

بررسی روش‌های مختلف انتقال ژن به ریز جلبک *Dunaliella salina*

Assessment of some gene transformation methods in microalgae *Dunaliella salina*

محمدرضا صفرنژاد^۱، محمد علیمردانی^۲، عبدالقادر سعدی‌زاده^۲، مولود خلیلیان^۲، محمد حسین دانشور^۳، محمد علی ابراهیمی^۴،
غلامرضا صالحی جوزانی^{۲*}

۱- استادیار، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

۲- به ترتیب دانشجویان کارشناسی ارشد، دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

۳- استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز

۴- دانشیار، دانشگاه پیام نور، تهران

Safarnejad MR¹, Alimardani M², Sadizadeh A², Khalilian M², Daneshvar MH³, Ebrahimi MA⁴, Salehi Jouzani GH^{2*}

1. Assistant Professor, Agricultural Research Education and Extension of Iran, Research Institute of Plant Protection, Iran
2. MSc Students, Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj
3. Professor, Ramin University of Agriculture and Natural resources of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
4. Associate professor, Payamenor University, Tehran, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gsalehi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

ریز جلبک *Dunaliella salina* از جمله جلبک‌های سبز تک سلولی متحرک می‌باشد که دارای توانایی بسیار بالایی برای رشد در شرایط شور بوده و به دلیل دارا بودن مزایای مختلف به عنوان یک کارخانه سلولی سبز جهت تولید فرآورده‌های ارزشمند دارویی از قبیل واکسن‌ها، هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و سایر پروتئین‌های نو ترکیب مورد توجه می‌باشد. در این تحقیق روش‌های انتقال ژن خارجی به این ریز جلبک مورد بررسی قرار گرفته است. در اولین قدم و به منظور استفاده از نشانگرهای انتخابی در فرآیند انتقال ژن، آزمون تعیین میزان حساسیت به ترکیبات بازدارنده رشد از قبیل کانامایسین، هیگرومایسین، کلرامفنیکل و فسفینوتربسین انجام شد. نتایج این آزمون حاکی از حساسیت ریز جلبک به فسفینوتربسین در غلظت ۷ میکروگرم در میلی لیتر بود. برای انتقال ژن از روش‌های همزدن با ذرات شیشه، الکتروپوراسیون، آگروباکتریوم و بمباران با تفنگ ژنی استفاده شد. سازه‌های مورد استفاده در این تحقیق حاوی ژن‌های گزارشگر *gus*، ژن انتخابگر *bar* و همچنین ژن کدکننده آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت بی تحت کنترل پیشبرهای 35S و بویی کوئیتین بود. نتایج حاصله حاکی از موفقیت آمیز بودن روش استفاده از ذرات شیشه و همچنین تفنگ ژنی در فرآیند انتقال ژن بود. در این روش‌ها سلول‌های جلبک تراریخته قابلیت رشد خود را در محیط کشت حاوی نشانگر انتخابی فسفینوتربسین حفظ کرده و حضور و بیان ژن‌های خارجی و نشانگر انتخابی با روش‌های PCR و RT-PCR تایید شد. همچنین بیان ژن *gus* در سلول‌های تراریخته، با استفاده از رنگ آمیزی هیستوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی

انتقال ژن

ریز جلبک

ژن گزارشگر *gus*

واکسن هپاتیت ب

Dunaliella salina

مقدمه

ریز جلبک دونالیا از گروه جلبک‌های سبز (فتوستتزن کننده) تک سلولی می‌باشد که فاقد دیواره سلولی است. این جنس دارای گونه‌های متعددی است. گونه *Dunaliella salina* به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های آن، به عنوان کارخانه زیستی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و همچنین کاربرد صنعتی و غذایی مورد توجه واقع شده‌است. سایر گونه‌هایی که انتقال DNA خارجی به آنها گزارش شده *Dunaliella tetiolecta* و *Dunaliella viridis* می‌باشند (Borowitzka and Siva 2007). ریز جلبک *D. salina* در حال حاضر به عنوان بهترین منبع تجاری تولید بتاکاروتن طبیعی در جهان می‌باشد. به علاوه گونه‌های مختلف این جلبک می‌توانند مقادیر قابل توجهی از مواد شیمیایی با ارزش مثل کاروتنوئیدها، گلیسرول، لیپیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و پروتئین‌ها را در سلول خود انباشته کنند (Hosseini Tafreshi and Shariati 2009).

این ریز جلبک در آب‌های شور تا خیلی شور رشد می‌کند بنابراین کشت در سطح وسیع آن، با کشاورزی متداول، در منابع محدود مانند زمین‌های قابل کشت و آب شیرین رقابت نمی‌کند. همچنین این ریز جلبک‌ها هیچ گونه سمی تولید نمی‌کنند و از این رو به عنوان منبع غذایی در طبقه میکروارگانیسم‌های ایمن (GRAS)¹ طبقه‌بندی می‌شوند. بنابراین بسیاری از ترکیبات با ارزش بالای تولید شده توسط این ریز جلبک به صورت پودر خشک شده و بدون انجام استخراج، قابل مصرف می‌باشد (Walker et al. 2005b). پتانسیل تولید ترکیبات زیست سازگار و استفاده از این ریزجلبک به عنوان منبع غذایی به علاوه کشت آسان و ارزان به همراه شوری بالای محیط کشت آن که مانع رشد سایر ارگانیسم‌ها در محیط آن می‌شود، همچنین عدم وجود دیواره سلولی که باعث تسهیل در انتقال ناقل به داخل سلول و خالص‌سازی پروتئین‌های بیان شده می‌شود، این ریزجلبک را کاندید مناسبی در انتقال ژن خارجی و تولید پروتئین‌های نوترکیب کرده است (Walker et al. 2005b).

عموماً انجام تغییرات ژنتیکی بر روی ریز جلبک‌ها برای اهداف مختلف از جمله افزایش تولید ترکیبات سنتی جلبک‌ها، تولید پروتئین‌های نوترکیب از قبیل هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌ها و ترکیبات زیست فعال جدید برای کاربردهای صنعتی و دارویی از طریق مهندسی متابولیک و استفاده از آنها به عنوان میزبان‌های یوکاریوتی جهت مطالعات زیست‌شناسی سلولی و مولکولی می‌باشد (León-Bañares et al. 2004; Ben-Amotz et al. 2009; Barzegari et al. 2011). طی سالیان اخیر دستورزی‌های ژنتیکی ریزجلبک‌ها به منظور افزایش میزان چربی جهت تولید سوخت‌های زیستی مورد توجه قرار گرفته‌است (Tabatabaie et al. 2011; Collet et al. 2014).

