

RAPD 分子标记技术用于 螺旋藻(*Spirulina*) 分类的研究*

李晋楠 汪志平¹⁾

(浙江大学原子核农业科学研究所 杭州 310029)

提要 用 106 条随机引物对 S_p-1 等 7 株钝顶螺旋藻进行 RAPD 分析。结果表明: (1) 绝大多数引物的 PCR 扩增结果均相同, 与它们同属于钝顶螺旋藻种的事实相符。(2) 筛选出 23 条具有明显多态性的随机引物, 扩增出的总条带数为 151, 平均每条引物的扩增条带数为 6.57; 其中多态性条带为 120, 占总带数的 79.5%。(3) 7 株材料经聚类分析可聚成 2 大类, S_p-1 和 S_p-2 与 S_p-6 聚成第 I 类, S_p-3 、 S_p-4 及 S_p-5 与 S_p-7 聚成第 II 类。(4) 第 I 类和第 II 类之间的遗传距离为 9.7639, 而两大类内部各藻株间的遗传距离仅为 2.6458—4.5828, 说明两大类间的遗传背景差异较大, 而两大类内部各藻株间的遗传背景差异相对较小。上述分类结果与 7 株材料的某些生理生化和分子生物学特性相吻合, 但与依据藻丝体形态特征的经典分类结果有较大出入。本研究首次将 RAPD 分子标记技术用于螺旋藻的分类, 为在 DNA 水平建立螺旋藻分类与新品种(系)鉴定的技术体系提供理论和技术依据。

关键词 钝顶螺旋藻, RAPD, 聚类分析, 分类

中图分类号 Q789

螺旋藻(*Spirulina*) 属蓝藻门(Cyanophyta)、颤藻科(Oscillatoriaceae), 系一种光合放氧的丝状原核微藻。目前在国内外已发现该属有 38 个种, 其中钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*) 和极大螺旋藻(*Spirulina maxima*) 是研究得较深入并已进行产业化开发的两个种²⁾。长期以来, 螺旋藻的分类主要以藻丝体形态学特征为依据。然而, 这一分类方法存在较大的局限性(Avigaad, 1987; Van, 1980; 汪志平, 2000²⁾), 严重影响了螺旋藻的品种(系)鉴定和保存、新品种(系)选育及大规模开发利用。为寻找更科学合理的螺旋藻分类依据, 近年来国内外学者已在生理生化水平进行了多方面的探索, 如对螺旋藻脂肪酸组成及蛋白谱带的特征分析等(汪志平, 2000; Romano *et al.*, 2000)。但到目前为止, 在遗传分子水平对螺旋藻进行分类的研究尚未见报道。

RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 分子标记技术可以简便、灵敏地检测基因组 DNA 的多态性, 现已广泛应用于高等植物和红藻、褐藻等海藻的分类学方面的研究(Beck *et al.*, 1998; 杨君等, 2000; 王茜等, 2000; 贾继增, 1996; Madelein *et*

* 国家自然科学基金资助项目, 30000010 号; 浙江省科委“九五”重点资助项目, 961102208-001 号。李晋楠, 女, 出生于 1970 年 3 月, 博士生, E-mail: ljinnan@hotmail.com

1) 通讯联系人, 汪志平, E-mail: zhpwang@zju.edu.cn

2) 汪志平, 2000. 螺旋藻形态建成的分子机制及转座子调控模型. 浙江大学博士学位论文

收稿日期: 2000-12-25, 收修改稿日期: 2001-08-20

al, 1995; Ho *et al.*, 1995; Haring *et al.*, 1996)。本文首次利用 RAPD 技术对 7 株钝顶螺旋藻的基因组特征进行了研究, 以期在 DNA 水平上建立更科学合理的螺旋藻分类方法提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

S_p-1 和 S_p-2 引自北京, S_p-3 引自深圳, S_p-4 引自江西, S_p-5、S_p-6 和 S_p-7 引自云南。使用前由本实验室分别将上述 7 株钝顶螺旋藻从单细胞培养成单克隆的藻丝群体。

饱和酚和 PCR 所用的 *Taq* 酶、dNTPs、随机引物 S 系列、Marker 及琼脂糖均为 Sangon (Canada) 产品, 购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 培养条件及形态观察

