

杜氏盐藻电击转化方法的系统优化

吕朋举, 闫红霞, 李杰, 刘红涛, 卢雪景, 薛乐勋

郑州大学生物工程系 细胞生物学研究室, 郑州 450052

摘要: 本研究系统分析了盐藻生长状态、电击条件、电击缓冲液成分和质粒浓度等条件对电击转化效率的影响。实验结果表明: 正常接种后培养 7 d 对数生长中期的盐藻细胞, 在 25 μ F、0.8 kV 的电击条件下加入终浓度为 10 μ g/mL 的质粒可使盐藻电击转化效率达到 1.85%; 电击缓冲液中加入 0.4 mol/L 的甘油可使转化效率显著提高至 2.03% ($P < 0.05$)。在上述优化电击体系下, 运用 3 种不同质粒分别转化盐藻细胞后获得的转化效率无显著差异。通过对电击转化中相关因素的优化, 本研究建立了一种适用于杜氏盐藻的高效稳定的电击转化体系, 为杜氏盐藻的转基因研究提供有效方法。

关键词: 杜氏盐藻, 电击, 转化效率

An optimal electroporation system for *Dunaliella salina*

Pengju Lü, Hongxia Yan, Jie Li, Hongtao Liu, Xuejing Lu, and Lexun Xue

Laboratory for Cell Biology, Department of Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: To optimize the electroporation system in *Dunaliella salina* (*D. salina*), we studied the effects of growth phase of cells, electric parameters, electroporation buffer and concentration of plasmid on transformation efficiency. The results showed that a transformation efficiency of 1.81% was achieved in *D. salina* cells at mid-log growth phase electroporated with plasmid (DCA-bar) 10 μ g/mL, voltage 0.8 kV and capacitance 25 μ F. However, when glycerol was added to electroporation buffer at a final concentration of 0.4 mol/L, the transformation efficiency was increased up to 2.03%. Additionally, transformation was done with plasmids DCA-bar, NR-bar, pU Ω -bar respectively, under above optimum conditions, and similar transformation efficiencies were obtained. The findings indicate that an efficient and stable system of electroporation in *D. salina* has been developed, providing a powerful tool for the transgenic research of *D. salina*.

Keywords: *Dunaliella salina*, electroporation, transformation efficiency

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)是一种无细胞壁的单细胞真核绿藻, 是已知最耐盐的真核生物之一。由于其简单的细胞结构以及便利的培养条件, 并且自身营养丰富, 使杜氏盐藻成为一种进行转基因研究的理想材料^[1,2]。近年来, 本实验室致力于将杜氏盐藻开发作为一种新型的生物反应器。但迄今为止,

尚不能真正高效的表达外源基因产物, 转化效率低下和不稳定被认为是主要影响因素之一。建立适用于盐藻的高效转化体系将非常有益于这一问题的解决。

目前, 已有采用基因枪法^[3-6]、玻璃珠法^[7,8]、超声波法^[9]转化盐藻获得成功的报道, 但在转化操作

Received: November 5, 2008; **Accepted:** February 16, 2009

Supported by: International Cooperative Project of of the National Science and Technology Ministry (No. 2007DFA01240), National Natural Science Foundation of China (Nos. 30700014, 30600006).

