

# 除草剂草丁膦抗性基因 *bar* 作为三角褐指藻基因工程选择标记的研究

卞曙光<sup>1,2</sup>, 姜鹏<sup>2</sup>, 崔玉琳<sup>2,3</sup>, 刘兆普<sup>1</sup>, 秦松<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学 海洋生物学江苏省重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 研究了三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)对氯霉素、卡那霉素、青霉素、链霉素、潮霉素 5 种抗生素和一种除草剂草丁膦的敏感性, 发现三角褐指藻对草丁膦非常敏感, 用统计学分析法得出了其 72 h 半致死质量浓度为 22 mg/L。通过基因枪法将携带草丁膦抗性基因 *bar* 的载体 pSVB 导入三角褐指藻细胞中, 通过草丁膦筛选成功获得了抗性藻细胞, PCR 检测获得阳性结果, 提示草丁膦更适用于构建安全、高效、廉价的三角褐指藻表达系统。

**关键词:** 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*); 草丁膦; *bar* 基因; 基因工程; 选择标记

中图分类号: Q 943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)05-0062-05

海洋硅藻是重要的初级生产者, 贡献了地球全部初级生产力的五分之一<sup>[1,2]</sup>。作为重要的模式藻之一, 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)已完成全基因组测序<sup>[3]</sup>, 建立了基因枪介导的遗传转化体系<sup>[4,5]</sup>, 并已应用于营养代谢、信号转导等基因的功能验证<sup>[6-9]</sup>。在应用方面, 应用光生物反应器已建立高密度培养体系<sup>[10,11]</sup>, 可用于饵料培育和活性物质提取<sup>[12,13]</sup>。但是, 目前在利用转基因技术建立三角褐指藻表达系统、高效获得活性产物方面尚无报道。

筛选转化子是构建表达系统的关键步骤, 现有技术全部应用抗生素 Zeocin 作为三角褐指藻的筛选试剂<sup>[4,5]</sup>, Zeocin 属于腐草霉素家族, *sh ble* 编码其抗性基因。但是, Zeocin 的价格比较昂贵, 通过非特异性剪切 DNA 从而表现诱变特性<sup>[14]</sup>, 且对光敏感容易失效。因此, 需建立更安全、廉价的替代筛选方案用于构建三角褐指藻表达系统。本文通过比较三角褐指藻对 5 种抗生素——氯霉素、卡那霉素、青霉素、链霉素、潮霉素和一种除草剂——草丁膦(phosphinothricin, PPT)的敏感性, 发现三角褐指藻对草丁膦非常敏感, 并进一步通过导入其抗性基因 *bar*, 验证其筛选效果, 以期发展一种更加安全、高效、经济的筛选体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻株与供体质粒

实验用三角褐指藻藻株(PT-1120)系本实验室分

离保存的克隆材料, 以 f/2 海水培养液培养<sup>[15]</sup>。供体质粒 pSVB 系本实验室构建, *bar* 基因上游为 SV40 启动子, 下游为其增强子(图 1), 应用质粒小抽试剂盒(北京博大泰克)进行制备。

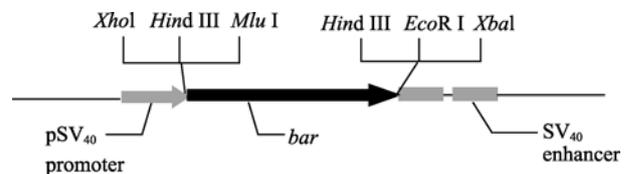


图 1 质粒 pSVB 图谱(4131bp)

Fig. 1 Construction of plasmids pSVB

### 1.2 试剂、仪器与耗材

氯霉素、卡那霉素、青霉素、链霉素、潮霉素 5 种抗生素购自青岛碧海生物技术有限公司。抗生素母液配制方法参考文献<sup>[16]</sup>。配制的抗生素母液用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌后 -20 °C 保存备用。除草剂草丁膦购自拜耳作物科学(天津)有限公司; Southern 杂交所用尼龙膜、地高辛 DNA 标记和检测试剂盒购自 Roche 公司; 基因枪 PDS-1000/He、DNA 载片、

收稿日期: 2009-06-06; 修回日期: 2009-10-08

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA100311, 20060110A402); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-209)

