

## 杜氏盐藻玻璃珠新型转化方法的建立

# Transformation of *Dunaliella salina* by Using Glass Beads —— A Novel Transformation Method

冯书营,贾岩龙,刘红涛,李 杰,薛乐勋\*

FENG Shu-Ying, JIA Yan-Long, LIU Hong-Tao, LI Jie and XUE Le-Xun\*

郑州大学医学实验中心,郑州大学第一附属医院,郑州 450052

Laboratory Center for Medical Sciences; The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

**摘 要** 首次采用玻璃珠法成功转化了杜氏盐藻(以下简称盐藻)转化细胞经染色后呈现蓝色,表明外源报告基因 GUS 得到了成功的表达。同时还进行了转化时间、转速、PEG 和质粒 DNA 浓度等因素对转化影响的分析,优化了转化条件。结果显示最佳的转化条件为:在 800 $\mu$ L 盐藻( $10^6$  个细胞/mL)中加入 150 $\mu$ L PEG 和 90 $\mu$ L 质粒,在 300mg 玻璃珠存在的条件下,于转速 2400r/min 涡旋 12s 能够得到较为理想的转化结果。该方法与已报道的转化方法相比,具有操作简便、省时快捷、不需要昂贵消耗试剂和仪器设备、比较经济等优点。此方法的建立为深入研究盐藻基因工程提供了有力的工具。

**关键词** 杜氏盐藻,玻璃珠,新型转化方法

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0358-05

**Abstract** A novel transformation method was firstly established using glass beads in *Dunaliella salina* (*D. salina*). The results showed that the GUS gene, a reporter gene, was successfully expressed in *D. salina*. Cells of *D. salina* presented blue color under the microscope after stained. In addition, different factors which influenced transformation were optimized including the transformation consecutive time, rotate speed, concentration of the plasmid and PEG 6000. The experiment indicated that this fit together can obtain the best results for *D. salina* transformation: adding 150 $\mu$ L PEG and 90 $\mu$ L plasmid DNA to 800 $\mu$ L culture of *D. salina* ( $10^6$  cells/mL) containing 300 mg glass beads, swirling 12 seconds under the rotate speed 2400r/min. This newly method can be used as a potential tool in the research of *D. salina* gene engineering with the advantage of more simpleness, convenience, quickness and less expense.

**Key words** *Dunaliella salina*, glass beads, novel transformation method

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*, *D. salina*)属于杜氏藻科杜氏藻属的一种单细胞真核藻类,由于其本身具有许多独特的优点<sup>[1-3]</sup>,如盐藻是天然的原生质体、适于高盐环境培养、本身营养丰富且无毒无害等等,已被本研究室开发作为一种新型的生物反应器<sup>[4]</sup>。但迄今为止,盐藻反应器还不能真正高效地

生产外源性物质,其中转化环节是主要的限制因素之一。

目前,有关盐藻的转化方法仅有基因枪法<sup>[5]</sup>和电穿孔法<sup>[6]</sup>,并且二者均需要昂贵的仪器设备、操作繁琐、试验耗材成本高、转化率低且外源基因呈瞬时表达等缺陷。至今为止,在其它藻类中已经建立起

Received: September 6, 2006; Accepted: November 29, 2006.

This work was supported by the grants from the Special Foundation for Training of Doctoral Students from Institutions of Higher Learning, Ministry of Education of China(No. 20050459007); National Natural Science Foundation of China(No. 30600006).