采用 Zarrouk's 培养液, 光照强度为 4000lx, 光照时间为每天 12h, 光照和黑暗时温度分别为 28℃和 20℃, 在温控光照培养箱中培养, 藻液每天摇匀 3—4 次。在 OLYMPUS CH-30 光学显微镜下观测藻丝体的形态。

1.3 DNA 提取及纯化

参照汪志平(2000)¹⁾的方法, 利用 CTAB 缓冲液提取螺旋藻基因组 DNA。

1.4 PCR 反应

PCR 扩增在 PTG 100™PCR 仪中进行。反应总体积为 25μl, 包含 10× buffer [Tris-HCl (pH= 8.3) 10mmol/L, KCl 350mmol/L, MgCl₂ 2mmol/L] 2.5μl, DNA 模板(100ng/μl) 1μl, *Taq* 酶(5U/μl) 0.3μl, 引物(25μmol/L) 3μl, 4× dNTPs(100μmol/L) 0.5μl, 以双蒸灭菌水补齐至 25μl。

PCR 反应条件: 94℃预变性 5min; 然后每个循环 94℃变性 0.5min, 36℃退火 1min, 72℃延伸 1min, 循环 35 次; 最后 72℃延伸 10min。

1.5 电泳分析与观察

将扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳分离, 80V 稳压 3h, 结束后 EB 染色 20min, 在紫外透射仪下观察并照相。

1.6 数据处理

PCR 扩增结果在同一电泳迁移位置上, 有 DNA 扩增条带的记为“1”, 没有的记为“0”。所得数据用 DPS 软件包(唐启义等, 1997)处理, 计算两样品间的 Jaccard 相似系数, 并利用欧氏距离类平均法进行聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 7 株螺旋藻的 RAPD 分析

利用 CTAB 缓冲液提取 S_p-1 等 7 株钝顶螺旋藻的基因组 DNA, 并用 106 条 10-mer 随机引物作 RAPD 分析。结果显示, 绝大多数随机引物对 7 株材料的 PCR 扩增结果均相同, 表明这 7 株螺旋藻的分子遗传背景相近, 这与它们在分类学上同属于钝顶螺旋藻种的事实相吻合。

进一步从 106 条随机引物中筛选出 23 条电泳条带清晰且多态性明显的随机引物, 对

1) 汪志平, 2000. 螺旋藻形态建成的分子机制及转座子调控模型. 浙江大学博士学位论文

上述 7 株螺旋藻作分类学研究。由表 1 和图 1 可知, (1) 所选的 23 条引物对 7 株材料扩增的 DNA 总条带数为 151, 平均每条引物的扩增条带数为 6.57; (2) 多态性条带数为 120, 占总条带数的 79.5%; (3) 不同引物扩增出的条带数差别较大, 少至 2 条, 多至 11 条, 扩增片段主要分布于 300—2500bp; (4) 多数引物对 7 株材料都能扩增出 1 至数条相同的特征带, 但每条引物对 7 株材料都显示出不同程度的多态性。

上述结果表明, 由不同引物扩增产物所组成的 RAPD 电泳图谱, 既反映了 7 株钝顶螺旋藻在基因水平的统一性, 又表明它们的分子遗传背景之间存有较大的差异。虽然有学者指出 RAPD 方法的灵敏度高而重复性较差, 但经多次重复试验表明, RAPD 结果的重复性主要与实验条件和操作者熟练程度等有关。只要操作熟练, 保持反应条件、反应体系所用的试剂来源和浓度一致, 并确保反应程序中各环节

和各参数的稳定性, 重复的结果是不难得到的。此外, 对实验中可能出现的假阳性条带给统计分析带来干扰的问题, 可通过设置阴性对照(图 1)、改善反应条件或增大样本分析数目等方法来解决。因此, RAPD 分析结果可作为螺旋藻分类学的重要参考。

