

# 海带基因工程选择标记的研究

武建秋 王希华 秦松 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 海带幼孢子体对抗生素的敏感性实验证明,氯霉素可以作为海带基因工程中较理想的选择压力。本文得出了氯霉素对海带的半致死剂量,提示 CAT(氯霉素乙酰转移酶)基因可以用作海带基因工程的阳性选择标记基因。

**关键词** 海带,基因工程,选择标记,抗生素,氯霉素

在蓝藻和单细胞绿藻基因工程的基础上,大型海藻基因工程取得了新进展<sup>[1]①</sup>。秦松等1994年用基因枪法将 GUS( $\beta$ -葡糖苷酸酶)基因导入海带和裙带菜的组织切块中,获得了瞬间表达的结果,证明 CaMv35S 启动子在大型褐藻中具有通用性<sup>[2]</sup>,大型海藻基因工程有了良好的开端。为了获得永久转化子,需要确立大型海藻的选择标记,以建立大型海藻遗传转化模式系统。植物基因工程中为了筛选和鉴定转基因的组织或细胞,必须共转化选择标记基因,特别是阳性选择标记基因<sup>[3]</sup>。阳性选择标记基因表达的蛋白质使转基因细胞产生对选择压力抗性,以此来区分转化和未转化的细胞,利于大规模筛选。而 GUS 基因等非阳性选择标记不编码抗性,不能大规模筛选。现在常用的选择性试剂有抗生素、除草剂、氨基嘌呤、氨基酸类等<sup>[4]</sup>。本文研究了海带幼孢子体对抗生素的敏感性,实验结果表明海带对氯霉素非常敏感,氯霉素可用作海带基因工程的有效选择压力。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及培养方法

海带(*Laminaria japonica*)幼孢子体 1994年11月取自荣成海带育苗场,孢子体长度(全长,以下同)为 0.5~6.0cm。用营养海水培养(煮沸海水冷却后加入营养盐,终浓度为 N:5.71mol/L, P:2.58mol/L),光照每天 10h,光强约 50 $\mu$ E/

m<sup>2</sup>s,温度 10 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C。预培养 1 周后进行抗生素实验。

### 1.2 海带对抗生素的敏感性实验

配制抗生素母液,用 0.22 $\mu$ m 的滤器过滤除菌<sup>[5]</sup>。取直径 9cm 的无菌培养皿,加 40ml 营养海水和所需抗生素母液,平行设置对照组,每个培养皿放入 10 株长度为 1.5~2.0cm 的海带,培养条件同 1.1。每天观察海带生长及死亡情况,死亡以藻体叶片褪色后全变为绿色为标志<sup>[6]</sup>。每周更换培养液一次。

### 1.3 海带对氯霉素的敏感性实验

同 1.2,培养皿中加入营养海水和氯霉素母液,平行设置对照组。海带分 1.5~2.0cm 和 3.5~4.0cm 两个实验组,观察海带死亡情况。利用寇氏法(Karber 氏法)计算氯霉素对海带的半致死剂量<sup>[7]</sup>。计算公式如下:

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

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

计算可信限公式:  $\lg(LD_{50}$  的 95% 可信限) =  $\lg LD_{50} \pm 1.96 S_{\lg LD_{50}}$

① 秦松等,1995。藻类分子生物技术两年评(1) 分子遗传学与基因工程。海洋与湖沼 26(6),待刊。  
 本项工作承蒙张培军研究员指导和多方帮助,特此致谢。

