

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

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

محمد رضا صفرنژاد<sup>۱</sup>، محمد علیردانی<sup>۲</sup>، عبدالقدار سعدی‌زاده<sup>۳</sup>، مولود خلیلیان<sup>۴</sup>، محمد حسین دانشور<sup>۳</sup>، محمد علی ابراهیمی<sup>۱</sup>،  
غلامرضا صالحی جوزانی<sup>\*</sup><sup>۲</sup>

- ۱- استادیار، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاه‌پژوهشی 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 MR<sup>1</sup>, Alimardani M<sup>2</sup>, Sadizadeh A<sup>2</sup>, Khalilian M<sup>2</sup>, Daneshvar MH<sup>3</sup>, Ebrahimi MA<sup>4</sup>, Salehi Jouzani GH<sup>\*</sup><sup>2</sup>

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 از جمله جلبک‌های سبز تک سلولی متحرک‌ک‌می باشد 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 مونو-کلونال و سایر بروتئین‌های نوترکیب 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 کاتامایسین، هیگرومایسین، کلرامفینیکل و فسفینوتربیسین انجام شد. نتایج این آزمون حاکی از حساسیت ریز جلبک به فسفینوتربیسین در غلظت ۷ میکروگرم در میلی لیتر بود. برای انتقال ژن از روش‌های همزن با ذرات شیشه، الکتروپوراسیون، اگروباکتریوم و بمباران با تفنگ ژنی استفاده شد. سازه‌های مورد استفاده در این تحقیق حاوی ژن‌های گزارشگر *gus* و همچنین ژن کدکننده آنتی ژن سطحی و بروس هپاتیت بی تحت کنترل پیشبرهای 35S و یوبی کوئینین 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 تراویرخته قابلیت رشد خود را در محیط کشت حاوی نشانگر انتخابی فسفینوتربیسین 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 تراویرخته، 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

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 داروئی از طریق مهندسی متابولیک و استفاده از آنها به عنوان میزبان‌های یوکاریوتی جهت مطالعات زیست‌شناسی سلولی و مولکولی (León-Bañares et al. 2004; Ben-Amotz et al. 2009; Barzegari et al. 2011; Tabatabaei et al. 2011; Collet et al. 2014) ریز جلبک‌ها به منظور افزایش میزان چربی جهت تولید سوخت‌های زیستی مورد توجه قرار گرفته است.

علی‌رغم مزایای فوق‌الذکر، فرایند انتقال ژن خارجی به ریز جلبک دونالیلا و ایجاد تیپ‌های تاریخ‌خته 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 شده است. انتقال ژن انتخابگر *ble* تحت کنترل نواحی پروموتور و ترمیناتور *RbcS1* در ریز جلبک *D. tertiolecta* از طریق الکتروپوراسیون انجام شده است (Walker et al. 2005a). همچنین این روش به صورت موفقیت‌آمیز برای انتقال ژن انتخابگر *D. salina ble* به *D. salina* مورد استفاده قرار گرفته است (Sun et al. 2005). روش تکان دادن با استفاده از *D. salina* دانه‌های شیشه<sup>2</sup> به طور موفقیت‌آمیزی برای تاریخ‌ختنی انجام شده است (Feng et al. 2007). علاوه بر این ذرات نانویی فیلوسیلیکات منزیم توансه به خوبی برای انتقال ژن در ریز جلبک کلامیدومناس 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

ریز جلبک دونالیلا از گروه جلبک‌های سبز (فتوستتر کننده) تک سلولی می‌باشد که قادر 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 شده است. سایر گونه‌هایی که انتقال DNA خارجی به *Dunaliella viridis* و *Dunaliella tertiolecta* (Borowitzka and Siva 2007) ریز جلبک *D. salina* می‌باشند در حال حاضر به عنوان بهترین منبع تجاری تولید بتاکاروتین طبیعی در جهان می‌باشد. به علاوه گونه‌های مختلف این جلبک می‌توانند مقادیر قابل توجهی از مواد شیمیایی با ارزش مثل کاروتینوئیدها، گلیسرول، لیپیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و پروتئین‌ها را در سلول خود انباسته 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 متدالو، 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<sup>1</sup>) 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 ریز جلبک 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 ریز جلبک را کاندید مناسبی در انتقال ژن خارجی و تولید پروتئین‌های نوترکیب کرده است (Walker et al. 2005b).