\* Corresponding author. Tel: +86-371-66658332; Fax: +86-371-66658356; E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn

教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20050459007)和国家自然科学基金项目(No. 30600006)资助。http://journals.im.ac.cn

多种较为成熟的方法,如在莱茵衣藻中,除了基因枪法<sup>[7]</sup>和电穿孔法<sup>[8]</sup>之外,还成功建立起农杆菌介导法<sup>[9]</sup>、硅晶须法<sup>[10]</sup>和玻璃珠转化法<sup>[11]</sup>,其中玻璃珠转化法的转化率非常高,约为 $10^3$ 个细胞/ $\mu\text{g}$ 质粒。为此,本研究尝试性地利用玻璃珠转化法转化盐藻,以克服目前盐藻转化方法的不足。通过玻璃珠法转化盐藻,结果显示外源基因 GUS 在盐藻细胞中成功得到了表达,表明玻璃珠转化法能够运用到盐藻的转化中去。同时,本研究对转化时间、转速、PEG 和质粒 DNA 的用量等因素做了最佳条件筛选,现对其过程和结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 藻株及质粒:**杜氏盐藻(*D. salina*, UTEX 1644 Teod)购自美国德州大学(The University of Texas, USA),培养基为 PKS 液体培养基<sup>[12]</sup>。质粒(pBI221-bar)由中国科学院遗传与发育学研究所孙勇如教授惠赠。质粒经扩增后采用质粒提取试剂盒提取,质粒的浓度经 1% 琼脂糖凝胶电泳测定,终浓度为 $0.55\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

**1.1.2 玻璃珠及其处理过程:**玻璃珠购自 Thomas 公司,10g 包装,直径为 $0.45\sim 0.52\text{mm}$ 。由于商品化的玻璃珠已经过酸处理,试验过程中直接用蒸馏水冲洗、烘干,用锡纸包裹分装,然后于 $200^\circ\text{C}$ 烘箱中烘烤灭菌 2h 后备用。

**1.1.3 主要试剂:**PEG 6000 购置于 Sigma 公司,使用时配制成 20%(W/V)浓度的工作液,经高压灭菌后备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 盐藻的转化:**实验所用盐藻首先从固体培养板中挑取单藻落,接种 5mL 液体培养基试管培养 10d。然后接种三角烧瓶扩大培养 30mL(10%的接种量),培养 7d 后细胞计数,其浓度达到 $10^6$ 个细胞/mL。取盐藻 $800\mu\text{L}$ ,加入 $100\mu\text{L}$  PEG 工作液,混匀后加入 $50\mu\text{L}$ 质粒 DNA,然后加入灭菌好的玻璃珠 300mg,在 WH-966 型旋涡混合器上以 2000r/min 连续涡旋 6s,沉淀玻璃珠后移到 5mL 无菌试管中,暗培养 8h,然后正常光照培养(光/暗:14/10h)40h,离心收集细胞,参考 Jefferson 法<sup>[13]</sup>固定染色,镜检观察计数。同时,设阴性对照和空白对照组,阴性对照组为不加入质粒 DNA,其余操作过程相同;空白对照组为直接取盐藻细胞固定染色,不加入任何试剂。本实验每一转化管均设有两组重复管,该转化实验

并进行了 3 次以上重复试验,力求结果科学可靠。另外,本研究进行了转化株的稳定表达分析,在转化的第 2 天、第 3 天、第 4 天和第 5 天分别做了 GUS 表达的染色检测,以确定报告基因的表达稳定性。

**1.2.2 转化时间和转速对转化结果的影响:**盐藻转化过程同上所述,即在 $800\mu\text{L}$ 盐藻中加入 $100\mu\text{L}$  PEG,混匀后加入 $50\mu\text{L}$ 质粒 DNA,在 300mg 玻璃珠存在的情况下,分别采用 600、1200、1800 和 2400 r/min 四个转速梯度进行涡旋 6s,比较转化结果。另外,在相同条件下以 2000r/min 转速分别进行 3、6、12 和 18s 四个时间梯度的连续涡旋,比较其转化结果,最终筛选出最佳的转化时间和转速。

