

东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 和海洋原甲藻 APBM (*P. micans* APBM) 的 5.8S rDNA 及其转录间隔区 (ITS) 的克隆和序列分析*

张宝玉 王广策^{†1)} 张炎[†] 韩笑天 吕颂辉^{††} 齐雨藻^{††} 邹景忠[†] 曾呈奎[†]

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 中国科学院研究生院 北京 100039)

[†](中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

^{††}(暨南大学水生生物研究所 广州 510632)

提要 对东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 和海洋原甲藻 APBM (*P. micans* APBM) 的 5.8S rDNA 及其转录间隔区 (ITS) 序列进行了 PCR 扩增、克隆和序列测定, 并分析了甲藻属 9 株赤潮藻 (7 株从 GenBank 获得) 的系统进化关系。结果表明, 海洋原甲藻 APBM 的 ITS 片段 (含 5.8S 区) 为 631bp, 东海原甲藻的 (含 5.8S 区) 为 552bp; 东海原甲藻与从 GenBank 中获得的微小原甲藻相似程度较高, 与甲藻属其他原甲藻相似程度较低; 本文研究的海洋原甲藻 APBM 的 ITS 序列与其他原甲藻相似程度都较低并且在进化树上距离也较远。用 ITS1 或 ITS2 序列构建的系统树与用 ITS + 5.8S rDNA 序列构建的系统树反映的结果基本一致, 5.8S 区因过于保守似乎不适于构建系统树反映种下的亲缘关系。

关键词 东海原甲藻, 海洋原甲藻, ITS, 序列分析, 系统进化

中图分类号 Q93

赤潮 (red tide) 是泛指海洋浮游生物 (主要是甲藻类) 过度繁殖造成海水变色 (一般为红色) 的现象, 近 20 年来对公众健康及经济的影响日益加剧, 其频度、强度和地理分布都在增加, 已成为全球性的主要海洋灾害之一 (齐雨藻等, 2003)。海洋浮游植物是引发赤潮的主要生物, 在四千多种海洋浮游植物中, 有 260 多种能形成赤潮, 其中有 70 多种能产生毒素 (Soumia, 1995)。由于某些赤潮藻形态高度多样化, 有毒赤潮的种类也在增加, 如以前从未在中国出现过的链状裸甲藻、异弯藻 (郭玉洁, 1994)、海洋褐胞藻 (齐雨藻等, 1994a, b) 等都是新赤潮种出现的例证。因此, 单凭传统的以形态鉴定为主的分类学已略显落伍, 分子生物技术的迅速发展为浮游植物的鉴定提供了新思路, 而如何找到一种快速简便的分子鉴定方法是

当前赤潮藻分类学研究的方向之一。

真核生物的 rDNA 成簇排列在一起, 由 16—18S rDNA、5.8S rDNA 和 26—28S rDNA 组成一个转录单位, 彼此被转录单元内间隔区 ITS (Internal Transcribed Sequences) 分开, 目前 rDNA 及 ITS 区被广泛用作研究系统发育、进化及分类鉴定的分子指标, 在动物 (Gonzalez *et al.*, 1990)、被子植物 (Baldwin, 1992)、真菌 (Morales *et al.*, 1993) 和绿藻 (Bakker *et al.*, 1992) 等均已获得理想的结果。Adachi 等 (1994, 1996a, b) 以 rDNA ITS 区为分类指标, 对日本海域的链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*) 和塔马亚历山大藻 (*A. tamarense*) 不同地理株进行分析; 陈月琴等 (1999) 对南海海域的 *A. catenella* 和 *A. tamarense* 的不同地理株的 ITS 区进行分析, 均获得了有意义的结论。

* 国家自然科学基金面上资助项目, 30170499 号; 中国科学院知识创新重要方向性项目, KZCX2-211 号; 国家 973 项目“我国赤潮高发区赤潮生物多样性及其种群分布特征”, 2001CB409701 号。张宝玉, 博士研究生, E-mail: by-zhang@163.com

1) 通讯作者, 王广策, E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-11-12, 收修改稿日期: 2003-12-29

作者以东海原甲藻、海洋原甲藻 APBM 为材料,对其 ITS 区进行了 PCR 扩增、克隆及测序,并对测序结果进行了分析,以期在赤潮微型生物快速准确识别方面获得有用的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)、海洋原甲藻 APBM(*P. micans* APBM)由中国科学院海洋研究所赤潮生物藻种库提供。藻种于 $f/2$ 培养基中培养,光暗比为 12h:12h,光照强度为 2000—4000 lx,培养温度为 19—20℃。实验所用的化学试剂购于上海生工及 Promega 公司。

