

# 微拟球藻抗生素抗性分析和选择标记筛选

张 琳<sup>3</sup> 马晓磊<sup>1</sup> 朱葆华<sup>1</sup> 于文功<sup>3</sup> 杨官品<sup>2\*</sup> 潘克厚<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室 应用微藻生物学研究室, 青岛 266003)

(<sup>2</sup>中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(<sup>3</sup>中国海洋大学医药学院, 青岛 266003)

**摘 要** 为了筛选到微拟球藻 *Nannochloropsis oculata* 的筛选标记, 研究了微拟球藻对新霉素 (Neomycin)、链霉素 (Streptomycin)、潮霉素 (Hygromycin)、壮观霉素 (Spectinomycin) 和博来霉素 (Zeocin) 的敏感性。每种抗生素都设置液体培养和固体培养实验并且浓度梯度相同。新霉素和链霉素的浓度梯度为: 0、100、200、400、600、800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。潮霉素的浓度梯度为 0、25、50、100、125、150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。壮观霉素浓度梯度为 0、40、80、100、150、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。博来霉素浓度梯度则为 0、0.1、0.2、0.4、0.5、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果表明, 微拟球藻对新霉素、链霉素、潮霉素和壮观霉素不敏感, 而对博来霉素高度敏感。在固体培养时, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  博来霉素即可完全抑制微拟球藻生长; 在液体培养时, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  博来霉素即可完全抑制其生长。博来霉素可作为微拟球藻遗传转化的选择抗生素。ble 基因为其阳性筛选的选择标记基因。

**关键词** 微拟球藻 遗传转化 筛选试剂 博来霉素

**中图分类号** S968.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)04-0072-05

## Antibiotic resistance of *Nannochloropsis oculata* and determination of selection markers for its genetic transformation

ZHANG Lin<sup>3</sup> MA Xiao-lei<sup>1</sup> ZHU Bao-hua<sup>1</sup> YU Wen-gong<sup>3</sup>  
YANG Guan-pin<sup>2\*</sup> PAN Ke-hou<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup>College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>3</sup>School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**ABSTRACT** To determine the selection marker of *N. oculata*, the sensitivity to 5 antibiotics (Neomycin, Streptomycin, Hygromycin, Spectinomycin, and Zeocin) was determined in this study. For each antibiotic, liquid medium and solid medium were both adopted with the same concentration gradient. The concentration gradient of Neomycin and Streptomycin was 0, 100, 200, 400, 600, and 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , while that of Hygromycin was 0, 25, 50, 100, 125, and 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and that of Spectinomycin was 0, 40, 80, 100, 150, and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The concentrations of Zeocin were much lower, which were 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . It was found that

国家自然科学基金项目(40976076)和国家重点基础研究发展计划项目(2011CB200901)共同资助

\* 通讯作者。潘克厚, E-mail: khpan@ouc.edu.cn; 杨官品, E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn

收稿日期: 2010-12-21; 接收日期: 2011-05-05

作者简介: 张琳(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事微藻分子生物学研究。E-mail: mwmylover@yahoo.com.cn, Tel: (0532)82032938

*N. oculata* is not sensitive to Neomycin, Streptomycin, Hygromycin or Spectinomycin, but highly sensitive to Zeocin. Zeocin can completely inhibit the growth of *N. oculata* when its concentration is  $0.5\mu\text{g/ml}$  in solid medium or  $1\mu\text{g/ml}$  in liquid medium. Zeocin could serve as a selection reagent in the genetic transformation of *N. oculata*, and the *ble* gene could be the selection marker.