علی‌رغم مزایای فوق‌الذکر، فرایند انتقال ژن خارجی به ریزجلبک دونالیا و ایجاد تیپ‌های تراریخته پایدار در آن از جمله مهمترین موانع در تولید پروتئین‌های نوترکیب در این ریز جلبک می‌باشد (León-Bañares et al. 2004; Barzegari et al. 2011; Anila et al. 2011). با این وجود، نتایج تحقیقات صورت گرفته در این زمینه حاکی از موفقیت‌هایی در این خصوص می‌باشد (Geng et al. 2003). تاکنون از روش‌های مختلفی از قبیل الکتروپوراسیون، تکان دادن با ذرات شیشه و تفنگ ژنی برای انتقال ژن‌های خارجی به ریز جلبک‌ها استفاده شده‌است. انتقال ژن انتخابگر *ble* تحت کنترل نواحی پروموتور و ترمیناتور *RbcS1* در ریزجلبک *D. tertiolecta* از طریق الکتروپوراسیون انجام شده‌است (Walker et al. 2005a). همچنین این روش به صورت موفقیت‌آمیز برای انتقال ژن انتخابگر *ble* به *D. salina* مورد استفاده قرار گرفته‌است (Sun et al. 2005). روش تکان دادن با استفاده از دانه‌های شیشه² به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تراریختی *D. salina* انجام شده‌است (Feng et al. 2007). علاوه بر این ذرات نانویی فیلوسیلیکات منیزیم توانسته به خوبی برای انتقال ژن در ریزجلبک کلامیدوموناس استفاده شود (Kim et al. 2014). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده که روش انتقال ژن با استفاده از اگروباکتريوم می‌تواند در مورد ریز جلبک‌ها نیز مورد استفاده قرار گیرد (Prasad et al. 2014; Pratheesh et al. 2014). اما علی‌رغم تلاش‌های صورت‌گرفته، همچنان کارایی انتقال ژن به این نوع

² Glass beads

¹ Generally regarded as safe

جدول ۱- ترکیب اجزاء محیط کشت تغییر یافته جانسون

مقادیر	ترکیبات
۶۰ گرم	NaCl
۱/۵ گرم	MgCl ₂ ·6H ₂ O
۰/۵ گرم	MgSO ₄ ·7H ₂ O
۰/۲ گرم	KCl
۰/۲ گرم	CaCl ₂ ·2H ₂ O
۱ گرم	KNO ₃
۰/۰۲۳ گرم	NaHCO ₃
۰/۰۳۵ گرم	KH ₂ PO ₄
۱۸۹ میلی گرم	Na ₂ EDTA
۲۴۴ میلی گرم	FeCl ₃ ·6H ₂ O
۶۱ میلی گرم	H ₃ BO ₃
۳۸ میلی گرم	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O
۶ میلی گرم	CuSO ₄ ·5H ₂ O
۵/۱ میلی گرم	CoCl ₂ ·6H ₂ O
۱/۴ میلی گرم	ZnCl ₂
۱/۴ میلی گرم	MnCl ₂ ·4H ₂ O
حجم محلول به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده و pH در ۷/۵ تنظیم شد	

مواد و روش‌ها

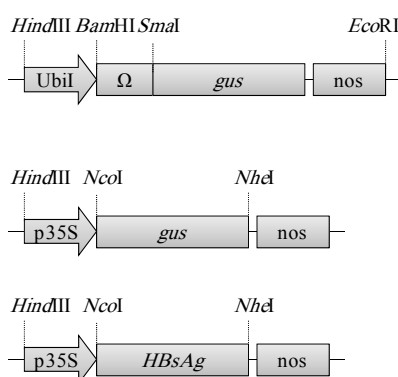
کشت ریزجلبک *D. salina*

در این تحقیق از ریزجلبک *D. salina* سویه UTEX200 جهت انجام آزمون‌های تراریختی استفاده شد. کشت ریزجلبک در محیط کشت تغییر یافته جانسون^۱ (Borowitzka and Borowitzka 1988) صورت پذیرفت (جدول ۱). کشت در شرایط ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی (در شیکر انکوباتور) و یا ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی (در فیتوترون و بدون شیکر) با شدت نور ۴۰-۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه انجام شد. شرایط دمای ۲۵±۳ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۶۰ دور در دقیقه در نظر گرفته شد. جهت بررسی رشد جلبک‌ها، سلول‌های *D. salina* با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰۰X شمارش شدند.

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها و علف‌کش باستا آزمون حساسیت ریزجلبک به آنتی‌بیوتیک‌ها و علف‌کش با استفاده از سلول‌های ریزجلبک در مرحله رشد لگاریتمی انجام پذیرفت (۱۰^۶ × ۴-۶ سلول در میلی‌لیتر). برای این منظور آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، هیگرومایسین، کلرامفنیکل، سفوتاکسیم و علف‌کش باستا استفاده شد. غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها از ۲۰۰ تا ۸۰۰ μg/ml و برای باستا ۳ تا ۲۰ μg/ml در نظر گرفته شد.

سازه‌های ژنی

از پلاسمید pCAMBIA3301 حاوی ژن گزارشگر *GUS* و پلاسمید pCAMBIA-HBsAg حاوی ژن آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) تحت کنترل پیشبر 35S ویروس موزاییک کلم (CaMV) و نیز ژن مقاومت به فسفینوتریسن (bar) تحت کنترل پیشبر 35S CaMV استفاده شد. همچنین از سازه pUΩGUS برای بررسی قابلیت استفاده از پیشبر یوئیکوئیتین استفاده شد. این سازه باعث بیان ژن گزارشگر *gus* تحت پیشبر یوئیکوئیتین می‌باشد (شکل ۱).

^۱ Dunaliella Jahnson medium modified(DJMM)

شکل ۱- نقشه سازه‌های ژنی مورد استفاده برای انتقال و بیان ژن‌های خارجی در ریزجلبک

آزمون‌های انتقال ژن

به منظور بررسی انتقال ژن از روش‌های هم‌زدن با ذرات شیشه، الکتروپوراسیون، هم‌کشتی با اگروباکتریوم و تفنگ ژنی استفاده شد.

روش هم‌زدن با ذرات شیشه

برای این منظور ابتدا ۱/۵ میلی‌لیتر کشت مایع حاوی سلول‌های ریز جلبک در مرحله رشد لگاریتمی (۱۰^۶ × ۴-۶ سلول در میلی-

لیتر) توسط سانتریفوژ رسوب داده شدند. پس از سه بار شستشو در ۰/۸ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه غوطه‌ور شدند. سپس ۳۰۰ میلی‌گرم از ذرات شیشه (به قطر ۰/۶ میلی‌متر) به محیط حاوی ریزجلبک افزوده شد. صد میکرولیتر محلول ۲۰ درصد پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ به نمونه اضافه شد. به صورت آلترناتیو و به منظور افزایش کارایی انتقال ژن، از DNA اسپرم ماهی (به عنوان کریر DNA) به مقدار ۵۰ میکروگرم به محلول افزوده شد. سپس به میزان ۴۰ میکروگرم پلاسמיד بیانی به محلول افزوده شده و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شدند. بعد از ته‌نشین شدن ذرات شیشه جلبک‌ها به فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری استریل منتقل شدند و به هر کدام از نمونه‌ها ۹ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در نور کم (حدود ۴-۵ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) در فیتوترون قرار داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر علف‌کش باستا اضافه شده و به شرایط بهینه رشد در شیکر انکوباتور منتقل شدند.