**1.2.3 PEG 浓度和质粒 DNA 浓度对转化结果的影响:**在 $800\mu\text{L}$ 盐藻中分别加入 50、100、150 和 $250\mu\text{L}$ 四个梯度的 PEG,补加 PKS 液体培养基,使各管体积相同,混匀后加入 $50\mu\text{L}$ 质粒 DNA,采用 2000r/min 连续涡旋 6s 以比较 PEG 量对转化结果的影响。同时,在相同条件下加入 $100\mu\text{L}$  PEG,混匀后分别加入 60、90、120 和 $150\mu\text{L}$ 四个梯度的质粒 DNA,同时补加 PKS 液体培养基,使各管体积一致,以确定最佳的质粒加入量。

**1.2.4 最佳转化条件下盐藻的转化结果:**以上述实验结果确定的最佳转化条件组合(转速、转化时间、PEG 和质粒 DNA 的用量等)转化盐藻,转化过程同上,最终记录转化结果,计算转化率和转化效率。

**1.2.5 统计学分析:**采用统计学分析软件 SPSS 11.0 软件包,对不同转化条件下统计的转化盐藻细胞数目进行了 *t* 检验,检验水准  $P < 0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐藻转化结果

玻璃珠法转化盐藻并经组织化学染色后镜检观察,可观察到盐藻细胞已被成功转化。成功转化的盐藻细胞呈现蓝色(图 1,箭头所指),而阴性对照和空白对照没有细胞呈蓝色。该结果表明,利用玻璃珠转化法已将 pBI221-bar 质粒成功转入盐藻细胞, GUS 基因得到了成功的表达。

在盐藻玻璃珠转化的重复试验中,转化结果曾出现 GUS 基因低表达的现象,如图 2A 所示,即整个盐藻细胞没有完全呈现蓝色,而是细胞的一部分呈现蓝色,阴性对照和空白对照没有蓝色显示。对 GUS 基因的稳定表达分析说明:在转化后的第 3 天开始,已表达 GUS 基因的盐藻转化细胞(呈现蓝色)逐渐失去蓝颜色,变成黄色,呈现未转化细胞的形

态 转化后的第 4 天 ,呈现蓝色的细胞数更少 ,在转化后的第 5 天 ,转化细胞已几乎全部变成了黄色细

胞( 图 2B ) ,GUS 基因完全失去了表达。

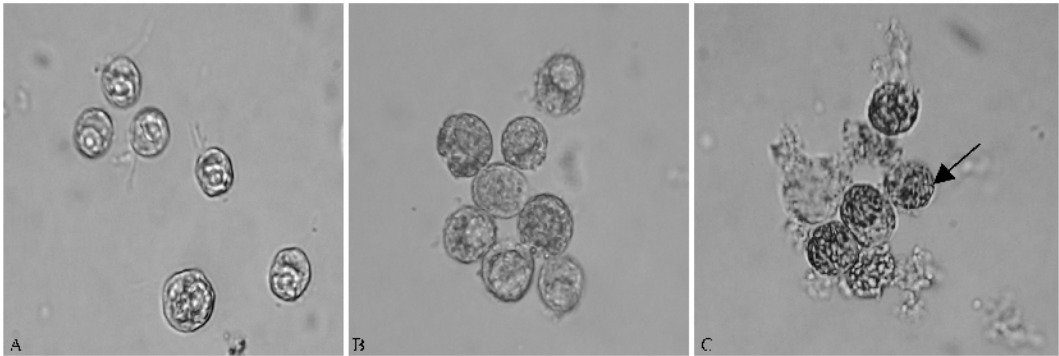


图 1 GUS 基因在盐藻细胞中表达的组织化学染色( 400 × )

Fig.1 Histochemistry stain of the GUS gene expression in *Dunaliella salina* cell( 400 × )

A : negative control ; B : blank control ; C : positive transformants .

