

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 基因工程选择试剂的筛选*

滕长英 梁成伟 秦 松¹⁾ 曾呈奎²⁾

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 烟台师范学院 烟台 264025)

¹⁾(中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 中国科学院研究生院 北京 100039)

²⁾(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用细胞计数法,研究了重要经济微藻——雨生红球藻对 10 种基因工程常用选择试剂的敏感性。结果表明,雨生红球藻对除草剂草 膦和抗生素 Zeocin 比较敏感,50 μ g/ml 的草 膦和 25 μ g/ml 的 Zeocin 可明显地抑制雨生红球藻生长,尤其是 50 μ g/ml 的草 膦能导致细胞两周内全部死亡;高浓度的卡那霉素和硫酸链霉素也可抑制雨生红球藻的生长;雨生红球藻对包括氯霉素和 G418 在内的其他 6 种试剂不敏感,即使处理浓度高达 1000 μ g/ml。本文结果提示草 膦可能是雨生红球藻基因工程适宜的选择试剂,其相应的抗性基因 *bar* 可能成为雨生红球藻遗传转化的选择标记基因。

关键词 雨生红球藻,选择标记基因,选择试剂,草 膦

中图分类号 Q789

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是一种单细胞淡水绿藻,在逆境胁迫下可以大量合成虾青素等类胡萝卜素(Boussiba *et al.*, 1991)。虾青素具有比其他类胡萝卜素更强的抗氧化特性,除了可以用作天然食用色素和水产养殖中的重要饵料添加剂外,还具有调节人体免疫系统功能和抗癌的应用潜力(Lorenz *et al.*, 2000)。雨生红球藻是至今所知虾青素含量最高的生物(可达干重的 4%)(Boussiba *et al.*, 1999),是目前最主要的天然虾青素来源。但虾青素的积累总是发生在不利于细胞增殖的逆境条件下(Boussiba *et al.*, 1991),这一直是限制虾青素产量的关键因素。近年来,生物学家们从生理生化等各方面研究虾青素的代谢机制以试图解决这一问题(张宝玉等,2003)。尽管随着基因工程技术的发展,人类已通过遗传改造的途径在非常多的生物体中实现了目标产物的大量表达,但至今还没有人利用基因工程技术手段从分子水平上改造虾青素的代谢调控以提高虾

青素的积累量。这与雨生红球藻的遗传转化体系尚未建立有一定关系。

利用报告基因 *lacZ* 的瞬间表达检测手段,作者已经建立了基因枪介导的雨生红球藻遗传转化模式,为雨生红球藻遗传转化体系的建立奠定了坚实的基础,也证明了雨生红球藻遗传转化的可行性(Teng *et al.*, 2003)。遗传转化体系的建立还必需选择标记基因用以区分转化和未转化的细胞,以方便转化细胞的大规模筛选。目前还未见有关雨生红球藻基因工程选择标记的研究报道。作者研究了雨生红球藻对目前高等植物和藻类常用选择试剂的敏感性,以期筛选到雨生红球藻适合的基因工程选择试剂和相应的选择标记基因。

1 材料与方法

1.1 雨生红球藻的来源及培养方法

本实验所用材料由中国科学院海洋研究所刘建国研究员提供,采用 MCM 培养基(Borowitzka

* 中国科学院知识创新重要方向性项目, KZCX3-SW-215 号。滕长英, 博士, 讲师, E-mail: lzhang@sina.com

1) 通讯作者, 秦 松, 研究员, 博士生导师, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-12-26, 收修改稿日期: 2004-10-26

et al., 1991), 于 20℃ 以 12h/12h 的光暗周期、20μE/(m²·s) 的光照强度进行静止培养。所用实验材料均处于对数生长期, 其中包括大部分的游动细胞和少量的不动细胞。

1.2 试剂

草丁膦为中国科学院遗传研究所李文彬研究员惠赠, 青霉素 G、氯霉素、卡那霉素、G418 购自美国 Amresco 公司, 潮霉素购自美国 Sigma 公司, Zeocin 购于荷兰 Invitrogen 公司, 洁霉素购自青岛黄海制药厂, 硫酸链霉素为大连制药厂产品, 氨基青霉素为山东鲁抗医药集团公司产品。

1.3 细胞计数方法

取少量细胞培养液, 用培养基稀释至约 10 个细胞/ml 的细胞密度, 然后取 20μl 稀释液于 400× 的显微镜下对其中的所有叶绿素分布占 30% 以上的细胞进行计数。

