

用于单一藻细胞 PCR 扩增反应的样品保存方法比较

李萍^{1,2}, 于仁成¹, 唐祥海¹, 周名江¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:用室内培养的塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense* ATHK 藻株) 作为实验对象, 分别选择了 5% 福尔马林固定后常温保存、95% 乙醇固定后常温保存、-20℃ 冷冻保存、鲁哥氏液 (Lugol's solution) 固定后常温保存等方法, 在 5、15、30、60 d 后对保存的样品进行单细胞 PCR 反应, 并与新鲜样品进行比较。实验结果表明, 用 95% 乙醇保存、-20℃ 冷冻保存、鲁哥氏液保存的样品在 60 d 后仍可扩增出目标条带, 与新鲜样品没有差别, 但是样品中的藻细胞形态有一些改变; 而以 5% 福尔马林固定保存的样品只能在 5 d 后扩增出目标条带, 但藻细胞形态比较完好。因此, 对于用于单细胞 PCR 实验的微藻样品, 短期内 (不多于 5 d) 可以采用福尔马林保存, 而需要长期保存的样品, 应当采用乙醇或鲁哥氏液固定, 或者采用 -20℃ 冷冻保存的方法。

关键词:有害赤潮; 单细胞 PCR; 保存方法; 塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*)
中图分类号: X835 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2008)06-0041-05

近年来, 分子生物学技术和方法在有害赤潮研究中的应用越来越多。其中, 单细胞 PCR 方法是对难以室内培养的有害赤潮藻种进行分子生物学研究的重要工具, 具有很好的应用潜力^[1-7]。这一方法通过对单一藻细胞的核酸序列信息进行分析, 方法简单准确, 尤其适用于目前尚不能室内培养的赤潮藻种。

要获得目标藻种的核酸序列信息, 制备高质量的 DNA 模板极为关键。这就要求对于单细胞 PCR 实验的微藻样品进行高质量的保存, 以避免 DNA 模板在样品保存过程中受到损伤。单细胞 PCR 实验的主要目标是分析野外采集藻类样品的遗传特征。在实际工作中, 受到诸多条件的限制, 很难保证野外采集的样品能够被迅速带回实验室进行分析, 必须对样品进行保存。可见, 选择适当的样品保存方法对于开展单细胞 PCR 实验非常重要。对于用于分子生物学实验的样品保存方法先前已有许多研究^[8-28], 这些研究工作针对不同的动物和植物样品种类, 提出了适宜的保存方法和期限。但是, 针对单一藻细胞 PCR 实验的样品保存方法还缺少系统的研究工作, 有必要对各种藻类样品保存方法进行筛选, 确定适合的样品保存方法, 用于单细胞 PCR 实验。

作者选择了 4 种比较常用的藻类样品保存方法, 通过单细胞 PCR 实验对各种样品保存方法及其保存时间进行了对比分析, 探讨了各种样品保存方法在单细胞 PCR 实验样品保存中的应用前景, 为开展单细胞 PCR 实验提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

由于野外样品在实验中具有很大的不确定性, 因此, 本实验采用了室内培养的一株塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamarense* (ATHK 藻株) 作为目标藻种。实验藻株由暨南大学提供, 分离于中国南海, 在中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室室内保种培养。培养液采用 f/2 配方, 但不添加 Na₂SiO₃。配制培养液的海水是经中国科学院海洋研究所水族楼海水处理系统处理的天然海水, pH 值为 7.9 ± 0.1, 盐度为 30 ± 1。海水经 120℃ 高温消毒 20 min, 室温冷却后加入营养盐, 并接入实验藻种进行培养, 培养温度为 21 ± 0.5℃, 光照为 4 000 lx, 光暗周期为 14 h : 10 h。

1.2 藻类样品的保存

实验选择了福尔马林 (5%) 固定后常温保存、乙醇 (95%) 固定后常温保存、鲁哥氏液固定后常温保存和 -20℃ 冷冻保存 4 种样品保存方法, 分别保存 5 mL 培养的藻液, 在保存 5、15、30、60 d 后取出藻类

收稿日期: 2007-05-20; 修回日期: 2007-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (4067072); 国家 863 计划项目 (2006AA09Z178)

作者简介: 李萍 (1982-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 从事有毒赤潮藻分子生物学研究, 电话: 0532-82898649, E-mail: liping@ms.qdio.ac.cn