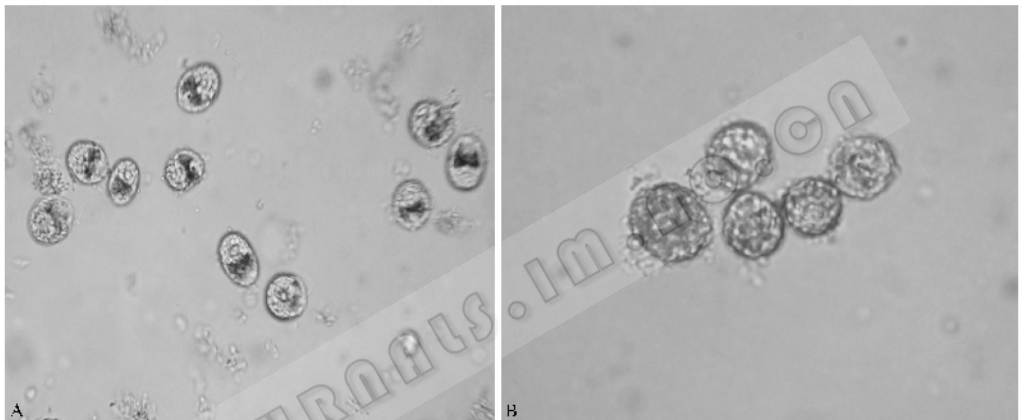


图 2 GUS 基因低表达

Fig.2 Morphology of the *D. salina* cells in which GUS gene was lower expressed ( A ) and losed ( B )

2.2 转化时间和转速对转化结果的影响

转化时间对转化结果的影响分析表明 :在 4 个时间梯度 3、6、12 和 18s 中 ,转化时间为 12s 时 ,得到的转化盐藻细胞数最多 ,但随着转化时间的逐渐增加 ,细胞转化数并没有明显的增加 ,故确定最佳的转化时间为 12s( 图 3 )。而转速对转化影响的结果表明 :在 4 个转速梯度 600、1200、1800 和 2400r/min 中 ,随着转速的增加 ,盐藻转化数目也逐渐增加 ,在 2400r/min 时盐藻的转化数达到最高( 图 4 )。

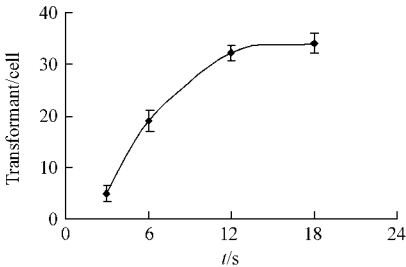


图 3 转化时间对转化结果的影响

Fig.3 Effect of transform consecutive time on transform efficiency

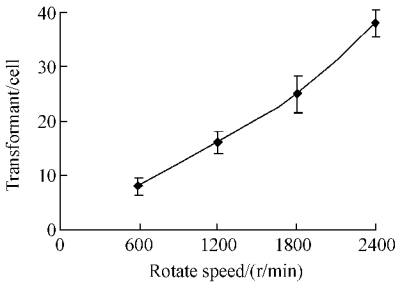


图 4 转速对转化结果的影响

Fig.4 Effect of rotate speed on transform efficiency

2.3 PEG 浓度和质粒 DNA 浓度对转化结果的影响

PEG 加入量对盐藻转化结果的影响表明 :当加入 150μL PEG 时 ,转化的盐藻细胞数最高。当 PEG 的加入量达到 250μL 时 ,细胞的转化数不但没有增加 ,反而却迅速降低( 图 5 )。质粒 DNA 浓度对转化结果的影响表明 :质粒加入量为 120μL 时细胞的转化数最高。如果继续增加质粒 DNA 的量 ,细胞的转化数没有明显的变化 ,从而确定该点为最佳的质粒

