

湖泊底泥中微囊藻 DNA 的分子检测*

徐 瑶^{1,2}, 李仁辉^{2**}, 王国祥¹, 余博识^{2,3}, 杨文斌¹

(1: 南京师范大学地理科学学院, 南京 210097)

(2: 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

(3: 西南林学院资源学院, 昆明 650224)

摘要:通过改进裂解温度和延长裂解时间并增加苯酚/氯仿洗脱次数的 DNA 提取方法获得南京玄武湖底泥中的 DNA, 通过 PCR 法来扩增微囊藻的 16SrRNA 基因. 结果表明在所有采样点中均得到微囊藻基因组 DNA, 并且纯度较高, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均高于 1.54, 最高值达到 1.89. PCR 的扩增结果显示所有样点的 DNA 都得到 212 bp 大小的微囊藻 16SrRNA 基因片断, 表明这种方法可以有效的从底泥中提取微囊藻的 DNA, 从而为研究底泥微囊藻生理生态及其越冬、上浮、形成水华的机理提供更有利的方法.

关键词:底泥; 微囊藻; DNA; 水华; 蓝藻

Molecular detection of *Microcystis* (Cyanobacteria) from sediments by DNA amplification

XU Yao^{1,2}, LI Renhui^{2*}, WANG Guoxiang¹, YU Boshi^{2,3} & YANG Wenbin¹

(1: College of Geographical Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, P. R. China)

(2: Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China)

(3: School of Nature Resources, Southwest Forestry University, Kunming 650224, P. R. China)

Abstract: A method for DNA extraction from sediment samples of Lake Xuanwu, Nanjing, China was developed, and purification and efficiency of extracted DNAs were evaluated through ultraviolet spectrum OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratios and PCR amplification of 16S rDNA specific for *Microcystis*. The results showed that sediment samples from all sites in the study obtained quite purified genomic DNAs with OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratios from 1.54 to 1.89, and *Microcystis* 16S rRNA gene fragments have been detected in all sampling sites, which indicating this method can be used for molecular detection of *Microcystis* cells in sediments.

Keywords: Sediment, *Microcystis*, DNA, waterbloom, cyanobacteria

富营养化成为目前我国湖泊重大水环境问题之一. 湖泊富营养化主要表现为水华暴发, 其中微囊藻 (*Microcystis* Kütz) 水华由于出现频率最高并且危害严重而成为研究最多的一种藻类水华^[1-5]. 有关微囊藻水华的暴发机制, 特别是对于其发生规律、归宿、越冬及其第二年的复苏等研究引起了广泛的关注, 并且提出了一些假设. 其中, 微囊藻是否能通过底泥越冬并能促进次年的水华形成是一个焦点问题^[7-12]. 目前对于底泥中微囊藻的越冬休眠和复苏上浮的研究还没有成熟的方法, 藻类的定性定量研究主要采取测定底泥中叶绿素 a、叶绿素 b 和藻蓝素的含量来计算底泥中蓝藻量的变化^[7,8]. 但该方法不能将微囊藻与其它蓝藻区分开来, 因此不能真实反映底泥中微囊藻含量. 要深入研究微囊藻在冬季底泥的极端环境下的生理生长情况、各种诱发因子的阈值及休眠对次年的水华暴发的贡献量等问题的关键是对底泥的微囊藻进行定量化研究. 然而, 底泥由于其所处的特殊的环境条件, 富含大量有机质、动植物残体及微生物^[13], 这对微囊藻的

* 中国科学院领域前沿 (055102-1-501), 国家“863”重大科技项目 (2003AA601100-2)、国家“十五”“211 工程”重大项目“不同时空尺度环境演变和生态建设”和江苏省重点科技专项 (BM2002701) 联合资助. 2006-08-06 收稿; 2006-10-19 收修稿稿. 徐瑶, 男, 1982 年生, 硕士研究生; E-mail: xuyao8207@126.com.

** 通讯作者; E-mail: reli@ihb.ac.cn.

定性定量带来很大困难. 近年来,随着分子生物学的飞速发展,通过定量 PCR 方法来测定环境中微生物数量的方法也日趋成熟. 在水生态环境中,直接从水体中提取细菌和藻类 DNA 的方法已应用很广. 但如何直接从底泥中提取微囊藻 DNA 的研究相对较少,却是研究微囊藻复苏及对二次暴发贡献机理的关键技术. 本研究在前人研究方法的基础上,发展一种从底泥中提取蓝藻等微生物 DNA 的简便有效的方法,为进一步分子定量微囊藻等蓝藻提供关键技术方法.