Corresponding author: Lexun Xue. Tel: +86-371-66658332; E-mail: xuelx@371.net

科技部国际科技合作项目(No. 2007DFA01240), 国家自然科学基金项目(Nos. 30700014, 30600006)资助。

中多照搬其他微藻的操作方法, 转化效率低且不稳定。在前期的杜氏盐藻转基因研究中, 本实验室的吕玉民等^[3]、潘卫东等^[6]采用基因枪法转化盐藻均获得了成功, 但由于基因枪法对操作人员要求较高, 且成本昂贵, 不适用于建立转化率相对稳定的标准转化程序。而由 Brown 等^[10]首次引入藻类遗传转化的电击法, 操作简便、成本低廉、能够有效减少操作人员对转化结果的影响, 很适于建立标准的转化程序。耿德贵等^[11,16]、孙煜等^[12]也先后报道了采用电击法成功转化盐藻细胞的实验。本实验室^[13,14]已多次采用电击法转化盐藻并获得了成功。然而到目前为止, 尚未见有针对盐藻细胞结构特点, 对盐藻电击转化方法进行系统优化以获得理想转化效率的报道。本研究首次系统分析了盐藻生长状态、电击参数、电击缓冲液成分以及质粒用量对杜氏盐藻电击转化效率的影响, 旨在建立适用于杜氏盐藻的高效电击转化体系, 为杜氏盐藻转基因研究提供能获得较稳定转化效率的标准电击转化程序。

1 材料和方法

1.1 盐藻藻株与培养

杜氏盐藻 UTEX LB-1644, 购自美国德克萨斯州立大学。盐藻的液体培养采用改良的 PKS 盐藻培养基^[2], 固体培养基额外添加 0.6% 琼脂。盐藻接种初始密度 2×10^5 个/mL。培养条件为: 温度 26°C, 光照强度 4500 Lux, 光照培养和暗培养各 12 h。

1.2 质粒 DNA 制备

质粒 DCA1-bar(D-B)和 NR-bar 由本实验室构建并保存, 分别由盐藻双碳酸酐酶基因(DCA1)启动子和硝酸还原酶基因(NR)启动子驱动, pUΩ-bar 由 ubil-Ω启动子驱动。3 种质粒均含有草丁膦抗性基因 *bar*。所有质粒在 *E. coli* JM109 中培养扩增, 用碱裂解法提取纯化, 并在 260 nm 测定光吸收值定量。

1.3 电击转化

室温 2000 r/min, 5 min 离心收集细胞, 用新鲜培养基清洗一次, 用 2×HEPES 电击缓冲液重悬盐藻细胞达到密度 $1.2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL; 取 400 μL 混合液加入预冷的 0.2 cm 的电击杯中, 加入质粒, 混匀后冰浴 10 min; 设定电击参数进行电击, 电击后冰浴 5 min, 最后 4000 r/min, 5 min 离心收集细胞, 1 mL 新鲜培养基重悬并静置恢复培养 24 h。取

$1.2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 个细胞涂布于含有 6 μg/mL 草丁膦 (Phosphinothricin, PPT) 的盐藻固体筛选培养基上, 每次涂布 3 个平板; 同样涂布非筛选培养基。同时涂布未加质粒电击的藻株于筛选培养基上作为对照。培养 15 d 后计算平板上单藻落数目, 转化效率以筛选培养基上单藻落数目与非筛选培养基上的单藻落的比值表示。

1.4 玉米淀粉固体涂板法

研碎的玉米粉经筛选后, 用无水乙醇清洗 3 次, 祛除色素, 75%乙醇浸泡保存。涂布平板前离心, 用杜氏盐藻培养基清洗 3 次, 重悬密度至 30%(W/V)。与悬浮盐藻细胞以 1:1 的比例混合涂布平板。

1.5 PPT 抗性转化株鉴定

转化细胞于固体筛选培养基上培养 15 d 后, 随机挑取 50 个单藻落, 液体培养 15 d, 分别提取盐藻总 RNA 和基因组 DNA, PCR 扩增 *bar* 基因, RT-PCR 产物送测序, 基因组 PCR 产物经检测后通过标准 Southern blotting 程序进行分析。

1.6 统计学分析

试验中每项处理均重复 3 次。数据运用 SPSS 统计软件进行独立性 *t* 检验, $P < 0.05$ 表明差异显著。

2 结果

2.1 通过添加固体玉米淀粉支持物提高盐藻植板率

细胞壁缺陷的莱茵衣藻在普通的固体平板培养基培养过程中, 由于培养基表面失水, 细胞易裂解死亡, 使衣藻固体培养植板率低下^[15]。针对杜氏盐藻无细胞壁的特点, 本研究尝试在培养基表面分别添加蔗糖、淀粉、矿物油作为支持物, 结果发现添加玉米淀粉作为支持物能显著提高盐藻植板率 ($P < 0.05$)。在未添加玉米淀粉支持物的情况下, 杜氏盐藻植板率仅为 58.4%, 添加玉米粉支持物后植板率达到 87.1%。添加蔗糖或矿物油则未见明显效果 (数据未显示)。因此, 在随后的实验中都添加玉米淀粉作为支持物。

