

不同生境下的钝顶螺旋藻 RAPD 分析

邵丽华¹ 张晓嵘¹ 于涛¹ 栗淑媛¹ 乔辰^{2*}

(1. 内蒙古师范大学生命科学与技术学院 呼和浩特 010022)

(2. 内蒙古农业大学农学院 呼和浩特 010019)

摘要: 本文对不同生境下的钝顶螺旋藻 *Spirulina (Arthrospira) platensis* 进行了 RAPD 分析。结果表明, 鄂尔多斯高原碱湖和 Chad 湖的钝顶螺旋藻基因组 DNA 扩增多态性片段同源率为 48.23%。2 个样品在分子遗传水平上存在着较大的差异, 这是由于各自生态环境明显不同和长期地理隔离造成的。

关键词: 钝顶螺旋藻, RAPD 分析, 同源性, 生境, 地理隔离

The RAPD Study on the *Spirulina platensis* in Different Habitats

TAI Li-Hua¹ ZHANG Xiao-Rong¹ YU Tao¹ LI Shu-Yuan¹ QIAO Chen^{2*}

(1. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022)

(2. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019)

Abstract: The samples of *Spirulina (Arthrospira) platensis* from different habitats were analyzed by the RAPD. The result shows that there are obvious differences in the molecular level between the *Spirulina (Arthrospira) platensis* from alkaline lakes in Erdos Plateau and the one from Chad Lake, and the homology of DNA in the amplified polymorphism of the *Spirulina (Arthrospira) platensis* only reaches 48.23%. The different habitats and geographical isolation are the primary reasons for the above-mentioned result.

Keywords: *Spirulina platensis*, RAPD analysis, Homology, Habitat, Geographical isolation

螺旋藻分子遗传方面的研究起步较晚, 近几年才有了一些研究, 汪志平等对钝顶螺旋藻形态不同的藻丝进行 RAPD 分析^[1], 李晋楠等利用 RAPD 技术对钝顶螺旋藻 7 株单克隆藻丝的基因组进行了研究, 并指出该方法可作为螺旋藻分类学的重要参考依据^[2]。1996 年, 在鄂尔多斯高原碱湖发现了我国的钝顶螺旋藻, 该藻的分布、形态解剖结构和生理

生化等方面已进行了一些研究^[3~6], 但对其遗传多态性的分析以及与 Chad 湖钝顶螺旋藻的遗传分化比较还未见报道。为此, 本文采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 的方法对鄂尔多斯高原碱湖和 Chad 湖的钝顶螺旋藻进行了比较研究, 为不同生境下钝顶螺旋藻种内不同生态种群的分子遗传变异以及这些变异与其生境之间的关系等提供基础的理论依据。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30460104); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (No. NJ 04036); 内蒙古自然科学基金资助项目 (No. 200607010932)

* 通讯作者: Tel: 0471-6946216; E-mail: qiao-chen@sohu.com

收稿日期: 2007-07-16; 接受日期: 2007-08-30

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料: 钝顶螺旋藻 *Spirulina (Arthrospira) platensis*, 一个样品来自鄂尔多斯高原巴彦淖尔碱湖, 记为S₁; 另一个来自非洲Chad湖, 记为S₂。

1.1.2 主要试剂: 蛋白酶K为Amresco公司产品, 溶菌酶、RNA 酶、Taq DNA 聚合酶、PCR 所用试剂等均为北京天为时代科技有限公司产品, 随机引物为上海生物工程技术服务有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 藻的培养: 用Zarrouk培养液^[7]在室温自然光下间歇通空气培养。

1.2.2 藻的处理: 取对数生长期藻用筛绢过滤收集藻丝体, 用双蒸水洗涤 3 遍, 灭菌的吸水纸吸去多余的水, 在 -20℃ 保存备用。

1.2.3 DNA 的提取: 准确称取 0.03 g 冻藻泥, 加 500 μL TE 缓冲液和溶菌酶(0.025 mg/mL), 37℃ 恒温水浴处理 1 h。加蛋白酶K(0.01 mg/mL)和 10% SDS, 在 60℃ 恒温水浴保温 1 h; 用等体积 Tris 饱和酚抽提 5 min, 在 4℃, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液再用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, V/V/V)抽提 1 次, 离心, 上清液加 2 倍体积无水

乙醇及 1/10 倍体积 3 mol/L NaAc 沉淀 DNA, 70% 乙醇洗涤, 加 TE 缓冲液及 RNase(0.02 mg/mL)37℃ 恒温水浴保温 1 h, 4℃ 保存。

