

滇池铜绿微囊藻(*M. aeruginosa* Kütz)的 分离培养与总 DNA 提取的改进^{*}

陆 源 文建凡^{**} 吕天雯

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明, 650223)

提 要 利用稀释法结合平板分离培养法将采自滇池水华中的铜绿微囊藻进行了成功的分离纯化. 对比纯化培养前后, 发现纯化后该藻的生长速度明显加快, 密度大为提高, 约为纯化前的 5 倍. 用乙醇乙醚混合液对该藻作预处理后, 破坏了其胶质被, 再经常规方法提取总 DNA, 其得率提高 3-4 倍

关键词 铜绿微囊藻 分离培养 总 DNA 提取

分类号 Q949.22

微囊藻是一类全球性分布的蓝藻类. 它们是在富营养化湖泊中形成“水华”进而对生态环境造成严重影响的主要藻类. 据报道国内外许多湖泊均因该藻的大量繁殖形成水华而造成大面积的水体生态破坏. 滇池作为国家重点保护和治理的著名湖泊, 其外海水域每年爆发的“水华”现象, 就是以微囊藻为优势种的藻类大量繁殖所致, 其中尤以铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* Kütz)在数量和发生频率上占绝对优势^[1]. 随着对湖泊生态环境治理保护工作的深入, 对微囊藻进行分离、纯化培养进而进行深入的生理、生化及分子生物学研究工作已在不断开展. Makoto Shirai 等曾成功地对微囊藻进行了分离纯培养^[2]. 何家苑等、李仁辉等分离、鉴定了东湖铜绿微囊藻的生长特性及毒素^[3,4]. 陈宇炜等对太湖中的水华微囊藻进行了分离纯培养并研究了其生长特征^[5]. 滇池中的微囊藻吴为梁进行过一些调查, 并确定了滇池外海中引起水华的三种主要微囊藻^[1]. 但未见有对滇池微囊藻进行分离纯培养的报道. 另外, 微囊藻一般都是形成由胶被裹着的多细胞群体, 当用常规方法裂解其细胞提取 DNA 进行分子生物学研究时, 由于胶被的存在而阻碍了细胞的裂解, DNA 得率很低, 影响研究的深入. 本研究一方面对滇池外海水华中的最优势种铜绿微囊藻进行了分离、纯化培养. 并通过改进提取方法对其总 DNA 进行了成功的提取, 以满足下一步对其进行分子生物学的需要.

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 采样: 1998 年 3 月从昆明海埂(属滇池外海)西侧, 水华发生严重的湖面采得藻种样品. 经显微镜初步观察该样品为多种原生动物和藻类的混杂生物群体, 其中一种球形的和另一种卵形的藻为优势种类.

* 云南省中青年学术和技术带头人培养经费和云南省应用基础研究基金联合资助.

收稿日期: 2000-12-18; 收到修改稿日期: 2001-05-04. 陆 源, 男, 1950 年生, 高级工程师.

** 文建凡, 通讯作者, 博士生导师.

(2)微囊藻培养基:采用远藤培养基^[5]: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.038g, KNO_3 0.01g, 尿素 0.02g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.006g, NaHCO_3 0.046g, P1 微量元素溶液 1.0mL, 纯水 1000mL (P1 微量元素溶液: EDTA 3.0g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.08g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.12g, ZnCl_2 0.015g, $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.003g, CuSO_4 0.0012g, H_3BO_3 0.6g, Na_2MoO_4 0.05g, 纯水 1000mL)。

(3)琼脂培养基:远藤培养基:纯水:琼脂=50:50:1。

1.2 方法

(1)分离纯化:根据中野治房^[6]的方法加以改进,用等比级稀释藻种样品。取 5 支灭菌试管,第 1 支加 10mL 微囊藻培养基,其余 4 支各加 5mL。将所采藻种样品滴 2~3 滴入第 1 支试管,混匀后从第 1 支试管取 5mL 稀释液放入第 2 支试管,再从第 2 支试管取 5mL 稀释液放入第 3 支试管,依次用同样方法稀释到第 5 管。将灭菌处理好的热琼脂培养基在无菌操作台里注入 5 个灭菌培养皿中,约 0.5cm 厚。待冷却到室温时,将已稀释好的 5 支试管中的藻液一一对应滴入 5 个培养皿中,轻轻晃动让稀释藻液均匀混入琼脂培养基,标记、加盖,将培养皿放在阳光能照到的地方,室温(20℃~25℃)下培养。

