

螺旋藻(*Spirulina*)基因组外 DNA 的高效提取与纯化*

曹学成^{1,2} 汪志平¹ 杨灵勇¹ 徐步进¹

(1. 浙江大学原子核农业科学研究所 农业部核农学重点实验室 杭州 310029; 2. 山东农业大学信息科学与工程学院 泰安 271018)

提要 通过研究建立了一种简便、高效提取螺旋藻基因组外 DNA(exDNA)的方法——CTAB-蛋白酶 K 法。该法先以含 200 μg/ml 蛋白酶 K 的 CTAB 提取液裂解螺旋藻细胞,并用氯仿/异戊醇抽提得到总 DNA 粗提物,粗提物再经 100 μg/ml 蛋白酶 K 酶解及酚/氯仿/异戊醇抽提得到总 DNA,再利用凝胶冻融离心法得到高纯度 exDNA。利用上述方法,对 6 株钝顶螺旋藻品系 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-6 所作的研究表明,(1) 6 株品系均含有 exDNA,但数目与相对质量不尽相同;(2) Sp-1、Sp-2、Sp-5 和 Sp-6 均只有一种 exDNA,依次约为 1.15kb、0.75kb、1.15kb 和 1.1kb;(3) Sp-3 和 Sp-4 均有 2 条 exDNA 带,Sp-3 的 exDNA 约为 1.55kb 和 3.0kb,Sp-4 的 exDNA 约为 1.8kb 和 3.6kb;(4) 螺旋藻品种(系)间 exDNA 的异同性及其与生理生态等特性的关系,暗示着 exDNA 可能与螺旋藻的分类、进化和形态建成等重大生物学课题有关,并有可能担负着某些生物学功能。

关键词 钝顶螺旋藻,基因组外 DNA,提取,纯化,CTAB-蛋白酶 K

中图分类号 Q556.3

螺旋藻(*Spirulina*)为光合放氧、无异形胞、不分枝、呈规则螺旋形的原核丝状蓝藻(cyanobacterium)(Ciferri, 1983)。此属中的钝顶螺旋藻(*S. platensis*)和极大螺旋藻(*S. maxima*)两个种,因培植设施与工艺简便、生产成本低、食用安全、营养丰富,并具有较高的医药保健功能,而得到大规模的开发利用,现已在全球形成了庞大的螺旋藻产业(胡鸿钧, 1997; Wang *et al.*, 2005)。与其他农业与生物产业一样,种质资源创新是有效提升当前螺旋藻产业技术水平与经济效益的重要途径,而通过研究揭示螺旋藻的分子遗传学背景,构建转基因技术体系,是开展种质创新的必要前提。为此,国内外在螺旋藻遗传育种学、分子生物学及转基因技术等方面作了大量研究,并取得了重要成果(胡鸿钧, 1997; Toyomizu *et al.*, 2001; 李晋楠等, 2002)。

已有研究表明,大多数藻类除基因组 DNA,还含有基因组外的 DNA(extra-genomic DNA 或 extrachromosomal DNA, 简称 exDNA),它们以质粒(Lau *et al.*, 1980; Goff *et al.*, 1990)、质粒状 DNA(La Claire *et al.*, 1997, 1998; 郭宝太等, 2000a)或线状 DNA(Lee *et al.*, 1995)等形式存在于细胞内。鉴于构建内源转基因载体,开展系统演化和形态建成等课题研究需要,螺旋藻 exDNA 存在与否、存在形式、结构与功能等问题,一直是近年来国内外藻类学领域研究的热点之一。Ciferri 等(1993)曾对钝顶螺旋藻和极大螺旋藻,以及一些尚未定名藻株 DNA 的组成进行了研究,但均未发现 exDNA; Qin 等(1993)、秦松等(1994)从两株钝顶螺旋藻中各分离到分子量不同的质粒,在电镜下这两种质粒均呈闭合环状; Kojima 等(1998)从钝顶螺旋藻株系 FS 中分离得到两种具有转座子结

*国家自然科学基金资助项目, 30000010 号; 浙江省“新世纪 151 人才工程”资助项目, 05-3-1055 号; 山东农业大学青年科技创新基金, 23437 号。曹学成, 博士, 副教授, 现在工作单位: 山东农业大学信息科学与工程学院, 地址: 山东省泰安市, 邮编: 271018, E-mail: xccao@sdau.edu.cn

