

## Getico Plus-Trans 藻类转化试剂操作手册

### 一、产品描述

将外源 DNA 导入单细胞绿藻莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 时, 会受到其坚硬细胞壁的阻碍。尽管玻璃珠搅拌、电穿孔和微粒轰击等多种方法已成功用于转化莱茵衣藻, 但这些方法的转化效率非常低。Getico Plus-Trans 藻类转化试剂可在电穿孔过程中促进 DNA 进入细胞, 与传统电穿孔方法相比, 转化效率提高了 2 到 3 个数量级。

产品	目录号	数量	储存条件	保质期
Getico Plus-Trans 藻类转化试剂	180701	250mL	储存于 2° C 至 8° C	6 个月

### 二、产品用途

仅限研究使用。不可用于诊断程序。

### 三、安全信息

阅读安全数据表 (SDS) 并遵循操作说明。穿戴适当的防护眼镜、衣物和手套。

### 四、莱茵衣藻培养条件

#### 4.1 培养基

TAP 培养基

#### 4.2 培养类型

常规实验通常在室温下并于 1.5% 琼脂上进行, 而单个实验的培养通常在摇瓶或培养瓶中的液体培养基中进行。

#### 4.3 温度范围

莱茵衣藻 137c 的最适生长温度为 26° C, 但实验室和野生型莱茵衣藻菌株在 20 - 28° C 范围内生长良好, 可耐受低至 15° C 和高至 35° C 的温度。

#### 4.4 培养条件

光照培养应提供 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件, 以实现最大生长, 并在连续光照下培养, 使用冷荧光白光 (50±10 μE m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), 并在旋转摇床上以 100-150 rpm 的速度持续搅拌。然而, 莱茵衣藻 137c 菌株可在不需要额外 CO<sub>2</sub> 供应的培养箱中生长。确保培养容器中实现适当的气体交换。转化和铺板后, 不要堆叠培养板, 以确保连续均匀的光照。

#### 4.5 推荐设备

培养莱茵衣藻的最佳设备是藻类生长室（例如，Geneva Scientific 的 Percival 藻类室），配备可调节的光源和光照计（例如，LI-COR® 的 LI-250A 光照计）以指导调整。如果没有藻类生长室，细胞可以在标准细胞培养箱中培养，培养箱内放置冷荧光灯，距离培养板 12 英寸以内。标准室内灯光提供的生长条件次优。

### 五、莱茵衣藻转化指南

#### 5.1 DNA 线性化

莱茵衣藻的核转化可以用环状 DNA 实现，但使用线性化 DNA 的转化效率要高得多。为了获得最多的菌落，建议将载体线性化。

#### 5.2 DNA 用量

建议每次电穿孔使用 2  $\mu$ g 线性化质粒 DNA。

#### 5.3 DNA 质量和浓度

所用 DNA 的质量和浓度对转化效率起着核心作用。

#### 5.4 细胞密度

为获得最佳效果，在进行电穿孔之前，将细胞培养至  $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$  个细胞 /mL。可以使用低于  $1 \times 10^6$  个细胞 /mL 的浓度，但浓度不应超过  $3 \times 10^6$  个细胞/mL。

#### 5.5 插入和筛选

质粒 DNA 随机插入基因组。作为可选步骤，可以首先通过菌落 PCR 筛选菌落，以确保启动子和目的基因的完全整合，然后筛选几个阳性克隆以检测目的基因的表达，从而挑选出表达量最高的克隆。

#### 5.6 密码子优化

由于莱茵衣藻基因组具有非常高的 GC 含量（约 62% GC），如果目的基因适应莱茵衣藻高表达基因的偏好密码子使用，重组基因的表达水平将显著提高。

#### 5.7 所需材料

- 含有目的基因并经适当限制酶线性化的 pChlamy 载体构建体。
- TAP 培养基，预热至室温。
- TAP-40mM 蔗糖溶液，预热至室温。
- 选择性 TAP 琼脂平板：TAP-琼脂-潮霉素平板（10  $\mu$ g/mL）或 TAP-琼脂-博来霉素平板（5  $\mu$ g/mL）。
- 无菌 15 mL 和 50mL 离心管。
- 0.4 cm 电穿孔比色皿，冰上冷却。
- 电穿孔仪，如 Bio-Rad® Gene Pulser® II。

