

太湖梅梁湾水华微囊藻基因型组成和产毒微囊藻丰度的变化*

施丽梅^{1,2}, 蔡元锋¹, 杨华林¹, 李朋富^{1,2**}, 孔繁翔², 孔令东¹

(1: 南京大学生命科学学院, 南京 210093)

(2: 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

摘要: 采用基于ITS序列的PCR-DGGE方法分析了太湖梅梁湾水华暴发过程中(6-11月)微囊藻的不同基因型组成的变化, 同时利用针对微囊藻毒素合成酶基因*mcyA*和微囊藻特异性的16S rDNA部分核苷酸序列的引物, 应用实时荧光定量PCR方法(qRT-PCR)分析水华样品中产毒微囊藻与总微囊藻的量, 通过两者的比值反映产毒微囊藻丰度. 结果表明, 在发生水华的不同时期, 微囊藻的基因型组成发生了变化, 其中以8月末、9月和10月的基因型最多, 基因型M5和M10存在于整个水华发展过程中. 共检测到12种主要的基因型, 每个基因型在水华的不同时期所占的比例互不相同. 实时荧光定量PCR结果显示从6月到10月, 产毒微囊藻的丰度呈增大的趋势, 从0.75%增加到32.16%, 而11月产毒微囊藻的丰度显著下降.

关键词: 微囊藻; 产毒微囊藻; ITS; 实时荧光定量PCR; DGGE; 水华; 太湖

Dynamics of composition of different *Microcystis* spp. genotypes and abundance of toxic *Microcystis* in Meiliang Bay of Lake Taihu during bloom

SHI Limei^{1,2}, CAI Yuanfeng¹, YANG Hualin¹, LI Pengfu^{1,2}, KONG Fanxiang² & KONG Lingdong¹

(1: School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, P.R.China)

(2: State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P.R.China)

Abstract: Dynamics of composition of different *Microcystis* spp. genotypes from June to November, 2008 in Meiliang Bay of Lake Taihu in China were investigated based on denaturing gradient gel electrophoresis analysis of PCR-amplified ITS (internal transcribed spacer sequence) fragments. Simultaneously, we investigated the relative abundance of microcystin-producing *Microcystis* spp. (the ratio of the toxic *Microcystis* to total *Microcystis*) based on microcystin synthetase gene (*mcyA*) and partial *Microcystis*-specific 16S rDNA sequence using real-time PCR. The results of this study indicated that there were shifts of composition of different *Microcystis* genotypes during algae bloom in Lake Taihu. The most abundant genotypes were found in the late of August, September and October. Genotypes M5 and M10 were found every month. A total of twelve main genotypes were found, and the relative abundance of each genotype changed during the development of algae bloom. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) revealed that the abundance of toxic *Microcystis* increased from 0.75% to 32.16% from June to October and decreased significantly in November.

Keywords: *Microcystis*; toxic *Microcystis*; ITS; qRT-PCR; DGGE; bloom; Lake Taihu

蓝藻水华在富营养化的水体中频繁发生已经是一个全球性的环境问题, 其中微囊藻(*Microcystis* spp.) 是一个在全世界广泛分布的水华蓝藻种类^[1]. 研究水华暴发过程中蓝藻种类组成的变化是理解蓝藻水华发生规律的一个重要方面. 基于16S-23S rRNA-ITS序列的PCR-DGGE方法可以将不同基因型的微囊藻在

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2008CB418004)和江苏省自然科学基金项目(BK2007150)联合资助. 2009-01-15 收稿; 2009-04-07 收修改稿. 施丽梅, 女, 1983年生, 博士研究生; E-mail: wslmhgl@126.com.

