



蓝藻高 CO_2 需求突变株的研究进展*

吴天福 刘永定 宋立荣

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

RESEARCH PROGRESS ON HIGH CO_2 REQUIRING MUTANTS IN CYANOBACTERIA

Wu Tianfu, Liu Yongding and Song Lirong

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词 蓝藻, CO_2 浓缩机制, 高 CO_2 需求突变株

Key words Cyanobacteria, CO_2 concentrating mechanism, High CO_2 requiring mutant

对蓝藻 CO_2 浓缩机制 (CO_2 concentrating mechanism, CCM) 的认识, 最终要揭示其作用的生理生化和分子生物学基础. 蓝藻高 CO_2 需求突变株的研究为这个目标的实现提供了一条最为有效的途径. 1986 年, Marcus 等第一次把筛选光合作用突变株的方法加以修改, 利用化学诱变筛选到第一个单细胞蓝藻 *Synechococcus* PCC7942 的高 CO_2 需求突变株^[1], 为这一领域的研究在方法学上开辟了一个新的途径. 1989 年, Price 等使人体 II 型碳酸酐酶基因在蓝藻细胞胞液中的超量表达产生了高 CO_2 需求突变株^[2], 证明 CA 在胞内的正确定位是 CCM 所必需的. 1991 年, Ogawa 等通过 *ndhB*, *ndhK* 及 *ndhL* 基因 (编码 NADH 脱氢酶不同亚单位) 的失活获得了高 CO_2 需求突变株^[3], 说明无机碳运输与光合电子传递有关, 光能是无机碳运输过程中所必需的能量. 1992 年, Fukuzawa 等发现, *icfA* 基因 (编码位于羧体内的碳酸酐酶) 的损伤产生了高 CO_2 需求突变株^[4], 说明羧体及位于羧体内的 CA 在 CCM 中具有重要作用. 不同的高 CO_2 需求突变株中相关基因的分离及测序的结果证明, 蓝藻的 CCM 是由多个基因控制的. 随着蓝藻分子生物学手段在该领域的运用, 对揭示蓝藻 CCM 的分子生物学基础起了重要的作用. 就单细胞蓝藻 *Synechococcus* PCC7942 而言, 已经鉴定了多个参与 CCM 功能的基因, 并对 *rbcLS* (编码 RubisCO 大小亚基) 操纵子基因组区的大部分基因构建了物理图谱. 总之, HCR 突变株已成为阐释蓝藻对变化的 CO_2 浓度适应及 CCM 的生理及分子生物学基础的一个重要工具, 并将继续成为蓝藻 CCM 领域最为有效的手段.

* 本工作得到“海洋 863”项目(819-03-03-4); 曾呈奎海洋科学基金及武汉市“晨光计划”的资助
1999-08-02 收到; 1999-09-02 修回

1 蓝藻CCM可能损伤的位点

蓝藻CCM的有效运转有赖于一个正常的无机碳运输系统和羧体以及它们之间的密切配合。蓝藻的质膜上有一个主动的C_i运输系统,和定位于羧体的RubisCO。无机碳泵把HCO₃⁻运输到胞液中,羧体的功能是利用胞液HCO₃⁻提高RubisCO附近的CO₂^[5,6]。目前认为,这种CO₂浓度的升高,是羧体CA的催化及羧体外被蛋白形成的CO₂扩散阻力共同作用的结果^[7]。因此,蓝藻CCM可能损伤的位点有以下几个方面:1)HCO₃⁻与CO₂利用系统的蛋白组分的损伤或缺失;2)运输过程的供能途径包括电子传递组分,ATPase,Na⁺/H⁺反向运输(Antiport)的损伤;3)羧体的变化,其中包括:a. 羧体对CO₂的泄漏增加;b. CA活性的改变或错误定位于胞液中;c. 羧体形态,数目及在胞内位置的改变;d. RubisCO错误定位于胞液。

