

# 纯培养节旋藻全基因组提取方法的比较研究

李善策<sup>1</sup>, 李勇勇<sup>2</sup>, 夏金兰<sup>1</sup>, 秦松<sup>3</sup>

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院, 湖南 长沙 410083; 2. 曲阜师范大学 化学与化工学院, 山东 曲阜 273165; 3. 中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

**摘要:** 本研究从实验室保藏的节旋藻(*Arthrospira*)藻种出发, 挑取形态不同的单藻丝体进行纯化培养, 采用 6 种方法进行全基因组 DNA 提取的比较研究, 而后以 16S rRNA-ITS 区基因作为分子标记对藻株进行相关序列测定和分子系统进化分析。结果表明, 冻融 CTAB 法能够提取出包含染色体外 DNA 在内的节旋藻全基因组, 高质量样品可以满足分子生物学实验要求; 分子系统研究表明, 纯化藻株皆为钝顶节旋藻, 节旋藻与螺旋藻在分子鉴定中属间差异明显。

**关键词:** 钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*); 全基因组提取; PCR; 16S rRNA-ITS

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)09-0028-09

节旋藻(*Arthrospira*), 又称螺旋藻(*Spirulina*), 属蓝藻门(Cyanophyta)蓝藻纲(Cyanophyceae)颤藻目(Oscillatoriales)颤藻科(Oscillatoriaceae), 是典型非固氮、不分枝、不成异形胞的丝状蓝藻。该螺旋型藻类群生长于高碱性、高重碳酸盐浓度的环境中, 具有特殊的耐碱和二氧化碳摄取机制, 在生物学研究上有重要价值。因其应用范围广、营养组分丰富、生物量及安全性高等特点, 成为目前产业化培养最为成功的经济微藻之一<sup>[1-3]</sup>。钝顶节旋藻是节旋藻属中的重要物种, 是现有节旋藻分子遗传学研究的模式生物。NCBI 已经提交全基因组序列的节旋藻藻株除 *Arthrospira maxima* CS-328 外, 均为钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)。然而现有进行全基因组测序的节旋藻仍未能获得完整的序列拼接完成图, 限制条件之一就在于足量高质基因组的获得。

节旋藻中进行基因组提取所面临的常见难题有基因组 DNA 含量低<sup>[4]</sup>, 细胞裂解效率低, 杂蛋白、多糖、酚类物质污染等<sup>[5]</sup>, 此外, 细胞内含有大量限制性内切酶<sup>[6]</sup>, 这些酶既能够有效防御外源 DNA 的入侵, 同时也阻碍了藻体本身全基因组的抽提。目前, 常用的基因组抽提方法及特点如下: (1)细菌基因组试剂盒: 常用细菌基因组提取方法, 快速提取流程, 利用对液体培养物的酶解破碎; (2)Qiagen 植物基因组提取试剂盒: 植物复合物中提取高分子量 DNA 方法, 同时使用机械和酶解法; (3)SDS-蔗糖法: 节旋藻高分子量制备法, 利用液氮碾磨对细胞进行机械裂解; (4)酶解法: 节旋藻基因组抽提特异性方法, 数

次冻融处理, 以使样品更加利于被酶解; (5)常规 CTAB 法: 植物基因组提取常用方法, 使用机械破碎; (6)冻融 CTAB 法: 节旋藻基因组特异性提取方法, 数次冻融处理, 蛋白酶 K 去除杂蛋白, CTAB 沉淀盐分。已有针对样品预处理过程研究关注很少, 虽有结果表明含水量少的出发样品其抽提 DNA 样品量多<sup>[7]</sup>, 但以往对植物 DNA 提取研究多忽略了预处理过程中对样品的初级破碎; 磁珠、超声波等机械破碎方法对 DNA 的剪切力往往过大, 难以获得完整的高分子量 DNA 样品; 同时, 因节旋藻复杂多层细胞壁<sup>[4]</sup>以及多糖胶质鞘形成的特殊超结构<sup>[8]</sup>使得其对溶菌酶的耐受质量浓度达 2 mg/mL<sup>[9]</sup>; 不同全基因组抽提方法之间在细胞破碎、杂质去除、核酸浓缩等方面差别显著。本研究以节旋藻为材料, 挑取单根藻丝体进行纯培养, 在对数生长期收集足量藻体后, 经反复冻融实现初级破碎, 作为后续实验的出发样品。针对特定藻株筛选出一种快速有效的全基因组提取方法, 不但获得量足质高的基因组, 还能稳定获得染色体外 DNA 片段。研究提取分离藻株全基因组进行 16S rRNA-ITS 基因扩增, 高质量样品可以满足分子生物学实验要求。

收稿日期: 2012-10-12; 修回日期: 2013-03-23

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费资助项目(200905021-3, 2012 05027); 山东省自然科学基金项目(ZR2012DQ015); 广东省中国科学院全面战略合作项目(2011A090100040)

作者简介: 李善策(1987-), 男, 黑龙江鸡西人, 硕士研究生, 主要从事藻类分子遗传学研究, 电话: 0535-2109077, E-mail: lihsance@126.com; 夏金兰, 通信作者, 教授, E-mail: jlxia@mail.csu.edu.cn, 秦松, 通信作者, 研究员, E-mail: sqin@yic.ac.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 藻株及其培养

本研究所用藻株如表 1 所示。其中 F3 野生藻株由中国海洋大学张学成老师惠赠。F3 藻株<sup>[10]</sup>经单藻

丝挑取获得 3 株纯培养品系, J12 为实验室保藏品系。藻株培养所用的培养基为 Zarrouk 液体培养基<sup>[11]</sup>, 26℃光暗交替(12L/12D), 40  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 培养至对数生长期( $A_{560}$  为 0.8~1.0), 离心收集, 经 TE 缓冲液冲洗 3 遍后, 于-80℃保存待用。

表 1 本研究中藻株的相关信息

Tab. 1 Information of *Arthrospira* strains.