**KEY WORDS** *Nannochloropsis oculata* Genetic transformation  
Selection reagents Zeocin

微拟球藻 *Nannochloropsis oculata* 是一种重要的经济微藻,其繁殖速度快,可合成高附加值的产物,可规模化养殖,呈现出巨大的开发潜力,因而备受关注。微拟球藻富含蛋白质、色素以及对动植物的生理过程有重要作用的多不饱和脂肪酸等(王吉桥等 2009; Lubián *et al.* 2000; 刘镜恪等 1998; Volkman *et al.* 1993; 徐学良等 1992),是优良活饵料(Volkman *et al.* 1993)。尤其重要的是,微拟球藻富含 EPA,达总脂肪酸的 30%以上(Renaud *et al.* 1993)。另外,微拟球藻油脂含量达干重的 30%,被认为是最适于开发的能源微藻之一(Rodolfi *et al.* 2008)。综上所述,微拟球藻基因工程改良具有重要的应用前景。但迄今为止,微拟球藻遗传转化研究尝试较少,落后于绿藻(Ladygin *et al.* 2004; Kim *et al.* 2002)、蓝藻(周杰等 1999)、红藻(吴顺章等 2008)和硅藻(Zaslavskaja *et al.* 2000)。

实现遗传转化,应用抗生素选择标记是关键。已实现遗传转化的绝大多数微藻都应用了抗生素选择标记基因,如杜氏盐藻的氯霉素、博来霉素抗性选择标记基因(耿德贵等 2001; 李子兴等 2005)、新月菱形藻的 G418 选择标记基因(魏秋红等 2005)、小球藻的 G418 和潮霉素选择标记基因(陈颖等 1999)、三角褐指藻的博来霉素选择标记基因(Zaslavskaja *et al.* 2000)和衣藻的腐草霉素选择标记基因等(Stevens *et al.* 1996)。但是,唯一报道的微拟球藻遗传转化研究(Chen *et al.* 2008)没有使用抗生素选择标记基因。本研究分析了微拟球藻对新霉素(Neomycin, Nm)、链霉素(Streptomycin, Str)、潮霉素(Hygromycin, Hyg)、博来霉素(Zeocin, Z)和壮观霉素(Spectinomycin, S)的敏感性,以期为微拟球藻遗传转化确定抗生素选择标记基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 微拟球藻来源与培养

微拟球藻购于澳大利亚微藻种质库(Australian CSIRO Collection of Living Microalgae, <http://www.cmar.csiro.au/microalgae>),编号为 CS-179,为单种纯种培养。藻种经过 f/2 海水培养基平板纯化后挑取单克隆,扩大培养后进行 18S 核糖体小亚基分子鉴定。

藻细胞培养条件如下:培养温度  $23\pm 1^\circ\text{C}$ ,盐度 30,光照  $70\mu\text{mol photons/s}\cdot\text{m}^2$ ,pH 7.8,光周期(L:D)为 12 h:12 h。f/2 培养基(Guillard *et al.* 1962)连续培养。海水取自青岛近海,经  $0.45\mu\text{m}$  混合纤维素酯膜过滤后进行  $121^\circ\text{C}$ ,15 min 高压蒸汽灭菌。

### 1.2 藻种鉴定

基于微拟球藻的 18S (GenBank Accession Number: AF045045)序列设计引物:F1(5'-CTGCTTGTCG-GACGGGATGTA-3')和 R1(5'-CGAGCTGATGACTCGCGTTTA-3')进行 PCR 扩增。反应体系如下:50  $\mu\text{l}$  PCR 反应体系中含有 1.5U PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、10 mmol/L dNTP(each)1  $\mu\text{l}$ 、引物 F1 和 R1 各 1.5pmol、5 $\times$ PrimeSTAR 缓冲液 10  $\mu\text{l}$  和模板 DNA 100 ng。热循环条件为:98 $^\circ\text{C}$  预变性 1 min;98 $^\circ\text{C}$  变性 10 s,57 $^\circ\text{C}$  复性 30 s,72 $^\circ\text{C}$  延伸 2 min,共 30 个循环;72 $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。取 5  $\mu\text{l}$  进行琼脂糖凝胶电泳检测。胶回收目的产物送公司进行测序分析。

