ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
صفحه ۳۵۸-۳۴۷

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 کارشناسی‌ارشد، دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
۳- استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز
۴- دانشیار، دانشگاه پیام نور، تهران

Safarnejad MR[1], Alimardani M[2], Sadizadeh A[2], Khalilian M[2], Daneshvar MH[3], Ebrahimi MA[4], 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 Agricultureand Natural resources of Khozestan, 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 نوترکیب مورد توجه می‌باشد. در این تحقیق روش‌های انتقال ژن خارجی به این ریزجلبک 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 فسفینوتریسین انجام شد. نتایج این آزمون حاکی از حساسیت ریز جلبک به فسفینوتریسین در غلظت ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. برای انتقال ژن از روش‌های همزدن با ذرات شیشه، الکتروپوراسیون، اگروباکتریوم 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 یوبی‌کوئیتین بود. نتایج حاصله حاکی از موفقیت‌آمیز 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 فسفینوتریسین 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 رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی

انتقال ژن
ریز جلبک
ژن گزارشگر *gus*
واکسن هپاتیت ب
Dunaliella salina

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]

مقدمه

ریز جلبک دونالیلا از گروه جلبک‌های سبز (فتوسنتز 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 خالص-سازی پروتئین‌های بیان شده می‌شود، این ریزجلبک را کاندید مناسبی در انتقال ژن خارجی و تولید پروتئین‌های نوترکیب کرده است (Walker et al. 2005b).

عموما 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 داروئی 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 دونالیلا 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 موفقیت-آمیز برای انتقال ژن انتخابگر *ble* به *D. salina* مورد استفاده قرار گرفته‌است (Sun et al. 2005). روش تکان دادن با استفاده از دانه‌های شیشه[2] 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 اگروباکتریوم 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

[1] Generaly regarded as sofe

[2] Glass beads

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]

جلبک پایین بوده و امکان تولید پروتئین‌های نوترکیب در آنها محدود است. تحقیق حاضر با هدف بررسی و بهینه‌سازی روش‌های مختلف انتقال ژن به ریز جلبک *D. salina* اجرا 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 تغییریافته جانسون[1] (Borowitzka and Borowitzka 1988) صورت پذیرفت (جدول۱). 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 ۶۰-۴۰ میکرومول فوتون برمتر مربع برثانیه انجام شد. شرایط دمای ۳± ۲۵ 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 ($۶-۴ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر). برای این منظور آنتی بیوتیک‌های 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

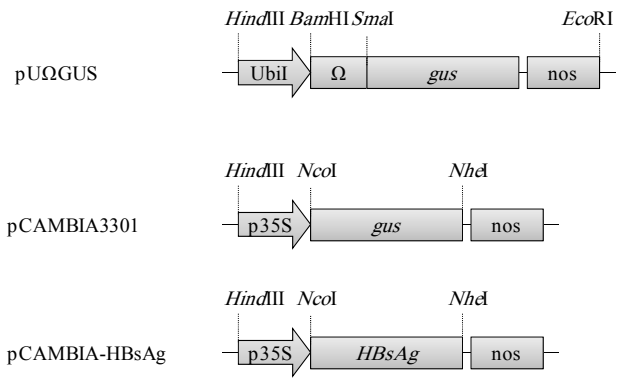
از پلاسمید pCAMBIA3301 حاوی ژن گزارشگر *GUS* و پلاسمید pCAMBIA-HBsAg حاوی ژن آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) تحت کنترل پیشبر 35S ویروس موزاییک کلم (CaMV) و نیز ژن مقاومت به فسفینوتریسین(*bar*) تحت کنترل پیشبر CaMV 35S استفاده شد. همچنین از سازه pUΩGUS برای بررسی قابلیت استفاده از پیشبر یوبیکوئیتین استفاده شد. این سازه باعث بیان ژن گزارشگر *gus* تحت پیشبر یوبیکوئیتین می‌باشد (شکل۱).

