesada A, Krapp A, Trueman LJ, Daniel-Vedele F, Fernández E, Forde BG, Caboche M. PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the crnA family. *Plant Mol Biol*, 1997, 34(2): 265–274.
- [26] Quesada A, Gómez I, Fernández E. Clustering of the nitrite reductase gene and a light-regulated gene with nitrate assimilation loci in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 1998, 206(2): 259–265.
- [27] Syrett PJ. Nitrogen assimilation by eucaryotic algae. In: Ullrich WR, Aparicio PJ, Syrett PJ, Castillo F eds. Inorganic nitrogen metabolism. Springer-Verlag, New York, 1987: 25–31.
- [28] Hildebrand M. Cloning and functional characterization of ammonium transporters from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 2005, 41(1): 105–113.
- [29] Glass ADM, Britto DT, Kaise BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi MY, Unkles SE, Vidmar JJ. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J Exp Bot*, 2002, 53(370): 855–864.
- [30] Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N⁻ and C⁻ status of *Arabidopsis* plants. *Plant J*, 1999, 18(5): 509–519.
- [31] 王利国, 李玲. 拟南芥中 ABC 转运蛋白的研究进展. *生命科学研究*, 2002, 6(1): 13–17.
- [32] Lorkowski S, Rust S, Engel T, Jung E, Tegelkamp K, Galinski EA, Assmann G, Cullen P. Genomic sequence and structure of the human *ABCG1* (*ABC8*) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(1): 121–131.
- [33] Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, Stransky H, Okumoto S, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB. Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J*, 2003, 34(1): 13–26.
- [34] Poulsen N, Kroeger N. A new molecular tool for transgenic diatoms -Control of mRNA and protein biosynthesis by an inducible promoter-terminator cassette. *FEBS J*, 2005, 272(13): 3413–3423.
- [35] Poulsen N, Chesley PM, Kroger N. Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 2006, 42(5): 1059–1065.
- [36] Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 354–357.
- [37] Shifrin NS, Chisholm SW. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol*, 1981, 17(3): 374–384.