

曹苏珊, 薛静, 陈绪清, 等. 磁性纳米颗粒介导的椭圆小球藻转化体系的建立[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 306-311.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.008

磁性纳米颗粒介导的椭圆小球藻转化体系的建立

曹苏珊¹, 薛静², 陈绪清², 王倩楠¹, 张秀海², 安贤惠¹

(1. 江苏海洋大学海洋生命与水产业学院/江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要: 旨在利用磁性纳米颗粒作为载体构建小球藻的新型转化方法, 由于纳米载体技术已经被成功地应用于动、植物的遗传转化中, 其主要优势是相对于传统转化技术更加便捷、高效。本研究首先利用磁性纳米颗粒吸附含有增强型绿色荧光蛋白基因(*EGFP*)的质粒载体 pYBA1132, 形成纳米颗粒-基因复合物, 通过磁场作用对椭圆小球藻原生质体进行转化, 进而观察 *EGFP* 基因在椭圆小球藻中的瞬时表达情况。结果表明, 对椭圆小球藻细胞进行酶解处理并形成半原生质体/原生质体后, 磁性纳米颗粒可以介导外源 *EGFP* 基因转入小球藻中, 并能够进行瞬时表达, 产生绿色荧光。

关键词: 磁性纳米颗粒; 增强型绿色荧光蛋白基因(*EGFP*); 转化; 瞬时表达

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)02-0306-06

Establishment of *Chlorella ellipsoidea* transformation system mediated by magnetic nanoparticles

CAO Su-shan¹, XUE Jing², CHEN Xu-qing², WANG Qian-nan¹, ZHANG Xiu-hai², AN Xian-hui¹

(1. College of Marine Life and Fisheries, Jiangsu Ocean University/Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Eco-environment, Lianyungang 222005, China; 2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing 100097, China)

Abstract: Using magnetic nanoparticles as carriers, a new transformation method of *Chlorella ellipsoidea* was constructed. Nanocarrier technology has been successfully applied to genetic transformation of animals and plants, which is more convenient and efficient than traditional transformation technologies. In this study, magnetic nanoparticles were used to absorb plasmid vector pYBA1132 containing enhanced green fluorescent protein gene (*EGFP*), and the nanoparticles-gene complexes were formed. In addition, the protoplasts of *Chlorella ellipsoidea* were transformed by magnetic force, and the transient expression of *EGFP* in *Chlorella ellipsoidea* was observed. After the formation of semi-protoplasts/protoplasts in *Chlorella ellipsoidea* cells by enzymolysis treatment, the magnetic nanoparticles mediated the transfer of exogenous *EGFP* gene into *Chlorella ellipsoidea*, and green fluorescence was detected after transient expression.

Key words: magnetic nanoparticles; enhanced green fluorescent protein gene(*EGFP*); transformation; transient expression

收稿日期: 2019-09-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0501005); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJ CX20170415)

作者简介: 曹苏珊(1996-), 女, 安徽亳州人, 硕士研究生, 研究方向为微藻分子生物学。(E-mail) css9631@163.com

通讯作者: 张秀海, (E-mail) zhangxiuhai@baafs.net.cn; 安贤惠, (E-mail) anxh@hhit.edu.cn

小球藻(*Chlorella*)作为单细胞真核微藻, 是一种重要的微藻资源。由于具有营养价值高、易大规模培养、可用于生产修饰复杂蛋白质且成本低廉等多重优点^[1], 小球藻可以作为一种环境友好型生物反应器用于生产活性物质, 并有望逐渐成为医学、食品、工业研究等领域的新型模式生物。随着小球藻

转基因技术研究的不断深入,目前已经有一些成功转化小球藻的报道,转化方法包括基因枪法^[2]、农杆菌侵染法^[3]、电击转化法^[4]、聚乙二醇(PEG)介导法^[5]等。研究者们将报告基因或者具有功能性的外源基因转入小球藻,并实现其表达^[6]。但是以上方法均存在不同的缺点,如操作复杂、效率低、遗传稳定性差等,从而限制了小球藻作为生物反应器的规模化应用。因此,研发操作简单、转化效率高的遗传转化方法对于加快小球藻生物反应器的有效开发和利用是一条重要的途径。

