

导入 *bar* 基因获得裙带菜草丁膦抗性配子体

任宝永^{1,2}, 姜 鹏¹, 崔玉琳^{1,2}, 姜进举^{2,3}, 秦 松¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 裙带菜(*Undaria pinnatifida*)配子体经 2.5 L 气升式光生物反应器快速营养增殖, 通过基因枪法将携带草丁膦抗性基因(*bar*)的载体转入扩增后的配子体, 经草丁膦筛选, 获得抗性克隆。提取抗性克隆配子体基因组总 DNA, 经 PCR 和 PCR Southern 检测, 结果显示 60% 的抗性克隆可检出 *bar* 基因, 表明 *bar* 基因是裙带菜配子体基因工程有效的筛选标记。

关键词: 裙带菜(*Undaria pinnatifida*)配子体; 基因工程; 草丁膦抗性基因

中图分类号: S968.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)01-0006-04

裙带菜(*Undaria pinnatifida*)在中国已形成规模化栽培, 具有重要的经济价值。大型海藻的基因工程研究开始于 20 世纪 90 年代, 建立了以海带为材料的稳定表达系统^[1-2]。裙带菜与海带同属海带目大型褐藻, 通过借鉴海带的经验, 于道展等^[3]、秦松等^[4]分别实现了 *lacZ* 报告基因在裙带菜孢子体中的瞬间表达和稳定表达, 证明基因枪法是适合裙带菜的有效导入方法, 通过在配子体阶段进行遗传操作, 在孢子体阶段进行表达是可行的技术路线, 但尚未发展有效的选择标记对转化子进行筛选。张亦陈等^[5]、于道展等^[6]开展了裙带菜配子体对不同筛选试剂的敏感性试验, 发现对草丁膦非常敏感, 提示草丁膦可作为裙带菜配子体遗传转化的筛选试剂。鉴于褐藻配子体不同品系的发育和生长速度存在较大差异^[7], 作者首先利用 2.5 L 生物反应器验证试验品系的快速营养增殖能力, 之后应用基因枪法将草丁膦抗性基因(*bar*)导入裙带菜配子体, 经草丁膦筛选和 PCR 及 PCR Southern 检测, 综合分析 *bar* 基因作为裙带菜配子体基因工程选择标记的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 裙带菜配子体的培养

裙带菜配子体品系(U2♂)由本实验室保存, 采用 PES 培养液静止培养, 培养温度为 22 ℃, 光暗周期为 14 h/10 h, 光照强度为 1700 lx。

1.1.2 菌株及质粒载体

宿主菌为 *Escherichia coli* TOP10 菌株, 转化所用质粒载体为 p35bar40tac, 该载体携带 *bar* 基因, 上游为 CaMV35S 启动子, 下游为 nos 终止子。菌株与载体均由本实验室保存。

1.1.3 仪器、耗材与试剂

2.5 L 气升式光生物反应器由中国科学院过程与工程研究所试制, 基因枪转化所用 GJ-1000 高压气体基因枪、DNA 载片、阻挡网、可裂膜(7MP)和金粉均为宁波新芝公司产品, Southern 杂交所用杂交膜、地高辛 DNA 标记和检测试剂盒购自 Roche 公司, 质粒小抽试剂盒购自天根公司, 植物基因组提取试剂盒购自百泰克公司。

1.2 方法

1.2.1 2.5 L 气升式光生物反应器中增殖配子体

1.2.1.1 培养条件

裙带菜配子体在 2.5 L 反应器中采用 PES 培养液营养增殖, 培养温度为 22 ℃, 光照强度为 2200 lx, 通气量为 0.6 L/min, 光暗周期为 14 h/10 h。

1.2.1.2 生长指标的测定

共测量 3 个生长指标: pH 值、DO 和叶绿素 a。

收稿日期: 2011-04-24; 修回日期: 2011-06-23

基金项目: 江苏省科技计划项目(BE2008341); 国家 863 计划项目(2009AA10Z106); 山东省博士基金项目(2010BSB02009); 山东东方海洋科技股份有限公司科研开放基金项目(200810)

作者简介: 任宝永(1985-), 男, 硕士研究生, 海洋药物专业, E-mail: baoyong2008@yahoo.cn; 秦松, 通信作者, 研究员, 博士, 从事海洋生物技术研究, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