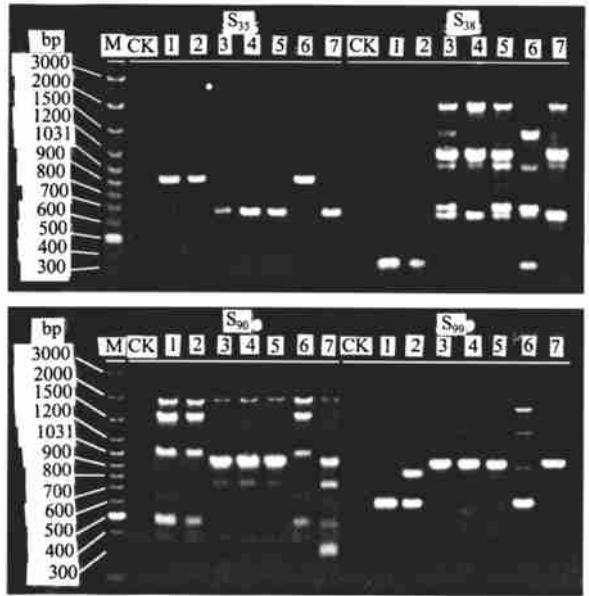


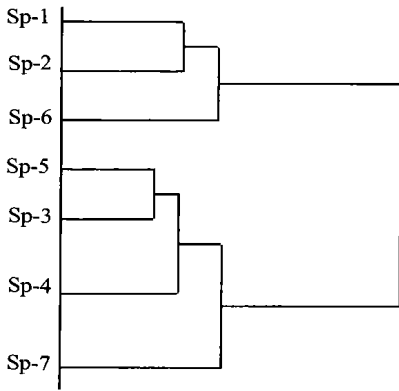
图 1 7 株钝顶螺旋藻材料的 RAPD 电泳图谱

Fig. 1 RAPD electrophoresis map of 7 strains of *Spirulina platensis* 编号 1—7 代表藻株 S_p 1—S_p 7, M: 标准分子量, CK: 阴性对照

表 1 23 条引物序列及 PCR 扩增的总条带与多态性片段数

Tab. 1 23 primer sequences, total numbers and polymorphic bands of PCR amplified products

引物	核苷酸序列 (5'—3')	扩增产物 条带数	多态性 条带数	引物	核苷酸序列 (5'—3')	扩增产物 条带数	多态性 条带数
S ₂₃	AGTCAGCCAC	11	10	S ₇₃	AAGCCTCGTC	7	4
S ₂₄	AATCGGGCTG	11	10	S ₇₈	TGAGTGGGTG	3	3
S ₃₁	CAATCGCCGT	11	9	S ₈₀	ACITCGCCAC	5	2
S ₃₃	CAGCACCCAC	8	7	S ₈₂	GGCACTGAGG	5	5
S ₃₅	TTCGGAACCC	2	2	S ₈₈	TCAGTCCAC	3	2
S ₃₈	AGGTGACCGT	9	8	S ₉₀	AGGGCCGTCT	8	7
S ₄₀	GTTGCGATCC	7	6	S ₉₁	TGCCCGTGGT	6	4
S ₅₃	GGGGTGACCA	6	5	S ₉₉	GTCAGGGCAA	6	6
S ₅₉	CTGGGACTT	9	7	S ₁₁₂	ACGGCATGT	6	4
S ₆₆	GAACGGACTC	8	6	S ₁₁₈	GAATCGGCCA	4	2
S ₆₉	CTCACCGTCC	4	4	S ₁₁₉	CTGACCAGCC	2	1
S ₇₀	TGTCTGGGTG	10	6	Total		151	120



2.2 聚类分析与分类学研究

将上述 23 条引物对 7 株材料的 RAPD 结果求出 Jaccard 相似系数矩阵 (表 2), 并用欧氏距离类平均法进行聚类分析 (图 2、表 3)。结果发现, (1) 7 株钝顶螺旋藻的遗传距离为 2.6458—9.7639, 且相互之间的遗传距离差异显著; (2) 7 株钝顶螺旋藻首先聚成 2 大类, Sp-1、Sp-2 和 Sp-6 为第 I 类, Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 属第 II 类; (3) 第 I 类的 Sp-1 和 Sp-2 先聚成一组, 再与 Sp-6 聚类; (4) 第 II 类中 Sp-5 和 Sp-3 先聚类后与 Sp-4 聚成一组, 再与 Sp-7 聚类; (5) 第 I 类和第 II 类之间的遗传距离为 9.7639, 而两大类内部各藻株间的遗传距离均小于 4.6, 说明两大类间的分子遗传背景差异较大, 而两大类内部各藻株间的分子遗传背景差异则相对较小。

