



农杆菌介导转化莱茵衣藻体系的优化

覃晓云^{1,2}, 李芳³, 王树军³, 刘志媛^{1,2*}

¹海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南 海口 570228

²海南大学海洋学院, 海南 海口 570228

³中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101

摘要: 【目的】为建立根癌农杆菌介导的莱茵衣藻快速简便高效的遗传转化体系, 本研究以模式生物莱茵衣藻为受体材料, 从转化方法和转化子快速鉴定两个方面进行了优化。【方法】比较了固体培养基共培养转化方法和液体培养基共培养转化方法对根癌农杆菌LBA 4404介导的莱茵衣藻CC425转化效率的影响; 研究并比较了(1)首先经过TE裂解再进行PCR (两步法)和(2)不经TE裂解直接进行PCR (一步法)的两种转化子鉴定方法的最佳反应条件和扩增效率。【结果】农杆菌LBA 4404和莱茵衣藻CC425液体培养基共培养5 d后的转化效果最好, 转化率达 43.33 ± 1.67 个转化子/ 10^6 个藻细胞。PCR最佳反应条件为: 使用高保真DNA聚合酶Taq 1进行扩增; 参加PCR反应的细胞密度为 $5 \times 10^3 - 5 \times 10^6$ 个/mL; TE裂解缓冲液沸水浴20 min (两步直接PCR方法), 或者预变性15 min (一步直接PCR方法)。两步法直接PCR的扩增效率优于一步法, 但后者反应步骤更简洁。【结论】本研究建立并优化了农杆菌液体介导莱茵衣藻遗传转化体系, 该体系可快速获得遗传转化子, 减少转化工作量。

关键词: 莱茵衣藻, 农杆菌介导, 液体共培养, PCR 鉴定方法, 转化子

单细胞真核绿藻莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*), 具有实验操作简单、生长周期短、遗传背景清楚和容易获得各种突变体等优点^[1], 是众多生物学过程研究的模式物种, 已广泛应用于光合作用、遗传与代谢、细胞周期调控、鞭毛功能和组装等生物学过程^[2-4]。

莱茵衣藻的遗传转化是获得突变体, 进而研究基因功能、遗传代谢等生物学过程的有效手段。目前莱茵衣藻的遗传转化方法主要有玻璃珠法^[5]、电击法^[6]、基因枪法^[7]和农杆菌介导法^[8]。

由于农杆菌介导的转化方法操作简单、可转移大片段DNA、插入基因整合拷贝数低、遗传稳

基金项目: 雨生红球藻海水驯化研究及陆海结合产业模式试点(ZDYF2019128)

*通信作者。E-mail: liuzhiyuan111@163.com; liuzhiyuan111@hainu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-24; 修回日期: 2020-05-18; 网络出版日期: 2020-05-29

定性好、重排少和可优先整合到转录活性区等优点^[9], 成为当前植物基因工程最常用的方法。然而农杆菌转化效率受颇多因素影响, 例如农杆菌株、受体类型、菌与受体共培养的方式、浸染浓度和时间等, 因此, 转化方法还需根据转化材料特性经过优化, 才能提高效率。

快速、简单、高效的转化子 PCR 鉴定方法是获得高效突变体的关键技术。传统的 PCR 检测需要细胞培养、收集及基因组 DNA 提取等步骤。不经过 DNA 提取和纯化, 直接将细胞进行 PCR 检测的方法可以显著节省时间和成本, 提高效率。直接 PCR 方法已经在细菌和酵母中成熟应用。研究者在三角褐指藻、亚心型扁藻、球等鞭金藻、盐生杜氏藻、海洋微拟球藻、李氏新月藻中型变种、雨生红球藻、莱茵衣藻、微绿球藻、栅藻和小球藻等单细胞藻类中成功应用直接 PCR 方法^[10-14]。利用玻璃珠研磨^[13], 或者加入 TE、chelex-100、EDTA、Y-PER 和 2×PCR buffer 等裂解液通过加热释放 DNA, 然后进行 PCR 扩增鉴定^[10-12,14]。基于现有的方法, 针对影响 PCR 扩增的主要因素, DNA 聚合酶、藻细胞浓度和藻细胞破碎时间进行优化, 以期提高转化子 PCR 鉴定方法的效率。

本研究以莱茵衣藻 CC425 为受体材料, 通过比较农杆菌介导转化的两种转化方法, 以及两种不经 DNA 提取、直接 PCR 扩增鉴定转化子的方法, 优化农杆菌介导转化莱茵衣藻的技术体系, 提高了转化效率, 为下一步基因功能研究提供技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 藻株、菌株与载体: 莱茵衣藻 CC425 购自

中国科学院水生生物研究所。农杆菌 LBA 4404 由本实验室保存。携带潮霉素抗性基因的植物双元表达载体 pCAMBIA 1301 由本实验室保存。

1.1.2 培养基: 莱茵衣藻继代培养基: TAP 培养基, pH 7.0, 固体培养基添加 1.5%琼脂粉, 高压灭菌后使用。

农杆菌继代培养基: LB 培养基, 固体培养基添加 1.5%琼脂粉, 高压灭菌后使用。

诱导培养基: TAP 液体培养基高压灭菌后, 添加 100 μmol/L 的乙酰丁香酮(AS, Sigma), pH 为 7.0。

恢复培养基: TAP 培养基高压灭菌后, 添加 500 μg/mL 头孢噻肟钠(Sigma)。

转化子固体筛选培养基: TAP 固体培养基高压灭菌后添加 15 μg/mL 潮霉素(Hyg, Merck)和 500 μg/mL 头孢噻肟钠。

转化子液体筛选培养基: TAP 液体培养基高压灭菌后添加 2.5 μg/mL 潮霉素和 500 μg/mL 头孢噻肟钠。

1.2 莱茵衣藻 CC425 潮霉素抗性浓度筛选

取 200 μL 指数生长期的莱茵衣藻 CC425 涂布于分别含有 0、5、10、15、20、25、30、35、50 μg/mL Hyg 和 500 μg/mL 头孢噻肟钠的 TAP 固体培养基上, 于 25 °C、55 μmol/(m²·s)、光暗周期为 12 h : 12 h (光照 : 黑暗)条件下培养。培养 5、10、15、30 d 后观察藻细胞生长状况。每个处理设置 3 次重复。

