

二种淡水微囊藻 rDNA16S-23S基因间隔区的序列测定与分析^{*}

陈月琴¹⁾ 何家苑²⁾ 庄丽¹⁾ 曾陇梅¹⁾ 屈良鹄¹⁾

¹⁾(中山大学生命科学学院, 化学化工学院, 广州 510275)

²⁾(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 本研究采用PCR及序列测定的方法, 对我国淡水铜绿微囊藻有毒株(M8641)和另一低毒的种类惠氏微囊藻(M574)rDNA 16S-23S基因间隔区进行了序列的测定和分析, 结果表明: rDNA 16S-23S基因间隔区可以作为一个精细且稳定的指标, 用于微囊藻的分类和鉴定。并从分子水平提出了铜绿微囊藻与惠氏微囊藻在种系发生上有较近缘的关系。本文首次对微囊藻属 *Microcystis* rDNA 基因间隔区全序列作了报道, 为微囊藻属的鉴定及系统学研究提供了分子基础。

关键词 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*), 惠氏微囊藻 (*Microcystis wesenbergii*), rDNA, 基因间隔区, 序列分析

微囊藻属 (*Microcystis*) 是全球淡水水体广泛分布的一种“水华”藻类, 并有不少种类或株系可产生毒素, 有毒株产生的毒素被称为微囊藻毒素 (Microcystin, MCYST)^[1,2], 为一种促肝癌剂^[2], 对鱼类等其它动物有毒害作用, 而且通过食物链的传递危害人类健康^[3]。近年来, 随着内陆水体富营养化的加剧, 有毒藻类水华分布范围及出现频率明显增加, 严重影响了人民生活 and 生态景观。有毒微囊藻的研究已引起人们的高度注意。

有毒与无毒微囊藻有时形态非常相似, 而且, 藻体的形态特征常常随着生长环境及生长阶段的不同而改变^[4], 实验室培养种与野生种存在差异, 常规的分类鉴定很难区分。但它们在形成“水华”或不形成“水华”所造成的危害性差异很大。目前, 以基因序列为基础的分子鉴定和分类已在蓝细菌中得到广泛的应用, 其中最常用的分子指标是大分子 rRNA (如 16S rRNA) 及其基因, 微囊藻属不同种及不同株系的 16S rRNA 及其基因的全序列已陆续被测出^[5]。分析结果表明, 16S rRNA 及其基因用于种以上水平鉴别是一个很好的指标, 但用于种间或种内不同株系, 其结构则过于保守而不能使用。相对来说, 大分子 rRNA 即 16S rRNA 和 23S rRNA 基因之间的间隔序列 (Intergenic Spacer Region) 是一个特殊的区域, 具有较高的突变速率, 可用于亲缘关系较密切的某些藻类和细菌的分类鉴

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 39770058 和 39770115)
1998-09-10修回。

定^[6]。

本研究以 16S rRNA 和 23S rRNA 基因之间的间隔序列为分子标记,对我国淡水铜绿微囊藻有毒株(M8641)和另一低毒的种类惠氏微囊藻(M574)rDNA 16S-23S基因间隔区进行研究,从分子水平揭示该藻有毒和无毒株遗传差异及二者之间的关系,为进一步开展专一性核酸分子探针的研制提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的藻种为铜绿微囊藻有毒株(*Microcystis aeruginosa* M8641),采自中国武汉东湖,和惠氏微囊藻无毒株(低毒性,*Microcystis wesenbergii* M574),采自中国科学院水生生物研究所关桥实验站鱼池。二种微囊藻由中国科学院水生生物研究所藻类研究室藻种库提供。藻种保存于水生生物研究所藻种室。

1.2 DNA 的制备及 rDNA ITS 区的 PCR 扩增反应

DNA 的制备 取 50—100 μ l 培养液于 0.5mL 的离心管中,8000r/min 离心 2min,弃上清,加入 25 μ l 提取缓冲液(1%SDS, 10mmol/L EDTA, pH8.0, 10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 10mmol/L NaCl);采用本实验室研制的 DPS 纯化系统直接从提取缓冲液中获取微量 DNA 用于 PCR 扩增,PCR 扩增反应条件等见文[7]。PCR 引物为: M16: 5' GGGGATGCCTAAGGCAGGGCT3', M23: 5' CCACGTCCTTCTTCGCCTCTG 3',分别对应于 16S rDNA 3'末端和 23S rDNA 5'末端区域(图 1)。M16 为微囊藻属的专一性引物,而 M23 为蓝绿藻的通用引物,于中国科学院上海生物化学研究所合成;扩增完成后,PCR 产物用乙醇沉淀或 DPS 系统纯化,沉淀晾干后加适量 TE 溶解,取 2 μ l 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查,其余 -20℃ 保存备用。