2 蓝藻高CO₂需求突变株的类型

到目前为止已在单细胞的蓝藻 *Synechococcus* PCC7942, *Synechocystis* PCC6301, *Synechocystis* PCC6803 和 *Synechococcus* PCC7002 中获得了许多高CO₂需求突变株。依诱变方式分有三类:(1)化学诱变产生的突变株;(2)限定突变株(Defined mutant);(3)随机片段插入诱变(Random insertion)。

2.1 化学诱变突变株 用化学诱变在 *Synechococcus* PCC7942 获得的高CO₂需求突变株,都是在胞内无机碳利用上缺陷的,迄今还没有发现无机碳运输和积累缺陷的突变株。在无机碳利用上受阻的突变株,主要有两类:一类是在羧体形态上发生改变如E₁,O₂₂₁和Type I;另一类在羧体形态上没有改变,如Type II和C3P-O。O₂₂₁和Type I中损伤的基因已被定位。这些基因定位在RubisCO大亚基基因5'端5kb区域内。这些基因可能参与了羧体的组装。这些基因的失活,产生了没有羧体的突变株(P/N)。很可能E₁和Type I是由同一基因的损伤导致的。RK₁和O₂₂₁也可能由同一基因的突变引起,因为这两个突变株在转入低碳条件下时都不能诱导42KD多肽。C3P-O突变株则不同,用RubisCO小亚基基因下游20kb处的DNA片段做互补实验(Complementation),该突变株可以回复到野生型。Type II突变株在黑暗中时,CO₂的泄漏速率下降,而且在HCO₃⁻向CO₂的转化中缺陷。Ogawa在 *Synechocystis* PCC6803 中获得了无机碳运输缺陷的高CO₂需求突变株,认为这种缺陷与能量供应有关。他分离到与突变相关的基因,并命名为*ic-tA*^[8]。进一步的研究发现,这个基因实际上编码NADH脱氢酶的一个亚单位,于是更名为*ndh1*^[9]。

2.2 限定突变株 随着蓝藻遗传转移系统的建立,人们可以通过定点插入失活或删除某一特定区域的DNA来构建突变株。通过这种方法已获得了大量的突变株。其中M9,hcrBXI和PVU的突变位点是从化学诱变突变株中分离得到的,然后在这些基因中插入一个抗药性的DNA片段^[10]。P/N是由O₂₂₁和Type I衍生来的突变株,包括相应的ORFs在内的1.8kb区被一个抗药性片段取代,产生的新的突变株没有羧体但胞内含有可溶性的RubisCO^[10]。另外,通过插入失活C3P-O突变位点相应的DNA区,获得了新

的高 CO_2 需求突变株，并鉴定了编码定位于羧体的 CA 基因 *icfA*^[4]，这个发现在 CCM 研究历史上是一件大事。

除了上述由化学诱变衍生的突变株外，还有两个高 CO_2 需求突变株，它们是由外源基因的导入产生的：一个被称做“Cyanorubrum”突变株，它是由编码深红红螺菌 *Rhodospirillum rubrum* RubisCO(L₂)的基因，取代 *Synechococcus* PCC7942 中编码 RubisCO (L₈S₈)的基因而获得的^[11]。这个实验有力地证实了羧体在 CCM 中的中心作用。另外一个突变株是由人体 II 型碳酸酐酶基因在 *Synechococcus* PCC7942 胞液中的超量表达产生的^[2]。这个突变株具有极高的胞液 CA 活性及高 CO_2 需求的表型。尽管无机碳运输正常但不能在胞内积累无机碳。该突变株的构建验证了： HCO_3^- 是胞液中 Ci 的主要形式，胞液中没有 CA，因而转化成 CO_2 的速率非常低。同时也验证了阻止 CO_2 泄漏的屏障定位于羧体而不是质膜，并进一步肯定了羧体在 CCM 中的中心作用。