### 1.3 抗生素配制

新霉素、链霉素、潮霉素、博来霉素和壮观霉素均购自北京索莱宝科技有限公司。分别配制抗生素母液,且用  $0.22\ \mu\text{m}$  的滤膜过滤除菌。5 种抗生素母液浓度分别为 50、50、100、100、100 mg/ml。

### 1.4 液体培养时微拟球藻抗生素敏感性

分别取 90 ml 新鲜 f/2 培养基,添加抗生素至设定的终浓度(表 1)并混匀,再加入 6ml 培养至对数期( $3 \times 10^7$  cell/ml)的藻液,混匀后平均分装到 100 ml 三角烧瓶中培养。每种处理重复 3 次,平行设置对照组。每天定时摇瓶并观察藻细胞生长情况,采用 KB-K-25 血球计数板隔天计数。

### 1.5 固体培养时微拟球藻抗生素敏感性

配制含有不同浓度(表 1)的抗生素的 f/2 固体培养基,每种处理重复 3 次,平行设置对照组。收集液体培养 5 d 的藻细胞,调细胞密度为  $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$  cell/ml,吸取 0.5 ml 藻细胞涂布于不同浓度的固体培养基上,倒置于光照培养箱中培养,每天观察藻落生长情况。

表 1 抗生素种类与浓度(单位:  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
Table 1 Kinds and concentrations of antibiotics

新霉素 Neomycin	链霉素 Streptomycin	潮霉素 Hygromycin	壮观霉素 Spectinomycin	博来霉素 Zeocin
0	0	0	0	0
100	100	25	40	0.1
200	200	50	80	0.2
400	400	100	100	0.4
600	600	125	150	0.5
800	800	150	200	1