روش الکتروپوراسیون

در این روش برای ایجاد تراریختی در جلبک از دستگاه الکتروپوراتور (Gene PulserII (BIORAD, USA) استفاده شد. برای این منظور از برنامه‌های Square wave و Exponential decay بر اساس روش توصیف شده توسط Sun et al. (2005) استفاده شد. ابتدا ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت ریز جلبک واقع در مرحله رشد لگاریتمی ($10^6 \times 4-6$ سلول در میلی‌لیتر) سانتریفوژ شده و پس از شستشوی سلول‌های ته‌نشین شده با محیط مایع تازه، توسط ۴۰۰ میکرولیتر بافر الکتروپوریشن (۱/۵ مولار گلیسرول، ۵۰ میلی‌مولار NaCl، ۶ میلی‌مولار $CaCl_2$ ، ۳۰ میلی‌مولار تریس و pH 7.5) مخلوق سازی شد. ۳۰ میکرولیتر پلاسמיד pCambia3301 (با غلظت حدود دو میکروگرم در میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه شد. سوسپانسیون به مدت ۱۰-۵ دقیقه بر روی یخ گذاشته شد و سپس به کووت الکتروپوراسیون منتقل شد. سلول‌ها با دستگاه الکتروپوراتور و با ولتاژهای ۵۰۰-۲۵۰۰ ولت بر سانتی‌متر الکتروپوریت شدند. کووت به مدت ۵ دقیقه مجدداً بر روی یخ گذاشته شده و نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه غوطه‌ور شده و به شرایط نور کم به مدت ۲۴ ساعت منتقل

شدند. نمونه‌ها نهایتاً به شرایط بهینه رشد در شیکر انکوباتور منتقل شدند.

روش تفنگ ژنی

روش بمباران با تفنگ ژنی با ایجاد تغییراتی در روش توصیف شده توسط Tun et al. (2005) انجام شد. برای این منظور ابتدا جمعیت 10^8 سلول ریزجلبک در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع بر روی پلیت حاوی محیط کشت DJMM جامد بر روی دایره‌ای که منطبق با محل شلیک با دستگاه تفنگ ژنی است، قرار گرفت سپس با استفاده از راپچر دیسک‌های 650 PSI و 900 PSI، ذرات طلا (به قطرهای ۰/۶ و یک میکرومتر) پوشش داده شده با پلاسמיד به سمت سلول‌های ریز جلبک شلیک شدند. پس از بمباران با تفنگ ژنی جلبک‌ها با پاپتور جمع‌آوری شده، و با محیط کشت تازه به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شده و پس از انتقال به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری، به مدت ۲۴ ساعت به فیتوترون و شرایط نور کم منتقل شدند.

روش هم‌کشتی با اگروباکتریوم

سلول‌های ریز جلبک بر روی محیط کشت جامد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شده تا به صورت چمنی رشد کرده و لایه‌ای از سلول‌ها را تشکیل دهد. هم‌کشتی اگروباکتریوم حاوی پلاسמיד بر روی لایه ریز جلبک درون پلیت به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. سلول‌های ریزجلبک از سطح پلیت با کمک محلول محیط کشت حاوی سفوتاکسیم شسته شده و جمع‌آوری شده و مجدداً بر روی محیط کشت جامد پخش شدند. پس از تراریزش، سلول‌ها در شرایط نور کم به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و سپس به محیط جامد حاوی ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر علف‌کش باستا منتقل شده و در شرایط رشد بهینه نگهداری شدند (Anila et al. 2011). پس از دو هفته کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط جامد حاوی غربالگر که نشان‌دهنده درج احتمالی ژن خارجی در ژنوم آنها می‌باشد به محیط مایع حاوی غربالگر منتقل شدند و پس از دو هفته از سلول‌هایی که در محیط مایع حاوی غربالگر رشد کرده و به مرحله لگاریتمی رسیده بودند برای استخراج DNA و بررسی‌های مولکولی استفاده شدند.

جدول ۲-آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

آغازگر	ژن هدف	ترادف (5'-3')	طول قطعه تکثیر شده (bp)
FHBsAg	HBsAg	CCGCTTCATCATCTTCCTGT	182
RHBsAg		AGCAGCAGGAGGGGTACAT	
Fbar	bar	TCTATCTCTCTCGAGCTTTCGCAG	428
Rbar		ATGGAGAAACTCGAGCTTGTTCGAT	
FGUS	gus	TTACCATGGTTATGTTACGTCCTGTAGAAC	500
RGUS		AATCTGCAGTCATTGTTTGCCTCCCTGCTGC	
FVir	virG	ATGATTGTACATCCTTCA	600
RVir		TGCTGTTTTTATCAGTTGAG	

بررسی کارایی انتقال ژن و بیان ژن خارجی در ریزجلبک جمع‌آوری سلول‌های ریز جلبک در اواخر مرحله رشد لگاریتمی با سانتریفوژ صورت پذیرفته و استخراج DNA به روش دلاپورتا انجام گرفت (Dellaporta et al. 1983). جهت بررسی حضور ژن‌های خارجی *gus*، *bar* و *HBsAg* در ریزجلبک، ابتدا واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) صورت پذیرفت. جهت اطمینان از عدم حضور اگروباکتریوم در محیط کشت از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های بیماری‌زایی (*vir*) در واکنش PCR استفاده شد.

برای تعیین بیان ژن *gus* در سلول‌های ترانسفورم شده *D. salina* از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی مطابق روش Jefferson (1987) با کمی تغییرات استفاده شد. برای این منظور ۴۸ ساعت پس از ترانسفورماسیون، جلبک‌های ترانسفورم شده (10^6 - 10^7 سلول) با سانتریفوژ جمع‌آوری شده و پس از حذف روش‌نشین ریزجلبک‌ها با محلول تثبیت کننده [اتانول ۹۶٪-اسیداستیک (۱:۳)] به مدت نیم ساعت در دمای اتاق تثبیت شدند. ۲۰۰ میکرولیتر محلول رنگ-آمیزی به سلول‌های ریزجلبک افزوده شد. پلت به آرامی در محلول رنگ‌آمیزی (0.1 M EDTA, 10 mM NaPO₄, 0.1% Triton X-100, 1 mM K₃Fe(CN)₆, 2 mM X-Gluc) حل شده و سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی زیر میکروسکوپ نوری بررسی شده و مجدداً سلول‌ها با سانتریفوژ جمع‌آوری شده و پس از حذف روش‌نشین، ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد جهت کلروفیل‌زدایی به سلول‌های ریزجلبک افزوده شد و نمونه‌ها بررسی شدند. همچنین به منظور بررسی تولید پروتئین واکسن هپاتیت بی در سلول‌های تراریخته،

آزمون Chemiluminescence assay با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی پروتئین مذکور توسط آزمایشگاه رازی (کرج، ایران) صورت پذیرفت.