1.3 农杆菌介导转化莱茵衣藻 CC425

1.3.1 藻细胞培养: 藻种活化后, 接种于 TAP 液体培养基中, 于 25 °C、150 μmol/(m²·s)、光周期为 12 h : 12 h (光照 : 黑暗)条件下继代培养。

1.3.2 农杆菌侵染用菌液制备: 热击法将表达载体 pCAMBIA 1301 转入农杆菌 LBA 4404 菌株中, 以潮霉素抗性基因(*Hpt*)作为目的检测基因, 进行 PCR 鉴定阳性菌株。将含有 pCAMBIA 1301 载体的农杆菌接种至含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素(Kan, Sigma)的 LB 液体培养基中, 培养至菌液 OD_{600} 达到 0.6 左右, 5000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 重悬到液体诱导培养基中黑暗孵育 2 h, 准备对莱茵衣藻 CC425 进行侵染转化。

1.3.3 农杆菌对莱茵衣藻 CC425 的基因遗传转化体系优化: (1) 固体培养基共培养转化法^[8], 将 200 μL 指数生长期(3×10^6 个/mL)莱茵衣藻 CC425 涂布于固体诱导培养基平板上, 3 个平行, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期为 12 h : 12 h (光照 : 黑暗)预培养 5 d, 再将含载体 pCAMBIA 1301 的农杆菌 LBA 4404 悬浮液 200 μL 均匀涂布浸染, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗共培养 2 d。

(2) 液体培养基共培养转化, 取 10 mL 指数生长期(3×10^6 个/mL)的莱茵衣藻 CC425 和 10 mL OD_{600} 为 0.6 左右的农杆菌悬浮液, 经 4000 r/min 离心 3 min, 去上清, 混匀于 10 mL 液体诱导培养基中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、摇床 50 r/min、黑暗共培养 3–5 d。

1.3.4 转化子筛选与培养: 将共培养藻细胞, 接种到液体的恢复培养基中恢复培养 12 h, 使农杆菌菌体死亡。然后调节藻细胞浓度为 3×10^6 个/mL, 取 200 μL 藻液涂布于固体筛选培养基(含有 Hyg 和头孢噻肟钠)上培养, 直至长出转化子藻落。将转化子接种于液体筛选培养基中活化和培养。培养条件均为 55 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期 12 h : 12 h (光照 : 黑暗)、25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.5 转化子 PCR 鉴定: 收集活化的藻细胞, 使用艾德莱基因组 DNA 提取试剂盒(DN14)提取

藻细胞基因组 DNA, PCR 检测 *Hpt* 基因的整合和表达, 筛选目的基因插入的转化子藻株。

取 1 μL DNA 作为模板, 加入 *Taq* 酶 1 U (艾德莱), *Hpt* 基因上下游引物各 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (表 1), dNTPs 0.2 mmol/L, 1 \times PCR buffer (Mg^{2+}), ddH₂O 补足至 25 μL , 用于 PCR 扩增。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

然后利用 X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-glucuronide, sigma)染色, 测定 GUS 活性, 检测 PCR 筛选的转化藻株 *Gus* 基因表达。

1.4 莱茵衣藻 CC425 转化子 PCR 检测方法优化

1.4.1 莱茵衣藻 CC425 18S rRNA 基因快速 PCR 检测: 以莱茵衣藻 18S rRNA 基因为目的扩增片段, 采取两种方法检测直接 PCR 方法的扩增效率。

(1) 两步直接 PCR 法: 根据 Wan 等^[11]方法, 藻细胞首先在 TE 中裂解, 然后进行 PCR 反应。取平板生长的藻落或离心收集藻细胞于 TE 缓冲液中, 使藻细胞浓度分别达到每毫升 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 左右, 分别进行沸水浴 5、10、15、20 min, 然后冰浴 5 min。取 2 μL 藻液于 PCR 管中, 加入 PCR 反应体系至 25 μL 进行扩增。

表 1. 用于 PCR 的引物

Table 1. Primers used for PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Amplification size/bp
18S rRNA	ACCTGGTTGATCCTGCCAGT TCACCTACGGAAACCTTGT	1770
<i>Hpt</i>	AAAAGTTCGACAGCGTCTC GCGACCTCGTATTGGGAATC	640

