

紫菜体细胞对抗生素的敏感性实验

沈怀舜¹ 王素娟²

(¹ 江苏省海洋水产研究所 南通 226007)

(² 上海水产大学 200090)

关键词 紫菜, 体细胞, 遗传选择标记, 抗生素

近几年来栽培紫菜常发生大面积的病烂, 给养殖生产造成巨大的损失, 因此, 培育出抗逆、高产、优质的紫菜新品种成为亟需解决的问题。利用细胞工程、尤其基因工程等生物技术研究紫菜的生物学特性、培育紫菜的新品种成为必然的发展方向。

秦松等对海带等大型经济褐藻类的研究取得了一些进展^[1,2]并发现氯霉素是海带基因工程的有效选择压力。上海水产大学王素娟在紫菜领域进行了这方面的研究工作, 探索外源基因导入紫菜细胞的方法。本文实验表明, 氯霉素在紫菜基因工程中可作为有效选择压力, 另外四环素也有一定的效果。

1 材料与方法

1.1 材料、体细胞制备及培养方法

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)1991年12月取自江苏启东, 阴干冷冻保存。紫菜体细胞获得及培养方法, 同王素娟等(1986)。

1.2 紫菜体细胞对抗生素的敏感性实验

配制抗生素母液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌。取直径6cm培养皿, 加入50000定量紫菜体细胞, 对氯霉素敏感性实验分别用培养第1天和第6天的细胞, 对其他抗生素敏感性实验用培养第1天的细胞, 10ml消毒海水, 所需抗生素母液, 培养7d开始显微镜计数并观察细胞生长情况。

1.3 条斑紫菜体细胞对氯霉素、四环素敏感性实验及半致死剂量的计算

同2.2, 第7天、14天显微镜观察细胞生长情况, 计数并计算死亡率。半致死剂量指一定时间内死亡率为50%的剂量, 计算方法用Karber氏法^[2]; 公式如下:

$$1gLD_{50} = X_m - i(p - 0.5)$$

式中 X_m 为最大剂量的对数值; i 为相邻剂量比值的对数; p 为各实验组死亡率的总和(以小数表示)。

2 结果

2.1 紫菜体细胞对抗生素的敏感性实验

做了可作选择标记用的卡那霉素、青霉素、链霉素、四环素及氯霉素抗生素等实验, 结果表明, 紫菜细胞对卡那霉素、青霉素、链霉素的耐受性很强, 对氯霉素很敏感, 而对四环素介于两者之间, 结果见表1。

2.2 条斑紫菜细胞对氯霉素及四环素的敏感性实验及半致死剂量的测定

实验结果见表2、表3。表2的实验所用细胞为当天酶解出的条斑紫菜体细胞, 细胞颜色为墨绿色, 星状色素体清晰, 加入不同剂量的氯霉素, 第7天经显微镜观察, 对照组紫菜体细胞颜色变为橙红色, 已有80~100 μm长的小苗, 加入100~500 U/ml氯霉素的各组紫菜体细胞已大部分死亡, 未死亡细胞变淡绿色, 细胞不分裂, 第14天对照组紫菜体细胞已有300 μm长的小苗, 颜色为棕红色, 加入氯霉素的各组紫菜体细胞已全部死亡。表3为培养6d紫菜体细胞, 大部分为单细胞, 少量细胞团, 橙红色, 此时细胞生长稳定, 成活率很高, 加入不同剂量氯霉素, 7d后显微镜观察发现, 在25 U/ml组相对对照组死亡率已达40%, 细胞生长缓慢, 由公式计算可知, 培养第7天时半致死剂量为71.9 U/ml, 说明条斑紫菜对氯霉素很敏感。第14天观察计数, 半致死剂量为44.7 U/ml。在条斑紫菜培养第1天细胞对氯霉素的敏感性实验中, 虽然未对细胞计数, 从表2、表3对比仍可以发现, 第1天的细胞对氯霉素的敏感性大于第6天的细胞, 对同样加入100 U/ml氯霉素的组, 第14天时培养第1天细胞加氯霉素的组细胞已全部死亡, 而第6天的仍有20%成活, 原因可能是刚酶解出的细胞部分是原生质体, 还有为带部分细胞壁的细胞, 氯霉素容易进入, 所以更加敏感。

收稿日期: 1996-12-02

表 1 条斑紫菜细胞对抗生素的敏感性试验

Tab. 1 The antibiotic sensitivity test of somatic cells of *Porphyra yezoensis*

抗生素	可耐受量 (U/ml)	能耐时间 (d)	生长情况观察
卡那霉素	2×10^3	7	与对照组比细胞生长显著减慢, 细胞团比例减少
青霉素	1×10^3	7	细胞不分裂, $> 5 \times 10^3$ U/ml 组细胞大部分死亡
链霉素	$> 4 \times 10^4$	7	在 4×10^4 U/ml 的浓度下 7 d 观察未见影响
四环素	300	7	细胞生长显著减慢, 500 U/ml 组细胞大部分死亡
氯霉素	< 100	7	细胞不分裂, 大部分死亡