2.3 随机插入突变株 Sultemeyer 等用卡那霉素抗性片段随机插入 *Synechococcus* PCC7002 中获得了一些 CCM 功能缺陷的突变株^[12]，但具体的突变位点还没有确定。

如以 CCM 功能损伤的部位分，HCR 突变株可以分为羧体突变株和 Ci 吸收功能丧失突变株两大类。到目前分离到的 HCR 突变株主要是前一类。无机碳吸收功能缺陷在研究 Ci 运输机制及鉴定相关基因方面都具有重要意义。上面所提到的在编码 NADH 脱氢酶各种亚单位的基因损伤的突变株，在积累 Ci 能力上下降，但从严格意义上讲，不能算“运输突变株”。Ogawa 分离了一个 *Synechocystis* PCC6803 突变株，当置于 3% 或 0.04% CO_2 下时，同野生型一样可以生长，但不能在 0.008% 下生长，称为“SC”突变株^[13]。该突变株在 CO_2 吸收上受到严重的阻碍，而 HCO_3^- 的吸收上却没有受到影响。SC 突变株基因的损伤是否直接参与了 Ci 的吸收，还不清楚。 HCO_3^- 与 CO_2 吸收的不同影响，反映出它在将 CO_2 转化为 HCO_3^- 能力上缺陷。Ronan-Tarazi and Kaplan 在 *Synechococcus* PCC7942 中已分离到 5 个不同的 HCR 突变株，它们在运输 HCO_3^- 能力上缺陷，但吸收 CO_2 能力上表现正常^[14]。 HCO_3^- 或 CO_2 吸收缺陷突变株的获得，将为两种 Ci 形式不同的吸收途径提供直接的证据。

如按照突变株对外源无机碳的表观光合作用亲合力分，可以分为两大类：第一大类显示了适应性突变株所期望的行为^[6]，即它们(D4 及 R14)对外源无机碳，表现出与高 CO_2 生长的野生型相似的表观光合作用亲和力，但它们不能在低 CO_2 下生长。它是通过 *PurK*(定位于 *rbcS* 下游)的修饰以后分离得到的，这种缺失影响嘌呤的生物合成，因此在严格意义上，它们不能被称作“适应性突变株”。第二大类是表观光合作用亲和力低于野生型两个数量级的突变株，它又分为 3 个小类：

(1)当供以 HCO_3^- 或 CO_2 时，突变株在积累 Ci 能力上缺陷，可能是由于编码 NADH 脱氢酶亚单位的基因缺失，或外源 CA 基因在胞质中的超量表达引起 (Price and Badger et al., 1989c)^[2]。在 *Synechococcus* PCC7942 中，*ndhB*(位于 *rbcL* 上游 12Kb 处)的转录程度可能依赖于环境中 CO_2 的水平^[15]。

(2)当 CO_2 作为唯一碳源供应时，突变株胞内积累 Ci 能力上缺陷。目前唯一的例证是 *Synechocystis* PCC6803 的 SC 突变株^[13]。

(3)当 CO₂ 作为唯一碳源供应时,突变株胞内可积累 Ci,至少有 3/4 的突变株在无机碳积累效率上与野生型一样,但在利用内源 Ci 库上缺陷.这类突变株包括由于 *icfA* 缺失而导致的羧体 CA 活性下降的突变株^[14],含有异常羧体或没有羧体的突变株^[11, 16, 17].

3 突变株筛选及分析的方法学

3.1 筛选 新的高 CO₂ 需求突变株的筛选需要在方法学上有所突破.传统的方法是通过筛选条件致死表型达到目的.但这个方法有它的局限性.比如,通过诱变使某个基因发生了缺失,如果这个基因是多拷贝的,那么相应的突变株就不能被检出,这就增加了筛选的难度.另外,突变株筛选的允许条件(Permissive conditions)——1~5% CO₂ 和不允许条件(Non-permissive conditions)——空气,是从高等植物和衣藻^[18, 19]那里借鉴过来的,对蓝藻是否为最合适的筛选条件,还有待于进一步探讨.