## 2 结果

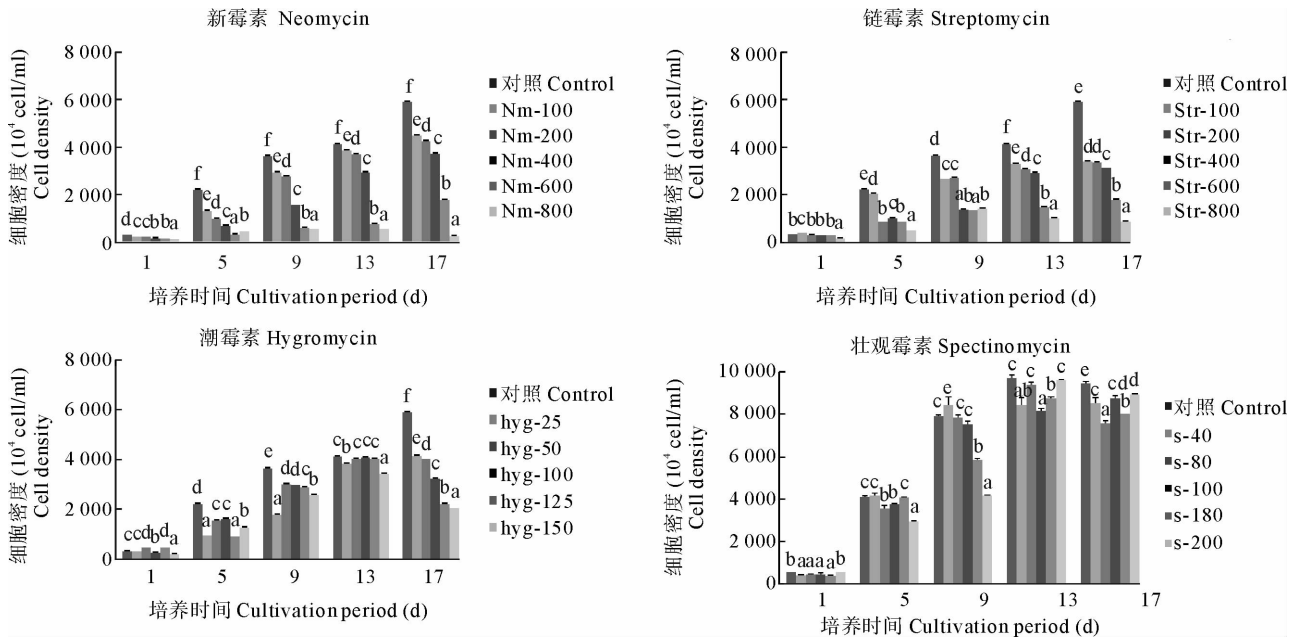
### 2.1 微拟球藻藻种鉴定结果

18S 产物片段长度为 1 426bp,对测序结果进行分析,发现与 GenBank 中已发表的 *Nannochloropsis oculata* 的 18S 序列相似性达到 99%,证明分离纯化后的藻就是微拟球藻。

### 2.2 液体培养基中微拟球藻对 5 种抗生素的敏感性

液体培养时,5 种抗生素对微拟球藻生长的影响如图 1、图 2 所示。新霉素、链霉素、潮霉素和壮观霉素对微拟球藻的生长有抑制作用,随浓度增加,抑制作用增强。其中新霉素和链霉素在浓度小于或等于  $400\ \mu\text{g}/\text{ml}$  时,对微拟球藻的生长抑制不明显;当浓度升高至  $600\ \mu\text{g}/\text{ml}$  后,微拟球藻的生长才受到明显的影响。但抗生素浓度过高,对遗传转化而言已经没有应用价值。潮霉素在开始的 15 d 对微拟球藻几乎没有影响,之后才出现一定程度的抑制。而在实验浓度范围内,壮观霉素则无明显作用。

由液体培养的结果来看,在实验所用的 5 种抗生素中,微拟球藻对博来霉素最为敏感(图 2)。对照组呈深绿色,各处理组间藻液颜色出现差异。低浓度的博来霉素( $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )即可抑制微拟球藻的生长,藻液呈淡绿色。随着博来霉素浓度的增加,藻细胞的密度逐渐降低。在  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  的博来霉素作用下,微拟球藻的生长几乎被完全抑制,藻液呈现白色,在显微镜下观察,视野里为数不多的藻细胞均为皱缩状态。由液体培养的结果看,博来霉素在实验所涉及的 5 种抗生素中最适合做微拟球藻遗传转化的选择性试剂。



备注: a、b、c、d、e、f 表示方差分析差异程度,有相同字母的表示差异不显著

Note: The letters (a, b, c, d, e, and f) represent the difference degrees of deviation analysis and the same letter means no significant difference

图 1 液体培养基中不同抗生素对微拟球藻生长的影响

Fig. 1 Effects of various antibiotics on *N. oculata* in liquid medium

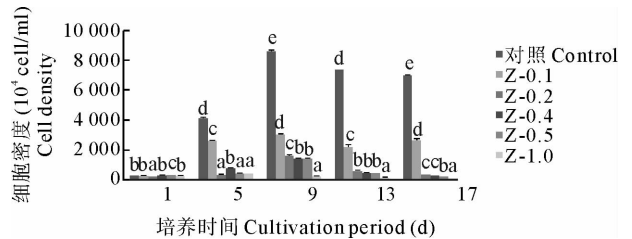
### 2.3 固体培养时微拟球藻抗生素敏感性

微拟球藻对壮观霉素最不敏感。培养至 11 d 时,150  $\mu\text{g/ml}$  及其以下浓度的培养基中,均长出明显的藻落,而到第 13 天时,200  $\mu\text{g/ml}$  的培养基中也出现了零星的藻落。可见,200  $\mu\text{g/ml}$  的壮观霉素尚不能抑制微拟球藻的生长。另外,链霉素和新霉素对微拟球藻也有一定程度的抑制作用,但不明显。当链霉素含量为 100  $\mu\text{g/ml}$  时,培养至 29 d 时有藻落出现,当浓度增至 200  $\mu\text{g/ml}$  时,才表现出对微拟球藻的完全抑制作用,培养至 50 d 仍未有藻落长出。在第 50 天,100 和 200  $\mu\text{g/ml}$  的新霉素培养基中,长出零星的藻落,而更高浓度的新霉素则完全抑制了微拟球藻在固体培养基中的生长。而在含有潮霉素的培养基中,始终没有藻落长出。