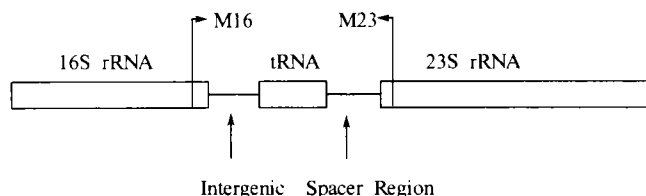


图1 引物M16和M23扩增rDNA 16S-23S基因间隔区示意图

Fig.1 Diagram of PCR amplification of rDNA Intergenic Spacer Region of *Microcystis* by using M16 and M23

1.3 rDNA ITS 区 PCR 扩增产物的克隆及序列测定

PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统纯化后,与质粒载体连接,质粒载体为 pTZ19,按《分子克隆》^[8]一书操作。采用美国 Life Science Sequenase Version 2.0(USB)测序试剂盒直接测定重组质粒的 DNA 序列。

1.4 序列比较分析

按照最大同源性的原则将所测得序列进行排列见(图 2)序列。序列中引入适当数量的空位(gap),以便达到最大可能的同源性。采用计算机分析软件包 PC gene 6.0 进行序

列的比较分析。

2 结果与讨论

2.1 rDNA 16S-23S基因间隔区的 PCR 扩增

本研究采用 DPS 纯化系统从高浓度 SDS 的提取液中获得微量 DNA, 所获得的微量 DNA 直接从用于专一性引物的 PCR 扩增反应, 具有较好的重复性。为了避免常见细菌对 PCR 造成的污染, 作者合成了专一性的 PCR 扩增引物 M16 和 M23, M16 和 M23 分别为微囊藻属 16S rDNA 3' 末端和蓝绿藻类 23S rDNA 5' 末端保守序列, 可用来专一性地扩增微囊藻属不同种或不同株系的 rDNA 16S-23S 基因间隔区 (图 1)。铜绿微囊藻和惠氏微囊藻的 PCR 扩增结果见图 2: 二种微囊藻的 PCR 产物长度基本一致, 约 500bp (包括 16S 3' 末端和 23S 5' 末端 rDNA 部分序列)。

2.2 PCR 产物的克隆及序列测定结果

PCR 产物以 DPS 系统纯化, 并连接到 pTZ19 的 *Sma*I 位点上, 通过 PCR 和限制性内切酶等方法检查转化子, 采用末端终止法测定重组质粒的 DNA 序列, 铜绿微囊藻和惠氏微囊藻 16S-23S 基因间隔区的长度分别为 360bp 和 364bp (不包括 16S 3' 末端和 23S 5' 末端 rDNA 部分序列), 各包含 1 个异亮氨酸 tRNA 基因, 约 160bp (图 3)。

用计算机对上述序列进行比较分析, 分析结果表明: 铜绿微囊藻和惠氏微囊藻之间, 序列间核苷酸有 5% 的差异性, 其中, 间隔区 1 (16S rDNA 与 tRNA 基因之间) 核苷酸差异为 4%, 而间隔区 2 (tRNA 基因与 23S rDNA 之间) 核苷酸差异为 6.4%。较明显的是, 铜绿微囊藻在间隔区 2 有一段 6 个核苷酸缺失的片段, 很可能可以作为我国铜绿微囊藻有毒株系的主要特征之一。测定不同的克隆子得到相同的结果。通过 Internet 与国际分子生物学数据库联网, 将所获得序列与 Genbank 中的数据进行比较, 发现微囊藻属 16S-23S 基因间隔区与 *Anacystis nidulans* 有较大的差异, 后者长度为 574bp, 包含异亮氨酸和丙氨酸 2 个 tRNA 基因, 表明蓝细菌不同属种间基因间隔区的差异, 同时还说明了蓝细菌不同属种其 rRNA 操纵子的不同。

