

全细胞 PCR 扩增用于鱼腥藻种类鉴定

黄家权^{1,2} 王高鸿¹ 李敦海¹ 刘永定¹ 尹黎燕¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学, 武汉 430070)

摘要: 传统鉴定藻种的方法主要是通过形态学观察的方法加以判断。蓝藻在自然条件和人工培养过程中, 其形态、代谢能力等都可能发生变化, 同时该过程需要的时间长, 难以区分种或种以下的分类、单位, 亦难以在水华暴发早期阶段准确鉴定。本文利用 rDNA 通用引物扩增, 表明在 50 μ L 的反应体系中加入 20 个鱼腥藻细胞能扩增出目的条带; 对已知的鱼腥藻 PC 基因的分析设计引物, 在 BSA 浓度为 0.2%—1% (w/v) 下, 全细胞扩增出实验室保存的四种鱼腥藻的部分 PC 以及 PG-IGS 序列, 序列分析结果表明 PG-IGS 序列能用来作为鉴定种及种以下的分类依据。

关键词: 分子鉴定; 鱼腥藻; PCR; 测序

中图分类号: Q949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)02-0159-04

蓝藻广泛存在于淡水水体中, 在特定的生态条件下, 不同种属的蓝藻混合在一起, 大量繁殖, 聚集于水面, 形成水华。作为水华藻类研究的第一步, 水体中蓝藻的鉴定一直是研究中的一个重点。传统的藻类学鉴定方法是通过形态学的观察来划分的, 形态学标准往往使检测样本中的一些种不能被辨别出^[1], 在水华发生的过程中, 细胞的外型, 产毒能力会发生变化^[2], 即使是在实验室培养条件下, 不同氮源蓝藻的外形也会发生变化^[3]; 因此需要一种能更准确的方法以鉴定和检测藻的种类。微囊藻及鱼腥藻能产生毒素, 危害水生生物以及通过食物链影响人体的健康, 关于如何区分有毒微囊藻和鱼腥藻以及他们的分子鉴定已有相关的报道^[4, 5], 但国内关于淡水鱼腥藻的分子鉴定的工作报告甚少。藻蓝蛋白(PC)是由藻蓝蛋白操纵子(PC operon)编码, 其中包含 *pcb* 和 *pca* 基因, 分别编码后藻胆色素 β 亚基和 α 亚基, 两基因间隔区(IGS)是一个高变区域, 可用来鉴定蓝藻的种类^[6]。本文通过全细胞 PCR 技术, 获得鱼腥藻部分 PC 以及 PG-IGS 的序列信息, 为获取鱼腥藻的特异分子信息建立一种简单快速的方法, 从分子水平上鉴定了鱼腥藻种类。

1 材料和方法

1.1 材料 四种鱼腥藻 *Anabaena* sp1(采自蕲春), *Anabaena* sp14(采自浙江), *Anabaena* sp15(采自浙江), *Anabaena* sp0(采自水生所)均为本实验室保存, BG11 培养基中弱光下静置培养, 下文中分别用 1、2、3、4 号鱼腥藻表示。

1.2 DNA 提取 采用 Porter 的方法^[7]。

1.3 全细胞扩增前处理 离心沉淀鱼腥藻丝, 灭菌蒸馏水洗涤 3 次后用适量的蒸馏水定容, 超声波处理使藻丝断裂成单个细胞, 显微镜下血球记数板记数。取适量藻液作为模板进行 PCR 扩增。

上游引物 5'-GCTTAAATGGCCTACGKGAAC-3'; 下游引物: 5'-AAACCACGAGCAGCTTCG-3', 扩增鱼腥藻 rDNA ITS 序列的通用引物^[8]为: 上游引物 5'-TGTA-CACCGCCCGT-3'; 下游引物 5'-GGGTTBCCCCATTCTRG-3'; K 为 G 或 T, Y 为 C 或 T, M 为 A 或 C; W 为 A 或 T; B 为 T 或 C 或 G; R 为 A 或 G。引物委托上海生工合成。

1.4 PCR 反应条件 根据 Genbank 中登录的鱼腥藻 *pcb* 和 *pca* 基因设计引物, 扩增鱼腥藻 PC 基因。PCR 的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 53 $^{\circ}$ C

