

氯霉素乙酰转移酶(CAT) 基因在海带中的表达*

武建秋 秦 松 邓 田 郭晓林 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于1994年12月—1995年4月,在山东荣成海带育苗场采集海带幼孢子体,用基因枪法将氯霉素乙酰转移酶基因(CAT gene, *cat*)导入海带幼孢子体中,48h后检测到瞬间表达。转化后恢复培养一周,以致死剂量氯霉素筛选。两周后对照组全部死亡,转化组75株海带中有11株存活。转化三个月后经CAT酶联免疫(CATELISA)分析,在11株存活海带中有2株检测到CAT基因的表达。结果初步证明了CAT基因是海带基因工程的有效选择标记;同时也证明SV40启动子是适用于大型褐藻的启动子元件。

关键词 CAT基因 海带 选择标记 SV40启动子 遗传转化

学科分类号 Q785

植物遗传转化中常用两类报告基因:一类如 β -葡糖苷酸酶(GUS)基因,易于定性定量检测,但不编码抗性、不具正选择作用(Dong *et al*, 1991; Lowe *et al*, 1995);另一类如新霉素磷酸转移酶(NPT II)基因、氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)基因,编码抗性且易于检测,具有正选择作用,也被称作选择标记基因(Charest *et al*, 1988; Ozcan *et al*, 1993)。在植物基因工程中,质粒导入后以游离状态存在并表达叫瞬间表达(Wang *et al*, 1992)。GUS基因已经在海带、裙带菜和紫菜中实现了瞬间表达(秦松等, 1994; Kubler *et al*, 1994),但为了获得稳定表达的转基因植株,必须转入选择标记基因,以区分转化与未转化细胞,并将后者淘汰。氯霉素可以用作海带的有效选择压力(武建秋等, 1995)。CAT基因编码产物CAT,将氯霉素乙酰化而使其失活,从而使转基因细胞获得对氯霉素的抗性,CAT基因已在多种高等植物中实现了瞬间和稳定表达(Daniell *et al*, 1990; Klopfenstein *et al*, 1991; Porsch *et al*, 1993; Vasil *et al*, 1989)。目前仅有高等植物基因工程中常用的CaMV35S启动子能被大型藻类的转录系统识别的正式报道(秦松等, 1994; Kubler *et al*, 1994)。本文报告将SV40启动子驱动下的CAT基因导入海带细胞中表达的实验结果,以期探讨CAT基因用作海带基因工程选择标记基因,以及SV40启动子用于海带藻类遗传转化的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材料及培养方法

海带(*Laminaria japonica*)幼孢子体于1994年12月由荣成海带育苗场提供,长度为

* 国家攀登计划B资助项目,PDB-6-4-1号;国家自然科学基金资助项目,39400076、39670367号。武建秋,男,出生于1970年8月,硕士,E-mail:sqin@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1996-07-02,收修改稿日期:1998-05-26

1.0—10.0cm。从育苗绳上取下, 去除杂藻污物, 用海水清洗后, 再用煮沸过的海水冲洗干净。除菌过程如下: 先用高压灭菌海水将海带浸泡 20—30min, 然后于 1.5%KI 中浸泡 20min, 再用无菌水浸泡 20min, 最后放入灭菌海水中恢复 20min。除菌后, 放入灭过菌的 N-P 海水中培养 (灭菌海水中加入海带营养母液, 体积比 1 000:1, 母液成分为: 0.43mol / L NaNO_3 ; 0.019mol / L KH_2PO_4)。光暗周期为 10h / 14h, 光强为 $50\mu\text{E} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度为 $(10 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。在实验室中培养 14d 后进行 CAT 基因转化。