[1] Dunaliella Jahnson medium modified(DJMM)

جدول۱- ترکیب اجزاء محیط کشت تغییریافته جانسون

ترکیبات	مقادیر
NaCl	۶۰ گرم
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	۱/۵ گرم
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	۰/۵ گرم
KCl	۰/۲گرم
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	۰/۲گرم
KNO_3	۱ گرم
$NaHCO_3$	۰/۰۴۳گرم
KH_2PO_4	۰/۰۳۵ گرم
Na_2EDTA	۱۸۹ میلی گرم
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	۲۴۴ میلی گرم
H_3BO_3	۶۱ میلی گرم
$(NH4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	۳۸ میلی گرم
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	۶ میلی گرم
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	۵/۱ میلی گرم
$ZnCl_2$	۱/۴ میلی گرم
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	۱/۴میلی گرم

حجم محلول به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده و pH در ۷/۵ تنظیم شد



شکل۱- 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 ($۶-۴ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]

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 میزان۴۰ میکروگرم پلاسمید بیانی به محلول افزوده شده و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شدند. بعد از ته‌نشین شدن ذرات شیشه جلبک‌ها به فالکون‌های 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 ۵-۴ 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 ($x10^6$ ۶-۴ سلول در میلی‌لیتر) سانتریفیوژ شده و پس از شستشوی سلول‌های ته‌نشین شده با محیط مایع تازه، توسط ۴۰۰ میکرولیتر بافر الکتروپوریشین (۱/۵ مولار گلیسرول، ۵۰ میلی مولار NaCl ، ۶ میلی‌مولار $CaCl_2$، ۳۰ میلی مولار تریس و pH 7.5) معلق سازی شد. ۳۰ میکرولیتر پلاسمید 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 مجددا بر روی یخ گذاشته شده و نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه غوطه ور شده و به شرایط نورکم به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند. نمونه‌ها نهایتا 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 و900 pSI، ذرات طلا (به قطرهای ۰/۶ و یک میکرومتر) پوشش داده شده با پلاسمید به سمت سلول‌های ریز جلبک شلیک شدند. پس از بمباران با تفنگ ژنی جلبک‌ها با پاپیتور 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 پلاسمید 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 مجددا 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]

جدول۲-آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

آغازگر	ژن هدف	ترادف (´3-´5)	طول قطعه تکثیر شده (bp)
FHBsAg	*HBsAg*	CCGCTTCATCATCTTCCTGT	182
RHBsAg		AGCAGCAGGAGGGGTACAT	
Fbar	*bar*	TCTATCTCTCTCGAGCTTTCGCAG	428
Rbar		ATGGAGAAACTCGAGCTTGTCGAT	
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 (جدول۲) 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^{7}- 10^{6} سلول) با سانتریفوژ جمع‌آوری شده و پس از حذف رونشین ریزجلبک‌ها با محلول تثبیت کننده [اتانول۹۶٪-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 NaPO4 , 10 mM EDTA, 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 مجددا سلول‌ها با سانتریفوژ جمع‌آوری شده و پس از حذف رونشین، 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

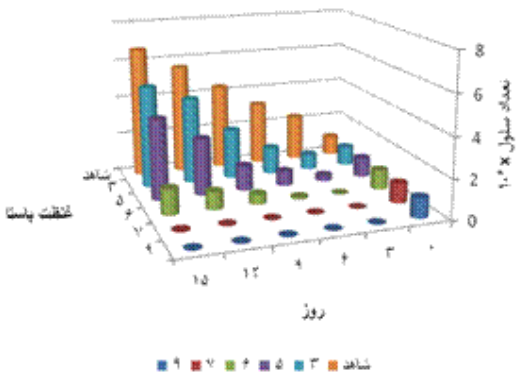
به منظور بررسی بیان ژن خارجی در سلول‌های رشد کرده در محیط انتخابی، از آزمون RT-PCR استفاده شد. استخراج RNA از سلول‌های جلبک با استفاده از کیت استخراج RNA (Biorad, USA) انجام و سپس cDNA با استفاده از oligo dT و با استفاده از کیت iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تولید 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 (جدول۲) 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 (شکل۲). غلظت‌های بالاتر از ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر باستا کاملا از رشد (در غلظت 10^{6}