作者简介: 卞曙光(1984-), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物技术, 电话: 0532-82898863, E-mail: bianshuguang3@163.com; 秦松, 通信作者, E-mail: sqin@qdio.ac.cn

阻挡网、可裂膜(1500 psi)、钨粉和 DNA 转膜仪为美国 Bio-Rad 公司产品; 纯度为 99.9999% 的高压氦气购自青岛天源气体制造有限公司; 分子杂交炉为上海新芝生物技术研究所产品。

### 1.3 敏感性实验

#### 1.3.1 藻株活化与培养

藻种经活化后, 接种至新鲜的  $f/2$  海水培养液中, 在  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ h}/12\text{ h}$  光暗周期、光强  $1500\text{ lx}$  条件下扩大培养。每隔  $24\text{ h}$  取样测  $A_{460}$ , 并绘制生长曲线。根据生长曲线, 选择处于对数生长早期的细胞进行敏感性实验。

#### 1.3.2 三角褐指藻对抗生素和除草剂的敏感性实验

取  $20\text{ mL}$  处于对数生长早期( $A_{460} = 0.64$ , 藻细胞浓度约为  $5.0 \times 10^6/\text{mL}$ )的细胞, 分别加入不同浓度梯度的抗生素和草丁膦(表 1)。每个处理组设 2 个重复, 并设置对照组。连续 1 周肉眼和显微镜明视场和暗视场观察各处理组的藻细胞生长状态。

表 1 选择试剂的浓度设定

Tab. 1 Concentrations of selective reagents

筛选试剂	不同的浓度梯度(mg/L)					
	0	1	2	3	4	5
氯霉素	0	100	150	200	250	300
卡那霉素	0	100	150	200	250	300
氨基青霉素	0	100	150	200	250	300
链霉素	0	100	150	200	250	300
潮霉素	0	100	150	200	250	300
草丁膦	0	30	60	90	120	150

#### 1.3.3 三角褐指藻对草丁膦的敏感性实验

根据上一步的结果, 重新转接新鲜的三角褐指藻, 培养至  $A_{460} = 0.64$  左右, 按  $0$ 、 $4$ 、 $8$ 、 $16$ 、 $32$ 、 $64\text{ mg/L}$  的浓度梯度加入草丁膦进行敏感性实验。每个处理组设 2 个重复, 并设置对照组。每天显微镜观察各处理组的藻细胞生长状态, 并用血球计数板统计存活情况。

#### 1.3.4 $LD_{50}$ 及其 95% 可信限的确定

采用寇氏法(Karber)计算三角褐指藻对草丁膦的半致死浓度( $LD_{50}$ )及其 95% 可信限<sup>[17]</sup>。计算公式如下:

$$\lg LD_{50} = X_m - i(\sum P - 0.5) \quad (1)$$

式中,  $X_m$  为最大剂量的对数值;  $i$  为相邻剂量比值的对数;  $\sum P$  为各实验组藻细胞死亡率的总和(以小数表示)。

$$\lg N = \lg LD_{50} \pm 1.96S_{\lg LD_{50}} \quad (2)$$

式中,  $N$  为  $LD_{50}$  的 95% 可信限;  $S_{\lg LD_{50}} = i[\sum pq/n]^{1/2}$ ,  $p$  为一个组的死亡率,  $q$  为一个组的存活率,  $n$  为每次统计藻细胞总数。

#### 1.3.5 对 $LD_{50}$ 差异的显著性检验

按两个一对分别检验相邻处理时间段的  $LD_{50}$  差异的显著性。可通过计算  $K_{i,j}$  和  $f_{i,j}$  二者比值的大小来比较差异是否显著, 如果  $K_{i,j}$  大于  $f_{i,j}$ (即  $K_{i,j}/f_{i,j} > 1$ ) 则两个  $LD_{50}$  有显著差异。其中:

$$K_{i,j} = \text{较大的 } LD_{50} \text{ 值} / \text{较小的 } LD_{50} \text{ 值} \quad (3)$$

$f$  为  $LD_{50}$  的 95% 可信限因子(可信限两端的值分别为  $LD_{50} \times f$  和  $LD_{50}/f$ );

$$f_{i,j} = \text{antilog}[(\lg f_i)^2 + (\lg f_j)^2]^{1/2} \quad (4)$$

### 1.4 基因枪转化、草丁膦筛选与检测

#### 1.4.1 受体藻细胞的制备

取  $20\text{ mL}$  处于对数生长早期( $A_{460} = 0.64$ )的三角褐指藻细胞,  $5\text{ }000\text{ g} \times 10\text{ min}$  离心收集、去上清后, 吹打均匀涂布于  $f/2$  固体平板中央。每次轰击约用  $1.0 \times 10^8$  个藻细胞。

