

小球藻对5种常用基因工程 抗生素的敏感性研究*

陈颖 李文彬 张利明 孙勇如

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

提要 于1996年以本实验室培养的椭圆小球藻为材料,就其对G418、潮霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素等5种抗生素的敏感性进行了研究。结果表明,小球藻对氯霉素、链霉素和卡那霉素不敏感,对潮霉素较为敏感,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (致死剂量,下同)即0.190 mmol/L (致死浓度,下同)的用量可抑制固体培养中小球藻的生长;对G418则高度敏感,30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即0.043 mmol/L 的G418即可完全抑制固体培养中小球藻的生长,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即0.022 mmol/L 的G418即可完全抑制液体培养中小球藻的生长。与其它4种抗生素相比,G418更适合作为小球藻基因工程的选择试剂。

关键词 小球藻 基因工程 选择试剂

学科分类号 Q789

目前高等植物遗传转化中选择性标记的研究已较为成熟(Waldron *et al.*, 1985; Hille *et al.*, 1986; Fuchs *et al.*, 1993),而藻类遗传转化选择标记的研究水平却参差不齐(Hasnain *et al.*, 1985; 武建秋等,1995, 1999; Stevens *et al.*, 1996)。椭圆小球藻是一种单细胞真核藻类,它体积小(3—12 μm),结构简单,再生迅速,大规模培养繁殖技术早已成熟,因此利用转基因小球藻作为高效的新型生物反应器来生产有用产品,具有很大的潜力。为了获得稳定的转基因藻株,必须利用选择标记基因对转化与未转化的细胞加以区分,以获得所需的含有目的基因的藻株。因此,研究小球藻对一些遗传转化中常用的选择试剂的敏感性,以确定适合小球藻的选择标记基因,是今后建立小球藻遗传转化系统、使外源目的基因在其中稳定表达的前提条件,对利用转基因小球藻作为高效生物反应器进行产品开发具有十分重要的意义。目前,此方面的工作国内外均未见报道。本文报告小球藻对5种常用的基因工程抗生素的敏感性的研究结果,以期今后小球藻遗传转化系统的进一步完善提供资料。

1 材料与amp;方法

1.1 小球藻来源及培养方法

椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)样品于1996年由北京大学张昫教授提供。液体

* 国家“九五”科技攻关资助项目,96-C02-04-05号。陈颖,女,出生于1972年8月,博士, E-mail:yingchen@bj.col.com.cn

收稿日期:1998-01-08, 收修改稿日期:1998-06-29

培养基成分为克氏培养液: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1.0g/L, K_2HPO_4 0.2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, KCl 0.12g/L, FeCl_3 10mg/L, 附加 0.1% 的酵母提取物和 0.2% 的葡萄糖。固体培养基成分同液体培养基, 并添加 1.8% 的琼脂, $\text{pH} = 6.0 - 8.0$ 。

固体培养: 温度为 25—28℃, 光照培养 16h, 光照条件为 3 000—4 000 lx, 黑暗培养 8h, 划线培养使藻成单藻落。

液体培养: 将在固体培养基中生长的直径约为 1mm 的单藻落接种于 20ml 液体培养基中悬浮培养, 转速为 80—100r/min, 温度及光照条件同固体培养方法。预培养 4—5d 后进行抗生素敏感性测定实验。

1.2 抗生素来源及配制

G418、卡那霉素购自 Life Technologies 公司, 潮霉素购自 Sigma 公司, 氯霉素、链霉素购自华美生物公司。抗生素母液的配制参照萨姆布鲁克等 (1992), 母液浓度均为 50mg/ml, 并用孔径为 0.22 μm 的细菌过滤器抽滤灭菌。

1.3 实验方法

1.3.1 固体培养中小球藻对抗生素敏感性的测定 配制不同抗生素浓度梯度 (表 1) 的固体培养基于直径为 9cm 的培养皿中, 每种处理设 3 次重复, 平行设置对照组。收集经液体培养第 5 天的小球藻, 调整密度至 1×10^8 cells/ml, 吸取 0.4ml 铺板于含不同抗生素的固体培养基中, 置于适宜条件下培养。

表 1 5种抗生素的实验浓度

Tab.1 Various concentrations of five antibiotics for test

抗生素	实验所设浓度梯度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	1	2	3	4	5
G418	0	10	20	25	30
潮霉素	0	25	50	75	100
氯霉素	0	50	100	150	200
链霉素	0	100	200	400	600
卡那霉素	0	100	200	400	600

1.3.2 液体培养中的小球藻对 G418 敏感性的测定 挑取单藻落于含有液体培养基的三角瓶中, 在适宜条件下培养 4—5d ($10^6 - 10^7$ cells/ml), 于 440nm 测定吸光度 OD 值, 然后将其分装到 100ml 三角瓶中, 每瓶加藻液 20ml, 再分别加入 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418, 3 次重复, 平行设置对照组, 观察培养, 并分别在生长第 1 周、第 2 周、第 3 周后测定 OD 值。