(2) 一步直接 PCR 法: 取平板生长的藻落或离心收集藻细胞于 PCR 管中, 使用无酶灭菌水使藻细胞浓度达到每毫升 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 左右, 不经过 TE 裂解和 PCR 缓冲液裂解细胞步骤, 取 2 μ L 藻液于 PCR 管中, 加入 PCR 反应体系至 25 μ L, 分别进行 5、10、15、20 min 预变性后, 再进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系为: *Taq* 酶 1 U (*Taq* 1: 艾德莱 F8 FastLong *Taq*; *Taq* 2: TaKaRa *rTaq*; *Taq* 3: 艾德莱 *Taq*), 18S rRNA 上下游引物(表 1)各 0.5 μ mol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 1 \times PCR buffer (Mg^{2+}), ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5–20 min, 两步法预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 总延伸 8 min。PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4.2 莱茵衣藻 CC425 转化子 *Hpt* 基因 PCR 快速检测: 选取 1.3.5 鉴定的阳性转化子, 使用 1.4.1 优化好的直接 PCR 方法进行 *Hpt* 基因的 PCR 扩增, 以基因组 DNA 为模板进行 *Hpt* 基因的 PCR 扩增结果作为对照。

1.5 分析方法

采用 DPS 数据处理系统对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA analysis)。Microsoft Excel 2016 进行作图分析。

2 结果和分析

2.1 莱茵衣藻 CC425 潮霉素抗性浓度筛选

将莱茵衣藻 CC425 涂布于含不同浓度 Hyg 和 500 μ g/mL 头孢噻肟钠的 TAP 固体培养基上。

对在不同 Hyg 浓度的平板上生长 10 d 的藻落观察发现, 在 Hyg 浓度为 5 μ g/mL 的平板上, 藻落可以正常生长, 藻细胞密度与对照无显著差异; 当 Hyg 浓度为 10 μ g/mL 时, 藻细胞密度显著低于对照; 当平板中的 Hyg 浓度在 15 μ g/mL 以上时, 则藻细胞的生长完全受到抑制(图 1)。培养 15 d 和 30 d 的结果与 10 d 的结果一致。因此选择 15 μ g/mL 的 Hyg 浓度为莱茵衣藻 CC425 转化子筛选浓度。

2.2 两种共培养方法对莱茵衣藻 CC425 转化的影响

分别采用固体培养基共培养转化方法和液体培养基共培养转化方法。前期实验表明, 固体共培养的最佳时间为 2 d; 随着培养时间延长, 农杆菌数量增加, 会抑制莱茵衣藻 CC425 生长, 影响转化效果。液体共培养则需要 3 d 才出现转化藻株。因此我们选择固体共培养 2 d, 液体共培养 3、4、5 d, 进行转化共培养。将两种方法共培养的藻细胞, 恢复培养 12 h 后分别涂布于固体筛选培养基上弱光培养。

7 d 后均得到转化子, 采用固体培养基共培养转化方法(图 2)获得 11.11 ± 1.67 个转化子/ 10^6 个细胞; 采用液体培养基共培养 3 d 获得的转化子数目(8.33 ± 0.96 转化子/ 10^6 个细胞)和固体共培养获得的无显著性差异($P > 0.05$)。而液体共培养 4 d (23.33 ± 1.67 个转化子/ 10^6 个细胞)和 5 d (46.67 ± 1.67 个转化子/ 10^6 个细胞)获得的转化子数目都显著高于固体共培养获得的转化子数目($P < 0.05$), 并且液体共培养 5 d 获得的转化子数目显著高于液体共培养 4 d 获得的转化子数目($P < 0.05$)。

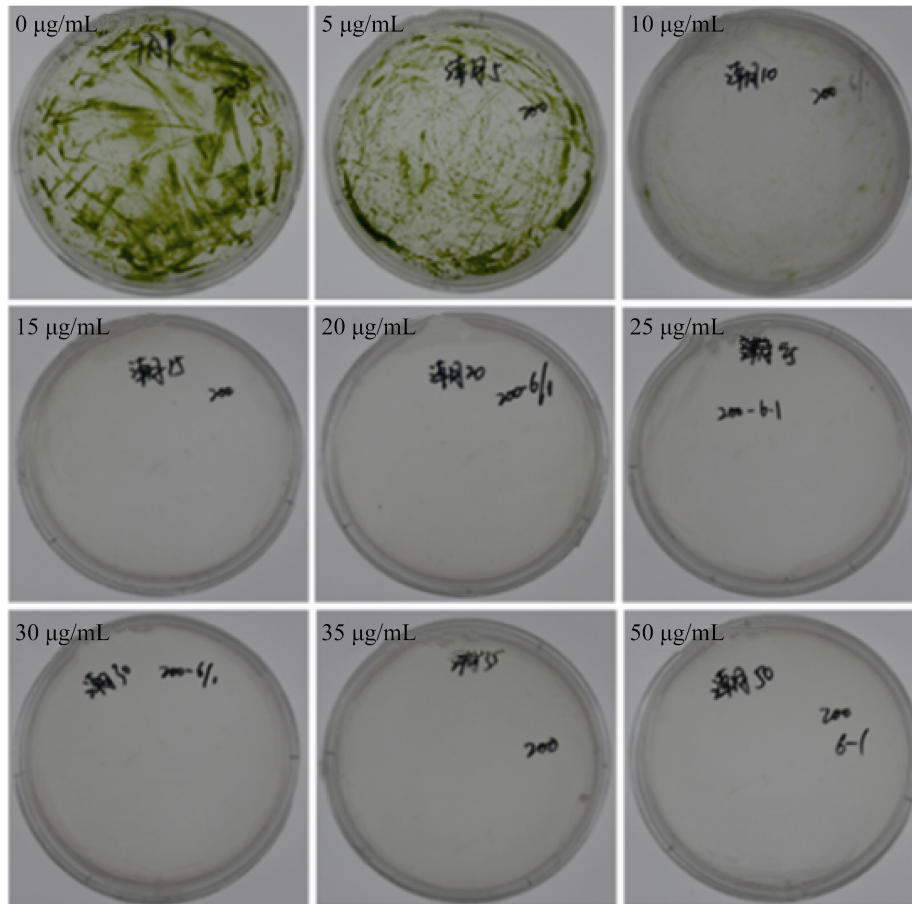


图 1. 莱茵衣藻 CC425 对潮霉素抗性试验

Figure 1. The resistance of different concentrations of Hyg on *C. reinhardtii* CC425.