2.2 不同电击条件对细胞存活率的影响

根据盐藻细胞无细胞壁的独特结构特点, 参照植物细胞和动物细胞的转化条件, 分别研究了电容 3 μF (适用于植物细胞)、10 μF 和 25 μF (适用于动物细胞) 条件下电压对杜氏盐藻细胞电击存活率的影响, 电击后 12 h 用血球计数板计数, 计算细胞存活

率。结果显示, 盐藻细胞的电击存活率在 3 μF 、1.4 kV, 10 μF 、0.9 kV, 25 μF 、0.8 kV 电击条件下达到 50%左右(图 1)。同时也研究了不同生长状态对细胞电击存活率的影响, 分别取对数生长前期、中期、后期即接种后培养 5 d、7 d、10 d 的盐藻细胞在电容 25 μF 条件下进行电击。结果表明, 生长 5 d 的盐藻细胞存活率最高, 生长 10 d 的最低(图 2)。另外由图 1、2 可见, 电压对细胞存活率影响显著, 随着电击电压的升高, 细胞存活率明显下降($P < 0.05$)。

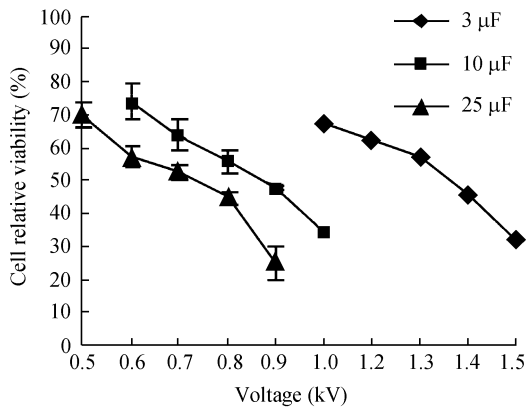


图 1 不同电击参数对细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of electroporation parameters on cell viability.

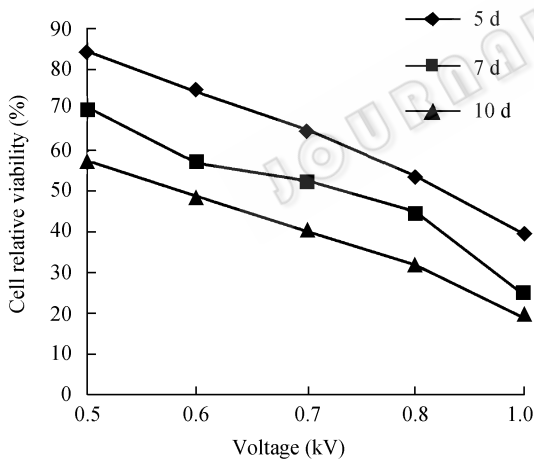


图 2 不同生长状态对盐藻细胞存活率的影响

Fig. 2 Effects of growth phase on cell viability.

2.3 不同电击参数对盐藻转化率的影响

取对数生长期盐藻细胞, 加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质粒, 分别设置电容为 25 μF 、10 μF 、3 μF , 在不同电压下进行电击转化。结果表明: 电击转化率在 25 μF 、0.8 kV 的电击条件下最高, 达到 1.85%, 其次分别为 10 μF 、0.9 kV 和 3 μF 、1.3 kV(图 3)。

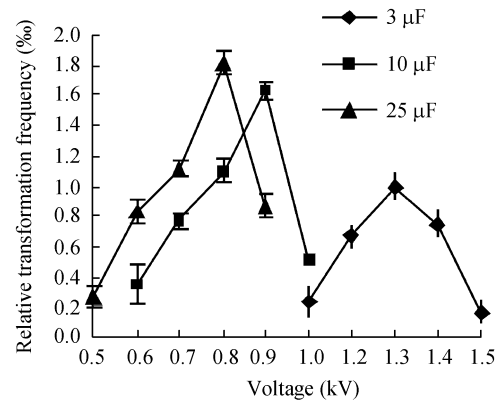


图 3 不同电击参数对细胞转化效率的影响

Fig. 3 Effects of electroporation voltage on transformation efficiency.