2 结果与分析

2.1 固体培养中小球藻对 5 种抗生素的敏感性

通过对 5 种抗生素的筛选后发现, 小球藻对 G418 最为敏感 (表 2)。在固体培养中, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418 即对小球藻的生长有明显的抑制作用, 培养 1 周后仅有少量藻落长出。在含有 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养基中, 1 周内没有生长出藻落, 仅在 2 周后, 有零星藻落出现, 说明 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418 尚不能完全抑制小球藻的生长。而在 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418 培养基中, 培养 3 周, 甚至 4—5 周以后, 均无一个藻落长出, 可见 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 0.043mmol/L 的 G418 已能够完

表2 小球藻对5种抗生素的敏感性测定结果

Tab.2 Test of sensitivity of *Chlorella ellipsoidea* to five antibiotics

抗生素	致死剂量($\mu\text{g}/\text{ml}$)	致死浓度(mmol/L)
G418	30	0.043
潮霉素	100	0.190
氯霉素	>200	>0.619
链霉素	>600	>0.412
卡那霉素	>600	>1.240

全抑制一定量的小球藻的生长,是小球藻生长的致死剂量(图版 I: 1)。

在被检测的 5 种抗生素中,卡那霉素对小球藻的生长抑制最不明显,当卡那霉素的用量高至 $600\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 $1.24\text{mmol}/\text{L}$ 时,经 2—3 周的培养,仍有大量成片的绿色藻群长出,其生长状态与对照组差别不大。小球藻对链霉素也不敏感,但较卡那霉素敏感。当选择压力增加至 $600\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 $0.412\text{mmol}/\text{L}$ 时,2—3 周后,大多数小球藻已不能生长,培养基中仅长出 2—3 个藻落。当潮霉素含量为 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,开始表现出对小球藻生长的抑制作用,只有当浓度增至 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 $0.190\text{mmol}/\text{L}$ 时,才表现出对小球藻的完全抑制作用,2—3 周后,未发现有藻落长出,继续培养至第 4、5 周,仍维持该状态(图版 I: 2)。而氯霉素含量达 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 $0.619\text{mmol}/\text{L}$ 时,固体培养中仍有小球藻成片长出,不能完全抑制小球藻的生长。因此,与其它 4 种抗生素相比,小球藻对 G418 最为敏感。

2.2 液体培养中小球藻对 G418 的敏感性

经测定,小球藻培养液在 440nm 时有最大吸收高峰,因此所有 OD 值均在 440nm 下测得。

未加抗生素之前,测得生长第 4 天的小球藻液体培养液密度为 3.9×10^7 cells/ml, OD 值为 1.770。分别加入浓度为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418,生长 1 周后观察,发现对照组及各处理溶液均为绿色,OD 值分别为 1.924、1.868、1.806、1.802 和 1.788。生长 2 周后,各处理间培养液颜色出现差异,对照组为深绿色(图版 I: 3),含 $5\mu\text{g}/\text{ml}$

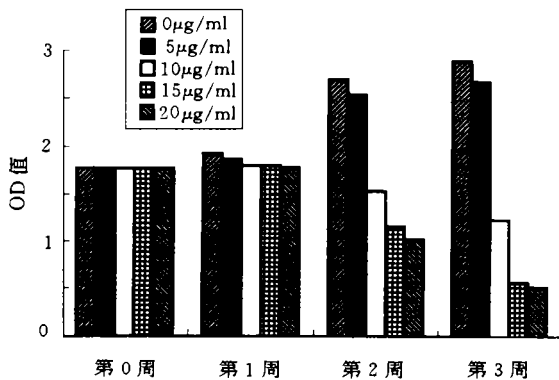


图1 液体培养中不同浓度G418对小球藻生长的影响

Fig.1 Effects of various G418 concentration on *C. ellipsoidea* growth in lipid culture

G418 的培养液颜色为浓绿色,其 OD 值为 2.552;而 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418 对小球藻的生长已表现出明显的抑制,培养液的颜色呈淡绿色,OD 值为 1.543,在显微镜下除能观察到一些正常的分裂细胞外,还有皱缩变形的死亡细胞。生长至第 3 周后,含 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的培养液完全变成黄白色(图版 I: 3),经测定,OD 值分别为 0.575 和 0.532,显微镜下观察发现小球藻细胞均呈皱缩状态,无处于分裂时期的细胞。可见在液体培养中,当培养基中 G418 的浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,即对小球藻的生长有了

一定的抑制作用,而 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 0.022 mmol/L 的 G418 则可完全抑制小球藻的生长(图 1)。