<sup>2</sup> Glass beads

<sup>1</sup> Generally regarded as safe

## بررسی روش‌های مختلف انتقال ژن به ریز جلبک ...

جدول ۱- ترکیب اجزاء محیط کشت تغییریافته جانسون

مقادیر	ترکیبات
۶۰ گرم	NaCl
۱/۵ گرم	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
۰/۵ گرم	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
۰/۲ گرم	KCl
۰/۲ گرم	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
۱ گرم	KNO <sub>3</sub>
۰/۰۴۳ گرم	NaHCO <sub>3</sub>
۰/۰۳۵ گرم	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
۱۸۹ میلی گرم	Na <sub>2</sub> EDTA
۲۴۴ میلی گرم	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O
۶۱ میلی گرم	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
۳۸ میلی گرم	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O
۶ میلی گرم	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
۵/۱ میلی گرم	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
۱/۴ میلی گرم	ZnCl <sub>2</sub>
۱/۴ میلی گرم	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
حجم محلول به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شده و pH ۷/۵ در تنظیم شد	

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

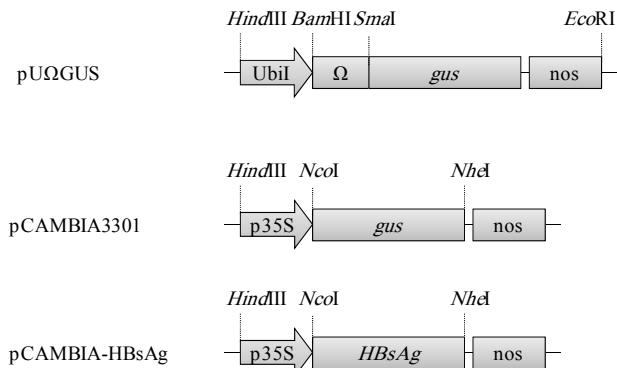
## کشت ریز جلبک

در این تحقیق از ریز جلبک *D. salina* سویه UTEX200 جهت انجام آزمون‌های تاریخی استفاده شد. کشت ریز جلبک در محیط کشت تغییریافته جانسون<sup>۱</sup> (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 لام‌ثوابار زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۲۰۰ شمارش شدند.

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها و علف‌کش باستا آزمون حساسیت ریز جلبک به آنتی‌بیوتیک‌ها و علف‌کش با استفاده از سلول‌های ریز جلبک در مرحله رشد لگاریتمی انجام پذیرفت ( $10^6 \times 4-6$  سلول در میلی لیتر). برای این منظور آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، هیگرومایسین، کلرامفینیکل، سفوتابکسیم و علف‌کش باستا استفاده شد. غلاظت آنتی‌بیوتیک‌ها از ۲۰۰ تا  $800 \mu\text{g}/\text{ml}$  و برای باستا  $3 \text{ تا } 20 \mu\text{g}/\text{ml}$  در نظر گرفته شد.

## سازه‌های ژنی

از پلاسمید pCAMBIA3301 حاوی ژن گزارشگر *GUS* و پلاسمید pCAMBIA-HBsAg حاوی ژن آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) تحت کنترل پیشبر 35S ویروس موزاییک کلم (CaMV) و نیز ژن مقاومت به فسفینوتیریسین (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 (شکل ۱).



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

## آزمون‌های انتقال ژن

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

## روش هم‌زدن با ذرات شیشه

برای این منظور ابتدا ۱/۵ میلی لیتر کشت مایع حاوی سلول‌های ریز جلبک در مرحله رشد لگاریتمی ( $10^6 \times 4-6$  سلول در میلی-

<sup>۱</sup> Dunaliella Johnson medium modified(DJMM)

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 ریز جلبک 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 pSI ۶۵۰ و ۹۰۰ ذرات طلا (به قطرهای  $0.06$  و یک میکرومتر) پوشش داده شده با پلاسمید به سمت سلول‌های ریز جلبک شلیک شدند. پس از بمباران با تفنگ ژنی جلبک‌ها با پایپتور 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 هم‌کشتنی 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. هم‌کشتنی اگروباکتریوم حاوی پلاسمید بر روی لایه ریز جلبک درون پلیت به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. سلول‌های ریز جلبک از سطح پلیت با کمک محلول محیط کشت حاوی سفتواتکسیم 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 (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.