样品,进行单细胞 PCR 实验,并与新鲜样品进行对比。

1.3 单细胞 PCR 实验

在倒置显微镜下,用拉制的微细玻璃管挑取单个藻细胞。在每种保存方法保存的样品中,挑取两个藻细胞进行单细胞 PCR 扩增,以新鲜藻液中挑取的藻细胞做为阳性对照。挑取的单个藻细胞在 TE 缓冲液中洗 1~2 次,最后置于 1 μ L TE 缓冲液中,加入 1 μ L 蛋白酶 K 溶液(200 g/L),55 $^{\circ}$ C 下酶解 30 min,95 $^{\circ}$ C 处理 5 min 后作为模板 DNA 进行 PCR 反应。以不添加藻细胞 DNA 模板的 PCR 反应液作为阴性对照。

单细胞 PCR 反应所用的引物对为:(F) CCGCT GAA TTTAA GCATA TAA GTA,(R) TTCAA GAC GGGTCAAG CAG。靶序列为藻细胞核糖体大亚基 RNA 基因(LSU rDNA) D1-D2 区。PCR 反应液总体积 50 μ L,其中包括 1 \times PCR 缓冲液,0.2 μ mol/L

引物,0.2 mmol/L dNTP,1U Taq DNA 聚合酶,2.5 mmol/L MgCl₂,以及提取的单细胞 DNA 模板。反应过程为:(1) 95 $^{\circ}$ C 5 min;(2) 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,53 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,并循环 35 次;(3) 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增结束后,取 10 μ L 扩增产物,以 1%琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增结果。

2 实验结果

用 4 种保存方法保存了 5,15,30,60 d 后的藻类样品,经单细胞 PCR 扩增后的电泳图谱如图 1 所示。从图中可以看出,应用 4 种保存方法保存 5 d 后的藻类样品,都可以扩增出大小约为 700 bp 的条带,与新鲜样品相比没有明显差异;而保存了 15,30,60 d 的藻类样品,通过福尔马林固定(5%)保存的样品都不能扩增出目标条带,而用乙醇(95%)固定、鲁哥氏液固定和 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存的样品仍然可以扩增

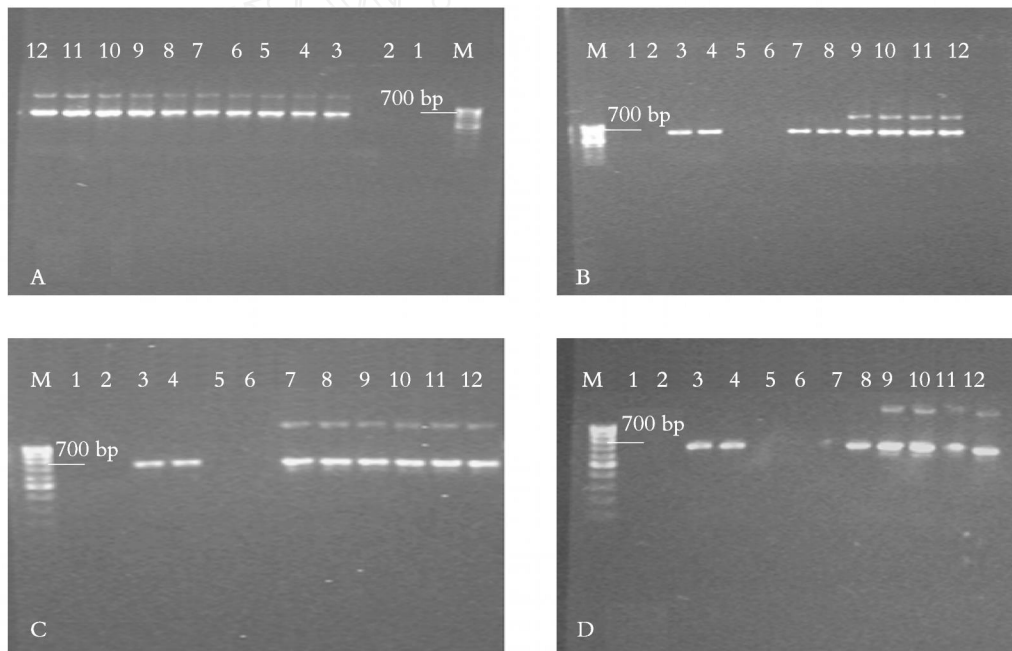


图 1 4 种保存方法保存的藻类样品经单细胞 PCR 扩增后的电泳图谱

Fig. 1 PCR amplified products of samples preserved with four different methods

A. 保存 5 d 后;B. 保存 15 d 后;C. 保存 30 d 后;D. 保存 60 d 后

M: marker; 1,2. 阴性对照; 3,4. 新鲜样品; 5,6. 甲醛(5%)固定的样品;7,8. 乙醇(95%)固定的样品; 9,10. 鲁哥氏液固定的样品; 11, 12. -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存的样品