2.4 不同生长时期对盐藻转化率的影响

分别取处于对数生长前期(5 d)、中期(7 d)、后期(10 d)的盐藻细胞, 加终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质粒, 在电容 25 μF 、不同电压条件下进行电击转化。结果显示, 0.8 kV 电压下, 对数生长中期即 7 d 的盐藻细胞具有最好的转化效果, 要高于 5 d 和 10 d(图 4)。

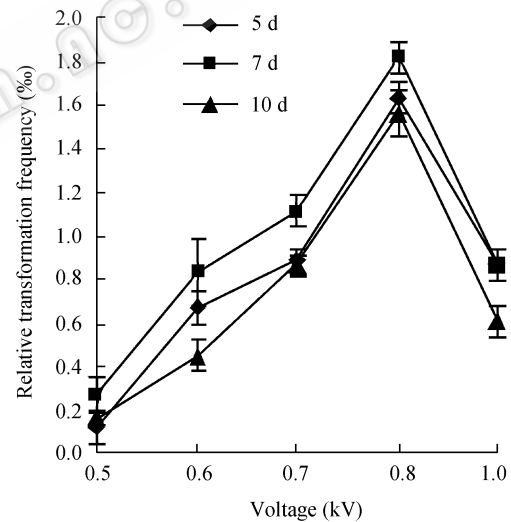


图 4 不同生长时期细胞对盐藻转化效率的影响

Fig. 4 Effects of growth phase of *Dunaliella salina* on transformation efficiency.

2.5 电击缓冲液中不同甘油浓度对盐藻转化率的影响

盐藻细胞无细胞壁, 主要通过细胞内的甘油维持渗透压平衡和细胞完整性, 因此在电击过程中维持盐藻的渗透压就显得极为重要。电击过程中, 通过传统电击缓冲液^[16]基础上添加甘油可以平衡电击前后渗透压变化。本研究结果显示, 在电击缓冲液中添加 0.4 mol/L 甘油可显著提高盐藻的电击转化

效率($P < 0.05$), 使转化率达到 2.03%, 电击缓冲液中甘油浓度过大反而降低转化效率(图 5)。

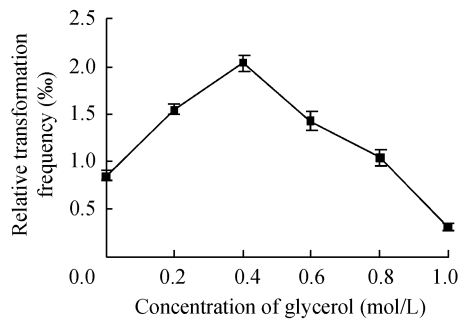


图 5 电击缓冲液中甘油浓度对转化效率的影响

Fig. 5 Effects of glycerol concentration in electroporation buffer on transformation efficiency.

2.6 不同质粒浓度对盐藻转化率的影响

在相同电击参数 25 μ F、0.8 kV 的条件下添加不同浓度的 DB 质粒, 转化盐藻细胞。结果显示, 一定范围内质粒浓度的增加可以提高转化效率, 当质粒浓度达到 10 μ g/mL 时, 转化率达到最大值。质粒浓度继续增加, 转化率反而急剧降低(图 6)。

2.7 不同质粒转化效率的比较

实验中比较了不同质粒用上述优化的电击转化体系转化的差异。将 2 种不同启动子驱动的质粒 NR-bar 和 pU Ω -bar 在优化的电击体系下分别进行电击转化,