آزمون RT-PCR

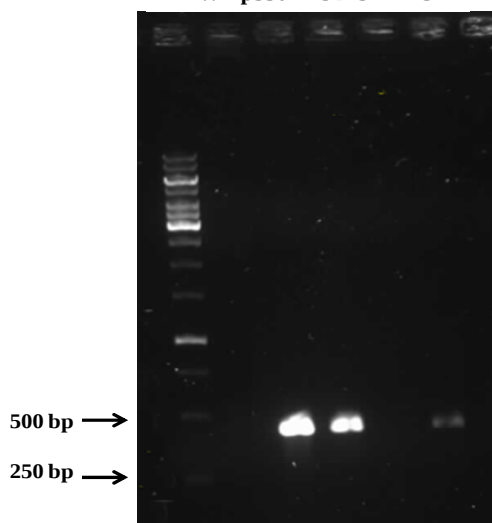
به منظور بررسی بیان ژن خارجی در سلول‌های رشد کرده در محیط انتخابی، از آزمون RT-PCR استفاده شد. استخراج RNA از سلول‌های جلبک با استفاده از کیت استخراج RNA (Biorad, USA) انجام و سپس cDNA با استفاده از oligo dT و با استفاده از کیت iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تولید شد. به منظور اطمینان از سنتز cDNA از روی نسخه‌های mRNA، نمونه‌های RNA استخراج شده ابتدا با آنزیم DNase تیمار شدند. در ادامه آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) انجام و قطعه تکثیر شده بر روی ژل آگارز ردیابی شد.

نتایج و بحث

نتایج استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، هیگرومایسین، کلرامفنیکل حاکی از آن بود که هیچ کدام از این آنتی‌بیوتیک‌ها نتوانستند حتی در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، از رشد ریزجلبک جلوگیری کنند. در مورد آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم، غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محدود کننده رشد بود. استفاده از علف‌کش باستا که حاوی ماده موثره فسفینوتریسین می‌باشد، نشان داد که سلول‌های ریزجلبک دارای حساسیت به این علف‌کش می‌باشند (شکل ۲). غلظت‌های بالاتر از ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر باستا کاملاً از رشد (در غلظت 10^6)

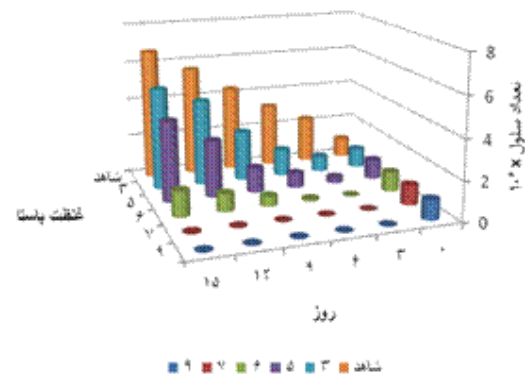
ماهی) برای انتقال ژن، فقط دو نمونه (T3B و T3A) در محیط حاوی باستا رشد کرده بودند، در حالی که نمونه کنترل منفی فاقد رشد بود. نمونه کنترل منفی شامل کشت سلول‌های ریز جلبک تحت تیمار مشابه ولی فاقد ناقل بیانی می‌باشد. نتایج آزمون PCR با آغازگرهای طراحی شده برای ژن *gus* و *bar* مشخص کرد که این دو نمونه هر دو حاوی ژن‌های *bar* و *gus* می‌باشند (شکل ۳ و ۴). در حالت عدم استفاده از DNA حامل فقط یک نمونه در محیط کشت انتخابی رشد کرد که نتایج آزمون PCR نشان داد که این نمونه (3A) فقط حاوی ژن *bar* می‌باشد و فاقد ژن *gus*/ست (شکل ۳ و ۴). با توجه به تعداد کلون‌های تراریخته حاصله، درصد تراریختی با استفاده از روش تکان دادن با ذرات شیشه در حدود 4×10^{-4} محاسبه شد. بررسی بیان ژن *gus* در ریزجلبک‌های ترانسفورم شده با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی صورت پذیرفت. نتایج این آزمون حاکی از بروز رنگ آبی در سلول‌های ریزجلبک ترانسفورم شده با روش ذرات شیشه‌ای بود (شکل ۵).

M WT p3301 T3B 3A T3A



شکل ۳- آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* محصولات PCR مربوط به حضور ژن *gus* (باند ۴۲۸ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده با روش ذرات شیشه‌ای؛ (3A) نمونه ترانسفورم شده بدون حامل DNA؛ (T3B و T3A) نمونه‌های ترانسفورم شده به همراه حامل DNA؛ (WT) نمونه ترانسفورم نشده؛ (p3301) پلاسمید pCambia3301

سلول در میلی لیتر) جلوگیری کرد. استفاده از جمعیت‌های بالاتر ریز جلبک منجر به افزایش آستانه تحمل به علف‌کش شد به نحوی که با جمعیت 10^8 سلول در میلی لیتر آستانه تحمل به باستا تا مقدار ۹ میکروگرم در میلی لیتر افزایش یافت. بنابراین علف‌کش باستا می‌تواند به عنوان یک غربالگر انتخابی مناسب برای انتقال ژن به این ریزجلبک مورد استفاده قرارگیرد.



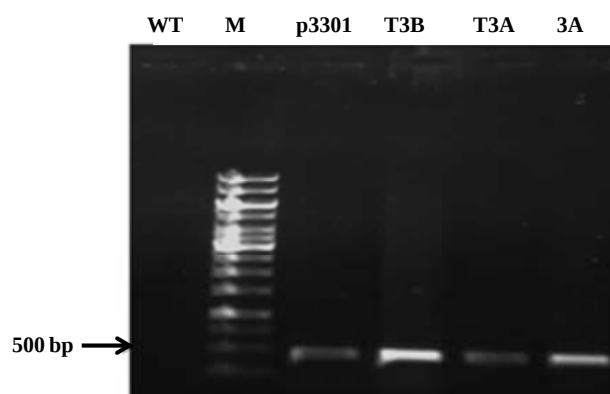
شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش باستا بر میزان رشد ریزجلبک دونالیلا در طی دو هفته