藻株鉴定	株型简称	来源	形态性状	16S rRNA-ITS 基因序列登录号
钝顶节旋藻 <i>Arthrospira platensis</i>	F3L	实验组保藏, 自行分离纯化	直线型	KC195864
钝顶节旋藻 <i>Arthrospira platensis</i>	F3S	实验组保藏, 自行分离纯化	松散螺旋	KC195865
钝顶节旋藻 <i>Arthrospira platensis</i>	F3C	实验组保藏, 自行分离纯化	紧致螺旋	KC195866
钝顶节旋藻 <i>Arthrospira platensis</i>	J12	实验组保藏, 自行分离纯化	直线型	KC195867

### 1.2 全基因组提取

#### 1.2.1 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Bac-geno 法: TIANamp Bacteria DNA Kit<sup>®</sup>)

收集 300 mg 新鲜藻体经 TE 缓冲液冲洗后, 分装在 1.5 mL EP 管中, 于-80℃条件存储。反复冻融 3 次后作为出发样品, 用于后续实验。后续基因组 DNA 抽提步骤按照试剂盒操作手册进行。每种方法进行 3 组平行样品实验。

#### 1.2.2 Qiagen 试剂盒(Qiagen 法: DNeasy Plant Mini Kit<sup>®</sup>, Cat. No.69104)

出发样品经液氮研磨后, 按照试剂盒操作手册进行基因组 DNA 提取。

#### 1.2.3 SDS-蔗糖法(SDS-suc 法)

出发样品经液氮研磨后, 按照茅云翔等<sup>[12]</sup>方法进行基因组 DNA 的提取。

#### 1.2.4 酶解法(Enzyme 法)

参照 Morin 等<sup>[13]</sup>改进的节旋藻全基因组 DNA 提取方法。将用 0.5 mL 0.15 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L EDTA 重新悬浮的细胞悬浮液倒入 2 mL 的 EP 管中。用液氮冻融, 再在 37℃水浴中融化, 如此反复冻融 3 次, 使得细胞壁破碎更易用酶裂解。然后 8000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 重新用 0.5 mL TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH8.0)重新悬浮, 并转移到新的 2 mL 的 EP 管中, 加 100  $\mu\text{L}$  50 mg/mL 的溶菌酶放入 37℃水浴 30 min。随后用 5  $\mu\text{L}$  50 mg/mL 蛋白酶 K 和终浓度为 2%的 SDS 在 37℃水浴 1 h。多糖、蛋白质和细胞壁碎片用加入 NaCl 的 CTAB 选择性沉淀剔除(150  $\mu\text{L}$  5 mol/L NaCl, 1/10 体积的 10% CTAB 储备液), 轻轻倒转混匀样品, 65℃水浴 10 min 用来优化 CTAB-蛋白和 CTAB-多糖复合物的结

构。加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)净化核酸。将 EP 管冰浴 30 min 析出 CTAB 复合物然后 8000 r/min 离心 10 min。将上清液转入新的 EP 管中, 用 0.6 体积的异丙醇轻轻地混匀直到 DNA 完全沉淀。15000 r/min, 4℃, 离心 10 min 获得 DNA 沉淀, 并用 1 mL 70%的冰乙醇移除剩余的盐。离心后, 移除最后的悬浮液, 将沉淀吹干后用 100  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液悬浮(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH8.0)。样品中加入 1  $\mu\text{L}$  10 mg/mL RNase, 放入 37℃水浴 1 h。

#### 1.2.5 常规 CTAB 法(Nor-CTAB 法)

出发样品经液氮研磨后, 加入 0.9 mL 已预热至 65℃的 2×CTAB 提取液[2.0% CTAB, 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 0.7 mol/L NaCl, 20  $\mu\text{L}$ , 1% $\beta$ -巯基乙醇(使用前加入)], 加入蛋白酶 K 溶液 20  $\mu\text{L}$  至终浓度 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 悬浮并混合均匀, 65℃水浴 1 h, 期间每隔 10 min 左右将样品轻轻颠倒混匀。加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 轻轻颠倒混匀, 12000 r/min 离心 10 min, 除去细胞碎片等杂质, 取上清, 加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 轻轻颠倒混匀后于 12000 r/min 离心 10 min。取上清液于另一灭菌离心管中, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇及 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH4.8), 同时加入 1  $\mu\text{L}$  助沉降剂, 轻轻颠倒几次后于-20℃下过夜放置, 使 DNA 充分沉淀。取出离心管, 12000 r/min 离心 10 min。沉淀用 70%的乙醇洗涤 2 次, 室温吹干, 溶于 40  $\mu\text{L}$  TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0), -20℃保存, 备用。

