

孤雌生殖海带对氯霉素和潮霉素的敏感性研究*

李新萍 秦松 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于1997年1—4月,以本所培养的孤雌生殖海带为材料,运用统计学方法研究其对氯霉素、潮霉素的敏感性,以期得出氯霉素、潮霉素对不同长度孤雌生殖海带的半致死剂量。结果表明,孤雌生殖海带长度(全长)在0.5—1.5cm时,氯霉素的半致死剂量与海带的长度相关,而潮霉素的半致死剂量与长度不相关。孤雌生殖海带对潮霉素比对氯霉素更敏感,提示潮霉素磷酸转移酶基因有可能成为海带基因工程的另一个选择标记。

关键词 海带 氯霉素 潮霉素 选择标记

学科分类号 Q789

在植物基因工程研究中,为了筛选和鉴定转基因的组织和细胞,必须共转化选择标记基因,尤其是阳性选择标记基因,从而使转基因细胞产生对选择压力的抗性,淘汰未转化细胞。武建秋等(1995)发现海带幼孢子体对氯霉素最敏感, Qin等(1997)初步证明了CAT(氯霉素乙酰转移酶)基因可以作为海带基因工程的选择标记基因。本文报告不同长度孤雌生殖海带对氯霉素和潮霉素的敏感性实验结果,以期确定适用于孤雌生殖海带的筛选时机、剂量和时间,为优化筛选方法、继续寻找更敏感的抗生素、确定海带基因工程的选择压力提供资料。

1 材料与方法

1.1 孤雌生殖海带及培养方法

孤雌生殖海带(*Laminaria japonica*)于1996年8月由中国科学院实验海洋生物学开放研究实验室按方宗熙等(1978)培养而得。孤雌孢子体全长(从柄基部至叶片梢尖)为0.5—1.5cm,培养用海水经过滤、煮沸,冷却后加入营养盐,使N和P元素的终浓度为N: 0.43mmol/L, P: 0.019mmol/L,光暗周期为10h/14h,光强为 $50\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 $(10 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。每7天更换一次培养基。

1.2 孤雌生殖海带对氯霉素、潮霉素的敏感性实验

氯霉素母液(100mg/ml)用无水乙醇配制,潮霉素母液(50mg/ml)用重蒸水配制,用 $0.2\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。

* 国家攀登计划B资助项目, PD B-6-4-1号;国家自然科学基金资助项目,39400076号。李新萍,女,出生于1974年4月,硕士, E-mail: sqjin@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 1998-03-26, 收修改稿日期: 1998-08-18

在对氯霉素的敏感性实验中,将海带分为: (4.9 ± 0.6) mm、 (6.5 ± 0.5) mm 和 (8.4 ± 0.9) mm 三个实验组,每个实验组均设置 8 种氯霉素剂量,分别为 0.0、50.0、65.0、84.5、110.0、143.0、185.5 和 241.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在对潮霉素的敏感性实验中,将海带分为: (6.3 ± 1.0) mm、 (8.3 ± 1.0) mm 和 (12.3 ± 2.3) mm 三个实验组,每个实验组均设置 7 种潮霉素剂量,分别为 0.0、38.5、50.0、65.5、84.5、110.0 和 143.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。取直径为 3.0cm 的无菌培养皿,加入营养海水 5ml 和所需的抗生素母液,每个平皿放入 10 株所需长度的孤雌生殖海带,每天观察其死亡情况。

1.3 半致死剂量 (LD_{50}) 及 95% 可信限的计算

利用寇氏法 (Karber 氏法) 计算抗生素对海带的半致死剂量及 95% 可信限 (张毓琪等, 1993), 计算公式为: $\lg LD_{50} = X_m - i (\Sigma p - 0.5)$, 式中, X_m 为最大剂量的对数值, i 为相邻剂量比值的对数, Σp 为各实验组死亡率的总和 (以小数表示)。

95% 可信限的计算公式为: $\lg (LD_{50} \text{ 的 } 95\% \text{ 可信限}) = \lg LD_{50} \pm 1.96 S_{\lg LD_{50}}$, 式中, $S_{\lg LD_{50}} = i \sqrt{\frac{pq}{n}}$, p 为一个组的死亡率, q 为一个组的存活率, i 为相邻剂量比值的对数, n 为各组海带数。