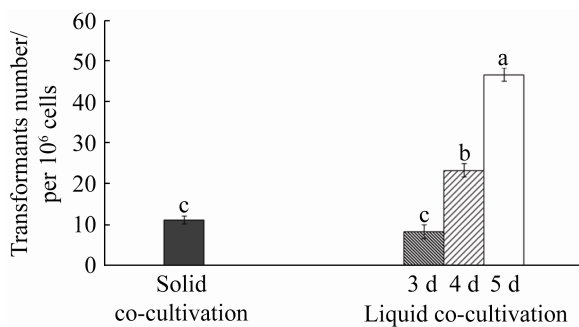


图 2. 农杆菌不同介导转化方法的效率

Figure 2. Efficiency of different methods of *Agrobacterium*-mediated transformation of *C. reinhardtii* CC425. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$) and different lower-case letters indicate significant statistical differences in every treatments according to Duncan test ($P<0.05$).

对抗性筛选平板上获得的转化子进行 *Hpt* 基因的 PCR 扩增鉴定(图 3), 发现固体培养基共培养方法每 10^6 细胞可以获得 5.00 ± 1.67 个阳性转化子, 阳性率达 $44.44\% \pm 11.98\%$ (图 4-A-B), 固体培养基共培养方法获得的阳性转化子与液体培养基共培养 3 d 无显著性差异($P>0.05$), 但是液体培养基共培养 3、4、5 d 的阳性率都显著高于固体共培养($P<0.05$)。此外, 液体共培养时间不同获得的阳性单克隆不同, 共培养 5 d (43.33 ± 1.67 个/ 10^6 个细胞)显著性($P<0.05$) 高于 4 d (21.11 ± 0.96 个/ 10^6 个细胞), 并且 4 d 显著性 ($P<0.05$) 高于 3 d (7.22 ± 0.96 个/ 10^6 个细胞), 但是不同液体共培养时间的阳性率没有显著性差

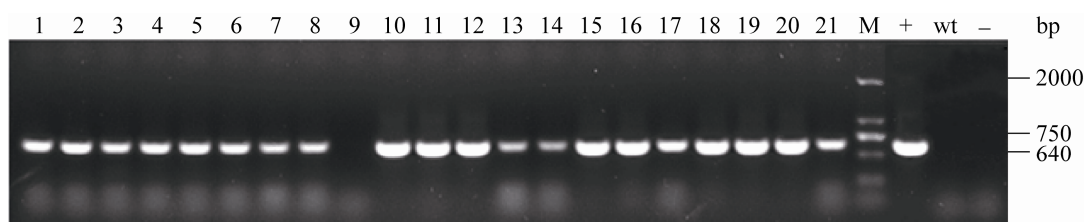


图 3. 莱茵衣藻 CC425 的 *Hpt* 转化子的 PCR 鉴定

Figure 3. PCR analysis of the transformants contained *Hpt* in *C. reinhardtii* CC425. M: marker; lanes 1–21: transformants; +: pCAMBI 1301 plasmid; wt: wild type; -: H₂O.

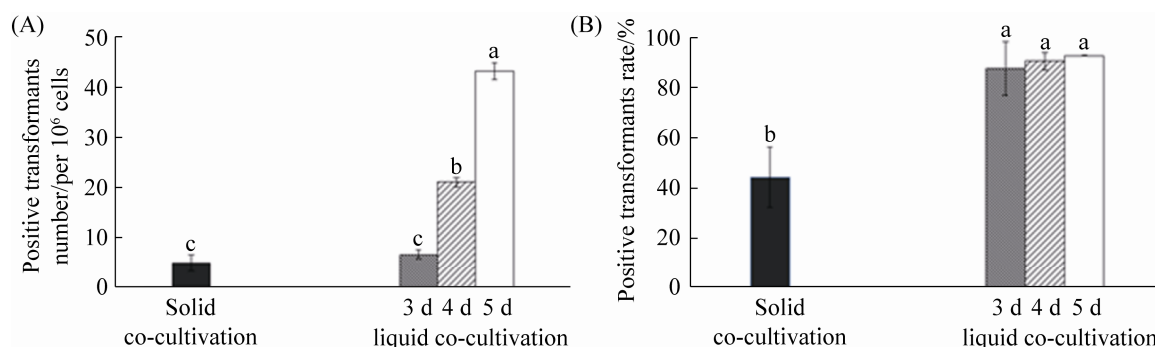


图 4. 莱茵衣藻 CC425 的 *Hpt* 阳性转化子和阳性率

Figure 4. Positive transformants and positive transformants rate of different co-cultivation methods contained *Hpt* in *C. reinhardtii* CC425. A: positive transformants of different co-cultivation methods contained *Hpt* in *C. reinhardtii* CC425; B: positive transformants rate of different co-cultivation methods contained *Hpt* in *C. reinhardtii* CC425. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$) and different lower-case letters indicate significant statistical differences in every treatments according to Duncan test ($P<0.05$).