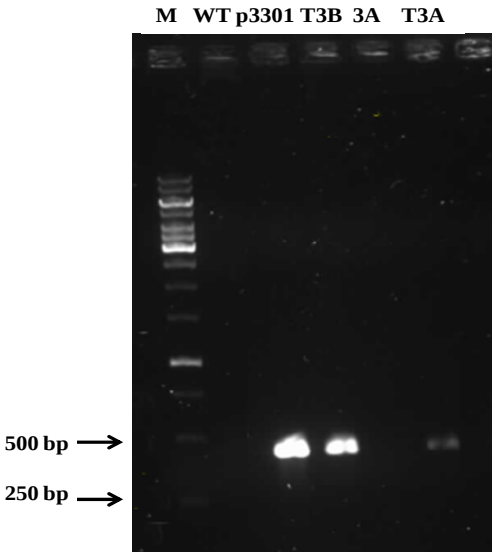
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]

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 میلی‌لیتر آستانه تحمل به باستا تا مقدار ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش‌یافت. بنابراین علف‌کش باستا می‌تواند به عنوان یک غربالگر انتخابی مناسب برای انتقال ژن به این ریزجلبک مورد استفاده قرارگیرد.



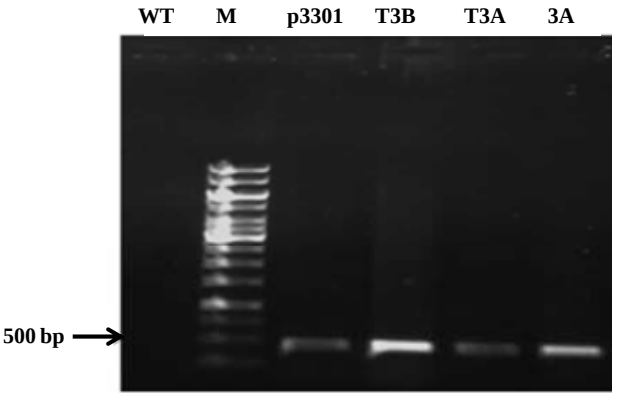
شکل۲- تاثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش باستا بر میزان رشد ریزجلبک دونالیلا در طی دو هفته

پس از انجام مراحل مختلف انتقال ژن‌های خارجی به میزبان ریزجلبک، بررسی حضور و بیان ژن‌های خارجی *gus* و آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت بی در کشت‌های حاوی ممانعت کننده باستا صورت پذیرفت. قابلیت رشد سلول‌های ریز جلبک در غلظت ۷ و یا ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر 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 ماهی) برای انتقال ژن، فقط دو نمونه (T3A و T3B) در محیط حاوی باستا رشد کرده بودند، در حالی‌که 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 (شکل۳ و۴). 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 (شکل۳ و۴). با توجه به تعداد کلون‌های تراریخته حاصله، درصد تراریختی با استفاده از روش تکان دادن با ذرات شیشه در حدود $۴x۱۰^{-۴}$ 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 (شکل۵).

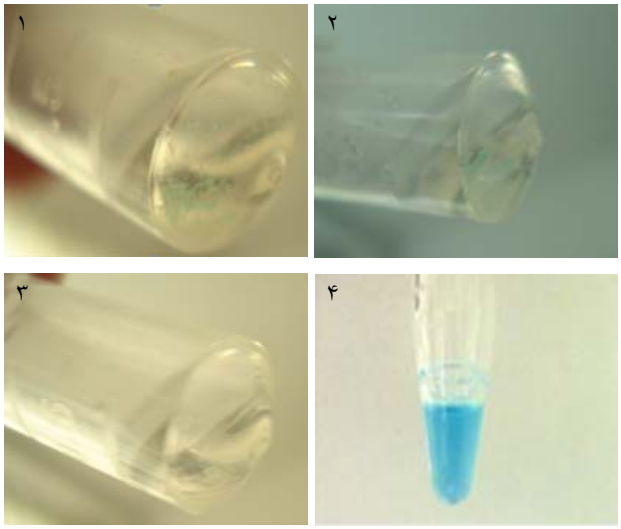


شکل۳- آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*. محصولات PCR مربوط به حضور ژن *gus* (باند bp ۴۲۸) نمونه‌های ترانسفورم شده با روش ذرات شیشه‌ای؛ 3A) نمونه ترانسفورم شده بدون حامل DNA؛ T3A و T3B) نمونه‌های ترانسفورم شده به همراه حامل DNA؛ WT) نمونه ترانسفورم نشده؛ p3301) پلاسمید pCAMBIA3301.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]



شکل۴- 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.