(2)纯培养及生长密度的测定:10d 培养后,经观察选择有单一藻群落出现的培养皿,用灭菌针棒在解剖镜下小心挑下该藻斑,放在载玻片上,经显微镜仔细检查确认除该球形藻外无其它藻类后,将该载玻片上的藻群落在无菌操作台内接种到液体培养基中为纯净组。对照组则直接接种所采混合藻种样品,两组的培养液相同,数量均为 20mL。经 5d 培养,并逐日滴片观察,根据其特征以确定所纯化的是否为铜绿微囊藻。并将纯培养物再次接种于新的培养基中培养直到仍然得到单纯的藻群体。分别将纯净组和对照组培养瓶内的藻细胞全部洗刷下来,振荡成均匀的混悬液,定容,各取一滴在血球计数板上计数。此外还用日本岛津 UV-120 紫外可见分光光度计在 663nm 分别测定二者的光吸收 A 。

(3)总 DNA 提取:纯化培养的铜绿微囊藻的总 DNA 提取前分为两组:一组经预处理,另一组为对照组。预处理方法为:由于培养时许多藻附壁生长,可将培养瓶中的培养基倾倒干净后加入脱脂液(无水乙醇:乙醚=1:1)20mL,脱脂 10min,再将培养瓶中的脱脂液倾倒干净,对照组也倾去培养基两组同时进行如下 DNA 提取:a)收集加入 PBS 缓冲液 10mL,用棉杆将培养瓶壁上的藻细胞洗刷下来转入离心管,2000 转/分离心 10min,弃上清液,加少许 PBS 缓冲液,振荡,将藻细胞液转入 1.5mL eppendorf 管,再用 PBS 缓冲液(PBS 缓冲液^[7]:8g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g KH_2PO_4 , 纯水 1000mL)洗涤藻细胞 2 次。b)消化:洗涤过的藻细胞中加入 STE 缓冲液^[7]10mmol/L Tris·Cl, pH 7.5, 10mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA)450 μL , 10% SDS 溶液 50 μL , 蛋白酶 K 溶液(10mg/mL)20 μL , 在 56℃ 消化过夜至澄清。c)提取:用 Gross-Bellard 的方法^[7]提取总 DNA,提取物待干燥后加入 TE 缓冲液^[7]10mmol/L Tris·Cl, pH 7.4, 1mmol/L EDTA, pH 8.0)50 μL 备用。d)检测:用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提总 DNA,美国 SYNGENE 公司的全自动凝胶图像成像仪记录。

2 结果与讨论

2.1 分离、纯化培养

用等比级数稀释藻种样品液后再接入 5 个琼脂培养基纯化培养 10d 后,经观察有的皿中(接种时约稀释了 132 倍)有球形藻的纯净群落出现。经用灭菌针棒在解剖镜下挑下该藻斑,进

一步经显微镜确认无其它藻类后经无菌操作台内接种到培养瓶培养. 观察其特征为:细胞呈球形,直径约 3-7 μm ,蓝绿色,大多数具伪空胞. 其群体形成特征为:初时所形成的群体为实心球形,后长成为网络状的中空囊状体,经不断扩展,囊体破裂形成大小不等的网状胶群体,群体胶被透明无色. 根据以上特征,确认已获得铜绿微囊藻的纯藻株,并成功地进行了纯培养. 将培养 5d 后的纯化组和未纯化对照组的生长密度进行对比测定(表 1). 结果表明铜绿微囊藻纯化培养以后,生长速度明显加快,从计数可见纯净组的数量约为对照组的 5 倍,光吸收值 A 为对照组的 2 倍. 该现象说明藻类在混杂生长环境中,有相互抑制的作用,所以在相同的培养基和培养条件下生长速度较慢. 纯化培养后生长速度明显加快,也提示了某些藻类(例如铜绿微囊藻)在生长环境适宜时成为优势种群后,在相对纯化的环境中易于疯长形成水华,呈现环境污染的景观.

2.2 DNA 的提取

纯培养的铜绿微囊藻经前述的预处理后,再用 Gross-Bellard 的方法提取总 DNA,经琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 1.

从对照组与预处理组 DNA 谱带显色浓度的比较可见,预处理组 T1 1 μL 样品的 DNA 含量相当于对照组 3-4 μL 的含量. 也就是说同样的样品量经脱脂预处理的铜绿微囊藻的总 DNA 浓度比对照组提高 3-4 倍. 光镜下观察到经预处理的样品,在经蛋白酶 K 消化后,其藻细胞内容物释放完全,大部分成为空壳,完好细胞较少(图 2 左);而对照组消化后仍可见较多的完好细胞(图 2 右).