通讯作者: 汪志平, E-mail: zhpwang@zju.edu.cn

收稿日期: 2005-09-20, 收修改稿日期: 2006-02-28

构特征的 exDNA, 并指出它们可能参与藻丝形态建成, 且可望改建成螺旋藻内源性的转基因载体, 以克服外源重组载体导入螺旋藻细胞内不能长期稳定遗传与表达的难题(Toyomizu *et al.*, 2001); 汪志平(2000)¹⁾研究发现钝顶螺旋藻品系中 exDNA 的存在与否, 因品系不同而存有差异。

上述有关螺旋藻 exDNA 存在与否, 以及存在形式等方面的差异, 不仅与研究者所用的藻株不同有关, 而且与所用的分离提取技术方法不同有关(Ciferri *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 1993; 秦松等, 1994; Kojima *et al.*, 1998; 汪志平, 2000¹⁾)。本文作者针对螺旋藻材料蛋白质和多糖含量高、exDNA 相对丰度低等特殊特性(汪志平, 2000¹⁾; 李晋楠等, 2002), 在总结有关藻类基因组 DNA 及 exDNA 提纯方法的基础上, 通过研究试图建立一种高效提取与纯化螺旋藻 exDNA 的技术方法, 以满足对螺旋藻 exDNA 进行酶切、克隆、杂交和测序等分子生物学操作的需要, 为深入开展螺旋藻 exDNA 的起源与进化、结构与功能, 以及应用于转基因载体构建等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验所用的钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*) 品系 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-6, 均保存于浙江大学原子核农业科学研究所生物资源与分子工程实验室。采用 Zarrouk 培养液, 在(30 ± 1)、4000 lx (12h : 12h)下通气培养。待生长至对数生长期时, 用 300 目的尼龙筛绢过滤采收藻体, 用蒸馏水洗 3 次并吸水后置 -20 冷冻保存, 备用(李晋楠等, 2002)。

1.2 exDNA 的制备方法

采用 CTAB 法、DNA 抽提试剂盒和 CTAB-蛋白酶 K 法, 并加以比较。

参照李晋楠等(2002)提取螺旋藻总 DNA 的 CTAB 法等三种方法提取螺旋藻 exDNA, 新鲜或保存于 -20 藻泥的用量均为 200mg。

利用 UNIQ-10 小量柱式 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程公司)提取 exDNA, 按试剂盒说明书操作。新鲜或保存于 -20 藻泥的用量均为 100mg。

CTAB-蛋白酶 K 提取法的步骤如下: 取 200mg 新鲜或保存于 -20 的藻泥于 5ml 灭菌的

离心管中, 用液氮冻融 2—3 次后加入 1.5ml 预热至 65 的 CTAB 提取缓冲液 [1.5% CTAB, 100mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1% (V/V) 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。悬浮并混合均匀后 65 水浴 1h, 并不时轻轻颠倒混匀。10000r/min 离心 5min 除去细胞碎片等杂质, 上清液加入 1.5ml 氯仿/异戊醇(24 1), 混匀后室温下 12000r/min 离心 10min。上清液加入 150 μl 浓度为 3mol/L 的 NaAc (pH 5.2), 3ml 预冷的无水乙醇, -20 放置 1h 后 12000r/min 离心 10min。沉淀先用 70% 的乙醇洗涤, 室温晾干或真空抽干后加入 500 μl TE-蛋白酶 K 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μg/ml, pH 8.0), 于 50 水浴 30—60min 并不时轻轻摇动, 直至完全溶解。用 500μl 的酚/氯仿/异戊醇(25 24 1)抽提 1 次后 12000r/min 离心 10min, 上清液加入 50μl 3mol/L 的 NaAc 和 1.25ml 预冷的无水乙醇, -20 放置 30—60min, 12000r/min 离心 15min。沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次, 真空抽干后用 100μl TE (pH 8.0) 溶解。

1.3 DNA 的浓度与质量检测

提得的 DNA 样品经适当稀释后, 在紫外-可见分光光度仪 (DU530 UV/Vis, Beckman, USA) 上于 200—300nm 波长范围扫描, 可测得吸收光谱, 并根据 A_{260} 计算 DNA 浓度、 A_{260}/A_{280} 检测 DNA 纯度(李晋楠等, 2002)。同时, 将所提得的 DNA 样品用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析, 电压为 3—5V/cm, 随后用 EB 染色 20min, 在 VersaDoc™ 3000 Imaging System (Bio-Rad, USA) 上进行成像、拍照, 并利用系统软件 Quantity One 进行 DNA 相对含量分析。

