

小球藻基因工程选择标记研究

王逸云*, 王长海

(大连理工大学 生物工程系, 辽宁 大连 116024)

摘要: 研究了小球藻对 10 种常见抗生素: 庆大霉素、新霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、头孢霉素、链霉素、G418 潮霉素、Zeocin 和氯霉素的敏感性, 发现小球藻对庆大霉素、新霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、头孢霉素和链霉素不敏感; 对 G418 和潮霉素较敏感; 对 Zeocin 和氯霉素最敏感. 利用统计学的方法和原理, 确定了 G418 潮霉素、Zeocin 和氯霉素在海水培养基和淡化 10 倍的培养基中对小球藻的半致死剂量和 95% 可信限. 为筛选出小球藻基因工程藻株的选择试剂, 建立其遗传转化系统奠定了基础.

关键词: 小球藻; 抗生素; 半致死剂量; 选择标记

中图分类号: Q949.217 **文献标识码:** A

0 引言

海洋藻类是海洋中重要的初级生产者, 其种类繁多, 数量庞大, 且利用太阳能效率高, 具丰富营养, 是重要的生物资源. 随着陆地生物资源的日益匮乏, 开发海洋, 利用海洋, 向海洋要食品、要药品、要能源已成为人们的共识, 因此海洋藻类, 尤其是经济种类基因工程的研究和开发潜力越来越受到关注. 近几年来, 海洋大型藻类基因工程研究已取得了一定的进展^[1~4], 但对海洋微藻的转化报道还较少. 小球藻是一种单细胞真核绿藻, 作为生物反应器可对复杂蛋白进行正确的翻译后加工, 形成有活性的分子; 同时又具备微生物的特点, 生长繁殖迅速, 培养条件简单, 生产成本相对低廉, 易于大规模培养; 对其基因组结构与功能的研究也日益深入, 因而小球藻是进行基因工程研究的较理想材料^[5]. 迄今有关小球藻基因工程的研究多集中于淡水小球藻^[5~10], 对于海水小球藻的相关研究还未见报道. 本实验室选用一种海水小球藻——*Chlorella* sp. M ACC/C95 为实验材料, 探索用它进行遗传操作的可能性.

建立遗传转化系统中一个关键的环节是确定

适合的选择标记基因, 以便于把转化体同非转化体分开. 目前, 真核藻类的选择标记基因研究得还不太完善. 以往的报道中, 对海带、裙带菜、金藻、盐藻, 及淡水小球藻的选择标记基因进行了较系统的研究^[5~16]. 但是, 海水生小球藻尚未有这方面的报道. 因此, 为筛选到海水生小球藻 (*Chlorella* sp. M ACC/C95) 基因工程的选择试剂, 选择 10 种抗生素, 研究小球藻对它们的敏感性, 并测定抗生素对小球藻的半致死剂量和 95% 可信限, 以期为此种海水生小球藻遗传转化系统的建立提供参考和依据.

1 材料和方法

1.1 小球藻来源及培养方法

小球藻 (*Chlorella* sp. M ACC/C95) 购自中国海洋大学微藻室. 培养温度 (25 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 光强 1.0~1.6 mW/cm², 持续光照, 培养液为 f/2 培养基, 所用海水取自大连水产学院近海海域, 并经孔径 0.22 μm 的玻璃纤维滤膜过滤除菌.

1.2 抗生素来源及配制

氯霉素、氨苄青霉素、链霉素、新霉素购自 Sigma 公司; G418 潮霉素、卡那霉素、Zeocin 购自

收稿日期: 2006-04-20; 修回日期: 2007-03-09.

基金项目: 国家“十五”重点科技攻关课题资助项目 (2001BA707B03).

作者简介: 王逸云* (1974-), 女, 博士生, E-mail: yanwy@ sina.com; 王长海 (1963-), 男, 教授, 博士生导师.

1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Invitrogen 公司;庆大霉素 头孢霉素购自郑州豫新制药有限公司. 抗生素母液的配制参照文献 [17],用 0.22 μ m 的玻璃纤维滤膜过滤除菌.

