

# 裙带菜配子体基因工程选择标记的研究

张亦陈<sup>1,2</sup>, 高江涛<sup>1,2</sup>, 张喆<sup>3</sup>, 姜鹏<sup>1</sup>, 秦松<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 中国海洋大学生命学院, 山东青岛 266003)

**摘要:** 研究了裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 配子体对除草剂草丁膦的敏感性以及温度对草丁膦处理效果的影响。结果表明, 裙带菜配子体对草丁膦敏感; 统计学分析得出了草丁膦在不同温度条件下处理裙带菜配子体的半致死浓度 (LD<sub>50</sub>) 及 95% 可信限; 温差达到 10 时, 相同处理时间各组内不同处理温度样品的 LD<sub>50</sub> 之间呈现显著差异, 第 6 天的 LD<sub>50</sub> 由 10 组的 15.78 mg/L 降为 20 组的 11.56 mg/L 和 25 组的 10.33 mg/L。研究发现可以尝试采用草丁膦作为裙带菜配子体遗传转化的选择试剂。

**关键词:** 裙带菜 (*Undaria pinnatifida*); 配子体; 温度; 草丁膦 (phosphiothricin, PPT); 选择标记

**中图分类号:** Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)12-0064-05

大型海藻遗传转化研究始于 20 世纪 90 年代初, 目前已经建立了以海带为代表的大型海藻遗传转化模型<sup>[1-3]</sup>, 在此基础上进一步实现了裙带菜的遗传转化<sup>[4]</sup>。已有的大型海藻遗传转化模型由于包含海上安全栽培操作流程, 因此面临转基因安全性问题<sup>[5]</sup>。褐藻配子体克隆的分离和大规模营养生长是比较成熟的技术, 因此将大型褐藻配子体作为转化受体, 筛选出转化克隆后直接利用其营养生长来积累转基因产物成为一个新的研究方向<sup>[6,7]</sup>。筛选是转基因研究的关键步骤, 采用适当的选择标记基因, 以及相应的选择试剂能够高效地挑选出转化子。除草剂草丁膦 (有效成分为 phosphiothricin, 或 PPT) 及其抗性基因 *bar* 筛选系统能够用于海带配子体转基因研究。裙带菜与海带同属褐藻, 生物学上有很大的相似性, 另一方面与海带相比裙带菜配子体具有生长速度快, 适温范围广的优点, 因此从应用角度来看, 比海带更适合作为转基因生物反应器。

作者研究了裙带菜配子体在其生长适宜温度范围内对除草剂草丁膦的敏感性, 并比较了温度对草丁膦处理效果的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 配子体克隆由本实验室保存, 培养液所用海水取自中国科学院海洋研究所实验海水处理系统, 经过滤、煮沸、冷却后加营养盐, 使终浓度为 N:0.43 mmol/L, P:0.019 mmol/L, 每周更换 1 次培养液; 培养瓶固定在置于光照培养箱中

的振荡器上, 光强为 500 lx, 光暗周期为 14 h:10 h。除草剂草丁膦 (德国 Bayer 公司产品) 由中国科学院遗传研究所李文彬研究员惠赠。Sigmacote 购自美国 Sigma 公司, 其他试剂均为国药集团沪试牌分析纯试剂。

### 1.2 方法

选取生长健康的裙带菜配子体, 在洁净工作台中用灭菌载玻片的磨砂端将配子体细胞簇小心地分散开, 按密度  $2 \times 10^4$  个/mL 分别加入各组瓶中, 弱光恢复培养 1 d。为防止研开的配子体贴壁, 三角瓶预先用 Sigmacote 进行硅烷化处理。实验温度设定为 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 温度波动为  $\pm 0.5$ 。草丁膦终浓度梯度设置为 0, 4, 8, 16, 32, 64 mg/L, 每组样品 3 个平行。每天用 NIKON 多功能显微镜的明视场和荧光视场观察各组样品处理情况并统计死亡率。

### 1.3 统计学分析

#### 1.3.1 LD<sub>50</sub> 及其 95% 可信限的确定

采用寇氏法 (Karber)<sup>[8]</sup> 计算草丁膦处理裙带菜配子体的半致死浓度 (LD<sub>50</sub>) 及其 95% 可信限。计算

收稿日期: 2006-02-26; 修回日期: 2006-06-30

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目 (KZCX3-SW-215)

作者简介: 张亦陈 (1975-), 男, 山西保德人, 博士研究生, 主要从事海洋生物技术方向研究, 电话: 0532-82898863, E-mail: cnzhangyc@yahoo.com.cn; 秦松, 研究员, 通讯作者, 电话: 0532-82898500, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

公式如下:

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

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

$$\lg N = \lg LD_{50} \pm 1.96 S_{\lg LD_{50}}$$

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,  $n$  为每次各组统计配子体总数。

### 1.3.2 不同温度条件下 $LD_{50}$ 差异的显著性检验

按两个一对分别检验相同处理时间各组内不同处理温度样品的  $LD_{50}$  差异的显著性。可通过计算  $K_{i,j}$  和  $f_{i,j}$  的比值来判断差异是否显著, 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  $K_{i,j}$  = 较大的  $LD_{50}$  值 / 较小的  $LD_{50}$  值;

$f$  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  $LD_{50}/f$ ),

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

## 2 结果

### 2.1 草丁膦敏感性

草丁膦处理两天后 8 mg/L 以上各组均可观察到比较明显的致死效果, 表现为从各个藻丝段分枝

的端部开始变绿而后逐渐变白、空化。荧光视野观察发现配子体藻丝段内部叶绿体的荧光消失, 配子体细胞已经开始死亡。在实验温度范围内, 低质量浓度 (32 mg/L 以下) 的草丁膦致死作用较弱, 只能起到抑制生长或部分杀死的作用, 最终只观察到各实验组有部分配子体藻丝段死亡; 高质量浓度 (64 mg/L) 处理组, 配子体在 6 d 处理时间内完全死亡。在实验温度范围内, 裙带菜配子体对草丁膦的耐受剂量呈现随温度升高而下降的趋势。10 时草丁膦在质量浓度 32 mg/L 时不能完全杀死裙带菜配子体细胞, 而当温度升高到 25, 配子体细胞死亡率即可达 100% (图 1)。

### 2.2 统计分析

采用寇氏 (Karber) 法得出裙带菜配子体在处理第 3~6 天时, 不同处理温度样品的  $LD_{50}$  及其 95% 可信限 (图 2)。显著性分析结果表明升高温度可提高致死效果: 草丁膦在相同处理时间组内温差达到 10 以上时  $LD_{50}$  剂量之间呈现出显著性差异; 在 20 以上相同处理时间组内温差达到 5 即可表现出  $LD_{50}$  的显著性差异。第 6 天的  $LD_{50}$  由 10 组的 15.78 mg/L 降为 20 组的 11.56 mg/L 和 25 组的 10.33 mg/L (表 1)。