1.4 exDNA 的纯化方法

所提 DNA 依上述方法进行琼脂糖凝胶电泳并经 EB 染色后, 在紫外透射仪 (UVP, USA) 365 nm 的紫外灯下切出 exDNA 处的凝胶块, 放入灭菌离心管中, 加入 1 倍于凝胶块体积的 TE 缓冲液。在 -20 冷冻约 30min 后取出并在室温下融化, 将凝胶混合液转至铺有一层灭菌脱脂棉或玻璃丝棉的微孔离心柱 (SK131/132 柱, 上海生工生物工程公司) 上, 10000r/min 离心 3min。在离心管

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

底部收集得到的 exDNA 液中加入等体积酚/氯仿/异戊醇, 混匀后 12000r/min 离心 5min。上清液中加入 0.1 倍体积 3mol/L NaAc 及 2.5 倍体积预冷无水乙醇, 并于 -20℃ 放置 30min 后 12000r/min 离心 10min。所得沉淀用 70%乙醇洗涤 2 次, 真空抽干, 并用 20 μ l 双蒸水溶解后, 保存于 -20℃ 待用。

2 结果与讨论

2.1 CTAB 法和 DNA 抽提试剂盒法提取螺旋藻 exDNA 效果的比较

对分别利用 CTAB 法和 UNIQ-10 DNA 抽提试剂盒法提得 6 株钝顶螺旋藻总 DNA 的电泳分析显示(图 1), 除个别样品在接近电泳前沿位置有 RNA 带(经 RNase 酶解处理后消失, 见图 2)外, 均只有一条整齐清晰、相对分子质量大于 21kb 的基因组 DNA 带, 而未见有 exDNA 带。值得注意的是, 笔者在一次电泳分析试验中因上样前忘记对 Sp-2 总 DNA 样品进行稀释, 致使上样量比图 1 中的增加了近 3 倍, 结果在用 CTAB 法提取的 Sp-2 总 DNA 电泳图的中下部位出现了一条新的条带(图 2 中的 2), 而在用 UNIQ-10 DNA 抽提试剂盒法提取的 Sp-2 总 DNA 电泳图上, 即使上样量也增加了近 3 倍, 但仍未见有新的条带(图 2 中的 1)。进一步用 RNase 酶解经 CTAB 法提得的 Sp-2 总 DNA 样品, 电泳图中下部位的条带依然存在(图 2 中的 3)。

对用上述两种方法提得 6 株螺旋藻共 12 个总 DNA 样品所作的紫外-可见光谱分析表明, 它们的 A_{260}/A_{280} 均在 1.75—1.94 之间(结果未显示), 而一般认为当 A_{260}/A_{280} 在 1.8—2.0 时, DNA 的纯

度较高、质量较好(李晋楠等, 2002)。可见, 无论利用 CTAB 法还是 UNIQ-10 DNA 抽提试剂盒法均可得到较高质量和纯度的螺旋藻 DNA, 这与图 1 的电泳图谱及李晋楠等(2002)的结果相吻合。从图 2 的结果表明, 包括 Sp-2 在内的 6 株螺旋藻, 并非如图 1 显示的那样, 均没有 exDNA, 只因某些藻株与 Sp-2 一样, exDNA 即使存在, 但 exDNA 在细胞内的丰度比基因组 DNA 的要小得多, 以至于应用一般的提取与检测方法难以被发现。UNIQ-10 小量柱式对 DNA 抽提试剂盒法 DNA 的提取率受 DNA 的分子量及其与膜的结合程度等多种复杂因素影响(产品说明书), 不宜用于提取螺旋藻 exDNA。螺旋藻等水生藻类与陆地植物相比, 不仅蛋白质含量高, 而且通常含有较高的多糖和多酚等次生代谢物质, 而 CTAB 既能充分地裂解藻细胞, 又能有效地除去多糖和多酚等物质, 因而在紫菜、蜈蚣藻和管形藻等藻类的 DNA 提取中均取得了良好效果(郭宝太等, 2000a; 李晋楠等, 2002)。上述实验结果也表明, CTAB 法用于螺旋藻 exDNA 提取比 UNIQ-10 小量柱式 DNA 抽提试剂盒法更有效, 只是提取与富集效率太低。因此, 还需根据螺旋藻材料的蛋白质和多糖含量高、exDNA 含量低等特点, 对上述常规的 CTAB 法加以改进。

