

# 一株赤潮甲藻转录单元内间隔区 (ITS) 和 5.8S rDNA 序列的克隆

张宝玉<sup>1,2</sup>, 王广策<sup>1</sup>, 张炎<sup>1</sup>, 吕颂辉<sup>3</sup>, 齐雨藻<sup>3</sup>, 邹景忠<sup>1</sup>, 曾呈奎<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

**摘要:** 为解决分子生物学方法中因纯化的新鲜材料不足而限制实验进展的情况, 采用改进的克隆方法将目的 DNA 片段保存在菌株中。首先应用改进的 DNA 提取方法从赤潮甲藻塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 中提取总核酸, 以提取的 DNA 为模板, 优化 PCR 扩增条件, 获得转录单元内间隔区 (ITS) 片段。将获得的 ITS 片段经 *Sal* I 和 *Pst* I 双酶切后与同样经过双酶切后的质粒载体 pBluscript SK<sup>+</sup> 连接, 转化受体菌 XL1-Blue, 克隆该 DNA 片段。该克隆方法简单易行, 克隆效率完全可以满足一般实验要求。该克隆技术的应用为随时获得目的 DNA 提供一条途径。

**关键词:** 赤潮; 塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*); 转录单元内间隔区 (ITS); 5.8S; PCR; 克隆

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)12-0049-05

赤潮, 泛指由于海水富营养化而造成的海洋浮游生物 (主要是甲藻类) 过度繁殖引起海水变色 (一般为红色) 的现象。自 20 世纪 70 年代之后, 有关赤潮的报道越来越多。据不完全统计, 1972~1998 年中国 (香港地区和台湾省未统计在内) 有记载的赤潮达 360 次<sup>[1]</sup>。随着经济的发展, 中国的赤潮发生频率明显增加, 发生规模及危害程度也日益加剧。赤潮的频繁爆发不仅危害海洋生态环境, 给海洋渔业、海水养殖业和滨海旅游业等造成一定的危害, 也给人类健康和生命安全带来威胁<sup>[2-5]</sup>。Sournia<sup>[6]</sup>认为海洋中有 3 365~4 024 种浮游藻类, 赤潮种约占 6%, 为 184~267 种, 其中有毒种约占 2%, 为 60~78 种。在赤潮藻中, 尤其是有毒藻中以甲藻占多数。

现在赤潮藻的分类一般采用形态鉴定和分子生物学技术相结合的方法。在目前普遍使用的分子鉴定方法中, 分子鉴定方法往往需要至少几毫升甚至几十毫升处于对数生长期的纯化的培养液, 这给研究带来很多不便, 因为某些有毒甲藻, 如裸甲藻 (*Gymnodiniales* spp.)、鳍甲藻 (*Dinophysiales* spp.)、微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*) 等的实验室单藻培养非常困难。虽然有人发明了甲藻单个细胞 DNA 的制备方法, 但该方法未公开试剂成分, 因此无法广泛应用<sup>[7]</sup>。分子克隆技术就是将目的片段转入受体菌, 该

菌株大量繁殖从而使目的片段得到大量表达, 这样在以后的分子生物学方法中只需将该菌株活化, 提取质粒即可, 而不需要每次都使用新鲜的无菌培养材料。因此克隆技术的发展为解决这一问题提供了一条途径。

作者以一株赤潮甲藻——塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 为材料, 通过 PCR 扩增其转录单元内间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 及 5.8S rDNA, 并对 PCR 产物进行克隆。

## 1 材料与方 法

### 1.1 藻株的获得与培养

该株赤潮藻分离自香港海域。在实验室于 1/2 培养基中进行单种培养, 光: 暗= 12 h: 12 h, 光照强度

收稿日期: 2004-02-12 修回日期: 2004-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170499, 40476059); 中国科学院知识创新重要方向性项目 (KZCX2-211); 国家 973 计划项目 (2001CB409701)

作者简介: 张宝玉 (1975-), 女, 山东诸城人, 博士生, 研究方向: 微藻分子生物学; 王广策, 通讯作者, E-mail: gcewang@ms.qdio.ac.cn