1.2 DNA 的制备

DNA 制备方法参见文献(Zhang *et al.*, 1999; 王广策等, 2002)。提取的 DNA 在室温下干燥后用 TE(pH = 8.0)溶解,用 Beckman DU-650 紫外分光光度计检测 DNA 的含量和质量。

1.3 ITS 区的 PCR 扩增

引物设计参照文献(陈月琴等, 1999)。序列为:

For 5' GTCGTCGACGTAGGTTGAACCTGCAGAAGGATCA 3',
Sal I
Rev 5' CCTGCAGTCGACATATGCTTAAATTCAGCAGG 3',
Pst I

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 反应条件如下:94℃变性 5min,94℃变性 40s,40℃退火 40s,72℃延伸 1min,30 个循环,72℃延伸 10min。50 μ l 扩增反应体系含有:50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH = 8.3), 1.5mmol/L MgCl₂, 模板约 10ng, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTPs, 0.2 μ mol/L 引物,0.3U/ μ l Taq DNAase。每次均设空白对照,在 Eppendorf Mastercycler Gradient 基因扩增仪上完成。扩增产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像系统 Pharmacia Biotech ImageMaster VDS 记录实验结果。

1.4 PCR 产物的克隆及测序

PCR 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上 50V 电泳 40s,从胶上回收目的 DNA 片段。用 T4 DNA 连接酶将目标片段连接到 pBluescript SK+ 质粒载体上。克隆方法按文献(萨姆布鲁克等, 2002)操作。菌液送至上海中科凯瑞测序公司测序。

1.5 序列分析

在 NCBI 服务器上(http://www.ncbi.nih.gov)用 BLAST 进行同源检测,表明所得的序列为 ITS 区。实验测得的序列和其他原甲藻 ITS 序列(来自 GenBank)用计算机软件 DNASTar、BioEdit 及 Philp 3.5 进行分析。用 BioEdit 进行多序列对位分析;用 DNASTar 比较序列的相似性时,采用 Wilbur-Lipman method,参数均用默认值。系统树构建用 Philp 3.5 软件中的邻接(neighbor-joining)法,重复 1000 次计算 bootstrap 值。选择链状亚历山大藻(*A. catenella*)作为外类群。序列的数据库入口号码如下:AF352370 (*P. minimum*),AF352371 (*P. minimum*),AF208244 (*P. minimum*),AF208245 (*P. micans*),AF370879 (*P. micans*),AF370878 (*P. micans*),AF208246 (*P. triestinum*),ACA298900 (*A. catenella*)。

2 结果

2.1 东海原甲藻和海洋原甲藻 APBM 的 ITS 和 5.8S rDNA 片段的 PCR 扩增及克隆

从图 1 中可以看出,使用 PCR 技术可以成功地扩增出东海原甲藻和海洋原甲藻相应的 DNA 片段,2 种藻的 PCR 产物大小有差别,海洋原甲藻 APBM 的 PCR 产物略大于东海原甲藻的 PCR 产物(图 1)。

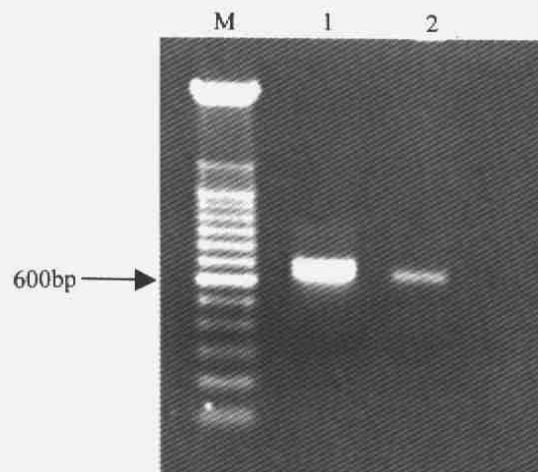


图 1 PCR 扩增产物 DNA 片段的电泳图谱(1% 琼脂糖)

Fig.1 Electrophoresis of the DNA fragment amplified by PCR (1% agarose)