#### 1.4.2 基因枪转化

微粒子制备参照 Jiang 等<sup>[18]</sup>方法, 基因枪转化全过程在超净工作台内进行。实验组采用质粒 pSVB 包裹的钨粉轰击涂布于平板上的三角褐指藻, 阴性对照组采用未经质粒包裹的裸钨粉轰击。转化参数为: 钨粉直径  $1.1\text{ }\mu\text{m}$ , 基因枪样品室真空度为 27 英寸汞柱,  $1\text{ }500\text{ psi}$  可裂膜, 轰击距离  $6\text{ cm}$ <sup>[4,5]</sup>。

#### 1.4.3 草丁膦筛选

基因枪轰击后暗培养  $24\text{ h}$ , 然后重悬于  $15\text{ mL}$   $f/2$  海水培养液中, 按照 1.3.1 的培养方法进行培养, 并在 1 周内将草丁膦的浓度逐步加至  $44\text{ mg/L}$  进行筛选。筛选持续约 2~3 周, 加入草丁膦的培养液每周更换 1 次。筛选结束后, 离心收集细胞转入新鲜  $f/2$  海水培养液中恢复培养  $30\text{ } \sim\text{ } 50\text{ d}$ 。

#### 1.4.4 PCR 检测 *bar* 基因

将细胞离心收集, 应用植物基因组小量提取试剂盒(北京天根)提取基因组总 DNA。以 PCR 方法扩增 *bar* 基因片段, 引物序列及 PCR 反应程序参照 Tan 等<sup>[19]</sup>方法, 预期扩增片段为  $427\text{ bp}$ 。

#### 1.4.5 Southern blotting 分析

以 *Hind*III 酶切 pSVB 质粒, 回收 *bar* 完整基因片段, 以随机引物法用地高辛标记制备杂交探针。DNA 的转膜和 Southern blotting 检测参照 Roche 公司的地高辛 DNA 标记和检测试剂盒使用说明进行。

## 2 结果

### 2.1 三角褐指藻对抗生素和除草剂的敏感性实验

对 5 种抗生素和 1 种除草剂的敏感性实验结果显示, 三角褐指藻对草丁膦最敏感, 其次是氯霉素, 对氨基青霉素也有一定的敏感性, 而对卡那霉素、潮霉素和链霉素完全不敏感。

在草丁膦各剂量组, 加入 4 h 后, 培养液均逐渐呈现亮黄绿色, 镜检发现细胞体积变大、颜色变浅, 推测胞内色素已向外界释放。随时间延长, 这种现象更加明显, 且形态完整的细胞数量显著减少。氯霉素 200 mg/L、300 mg/L 处理组 24 h 后培养液开始呈现黄绿色, 显微镜下亦能看到少量细胞体积变大。但在培养 72~96 h 后, 细胞数目逐渐增多。氨基青霉素 300 mg/L 处理组 24 h 后可观察到部分细胞体积变大, 但培养液没有颜色变化。而卡那霉素、潮霉素和链霉素处理组未观察到变化。所有 5 种抗生素处理组 96 h 后细胞状态好转, 细胞数目开始增多, 推测是在低敏感性抗生素压力下, 耐性(而非抗性)藻细胞表现出生长优势。

### 2.2 三角褐指藻对草丁膦的敏感性实验

用细胞计数法详细跟踪记录了草丁膦对三角褐指藻的生长抑制情况及致死情况(图 2)。加入草丁膦 48 h 内, 8、16、32、64 mg/L 浓度梯度草丁膦实验组存活的藻细胞数目迅速下降, 并且显微镜下视野中有许多细胞解体产生的碎片和颗粒。荧光视野观察发现胞外有许多零碎的荧光点, 说明叶绿素已经释放。在本实验的培养条件下, 低浓度(16 mg/L 以下)草丁膦实验组 1 周内藻细胞没有完全死亡, 只有部分细胞被杀死, 其他细胞生长受到抑制; 而高浓度(64 mg/L)草丁膦的实验组, 细胞死亡及解体速度很快, 1 周后已基本无完整形态的细胞。

