

南海有毒塔玛亚历山大藻的 分子地理标记分析*

陈月琴 邱小忠 屈良鹄 曾陇梅[†] 齐雨藻^{††} 郑磊^{††}

(中山大学生命科学院 [†]化学化工学院 广州 510275)

^{††}(暨南大学水生生物研究所 广州 510632)

提要 采用聚合酶链扩增反应(PCR)和限制性片段长度多态性分析(RFLP)方法,对1992年5月和1994年12月采自中国南海大鵬湾、大亚湾、香港海域的赤潮有毒甲藻塔玛亚历山大藻8个不同地理株的核糖体小亚基RNA基因(Ss-rDNA)进行分析,并与北美、西欧等地的比较。结果表明,中国南海的塔玛亚历山大藻缺少B基因,这与北美等地的塔玛亚历山大藻(包括有毒和无毒株)不同,而与西欧、澳洲等地的有毒和无毒株相似,提示B基因的存在可以作为一种分子地理标记而不是藻种有毒的标记。

关键词 塔玛亚历山大藻 分子地理标记 核糖体小亚基RNA基因 限制性片段 赤潮
学科分类号 X55

甲藻的亚历山大藻属(*Alexandrium*)为全球分布的有毒藻属之一。由于其地域上分布的广泛性,及所产毒素(麻痹性贝毒素, Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)的危害性,已引起国内外的高度重视,对诱发有害性赤潮的甲藻种类、产毒机理、所产生毒素的化学本质都作了较深入的研究(Anderson *et al*, 1996; Taylor *et al*, 1985)。近几年,人们的注意力已逐渐转向甲藻的基因水平研究,试图从分子水平认识甲藻的遗传特征,探讨其种属间或不同地理株之间的分子标志(Destombe *et al*, 1992; Scholin *et al*, 1993, 1994, 1996)。中国南海海域地处亚热带、热带海区,甲藻种类繁多(林永水等, 1993),但是,对甲藻分类鉴定的认识基本上处于形态学水平,关于其分子水平的研究尚未见有报道。本研究以核糖体小亚基RNA基因(Ss-rDNA)为分子标记,对中国南海海域的塔玛亚历山大藻不同地理株进行限制性片段长度多态性分析(RFLP分析),并从分子水平比较不同海域塔玛亚历山大藻的遗传差异,找出中国南海近海岸塔玛亚历山大藻及其它藻种的地理标记,以为赤潮生物学的研究提供分子水平的资料。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用材料列于表1。塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)和 *Scrippsiella*

* “九五”国家自然科学基金重大项目资助, 39790110号。陈月琴, 女, 出生于1964年12月, 博士后, 讲师, E-mail: lsbrc04@zsu.edu.cn

收稿日期: 1997-03-18, 收修改稿日期: 1998-08-28

表1 藻种的株系、种名、采集地点和分离培养方法

Tab.1 Strain numbers, species designations, collected locales and isolation cultures methods for algal species

株系	种名	采集地点, 时间(年-月)	单细胞分离培养方法	毒性
ATDP01	<i>A. tamarensis</i>	大鹏湾, 1992-05	营养细胞分离	有毒
ATDP03	<i>A. tamarensis</i>	大鹏湾, 1992-05	营养细胞分离	有毒
ATCI01	<i>A. tamarensis</i>	大亚湾, 1992-05	孢囊萌发后营养细胞分离	有毒
ATCI02	<i>A. tamarensis</i>	大亚湾, 1992-05	孢囊萌发后营养细胞分离	有毒
ATCI03	<i>A. tamarensis</i>	大亚湾, 1992-05	孢囊萌发后营养细胞分离	有毒
ATHK01	<i>A. tamarensis</i>	香港海域, 1994-12	营养细胞分离	有毒
ATNA01	<i>A. tamarensis</i>	大鹏湾, 南澳, 1994-12	孢囊分离	有毒
ATNA02	<i>A. tamarensis</i>	大鹏湾, 南澳, 1994-12	孢囊分离	有毒
ALJP01	<i>A. leei</i>	日本, 1995-08	孢囊分离营养细胞	未测定
SCDP01	<i>S. trochoidea</i>	大鹏湾, 1993-01	孢囊分离营养细胞	无毒