2.3 微囊藻 rDNA 16S-23S 基因间隔区的特点及在种间与种下水平分类鉴定中的应用

采用分子生物学手段对全球水域“赤潮”或“水华”藻类进行快速准确的鉴定是目前环境微生物学研究的热点之一, 人们期望通过对这些种类遗传特征的了解, 建立起微藻的快速分子鉴定方法, Neilan 等人^[5]以 16S rRNA 基因为分子指标来进行微囊藻属有毒无毒株的分类和鉴定, 但由于 16S rRNA 基因其结构过于保守, 同种不同株系间序列核苷酸相似性高达 99.6%, 而种间相似性也可达 99% 以上, 如铜绿微囊藻与惠氏微囊藻, 二者仅有 0.7% 的差异, 因而不能分辨。作者在有毒微藻种间种内识别获得突破。从本研究对铜绿微囊藻与惠氏微囊藻 rDNA 16S-23S 基因间隔区的分析来看, 铜绿微囊藻 (株系 8641) 与惠氏微囊藻 (株系 574) 序列间核苷酸差异为 5.2%, 尤其在间隔区 2, 可达 6.4%。对铜绿微囊藻不同株系 (8641 与 7820) rDNA 16S-23S 基因间隔区序列测定结果也表明, 该区域在

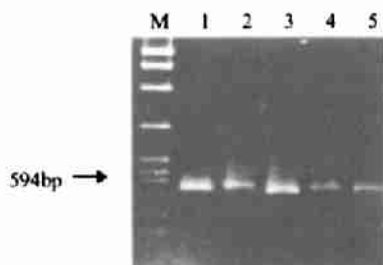


图 2 rDNA 16S-23S 基因间隔区 PCR 扩增结果

Fig.2 The result of PCR amplification
1, 2 铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa*;
3, 4, 5 惠氏微囊藻 *Microcystis wesenbergii*
M 2Kb 分子量标准

3'end of 16S rDNA

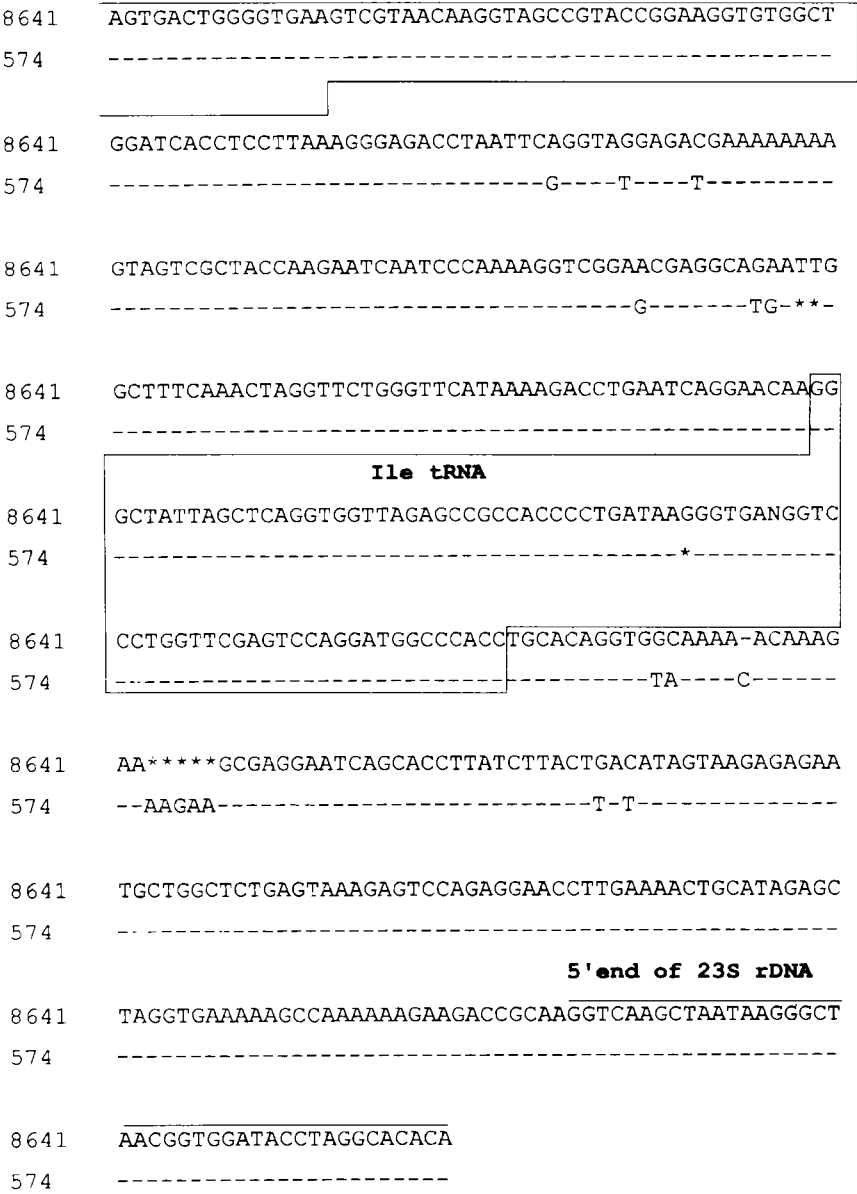


图3 铜绿微囊藻(8641)与惠氏微囊藻(574)rDNA 基因间隔区序列比较

Fig.3 Sequences alignments for the nucleotides of rDNA Intergenic Spacer Region of *Microcystis aeruginosa* (8641) and *Microcystis wesenbergii* (574)