#### 1.2.6 冻融 CTAB 法(Fre-CTAB 法)

参照 CTAB-蛋白酶 K 法<sup>[14]</sup>改进的节旋藻全基因组 DNA 提取方法。出发样品室温融化后, 加入

0.9 mL 已预热至 65℃ 的 2 × CTAB 提取液[2.0% CTAB, 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 0.7 mol/L NaCl, 1%β-巯基乙醇(使用前加入)], 加入蛋白酶 K 溶液至终浓度 200 μg/mL, 悬浮并混合均匀, 65℃ 水浴 1 h, 期间每隔 10 min 左右将样品轻轻颠倒混匀。室温下 10000 rpm 离心 5 min, 除去细胞碎片等杂质, 上清液中加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 轻轻颠倒混匀后于 12 000 r/min 离心 10 min。取上清液于另一灭菌离心管中, 加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 轻轻颠倒混匀, 12000 r/min 离心 10 min。上清液中加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 轻轻颠倒混匀后于 12000 r/min 离心 10 min。取上清, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇及 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH4.8), 轻轻颠倒几次后于 -20℃ 下过夜放置, 使 DNA 充分沉淀。取出离心管, 12000 r/min 离心 10 min。沉淀用 70% 的乙醇洗涤, 室温吹干, 溶于 40 μL TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0)或 ddH<sub>2</sub>O, -20℃ 保存备用。

### 1.3 DNA 定量与纯化分析

分离 DNA 样品的分子量和降解情况通过凝胶电泳来分析。3 μL 样品上样于浓度为 1% 的琼脂糖凝胶, EB 染色, 在 130 V, 195 mA 条件下电泳 35 min, 同时上样分子质量标记 Marker。抽提 DNA 样品的含量与纯度测定可以通过 ND-1000 分光光度系统(Nanodrop Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.)来完成。每个样品取 2 μL 用以测定 230 nm, 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度。DNA 浓度通过在 260 nm 处进行分光光度定量进行测定。样品纯度通过测定  $A_{260}/A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{230}$  吸收率比例的计算来评估。通常情况下, 认为  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ ,  $A_{260}/A_{230} > 2$  时 DNA 样品纯度好。反之, 较低的  $A_{260}/A_{280}$  比率表明样品中有蛋白和/或酚污染, 而低  $A_{260}/A_{230}$  比率表明在抽提物中可能有苯酚盐、硫氰酸盐、碳水化合物或盐类等有机化合物的存在。

### 1.4 PCR 扩增

#### 1.4.1 16S rRNA-ITS 基因 PCR 扩增

节旋藻全基因组 16S rRNA-ITS 基因序列的特定引物参照 Willmott 等<sup>[15]</sup>设计的引物 P: 5'-AGAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3'和 Pr: 5'-TTTGCGGCCG-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3'进行合成。PCR 扩增反应体系为 25 μL, 其中 2.5 μL 10×Buffer, 2 dNTPs(2.5 mmol/L), 0.125 μL *Taq* DNA polymerase (5 U/μL), 正反引物(10 mol/L)各 1 μL, 模板 1 μL(10~

100 ng/μL), 17.375 μL ddH<sub>2</sub>O; PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 3.5 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。

#### 1.4.2 ITS 基因 PCR 扩增

为证实抽提 DNA 样品用于分子生物学实验的稳定性, 针对节旋藻的转录间隔区(ITS, Internally Transcribed Spacer)以样品为模板进行聚合酶链式反应实验。按照节旋藻已经划分出的 2 个聚簇和 4 个亚簇, 同时进行 6 个 PCR 反应。PCR 的引物和条件按照已有文献报道进行<sup>[16]</sup>。PCR 产物经 EB 染色后, 上样 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。本实验选择的 ITS 扩增引物如下: 16S3'F: TGYGGCTGGATCAC-CTCCTT; 23S5'R: TCTGTGTGCCTAGGTATCCAC-CGTT。PCR 扩增反应体系为 25 μL, 其中 2.5 μL 10×buffer, 2 dNTPs (2.5 mmol/L), 0.125 μL *Taq* DNA polymerase(5U/μL), 正反引物(10 mol/L)各 1 μL, 模板 1 μL(10~100 ng/μL), 17.375 μL ddH<sub>2</sub>O; PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 53℃ 复性 40 s, 68℃ 延伸 75 s, 10 个循环; 90℃ 变性 45 s, 53℃ 复性 40 s, 68℃ 延伸 75 s, 25 个循环; 68℃ 延伸 7 min。

### 1.5 序列测定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶回收, 将回收的 PCR 产物连接到 pMD-18T 载体, 然后转化到 *E.coli* 感受态 Top10 细胞, 以含 Amp (100 mg/mL) 的 LB 培养基筛选转化子, 采用菌落 PCR 法检测重组子。阳性克隆子经扩大培养, 送交上海生工公司进行双向测序。

### 1.6 系统进化分析

用 BLAST 软件将测序结果与 GenBank 中的相关序列进行同源性比较, 确定所得的基因片段。采用 BioEdit 7.0 软件进行序列分析, Clustal X1.81 进行多重序列比对<sup>[17]</sup>, 系统发育树的构建采用 phyML 软件, Bootstrap 重复检测 1000 次构建基于节旋藻的 16S rRNA-ITS 基因的系统发育树。

## 2 结果

### 2.1 针对特定钝顶节旋藻藻株基因组不同提取方法的比较

不同方法提取的 *Arthrospira* sp. F3L 基因组 DNA 电泳图如图 1 所示。结果表明, 不同方法提取的基因组 DNA 的量和纯度存在明显差别。其中, 最优化冻融 CTAB 法的基因组抽提量较酶解法多 50%, 是常规 CTAB 法的近 2 倍。



