

# 自然水样微型藻类遗传多样性的方法学研究\*

邵鹏<sup>1</sup> 袁洁<sup>1</sup> 陈月琴<sup>1\*\*</sup> 屈良鹄<sup>1</sup> 黄邦钦<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中山大学基因工程教育部重点实验室 广州 510275)

(<sup>2</sup> 厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室, 环境科学研究中心 361005)

**摘要** 以海洋微型藻类为研究材料, 探索和建立了适用于自然水样中低浓度微型藻类遗传多样性研究的分子生物学方法, 为进一步开展海洋微型藻类多样性研究提供了新的分析手段。并在此基础上, 对厦门西海域真核藻部分种群的结构特点进行了初步分析。

**关键词** 微型藻类, rDNA, 遗传多样性

海洋微型藻类是一类重要的浮游生物, 它们在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着十分重要的作用<sup>[1-5]</sup>。然而, 由于微型浮游生物个体微小, 许多种类难以在实验室人工培养, 致使人们对海洋微型浮游植物的生物多样性的认识还十分不够。采用新的方法和手段来研究海洋微型藻类的遗传多样性已成为目前海洋微型浮游生物研究的重要内容之一, 对全球生物多样性的研究和保护具有重要理论意义。

鉴于海洋微型藻类个体微小, 自然水样中微藻样品丰度较低的特点, 本研究建立了少量微型藻类 DNA 提取、文库构建和 RFLP 等方法, 为海洋微型藻类多样性研究提供了分子生物学的可行性方法, 并在此基础上对厦门西海域真核藻类种群的结构特征进行分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻样来源

样品是于 2000 年 12 月采自厦门西海域, 1 000 ml 海水经 200 μm 浮游生物网过滤后, 弃其大型藻类和原生浮游动物, 然后离心(5 000 r/min, 离心 5 min), 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇浸泡, -20℃ 保存。

### 1.2 藻样总 DNA 制备

将用乙醇保存的藻样经离心处理后, 加入藻类提取液(1% SDS, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L NaCl), 然后和适量石英砂一起涡旋并作冷热处理, 反复数次后, 用等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1) 抽提后取上清, 加入 1/10 体积的 3 mol/L pH 5.2 NaAc, 混匀后加入 3 倍体积的乙醇, 于 -20℃ 沉淀过夜。藻样总 DNA 采用本实验室 DPS 纯化系统纯化。即用 6 mol/L NaI 处理总 DNA 后, 加入适

量玻璃粉, 稍稍振荡, 静置 8 min, 用 DPS 溶液(95% 乙醇 29 ml, 5 mol/L KAc 0.8 ml, 1 mol/L Tris-HCl 4.2 ml, 0.5 mol/L EDTA 4.0 μl, 用无菌三蒸水定容至 50 ml) 洗涤, 真空抽干后用 TE 液溶解。

### 1.3 PCR 反应及纯化

将藻样总 DNA 经简单的稀释后, 直接用于目的片段的扩增。20 μl PCR 反应液中含 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mmol/L dNTPs, 10× buffer, 1 μl DMSO, 0.25 U Taq DNA 聚合酶(Sangon 公司), 采用扩增真核生物 18S rDNA 通用引物 18N5: 5' TGGTGCCAGCAGCCGCGGT3', 18N1R: 5' CTCAGTAAGCTTGATCCTCCGCAGTTCACC3'。扩增程序为: 94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 30 个循环; 最后 72℃ 10 min。扩增完成后, 取 2 μl 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查, 切取 PCR 产物目的片段(约 1 200 bp) 后用 Qiagen 公司的割胶纯化试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit) 纯化。

### 1.4 文库的构建及克隆子筛选

割胶回收产物经纯化后与载体 pTZ19 进行连接反应<sup>[2]</sup>, 并转化感受态大肠杆菌 TG1, 在含有 Amp 及 Xgal 的 2YT 培养平板上, 置于 37℃ 倒置培养过夜。

\* 国家自然科学基金资助项目 39970063 和 40076031 号; 广东省自然科学基金资助项目 001213 号。

\*\* 通讯作者

第一作者: 邵鹏, 出生于 1977 年, 硕士研究生。研究方向: 基因结构与进化。E-mail: lsp00sp@student.zsu.edu.cn; 电话: 020-84036952