异($P>0.05$), 维持在 87.78%–92.85%, 阳性率高、稳定且不受共培养时间因素影响。

为了检测 *Hpt* 阳性转化子细胞中 *Gus* 基因的表达对 PCR 鉴定为阳性的转化子进行了 *Gus* 表达分析, *Gus* 检测结果显示, 藻细胞经 X-gluc 孵育和乙醇漂白后均呈现出靛蓝色(图 5), 表明 *Gus* 基因已经整合到莱茵衣藻 CC425 基因组中。

2.3 莱茵衣藻 CC425 转化子 PCR 检测方法优化

2.3.1 18S rRNA 基因快速 PCR 检测: 分别采用两步直接 PCR 和一步直接 PCR 方法扩增衣藻 18S rRNA 基因的目的片段, 结果表明, DNA 聚合酶种类、细胞破碎时间和藻细胞浓度等均影响扩增效率(图 6)。

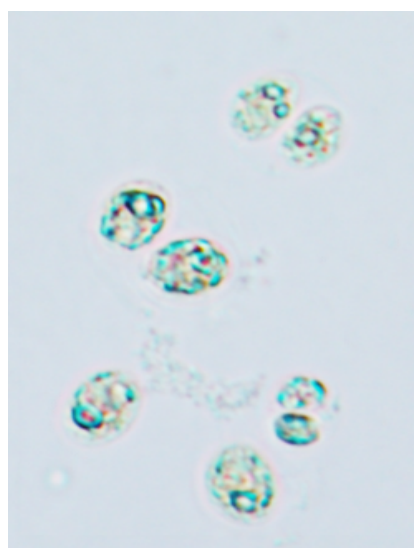


图 5. GUS 组织化学染色

Figure 5. The histochemical staining of GUS.

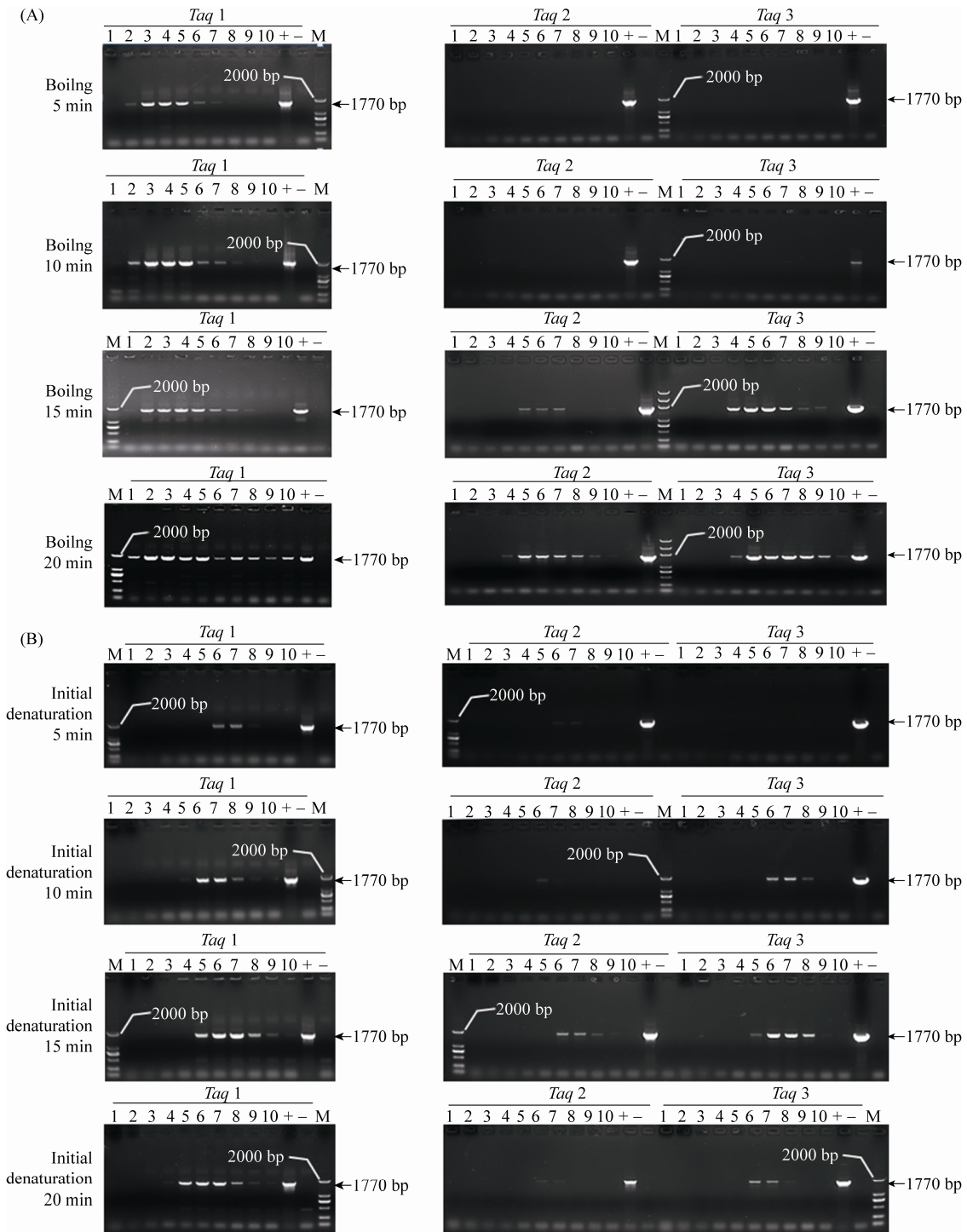


图 6. 两种直接 PCR 方法的 DNA 聚合酶种类、细胞浓度和细胞破碎时间的优化

Figure 6. The optimization of DNA polymerase type, cell concentration and cell fragmentation time of two direct PCR methods for *C. reinhardtii* CC425. A: two-steps PCR method. B: one-step PCR method. *Taq 1*: high fidelity DNA polymerase (Aidlab); *Taq 2* (TaKaRa) and *Taq 3* (Aidlab): common DNA polymerase; M: marker; lanes 1–10: the cell concentration of 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 , 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 cell/mL; +: purified genomic DNA; -: H₂O.