结果显示, 2 种质粒的转化效率分别为 1.98‰和 2.01‰与此前所的转化效率没有明显差异($P > 0.05$)。

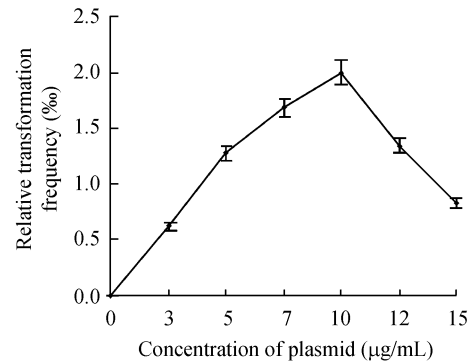


图 6 质粒浓度对细胞转化率的影响

Fig. 6 Effects of plasmid (D-B) concentration on transformation efficiency.

2.8 PPT 抗性转化株的鉴定

随机挑取抗性单藻落扩大培养后提取总 RNA 和基因组 DNA, 利用 RT-PCR 扩增 *bar* 基因, 测序结果证实均为 *bar* 基因序列, 阳性率为 100%。图 7 显示部分抗性株 PCR 电泳检测结果。

对部分单克隆基因组 PCR 产物进行 Southern blotting 分析, 结果显示, 单藻落的杂交结果均为阳性, 大小与质粒对照一致, 证实扩增产物为 *bar* 基因(图 8)。

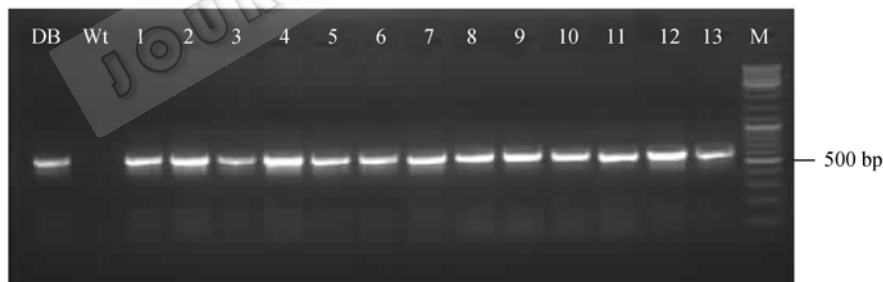


图 7 抗性株 *bar* 基因 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 7 RT-PCR of PPT resistant isolates. DB: plasmids; Wt: wild type; 1-13: transformants; M: marker.

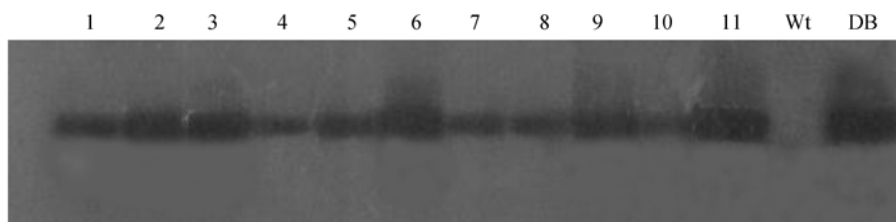


图 8 Southern blotting 鉴定抗性株 *bar* 基因组 PCR 产物

Fig. 8 PCR-Southern blotting of PPT resistant isolates. DB: plasmids; Wt: wild type; 1-11: transformants.

3 讨论

影响藻类电击转化的因素主要有电击电压、质粒浓度、电击缓冲液组成、藻种状态等^[15,17]。通过对上述影响因素的优化可以有效提高转化效率。Shimogawara 等^[15]就曾通过对电击方法的优化使莱茵衣藻的转化效率从 10^3 个转化子/ μg DNA 提高到 10^5 个转化子/ μg DNA。

本研究针对盐藻细胞结构特点,首先进行了提高盐藻植板率的试验。盐藻细胞无细胞壁,这为外源基因的导入提供了便利,但也增加了涂布过程和电击过程中细胞裂解的几率。本研究尝试添加玉米淀粉作为支持物提高植板率取得了明显的效果,其原因可能有 2 个:一是玉米淀粉的颗粒可以为盐藻细胞提供涂布过程中的保护,提高盐藻细胞在涂布过程中的存活数量;二是玉米淀粉的存在减少了水分的流失,使盐藻能形成良好的单藻落。盐藻植板率的提高为电击转化率的提高奠定了基础。