2.2 CTAB-蛋白酶 K 提取螺旋藻 exDNA 方法的建立

以上述含有 exDNA 的 Sp-2 为材料, 通过减少提取步骤并在一些步骤加入适量的蛋白酶 K 处理等改进, 建立了 CTAB-蛋白酶 K 螺旋藻 exDNA 提取法。利用该方法可简便、有效地从 Sp-2 中提

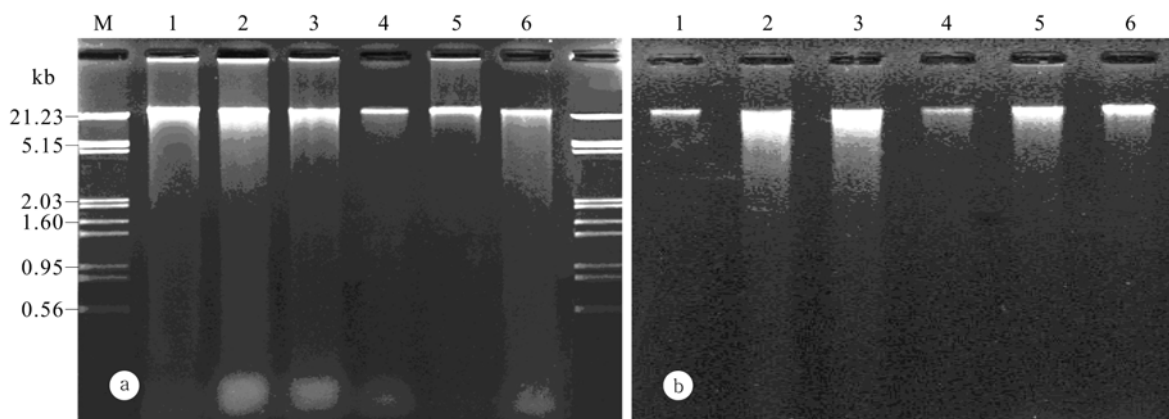


图 1 用 CTAB 法(a)和 UNIQ-10 DNA 抽提试剂盒法(b)提得螺旋藻总 DNA 样品的电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis map of total DNA from 6 strains of *S. platensis* with CTAB method (a) and UNIQ-10 DNA extraction kit (b) M: λ DNA / *Eco*R + *Hind* molecular marker; 1—6: 钝顶螺旋藻品系 Sp-1 至 Sp-6

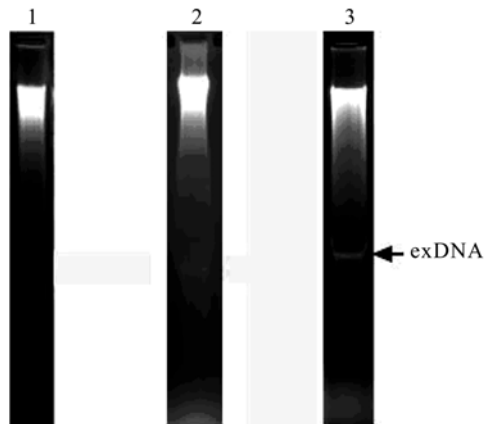


图2 DNA抽提试剂盒法与CTAB法提得Sp-2总DNA中exDNA的相对丰度

Fig.2 Relative abundance of exDNA in total DNA from Sp-2 with CTAB method and UNIQ-10 DNA extraction kit 1: DNA抽提试剂盒法; 2和3: CTAB法, 其中3经RNase酶解

取到 exDNA, 其大小约为 0.75kb(图 3 中的 1)。实验表明, 在第一次沉淀的 DNA 粗提物中再加入适量的蛋白酶 K 进行第二次酶解处理非常重要, 否则, 基因组 DNA 的条带虽依然清晰, 但 exDNA 带的相对含量只有经第二次酶解处理组的 34%(图 3 中的 2)。进一步利用 CTAB-蛋白酶 K 法对其他 5 株钝顶螺旋藻进行 DNA 提取及电泳分析发现, 这 5 个品系都有 exDNA 带。其中, Sp-1、Sp-5 和 Sp-6 与 Sp-2 的一样, 均只有一条 exDNA 带, Sp-1 和 Sp-5 的 exDNA 约为 1.15kb, Sp-6 的 exDNA 约为 1.1kb; 而 Sp-3 和 Sp-4 均有 2 条 exDNA 带, Sp-3 的 exDNA 约为 1.55kb 和 3.0kb, Sp-4 的 exDNA 约为 1.8kb 和 3.6kb(图 4)。