M. Marker(100bp), 1. *P. micans* APBM 的 PCR 产物,
2. *P. donghaiense* 的 PCR 产物

纯化上述 PCR 产物,经过 *Sal* I 和 *Pst* I 酶切后将其连接至 PBluescript SK+ 质粒中。图 2 是带

藻与 GenBank 中海洋原甲藻的相似程度达到 98% 以上,而海洋原甲藻 APBM 与 GenBank 海洋原甲藻的相似性只有 59% 左右。在 ITS1 和 ITS2 区域,东海原甲藻与其他原甲藻的相似程度也高于海洋原甲藻 APBM 与其他海洋原甲藻的相似程度。

东海原甲藻与 GenBank 中的微小原甲藻 ITS1、ITS2 和 5.8S 序列相似性比较结果见表 2。

在 ITS1 和 ITS2 区域,相似性都超过 83%。无论是 ITS1、ITS2 还是 5.8S 序列,东海原甲藻与微小原甲藻的相似性都比与海洋原甲藻的相似性高。

东海原甲藻与三棘原甲藻(*P. triestinum*) ITS1、ITS2 和 5.8S 序列相似性比较结果见表 3。在 ITS1 和 ITS2 区域,东海原甲藻与三棘原甲藻的相似性只有 60% 多,比其他原甲藻的相似程度都低。

表 2 东海原甲藻和 GenBank 中的微小原甲藻 ITS + 5.8S 序列的相似性(%)比较

Tab.2 Comparison of percent identity (%) of *P. donghaiense* and *P. minimum* from GenBank using ITS + 5.8S sequence

序列名称	<i>P. donghaiense</i>			<i>P. minimum</i> AF352371			<i>P. minimum</i> AF352370			<i>P. minimum</i> AF208244		
	ITS1	5.8S	ITS2	ITS1	5.8S	ITS2	ITS1	5.8S	ITS2	ITS1	5.8S	ITS2
<i>P. donghaiense</i>	ITS1	100		83.3			83.6			84.1		
	5.8S		100		98.7			99.4			99.4	
	ITS2			100		85.8			85.8			86.3
<i>P. micans</i>	ITS1			100			99.5			99.5		
	AF352371	5.8S			100			99.4			99.4	
	ITS2					100			98.4			99.4
<i>P. micans</i>	ITS1						100			99		
	AF352370	5.8S						100			100	
	ITS2								100			98.9
<i>P. micans</i>	ITS1									100		
	AF208244	5.8S									100	
	ITS2											100

表 3 东海原甲藻和 GenBank 中的三棘原甲藻 ITS + 5.8S 序列的相似性(%)比较

Tab.3 Comparison of percent identity (%) of *P. donghaiense*, and *P. triestinum* from GenBank using ITS + 5.8S sequence

序列名称	<i>P. triestinum</i> ITS1	<i>P. triestinum</i> ITS2	<i>P. triestinum</i> 5.8S
<i>P. donghaiense</i> ITS1	66.4		
<i>P. donghaiense</i> ITS2		62.9	
<i>P. donghaiense</i> 5.8S			98.7

2.3.2 用不同区域构建的系统树反映结果

分别用 ITS + 5.8S、ITS1、5.8S 和 ITS2 区域构建系统进化树见图 4,发现用 ITS2 序列构建的进化树与用 ITS + 5.8S 序列构建的完全一致,故用 ITS2 序列构建的进化树略去。用 ITS1 序列构建的基本上与用 ITS + 5.8S 序列构建的一致。而用 5.8S 序列构建的进化树反映的结果差异很大。用 ITS + 5.8S、ITS1 和 ITS2 构建的系统树中,3 株微小原甲藻(其中 AF208244 来自韩国,AF352371 和 AF352370 来自美国)亲缘关系较近聚在一起。

GenBank 中的 3 株海洋原甲藻(AF208245 来自韩国,AF370879 和 AF370878 来自美国)也因亲缘关系较近而聚在一起。东海原甲藻与微小原甲藻的距离较近而与其他藻的距离较远。海洋原甲藻 APBM 与其他原甲藻的距离都很远。此结果与相似性反映的结果一致。

用 5.8S 序列构建的进化树中,微小原甲藻 AF352371 与另外两株微小原甲藻的距离较远,而东海原甲藻与 GenBank 中的海洋原甲藻进化距离却比和微小原甲藻的近。