近年来,纳米载体相关技术作为极具前景的技术之一而得到快速发展,已经在各领域发挥出巨大的作用^[7]。磁性纳米材料由于具有特殊的理化性质和结构,因而可以被用作基因载体,进行磁转化^[8],并且可以在一定程度上起到保护DNA的作用^[9]。四氧化三铁(Fe_3O_4)磁性纳米颗粒是目前应用比较广泛的磁性颗粒,经过聚乙烯亚胺(PEI)修饰的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒可以携带核酸分子在磁场力的作用下进行定向移动,从而富集在目的细胞表面,通过电荷之间的相互作用,在短时间内进行高效转化。磁转化最初被应用于逆转录病毒^[10],随着纳米载体技术的研究日益深入,该技术因操作简单且高效,同时具有目的基因高效稳定表达、安全无害、靶向性高等优点^[11],被国内外很多研究者用于进行体内外细胞基因转化试验,目前已经成功转化大鼠胃组织细胞、猪呼吸道上皮细胞及人细胞等^[12]。由于植物细胞壁的屏障作用,使纳米载体介导的植物基因转化研究发展相对缓慢。Torney 等于 2007 年利用二氧化硅纳米粒子结合外源基因转化植物细胞,首次成功获得了转基因植株,并将该技术成功应用于植物转基因领域^[13]。研究者们随后利用磁性纳米基因载体技术对拟南芥^[14]、水稻^[15]等植物进行了遗传转化,并取得了一定成果,从而使纳米载体技术开始逐步应用于植物遗传转化方面。

椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)为单细胞生物,直径为3~10 μm ,利用磁性纳米颗粒作为载体转化藻细胞在理论上是可行的。考虑到小球藻具有坚硬、复杂的细胞壁,不利于转化的进行,因此在利用磁性纳米颗粒对小球藻细胞进行转化时,要部分或完全去除小球藻的细胞壁^[16]以制备半原生质体或原生质体,从而提高磁性纳米颗粒-质粒复合物进入细胞的概率,进而提高转化效率。本研究用直径为100 nm

的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒作为载体,介导外源基因对小球藻原生质体的转化,实现外源增强型荧光蛋白基因(*EGFP*)在小球藻中的转化与瞬时表达,为进一步通过基因工程技术深入开发小球藻生物反应器提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 试验材料 椭圆小球藻 F962 购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库,并在固体平板上连续划线继代进行纯化;质粒 pYBA1132、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株由笔者所在实验室保藏。

1.1.2 试剂与仪器 磁性纳米颗粒 CombiMAG-200、磁板购自 Chemicell 公司;配制培养基及溶液所用试剂购自国药集团化学试剂有限公司;质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶购自北京索莱宝科技有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。荧光显微镜为 Leica DM5500 B 生物显微镜。

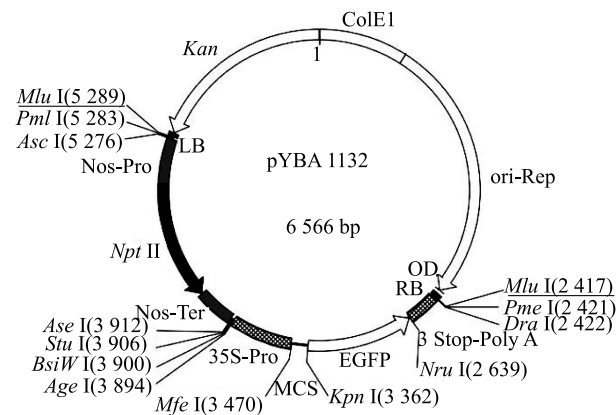
1.2 试验方法

1.2.1 培养基与培养条件 椭圆小球藻培养基为 SE^+ (亚硒酸盐富集的)培养基,1L培养基的配方如下:1 ml 2.9 mmol/L NaNO_3 、1 ml 0.3 mmol/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、1 ml 0.3 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 ml 0.17 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 ml 1.2 mmol/L KH_2PO_4 、1 ml 0.4 mmol/L NaCl 、1 ml 0.09 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1 ml EDTA-Fe(取4.1 ml 浓盐酸,用蒸馏水稀释至50 ml,配制成1 mol/L HCl,称取0.9306 g EDTA- Na_2 溶解至50 ml 蒸馏水中,配制成0.1 mol/L EDTA- Na_2 ,称取0.901 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于10 ml 上述已经配制好的1 mol/L HCl 中,然后与10 ml 已经配制好的0.1 mol/L EDTA- Na_2 混合,加入蒸馏水稀释至1 L)、1 ml A5 溶液[配方为2.86 g/L H_3BO_3 、1.86 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.22 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.39 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.08 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 g/L $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]、5 g 葡萄糖、1 g 酵母提取物,pH 值为7.0,固体培养基中需要加入1.8%琼脂。此外,固体平板划线培养条件为温度25 $^{\circ}\text{C}$,光照度4 000 lx,光照-黑暗周期16 h-8 h;液体摇瓶培养条件为温度25 $^{\circ}\text{C}$,转速140 r/min。

