

# 红藻真江蓠质粒的发现\*

秦松 童顺 崔武<sup>†</sup> 王希华 李亚非<sup>††</sup>

吴光耀<sup>†</sup> 张培军 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(北京大学, 北京 100871)<sup>†</sup>

(中国人民解放军肝病研究所, 北京 100700)<sup>††</sup>

**提要** 于 1992 年 4 月—1993 年 4 月, 用液氮研磨-苯酚/氯仿抽提-异丙醇沉淀的方法提取青岛沿海产紫菜、真江蓠、龙须菜、海膜 4 种红藻的总 DNA; 利用 Hoechst-CsCl 密度梯度超离心法将叶绿体 DNA 与核 DNA 分开。对抽取的叶绿体 DNA 梯度组分电泳结果表明, 真江蓠样品出现质粒的电泳条带。以透射电镜观察到闭合环状 DNA 图像(周长平均值为  $4.3 \times 10^{-7} \text{m}$ , 约为 1.3kb); 分子杂交结果显示, 真江蓠质粒与其叶绿体 DNA 之间没有同源性, 而与核 DNA 之间有一定同源性。

**关键词** 红藻 真江蓠 质粒 CsCl 密度离心

质粒是指独立于染色体 DNA 之外的遗传物质 (Lederberg, 1952)。Goff 等(1988) 用 Hoechst-CsCl 密度梯度超离心法分离龙须菜等红藻叶绿体 DNA 的同时, 还分离到闭合环状的质粒。目前国外已对 20 余种红藻进行了研究, 在 13 种红藻中发现了质粒的存在 (Goff et al., 1990; Villemur, 1990a; Shivji, 1991)。尽管浮力密度同叶绿体 DNA 接近, 但不能确定在细胞中的分布位置; 尽管有些质粒发现具有转录活性, 但尚未探明其担负的功能 (Goff et al., 1990; Villemur, 1990b)。红藻质粒已成为藻类分子生物学的热点之一, 为红藻遗传分析和分类进化研究提供了新的途径。特别是红藻质粒可用于红藻基因工程载体的构建, 对红藻的遗传转化意义重要。本文报告在我国特产的真江蓠中发现质粒的研究结果。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 红藻紫菜 (*Porphyra* sp.)、真江蓠 (*Gracilaria asiatica*)、龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*)、海膜 (*Halymenia* sp.) 于 1992 年 4—9 月采于青岛沿海。用海水、蒸馏水洗净, 并用超声波清洗器处理 10min, 以除去杂藻。

**1.2 总 DNA 提取** 参照 Goff 等(1988) 和 Villemur (1990a) 方法, 略作改动。取红藻 5g, 剪碎后置瓷研钵中, 倒入液氮 20—30ml, 研磨至粉状。加入 50ml 缓冲液 [20

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2337 号。中科院海洋研究所所长基金资助。博士论文一部分。  
蒙段德麟、王永旭同志协助采集红藻, 张峻甫教授、夏邦美教授鉴定藻种, 谨志谢忱。  
收稿日期: 1994 年 1 月 27 日, 接受日期: 1994 年 3 月 18 日。

mmol/L Tris-Cl, 10mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 2%(W/V) Sarkosyl, 10 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, pH = 8.0], 不断搅拌直至化冻。于 3 000r/min 离心, 沉淀再经液氮研磨、化冻, 并与上清液合并。加入蛋白酶 K 2.5mg, 于 37°C 处理 1h。用 TE 饱和酚抽提一次, 水相再用酚:氯仿:异戊醇(50:49:1)抽提一次。水相中加入醋酸铵至终浓度为 2.5mol/L, 用 0.6 倍体积异丙醇沉淀 DNA 过夜(-20°C)。经离心(8 000r/min)后, 沉淀用 70% 乙醇洗两次, 真空冷冻干燥后, 溶解于 3ml TE 中。