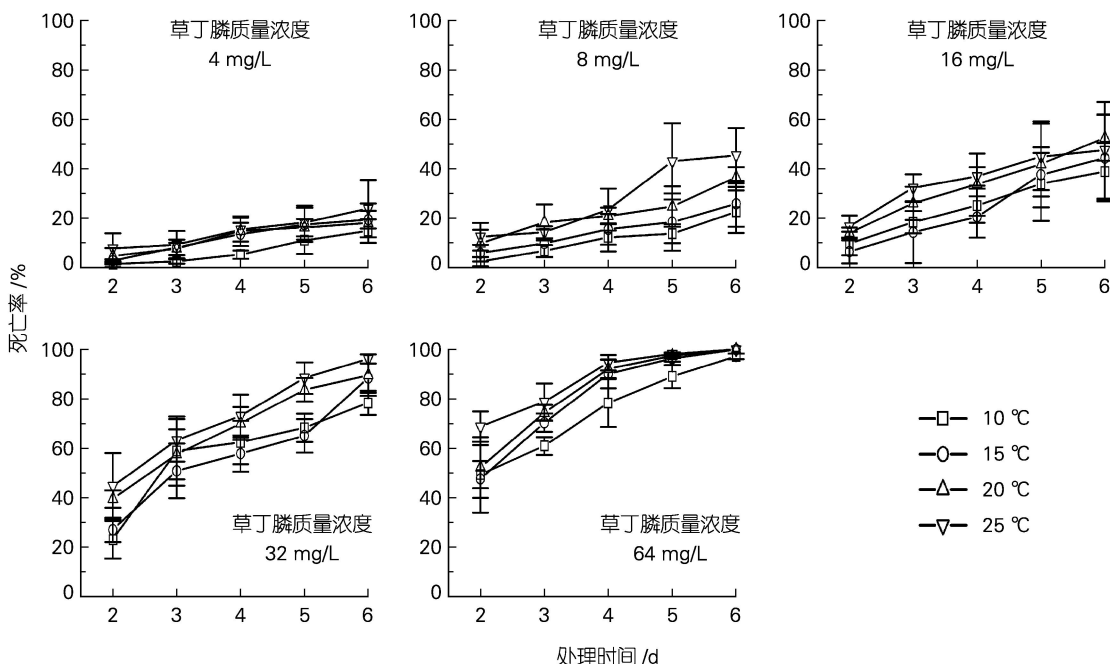


图 1 不同质量浓度草丁膦对不同温度下裙带菜配子体的致死情况

Fig. 1 The lethal effect of PPT at different temperatures

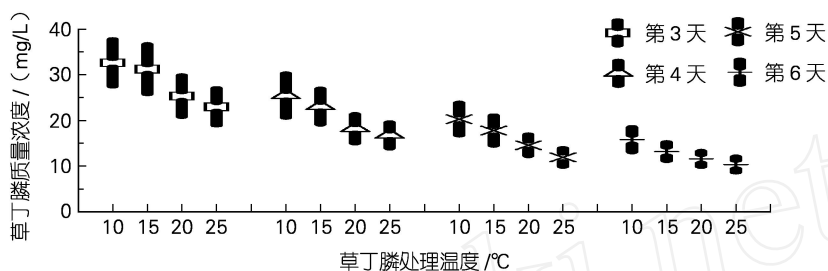


图2 不同温度条件下草丁膦处理裙带菜配子体3~6 d的LD<sub>50</sub>及95%可信限

Fig. 2 The LD<sub>50</sub> and 95 % Confidence Range of PPT for treating gametophytes at different temperatures

表1 不同处理温度条件下草丁膦LD<sub>50</sub>的95%可信限统计及差异的显著性分析

Tab.1 Significance analyse of LD<sub>50</sub> 95 % Confidence Range of PPT at different temperatures

处理时间	样品	处理温度 (°C)	LD <sub>50</sub> (mg/L)	LD <sub>50</sub> 的95%可信限(mg/L)	组内差异显著性分析 ( $K_{i,j}/f_{i,j}$ )					
					b-a	b-c	c-a	c-d	d-b	d-a
第3天	a	10	32.59	28.14 ~ 37.76						
	b	15	31.22	26.57 ~ 36.68	0.84	0.98				
	c	20	25.32	21.47 ~ 29.85			1.03	1.14		
	d	25	22.97	19.52 ~ 27.03					1.08	1.14
第4天	a	10	25.42	21.37 ~ 30.25						
	b	15	23.02	19.70 ~ 6.91	0.87	1.01				
	c	20	18.17	15.46 ~ 1.36			1.10	1.15		
	d	25	16.73	14.30 ~ 19.58					1.10	1.20
第5天	a	10	20.27	17.22 ~ 23.86						
	b	15	17.77	14.98 ~ 21.07	0.90	0.97				
	c	20	14.54	12.53 ~ 16.89			1.12	1.02		
	d	25	11.90	10.17 ~ 13.93					1.18	1.36
第6天	a	10	15.78	13.45 ~ 18.51						
	b	15	13.17	11.40 ~ 15.22	0.97	0.93				
	c	20	11.56	10.07 ~ 13.27			1.11	1.10		
	d	25	10.33	8.86 ~ 12.04					1.03	1.22

### 3 讨论

海洋生物反应器是海洋生物技术研究的热点,海洋藻类基因工程目的之一就是将海洋藻类作为新型的生物反应器,把外源基因导入其中,表达出目的基因产物。由于大型海藻的生物学特殊性,筛选是其遗传转化研究的难点,目前发现海带和裙带菜幼孢子体对氯霉素和潮霉素较敏感<sup>[9,10]</sup>。作者对裙带菜

配子体的初筛结果显示其对氯霉素的耐受浓度达到700 mg/L以上,远远高于幼孢子体的耐受限度,氯霉素不适于用作转基因裙带菜配子体的选择试剂,但可以考虑作为裙带菜配子体无菌培养的除菌剂使用。

作者研究了裙带菜配子体在不同处理温度条件下对草丁膦的敏感性。统计分析结果显示,裙带菜配子体对草丁膦非常敏感;10 °C处理条件下草丁膦3 d的LD<sub>50</sub>为32.59 mg/L;裙带菜配子体较其幼孢子体

对草丁膦有更强的耐受能力<sup>[11]</sup>;升高温度能显著提高草丁膦的致死效果,当各个浓度实验组的处理温度从 10 升高到 25 时,草丁膦的 LD<sub>50</sub> 值均显著下降,其中第 5 天最明显,降幅近 50%。海带配子体对草丁膦敏感性研究也有类似的结果<sup>[6]</sup>。广谱除草剂草丁膦能通过抑制植物体内唯一解氨毒的谷氨酰胺合成酶导致植物死亡<sup>[12,13]</sup>,升高温度提高其致死效率可能的原因是:配子体生长速度加快,但是由于草丁膦抑制了细胞内氨的同化作用,从而导致氨的迅速积累,最终引起叶绿体解体,细胞死亡<sup>[14]</sup>;另一个可能的原因是升高温度增加了细胞膜的流动性和通透性,因此草丁膦可以快速渗入,达到致死浓度;是否还有其他原因有待于深入研究。

