

两株蛋白核小球藻 *rbcS* cDNA 全序列的克隆和分析

李春燕, 孙雪, 杨锐

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 以 2 株蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) F-9 和 820 为实验材料, 根据已知绿藻 *rbcS* 基因设计简并引物, 分别克隆到 2 条 245 bp 的 cDNA 片段, 以此片段为基础使用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术, 获得了 2 条长度分别为 861 bp 和 907 bp 的 *rbcS* 基因。序列分析表明, 蛋白核小球藻 F-9 和 820 的 *rbcS* 分别编码 181 和 184 个氨基酸, 编码区具有与高等植物 *rbcS* 保守序列 YYDGRYWTMWKLPFMFG 相类似的结构, 起始密码子附近有 Kozak 保守序列(A/GXXATGG), 3' 非翻译区有加尾信号 TGTA。同源性分析结果表明, F-9 与蛋白核小球藻(GenBank 登录号 BAE48226)的相似性最高(91%), 而 F-9 与 820、F-9 和普通小球藻(*C. vulgaris*)的相似性分别为 64% 和 50%。这 2 条 *rbcS* 基因与其他绿藻和高等植物也表现了广泛的同源性, 但相似性不高。该研究旨在为 *rbcS* 基因的功能和表达研究奠定基础。[中国水产科学, 2010, 17(2): 357-362]

关键词: 蛋白核小球藻; 核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco); *rbcS*; RACE

中图分类号: S97

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)02-0357-06

小球藻(*Chlorella*)是一种重要的经济微藻,属于绿藻门(Chlorophyta)、Trebouxiophyceae 纲、小球藻目(Chlorellales)、小球藻科(Chlorellaceae)^[1]。小球藻具有丰富均衡的营养成分和良好的医疗保健作用,因此在保健品、饵料与饲料、环境检测、生物柴油等方面被广泛应用或有巨大潜力^[2-4]。小球藻光合效率高,在光合作用机理、跨膜转运机理、基因工程研究等方面也是良好的实验材料^[5-6]。

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, EC 4.1.1.39, 简称为 Rubisco)是光合作用中催化碳固定的关键酶。Rubisco 不仅催化卡尔文循环中 CO₂ 的固定,同时也参与植物光呼吸代谢过程,消耗植物光合作用合成的有机物,从而影响植物的净光合速率。该酶在绿色植物、藻类以及光合细菌中都大量存在,是绿色植物中含量最丰富的蛋白质。常见 I 型 Rubisco 酶由 8 个大亚基(Rubisco large subunit, RbcL)和 8

个小亚基(Rubisco small subunit, RbcS)组成。其中 RbcL 主要起催化作用,而 RbcS 主要起调节大亚基活性和影响 Rubisco 酶与 CO₂/O₂ 的特异性结合的作用。*rbcS* 基因是最先克隆、测序和进行表达研究的植物核基因之一^[7]。近年来,*rbcS* 基因的转运肽、启动子活性和分子标记等研究都是科学工作者比较感兴趣的几个方面^[8]。相对于高等植物,绿藻中 *rbcS* 基因的研究要少得多。目前已有 *rbcS* 基因族和基因序列系统报道的单细胞绿藻仅有杜氏藻(*Dunaliella tertiolecta*)、Nannochloris bacillaris 和莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)等几种^[9-11],而同样具有重要经济和研究价值的小球藻中只有 2 条 *rbcS* 的 cDNA 序列,未见全部 *rbcS* 种类的系统报道。

本研究利用数据库中已有绿藻 *rbcS* 序列设计简并引物,扩增得到两株蛋白核小球藻 F-9 和 820 *rbcS* 的部分 cDNA 序列。以这 2 条序列为基础,分别利用 cDNA 末端快速扩增法(rapid amplification

收稿日期: 2009-08-12; 修订日期: 2009-10-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30700610); 浙江省自然科学基金资助项目(Y3080490)。

