

# 一种快速制备甲藻细胞 PCR 扩增 DNA 模板的方法

张 炎, 韩笑天, 邹景忠, 周名江, 王广策

(中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境重点实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:**报道了一种快速制备 PCR 扩增甲藻细胞模板 DNA 的方法。以赤潮甲藻塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 和链状亚历山大藻 (*A. catenella*) 为目标藻, 对藻液预处理后直接用于 PCR 扩增, 获得 5.8S 核糖体 RNA 基因及其两侧的核糖体 RNA 基因转录单元内基因间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列片段, 成功测序。此方法避免了复杂的 DNA 提取过程。

**关键词:**赤潮甲藻; 亚历山大藻(*Alexandrium*); 转录单元内基因间隔区; PCR 扩增  
**中图分类号:** Q78    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3096(2005)11-0001-03

赤潮甲藻的分类和鉴定是赤潮研究中较为困难的工作之一, 尤其是某些微型甲藻的分类和鉴定。赤潮甲藻塔玛亚历山大藻和链状亚历山大藻是 2 个有毒种, 二者细胞形态非常相似, 仅在顶孔板形状、后连接孔位置、腹孔等特征有微小差异<sup>[1]</sup>。过去十几年中在光学显微镜和电子扫描显微镜下, 常常被鉴定为同一个种。分类学者无法从形态上区分塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 和链状亚历山大藻 (*A. catenella*), 统称为“*tamarense complex*”<sup>[1]</sup>。20 世纪 90 年代以来, 分子生物学技术的运用, 为甲藻分类鉴定提供了新手段<sup>[2]</sup>。从 DNA 水平寻找甲藻的遗传特征, 获得稳定、可靠的标志物, 已获得初步结果<sup>[3-6]</sup>。目前广泛用于甲藻系统发育研究的标志物有核糖体 RNA 大小亚基基因及转录单元内间隔区等<sup>[3, 4, 7]</sup>。获取标志物序列, 需要提取甲藻总 DNA, 再通过特异引物扩增, 该过程较复杂, 需要建立快捷便利的制备甲藻细胞 PCR 扩增 DNA 模板的方法, 从而提高分析速度。

作者以采自东海海域的塔玛亚历山大藻和链状亚历山大藻为材料, 建立了一种快速制备甲藻细胞 PCR 扩增 DNA 模板的方法。

## 1 材料

### 1.1 藻种

采集自东海长江口海域孢囊萌发产生的塔玛亚历山大藻 ATDH 和链状亚历山大藻 ACDH, 由国家海洋局第三海洋研究所顾海峰提供。

培养条件: 室温 20℃, 光照 3500~3800 lx, 光暗比 12 h/12 h, f/2 培养液。

### 1.2 PCR 引物

引物 ITSn1 (32bp): 5'-gTCgTCgACgTAgg-TgAACCTgCAGAAggATC-3', 引物 ITSn2 (29bp): 5'-CCTgCAGTCgACATATgCTTAAATTCAGC-3'<sup>[7]</sup>, 根据 Gen Bank 中获取的亚历山大藻 18S rDNA 末端保守序列和 28S rDNA 前端保守序列修改, 由成都砒码公司合成。

收稿日期: 2005-01-28; 修回日期: 2005-04-03

基金项目: 国家重点基础研究规划资助项目(2001CB409701); 国家自然科学基金资助项目(40376040 号)

作者简介: 张炎 (1975-), 男 (蒙古族), 内蒙古呼和浩特人, 硕士, 研究方向: 海洋环境生物学, 电话: 0532-82898597, E-mail: fire2zhang@gmail.com; 韩笑天, 通讯作者, E-mail: xthan@ms.qdio.ac.cn



## 2 方法

### 2.1 藻细胞预处理

分别取 1.2 mL 对数生长期的塔玛亚历山大藻和链状亚历山大藻藻液于两个 1.5 mL 离心管中, 4000 r/min 离心 10 min, 弃去上清; 向藻细胞沉淀中加入 1.2 mL dH<sub>2</sub>O, 迅速将两个小管转移至 90~100 °C 水浴中放置 10 min。

### 2.2 PCR 扩增及产 PCR 产物

将藻细胞预处理液直接作为 PCR 扩增反应的模板。50 μL PCR 反应体系含有 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 约 10 ng 模板 DNA, 0.2 mmol/L dNTPs, 各条引物 0.2 μmol/L, 1.2 U Taq DNA 聚合酶。反应体系中每反应加入藻细胞预处理液 1~2 μL。94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