草丁膦在陆生植物转基因方面有广泛应用<sup>[12]</sup>,近年来开始用于藻类基因工程研究<sup>[15,16]</sup>,也是目前发现海带和裙带菜对其敏感的少数筛选剂之一<sup>[11,17]</sup>。草丁膦抗性基因 *bar* 转化海带配子体的研究表明草丁膦可以作为海带配子体遗传转化的选择试剂。本实验结果提示,草丁膦可能成为适合转基因裙带菜配子体生物反应器的选择试剂,而且可以通过提高处理温度的方法来降低草丁膦的用量或缩短筛选时间。

#### 参考文献:

[1] Qin S, Jiang P, Li X P, *et al.* A transformation model for *Laminaria japonica* [J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 1998, **16** (Suppl): 50-55.  
 [2] Jiang P, Qin S, Tseng C K. Expression of hepatitis B surface antigen gene (*HBsAg*) in *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta) [J]. **Chinese Science Bulletin**, 2002, **47**: 1 438-1 440.  
 [3] Jiang P, Qin S, Tseng C K. Expression of the *lacZ* reporter gene in sporophytes of the seaweed *Laminaria japonica* (Phaeophyceae) by gametophyte-targeted transformation [J]. **Plant Cell Reports**, 2003, **21**: 1 211-1 216.  
 [4] 秦松,于道展,姜鹏,等. -半乳糖苷酶基因(*lacZ*) 在海藻裙带菜中的稳定表达[J]. 高技术通讯, 2003,

7: 87-89.  
 [5] Qin S, Jinag P, Tseng C K. Transforming kelp into a marine bioreactor [J]. **Trends in Biotechnology**, 2005, **23** (5): 264-268.  
 [6] 张亦陈. 利用海带配子体营养增殖体系实现外源基因表达[D]. 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2006.  
 [7] Gao J T, Zhang Y C, Wang H H, *et al.* Suspension culture of gametophytes of transgenic kelp in a photobioreactor [J]. **Biotechnology Letters**, 2005, **27** (14): 1 025-1 028.  
 [8] 张毓琪,陈叙龙. 环境毒理学[M]. 天津:天津大学出版社, 1993. 257-258.  
 [9] 武建秋,王希华,秦松,等. 海带基因工程选择标记的研究[J]. 海洋科学, 1995, **5**: 42-45.  
 [10] 李新萍,秦松,曾呈奎. 孤雌生殖海带对氯霉素和潮霉素的敏感性研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, **30** (2): 186-191.  
 [11] 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, **6**: 74-77.  
 [12] 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.  
 [13] 段发平,梁承邨,黎垣庆. *Bar* 基因和转 *bar* 基因作物的研究进展[J]. 广西植物, 2001, **21** (2): 166-172.  
 [14] Zeldin E L, Jury T P, Serres R A, *et al.* Tolerance to the herbicide glufosinate in transgenic cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and enhancement of tolerance in progeny [J]. **Journal of The American Society for Horticultural Science**, 2002, **127** (4): 502-507.  
 [15] 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.  
 [16] Tan C P, Qin S, Zhang Q, *et al.* Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina* [J]. **Journal of Microbiology**, 2005, **43** (4): 361-365.  
 [17] 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.

# Study on selective marker for genetic engineering of *Undaria pinnatifida* gametophytes

ZHANG Yi-chen<sup>1,2</sup>, GAO Jiang-tao<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhe<sup>3</sup>, JIANG Peng<sup>1</sup>, QIN Song<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. College of Marine Life Sciences, China Ocean University, Qingdao 266003, China)

**Received:** Feb., 26, 2006

**Key words:** *Undaria pinnatifida*; gametophytes; temperature; phosphiothricin (PPT); selective marker

**Abstract:** The sensitivity of *Undaria pinnatifida* gametophytes to PPT (phosphiothricin) at different temperatures (10.0, 15.0, 20.0, 25.0,  $\pm 0.5$ ) was tested. The results of LD<sub>50</sub> and 95% Confidence Range of PPT showed that *U. pinnatifida* gametophytes were sensitive to PPT; increasing the cultivation temperature could significantly decrease the LD<sub>50</sub> of PPT. At the sixth day, the LD<sub>50</sub> dropped from 15.78 mg/L at 10.0 to 11.56 mg/L at 20.0 and 10.33 mg/L at 25.0. The results mentioned above indicated that PPT could be a promising selective pressure for *U. pinnatifida* gametophytes transgenic research.

(本文编辑:张培新)