先 TE 裂解再进行 PCR 扩增的两步 PCR 法扩增结果表明(图 6-A), TE 沸水浴时间为 20 min 条件下, 第一种高保真 DNA 聚合酶 *Taq* 1 的扩增效果最好, 所有样品(细胞密度为 5×10^3 – 1×10^8 个/mL) 扩增均获得了清晰条带; 而普通 DNA 聚合酶的有效扩增的细胞密度为 5×10^3 – 5×10^6 个/mL。

与两步 PCR 法相比, 不经 TE 裂解的一步 PCR 法对样品的细胞密度要求较为严格(图 6-B), 细胞密度过高不利于扩增。高保真 DNA 聚合酶的扩增条件为预变性 15–20 min, 样品细胞密度为 5×10^3 – 5×10^6 个/mL; 其他两种普通 DNA 聚合酶扩增条件为预变性 15 min, 样品的最佳细胞密度为 5×10^4 – 5×10^5 个/mL。

综合上述结果, 确定衣藻 CC425 转化子 PCR 快速检测的最佳条件为: 高保真 DNA 聚合酶的扩增, 细胞密度为 5×10^3 – 5×10^6 个/mL, TE 沸水浴 20 min (两步法), 或 95 °C 预变性 15 min (一步法)。

2.3.2 莱茵衣藻 CC425 转化子 *Hpt* 基因的 PCR 快速检测

随机选取 9 个阳性转化子, 分别采用两步直接 PCR 法和一步直接法 PCR 对 *Hpt* 基因进行 PCR 扩增, 两步法采用沸水浴 20 min, 一步法采用 95 °C 预变性 15 min, 所用细胞密度均为 10^6 个/mL, 所用聚合酶为 *Taq* 1。以纯化的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增作为参照。结果表明(图 7), 3 种扩增方法均可获得清晰的 *Hpt* 基因目的条带, 表明这两种快速的直接 PCR 方法均可应用于莱茵衣藻 CC425 转化子的快速检测。

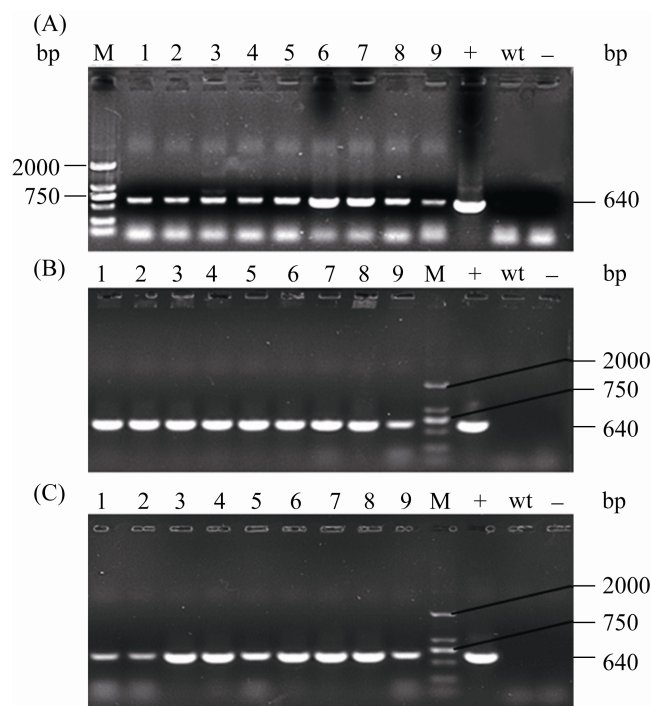


图 7. 不同 PCR 方法鉴定莱茵衣藻 CC425 的 *Hpt* 转化子

Figure 7. Different PCR methods identified of the transformants contained *Hpt* in *C. reinhardtii* CC425. A: purified genomic DNA amplified the *Hpt* gene; B: two-steps method amplified the *Hpt* gene; C: one-steps method amplified the *Hpt* gene. M: marker; lanes 1–9: transformants; +: pCambia 1301 plasmid; wt: wild type; -: H₂O.

3 讨论

建立高效成熟的转化体系是研究基因功能的重要前提。目前已报道的农杆菌介导转化莱茵衣藻共培养的方法主要采用固体共培养方法^[8–9,15]。Kumar 等^[8]最先使用农杆菌 LBA 4404 在固体 TAP 培养基中转化莱茵衣藻 CC-124 (mt–), 并在筛选培养基中获得的转化子数目约是玻璃珠法的 50 倍。而 Pratheesh 等^[9]改进了 Kumar 的方法, 将活化的农杆菌 EHA-105 在液体 TAP 培养基中