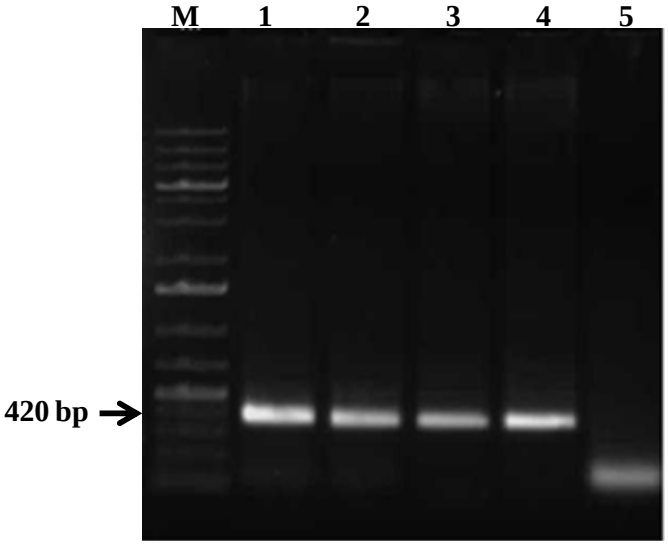
شکل۵- آزمون هیستوشیمیایی برای بررسی بیان ژن *gus*. ۱ و ۲) نمونه‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pCAMBIA3301؛ ۳) کنترل منفی: (جلبک‌هایی فاقد پلاسمید)؛ ۵) کنترل مثبت (اگروباکتری حاوی ژن *gus*).

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 (شکل۱) 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 آزمون هیستوشیمیایی بر روی سلول‌های ریز جلبک تحت تیمار ناقل فوق حاکی از عدم بیان ژن *gus* در سلول‌های ریز جلبک بود.

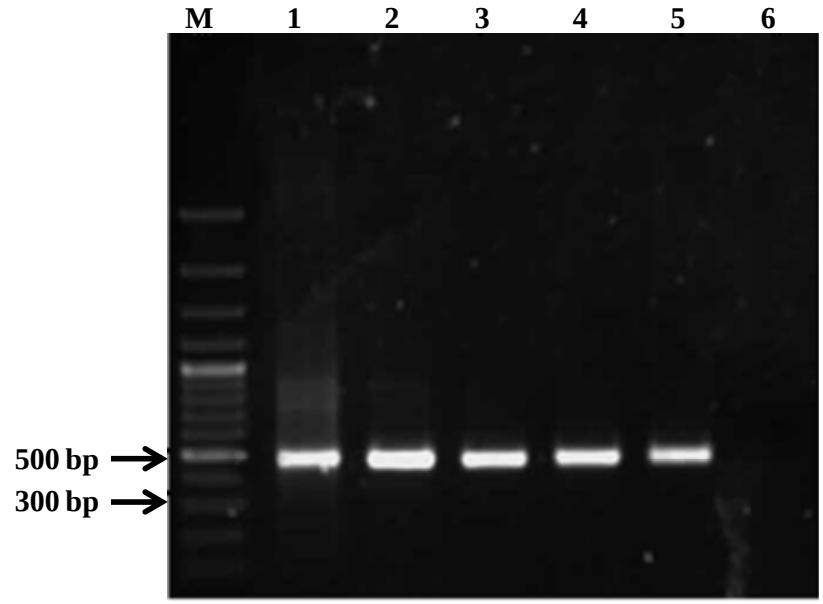
در روش الکتروپوراسیون در بسیاری از موارد با ایجاد جرقه در هنگام اتصال جریان الکتریکی همراه می‌شد. برای رفع این مشکل از بافرهای مختلف و یا ایجاد تغییر در شرایط برق دهی دستگاه استفاده شد. جلبک‌ها فقط زمانی زنده مانده و به طور کامل از بین نرفتند که با استفاده از برنامه Exponential decay با شدت جریان الکتریکی 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 میلی-لیتر باستا رشد کردند و تنها در غلظت ۹ میکروگرم نمونه‌های کنترل منفی رشد نکردند. این نتایج نشان می‌دهد که غلظت ۶ و۷ 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 (شکل‌های۶ و ۷) حاکی از حضور ژن‌های فوق در جلبک‌های به دست آمده می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]