收稿日期:1995年4月25日

$$\text{式中, } S_{\lg LD_{50}} = i \sqrt{\frac{\sum pq}{n}}$$

$P$ ——一个组的死亡率;  $q$ ——一个组的存活率;  $i$ ——相邻剂量比值的对数;  $n$ ——各组海带数。

## 2 实验结果

### 2.1 抗生素的初步筛选结果

本实验进行了6种抗生素的筛选(表1),发现海带幼孢子体对氯霉素最敏感。用50 $\mu\text{g/ml}$ 的氯霉素处理,在48h内处理组与对照组无显著差别,海带色素正常,60h死亡率为15%,120h死亡率为60%。死亡从色素逐渐变淡开始,先变成黄绿色,然后逐渐变成全绿色;叶片尖端最先死亡,之后是叶片基部,柄部最后死亡。3 000单位/ml的盐酸洁霉素在5d之内对幼孢子体无作用。1 000单位/ml的青霉素G 9d之内,处理组和对照组之间无显著差别,9d之后叶片逐渐褪色,由黄绿到绿最后变白。用1 000 $\mu\text{g/ml}$ 及低于此浓度的新霉素处理11d之内无显著变化,11d之后1 000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度组的海带逐渐变为绿色,500 $\mu\text{g/ml}$ 及低于此浓度的新霉素处理组海带生长正常。2 000单位/ml的硫酸卡那霉素16d内对海带幼孢子体无致死作用,色素正常。用硫酸链霉素处理,100~1 000单位/ml的处理组2个月内均无致死作用,但叶片颜色均加深,变为深褐色,与对照组差别显著,其他5种抗生素未发现有此效应。

表1 海带幼孢子体对抗生素的敏感性

Tab. 1 The antibiotic sensitivity test of young sporophytes of *Laminaria japonica* (length: 1.5~2.0cm)

抗生素	对应的抗性基因	可耐受剂量	可耐受时间(d)
盐酸洁霉素	/	3 000单位/ml	5
青霉素G	Amp <sup>r</sup> 基因	1 000单位/ml	9
硫酸链霉素	Str <sup>r</sup> 基因	1 000单位/ml	60
硫酸卡那霉素	NPTII 基因	2 000单位/ml	16
新霉素	NPTII 基因	1 000 $\mu\text{g/ml}$	11
氯霉素	CAT 基因	50 $\mu\text{g/ml}$	2

### 2.2 氯霉素对海带幼孢子体的半致死剂量

海带幼孢子体对氯霉素敏感性实验结果见

1995年第5期

表2、表3,利用寇氏法计算半致死剂量。长1.5~2.0cm的海带在氯霉素中的 $LD_{50}$ 为188.8 $\mu\text{g/ml}$ ,95%可信限为146.5~243.4 $\mu\text{g/ml}$ ;  $LD_{95}$ 为154.6 $\mu\text{g/ml}$ ,95%可信限为116.9~204.2 $\mu\text{g/ml}$ 。长3.5~4.0cm的海带在氯霉素中的 $LD_{50}$ 为406.5 $\mu\text{g/ml}$ ,95%可信限为317.6~520.4 $\mu\text{g/ml}$ ;  $LD_{95}$ 为184.6 $\mu\text{g/ml}$ ,95%可信限为146.5~232.6 $\mu\text{g/ml}$ 。3.5~4.0cm的海带在氯霉素中的 $LD_{50}$ 比1.5~2.0cm海带的 $LD_{50}$ 要高,因此选用海带不同生长阶段的藻体进行氯霉素抗性筛选所需的氯霉素剂量应有所不同。长1.5~2.0cm海带在氯霉素剂量为223.4 $\mu\text{g/ml}$ 以上各处理组中6d后死亡率为100%,长3.5~4.0cm的海带在氯霉素剂量为233.8 $\mu\text{g/ml}$ 以上各组处理6d后全部死亡。

同时进行了裙带菜(*Undaria pinnatifida*)对氯霉素的敏感性实验,发现裙带菜对氯霉素也很敏感,结果另报道。

表2 海带幼孢子体(长1.5~2.0cm)对氯霉素的敏感性实验结果

Tab. 2 The test of Chloromycetin sensitivity of young sporophytes of *Laminaria japonica* (Length: 1.5~2.0cm)

组别	1	2	3	4	5	6	7	8
氯霉素剂量( $\mu\text{g/ml}$ )	0	50.0	82.4	135.6	223.4	367.9	606.0	998.0
60h的死亡率	0	0.20	0.15	0.10	0.50	0.95	1.00	1.00
72h的死亡率	0	0.30	0.15	0.35	0.55	1.00	1.00	1.00

表3 海带幼孢子体(长3.5~4.0cm)对氯霉素的敏感性实验结果

Tab. 3 The test of chloromycetin sensitivity of young sporophytes of *Laminaria japonica* (Length: 3.5~4.0cm)

组别	1	2	3	4	5	6	7	8
氯霉素剂量( $\mu\text{g/ml}$ )	0	20.0	36.9	68.4	126.4	233.8	422.2	799.2
60h的死亡率	0	0	0	0	0.10	0.10	0.40	1.00
72h的死亡率	0	0	0	0	0.20	0.70	1.00	1.00