预侵染莱茵衣藻细胞 CC-125 (mt+) 30 min, 转至固体培养基共培养 2 d, 转化效率进一步提高。在本实验中, 参考 Kumar 等^[8]方法, 进行农杆菌 LBA 4404 介导转化莱茵衣藻 CC425 藻株, 只有 6–7 个转化子/ 10^6 个细胞, 并且假阳性率比较高。而 Mini 等^[15]参考该方法无法获得耐巴龙霉素的藻落, 认为农杆菌菌株、莱茵衣藻藻株和诱导培养基影响转化效率, 采用改良的方法, 将两株根癌农杆菌 C58C1 和 LBA4404 分别与两株莱茵衣藻 cw15 和 CC125 在固体 AB 诱导培养基上共培养 2 d, 结果 LBA4404 和 C58C1 农杆菌菌株都成功转化 cw15 细胞(分别得到 16–31 个转化子/ 10^8 个细胞和 25–33 个转化子/ 10^8 个藻细胞), 而 CC125 细胞只有 C58C1 转化成功(分别得到 6–14 个转化子/ 10^8 个细胞), 证明使用细胞壁缺陷莱茵衣藻细胞和高毒性农杆菌获得更高的转化效率。为提高转化效率, 本研究对其诱导培养的方法进行了改进, 采用了液体共培养的方法进行了诱导转化。以期找到一种简便高效的农杆菌介导莱茵衣藻 CC425 遗传转化体系。

液体共培养法的关键是控制农杆菌的生长和共培养的时间, Ghosh 等^[16]采用该方法介导香蕉胚性细胞, 由于农杆菌污染严重, 没能获得转基因植株, 而 Huang 等^[17]同样使用液体共培养法介导芭蕉胚性细胞, 并稍作改动, 在共培养过程中, 通过控制摇床转速和更换培养基来控制农杆菌浓度, 防止农杆菌过度生长并获得转基因植株。在农杆菌介导的莱茵衣藻转化的报道中, 使用了 2 d 的共培养时间转化藻株^[8–9, 15]。然而, 在其他植物的结果表明, 3–4 d 的共培养对植株总体上更有利^[18]。长时间共培养的主要缺点是农杆

菌过度生长, 导致植株坏死和死亡^[19], 本实验使用固体培养基共培养 3 d 以上, 农杆菌过度生长, 完全覆盖在固体抗性平板上, 导致莱茵衣藻转化子无法生长而死亡。San 等^[20]采用 2 d 液体共培养方法, 没有获得转基因植株, 这跟本研究的实验结果是一致的, 通过延长共培养时间到 3 d, 可以成功得到转化子, 并且共培养 5 d 的转化率最高, 达 43.33 ± 1.67 个转化子/ 10^6 个藻细胞。液体共培养的转化率受共培养时间影响, 虽然共培养 6 d, 获得的转化子就比 5 d 的多(数据未显示), 但是抗性培养皿中不能完全抑制农杆菌生长。此外液体共培养的阳性转化率不受共培养时间影响, 平均阳性率达 87.78%–92.85%。

液体共培养法转化率较高的原因可能是在液体共培养时农杆菌与莱茵衣藻 CC425 细胞接触更加充分, 整个过程中减少莱茵衣藻涂布于固体诱导培养基预培养, 农杆菌涂布, 藻菌混合细胞洗脱的步骤。相对于固体共培养方法, 液体共培养法在操作上更加简便, 减少了污染的可能性。农杆菌介导莱茵衣藻转化体系的操作中步骤繁琐, 并且农杆菌介导莱茵衣藻转化并没有像在植物转化中减轻转基因重排的表现, 所以农杆菌介导的转化在更高或更稳定的表达方面与电击法相比没有表现出明显的优势, 但是农杆菌介导转化的单基因位点插入的比例较高, 可用于插入突变的实验中^[15]。因此优化农杆菌液体共培养介导的转化方法可能对莱茵衣藻的插入突变提供技术基础。

直接 PCR 方法与传统 PCR 的比较, 传统的 PCR 检测转化子需要在 PCR 步骤之前进行多个准备工作, 如藻细胞液体培养基中传代培养、细

胞收集和裂解、基因组 DNA 分离和纯化步骤,它是耗时和耗力的步骤,特别是在筛选大量的转基因转化子。直接 PCR 旨在简化过程,本研究发现,直接 PCR 方法由 3 种因素决定,即裂解细胞时间、DNA 聚合酶的种类和藻细胞浓度。对于藻细胞裂解,大多数实验方法倾向于采用沸水浴^[10-12],本实验的两步 PCR 结果表明,用该方法进行 PCR 扩增效果良好。而本研究改良的采用延长预变性时间裂解藻细胞的一步 PCR 方法,也可以稳定进行扩增。DNA 扩增酶影响直接 PCR 的扩增效率,两种直接 PCR 结果显示,高保真 DNA 聚合酶更适用于直接 PCR 方法体系。藻细胞浓度可能影响直接 PCR 的效果,两步 PCR 方法在最佳条件下能稳定扩增 5×10^3 – 5×10^8 个/mL 的藻细胞浓度,而一步 PCR 方法在最佳条件下能稳定扩增 5×10^3 – 5×10^6 个/mL 的藻细胞浓度。两种直接 PCR 方法相比较,两步 PCR 方法的扩增效率更高,更稳定,适用于广范围藻细胞浓度和多次多基因的扩增中。而一步法 PCR,不需要从 TE 裂解液中再次移取藻细胞进行 PCR 这一步骤,如果进行批量操作,会更省时。

莱茵衣藻的遗传转化和鉴定筛选方法是一个耗时长且工作量大的过程,建立一个快速、简便、高效的转化方法是非常重要的。我们通过莱茵衣藻和农杆菌在液体中完成共培养步骤,减少中间藻预培养、农杆菌涂布和藻菌混合细胞洗脱这些工作量和污染的可能性,并且该方法得到的转化子准确率高,通过延长共培养时间还可以得到更多的转化子。此外通过藻细胞直接 PCR 的方法减少筛选转化子的工作量,大大缩短筛到转化子的时间。