trochoidea 由暨南大学水生生物研究所提供, 采集海域见图 1。 *A. leei* 由日本北理大学耳玉正昭教授提供。 *S. trochoidea* 为甲藻另一赤潮种, 在此用作外类群对比。所有藻种均于 *f/2* 培养基中培养, 培养条件: 温度为 20—25 °C, 光照度为 2 000—4 000lx, 光: 暗 = 14h: 10h。藻种保存于暨南大学水生生物研究所。

1.2 DNA 的制备及核糖体小亚基 RNA 基因 (Ss-rDNA) 的扩增反应

采用“甲藻单个细胞 DNA 制备法”(陈月琴等, 1997) 进行 DNA 制备及 Ss-rDNA 的聚合酶链扩增反应 (PCR)。PCR 引物为: P18 (+): 5' GTCTCAAAGATTAAGCCATGCA 3', P18 (-): 5' AGCGACGGGCGGTGTGTACAA 3', 由中国科学院上海生物化学研究所合成。PCR 反应程序为: 于 94 °C 变性 5min; 然后分别于 94 °C 变性 1min, 55—57 °C 退火 1min, 72 °C 延伸 2min, 30 个循环, 最后于 72 °C 延伸 10min。PCR 反应液: 20—30 μl 反应体积

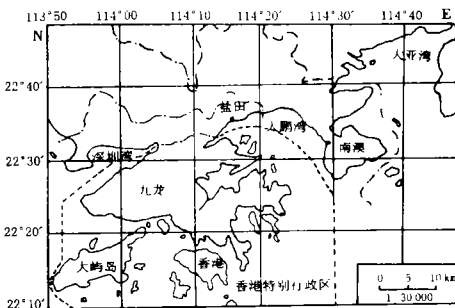
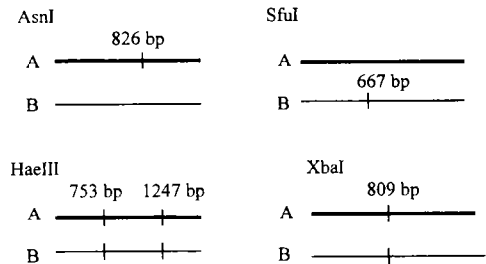


图1 藻种采集地点

Fig.1 The collected locations of *A. tamarensis* in South China Sea图2 根据 *A. fundyense* 核糖体小亚基 RNA 基因序列的 4 种限制性内切酶的理论图谱Fig.2 Theoretical maps of restriction enzymes with AsnI, SfuI, HaeIII, XbaI based on *A. fundyense* Ss-rDNA sequence

竖线处为酶切位点。没有 B 基因时, AsnI, SfuI, HaeIII, XbaI 的酶切片段数分别为: 2 条、1 条、3 条、1 条; 有 B 基因时 AsnI, SfuI, HaeIII, XbaI 的酶切片段数分别为: 3 条、3 条、3 条、1 条

含 1—1.5U 的 Taq polymerase (Sangon, 上海), 200 μ mol / L dNTP (华美公司), 2—2.5mmol / L 的 MgCl₂ 及痕量 DNA (小于 1pg) 甲藻 DNA。扩增完成后, PCR 产物用乙醇沉淀, 沉淀晾干后加适量三氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液 (TE) 溶解, 取 2 μ l 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查, 其余于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 Ss-rDNA PCR 扩增产物的酶切分析