1.2.2 小球藻原生质体的制备 挑取固体平板上

的单藻落,接种至 20 ml SE⁺培养基中,培养 7d 后,以 10% 的接种量转接至 200 ml 培养基中,在光照摇床中培养至对数生长期。取 200 ml 藻液,8 000 r/min 离心 5 min,小心弃去上清,收集藻体。将藻细胞用无菌水洗涤 3 次,加入 25 ml 酶解液[含有 2% 纤维素酶、2% 果胶酶、2% 半纤维素酶、0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(PBS)、0.12 mol/L 甘露醇,用 0.22 μm 滤膜无菌过滤,现配现用],使藻细胞充分悬浮于酶解液中,于 30 ℃、140 r/min 避光振荡条件下分别酶解 5 h、10 h、20 h、30 h、40 h、50 h 后,于 8 000 r/min 离心,弃上清,用 0.02 mol/L PBS(含有 0.3 mol/L 甘露醇)洗涤 3 次,去除残留的酶解液,将藻细胞含量调整为 1 ml 10⁸~10⁹ 个,分别在显微镜下观察小球藻原生质体/半原生质体情况,统计结果为 3 次观察结果的生物学重复平均值,每次重复至少统计 3 个具有代表性的视野中的原生质体数和半原生质体数。

1.2.3 质粒的提取 如图 1 所示,质粒 pYBA1132 含有由花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子与胭脂碱合成酶终止子(NOS)构成的 EGFP 报告基因的表达框。按照天根生化科技(北京)有限公司的内毒素质粒大提试剂盒说明书抽提质粒,提取纯度(OD_{260/280})约为 1.8,于 -20 ℃ 保存备用。



括号中数字为酶切位点在序列中的位置(bp);ori-Rep 为质粒复制起始位点;LB、RB 分别为载体的左边界、右边界;左右边界中间部分的序列为可以整合至宿主基因组的片段;Kan 为卡那霉素抗性基因;MCS 为载体的多克隆位点;Nos-Ter、Nos-Pro 分别为胭脂碱合成酶启动子、终止子。

图 1 含 EGFP 基因的 pYBA1132 载体图谱

Fig.1 Map of plasmid vector pYBA1132 containing enhanced green fluorescent protein gene

1.2.4 磁性纳米颗粒对质粒的吸附性及保护性分

析 将磁性纳米颗粒 CombiMAG-200 和质粒按照 1:1、1:2、1:5、1:10、1:20 的质量梯度比例混匀孵育 0.5 h,制备磁性纳米颗粒-DNA 复合物,将所有复合物中的 DNA 质量固定为 2 μg。通过琼脂糖凝胶电泳阻滞技术进行分析,以质粒作为对照,电泳结束后使用凝胶成像系统进行观察。在相同条件下,制备复合物后加入脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)进行酶切消化,将消化后的产物通过琼脂糖凝胶电泳进行观察,以未酶切的复合物作为对照。

1.2.5 磁性纳米颗粒介导的小球藻转化 将磁性纳米颗粒 CombiMAG-200 和质粒 pYBA1132 按照 1:2、1:5、1:10 的质量比混匀,在室温条件下孵育 0.5 h,制备磁珠-质粒复合物。在无菌操作台上,将 24 孔板置于磁板上,加入外加磁场,分别在不同孔中加入 300 μl 经酶解处理的小球藻液与由不同质量比例磁性纳米颗粒-DNA 复合物组成的混合液,用枪头轻轻吹打几次,混合均匀后进行共培养。在磁场作用下,带有磁性的纳米颗粒携带质粒按照特定方向富集于细胞上,磁转化 2 h 后撤去磁场,取出藻细胞培养液继续培养。