为 2 000~4 000 lx。培养温度 19~20 °C。用 Olympus 显微镜观察培养情况。

## 1.2 质粒载体与菌株

质粒载体为 pBluescript SK<sup>+</sup>，受体菌株为大肠杆菌 XL1-Blue，均为本实验室保存。

## 1.3 细胞总 DNA 的提取

细胞总 DNA 的提取参照文献[8, 9]，具体过程如下：取对数生长期的藻培养物，5 500 r/min，4 °C 离心 5 min，弃上清，沉淀用双蒸水洗 2 遍，离心，弃上清，收集的藻细胞湿质量约 20 mg；用 200 μL 冷的裂解液（50 mmol/L Tris-HCl；100 mmol/L EDTA；100 mmol/L NaCl；pH 8.0）悬浮藻细胞；加 SDS 和 Proteinase K 使其终浓度分别为 1.5% 和 250 μg/mL，55 °C 温育 1~2 h，期间振荡几次；用等体积酚和酚-氯仿-异戊醇（25:24:1），氯仿-异戊醇（24:1）依次抽提，上下颠倒几次混匀后，4 °C，9 000 r/min 离心 15 min，上清液加 1/10 体积的 NaAc（3 mol/L，pH 5.2）和 2 倍体积无水乙醇，混匀后-20 °C 静置至少 6 h；4 °C，12 000 r/min 离心 20 min，沉淀用 70% 乙醇洗 1 次后，室温干燥 10~15 min 至无酒精味，沉淀用 TE（pH 8.0）溶解置于-20 °C 备用。

正向引物：

5'-CTCGTCGACGTAGTGAACCTGCAGAAGGATCA-3'  
Sal I

反向引物：

5'-CCTGCAGTCGACATATGCTTAAATTCAGCAGG-3'  
Pst I

## 1.4 引物及 PCR 扩增

引物参照文献[10]。修改了酶切位点，序列为：

PCR 反应条件如下：94 °C 变性 5 min 后，接 30 个循环，即 94 °C 变性 40 s，50 °C 退火 40 s，72 °C 延伸 1 min，循环结束后 72 °C 延伸 10 min。50 μL 扩增反应体系含有：50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.3），1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>，模板约 10 ng，0.2 mmol/L dNTPs，0.2 μmol/L 引物，0.3 U/μL Taq DNA polymerase 聚合酶。每次均设空白对照，扩增产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.5 PCR 产物的克隆

### 1.5.1 电泳与胶回收

PCR 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上 50V 电泳 40 min，从胶上回收目的 DNA 片段，纯化后经过 Sal I

和 Pst I 酶切，用 T4 DNA 连接酶将片段连接到同样经过 Sal I 和 Pst I 酶切的 pBluescript SK<sup>+</sup> 质粒载体上。

### 1.5.2 感受态细胞的制备

取保存的 XL1-Blue 菌株于 LB 琼脂平板上划线，37 °C 培养过夜；挑单个菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中，37 °C，振荡过夜培养；取 500 μL 菌液接种于 50 mL 新鲜的 LB 培养液中，37 °C，振荡培养 2.5~3 h。将培养液转移到 1 个 50 mL 预冷的无菌聚丙烯管中，在冰上放置 10 min，4 °C，3 900 r/min 离心 6 min；细胞沉淀用 12.5 mL 冰冷的 100 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液悬浮，4 °C，2 600 r/min 离心 5 min；细胞沉淀用 2 mL 冰冷的 CaCl<sub>2</sub> 溶液重悬，放置冰水中下一步用。

### 1.5.3 CaCl<sub>2</sub> 转化法

将连接产物转入 5 mL 无菌的圆底试管中，并置于冰上。然后加入刚制备好的感受态细胞 200 μL，轻轻转动，置于冰上 10 min，然后将试管放入 42 °C 水浴 2 min，立即取出置于冰水中；加入 1 mL LB 培养液，于 37 °C 摇床振荡培养 1 h 然后将菌液涂布于含氨苄青霉素，X-gal 和 IPTG 平皿上，37 °C 静置培养 12~16 h。

### 1.5.4 质粒抽提、鉴定

从平皿上挑取白色菌落接种于 LB 培养液中，37 °C 振荡培养 12~16 h，质粒提取过程按文献[11]的方法操作。

## 2 结果

### 2.1 细胞总 DNA 的提取结果

DNA 的提取结果见图 1。从图中可以看出，提取的 DNA 在电泳图片中仅出现一条带，位于 21 kb 处，表明提取的 DNA 分子完整，没有降解。因此，使用上述方法提取甲藻总 DNA 的方法是可行的。