根据 *A. fundyense* Ss-rDNA 的序列 (Scholin *et al.*, 1993), 选定 AsnI、SfuI (Boehringer Mannheim, 德国) 及 HaeIII、XbaI (华美) 4 种限制性内切酶进行酶切分析; AsnI 在理论上作用于 Ss-rDNA 的 A 基因, SfuI 则作用于 B 基因, HaeIII 和 XbaI 可同时作用于 A 基因和 B 基因。4 种限制性内切酶理论酶谱如图 2。酶切反应: 取 50—100ng PCR 产物, 5—8U 的限制性内切酶于 10 μ l 反应液中, 于 37 $^{\circ}$ C 置 3h, 或过夜; 酶切结果于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查。

2 实验结果

2.1 DNA 的制备及 PCR 扩增结果

采用单个细胞 DNA 快速制备法获得的痕量 DNA (小于 1pg) 直接用于专一性引物的 PCR 扩增反应, PCR 扩增结果见图 3a。塔玛亚历山大藻 8 个不同地理株, 同 *A. leei* 和 *S. trochoidea* 的 PCR 产物长度基本一致, 约 1 617 个碱基 (base pair, 简称 bp), 为 Ss-rDNA 部分序列。说明以单个细胞 DNA 制备法获得的痕量 DNA 用于 PCR 扩增, 具有较好的重复性。

2.2 PCR 产物 (Ss-rDNA) 的酶切结果

AsnI、SfuI、HaeIII 及 XbaI 限制性内切酶酶切结果见图 3b—e。结果如下: (1) 亚历山大藻属与 *Scrippsiella* 属之间的带型有差异 (图 3d 和 e)。而塔玛亚历山大藻属内种间或不同地理株之间带型一致。(2) 塔玛亚历山大藻不同地理株同 *A. leei* 和 *S. trochoidea* 的 AsnI 图谱一致, 酶切结果有 2 个不同片段, 分别为 791bp 和 826bp (图 3b)。AsnI 为切割 A 基因的专一性酶, 酶谱的一致性, 说明塔玛亚历山大藻不同地理株, 甚至亚历山大藻属与 *Scrippsiella* 属之间, Ss-rDNA 的 A 基因在该位点上具有保守性。(3) SfuI 酶切图谱见图 3c。SfuI 理论上为作用于 B 基因 667bp 处的限制性内切酶, 但所有藻种的 PCR 产物都未能被割, 说明南海海域的塔玛亚历山大藻, *S. trochoidea* 以及日本海的 *A. leei* 不存在 Ss-rDNA 的 B 基因。(4) 塔玛亚历山大藻不同地理株的 HaeIII、XbaI 酶谱完全一致 (图 3d 和 e), 而且所获酶切产物与理论图谱完全相符, 表明中国南海海域塔玛亚历山大藻 Ss-rRNA 基因结构上的一致性。

3 讨论与结语

3.1 PCR 引物及反应条件的选择

PCR 反应直接用于 RFLP 分析, 具有快速、方便等优点, 为藻类的属间和种间鉴定提供方法学基础。但 PCR 易产生非特异扩增, 本实验采用提高退火温度, 如将传统的退火温度 50 $^{\circ}$ C 提高到 55 $^{\circ}$ C 或 57 $^{\circ}$ C, 可消除这一现象。引物的设计也很重要, 最初 PCR 引物是以真核生物通用引物 A: 5' AACCTGGTTGATCCTGCCAGT 3' 和引物 B: 5' TCCTTCTGCAGGTTACCTAC 3' 扩增 Ss-rDNA 全基因 (Sogin, 1990)。但是, 由于 B 引物位于 Ss-rDNA 非常保守的二级结构区, 影响引物与模板的形成, 为此, 除个别藻种能

获得较好的结果外,大多数材料重复性差,无明显主带,呈严重拖带现象。本研究通过比较 *A. fundyense* 及其它真核生物的 Ss-rDNA 的全序列,选择位于 35—56 (forward) 和 1 631—1 652 (reverse) 这两段序列作为 PCR 引物,则可获得专一性较好的扩增产物,重复性好;尽管所获的片段为 Ss-rDNA 的部分序列,但所选择位点已包含在内,不影响结果的比较。