** 通讯作者; E-mail: pengfuli@nju.edu.cn.

DGGE图谱上区分^[2], 运用这种方法, Humbert等分析了法国Grangent水库中存在的微囊藻不同基因型^[3], Kardinaal等对荷兰三个湖泊的研究表明伴随着水华的发展, 存在着微囊藻不同基因型的演替现象, 包括产毒藻和不产毒藻的演替^[4]. 谭啸等比较分析了太湖春、夏、秋、冬四季微囊藻群落组成, 发现夏、冬两季微囊藻彼此分离成两大特征类群, 而春、秋两季的微囊藻彼此混杂^[5]. 但是, 目前没有发现针对太湖微囊藻水华暴发过程中不同微囊藻基因型组成变化的研究报道.

利用酶联免疫吸附法(ELISA)和高效液相色谱法(HPLC)可以检测水体中微囊藻毒素含量的变化, 但是不能直接反映产毒微囊藻丰度的变化. 微囊藻毒素是由基因簇 *mcy* 编码的毒素合成酶合成的, 针对该基因簇的 *mcyA*、*mcyB* 和 *mcyC* 基因, 利用分子生物学方法检测环境中具有产毒潜力的微囊藻藻株已经被国内外学者广泛采用^[6-10]. 其中应用针对 *mcyA* 基因的特异性引物借助实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法分析产毒微囊藻的含量被证明是快速和准确的^[11]. 目前未见利用产毒基因检测太湖产毒微囊藻的报道. 本文采用基于 rRNA-ITS 的 DGGE 方法研究了太湖梅梁湾水华暴发过程中的微囊藻基因型组成的变化, 同时采用 qRT-PCR 方法分析了产毒微囊藻丰度的变化, 旨在揭示太湖梅梁湾微囊藻基因型的演替规律.

1 材料与方法

1.1 微囊藻基因型组成分析

1.1.1 样品的采集和总 DNA 的提取 2008 年 6-11 月微囊藻水华发生期间, 在太湖梅梁湾采集水样, 实验室内用 0.22 μ m 滤膜过滤后, 采用 XS 方法提取样品的基因组 DNA^[12].

1.1.2 PCR-DGGE 分析微囊藻基因型的组成 采用针对 rRNA-ITS 序列的一对引物 CSIF(5'-GTCCACGCC-CGAAGTCGATTAC-3')和 ULR(5'-CCTCTGTGTGCCTAGGTATC-3')^[4], 以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 其中引物 CSIF 的 5'端连接着 40 个碱基的 GC 发夹结构(5'-CGCCCCGCCGCCCCGCGCCCCGCCCC-GCCGCCCCCGCCCC-3'). 采用 Touchdown PCR 策略, 条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 以下为 94 $^{\circ}$ C 1min, 62-52 $^{\circ}$ C 1min(每 2 个循环降 1 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 20 个循环, 后 10 个循环用 52 $^{\circ}$ C 退火, 最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 30min.

变性梯度凝胶电泳(DGGE)采用美国CBS公司电泳仪, 条件为: 聚丙烯酰胺凝胶浓度8%, 变性梯度30%-60%(100%变性剂含有7mol/L尿素和40%去离子甲酰胺), 电泳缓冲液为1 \times TAE, 60 $^{\circ}$ C条件下75V电泳16h. 电泳完成后聚丙烯酰胺凝胶用SYBR Green I(用TAE稀释10000倍)染色30min, 用Omega 10TM全自动多功能凝胶成像分析系统拍照. DGGE图谱中优势条带的相对含量采用Gel-Pro软件分析, 并根据分析结果作基因型组成柱状图.

从聚丙烯酰胺凝胶上切下优势条带, 放到1.5ml无菌离心管中捣碎, 加入TE缓冲液30 μ l, 4 $^{\circ}$ C过夜溶出DNA, 离心后取上清为模板, 用上述同样的引物(其中CSIF不含GC夹)和程序进行PCR扩增. PCR产物送上海生工生物工程技术有限公司测序, 将所测的rRNA-ITS序列在GenBank数据库中进行相似性比对. 同时将测序结果提交到GenBank, 序列号为FJ602437-FJ602446.

