

技术与方法 Techniques and Methods

一种高效提取普通小球藻叶绿体DNA的新方法

许夏冰^{1,2}, 谭德冠², 孙雪飘², 弓淑芬², 张家明^{2,*}¹海南大学农学院, 海口570228; ²中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南省热带生物质能源工程技术研究中心, 海口571101

摘要: 本文采用尿素-月桂酰肌氨酸钠(urea-sarkosyl)法, 用于分离带有坚硬细胞壁小球藻的高纯度叶绿体DNA (cpDNA)。将对数生长期的小球藻收集后置于冰上研磨, percoll密度梯度离心收集叶绿体层, 显微观察表明叶绿体经梯度离心后形态完整。采用尿素-月桂酰肌氨酸钠法、蛋白酶K消化及酚/氯仿/异戊醇抽提, 获得了高纯度的cpDNA。检测结果显示, cpDNA分子长度为22 kb, $A_{260}:A_{280}$ 值为 1.87 ± 0.01 , 产率达 $(2.52\pm 0.01) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW); cpDNA编码的16S rDNA扩增呈阳性, 而由细胞核编码的18S rDNA扩增呈阴性。表明cpDNA纯度高, 没有受到核基因组DNA的污染, 符合小球藻cpDNA高通量测序的要求。同时, 该方法也适合提取具有相似细胞壁成分的其他微藻的基因组DNA和cpDNA。

关键词: 普通小球藻; 叶绿体DNA; 尿素; 月桂酰肌氨酸钠; percoll分离液

A New Method for Efficient Extraction of *Chlorella vulgaris* Chloroplast DNAXU Xia-Bing^{1,2}, TAN De-Guan², SUN Xue-Piao², GONG Shu-Fen², ZHANG Jia-Ming^{2,*}¹College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; ²Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tropical Crops Biology and Genetic Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Hainan Provincial Tropical Bioenergy Engineering Research Center, Haikou 571101, China

Abstract: The purpose of this study was to establish a method for isolation of high quality chloroplast DNA (cpDNA) from a green microalgae *Chlorella vulgaris* with rigid cell wall. *C. vulgaris* cells at logarithmic phase were collected and ground on the ice. Intact chloroplasts were isolated from the abrasives by using percoll density gradient centrifugation, and were verified by microscope observation. High quality cpDNA was then isolated from the chloroplasts with urea-sarkosyl method, digested with protease K and purified by phenol/chloroform/isoamylol extraction. The purified cpDNA had a molecular length of 22 kb, an $A_{260}:A_{280}$ value of 1.87 ± 0.01 , and a yield of $2.52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW). The nuclear-encoded 18S rDNA could not be amplified from the purified cpDNA, while the chloroplast-encoded 16S rDNA was amplified, indicating that the cpDNA was not contaminated by nuclear DNA. These results showed that the cpDNA isolated by urea-sarkosyl method meets the requirements of high-throughput sequencing. This method may also be used to isolate total DNA and cpDNA from other microalgae with similar cell wall components.

Key words: *Chlorella vulgaris*; cpDNA; urea; sarkosyl; percoll separation medium

叶绿体是绿色植物细胞中能进行光合作用的一类质体, 其形态呈扁球状, 可通过光合作用将光能转变成化学能, 是植物的“养料制造车间”和“能量转换站”。目前, 叶绿体DNA (cpDNA)的研究已涉及细胞质遗传、植物雄性不育、植物系统发育、遗传多样性和亲缘关系等方面(王彦涵等2003; 张茜等2005), 但对于叶绿体基因组学的研究却相对较少, 鉴于叶绿体及其cpDNA的特殊功能, 因而对叶绿体的基因组测序显得尤为重要。

多数叶绿体基因组大小在120~160 kb之间(赵

卫国等2001), 其DNA分子都是以共价、闭合、环状和双链形式存在。藻类植物的cpDNA结构复杂且相对保守, 普遍缺失反向重复序列IR, 即使存在IR的藻种, cpDNA也有IR变短退化迹象。藻类植物的cpDNA包含的基因一般比高等植物要多, 编