3.2 中国南海海域塔玛亚力山大藻 Ss-rDNA 的特点

塔玛亚力山大藻在世界上的许多海域都有分布,并通过自然的和人为的因素在逐渐扩大其地理范围,要确定从某一海域分离出来的藻种为特有种还是广布种,必需选择合适

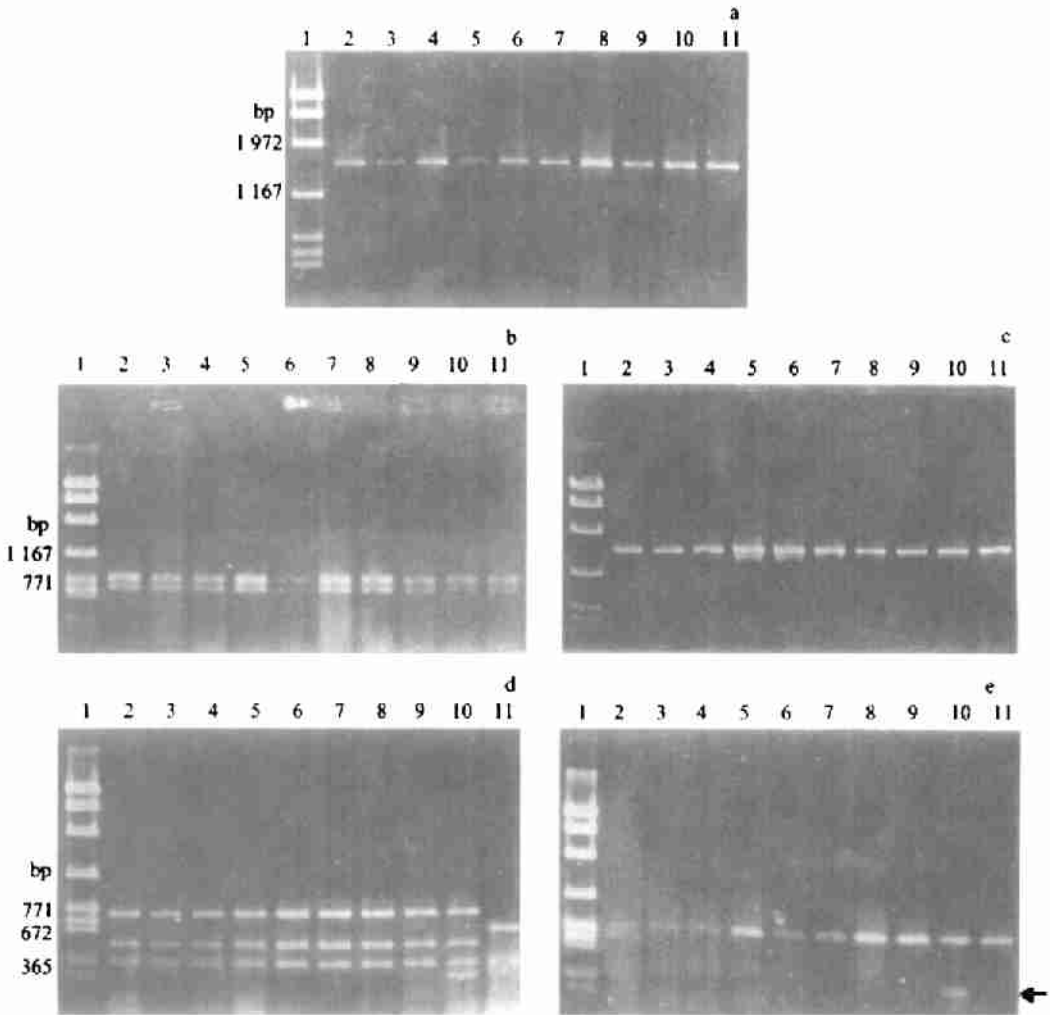


图3 Ss-rDNA PCR 扩增产物及 PCR 产物的 4 种限制性内切酶酶切结果

Fig.3 Ss-rDNA PCR amplification products and restriction patterns digested with AsnI, SfuI, HaeII and XbaI
a 为 PCR 扩增产物 (约 1 600kb); b, c, d, e 分别为 AsnI, SfuI, HaeII 和 XbaI 的酶谱。a—e: 1. 2kb marker. 2. *A. tamarense*, ATDP01; 3. *A. tamarense*, ATDP03; 4. *A. tamarense*, TC101; 5. *A. tamarense*, ATC102; 6. *A. tamarense*, ATC103; 7. *A. tamarense*, ATHK01; 8. *A. tamarense*, ATNA01; 9. *A. tamarense*, ATNA02; 10. *A. leei*, ALJP01; 11. *Scripsiella trachioidea*, SCDP01. ← 示 PCR 非特异性产物

的地理标志。SfuI 酶切结果揭示了中国南海海域塔玛亚历山大藻的 Ss-rDNA 特点,即不存在 B 基因,而且不同的地理株,4 种限制性内切酶酶切结果都表现出较大的一致性。此结果与北美东西部海域及日本等海域的塔玛亚历山大藻的不同 (Scholin *et al.*, 1994)。Scholin 等 (1994) 对北美东西部海域,西欧和日本等海域的亚历山大藻属不同藻种 B 基因的分布情况进行研究后,得出北美西部和东部海域、日本南部和北部海域该属的许多种类 (包括有毒和无毒种类) 普遍存在 Ss-rDNA 的 B 基因,结果见表 2。可以看出,塔玛亚历山大藻不同的地理株,基因水平上表现出明显的多态性,笼统地可分为三大类: I 型,同时具有 A 基因和 B 基因。北美西部海域、日本北部海域的某些类群既为此型代表。II 型,II 型的塔玛亚历山大藻,不仅具有 A 基因和 B 基因,而且 Ss-rDNA 的 PCR 产物中还同时存在较大片段的 PCR 扩增产物 (大于 2.1kb)。表现出基因水平的复杂性。北美东部海域、日本北部和南部的类群具该型特点。III 型, Ss-rDNA 仅具有 A 基因,南海海域的塔玛亚历山大