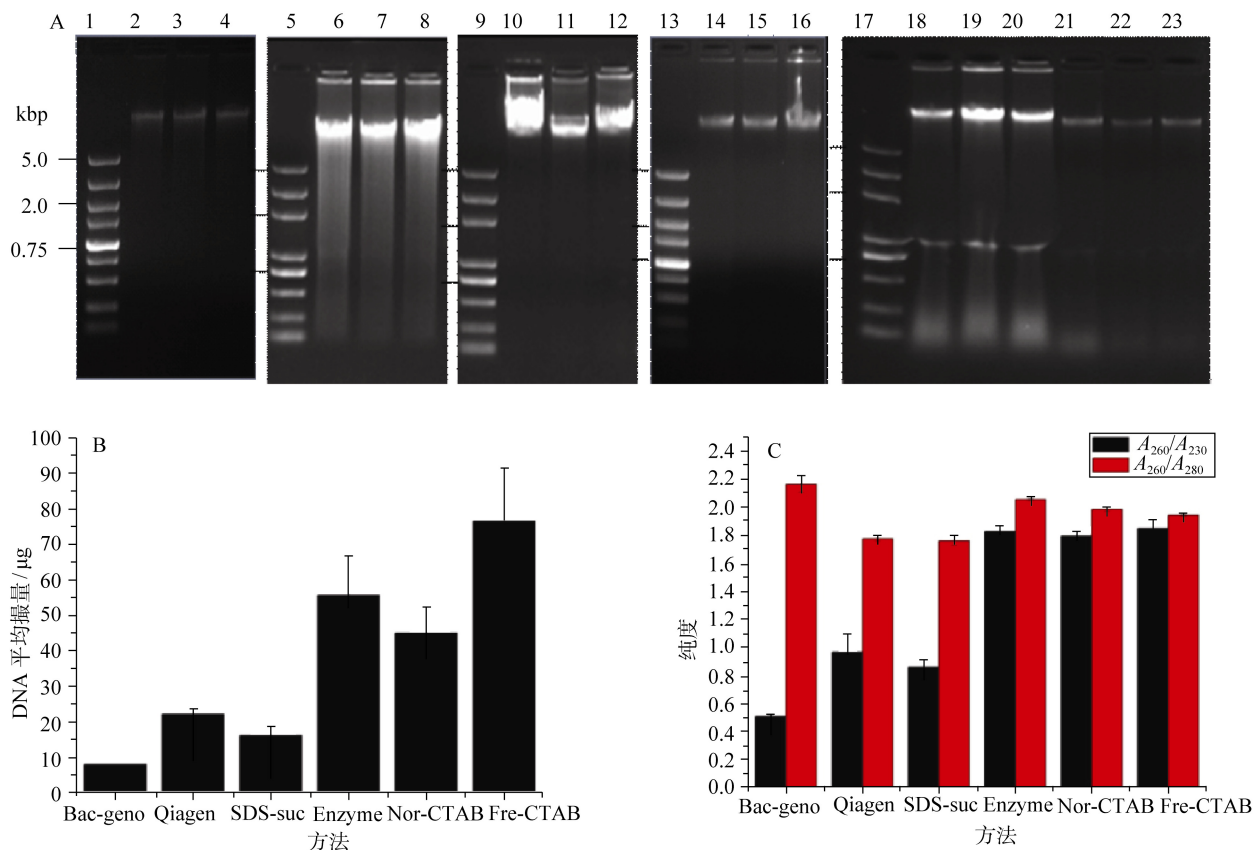


图1 不同方法针对藻株 *Arthrospira* sp. F3L 进行基因组 DNA 提取后, 1%琼脂糖凝胶电泳图(A); DNA 样品平均提取量(B); DNA 样品纯度检测(C);

Fig.1 Comparison of 6 methods for *Arthrospira* sp.F3L genome extraction, 1% agarose gel electrophoresis(A); DNA yield(B); DNA purity detection(C)

1,5,9,13,17. 5 kbp DNA 梯度; 2~4. Bac-geno 法; 6~8. Qiagen 法; 10~12. SDS-suc 法; 14~16. Enzyme 法; 18~20. Fre-CTAB; 21~23. Nor-CTAB;

1,5,9,13,17. 5 kbp DNA ladder; 2~4. Bac-geno; 6~8. Qiagen; 10~12. SDS-suc; 14~16. Enzyme; 18~20. Fre-CTAB; 21~23. Nor-CTAB

细菌基因组提取试剂盒法样品提取量/纯度最低; SDS-蔗糖法提取的基因组 DNA 纯度较差, 有少量的蛋白污染, 同时 260 nm 处吸光值表明杂盐成分或杂酚类物质污染严重; 与此同时, 用 Qiagen 试剂盒法提取的基因组 DNA 样品, 由其  $A_{260}/A_{230}$  比值结果表明, 盐分污染严重; 酶解法、常规 CTAB 法和冻融 CTAB 法的全基因组质量检测在高质量可接受的阈值范围之内。

通过琼脂糖凝胶电泳的检测支持上述的观察结果。细菌基因组提取试剂盒法和 Qiagen 植物基因组提取试剂盒法其样品降解严重; Qiagen 试剂盒和 SDS-蔗糖法提取的样品其电泳条带亮度大而不均一, 可能有部分核酸被阻塞在点样孔和泳道中, 分光光度检测的结果与之相印证, 推测样品形成了盐与核酸的复合物, 最终导致其迁移形态的异常。

