金藻基因工程选择标记的研究

STUDY ON THE SELECTABLE MARKER FOR *Dicrateria inornata* GENE ENGINEERING

曹军平[1]　费志清[2]　刘必谦[2]　胡国成[1]　孙宗修[1]

([1]中国水稻研究所农业部水稻生物学重点开放实验室 杭州 310006)
([2]宁波大学海洋生物工程重点实验室 315211)

关键词　叉鞭金藻,基因工程,选择标记,抗生素,Zeocin

藻类的遗传转化有广阔的应用前景,有关的研究国外进行得较早,国内也已开展了相应的研究。和高等植物的基因转化一样,为了获得稳定遗传的转基因藻株,必须利用适当的选择压力把转化与未转化的细胞区分开来。目前基因工程中常用的选择性试剂大致可以分为抗生素类、除草剂类、氨基酸类、氨甲喋呤类等。叉鞭金藻(*Dicrateria inornata*)是一种海洋微藻,体呈球形,直径5~7 μm,有两条等长的鞭毛,无细胞壁,含有一些生物活性物质;它又是理想的饵料,可以对其进行综合利用以提高经济效益[1],因此是基因工程的理想受体。本文首次报道了叉鞭金藻对在转基因时常用的6种抗生素:潮霉素(Hygromycin,Hyg)、氯霉素(Chloramphenicol,Chl)、G418(Geneticin)、链霉素(Stretomycin,Str)、头孢霉素(Cefotaxime,Cef)、Zeocin和1种除草剂PPT(Phosphinotricin,PPT)共7种常用的基因工程选择性试剂的敏感性。

1　材料与方法

1.1　实验材料

叉鞭金藻(以下简称金藻)及培养基由宁波大学海洋生物工程重点实验室提供,培养基的pH值为7.5,培养条件为光照强度1 000~2 000 lx,温度25 ℃左右,光周期L∶D为16 h∶8 h。

1.2　实验试剂

本试验使用6种抗生素和1种除草剂。氯霉素、链霉素购自华美生物公司;G418购自Life Biology公司;潮霉素购自Sigma公司;Zeocin购自Invitrogen公司;头孢霉素购自中国科学院遗传所;PPT由中国科学院上海植生所提供。分别配制母液,用0.22 μm的过滤器过滤除菌。

1.3　在正常盐度下金藻对常用选择试剂敏感性的测定

在盐度为30的培养基中培养至对数期($\times 10^5$个/ml)的金藻藻液,分装到100 ml的三角烧瓶中,每瓶加50 ml的藻液。按表1所列浓度添加抗生素或除草剂,置于适宜的条件下培养,每种处理设3次重复,平行设置对照组。每天定时观察藻的生长情况并采用KB-K-25血球计数板计数,每次计4个数,取其平均值,敏感性以能抑制金藻细胞不分裂繁殖为标准。每两周把培养液全部更换一次,并再加入相应剂量的选择试剂。

1.4　在适当稀释的培养基中金藻对Zeocin敏感性的测定

按1.3的方法进行,但适当稀释盐度,Zeocin的终浓度为0,2.5,5,10,20,30 mg/L。每天用721型分光光度计在波长420 nm处测OD值。

1.5　Zeocin对金藻的半致死剂量的测定

在稀释的培养基中测半致死剂量,开始浓度为$\times 10^6$个/ml,Zeocin的终浓度为0,2.5,5,10,20,40,80,160,320 mg/L,每天按1.3的方法计数,用寇氏法计算Zeocin对金藻的半致死剂量[2]。计算公式如下:

$\lg LD_{50} = Xm - i(\Sigma P - 0.5)$ 式中,Xm为最大剂量的对数值;i为相邻剂量比值的对数;ΣP为各实验组死亡率的总和。

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

式中,$S_{\lg LD_{50}} = i(\Sigma(pq/n))^{1/2}$

收稿日期:2000-04-29;修回日期:2000-07-26

式中，p 为一个组的死亡率；q 为一个组的存活率；i 为相邻剂量比值的对数；n 为各组细胞数。

表 1　6 种抗生素和 1 种除草剂的实验浓度

选择试剂	浓度(mg/L)				
	1	2	3	4	5
Zeocin	0	20	50	100	200
潮霉素	0	50	100	200	600
G418	0	20	30	40	50
氯霉素	0	68	136	170	340
头孢霉素	0	50	100	150	200
链霉素	0	50	100	300	500
PPT	0	20	30	40	50