1.4 不同长度孤雌生殖海带 LD_{50} 差异的显著性检验

按两个一组分别检验相同处理时间、不同长度孤雌生殖海带的 LD_{50} 95% 可信限重叠的情况。若无重叠, 表明差异显著; 若有重叠, 仍然可能有所差异。可用 $f_{i,j}$ 及 $K_{i,j}$ 值二者大小的比较检验差异是否明显, 按公式¹⁾:

$$f_{i,j} = \text{antilog} \sqrt{(\lg f_i)^2 + (\lg f_j)^2}$$

式中, $f_{i,j}$ 为 LD_{50} 的 95% 可信限因子 (可信限的两端分别为 $LD_{50} \times f$ 及 LD_{50} / f), $K_{i,j}$ = 较大的 LD_{50} 值 / 较小的 LD_{50} 值。如 $K_{i,j} > f_{i,j}$, 则两个 LD_{50} 有明显的差异。

以 LD_{50} 为横坐标, 处理时间为纵坐标, 在半对数坐标纸上绘制敏感性曲线, 也可以更直观地反映不同长度实验组间差异是否显著¹⁾。

2 实验结果

2.1 孤雌生殖海带对氯霉素的敏感性实验

实验结果见表 1。在含有氯霉素的营养海水中, 孤雌生殖海带的死亡首先是颜色变淡、变白, 再是藻体上出现小块白斑, 然后扩散至整个藻体, 最后藻体变为淡绿色。结果表明, 不同长度的孤雌生殖海带, 经相同处理时间得到的 LD_{50} 存在差异。在全长为 4.9—8.4mm 时, 氯霉素对孤雌生殖海带的 LD_{50} 随藻体长度的增加而降低。

以 LD_{50} 为横坐标, 以处理时间为纵坐标, 在半对数坐标纸上绘制敏感性曲线如图 1 所示。由图 1 可知, 不同长度的三组海带 LD_{50} 有明显差异。

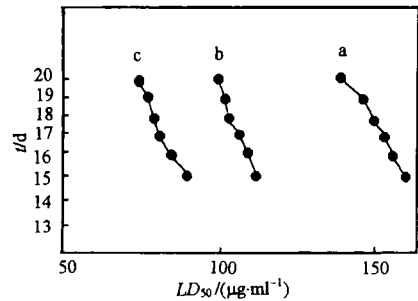


图1 孤雌生殖海带对氯霉素的敏感性曲线

Fig.1 The chloramphenicol sensitivity of parthenogenetic *Laminaria japonica*
a, b, c 三组海带全长同表1; 表2同

1) 宋仁元, 张亚杰等译, 1980. 水和废水标准检验法. 北京: 中国建筑工业出版社, 590—593

表1 孤雌生殖海带对氯霉素的敏感性实验结果

Tab.1 The test of chloramphenicol sensitivity of sporophytes of parthenogenetic *Laminaria japonica*

时间 (d)	组 别	不同剂量氯霉素(μg/ml)中海带的死亡率(%)								LD ₅₀ (μg/ml)	95%可信限 (μg/ml)
		0	50.5	65.0	84.5	110.0	143.0	185.5	241.2		
15	a	0	12	5	25	30	40	30	65	158.9	132.7—190.3
	b	0	30	25	30	40	70	70	80	140.6	91.1—134.3
	c	0	25	60	60	45	70	83	85	89.0	73.4—107.8
16	a	0	12	5	25	30	45	30	70	154.7	129.3—185.1
	b	0	30	25	30	40	70	75	85	107.7	89.0—130.3
	c	0	35	60	65	55	70	85	85	82.9	68.3—100.5
17	a	0	15	8	25	30	45	30	70	152.3	127.1—182.6
	b	0	32	28	33	40	70	75	85	105.5	87.0—127.9
	c	0	40	65	65	55	75	85	90	78.6	65.1—94.9
18	a	0	15	10	25	30	45	35	75	147.6	122.8—177.5
	b	0	32	35	35	40	70	80	85	101.7	83.8—123.4
	c	0	40	65	65	55	75	88	90	78.0	64.7—94.1
19	a	0	15	10	25	30	45	35	80	145.7	121.5—174.8
	b	0	32	35	35	40	70	80	90	100.4	83.6—120.6
	c	0	40	65	65	55	75	90	95	76.6	63.8—92.0
20	a	0	20	15	25	35	45	40	85	136.4	113.2—164.4
	b	0	32	35	35	40	70	80	95	98.5	81.6—118.8
	c	0	40	70	70	55	80	95	97	72.3	60.8—86.0