شکل ۶- محصولات PCR مربوط به حضور ژن *HBsAg* (باند ۴۲۰ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده توسط تفنگ ژنی با راپچر دیسک 650 psi و در فاصله ۶ سانتی‌متر. چاهک M) مارکر 1 kb Plus؛ چاهک ۱ و۲ و۳) نمونه‌های ترانسفورم شده در غلظت ۹ میکروگرم در میلی لیتر باستا؛ چاهک ۴) کنترل مثبت (پلاسمید pCAMBHBsAg)؛ چاهک ۵) نمونه کنترل منفی (پلاسمیدpCAMBIA3300).



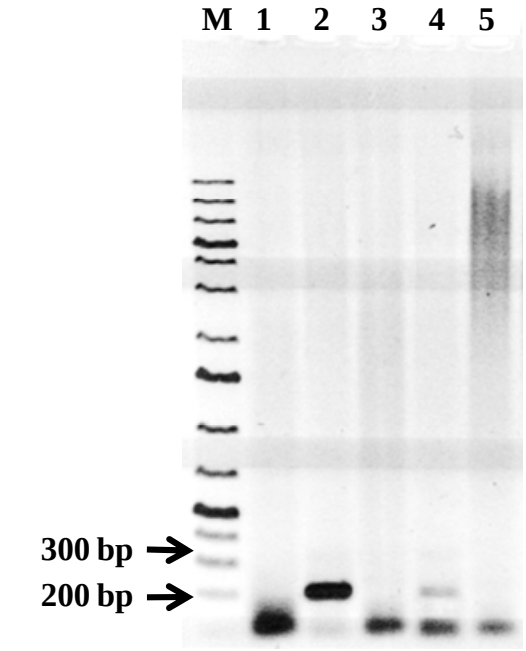
شکل ۷- محصولات PCR مربوط به حضور ژن *bar* (باندbp ۵۰۰) نمونه‌های ترانسفورم شده توسط تفنگ ژنی با راپچر دیسک 650 psi و در فاصله ۶ سانتی‌متر. چاهک M) مارکر؛ چاهک ۱ تا۴) نمونه‌های ترانسفورم شده در غلظت ۹ میکروگرم در میلی لیتر باستا؛ چاهک ۵) نمونه کنترل مثبت (پلاسمیدpCAMBI3300)؛ چاهک ۶) نمونه کنترل منفی.

در این روش درصد تراریختگی در حدود $۴x۱۰^{-۶}$ محاسبه شد. همچنین نتایج آزمون سرولوژیک Chemiluminescence Assay بر روی سلول‌های ریزجلبک رشدیافته بر روی محیط کشت انتخابی حاکی از عدم وجود مقادیر قابل ردیابی پروتئین زیر واحدهای HBsAg در سلول‌های ریز جلبک تراریخته می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]

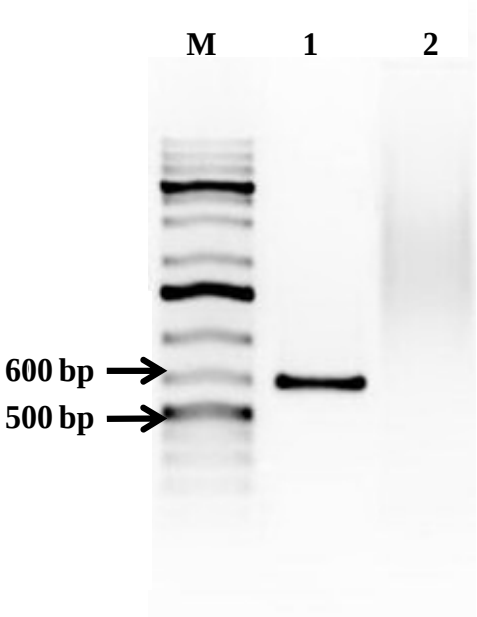
در روش هم‌کشتی با اگروباکتریوم ابتدا به منظور حذف باکتری، سلول‌های ریزجلبک پس از هم‌کشتی با محیط کشت مایع حاوی سفوتاکسیم شسته شدند و سپس بر روی محیط کشت جامد جلبک حاوی سفوتاکسیم (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و باستا (۶، ۷ و ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) واکشت شدند. در پتری‌هایی که غلظت ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر 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 واکشت شدند.