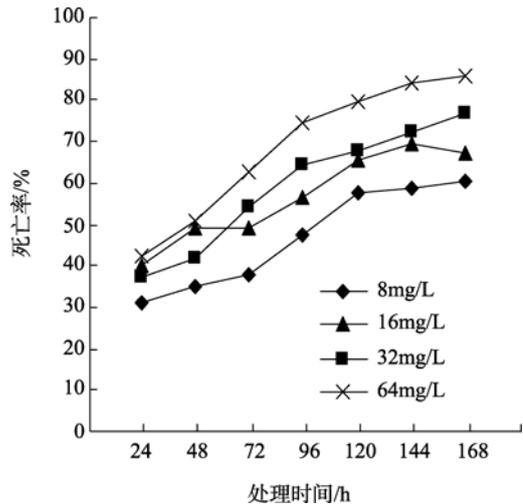


图 2 不同浓度的草丁膦对三角褐指藻的致死情况

Fig. 2 The time-dependent lethal effects of different concentrations of PPT on *Phaeodactylum tricornutum*

### 2.3 统计分析

采用寇氏法(Karber)计算出草丁膦对三角褐指藻处理 1 周内的半致死浓度(LD<sub>50</sub>)及其 95%可信限(图 3)。对 LD<sub>50</sub> 差异的显著性分析结果表明, 在草丁膦的有效作用期内, 不同时间段的 LD<sub>50</sub> 差异显著, 72 h 后的差异最为显著, LD<sub>50</sub> 从 72 h 的 22.09 mg/L 迅速降为 96 h 的 16.80 mg/L 和 120 h 的 13.89 mg/L(表 2)。

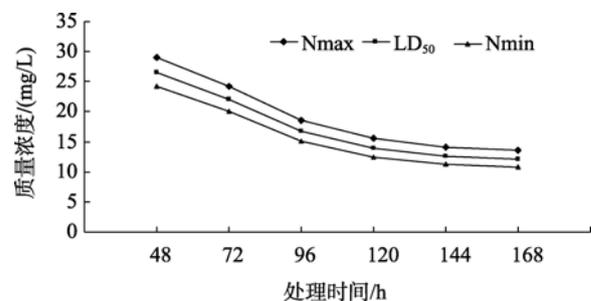


图 3 草丁膦处理 1 周内的半致死浓度(LD<sub>50</sub>)及 95%可信限  
Fig. 3 LD<sub>50</sub> values and 95% confidence ranges of PPT at different treatment durations

表 2 不同时间段内 LD<sub>50</sub> 的 95%可信限统计及差异的显著性分析

Tab. 2 Significance analyse of LD<sub>50</sub> 95% confidence range at different states

时间(h)	半致死浓度 LD <sub>50</sub> (mg/L)	半致死浓度 95% 可信限(mg/L)	$K_{i,j}/f_{i,j}$				
			48 ~ 72 h	72 ~ 96 h	96 ~ 120 h	120 ~ 144 h	144 ~ 168 h
48	26.53823	24.26~29.03	0.96				
72	22.08508	20.08~24.29		1.08			
96	16.79547	15.14~18.63			1.02		
120	13.88062	12.43~15.50				0.95	
144	12.55335	11.22~14.05					0.90
168	12.08378	10.79~13.53					

## 2.4 转基因三角褐指藻的筛选

转化后经 24 h 暗培养, 各组中加入 44 mg/L 的草丁膦进行筛选。24 h 内即发现培养液呈现黄绿色, 推测藻细胞大量死亡解体并释放色素。约两周后, 培养液逐渐清亮, 并有死亡细胞残骸沉淀。继续培养 2 周, 实验组培养液逐渐呈现浅褐色, 镜检有阳性转化子增殖, 而对照组无颜色变化(图 4)。

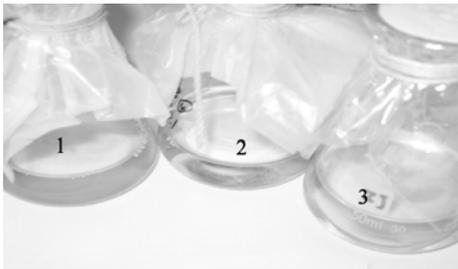


图 4 草丁膦筛选的转基因三角褐指藻

Fig. 4 The transformed *P. tricornutum* screened by PPT 1, 3 轰击 pSVB 质粒的实验组, 浅褐色; 2. 轰击裸钨粉的对照组, 无色  
1. and 3. treatment groups bombarded with plasmids pSVB-coated tungsten particles; 2. the negative control bombarded with uncoated tungsten particles