收稿 2014-01-07 修定 2014-04-09

资助 海南省重点实验室和工程技术研究中心建设专项(gczx-2013001)和海南省自然科学基金项目(310068)。

* 通讯作者(E-mail: zhangjiaming@itbb.org.cn; Tel: 0898-66984866)。

码能力更强。cpDNA序列的测定不仅对功能基因组学和叶绿体起源问题的研究意义重大,在藻类物种演化和系统发育研究中也起到极其重要的作用(吉莉等2005)。目前,对于微型绿藻cpDNA的研究报道较少(Walker等2005),主要原因是实验过程中难以分离到较多的完整叶绿体(欧立军等2006),无法获得高质量的cpDNA来满足基因组测序的要求。如普通小球藻这类具有坚固细胞壁和较多胞外次生代谢产物的单细胞绿藻,通常采用液氮冷冻研磨来提取cpDNA,容易造成其叶绿体双层膜在冻融过程中裂解而过早释放cpDNA,最终难以获得含量多且纯度高的cpDNA,延缓了叶绿体功能基因组的研究进展。因而,寻求一种高效提取藻类cpDNA的方法受到科研工作者的极大关注。

本文研究了一种新的高效提取小球藻cpDNA的方法,即将材料在冰上研磨,再进行percoll密度梯度离心并结合尿素-月桂酰肌氨酸钠(urea-sarkosyl)法来提取cpDNA,可获得高质量的cpDNA,满足小球藻叶绿体基因组高通量测序的要求并用于后续的研究。

材料与amp;方法

1 材料与试剂

所用藻种的编号为SAG211-12,源自德国歌德堡大学藻种库。该藻种为普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)的模式藻种,细胞直径3~8 μm ,是绿藻门小球藻属普生性单细胞球形绿藻。所用的TAP培养基组成为:2 \times Filner's Beijernicks溶液(含 NH_4Cl 16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 25 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 、磷酸钾母液(含1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 、1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4) 1 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 、微量元素溶液(含 $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 H_3BO_3 2.28 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.032 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.146 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.032 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 5 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Tris-Base 2.42 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、冰乙酸1 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 。121 $^\circ\text{C}$ 灭菌20 min。

将经固体TAP培养基(含0.7%琼脂粉)活化的藻体接种至1 000 mL TAP液体培养基中,于光强为150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的摇床中进行光照培养,培养温度为25 $^\circ\text{C}$,转速为150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,持续培养10~15 d。

细胞裂解缓冲液组成为:0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇、

2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ 、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES-KOH (pH 7.8)、1% β -巯基乙醇(β -ME)。叶绿体重悬缓冲液为:0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ 、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES-KOH (pH 7.8)。以叶绿体重悬缓冲液为溶剂,将percoll加入其中,分别配置成50%、30%和10%的密度梯度分离液。cpDNA提取液含尿素41.4% (m/V)、月桂酰肌氨酸钠2% (m/V)、 NaCl 350 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 EDTA (pH 8.0) 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Tris-HCl (pH 8.0) 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 方法

2.1 完整叶绿体分离

将对数生长中期的小球藻置于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中暗处理24~36 h,2 000 $\times g$ 离心5 min后收集小球藻。称取小球藻15 g,先用1% SDS溶液清洗2次,在中性滤纸上充分吸水后,转入研钵,加入0.1% PVPP、30 mL细胞裂解缓冲液(Goyal等1988, 1998)和少量石英砂,快速充分研磨,用6层医用纱布(中间夹1层脱脂棉)过滤,滤液于4 $^\circ\text{C}$ 下800 $\times g$ 离心3 min,将上清液转至新的离心管,4 $^\circ\text{C}$ 下3 000 $\times g$ 离心10 min,弃上清,加入30 mL叶绿体重悬缓冲液,充分悬浮叶绿体沉淀并将其轻柔混匀。上述操作均置于冰上进行。

用自制的弯头塑料滴管(图1)依次缓慢添加50%、30%和10%的percoll溶液分别4、3、2 mL于6支15 mL的离心管中,易于形成带有两个明显界面的分离体系;分别吸取5 mL沉淀重悬液缓慢平



图1 用于平铺密度梯度分离体系的弯头塑料滴管
Fig.1 Curving plastic dropper used to build density gradient separation system