常规 CTAB 法抽提节旋藻基因组虽然经过了液氮研磨, 使得藻体细胞充分破碎, 抽提效果较好, 用该法提取的基因组显示出了正常的条带模式, 此外还有少量出现的染色体外 DNA 片段, 但获得的样品量较低; 酶解法是对 Morin 等<sup>[13]</sup>设计的节旋藻基因组最优化提取流程的修饰方法, 基因组电泳条带单一, 质量稳定, 可靠性高, 没有明显降解现象, 同时也得到了荧光检测的阈值支持。冻融 CTAB 法可以获得大量的基因组样品, 电泳条带亮度均一, 重复性好, 更为有趣的是, 该方法不但抽提出高质量基因组, 同时还出现了明显的染色体外 DNA 条带, 该条带中间亮度高, 向两侧渐细, 且呈弯弧状。研究选取冻融 CTAB 法为节旋藻全基因组抽提的最优方法。

## 2.2 最优方法针对不同藻株的基因组提取

除却 F3L, 对其余几株钝顶节旋藻进行冻融

CTAB 法的全基因组 DNA 提取实验。结果如图 2 所示。从这些藻株中均可以获得稳定性好, 高分子量

的基因组样品。然而, 不同藻株之间在基因组获得量以及纯度方面存在差异性。

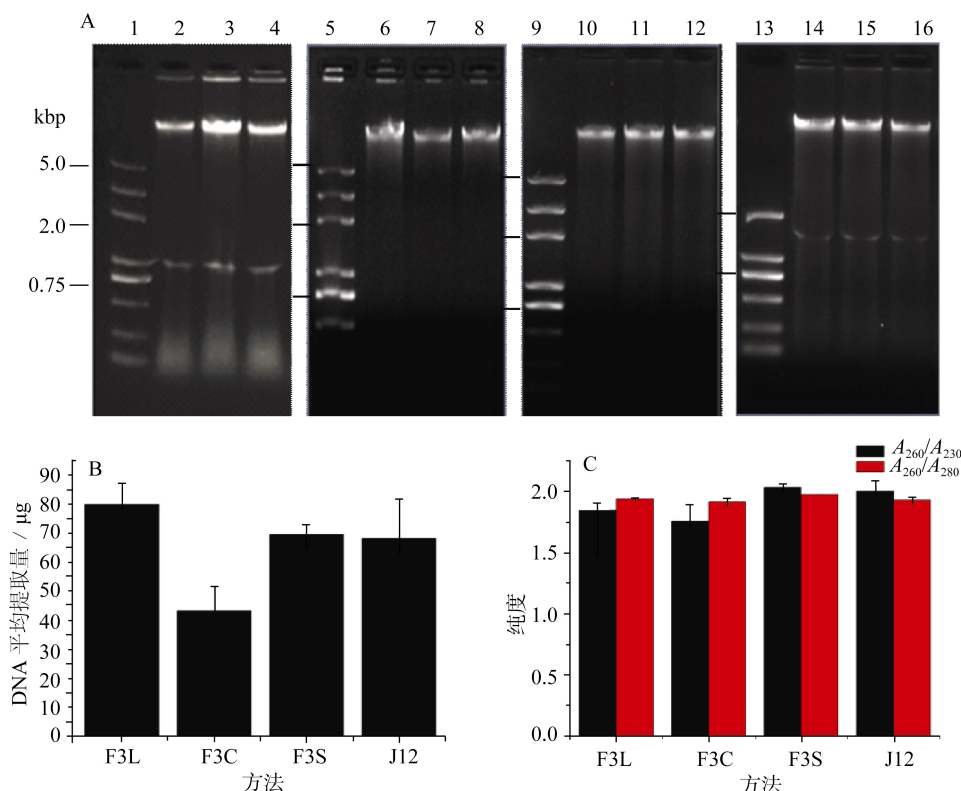


图 2 冻融 CTAB 法对不同藻株进行全基因组 DNA 提取样品, 1%琼脂糖凝胶电泳图(A); DNA 样品平均提取量(B); DNA 样品纯度检测(C);

Fig. 2 Fre-CTAB for genome extraction in four *Arthrospira* sp., 1% agarose gel electrophoresis(A); DNA yield(B); DNA purity detection(C)

1,5,9. 5 kbp DNA 梯度; 13. 2 kb DNA 梯度; 2~4. F3L; 6~8. F3S; 10~12. F3C; 14~16. J12

1,5,9. 5 kbp DNA ladder; 13. 2 kb DNA ladder; 2~4. F3L; 6~8. F3S; 10~12. F3C; 14~16. J12

实验验证, 分离流程有较好的重复性, 但在不同藻株间, 其基因组抽提样品量有明显差异。从藻株 F3C ca.43.3 µg 到藻株 F3S ca.69.6 µg。尽管这些样品产量相对较高, 但均低于 F3L 样品的基因组抽提量。此外, 冻融 CTAB 法对于藻株 F3S 和 J12 两株藻在基因组抽提量上相近。而且, 在藻株 J12 中, 同样发现了节旋藻的染色体外 DNA 片段, 其大小为 1200 bp 左右。藻株 F3C 抽提样品的  $A_{260}/A_{230}$  比值较低, 表明其中可能存在少量有机化合物的污染, 在电泳检测中可以看到有少量的拖尾现象。

### 2.3 基于 16 SrRNA-ITS 基因的系统发育分析

对测序获得 4 株藻(系统发育树中实心圆标记)的 16S rRNA-ITS 基因序列递交到 NCBI 数据库, 登录号分别为: KC195864, KC195865, KC195866,