3.1.1 突变株对 Ci 的理论需求量 根据 Reinhold 等提出的 CCM 模型,可以估计出不同突变株对外源无机碳的需求.假定细胞生长在 pH8 的平板上,分别通以 0.003%, 0.03%, 1% 和 4% CO₂,并且每种类型的细胞都有高 Ci 和低 Ci 运输特性.对生长在空气中的野生型细胞来说,高 Ci 细胞可以象低碳细胞一样进行光合作用.这就带来一个问题,在空气中平板上生长的细胞到底表现高 Ci 生理还是低碳 Ci 生理?事实上,当生长在空气中的细胞转移到 0.003% 的 CO₂ 环境下时,细胞体现出低碳生理的特点^[10].

3.1.2 突变株的筛选条件 在筛选过程中,CO₂ 达到什么水平对突变株才是非允许条件呢?以化学诱变为例,第一,细胞在氨苄青霉素富集培养阶段进行分裂的时候不能快速生长;第二,在后面复制平板的过程中藻落的生长极为缓慢甚至不生长.允许条件是突变株的生长接近野生型的条件.对无机碳运输突变株来说,如果是单泵(CO₂ 泵)缺陷,那么空气(0.035% CO₂)即为非允许条件,而大于 2% CO₂ 的条件为允许条件.如果是双泵,就很难定义一个 CO₂ 泵缺陷的突变株的非允许条件.因为即使在空气条件下,细胞也可以依赖 HCO₃⁻ 泵生长,如同野生型在低碳下的情况.如果要筛选 HCO₃⁻ 利用系统缺陷的突变株,空气将是允许条件,而相当于甚至低于空气中 CO₂ 浓度的 1/10(即 0.003% CO₂ 或更低)是非允许条件.羧体突变株中,如果羧体外被泄漏,没有羧体或 RubisCO 错误定位于胞液中,空气为非允许条件,而 1~5% CO₂ 为允许条件^[10].

3.2 突变株的生理分析

突变株筛选到以后,要对其生理生化特性进行分析,以确定它对外源无机碳的表观光合作用亲合力,无机碳运输是否正常,无机碳的积累及利用特性,羧体的特性等.以此确定突变株的类型.

4 与突变相关的基因

迄今为止,在 *Synechococcus* PCC7942 中所鉴定的导致高 CO₂ 需求表型的突变位点,大都围绕在 *rbcLS* 操纵子基因组区,这说明参与适应于变化的 CO₂ 环境的基因群居于该区.*rbcL* 上游 5 个 ORF 失活,缺失或化学诱变都导致了 HCR 表型,这些 ORF 分别被命名为 *ccmK*~*ccmL*~*ccmM*~*ccmN*~*ccmO*^[20].*ccmN* 和 *ccmO* 最早被命名为 ORF1 和

ORFII. 在 *ccmO* 基因 3' 端的 *Bcl* I 位点插入 *Km*^r 后, 无突变表型出现^[21], 但是 *ccmO* 3' 端大片段的缺失会产生 HCR 突变株 N1. 通过 *ccmK*, *ccmM*, *ccmN*, *ccmO* 的修饰所得的突变株含有缺陷的羧体. 在 ORF236 下游的 *EcoRI* 位点插入一个授予卡那霉素抗性的基因, 产生了一个 M3 突变株, 它含有异常的羧体^[6]. Ogawa 的研究中, 把 HCR 突变株 G3 (*Synechocystis* PCC6803) 的突变位点定位于 ORF535 内, ORF535 的产物与 *Synechococcus* PCC7942 与 *ccmN* 具有极高的同源性, 与 *rbcS* 也具有一些同源性. 他还鉴定了与 ORF535 邻近的产物 ORF242, 它与 *Synechococcus* PCC7942 的 *ccmM* 具有同源性. 目前还不知道 *Synechocystis* PCC6803 中 ORF535 与 ORF242 损伤的突变株中是否存在正常的羧体, 这些 ORF 是否定位于 *rbcLS* 操纵子的附近.