لیتر) توسط سانتریفیوژ رسوب داده شدند. پس از سه بار شستشو در  $0.8$  میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه غوطه‌ور شدند. سپس  $300$  میلی‌گرم از ذرات شیشه (به قطر  $0.6$  میلی‌متر) به محیط حاوی ریز جلبک افروده شد. صد میکرولیتر محلول  $20$  درصد پلی اتیلن گلیکول افروده شد. به نمونه اضافه شد. به صورت آلترناتیو و به منظور افزایش کارایی انتقال ژن، از DNA اسپرم ماهی (به عنوان کریر DNA) به مقدار  $50$  میکروگرم به محلول افروده شد. سپس به میزان  $40$  میکروگرم پلاسمید بیانی به محلول افروده شده و به مدت  $15$  ثانیه ورتکس شدند. بعد از تهشیش شدن ذرات شیشه جلبک‌ها به فالکون‌های  $50$  میلی‌لیتری استریل منتقل شدند و به هر کدام از نمونه‌ها  $9$  میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت  $24$  ساعت در نور کم (حدود  $4-5$  میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) در فیتوترون قرار داده شدند. پس از  $48$  ساعت،  $7$  میکروگرم بر میلی‌لیتر علفکش باستا اضافه شده و به شرایط بهینه رشد در شیکر انکوباتور منتقل شدند.

#### روش الکتروپوراسیون

در این روش برای ایجاد تاریختنی در جلبک از دستگاه الکتروپوراتور (BIORAD, USA) استفاده شد. برای این منظور از برنامه‌های Exponential و Square wave decay Sun et al. (2005) بر اساس روش توصیف شده توسط استفاده شد. ابتدا  $1/5$  میلی‌لیتر از کشت ریز جلبک واقع در مرحله رشد لگاریتمی ( $10^6 \times 4-6$  سلول در میلی‌لیتر) سانتریفیوژ شده و پس از شستشوی سلول‌های تهشیش شده با محیط مایع تازه، توسط  $400$  میکرولیتر بافر الکتروپوراسیون (۱/۵ مولار گلیسرول،  $50$  میلی‌مolar NaCl،  $6$  میلی‌مolar CaCl<sub>2</sub>،  $30$  میلی‌مolar تریس و pH ۷.۵) معلق سازی شد.  $30$  میکرولیتر پلاسمید pCAMBIA3301 (با غلظت حدود دو میکروگرم در میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه شد. سوسپانسیون به مدت  $10-15$  دقیقه بر روی یخ گذاشته شد و سپس به کووت الکتروپوراسیون منتقل شد. سلول‌ها با دستگاه الکتروپوراتور و با ولتاژهای  $2500-500$  ولت بر سانتی‌متر الکتروپوریت شدند. کووت به مدت  $5$  دقیقه مجدداً بر روی یخ گذاشته شده و نمونه‌ها در  $10$  میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه غوطه‌ور شده و به شرایط نورکم به مدت  $24$  ساعت منتقل

جدول ۲-آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

آغازگر	ژن هدف	ترادف (5'-3')	طول قطعه تکثیر شده (bp)
FHBsAg	HBsAg	CCGCTTCATCATCTTCTGT AGCAGCAGGAGGGGTACAT	182
RHBsAg	bar	TCTATCTCTCGAGCTTCGCAG ATGGAGAAACTCGAGCTTGTGCAT	428
Fbar	gus	TTACCATGGTTATGTTACGTCTGTAGAAC AATCTGCAGTCATTGTTGCCTCCCTGCTGC	500
Rbar	virG	ATGATTGTACATCCTCA TGCTGTTTATCAGTTGAG	600
FGUS			
RGUS			
FVir			
RVir			

آزمون Chemiluminescence assay با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی پروتئین مذکور توسط آزمایشگاه رازی (کرج، ایران) جمع‌آوری سلول‌های ریز جلبک در اوخر مرحله رشد لگاریتمی

با سانتریفیوژ صورت پذیرفته و استخراج DNA به روش دلپورتا

انجام گرفت (Dellaporta et al. 1983).

آزمون RT-PCR با استفاده از کیت اسخراج RNA (Biorad, USA)

از سلول‌های جلبک با استفاده از کیت اسخراج 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 I تیمار شدند. در ادامه آزمون PCR با

استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) انجام و قطعه تکثیر

شده بر روی ژل آگارز ردیابی شد.

بررسی کارایی انتقال ژن و بیان ژن خارجی در ریز جلبک

جمع‌آوری سلول‌های ریز جلبک در اوخر مرحله رشد لگاریتمی

با سانتریفیوژ صورت پذیرفته و استخراج DNA به روش دلپورتا

انجام گرفت (Dellaporta et al. 1983).

آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) صورت

پذیرفت. جهت اطمینان از عدم حضور اگروباکتریوم در محیط

کشت از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های بیماری‌زا (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

كمی تغییرات استفاده شد. برای این منظور ۴۸ ساعت پس از

ترانسفورماسیون، جلبک‌های ترانسفورم شده ( $10^7$  سلول)

با سانتریفیوژ جمع‌آوری شده و پس از حذف رونشین ریز جلبک‌ها

با محلول ثابت کننده [اتانول ۹۶٪-اسید استیک (۱٪)] به مدت نیم

ساعت در دمای اتاق ثابت شدند. ۲۰۰ میکرولیتر محلول رنگ-

آنژی به سلول‌های ریز جلبک افزوده شد. پلت به آرامی در

محلول رنگ‌آمیزی (M NaPO4, 10 mM EDTA, 0.1% ۰.۱ M

Triton X-100, 1 mM K3Fe(CN)6, 2 mM X-Gluc

و سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور

درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون

سلولی زیر میکروسکوپ نوری بررسی شده و مجددا سلول‌ها با

سانتریفیوژ جمع‌آوری شده و پس از حذف رونشین، ۱۵۰

میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد جهت کلروفیل‌زادی به سلول‌های

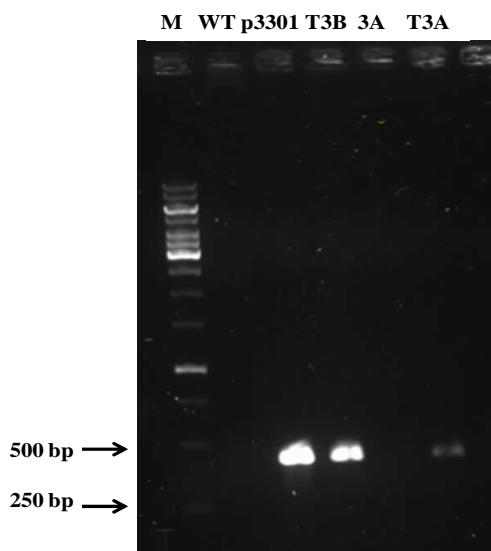
ریز جلبک افزوده شد و نمونه‌ها بررسی شدند. همچنین به منظور

بررسی تولید پروتئین واکسن هپاتیت بی در سلول‌های تراریخته،

## نتایج و بحث

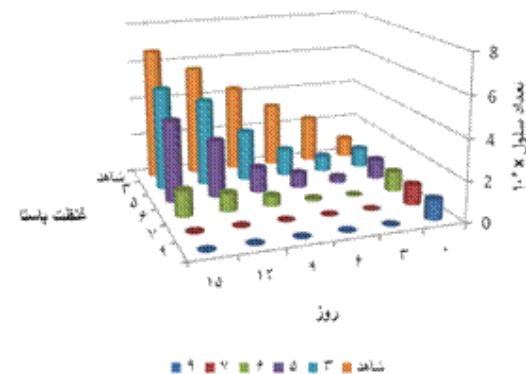
نتایج استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، هیگرومایسین، کلرامفینیکل حاکی از آن بود که هیچ کدام از این آنتی‌بیوتیک‌ها توانستند حتی در غلظت  $800 \mu\text{g/ml}$  میکروگرم در میلی‌لیتر، از رشد ریز جلبک جلوگیری کنند. در مورد آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم، غلظت‌های بالاتر از  $500 \mu\text{g/ml}$  میکروگرم در میلی‌لیتر محدود کننده رشد بود. استفاده از علف‌کش باستا که حاوی ماده موثره فسفینوتربیسین می‌باشد، نشان داد که سلول‌های ریز جلبک دارای حساسیت به این علف‌کش می‌باشند (شکل ۲). غلظت‌های بالاتر از  $7 \mu\text{g/ml}$  میکروگرم در میلی‌لیتر باستا کاملا از رشد (در غلظت  $10^6$