前两者通过 pH 电极和溶氧电极检测。由于裙带菜配子体在培养过程中形成多细胞丝状体，不能通过测量藻体的吸光值来直接测定藻体的生长状况，作者借鉴采用 Porra 测定叶绿素的方法来间接测定其生长速度^[8]。

1.2.2 转化质粒载体的制备

采用天根公司的质粒小抽试剂盒提取高质量的质粒载体 DNA。

1.2.3 基因枪转化

1.2.3.1 藻体转化前处理

利用自然沉淀的方式收集 2.5 L 气升式生物反应器中培养的配子体细胞，使用载玻片研磨丝状配子体至形成 5~10 个细胞的藻段，避光恢复培养 24 h。

1.2.3.2 基因枪转化

微粒子弹的制备及基因枪的轰击按照 Jiang 的方法^[1]，轰击压力 7 MP，真空度为 - 0.085 MP，轰击距离为 6 cm，共转化两组样品，每组样品平行轰击 2 次。

1.2.4 裙带菜配子体的筛选和扩增

转化后的配子体细胞避光恢复培养 24 h，之后见光恢复培养 7 d，培养条件为：温度为 22℃，光周期 14 h/10 h，光照强度为 1700 lx，使用 PES 培养液。7 d 后加入草丁膦筛选，草丁膦质量浓度为 50 mg/L，持续筛选 3 周，每周更换 1 次培养液。3 周后更换含 30 mg/L 的草丁膦培养液，1 周后去除草丁膦恢复培养，60 d 后取抗性克隆分别单独培养，用于 PCR 检测。

1.2.5 转基因裙带菜配子体的分子检测

利用百泰克植物基因组提取试剂盒提取抗性克隆的基因组总 DNA，设计扩增引物见表 1 和图 1。以提取的两个转化组的基因组 DNA 为模板，用 p1 和 p3 引物 PCR 扩增检测。从两个转化组中各挑选一个

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide sequences of primers

引物名称	引物序列 5'----3'
p1	AACCTCCTCGGATTCCATTG
p2	GCACCATCGTCAACCACTA
p3	AAACCCACGTCATGCCAGTT

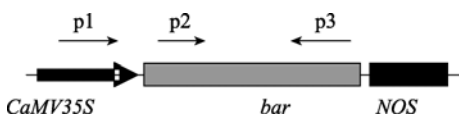


图 1 PCR 引物与 Southern 杂交探针示意图

Fig. 1 Primers design for bar gene and the Southern blot

阳性 PCR 产物，以其为模板，利用 p2 和 p3 引物二次 PCR 扩增，将此次得到的 PCR 片段进行 Southern 杂交。以 p2 和 p3 为引物，从质粒上扩增 bar 基因片段，该片段纯化后以随机引物法地高辛标记制成探针。Southern 杂交检测方法参照 Roche 公司的地高辛 DNA 标记和检测试剂盒使用说明进行。

PCR 程序为：94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 45 sec，54℃ 退火 35 sec(p1/p3)或 57℃ 退火 35 sec(p2/p3)，72℃ 延伸 1 min，循环 35 次，72℃ 延伸 10 min。

2 结果

2.1 裙带菜配子体在 2.5 L 气升式光生物反应器中的培养

将配子体在 2.5 L 气升式光生物反应器中进行培养，每天定时测量 pH、溶氧(DO)和叶绿素 a 含量，培养过程大致可以分为两个阶段：第一阶段(1~5 d)，培养基中的溶氧、pH 值和叶绿素 a 含量变化不大，第二阶段(6~10 d)，溶氧升高，pH 值也随之略有升高，同时叶绿素 a 含量逐渐增加。在整个培养周期中，配子体大约扩增了 3 倍，说明该转基因所用品系配子体可以实现快速营养增殖(图 2)。

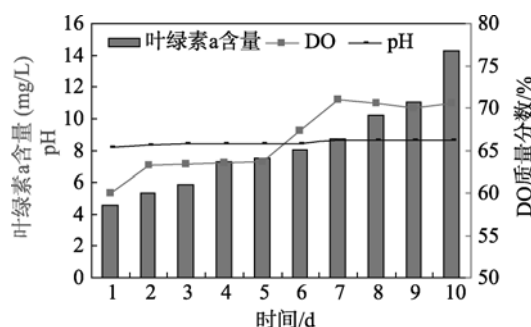


图 2 裙带菜配子体在 2.5 L 光生物反应器中的生长曲线及溶氧和 pH 变化曲线

Fig. 2 The growth, variation of DO and variation of pH curve of *U. pinnatifida* gametophytes in 2.5L photobioreactor