铺于6支离心管的最高液面,于4℃下8 000×g离心15 min,逐一吸取位于30%与50%浓度界面的绿色组分,归并为1份,用叶绿体重悬液将收集的叶绿体组分洗涤1次,于4℃保存备用。

2.2 cpDNA提取

在所得的叶绿体样品中,分别加入终浓度为100 μg·L⁻¹的DNase I和RNase A及10 mmol·L⁻¹ MgCl₂,冰上静置1.5 h以去除核基因组DNA,加入1.5 mL EDTA (pH 8.0, 200 mmol·L⁻¹)终止上述酶解反应,用叶绿体重悬液稀释并洗涤2次,于4℃、1 500×g离心3 min,弃上清,所得的叶绿体沉淀用研磨棒快速充分研磨后,迅速加入8 mL的cpDNA提取液、终浓度为1%的β-ME和200 μg·mL⁻¹的蛋白酶K,混匀,室温静置20 min,再用等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提2次,并以2倍预冷的无水乙醇沉淀,最后溶解于1.0 mL 1×TE 缓冲液(含10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0)。

2.3 总DNA提取

称取干燥的小球藻5 g,加液氮快速研磨,加入15 mL细胞裂解缓冲液(含尿素和月桂酰肌氨酸钠)充分混匀,采用本研究创新的尿素-月桂酰肌氨酸钠法,结合酚/氯仿/异戊醇抽提小球藻总DNA,选用异丙醇沉淀核酸, RNA酶(10 mg·mL⁻¹, TaKaRa)于37℃消化30 min后再用氯仿/异戊醇(24:1)抽提3次,离心转速均为8 000×g,时间6 min。用2倍体积预冷的无水乙醇对小球藻总DNA进行沉淀,最终将DNA干燥后溶解于1×TE缓冲液(pH 8.0)。

2.4 总DNA和cpDNA的质量检测

将上述所得的小球藻总DNA和cpDNA各稀释10倍后进行1%琼脂糖凝胶电泳,电泳电压为5 V·cm⁻¹,时间30 min,用紫外凝胶成像仪检测并拍照。

用高精度微量分光光度计Thermo Scientific Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific)测定小球藻总DNA和cpDNA的OD值,重复3次。

小球藻总DNA和cpDNA最终浓度和产率计算公式如下: DNA浓度(μg·mL⁻¹)=A₂₆₀×50 μg·mL⁻¹×稀释倍数; DNA产率(μg·g⁻¹)=A₂₆₀×50 μg·mL⁻¹×稀释倍数×溶液体积(V)/样品干重(m)。

2.5 PCR扩增鉴定

用PCR扩增鉴定cpDNA的纯化效果。根据叶绿体编码的16S rDNA序列设计扩增引物: 5'-TCT-GATTAGCTAGTTGGTGGGG-3'和5'-ATGGTGT-

GACGGGCGGTGTGT-3'; 设计细胞核18S rDNA特异性扩增引物: 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-TAG-3'和5'-ACCTTGTTACGACTTCTCCTT-CCTC-3'。分别对提取的小球藻总DNA和cpDNA进行特异性扩增。50 μL PCR反应体系包括: Taq聚合酶(TaKaRa) 0.5 μL、10×LA PCR缓冲液5 μL、dNTP 8 μL、模板(cpDNA原液稀释50倍) 1 μL、正反向引物各1 μL和ddH₂O 33.5 μL。PCR反应程序为: 95℃预变性2 min; 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸2 min, 循环30次; 最后72℃延伸10 min。

实验结果

1 小球藻叶绿体的分离效果

小球藻的研磨液经percoll密度梯度离心后,分层效果明显(图2)。10%与30%分离液界面为小球藻细胞色素层, 30%与50%分离液界面为小球藻的叶绿体, 50%分离液中的沉淀为小球藻的细胞碎片。

本研究采用冰上研磨的方法代替液氮研磨, percoll密度梯度离心之前, 显微镜下观察研磨液涂片后发现, 研磨液中存在大量游离的膜结构完整的叶绿体(图3-A), 说明研磨效果良好, 未造成叶绿体结构的较大破坏。经percoll密度梯度离心后, 叶绿体层中已不存在未破碎或部分破碎的藻细胞和大的细胞碎片(图3-B)。上述密度梯度离心结果表明: 该方法分离纯化的小球藻叶绿体能较好地维持叶绿体的正常形态, 达到了理想的分离效果。