پس از انجام مراحل مختلف انتقال ژن‌های خارجی به میزبان ریزجلبک، بررسی حضور و بیان ژن‌های خارجی *gus* و آنتی ژن سطحی ویروس هیپاتیت بی در کشت‌های حاوی ممانعت کننده باستا صورت پذیرفت. قابلیت رشد سلول‌های ریز جلبک در غلظت ۷ و ۹ میکروگرم در میلی لیتر باستا به عنوان معیار اولیه برای جداسازی سلول‌های کاندید حاوی ژن خارجی استفاده شد. در آزمون تراریختگی با استفاده از ذرات شیشه از دو ناقل بیانی pCambia3301 (حاوی ژن‌های *gus* و نشانگر انتخابی *bar*) و pUΩGUS (حاوی ژن گزارشگر *gus* و پیشبر یوبیکوئیتین) استفاده شد. نتایج حاصله در مورد استفاده از ناقل بیانی pCambia3301 نشان داد که در محیط کشت جامد و در حضور علف کش باستا، پس از ۱۶ روز تک کلون‌های ریز و سبز رنگ ظاهر می‌شوند. به منظور بررسی تراریختگی در کلون‌های مذکور، سلول‌های هر کلنی به صورت مجزا در محیط مایع حاوی باستا کشت داده شدند و پس از رشد استخراج DNA از آنها صورت پذیرفت. در حالت استفاده از DNA حامل (DNA اسپرم

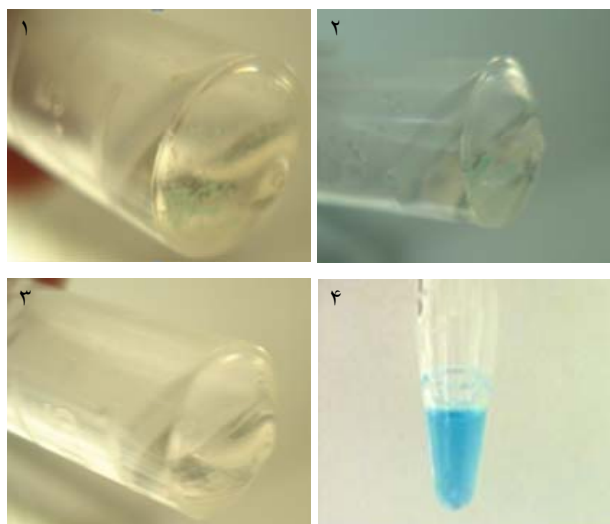
آزمون هیستوشیمیایی بر روی سلول‌های ریز جلبک تحت تیمار ناقل فوق حاکی از عدم بیان ژن *gus* در سلول‌های ریز جلبک بود.

در روش الکتروپوراسیون در بسیاری از موارد با ایجاد جرقه در هنگام اتصال جریان الکتریکی همراه می‌شد. برای رفع این مشکل از بافرهای مختلف و یا ایجاد تغییر در شرایط برق دهی دستگاه استفاده شد. جلبک‌ها فقط زمانی زنده مانده و به طور کامل از بین نرفتند که با استفاده از برنامه Exponential decay با شدت جریان الکتریکی ۵۰۰ ولت بر سانتی‌متر الکتروپوریت شدند. پس از انتقال سلول‌های الکتروپوریت شده به محیط کشت حاوی باستا، مشاهدات حاکی از عدم رشد سلول‌های ریز جلبک در محیط انتخابی می‌باشد. بنابراین درصد تراریختگی در این روش صفر منظور شد.

روش انتقال ژن با استفاده از تفنگ ژنی برای سازه حاوی ژن *HBsAg* استفاده شد. نتایج این روش حاکی از این بود که همه نمونه‌ها شامل نمونه‌های کنترل منفی فاقد ناقل بیانی و همچنین نمونه‌های دارای ناقل بیانی در غلظت ۷ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر باستا رشد کردند و تنها در غلظت ۹ میکروگرم نمونه‌های کنترل منفی رشد نکردند. این نتایج نشان می‌دهد که غلظت ۶ و ۷ میکروگرم باستا علف‌کش برای جلوگیری از رشد این جمعیت از سلول‌های *D. salina* کافی نیست و بهترین غلظت باستا برای بازدارندگی و انتخاب گزینش‌گری برای ترانسفورمانت‌ها میزان ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. تفاوت مشاهده شده با نتایج حاصله از آزمون تعیین میزان حساسیت به علف‌کش به دلیل استفاده از جمعیت حدود صد برابری ریزجلبک در این روش می‌باشد. بنابراین در این روش از غلظت ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر باستا استفاده شد. رشد ریزجلبک‌ها درون محیط کشت حاوی باستا گرچه می‌تواند دلیلی بر تراریخته بودن آنها باشد ولی در گزینش آنها بر روی محیط گزینش‌گر امکان فرار غیر تراریخته‌ها نیز وجود دارد. حضور ژن خارجی در جلبک‌های به دست آمده از روش انتقال ژن با استفاده از تفنگ ژنی، با انجام آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *HBsAg* و همچنین ژن *bar* صورت پذیرفت. نتایج این آزمون‌ها (شکل‌های ۶ و ۷) حاکی از حضور ژن‌های فوق در جلبک‌های به دست آمده می‌باشد.

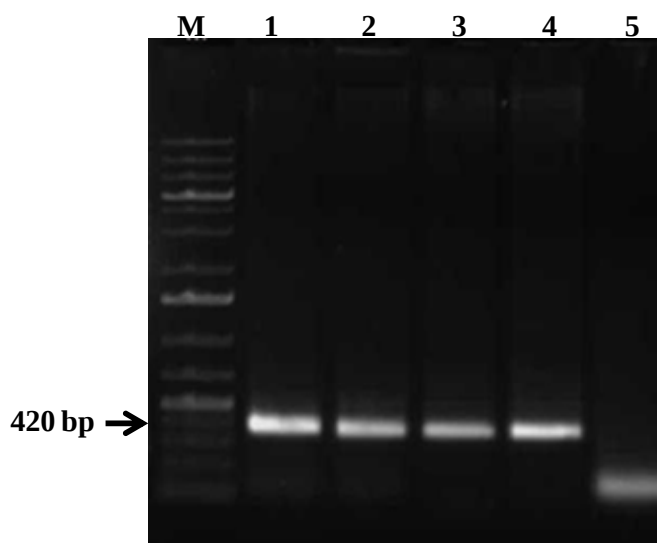


شکل ۴- واکنش PCR با آغازگر ژن *bar* (باند ۵۰۰ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده با روش ذرات شیشه ای. 3A نمونه ترانسفورم شده بدون کریر DNA؛ T3A و T3B نمونه‌های ترانسفورم شده به همراه حامل DNA؛ WT نمونه ترانسفورم نشده؛ p3301 پلاسمید pCambia3301.