1.2 CAT 基因的转化

pCAT-Control 质粒 (4 750bp) 为美国 Promega 公司产品, 在 CAT 基因的上、下游分别装有 SV40 启动子和增强子。质粒浓度为 $1\mu\text{g} / \mu\text{l}$, A_{260} / A_{280} 为 1.89。选取全长约 5.0cm 的海带, 按前述方法再次除菌, 在距叶片基部 0.5cm 处用灭过菌的手术刀片切去尖端, 剩余部分用灭菌海水冲洗 3 次, 放于灭菌海水中待用。基因枪为 Bio-Rad 公司的 PDS-1000 / He 型, 整个轰击过程为无菌操作, 所有实验用品均用 70% 乙醇灭菌。微粒子的准备按 Sanford 等 (1991) 的方法进行。每次轰击用微粒子悬液 $6\mu\text{l}$ 。将 5 株小海带放在铺有 2 层无菌滤纸的培养皿中作为一批样品, 共 21 批。每批样品轰击 2 次, 第二次轰击时, 将样品旋转 90° 。轰击参数如下: 样品室真空度为 $6.1 \times 10^3\text{Pa}$, 可裂膜为 1 100psi, 样品与阻挡网间的距离为 6cm。阴性对照组的海带用无 DNA 的金粉轰击 2 次, 空白对照组的海带不轰击。

1.3 CAT 基因瞬间表达的检测

轰击后所有样品放入灭菌海水中黑暗培养 48h 后, 用 Boehringer Mannheim 公司的 CAT ELISA 试剂盒检测 CAT 的表达。随机取出轰击过的一批海带 (5 株) 作瞬间检测, 同时取出阴性对照和空白对照海带各 5 株, 其余海带光照 (见 1.1) 下继续培养。取出的海带用 5ml 磷酸缓冲液冲洗 3 次后, 吸去缓冲液, 将每组 5 株海带合并后用无菌剪刀剪碎, 加入 1ml 裂解液 (由试剂盒中提供), 室温放置 30min。在 $15\ 000\text{r} / \text{min}$, 4°C 离心 10min。取出上清液, 放入 -20°C 乙醇中待其冻结后转入 -70°C 备用。细胞抽提物用 Bradford (1976) 的方法测出总蛋白含量, 微孔板上每孔加入 $200\mu\text{l}$ (约含 $25\mu\text{g}$ 总蛋白)。其它操作均按试剂盒的指示进行。加入 ABTS 底物后, 用 511 型酶标仪 (上海第三分析仪器厂) 测定绿色反应产物在 405nm 处的吸光值。将样品吸光值与 CAT 标准曲线比较, 计算出样品中 CAT 含量, 最后得出单位总蛋白中 CAT 的含量。

1.4 氯霉素筛选以及筛选后 CAT 基因表达的检测

转化后恢复培养一周 (开始 48h 黑暗培养, 然后转入 1.1 所述条件), 采用含 $200\text{mg} / \text{L}$ 氯霉素的选择培养基进行筛选。每周更换培养基一次。筛选开始时, 转化组海带 75 株, 阴性对照和空白对照组各 20 株。当对照组全部死亡后, 将转化组存活海带转入无氯霉素的 N-P 营养海水中培养。CAT 基因表达的检测在转化后三个月进行。将存活海带纵向平分, 取一半作检测, 每株海带为一个样品。将同样大水的空白对照海带也纵向平分, 取 5 个对照样品分别检测 CAT 含量, 最后求其平均值。

2 结果

2.1 CAT 基因的瞬间表达

图 1 显示 CAT 基因在海带幼孢子体中瞬间表达的结果。进行 CAT ELISA 检测时, 因将基因枪轰击的每批 5 株海带放在一起作为一个样品, 所得数值为 5 株海带单位总蛋白

中 CAT 的平均含量。由图 1 可见,海带 CAT 本底很低。转化组中 CAT 含量比对照组高出近一倍,说明 CAT 基因在海带中实现了瞬间表达。此结果表明:CAT 基因与 SV40 启动子可以作为海带遗传转化研究的元件,为进一步研究提供了可行性。