2 小球藻总DNA和cpDNA的提取效果

采用尿素-月桂酰肌氨酸钠法提取的小球藻总DNA条带亮度大, 泳道干净, DNA片段长度大于23 kb (图4); 总DNA的A₂₆₀:A₂₈₀值为1.96, 介于1.8~2.0; 浓度为44.2 μg·mL⁻¹, 产率达到52.98 μg·g⁻¹ (DW) (表1)。另外, 用此法提取的cpDNA片段长度比总DNA的略小, 约为22 kb, 且泳道更干净(图4); cpDNA的A₂₆₀:A₂₈₀值为1.87, 介于1.8~2.0; 浓度达到37.8 μg·mL⁻¹, 产率为2.52 μg·g⁻¹ (DW) (表1)。

为了进一步验证所提取的小球藻cpDNA是否受到核基因组DNA的污染, 我们对小球藻总DNA和cpDNA同时进行16S rDNA和18S rDNA基因片段的扩增。结果显示, 小球藻总DNA的16S rDNA和18S rDNA基因片段都能扩增出来, 长度分别为1 400和1 800 bp左右, 而cpDNA只扩增出16S rDNA, 18S rDNA未见扩增(图5), 说明所提取的

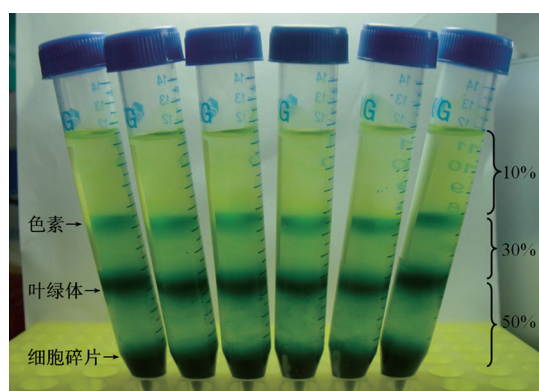


图2 percoll密度梯度离心后细胞组分的分层状况
Fig.2 The stratified result of cell components after percoll density gradient centrifugation

cpDNA没有核基因组DNA污染,与预期相符。小球藻总DNA扩增出的18S rDNA片段测序后的长度为1 769 bp,与实验结果相符,NCBI在线比对结果显示:其与普通小球藻18S rDNA序列相似性达到100%,证明SAG211-12藻株确实为普通小球藻。

上述结果表明,尿素-月桂酰肌氨酸钠法提取小球藻cpDNA的浓度和纯度较高,没有核基因组DNA污染,可满足高通量测序的要求。

讨论

叶绿体基因组文库构建和高通量测序需要高纯度的cpDNA,因此分离大量完整且较纯的叶绿体就显得极为重要。在本研究中,我们对藻细胞

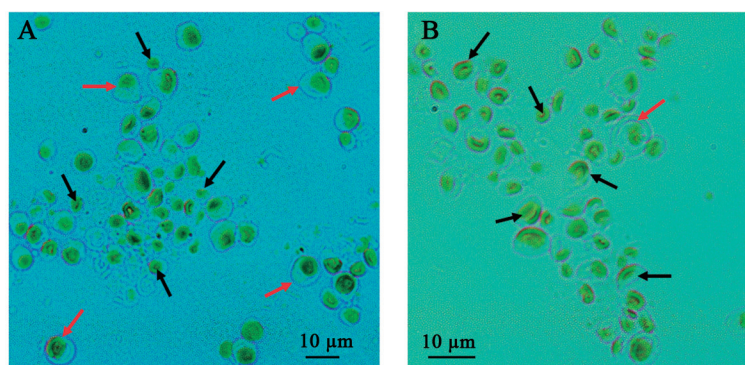


图3 percoll密度梯度分离前后的叶绿体
Fig.3 Chloroplasts before (A) and after (B) the percoll density gradient centrifugation
A: 分离前; B: 分离后。黑箭头为完整叶绿体; 红箭头为未破碎或部分破碎细胞。