作者简介: 李春燕(1983-),女,硕士研究生,从事藻类分子生物学研究.E-mail: wenjuan200388@yahoo.com.cn

通讯作者: 孙雪,副研究员,从事藻类生化与分子生物学研究.Tel: 0574-87600170; E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

of cDNA ends, RACE) 成功获得了两株小球藻的 *rbcS* cDNA 全序列。该工作为后续 *rbcS* 基因的结构、功能、表达研究及 Rubisco 酶的修饰和改造工作奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 藻种 蛋白核小球藻 820 来自宁波大学海洋生物工程实验室,原藻种室编号为 NMBLuh015-1,蛋白核小球藻 F-9 购自中国科学院水生生物研究所。蛋白核小球藻 F-9 和 820 分别于 knop 培养基和 MAV3 号培养基中培养,温度为 25 ℃,光照强度

为 2 000 lx,光暗周期为 12 L : 12 D。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司; *Taq* 酶、pMD18-T 载体和 5' RACE 试剂盒购自大连宝生物公司(TaKaRa); 3'-RACE 试剂盒购自 Clontech 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程技术公司。

1.1.3 引物序列 从 GenBank 数据库中搜索莱茵衣藻、杜氏藻、*Nannochloris bacillaris* 等的 *rbcS* 基因序列,根据它们的保守氨基酸和核苷酸序列设计了两条简并引物(RF 和 RR)扩增 *rbcS* 部分序列。5' RACE 和 3' RACE 引物根据试剂盒的使用说明和 Primer Premier 5.0 软件来设计,各引物序列见表 1。

表 1 蛋白核小球藻 F-9 和 820 株 *rbcS* 基因扩增用引物
Tab. 1 Primers used for amplification of *rbcS* cDNAs from *C. pyrenoidosa* F-9 and 820

项目 Item	引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence(5'-3')
简并引物	RF	GTBTGGNVBCCSDTBRACAACAAG
	RR	GTGCADCCRAACATKGGSAGYTT
F-9 5'-RACE 引物	GSP1	GCAGTTCTCGTTGCTGGCGTAGGC
	NGSP1	TTCACGATGTAGTCCACCTGGCGGG
820 5'-RACE 引物	GSP2	ATTGTCCTGGTAGCCAACGGACAC
	NGSP2	TCCAGCCGTTGAGGACGATGTAGTC
F-9 3'-RACE 引物	GSP3	AGCGCCTACGCCAGCAACGAGAACT
820 3'-RACE 引物	GSP4	TCCGTTGGCTACCAGGACAATCGCTAC

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 *rbcS* 基因部分 cDNA 片段的扩增 6 000 r/min 离心 10 min 收集对数生长期藻细胞,再按 Trizol 试剂的使用说明进行总 RNA 的提取。*rbcS* 部分 cDNA 序列的克隆方法见文献^[12]。PCR 产物回收、连接、转化与重组子检测等按常规分子克隆方法进行,阳性重组菌交由上海英骏生物技术公司测序。

1.2.2 *rbcS* 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增 利用已克隆两条藻 *rbcS* 的 cDNA 序列和表 1 中的 RACE 特异性引物,按试剂盒的说明分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增。

1.2.3 *rbcS* 基因全序列的获得和分析 分别将得到的蛋白核小球藻 F-9 和 820 的 *rbcS* cDNA 部分片

段与 RACE 方法得到的上、下游片段进行拼接。再按照拼接序列重新设计上下游引物以验证拼接序列的正确性。用 NCBI/ORF finder 进行开放阅读框(ORF)的预测,用 DNAMAN 软件和在线 Blast 工具进行 *rbcS* 基因的翻译和同源性比对。

2 结果与分析

2.1 *rbcS* 部分 cDNA 片段的获得与分析

提取的两株蛋白核小球藻总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,提取质量较好,28S 和 18S rRNA 条带清晰(图 1),可用于下一步的实验。以该总 RNA 反转录的 cDNA 第一条链为模板,PCR 扩增的部分 cDNA 序列大小约 250 bp (电泳结果见图 2)。测序后分析,两条序列长度均为 245 bp。

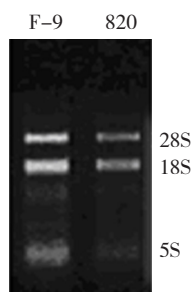
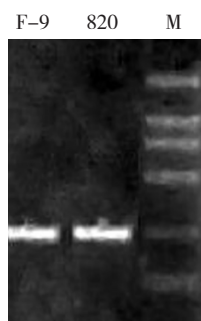