1.2 实时荧光定量 PCR 法分析产毒微囊藻的丰度

1.2.1 所用引物 使用下述引物分别扩增样品中的产毒微囊藻以及总微囊藻的部分 DNA 片段. MSF(5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3')和 MSR-2R(5'-GCCGATGTTTGGCTGTAAAT-3')是针对产毒微囊藻毒素合成酶基因 *mcyA* 的特异性引物^[11]. 引物 MICR 184F(5'-GCCGCRAGGTGAAAMCTAA-3')和 MICR 431R(5'-AATCCAAARACCTTCCTCCC-3')是针对一段保守的微囊藻特异性的 16S rDNA 片段^[13].

1.2.2 标准品的制备 采用XS方法提取铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* PCC 7806)的基因组DNA作为模板, 用上述两对引物分别进行PCR扩增, 反应体系总体积为50 μ l, dNTP 200 μ M、10 μ M的引物各1 μ l、MgCl₂ 4.0mM、Taq酶2.0个单位、10 \times PCR缓冲液5 μ l. 产毒微囊藻PCR反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性10min, 以下为95 $^{\circ}$ C 10s, 62 $^{\circ}$ C 10s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共35个循环^[11]. 总微囊藻PCR反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C预变性10min, 以下为95 $^{\circ}$ C 10s, 55 $^{\circ}$ C 10s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共45个循环^[13]. 将纯化后的PCR产物连接到pGEM-T载体, 构建重组质粒, 经转化感受态细胞和扩增培养后提取质粒DNA, 紫外吸收定量法(OD₂₆₀)检测浓度后, 将其进行10倍梯度稀释, 形成10³-10⁸拷贝/ μ l, 作为标准品4 $^{\circ}$ C保存备用.

1.2.3 标准曲线的绘制 进行荧光定量 PCR 反应的仪器为 ABI Prism 7000, 扩增反应体系总体积为 25 μ l, 包括 12.5 μ l SYBR Green I 混合液(包括 DNA Taq 酶, Mg²⁺, dNTP, SYBR Green I 和 10 \times PCR 缓冲液)、10 μ M 的引物各 0.5 μ l、10.5 μ l 灭菌重蒸水和 1 μ l 作为模板的上述各浓度梯度 DNA, 置于 PCR 管板中, 进行自动化扩增反应. PCR 反应条件分别同上所述, 分析总微囊藻的循环数增至 55 个, 分析产毒微囊藻的循环数增至 45 个. 以初始模板 DNA 量的对数为横坐标, 以 PCR 反应过程中每个稀释样品的 Ct 值为纵坐标, 分别绘制总微囊藻及产毒微囊藻的标准曲线.

1.2.4 产毒微囊藻丰度的分析 将从太湖水华样品中提取的基因组 DNA 作为模板, 分别经两对引物进行 qRT-PCR 扩增后, 从仪器读取样品的 Ct 值, 用标准曲线方程计算出产毒微囊藻及总微囊藻的初始拷贝数, 两者之比即为产毒微囊藻在水华样品中的丰度.

2 实验结果

2.1 PCR-DGGE 分析微囊藻不同基因型的演替

PCR-DGGE 分析不同时期的微囊藻水华样品(图 1), 共得到了 12 个不同的优势条带. 在水华的不同时期, 微囊藻的基因型组成不同(图 2). 在 6 月 7 日, 主要的微囊藻基因型有 6 种, 包括 M1、M2、M3、M5、M8 和 M10; 在 7 月 4 日和 8 月 6 日, 以 M3、M5、M8 和 M10 基因型为主, M1 和 M2 的比例减少; 在 8 月 26 日、9 月 11 日和 10 月 18 日, 微囊藻的基因型是最丰富的, 其中 M0、M4、M11 和 M9 的比例相对于其它时期有明显增加; 在 11 月 2 日, 微囊藻的基因型较少, 主要是 M3、M5、M8 和 M10. M5 和 M10 是所调查的月份中都存在的基因型, 在不同的时期各微囊藻基因型的相对含量是不相同的.