收稿日期: 2003-11-13; 修订日期: 2003-12-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-12); 973 项目(2002CB412300); 国家重大环境课题“滇池蓝藻水华污染控制技术”研究(K99-05-35-01); 中国科学院领域前沿课题(No. 220316)资助

作者简介: 黄家权(1976-), 男, 湖北省恩施市人, 博士, 从事藻类分子鉴定的研究

通讯作者: 刘永定, liuyd@ihb.ac.cn

30s, 72℃1min 循环 30 次; 72℃延伸 7min。反应总体积为 50μL, 其中 MgCl₂ 1.5mmol/L, 引物 1μmol/L, 10X 缓冲液 5.0μL, dNTPs 0.2 mmol/L 以及 1U 的 Taq 酶 (Promega), 除非文中另有说明, 10% BSA (w/v) 5.0μL, DNA 模板约 50ng, 全细胞的数量依据实验条件而变化。

1.5 PCR 产物克隆测序 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后, 紫外灯下用解剖刀切割下目的条带, TAKARA 凝胶试剂盒回收目的条带后和 T 载体连接, 连接产物转化用 CaCl₂ 制备的大肠杆菌 DH5 a, 菌斑 PCR 筛选阳性克隆, 序列测定由上海生工完成。

1.6 序列结果分析 测序结果采用 Clustal 软件进行多序列比对, 利用 Blast 在线查找最相近的序列。

2 结果

2.1 PCR 扩增 PG-IGS 序列

提取的 DNA 在加入 BSA 后能扩增出预期的目的条带, BSA 的加入对 PCR 扩增是必须的, BSA 的浓度不同, 扩增产物量稍有差别, 以 BSA 浓度达到 1% (w/v) 时的扩增效果最佳; 0.2% (v/v) 的 DMSO 的加入能有限的增加或减少特异产物带的亮度。在所有加入 BSA 的 PCR 反应中, 电泳带型基本一致(图 1)。

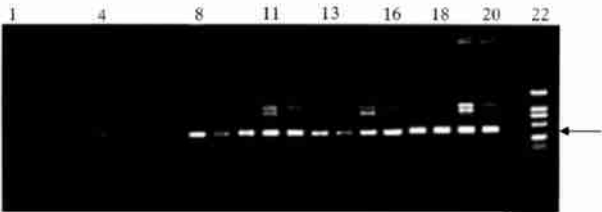


图 1 提取的基因组 DNA 扩增鱼腥藻 PC 的 IGS 序号

Fig.1 Amplification of *Anabaena* PG-IGS sequences using extracted DNA as template

全细胞 PCR 扩增 PG-IGS 序列结果表明, 在 PCR 反应管中加入 BSA 时, 利用全细胞作为模板也能扩增出相应的目的条带, 但亮度减小, 同时增加了许多非特异的条带, 这种非特异性扩增在不同的 PCR 条件下能重复出来(图 2)。

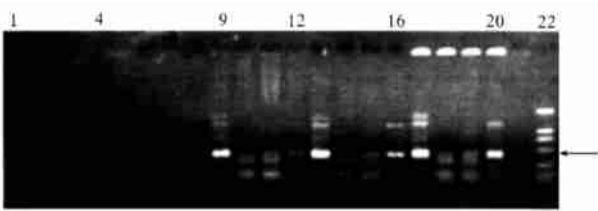


图 2 鱼腥藻全细胞 PCR 扩增 PC 的 IGS 序列

Fig. 2 Amplification of *Anabaena* PG-IGS sequences using whole cell as template

图 1, 2 说明: 1—4: PCR 反应体系中既没有加入 DMSO, 也没有加入 BSA; 5—8: PCR 反应体系中加入终浓度为 0.2% (v/v) 的 DMSO; 9—12: PCR 反应体系中加入终浓度为 0.2% (w/v) 的 BSA; 13—16: PCR 反应体系中加入终浓度分别为 0.2% (v/v) 的 DMSO 和 0.2% (w/v) 的 BSA; 17—20: PCR 反应体系中加入终浓度分别为 0.2% (v/v) 的 DMSO 和 1% (w/v) BSA; 21: 阴性对照; 22: DL 2000 marker。1, 5, 9, 13, 17 为 1 号鱼腥藻反应结果; 2, 6, 10, 14, 18 为 2 号鱼腥藻反应结果; 3, 7, 11, 15, 19 为 3 号鱼腥藻反应结果; 4, 8, 12, 16, 20 为 4 号鱼腥藻反应结果。箭头所示为预期的 PC 的 IGS 序列, 约 400bp。