2 结果与分析

2.1　金藻对选择试剂的敏感性

在正常海水的盐度培养基中通过对 6 种抗生素和 1 种除草剂的筛选发现：金藻对 Zeocin 最为敏感(见表 2)，在用 Zeocin 处理后的第 10 天，100 mg/L 的 Zeocin 使金藻不能游动。观察金藻对各个处理组最高浓度的反应，可见金藻对链霉素最不敏感，即使链霉素的浓度高达 500 mg/L 中生长依然很好，连续观察 40 d 后，还有 10^5 个/ml 的金藻细胞在游动；金藻对头孢霉素和 PPT 也不敏感，用 200 mg/L 的头孢霉素处理 25 d 后，或用 50 mg/L 的 PPT 处理 40 d 后，仍有 10^5 个/ml 细胞在游动；金藻对潮霉素、G418 和氯霉素比较敏感，金藻在含 50 mg/L 的 G418 或 600 mg/L 潮霉素的海水培养基中，连续观察发现到第 15 天，就不再看到会游动的金藻细胞，在 340 mg/L 氯霉素的处理中，连续观察到第 10 天也找不到能游动的金藻细胞。至于其他浓度的处理，由于都低于上述最高浓度，对金藻生长的抑制效果更差：在含链霉素、头孢霉素、PPT 的海水培养基中，对金藻连续追踪 40 d，都可观察到金藻细胞在游动，生长依然很好，而在其他浓度的潮霉素、G418 和氯霉素处理中，对金藻作了连续 15 d 的观察，发现细胞都还在游动，长得也很好。相比之下，金藻对 Zeocin 的反应则明显不同。在用 Zeocin 处理后的第 10 天，100 mg/L 的 Zeocin 使金藻不能游动。因此比较供试的抗生素与除草剂，金藻对 Zeocin 最为敏感。

2.2　金藻在适当稀释的培养基中对 Zeocin 的半致死剂量的测定

已经知道抗生素与除草剂在一定的离子强度下才有效，因此在基因工程中筛选标记的时候，应特别考虑选择剂对培养液中的盐离子浓度及 pH 值的要求。目前植物基因工程中常用的选择剂，是以陆地生物为对象，在没有高盐环境的正常渗透压条件下选出来的。而海洋生物所处的高盐环境对选择剂的选择效果有明显不利的影响。为了兼顾选择剂的效果和微藻的生长，Zeocin 作用的盐度为 5，作者根据 Zeocin 发挥有效功能所需的离子浓度，进行了一系列的培养液淡化梯度的实验，结果表明金藻在稀释 10 倍后的海水中，对数生长期比对照延缓 1 ~ 2 d，但并未影响其生长活力；而其他淡化处理要不是使金藻生长不好，要不就是选择剂的浓度较大及时间较长。因此以稀释 10 倍的培养基测定 Zeocin 的半致死剂量。

随后初步测定了在稀释培养液中金藻对 Zeocin 的敏感性(见图 1)，从图 1 可以看出金藻在 2.5 mg/L Zeocin 中与对照的差异不大，用 5 mg/L 的 Zeocin 处理 2 d 后 OD 值明显下降，而 10，20，30 mg/L 的 Zeocin 处理中金藻 OD 值下降的趋势却比 5 mg/L Zeocin 处理下降慢，下降慢的原因作者认为是 5 mg/L 的 Zeocin 在金藻培养液中的 pH 值及离子浓度比 10，20，30 mg/L 的 Zeocin 最能抑制细胞生长，因而下降就快。

表 2　金藻对 7 种选择剂的敏感性测定结果

选择试剂	相应抗性基因	观察时间(d)	检测剂量(mg/L)	生长情况
Zeocin	ble	10	100	−
潮霉素	hpt	15	600	−
G418	nptⅡ	15	50	−
氯霉素	cat	10	340	−
头孢霉素	amp	25	200	+
链霉素	str	40	500	+
PPT	bar	40	50	+

注：+ 指显著生长，− 指细胞都不运动

随后作者测定了 Zeocin 对金藻的半致死剂量(结果见表 3)。

利用寇氏法计算 Zeocin 对金藻的半致死剂量，当

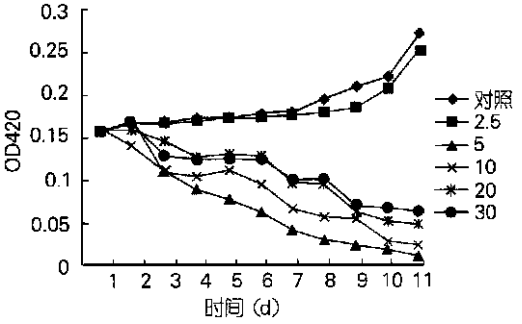

图 1　金藻在含 Zeocin 的稀释培养基中的敏感性

金藻的细胞密度为大约 10^6 个/ml 时,48 h 的 LD_{50} = 4.457 mg/L,95%的可信度为 3.452 ~ 5.462 mg/L,72 h 的 LD_{50} = 1.85 mg/L,95%的可信度为 0.83 ~ 2.87 mg/L。160 mg/L的 Zeocin 在 48 h 后的死亡率为 100%,而 20 mg/L的 Zeocin 在 72 h 时死亡率为 100%。

表 3 淡化培养基中 Zeocin 对金藻的敏感性的测定结果(密度:× 10^6 个/ml)