海带全长分别为a: (4.9±0.6)mm, b: (6.5±0.5)mm, c: (8.4±0.9)mm

再分别计算相同处理时间3组孤雌生殖海带之间的 $f_{i,j}$ 及 $K_{i,j}$,结果见表2。由表2可知,除个别 $K_{b,c} < f_{b,c}$ 外, $K_{i,j}$ 普遍大于 $f_{i,j}$,说明氯霉素对长度不同的三组孤雌生殖海带的 LD_{50} 有明显差异,因此孤雌生殖海带对氯霉素的敏感性随藻体长度不同而有所差异。

表2 氯霉素对不同长度孤雌生殖海带的LD₅₀差异显著性检验结果

Tab.2 The test of chloramphenicol LD₅₀ difference between different length sporophytes of parthenogenetic *Laminaria japonica*

时间(d)	f_a	f_b	f_c	$f_{a,b}$	$K_{a,b}$	$f_{a,c}$	$K_{a,c}$	$f_{b,c}$	$K_{b,c}$
15	1.20	1.21	1.20	1.30	1.44	1.29	1.79	1.30	1.24
16	1.20	1.21	1.21	1.30	1.44	1.30	1.86	1.31	1.30
17	1.20	1.21	1.21	1.30	1.44	1.30	1.94	1.31	1.34
18	1.20	1.21	1.21	1.30	1.45	1.30	1.89	1.31	1.30
19	1.20	1.20	1.20	1.29	1.45	1.29	1.90	1.29	1.31
20	1.20	1.21	1.19	1.30	1.38	1.29	1.89	1.29	1.36

2.2 孤雌生殖海带对潮霉素的敏感性实验

实验结果见表3。在含有潮霉素的营养海水中,孤雌生殖海带的死亡现象与在含氯霉素的营养海水中相似。结果表明,不同长度的孤雌生殖海带,相同处理时间对应的 LD_{50} 有

表3 孤雌生殖海带对潮霉素的敏感性实验结果

Tab.3 The test of Hygromycin sensitivity of sporophytes of parthenogenetic *Laminaria japonica*

时间 (h)	组别	不同剂量潮霉素 ($\mu\text{g/ml}$)中海带的死亡率 (%)							LD_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	95%可信限 ($\mu\text{g/ml}$)
		0	38.5	50.5	65.0	84.5	110.0	143.0		
36	a	0	0	0	0	10	45	50	123.7	109.2—140.1
	b	0	0	10	15	40	50	65	101.6	86.8—118.9
	c	0	0	5	10	35	80	90	91.5	80.5—104.0
48	a	0	20	15	20	35	65	65	91.5	77.0—108.8
	b	0	25	15	30	45	75	90	78.1	66.1—92.3
	c	0	5	10	15	35	85	95	85.6	74.9—97.8
72	a	0	60	35	50	55	85	85	61.3	51.6—73.8
	b	0	45	40	45	55	90	97	61.4	51.8—72.8
	c	0	10	18	20	50	95	100	75.5	65.9—86.5
96	a	0	70	55	70	80	100	95	47.4	40.7—55.2
	b	0	60	50	55	80	100	100	50.7	43.5—59.1
	c	0	10	20	25	70	100	100	69.4	60.6—79.1

注：海带全长分别为a: (6.3±1.0)mm, b: (8.3±1.0)mm, c: (12.3±2.3)mm

表4 潮霉素对不同长度孤雌生殖海带的 LD_{50} 差异显著性检验结果

Tab.4 The test of hygromycin LD_{50} difference between different length sporophytes of parthenogenetic