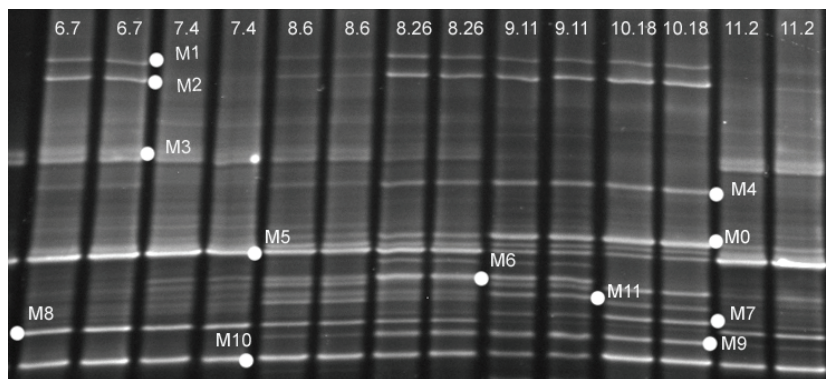


图 1 水华不同时期微囊藻基因型的 DGGE 图谱
(泳道顶部数字为采样时间, 图中“○”标记为割胶回收的 12 个条带)

Fig.1 DGGE profiles of *Microcystis* genotype succession in Lake Taihu during bloom

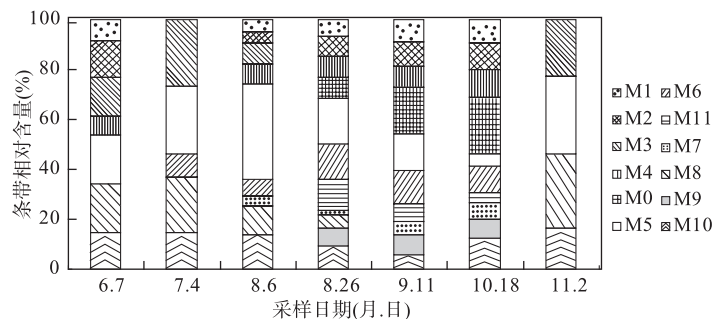


图 2 水华不同时期主要微囊藻基因型组成的变化

Fig.2 Dynamics of composition of the dominant *Microcystis* genotypes in Lake Taihu during bloom

将 ITS 序列通过 BLAST 比对看出(表 1), 微囊藻基因型 M1 与其最相近的铜绿微囊藻藻株(AM773538)之间具有 100% 的相似性, 基因型 M9 与其最相近的藻株相似性是 96%, 其它基因型与其最相近的藻株的相似值都在 97%–99% 之间. M0 和 M11 测序不成功.

表 1 代表微囊藻基因型的 DGGE 条带序列分析结果

Tab.1 Characterization of *Microcystis* genotypes based on rRNA-ITS fragments retrieved from the DGGE gels and their relatedness to known organisms

条带	序列号	相近的藻种株	相似值(%)
M1	FJ602437	<i>Microcystis aeruginosa</i> (AM773538)	100
M2	FJ602438	<i>Microcystis aeruginosa</i> (AM773535)	99
M3	FJ602439	<i>Microcystis</i> sp. B23(AY827804)	99
M4	FJ602440	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843 (AP009552)	98
M5	FJ602441	<i>Microcystis</i> sp. AICB 688 (AY672732)	97
M6	FJ602442	<i>Microcystis</i> sp. K61-1 (AJ605199)	97
M7	FJ602443	<i>Microcystis aeruginosa</i> (AM773538)	98
M8	FJ602444	<i>Microcystis</i> sp. 'Brown' (AY333417)	98
M9	FJ602445	<i>Microcystis</i> sp. 10-9 (EF150987)	96
M10	FJ602446	<i>Microcystis</i> sp. 'Brown' (AY333417)	99

2.2 太湖水中产毒微囊藻的丰度

经实时荧光定量 PCR 分析得到总微囊藻的标准曲线为 $Ct = -3.283 \lg C + 36.935 (R^2 = 0.997)$ (图 3a), 产毒微囊藻的标准曲线为 $Ct = -3.382 \lg C + 36.735 (R^2 = 0.998)$ (图 3b).