原因可能是脱脂液处理后,破坏了铜绿微囊藻的胶质鞘. 因而蛋白酶 K 和去垢剂 SDS 能更好地直接作用于其细胞壁,造成缺口,使藻细胞内的 DNA 释放较完全,从而提高了总 DNA 的得率. 重复该实验得到了同样的结果. 这表明该预处理确能大为提高该藻总 DNA 的提取效率. 这对于进一步的生物化学和分子生物学研究具有很好的应用价值.

表 1 纯化的铜绿微囊藻及对照组的计数及光吸收值 A

Tab. 1 The algae count and absorbance at 663nm of the pure culture of *M. aeruginosa* and the control

组别($A_{663\text{nm}}$)	个(mL)	光吸收
对照组	1.453×10^7	0.136
纯净组	7.469×10^7	0.267

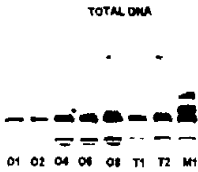


图 1 铜绿微囊藻总 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 1 *M. aeruginosa* total DNA electrophoreogram extracted by two methods

参 考 文 献

1 吴为梁. 滇池富营养化与藻类资源. 云南环境科学, 2000, 19(1): 35-37
2 Makoto Shirai, et al. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strain (Cyanobacteria). *App Enviro Microbiology*, 1989, 10: 2569-2571
3 何家尧, 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
4 李仁辉, 俞敏娟. 铜绿微囊藻的某些生长特性及毒性的研究. 水生生物学报, 1993, 17(1): 90-92
5 陈宇炜, 高锡云, 陈伟民等. 太湖微囊藻的生长特征及其分离纯培养的初步研究. 湖泊科学, 1999, 11(4): 351-356
6 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用. 农业出版社, 1986. 285-286, 334
7 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖等译. 北京: 科学出版社, 1998. 30-41
8 马文漪, 杨柳燕. 环境微生物工程. 南京: 南京大学出版社, 1998. 19

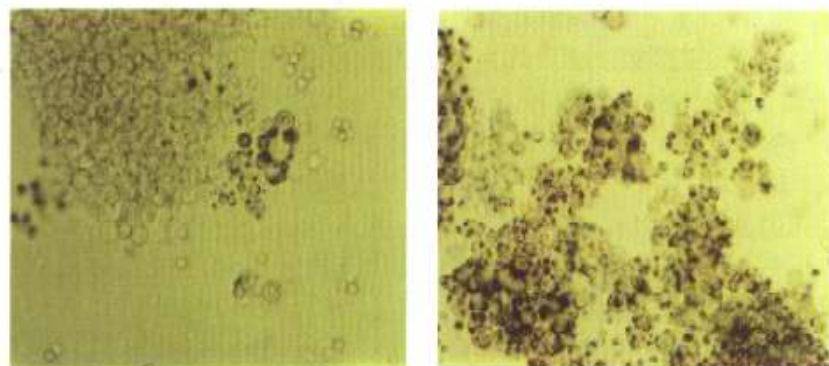


图2 铜绿微囊藻细胞先用乙醇乙醚混合液预处理或不经此处理，
再经蛋白酶K消化液处理过夜后的光镜对照

(左)经预处理样品消化后，其藻细胞内容物释放完全，大部分成为空壳，完好细胞较少($\times 350$)
(右)未经预处理的对照组消化后仍可见较多完好细胞($\times 350$)

Fig. 2 Comparison under light microscope between the *M. aeruginosa* Kütz cells pre-treated with alcohol + ether (1:1) and the cells without such a treatment.

All of them were lysed by proteinase K overnight.

(L) *M. aeruginosa* Kütz cells pre-treated with alcohol + ether (1:1), showed that most of the cells released their contents out completely with empty shells left ($\times 350$)

(R) *M. aeruginosa* Kütz cells without the pre treatment, showed that a lot of intact cells remained ($\times 350$)

Isolation, Pure Cultivation and Total DNA Extraction of *Microcystis aeruginosa* Kütz in Dianchi Lake

LU Yuan WEN Jianfan Lü Tianwen

(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology,
Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, P. R. China)

Abstract

M. aeruginosa Kütz is harmful to ecological environment of lakes. The algae in waterbloom of Dianchi Lake was isolated with methods of dilution and agar solid-media culture. It was found that after purification, growing rate of the algae was raised by 5 times in liquid culture media. When extracting total DNA of the algae, if the cells were pre-treated by alcohol + ether (1:1), their gelatinous sheathes were broken and the production of total DNA increased by 3-4 times. The improvement of DNA extraction is useful to molecular biology studies of the algae.

Key Words *M. aeruginosa* Kütz, pure cultivation, total DNA extraction