Laminaria japonica

时间 (h)	f_a	f_b	f_c	$f_{a,b}$	$K_{a,b}$	$f_{a,c}$	$K_{a,c}$	$f_{b,c}$	$K_{b,c}$
36	1.13	1.17	1.14	1.22	1.22	1.20	1.35	1.23	1.11
48	1.19	1.18	1.14	1.27	1.17	1.24	1.07	1.24	1.10
72	1.20	1.19	1.15	1.29	1.00	1.26	1.33	1.25	1.23
96	1.16	1.19	1.14	1.26	1.07	1.22	1.46	1.24	1.39

重叠。

以 LD_{50} 为横坐标, 以处理时间为纵坐标, 在半对数坐标纸上绘制敏感性曲线如图 2 所示。由图 2 可以看出, 不同长度的三组海带其敏感性曲线有交叉, 同一处理时间的 LD_{50} 差别不大。

再分别计算相同处理时间 3 组孤雌生殖海带之间的 $f_{i,j}$ 和 $K_{i,j}$, 结果见表 4。由表 4 可以看出, 除个别 $K_{i,j} > f_{i,j}$ 外, $K_{i,j}$ 普遍小于 $f_{i,j}$, 说明潮霉素对长度不同的三组孤雌生殖海带的 LD_{50} 没有明显差异。

3 讨论与结语

3.1 氯霉素干扰核糖体的蛋白质合成, 最终抑制细胞生长。CAT(氯霉素乙酰转移酶) 基因编码 CAT, 可以使氯霉素乙酰化而失活, 且植物细胞内

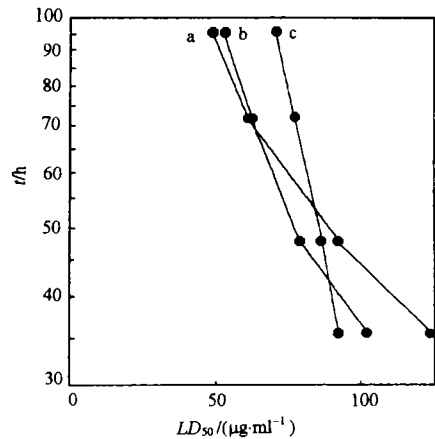


图2 孤雌生殖海带对潮霉素的敏感性曲线
Fig.2 The hygromycin sensitivity of parthenogenetic *Laminaria japonica*
a, b, c三组海带全长同表3; 表4同

非特异性 CAT 活性本底很低,不会造成对基因产物分析的干扰,适于定量分析。用 CAT ELISA(酶联免疫反应)方法可以迅速简便地测定 CAT 基因的表达,灵敏度很高。将 CAT 基因导入植物细胞中表达已经取得一些成功的例子(Daniell *et al*, 1990; Porsch *et al*, 1993; Klopfenstein *et al*, 1991)。Qin 等(1996)将 SV40 启动子驱动下的 CAT 基因导入海带雌配子体,经孤雌再生途径得到了具氯霉素抗性的孤雌生殖海带,初步确立了以海带雌配子体作为外源基因受体,以基因枪为转化手段,通过孤雌生殖途径再生海带孢子体的海带基因工程转化模式。本文研究了孤雌生殖海带对氯霉素的敏感性,确定了氯霉素对不同长度孤雌生殖海带的 LD_{50} ,为转化后再生的孤雌生殖海带的筛选提供了依据。

3.2 潮霉素抑制核糖体上肽链的延长,从而导致细胞的死亡。潮霉素磷酸转移酶(HPH)基因也是植物基因工程中常用的标记基因,编码 HPH 基因,可以使潮霉素磷酸化而失活。本文结果表明孤雌生殖海带对潮霉素更加敏感。全长 0.5—1.5cm 的孤雌生殖海带分别用氯霉素和潮霉素处理,氯霉素组经 20d,高剂量组(241.2 μ g/ml)才出现接近 100% 的死亡率;而潮霉素组仅经过 3d(72h),其高剂量组(184.5 μ g/ml)死亡率就达到 100%。HPH 基因可能成为海带基因工程的另一个更加灵敏的阳性选择标记。