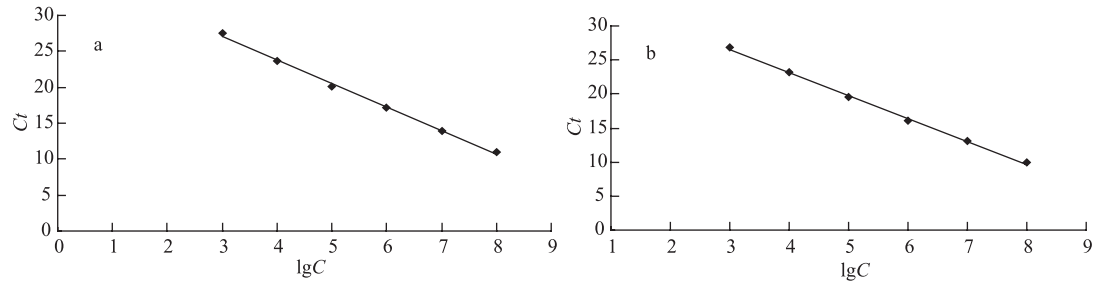


图 3 总微囊藻(a)和产毒微囊藻(b)的标准曲线

Fig.3 Standard curve of total *Microcystis* spp.(a) and toxic *Microcystis* spp. (b)

实时荧光定量 PCR 分析得出 6 月 7 日、7 月 4 日、8 月 6 日、8 月 26 日、9 月 11 日、10 月 18 日、11 月 2 日采集的太湖梅梁湾水华样品中产毒微囊藻的丰度分别为 0.75 ± 0.37 、 0.92 ± 0.28 、 2.60 ± 0.46 、 6.10 ± 0.61 、 13.21 ± 0.56 、 32.16 ± 0.55 和 3.47 ± 0.34 (%)。产毒微囊藻在整个水华发生过程中都存在, 从 6–10 月产毒微囊藻丰度呈增加趋势, 11 月产毒微囊藻丰度显著下降。

3 讨论

本文采用 rRNA-ITS 序列对太湖梅梁湾微囊藻水华爆发过程中微囊藻基因型组成变化进行了分析. 结果显示, 本文所检测的基因型与 GenBank 中已知微囊藻有较高的相似性. 微囊藻不同基因型共存并伴随着水华的发展而出现演替. 每种微囊藻基因型的相对含量随着水华的发展也在不断变化. Kardinaal 等运用同样的方法证实了荷兰西部淡水湖中的微囊藻水华发展过程中, 存在多种基因型共存和微囊藻不同基因型的演替^[4], 这与我们在太湖梅梁湾发现的结果一致. 对于不同时期的样品, 我们也进行了形态学观察, 所有的样品中都有水华微囊藻、惠氏微囊藻和铜绿微囊藻, 但是, 由于相当多的微囊藻群体不是典型的形态, 难以按照形态学准确分类, 而且已有的报道显示微囊藻的形态学和遗传学的鉴定不一致^[14-15], 所以不能确定这些基因型具体对应于哪些种类微囊藻.