1.2.4 DNA 的检测: 采用琼脂糖凝胶电泳分离 DNA, 凝胶浓度 0.8%, 电压约 5 V/cm, 时间 1.5 h。用 Lab Tech UV2000 紫外-可见分光光度计, 在波长 260 nm 和 280 nm 处测定 OD 值。

1.2.5 PCR反应: 采用 24 条随机引物在Biometra-Tgradient PCR仪中进行扩增。具体引物见表 1, 引物的选择基本上参考了李晋楠的文献^[2]。

反应体系 2 μL 的 10×Taq Reaction Buffer, 2 μL dNTP(2.5 mmol/L), 1 U Taq 酶, 1 μL 随机引物, 2 μL 模板 DNA, 加灭菌双蒸水, 使反应体积达到 20 μL。

反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 0.5 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 循环 35 次; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温 30 min^[2]。每个PCR反应重复 3 次。

1.2.6 电泳分析: 将扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳分离, 电压 5 V/cm, 时间约 2.5 h, 在 Tanon GIS-2010 紫外透射成像系统中观察、照相并进行条带同源性分析。

表 1 扩增产物同源条带及特异条带
Table 1 Homologous bands and specific bands of amplified products

引物 Primer	核苷酸序列 Nucleotide sequence (5'→3')	同源条带数 Amount of homologous bands	S ₁ 特异条带数 Specific bands of S ₁	S ₂ 特异条带数 Specific bands of S ₂	引物 Primer	核苷酸序列 Nucleotide sequence (5'→3')	同源条带数 Amount of homologous bands	S ₁ 特异条带数 Specific bands of S ₁	S ₂ 特异条带数 Specific bands of S ₂
S22	TGCCGAGCTG	3	2	3	S70	TGTCTGGGTG	2	5	3
S23	AGTCAGCCAC	3	3	5	S73	AAGCCTCGTC	3	2	5
S24	AATCGGGCTG	3	4	7	S78	TGAGTGGGTG	1	7	3
S31	CAATCGCCGT	4	1	2	S80	ACTTCGCCAC	4	5	5
S33	CAGCACCCAC	4	6	3	S82	GGCACTGAGG	0	2	1
S35	TTCCGAACCC	3	7	3	S88	TCACGTCCAC	2	4	5
S38	AGGTGACCGT	4	1	3	S90	AGGGCCGTCT	4	4	2
S40	GTTGCGATCC	5	4	1	S91	TGCCCCTCGT	6	4	2
S53	GGGGTGACGA	0	5	5	S99	GTCAGGGCAA	1	5	2
S59	CTGGGGACGA	5	1	2	S112	ACGCGCATGT	4	7	0
S66	GAACGGA CTC	2	2	3	S118	GAATCGGCCA	6	3	3
S69	CTCACC GTCC	3	1	2	S119	CTGACCAGCC	3	3	3
2 个样品扩增产物总条带数		Total bands of amplified products in 2 samples					75	88	73
扩增产物总条带数		Total bands of amplified products					311		

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的鉴定

钝顶螺旋藻 S₁ 和 S₂ 的基因组 DNA 条带清晰,

均为 1 条亮带, 说明 DNA 样品很少降解。与 1 kb Plus DNA Ladder 分子量参照物进行对比, 表明获得了大分子量的基因组 DNA, 其分子量>10 kb(图 1)。

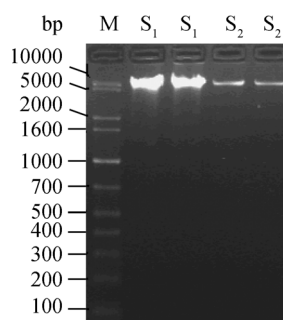


图1 钝顶螺旋藻基因组DNA电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of *Spirulina (Arthrospira) platensis*

M: Marker(1 kb plus ladder)

S_1 和 S_2 的DNA OD_{260}/OD_{280} 值分别为 1.9711 和 1.9844, 说明所提取的DNA样品具有较高的纯度。由 OD_{260} 值算出 S_1 和 S_2 的DNA浓度分别为 280 $\mu\text{g/mL}$ 和 191 $\mu\text{g/mL}$, 这与图1中观察到的 S_1 条带比 S_2 的宽相符。

2.2 RAPD 扩增结果

在钝顶螺旋藻 S_1 和 S_2 的DNA中, 24 条有效随机引物扩增出比较清晰的谱带 311 条, 其中 S_1 扩增出的总数为 163 条, 平均每条引物扩增出 6.70 条; S_2 扩增出的总数为 148 条, 平均每条引物扩增出 6.17 条;不同的引物扩增出的条带数差别较大, 少至 1 条, 多至 11 条, 扩增片段主要分布于 400 bp~5000 bp 之间(图2)。