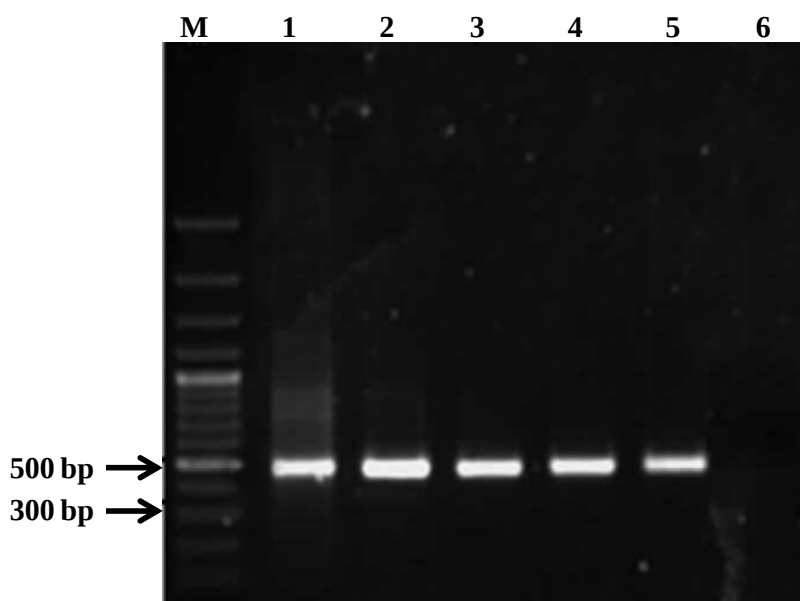


شکل ۵- آزمون هیستوشیمیایی برای بررسی بیان ژن *gus*. ۱ و ۲ نمونه‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pCambia3301؛ ۳ کنترل منفی؛ (جلبک‌هایی فاقد پلاسمید)؛ ۵ کنترل مثبت (اگروباکتری حاوی ژن *gus*).

در این تحقیق به صورت آلترناتیو، قابلیت پیشبر یوبیکوئیتین در بیان ژن گزارشگر *gus* با روش استفاده از ذرات شیشه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از ناقل pUΩGUS (شکل ۱) که حاوی ژن گزارشگر *gus* تحت پیشبر یوبیکوئیتین می‌باشد، استفاده شد. این ناقل فاقد ژن انتخابگر برای کشت ریزجلبک در محیط حاوی آنتی بیوتیک می‌باشد. بنابراین نتایج حاصله مربوط به بیان موقت ژن *gus* در سلول‌های ریزجلبک می‌باشد. نتایج



شکل ۶- محصولات PCR مربوط به حضور ژن *HBsAg* (باند ۴۲۰ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده توسط تفنگ ژنی با راپچر دیسک ۶۵۰ psi و در فاصله ۶ سانتی‌متر. چاهک (M) مارکر 1 kb Plus؛ چاهک ۱ و ۲ و ۳ نمونه‌های ترانسفورم شده در غلظت ۹ میکروگرم در میلی لیتر باستا؛ چاهک ۴ کنترل مثبت (پلاسمید pCAMBIA3300)؛ چاهک ۵ نمونه کنترل منفی (پلاسمید pCAMBHBsAg).

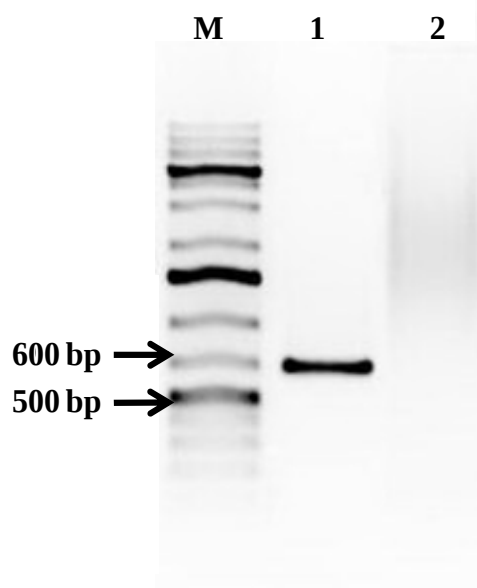


شکل ۷- محصولات PCR مربوط به حضور ژن *bar* (باند ۵۰۰ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده توسط تفنگ ژنی با راپچر دیسک ۶۵۰ psi و در فاصله ۶ سانتی‌متر. چاهک (M) مارکر؛ چاهک ۱ تا ۴ نمونه‌های ترانسفورم شده در غلظت ۹ میکروگرم در میلی لیتر باستا؛ چاهک ۵ نمونه کنترل مثبت (پلاسمید pCAMB3300)؛ چاهک ۶ نمونه کنترل منفی.

انتخابی حاکی از عدم وجود مقادیر قابل ردیابی پروتئین زیر واحدهای *HBsAg* در سلول‌های ریز جلبک تراریخته می‌باشد.

در این روش درصد تراریختگی در حدود 4×10^{-6} محاسبه شد. همچنین نتایج آزمون سرولوژیک Chemiluminescence Assay بر روی سلول‌های ریزجلبک رشدیافته بر روی محیط کشت

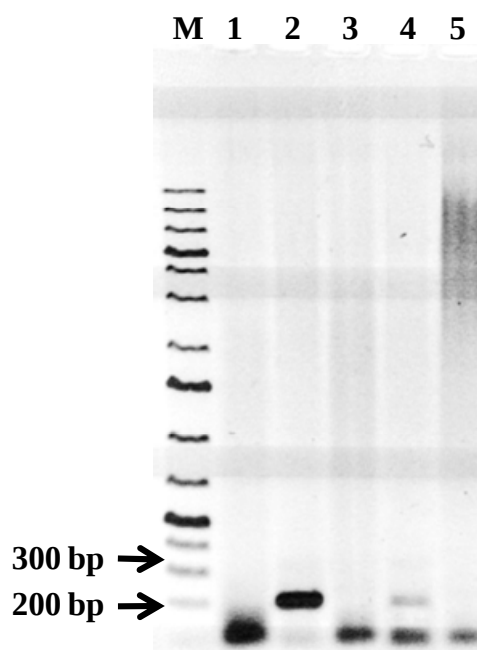
جهت اطمینان از عدم حضور آگروباکتریوم در محیط کشت از آغازگرهای اختصاصی ژن *vir* نیز در واکنش PCR استفاده شد که نتایج حاصله حاکی از عدم وجود آگروباکتریوم در محیط می‌باشد (شکل ۹). با توجه به نتایج حاصله درصد تراریختگی در این روش 1×10^{-6} محاسبه شد.



شکل ۹- الکتروفورز محصولات واکنش PCR با آغازگرهای ژن *vir* (آگروباکتریوم: چاهک ۱) مارکر DNA: چاهک ۲) کنترل مثبت؛ چاهک ۳) نمونه جلبک تراریخته.

به منظور بررسی حضور ترانسکریپت ژن‌های خارجی در ریزجلبک‌های به دست آمده بر روی محیط کشت انتخابی آزمون RT-PCR صورت پذیرفت. در این آزمون، بررسی حضور ترانسکریپت‌های ژن‌های *HBsAg* و *bar* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. برای این منظور ابتدا جداسازی RNA از نمونه‌های جلبک تراریخته مقاوم به علف‌کش صورت پذیرفت و سنتز cDNA با استفاده از آغازگر oligo dT انجام گرفت. در نهایت تکثیر نواحی اختصاصی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *HBsAg* و *bar* و الگوی cDNA ساخته شده صورت پذیرفت. نتایج این آزمون‌ها (شکل ۱۰) حاکی از حضور ترانسکریپت‌های ژن‌های مذکور در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. نتایج این آزمون در خصوص نمونه‌های به دست آمده از روش هم‌کشتی با آگروباکتریوم منفی بود.