2.2 草丁膦筛选

基因枪转化后，配子体在黑暗中恢复培养 24 h，之后在 PES 培养液中静置培养。1 周后转入 50 mg/L 草丁膦溶液中筛选。发现配子体在草丁膦的作用下逐渐由褐色转为绿色，筛选 1 周之后大部分配子体白化死亡，每周更换筛选培养液。3 周后，将配子体转入低剂量 30 mg/L 草丁膦培养液中恢复培养 1 周，之后将配子体转入正常 PES 培养基中恢复生长，约 2

个月后, 第一转化组有 18 个抗性克隆出现, 第二个转化组有 15 个抗性克隆出现, 将抗性克隆分离并单独培养增殖。

2.3 PCR 及 PCR Southern 检测

从第一和第二转化组中分别随机取 12 和 10 个抗性克隆, 提取其基因组总 DNA 并做 PCR 检测, 利用 p1 和 p3 引物扩增载体中间 818 bp 的片段。两个

转化组均获得抗性克隆, 第一转化组有 6 个阳性克隆(图 3), 第二转化组有 7 个阳性克隆(图 4), 统计数据如表 2 所示。从第一和第二转化组中各取一个阳性 PCR 产物进行二次 PCR, 得到 424 bp 的片段, 该产物进行 Southern 杂交检测, 结果显示两转化组 PCR Southern 杂交均有阳性信号(图 5), 表明两组抗性克隆配子体已成功转化 *bar* 基因。

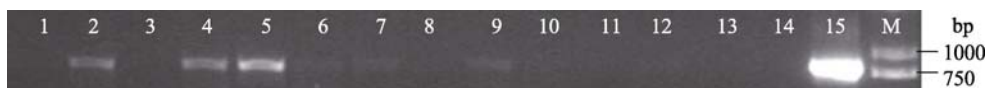


图 3 p1 和 p3 引物 PCR 扩增检测第一转化组

Fig. 3 PCR analysis of Group 1 transformed *U. pinnatifida* gametophytes genomic DNA with p1/ p3 primers

1-12: 转化的配子体抗性克隆 DNA; 13. PCR 空白对照; 14. 未转化的配子体 DNA; 15. 质粒; M. DL2000 DNA marker

1-12. transformed *U. pinnatifida* gametophytes clones; 13: blank control; 14. untransformed *U. pinnatifida* gametophytes; 15. plasmid; M. DL2000 DNA marker

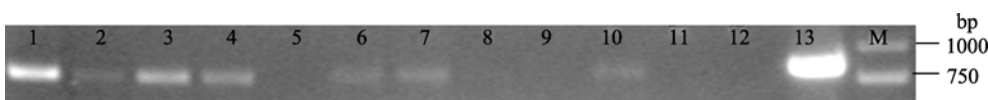


图 4 p1 和 p3 引物 PCR 扩增检测第二转化组

Fig. 4 PCR analysis of Group 2 transformed *U. pinnatifida* gametophytes genomic DNA with p1/ p3 primers

1-10. 转化的配子体抗性克隆 DNA; 11. 未转化的配子体 DNA; 12. PCR 空白对照; 13. 质粒; M. DL2000 DNA marker

1-10. transformed *U. pinnatifida* gametophytes clones; 11. untransformed *U. pinnatifida* gametophytes; 12. blank control; 13. plasmid; M. DL2000 DNA marker

表 2 阳性克隆配子体统计

Tab. 2 Statistics of positive clones

组别	抗性克隆数量(个)	PCR 检测数量(个)	阳性克隆数量(个)	阳性克隆率(%)	平均阳性克隆率(%)
第一组	18	12	6	50	60
第二组	15	10	7	70	

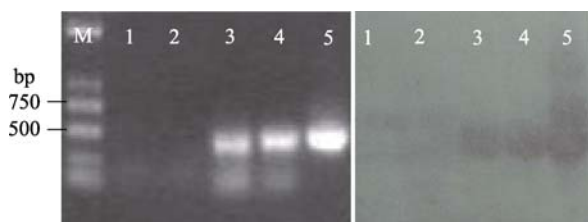


图 5 PCR-Southern Blotting 检测 *bar* 基因(p2/p3 引物)

Fig. 5 PCR-Southern Blotting analysis of *bar* gene (p2/p3 primer)