图 2 7 株钝顶螺旋藻材料的聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis dendrogram of 7 strains of *Spirulina platensis*

表 2 7 株钝顶螺旋藻材料间的相似系数矩阵

Tab 2 Similarity matrix of 7 strains of *Spirulina platensis*

藻株	Sp-1	Sp-2	Sp-3	Sp-4	Sp-5	Sp-6	Sp-7
Sp-1	1.000						
Sp-2	0.871	1.000					
Sp-3	0.261	0.244	1.000				
Sp-4	0.272	0.265	0.906	1.000			
Sp-5	0.299	0.273	0.918	0.876	1.000		
Sp-6	0.788	0.800	0.277	0.298	0.295	1.000	
Sp-7	0.292	0.276	0.785	0.771	0.800	0.299	1.000

表 3 7 株钝顶螺旋藻材料间的遗传距离

Tab 3 Genetic distances of 7 strains of *Spirulina platensis*

样本 1	样本 2	欧氏距离 (类平均法)	样本 1	样本 2	欧氏距离 (类平均法)
Sp-3	Sp-5	2.6458	Sp-6	Sp-1	4.4721
Sp-4	Sp-5	3.3166	Sp-7	Sp-5	4.5828
Sp-2	Sp-1	3.4641	Sp-5	Sp-1	9.7639

上述利用 RAPD 技术在 DNA 水平对 7 株钝顶螺旋藻的分类结果, 与 7 株材料的某些生理生化和分子生物学特性相吻合。一方面, 在相同的培养条件下, 由 Sp-1、Sp-2 和 Sp-6 聚成的第 I 类藻株与由 Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 聚成的第 II 类藻株相比, 不仅对温度、光照强度和 pH 等因子的适应能力较差、形态易发生变异, 而且当接入新的培养液

后,藻体色泽偏黄绿,需要较长时间才能恢复对数生长期,生长速率较慢,因而第 I 类藻株一般不用于工厂化养殖,而第 II 类藻株则为工厂化养殖中的优良品种(系);另一方面,汪志平(2000)¹⁾在比较上述 7 株钝顶螺旋藻的总 DNA 组成时发现,在电泳图谱上 7 株材料都有清晰且分子量相近的基因组 DNA 条带,但第 II 类藻株比第 I 类藻株多了 1 条约 1kb 的基因组外的 DNA 小片段。可见,依据 RAPD 分析所得的相似系数和遗传距离,对上述 7 株螺旋藻所作的分类结果是比较合理的,从而提示可利用 RAPD 技术在分子遗传学水平上对螺旋藻进行分类与新品种(系)鉴定。

但值得注意的是,上述利用 RAPD 方法对 S_P-1 等 7 株钝顶螺旋藻的分类结果,与依据藻丝体显微形态特征的经典分类结果则有较大出入。如 S_P-1 呈波浪形而 S_P-6 为紧密螺旋形,两者的形态特征相差最大,但它们在 RAPD 的分类结果中均属第 I 类;S_P-2、S_P-3、S_P-4、S_P-5 和 S_P-7 均呈螺旋形,而 S_P-2 属第 I 类不与 S_P-3、S_P-4、S_P-5 和 S_P-7 同属第 II 类;S_P-5 和 S_P-7 的形态学特征最相近,它们在 RAPD 分类结果中虽同属第 II 大类,但两者在第 II 类中的遗传距离相差最大,等等。同时,已有研究表明,有的藻株之间的形态特征虽然十分相近,但生理生化特性和分子遗传背景却差异显著;即使由某一藻丝单体繁殖成的藻丝群体中,也会有几种形态不同的藻丝体,且具有互变性;螺旋藻的形态易受温度、光照强度和 pH 等诸多因素影响,几乎所有螺旋藻都会变成直线形,完全失去各自原来的形态特征,根本无法依其形态进行分类等等。因此,作者同意 Lewin(1980)及崔海瑞等(1997)的观点:目前仅依据形态特征对螺旋藻进行分类是不合理的。