3 讨论与结语

3.1 在目前的高等植物遗传转化中,G418、潮霉素、氯霉素、链霉素和卡那霉素是较为常用的一些抗生素类选择试剂。其中卡那霉素是迄今转化报道中利用最多的一种,它已成功地应用于马铃薯、大豆、蕃茄、向日葵、棉花、烟草、拟南芥、菊花等几十种双子叶植物以及玉米等极少数单子叶植物中。但卡那霉素的使用浓度变化范围很大,即不同植物对其的敏感性不同。在转化向日葵的分生组织时,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的卡那霉素被认为是最佳浓度(傅荣昭等,1994),而 Vasil 等(1991)在转化小麦悬浮细胞时,卡那霉素的用量则高达 400—800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。本实验的结果表明:小球藻对卡那霉素极不敏感,当用量高达 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 1.24 mmol/L 时,仍未出现抑制小球藻生长的迹象。

3.2 CAT 基因编码的氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)使转基因植物获得氯霉素抗性。目前已在多种高等植物中实现了瞬间和稳定表达(Porsch,1993; Klopfenstein, 1991)。Thiel 等(1987)用电击法将穿梭质粒 pRL6 导入丝状蓝藻(*Anabaena* sp. Strain M131)中,用 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氯霉素筛选获得了阳性克隆。武建秋等(1995,1999)的研究表明,海带对氯霉素很敏感,CAT 基因可用作海带及其它大型褐藻基因工程的选择标记基因。虽然大型藻类对氯霉素很敏感,但作者通过实验发现,小球藻对氯霉素并不敏感,当用量达到 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 0.619 mmol/L 时,仍不能抑制多数小球藻的生长。

3.3 HPT 基因编码蛋白酶——潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase, HPT),使转基因植物获得潮霉素抗性。研究发现许多植物对潮霉素表现出很高的敏感性,其使用浓度大致为 20—200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (傅荣昭等,1994)。小球藻对潮霉素也较为敏感,当用量增至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 0.190 mmol/L 时,小球藻的生长可完全受抑制。

3.4 由 NPTII 基因编码的新霉素磷酸转移酶(Neomycin phosphotransferase-II, NPTII)所对应的另一种抗生素 G418,在多种植物中都表现出较低的本底,在筛选使用时浓度也相对较低。如在转化大豆胚性悬浮系时,G418 用量为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (傅荣昭等,1994),李文彬等(1995)在转化水稻原生质体时,G418 的用量为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。Hasnain 等(1985)转化莱茵衣藻时,固体培养基中 G418 的用量为 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$,而在液体培养基中 G418 的用量仅为 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,表现出对 G418 的高度敏感性。本实验的结果表明:与其它 4 种被检抗生素相比,小球藻对 G418 也表现出较高的敏感性。在固体培养中,30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 0.043 mmol/L 的 G418 即可完全抑制小球藻的生长,而在液体培养中,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 G418 对小球藻的生长表现出明显的抑制效应,当用量达 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即 0.022 mmol/L 时,即可完全抑制其在液体培养中的生长。因此,基于小球藻对 G418 的高度敏感性,可以认为:如果以 NPTII 基因作为小球藻基因工程的选择标记基因,则 G418 更适宜作为转基因小球藻遗传转化的抗生素抗性选择试剂。

在目前的藻类遗传转化研究中,莱茵衣藻研究的最为透彻,已成为染色体、叶绿体、线粒体三套基因组均能稳定转化的单细胞真核藻类,主要运用野生 DNA 与突变 DNA 同源重组,通过互补对转基因藻进行筛选(Rochaix *et al*, 1982; Kindle, 1990; Mayfield *et al*, 1991; Hall *et al*, 1993)。同时研究还表明,莱茵衣藻对 G418、卡那霉素及腐草霉素(Phleomycin)等抗生素较敏感(Hasnain *et al*, 1985; Stevens *et al*, 1996),它们的抗性基

因可作为转基因藻的选择标记基因。大型藻类遗传转化的研究特别是选择标记的研究也初见端倪。武建秋等(1995, 1999)研究发现,海带对链霉素、卡那霉素等不敏感,而对潮霉素、氯霉素则非常敏感,认为氯霉素可作为转基因海带的有效选择试剂, CAT 基因是海带基因工程的有效选择标记基因。小球藻的遗传转化虽也取得了一些进展(Jarivs *et al*, 1991; Chen *et al*, 1998),但有关小球藻基因工程选择标记的研究从未见报道,本文通过5种基因工程中常用抗生素对小球藻生长抑制的研究发现:小球藻对氯霉素、链霉素、卡那霉素不敏感,对潮霉素较为敏感,而对 G418 表现出高度敏感性。实验结果初步证明,如果以 NPTII 基因作为小球藻基因工程的选择标记基因,则 G418 更适宜作为转基因小球藻的抗生素抗性选择试剂。