## 2.5 转基因三角褐指藻的分子检测

PCR 检测结果显示, 实验组在 427 bp 左右出现特异性条带, 而未轰击对照组没有扩增条带(图 5)。标记 *bar* 基因探针, PCR-Southern blotting 也显示阳性结果(图 6)。

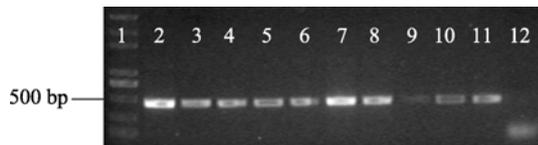


图 5 PCR 扩增检测 *bar* 基因

Fig. 5 PCR amplification of *bar* gene

1. DL2000 DNA marker; 2. 质粒 pSVB; 3~11. 筛选出的抗性三角褐指藻; 12. 未转化的三角褐指藻

1. DL2000 DNA marker; 2. plasmids pSVB; 3~11. The resistant *P. tricornutum*; 12. Untransformed *P. tricornutum*

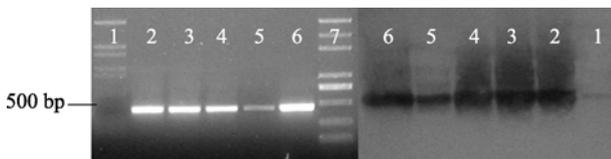


图 6 转基因三角褐指藻的 PCR-Southern Blotting 检测

Fig. 6 PCR-Southern blot analysis of transformed *P. tricornutum*  
1. unlabeled control DNA; 2~5. 筛选出的抗性三角褐指藻; 6. 质粒 pSVB;  
7. DL2000 DNA marker

1. Unlabeled control DNA; 2~5. The resistant *P. tricornutum*;  
6. plasmids pSVB; 7. DL2000 DNA Marker

## 3 讨论

结果表明, 高浓度剂量(300 mg/L)的氯霉素、卡那霉素、青霉素、链霉素、潮霉素对三角褐指藻仍不致死, 因此上述几种抗生素不适合在筛选转化子中作为三角褐指藻的筛选压力, 提示可作为杀菌剂使用。90 mg/L 的草丁膦处理 5 d 后, 几乎所有细胞都解体或空化, 用统计学分析法得出了其 72 h 半致死质量浓度为 22 mg/L, 与抗生素的作用效果对比, 除草剂草丁膦是三角褐指藻理想的筛选试剂。

草丁膦也被称为 PPT(phosphinothricin, 膦丝菌素), 是非选择性广谱除草剂 BASTA 的活性成分, 是植物体内的谷氨酰胺合成酶(GS)的竞争性抑制剂。*bar* 基因编码乙酰辅酶 A 转移酶, 催化乙酰辅酶 A 与草丁膦的游离氨基结合, 使其失活, 从而解除草丁膦对 GS 的竞争性抑制作用。草丁膦是目前植物基因工程中常用的选择试剂<sup>[20]</sup>, 近年来在藻类中也证明普遍有效<sup>[19,21]</sup>, 大型褐藻如海带、裙带菜的孢子体<sup>[22,23]</sup>、配子体<sup>[24,25]</sup>, 单细胞绿藻如雨生红球藻<sup>[26]</sup>、杜氏盐藻等<sup>[19]</sup>都对草丁膦极其敏感, 提示藻类对草丁膦的敏感性具有普遍性。

三角褐指藻具有硅质细胞壁, 通常的转化方法难以突破这一屏障。基因枪在高压气体的驱动下, 能使包裹外源 DNA 的微粒子在瞬间实现穿壁, 而被导入到藻细胞内。通过分子检测手段证明, 在阳性转化子中, 外源 DNA 已经整合到受体藻细胞的基因组染色体上。

已有研究表明, Zeocin 是三角褐指藻比较敏感的少数抗生素之一, 有效浓度为 100 mg/L<sup>[4]</sup>。在本实验中, 草丁膦对三角褐指藻的最小致死浓度为 44 mg/L, 具有比 Zeocin 更高的敏感性, 尤其是, 草丁膦成本相对低廉, 作用时效长, 属于生物除草剂, 高效无毒, 因此更适合用于构建安全、高效的三角褐指藻外源基因表达系统。