1.4 初步筛选

取 5ml 细胞培养液置于 15ml 试管中, 按表 1 的浓度加入不同的选择试剂, 按 1.1 的培养方法对细胞进行培养并观察生长情况。

表 1 所用选择试剂的浓度设定

Tab. 1 Concentration of selective reagents applied

选择试剂	实验所设浓度梯度(μg/ml)				
	1	2	3	4	5
Zeocin	0	25	50	100	200
潮霉素	0	100	200	500	1000
氯霉素	0	100	200	500	1000
氨基青霉素	0	100	200	500	1000
G418	0	100	200	500	1000
洁霉素	0	100	200	500	1000
卡那霉素	0	100	200	500	1000
硫酸链霉素	0	100	200	500	1000
青霉素 G	0	200	500	1000	2000

1.5 雨生红球藻对草丁膦的敏感性实验

取 5ml 细胞培养液, 按 0、25、50、100、200μg/ml 的浓度梯度加入草丁膦, 每个浓度设三个平行组。按 1.1 的培养方法进行培养, 每隔 1—2 天进行细胞计数, 每个样品计数三次, 取平均值。静止状态下取上层培养液中的细胞数目计为游动细胞数, 将底层细胞摇起混匀后所计的细胞数目为总细

胞数。

2 结果与分析

2.1 抗生素的初步筛选结果

雨生红球藻对以上 10 种常用基因工程筛选试剂的敏感性实验结果显示, 该藻对草丁膦和 Zeocin 最敏感。Zeocin 和草丁膦在处理 22h 后已可见部分游动细胞转变成不动细胞沉于试管底部, 处理浓度越高转变越多, 其中 Zeocin 100μg/ml、200μg/ml 以及草丁膦 200μg/ml、500μg/ml 几个处理浓度下已基本见不到游动细胞。同时, 处理 1—3 天时草丁膦各处理组培养液呈现绿色, 推测是叶绿素释放的结果。随培养时间的延长, 草丁膦各处理组的总细胞数在逐渐减少, 两周内各处理组细胞全部死亡。Zeocin 各处理组在处理 22h 后至一周内游动细胞数目逐渐减少, 直至最后几乎见不到游动细胞, 100μg/ml、200μg/ml 的处理组在显微镜下可见部分细胞皱缩、脱色以至死亡。但培养一周以后, 在显微镜下发现有鲜绿色的游动细胞重新出现, 且随着培养时间的增加游动细胞逐渐增多, 12 天之后肉眼可见悬浮于培养基中的大量游动细胞。卡那霉素 200—1000μg/ml, 处理两天后的游动细胞数目有不同程度地减少, 500μg/ml 的处理组一周后有极少数细胞死亡, 而 1000μg/ml 处理组在显微镜下可见有较多死亡细胞残片, 但两周后仍有大约一半的绿色细胞存活。这是继草丁膦和 Zeocin 后, 雨生红球藻较为敏感的抗生素。硫酸链霉素 500μg/ml、1000μg/ml 处理组的细胞处理两天后游动细胞数量有所下降, 两周后两处理组在显微镜下皆见不到游动细胞, 但两组始终都没有细胞死亡的现象, 1000μg/ml 处理组的细胞颜色较正常细胞淡而暗。100—200μg/ml 硫酸链霉素处理细胞的生长状况与对照组基本无差别。潮霉素、氯霉素、氨基青霉素、洁霉素、青霉素 G、G418 所有浓度处理组的细胞在处理 20 天后仍与对照细胞表现完全相同, 说明雨生红球藻对上述 6 种抗生素皆不敏感。

2.2 雨生红球藻对草丁膦的敏感性

用细胞计数法详细跟踪记录了草丁膦对红球藻的毒性效应。处理一天后, 草丁膦各处理组的游动细胞数目即迅速下降(图 1a), 200μg/ml、100μg/ml、50μg/ml 三个浓度处理组分别在第 2 天、第 6 天、第 10 天游动细胞完全消失。25μg/ml 处理组的游动细胞数量在前 8 天也在明显减少,

但8天后又开始有所上升。上述细胞数目变化一方面是由游动细胞向不动细胞的转变引起的,另一方面是由细胞直接死亡引起的。图1b详细记录了在不同草丁膦处理浓度下红球藻的死亡情况。在显微镜下可以很明显地看到皱缩、失掉叶

绿素的死亡或接近死亡的细胞。由图1b可见,在200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下处理3天细胞会全部死亡,在较低的浓度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下也分别在第8天和第10天全部死亡,但25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的草丁膦浓度对红球藻的总细胞数目影响不大。