ماهی) برای انتقال ژن، فقط دو نمونه (T3A و T3B) در محیط حاوی باستا رشد کرده بودند، در حالی که نمونه کنترل منفی فاقد رشد بود. نمونه کنترل منفی شامل کشت سلول‌های ریز جلبک PCR تحت تیمار مشابه ولی فاقد ناقل بیانی می‌باشد. نتایج آزمون PCR با آغازگرهای طراحی شده برای ژن *bar* و *gus* 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 تاریخته حاصله، در حدود تاریختی با استفاده از روش تکان دادن با ذرات شیشه در حدود  $4 \times 10^{-4}$  محاسبه شد. بررسی بیان ژن *gus* در ریزجلبک‌های ترانسفورم شده با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هیستوشیمیابی صورت پذیرفت. نتایج این آزمون حاکی از بروز رنگ آبی در سلول‌های ریزجلبک ترانسفورم شده با روش ذرات شیشه‌ای بود (شکل ۵).



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 pCAMBIA3301 و T3B نمونه ترانسفورم شده به همراه حامل pCAMBIA3301 (WT) نمونه ترانسفورم نشده؛ p3301 پلاسمید.

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  $10^4$  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 قرار گیرد.



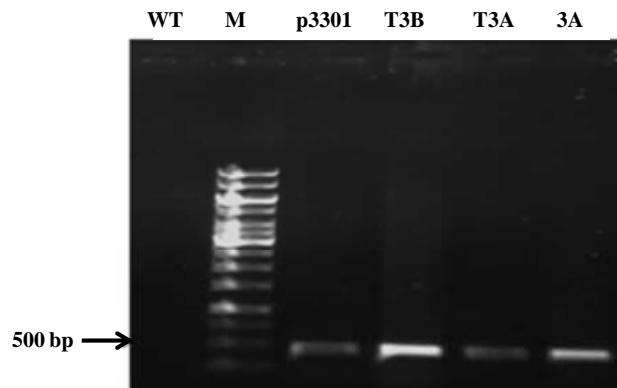
شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف علفکش باستا بر میزان رشد ریزجلبک دونالیلا در طی دو هفته

پس از انجام مراحل مختلف انتقال ژن‌های خارجی به میزبان ریزجلبک، بررسی حضور و بیان ژن‌های خارجی *gus* و آتنی ژن سطحی وبروس هپاتیت بی در کشت‌های حاوی ممانعت کننده باستا صورت پذیرفت. قابلیت رشد سلول‌های ریز جلبک در غلظت ۷ و یا ۹ میکروگرم در میلی لیتر باستا به عنوان معیار اولیه برای جداسازی سلول‌های کاندید حاوی ژن خارجی استفاده شد. در آزمون تاریختگی با استفاده از ذرات شیشه از دو ناقل بیانی pCAMBIA3301 (حاوی ژن گزارشگر *gus* و نشانگر انتخابی *bar*) و pUΩGUS (حاوی ژن گزارشگر *gus* و پیشبر یوویکوئین) استفاده شد. نتایج حاصله در مورد استفاده از ناقل بیانی pCAMBIA3301 حضور علفکش باستا، پس از ۱۶ روز تک کلون‌های ریز و سبز ظاهر می‌شوند. به منظور بررسی تاریختگی 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 اسپریم

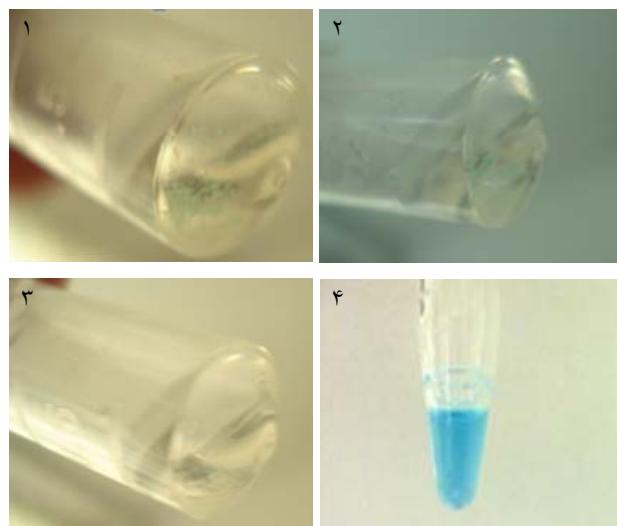
آزمون هیستوشیمیابی بر روی سلول‌های ریز جلبک تحت تیمار ناقل فوق حاکی از عدم بیان ژن *gus* در سلول‌های ریز جلبک بود.