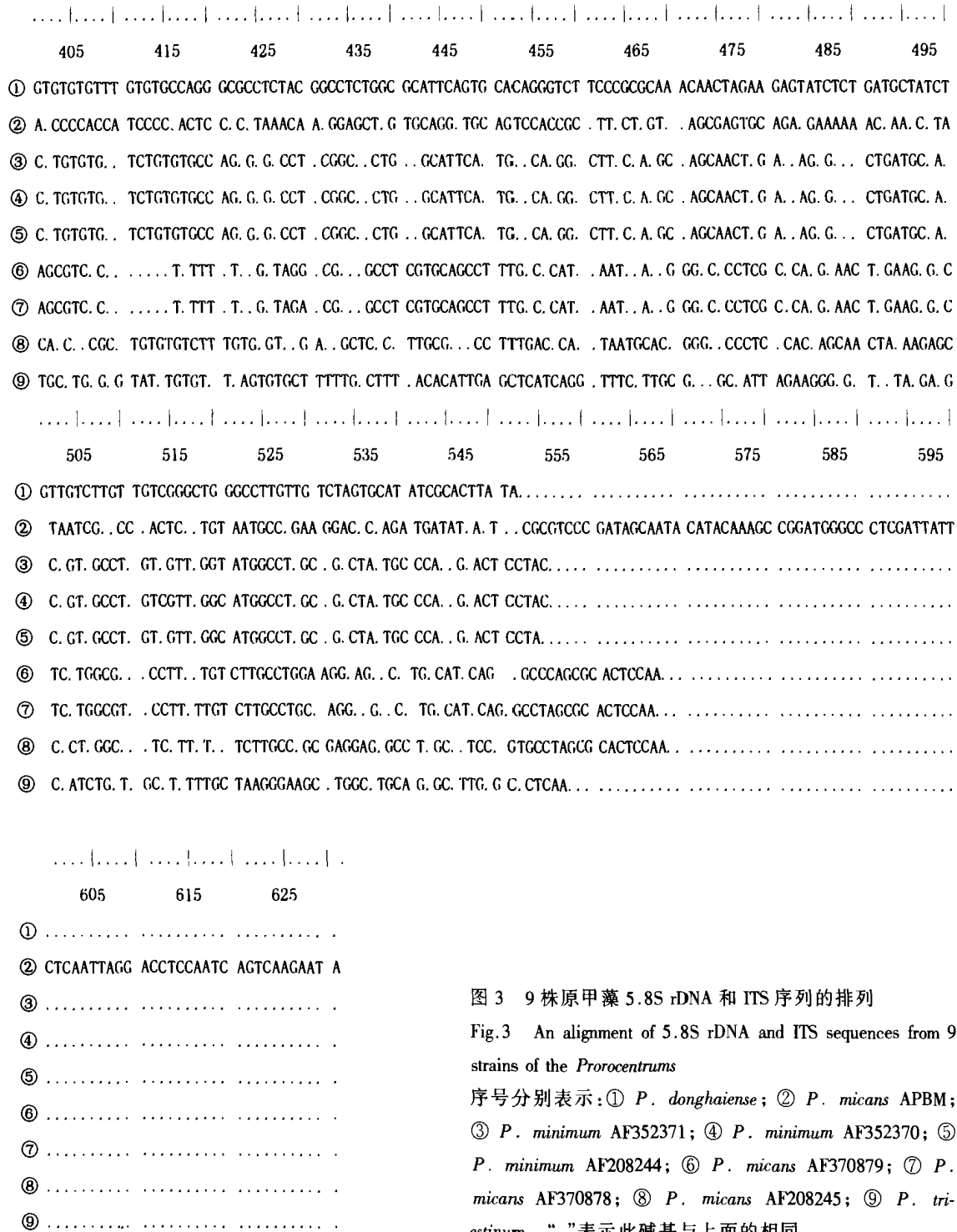


图3 9株原甲藻 5.8S rDNA 和 ITS 序列的排列

Fig.3 An alignment of 5.8S rDNA and ITS sequences from 9 strains of the *Prorocentrum*

序号分别表示:① *P. donghaiense*; ② *P. micans* APBM; ③ *P. minimum* AF352371; ④ *P. minimum* AF352370; ⑤ *P. minimum* AF208244; ⑥ *P. micans* AF370879; ⑦ *P. micans* AF370878; ⑧ *P. micans* AF208245; ⑨ *P. triestinum*。“.”表示此碱基与上面的相同

