

微绿球藻 DNA 质粒文库的构建

赵大显, 周志刚

(上海水产大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: 微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*) DNA 被提取纯化并经超声波处理后, 将所得大小在 1.6~3 kb 之间的 DNA 片段用 T4 DNA 聚合酶补平, 再与 *Sma* I 酶切消化并经去磷酸化处理的质粒载体 pUC18 连接, 转化至 DH10B 大肠杆菌(*Escherichia coli*)的感受态细胞中。建立的 DNA 质粒文库容量含 2×10^4 个克隆, 其中重组子占 90%。随机挑选白色菌落并培养, 抽提的质粒经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定, 显示重组的质粒中均含有大小不等的 DNA 插入片段。

关键词: 微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*); 超声处理; 质粒载体 pUC18; DNA 文库
中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)05-0087-05

在系统分类地位上, 有人^[1]认为微绿球藻或眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*)属绿藻门(Chlorophyta)、绿藻纲(Chlorophyceae), 也有人^[2,3]认为它属金藻门(Chrysophyta)、真眼点纲(Eustigmatophyceae)。微绿球藻是单细胞藻, 呈球形, 直径 2~4 μm , 单独或集合, 色素体一个, 淡黄绿色, 侧生, 仅占原生质体的一部分, 无蛋白核, 有淀粉粒 1~3 个, 细胞壁极薄^[1]。微绿球藻细胞富含二十碳五烯酸(EPA)^[4,5]、蛋白质、维生素等物质, 是健康食品和药品的重要资源之一。其中, EPA 不仅是水产动物幼体发育必需脂肪酸之一, 还能增强水产养殖动物免疫系统功能, 提高成活率和抗病力^[6,7]。因此, 微绿球藻还是一种非常重要的海产经济饵料微藻^[8,9]。

目前国内外对微绿球藻的研究多集中在藻的培养工艺^[10-16]、分子系统学^[3,17,18]及环境因子对 EPA 生物合成影响等方面。有关环境因子与 EPA 生物合成关系的研究主要涉及温度^[19]、氮源与 N/P^[20-21]、pH^[22]、碳源^[23]等因素对其脂肪酸组成及含量的影响。关于微绿球藻 EPA 生物合成的生化调控机制未见研究报道。作者拟构建微绿球藻 DNA 的质粒文库, 为今后克隆和表达与 EPA 合成相关酶的基因, 进一步探讨藻细胞中 EPA 的生物合成途径及分子调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养

微绿球藻系上海水产大学饵料藻种室提供。使用 f/2 培养液^[24], 在 25℃、3500lx 连续光照的条件下培养至对数生长期, 离心收集。

1.2 DNA 提取

将收集的微绿球藻用灭菌海水清洗 2 次后, 除了

不用鲍鱼酶处理细胞壁外, 其他操作步骤均按 Hu 等^[25]叙述的方法提取 DNA。

1.3 外源插入片段制备

取 DNA 4~5 μg 于 1.5 mL Eppendorf 管中, 用超声波按工作 2 s, 间歇 10 s 的程序多次重复处理, 并在重复过程中, 取 10 μL 已处理的样品, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察处理效果, 尽可能使大部分处理的 DNA 片段集中在 1.6~3 kb 之间。然后用 T4 DNA 聚合酶(TaKaRa 公司)补平超声波处理的 DNA 片段, 100 μL 补平体系含 2.5 U T4 DNA 聚合酶及 2 μL 10 mmol/L 的 dNTPs, 37℃ 水浴反应 1 h 后, 用酚/氯仿终止反应。然后用 QIAquick 胶抽提试剂盒(Qiagen 公司)回收 1.6~3 kb 之间的 DNA 片段。

1.4 克隆载体制备

用限制性内切酶 *Sma* I(TaKaRa 公司)完全消化质粒载体 pUC18 DNA(Invitrogen 公司), 再用碱性磷酸酶(CIP)(NEB 公司)对酶切后的质粒载体(pUC18/*Sma* I)DNA 按 Sambrook 等方法^[26]去磷酸化处理。