### 2.2 PCR 扩增结果

如图 2 中所示，使用 PCR 技术可以成功地扩增出该藻相应的 DNA 片段，其大小约在 600 bp 左右。

### 2.3 克隆

图 3 是带有外源 DNA 片段的重组质粒经过酶切后的电泳图片。重组质粒经 Sal I 和 Pst I 限制性内切酶双酶切后，一条带在 3 kb，此为质粒的酶切条带；一条带在 600 bp 左右，这是外源片段，与 PCR 产物的电泳结果处在同一位置。因此采用上述方法可将外源 DNA 片段成功克隆至质粒载体中。

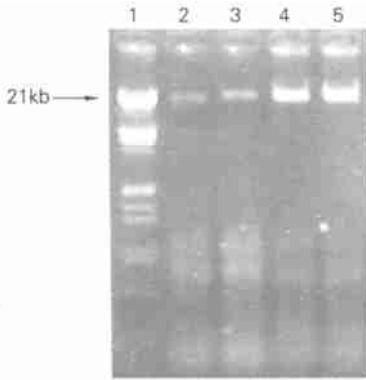


图 1 提取的该株塔玛亚历山大藻的总 DNA

Fig. 1 The total nucleic acids extracted from *A. tamareuse*  
 1. *Eco* R I+ *Hind* III 核酸分子质量标准; 2, 3, 4, 5 塔玛亚历山大藻的总 DNA  
 1. *Eco* R I+ *Hind* III marker; 2, 3, 4, 5 total nucleic acid of *A. tamareuse*

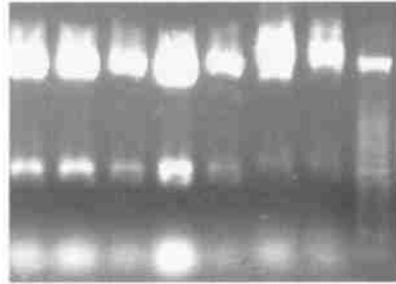


图 3 带有外源 DNA 片段的重组质粒经过 *Sal* I 和 *Pst* I 酶切后的电泳图片 (1% 琼脂糖)

Fig. 3 Electrophoresis of recombinant plasmid pBluescript sk<sup>+</sup> containing PCR DNA fragment after being digested with both *Sal* I and *Pst* I (1% agarose)  
 外源片段为塔玛亚历山大藻的 PCR 纯化产物  
 The target DNA fragment was the purified PCR product of *A. tamareuse*

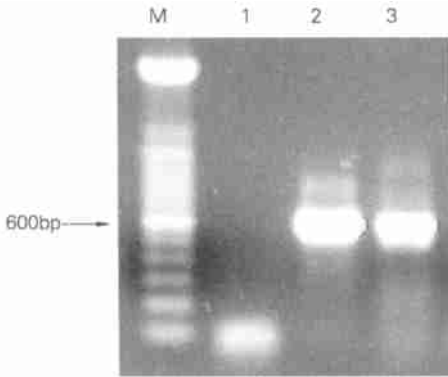


图 2 PCR 扩增产物的电泳图谱 (1% 琼脂糖)

Fig. 2 Electrophoresis of amplified DNA fragment  
 M. 100bp 的核酸分子质量标准; 1. 阴性对照; 2, 3. 扩增平均  
 M. 100bp ladder marker; 1. negative control; 2, 3 PCR product

### 3 讨论

目前在分子生物学技术水平上, 国内外学者对赤潮甲藻开展了大量的研究, 其中甲藻细胞总 DNA 的提取方法各不相同<sup>[12-15]</sup>, 而提取的 DNA 的质量, 尤其是其完整性是保证研究成功的关键。作者在总结他人提取方法的基础上加以改进, 如省去加玻璃珠在涡流震荡器上震荡这一步; 调整蛋白酶 K 和 SDS 的用量。作者介绍的这个方法不仅可以应用于甲藻细胞总 DNA 的提取, 同样适用于海洋硅藻, 定鞭藻细胞总

