

赤潮铜绿微囊藻 rDNA 基因间隔区的序列分析以及与淡水微囊藻的比较*

陈月琴¹ 庄丽¹ 屈良鹄¹ 郑天凌²

王大志² 王艳丽²

(¹中山大学生命科学学院 广州 510275)

(²厦门大学环境科学中心, 国家教委海洋生态环境开放研究实验室 361005)

摘要 采用 PCR 及序列测定的方法, 对在厦门西港海域采集的赤潮铜绿微囊藻 16S 和 23S rDNA 基因间隔区 Intergenic Spacer Region (ISR) 区进行了序列测定和分析, 并通过与两种淡水微囊藻的比较, 找出了其特征性核苷酸作为专一性分子探针设计的靶序列, 为该藻种以及微囊藻属的快速鉴定及系统学研究提供了分子基础。

关键词 赤潮铜绿微囊藻, rDNA 基因间隔区, 序列分析

铜绿微囊藻是蓝藻微囊藻属 (*Microcystis*) 的一个有毒种类, 也是诱发全球性有害有毒“赤潮”及湖泊“水华”的主要类群之一。

本研究采用先进的分子生物学技术, 以核糖体 16S 和 23S rDNA 之间的转录间隔区——ISR 区 (Intergenic Spacer Region) 为分子指标, 通过对我国海区分离到的赤潮铜绿微囊藻 rDNA 基因间隔区进行研究, 找出其特征性核苷酸序列, 为海洋铜绿微囊藻的快速鉴定的核酸分子探针的研制奠定基础。以 DNA 序列为基础的分子鉴定是目前国际赤潮微型生物研究的热点之一^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料

赤潮铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 采自福建厦门西港海域, 由厦门大学国家海洋生态环境开放研究实验室分离培养并鉴定。淡水铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* 和惠氏微囊藻 *M. wesenbergii* 的 rDNA 间隔区序列作为参考序列^①。

1.2 rDNA ISR 区的 PCR 扩增反应及序列测定

从显微镜下挑取数个藻细胞于 0.5 ml 的 Ependorf 管中, 加入 25 μ l 提取缓冲液 (1% SDS, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L NaCl); DNA 的制备以及 PCR 扩增反应条件

等见文献^[1]。通过 Internet 从国际分子生物学数据

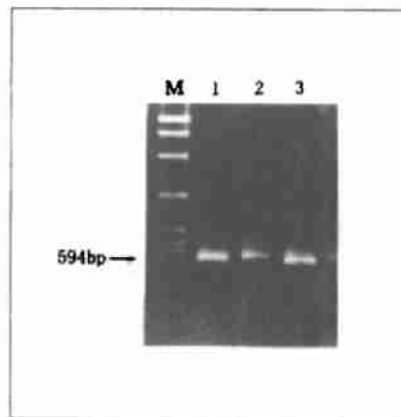


图1 赤潮铜绿微囊藻 rDNA 16S-23S 基因间隔区 PCR 扩增结果

Fig. 1 The result of rDNA ISR PCR amplification from "red tide" species *Microcystis aeruginosa*

M 与 2kb 分子量标准; 1~3 为分别取 20 个以上, 10 个, 5 个

铜绿微囊藻获取的微量 DNA 的 PCR 扩增结果

库中获取并比较分析微囊藻属不同种 16S rDNA 和 23S rDNA 的全序列, 合成了微囊藻属专一性引物

* 国家自然科学基金资助项目 39770058 和厦门大学海洋生态环境开放研究室开放基金资助项目。

① 陈月琴等, 二种淡水微囊藻 rDNA 16S-23S 基因间隔区的序列测定与分析, 水生生物学报, (出版中)
收稿日期: 1998-08-04; 修回日期: 1998-09-08

M16和M23.引物序列为:M16: 5' GGGGATGCC-TAAGGCAGGGCT 3',M23: 5' CCACGTCCTTCTT-CGCCTCTG 3',分别对应于16S rDNA 3'末端和23S rDNA 5'末端区域。PCR扩增产物经DNA纯化系统