除上面所述 HCR 突变株外, 还获得了只能在低 CO₂ 下生长的突变株. 把授予卡那霉素抗性的基因插入 *ndhB* 下游的 ORF839 中 *Cla* I 或 *Sal* I 位点, 导致了局部二倍体的产生即突变株 M1 与 C1, 后者在缺乏卡那霉素的条件下, 可以在高 CO₂ 或低 CO₂ 下生长; 在有卡那霉素存在的情况下, 它只能在低 CO₂ 下生长^[6]. ORF839 的产物与编码 *E. coli* 中编码拓扑异构酶的 *TopA* 具有高度相似的序列. 在低 CO₂ 条件下, 卡那霉素抗性在突变株中广泛的表达^[6], 这一现象也有待于进一步研究.

在围绕 *Synechococcus* PCC7942 *rbcLS* 区的 Northern 及序列分析发现几个 ORF, 它们的失活, 在实验条件下没有得到高 CO₂ 需求的表型. 位于 *ccmK* 上游的 ORF286(以前的 *frxC*, 现在的 *chlL*) 及 ORF466(*chlN*), 被鉴定为编码原叶绿素酸酯还原酶的两个亚单位的基因^[14], 它与集胞藻 PCC6803 及苔藓植物的相关基因具有同源性. ORF145 与编码肽基脯氨酸顺反异构酶的 *rotA* 具有极高的同源性, 它位于 ORF83 下游^[22]. ORF145 的插入诱变导致了局部二倍体而且这个突变位点是致死的.

通过 *cmpA*(编码质膜上 42KD 多肽)基因的失活得到的突变株 M42, 可以在低 CO₂ 下生长. 当时认为, 该基因没有直接参 CCM. 但最近的研究结果表明: 在 0.05% CO₂ 条件下, M42 对 HCO₃⁻ 的运输速率低于野生型; 而在高 CO₂ 条件下(2% CO₂), 它对 HCO₃⁻ 的运输速率与野生型细胞相同. 而且, *cmpA* 的失活并没有影响细胞对 CO₂ 的亲合力(Bagder and Omata, 私人通讯). *cmpA* 基因组区包括 4 个 ORF—*cmpA*, *cmpB*, *cmpC* 和 *cmpD*, 序列分析表明: 它们分别与编码硝酸盐运输者(Nitrate transporter)的 4 个 ORF—*nrtA*, *nrtB*, *nrtC* 及 *nrtD* 具有高度的同源性^[24]. 这个硝酸盐运输者是一个典型的 traffic ATPase 运输者, 因此, 很有可能 *cmp* 基因簇编码一个 HCO₃⁻ 运输者.

5 展望

到目前为止, 蓝藻 CCM 的研究主要集中在单细胞蓝藻的几个种: *Synechococcus* PCC7942, *Synechococcus* PCC7002, *Synechococcus* PCC6301 和 *Synechocystis* PCC6803. 丝状蓝藻是水体中分布很广, 生物量很大的一类多细胞藻类, 对水环境的维持和利用起着举足轻重的作用. 鉴于它结构、代谢特点及遗传操作的复杂性, 到目前为止 CCM 的研究还非常有限, 与 CCM 相关的基因及 HCR 突变株尚没有报道. 1996 年, Chrispin 等试图通过 *ndhK* 基因的失活得到丝状蓝藻 *Anabaena* sp. strain PCC7120 的高 CO₂ 需求突变