3 讨论

东海原甲藻是在我国东海新出现的赤潮物种,关于它的定种问题一直以来存在争议。一种观点认为它是具齿原甲藻(Lü *et al*, 2003),另一种观点认为它是新种——东海原甲藻(Lu *et al*, 2001; 齐雨藻等, 2003)。本文根据其 ITS 序列(含 5.8S 区域)发现该物种与微小原甲藻的亲缘关系

较近,此结果与胡鸿钧等用该藻的核糖体 18S rDNA 的研究结果相似(个人通讯)。同时,也证明用 ITS 区作为属下种间的分类指标是可行的,而 5.8S 区域相对保守,用 5.8S 序列构建系统树并不能真实地反映种以下之间的亲缘关系。与 5.8S 区域相比, ITS 区为高变的区域,在生物各类群属下水平的研究,可以提供比较丰富的信息。因此,该区域的序列不仅可以作为相对接近生物种类分

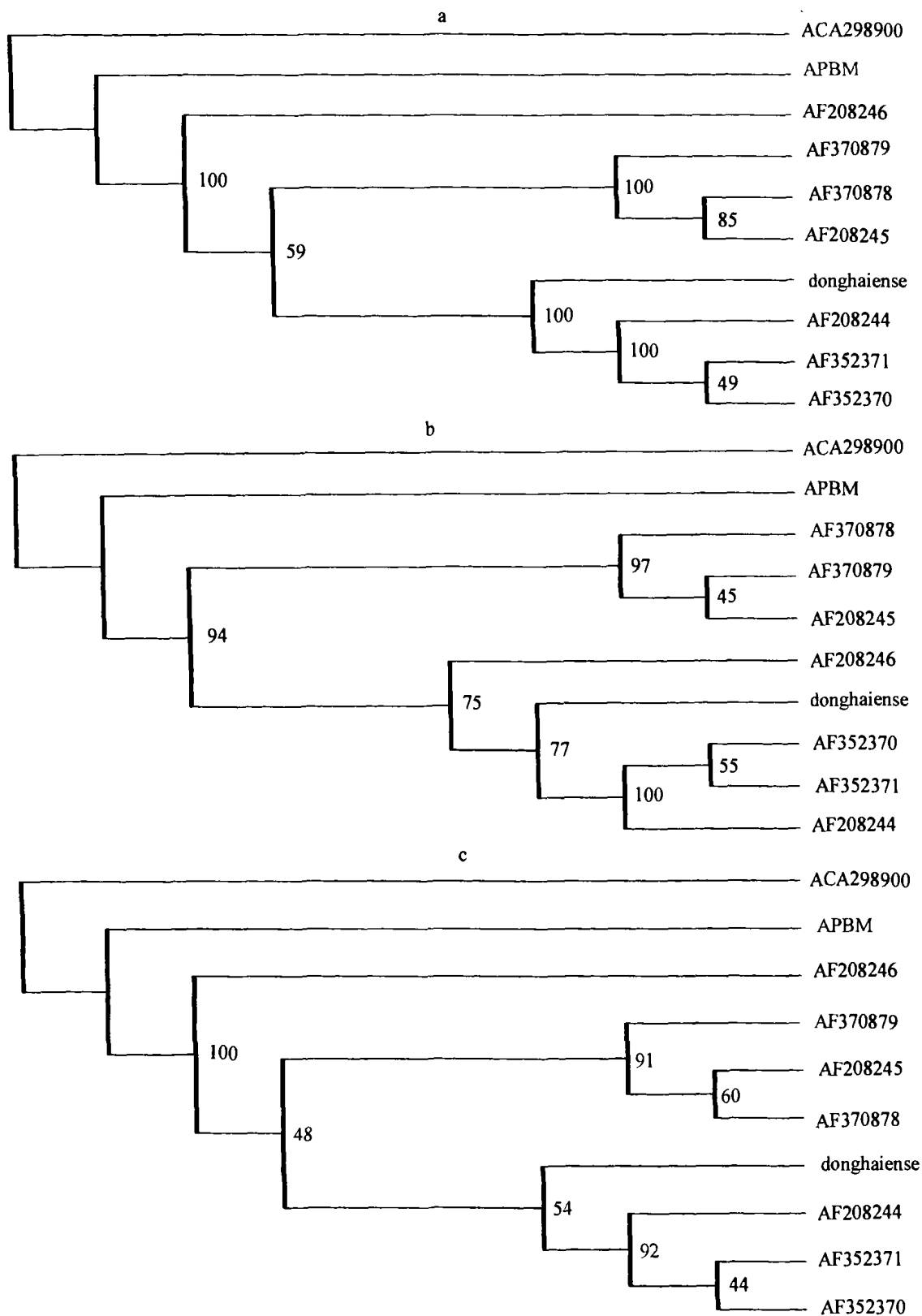


图 4 根据 ITS + 5.8S 序列(a)、ITS1 序列(b)和 5.8S 序列(c)构建的原甲藻属系统树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Procoentrum* with ITS + 5.8S (a), ITS1 (b) and 5.8S (c) sequences by NJ method

注: ACA298900 (*Alexandrium catenella*); APBM (*P. micans* APBM); AF208246 (*P. triestinum*);

AF370879, AF370878 and AF208245 are the species of *P. micans*; AF208244, AF352370 and AF352371

are the species of *P. minimum*; donghaiense is *P. donghaiense*

析的指标,而且是寻找特异性分子标记的良好区域。目前用 rDNA 和 ITS 区作为分子指标在研究甲藻系统发育方面都取得了较好的结果(庄丽等, 2001)。陈月琴等(1999)根据 *A. catenella* 和 *A. tamarense* 的 ITS 序列设计出各自专一性的核酸分子探针。

本实验室保存的海洋原甲藻 APBM 非常特殊,尽管其序列经过 BLAST 比对分析,表明是带有 5.8S 的 ITS 区域,但其序列与其他原甲藻差距都很大(表 1—表 3),并且在进化树上也单独成为一支,其原因有待进一步研究。

参 考 文 献

- 王广策,孙海宝,曾呈奎,2002. 三角褐指藻磷酸甘油酸变位酶基因可能侧翼序列的筛选、克隆以及序列测定. 海洋与湖沼, 33(3): 259—264
- 庄 丽,陈月琴,李钦亮等,2001. 赤潮叉角藻 18S rDNA 和 ITS 区序列测定与分析. 海洋与湖沼, 32(2): 148—153
- 齐雨藻,洪 英,吕颂辉等,1994a. 南海大鹏湾海洋褐胞藻赤潮及其成因. 海洋与湖沼, 25(2): 132—137
- 齐雨藻,钱 锋,1994b. 大鹏湾几种赤潮甲藻的分类学研究. 海洋与湖沼, 25(2): 206—210
- 齐雨藻,王 艳,2003. 我国东海赤潮原甲藻应属哪种? 应用生态学报, 14(7): 1188—1190
- 陈月琴,屈良鹤,曾陇梅等,1999. 南海赤潮有毒甲藻——链状塔马亚历山大藻的分子鉴定. 海洋学报, 21(3): 106—111
- 郭玉洁,1994. 大连湾赤潮生物——赤潮异弯藻. 海洋与湖沼, 25(2): 211—215
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著, 黄培堂, 朱厚础, 范明等译, 2002. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 96—105