参 考 文 献

- [1] Blaby IK, Blaby-Haas CE, Tourasse N, Hom EFY, Lopez D, Aksoy M, Grossman A, Umen J, Dutcher S, Porter M, King S, Witman GB, Stanke M, Harris EH, Goodstein D, Grimwood J, Schmutz J, Vallon O, Merchant SS, Prochnik S. The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(10): 672–680.
- [2] Merchant SS, Kropat J, Liu BS, Shaw J, Warakanont J. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 352–363.
- [3] Grossman AR, Catalanotti C, Yang WQ, Dubini A, Magneschi L, Subramanian V, Posewitz MC, Seibert M. Multiple facets of anoxic metabolism and hydrogen production in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytologist*, 2011, 190(2): 279–288.
- [4] Yang WQ, Catalanotti C, D'Adamo S, Wittkopp TM, Ingram-Smith CJ, Mackinder L, Miller TE, Heuberger AL, Peers G, Smith KS, Jonikas MC, Grossman AR, Posewitz MC. Alternative acetate production pathways in *Chlamydomonas reinhardtii* during dark anoxia and the dominant role of chloroplasts in fermentative acetate production. *The Plant Cell*, 2014, 26(11): 4499–4518.
- [5] Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(3): 1228–1232.
- [6] Brown LE, Sprecher SL, Keller LR. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(4): 2328–2332.
- [7] Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 1988, 240(4858): 1534–1538.

- [8] Kumar SV, Misquitta RW, Reddy VS, Rao BJ, Rajam MV. Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 2004, 166(3): 731–738.
- [9] Pratheesh PT, Vineetha M, Kurup GM. An efficient protocol for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology*, 2014, 56(6): 507–515.
- [10] Cao MQ, Fu Y, Guo Y, Pan JM. *Chlamydomonas* (chlorophyceae) colony PCR. *Protoplasma*, 2009, 235(1/4): 107–110.
- [11] Wan MX, Rosenberg JN, Faruq J, Betenbaugh MJ, Xia JL. An improved colony PCR procedure for genetic screening of *Chlorella* and related microalgae. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(8): 1615–1619.
- [12] Packeiser H, Lim C, Balagurunathan B, Wu JC, Zhao H. An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(2): 695–700.
- [13] Radha S, Fathima AA, Iyappan S, Ramya M. Direct colony PCR for rapid identification of varied microalgae from freshwater environment. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(2): 609–613.
- [14] Liu J, Gerken H, Li YT. Single-tube colony PCR for DNA amplification and transformant screening of oleaginous microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(4): 1719–1726.
- [15] Mini P, Demurtas OC, Valentini S, Pallara P, Aprea G, Ferrante P, Giuliano G. *Agrobacterium*-mediated and electroporation-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: a comparative study. *BMC Biotechnology*, 2018, 18: 11.
- [16] Ghosh A, Ganapathi TR, Nath P, Bapat VA. Establishment of embryogenic cell suspension cultures and *Agrobacterium*-mediated transformation in an important *Cavendish banana* cv. Robusta (AAA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2009, 97(2): 131–139.
- [17] Huang X, Huang XL, Xiao W, Zhao JT, Dai XM, Chen YF, Li XJ. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via a liquid co-cultivation system. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(10): 1755–1762.
- [18] Lopez SJ, Kumar RR, Pius PK, Muraleedharan N. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze). *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22(2): 201–202.
- [19] Hu Z, Wu YR, Li W, Gao HH. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Lycium barbarum* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2006, 42(5): 461–466.
- [20] Cha TS, Yee W, Aziz A. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1771–1779.

Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*

Xiaoyun Qin^{1,2}, Fang Li³, Shujun Wang³, Zhiyuan Liu^{1,2*}

¹ Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province, Haikou 570228, Hainan Province, China

² Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, Hainan Province, China

³ Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan Province, China

Abstract: **[Objective]** To establish a rapid, simple and efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system for *Chlamydomonas reinhardtii*, we used the model organism *C. reinhardtii* as the receptor material and optimized the *Agrobacterium*-mediated transformation system of *C. reinhardtii* from two aspects: transformation method and transformants identification method. **[Methods]** We compared the effect of solid co-culture and liquid co-culture on the transformation efficiency of *C. reinhardtii* CC425 mediated by *A. tumefaciens* LBA4404. Besides, we analyzed the optimal reaction conditions and amplification efficiency of (1) two-step PCR after TE cleavage, and (2) one-step PCR without TE cleavage. **[Results]** The highest transformation efficiency was achieved by a 5-day liquid-medium co-culture of *Agrobacterium* and *Chlamydomonas*. The transformation rate was 43.33 ± 1.67 transformants/ 10^6 algal cells. The optimal reaction conditions were: amplification with high fidelity DNA polymerase Taq 1; the cell density involved in PCR was 5×10^3 – 5×10^6 cells/mL; before amplification, cells were boiled in TE lysis buffer for 20 min (two-step PCR method), or initial denaturation for 15 min (one-step direct PCR method). The amplification efficiency of two-step PCR is better than that of one-step PCR, but the latter is more concise. **[Conclusion]** *Agrobacterium*-mediated transformation system of *C. reinhardtii* was established and optimized, through which rapid genetic transformation can be fulfilled and the workload could be reduced.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Agrobacterium*-mediated, liquid co-culture, PCR identification method, transformant

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Study on Seawater Acclimation of *Haematococcus pluvialis* and Pilot Land-sea Industrial Model (ZDYF2019128)

*Corresponding author. E-mail: liuzhiyuan111@163.com; liuzhiyuan111@hainu.edu.cn

Received: 24 February 2020; Revised: 18 May 2020; Published online: 29 May 2020