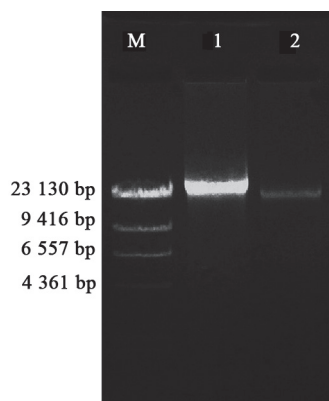


图4 用尿素-月桂酰肌氨酸钠法提取的普通小球藻总DNA和cpDNA电泳图
Fig.4 The electrophoresis of total DNA and cpDNA of *C. vulgaris* isolated with urea-sarkosyl method
M: Marker (TaKaRa); 1: 总DNA; 2: cpDNA。

先进行4 °C低温暗处理24~36 h,是为了避免高速离心过程中叶绿体内的高密度淀粉核对叶绿体膜产生较大的破坏,以得到更多的完整叶绿体;小球藻坚固的细胞壁上附有大量的次级代谢产物,裂解细胞壁前用1% SDS进行洗涤,有利于胞外杂质的去除和高纯度完整叶绿体的分离。由于藻类细胞

表1 尿素-月桂酰肌氨酸钠法分离的小球藻总DNA和cpDNA的参数比较

Table 1 Comparison of total DNA and cpDNA of *C. vulgaris* isolated with urea-sarkosyl method

核酸样品	$A_{260}:A_{280}$	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	产率/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)
总DNA	1.96±0.02	44.2±0.1	52.98±0.02
cpDNA	1.87±0.01	37.8±0.2	2.52±0.01

壁较厚,提取藻cpDNA的常用方法如SDS(卢太白等2006;龙兴等2008)和CTAB(李继耕等1982)法均采用液氮冷冻研磨和长时间高速离心的方式分离纯化叶绿体,使得大部分叶绿体膜很难保持完整;当使用DNase I消化核基因组DNA时,破损的叶绿体膜内cpDNA也基本被核酸酶降解,结果造成cpDNA得率明显偏低(表2)。在本研究中,采用冰上研磨藻细胞和低速短时间离心的方式分离纯化叶绿体,充分保证了叶绿体膜的完整,使叶绿体的整体结构未受较大损伤,也避免其膜内cpDNA被DNase I所消化,因此在后续的实验中得到总量较多的cpDNA。同时,我们采用自制的弯头塑料滴管向试管中缓慢添加percoll分离液,有利于垂直方向流动的分液减少浓度界面造成的冲击,从而使不同密度分离液之间容易形成清晰的界面,有助于小球藻叶绿体的分离纯化。

Percoll是经过聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)处理的硅胶颗粒混悬液,具备渗透性

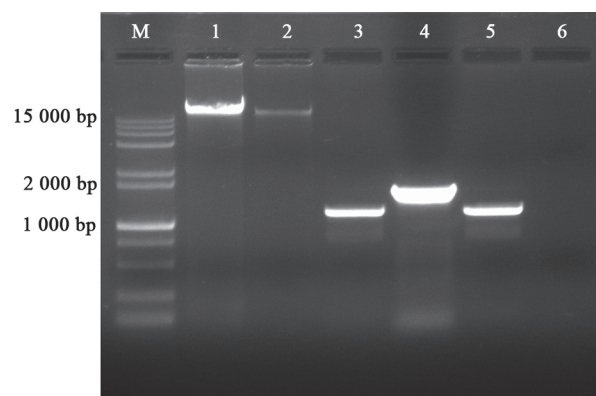


图5 普通小球藻总DNA和cpDNA的16S和18S rDNA扩增结果

Fig.5 16S and 18S rDNAs amplified from *C. vulgaris* total DNA and cpDNA

M: D15 000+2 000 Marker (TIANGEN); 1: 总DNA; 2: cpDNA; 3: 总DNA的16S rDNA扩增片段; 4: 总DNA的18S rDNA扩增片段; 5: cpDNA的16S rDNA扩增片段; 6: cpDNA的18S rDNA扩增片段。