2.3 同源性分析

对 S_1 和 S_2 的RAPD扩增产物进行分析, 条带误差定为 4, 将迁移率一致的认为是同源条带, 迁移率不同的为特异条带, 得到的数据见表1。

从扩增出的同源带来看, 最高的可达到 6 条(S_{91} 、 S_{118}), 最低的为 0 条(S_{53} 、 S_{82})。不同引物所得到条带的同源性最高达到了 76.92%(S_{59}), 最低为 0%(S_{82})。2 个样品的同源总条带数为 150(75×2), 占扩增出总条带数的 48.23%。不同引物扩增出的特异条带数有较大的差异, 最高的可达到 7 条, S_1 用引物 S_{35} 、 S_{78} 、 S_{112} , S_2 用引物 S_{24} 均扩增出 7 条特异带, 最低的为 0 条, S_2 用引物 S_{24} 未扩增出特异条带; S_1 和 S_2 特异条带数分别为 88 和 73, 前者比后者多 20.5%, 显示出较高的多态性。说明, S_1 的变异大于 S_2 。

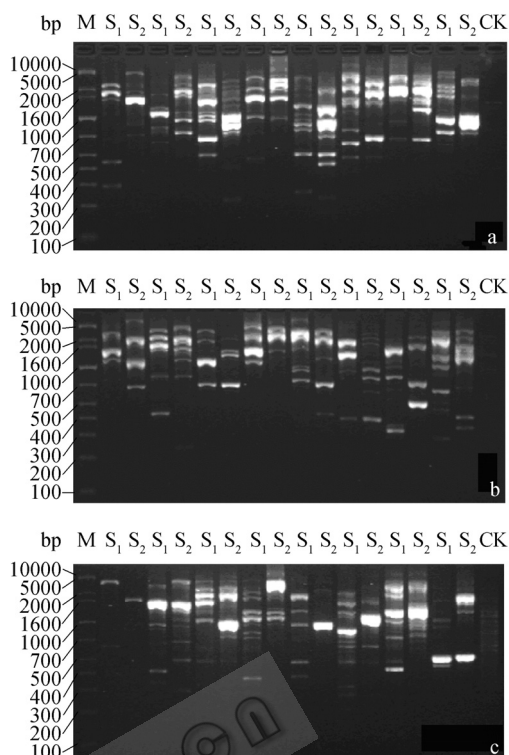


图2 S_1 和 S_2 的PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products in the S_1 and S_2

a: 8 种随机引物 (S_{22} 、 S_{23} 、 S_{24} 、 S_{31} 、 S_{33} 、 S_{35} 、 S_{38} 、 S_{40}) RAPD 电泳图谱; b: 8 种随机引物 (S_{53} 、 S_{59} 、 S_{66} 、 S_{69} 、 S_{70} 、 S_{73} 、 S_{78} 、 S_{80}) RAPD 电泳图谱; c: 8 种随机引物 (S_{82} 、 S_{88} 、 S_{90} 、 S_{91} 、 S_{99} 、 S_{112} 、 S_{118} 、 S_{119}) RAPD 电泳图谱; M: Marker(1 kb plus ladder)

a: RAPD patterns from 8 random primers (S_{22} 、 S_{23} 、 S_{24} 、 S_{31} 、 S_{33} 、 S_{35} 、 S_{38} 、 S_{40}); b: RAPD patterns from 8 random primers (S_{53} 、 S_{59} 、 S_{66} 、 S_{69} 、 S_{70} 、 S_{73} 、 S_{78} 、 S_{80}); c: RAPD patterns from 8 random primers (S_{82} 、 S_{88} 、 S_{90} 、 S_{91} 、 S_{99} 、 S_{112} 、 S_{118} 、 S_{119}); M: Marker(1 kb plus ladder)

3 讨论

24 条有效随机引物对鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻 S_1 和Chad湖的钝顶螺旋藻 S_2 基因组DNA的RAPD扩增产物分析, 它们在分子水平上存在着差别。虽然是同一个物种, 但它们相似系数仅为 0.482, 这与杨茜等对 2 个样品 5 种酶的同工酶和可溶性蛋白谱带数目分析所得出的相似系数为 0.476 极为接近^[5]。

钝顶螺旋藻的 2 个样品在 RAPD 分析上为什么会产生如此大的差异? 推测与其各自的生境不同以及地理隔离有关。鄂尔多斯高原的钝顶螺旋藻分布于毛乌素沙地的巴彦淖尔($39^{\circ}01'N$, $109^{\circ}17'E$)及其邻近碱湖, 这里是典型的温带大陆性干旱、半干