在固体培养中,微拟球藻对博来霉素很敏感。培养至 12 d,博来霉素终浓度为 0.1、0.2、0.4  $\mu\text{g/ml}$  的培养基中,有零星藻落出现,藻落数目明显比对照少。说明在固体培养中,0.4  $\mu\text{g/ml}$  的博来霉素尚不能完全抑制微拟球藻的生长。而 0.5、1  $\mu\text{g/ml}$  的博来霉素培养基中,培养至 50 d,均无一个藻落长出。可见,在固体培养中,0.5  $\mu\text{g/ml}$  的博来霉素已能够完全抑制微拟球藻的生长。因此可以选用博来霉素作为固体培养中的筛选试剂。

### 3 结论

本研究选用 5 种抗生素对微拟球藻的抗生素抗性进行了研究。综合液体和固体培养的实验结果来看,微拟球藻对新霉素、链霉素、潮霉素、壮观霉素不敏感,而对博来霉素表现出高度敏感性。在固体培养中,0.5  $\mu\text{g/ml}$  的博来霉素即可完全抑制微拟球藻的生长;而在液体培养中,当用量达 1  $\mu\text{g/ml}$  时,即可完全抑制其生长。因



备注: a、b、c、d、e、f 表示方差分析差异程度,有相同字母的表示差异不显著

Note: The letters (a, b, c, d, e, and f) represent the difference degrees of deviation analysis and the same letter means no significant difference

图 2 液体培养基中博来霉素对微拟球藻生长的影响

Fig. 2 Effects of various zeocin concentrations on *N. oculata* in liquid medium

此博来霉素适宜做微拟球藻遗传转化的抗生素抗性选择试剂。博来霉素所对应的抗性基因 *ble* 基因也已经存在,这也为博来霉素做筛选标记提供了方便。

博来霉素对细菌、真菌、植物乃至动物都有不同程度的作用。在细胞内,博来霉素可与 DNA 结合并使之断裂,导致细胞死亡。博来霉素抗性基因 *ble* 基因的产物可以与博来霉素结合,使其不能切割 DNA。*ble* 基因作为筛选标记已用于多种真核生物的遗传转化研究中(肖志新等 2004;Leiting *et al.* 1991)。*ble* 基因在藻类中作为选择标记的成功例子也有很多。例如,*ble* 基因在杜氏盐藻中的表达(李子兴等 2005),另外在金藻(曹军平等 2001)、三角褐指藻(*Zaslavskaja et al.* 2000)中也有报道。其中博来霉素对杜氏盐藻、金藻及三角褐指藻的最低抑制浓度分别为 10、5、100  $\mu\text{g/ml}$ ,而实验显示博来霉素对微拟球藻的最低抑制浓度为 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ,可见各物种间差异较大。

基于微拟球藻本身的优点,利用转基因手段改变微拟球藻内源产物的品质及含量,以期创造出更大的经济价值必将成为研究的热点。选择适当的筛选标记基因是基因工程的关键之一,也是建立微拟球藻遗传转化体系的前提条件。Chen 等(2008)对微拟球藻转基因的研究中,涉及到了微拟球藻对氨基青霉素、卡那霉素、链霉素、氯霉素的敏感性探索,但是没有筛选出合适的筛选标记。本实验研究微拟球藻对抗生素的敏感性,并筛选出博来霉素作为微拟球藻遗传转化系统中的选择试剂,为筛选转化子提供依据,对微拟球藻遗传转化体系的建立与完善具有十分重要的意义。