2.2 筛选结果与筛选后 CAT 基因的表达

经 200mg/L 的氯霉素处理 14d 后,阴性对照组和空白对照组的各 20 株海带全部死亡。转化组的 75 株海带中有 11 株存活,存活率为 15%。死亡过程从叶片逐渐褪色开始,先变成黄绿色,再变为绿色,最后色素消失变白;叶片尖端最先死亡,之后是叶片基部,最后是柄部。经氯霉素筛选后存活的 11 株海带,藻体色泽比对照组深,其它生长状态与对照无显著差别。存活海带到 CAT 检测时有显著生长,平均长度从转化时的 0.5cm 增至 5.0cm 左右。对照组的 CAT 值是 5 株未经轰击海带的平均值,11 株存活海带中,有 2 株检测到高于对照组的 CAT 活性(图 2)。

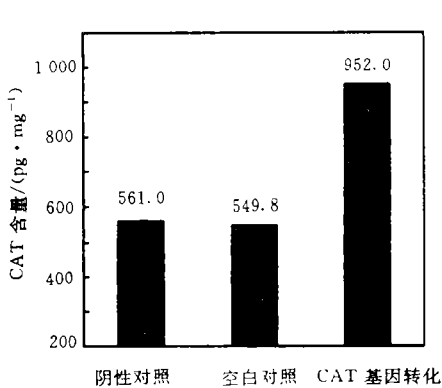


图 1 CAT 基因 (*cat*) 在海带幼孢子体中的瞬间表达 (48h 后) (每 mg 总蛋白中 CAT 的 pg 值)

Fig.1 Transient expression of *cat* in young sporophytes of *L. japonica* (after 48h)

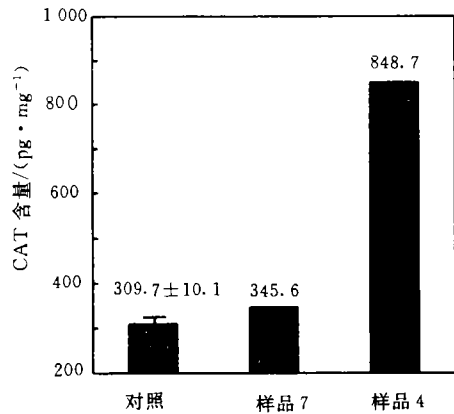


图 2 转化三个月后海带幼孢子体中 CAT 的含量 (每 mg 总蛋白中 CAT 的 pg 值)

Fig.2 Contents of CAT in transformed young sporophytes of *L. japonica* after 3 months of transformation

对照: 5 株未经轰击海带的平均值 (± 标准差)

3 讨论

CAT 活性多用放射性同位素方法进行检测 (Daniell *et al*, 1990; Klein *et al*, 1987), 该法仅能检测出有活性的 CAT, 且花费时间长 (Gorman *et al*, 1982)。而 CATELISA 方法不需使用同位素, 既能检测出有活性的 CAT, 也可检测出总 CAT 量, 使结果更准确, 与同位素方法具有同样的敏感性 (Porsch *et al*, 1993); 同时具有快速的特点, 从点样到酶标仪测量出实验结果仅需 4h。

大多数植物细胞中 CAT 本底都很低, 一般不会造成对基因产物分析的干扰 (Daniell *et al*, 1990; Hauptmann *et al*, 1987; Klein *et al*, 1987; Porsch *et al*, 1993)。本实验中的 CAT 本底可能由两方面引起: CAT 的微弱非特异性交叉反应和海带细胞中微量的内源性 CAT, 前者可能因为 CAT 抗体和海带细胞抽提物中 CAT 结构类似物发生了微弱结合,

经 ELISA 的放大作用而表现出来。Porsch 等 (1993) 发现马铃薯原生质体中 CAT 本底为 200—400pg/mg 蛋白, 不会对基因产物的分析造成干扰, 与本实验的结果近似。