1.3 小球藻在海水液体培养基中的抗生素基础抗性测定

取对数生长期的藻液,按 10% 的接种量接种到海水液体培养基中,加入各种抗生素至终浓度为 100 200 300 400 500 μ g /mL, 并设置空白对照组,每天观察小球藻的生长状况,并计数. 每组实验重复 3 次.

1.4 液体培养基中抗生素对小球藻半致死剂量的测定

取对数生长期的藻液,按 10% 的接种量分别接种到海水液体培养基和淡化 10 倍的液体培养基中(起始浓度约为 10⁶ 个 /mL). 根据统计学的

要求,设计 1.3 中小球藻敏感的选择试剂浓度(选择试剂终浓度设置见表 1 2). 在 24 48 72 168 h 数细胞数,统计死亡率,每组实验重复 3 次. 用寇氏法计算抗生素对小球藻的半致死剂量^[18],计算公式为

$$\lg LD_{50} = X_m - I(\sum P - 0.5) \tag{1}$$

式中: X_m 为最大剂量的对数值; I 为相邻剂量比值的对数值; $\sum P$ 为各组死亡率的总和.

$$\lg (LD_{50} \text{ 的 } 95\% \text{ 可信限}) = \lg LD_{50} \pm 1.96 S_{\lg LD_{50}} \tag{2}$$

式中

$$S_{\lg LD_{50}} = I(\sum (pq/n))^{\frac{1}{2}} \tag{3}$$

p 为各组的死亡率; q 为各组的存活率; n 为各组细胞的数目.

表 1 海水培养基中测定 LD_{50} 的抗生素终浓度设置
Tab. 1 Concentration of antibiotics in seawater medium for LD_{50} determining

抗生素	d/(μ g · mL ⁻¹)								
潮霉素	0	20	40	80	160	320	640	1 280	2 560
G418	0	10	20	40	80	160	320	640	1 280
氯霉素	0	2.5	5	10	20	40	80	160	320
Zeocin	0	2.5	5	10	20	40	80	160	320

表 2 淡化培养基中测定 LD_{50} 的抗生素终浓度设置
Tab. 2 Concentration of antibiotics in decreasing NaCl concentration medium for LD_{50} determining

抗生素	d/(μ g · mL ⁻¹)								
潮霉素	0	10	20	40	80	160	320	640	1 280
G418	0	2.5	5	10	20	40	80	160	320
氯霉素	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160
Zeocin	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160

2 结果和分析

2.1 海水液体培养中小球藻对 10 种抗生素的基础抗性

实验结果如表 3 所示,小球藻对卡那霉素 庆大霉素 新霉素 氨基青霉素 头孢霉素 链霉素都不敏感,在它们浓度高达 500 μ g /mL 的条件下,培养两周后小球藻依然生长良好,没有任何死亡现象;小球藻对潮霉素、G418 有一定的敏感性,在它们浓度为 500 μ g /mL 的条件下,经过两周的培

养,小球藻的生长受到一定抑制,一些细胞死亡;小球藻对氯霉素和 Zeocin 非常敏感,在它们浓度为 100 μ g /mL 时,小球藻的生长就受到强烈抑制,大量细胞死亡. 同时在实验中观察到本藻种对氯霉素的溶剂——乙醇也有一定的敏感性. 如表 3 所示,加入各剂量的氯霉素处理时,设置加入相同体积乙醇的空白对照组. 结果表明乙醇在最低剂量时即对小球藻有一定的抑制作用,如选用氯霉素做小球藻的筛选抗生素需考虑这个影响因素.

表 3 海水培养基中小球藻对 10 种抗生素的基础抗性

Tab. 3 Sensitivity of *Chlorella* sp. to 10 antibiotics in seawater medium

d/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抗生素										乙醇
	卡那霉素	庆大霉素	新霉素	氨基青霉素	链霉素	头孢霉素	潮霉素	G418	氯霉素	Zeocin	
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100	—	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+
200	—	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+
300	—	—	—	—	—	—	—	+	+++	+++	++
400	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++	++
500	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	++

注 1): +++ : 完全抑制; ++ : 强烈抑制; + : 抑制; - : 不抑制.
2): 乙醇与同组的氯霉素加入体积相同

2.2 海水液体培养基中小球藻对 4 种抗生素的敏感性

小球藻对潮霉素有很强的耐受性,仅对高剂量的潮霉素表现出一定的敏感性.当潮霉素浓度为 2 560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,第 7 d 藻细胞死亡率为 85.2%.而当潮霉素浓度低于 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,小球藻的生长在第 1 2 d 受到一些抑制后,从第 3 d 又逐渐恢复正常(见表 4).