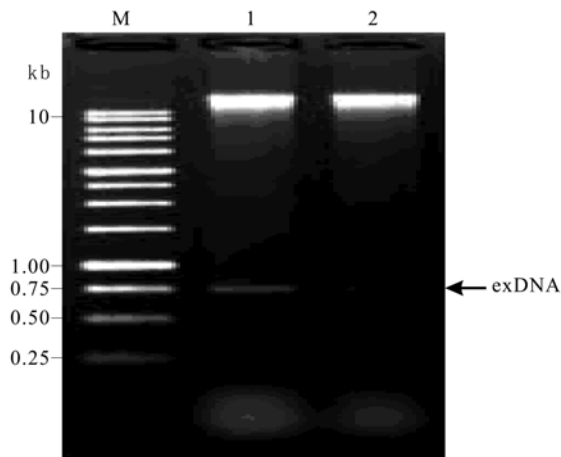


图3 Sp-2总DNA粗提物用蛋白酶K处理与否对exDNA提取率的比较

Fig.3 Comparison of efficiency of exDNA extraction from total crude DNA with or without proteinase K treatment M: DNA molecular marker; 1: 用蛋白酶K处理; 2: 不用蛋白酶K处理

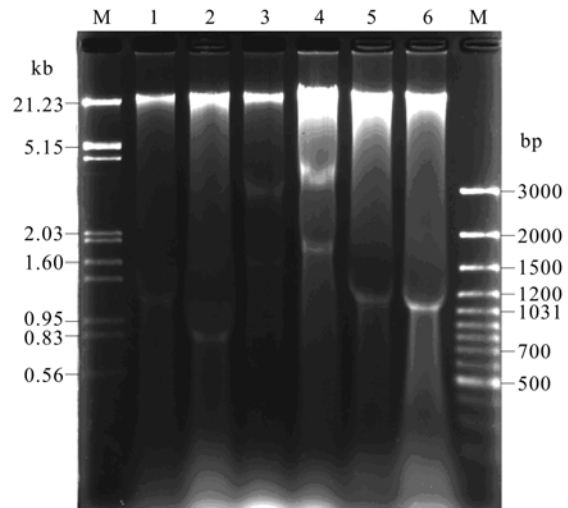


图4 CTAB-蛋白酶K法提取螺旋藻总DNA的电泳图谱
Fig.4 Electrophoresis map of total DNA from 6 strains of *S. platensis* with the method of CTAB-Proteinase K
M: DNA molecular markers; 1—6: 钝顶螺旋藻品系 Sp-1 至 Sp-6

上述结果表明, 利用所建立的 CTAB-蛋白酶 K 法能有效地检测并提取螺旋藻的 exDNA。此法与 CsCl 密度梯度离心法等其他提取方法相比, 操作更简便、快捷, 且不需超速离心机等昂贵设备(Qin *et al*, 1993)。此法与常规的 CTAB 法相比, 主要作了以下两方面的改进: (1) 在起初的 DNA 抽提液及第一次沉淀的总 DNA 粗提液中加入适量的蛋白酶 K 进行酶解, 不仅可破坏螺旋藻细胞内源 DNA 酶的活性, 有效防止 exDNA 在提取过程中被降解, 而且能有效分离与 exDNA 结合的蛋白质, 使 exDNA 不随蛋白质一起沉淀而被丢弃(Chan *et al*, 1995; Nair *et al*, 1999); (2) 由于采用了二次沉淀提取技术, 整个过程仅用了 1 次氯仿/异戊醇及 1 次酚/氯仿/异戊醇共 2 次抽提, 显著少于常规 CTAB 法中 2 次酚、2 次酚/氯仿/异戊醇及 3 次氯仿/异戊醇共 7 次抽提, 从而有效地减少了 exDNA 在提取过程中的损失。此外, 在被检测的 6 株钝顶螺旋藻中, 除 Sp-1 和 Sp-5 的 exDNA 因相对质量相同而有可能同源外, 其他藻株间的 exDNA 均存有差异, 并且这种差异似乎与螺旋藻的某些生理生态特性相关。例如, 具有两种 exDNA 的 Sp-3 和 Sp-4, 与只有一种 exDNA 的 Sp-1 和 Sp-2 及 Sp-5 相比, 环境适应性强、形态稳定、生长繁殖性能良好, 常作为优良品系应用于规模化生产。螺旋藻品种(系)间 exDNA 的异同性及其与生理生态等特性的关系, 暗示着 exDNA 可能与螺旋藻的分类、进化和形态建成等