A. samples preserved for 5 days; B. samples preserved for 15 days; C. samples preserved for 30 days; D. samples preserved for 60 days

M. marker; 1,2. negative samples; 3,4. fresh samples; 5,6. samples preserved in formalin (5%); 7,8. samples preserved in ethanol (95%); 9,10. samples preserved in Lugol's solution; 11,12. samples preserved by refrigeration at -20 $^{\circ}$ C

出目标条带,与新鲜样品相比没有明显差异。这说明 4 种保存方法均可用于短期保存样品(根据本实验的结果,应少于 5 d)。经乙醇(95%)固定、鲁哥氏液固定和 -20℃ 冷冻等方法长期保存(根据本实验,5~60 d)的藻类样品可以用于单细胞 PCR 实验,而经福尔马林固定后长期保存的样品则不适合于单细胞 PCR 实验。

从对藻细胞形态的保存效果来看,甲醛固定的藻细胞形态特征保存最好,其他 3 种保存方法保存的细胞形态均有不同程度的改变。

3 讨论

分子生物学技术与方法的发展使得人们对单一细胞的遗传特征分析成为可能。近年来,许多学者尝试将单细胞 PCR 方法应用于有害赤潮研究,对难于室内培养的赤潮藻种进行遗传特征分析,已取得较好的进展。Marin^[1]较早报道了从单个甲藻细胞中提取 DNA 并用于目标序列扩增的方法。Edvardsen^[6]和 Ki 等^[7]也应用单细胞 PCR 方法分析了几种赤潮藻的遗传特征及其种系进化关系。为深入应用单细胞 PCR 方法,本文采用室内培养的亚历山大藻作为目标藻种,对比研究了 4 种藻类样品保存方法对单细胞 PCR 实验结果的影响,探讨了 4 种方法在藻类单细胞 PCR 实验样品保存中的应用前景。

福尔马林固定是浮游植物样品保存的常用方法。福尔马林中的甲醛属于交联类固定剂,能够作用于蛋白质中的赖氨酸等残基,可以较好地维护蛋白质的二级和三级结构,对于样品形态的保存非常有效。但是不少研究表明,从福尔马林固定保存的标本中提取 DNA 比较困难,难以满足分子生物学研究的需求^[1,9~11]。出现这一现象的一个重要原因是由于甲醛易被氧化生成甲酸,而甲酸对 DNA 有较强的破坏作用^[12,13]。因此,福尔马林固定的样品不适合于分子生物学实验。但也有研究表明,通过清洗样品去除甲醛成分会有助于基因组 DNA 的提取^[15~18]。蛋白酶 K 处理福尔马林固定的样品对 DNA 模板的提取也有帮助,加入的蛋白酶 K 量越多,DNA 的回收率越高^[19]。本实验的结果也显示,经福尔马林长时间保存的样品不能满足单细胞 PCR 实验的需求,但短期福尔马林固定保存的微藻样品,经蛋白酶 K 处理后,可以满足单细胞 PCR 实验的要求。由于福尔马林固定的藻细胞形态保存得最为完整,因此,如果野外样品能够在短期内(<5 d)进行分析,福尔马林固定应当是首选的方法。此外,Godhe 等^[8]还建议先用福尔马林固定样品 5~30 min,然后再置于 100% 的甲醇中保存,这样细胞的形态比较完

整,而且样品保存较长时间后,DNA 仍可以用来作为 PCR 反应的模板。

乙醇也是一种常见的固定剂,能够迅速渗透细胞,使蛋白质变性而不损伤 DNA。与其他方法相比,乙醇保存的标本无毒害,保存时间长,适合于保存样品用于分子生物学实验。已有许多研究表明乙醇固定是适用于分子生物学实验的快速、简易和有效的方法^[9,11,21~23]。本实验结果也说明,乙醇保存的微藻样品在较长时间后,仍可以用于单细胞 PCR 实验。但是,长期保存于乙醇中的藻细胞形态会出现一定的变化,而且,乙醇保存的样品对细胞的挑取有一定的影响,容易造成细胞丢失。