**1.3 叶绿体 DNA 的分离** 参照 Goff 等(1988), Villemur (1990a)以及 Shivji (1990)的方法并适当改进。在 DNA 溶液中加入 CsCl (DNA 级) 4.00g, 荧光染料 Hoechst 33258 200 $\mu$ g; 溶解后用毛细管转入 5ml Beckman 超速离心管, 用 1g/ml CsCl 溶液注满并配平、封口; 然后, 于 Beckman LB80 超速离心机上、VTi-65 转头中以 50 000 r/min 转速离心 40h。取出离心管后小心固定在架台上, 在紫外光下拍照记录。用 4 1/2# 注射针头从离心管颈口扎入通气, 用 12# 针头距密度梯度条带下 3mm 处斜插入管内, 分别吸出叶绿体和核 DNA 两个条带。用 NaCl 饱和的异丙醇除 Hoechst 两次, 在 4°C 下水相对 TE 透析 2d, 更换 8 次透析液。用乙醇沉淀 DNA, 悬浮于 TE 中。

**1.4 电泳及透射电镜观察** 所得叶绿体与核 DNA 梯度组分分别进行琼脂糖凝胶电泳(1%, TBE)观察; 质粒带用低熔点琼脂糖方法 (Sambrook et al., 1989) 回收, 溶解于缓冲液 (100mmol/L Tris-Cl, 20mmol/L EDTA, pH = 8.5)中; 用于透射电镜观察的铜网的制备, 根据改进了的 Goff 等(1988)与 Villemur (1990a)的方法。展开液中去离子甲酰胺浓度为 23% V/V, 细胞色素 C 浓度为 14% (W/V)。用覆盖有 Parlodion 膜的 200 目铜网蘸取单分子膜, 用铂合金 7° 旋转喷镀。用国产电镜观察, 激发电压为 80kV。

**1.5 分子杂交** 按缺口平移法 (Sambrook et al., 1989) 标记质粒探针, 与总 DNA、核 DNA 和叶绿体 DNA 进行斑点杂交, 点样量均为 2ng, 以质粒为阳性对照, 点样量为 0.4 $\mu$ g。

## 2 结果

研究结果表明, 以 Hoechst 33258 为染料, 用 CsCl 密度梯度超离心法将红藻总 DNA 分为两个浮力密度组分(图版 I:1), 上面条带浮力密度较低, 为叶绿体 DNA 组分; 下面条带浮力密度较高, 为核 DNA 组分 (Goff et al., 1988; Villemur, 1990a; Shivji, 1991)。通过电泳检查, 在真江蓠叶绿体 DNA 组分中出现了叶绿体 DNA 带以外的特异条带(图版 I:2); 在龙须菜等其它 3 种红藻中未见到。从凝胶上回收并用透射电镜观察, 发现闭合环形 DNA 图像(图版 I:3), 测量其周长, 平均值为 3.43cm; 电镜及照相总放大倍数为  $8 \times 10^4$ , 实际周长为  $3.43/8 \times 10^{-4} = 4.3 \times 10^{-7}$ m。根据经验公式, 1 $\mu$ m 双链 DNA 约合 3 000 对碱基 (Goff et al., 1988), 真江蓠质粒约为 1.3kb。分子杂交的结果显示, 该质粒与叶绿体 DNA 之间并无同源性, 而与核 DNA 之间有一定同源性。因为总 DNA 含有核 DNA、叶绿体 DNA 与质粒 DNA, 因此亦显示阳性斑点(图版 I:4)。

## 3 讨论与结语

本研究发现, 我国特产的真江蓠具有一个 1.3kb 质粒, 但在我国产的紫菜和龙须菜中均未发现质粒。对国外学者尚未考察的海膜, 也未发现质粒。

国外学者通过对美国、加拿大、智利、新西兰产 20 余种红藻 DNA 的研究,发现在 6 种江藻(*Gracilaria textorii*, *G. pacifica*, *G. robusta*, *G. tekuahiae*, *G. chilensis* 与 *G. sordida*)、龙须菜、藻生藻(*Gracilariophila oryzoides*)、叉枝藻(*Gymnogongrus* sp.)、凹顶藻(*Laurencia spectabilis*)、条斑紫菜、*Porphyra miniata* 和似紫菜(*Smithora naiadum*) 中,均含有质粒 1—4 个(Goff et al., 1990; Villemur, 1990a; Shivji, 1991),长度在 1.6—7.8kb。就龙须菜而言,Goff 等(1990)在美国加州产龙须菜中确定了 3 个质粒,而 Villemur (1990a)在英国产的 *Gracilariopsis* 中并未检测到质粒。Shivji (1991)在实验室培养的条斑紫菜中检测到似质粒(plasmid like)带的存在,但未能确定质粒数目。Villemur (1990a)在加拿大产紫菜 *P. miniata* 中发现 3 个质粒,在另一种紫菜 *P. linearis* 和江藻 *G. cf verrucosa* 中亦未发现质粒。结合本文结果提示,质粒的分布具有种间的差异,也随着红藻地理分布的差异而存在差异。