重大生物学课题有关, 并有可能担负着某些生物学功能。

2.3 螺旋藻 exDNA 的纯化

为满足对螺旋藻 exDNA 进行酶切、克隆、测序等分子生物学操作的需要, 作者进一步对上述经 CTAB-蛋白酶 K 法提取的 exDNA 的纯化方法进行了优化。以 Sp-2 为材料, 利用凝胶冻融-离心纯化法得到 exDNA 的条带单一、清晰, 回收效率高于 90%(图 5)。进一步实验表明, 上述方法不仅适用于其他螺旋藻品种(系)exDNA 的纯化, 而且纯化出 exDNA 的 A_{260}/A_{280} 均在 1.8—2.0 之间, 且能满足 PCR、限制性酶切、克隆及分子杂交等分子生物学操作的需要(有关研究结果将另文发表)。

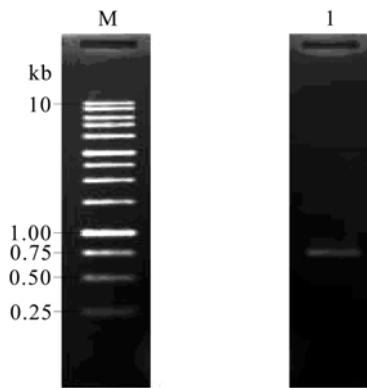


图 5 Sp-2 高纯度 exDNA 的电泳图谱

Fig.5 Electrophoresis map of high-purification exDNA from Sp-2

M: DNA molecular marker; 1: exDNA

目前通常所用的试剂盒回收法、电洗脱法和 glassmilk 吸附法, 比较适合对丰度较高的 DNA 进行纯化(Shivji *et al*, 1992; 郭宝太等, 2000b)。本文作者针对螺旋藻总 DNA 中 exDNA 丰度较低等问题, 采用凝胶冻融-离心法不仅纯化效果好, 而且简便、快捷、成本低。

参 考 文 献

李晋楠, 汪志平, 2002. 高质量螺旋藻基因组 DNA 制备方法研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 28(5): 533—536
 胡鸿钧, 1997. 国外螺旋藻生物技术的现状及发展趋势. 武汉植物学研究, 15(4): 369—374
 秦松, 董顺, 崔武等, 1994. 钝顶螺旋藻质粒的电镜观察及杂交研究. 海洋与湖沼, 25(5): 560—563

郭宝太, 毕玉平, 单雷等, 2000a. 条斑紫菜高纯度总 DNA 及其质粒状 DNA 的提取. 海洋学报, 22(2): 87—91
 郭宝太, 夏连胜, 孙世孟等, 2000b. 条斑紫菜质粒状 DNA 的提取与富集. 海洋通报, 19(4): 56—60
 Chan J W, Goodwin P H, 1995. Extraction of genomic DNA from extracellular polysaccharide-synthesizing Gram-negative bacteria. Biotechniques, 18: 418—422
 Ciferri O, 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. Microbiological Reviews, 47(4): 551—578
 Ciferri O, Tiboni O, Riccardi G *et al*, 1993. Mutants, genes and phylogeny of *Spirulina platensis*. Monaco Musee Oceanographique, 12: 25—29
 Goff L J, Coleman A W, 1990. Red algal plasmids. Curr Genet, 18: 557—565
 Kojima H, Qin Song, Kumar T A *et al*, 1998. Transposable genetic elements in *Spirulina* and potential applications for genetic engineering. Chin J Oceanol Limnol, 16: 30—39
 La Claire J W, Zuccarello G C, Tong S, 1997. Abundant plasmid-like DNA in various members of the orders Siphonocladales and Cladophorales (Chlorophyta). J Phycol, 33: 830—837
 La Claire J W, Loudenslager C M, Zuccarello G C, 1998. Characterization of novel extrachromosomal DNA from giant-celled marine green algae. Curr Genet, 34: 204—211
 Lau R H, Sapienza C, Doolittle W F, 1980. Cyanobacterial plasmids: their widespread occurrence, and the existence of regions of homology between plasmids in the same and different species. Mol Gen Genet, 178(1): 203—211
 Lee M A, Russell D W, 1995. Analysis of two mitochondrially-associated linear plasmids from the red alga *Porphyra* spp. (Bangiales, Rhodophyceae). Plant Sci, 106: 99—105
 Nair S, Karim R, Cardosa M J *et al*, 1999. Convenient and versatile DNA extraction using agarose plugs for ribotyping of problematic bacterial species. J Microbiol Methods, 38: 63—67
 Qin S, Tong S, Zhang P *et al*, 1993. Isolation of plasmid from the blue-green alga—*Spirulina platensis*. Chin J Oceanol Limnol, 11(3): 285—288
 Shivji M S, Rogers S O, Stanhope M J, 1992. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae. Mar Ecol Pro Sec, 84: 197—203
 Toyomizu M, Suzuki K, Kawata Y *et al*, 2001. Effective transformation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* using electroporation. J Appl Phycol, 13(3): 209—214
 Wang Z P, Zhao Y, 2005. Morphological reversion of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanophyta): from linear to helical. J Phycol, 41(3): 622—628