表 4 小球藻对不同剂量潮霉素的敏感性统计分析

Tab. 4 Statistical analysis of sensitivity of *Chlorella* sp. to different dose of hygromycin

t/d	不同剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 潮霉素中小球藻的死亡率 %										LD_{50} 的 95% 可信限	
	0	20	40	80	160	320	640	1 280	2 560	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
1	0	6.6	2.9	4.3	0.5	0.5	0.5	1.1	2.1	3 184.70	3 186.02~	3 182.37
2	0	8.1	5.1	7.0	4.2	3.5	5.5	4.2	11.7	2 570.40	2 572.76~	2 568.04
3	0	5.0	2.3	4.7	3.0	1.1	3.6	8.5	27.7	2 454.71	2 456.99~	2 452.43
7	0	0	2.7	0	0	0	3.4	17.1	85.2	1 706.08	1 707.40~	1 704.77

小球藻对 G418 有一定的耐受性,1 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418 第 7 d 可使绝大部分藻细胞死亡.当 G418 浓度低于 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,小球藻的生长在第 1 2 d 受到一些抑制后,从第 3 d 开始也有一定恢复(见表 5).

表 5 小球藻对不同剂量 G418 的敏感性统计分析

Tab. 5 Statistical analysis of sensitivity of *Chlorella* sp. to different dose of G418

t/d	不同剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) G418 中小球藻的死亡率 %										LD_{50} 的 95% 可信限	
	0	10	20	40	80	160	320	640	1 280	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
1	0	7.4	7.7	6.4	6.9	8.5	9.3	9.8	10.6	1 139.75	1 141.46~	1 139.04
2	0	10.3	10.5	10.5	10.1	9.6	11.8	14.9	18.1	933.25	934.42~	932.09
3	0	6.8	6.7	5.3	5.8	7.4	9.9	17.9	42.5	891.25	892.32~	890.18
7	0	0	0.6	0.6	5.9	11.8	24.4	59.2	96.4	456.04	456.52~	455.56

小球藻对氯霉素很敏感,在相同的剂量下氯霉素对小球藻的致死率明显高于 G418 和潮霉素,320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯霉素第 7 d 可使藻细胞全部死亡(见表 6).

表 6 小球藻对不同剂量氯霉素的敏感性统计分析

Tab. 6 Statistical analysis of sensitivity of *Chlorella* sp. to different dose of chloramphenicol

t/d	不同剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 氯霉素中小球藻的死亡率 %										LD_{50} 的 95% 可信限	
	0	2.5	5	10	20	40	80	160	320	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
1	0	0.7	0	0	0	5.4	6.1	6.2	7.0	374.98	375.23~	374.72
2	0	8.7	5.8	8.2	9.2	20.2	24.3	27.2	31.7	177.01	177.26~	176.76
3	0	8.2	6.7	11.4	16.3	32.1	42.2	43.8	49.9	105.20	105.36~	105.03
7	0	6.7	2.0	3.3	5.3	30.8	63.6	80.9	100	59.55	59.64~	59.49

小球藻对 Zeocin 极敏感, Zeocin 在低浓度下即对小球藻的生长有明显的抑制作用, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时第 7 d 的致死率即达 44.7%, 320 $\mu\text{g/mL}$ 的 Zeocin 第 7 d 可使藻细胞全部死亡(见表 7).