Lane1—4: DMSO and BSA are not added to the PCR reaction buffer; 5—8: DMSO are added to the PCR reaction buffer with final concentration of 0.2% (v/v); 9—12: BSA are added to the PCR reaction buffer with final concentration of 0.2% (w/v); 13—16: DMSO and BSA are added to the PCR reaction buffer with final concentration of 0.2% (v/v) and 0.2% (w/v) respectively; 17—20: DMSO and BSA are added to the PCR reaction buffer with final concentration of 0.2% (v/v) and 1% (w/v) respectively. 1, 5, 9, 13, 17 are using the same template referred to as No 1; correspondingly, template used in lane 2, 6, 10, 14, 18 are referred to as No 2; 3, 7, 11, 15, 19 are referred to as No 3; 4, 8, 12, 16, 20 are referred to as No 4. Lane 21 represents the negative control and lane 22 represents DL 2,000 DNA marker. Arrows indicate the expected target bands approximately 400 bp.

2.2 PCR 扩增 rDNA ITS 序列

为了验证特异性出现的条带不是由于 BSA 的加入而引起的, 以及确定 PCR 方法能检测到鱼腥藻的数量下限, 利用 rDNA 的通用引物扩增四种鱼腥藻的 16S 和 23S rDNA 的 ITS 序列, 结果表明, 当 PCR 反应体系中细胞浓度达到 10⁵ 个/mL 时, 扩增的条带和以提取 DNA 为模板扩增的带型完全相同, 当细胞浓度降低到 10³ 个/mL 时, 仍然可见 PCR 的产物, 但产物带模糊, 同时扩增的带型也略有变化(图 3)。

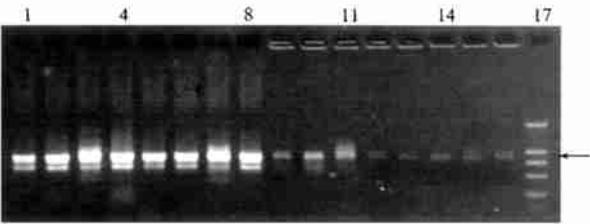


图 3 通用引物扩增鱼腥藻 rDNA ITS 序列

Fig. 3 Universal primers to amplify *Anabaena* 16S 23S rDNA ITS sequences

1, 2, 3, 4 泳道分别为 1, 2, 3, 4 号鱼腥藻的提取 DNA 的 PCR 结果; 5, 6, 7, 8 分别为 1, 2, 3, 4 号鱼腥藻的全细胞 PCR 结果, 细胞在反应体系中的浓度约为 $10^5/\text{mL}$; 9, 10, 11, 12 分别为 1, 2, 3, 4 号在细胞浓度为 $10^4/\text{mL}$ PCR 结果; 13, 14, 15, 16 分别为 1, 2, 3, 4 号的全细胞浓度为 $10^3/\text{mL}$ 的 PCR 结果; 17 为 DL 2,000 marker。箭头所指为扩增的约 900bp 的目的序列。