图1 蛋白核小球藻 F-9 和 820 株总 RNA

Fig.1 Total RNAs isolated from *C. pyrenoidosa* strains F-9 and 820图2 蛋白核小球藻 F-9 和 820 株 *rbcS* 部分 cDNA

M; DL2000 Marker

Fig.2 Partial *rbcS* cDNAs amplified from *C. pyrenoidosa*

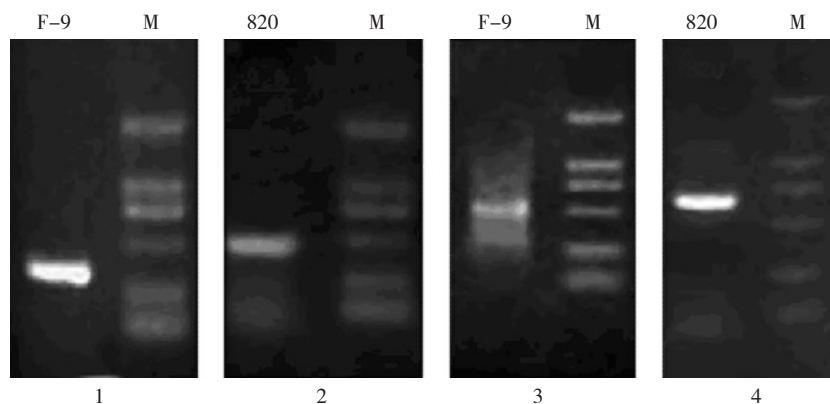
strains F-9 and 820

M; DL2000 Marker

将两条 *rbcS* cDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 blastn 搜索,结果显示: F-9 *rbcS* 核苷酸序列与数据库中 *C. pyrenoidosa* (GenBank 号 AB240146) *rbcS* 基因的相似性最高,为 97% (197/203),与 *Chlamydomonas reinhardtii* (X04471) 为 82% (193/234),与 *D. salina* (AY646428) 为 86% (107/123), *Nannochloris bacillaris* (AB125312) 为 72% (159/219), *C. vulgaris* (AB058647) 为 71% (180/253)。而 820 *rbcS* 的核苷酸序列与上述几种绿藻的相似性依次为 78% (161/205)、81% (201/247)、76% (187/245)、76% (174/227) 和 76% (192/245)。该比对结果表明本实验所得的 2 条序列是 *rbcS* 的 cDNA 序列。

2.2 *rbcS* 的 5'-RACE 和 3'-RACE 结果与分析

根据已得到的两条 *rbcS* cDNA 片段,用 5'-RACE 和 3'-RACE 的方法扩增得到了蛋白核小球藻 F-9 和 820 的 *rbcS* cDNA 5'端和 3'端序列,其大小在 250 ~ 700 bp 之间(图 3)。测序后去掉接头引物后, F-9 和 820 5'-RACE 片段长度分别为 293 bp 和 348 bp, 3'-RACE 片段长度分别为 466 bp 和 518 bp。

图3 蛋白核小球藻 F-9 和 820 株 *rbcS* 的 RACE 扩增结果

M; DL2000 Marker; 1 和 2 分别是 F-9 和 820 5'-RACE; 3 和 4 分别是 F-9 和 820 3'-RACE

Fig. 3 Results of *rbcS* RACE products from *C. pyrenoidosa* strains F-9 and 820

M; DL2000 Marker; 1. F-9 5'-RACE; 2. 820 5'-RACE; 3. F-9 3'-RACE; 4. 820 3'-RACE

分别将两株小球藻部分 *rbcS* 片段和 5'-RACE 与 3'-RACE 片段进行拼接,得到了 *rbcS* 的完整 cDNA 序列。经再次设计引物进行 PCR 扩增和测序验证表明拼接序列是正确的。F-9 *rbcS* 全长为 861 bp

(GenBank 号 GQ355311), 5' 非翻译区长 66 bp, ORF 为 546 bp, 3' 非翻译区长 249 bp。820 *rbcS* 全长为 907 bp (GenBank 号 GQ355312), 其 ORF 为 555 bp, 有 68 bp 的 5' 非翻译区和 284 bp 的 3' 非翻译区。