1.2.6 荧光显微观察 磁转化处理后的 48 h 内进行荧光显微观察。用接种环蘸取微量藻液置于载玻片上,用清水稀释后,盖上盖玻片。首先用荧光显微镜在明场下寻找到小球藻视野,再用激发光观察 EGFP 基因在小球藻中的瞬时表达情况。

2 结果与分析

2.1 小球藻酶解及酶解时长对半原生质体/原生质体生成的影响

由于小球藻细胞壁成分复杂、细胞壁较厚,并且不同小球藻种之间细胞壁差异较大,因此制作小球藻原生质体及半原生质体是转化体系中较为关键的一步。由于单一酶解液的效果并不理想,因此采用组合酶液对小球藻进行酶解处理。

取酶解不同时间的藻细胞,在光学显微镜下观察细胞状态。通过研究不同酶解时间对半原生质体/原生质体形成的影响发现:酶解时间不足,形成半原生质体/原生质体的数量较少;酶解时间过长,细胞酶解过度,又会导致细胞内容物溢出,无法形成完整细胞。综合分析,最佳酶解条件为在避光条件下于 30 ℃、140 r/min 酶解 30 h,相应的原生质体/半原生质体形成率为 55.7%(图 2)。

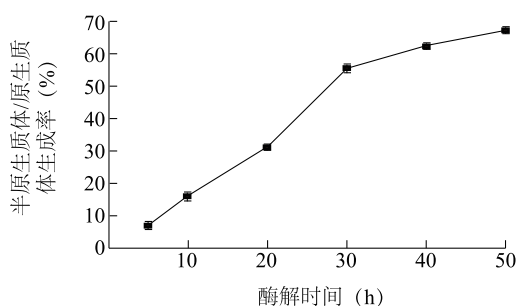
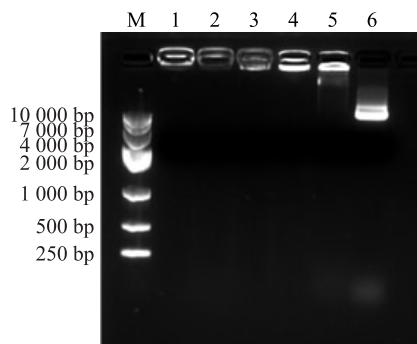


图2 酶解时间对半原生质体/原生质体生成的影响

Fig.2 Effects of enzymolysis time on semi-protoplast/protoplast formation

2.2 磁性纳米颗粒对质粒的吸附性

DNA 小分子可以穿过琼脂糖凝胶,向电场正极方向迁移而形成条带。磁性纳米颗粒通过静电吸附作用与质粒相互结合形成磁性纳米颗粒-DNA 复合物,将大量质粒吸附于磁性纳米颗粒上后,由于复合物的粒径相对较大,进行电泳时复合物会被阻滞于点样孔中而不随之迁移。当磁性纳米颗粒对质粒的吸附达到饱和以后,未被吸附的质粒则会在凝胶中进行迁移,因此对电泳后的凝胶进行观察分析便可以判断磁性纳米颗粒对质粒的吸附性能。图3的电泳结果显示,不同质量比梯度的磁性纳米颗粒-DNA 复合物的结合能力不同,其中1~4泳道的质粒基本未迁移出点样孔,5泳道中有部分质粒开始迁移,表明磁性纳米颗粒与质粒的质量比为1:1、1:2、1:5、1:10时均可稳定结合,当质量比达到1:20时,磁性纳米颗粒的吸附能力已经达到饱和状态。



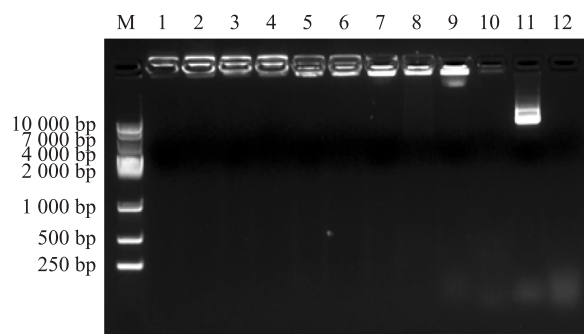
1~5泳道分别表示磁性纳米颗粒-DNA 复合物中磁性纳米颗粒与质粒的质量比分别为1:1、1:2、1:5、1:10、1:20;6泳道为质粒。每孔中的DNA质量均为2 μg。