در روش هم‌کشتی با آگروباکتریوم ابتدا به منظور حذف باکتری، سلول‌های ریزجلبک پس از هم‌کشتی با محیط کشت مایع حاوی سفوتاکسیم شسته شدند و سپس بر روی محیط کشت جامد جلبک حاوی سفوتاکسیم (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و باستا (۶، ۷ و ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) واکنش شدند. در پتری‌هایی که غلظت ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر باستا داشتند، پس از ۱۵ روز هیچ کلونی مشاهده نشد. اما در غلظت‌های ۶ و ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر پس از دو هفته کلونی‌هایی مشاهده شد. کلنی‌های حاصله سپس به صورت جداگانه در محیط مایع حاوی سفوتاکسیم و باستا واکنش شدند.

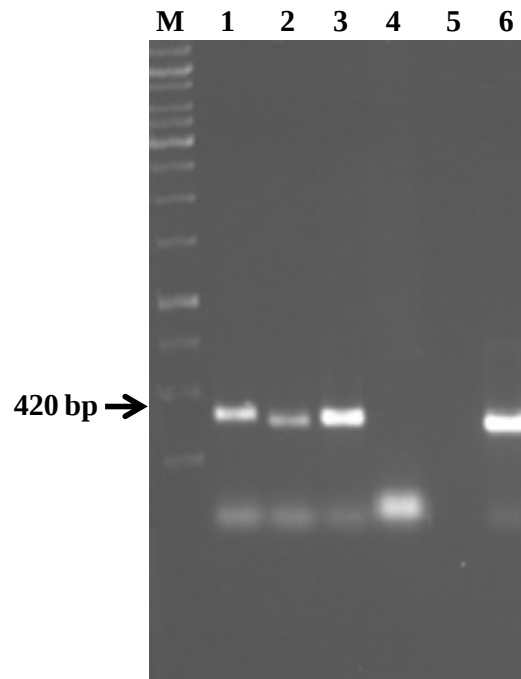


شکل ۸- محصولات PCR مربوط به حضور ژن *HBsAg* (باند ۱۸۲ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده با آگروباکتریوم، چاهک ۱) مارکر ۱ kb. چاهک ۲) نمونه وحشی؛ چاهک ۳) کنترل مثبت (پلاسمید pCAMB-HBsAg)؛ چاهک ۴ و ۵) نمونه‌های حاصل از ریزجلبک‌های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی (چاهک ۴ نمونه تراریخته).

به منظور بررسی حضور ژن خارجی سلول‌های ریزجلبک به دست آمده، ابتدا آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *HBsAg* صورت پذیرفت. نتایج این آزمون حاکی از وجود ژن خارجی در یکی از کلون‌های به دست آمده می‌باشد (شکل ۸).

غلظت ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود در حالی که سایر مواد بازدارنده رشد در تمامی غلظت‌های بکار رفته هیچ گونه تاثیری در کاهش روند رشدی جلبک نداشتند. بررسی تحقیقات صورت گرفته در منابع مختلف حاکی از حساسیت سویه‌های مختلف این جلبک به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد. نتایج یک تحقیق حاکی از حساسیت سویه‌ای از این ریزجلبک به کلرامفنیکل در غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (Geng et al. 2003) در حالی که سویه مورد استفاده در این تحقیق در تمامی غلظت‌های به کار رفته دارای مقاومت به این آنتی‌بیوتیک می‌باشد. همچنین تحقیقات قبلی در خصوص *D. salina* نشان داده که این ریز جلبک به آنتی‌بیوتیک‌های ژئوسین، کلرامفنیکل و علف‌کش باستا به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حساسیت دارد (Tan et al. 2005; Sun et al. 2005). همچنین استفاده از ژن *bar* به عنوان ژن نشانگر انتخابی و از علف‌کش فسفینوتریسن به عنوان ماده انتخابگر در انتقال ژن به این ریزجلبک گزارش شده‌است (Wang et al. 2007; Feng et al. 2009).

در این تحقیق از روش‌های مختلف انتقال ژن برای ایجاد جلبک‌های تراریخته استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، استفاده از روش الکتروپوراسیون برای تولید جلبک‌های تراریخته با موفقیت همراه نبود و در تمامی موارد و با اعمال تیمارهای مختلف، سلول‌های جلبک به طور کامل از بین رفتند و حتی در محیط کشت فاقد باستا نیز رشد نکردند. علی‌رغم نتایج بدست آمده در این تحقیق، نتایج تحقیقات قبلی حاکی از موفقیت این روش در انتقال ژن به سلول‌های *D. salina* می‌باشد (Geng et al. 2003). در تحقیقات قبلی از محلول‌های ۲۰۰ میلی‌مولار سوربیتول-۲۰۰ میلی‌مولار مانیتول به عنوان محلول پیش تیمار و محلول‌های دارای نمک به عنوان بافر اصلی الکتروپوراسیون استفاده شده‌است (Xue et al. 2003, Sun et al. 2008). در این تحقیق استفاده از نمک در بافر الکتروپوراسیون منجر به ایجاد جرقه می‌شد و جلبک‌ها فقط زمانی زنده می‌ماندند که از ولتاژ ۵۰۰ استفاده می‌شد. عدم نتیجه‌گیری در این روش احتمالاً به دلیل ناکافی بودن این ولتاژ برای ایجاد حفره در سطح غشای پلاسمایی سلول‌ها می‌باشد.



شکل ۱۰- الکتروفورز قطعات تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی HBsAg در تکنیک RT-PCR در جلبک‌های تراریخته. چاهک (M) مارکر؛ چاهک ۱ و ۳ نمونه ترانسفورم شده به روش تفنگ ژنی در غلظت ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر باستا؛ چاهک ۲ نمونه ترانسفورم شده به روش هم‌زدن با ذرات شیشه‌ای در غلظت ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر باستا؛ چاهک ۴ نمونه شاهد؛ چاهک ۵ نمونه منفی؛ چاهک ۶ کنترل مثبت (pCAMHBsAg).