将 F-9 和 820 *rbcS* 基因 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列进行比对,发现其核苷酸序列的相似性为 74%,而氨基酸序列的相似性为 64%。再将蛋白核小球藻 F-9 和 820 *rbcS* 全序列在 NCBI 数据库中进行 blastx 同源性比对,结果发现两者与已知物种 *rbcS* 具有广泛的同源性,但相似性不是很高。除了 F-9 与 *C. pyrenoidosa* (GenBank 号 BAE48226) 的相似性最高为 91% (113/124) 之外, F-9 与其他物种 *rbcS* 的相似性分别为: *Nannochloris bacillaris* (BAD42333) 62% (100/159), *Chlamydomonas reinhardtii* (CAA28159) 69% (97/140), *C. vulgaris* (BAB39865) 50% (59/117)。而 820 与上述的 *C. pyrenoidosa* 的相似性为 69% (86/124), *Nannochloris bacillaris* 为 61% (113/184), *Chlamydomonas reinhardtii* 为 72% (101/140), *C. vulgaris* 为 58% (60/103)。

2.3 *rbcS* cDNA 全序列的分析

对蛋白核小球藻 F-9 和 820 *rbcS* cDNA 序列进行结构分析,发现其翻译起始位点附近序列分别为: AAAATGG 和 GCAATGG,其中 ATG 为起始位点。该两段序列与真核生物翻译起始位点的保守序列—Kozak 保守序列 (A/GXXATGG) 相符合^[13]。在两条 *rbcS* cDNA 序列的 3' 非翻译区发现长为 5 bp 的加尾信号 TGTA,该加尾信号在盐生杜氏藻 (*D. salina*) *rbcS* 的 3' 非翻译区也有报道^[14]。

高等植物 *rbcS* 序列中通常有一段 16 个氨基酸的高度保守序列,在茶树 (*Camellia sinensis*) 中这段保守序列为 YYDGRYWTMWKLPFG^[15]。分析 F-9 和 820 *rbcS* 推导的氨基酸序列,也找到了这段保守序列,在 F-9 *rbcS* 氨基酸序列的第 108–123 位,为 YYDNRYWTMWKLPFG,与茶树 *rbcS* 的保守序列仅第 4 个氨基酸有差别;在 820 *rbcS* 序列的第 111–126 位也含有该类似的保守序列 (YQDNRYWTMWKLPFG),与茶树中保守氨基酸差别在第 2 和第 4 个氨基酸。F-9 和 820 的两段 16 个氨基酸的保守序列的第 4 个氨基酸相同,均为 N,仅第 2 个氨基酸不同 (图 4)。

RbcS 小亚基由 2 部分组成—转运肽和成熟肽,前者负责将小亚基转运到叶绿体中。分析这 2 条 *rbcS* 的氨基酸序列: F-9 *rbcS* 序列编码 181 个氨基酸,转运肽和成熟肽分别由 41 个和 140 个氨基酸组成;而 820 *rbcS* 由 184 个氨基酸组成,转运肽有 44 个氨基酸,在第 8~10 位比 F-9 多 3 个氨基酸: Ser、Leu 和 Val (图 4),成熟肽也是 140 个氨基酸。该 2 条 *rbcS* 长度与大多数绿藻比较接近,如 *Nannochloris bacillaris* 编码 182 个氨基酸,成熟肽也是 140 个氨基酸^[10];莱茵衣藻 *rbcS* 基因编码 185 个氨基酸,成熟肽也是 140 个^[11]。但与普通小球藻差别较大,普通小球藻编码氨基酸为 214 个,其转运肽与成熟肽的区分界限不明显。



图 4 蛋白核小球藻 F-9 和 820 株 *rbcS* 推导的氨基酸序列比对

阴影部分表示氨基酸相同;“.”表示氨基酸缺失。

Fig. 4 Alignment of *rbcS* deduced amino acid sequences of *C. pyrenoidosa* strains F-9 and 820
Shadow indicated identical amino acid residues; “.” indicated deletion of amino acid residues.