株,结果发现 $ndhK$ 基因并不是丝状蓝藻CCM所必需的^[25],尽管单细胞蓝藻 $Synechocystis$ PCC6803中 $ndhK$ 基因的失活可以导致HCR突变株,这一结果说明丝状蓝藻在CCM的运作上与单细胞蓝藻有所差异。因此,丝状蓝藻中与CCM相关的基因的克隆和鉴定,已成为蓝藻CCM研究领域中亟待解决的问题。它对于解释究竟哪些基因是蓝藻CCM所必需的,单细胞蓝藻与丝状蓝藻在CCM运作上存在哪些共性,哪些差异,为什么会有这些差异等一系列问题提供分子生物学水平上的证据。要克隆丝状蓝藻中与CCM相关的基因,首先在方法上要有所突破。随着丝状蓝藻中遗传转移系统的建立和基因克隆新技术在蓝藻中的运用^[26],丝状蓝藻CCM基因的克隆与鉴定已成为可能。

在许多实验中均发现:参与特定生理功能的基因群集在一起。HCR突变株的分析说明:一些相关基因群集于 $rbcLS$ 操纵子的基因组区,至少在 $Synechococcus$ PCC7942中是如此。一个有待进一步证实的问题是,这些群集的基因是否被共同调节。

DNA拓扑学对这个区段中不同ORF转录的影响,是今后研究中另一个具有挑战性的问题。 CO_2 依赖性基因表达的研究^[27],为阐明蓝藻对 CO_2 的反应机制开辟了道路。相关启动子区的鉴定,及其它信号转导途径的组成无疑成为今后的一个目标。需要指出的是:并非所有的与 CO_2 响应相关的基因都直接参与了CCM或光合作用。

突变株的研究表明:羧体结构组装的正确性是十分重要的,包括CA与RubisCO之间的紧密联系。目前仅仅是理论模型的假设,仍需通过实验进一步证实。随着羧体分离纯化技术的发展,将对相关多肽成分的鉴定,搞清羧体在蓝藻光合作用中的作用方式,多肽组分对羧体组装与生物发生机制有重要作用。 Ci 运输缺陷的新的突变株的分离^[28],及其 HCO_3^- 载体的鉴定将有助于证明是否有一个能量依赖的CA活性,参与了 CO_2 的吸收与再循环。

参考文献

- [1] Marcus Y, et al. High CO_2 requiring mutant of *Anacystis nidulans* R2. *Plant Physiol.*, 1986, 82: 610~612
- [2] Price GD, et al. Expression of human carbonic anhydrase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 creates a high CO_2 requiring phenotype. *Plant Physiol.*, 1989a, 91: 505~513
- [3] Ogawa T. A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 4275~4279
- [4] Fukuzawa H, Suzuki E, et al. A gene homologous to chloroplast carbonic anhydrase (icfA) is essential to photosynthetic carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 4437~4441
- [5] Badger MR, Price GD. The CO_2 concentrating mechanism in cyanobacteria and green alga. *Physiol. Plant.*, 1992, 84: 606~615
- [6] Kaplan A, Schwarz R, Lieman-Hurwitz J, et al. Physiological and molecular studies on the response of cyanobacteria to changes in the ambient inorganic carbon concentration. In Bryant D. [ed.] *Molecular biology of the Cyanobacteria*. Netherlands: Kluwer Academic, 1994, 469~485
- [7] Reinhold L, Zvitman M, et al. A quantitative model for inorganic carbon fluxes and photosynthesis in cyanobacteria. *Plant Physiol. & Biochem.*, 1989, 27: 945~954
- [8] Ogawa T, et al. Molecular analysis of mutants of *Synechocystis* PCC6803 defective in inorganic carbon transport. In "Current Research in Photosynthesis", Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990, Vol IV, 471~474
- [9] Ogawa T. Identification and characterization of the icfA/ndhL gene product essential to inorganic carbon transport of

- Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol.* 1992, **99**: 1604–1608
- [10] Badger M R, Price G D, Yu J W. Selection and analysis of mutants of the CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria. *Can J Bot.* 1991, **69**: 974–983
- [11] Pierce J, Carlson T J, Williams J G K. Anomalous oxygen sensitivity in a cyanobacteria mutant requiring the expression of ribulose bisphosphate carboxylase from a photosynthetic anaerobe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, **86**: 5753–5757
- [12] Sultemeyer D F, Klughammer B, Ludwig M, et al. Random insertion mutagenesis used in the generation of mutants of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7002 with an impaired CO₂ concentrating mechanism. *Aust. J. Plant Physiol.* 1997, **24**: 317–327
- [13] Ogawa T. Molecular analysis of the CO₂-concentrating mechanism in cyanobacteria. In: Yamamoto H and Smith C (eds) *Photosynthetic Responses to the Environment*. American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, 1993, 113–125
- [14] Ronen-Tarazi M, et al. The genomic region of *rbcLS* in *Synechococcus* sp. PCC7942 contain genes involved in the ability to grow under low CO₂ concentration and in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol.* 1996, **108**: 1461–1469
- [15] Marco M, Ohad N, Schwarz R, et al. High CO₂ concentration alleviates the block in photosynthetic electron transport in an *ndhB*-inactivated mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Physiol.* 1993, **101**: 1047–1053
- [16] Lieman-Hurwitz J, Schwarz R, Martinez F, et al. Molecular analysis of high-CO₂ requiring mutants indicates that genes in the region of cyanobacteria to grow under low CO₂. *Can. J. Bot.* 1990, **69**: 945–950
- [17] Orus M I, Martinez F, Rodriguez M L, et al. Ultrastructural study of carboxysomes from high-CO₂ requiring mutants of *Synechococcus* PCC7942. In Murata N (ed) *Research in Photosynthesis*, Dordrecht. Kluwer, 1992, Vol III, 787–790
- [18] Sommerville C R, et al. Isolation of photorespiration mutants in *Arabidopsis thaliana*. In M. Edelman, R Hallick, NH Chua, eds. *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, New York: Elsevier, 129–138
- [19] Spalding M H, Spreitzer R J, Ogren W L. Carbonic anhydrase-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* requires elevated carbon dioxide concentration for photoautotrophic growth. *Plant Physiol.* 1983, **73**: 268–272
- [20] Price G D, Howitt S M, Harrison K. Analysis of a genomeic DNA region from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 involved in carboxysome assembly and function. *J. Bacteriol.* 1993, **175**: 2871–2879
- [21] Friedberg K, Kaplan A, Ariel R, et al. The 5' flanking region of the gene encoding the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is crucial for growth of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 in air level of CO₂. *J. Bacteriol.* 1989, **171**: 6069–6076
- [22] Hassidim M, Schwarz R, Lieman-Hurwitz J, et al. A cyanobacterial gene encoding peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Plant Physiol.* 1992, **100**: 1982–1986
- [23] Orus M I, Martinez F, Rodriguez M L, et al. Ultrastructural study of carboxysomes from high-CO₂ requiring mutants of *Synechococcus* PCC7942. In Murata N (ed) *Research in Photosynthesis*, Dordrecht. Kluwer, 1992, Vol III, 787–790
- [24] Omata T. Characterization of the downstream region of permease of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. In: Murata (ed) *Research in photosynthesis*. Dordrecht, Kluwer, 1992, Vol III, 807–810
- [25] Crispin A, Howitt, et al. Cloning, analysis and inactivation of the *ndhK* gene encoding a subunit of NADH quinone oxidoreductase from *Anabaena* PCC7120. *Europ. J. Biochem.* 1996, **240**: 173–180
- [26] Wolk CP, Vonshak A, Kehoe P, et al. Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984, **81**: 1561–1565
- [27] Scanlan DJ, et al. Construction of *lacZ* promoter probe vectors for use in *Synechococcus*: application of the identification of CO₂-regulated promoters. *Gene*, 1990, **90**: 43–49
- [28] Wu TF, Song LR, Liu YD. Physiological aspects of a high-CO₂ requiring mutant and the High-CO₂ growing cells of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *CHIN. J. OCEANOL. LIMNOL.*, 1998, **16**: 133–139