事实上,目前各实验室和养殖场根本无法依据藻丝体的形态特征对螺旋藻进行分类与归类,而只有对不同来源或不同形态的藻株分别编号,视为新的品种(系)进行保种和试验,不仅费时、费力,而且极大制约着螺旋藻的研究和开发利用。因此,尽快在分子水平上建立合理、有效的螺旋藻分类及新品种(系)鉴定方法,具有十分重要的理论与实际意义。本文初步建立了利用 RAPD 分子标记技术在 DNA 水平上对螺旋藻进行分类的新方法,作者正在引入有关分子生物学,特别是螺旋藻分子生物学的最新研究成果,对此法作进一步的改进和完善,以期尽快在分子遗传水平建立科学、合理、实用的螺旋藻分类与新品种(系)鉴定的技术体系。

参 考 文 献

- 王 茜,安利佳,杨 君等,2000 蜈蚣藻和管形藻的 RAPD 分析. 海洋与湖沼, 31(5): 506—510
- 汪志平,2000 蛋白质 SDS-PAGE 用于螺旋藻分类及突变体鉴定的研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 26(6): 583—587
- 杨 君,安利佳,王 茜等,2000 石莼属和浒苔属绿藻的 RAPD 分析. 海洋与湖沼, 31(4): 408—413
- 贾继增,1996 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种. 中国农业科学, 29(4): 1—10
- 唐启义,冯明光著,1997 实用统计分析及其计算机处理平台. 北京:中国农业出版社, 108—115
- 崔海瑞,汪志平,徐步进,1997 甲基磺酸乙酯对钝顶螺旋藻生长和形态的影响. 浙江农业大学学报, 23(6): 645—648
- Avigad V, 1987. Strain selection of *Spirulina* suitable for mass production. *Hydrobiologia*, 151/ 152: 75—77

1) 汪志平, 2000. 螺旋藻形态建成的分子机制及转座子调控模型. 浙江大学博士学位论文

- Beck H C, 赵坚义, 1998 同工酶分子标记研究中国和欧洲栽培油菜的遗传差异. 作物学报, 24(2): 213—220
- Haring M A, Seluring F, Urbanus J *et al*, 1996. Random polymorphic DNA primers(RAPDs) as tools for gene mapping in *Chlamydomonas eugametos* (Chloophyta). J Phycol, 32: 1043—1048
- Ho Cha+ling, Phang Siew-moi, Pang Tikki, 1995. Application of polymerase chain reaction(PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta, Fucales). Eur J Phycol, 30: 273—280
- Lewin R A, 1980 Uncoiled variants of *Spirulina platensis*. Arch Hydrobiol, 60(1): 48—52
- Madelein JH, Van O, Jeanine L *et al*, 1995. Genetic variation within and among north Atlantic and Baltic populations of the benthic alga *Phycodrys rubens* (Rhodophyta). Eur J Phycol, 30: 251—260
- Romano I, Bellitti M R, Nicolaus B *et al*, 2000. Lipid profile: A useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. Phytochemistry, 54(3): 289—294
- Van E C, 1980. Some theoretical considerations on the *in vitro* shape of the cross-walls in *Spirulina* spp J Theor Biol, 82: 271—282

CLASSIFICATION WITH RAPD MARKER IN *SPIRULINA*

LI Jia-Nan, WANG Zhi-Ping

(*Zhejiang University, Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Hangzhou, 310029*)

Abstract Seven strains of *Spirulina platensis* (Sp-1—Sp-7) were analyzed with 106 random primers using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. The results were as follows: (1) The amplification bands were mostly same which accorded with that they belonged to the same species. (2) From the 106 arbitrary primers used, 23 primers revealed scorable polymorphisms and generated a total of 151 fragments with a mean of 6.57 bands per primer. 120 (79.5%) of which were polymorphic. (3) The result of cluster analysis showed that 7 strains of *Spirulina platensis* could be divided into 2 groups, Sp-1, Sp-2 and Sp-6 belonged to group I, while Sp-3, Sp-4, Sp-5 and Sp-7 belonged to group II. (4) The genetic distances were 9.7639 between group I and group II and 2.6458—4.5828 within group I or group II demonstrated that the genetic relationship were remarkable different in the former whereas relatively close among the later. These results were consistent with some of their physiological and biochemical characters as well as some molecular biological characteristics, but dissimilar with the classification by their morphological characteristics. It was the first time that RAPD marker was used in the classification in *Spirulina*, it provides a new alternative at DNA molecular level for classification and identification of new strains in *Spirulina*.

Key words *Spirulina platensis*, RAPD, Cluster analysis, Classification