鲁哥氏液是一种常见的浮游植物固定剂。有报道指出,从鲁哥氏液固定保存的样品中提取的 DNA 可以用于 PCR 扩增实验^[24,25],但也有实验未能从鲁哥氏液固定的藻类样品得到 PCR 扩增产物^[8]。在本实验中,经鲁哥氏液固定保存的亚历山大藻样品在 60 d 后仍可以扩增出目标条带。出现这一结果的原因可能是由于各个作者对样品的前期处理方法不同。本实验通过蛋白酶 K 处理藻细胞后,得到了比较理想的结果。

冷冻保存是分子生物学研究中样品保存的首选方法。有研究表明冷冻保存的海湾扇贝和蝗虫标本能够满足分子生物学实验的需要^[9,26]。但是,也有研究发现从 -20℃ 冷冻保存的光皮桦中不能提到 DNA^[27],作者认为这可能与光皮桦自身特征有关,光皮桦鲜叶组织中富含酚类、糖类及其他次生代谢物,容易发生褐变。而从 -20℃ 冷冻的猕猴桃幼叶中提取的 DNA,其完整性和纯度都可以满足分子生物学实验的要求^[28]。因此,冷冻保存能够满足一般动、植物样品分子生物学研究的需求。

综合几种样品保存的方法可以看出,对于单细胞 PCR 实验,福尔马林固定比较适合于短期样品保存,对需要长期保存的藻类样品,乙醇固定、鲁哥氏液固定和 -20℃ 冷冻保存是较好的选择。

参考文献:

- [1] Marin I, Aguilera A, Reguera B, et al. Preparation of DNA suitable for PCR amplification from fresh or fixed single dinoflagellate cells[J]. *Biotechniques*, 2001, 30: 88-93.
- [2] Rehnstamr Holm A S, Godhe A, Anderson D M. Molecular studies of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Sweden and North America [J]. *Phycologia*, 2002, 41(4): 348-357.
- [3] Bolch C J S. PCR protocols for genetic identification of dinoflagellates directly from single cysts and plankton