表 7 小球藻对不同剂量 Zeocin 的敏感性统计分析
Tab. 7 Statistical analysis of sensitivity of *Chlorella* sp. to different dose of Zeocin

t/d	不同剂量 ($\mu\text{g/mL}$) Zeocin 中小球藻的死亡率 %									LD_{50} 的 95% 可信限	
	0	2.5	5	10	20	40	80	160	320	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	0	0	0	0	0	0	0	0.2	2.1	445.25	445.75~445.56
2	0	5.1	0	5.0	0.2	0	0.7	16.5	27.1	316.24	316.52~315.95
3	0	12.1	8.2	14.6	12.2	12.1	15.8	29.5	46.9	158.49	158.72~158.26
7	0	44.7	40.8	47.7	49.4	54.1	62.6	75.3	100	16.86	16.90~16.84

2.3 淡化液体培养中小球藻对 4 种抗生素的敏感性

已知抗生素在一定的离子浓度下才有效, 在筛选海洋生物基因工程的选择标记时, 就需考虑盐度的影响. 曹军平、李杰等报道淡化培养基中藻对抗生素的敏感性大为增加^[14-15]. 为了兼顾选择剂的效果和小球藻的生长, 设计了一系列的梯度淡化实验. 结果表明在稀释 10 倍的培养基中, 小球藻的生长未受到影响, 且对抗生素的敏感性大为提高. 而低稀释倍数时, 抗生素的作用浓度仍较大, 完全淡化处理则对小球藻的生长有一定

影响. 因此又在稀释 10 倍的培养基中测定小球藻对这 4 种抗生素的敏感性.

在淡化培养基中, 小球藻对潮霉素的敏感性大为提高, 其浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 便对小球藻的生长产生一定的抑制作用, 当其浓度为 640 $\mu\text{g/mL}$ 时, 第 7 d 藻细胞全部死亡(见表 8).

淡化培养也使小球藻对 G418 更为敏感, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 G418 就对小球藻有明显抑制作用, 160 $\mu\text{g/mL}$ 的 G418 第 7 d 使藻细胞全部死亡. 但其作用时间略有延缓, 第 1-2 d 几乎不影响藻的生长(见表 9).

表 8 淡化液体培养基中小球藻对不同剂量潮霉素的敏感性统计分析
Tab. 8 Statistical analysis of sensitivity of *Chlorella* sp. to hygromycin in decreasing NaCl concentration medium

t/d	不同剂量 ($\mu\text{g/mL}$) 潮霉素中小球藻的死亡率 %									LD_{50} 的 95% 可信限	
	0	5	10	20	40	80	160	320	640	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	0	0	1.2	0	1.8	1.2	0	0	0	879.02	879.26~878.78
2	0	7.2	12.3	11.6	17.8	18.1	14.5	15.6	23.3	393.55	394.09~393.01
3	0	15.3	25.9	15.9	33.2	34.9	31.8	34.9	40.9	179.89	180.20~179.58
7	0	12.2	31.6	52.9	75.8	82.6	85.2	92.9	100	22.48	22.52~22.46

表 9 淡化液体培养基中小球藻对不同剂量 G418 的敏感性统计分析
Tab. 9 Statistical analysis of sensitivity of *Chlorella* sp. to G418 in decreasing NaCl concentration medium

t/d	不同剂量 ($\mu\text{g/mL}$) G418 中小球藻的死亡率 %									LD_{50} 的 95% 可信限	
	0	2.5	5	10	20	40	80	160	320	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	452.90	452.90~452.90
2	0	0	0	0	0	0	0	10.1	24.3	356.40	356.70~356.20
3	0	16.2	16.7	6.4	8.7	12.2	22.8	38.2	47.6	140.28	140.49~140.07
7	0	85.6	87.2	91.6	92.6	95.1	98.8	100	100	2.48	2.48~2.48

淡化培养时小球藻对氯霉素也更为敏感, 氯霉素浓度为 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 便对小球藻的生长产生明显的抑制作用, 当其浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, 第 7 d 藻细胞全部死亡(见表 10).

表 10 淡化液体培养基中小球藻对不同剂量氯霉素的敏感性统计分析

Tab. 10 Statistical analysis of sensitivity of *Chlorella* sp. to chloramphenicol in decreasing NaCl concentration medium

<i>t</i> /d	不同剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 氯霉素中小球藻的死亡率 <i>%</i>									LD_{50} 的 95% 可信限	
	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	0	8.8	8.2	8.2	6.5	9.4	11.8	15.3	14.7	127.34	127.50~127.20
2	0	19.9	21.4	22.8	27.5	34.8	44.6	56.9	53.3	32.23	32.27~32.15
3	0	29.2	26.7	29.5	39.5	42.9	58.8	70.7	68.8	17.91	17.94~17.87
7	0	24.6	15.3	22.3	42.5	51.0	88.5	100	100	10.42	10.44~10.41

淡化培养时小球藻对 Zeocin 仍然极敏感, Zeocin浓度为 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,第 7 d藻细胞全部死亡. 但同 G418相似,其作用时间略为延缓,第 1 2 d几乎不影响藻的生长(见表 11).