### DNA 的提取。

该株赤潮甲藻的上述 PCR 产物经测序分析表明为塔玛亚历山大藻, 序列见图 4。目前国内外采用分子手段对亚历山大藻的研究已比较广泛。Adachi<sup>[16,17]</sup>以 rDNA ITS 区为分类指标对日本海域的链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*) 和塔玛亚历山大藻不同地理株进行分析; 陈月琴<sup>[10]</sup>则对南海海域的链状亚历山大藻和塔玛亚历山大藻的不同地理株的 ITS 区进行比较, 序列分析结果与采用 RFLP 法得到的结果完全吻合。二位学者都认为链状亚历山大藻或塔玛亚历山大藻种内个体间 ITS 区序列非常相似, 而链状亚历山大藻和塔玛亚历山大藻种间 ITS 区序列则有显著差异, 表明 ITS 区用于不同海区链状亚历山大藻和塔玛亚历山大藻种间鉴定是一个较稳定的指标。陈月琴<sup>[18]</sup>又以海洋亚历山大藻的 rDNA ITS 序列为材料, 采用计算机分析软件包对其进行分析及构建系统树, 得到了亚历山大藻属种间界定的分子标准。核糖体大、小亚基核酸序列相对于其转录间隔区更加保守, 但其序列是由相互间隔的保守区和多变区构成。Scholin 研究<sup>[12]</sup> *A. fundyense* Balech 时发现了 2 个独特的核糖体小亚基 RNA 基因, 他将它们命名为 A 基因和 B 基因。他发现 B 基因是一个有潜力的分类学和生物地理学标记。后来 Scholin 等<sup>[19]</sup>又研究了多株亚历山大藻大亚基中的 D1 和 D2 区 (该藻核糖体大亚基 rDNA 由高变区和保守区构成, 高变区被人为地分为 12 个区), 认为此区域属于高变区, 不仅是一个很好

GCACATGTGTAGCCAACCTGCATGCTAATGATATTGTGGGCAACTGTAAGCATGTATTGC  
 AATGGACTTGCACCTTGCCTGGGCAGCATGATTTGTTTTCAAGCATGTGTGCTGTAGC  
 GTGTGATGTGTTGTGAACTGTTGCATTTCTCTAGTTGCTGCAACACTTATGTTTTGC  
 AAGGAATGTCTTAGCTCAATAAATGATGAAGAATGCAGCCACATGCAATATGCATTGCG  
 AATTGCAGAATCCGTGAGCTAACAGATGTTGAATGTTACTTGGACCTTTGGGATATT  
 CTTGAAGGTTTGCTTGGTTAATGCAAAGTAGCTTTCATATACAGTTAATGCTGATTAGC  
 ATTTGTTGTGAACAATAAAGGTCAATGTTTTGCATTGAACCTGGATGTCATACAGTTGTTT  
 ACAACCTAAACATGGTTTCGTGGGGCAGACCTGTTTCGTCATTTGATGGTTGATATTTGT  
 AAATGTGCACAACCTGGGACAAGCTGAAGACTTGCATATGCTAAGCGTGAAGTGAAGC  
 ACATAA

图4 塔马亚历山大藻 ITS 及 5.8 S rDNA 序列 (539bp)

Fig. 4 The ITS and 5.8S ribosomal RNA genes of *Alexandrium tamarense* (539bp)

的分类学和生物地理学标记,也是构建特异性分子探针的良好区域。国外有的研究者以亚历山大藻为材料,发展了定量检测微藻的一种方法——PCR-ELISA法。这种方法将PCR技术和免疫杂交技术结合起来最后根据显色的强弱定量待检样品中的细胞浓度<sup>[20]</sup>。

在分子生物学中,无论是用RAPD, RFLP等方法研究某一段基因,还是运用PCR-ELISA、全细胞杂交(Whole-cell Hybridization)等更先进的分子生物学方法进行深入研究,都离不开所需要的核酸材料,若将该材料采用克隆的方法大量复制链状亚历山大藻和塔马亚历山大藻后就可以避免因实验活材料不够而限制实验进展的局面。因此克隆技术在分子生物学的研究中非常有用。

参考文献:

[1] 齐雨藻. 中国沿海赤潮 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. 302- 303.  
 [2] 彭昆仑, 李锦蓉. 一次发生在深圳赤湾赤潮的初步报告[J]. 暨南大学学报, 1989(赤潮研究专刊): 86-89.  
 [3] 齐雨藻, 洪英, 吕颂辉, 等. 中国赤潮生物新记录种—海洋褐胞藻[J]. 暨南大学学报(自然科学版) 1991, 12(3): 92- 95.  
 [4] Ho K C, Hodgkiss I J. Severe fishkills in Hong Kong caused by *Noctiluca scintillans* blooms [J]. **Red Tide Newsletter**, 1992, 5: 12.  
 [5] Wang D F. Red tides in Hong Kong : problems and management. strategy with special reference to the mariculture industry[J]. **J Shoreline Management**,