旱气候区, 海拔 1200 m ~ 1600 m; 冬季寒冷漫长, 夏季炎热短暂, 日温差和年温差都较大, 极端最低气温 -35.7°C , 极端最高气温 40.2°C , 年平均温度 $4.7^{\circ}\text{C} \sim 6.5^{\circ}\text{C}$; 干旱少雨, 年降水量 271.4 mm ~ 401.6 mm, 年蒸发量 2000 mm ~ 3000 mm, 蒸发量是降水量的 5.0 ~ 11.1 倍; 光照充足, 风大沙多。碱湖面积小, 水深 0.1 m ~ 0.5 m, 甚至干枯, 湖水 pH 值 9.3 ~ 10.5; 主要靠大气降水补给, 故受气候影响湖水的水量、pH 值、水温及湖水化学成分等受气候影响变化都很大, 水环境极不稳定^[3]。而 Chad 湖 (13.20°N , 14.00°E) 为非洲第 4 大湖, 湖面海拔 243 m。其地处热带, 为热带草原气候区。终年高温, 冬天平均气温 $20 \sim 23^{\circ}\text{C}$, 夏天 $30 \sim 42^{\circ}\text{C}$, 年平均为 27°C 以上, 早晚温差大。夏季潮湿多雨, 冬季干燥少雨; 6 ~ 10 月为雨季, 气候湿热; 11 月至翌年 5 月为旱季, 气候炎热。年平均降水量 200 mm ~ 300 mm; 年平均日照时数 3000 h 以上。湖面积为 25900 km^2 (1972 年) ~ 2000 km^2 (2002 年), 最大水深 4 m ~ 11 m, 水源主要来自 Chari 河^[8,9]。与鄂尔多斯高原碱湖相比, Chad 湖的水环境相对稳定。

本文研究在不同生境下的钝顶螺旋藻, 它们各自所在的地理位置、气候特征、湖面积、水深等方面存在很大差异。在进化的历史长河中, 为了生存钝顶螺旋藻必然要不断地进化。鄂尔多斯高原碱湖与 Chad 湖相比较, 前者的环境不及后者稳定, 钝顶螺旋藻 S_1 的存活要靠机会, 且变异必然要比 S_2 的大。另外, 它们长期的地理隔离, 二者之间不可能有遗传物质的交流, 促使两个种群在遗传上发生了一定的分化, DNA 碱基有了较大的差异。正因为如此, 它们虽为同一物种, 但二者间的相似系数较小, 同

源性较低。

致 谢: Chad 湖的钝顶螺旋藻由曾昭琪教授惠赠, 特此致谢!

参 考 文 献

- [1] Wang ZP, Zhao YJ. Morphological reversion of *Spirulina* (*Arthrospira*) *Platensis* (Cyanophyta): from linear to helical. *Phycological*, 2005, **41**: 622-628.
- [2] 李晋楠, 汪志平. RAPD 分子技术用于螺旋藻(*Spirulina*) 分类的研究. 海洋与湖泊, 2002, **33**(2): 203-208.
- [3] 乔 辰, 李博生, 曾昭琪. 鄂尔多斯沙区碱湖与螺旋藻资源. 干旱区资源与环境, 2001, **15**(4): 86-91.
- [4] Tian XY, Qiao C, Gao LY. The microstructure and ultra-structure of *Arthrospira platensis* (Hormogonophyceae, Cyanophyta) in alkaline lakes of Erdos Plateau, China. *Arch Hydrobiol Suppl 164/Algol Stud*, 2006, **121**: 75-84.
- [5] Yang Q, Li SY, Hu RP, et al. Isoenzymes and soluble protein in *Arthrospira* from alkaline lakes in Erdos Plateau, China and in exotic species. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2006, **24**(2): 134-141.
- [6] 扈瑞平, 张三润, 栗淑媛. 低温下两个品系的钝顶螺旋藻质膜蛋白的变化. 科学技术与工程, 2007, **7**(8): 1305-1308.
- [7] Zarrouk C. Contribution a l' étude d'une cyanophycée. Influence de diverses facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch. et Gardner) Geitler. PhD Thesis, France: University of Paris, 1966.
- [8] 陈 顺. 资金短缺意见相左, 乍得湖拯救计划被迫推迟. 新华网, 2002-01-17.
- [9] 刘 伉, 毛汉英, 王守春. 世界自然地理手册. 北京: 知识出版社, 1981, p.27.

新辟栏目介绍

显 微 世 界

“显微世界”栏目将刊出一些精美清晰的显微照片, 带您走进显微镜下的微生物世界, 希望在阅读期刊相关科学新进展的同时, 给您带来一种愉悦的科学艺术视觉享受。同时欢迎广大作者、读者朋友积极为我们推荐或提供高质量、高清晰的显微照片(提供者保证该图片无任何知识产权问题)。