1 材料与方 法

1.1 样品采集

玄武湖是江苏南京著名风景区,是个典型的城市小型浅水湖泊,湖泊水面面积约 3.7 km²,平均水深 1.3 m,富营养化严重并于 2005 年夏季暴发大规模微囊藻水华,叶绿素 a 迅速升至 1.89 mg/L. 在 2006 年 2 月 23 日,用柱状采泥器在玄武湖西南、西北、东南、东北四个湖区采集六个样点底泥(表层 3 cm),放入冰盒带回实验室风干备用. 其中样点 5 位于东南湖靠近玄武门的湾角,是水华的聚积处.

1.2 DNA 的提取检测方法

1.2.1 仪器 点振器,水浴锅,移液枪(ependorf),紫外分光光度(岛津 mini 1240,日本),PCR 仪(Biorad,美国),紫外凝胶成像系统(培清 JS-380,上海),DNA 测序仪(ABI 377,美国).

1.2.2 提取方法及试剂 DNA 提取方法在 Rinta-Kanto^[14]等方法的基础上略加修改. 具体操作如下:

取风干底泥土样 2g 于离心管中,加入 5 ml 溶菌缓冲液,50 μ l 溶菌酶(100 mg/ml),充分振荡后 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h;加入 15 μ l 蛋白酶 K(20 mg/ml);262.5 μ l 10% SDS(100 mg/ml);60 $^{\circ}$ C 水浴 2 h;取出后,依次加入 5.3 ml 等体积的苯酚,充分振荡(约 3 min)后在 12000 rpm 条件下离心 8 min;取上清液转入新的离心管,加入 5.3 ml 氯仿在 12000 rpm 转速离心 8 min;用苯酚和氯仿抽提三次,然后将上清液转入新的离心管,加入 1/10 体积的乙酸铵(10 mol/L),混匀后再加入 2 倍体积的 4 $^{\circ}$ C 预冷的乙醇,在 -20 $^{\circ}$ C 条件下放置至少 1 h,然后 12000 rpm 转速离心 20 min,沉淀 DNA 用 70% 的 4 $^{\circ}$ C 预冷的乙醇洗涤、离心、沉淀,自然干燥,最后将 DNA 溶于 TE 缓冲液,-20 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.2.3 DNA 纯度检测 DNA 纯度采用紫外分光光度分别测定 260 nm 和 280 nm 的吸光值(OD₂₆₀、OD₂₈₀),通过换算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比率来衡量样品纯度.

1.2.4 微囊藻 16S rRNA 基因的扩增 将溶于 TE 缓冲液的基因组 DNA 作为聚合酶链式反应的模板,采用对微囊藻具特异性的 16S rRNA 基因引物 *Microcystis* F(F5'-GCCGCRAGGTGAAAMCTAA-3') 和 *Microcystis* R(5'-AATCCAAAGACCTTCCTCCC-3') 进行扩增.

扩增条件:PCR 体积 50 μ l,其中包含无菌双蒸水 28 μ l,10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ l,MgCl₂(20 mM)7.5 μ l,DNA 顺反引物(10 pmol/ μ l)各 1 μ l,Taq 酶(5 μ / μ l)0.5 μ l,dNTP(10 mmol)2.5 μ l,BSA(3 mg/ml)2.5 μ l,DNA 溶液 2 μ l. 温度控制程序:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s;引物退火 50 $^{\circ}$ C 30 s;延伸 72 $^{\circ}$ C 20 s 的 39 个循环;最后在 72 $^{\circ}$ C 下保留 5 min. PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳(内含 1 μ g/ml 溴化乙锭),1 \times TAE 缓冲液,电泳后在紫外凝胶成像系统中观察、拍照.

1.2.5 基因测序与分析 扩增产物用 PCR 纯化试剂盒进行纯化(TaKaRa Biotech,日本),在 DNA 测序仪上测序,并用 ClustalX(1.83)软件将得到的序列与 Genbank 中微囊藻序列进行匹配校准.