本工作在分子生物学技术上得到中山大学生物工程中心周惠副教授的帮助, 谨此致谢。

收稿日期: 2001-10-08; 修回日期: 2002-01-15

在平板上挑取白斑单菌落并转移到另一含 Amp 及 Xgal 平板上划线培养。待 6~8 h 后,提取菌体质粒。用引物 18N5 和 18N1R 作 PCR 反应,电泳检测,取能扩增出目的片断并且其质粒经 EcoRI 和 BamHI 双酶切检测为目的片断的重组子,用同位素  $\gamma$ -P32 标记的引物 18N1R 进行菌体原位杂交和质粒原位杂交,做初步筛选。提取初筛的质粒 DNA,选择酶切位点为 4 bp 的两种 DNA 内切酶 HaeIII、HhaI 对 PCR 产物进行 RFLP 分析。

### 1.5 18S 部分序列的测定

用 Qagen 公司提供的质粒提取试剂盒提取所要的克隆子质粒 DNA,377 型自动测序仪 (ABI PRISM) 进行序列测定。测序引物为质粒上的引物, M3/ pUC Sequencing Primer (-47): 5' CGCCAGGGTTTCCAGF CACGAC 3' 和 M3/ pUC Sequencing Primer (-48): 5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3'

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取与 PCR 扩增

水样中混合藻样总 DNA 18S rDNA 部分基因的 PCR 扩增结果见图 1-A 道 (加入石英砂反复冻融法提取)。图 2-B 道为没有加入石英砂提取总 DNA 时的 18S rDNA 部分基因的 PCR 扩增结果。比较图 1 PCR 扩增结果可知,加入适量的石英砂与样品一起涡旋处理,配合藻样提取液能从低浓度藻类水样中提取出较高的浓度以进行 PCR 扩增反应。

### 2.2 文库构建与阳性克隆子筛选结果

虽然 PCR 扩增结果有明显的真核藻类特异性



图 1 加入石英砂处理的总 DNA PCR 反应扩增结果  
Fig.1 PCR amplification with genomic DNA treated by silica sand  
M: 2kb marker A: 藻类 PCR 结果



图 2 未加入石英砂处理的总 DNA PCR 反应扩增结果  
Fig.2 PCR amplification with genomic DNA not treated by silica sand  
M: 2kb marker B: 藻类 PCR 结果

DNA 扩增带,但由于 PCR 混合液中含有混合样品的微量总 DNA,对文库的构建与筛选会造成一定的影响。因此,克隆前作者对 PCR 产物进行割胶纯化。割胶纯化后的 PCR 产物直接与载体 PTZI9 连接,转化后获得数百个阳性克隆子。实验用空载体质粒 DNA 为负对照,杂交温度采用 50 °C,并在 25 °C 洗膜,最后从 192 个克隆子中筛选出 118 个有杂交信号的阳性克隆子。

### 2.3 RFLP 分析和 18S rDNA 部分序列测定

从文库中筛选到的所有阳性克隆子中不可避免地存在同一真核藻类的不同克隆,所以为了避免重复测序,以减少测序的工作量和费用,经多种核酸内切酶进行酶切试验,最后选用两种不同的核酸内切酶 HaeIII、HhaI 对质粒 DNA 的 PCR 产物进行 RFLP 分析。考虑到 PCR 产物片断较短,用双酶切方法有时很难对小片断进行分型,故对 PCR 产物分别选取一种酶切逐个分型,得到很好的分析度。分析结果得到 17 种酶切带型。每种 RFLP 型选择 1~2 个进行序列测定。把所测得的全部序列输入到国际分子生物学数据库 (收录号见表 1),以 Blast 程序进行比较分析,结果见表 1。

## 3 讨论

### 3.1 关于海洋微型藻类 DNA 提取及纯化方法的探讨

对于藻类 DNA 提取方法已有许多的报道,基本上是用 TES 溶液即 Tris-HCl (pH 8.0)、EDTA (pH 8.0) 和 NaCl,还有加入 10% SDS。有些改良的方法也提到

表 1 厦门西海域真核微藻藻样 18S rDNA 克隆的序列分析

Tab.1 Sequence analysis of the 18S rDNA of micro algae from the coastal waters of Xiamen