收稿日期: 2004 06 30; 修回日期: 2005 02 20

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY03-B-20); 上海市属高校自然科学基金资助项目(01H04)

作者简介: 赵大显(1979), 男, 江西新建人, 硕士研究生, 从事藻类生物技术研究, E-mail: dxzhao@stm.ail.shfu.edu.cn; 周志刚, 通讯作者, 电话: 021-65710533, E-mail: zgzhou@shfu.edu.cn

1.5 连接与转化

将外源插入片段与去磷酸化的质粒 pUC18 混合后,加入 T4 DNA 连接酶(Invitrogen 公司),于 14℃ 温浴过夜。将连接液于 70℃ 灭活 10 min 后,放于漂在 TE 缓冲液(1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)的 Millipore 纯化膜($\phi = 0.025 \mu\text{m}$)上,静置点透析 1.5 h 以达到纯化目的,然后吸出膜上已纯化的连接液放于 1.5 mL 的离心管中,待转化用。

将渗析后的连接液用高压电穿孔法^[26]转化至感受态 DH10B 大肠杆菌(Invitrogen 公司)。转化后立即加入 1 mL 平衡至室温的 SOC 液体培养基^[26],在 37℃ 振荡培养(200 r/min)1 h 后,取 100 μL 菌液涂布到 LB/氨苄/IPTG/X-Gal 平板上,于 37℃ 倒置培养过夜后观察分析菌落生长情况。

1.6 重组质粒鉴定

随机挑取 6 个白色菌落进行小规模培养,用小量质粒抽提纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)提取质粒 DNA,再用 *Xba*I 和 *Sac*I 对提取的质粒 DNA 进行双酶切鉴定。

2 结果与讨论

2.1 DNA 提取

用 Hu 等^[25]的方法自微绿球藻中提取的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 1),表明 DNA 的分子量约为 23 kb,没有 RNA 的污染。通过紫外检测可知, A_{260}/A_{280} 的比值在 1.82~1.89 之间,可用于下一步的酶切及 PCR 实验。

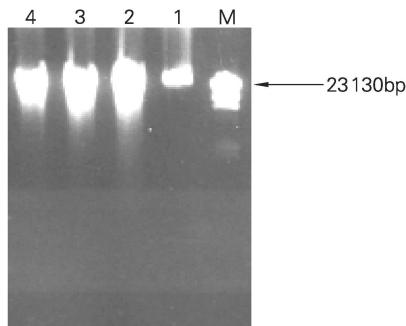


图 1 微绿球藻 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pattern of total DNA isolated from *Nannochloropsis oculata* on 1% agarose gel

M: λ DNA/*Hind* III 大小标准; 1 泳道: λ DNA; 2~4 泳道: 3 次独立提取的 DNA

M: λ DNA/*Hind* III; Lane 1: λ DNA; Lanes 2~4: Independent isolations of DNA from *Nannochloropsis oculata*

2.2 克隆载体制备

超螺旋质粒载体 pUC18 的 DNA 经 *Sma*I 消化处理后于 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 2),结果表明超螺旋质粒 pUC18 的 DNA 经 *Sma*I 酶切后变成了线形 DNA。用牛小肠碱性磷酸酶(CIP)去除线状 DNA 两端的 5' 磷酸基团,可以防止载体的自身连接并环化,从而降低细菌转化时的背景。处理后的质粒 DNA 质量浓度为 25 mg/L。