图3 磁性纳米颗粒-DNA 复合物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis result of magnetic nanoparticles-DNA complexes

2.3 磁性纳米颗粒对质粒的保护性

外源基因在磁性纳米颗粒的携带下进入细胞后,细胞内部酶的消化作用可能导致DNA降解。而磁性纳米颗粒与质粒由于静电吸附作用形成的复合物紧密结合,产生了构象上的变化,可以在一定程度上保护DNA。因此,通过分析磁性纳米颗粒-DNA 复合物能否免受酶解消化作用,能够检测复合物在进入细胞后对外源核酸的保护作用。制备磁性纳米颗粒-DNA 复合物之后,用DNase I进行消化,以同样条件下未加入DNase I的磁性纳米颗粒-DNA 复合物作为对照,进行琼脂糖凝胶电泳。电泳结果显示,磁性纳米颗粒在与质粒的质量比为1:10及以内时均停留在点样孔中,未被消化,与未加入DNase I的复合物基本一致,磁性纳米颗粒呈现出良好的结合性和保护性;而当磁性纳米颗粒与质粒的质量比为1:20时,由于结合达到饱和,质粒并未完全与磁性纳米颗粒结合而被降解;经过酶处理的纯质粒完全被降解(图4)。结果表明,在磁性纳米颗粒-DNA 复合物中,磁性纳米颗粒可以与外源基因结合,从而有效保护DNA免受核酸酶的降解。



1、3、5、7、9泳道为未经酶切的磁性纳米颗粒-DNA 复合物,磁性纳米颗粒与质粒的质量比分别为1:1、1:2、1:5、1:10、1:20;2、4、6、8、10泳道为相同条件下经过酶切的磁性纳米颗粒-DNA 复合物产物,磁性纳米颗粒与质粒的质量比分别为1:1、1:2、1:5、1:10、1:20;11泳道为未经酶切的质粒;12泳道为经过酶切的质粒。每孔中的DNA质量均为2 μg。

图4 磁性纳米颗粒-DNA 复合物酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果

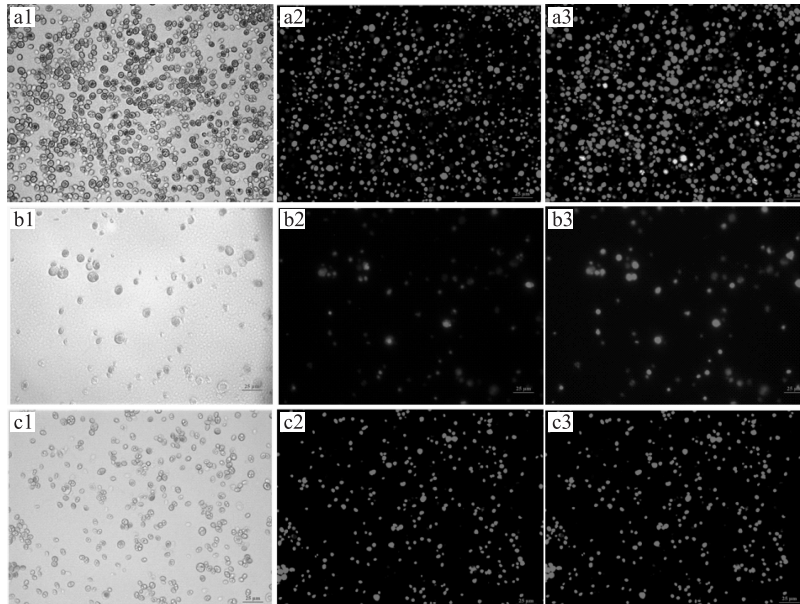
Fig.4 Agarose gel electrophoresis result of magnetic nanoparticles-DNA complexes digested by DNase I