شکل۸- محصولات PCR مربوط به حضور ژن *HBsAg* (باند ۱۸۲ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده با اگروباکتریوم، چاهک M) مارکر 1 kb. چاهک ۱) نمونه وحشی؛ چاهک ۲) کنترل مثبت (پلاسمید pCAMB-HBsAg)؛ چاهک ۳ و۴ 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).

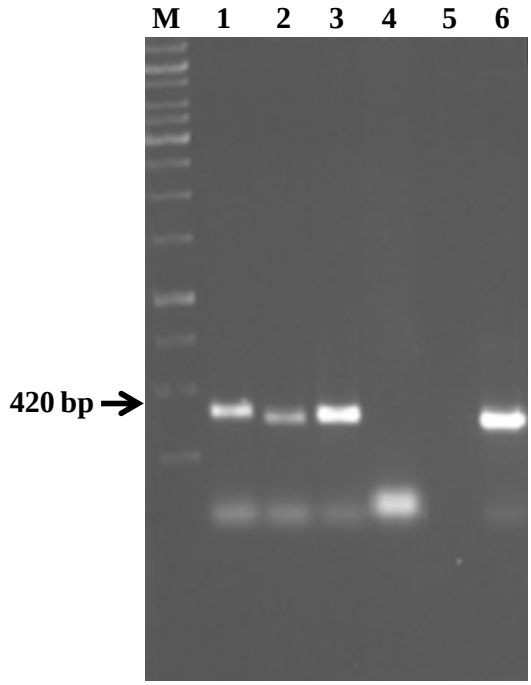
جهت اطمینان از عدم حضور اگروباکتریوم در محیط کشت از آغازگرهای اختصاصی ژن *vir* نیز در واکنش PCR استفاده شد که نتایج حاصله حاکی از عدم وجود اگروباکتریوم در محیط می‌باشد (شکل۹). با توجه به نتایج حاصله درصد تراریختگی در این روش $۱x۱۰^{-۶}$ محاسبه شد.



شکل۹- الکتروفورز محصولات واکنش PCR با آغازگرهای ژن *vir* اگروباکتریوم. چاهک M) مارکر DNA؛ چاهک ۱) کنترل مثبت؛ چاهک۲) 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 اگروباکتریوم منفی بود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]



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 میلی لیتر باستا؛ چاهک ۲) نمونه ترانسفورم شده به روش هم‌زدن با ذرات شیشه‌ای در غلظت ۹ میکروگرم در میلی لیتر باستا؛ چاهک ۴) نمونه شاهد؛ چاهک ۵) نمونه منفی؛ چاهک ۶) کنترل مثبت (pCAMHBsAg).

علی‌رغم پتانسیل بسیار بالای جلبک‌های میکروسکوپی و مخصوصا ریز جلبک دونالیلا برای استفاده در صنایع مختلف غذایی و دارویی، متاسفانه 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 فسفینوتریسین صورت پذیرفت. نتایج حاصله حاکی از قابلیت بازدارندگی علف‌کش باستا، حاوی ماده موثره فسفینوتریسین، برای ادامه رشد سویه UTEX200 جلبک *D. salina* بود. قابلیت بازدارندگی این علف‌کش در 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 حالی‌که 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 زئوسین، کلرامفینکل 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 فسفینوتریسین 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 میلی مولار 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 احتمالا به دلیل ناکافی بودن این ولتاژ برای ایجاد حفره در سطح غشای پلاسمایی سلول‌ها می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]

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 کارآیی 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 زئوسین، 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 دونالیلا 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 $۱۰^{-۶}$ – $۱۰^{-۴}$ 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 دونالیلا 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 بیوتکنولوزی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تشکر و قدردانی نمایند. 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 minipreparation: 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.5.5]