组别	Zeocin 剂量 (mg/L)	24 h 的死亡率 (%)	48 h 的死亡率 (%)	72 h 的死亡率 (%)
1	0	0.00	0.00	0.00
2	2.5	0.24	0.89	0.89
3	5	0.26	0.90	0.99
4	10	0.40	0.92	0.99
5	20	0.50	0.95	1.00
6	40	0.55	0.97	1.00
7	80	0.64	0.98	1.00
8	160	0.75	1.00	1.00
9	320	0.85	1.00	1.00
LD_{50}(mg/L)		24.77	4.46	1.85
95%的可信度 (mg/L)		24.73 ~ 24.82	3.45 ~ 5.46	0.83 ~ 2.87

术的一个重点研究内容。现在大型经济藻类的转化已取得了一定的进展,但是发现大型藻类海带(*Laminaria japonica*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)对高等植物遗传转化中常用的卡那霉素、新霉素等选择性试剂不敏感。秦松等用 7 种抗生素处理海带,发现海带对潮霉素最敏感,对氯霉素较敏感,认为可以用潮霉素和氯霉素作为筛选剂。与大型经济藻类的转化相比,目前对海洋微藻的转化报道很少。作者选择海洋单细胞藻——叉鞭金藻为实验材料,探索用它进行遗传操作的可能性。由于金藻还未见有合适的选择标记报道,因此借鉴大型海藻和淡水微藻的研究成果,系统研究金藻对遗传转化中常用的选择试剂的敏感性,确定适合金藻的选择标记基因,是建立金藻遗传转化系统,使外源目的基因在其中稳定表达的前提条件,对利用转基因金藻作为高效生物反应器生产药用蛋白也具有十分重要的意义。

在目前的陆生高等植物遗传转化中,潮霉素、G418、氯霉素、链霉素、PPT是一些常用的选择试剂。秦松等的研究表明,海带对氯霉素、潮霉素敏感,可作为海带的选择标记。作者实验发现虽然金藻对潮霉素、G418 和氯霉素有点敏感,但所需的选择剂量大、选择时间长,因此不适宜作为选择剂。Drocourt 等在 1990 年报道 Zeocin 是腐草霉素家族的一员,腐草霉素家族是小的糖蛋白,通过诱导对细胞内 DNA的损伤以非特异性的方式起作用,这类抗生素对包括细菌、酵母、植物和哺乳动物的许多生物都有效。来自细菌 *Streptolloteichus hindustanus* 的 ble 基是编码对腐草霉素家族有很强亲和力的蛋白的基因,当 Zeocin 结合 BLE 蛋白时,就不能切离 DNA。Stevens 报道莱茵衣藻对 Zeocin 很敏感,20 mg/L Zeocin 就可抑制莱茵衣藻的生长[4]。Apt 等在 1995 年也将 ble 基因作为三角褐指藻(*Phaeodactylum tricomutum*)转化的筛选标记,5 mg/L就表现出高度敏感性。近来 Porath 等报道了用 ble 作为标记基因,用来转化杜氏盐藻[4]。在作者的实验中金藻对 Zeocin 也表现出高度敏感,因此 Zeocin 适宜作为金藻转化的选择试剂。

本文研究了基因工程中常用的 6 种抗生素和 1 种除草剂对叉鞭金藻的敏感性,叉鞭金藻对腐草霉素家族的 Zeocin 最敏感,当金藻的细胞数目为大约10^6个/ml 时,确定了金藻的 LD_{50}。Zeocin 能完全抑制金藻的生长,因此可以把编码对腐草霉素家族有很强亲和力的蛋白的 ble 基因作为叉鞭金藻基因工程的选择标记基因,并用 Zeocin 作为转基因金藻的选择试剂。

3 讨论和结论

藻类遗传转化的研究,国外进行得较早。开始是用天然方法转化单细胞原核蓝藻,以后 Thiel 在 1989 年又在丝状蓝藻鱼腥藻(*Anabaena* sp.)中用电击转化,真核藻类转化的工作是 Rochaix 在 1982 年首先在单细胞莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhandtii*)中进行。Kindle 1989 年报道莱茵衣藻是唯一的染色体、叶绿体和线粒体 3 套基因组均能遗传转化的植物。国内陈颖等 1999 年以 G418 为选择试剂筛选获得生产防御素蛋白基因转小球藻(*Chlorella* sp.)。

海洋中蕴藏着丰富的藻类植物,海藻的基因转化已成为海洋生物技

参考文献

1 华汝成。单细胞藻类的培养与利用。北京:农业出版社,1986。57 ~ 58
2 张毓琪等。环境生物毒理学。天津:天津大学出版社,1993。257 ~ 258
3 Stevens D.R., Rochaix J-D & Purton S.. *Mol. Gen. Genet.*, 1996,251:23 ~ 30
4 Porath J.B., Gokhman I.. *et al*.. *Phycologia*, 1997, 36 (Suppl.):89

(本文编辑:刘珊珊)