3 讨论

前期实验中,本课题组根据杜氏藻、*Nannochloris bacillaris*、普通小球藻和伞藻等几种单细胞绿藻的核苷酸序列,设计了两条简并引物,从蛋白核小球藻 820 中扩增了 *rbcS* 基因的部分片段^[12]。本研究在该部分序列的基础上通过 5'-RACE 和 3'-RACE 方法获得了 820 株的 cDNA 全编码序列,其开放读框(ORF)长度为 555 bp,比普通蛋白核小球藻的 645 bp 少了近 100 bp。因此我们又扩增了另一株蛋白核小球藻 F-9 的 *rbcS* 序列,其 ORF 长 546 bp,与 820 的 *rbcS* 序列长度接近。分析这两株小球藻与普通小球藻 *rbcS* 长度差别较大的原因可能与 *rbcS* 为多基因家族有关。*rbcS* 在高等植物及绿藻中是由多基因家族编码的,其基因的拷贝数不等,由绿藻中莱茵衣藻的两个拷贝到高等植物小麦中的至少 22 个拷贝^[16]。在已知的几种单细胞绿藻中,大多都有两种不同的 *rbcS* 基因,如杜氏藻和衣藻,而 *Nannochloris bacillaris* 中有 3 条。因而小球藻中至少也有两条 *rbcS* 序列,由于不同的 *rbcS* 序列长度有差别,可能本研究获得的是其中长度偏短的。

RACE 技术是一种常用的扩增已知 cDNA 序列两端未知序列的方法,是一种可以快速地从低丰度的转录本中扩增得到 cDNA 两端未知序列的简单有效的方法。与传统的通过筛选 cDNA 文库来得到 cDNA 全序列的方法相比, RACE 方法具有简单易行、周期短、费用低和特异性高等优点^[17]。虽然 RACE 方法在分离全长基因方面有很大的优势,但在实验过程中仍有一定的难度,主要是因为 RNA 易降解。而 RACE 技术,特别是 5'-RACE 对 RNA 的完整性要求较高。本研究中,我们综合了两种 RACE 试剂盒的方法,仅从两株藻中各得到一条 *rbcS* 基因,其余 *rbcS* 基因的获得比较困难,如在 F-9 中我们仅克隆到第 2 条 *rbcS* 序列的 3' 片段,而 5'-RACE 没有成功。

rbcS 全长 cDNA 序列的获得是进行后续基因的结构、功能、表达及修饰和改造 Rubisco 酶的基础。本研究得到了两株蛋白核小球藻 *rbcS* 的 cDNA 序列,

并将其与数据库中其他藻相应序列进行了分析和比较,丰富了小球藻属中该基因的研究资料。现在杜氏藻、*Nannochloris bacillaris*、莱茵衣藻等绿藻中已有关于 *rbcS* 基因家族的 cDNA 序列和 DNA 序列的系统报道,但小球藻中还缺乏该系统化的研究,希望在本研究的基础上,能够进一步阐明小球藻中全部 *rbcS* 的 cDNA 和 DNA 序列,并进行相关研究如 *rbcS* 启动子的分离及 *rbcS* mRNA 表达变化等方面的工作。

参考文献:

- [1] Huss V A R, Frank C, Hartmann E C, et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensulato* (Chlorophyta) [J]. J Phycol, 1999, 35: 587-598.
- [2] Kittaka-Katsura H, Fujita T, Watanabe F, et al. Purification and characterization of a corrinoid compound from *Chlorella* tablets as an algal health food [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50 (17): 4994-4997.
- [3] Cai X, Liu W, Jin M, et al. Relation of diclofop-methyl toxicity and degradation in algae cultures [J]. Environ Toxicol Chem, 2007, 26 (5): 970-975.
- [4] 张薇,吴虹,宗敏华. 蛋白核小球藻发酵产油脂的研究 [J]. 微生物学通报, 2008, 35 (6): 855-860.
- [5] Belyaeva N E, Schmitt F J, Steffen R, et al. PS II model-based simulations of single turnover flash-induced transients of fluorescence yield monitored within the time domain of 100 ns-10 s on dark-adapted *Chlorella pyrenoidosa* cells [J]. Photosynth Res, 2008, 98: 105-119.
- [6] 王义琴,陈颖,白琴华,等. 以小球藻为载体生产兔防御素的研究 [J]. 高技术通讯, 2001, 11 (9): 1-5.
- [7] Dean C, Pichersky E, Dunsmuir P. Structure, evolution, and regulation of *rbcS* genes in higher plants [A]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1989, 40: 415-439.
- [8] Spreitzer R J. Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase [J]. Archives Biochem Biophys, 2003, 414: 141-149.
- [9] Walker T L, Becker D K, Collet C. Characterisation of the *Dunaliella tertiolecta RbcS* genes and their promoter activity in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 727-735.
- [10] Yamazaki T, Yamamoto M, Sakamoto W, et al. Isolation and molecular characterization of *rbcS* in the unicellular green alga *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) [J].