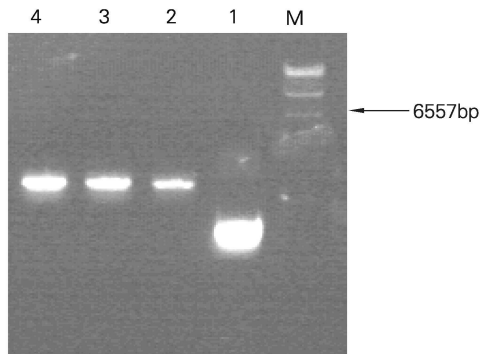


图 2 质粒 pUC18 DNA 的 *Sma*I 酶切图谱

Fig. 2 Restriction map of pUC18 DNA digested by *Sma*I

M: λ DNA/*Hind* III 大小标准; 1 泳道: pUC18 DNA; 2~4 泳道: *Sma*I 酶切后的 pUC18 DNA

M: λ DNA/*Hind* III; Lane 1: pUC18 DNA; Lanes 2~4: pUC18 DNA digested by *Sma*I

2.3 外源插入片段的制备

由于超声波处理的随机性,当微绿球藻 DNA 经超声波打碎后,还有部分核 DNA 未被有效地打断,出现如图 3 所示大于 10 kb 的条带。将超声波处理的 DNA 用 T4 DNA 聚合酶进行末端平滑化,平滑化的 DNA(图 3B)电泳图谱在 1.6~3 kb 之间出现一块明亮且连续的区域。鉴于质粒载体只能插入约 2 kb 大小的外源 DNA,将图 3B 中 1.6~3 kb 之间的 DNA 片段,经 QIAquick 胶抽提试剂盒回收后得到 30 μL 末端平滑化的微绿球藻 DNA,其质量浓度约 30 mg/L。

2.4 连接与转化

末端平滑化的 DNA 与经过 *Sma*I 酶切和去磷酸化处理的质粒 DNA 连接,转化至大肠杆菌 DH10B

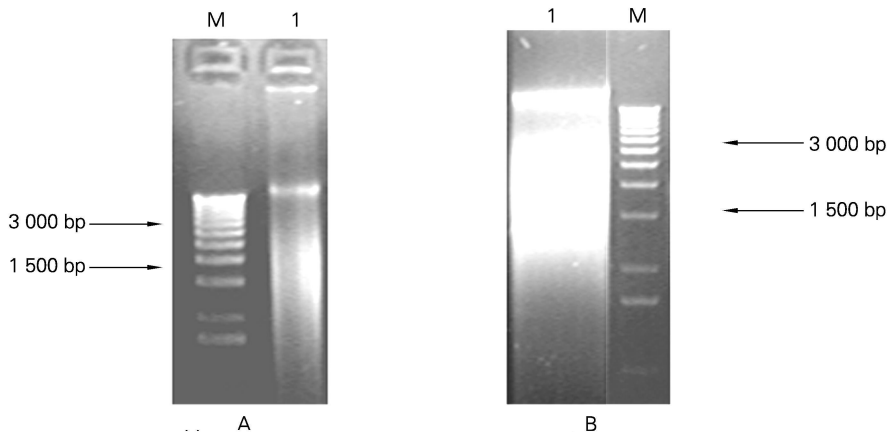


图3 超声处理(A)及末端平滑化(B)的DNA电泳图

Fig. 3 Electrophoresis patterns of ultrasonicated and blunt ended DNAs of *Nannochloropsis oculata*

M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder 大小标准; 1 泳道: 超声处理(A)及平滑化(B)的DNA

M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Lane 1: ultrasonicated (A) and blunt ended (B) DNAs

感受态细胞后,在LB/氨苄/IPTG/X-Gal平板上形成蓝白斑(图4)。从30 μL连接液中取1.5 μL进行转化,加1 mL SOC复性后取100 μL涂平板可得白斑110个,蓝斑12个,白斑(即重组子)约占总菌落的90%,说明微绿球藻基因组DNA已有效地克隆到pUC18载体上。由此估算该基因组文库的容量约为 2×10^4 个克隆。