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 تعییر 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 باست، مشاهدات حاکی از عدم رشد سلول‌های ریز جلبک در محیط انتخابی می‌باشد. بنابراین درصد ترازیختگی 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 باست 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 غلاظت باستا برای بازدارندگی و انتخاب گزینش‌گری برای ترانسفورمات‌ها 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 ترازیخته بودن آنها باشد ولی در گزینش آنها بر روی محیط گزینش‌گر امکان فرار غیر ترازیخته‌ها 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.

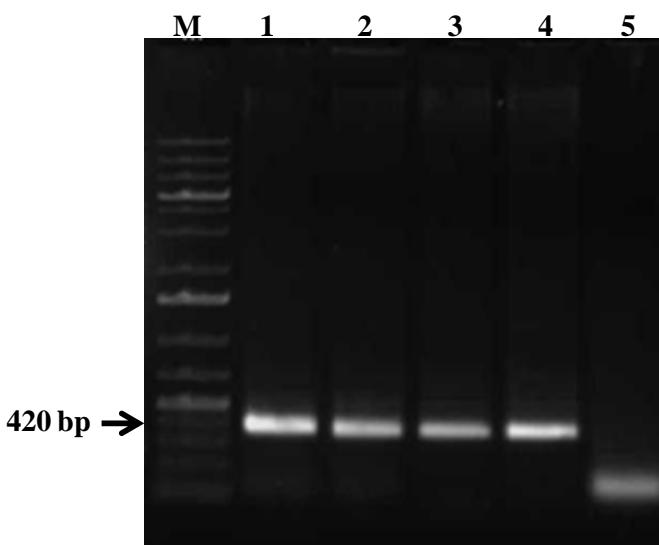


شکل ۴- واکنش PCR با آغازگر ژن *bar* (باند ۵۰۰ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده با روش ذرات شیشه‌ای (3A)، نمونه‌های ترانسفورم شده بدون کریر (WT)، T3B و T3A نمونه‌های ترانسفورم شده به همراه حامل pCAMBIA3301 (p3301) نمونه ترانسفورم نشده؛ ۳A پلاسمید pCAMBIA3301.

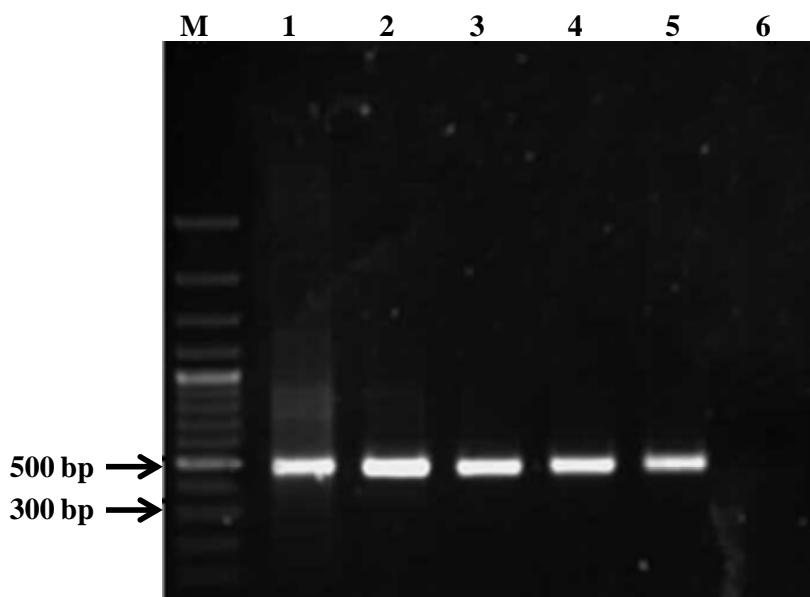


شکل ۵- آزمون هیستوشیمیابی برای بررسی بیان ژن *gus*، (۱ و ۲) نمونه‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pCAMBIA3301؛ (۳) کنترل منفی: (جلبک‌های اگروباكتری حاوی ژن *gus*)، (۴) کنترل مثبت (اگروباكتری حاوی ژن *gus*).

در این تحقیق به صورت آلترباتیو، قابیلت 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 تفنج ژنی با راپجر دیسک psi 650 و در فاصله ۶ سانتی‌متر. چاهک (M) مارکر Plus 1 kb؛ چاهک ۱ و ۲ و (۳) نمونه‌های ترانسفورم شده در غلظت ۹ میکروگرم در میلی لیتر باست؛ چاهک (۴) کنترل مثبت (پلاسمید pCAMBIA3300)؛ چاهک (۵) نمونه کنترل منفی (پلاسمید pCAMBHBsAg).