纯化后,与质粒载体连接,质粒载体为pTZ19,按文献[2]操作。采用美国Life Science Sequenase Version 2.0(USB)测序试剂盒,以Universal和Reversal引物从两端人工直接测定重组质粒的DNA序列。

2 结果与讨论

2.1 rDNA 16S-23S 基因间隔区(ISR)的PCR扩增结果

用DPS纯化系统从高浓度SDS的提取液中获得微量DNA,直接用于专一性引物的PCR扩增反应。PCR结果见图1。从显微镜下挑取5~10个藻细胞则可得所需要的PCR产物。该方法的应用使得材料的获得不依赖于微藻培养技术的完善。而且所获得的微量DNA用于PCR扩增,具有较好的重复性。赤潮铜绿微囊藻rDNA 16S-23S ISR区PCR产物长度约500bp(包括16S 3'末端和23S 5'末端rDNA部分序列)。

2.2 PCR产物的克隆、序列测定与分析

PCR产物以DPS系统纯化,并连接到pTZ19的SmaI位点上,通过PCR和限制性内切酶等方法检查转化子,采用末端终止法测定重组质粒的DNA序列,结果见图2。赤潮铜绿微囊藻16S-23S基因间隔区的长度为360bp(不包括16S 3'末端和rRNA-tRNA^{Ile}-23S rRNA基因的排列顺序相同,测定不同的克隆子,得到相同的结果。序列比较结果见图2。从图2看,引发赤潮的海洋铜绿微囊藻与淡水铜绿微囊藻,基因间隔区的序列非常相似,仅有4个核苷酸差异,而铜绿微囊藻与惠氏微囊藻之间,核苷酸差异数为19,尤其在间隔区2(即tRNA与23S rRNA基因之间的序列),海洋与淡水铜绿微囊藻都有一段6个核

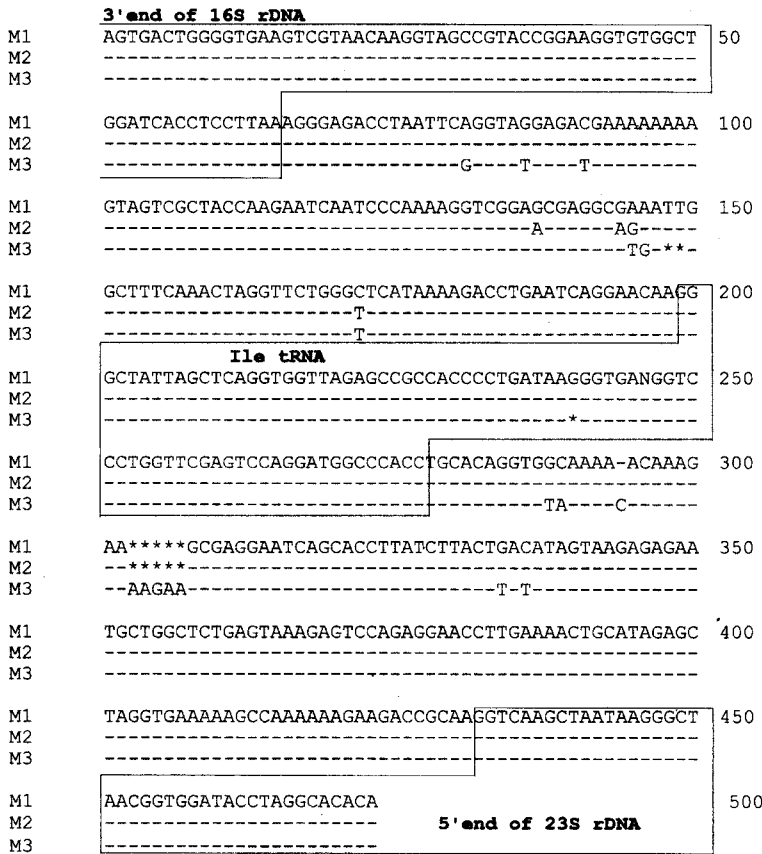


图2 赤潮铜绿微囊藻与淡水株系rDNA基因间隔区序列比较

Fig. 2 Sequences alignments for the nucleotides of rDNA Intergenic Spacer Region of "red tide" species *Microcystis aeruginosa* with that of fresh water strains

排列中仅标明与顶部不同的核苷酸,相同的核苷酸以短线代表,"*"代表缺失的核苷酸。

Only the nucleotides differing from the first sequences are shown, identities are denoted by hyphens; deletions are denoted by "*".