1987, 3: 2- 21.  
 [6] Sournia A. Red tide and marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity[A]. Lassus P, Arzul G, Denn E, et al. *Harmful Marine Algal Blooms*[C]. London, New York, Paris: Technique & Documentation-Lavoisier/Andover, England UK: Intercept Ltd, 1995. 103- 112  
 [7] 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.  
 [8] 张宝玉, 王广策, 张炎, 等. 东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和海洋原甲藻 APBM (*P. micans* APBM)的 5.8S rDNA 及其转录间隔区(ITS)的克隆和序列分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(3): 264- 272  
 [9] 王广策, 孙海宝, 曾呈奎. 三角褐指藻甘油酸变位酶基因可能侧翼序列的筛选、克隆以及序列测定[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 259- 264.  
 [10] 陈月琴, 屈良鹄, 曾陇梅, 等. 南海赤潮有毒甲藻链状-塔马亚历山大藻的分子鉴定[J]. 海洋学报, 1999, 21(3): 106- 111.  
 [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 黄培堂, 朱厚础, 范明, 等译. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002 96- 105.  
 [12] Scholin C A, Anderson D M. Identification of group- and- strain- specific genetic markers or globally distributed *Alexandrium*(Dinophyceae) I. RFLP analysis of SSU rRNA genes[J]. **J Phycol**, 1994, 30: 744- 754.  
 [13] Medlin LK, Elwood H J, SICKEL S, et al. Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema Cos-*

- tatum* (Bacillariophyta): evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum* [J]. **J Phycol**, 1991, 27: 514– 524.
- [ 14 ] Boczar B A, Liston J, Cattolico R A. Characterization of Satellite DNA from three marine dinoflagellates (Dinophyceae): *Glenodinium* sp. and two members of the toxic genus, protogonyaulax [J]. **Plant Physiol**, 1991. 97: 613– 618.
- [ 15 ] Zh Z D, Green B R, Smith T C. Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes [J]. **Nature**, 1999, 400: 155– 159.
- [ 16 ] Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5. 8S regions in Japanese *Alexandrium speciosum* (Dinophyceae) [J]. **J Phycol**, 1994, 30: 857– 863.
- [ 17 ] Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5. 8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions [J]. **J Phycol**, 1996, 32: 424– 432.
- [ 18 ] 陈月琴, 屈良鹄. 海洋亚历山大藻属种间界定的分子标准 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1999, 38 ( 1 ): 7– 11.
- [ 19 ] Scholin C A, Michel H, Mitchell S, et al. Identification of group- and strain- specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene [J]. **J Phycol**, 1994, 30: 999– 1 011.
- [ 20 ] Perna A, Magnani M. A PCR immunoassay method for the detection of *Alexandrium* (Dinophyceae) species [J]. **J Phycol**, 2000, 36: 1 183– 1 186.

## Cloning of internal transcribed spacer of ribosomal RNA transcript unit and 5. 8S RNA gene of *Alexandrium tamarense*

ZHANG Bao- yu<sup>1,2</sup>, WANG Guang- ce<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, LÜ Song- hui<sup>3</sup>, QI Yu- zao<sup>3</sup>, ZOU Jing- zhong<sup>1</sup>, C. K. Tseng<sup>1</sup>

( 1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Received:** Feb. 12, 2004

**Key words:** red tide; *Alexandrium tamarense*; internal transcribed spacer (ITS); 5. 8S; PCR; clone

**Abstract:** To overcome the shortage of fresh materials demanded by molecular biological experiments, an improved cloning method was applied. Target DNA fragments were preserved in a strain of *E. coli*. Total nucleic acid from *Alexandrium tamarense* was extracted using a modified DNA extracting method. Using this DNA as template, the internal transcribed spacer (ITS) and 5. 8S ribosomal RNA gene (5. 8S rDNA) region was obtained by an improved PCR condition. This ITS and 5. 8S rDNA region was digested with two restriction endonuclease enzymes *Sal* I and *Pst* I and linked to plasmid vector pBluescript SK<sup>+</sup> which was also digested by the same two restriction endonuclease enzymes, transforming this recombinant plasmid to the host, XL 1- Blue and obtaining the cloning DNA fragment. This cloning method is simple, practical and efficient able to meet the need for regular cloning in lab. This study can provide target DNA on call.

( 本文编辑: 张培新 )