KC195867; 通过建立本地基因组数据集, 从已经测序节旋藻藻株(系统发育树中空心圆标记)全基因组中挖掘 16S rRNA-ITS 序列数据, 同时选取 PCC 藻种库、淡水藻种库保藏藻株等节旋藻藻株的对应序列(序列登录号如下: DQ393284, JN831265, DQ279772, AF329392, AF329393, FJ826623, DQ279770, DQ279768, DQ393285, Y18793, AJ639890, AJ635436, X75045, AY575935, Y18792, AB003166, AY575934, FJ826621), 选定颤藻属藻株 *Oscillatoria miniata* NAC8-50 (登录号: GU724203)的 16S rRNA-ITS 区序列为外支, 利用极大似然法构建系统发育树(图 3)。结果表明: (1)四株测序藻株 16S rRNA-ITS 序列同其他节旋藻藻株构成了稳定簇群, 并得到 bootstrap 分析的极强支持(100%); (2)由数据库中的 9 株螺旋藻品系聚类至另一个分支, 且并未形成单一簇群,

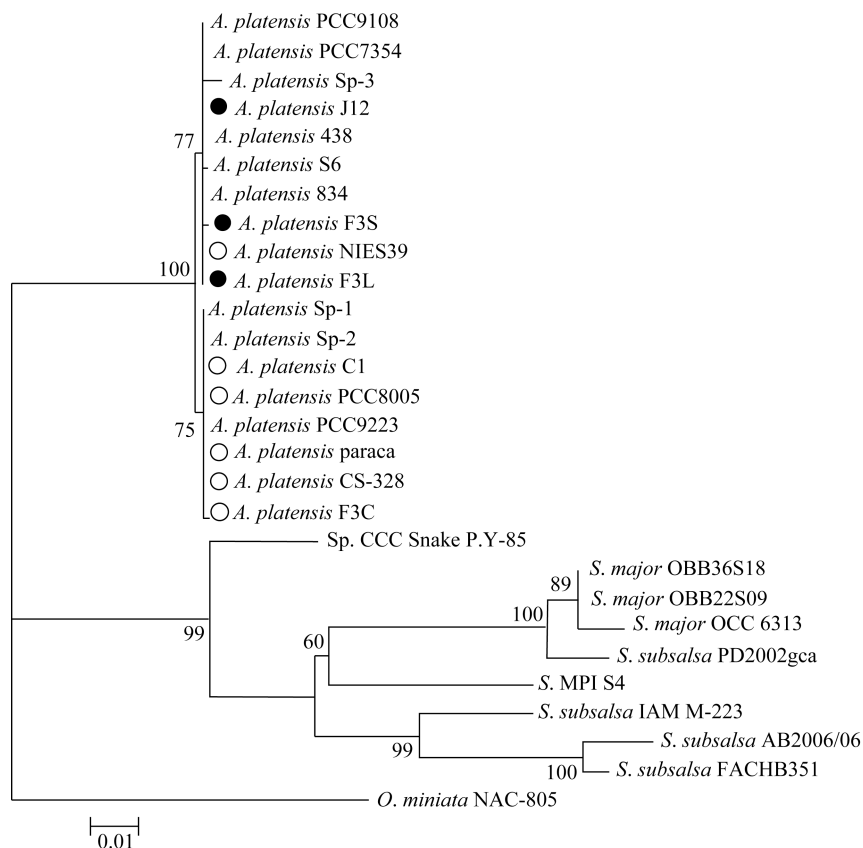


图 3 基于 16S rRNA-ITS 区序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA-ITS region sequences

*S. major* OBB36S18, *S. major* OBB22S09, *S. major* PCC6313 与 *S. subsalsa* PD2002gca, *S. subsalsa* AB 2002/06, *S. subsalsa* FACHB 351 与 *S. subsalsa* IAM M-233 各构成一个分支, bootstrap 分析支持率分别为 100 % 和 99%; (3) 节旋藻与螺旋藻在系统发育树中明显分为两支, 现有进行全基因组测序的藻株均为节旋藻。

#### 2.4 16S-23S rRNA 转录间隔区间 ITS 基因 PCR 扩增

采用冻融 CTAB 法对四株单藻丝分离纯培养藻株进行转录间隔序列(ITS)的 PCR 检测。在 6 个引物对条件下对全基因组 DNA 样品进行 PCR 扩增。各藻株不同亚簇扩增情况: F3C、J12(I); F3S、J12(II), 引物对簇 I 和簇 II 的目的产物 365 bp; F3C、J12(IA), J12(IB), 亚簇 IA 和 IB 的目的产物为 329 bp; F3L、F3S、F3C、J12(IIA), F3L、F3S、F3C、J12(IIB)亚簇 IIA 和 IIB 的目的产物为 225 bp。PCR 产物的电泳检测结果(图 4)表明, 电泳条带大小与预期相符。该方法提取的全基因组 DNA 样品可以满足 PCR 等分子生物学分析的要求。

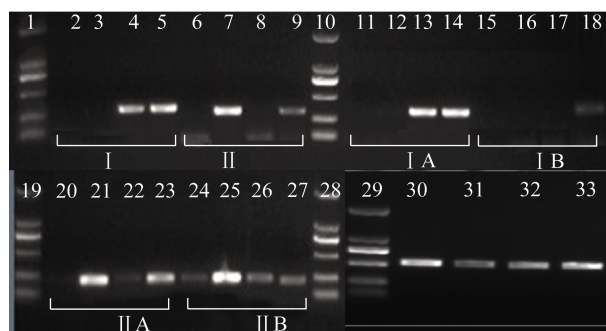


图 4 4 株藻样全基因组样品 PCR 扩增转录间隔序列(ITS) 簇与亚簇

Fig. 4 Different *Arthrospira* strains ITS gene and subcluster PCR

1,10,19,28,29 泳道. 2kb DNA 梯度; 2~5. cluster I 引物对; 6~9. clusterII 引物对; 11~14. subcluster IA 引物对; 15~18. IB 引物对; 20~23. subcluster IIA 引物对; 24~27. subcluster IIB 引物对; 30~33. F3L、F3S、F3C、J12 的 ITS 序列  
1,10,19,28,29 lane. 2kb DNA ladder; 2~5. cluster I primer pair; 6~9. clusterII primer pair; 11~14. subcluster IA primer pair; 15~18. IB primer pair; 20~23. subcluster IIA primer pair; 24~27. subcluster IIB primer pair; 30~33. ITS sequence of F3L、F3S、F3C、J12