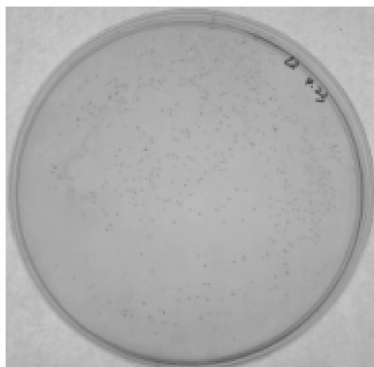


图4 基因组文库的蓝白斑筛选

Fig. 4 Blue/white color screening of genomic library

2.5 重组质粒酶切鉴定

2.5.1 质粒DNA抽提

随机挑取6个白色菌落进行小规模培养,用小量

质粒抽提纯化试剂盒提取质粒DNA,经1%琼脂糖凝胶电泳发现DNA大小在4~6 kb之间(图5)。

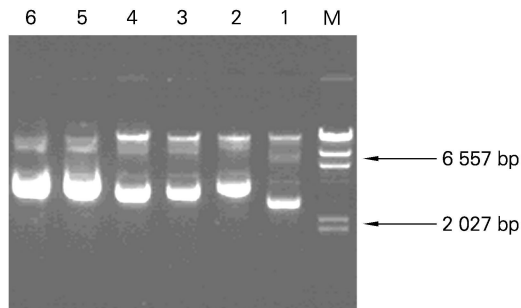


图5 重组质粒DNA的电泳图

Fig. 5 Electrophoresis patterns of recombinant plasmid DNAs

M: λDNA/Hind III大小标准; 1~6泳道: 重组质粒DNA

M: λDNA/Hind III; Lanes 1~6: recombinant plasmid DNAs

2.5.2 双酶切鉴定

重组质粒DNA经Xba I和Sac I双酶切后于1%琼脂糖凝胶的电泳结果如图6,其中约2 700 bp是质粒经双酶切后的共同带,图6同样显示出随机挑取的3个白色菌落中均含有大小不等的插入片段。

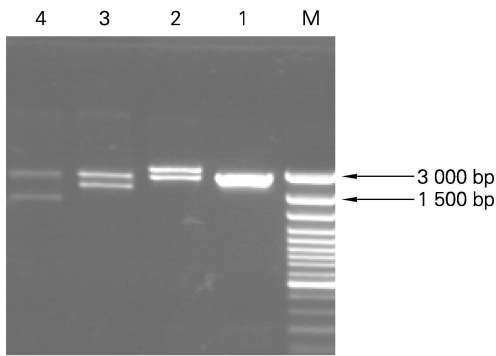


图6 重组质粒的酶切图谱

Fig. 6 Restriction mapping of the recombinant plasmids digested by *Xba* I and *Sac* I endonucleases

M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 大小标准;

1 泳道: 经 *Xba* I/*Sac* I 双酶切的质粒载体 pUC18 DNA; 2~4 泳道: 经 *Xba* I/*Sac* I 双酶切的重组质粒 DNA

M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus; Lane 1: pUC18 DNA digested by *Xba* I/*Sac* I; Lanes 2~4: recombinant plasmid DNAs digested by *Xba* I/*Sac* I

参考文献:

- [1] 陈明耀. 生物饵料培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 30-31.
- [2] Lubian L M, Montero O, Moreno Garrido I, *et al.* *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments [J]. **J Appl Phycol**, 2000, 12: 249-255.
- [3] Suda S, Atsumi M, Miyashita H. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae) [J]. **Phycologia**, 2002, 41: 273-279.
- [4] Gelin F, Volkman J K, de Leeuw J W, *et al.* Mid chain hydroxy long chain fatty acids in microalgae from the genus *Nannochloropsis* [J]. **Phytochemistry**, 1997, 45: 641-646.
- [5] Tago A, Teshima S-I. Preparation of ¹³C eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis oculata* [J]. **Fish Sci**, 2002, 68: 452-454.
- [6] Brown M R, Jeffrey S W, Volkman J K, *et al.* Nutritional properties of microalgae for mariculture [J]. **Aquaculture**, 1997, 151: 315-331.
- [7] 麦康森, 何良. 增强鱼类免疫力的饲料生产技术基础 [A]. 曾呈奎, 相建海. 海洋生物技术 [M]. 济南: 山东科技出版社, 1998. 544-551.
- [8] Muller-Feuga A. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends [J]. **J Appl Phycol**, 2000, 12: 527-534.
- [9] Wikfors G H, Ohno M. Impact of algal research in aquaculture [J]. **J Phycol**, 2001, 37: 968-974.
- [10] Zittelli G C, Lavista F, Bastianini A, *et al.* Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors [J]. **J Biotechnol**, 1999, 70: 299-312.
- [11] Zou N, Zhang G W, Cohen Z, *et al.* Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) [J]. **Eur J Phycol**, 2000, 35: 127-133.
- [12] Zou N, Richmond A. Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) [J]. **J Appl Phycol**, 2000, 12: 349-354.
- [13] Richmond A, Zhang G W. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors [J]. **J Biotechnol**, 2001, 85: 259-269.
- [14] Zhang G W, Zmora O, Kopel R, *et al.* An industrial size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) [J]. **Aquaculture**, 2001, 195: 35-49.
- [15] Rodolfi L, Zittelli G C, Barsanti L, *et al.* Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation [J]. **Biomol Engineer**, 2003, 20: 243-248.
- [16] Xu F, Hu H-H, Cong W, *et al.* Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions [J]. **Biotechnol Lett**, 2004, 26: 51-53.
- [17] van der Auwera G, De Wachter R. Complete large subunit ribosomal RNA sequences from the Heterokont algae *Ochromonas danica*, *Nannochloropsis salina*, and *Tribonema aequale*, and phylogenetic analysis [J]. **J Mol Evol**, 1997, 45: 84-90.
- [18] Andersen R A, Brett R W, Potter D, *et al.* Phylog-

- eny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis* [J]. **Pro**
tist, 1998, 149: 61-74.
- [19] 杨官品, 张继民, 魏东, 等. 温度逆境处理提高拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*) EPA 含量的研究 [J]. 海洋学报, 2002, **24** (4): 132-135.
- [20] 魏东, 张学成, 隋正红, 等. 氮源和 N/P 对眼点拟微球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响 [J]. 海洋科学, 2000, **24** (7): 46-50.
- [21] Yamasaki S, Kawaida A. Influences of ammonium N and nitrate N on pH and dissolved inorganic carbon concentration during early growth stage of *Nannochloropsis oculata* [J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 2001, **67**: 1122-1123.
- [22] 王秀良, 刘晨临, 张学成. pH 对眼点拟微绿球藻的生长、总脂含量及脂肪酸组成的影响 [J]. 海洋科学, 2002, **26** (5): 63-67.
- [23] Hu H, Gao K. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources [J]. **Biotechnol Lett**, 2003, 25: 421-425.
- [24] Bidwell J P, Spotte S. Artificial Seawaters: Formulas and Methods [M]. Boston, and Woods Hole: Jones and Barlett Publishers, Inc., 1985. 305-307.
- [25] Hu, Y J, Zhou, Z G. Extraction of RAPD-friendly DNA from *Laminaria japonica* (Phaeophyta) after enzymatic dissociation of the frozen sporophyte tissue [J]. **J Appl Phycol**, 2001, 13: 415-422.
- [26] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

DNA library of *Nannochloropsis oculata* constructed with plasmid vector pUC18

ZHAO Da-xian, ZHOU Zhigang

(Key Laboratory of Genetic Resources and Ecology in Aquaculture, the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, and College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Received: Jun. 30, 2004

Key words: *Nannochloropsis oculata*; ultrasonication; plasmid vector pUC18; genomic library

Abstract: The genomic DNA isolated and purified from *Nannochloropsis oculata* was sheared after a treatment with an ultrasonic processor. The treated DNA was blunt ended with T4 DNA polymerase and then was collected from 1.6 kb to 3 kb in size. The target blunt ended DNA was cloned into plasmid vector pUC18 which was previously digested with *Sma* I and dephosphorylated with calf alkaline phosphatase. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH 10B competent cells and the genomic library was constructed. There were about 2×10^4 clones in the genomic library of *N. oculata*, and the percentage of recombinants was about 90%. It was confirmed that all randomly selected plasmids of white colonies contained target DNA inserts from 1.6 kb to 3 kb in size after restriction mapping with *Xba* I and *Sac* I endonucleases.

(本文编辑: 张培新)