2.4 磁性纳米颗粒-DNA 复合物转化小球藻的荧光瞬时表达

用纳米磁性颗粒介导EGFP基因转化小球藻细胞后,48 h内进行荧光显微观察。图5显示,经质粒

pYBA1132 转化的藻细胞中部分发出绿色荧光,在视野中呈清晰的绿色,未被转化的藻细胞呈现红色,表明绿色荧光蛋白基因 *EGFP* 被成功转入椭圆小球

藻 F962 中并表达出荧光蛋白。试验结果表明,由磁性纳米颗粒介导的小球藻遗传转化方法是成功的。



a、b:不同视野下转化的小球藻;c:对照;a1、b1、c1:明场视野下的小球藻细胞;a2、b2、c2:叶绿体自发荧光;a3、b3、c3:细胞内 EGFP 荧光。

图 5 荧光显微镜下磁性纳米颗粒介导的绿色荧光蛋白基因 *EGFP* 在小球藻中的表达情况

Fig.5 Expression of enhanced green fluorescent protein gene in *Chlorella ellipsoidea* under fluorescence microscope

3 讨论

遗传转化体系的构建是开展基因工程研究工作的基础,而新型、高效的纳米载体技术的出现,加快了植物基因工程的研发速度。当前,已有研究将该技术应用于棉花^[17]、水稻^[15]等作物上,通过便捷稳定的操作,简化了转化过程中一系列繁琐的步骤,而且在遗传转化的过程中,受体材料的可选择范围广,磁性纳米颗粒对受体材料呈现出优良的安全性、稳定性与保护性。本研究首次尝试将磁性纳米颗粒介导的转化方法用于小球藻,小球藻作为当前最具经济潜力和生产价值的真核微藻之一^[18],其应用范围广泛,可作为转基因技术良好的受体材料,但是由于其遗传转化方法的限制等原因,导致小球藻的基因工程工作进展缓慢。纳米载体具有独特的理化结构和转化原理,可以简化传统转化方法的操作步骤,装载大量核酸分子,并且在一定程度上保护与之结合的外源基因,从而提高转化效率。本研究结果表明,磁性纳米颗粒与质粒的质量比在1:10 及以内时均可以稳定结合且 DNA 不容易被 DNase I 消化降解,这是外源基因有效进入

细胞进行转化的基础。

植物细胞具有坚实的细胞壁,小球藻的细胞壁是磁性纳米颗粒-质粒复合物进入受体细胞的障碍之一,因此利用酶解法去除小球藻细胞壁是转化过程中的第一步。小球藻细胞壁成分复杂,主要成分为纤维素和半纤维素^[19],本试验使用混合酶解液制备小球藻半原生质体/原生质体,纤维素酶和半纤维素酶可以有效疏松其细胞壁,提高转化效果,并且对细胞的整体伤害小。酶解时间的选择是其中关键的一步,酶解时间过短,半原生质体/原生质体获得率较低;而酶解时间过长,细胞内容物流出,导致细胞不完整,无法作为转化受体进行高效遗传转化。本试验探究了酶解时间对椭圆小球藻 F962 半原生质体/原生质体形成的影响,最终确定了椭圆小球藻在 30 ℃、140 r/min 条件下避光酶解 30 h 时,获取半原生质体/原生质体的效果最佳。

本研究在转化过程中使用增强型荧光蛋白基因作为外源报告基因,*EGFP* 基因为 *GFP* 基因的突变型,发射的荧光强度比 *GFP* 基因增加了约 35 倍^[20],且已有报道表明该基因已经成功在杜氏盐藻

(*Dunaliella salina*) 中表达^[21]。在本研究中, *EGFP* 基因在小球藻中的瞬时表达结果清晰, 因此更适合作为一种报告基因在小球藻中用于检测基因的瞬时表达情况。通过 *EGFP* 基因瞬时表达建立磁性纳米颗粒介导的转化方法作为构建生物新型遗传转化体系的初步探索, 证明了此方法用作小球藻转化技术的可行性。

利用小球藻作为生物反应器生产功能蛋白质正在不断发展, 虽然目前小球藻已经成功表达人生长素^[22]、比目鱼生长激素^[23]、兔防御素^[24]等具有功能性的外源蛋白质, 但是由于转化体系与方法不稳定等原因, 限制了小球藻作为生物反应器的进一步开发和应用。因此, 不断发展便捷稳定的转化方法和技术对于小球藻的开发利用尤为重要。磁性纳米颗粒作为载体介导转化方法, 已经被证明可以用于小球藻的转化, 相对于其他转化方法具有可以装载大量大片段 DNA 与操作简单等优势, 具有一定的优越性。后续还需不断优化转化条件, 建立更加稳定高效的遗传转化体系, 为发展小球藻新型转基因技术提供理论基础。