表2 三种方法分离的cpDNA比较

Table 2 Comparison of cpDNAs isolated by three methods

提取方法	A_{260}/A_{280}	cpDNA浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	cpDNA产率/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}(\text{DW})$
尿素-月桂酰肌氨酸钠法	1.87±0.01	37.8±0.2	2.52±0.01
SDS法(龙兴等2008)	1.77±0.01	2.2±0.1	0.41±0.02
CTAB法(李继耕等1982)	1.78±0.01	12.1±0.1	1.51±0.01

低、非细胞穿透、粘度低、密度高和无毒害等优点,与目前常用的密度梯度离心介质(包括蔗糖、血清白蛋白、聚蔗糖、氯化铯等)相比,percoll在实验操作中易于去除,对cpDNA的提纯不造成干扰,是一种较理想的介质。该分离技术已广泛应用于现代免疫医学研究领域,也开始用于分离和纯化植物原生质体、细胞核、线粒体等组分。

Sarkosyl即月桂酰肌氨酸钠(sodium *N*-lauroyl-sarcosinate),它与阳离子表面活性剂形成较好的协同作用,达到更佳的浮选效果,是新型氨基酸类阴离子表面活性剂;同时具有洗涤、乳化、渗透、增溶等特性。本研究将尿素、月桂酰肌氨酸钠与蛋白酶K配合使用,使得cpDNA更快、更彻底地从核酸-蛋白复合物中释放出来,提高了分离的效率。

本研究也首次采用percoll密度梯度分离法,结合尿素-月桂酰肌氨酸钠法来提取普通小球藻cpDNA,不仅快速得到了高纯度的cpDNA,而且成功地解决了cpDNA产率和纯度低的难题,同时避免了核基因组的污染,满足叶绿体基因组高通量测序的要求。与蔗糖梯度离心法(龙兴等2008)和CsCl密度梯度离心法(李继耕等1982)等相比,尿素-月桂酰肌氨酸钠法所提取的cpDNA产率和纯度高,且操作步骤简易,值得推广。

参考文献

- 吉莉, 谢树莲, 冯佳(2010). 藻类植物叶绿体基因组研究进展. 西北植物学报, 30 (1): 208~214
- 李继耕, 舒群芳, 高文琴, 耿玉轩(1982). 菠菜叶绿体DNA的分离与鉴定. 遗传学报, 9 (3): 203~208
- 龙兴, 曾继吾, 黄秉智, 黄永红, 易干军, 陈金印, 夏瑞(2008). 香蕉叶绿体分离及叶绿体DNA提取方法. 江西农业大学学报, 30 (3): 534~542
- 卢太白, 曾玲, 李坤, 战海栗(2006). 绿色蔬菜叶绿体DNA的提取和纯化. 西北农业学报, 15 (1): 186~188
- 欧立军, 黄光文, 王京京, 陈良碧(2006). 水稻叶绿体DNA提取和纯化方法优化. 湖南师范大学自然科学学报, 29 (1): 92~94
- 王彦涵, 张寿州, 高建平, 李晓波, 陈道峰(2003). 从叶绿体DNA *rbcL*序列分析探讨五味子科的系统发育. 复旦学报(自然科学版), 42 (4): 550~554
- 张茜, 杨瑞, 王钦, 刘建全(2005). 基于叶绿体DNA *trnT-trnF*序列研究祁连圆柏的谱系地理学. 植物分类学, 43 (6): 503~512
- 赵卫国, 赵巧玲, 张志芳, 肖庆利, 潘一乐, 何家禄(2001). 桑树叶绿体基因组DNA的提取及部分序列分析. 蚕业科学, 27 (4): 303~305
- Goyal A, Beteche T, Tolbert NE (1988). Isolation of intact chloroplasts from *Dunaliella tertiolecta*. Plant Physiol, 88 (5): 543~546
- Goyal A, Thielmann J, Tolbert NE (1998). Isolation of chloroplast envelopes from *Dunaliella tertiolecta*. Can J Bot, 76 (6): 1146~1152
- Walker TL, Collet C, Purton S (2005). Algal transgenics in the genomic era. J Phycol, 41 (6): 1077~1093