本实验结果表明,红藻质粒富含 A-T,在 Hoechst-CsCl 密度梯度离心管中,位置与 A-T 丰富的叶绿体 DNA 接近。经 Manuelidis (1977)研究, Hoechst 33258 与 DNA 的 A-T 丰富区结合。红藻质粒 DNA 由于 A-T 丰富而与叶绿体 DNA 难以分开(Goff et al., 1988; Villemur, 1990a)。Aldrich 等(1981)开始使用 Hoechst-CsCl 密度梯度超离心,有效地将藻类细胞器 DNA 与核 DNA 分开。目前在红藻中由于难以制备足够的完整的叶绿体,而使得这个方法成为叶绿体 DNA 分离的常用方法(Goff et al., 1988)。本文再次验证了用该法分离红藻叶绿体 DNA 和质粒 DNA 的可行性。但这并不意味着红藻质粒位于叶绿体中或与叶绿体 DNA 之间一定具有同源性。从电泳(图版 I:2)和斑点杂交(图版 I:4)结果来看,质粒的拷贝数很高,Goff 等(1990)也有此结论。

本文结果提示,真江藻质粒与核 DNA 具有同源性,很可能能够整合到核基因组中,这有待继续研究。Goff 等(1990)则发现龙须菜两个质粒与核 DNA、叶绿体 DNA 之间均无同源性。Shivji (1991)发现条斑紫菜似质粒 DNA 与叶绿体 DNA 之间具有同源性,认为质粒可能整合到叶绿体 DNA 中。Villemur (1990a)的杂交结果显示了 *G. chilensis* 核 DNA 的酶切片段与质粒 DNA 杂交有一条阳性带,他解释为混于核 DNA 中的质粒,还需进一步研究。

尽管红藻质粒的功能、分布、来源尚需深入探究,但正如 Goff 等(1990)和 Villemur (1990a)所言,它为我们提供了红藻分子生物学和基因工程研究的新工具。我国真江藻质粒的发现,意义正在于此。

### 参 考 文 献

- Aldrich, J. and Cattolico, R.A., 1981, Isolation and characterization of chloroplast DNA from the marine chromophyte, *Olisthodiscus luteus*: electron microscopic visualization of isomeric molecular forms, *Plant Physiol.*, **68**: 641—647.
- Goff, L.J. and Coleman, A.W., 1988, The use of plastid DNA restriction endonuclease patterns in delineating red algal species and populations, *J. Phycol.*, **24**:357—368.
- Goff, L.J. and Coleman, A.W., 1990, Red algal plasmids, *Curr. Genet.*, **18**:557—565.
- Lederberg, J., 1952, Cell genetics and hereditary symbiosis, *Physiol. Rev.*, **32**:403—429.
- Manuelidis, L., 1977, A simplified method for preparation of mouse satellite DNA, *Anal. Biochem.*,

78:561—568.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 10.60—10.69.

Shivji, M.S., 1991, Organization of the chloroplast genome in the red alga *Porphyra yezoensis*, *Curr. Genet.*, **19**:49—54.

Villemur, R., 1990a, Circular plasmid DNAs from the red alga *Gracilaria chilensis*, *Curr. Genet.*, **18**:251—257.

Villemur, R., 1990b, The DNA sequence and structural organization of the GC2 plasmid from the red alga *Gracilaria chilensis*, *Plant Mol. Biol.*, **15**: 237—243.