实验过程中发现,传统的电击缓冲液并不适用于盐藻,针对盐藻独特的渗透调节机制^[1],在普通电击缓冲液中加入终浓度为 0.4 mol/L 甘油可以减少由于渗透压变化造成的盐藻大量死亡,从而显著提高转化率。但是值得注意的是甘油浓度过大,可使细胞紧缩,反而影响外源基因的进入,导致电击转化效率的降低。

盐藻的生长状态是影响外源基因转化的重要因素之一。本实验中分别选取处于对数生长前期(5 d)、中期(7 d)、后期(10 d)的盐藻细胞进行转化。结果表明,对数前期的藻种存活率普遍要高于中期和后期的藻种(图 1),但中期(7d)的藻种可获得最高的转化率(图 5)。原因可能是处于对数中期的藻种处于旺盛生长状态,对外界环境比较敏感,对外源基因吸收能力较强。处于对数生长前期的藻种,细胞分裂较少,外源基因不易整合进基因组中。而后期的藻种处于对数晚期,在转化实验操作中死亡较多,从而转化率较低,这与此前耿德贵等^[16]盐藻转化率在对数生长前期最高的报道不太一致。

电压和电容是影响电击转化效率的重要因素。Brown 的研究结果表明,电击转化后细胞存活率在 50%左右时转化率达到最大值^[3]。与此结果一致,本研究发现盐藻细胞存活率在电容和电压分别为

25 μF 、0.8 kV, 10 μF 、0.9 kV, 3 μF 、1.3 kV 时达到 50%左右,此时转化率较高。但最高的转化率出现在 25 μF 、0.8 kV 处,提示电压与电容的相互关系对电击转化率有重要影响,高电容低电压可以降低对盐藻细胞的伤害,提高细胞存活率,从而提高转化效率。

此前的研究结果显示,在一定范围内提高质粒浓度可以提高转化效率^[8,11,12],这在本研究中也得到了证明,但与上述报道不同的是,在本研究中,质粒浓度超过 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,转化率反而急剧下降。这可能是由于质粒浓度过大时,可在盐藻细胞膜表面聚集成团,增加外源 DNA 进入盐藻细胞的难度,从而影响了转化效率。此外,本研究还对线性质粒和环状质粒的转化效率进行了比较。本实验结果表明质粒的存在形式对盐藻的稳定转化效率并无明显影响(数据未显示),与部分盐藻相关报道不同^[8,12]。这是否与质粒的稳定或者瞬时表达的机理有关尚需进一步研究。

为了对系统优化得到的标准电击程序的稳定性进行验证,不同质粒在同一电击条件下被分别转化盐藻细胞,无明显差别的转化效率证明本研究通过对电击转化相关因素的系统优化,建立了一个适用于杜氏盐藻且转化效率相对稳定的电击转化体系,为盐藻的转基因研究提供了有力工具。

REFERENCES

- [1] Ginzburg M. *Dunaliella*: A green alga adapted to salt. *Adv Bot Rev*, 1987, **14**: 93-183.
- [2] Fisher M, Gokhmon I, Pick U, *et al.* A structurally novel transferring-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. *Biol Chem*, 1997, **272**(3): 1565-1570.
- [3] Lu YM, Xie H, Niu XL, *et al.* Transfer of *bar* gene to *Dunaliella salina* by microprojectile delivery and detection of transgenic alga. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2004, **39**(1): 31-35.
吕玉民, 谢华, 牛向丽, 等. 用基因枪法将 *bar* 基因导入杜氏盐藻及转基因藻株的检测. 郑州大学学报(医学版), 2004, **39**(1): 31-35.
- [4] Li J, Ren HW, Huang JH, *et al.* Transient expression of reporter gene *EGFP* in transformed *Dunaliella salina*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2003, **19**(3): 338-342.
李杰, 任宏伟, 黄洁虹, 等. 外源报告基因 *EGFP* 在盐藻中实现瞬时表达. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, **19**(3): 338-342.