参 考 文 献

- 李文彬,王革娇,孙勇如等,1995. PEG 介导原生质体转化获得水稻转基因植株. 植物学报, 37(5): 409—412
- 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
- 武建秋,秦 松,邓 田等,1999. 氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因在海带中的表达. 海洋与湖沼, 30(1): 28—33
- 傅荣昭,孙勇如,贾士荣等,1994. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科技出版社, 125—127
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著, 金冬雁, 黎孟枫译, 1992. 分子克隆试验指南. 北京: 科学出版社, 912—913
- Chen Ying, Li Wenbin, Bai Qinhuo *et al*, 1998. Study on transient expression of GUS gene in *Chlorella ellipsoidea* (Chlorophyta) by using biolistic particle delivery system. Chin J Oceanol Limnol, 16(supplement): 47—49
- Fuchs R L, Ream J E, Hammond B G *et al*, 1993. Safety assessment of the Neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. Bio/Technology, 11: 1 543—1 547
- Hall L M, Taylor K B, Jone D D, 1993. Expression of a foreign gene *Chlamydomonas reinhardtii*, Gene, 124(1): 85—91
- Hasnain S E, Manavathu E K, Leung W C, 1985. DNA-Meditated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* cells: use of Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase as a selectable marker. Mol Cell Bio, 5(12): 3 647—3 650
- Hille J, Verheggen F, Roelvink P *et al*, 1986. Bleomycin resistance: a new dominant selectable marker for plant cell transformation. Plant Molecular Biol, 7: 171—176
- Jarivs E E, Brown L M, 1991. Transient expression of firefly luciferase in protoplast of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. Curr Genet, 19: 317—321
- Kindle K L, 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87: 1 228—1 232
- Klopfenstein N B, 1991. Transgenic Populus hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor II-CAT gene fusion. Can J For Res, 21(9): 1 321—1 328
- Mayfield S P, Kindle K L, 1991. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. Proc Natl Acad Sci U S A, 87: 2 087—2 091
- Porsch P, 1993. The nonradioactive chloramphenicol acetyltransferase enzyme-linked immunosorbent assay test is suited for promoter activity studies in plant protoplasts. Anal Biochem, 211: 113—116
- Rochaix J D, Dillewijn J Van, 1982. Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. Nature, 296: 70—72
- Stevens D R, Rochaix J D, Purton S, 1996. Bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. Gen Genet, 251: 23—30
- Thiel T, Poo H, 1987. Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. J Bacterial, 171:

5 743—5 746

Vasil V, Brow S M, Fromm M E *et al*, 1991. Stable transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology*, 9:743—747

Waldron C, Murphy E B, Roberts J L *et al*, 1985. Resistance to hygromycin B: a new marker for plant transformation studies. *Plant Mol Biol*, 5:103—108

STUDY ON SENSITIVITIES OF *CHLORELLA ELLIPSOIDEA* TO 5 ANTIBIOTICS IN GENETIC ENGINEERING

CHEN Ying, LI Wen-bin, Zhang Li-ming, SUN Yong-ru

(*Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101*)

Abstract Much progress has been made for recent years in selection markers of high plants. However, the situation varies for different algae. Researches on *Chlamdomonas reinhardtii* developed rapidly and there is also a good start in macroalgae, such as *Laminaria japonica*, but little progress has been made for *Chlorella*. Lack of selection marker made the use of gene transferred *Chlorella* limited. This paper reports a study on sensitivities of *Chlorella ellipsoidea* to 5 antibiotics in order to identify suitable selection marker of *Chlorella* genetic engineering.

Chlorella ellipsoidea cells after 4—5 days' culture were used as material and antibiotics — Hygromycin (Hm), Chloromycetin (Cm), and Streptomycin (Str) and Kanamycin (Km); different concentrations were used for test in solid culture and Geneticin (G418) was used in solid and liquid culture. After 1—5 weeks' culture, the results show that *C. ellipsoidea* is not sensitive to Cm, Str and Km; 600 μg / ml or 1.240mmol / L Km, 600 μg / ml or 0.412mmol / L Str and 200 μg / ml or 0.169mmol / L Cm cannot inhibit the growth of *C. ellipsoidea*. However, it is relatively sensitive to Hm; 100 μg / ml or 0.190mmol / L Hm can completely stop the growth of *C. ellipsoidea* on solid media. Further, *C. ellipsoidea* was highly sensitive to G418, since 30 μg / ml or 0.043mmol / L and 15 μg / ml or 0.022mmol / L completely inhibited the growth of *C. ellipsoidea* in solid and liquid cultures, respectively. It suggests that G418 be the most suitable selection reagent if using NPTII gene as selection marker for *C. ellipsoidea* genetic engineering.

Key words *Chlorella ellipsoidea* Genetic engineering Selection marker

Subject classification number Q789