#### 5.8 培养基和试剂的准备

## TAP-40 mM 蔗糖溶液

5.8.1 制备 1 M 蔗糖储备溶液：将 342.3g 蔗糖溶解于 800mL 去离子水中，加水至最终体积 1 L。通过 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器对 1M 蔗糖溶液进行过滤灭菌。

5.8.2 制备 TAP-40mM 蔗糖溶液：将 44mL 1M 蔗糖加入 1L TAP 培养基中。

## 选择性 TAP 琼脂平板

5.8.3 将 15g 琼脂加入 200mL TAP 培养基中，在液体循环模式下高压灭菌 20 分钟。

5.8.4 将 800mL TAP 培养基在水浴中预热至 55-60° C。

5.8.5 高压灭菌后，将含有琼脂的烧瓶冷却至约 55° C。

5.8.6 将含有琼脂的烧瓶与 800mL TAP 培养基混合，加入潮霉素 B 至终浓度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  或博来霉素至终浓度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，然后倒入 10cm 培养板中。

5.8.7 让平板凝固（不要过度干燥），倒置并在 4° C 黑暗中储存。最终琼脂浓度为 1.5%。

## 5.9 使用 Bio-Rad® Gene Pulser® II 转化莱茵衣藻

5.9.1 复苏 1 小瓶冷冻的莱茵衣藻细胞，并接种到 200mL TAP 培养基中。在标准条件下培养细胞，并持续监测其浓度 3 天。

5.9.2 当细胞浓度达到  $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$  个细胞/mL 时，通过 2500 rpm 离心 5 分钟收获细胞。弃去上清液，并尽可能小心地去除所有液体。注意：细胞必须处于对数早期阶段，并且收获时要轻柔。如果细胞浓度低于  $1 \times 10^6$  个细胞 /mL，仍可收获细胞，且不会显著影响转化效率。

5.9.3 将细胞沉淀重悬于 10 mL Getico Plus-Trans 藻类转化试剂中，并以 2500 rpm 离心 5 分钟。弃去上清液，并尽可能小心地去除所有液体。

5.9.4 将沉淀再次重悬于 10 mL Getico Plus-Trans 藻类转化试剂中，并再次以 2500 rpm 离心 5 分钟。

5.9.5 将细胞重悬于 Getico Plus-Trans 藻类转化试剂中，终浓度为  $2 \times 10^8 - 3 \times 10^8$  个细胞 /mL。

5.9.6 每 250  $\mu\text{L}$  细胞悬液中加入 2 - 4  $\mu\text{g}$  线性化 DNA，并在 4° C 下孵育 5 分钟。

5.9.10 在 Gene Pulser® II 上设置电穿孔参数如下：

电压	容量	电阻
500 V	50 $\mu$ F	800 $\Omega$

- 5.9.11 在电穿孔前，将 250  $\mu$ L 细胞 - DNA 混合物转移至冰预冷的比色皿中。
- 5.9.12 使用适当的设置对细胞进行电穿孔。通常，电脉冲持续时间约为 30 ms。
- 5.9.13 电穿孔后，让细胞在工作台上恢复 15 分钟。
- 5.9.14 将细胞转移至含有 10 mL 室温 TAP-40mM 蔗糖溶液的 50mL 锥形管或烧瓶中。
- 5.9.15 将细胞置于藻类培养室中孵育 14 - 16 小时。
- 5.9.16 通过 2500 rpm 离心 5 分钟收获细胞，弃去上清液，并将沉淀重悬于 200  $\mu$ L TAP 培养基中。
- 5.9.17 将细胞铺在选择性 TAP 琼脂平板上，并在藻类培养室中孵育 5 - 7 天。注意：菌落产量取决于质粒 DNA 的大