- Phycolog Res, 2005, 53: 67–76.
- [11] Goldschmidt-Clermont M, Rahire M. Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of *rbcS* in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. J Mol Biol, 1986, 191 (3): 421–432.
- [12] 孙雪, 马斌, 周成旭. 蛋白核小球藻核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶小亚基部分基因序列的克隆与分析 [J]. 海洋科学, 2008, 2 (2): 40–43.
- [13] Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6 [J]. EMBO, 1997, 16 (9): 2482–2492.
- [14] 柴玉荣, 刘国红, 刘红涛, 等. 杜氏盐藻 Rubisco 小亚基基因的克隆和分析 [J]. 生命科学研究, 2008, 12 (1): 29–34.
- [15] Ye A H, Jiang C J, Zhu L, et al. Cloning and sequencing of a full-length cDNA encoding the RuBPCase small subunit (RbcS) in tea (*Camellia sinensis*) [J]. Agr Sci Chin, 2009, 8 (2): 161–166.
- [16] Sasanuma T. Characterization of the *rbcS* multigene family in wheat: subfamily classification, determination of chromosomal location and evolutionary analysis [J]. Mol Genet Genom, 2001, 265 (1): 161–171.
- [17] 郑阳霞, 李焕秀, 严泽升. RACE 技术及其在植物基因研究中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (7): 2674–2676.

Cloning and analysis of *rbcS* full-length cDNA sequences from two strains of *Chlorella pyrenoidosa*

LI Chunyan, SUN Xue, YANG Rui

(College of Life Science and Bioengineering, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Minister of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is one of the key enzymes catalyzing the CO₂ fixation in the Calvin cycle. RbcS, the small subunit of Rubisco, plays a role in regulating the Rubisco activity. In this study, two *rbcS* genes of unicellular green algae *Chlorella pyrenoidosa* strains F-9 and 820 were cloned and analyzed, respectively. Two cDNA sequences of 245 bp were obtained according to a pair of degenerate primers, and then two full-length *rbcS* cDNA sequences were cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology. The full-length *rbcS* cDNA of *C. pyrenoidosa* F-9 was 861 bp including 66 bp 5′-untranslated region, 249 bp 3′-untranslated region and 546 bp open reading frame (ORF). The 907 bp full-length *rbcS* sequence of *C. pyrenoidosa* 820 was consisted of 68 bp 5′-untranslated region, 284 bp 3′-untranslated region and 555 bp ORF. The F-9 ORF contained 41 deduced amino acids transit peptide and 140 amino acids mature peptide. The transit peptide of 820 ORF 44 amino acids, and the mature peptide was the same length as that of F-9. Structural analysis revealed one Kozak consensus sequence (A/GXXATGG) around the start codon ATG, and a 5 bp TGTAA tailing signal in the 3′-untranslated region. The similar conserved sequence of YYDGRYWTMWKLPFMFG in higher plants were also found in the two *rbcS* cDNAs with one or two amino acids differences in the second and fourth position, respectively. Similarity analysis showed that the highest identity (91%) was between F-9 and *C. pyrenoidosa* (GenBank accession No. BAE48226), and F-9 showed 64% identity with 820, and 50% identity with *C. vulgaris*. The two *rbcS* genes shared wide and moderate similarities with other green algae and high plants. This study provided materials for further research on the function and expression of *rbcS* genes. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (2): 357–362]

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco); *rbcS* gene; RACE

Corresponding author: SUN Xue. E-mail: sunxue@nbu.edu.cn