### 参考文献:

- [1] Falkowski P G, Barber R T, Smetacek V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production [J]. *Science*, 1998, 281: 200-206.
- [2] Field C B, Behrenfeld M J, Randerson J T, et al. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components [J]. *Science*, 1998, 281: 237-240.
- [3] Bowler C, Allen A E, Badger J H, et al. The *Phaeodac-*

- tylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes [J]. **Nature**, 2008, **456**(13): 239-244.
- [4] Apt K E, Kroth-panic P G, Grossman A R. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* [J]. **Mol Gen Genet**, 1996, 252: 572-579.
- [5] Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, *et al.* Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms [J]. **Mar. Biotechnol** 1999, 1: 239-251.
- [6] Tanaka Y, Nakatsuma D, Harada H, *et al.* Localization of soluble  $\beta$ -carbonic anhydrase in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Sorting to the chloroplast and cluster formation on the girdle lamellae [J]. **Plant Physiology**, 2005, 138: 207-217.
- [7] Saton D, Hiraoka Y, Colman B, *et al.* Physiological and molecular biological characterization of intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* [J]. **Plant Physiology**, 2001, 126: 1 459-1 470.
- [8] Falciatore A, D'alcala M R, Croot P, *et al.* Perception of environmental signal by a marine diatom [J]. **Science**, 2000, **288**(30): 2 363-2 366.
- [9] Zaslavskaja L A, Lippmeier J C, Shih C, *et al.* Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering [J]. **Science**, 2001, **292**(15): 2 073-2 075.
- [10] Perez E B, Pina I C, Rodriguez L P. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricorutum* in intensive culture photobioreactor [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2008, 40: 520-525.
- [11] Miron A S, Garcia M. C C, Gomez A C, *et al.* Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricorutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2003, 16: 287-297.
- [12] Gladue R M, Maxey J E. Microalgal feeds for aquaculture [J]. **Appl Phycol**, 1994, 6: 131-141.
- [13] Bozarth A, Maier U G, Zauner S. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2009, 82: 195-201.
- [14] Fernandez J M, Hoeffler J P. Gene Expression Systems [M]. New-York: Academic Press, 1999.
- [15] Guillard, R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [A]. Smith W L, Chaney M H. Culture of Marine Invertebrate Animals [C]. New York: Plenum Press, 1975.
- [16] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 第三版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [17] 张毓琪, 陈叙龙. 环境生物毒理学 [M]. 天津: 天津大学出版社, 1993, 257-258.
- [18] Jiang P, Qin S, Tseng C K. Expression of hepatitis B surface antigen gene (*HBsAg*) in *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta) [J]. **Chin Sci Bull**, 2002, 47: 1 438-1 440.
- [19] Tan C P, Qin S, Zhang Q, *et al.* Establishment of a microparticle bombardment transformation system for *Dunaliella salina* [J]. **Journal of Microbiology**, 2005, **43**(4): 361-365.
- [20] 黎垣庆, 刘刚, 严文贵, 等. 除草剂(草丁膦)抗性基因的遗传与利用 [J]. 植物学报, 1999, **41**(12): 1 348-1 350.
- [21] 郑和明, 薛乐勋. 抗生素及草丁膦对盐藻生长的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2002, **37**(6): 790-793.
- [22] 吴韵, 邹立红, 姜鹏, 等. 孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性 [J]. 海洋与湖沼, 2001, **32**(1): 19-22.
- [23] 于道展, 杨玲玲, 姜鹏, 等. 裙带菜基因工程选择标记的研究 [J]. 高技术通讯, 2003, **13**(6): 74-77.
- [24] 张亦陈, 高江涛, 张喆, 等. 草丁膦抗性基因(*bar*)在海带配子体中的稳定表达 [J]. 高技术通讯, 2006, **16**(9): 970-974.
- [25] 张亦陈, 高江涛, 张喆, 等. 裙带菜配子体基因工程选择标记的研究 [J]. 海洋科学, 2007, **31**(12): 64-67.
- [26] 滕长英, 梁成伟, 秦松, 等. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 基因工程选择试剂的筛选 [J]. 海洋与湖沼, 2005, **36**(4): 302-306.

(下转第 78 页)