表2 不同海域中塔玛亚历山大藻的Ss-rDNA比较

Tab.2 Ss-rDNA comparison of *Alexandrium* species isolated from different areas

海 域	株 系	种 名	采集地	毒 性	A/B基因检测		Ss-rDNA大 片段产物
					A基因	B基因	
北美西部	PW05	<i>A. tamarense</i>	Port Benny, AK, U.S	+	+	+	
北美东部	GtPP01	<i>A. tamarense</i>	Falmouth, MA, U.S	+	+	+	+
	GtCN1	<i>A. tamarense</i>	Groton, CN, U.S.	+	+	+	+
	GtLI21	<i>A. tamarense</i>	Babylon, NY, U.S	+	+	+	+
西欧							
英国	Pgt183	<i>A. tamarense</i>	Plymouth, U.K.	-	+		
西班牙	PE1V	<i>A. tamarense</i>	Galicia, Spain	-			
日本							
北部	ND-1	<i>A. tamarense</i>	Noda Bay	+	+	+	+
	OK875-1	<i>A. tamarense</i>	Okkirai Bay	+	+	+	+
	OFO41	<i>A. tamarense</i>	Ofunato Bay	+	+	+	
	OFO51	<i>A. tamarense</i>	Ofumato Bay	+	+	+	
南部	WKS-1	<i>A. tamarense</i>	Tanabe Bay	-	+		
泰国	CU-13	<i>A. tamarense</i>	Gulf of Thailand	+	+		
澳洲							
Tasmania	ATBBO1	<i>A. tamarense</i>	Bell Bay	+	+		
中国南部	ATDP01	<i>A. tamarense</i>	大鹏湾	+	+		
	ATDP03	<i>A. tamarense</i>	大鹏湾	+	+		
	ATCI01	<i>A. tamarense</i>	大亚湾	+	+		
	ATCI02	<i>A. tamarense</i>	大亚湾	+	+		
	ATCI03	<i>A. tamarense</i>	大亚湾	+	+		
	ATHK01	<i>A. tarmarens</i>	香港海域	+	+		
	ATNA01	<i>A. tarmarens</i>	大鹏湾, 南澳	+	+		
	ATNA02	<i>A. tarmarens</i>	大鹏湾, 南澳	+	+		