## 3 讨论与小结

### 3.1 高等植物基因工程中常用的抗生素

类选择压力有卡那霉素、新霉素、氯霉素和潮霉素等。海带对卡那霉素、新霉素不敏感,而对氯霉素敏感,氯霉素可以作为海带基因工程的选择压力。对不同生长阶段的材料,应选用不同的剂量进行筛选。

3.2 氯霉素干扰核糖体的蛋白质合成,最终抑制细胞生长。CAT 基因编码氯霉素乙酰转移酶(CAT),此酶使氯霉素乙酰化而失活<sup>[8]</sup>。植物细胞内非特异性 CAT 活性本底很低,不会对基因产物分析的干扰,适于定量分析<sup>[9]</sup>。在高等植物中用 CAT 基因作选择标记基因成功的实例很多。Prols 等1988年将 P<sup>RT101cat</sup> 导入烟草叶肉原生质体,培养30min 后就能检测到 CAT 活性,4~24h 内 CAT 活性最强<sup>[10]</sup>。Werr 等1986年将 CAT 基因导入一粒小麦 (*Triticum monococum*) 原生质体中,获得了很强的瞬间表达<sup>[11]</sup>。1985年 Michael 等用电击法把 P<sup>NOSC</sup> 导入到胡萝卜的原生质体中,在转化后24~48h 内检测到了 CAT 的活性<sup>[12]</sup>。在蓝藻中 CAT 基因也是比较常用的阳性选择标记基因<sup>[13,14]</sup>。1987年 Thiel 与 Poo 用电击法将穿梭质粒 P<sup>RL6</sup> 导入丝状蓝藻 *Anabaena* sp. M131品系中,用25μg/ml 的氯霉素筛选获得了阳性克隆<sup>[15]</sup>。大型海藻基因工程阳性选择标记基因以前尚未见报道,CAT 基因很有希望成为大型褐藻的阳性选择标记基

因。

## 参考文献

- [1] 王希华等,1995.海洋科学 1:18~19.
- [2] 秦松等,1994.海洋与湖沼 25(4):353~356.
- [3] 程玉忠,1991.遗传 13(4):45~48.
- [4] 傅荣昭等,1994.植物遗传转化技术手册.科学出版社,124~130.
- [5] 金冬雁、黎孟枫等译,1992.分子克隆实验指南.科学出版社,912.
- [6] 王清印、方宗熙,1981.山东海洋学院学报 11(1):53~60.
- [7] 张毓琪、陈叙龙,1993.环境生物毒理学.天津大学出版社,257~258.
- [8] 杨仲南、许智宏,1991.植物生理学通讯 27(5):321~326.
- [9] Klein, T. M. et al., 1987. Nature 327:70-73.
- [10] Prols, M. et al., 1988. Plant Cell Rep. 7:221.
- [11] Werr, W. et al., 1986. Mol. Gen. genet. 202:471.
- [12] Michael, F. et al., 1985. Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A.
- [13] Williams, J. G. K. and Azalay, A. A., 1993. Gene 24:37-51.
- [14] Marsac, de N. T. et al., 1987. Mlo. Gen. Genet. 269:396-398.
- [15] Thiel, T. and Poo, H., 1989. J. Bacteriol. 17(1):5 743-5 746.

## STUDIES OF SELECTIVE MARKER FOR KELP TRANSFORMATION

Wu Jianqiu, Wang Xihua, Song Qin and C. K. Tseng

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Apr. 25, 1995

Key words: *Laminaria japonica*, Transformation, Selective marker, Antibiotic, Chloromycetin

### Abstract

In recent years, progress has been made in the gene transfer of seaweeds. Lack of selective marker made it difficult to acquire a stably expressed transgenic kelp. Results of antibiotic sensitivity of young sporophytes of *Laminaria japonica* was reported in the present paper. It is proved that, *Laminaria japonica* is

very sensitive to chloromycetin.  $LD_{50}^{60h}$  of young sporophytes (1.5cm-2.0cm in length) to of chloromycetin is 188.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and  $LD_{50}^{72h}$  is 154.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .  $LD_{50}^{60h}$  of sporophytes from 3.5cm to 4.0cm in length is 406.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and  $LD_{50}^{72h}$  is 184.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . These results indicate that chloromycetin can be a selective marker and CAT gene will be a promising positive selective gene for kepl transformation.