M. DL2000 DNA marker; 1. PCR 空白对照; 2. 未转化的配子体; 3. 第一转化组的配子体; 4. 第二转化组的配子体; 5. 质粒

M. DL2000 DNA marker; 1. blank control; 2. untransformed *U. pinnatifida* gametophytes; 3. Group 1 transformed *U. pinnatifida* gametophytes; 4. Group 2 transformed *U. pinnatifida* gametophytes; 5. plasmid

3 讨论

作者以裙带菜配子体为材料, 利用基因枪法导

入含有 *bar* 基因的质粒载体, 经草丁膦筛选, 两个转化组分别获得 18 个和 15 个抗性克隆, PCR 检测结果显示, 平均阳性克隆率为 60%, 结果显示 *bar* 基因能够赋予转化子草丁膦抗性并在筛选压力下存活。本文首次证明 *bar* 基因是裙带菜基因工程有效的筛选标记。

筛选标记基因是藻类基因工程的重要载体元件, 用于筛选成功转化的细胞。草丁膦抗性基因(*bar*)是植物基因工程常用的筛选标记基因, 其原理是 *bar* 基因编码 PPT 乙酰辅酶 A 转移酶, 能催化乙酰辅酶 A 与草丁膦的游离氨基结合, 使其失活^[9-10]。在抗性克隆中有 40% 的配子体为假阳性, 分析其中的原因, 主要与配子体的生长特点有关, 配子体是多细胞段藻体, 在生长过程中会出现配子体黏附一起生长现象, 有些会形成小的细胞团。当加草丁膦筛选后, 处于细胞团内部的配子体接触的药物浓度剂量较低,

出现不完全致死效应,待恢复生长时,这些配子体会逐渐恢复,出现假阳性克隆,以后的研究中可以通过每天定时摇动培养液来加以克服。

参考文献:

- [1] Jiang P, Qin S. Expression of the *lacZ* reporter gene in sporophytes of the seaweed *Laminaria japonica* (Phaeophyceae) by gametophyte-targeted transformation[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(12): 1211-1216.
- [2] Qin S, Jiang P, Tseng C K. Transforming kelp into a marine bioreactor[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(5): 264-268.
- [3] 于道展, 秦松. -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)在大经济海藻裙带菜中的瞬间表达[J]. 高技术通讯, 2002, 8: 93-95.
- [4] 秦松, 于道展, 姜鹏, 等. -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)在海藻裙带菜中的稳定表达[J]. 高技术通讯, 2003, 7: 87-89.
- [5] 张亦陈, 高江涛, 张喆, 等. 裙带菜配子体基因工程选择标记的研究[J]. 海洋科学, 2007, 12: 64-68.
- [6] 于道展, 杨玲玲, 姜鹏. 裙带菜基因工程选择标记的研究[J]. 高技术通讯, 2003, 6: 74-77
- [7] 白逢伟, 秦松, 李永祺. 海带丝状雌配子体孤雌生殖的初步研究[J]. 海洋科学, 1998, 6: 32-34
- [8] Porra R J, Thompson W A, Kriedemann P E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents - verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1989, 975(3): 384-394.
- [9] 段发平, 梁承邨, 黎垣庆. *Bar* 基因和转 *Bar* 基因作物的研究进展[J]. 广西植物, 2001, (2): 166-172.
- [10] Thompson C J, Movva N R, Tizard R, et al. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*[J]. EMBO J, 1987, 6(9): 2519-2523.

Transformation of phosphiothrici resistance gene(*bar*) in *Undaria pinnatifida* gametophytes

REN Bao-yong^{1, 2}, JIANG Peng¹, CUI Yu-lin^{1, 2}, JIANG Jin-ju^{2, 3}, QIN Song¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Received: Apr., 24, 2011

Key words: *Undaria pinnatifida* gametophyte; genetic engineering; phosphiothrici resistance gene

Abstract: *Undaria pinnatifida* gametophytes were cultured in a 2.5 L airlift photobioreactor, and were transformed with phosphiothrici resistance gene (*bar*) by particle bombardment. After phosphiothrici screening, resistance colonies appeared. PCR and PCR Southern blotting results showed that *bar* gene had integrated into the genome of 60% of the *U. pinnatifida* gametophytes and could be a suitable selective marker for *U. pinnatifida* gametophyte genetic engineering.

(本文编辑: 梁德海)