### 3 讨论

螺旋藻是目前利用最为广泛的经济微藻,但关于其分子遗传的研究却进展缓慢,高质足量基因组样品的获得是关键环节。藻体特性上,节旋藻全基因组抽提存在的两大主要难题:细胞裂解效率低<sup>[18-19]</sup>,高污染或低纯度<sup>[20]</sup>。方法选择上,样品对于方法的要求上存在藻体特异性,如多种基因组抽提流程对于 F3L 藻株的分离效率差别明显,在检测指标上出现了显著的不同。同时,针对不同藻株提取流程的优化也是影响高质量样品获得的重要因素。

节旋藻外被胶质鞘,使其可耐受高浓度溶菌酶、煮沸裂解等处理;单纯的酶解法对于节旋藻复杂多层细胞壁的破碎效率低,基因组样品获得率低,而液氮研磨对于基因组 DNA 的剪切力过大,常导致其降解严重。针对细胞裂解效率问题,本研究基因组提取实验的出发样品先经反复冻融实现了初级破碎,该步骤的关键点在藻样融化应在低于室温条件下进行,时间长短视藻体量决定,这可避免快速反复冻融导致的基因组降解,同时由于条件温和,也利于后续缓冲液条件下细胞的进一步裂解。

DNA 样品制备过程中的蛋白和多糖的选择性沉降,通常是使用含有 NaCl 的 CTAB 缓冲液来实现的<sup>[21, 22]</sup>。藻类 DNA 提取研究中无论是充分裂解细胞,还是对于藻体内次生代谢物的去除,CTAB 作为缓冲液组分都取得了较好的效果<sup>[7, 23, 24]</sup>。本研究中,细菌和植物基因组提取试剂盒法在样品纯度上不理想,SDS 蔗糖法也出现了杂蛋白多的情况,可见,在处理反复冻融节旋藻样品时,商业试剂盒中的裂解缓冲液对于保证其基因组的完整性并不适合,SDS 缓冲液也难以获得高纯度 DNA。而本文实验流程中均采用 CTAB 缓冲液的其余 3 种方法,其样品  $A_{260}/A_{280}$  及  $A_{260}/A_{230}$  比值均在标准阈值范围内,无论是从基因组 DNA 提取量还是样品纯度上都具有明显的优势。此外,实验发现,针对节旋藻的全基因组 DNA 抽提过程,苯酚、氯仿、异戊醇等有机试剂的加入顺序对终样品存在显著影响,冻融 CTAB 法需要先经氯仿:异戊醇(24:1)抽提后,再混合抽提(酚:氯仿:异戊醇为 25:24:1),为保证杂酚的去除,再次经过氯仿:异戊醇(24:1)抽提,且每次抽提过程样品充分混合,这个操作过程直接决定了包括染色体外 DNA 在内的节旋藻全基因组抽提量,同时,对于藻体色素去除效果显著。

冻融 CTAB 法也适用于节旋藻其他藻株的全基因组抽提,如 *Arthrospira* F3S, *Arthrospira* F3C 和 *Arthrospira* J12,虽然在样品量上有差别,但其纯度质量上满足分子生物学的实验要求,这在 PCR 扩增产节旋藻转录间隔序列(ITS)及其亚簇实验中得以佐证(如图 4)。此外,琼脂糖凝胶电泳显示,在 *Arthrospira* J12 藻株中也出现了节旋藻染色体外 DNA,大小在 1.4kb 左右,该方法在全基因组抽提中有比较稳定的重复性。

作为食品用途的“螺旋藻”在生物分类学上,该命名并不恰当。随着高分辨电镜技术的开发和分子系统学研究的开展,节旋藻与螺旋藻种系划分已日渐清晰。《伯杰氏系统细菌学手册》已正式将节旋藻和螺旋藻分立颤藻科的两个不同的属,其中节旋藻包括钝顶节旋藻和极大节旋藻在内的 30 个不同种<sup>[25]</sup>。钝顶节旋藻的主要生物学特征是由多细胞围成的柱型丝状体蓝藻,光学显微镜下藻丝体整体呈螺旋状,有薄的细胞横壁且横隔膜收缢可见,含气囊<sup>[3]</sup>,GC 含量为 44%~46%<sup>[25-29]</sup>,16S 和 23S rRNA 转录间隔序列包括 tRNA<sup>Ile</sup> 和 tRNA<sup>Ala</sup> 基因<sup>[12, 30]</sup>。本文利用传统分子标记 16S rRNA-ITS 区基因构建的系统发育树表明,节旋藻与螺旋藻在系统发育树中明显分为两支,现有进行全基因组测序的藻株均为节旋藻。研究为节旋藻和螺旋藻的分类提供了分子遗传学证据,为进一步研究节旋藻分子系统学提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Ciferri O, Tiboni O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1985, 39(1): 503-526.
- [2] Vonshak A. *Spirulina*: growth, physiology and biochemistry[M]. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). London: Taylor & Francis, 1997: 43-65.
- [3] Sili C, Torzillo G, Vonshak A. *Arthrospira* (*Spirulina*)[J]. Ecology of Cyanobacteria II, 2012, 12: 677-705.
- [4] Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism.[J]. Microbiological Reviews. 1983, 47(4): 551.
- [5] De Philippis R, Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1998, 22(3): 151-175.
- [6] Zhao F, Zhang X, Liang C, et al. Genome-wide analysis of restriction-modification system in unicellular and