Lane 1, 2, 3, 4 are results of the PCR using No. 1, 2, 3, 4 *Anabaena* extracted DNA as template respectively; lane 5, 6, 7, 8, are results of the PCR using No. 1, 2, 3, 4 *Anabaena* pretreated whole cell as template in the reaction concentration of $10^5/\text{mL}$ respectively; lane 9, 10, 11, 12 are results of the PCR using No. 1, 2, 3, 4 *Anabaena* pretreated whole cell as template in the reaction concentration of $10^4/\text{mL}$ respectively; lane 13, 14, 15, 16 are results of the PCR using No. 1, 2, 3, 4 *Anabaena* pretreated whole cell as template in the reaction concentration of $10^3/\text{mL}$ respectively. Lane 17 is the DL 2,000 DNA marker. Arrow indicated the target band approximately 900bp.

```
c tac agc gcc cta ggt act cct ggt tct tcc gta gct gtt ggc gtt caa aaa atg aaa gat gca gct att ggg att gct
Y S A L G T P G S S V A V G V Q K M K D A A I G I A
aac gat ccc aac ggt atc acc aaa ggt gat tgc agt gca ttc atc tcc gaa gta gct ggc tac ttt gat cgc gct gct
N D P N G I T K G D C S A L I S E V A G Y F D R A A
gct gct gtt gct taatagcagtctagagtctcaatacgcgaagtatttagcaaccaggtaaaaagactaaaaataccaaggagatttgaaa
A A V A
ag atg gtt aaa aca cca att acc gaa gct atc gca gct gct gat acc caa gga cgc ttt ttg ggc aac act gaa tta
M V K T P I T E A I A A A D T Q G R F L G N T E L
caa gct gtt aac ggt cgt tat gta cgt gct gct gca agc tt
Q A V N G R Y V R A A A S
```

图 4 两种鱼腥藻部分 PC 序列及 PG-IGS 序列测定结果

Fig. 4 part of No. 1 and 2 *Anabaena* *pcb*, *pca* gene and the IGS sequence between them

单下划线为 *pcb* 部分基因序列所处的位置, 双下划线为 *pca* 部分基因序列所处的位置, 两者之间为 PG-IGS 序列。箭头所示的位置为测定的两种鱼腥藻仅有的两个碱基的差别, 2 号鱼腥藻在上箭头处 c 碱基取代了 1 号的 t 碱基; 下箭头处 a 取代了 t

Nucleotides underlined are part of the *pcb* gene sequence, nucleotides double underlined are part of the *pca* gene sequence, sequence in between them is PG-IGS. 2 arrows indicate the difference between two *Anabaena* strains, the arrow above indicates c substitue t in *Anabaena* No. 2 and the arrow below indicates a substitute t

模板扩增出了非特异的条带^[11]。在本实验条件下利用通用引物可扩增出 PCR 反应体系中细胞浓度为 $10^3/\text{mL}$ 的样本, 即在一个 PCR 反应中加入 20 个单细胞就能扩增出目的条带, 但细胞浓度的降低将使一些亮度较低的带在 EB 染色时消失(图 3)。

2.3 扩增产物序列分析

为验证全细胞扩增的带为所设计的 PC 的 IGS 序列, 挑选 1 号和 2 号鱼腥藻, 全细胞 PCR 的产物电泳后, 将目的条带切胶回收, T-A 克隆, 测序。测序结果表明, 所克隆的片段为部分 *pcb*, *pca* 基因序列及两个基因间的 PG-IGS 序列, 两种鱼腥藻在核苷酸上仅有两处差别, 氨基酸水平没有差别(图 4)。

3 讨论

BSA 的加入对以鱼腥藻提取的 DNA 及全细胞为模板做 PCR 均是必须的, 虽然有的鱼腥藻在没有加入 BSA 时也能扩增出目的条带(图 1, 2), 但扩增的量大大减少。加入的 BSA 在 0.2%—1% (w/v) 的终浓度时均能有效的扩增出目的条带, 1% (w/v) 的 BSA 的浓度为有报道的加入最大量, 其扩增结果仍然理想。BSA 的量进一步加大就会在溶液中形成沉淀, 从而干扰 PCR 的反应和电泳检测; 加入 DMSO 能提高扩增的效率, 和前人的结果一致^[9, 10]。

在利用设计的引物进行全细胞扩增时, 有不同于以 DNA 为模板时 PCR 扩增的带出现, 而在通用引物中则无此现象(图 2, 3), 这种非特异的条带在前人也有报道, 这可能是由于与鱼腥藻伴生的细菌为

1 号和 2 号鱼腥藻序列 BLAST 结果表明 PCR 扩增出的约 400bp 的片段和 PCC7120 的序列最为相近; 测定的 *pcb* 基因部分序列中, 鱼腥藻和 PCC7120 相似程度最大, 核苷酸组成的序列相似性为 92%, 氨基酸序列的相似性为 91%, 测定的 *pca* 基因部分