## 3 结果

### 3.1 电泳结果

PCR 扩增完成, 用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 结果见图 1。

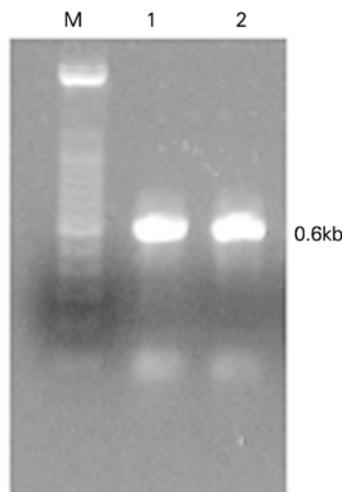


图 1 5.8S 核糖体 RNA 基因及两侧 ITS 区的 PCR 扩增产物  
Fig.1 PCR product of 5.8S ribosomal RNA gene and two internal transcribed spacers

M 为 100~3000 bp 分子质量标准; 1,2 分别为 ATDH 和 ACDH 的扩增产物。

M: DNA marker; 1,2 are amplified products of ATDH and CDH

### 3.2 PCR 产物测序

PCR 扩增产物经商业纯化和 ABI 测序仪直接双

向测序, 获得 539 bp 长的高质量序列。经与 Gen Bank 中亚历山大藻序列对比, 确定为亚历山大藻。表明藻细胞预处理制备模板 DNA, 不仅可以直接用于 PCR 扩增, 而且扩增产物可直接用于测序。

## 4 讨论

采用藻液 90~100 °C 水浴 10 min 预处理制备 PCR 扩增模板, 比传统酚氯仿抽提获得 DNA 产物的方法和海藻单个细胞 DNA 的制备方法<sup>[5]</sup>更快速、便利。传统方法要经过温浴、裂解、抽提、沉淀等步骤, 需数个小时, 本方法则只需 10 多分钟。

亚历山大藻细胞壁具有脆而易碎的特性, 离心沉淀的细胞中加入 dH<sub>2</sub>O, 使原来培养在海水中的细胞更容易地溶胀破碎, 包括基因组 DNA 在内的细胞内含物释放出来。90~100 °C 高温水浴中变性 DNA 酶抑制其活性, 减少对基因组 DNA 的降解。控制时间 10 min 可以防止高温过久对 DNA 造成损伤。本研究中, 由于扩增片段包含在基因组 DNA 链上单串联多拷贝区域中, 所以部分链的断裂不会影响 PCR 扩增效果。

该方法同样适用于扩增亚历山大藻核糖体大、小亚基基因, 也值得在结构相近的其它微藻上试用。

甲藻是引发赤潮灾害的主要门类。本研究中建立的快速制备甲藻细胞 PCR 扩增 DNA 模板方法, 为赤潮甲藻快速检测、鉴定及监控提供了有效的研究途径, 对赤潮甲藻的遗传分析及分子系统学研究具有重要科学意义。

参考文献:

- [1] Taylor F J R. The taxonomy and relationships of red tide dinoflagellates[A]. Anderson D M, White A W, Baden D G. Toxic Dinoflagellates[C]. New York: Elsevier, 1985. 11 - 26.
- [2] Zardoya R, Costas E, Lopez-Roda V, et al. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences[J]. *J Mol Evol*, 1995, 41:637 - 645.
- [3] Scholin C A, Anderson D M. Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) I. RFLP analysis of SSU rRNA genes[J]. *J Phycol*, 1994, 30:744 - 754.
- [4] Scholin C A, Anderson D M. LSU rDNA-based RFLP assays for discrimination species and strains of *Alexandrium*



- (Dinophyceae) [J]. *J Phycol*, 1996, 32: 1 022 – 1 035.
- [5] 陈月琴、屈良鹄、邱小忠,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[J].中山大学学报(自然科学版), 1997, **36** (4): 66 – 69.
- [6] 陈月琴,屈良鹄,曾陇梅,等.南海赤潮有毒甲藻链状-塔玛亚历山大藻的分子鉴定[J].1999, **21** (3): 106 – 112.
- [7] Godhe A, Anderson D M, Rehnstam-Holm A S. PCR amplification of microalgal DNA for sequencing and species identification: studies on fixatives and algal growth stages[J]. *Harmful Algae*, 2002, 375 – 382.
- [8] Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae) [J]. *J Phycol*, 1994, 30:857 – 863.

## A method for quickly preparing PCR amplification of dinoflagellate total DNA template

ZHANG Yan, HAN Xiao – tian, ZOU Jing – zhong, ZHOU Ming – jiang, WANG Guang – ce

(Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Jan., 28, 2005

Key words: dinoflagellate; *Alexandrium*; internal transcribed spacer; PCR

**Abstract:** A method for quickly preparing PCR amplification of dinoflagellate total DNA template was reported. *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* were solved in advance and used as template of PCR amplification. The production of internal transcribed spacer including 5.8s RNA gene was sequenced. It was demonstrated that the method was simple and useful to molecular analysis of dinoflagellate.

(本文编辑:张培新)