## 参 考 文 献

- 王吉桥,赵丽娟,姜玉声,张剑诚,王锡荣. 2009. 饲料中不同脂肪酸搭配对仿刺参幼参生长和体组分的影响. 渔业科学进展, 30(6): 62~74
- 刘镜恪,雷霖霖. 1998. 活饵料中 n-3 高度不饱和脂肪酸对黑鲟仔稚鱼生长和存活的影响. 海洋水产研究, 19(2): 14~18
- 李子兴,孙煜,刘志学,宋任涛,许政. 2005. 外源 *ble* 基因在杜氏盐藻中的瞬时表达. 实验生物学报, 38(5): 411~416
- 吴顺章,李博文,赵扬,陈奕欣. 2008. 坛紫菜转萤素基因的初步研究. 厦门大学学报(自然科学版), 47(4): 567~570
- 肖志新,周冀衡,杨虹琦,李鹏飞,黎娟. 2004. 转基因植物选择性标记基因. 中国农业科技导报, 6(5): 19~22
- 陈颖,李文彬,张利明,孙勇如. 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): 500~505
- 周杰,施定基,武宝,茹炳根. 1999. 人肝金属硫蛋白突变体  $\beta$  基因通过同源重组在蓝藻中的克隆与表达. 中国生物化学与分子生物学报, 15(6): 907~911
- 徐学良,季文娟. 1992.  $\omega$ -3 及  $\omega$ -6 不饱和脂肪酸对中国对虾幼虾存活、蜕皮和生长的影响. 海洋水产研究, 13: 21~27
- 耿德贵,王义琴,李文彬,孙勇如. 2001. 杜氏盐藻基因工程选择标记的研究. 生物技术, 11(5): 1~2.
- 曹军平,费志清,刘必谦,胡国成,孙宗修. 2001. 金藻基因工程选择标记的研究. 实验与技术, 25(7): 6~8
- 魏秋红,李强,张雪花. 2005. 新月菱形藻遗传重组标记的选择. 大连轻工业学院学报, 24(2): 119~122
- Chen, H. L., Li, S. S., Huang, R., and Tsai, H. J. 2008. Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). J. Phycol. 44(3): 768~776
- Guillard, R. R. L., and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms; *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8: 229~239
- Kim, D. H., Kim, Y. T., Cho, J. J., Bae, J. H., Hur, S. B., Hwang, I., and Choi, T. J. 2002. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalgae, *Chlorella ellipsoidea*. Mar. Biotechnol. 4: 63~73
- Ladygin, V. G. 2004. Efficient transformation of mutant cells of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Process Biochem. 39: 1 685~1 691
- Leiting, B., and Noegel, A. A. 1991. The *ble* gene of *Streptoactichus hindustanus* as a new selectable marker for *Dictyostelium discoideum* confers resistance to phleomycin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180(3): 1 403~1 407
- Lubián, L. M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, E., Sobrino, C., Valle, M. G., and Parés, G. 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as a source of commercially valuable pigments. J. Appl. Phycol. 12: 249~255
- Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L. V., Kuo, C., Padovan, A., and Sammy, N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. J. Appl. Phycol. 3: 43~53
- Rodofli, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. and Tredici, M. R. 2008. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnol. Bioeng. 102 (1): 100~112
- Stevens, D. R., Roehaix, J. D., and Purton, S. 1996. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. Mol. Gen. Genet. 251: 23~30
- Volkman, J. K., Brown, M. R., Dunstan, G. A., and Jeffrey, S. W. 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. J. Phycol. 29: 69~78
- Zaslavskaja, L. A., Lippmeier, J. C., Korth, P. G., Grossman, A. R., and Apt, K. E. 2000. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. J. Phycol. 36: 379~386