علی‌رغم پتانسیل بسیار بالای جلبک‌های میکروسکوپی و مخصوصاً ریز جلبک دونالیا برای استفاده در صنایع مختلف غذایی و دارویی، متأسفانه اصلاح ژنتیکی آن از طریق مهندسی ژنتیک تاکنون به دلیل ناشناخته بودن ساختار ژنتیکی آن همواره مشکل بوده‌است (Barzegari et al. 2010). در دسترس بودن ژن-های نشانگر مناسب کلید انتخاب ریزجلبک‌های ترانسفورم شده می‌باشد (León-Bañares et al. 2004). در این تحقیق و به منظور استفاده از نشانگر انتخابی در مراحل انتقال ژن، آزمون‌های تعیین حساسیت به مواد بازدارنده رشد از قبیل کانامایسین، هیگرومایسین، کلرامفنیکل و فسفینوتریسن صورت پذیرفت. نتایج حاصله حاکی از قابلیت بازدارندگی علف‌کش باستا، حاوی ماده موثره فسفینوتریسن، برای ادامه رشد سویه UTEX200 جلبک *D. salina* بود. قابلیت بازدارندگی این علف‌کش در

این تحقیق در قالب پروژه تحقیقاتی مصوب پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران اجرا شده‌است.

منابع

- Anila N, Chandrashekar A, Ravishankar G, Sarada R (2011) Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil*. *European Journal of Phycology* 46:36-44.
- Ben-Amotz A, Polle JE, Rao DS (2009) The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology: Science Publishers Enfield.
- Barzegari A, Hejazi MA, Hosseinzadeh N, Eslami S, Mehdizadeh Aghdam E, Hejazi MS (2010) *Dunaliella* as an attractive candidate for molecular farming. *Molecular Biology Reports* 37:3427-3430.
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ (1988) Micro-algal biotechnology: Cambridge University Press.
- Borowitzka MA, Siva CJ (2007) The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology* 19:567-590.
- Collet P, Lardon L, Hélias A, Bricout S (2014) Biodiesel from microalgae-Life cycle assessment and recommendations for potential improvements. *Renewable Energy* 71:525-533
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Feng SY, Jia YL, Liu HT, Li J, Xue LX (2007) Transformation of *Dunaliella salina* by using glass beads a novel transformation method. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 23:358-362.
- Feng S, Xue L, Liu H, Lu P (2009) Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Molecular Biology Reports* 36:1433-1439.
- Geng D, Wang Y, Wang P, Li W, Sun Y (2003) Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 15:451-456.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Jin E, Polle JEW, Melis A (2001) Involvement of zeaxanthin and of the Cbr protein in the repair of photosystem II from photoinhibition in the green alga *Dunaliella salina*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1506:244-259.
- Hosseini Tafreshi A, Shariati M (2009) *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology* 107:14-35.
- León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A, Fernández E (2004) Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnology* 22:45-52.

نتایج به دست آمده از روش‌های هم زدن با ذرات شیشه و تفنگ ژنی حاکی از موفقیت این روش‌ها در انتقال ژن به ریزجلبک مذکور می‌باشد. نتایج تحقیقات قبلی موید کارایی بالای روش تفنگ ژنی در انتقال ژن‌های خارجی به ریز جلبک *D. salina* می‌باشد (Tan et al. 2005). نتایج آزمون‌های مولکولی و هیستوشیمیایی حضور ژن‌های خارجی را در سلول‌های تراریخته به اثبات رسانید. در تحقیقات قبلی با استفاده از روش ذرات شیشه‌ای ژن انتخابگر *ble* وارد سلول‌های *D. salina* شده‌است ولی در طی نسل‌های متوالی علی‌رغم مقاوم ماندن جلبک‌ها به ماده بازدارنده رشد ژنوسین، شواهدی مبنی بر درج ژن *ble* در ژنوم تراریخته‌ها ارایه نشد (Jin et al. 2001). همچنین مشخص شده که پارامترهای متعدد از جمله غلظت PEG، مدت زمان ورتکس کردن، سرعت ورتکس کردن و غلظت DNA پلاسمیدی بر کارایی ترانسفورماسیون به روش ذرات شیشه موثر می‌باشد (Feng et al. 2009). در این تحقیق از پارامترهای بهینه شده در این روش‌ها استفاده شده‌است.

نتایج حاصله در این تحقیق نشان می‌دهد که روش‌های استفاده از ذرات شیشه و همچنین تفنگ ژنی می‌تواند به منظور انتقال ژن‌های خارجی به ریز جلبک *دونالیا* مورد استفاده قرار گیرد. نتایج حاصله نشان داد که استفاده از این روش‌ها منجر به تولید تعداد معدودی از کلون‌های حاوی ژن خارجی شود و درصد تراریختگی در این روش‌ها در حدود 10^{-6} - 10^{-4} محاسبه شد. درصد بسیار پایین تراریختی و عدم پایداری آن در سلول‌های ریزجلبک باعث می‌شود که تولید رده‌های سلولی تراریخته این ریزجلبک با مشکلاتی همراه باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود بهینه سازی روش‌های مذکور با استفاده از ژرم‌پلاسم‌های متفاوت ریز جلبک *دونالیا* و یا سایر گونه‌ها و همچنین بررسی قابلیت بیان ژن‌های خارجی در سیستم کلروپلاست مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری صمیمانه کارشناسان بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تشکر و قدردانی نمایند.

- Kim S, Lee YC, Cho DH, Lee HU, Huh YS, Kim GJ, Kim HS (2014) A simple and non-invasive method for nuclear transformation of intact-walled *Chlamydomonas reinhardtii*. PLoS One 9: e101018.
- Prasad B, Vadakedath N, Jeong HJ, General T, Cho MG, Lein W (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of haptophytes (*Isochrysis* species). Applied Microbiology Biotechnology 98:8629-39.
- Pratheesh PT, Vineetha M, Kurup GM (2014) An efficient protocol for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Molecular Biotechnology 56:507-515.
- Sun Y, Yang Z, Gao X, Li Q, Zhang Q, Xu Z (2005) Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. Molecular Biotechnology 30:185-192.
- Sun G, Zhang X, Sui Z, Mao Y (2008) Inhibition of pds gene expression via the RNA interference approach in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). Marine Biotechnology 10:219-226.
- Tabatabaei M, Tohidfar M, Salehi Jouzani GR, Safarnejad MR, Pazoukib M (2011) Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran. Renewable and Sustainable Energy Reviews 15:1918-1927.
- Tan C, Qin S, Zhang Q, Jiang P, Zhao F (2005) Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. Journal of Microbiology 43:361-365.
- Walker TL, Becker DK, Dale JL, Collet C (2005a) Towards the development of a nuclear transformation system for *Dunaliella tertiolecta*. Journal of Applied Phycology 17:363-368.
- Walker T L, Purton S, Becker D K, Collet C (2005b) Microalgae as bioreactors. Plant Cell Reports 24:629-641.
- Wang T, Xue L, Hou W, Yang B, Chai Y, Ji X, Wang Y (2007) Increased expression of transgene in stably transformed cells of *Dunaliella salina* by matrix attachment regions. Applied Microbiology and Biotechnology 76:651-657.
- Xue L, Pan W, Jiang G, Wang J (2003) Transgenic *Dunaliella salina* as a bioreactor. US Patent No 7081567: pp. B2