排列中仅标明与顶部不同的核苷酸,相同的核苷酸以短线代表,*代表缺失的核苷酸。

Only the nucleotides differing from the first sequences are shown, identities are denoted by hyphens; deletions are denoted by "**"

同种不同株系也具有较高的突变速率(8641 与 7820 核苷酸差异为 4.1%,7820 序列未列

出),说明了 rDNA 基因间隔区可作为一个精细的分子指标用于微囊藻属种间与种内的分类鉴定。根据序列同源性比较结果(序列核苷酸相似性大小),可以看出,铜绿微囊藻与惠氏微囊藻,二者的核苷酸相似性值与铜绿微囊藻种内不同株系间核苷酸相似性值差异不大(前者为 5.2%,后者 4.1%)。根据核酸分子进化特点,即分类学上亲缘关系较密切的类群,其核苷酸相似性值较大,因而可以推断二者在种系发生上有较近缘的关系,关于这一点,还需对该属其它种或株系进行系统的研究,才能得出更加确切的结论。随着研究的深入,rDNA 基因间隔区将在微囊藻属或蓝藻其它种属的分类和鉴定,以及系统学研究中发挥重要作用。

3 结论

rDNA 16s-23s基因间隔区,为突变速率较高的区域,用于亲缘关系十分密切的类群的分类和鉴定是很好的分子指标。本文首次对微囊藻属 *Microcystis* rDNA 基因间隔区全序列作了报道,为进一步开展微囊藻属的分子系统学研究及专一性的核酸分子探针的研制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 何家菴,何振荣,俞家禄,等. 东湖铜绿微囊藻毒素的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 1988, 19(5):424—430
- [2] Carmichael W W. A status report on planktonic Cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, VS. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 1992
- [3] Infante A, Riechl W. The effect of cyanophyta upon zooplankton in a eutrophic tropical Lake. *Hydrobiology*, 1984, 113(29):293—298
- [4] Komarek J, Anagnostidis K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 1989, 82.3 *Algol. Stud.* 56:247—345
- [5] Neilan B A, Jacobs D, Del Dot I, Blackall L L, Hawkins P R, Cox P T, Goodman A E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int J Syst Bacteriol.* 1997, 47(3):693—697
- [6] Jensen M A, Hubner R J. Use of homoduplex ribosomal DNA spacer amplification products and heteroduplex cross-hybridization products in the identification of *Salmonella* serovars. *Appl Environ Microbiol.* 1996, 62(8):2741—2746
- [7] 陈月琴, 屈良鹄等. 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), 1997, 36(4): 66—69
- [8] J 萨姆布鲁克 EF 弗里奇 T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版). 北京:科学出版社, 1996

SEQUENCE ANALYSIS OF rDNA 16S-23S INTERGENIC SPACER FROM *MICROCYSTIS AERUGINOSA* AND *MICROCYSTIS* *WESENBERGII* IN DONGHU LAKE, CHINA

Chen Yueqin¹⁾ He Jiawan²⁾ Zhuang Li¹⁾ Zeng Longmei¹⁾ and Qu Lianghu¹⁾

¹⁾ (Zhongshan University, Guangzhou 510275)

²⁾ (Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract The rDNA 16S-23S intergenic spacer regions from *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii* in Donghu Lake of China were sequenced and analyzed to illustrate the evolutionary affiliations between toxic and nontoxic strains in genus. The rDNA spacer sequences ranged from 360bp to 364bp exclusive of 16S and 23S rDNA coding regions, containing a Ile tRNA gene. Sequence comparisons by computer programs showed that distance values between two species were about 0.05, whereas distance values between two toxic strains of *Microcystis aeruginosa* (8641 and 7820) were 0.04, which indicated *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii* has a quite close relationship. In addition, Sequence comparisons showed the variations in the position 282—295bp were high between two species. High diversity of this region may facilitate the design of DNA probes specific for toxic *Microcystis aeruginosa* in Donghu Lake of China. It is the first sequence report of rDNA 16S-23S intergenic spacer regions for *Microcystis*, and the sequences will serve as the basis for the indepth studies on the phylogeny of *Microcystis*.

Key words *Microcystis aeruginosa*; *Microcystis wesenbergii*; rDNA; Intergenic spacer regions; Sequence analysis