## PLASMID FROM THE RED ALGA *GRACILARIA ASIATICA* OF QINGDAO COAST IN CHINA

Qin Song, Tong Shun, Cui Wu<sup>†</sup>, Wang Xihua, Li Yafei,<sup>††</sup>

Wu Guangyao<sup>†</sup>, Zhang Peijun, Zeng Chengkui (C.K. Tseng)

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

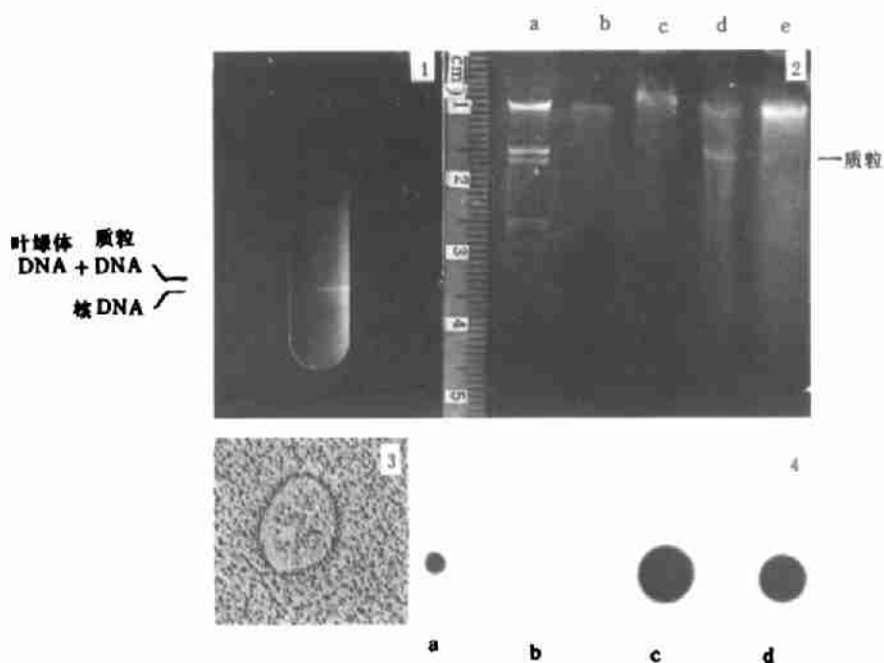
(*Department of Biology, Beijing University, Beijing 100871*)<sup>†</sup>

(*Institute for Liver Diseases, PLA, Beijing 100700*)<sup>††</sup>

### ABSTRACT

DNAs of the rhodophyte, *Gracilaria asiatica*, *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Porphyra* sp. and *Halymenia* sp. from coast of Qingdao were characterized using Hoechst 33258-Cesium chloride ultracentrifugation from 1992 to 1993. Only in *G. asiatica*, an A-T rich plasmid was co-isolated while it co-migrated with chloroplast DNA in Hoechst-CsCl gradient. Circular and closed pattern was observed under an electron microscope. The girth was  $4.3 \times 10^{-7}$ m on average, and its size was ca. 1300bp. Both gel electrophoresis and hybridization showed that its copy number was high. It has homologous sequence with nuclear DNA, instead of chloroplast DNA, which suggest that it may have integrated form.

**Key words** Rhodophyte *Gracilaria asiatica* Plasmid Cesium chloride gradient ultracentrifugation



图版 I 真江蕨质粒 DNA 的分离及特性

Plate I Isolation and characterization of plasmid DNA from *Gracilaria asiatica*

1. 红藻 DNA 的 Hoechst33258-CsCl 密度梯度 (Hoechst33258-CsCl gradient of red algal DNA)。
2. 红藻叶绿体 DNA 梯度组分的琼脂糖凝胶电泳图 (Agarose gel electrophoresis of chloroplast DNA gradient: a.  $\lambda$  DNA/Hind III + EcoR I marker; b. *Porphyra* sp.; c. *Halymenia* sp.; d. *Gracilaria asiatica*; e. *Gracilariopsis lemaneiformis*)。3. 真江蕨质粒 DNA 的透射电镜图像 (A circular plasmid DNA molecule from *G. asiatica* under an electron microscope, magnification  $\times 8 \times 10^4$ )。4. 真江蕨各种 DNA 成份与质粒的点杂交 (Dot blotting of DNA components from *G. asiatica* hybridized to its plasmid: a. plasmid—positive control; b. chloroplast DNA; c. total DNA; d. nuclear DNA)。