- filamentous cyanobacteria[J]. *Physiological Genomics*, 2006, 24(3): 181-190.
- [7] 李晋楠, 汪志平. 高质量螺旋藻基因组 DNA 制备方法研究[J]. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*. 2002, 28(5): 533-536.
- [8] Hoiczky E, Hansel A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(5): 1191-1199.
- [9] Robinson S J, Deroo C S, Yocum C F. Photosynthetic electron transfer in preparations of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*[J]. *Plant Physiology*, 1982, 70(1): 154-161.
- [10] Song Q, Shun T, Peijun Z, *et al.* Isolation of plasmid from the blue-green alga *Spirulina platensis*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 1993, 11(3): 285-288.
- [11] Zarrouk C. Contribution a L'etude D'une Cianophycee: Influence de Divers Facteurs Physiques Et Chimiques Sur la Croissance Et la Photosynthese de *Spirulina Maxima* (Setch. Et Garndner) Geitler[M]. *Faculte des Sciences: Universite de Paris*, 1966.
- [12] 茅云翔, 杨官品, 张宝红, 等. 16S rRNA 基因与 16S—23S rRNA 转录单元内间隔区序列分析及其在节旋藻和螺旋藻分类鉴定中的应用[J]. *高技术通讯*, 2001, 11(6): 12-18.
- [13] Morin N, Vallaeyts T, Hendrickx L, *et al.* An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 80(2): 148-154.
- [14] 曹学成, 汪志平, 杨灵勇, 等. 螺旋藻 (*Spirulina*) 基因组外 DNA 的高效提取与纯化[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(3): 193-198.
- [15] A. W, S. T, Van de Peer Y, *et al.* Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA[J]. *Journal of Phycology*, 1992, 28: 828-838.
- [16] Baurain D, Renquin L, Grubisic S, *et al.* Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* ("*Spirulina*") (cyanophyceae, cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30-year-old dried samples from africa1[J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(2): 384-393.
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [18] Billi D, Caiola M G, Paolozzi L, *et al.* A method for DNA extraction from the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* and its application to identification of *ftsZ*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 4053-4056.
- [19] Fiore M F, Moon D H, Tsai S M, *et al.* Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 39(2): 159-169.
- [20] Porter R D. DNA transformation[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 167: 703-712.
- [21] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [22] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues[J]. *Plant Molecular Biology*, 1985, 5(2): 69-76.
- [23] 郭宝太, 毕玉平. 条斑紫菜高纯度总 DNA 及其质粒状 DNA 的提取[J]. *海洋学报*, 2000, 22(2): 87-91.
- [24] 郭宝太, 夏连胜. 条斑紫菜质粒状 DNA 的提取与富集[J]. *海洋通报*, 2000, 19(4): 56-60.
- [25] Fujisawa T, Narikawa R, Okamoto S, *et al.* Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39[J]. *DNA Research*, 2010, 17(2): 85-103.
- [26] 赵方庆. 螺旋藻基因组结构分析和藻胆蛋白的适应性进化[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006.
- [27] Janssen P J, Morin N, Mergeay M, *et al.* Genome sequence of the edible cyanobacterium *Arthrospira sp.* PCC 8005[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(9): 2465-2466.
- [28] 谭扬. 钝顶节旋藻 (*Arthrospira platensis* AGB-AP02) 全基因组测序及特性分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.



- [29] Cheevadhanarak S, Paithoonrangsarid K, Prommeenate P, et al. Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438)[J]. Standards in Genomic Sciences, 2012, 6(1): 43.
- [30] 徐虹, 柯珍恋, 章军. 螺旋藻的系统分类学及基因工程研究进展[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 26-28.

## Comparative investigation on whole genome DNA extraction of axenic strains of *Arthrospira platensis*

LI Shan-ce<sup>1</sup>, LI Yong-yong<sup>2</sup>, XIA Jin-lan<sup>1</sup>, QIN Song<sup>3</sup>

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China; 2. School of Chemistry and Chemical engineering, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

**Received:** Oct.,12,2012

**Key words:** *Arthrospira platensis* whole genome DNA extraction PCR 16S rRNA-ITS

**Abstract:** Single filaments of *Arthrospira/Spirulina* strains were picked up and axenically cultured. Six protocols for extraction of whole genome DNA of the *Arthrospira* strains were comparatively studied. The phylogenetic analysis of 16S rRNA-ITS (internally transcribed spacer) gene sequences as molecular markers were conducted. The results show that the method of Freezing-thawing CTAB was effective in extracting extra-genomic DNA, not chromosomal from the tested strains. The extracted DNA containing excellent overall quality and high molecular weight can be directly used for molecular biology experiments. The molecular phylogenetic dendrogram indicates that the strains used in this research were all *Arthrospira platensis*, which were significantly different from strains of *Spirulina* in molecular classification and identification in cyanobacterial genus.

(本文编辑: 梁德海)