加入量(图6)。

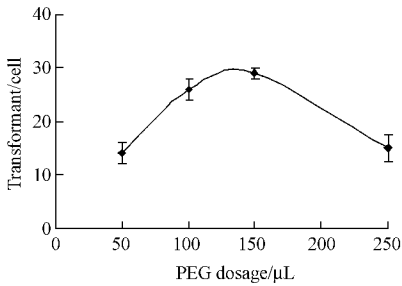


图5 PEG用量对转化结果的影响

Fig.5 Effect of PEG dosage on transform efficiency

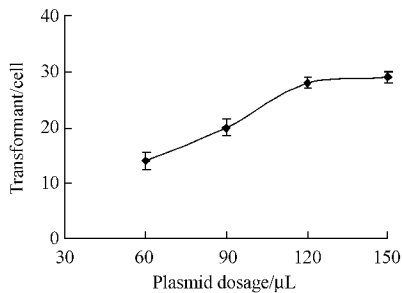


图6 质粒加入量对转化结果的影响

Fig.6 Effect of plasmid dosage on transform efficiency

2.4 最佳转化条件下盐藻的转化结果

盐藻转化的单因素分析结果说明,在 800 $\mu\text{L}$  盐藻(  $10^6$  个细胞/ $\text{mL}$  )中加入 150 $\mu\text{L}$  PEG 和 90 $\mu\text{L}$  质粒,在 300mg 玻璃珠存在的条件下,于转速 2400r/min 涡旋 12s 能够得到理想的转化结果。在此优化条件下进行了盐藻转化,转化率最高达到 59 个转化子/100 个细胞,转化效率约为 100 个转化子/ $\mu\text{g}$  DNA。

3 讨论

为尽快完善盐藻生物反应器,以期及早地生产外源性蛋白,基因工程操作环节中的转化步骤较为关键。鉴于目前盐藻转化方法的不足<sup>[5,6]</sup>,同时为了进一步提高外源基因的转化效率,本研究已成功建立起盐藻的玻璃珠转化法。该方法利用玻璃珠的研磨作用,在盐藻细胞表面造成短暂的孔隙,同时利用 PEG 的聚合作用,使得外源质粒进入到细胞内部,进而与盐藻基因组得以整合和表达。本研究在转化盐藻的过程中,对影响转化的不同因素进行了分析比较,优化了不同的转化条件。在四种影响因素中,转速对转化结果的影响较明显。随着转速的增高,细胞的转化率也在逐渐升高,但由于试验所用 WH-966 型旋涡混合器最高转速为 2400r/min,无法继续增加其转速,所以选择转速 2400r/min 作为最佳转速。而在比较转化时间对转化的影响中,持续时间为 3s

时,细胞的转化率几乎为零,持续时间达 6s 时,细胞的转化数迅速增加,持续时间达 12s,细胞的转化数达到最高。随着持续时间的进一步延长,转化率并没有太大的变化,以此确定最佳的转化持续时间为 12s,该结果与衣藻的转化时间和细胞转化数变化较一致<sup>[11]</sup>。

PEG 和质粒加入量对转化影响的分析说明,PEG 最佳用量为 150 $\mu\text{L}$ ,该用量略低于衣藻转化的 PEG 用量<sup>[11]</sup>。当 PEG 的加入量小于 150 $\mu\text{L}$  时,盐藻的转化数较低,没有达到最高值,然而,当 PEG 加入量达到 250 $\mu\text{L}$  时,细胞的转化率不但没有升高,反而出现了迅速降低现象。究其原因可能是由于 PEG 浓度太高,聚合作用太强,进而使细胞凝聚成团,大大影响到细胞的分散性,造成转化结果明显降低。图 7 显示了质粒 DNA 浓度对转化的影响,当加入质粒 DNA 的量低于 120 $\mu\text{L}$  时,细胞的转化数随着质粒量的增加而逐渐升高。但超过最佳值(120 $\mu\text{L}$ )时,细胞转化率变化不明显。转化盐藻质粒 DNA 的最佳加入量和转化衣藻相比较,其明显高于衣藻的质粒 DNA 加入量<sup>[11]</sup>,这可能受盐藻的不同转化条件和生长状态影响所致。综合盐藻转化的单因素分析结果,利用最佳的组合条件进行了转化盐藻分析,其转化效率可达到 100 个转化子/ $\mu\text{g}$  DNA,但该转化效率还是明显低于衣藻的转化效率,这可能与其它转化因素和条件有关<sup>[11]</sup>。另外,在不同批次盐藻的转化中,出现了 GUS 基因低表达的现象,即盐藻细胞部分呈现蓝色,整个细胞没有完全呈蓝色(图 2),但此时细胞的转化率非常高。造成基因 GUS 低表达的原因可能有,一是由于外源基因是随机插入到盐藻基因组中,插入的位置和基因的数目不同,造成外源基因在盐藻中表达量的差异,从而出现表达量较低现象,也可能因为盐藻生长状态的影响,培养时间较长的盐藻细胞影响到质粒的整合,进而造成表达量较低的现象。关于盐藻生长状态对转化的影响,本文没有进行深入的探讨。