序列和 PCC7120 的相似程度也很高, 和已知的几种鱼腥藻比较表明差异主要在 PG-IGS 区域, 该区核苷酸序列 BLAST 未能在藻类的 PG-IGS 区找到相似片段, 因此, 可通过该区段的序列碱基组成可确定种或种以下分类鉴定。

Genebank 中已有大量的藻类基因序列可用于藻种的鉴定, 如 PC 序列, rDNA 序列, *gyp* 基因序列等, 为分子鉴定藻种打下了基础, 本文通过对已知的鱼腥藻序列设计的引物扩增 PG-IGS 序列以及序列测定, 通过这种方法可方便快速的鉴定和确认培养中的鱼腥藻种类。

参考文献:

- [1] Do Carmo Bittencourt Oliveira M, de Oliveira M C, Bolch C J. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions(*cpeBA*) [J]. *J. Phycol.* 2001, **37**: 810—818
- [2] Baker J A, Entsch B, Neilan B A, *et al.* Monitoring changing Toxicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, **68**: 6070—6076
- [3] Saker M L, Neilan B A. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically Australia[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, **67**: 1839—1845
- [4] Beltran E C, Neilan B A. Geographical segregation of the neurotoxin producing cyanobacterium *Anabaena circinalis* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, **66**: 4468—4474
- [5] Pan H, Song L R, Liu Y D, *et al.* Characterization of toxic waterbloom forming cyanobacteria by modified PCR[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica.* 2001, **25**(2): 159—166. [潘卉, 宋立荣, 刘永定, 等. 水华蓝藻产毒特性的 PCR 检测法[J]. 水生生物学报, 2001, **25**(2): 159—166]
- [6] Neilan B A, Jacobs D, Goodman A E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphism within the phycocyanin locus[J]. *Appl. Environ. microbiol.* 1995, **61**: 3875—3883
- [7] Porter R D. DNA transformation[J]. *Methods Enzymol.* 1988, **167**: 703—712
- [8] Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in Bacterial Systematics [M]. New York: John Wiley and Sons. 1991, 115—175
- [9] Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, *et al.* PCR Protocols. A guide to methods and application [C]. San Diego: Academic Press, 1990, 3—13
- [10] Henegariu O, Heerema M A, Dlouhy S R, *et al.* Multiplex PCR: Critical parameters and step by step protocol[J]. *Bio. Techniques.* 1997, **23**(3): 504—511
- [11] Pan H, Song L R, Liu Y D, *et al.* Detection of hepatotoxic microcystis strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples[J]. *Arch Microbiol.* 2002, **178**: 421—427

WHOLE-CELL PCR TO IDENTIFY ANABAENA SPECIES AND STRAINS

HUANG Jia-Quan^{1, 2}, WANG Gao-Hong¹, LI Duan-Hai¹, LIU Yong-Ding¹ and YIN Li-Yan¹

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: The traditional way to identify algae is usually depend on the observation of the morphology. This way is time consuming and usually difficult to identify the algae during the early algal growth stage in which the character is not obvious and can not detect the subtle differences between species or strains; also, the morphology and the ability to produce toxicants of cyanobacteria may change under different natural or cultural conditions. In this paper, we use the molecular method to identify *Anabaena* species, the results showed that BSA are necessary for the PCR amplification and the optimal concentration is 1% (w/v) in the reaction buffer. DMSO increased or decreased the quantity of the amplification products selectively, but the effect is not significant. The self designed primers after comparison of other *Anabaena* PC sequences amplified the part of *pcb* and *pca* gene along with PG-IGS sequence when using both extracted DNA and pretreated whole cells as template, the banding pattern is not uniform but all produced the target bands, cloning and sequencing analyses indicated that PC in line with PC-IGS was amplified, even though the nucleotide between two *Anabaena* strains collected from two different regions in China show that only 2 sites in a fragment about 400 bp are different, but the PC-IGS sequences are quite different from others and thus can be applied to identify the different species or strains. The universal primers to amplify part of 16S rDNA and 23S rDNA along with their ITS sequence using the extracted DNA and pretreated whole cell showed that the banding pattern of amplification products are uniform when the whole cells were at the concentration of 10^5 /mL in the reaction buffer, the minimum amount of whole cell to amplify the target band is 20 cells in 50 μ L reaction buffer.

Key words: Molecular identification; *Anabaena*; PCR; Sequencing