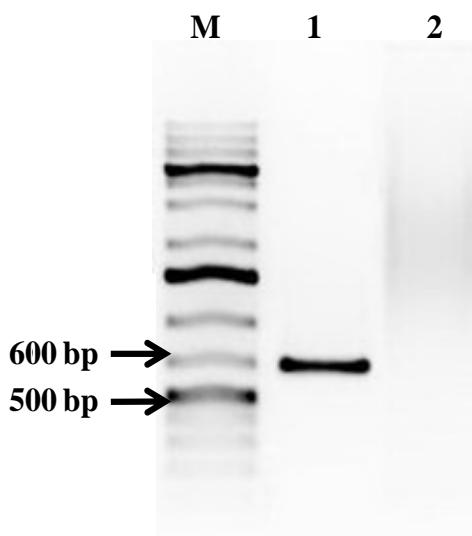


شکل ۷- محصولات PCR مربوط به حضور ژن *bar* (باند ۵۰۰ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده تفنج ژنی با راپجر دیسک psi 650 و در فاصله ۶ سانتی‌متر. چاهک (M) مارکر؛ چاهک ۱ تا (۴) نمونه‌های ترانسفورم شده در غلظت ۹ میکروگرم در میلی لیتر باست؛ چاهک (۵) نمونه کنترل مثبت (پلاسمید pCAMBI3300)؛ چاهک (۶) نمونه کنترل منفی.

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

در این روش درصد تاریختگی در حدود  $4 \times 10^{-9}$  محاسبه شد. همچنین نتایج آزمون سرولوژیک Chemiluminescence Assay بر روی سلول‌های ریز جلبک رشدیافته بر روی محیط کشت

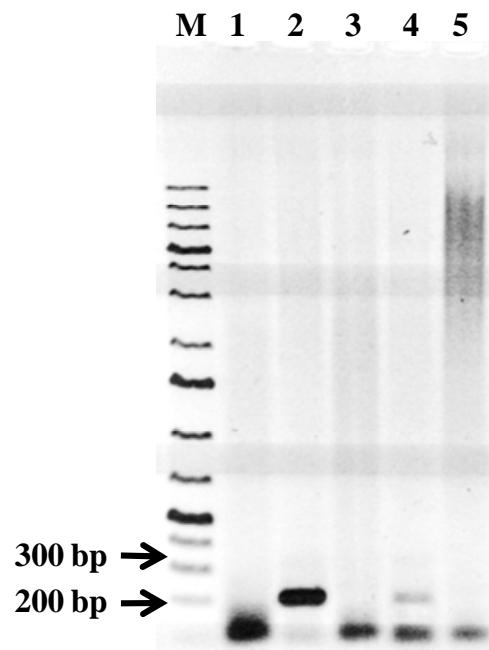
جهت اطمینان از عدم حضور اگروباکتریوم در محیط کشت از آغازگرهای اختصاصی ژن *vir* نیز در واکنش PCR استفاده شد که نتایج حاصله حاکی از عدم وجود اگروباکتریوم در محیط می‌باشد (شکل ۹). با توجه به نتایج حاصله درصد تراویختگی در این روش  $1 \times 10^{-6}$  محاسبه شد.



شکل ۹- الکتروفورز محصولات واکنش PCR با آغازگرهای ژن *vir* اگروباکتریوم. چاهک (M) مارکر DNA؛ چاهک (۱) کنترل مثبت؛ چاهک (۲) نمونه جلبک تراویخته.

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 *bar* و *HBsAg* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. برای این منظور ابتدا جداسازی RNA از نمونه‌های جلبک تراویخته مقاوم به علفکش صورت پذیرفت و ستر cDNA با استفاده از آغازگر oligo dT 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 درخصوص نمونه‌های به دست آمده از روش هم‌کشتی با اگروباکتریوم منفی بود.

در روش هم‌کشتی با اگروباکتریوم ابتدا به منظور حذف باکتری، سلول‌های ریزجلبک پس از هم‌کشتی با محیط کشت مایع حاوی سفووتاکسیم شسته شدند و سپس بر روی محیط کشت جامد جلبک حاوی سفووتاکسیم (۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و باستا (۶، ۷ و ۹ میکروگرم در میلی لیتر) واکشت شدند. در پنجمین روز غلظت ۹ میکروگرم در میلی لیتر باستاد داشتند، پس از ۱۵ روز هیچ کلونی مشاهده نشد. اما در غلظت‌های ۶ و ۷ میکروگرم در میلی لیتر پس از دو هفته کلونی‌هایی مشاهده شد. کلونی‌های حاصله سپس به صورت جداگانه در محیط مایع حاوی سفووتاکسیم و باستاد واکشت شدند.