GUS 基因的稳定表达分析表明:在转化后的第 3 天开始,蓝色的盐藻转化细胞逐渐失去颜色变成黄色,呈现未转化细胞的形态;转化后的第 4 天,蓝色的转化细胞数更少,在转化后的第 5 天,转化的蓝色细胞几乎全部变成了黄色(图 3),GUS 基因完全失去了的表达。该结果说明,外源基因 GUS 在盐藻细胞中的表达为瞬时表达,该结果与耿德贵等<sup>[14]</sup>报道的结果一致。造成基因瞬时表达的原因可能与载体构建和宿主细胞自身的保护机制有关,需重新构

建转化载体并优化转化条件,以期待外源基因能够在盐藻中持续稳定地表达。

综合本研究结果表明,已成功地建立起盐藻的玻璃珠转化法,且此方法较其它方法具有更简单、方便快捷和经济性等优点。该方法的成功建立为盐藻的基因工程研究工作提供了有力工具,加快了盐藻生物反应器的成熟步伐,以期待及早地实现外源性物质的生产。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Ben-Amotz A, Shaish A, Avron M. The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of  $\beta$ -Carotene rich algae. *Bioresour Technol*, 1991, **38**: 233 – 235.
- [ 2 ] Walker TL, Purton S, Becker DK, *et al.* Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep*, 2005, **24**( 11 ): 629 – 641.
- [ 3 ] Nikookar K, Moradshahi A, Hosseini L. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomol Eng*, 2005, **22**( 4 ): 141 – 146.
- [ 4 ] Xue LX, Pan WD, Jiang GZ, *et al.* *Dunaliella salina* as a bioreactor, China patent, CN00131217.0.
- [ 5 ] Tan C, Qin S, Zhang Q, *et al.* Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *Microbiol*, 2005, **43**( 4 ): 361 – 365.
- [ 6 ] Sun Y, Yang Z, Gao X, *et al.* Expression of foreign genes in *dunaliella* by electroporation. *Mol Biotechnol*, 2005, **30**( 3 ): 185 – 192.
- [ 7 ] Kindle KL, Schnell RA, Fernandez E, *et al.* Stable nuclear transformation of *chlamydomonas* using the *chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *The Journal of Cell Biology*, 1989, **109**: 2589 – 2601.
- [ 8 ] Brown LE, Sprecher SL, Keller LR. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**: 2328 – 2332.
- [ 9 ] Kumar SV, Misquitta RW, Reddy VS, *et al.* Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 2004, **166**: 731 – 738.
- [ 10 ] Dunahay TG. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques*, 1993, **15**: 452 – 460.
- [ 11 ] Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 1228 – 1232.
- [ 12 ] Fisher M, Pick U, Zamir A. A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. *Plant Physiol*, 1994, **106**: 1359 – 1365.
- [ 13 ] Jefferson RA, Knvnanagh TA, Bevan MW. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, **6**: 3901 – 3907.
- [ 14 ] Geng DQ(耿德贵), Wang YQ(王义琴), Li WB(李文彬), *et al.* Transient expression of GUS gene in *Dunaliella salina*. *High Technology Letters*(高技术通讯), 2002, **12**( 2 ): 35 – 39.