3.3 氯霉素和潮霉素的作用机理都是干扰核糖体上蛋白质的合成,但前者的 LD_{50} 与海带的长度相关,而后者的 LD_{50} 与海带长度相关性不大,这可能与海带不同部位不同生长速度的细胞对不同抗生素的吸收和运输速度不同有关。将 CAT 基因作为选择标记,转化后需确定筛选时机、剂量及筛选时间;而将潮霉素作为选择压力时,是否应考虑海带长度的差别,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 方宗熙,戴继勋,崔竞进等,1978. 海带单倍体遗传育种的实验. 中国科学,2:226—311
- 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
- 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,李文斌等,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
- Daniell H, Vivekananda J, Nielsen B L, 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
- Klopfenstein N B, Shi N Q, Keman A, 1991. Transgenic *Populus* hybrid expresses a woundinducible potato proteinase inhibitor II-CAT gene fusion. Can J For Res, 21(9):1 321—1 328
- Porsch P, Merkelbach S, Gehlen J, 1993. The nonradioactive chloramphenicol acetyltransferase-enzyme-linked immunosorbent assay test is suited for promoter activity studies in plant protoplasts. Anal Biochem, 211:113—116
- Qin S, Wu J, Wang X *et al*, 1996. Expression of Foreign Genes in *Laminaria japonica*. In: Morton B ed. The Marine Biology of the South China Sea. Hong Kong: Hong Kong University Press, 209—217

SENSITIVITY OF SPOROPHYTES OF PARTHENOGENETIC *LAMINARIA JAPONICA* TO CHLORAMPHENICOL AND HYGROMYCIN

LI Xin-ping, QIN Song, ZENG Cheng-kui (C.K.Tseng)

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

Abstract In order to optimize the selection condition for transgenic *Laminaria japonica*, the sensitivity of sporophytes of parthenogenetic *L. japonica* to chloramphenicol and hygromycin was tested from Jan. to Apr., 1997. Young sporophytes of parthenogenetic *L. japonica* were regenerated from parthenogenetic gametophytes and cultured in laboratory. The total lengths of young sporophytes were from 0.5 to 1.5cm. In the test for chloramphenicol, the young sporophytes were divided into three groups according to their total lengths: a) (4.9 ± 0.6) mm, b) (6.5 ± 0.5) mm, and c) (8.4 ± 0.9) mm. Chloramphenicol concentration in each group was 0, 50.0, 65.0, 84.5, 110.0, 143.0, 185.5, and 241.2 μ g/ml, respectively. In the test for hygromycin, the young sporophytes were also divided into three groups i.e. a) (6.3 ± 1.0) mm, b) (8.3 ± 1.0) mm, and c) (12.3 ± 2.3) mm. Hygromycin concentration in each group were 0, 50.0, 65.0, 84.5, 110.0, and 143.0 μ g/ml, respectively. Steril polystyrene dishes (diameter 3.0cm) were used, which contains 5ml enriched seawater added with necessary antibiotics stock. Every ten young sporophytes were put into a plate, cultured at (10.0 ± 0.5) °C in about 50 μ E / (m² · s), 10h light / 14h darkness, and their death were observed everyday. All media were renewed every week.

LD_{50} of Chloramphenicol at 15, 16, 17, 18, 19 and 20d and LD_{50} of hygromycin at 36, 48, 72 and 96h were calculated. The results show that the LD_{50} of *L. japonica* to chloramphenicol is correlated with total length (0.5—1.5cm), but the LD_{50} of hygromycin is not. The parthenogenetic sporophytes are more sensitive to hygromycin than to chloramphenicol. For example, LD_{50} of chloramphenicol in the three groups at 15d are 158.9, 110.6 and 89.0 μ g/ml, respectively, but LD_{50} of hygromycin in the three groups at 96h (4d) are only 47.4, 50.7 and 69.4 μ g/ml, respectively. This observation suggests that HPH (hygromycin phosphotransferase) gene is a more efficient selectable marker than CAT (chloramphenicol acetyltransferase) gene.

Key words *Laminaria japonica* Chloramphenicol Hygromycin Selectable marker

Subject classification number Q789