- cells [J]. **Phycologia**, 2001, **40**(2): 162-167.
- [4] Guillou L, Nezan E, Cuff V, *et al.* Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis* and *Karenia*) from French Coasts [J]. **Protist**, 2002, **153**(3): 223-238.
- [5] Sebastian C R, O'Ryan C. Single-cell sequencing of dinoflagellate (Dinophyceae) nuclear ribosomal genes [J]. **Molecular Ecology Notes**, 2001, **1**: 329-331.
- [6] Edvardson B, Shalchian-Tabrizi K, Jakobsen K S, *et al.* Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA [J]. **Journal of Phycology**, 2003, **39**: 395-408.
- [7] Ki J S, Jang G Y, Han M S. Integrated method for single-cell DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of ribosomal DNA from harmful dinoflagellates *Cochlodinium ploykrioides* and *Alexandrium catenella* [J]. **Marine Biotechnology**, 2005, **6**: 587-593.
- [8] 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, **1**: 375-382.
- [9] 刘保忠, 宋林生, 相建海. 海湾扇贝样品不同保存条件下 DNA 的提取及 RAPD 扩增比较 [J]. **海洋科学**, 2001, **25**(3): 51-52.
- [10] 王义权, 周开亚, 徐珞珊, 等. 不同固定剂保存动物组织标本对 RAPD 反应的影响 [J]. **动物学杂志**, 1999, **34**(1): 33-37.
- [11] 方旅平, 林元烧, 曹文清. 不同保存条件下中华哲水蚤基因组 DNA 提取的比较 [J]. **海洋科学**, 2005, **29**(2): 1-4.
- [12] Bielawski K, Zaczek A, Lisowska U, *et al.* The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis [J]. **International Journal of Molecular Medicine**, 2001, **8**: 573-578.
- [13] Gillespie J W, Best C J M, Bichsel V E, *et al.* Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies [J]. **American Journal of Pathology**, 2002, **160**(2): 449-457.
- [14] Banerjee S K, Makdisi W F, Weston A P, *et al.* Microwave based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification [J]. **Biotechniques**, 1995, **18**: 768-773.
- [15] 徐来祥, 张知彬, 宋铭晶, 等. 福尔马林保存的动物标本基因组 DNA 的提取方法 [J]. **动物学报**, 2002, **48**(2): 264-269.
- [16] 张海琪, 薛良义, 李多云, 等. 不同保存方法的大黄鱼肌肉样品基因组 DNA 提取及 RAPD 分析 [J]. **台湾海峡**, 2002, **21**(3): 296-299.
- [17] 肖武汉, 吴春花, 宿兵, 等. 福尔马林固定云南鲷的 DNA 提取及其细胞色素 b 基因序列分析 [J]. **动物学研究**, 1997, **18**(3): 242, 252, 258, 284.
- [18] 何舜平, 陈永久, 张亚平. 鮠科鱼类细胞色素 b 基因片段的序列测定及其系统发育的初步研究 [J]. **动物学研究**, 1999, **20**(2): 81-87.
- [19] 高天翔, 张秀梅, 曾晓起, 等. 固定标本的 DNA 提取及 PCR 扩增 [J]. **青岛海洋大学学报**, 2000, **30**(2): 244-248.
- [20] 李海军, 柳刚, 蒋会勇, 等. 固定剂及固定时间对 DNA 提取质量的影响 [J]. **诊断病理学杂志**, 2004, **11**(3): 182-184.
- [21] 张德华, 周开亚, 孙红英. 乙醇保存的动物标本基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. **生物学杂志**, 2004, **21**(6): 46-48.
- [22] 张德春, 杨代淑, 李晓迎, 等. 用于 RAPD 分析鱼类血样乙醇保存方法的研究 [J]. **淡水渔业**, 1998, **28**(2): 9-11.
- [23] 魏育红, 薛仁宇, 曹广力, 等. 乙醇固定中华绒螯蟹组织的 DNA 提取方法 [J]. **中国水产科学**, 2001, **7**(4): 116-118.
- [24] Tengs T, Bowers H A, Ziman A P, *et al.* Genetic polymorphism in *Gymnodinium galatheanum* chloroplast DNA sequences and the development of a molecular detection assay [J]. **Molecular Ecology**, 2001, **10**(2): 515-523.
- [25] Bowers H A, Tengs T, Glasgow H B, *et al.* Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates [J]. **Applied Environmental Microbiology**, 2000, **66**(11): 6414-6418.
- [26] 张建珍, 郭亚平, 马恩波. 不同保存方式下蝗虫组织 DNA 的提取及 RAPD 分析 [J]. **动物学杂志**, 2004, **39**(2): 53-57.
- [27] 李志真, 谢一青, 黄儒珠, 等. 不同保存方法对光皮桦总 DNA 提取效果的影响 [J]. **分子植物育种**, 2006, **4**(1): 131-134.
- [28] 徐小彪, 陈华, 张秋明. 样品不同保存方法对猕猴桃总 DNA 提取效果的影响 [J]. **江西农业大学学报**, 2004, **26**(3): 321-328.

Comparison of sample preservation methods in single-cell PCR experiment of algae

LI Ping^{1,2}, YU Ren-cheng¹, TANG Xiang-hai¹, ZHOU Ming-jiang¹

(1. The Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: May, 20, 2007

Key words: harmful algal bloom; single-cell PCR; Preservation; *Alexandrium tamarense*

Abstract: Recently, more and more molecular biological methods and techniques have been used in harmful-algal-bloom (HAB) studies. The single-cell PCR method, for example, is promising in genetic studies of HAB species which is hard to culture in the lab. However, little information is available on preservation of the algae samples used for single-cell PCR study. In this experiment, the cultured cells of *Alexandrium tamarense* were used to compare the different sample preservation methods, including formalin fixation (5%), ethanol fixation (95%), Lugol's solution fixation, and refrigeration at -20°C, to find the appropriate sample preservation method. The valid time for each sample preservation method was also tested, using samples preserved for 5 d, 15 d, 30 d and 60 d, respectively. It was found that algae samples preserved by ethanol fixation (95%), Lugol's solution fixation or refrigeration at -20°C for as long as 60 d could still be effectively used for single-cell PCR study. However, for formalin fixation (5%) method, only sample preserved for 5 d gave a positive single-cell PCR result. The morphological features of the algae samples were well preserved by formalin fixation (5%). These results suggest that formalin fixation (5%) is a good choice for short-term (less than 5 d) preservation of algae samples, while 95% ethanol fixation, Lugol's solution fixation, or refrigeration at -20°C are suitable for relatively long-term preservation of algae samples.

(本文编辑:张培新)