瞬间表达一般维持 10 多天以后消失, 以致检测不到酶活性 (Werr *et al*, 1986)。本工作中转化海带 3 个月后仍有 2 株检测到高于对照组的 CAT 含量, 表明 CAT 基因有可能与海带基因组发生了整合, 尚需分子杂交实验证实。在本实验中, 有 11 株转化海带对致死剂量的氯霉素具有抗性, 其中仅有 18% 的海带检测到 CAT 含量高于对照组水平。这可能是有些未转化的细胞由于不能与氯霉素充分接触而发生“逃逸”(Escape), 产生嵌合体 (Dong *et al*, 1991; Lowe *et al*, 1995; May, 1995)。Dong 等 (1991) 报道以子叶为受体转化甜瓜时, 最后也仅有约 4% 能产生转基因植株, 结果与本实验类似。以海带孢子体为受体, 由于整体抗性大, 一些未转化的细胞不能被氯霉素杀死, 与转化细胞不容易分开而产生嵌合体。嵌合体会使外源基因的表达水平发生很大变化 (May, 1995), Peach 等 (1991) 报道 CAT 的表达在不同的转化体中可相差 136 倍。

植物基因工程中常用抗生素抗性基因作为选择标记 (Fuchs, 1993; Newman, 1990; Wang *et al*, 1992)。Kubler 等 (1994) 认为: 由于大多数大型海藻对抗生素有显著的、固有的抗性, 抗生素抗性不能用作选择标记。但武建秋等 (1995) 证实, 海带虽然对卡那霉素、新霉素、青霉素和链霉素等抗生素不敏感, 而对氯霉素却非常敏感。本文结果表明, CAT 基因可以作为海带基因工程的选择标记基因。

致谢 本实验在酶标仪使用方面得到中国水产科学研究院黄海水产研究所黄捷研究员的大力支持, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 武建秋, 王希华, 秦松等, 1995. 海带基因工程选择标记的研究. 海洋科学, 5: 42—45
- 秦松, 张健, 李文彬等, 1994. 用基因枪将 GUS 基因导入褐藻细胞中表达. 海洋与湖沼, 25(4): 353—356
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248—254
- Charest P J, Holbrook L A, Gabard J *et al*, 1988. *Agrobacterium* mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. Theor Appl Genet, 75(3): 438—445
- Daniell H, Vivekananda J, Nielsen B L *et al*, 1990. Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. Proc Natl Acad Sci USA, 87: 82—92
- Dong J Z, Yang M Z, Jia S R *et al*, 1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. Bio / Technology, 9(9): 858—863
- Fuchs R L, 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPT II) protein. Bio / Technology, 11: 1543—1547
- Gorman C M, Moffat L M, Howard B H, 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. Mol Cell Biol, 2: 1044—1051
- Hauptmann R M, Ozias-Akins P, Vasil V *et al*, 1987. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. Plant Cell Reports, 6: 265—270
- Klein T M, Wolf E D, Wu R *et al*, 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature, 327: 70—73

- Klopfenstein N B, Shi N Q, Kernan A *et al*, 1991. Transgenic *Populus hybrid* expresses a wound-inducible poraro proteinase inhibitor II-CAT gene fusion. *Can J For Res*, 21(9):1 321—1 328
- Kubler J E, Minocha S C, Mathieson A C *et al*, 1994. Transient expression of the GUS reporter gene in protoplasts of *Porphyra miniata* (Rhodophyta). *J Mar Biotech*, 1(4):165—169
- Lowe K, Bowen B, Hoerster G *et al*, 1995. Germline transformation of maize following manipulation of chimeric shoot meristems. *Bio / Technology*, 13(7):677—682
- May G D, 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio / Technology*, 13(5):486—492
- Newman S M, 1990. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*, 126:875—888
- Ozcan S M, Firek S, Draper J, 1993. Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation. *Bio / Technology*, 11(2):218—221
- Peach C, Velten J, 1991. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS report genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol*, 17(1):49—60
- Porsch P, Merkelbach S, Gehlen J *et al*, 1993. The nonradioactive chloramphenicol acetyltransferase-enzyme-linked immunosorbent assay test is suited for promoter activity studies in plant protoplasts. *Anal Biochem*, 211:113—116
- Sanford J C, Devit M J, Russell J A *et al*, 1991. An improved, helium-driven biolistic device. *Technique*, 3:3—16
- Vasil V, Clancy M, Ferl R J *et al*, 1989. Increased gene expression by the first intron of maize shrunken-1 locus in grass species. *Plant Physiol*, 91:1 575—1 579
- Wang Z Y, Takamizo T, Iglesias V A *et al*, 1992. Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Bio / Technology*, 10(6):691—696
- Werr W, Lowe H, 1986. Transient gene expression in a Gramineae cell line: a rapid procedure for studying plant promoters. *Mol Gen Genet*, 202:471—475