由表 8~ 11可见,在淡化 10倍的液体培养基中,小球藻对 4种抗生素的敏感性大为提高. 相同的培养时间内,当小球藻的起始浓度相同时,淡

化培养基中抗生素对小球藻的半致死剂量远远低于海水培养基中的值.

例如:潮霉素 168 h 的 LD_{50} 从 $1\,708.00\mu\text{g}/\text{mL}$ 降为 $22.48\mu\text{g}/\text{mL}$, Zeocin 168 h 的 LD_{50} 也从 $16.80\mu\text{g}/\text{mL}$ 降为 $1.16\mu\text{g}/\text{mL}$. 因此在以抗生素做选择剂,大规模培养转基因小球藻时,可以考虑采用淡化培养基.

表 11 淡化液体培养基中小球藻对不同剂量 Zeocin的敏感性统计分析

Tab. 11 Statistical analysis of sensitivity of *Chlorella* sp. to Zeocin in decreasing NaCl concentration medium

<i>t</i> /d	不同剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Zeocin中小球藻的死亡率 <i>%</i>									LD_{50} 的 95% 可信限	
	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$LD_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	226.46	226.46~226.46
2	0	0	0	0	0	0	0	14.0	23.0	190.98	191.10~190.87
3	0	10.5	13.6	10.8	3.0	15.7	27.5	37.3	55.9	67.64	67.71~67.51
7	0	88.3	92.8	89.1	92.3	97.9	100	100	100	1.16	1.17~1.16

3 讨 论

小球藻对氯霉素 G418 潮霉素、Zeocin较敏感,与其他真核藻类的报道较为一致. 其中,氯霉素是藻类普遍敏感的抗生素,其干扰细胞内核糖体的蛋白质合成,抑制细胞生长并最终导致死亡^[11~16]. 而 *cat* 基因编码的氯霉素乙酰转移酶可使氯霉素乙酰化而失活. 小球藻对氯霉素很敏感,但氯霉素的溶剂——乙醇,对小球藻也有很强的毒害作用,选择氯霉素做小球藻转基因的选择抗生素时需考虑此问题. 新霉素磷酸转移酶基因(*npt II*)和潮霉素磷酸转移酶基因(*hpt*)是在植物基因转化中广泛应用的选择标记. *npt II*编码的产物通过酶促磷酸化使氨基葡萄糖苷类抗生素失活,从而解除毒性. *hpt*基因编码潮霉素磷酸转移酶使潮霉素分子结构上的某个羟基发生磷酸化而使其失活,本实验表明,小球藻对潮霉素的敏感性较低,但是在淡化培养基中其敏感性大增,有可能成为小球藻转化的选择试剂. 小球藻对 G418较敏感,这与陈颖等的结果较吻合^[5],但作用剂量

不同,可能是使用的藻种和培养基有差异所致. 这是在进行藻类转基因工作时必须注意的问题. Zeocin通过诱导对细胞内 DNA 的损伤以非特异性的方式起作用, *ble* 基因编码对 Zeocin有很强亲和力的蛋白,该蛋白可结合 Zeocin使之不能切离 DNA. 在本实验中小球藻对 Zeocin极为敏感,有可能成为其转化的高效选择试剂. 其他 6种抗生素小球藻对其不敏感,可用做小球藻除菌的工具.

4 结 语

本实验测定了小球藻对 10种常见抗生素的敏感性,找到了 4种有效的选择试剂,测定了小球藻对这 4种抗生素在海水液体培养基和淡化液体培养基中的半致死剂量,为确定小球藻基因工程中适用的阳性选择标记基因提供了实验依据. 利用这些选择标记构建表达载体转化小球藻,经过筛选得到表达目的基因的藻体,可能在小球藻基因工程等方面发挥重要作用,相关工作正在进行中.