- Adachi M, Sako Y, Ishida Y. 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). J Phycol, 30: 857—863
- Adachi M, Sako Y, Ishida Y. 1996a. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. J Phycol, 32: 424—432
- Adachi M, Sako Y, Ishida Y, 1996b. Analyses of *Alexandrium* species using sequences of 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. J Phycol, 32: 424—432
- Bakker F T, Olsen J L, Stam W T *et al.*, 1992. Biogeography of *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta) based on comparisons of nuclear rDNA ITS sequences. J Phycol, 28: 660—668
- Baldwin B G, 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the composite. Mol Phylog Evol, 1: 3—16
- Gonzalez I L, Sylvester J E, Smith T F *et al.*, 1990. Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny. Mol Biol Evol, 7: 203—219
- Lu D, Goebel J, 2001. Five red tide species in genus *Prorocentrum* including the description of *Prorocentrum donghaiense* Lu sp. nov. from the East China Sea. Chin J Oceanogr Limnol, 19(4): 337—344
- Lü S-H, Zhang Y-Y, Cheng J-Y, 2003. Scanning electron-microscopic study on *Prorocentrum dentatum* from the East China Sea. Chin J Appl Ecol, 14(7): 1070—1072
- Morales V M, Pelcher L E, Taylor J L, 1993. Composition of the 5.8S rDNA and internal transcribed space sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. Curr Genet, 23: 490—495
- Sournia A, 1995. Red Tide and Marine Phytoplankton of the World Ocean: An Inquiry Into Biodiversity. In: Lassus P, Arzul G, Denn E *et al.* ed. Harmful Marine Algal Blooms. London, New York, Paris: Technique & Documentation-Lavoisier/Andover, England U K: Intercept Ltd, 103—112
- Zhang Zhaoduo, Green B R, Cavalier-Smith T, 1999. Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes. J Nature, 400: 155—159