M1: *Microcystis aeruginosa* (red tide species); M2: *Microcystis aeruginosa* (Fresh water species); M3: *Microcystis wesenbergii* (Fresh water species)

23S 5'末端rDNA部分序列),包含1个异亮氨酸tRNA基因,约160bp。

采用计算机分析软件包PcGene6.0(IntelliGenetics Inc., Switzerland)将所测得序列与作者已获得的另外两种淡水微囊藻,即铜绿微囊藻*Microcystis aeruginosa*和惠氏微囊藻*M. wesenbergii*的rDNA间隔区进行比较分析,三者具有相同的rRNA操纵子,即16S

苷酸的缺失。这一结果表明了 rDNA 间隔区用于种间鉴定是一个较稳定的指标,不会因生长环境及生长阶段的不同而改变。

2.3 rDNA 基因间隔区在核酸分子探针设计中的应用及其意义

铜绿微囊藻是蓝藻微囊藻属 (*Microcystis*) 的一个有毒种类,所产的毒素被称为微囊藻毒素 (Microcystin, MCYST), 对鱼类,动物和人类健康有毒害作用。该种不仅在海洋引起有害有毒“赤潮”,而且广泛分布于世界各国湖泊、池塘中,产生有毒藻华,造成饮用水的污染。因此建立新的方法和指标,用于其快速鉴定是非常必要的。Neilan 等人^[3]曾以 16S rRNA 基因为分子指标来进行微囊藻属有毒无毒株的分类和鉴定,但由于 16S rRNA 及其基因结构过于保守,种间相似性高达 99%,不适合核酸分子探针的设计。从作者对铜绿微囊藻和惠氏微囊藻 rDNA 16S-23S 基因间隔区的分析来看,该区域在种间具有较高的突变速率,而在种内个体间非常保守,用于探针的设计是很好的靶序列。因此可以根据序列的这些特征,选择

某些区域,如间隔区 2 紧邻 tRNA^{Ile} 基因的 20~30 个核苷酸,在两个种之间有 8 个核苷酸差别,在此区域合成专一性核酸分子探针,可用于某一类种的特异性检测。随着研究的深入,如探针应用的最佳条件等,该项工作将为我国海区赤潮藻快速检测和监测提供一有效的手段。

参考文献

- 1 陈月琴,屈良鹤等. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 38(4): 66~69
- 2 萨姆布鲁克 J. 弗里奇 E. F. 等. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1996. 1~
- 3 Neilan BA., Jacobs D. et al. . *J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47(3): 693~697
- 4 Scholin C., Miller P. et al. . Harmful Marine Algal Blooms, Sendai, Japan; Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1996. 439~462

SEQUENCE ANALYSIS AND COMPARISON OF rDNA ISR REGIONS OF *Microcystis* SPECIES FROM RED TIDE AND NORMAL REGIONS

CHEN Yue-qin¹ ZHUANG Li¹ QU Liang-hu¹ ZHENG Tian-ling² WANG Da-zhi² WANG Yan-li²

(¹School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

(²Research Lab of MEE of Marine Ecology Environment, Xiamen University 361005)

Received: Aug. 4, 1998

Key Words: rDNA Intergenic Spacer Region, Sequence Analyses, Red tide *Microcystis aeruginosa*

Abstract

The rDNA Intergenic Spacer Region (ISR) was sequenced and analyzed from a "Red Tide" species *Microcystis aeruginosa* collected from Xiamen. The spacer sequences was 360 bp in length exclusive of 16S and 23S rDNA coding regions, containing a Ile tRNA gene. Based on the analyses of the obtained sequences and other two sequences from fresh water strains, the evolutionary affiliation between species was discussed.