参考文献:

- [1] 秦 松, 张 健, 李文斌, 等. 用基因枪将 GUS 基因导入褐藻细胞中表达 [J]. 海洋与湖沼, 1994, **25**(4): 353-357
- [2] 匡 梅, 王素娟, 李 瑶, 等. 基因枪作用下的外源 GUS 基因在四种红藻组织块中的瞬间表达 [J]. 水产学报, 1998, **22**(2): 178-181
- [3] 武建秋, 秦 松, 邓 田, 等. 氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因在海带中的表达 [J]. 海洋与湖沼, 1999, **30**(1): 28-33
- [4] 秦 松, 于道展, 姜 鹏, 等. β -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, **13**(7): 87-89
- [5] 陈 颖, 李文彬, 张利明, 等. 小球藻对 5 种常用基因工程抗生素的敏感性研究 [J]. 海洋与湖沼, 1999, **30**(5): 500-505
- [6] CHEN Y, LI W B, BAI Q H, *et al.* Study on transient expression of gus gene in *Chlorella ellipsoidea* (Chlophyta) by using biolistic particle delivery system [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 1998, **16**(Suppl): 47-49
- [7] 王义琴, 陈 颖, 白琴华, 等. 以小球藻为载体生产免疫素的研究 [J]. 高技术通讯, 2001, **11**(9): 1-5
- [8] JARVIS E E, BROWN L M. Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga *Chlorella ellipsoidea* [J]. *Curr Genet*, 1991, **19**(4): 317-321
- [9] EL-SHEEKH M M. Stable transformation of the intact cells of *Chlorella kessleri* with high velocity microprojectiles [J]. *Biologia Plantarum*, 1999, **42**(2): 209-216
- [10] KIM D H, KIM Y T, CHO J J, *et al.* Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga *Chlorella ellipsoidea* [J]. *Mar Biotechnol*, 2002, **4**(1): 63-73
- [11] 武建秋, 王希华, 秦 松, 等. 海带基因工程选择标记的研究 [J]. 海洋科学, 1995, **5**: 42-44
- [12] 黄 健, 唐学玺, 官相忠, 等. 海洋微藻基因工程的选择标记 [J]. 植物学报, 2000, **42**(8): 841-844
- [13] 耿德贵, 王义琴, 李文彬, 等. 杜氏盐藻基因工程选择标记的研究 [J]. 生物技术, 2001, **11**(5): 1-3
- [14] 曹军平, 费志清, 刘必谦, 等. 金藻基因工程选择标记的研究 [J]. 海洋科学, 2001, **25**(7): 6-8
- [15] 李 杰, 刘 颖, 黄洁虹, 等. G418 和氯霉素作为转基因盐藻的抗生素筛选标记 [J]. 生物技术, 2003, **13**(3): 22-23
- [16] 于道展, 杨玲玲, 姜 鹏, 等. 裙带菜基因工程选择标记的研究 [J]. 高技术通讯, 2003, **13**(6): 74-77
- [17] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992
- [18] 张毓琪, 陈叙龙. 环境生物毒理学 [M]. 天津: 天津大学出版社, 1993 257-258

Study of selectable markers in genetic engineering of *Chlorella* sp.WANG Yi yun^{*}, WANG Chang hai

(Dept. of Biosci. and Biotechnol., Dalian Univ. of Technol., Dalian 116024, China)

Abstract The sensitivities of *Chlorella* sp. to 10 antibiotics gentamicin, neomycin, ampicillin, kanamycin, cephalothin, streptomycin, G418, hygromycin Zeocin and chloramphenicol were investigated. The results show that *Chlorella* sp. is not sensitive to gentamicin, neomycin, ampicillin, kanamycin, cephalothin and streptomycin, and they cannot inhibit the growth of *Chlorella* sp. in the concentration of this test. However, it is relatively sensitive to G418 and hygromycin, and very sensitive to Zeocin and chloramphenicol. LD_{50} and 95% confidence ranges of these four reagents in both seawater culture and decreasing NaCl concentration medium were calculated respectively. The results provide important data in developing selectable markers in genetic engineering of *Chlorella* sp.

Key words *Chlorella* sp.; antibiotics; LD_{50} ; selectable marker