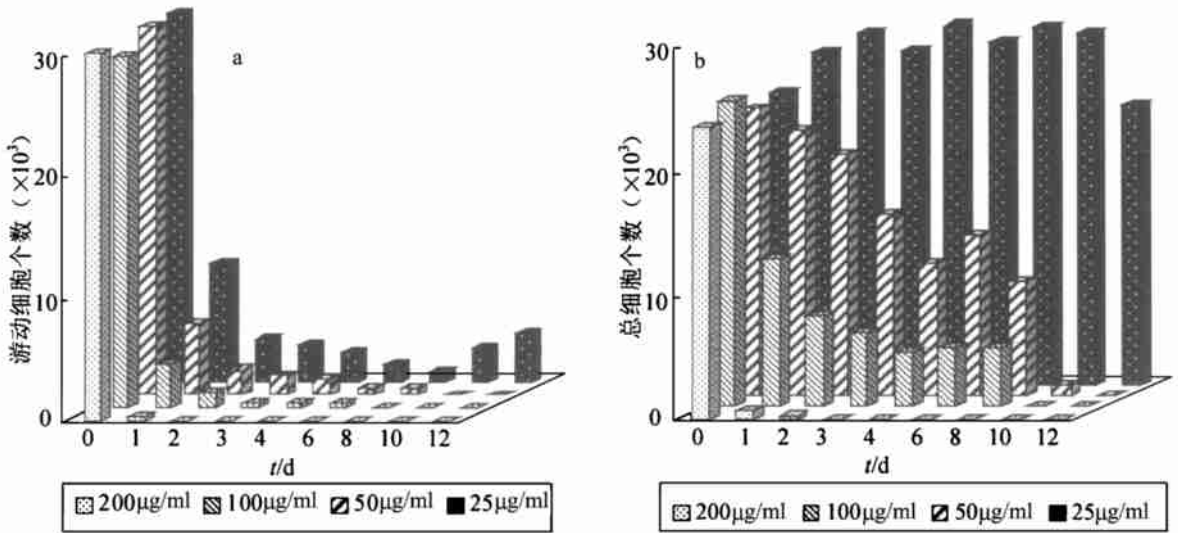


图1 雨生红球藻对不同浓度草丁膦的敏感性反应

Fig.1 Sensitivity of *H. pluvialis* to basta in different concentration

a. 游动细胞; b. 总细胞

3 讨论

LD_{50} 表示一定时间内生物体死亡一半所需的试剂剂量,是一种评价生物体对抗生素等试剂敏感性的标准(张毓琪等,1993),为敏感性选择试剂的筛选提供了量化依据,已经用于大型藻类的选择试剂筛选中(吴韵等,2001)。单细胞藻具有非常快的增殖能力,难以定义死亡率,作者认为不适宜用 LD_{50} 评价筛选试剂的敏感性。

卡那霉素、氨基青霉素、潮霉素、G418、硫酸链霉素等是目前陆生高等植物基因工程常用的选择试剂,一般高等植物都表现出比较高的敏感性,但藻类对这些选择试剂的敏感性却比较低(于文功等,2002;耿德贵等,2001)。有两种可能机制会导致生物体对抗生素等试剂的不敏感性:一是生物体细胞壁等的屏障作用使得外界的选择试剂难以进入细胞内部;二是生物体本身具有解除毒性的代谢机制。藻类的耐受机制有待深入研究。

氯霉素通过干扰细胞核糖体的蛋白质合成来抑制细胞生长,氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因编码的CAT使其乙酰化而导致失活。氯霉素及其

抗性基因 *cat* 不仅在高等植物中应用广泛,在藻类中如裙带菜(于道展等,2003)、条斑紫菜(于文功等,2002)以及单细胞绿藻盐藻(耿德贵等,2001)等也都对氯霉素表现出了很高的敏感性,*cat*已被用作海带的基因工程选择标记(武建秋等,1999)。本文的实验结果表明红球藻对氯霉素不敏感,即使在1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下对红球藻的生长也没有任何影响,这种反应与小球藻相似(陈颖等,1999)。

卡那霉素和G418同属氨基糖苷类抗生素,可干扰核糖体中蛋白质的合成导致细胞死亡,其对应的抗性基因 *heo* 通过磷酸化作用使其丧失毒性。已证明莱茵衣藻对卡那霉素和G418都比较敏感(Hasnain *et al.*, 1985),而小球藻则对G418比较敏感(陈颖等,1999)。本文结果显示雨生红球藻只对较高剂量的卡那霉素有所反应,而对浓度高达1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的G418没有任何毒性反应。