参考文献:

- [1] YANG B, LIU J, JIANG Y, et al. *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: progress, challenge and perspective[J]. *Biotechnol Journal*, 2016, 11(10): 1244-1261.
- [2] TALEBI A F, TOHIDFAR M, TABATABAEI M, et al. Genetic manipulation, a feasible tool to enhance unique characteristic of *Chlorella vulgaris* as a feedstock for biodiesel production[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(7): 4421-4428.
- [3] 冯兴标, 李光伟, 陈丹阳, 等. 小球藻表达 β 胡萝卜素酮化酶基因提高虾青素的量[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2019, 42(2): 267-272.
- [4] KUMAR M, JEON J, CHOI J, et al. Rapid and efficient genetic transformation of the green microalga *Chlorella vulgaris*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(3): 1735-1745.
- [5] YANG B, LIU J, LIU B, et al. Development of a stable genetic system for *Chlorella vulgaris* — a promising green alga for CO₂ biomitigation[J]. *Algal Research*, 2015, 12: 134-141.
- [6] 吴丽娟, 余志良, 林祥志, 等. 小球藻基因工程的研究进展及应用前景展望[J]. *科技通报*, 2016, 32(12): 51-56.
- [7] CUI J H, CUI H X, WANG Y, et al. Application of PEI-modified magnetic nanoparticles as gene transfer vector for the genetic modification of animals[J]. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2012, 6753: 1-6.
- [8] ARORA S, GUPTA G, SINGH S, et al. Advances in magnetofection-magnetically guided nucleic acid delivery: a review[J]. *Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management*, 2013, 1(1): 19-29.
- [9] HE X X, WANG K, TAN W, et al. Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(24): 7168-7169.
- [10] HUGHES C, GALEA-LAURI J, FARZANEH F, et al. Streptavidin paramagnetic particles provide a choice of three affinity-based capture and magnetic concentration strategies for retroviral vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2001, 3(4): 623-630.
- [11] 王安琪, 朱华新, 赵翔, 等. 基于纳米基因载体的动植物遗传转化研究进展[J]. *生物技术进展*, 2018, 8(4): 293-301.
- [12] 李瑶, 崔海信, 刘琪, 等. 磁性纳米颗粒作为基因载体的研究发展概况[J]. *功能材料*, 2010, 41(增刊1): 14-19.
- [13] TORNEY F, TREWYN B G, LIN V S, et al. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants[J]. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2(5): 295-300.
- [14] 宋瑜, 李颖, 崔海信, 等. 两种阳离子纳米基因载体及植物基因介导效果的研究[J]. *生物技术通报*, 2009(6): 75-80.
- [15] 王凤华, 刘俊, 童春义, 等. 电击法磁性纳米颗粒作为水稻转基因载体的研究[J]. *分析化学*, 2010, 38(5): 617-621.
- [16] HATANNO S, JOH T, MIYAMOTO T, et al. Preparation of protoplasts from *Chlorella ellipsoidea* C-27[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1992, 33(5): 651-655.
- [17] ZHAO X, MENG Z G, WANG Y, et al. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers[J]. *Nature Plants*, 2017, 3(12): 956-964.
- [18] 罗爱国, 冯佳, 胡变芳, 等. 7 种可食藻提取物对食品致病菌的抑菌效果[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(5): 162-167.
- [19] 钟韵山, 徐仰仓, 荆柏林, 等. 小球藻破壁技术研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(14): 120-124.
- [20] 马金石. 绿色荧光蛋白[J]. *化学通报*, 2009, 72(3): 243-250.
- [21] 李杰, 任宏伟, 黄洁虹, 等. 外源报告基因 *EGFP* 在盐藻中实现瞬时表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19(3): 338-342.
- [22] HAWKINS R L, NAKAMURA M. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*[J]. *Current Microbiology*, 1999, 38(6): 335-341.
- [23] KIM D H, KIM Y T, CHO J J, et al. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*[J]. *Marine Biotechnology*, 2002, 4(1): 63-73.
- [24] 王义琴, 陈颖, 白琴华, 等. 以小球藻为载体生产兔防御素的研究[J]. *高技术通讯*, 2001(9): 1-5.

(责任编辑: 徐艳)