[5] Tan C, Qin S, Zhang Q, *et al.* Establishment of a microparticle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *Microbiol*, 2005, **43**(4): 361–365.

[6] Pan WD, Yuan BM, Xie H, *et al.* Construction of transformation vector pDS16S-CAT for chloroplast of *Dunaliella Salina*. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2004, **39**(1): 25–28.
潘卫东, 袁保梅, 谢华, 等. 杜氏盐藻叶绿体转化载体 pDS16S-CAT 的构建. 郑州大学学报(医学版), 2004, **39**(1): 25–28.

[7] Jin ES, Polle JE, Melis A. Involvement of zeaxanthin and of the *cbr* protein in the repair of photosystem from photoinhibition in the green alga *Dunaliella salina*. *Bioenergetics*, 2001, **1506**(3): 244–259.

[8] Feng SY, Jia YL, Liu HT, *et al.* Transformation of *Dunaliella salina* by using glass beads—a novel transformation method. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(2): 358–362.
冯书营, 贾岩龙, 刘红涛, 等. 杜氏盐藻玻璃珠新型转化方法的建立. 生物工程学报, 2007, **23**(2): 358–362.

[9] Liu HY, Ling JQ, Mai S. A study of recombinant *Dunaliella salina* vaccine against dental caries—Transform the chimera gene encoding SBR-CT^{ΔA1} into *Dunaliella salina* cells by ultrasonic treatment. *Chin J Conserv Dent*, 2006, **16**(3): 137–141.
刘红艳, 凌均荣, 麦穗. 转基因盐藻防龋疫苗的基础研究 I—超声转化编码嵌合体 SBR-CT^{A1} 基因. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2006, **16**(3): 137–141.

[10] Brown LE, Sprecher SL, Keller LR. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**(4): 2328–2332.

[11] Geng DG, Han Y, Wang YQ, *et al.* Construction of a system for the stable expression of foreign genes in *Dunaliella salina*. *Acta Bot Sin*, 2004, **46**(3): 342–345.

[12] Sun Y, Yang Z, Gao X, *et al.* Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Mol Biotechnol*, 2005, **30**(3): 185–192.

[13] Pan WD, Lu YM, Zhang GX, *et al.* Transcription activities of the *atpA* promoter of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast in *Dunaliella salina*. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2004, **39**(1): 35–38.
潘卫东, 吕玉民, 张贵星, 等. 莱茵衣藻叶绿体 *atpA* 启动子在杜氏盐藻中转录活性的检测. 郑州大学学报(医学版), 2004, **39**(1): 35–38.

[14] Chai YR, Wang TY, Hou GQ, *et al.* Construction of expression plasmid vectors containing the luciferase gene of an algae *Dunaliella salina*. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2004, **39**(1): 29–31.
柴玉荣, 王天云, 侯桂琴, 等. 杜氏盐藻荧光素酶基因表达载体的构建. 郑州大学学报(医学版), 2004, **39**(1): 29–31.

[15] Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, *et al.* High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*, 1998, **148**(4): 1821–1828.

[16] Geng DG, Wang YQ, Sun YR. Transient expression of *GUS* gene in *Dunaliella Salina*. *High Tech Lett*, 2002, **12**(2): 35–39.
耿德贵, 王义琴, 孙勇如. *GUS* 基因在杜氏盐藻细胞中的瞬时表达. 高技术通讯, 2002, **12**(2): 35–39.

[17] Nishi T, Yoshizato K, Yamashiro S, *et al.* High efficiency *in vivo* gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following *in vivo* electroporation. *Cancer Res*, 1996, **56**(5): 1050–1055.

本期广告索引

企业	版位	企业	版位
东曹达(上海)贸易有限公司	封底	生物谷网站	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
赛默飞世尔科技有限公司	封三	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	泰州贝今生物技术有限公司	内页
上海同田生物技术有限公司	内页		