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF 5.8S rDNA AND ITS REGION FROM *PROROCENTRUM DONGHAIENSE* AND *P. MICANS* APBM

ZHANG Bao-Yu, WANG Guang-Ce[†], ZHANG Yan[†], HAN Xiao-Tian, LÜ Song-Hui^{††},

QI Yu-Zao^{††}, ZOU Jing-Zhong[†], ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)[†]

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;*

Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

[†](*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

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

Abstract Red tide (HABs) is a global coastal water phenomenon caused by excess propagation of algae (mainly dinoflagellate species). Many algae are potential producers of potent toxins, posing not only a significant risk to public health, but also a negative economic impact. Sequences of 5.8S rDNA and internal transcribed spacers 1 and 2 have proved to be good molecular tools, and an important complement to traditional morphological identification. In this research, the 5.8S rDNA and ITS region from *Prorocentrum donghaiense* and *P. micans* APBM were amplified by PCR. 1) BLAST showed that the DNA amplified by polymerase chain reaction (PCR) were the ITS sequences including 5.8S rDNA. 2) The ITS length of *P. micans* APBM was 631 base pairs, and *P. donghaiense*'s ITS sequence was 552bp, further study showed that the ITS1 length of *P. micans* APBM is 245bp, 5.8S rDNA length is 165bp and ITS2 is 221bp; while the ITS1, 2, and 5.8S rDNA length of *P. donghaiense* is 203bp, 159bp, 190bp, respectively. 3) In the ITS sequence, *P. donghaiense* had a high level of similarity with *P. minimum* (all above 83%), but low level similarity with other species of *P. micans* and *P. triestinum* (about 60%—70%), while *P. micans* APBM showed the lowest level similarity with other *P. micans* species according to ITS sequence, it was about 30% only. The 5.8S rDNA was so conserved that the similarity of this region between *P. donghaiense* and other *Prorocentrum* species was very high, all above 95%, so was the similarity between *P. micans* APBM and other *P. micans* species. 4) Genetic trees were constructed using 5.8S rDNA, ITS1, ITS2 sequence and ITS + 5.8S rDNA sequence respectively with Neighbor-joining (NJ) method. The result from phylogenetic tree of ITS2 sequence was the same as that showed by phylogenetic tree of ITS and 5.8S sequence, thus, the tree constructed using ITS2 sequence was not showed. The phylogenetic tree constructed with ITS + 5.8S rDNA sequence showed that: 1) 3 species of *P. minimum* form a clade with 100% bootstrap support, among which two species from Atlantic ocean got together because they had close relationship. *P. donghaiense* and *P. minimum* form a branch with 100% bootstrap support, this phenomenon showed that it had a close relationship with *P. minimum*, so was the result from the phylogenetic tree constructed with ITS1 sequence. However, *P. donghaiense* was found to be distantly related to other species of the *Prorocentrum*. This result accored with that showed by sequence similarity. 2) 3 species of *P. micans*, among which two coming from Atlantic Ocean, one from Korea sea area, form a clade with 100% bootstrap support. One Korea species and one Atlantic species got together. However, *P. micans* APBM formed a new branch in the phylogenetic tree of ITS + 5.8S rDNA sequence, as well as in the tree of ITS1. This result should to be paid good attention, though BLAST show that the DNA fragment of *P. micans* APBM was in ITS and 5.8S rDNA region. 3) To the contrary, the phylogenetic tree constructed with 5.8S rDNA sequence indicated that *P. minimum* had a close relationship with *P. micans*, while one species of *P. minimum* was distant from other two species. The results of the phylogenetic tree constructed with 5.8S sequence were inaccurate; therefore, the use of 5.8S rDNA as a classification standard between species is not reasonable.

Key words *Prorocentrum donghaiense*, *P. micans*, ITS, Sequence analysis, Phylogeny