HIGH EFFICIENT EXTRA-GENOMIC DNA EXTRACTION AND PURIFICATION FROM *SPIRULINA*

CAO Xue-Cheng^{1,2}, WANG Zhi-Ping¹, YANG Ling-Yong¹, XU Bu-Jin¹

(1. Institute of Nuclear Agriculture Sciences, Zhejiang University, Key Laboratory of Nuclear Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture of China, Hangzhou, 310029; 2. College of Information Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, 271018)

Abstract Genus *Spirulina* is a photoautotrophic filamentous cyanobacterium of Family Oscillatoriaceae, Phylum Cyanophyta. Because of *Spirulina* contain bioactive polysaccharides, β -carotene and γ -linolenic acid, having superior physiological effects on human, FAO of the UN and WHO claimed it as an ideal food and dietary supplement in the 21st century. Happily, *Spirulina* is easy to culture in large scale. Because of its alkaliphilic nature, it can be grown as mono-culture in natural environment. Two widely exploited economic microalgae, *Spirulina platensis* and *Spirulina maxima*, have been selected for mass production.

To optimize the industrial cultivation, genetic study on the microalgae is necessary, and some technologies have been developed in several laboratories. However, conventional approaches such as chromosomal integration and conjugal transfer were not fully successful, because the multi-genome system in *Spirulina* hampers high expression of exogenous genes, and no endogenous extra-genomic DNA (exDNA) that is suitable to be used as recombinant vector has been found in *Spirulina* genus. It is not easy to extract and purify exDNA from *Spirulina* due to its high contents of protein and polysaccharide.

In this study, a modified CTAB-Proteinase K extracting method for exDNA in *Spirulina* is established. First, the *Spirulina* cells are lysed in CTAB extraction buffer containing 200 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K, and the total DNA crude is extracted with chloroform-isoamyl alcohol. Secondly, the total DNA is obtained after the crude is treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K and extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol. Finally, the high-purification exDNA is obtained using gel freezing-thawing method.

Furthermore, the exDNA of six strains of *Spirulina platensis*, Sp-1, Sp-2, Sp-3, Sp-4, Sp-5 and Sp-6, were extracted and analysed. The results show that: (1) all of the six strains contain exDNA, but the number and molecular weight of exDNA are usually different with strains; (2) four stains, Sp-1, Sp-2, Sp-5 and Sp-6, contain only one kind of exDNA, and the molecular weights is about 1.15kb, 0.75kb, 1.15kb and 1.1kb, respectively; (3) Sp-3 and Sp-4 contain two kinds of exDNA, and the molecular weights are about 1.55kb and 3.0kb in Sp-3, and 1.8kb and 3.6kb in Sp-4; (4) the distinction of exDNA in different spirulina strains and its related to physiological and ecological characteristics imply that exDNA may have some biological functions, and relate to taxonomy, evolution, and morphogenesis.

Key words *Spirulina platensis*, Extra-genomic DNA, Extraction, Purification, CTAB-Proteinase K