Zeocin是腐草霉素家族中的一员,是一种 Cu^{2+} 螯合糖蛋白。这一类抗生素通过对细胞内DNA的切割损伤导致细胞死亡。从链球菌 *Strep-*

toalloteichus hindustanus 中分离出的 *ble* 基因所编码的蛋白对该抗生素家族成员具有很强的亲和力, 结合后可抑制它们的 DNA 切割活性。研究结果显示, 腐草霉素类抗生素及其抗性基因可用作单细胞绿藻莱茵衣藻(Stevens *et al.*, 1996)、多细胞绿藻团藻(Hallmann *et al.*, 1998)、硅藻三角褐指藻(Apt *et al.*, 1996) 的基因工程选择标记。于文功等(2002) 的研究证明, Zeocin 对大型红藻条斑紫菜具有很好的致死效应, *ble* 有望成为其理想的选择标记。本实验结果表明, 红球藻对 Zeocin 也具有强烈的敏感性, 即使在 25 μ g/ml 的较低浓度下也会使游动细胞全部转变为不动细胞。但随着处理时间的延长, 这种毒害作用逐渐消失, 可能是 Zeocin 在光照下被逐渐分解所致, 在今后的工作中可以考虑用腐草霉素代替以避免光分解。

除草剂草丁膦是一种谷氨酰氨合成酶(GS) 的竞争性抑制剂, GS 是植物细胞中用于解除细胞代谢过程中产生的 NH_4^+ 毒害的惟一途径, 当 GS 被草丁膦竞争性抑制时, 细胞中的 NH_4^+ 积累, 导致细胞死亡。 *bar* 基因编码的乙酰辅酶 A 转移酶可以催化乙酰辅酶 A 与草丁膦的游离氨基结合, 使其失活, 从而解除对 GS 的竞争性抑制作用。 *bar* 作为选择标记基因已被成功地应用于多种高等植物中, 大型海藻海带(吴韵等, 2001)、裙带菜(于道展等, 2003) 也已表现出对草丁膦的敏感性。从本文的筛选结果可见, 雨生红球藻对草丁膦比较敏感, 提示草丁膦是雨生红球藻基因工程适宜的选择试剂, *bar* 基因有望成为雨生红球藻基因工程操作中有效的选择标记基因。

参 考 文 献

于文功, 戴继勋, 路新枝等, 2002. 条斑紫菜叶状体细胞的抗生素敏感性研究. 青岛海洋大学学报, 32(2): 245—250 [Yu W G, Dai J X, Lu X Z *et al.*, 2002. Study on sensitivities of *Porphyra yezoensis* Thallus somatic cell to antibiotics. Journal of Ocean University of Qingdao, 32(2): 245—250]

于道展, 杨玲玲, 姜 鹏等, 2003. 裙带菜基因工程选择标记的研究. 高技术通讯, 13(6): 74—77 [Yu D Z, Yang L L, Jiang P *et al.*, 2003. Study on selectable markers in genetic engineering of *Undaria pinnatifida*. High Technology Letters, 13(6): 74—77]

吴 韵, 邹立红, 姜 鹏等, 2001. 孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性. 海洋与湖沼, 32(1): 19—22 [Wu Y, Zou L

H, Jiang P *et al.*, 2001. Sensitivity of parthenogenetic sporophytes of *Laminaria japonica* phaeophyta to basta. Oceanologia et Limnologia Sinica, 32(1): 19—22]

张毓琪, 陈叙龙, 1993. 环境生物毒理学. 天津: 天津大学出版社, 257—258

张宝玉, 李夜光, 李中奎等, 2003. 光照、温度和 pH 对雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 光合作用和生长速率的影响. 海洋与湖沼, 34(5): 558—565 [ZHANG Bao-Yu, LI Ye-Guang, LI Zhong-Ku *et al.*, 2003. Effects of Temperature, Light intensity and pH on Photosynthesis and growth rate of *Haematococcus pluvialis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 34(5): 558—565]

陈 颖, 李文彬, 张利明等, 1999. 小球藻对 5 种常用基因工程抗生素的敏感性研究. 海洋与湖沼, 30(5): 500—504 [Chen Y, Li W B, Zhang L M *et al.*, 1999. Study on sensitivities of *Chlorella ellipsoidea* to 5 antibiotics in genetic engineering. Oceanologia et Limnologia Sinica, 30(5): 500—504]