克隆子编号	比较序列长度(bp)	GenBank 收录号	最相似物种及相似性	系统类群
XMA11	700	X85396	<i>Thalassiosira eccentrica</i> (97%)	Bacillariophyta
XMA21	700	X85396	<i>Thalassiosira eccentrica</i> (96%)	Bacillariophyta
XMA37	700	X85393	<i>Skeletonema pseudocostatum</i> (95%)	Bacillariophyta
XMA39	700	X85396	<i>Thalassiosira eccentrica</i> (93%)	Bacillariophyta
XMA43	700	X85393	<i>Skeletonema pseudocostatum</i> (92%)	Bacillariophyta
XMC17	700	X85393	<i>Skeletonema pseudocostatum</i> (strain CCMP 1077/6) (92%)	Bacillariophyta
XMD04	700	X85396	<i>Thalassiosira eccentrica</i> (95%)	Bacillariophyta
XMA28	700	AJ404886	<i>Pyramimonas australis</i> (96%)	Chlorophyta
XMA44	700	AF290539	<i>Cryptothecomonas aestivalis</i> strain 1 (97%)	Cryptothecomonas
XMB04	700	AF363191	Eukaryote marine clone ME1 - 22 (96%)	Picoplankton
XMC27	700	AF363191	Eukaryote marine clone ME1 - 22 (95%)	Picoplankton
XMB43	700	AF123289	<i>Dinobryon sertularia</i> (91%)	Chrysophyceae
XMD34	700	AF109323	<i>Paraphysomonas imperforata</i> (94%)	Chrysophyceae
XMC07	700	AF022196	<i>Gymnodinium</i> sp. MUCC284 (96%)	Dinophyceae
XMD17	700	AF276818	<i>Gymnodinium sanguineum</i> (97%)	Dinophyceae
XMC08	700		Unidentified sequence	
XMD33	700		Unidentified sequence	

用溶菌酶、蛋白酶 K 等。由于所得藻样总量很少,而且经酒精处理以后海藻的细胞壁变得更为坚硬,所以用一般的提取方法很难得到理想的效果,而且所提取的 DNA 中残留的少量 SDS 会对以后 PCR 反应造成影响<sup>[3]</sup>。用 DPS 纯化系统或用试剂盒纯化去除少量的 SDS 和以后的割胶纯化又在很大程度上减少了 DNA 浓度,这无疑给分析工作带来困难。为此,本实验对提取方法稍作改进,采用藻类提取液(1%SDS,10 mmol/L EDTA pH 8.0,10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,10 mmol/L NaCl),并加入了少量的石英砂混匀后进行高速涡旋,并经数次的液氮反复冻融等处理后,所得的总 DNA 浓度较高,经过 DPS 纯化系统纯化后直接进行 PCR 反应得到较好的扩增结果(见图 1)。而割胶纯化对 DNA 的损失程度来说是比较大的,故要求 PCR 扩增产物的要有足够的丰度才不至于影响以后文库的构建。

### 3.2 引物的选择

有关扩增海洋浮游植物的引物设计的报道很多<sup>[6]</sup>,许多相关的研究是集中在通过分析 rRNA 基因来研究微型浮游生物的多样性和系统发育<sup>[7]</sup>。起初 PCR 引物是以真核生物通用引物 18 N1:5' AACCTGGTTGATCTGCCAGT3' 和 18 N1R 扩增 18Sr DNA 全基因,但扩增结果不理想。最后选择位于 610~630(forward) 5'

TGGTGCCAGCAGCCGCGTA3', 和 18 N1R(reverse) 5' CTCAGTAAGCTTGATCCTTCCGAGGTTACC3'。这段序列作为引物,则可获得较好的扩增产物。而且大量实验结果表明分析藻样系统发育特征用 18S rRNA 基因全序列分析和用部分序列分析结果是一致的<sup>[7]</sup>,所以作者采用扩增真核藻类 18SrDNA 的通用引物 18N5 和 18N1R 对混合样中真核藻类 18S rDNA 部分序列进行扩增。