表 2 条斑紫菜培养第 1 天细胞对氯霉素的敏感性实验

Tab. 2 The Chloromycetin sensitivity test of the first day's somatic cells

氯霉素 (U/ml)	0	100	200	300	500
第 7 天细胞情况	橙红, 出现细胞团	细胞淡绿, 细胞不分裂, 大部分死亡	同前	同前	同前
第 14 天细胞情况	棕红, 较多小苗	细胞全部死亡	同前	同前	同前

表 3 条斑紫菜培养第 6 天细胞对氯霉素的敏感性实验

Tab. 3 The Chloromycetin sensitivity test of the sixth's somatic cells

氯霉素(U/ml)	0	25	50	100	200
第 7 天细胞数 ($\times 10^4$)	4.2	2.5	3.0	1.6	1.4
细胞情况	棕红, 较多 80~ 100 μm 少小苗	黄绿, 较少小苗 < 50 μm	同前	绿色, 细胞团 < 25 μm 极小苗	淡绿色细胞团 < 25 μm 极少小苗
第 14 天细胞数 ($\times 10^4$)	4.0	2.1	1.9	0.80	0.56
细胞情况	棕红, 小苗长 300 μm 左右	棕黄, 小苗 100 μm 左右	黄, 小苗长 60~ 80 μm	黄色, 小苗长 60 μm 左右	绿色, 细胞团 < 40 μm

用培养第 1 天条斑紫菜体细胞做对四环素的敏感性实验, 结果见表 4。发现紫菜体细胞对四环素有一定的敏感性, 加入四环素的各组与对照组相比细胞生长缓慢, 500 U/ml 的四环素使紫菜体细胞大部分死亡, 但 100~200 U/ml 剂量时, 细胞成活率反而比对照

组成活率高, 这可能是由于低剂量的抗生素正好起到杀菌作用, 防止了培养液的污染, 故成活率反而提高, 在做紫菜体细胞对抗生素敏感实验时, 也发现同样的现象。

表 4 条斑紫菜体细胞对四环素的敏感性实验

Tab. 4 The tetracin sensitivity test of somatic cells of *Porphyra yezoensis*

四环素(U/ml)	0	100	200	300	500
第 7 天细胞情况	橙红, 出现小苗	橙红, 极少细胞二分裂	同前	同前	绿色, 黄色, 大部分死亡
第 14 天细胞数 ($\times 10^4$)	1.28	3.75	4.52	2.42	0.61
细胞情况	棕红, 较多小苗	棕红, 少量二分裂	黄色, 单细胞	黄绿色, 单细胞	绿色, 单细胞

3 讨论

在微生物、植物的基因工程中常用的抗生素选择压力中有卡那霉素、青霉素、新霉素、四环素、氯霉素等, 通过实验发现条斑紫菜的体细胞对卡那霉素、青霉素及链霉素不敏感, 而对氯霉素相当敏感, 半致死

浓度 < 100 U/ml, 对四环素也有一定的敏感性。但低浓度的对紫菜细胞不敏感的抗生素对紫菜细胞培养能提高成活率, 可能是低浓度的卡那霉素、青霉素、链霉素的杀菌作用, 防止了培养液的污染。氯霉素可以作为紫菜基因工程很好的选择标记因子。武建秋等^[2]发现氯霉素可以作为海带基因工程的选择标记, 说明在大型经济海藻中, 对氯霉素的敏感性有共性。氯霉

素乙酰转移酶(CAT)基因产物能使氯霉素失活, 高等植物及蓝藻类基因工程中已有很多应用 CAT 基因作选择标记基因的例子^[2], 在紫菜基因工程中如能找到合适的载体, CAT 基因是很好的选择标记基因。

主要参考文献

- 1 秦 松等。海洋与湖沼, 1994, 25(4): 353~ 356
- 2 武建秋等。海洋科学, 1995, 5: 42~ 44

THE TEST OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF SOMMATIC CELLS OF *Porphyra yezoensis*

SHEN Hua-shun¹, WANG Su-juan²

(¹Marine Fisheries Research Institute of Jingsu Province, Nantong 226007)

(²Shanghai Fisheries University 200090)

Received: Dec. 2, 1996

Key Words: *Porphyra yezoensis*, Somatic cell, Selective marker, Chloromycetin, Tetracin

Abstract

The paper reported various antibiotic sensitivity test of somatic cells of *Porphyra yezoensis*. The result showed somatic cells are very sensitive to Chloromycetin; semicidal dose is less than 100 U/ml. It is proved that Chloromycetin is a good selective pressure for gene transformation of *P. yezoensis*. Somatic cells are also sensitive to tetracin.