耿德贵, 王义琴, 李文彬等, 2001. 杜氏盐藻基因工程选择标记的研究. 生物技术, 11(5): 1—3 [Geng D G, Wang Y Q, Li W B *et al.*, 2001. Study on selective marker of *Dunaliella salina* genetic engineering. Biotechnology, 11(5): 1—3]

Apt K E, Kroth-Pancic P G, Grossman A R, 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Mol Gen Genet, 252: 572—579

Borowitzka A B, Huisman J, Osborn M, 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. J Applied Phycol, 3: 295—304

Boussiba S, Bing W, Zarka A *et al.*, 1999. Changes in pigment profiles of during exposure to environmental stresses. Biotechnol Lett, 21: 601—604

Boussiba S, Vonshak A, 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Cell Physiol, 32: 1077—1082

Hallmann A, Rappel A, 1998. Genetic engineering of the multicellular green alga *Volvox*: a modified and multiplied bacterial antibiotic resistance gene as a dominant selectable marker. The Plant Journal, 17(1): 99—109

Hasnain S E, Manavathu E K, Leung W C, 1985. DNA-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* cell: use of aminoglycoside 3-phosphotransferase as a selectable marker. Mol Cell Bio, 5(12): 3647—3650

Lorenz T R, Cysewski G R, 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Tibtchnology, 18: 160—167

Stevens D R, Rochaix J D, Purton S, 1996. Bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable

marker in *Chlamydomonas*. Mol Gen Genet, 251: 23—30
 Teng C Y, Qin S, Liu J G *et al*, 2003. Transient expression of

lacZ in bombarded unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. J Applied Phycol, 14: 497—500

STUDY ON SENSITIVITIES OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* TO TEN SELECTIVE REAGENTS FOR GENETIC ENGINEERING

TENG Chang-Ying, LIANG Cheng-Wei, QIN Song, ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Yantai Normal College, Yantai, 264025)

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;

Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

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

Abstract *Haematococcus* has high economic value for the mass production of astaxanthin in unfavorable environments. The high mass production of astaxanthin by *Haematococcus* remains problematic since the inhibition of cell division occurs while astaxanthin is produced. Although it has proven to be true that through genetic engineering, target products is abundant in many species. Study on increasing the production of astaxanthin in *Haematococcus* through genetic modification is so far not available, because the genetic transformation system of *Haematococcus* has not been built up which it is necessary to develop. In order to choose a selectable marker gene used for steady genetic transformation, sensitivities of *H. pluvialis* to some common selective reagents for genetic engineering were studied in cell count method.

In this paper, ten selective reagents were studied, including ampicillin (Amp), kanamycin (Kan), G418, streptomycin (Str), chloramphenicol (Cm), hygromycin (Hyg), penicillin G, teicoplanin, basta and zeocin. Results showed that *Haematococcus* is highly sensitive to basta and zeocin. 50 µg/ml of basta and 25 µg/ml of zeocin significantly inhibited cell growth. Dead cells could be found under microscope several days after being treated by the two reagents. All the cells died after being treated by basta two weeks later, while the number of cells treated by zeocin began to rise up about one weeks later, which might be ascribed to the decomposition of zeocin in light. High concentrations of kanamycin ($\geq 200 \mu\text{g/ml}$) could also result in the decline of the cells number. It was the more sensitive reagents in this study but for basta and zeocin. However, twenty days after treated by 1000 µg/ml kanamycin, half of *H. pluvialis* cells still survived. High concentrations of streptomycin ($\geq 500 \mu\text{g/ml}$) could inhibit cell growth too, but it (at even 1000 µg/ml) could not kill the cells completely. No sensitivity to the other six reagents has been shown after 20 days of treatment, including Hyg (1000 µg/ml), Cm (1000 µg/ml), Amp (1000 µg/ml), teicoplanin (1000 µg/ml), penicillin G (2000 µg/ml) and G418 (1000 µg/ml). It is suggested that basta could be suitable agent and its *bar* gene could be a promising selectable marker for genetic engineering of *H. pluvialis*.

Details of the effect of basta in different concentration (200 µg/ml, 100 µg/ml 50 µg/ml and 25 µg/ml) on *H. pluvialis* were also studied. Results showed that all the motile cells in concentration of 200 µg/ml, 100 µg/ml and 50 µg/ml disappeared 2, 6 and 10 days later, respectively. However, non-motile cells died 3, 8 and 10 days later respectively. The basta in 50 µg/ml is recommended to apply in genetic engineering.

Considering the high toxicity of basta and zeocin, it is suggested that other sensitive selective reagents should be applied in genetic engineering.

Key words *Haematococcus pluvialis*, Selectable marker, Selective reagent, Basta