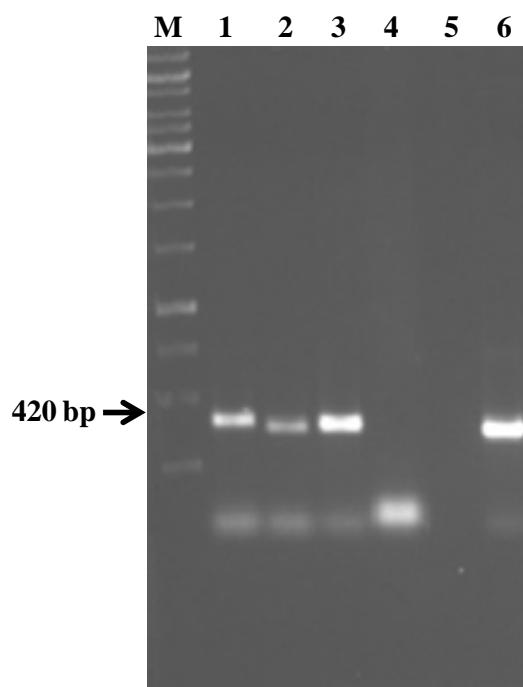


شکل ۸- محصولات PCR مربوط به حضور ژن *HBsAg* (باند ۱۸۲ bp) نمونه‌های ترانسفورم شده با اگروباکتریوم، چاهک (M) مارکر ۱ kb؛ نمونه وحشی؛ چاهک (۲) کنترل مثبت (پلاسمید pCAMB-HBsAg)؛ چاهک (۳ و ۴) نمونه‌های حاصل از ریزجلبک‌های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی (چاهک ۴ نمونه تراویخته).

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 کلامفینیکل 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 زئوسین، کلامفینیکل 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 فسفینوتیریسین به عنوان ماده انتخابگر در انتقال ژن به این ریزجلبک گزارش شده است (Wang et al. 2007; Feng et al. 2009).

در این تحقیق از روش‌های مختلف انتقال ژن برای ایجاد جلبک‌های تاریخخته استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، استفاده از روش الکتروپوراسیون برای تولید جلبک‌های تاریخخته 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 میلی‌مolar سوربیتول ۲۰۰ میلی‌مolar مانیتول به عنوان محلول پیش تیمار و محلول‌های دارای نمک به عنوان بافر اصلی الکتروپوراسیون استفاده شده است (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 Ag در تکنیک RT-PCR در جلبک‌های تاریخخته. 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 میکروسکوبی و مخصوصاً ریز جلبک دونالیلا برای استفاده در صنایع مختلف غذایی و دارویی، متسافانه اصلاح ژنتیکی آن از طریق مهندسی ژنتیک تاکنون به دلیل ناشناخته بودن ساختار ژنتیکی آن همواره مشکل بوده است (Barzegari et al. 2010). در دسترس بودن ژن‌های 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، کلامفینیکل و فسفینوتیریسین صورت پذیرفت. نتایج حاصله حاکی از قابلیت بازدارندگی علف‌کش باستا، حاوی ماده موثره فسفینوتیریسین، برای ادامه رشد سویه UTEX200 جلبک *D. salina* بود. قابلیت بازدارندگی این علف‌کش در

این تحقیق در قالب پژوهه تحقیقاتی مصوب پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران اجرا شده است.

### منابع

- Anila N, Chandrashekhar 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.

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

نتایج حاصله در این تحقیق نشان می‌دهد که روش‌های استفاده از ذرات شیشه و همچنین تفنج 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 معدهودی از کلون‌های حاوی ژن خارجی شود و درصد تاریختگی در این روش‌ها در حدود  $10^{-6} - 10^{-4}$  محاسبه شد. درصد بسیار پایین تاریختی و عدم پایداری آن در سلول‌های ریز جلبک باعث می‌شود که تولید رده‌های سلوالی تاریخته این ریز جلبک 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

نویسنده‌گان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری صمیمانه کارشناسان بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و اینمی 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