EXPRESSION OF CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE (CAT) GENE TRANSFERRED INTO *LAMINARIA JAPONICA*

WU Jian-qiu, QIN Song, DENG Tian,
GUO Xiao-lin, ZENG Cheng-kui(C. K. Tseng)

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

Abstract In order to study the expression of foreign genes in *Laminaria japonica* and to determine suitable markers, experiments were undertaken from December, 1994 to April, 1995. The materials used were young sporophytes of *L. japonica*. They were provided by Rongcheng Seeding Farm in December, 1994. The methods are as follows:

1. Sterilization and culture of materials. Dipping materials in autoclaved seawater (20—30min), then transfer to 1.5% KI (*W / V*, 20—30min), and at last autoclaved water (20—30min). Finally materials were recovered in autoclaved seawater for 20min. The culture condition was 10h / 14h (ratio of light period to darkness period), $50\mu\text{E} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$ and $(10.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$.
2. Introduction of CAT gene (*cat*), pCAT-control plasmid (SV40 promoter-*cat*-SV40 enhancer,

4 750bp), by a Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System. 5 sporophytes were used as one sample and were bombarded twice. The bombardment parameters were: vacuum 6.1×10^3 Pa, rupture disk 1 100 psi and the distance between samples and macrocarrier holder 6cm.

3. Transient expression of *cat*. One bombarded sample (5 sporophytes, bombarded with DNA), negative control (5 sporophytes, bombarded without DNA) and blank control (5 sporophytes, non-bombarded) were detected by using CAT ELISA Kit (Boehringer Mannheim GmbH Germany) after 48h culture in darkness. The amount of CAT was counted by comparing OD at 405nm with CAT standard sample.

4. Selection and stable expression of *cat*. After bombardment, sporophytes underwent a week of recovery period in non-selective medium and then selected in liquid medium containing 200mg / L chloramphenicol. The medium was renewed every 7 days. 75 transgenic sporophytes, 20 negative controls and blank controls were used. When all controls died the survived bombarded sporophytes were transferred to non-selective medium. CAT was detected by the same method as mentioned above.

Results are as follows:

1. *Cat* transient expression. The results are shown in Fig.1. The amount of CAT is 952.0 pg / mg protein. It is almost twice of that in control (negative control: 561.0 pg / mg protein; blank control: 549.8 pg / mg protein).

2. Selecting and stable expression of *cat*. All control died after 14 days of culture but 11 of 75 bombarded sporophytes were alive. High CAT content was detected in two of them, sample 4 was 848.7 pg / mg protein (Fig.2). It is about three times of that for the control samples (309.7 pg / mg protein), which indicates that *cat* had stably expressed in *L. japonica*. Another sample has a CAT amount of 345.6 pg / mg protein.

The results of this paper suggest that *cat* can be a suitable selectable marker for genetic transformation of *L. japonica*, and that SV40 promoter can work in kelp.

Key words CAT gene (*cat*) *Laminaria japonica* Selectable marker SV40 promoter
Genetic transformation

Subject classification number Q785