注:“-”示存在或有;“+”示无

藻为该类型的典型代表,此外,西欧和澳洲某些海域的无毒种类,以及日本南部海域的某些有毒种类也表现出 III 型的特点,这说明 B 基因的存在可以作为一个生物地理标志,用于中国海域有毒种类发生或扩展监控的指标。

参 考 文 献

- 陈月琴,屈良鹄,邱小忠等,1997. 甲藻单个细胞 DNA 的制备及在赤潮藻类分子鉴定中的应用. 中山大学学报(自然科学版), 36(4): 66—69
- 林永水,周近明,1993. 南海甲藻. 北京:科学出版社,1—4
- Anderson D M, Kulis D M, Qi Y Z *et al*, 1996. Paralytic shellfish poisoning in southern China. *Toxicon*, 34(5):579—590
- Destombe C, Cemella A D, Murphy C A *et al*, 1992. Nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA genes from the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Gonyaulacales, Dinophyta). *Phycologia*, 31(1):121—12
- Scholin C A, Anderson D M, 1993. Two distinct small subunit ribosomal RNA genes in the north American toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae). *J Phycol*, 29:209—216
- Scholin C A, Anderson D M, 1994. Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) I. RFLP analysis of SSU rRNA genes. *J Phycol*, 30:744—754
- Scholin C A, Anderson D M, 1996. LSU rDNA-based RFLP assays for discriminating species and strains of *Alexandrium* (Dinophyceae). *J Phycol*, 32:1 022—1 035
- Sogin M L, 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 95—102
- Taylor F J R, White D M A, Baden D G, 1985. Toxic Dinoflagellates. New York: Elsevier, 11—26

ANALYSIS OF MOLECULAR BIOGEOGRAPHIC MARKER ON RED TIDE TOXIC *ALEXANDRIUM TAMARENSE* IN THE SOUTH CHINA SEA

CHEN Yue-qin, QIU Xiao-zhong, QU Liang-hu, ZENG Long-mei[†],
QI Yu-zao^{††}, ZHENG Lei^{††}

(School of Life Sciences, [†]School of Chemistry and Chemical Technology,
Zhongshan University, Guangzhou, 510275)

^{††}(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, 510632)

Abstract In this study, cultures of eight strains of red tide toxic *Alexandrium tamarense* were established from germinated cysts or vegetative cells isolated from Dapeng Bay, Daya Bay and the Hong Kong area in May 1992 and December 1994, and a method of PCR amplification with individual cells was used to amplify the small subunit ribosomal RNA genes (Ss-rDNA) of eight strains for a restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay. PCR-RFLP analysis of Ss-rDNA on the red tide toxic *A. tamarense* demonstrated that the strains of *A. tamarense* in the South China Sea have Ss-rDNA A gene and lack of B gene, which was the same with that of the strains in western Japan and Australia (toxic or non-toxic), but different from that of the strains in North American seas. The genetic consistence of toxic *A. tamarense* in China seas suggested that the increase in the geographic range of *A. tamarense* in this sea area has possibly a local origin. In addition, it was demonstrated that the type of Ss-rDNA could be as a report marker for the identification and monitoring of the origin and dispersal of toxic species of *Alexandrium*.

Key words *Alexandrium tamarense* Molecular geographic marker Small subunit ribosomal RNA genes (Ss-rDNA) RFLP Red tide

Subject classification number X55