实时荧光定量PCR的结果显示产毒微囊藻的丰度随着水华发展过程而变化, 产毒微囊藻和不产毒微囊藻共存于水体中, 随着水华的发展产毒微囊藻的丰度从6-10月呈增大的趋势, 从0.75%增加到32.16%。Yoshida等^[16]运用针对*mcyA*的荧光定量PCR方法发现日本Mikata湖中产毒微囊藻的丰度随着采样时间的不同而多变, 在0.5%-35%之间。在太湖梅梁湾水华的发展过程中, 产毒微囊藻丰度逐渐增大, 但是从总体上看仍然以无毒微囊藻为主。许秋瑾等^[17]应用酶联免疫吸附法检测到太湖中毒素含量在夏秋季时增高, 结合我们的结果说明, 水体中毒素含量的增高, 可能是来源于产毒微囊藻丰度的增加。需要注意的是, 用荧光定量PCR得出的产毒微囊藻的丰度变化可以大概反映水体中微囊藻毒素含量的变化, 但是产毒微囊藻的丰度并不能直接反映毒素的含量, 因为各种理化因子会影响微囊藻毒素基因的表达和毒素产量^[7,18]。本研究发现太湖梅梁湾水华发生过程中从6-10月微囊藻基因型种类呈增加趋势, 同时产毒微囊藻的相对丰度也呈增加趋势, 两者之间是否相关, 这有待进一步的研究。产毒微囊藻丰度的变化趋势说明梅梁湾水华暴发过程中存在无毒到有产毒微囊藻的演替过程, 这与Kardinaal等^[4]研究的荷兰西部淡水湖中的微囊藻从无毒到有产毒的演替规律一致。本文首次揭示了太湖梅梁湾水华暴发过程中微囊藻基因型的演替规律, 为进一步研究太湖蓝藻水华暴发机理提供了参考依据。

4 参考文献

- [1] 孙慧群, 朱琳, 高文宝. 淡水湖泊中微囊藻水华的成因分析. 生物学通报, 2005, **40**(8): 23-24.
- [2] Janse I, Meima M, Kardinaal WEA *et al.* High resolution differentiation of cyanobacteria using rRNA-ITS DGGE. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 6634-6643.
- [3] Humbert JF, Duris-Latour D, Le Berre B *et al.* Genetic diversity in *Microcystis* populations of a French storage reservoir assessed by sequencing of the 16S-23S rRNA intergenic spacer. *Microbial Ecology*, 2005, **49**: 308-314.
- [4] Kardinaal WEA, Janse I, Kamst-van Agterveld M *et al.* *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquatic Microbiology Ecology*, 2007, **48**: 1-12.
- [5] 谭啸, 孔繁翔, 曾庆飞等. 太湖中微囊藻群落季节变化分析. 生态与农村环境学报, 2009, **25**(1): 1-4.
- [6] Kurmayer R, Kutzenberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 6723-6730.
- [7] Kaebnick M, Neilan BA, Borner T *et al.* Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 3387-3392.
- [8] Yoshida T, Yuki Y, Lei S *et al.* Quantitative detection of toxic strains of the cyanobacterial genus *Microcystis* by competitive PCR. *Microbes and the Environment*, 2003, **18**: 16-23.
- [9] Nishizawa T, Asayama M, Fujii K *et al.* Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin *Microcystis* spp. *The Journal of Biochemistry*, 1999, **126**: 520-529.
- [10] 潘卉, 宋立荣, 刘永定等. 水华蓝藻产毒特性的PCR检测法. 水生生物学报, 2001, **25**(2): 159-166.
- [11] Furukawa N, Noda S, Tsuneda T *et al.* Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, **102**: 90-96.
- [12] Tillett D, Neilan BA. Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 2000, **36**: 251-258.
- [13] Rinta-Kanto JM, Ouellette AJ, Boyer GL *et al.* Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environmental Science and Technology*, 2005, **39**: 4198-4205.
- [14] Otsuka S, Suda S, Li R *et al.* Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiology Letter*, 1999, **172**: 15-21.
- [15] Janse I, Kardinaal WEA, Meima M *et al.* Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**: 3979-398.
- [16] Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y *et al.* Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiology Letter*, 2007, **266**: 49-53.
- [17] 许秋瑾, 高光, 陈伟民. 太湖微囊藻毒素年变化及其与浮游生物的关系. 中国环境科学, 2005, **25**(1): 28-31.
- [18] 潘晓洁, 常锋毅, 沈银武等. 滇池水体中微囊藻毒素含量变化与环境因子的相关性研究. 湖泊科学, 2006, **18**(6): 572-578.