### 3.3 厦门西海域微型真核微藻遗传多样性的初步研究

应用 RFLP 对 18Sr DNA 文库中 118 个阳性克隆子的 PCR 产物进行分析。研究表明以酶切带型的大小可以用于区分不同种水平上的藻样,而同种水平上的酶切带型应几乎是相同的<sup>[8]</sup>。RFLP 分析结果共得到 17 种带型,表明该混合样中至少由 17 个不同种真核藻类构成。对序列结果进行初步分析,发现该水样中微型真核藻类主要由硅藻(Bacillariophyta)的海链藻属(*Thalassiosira*)与骨条藻属(*Skeletonema*)、金藻(Chrysophyceae)的锥囊藻属、甲藻(Dinophyceae)的裸甲藻属(*Gymnodinium*)、绿藻(Chlorophyta)等真核藻类组成,还有两种未明确分类或鉴定的真核藻类,其中以硅藻门在真核藻类种群组成上占主要位置(41%),为优势类群;其次是甲藻和金藻纲。骨条藻属占 18%,

这比例较低,这可能与取样季节有关,因为夏季是骨条藻繁殖高峰期<sup>[4]</sup>,而本研究则是在冬季取样。按最大同源性的方法对所测的序列进行排列比较,采用 DNASTAR(version 4.0) 软件包进行分析,计算序列间核苷酸差异值,发现克隆子序列之间的相似性都不高,与酶切分型结果吻合。而同是海链藻属的不同序列,其相似性介于 88.8%~95.5%。

总之, PFLP 分析和序列数据分析结果表明了该样品中微型真核藻类群落具有较大的多样性。但由于本研究对象为海洋微型真核藻类,势必带有很大的局限性,至少排除了其他构成多样性的原核藻类如蓝藻、浮游细菌等的研究,加上样品是单一取样,相对于厦门西海域广阔的海域区域而且是生境多变的条件来说,这是否就意味着厦门西海域微型浮游生物有着更大的生物多样性?而未被明确分类鉴定的真核藻类的存在,是否说明该海域蕴藏着更诱人的生物资源呢?对于厦门西海域超微型浮游植物遗传多样性问题,将作进一步的研究。

#### 参考文献

1 黄邦钦等. 厦门西海域微微型浮游植物的时空分布及

其调控机制, 台湾海峡, 2000, 19(3): 329~336

- 2 萨姆布鲁克 J., 弗里奇 E.F., 曼尼阿蒂斯 T. . 分子克隆实验指南(第 2 版). 北京: 科学出版社, 1996. 34~69
- 3 陈月琴、屈良鹤等. 甲藻单个细胞 DNA 的制备及在赤潮藻类分子鉴定中的应用, 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36(4): 66~69
- 4 杨清良等. 厦门东侧海域浮游植物的种类组成与分布, 台湾海峡, 2000, 19(3): 337~343
- 5 Huang B. Q., Hong H., Wang H. . Size-Fractionated primary productivity and the phytoplankton-Bacteria relationship in the Taiwan Strait, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1999, 183: 29~38
- 6 Ulrich Nibel *et al.* . PCR primer to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 3327~3332
- 7 Bart Nelissen *et al.* . Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16SrRNA sequence analysis, *J. Mol. Evol.*, 1996, 42: 194~200
- 8 Akira Hiraishi *et al.* . Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens, *J. Ferment Bioeng.*, 1995, 79: 523~529

## METHODOLOGICAL STUDY ON THE GENETIC DIVERSITY OF MICROALGAE IN THE NATURAL WATERS

SHAO Peng<sup>1</sup> YUAN Jie<sup>1</sup> CHEN Yue-qin<sup>1</sup> QU Liang-hu<sup>1</sup> HUANG Bang-qin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Gene Engineering of Education Ministry, Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou, 510275)

(<sup>2</sup> Marine Environmental Lab. of Education Ministry, Environmental Science Research Center, Xiamen University, 316005)

Received: Oct., 8, 2001

Key Words: Microalgae, rDNA, Genetic diversity

### Abstract

The molecular biological methods for studying the genetic diversity of microalgae at low concentration in the natural waters were developed and discussed in the paper, which provided new analysis methods for the further research. It was demonstrated that the methods were useful for analyzing natural populations and solving the problems resulting from the analysis for the organisms that are difficult or even impossible to propagate in the laboratory. (本文编辑:张培新)