2 结果与讨论

2.1 方法的改良

目前从水环境和土壤中提取 DNA 方法以及对 DNA 的恢复评价的研究已有不少报道^[15-20],但对于如何从底泥中提取水华蓝藻特别是微囊藻 DNA 的方法,以及通过 PCR 法来进行底泥中的微囊藻的多样性及数量等分子监测的研究还较少. Humbert 等通过直接对底泥加水稀释并过 50 μ m 滤膜得到底泥微囊藻的个体^[21],该方法中 50 μ m 的滤膜会损失一定量解体的微囊藻群体和细胞,不适合微囊藻的量化研究. 本文方法是在 Rinta-Kanto^[14]等方法的基础上建立起来的,主要的修正在以下几个方面:(1)充分振荡使土壤颗粒中的微囊藻 DNA 完全释放到溶液中;(2)针对底泥成分复杂适当提高水浴温度;(3)增加了苯酚/氯仿的

抽提次数,使得提取物中蛋白质的去除更彻底. 与 Cinzia Corinaldesi^[15] 等人的方法相比,省去烦琐的抽提过程,同时也减少操作过程中的 DNA 损失,更能反映现实情况.

2.2 方法的可行性分析

用改良的 DNA 提取方法,从玄武湖 6 个底泥样品中均提出 DNA. 采用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值测定样品 DNA 纯度,表 1 显示全湖 6 个样点 DNA 纯度均大于 1.54,最高达到 1.89,而其他人从土壤中抽提的 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比率一般在 1.35 - 1.70^[22-24], Corinaldesi 等从底泥中提取的 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比率为 1.45 - 1.50^[15]. 与前人结果比较看出,本方法在底泥 DNA 的抽提方面获得更高的纯度,方法可行.

表 1 底泥提取的 DNA 的纯度分析

Tab. 1 Analysis of *Microcystis* DNA extracted from sediment

	1 号点	2 号点	3 号点	4 号点	5 号点	6 号点
OD ₂₆₀	0.0564	0.0823	0.0574	0.1173	0.0618	0.0276
OD ₂₈₀	0.0298	0.0533	0.0352	0.0745	0.0358	0.0178
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.8934	1.5423	1.6319	1.5754	1.7270	1.5476

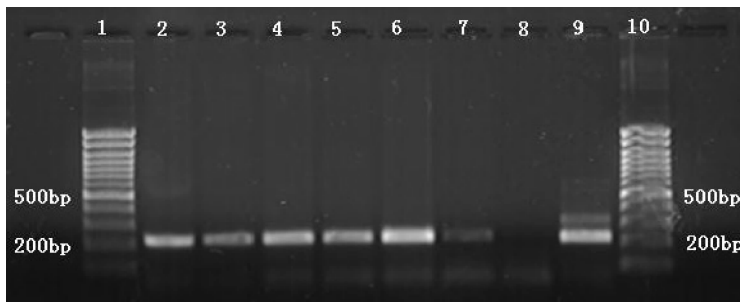


图 1 PCR 凝胶电泳图谱

1、10; DNA Marker; 2: 1 号点; 3: 2 号点; 4: 3 号点; 5: 4 号点; 6: 5 号点; 7: 6 号点;
8: 负控制(无模板 DNA); 9: 正控制(铜绿微囊藻 PCC7806 基因组 DNA)

Fig. 1 Gel electrophoresis image of PCR results

Lane 1, 10; DNA Marker; Lane 2; site 1; Lane 3; site 2; Lane 4; site 3; Lane 5; site 4; Lane 6; site 5; Lane 7; site 6; Lane 8; negative control(no template DNA); and Lane 9; positive control (*M. aeruginosa* 7806 genomic DNA)

2.3 微囊藻基因的扩增及应用

Rudi 等通过设计对微囊藻 16S rRNA 片段的特异性引物成功将微囊藻区别于其他蓝藻^[25]. 本研究中的应用特异性引物,对微囊藻 16S rRNA 基因的进行扩增,6 个底泥样点中均获得 212 bp 的片段(图 1). 产物纯化后测序,并与 Genbank 中已有微囊藻 16S rRNA 基因进行比较,结果(图 2)表明所扩增的产物均为微囊藻 16S rRNA 的基因片段,相似性达 100%,由此,可以通过图 1 电泳亮度对 6 个样点进行粗略定量. 5 号样点亮度显著高于其他样点,主要原因是水华期间该点为水华聚集点;而 6 号样点亮度最弱,这主要是因为该点位于玄武湖引水冲湖的线路上,在水华暴发后,玄武湖每天引大量长江水冲洗玄武湖,导致该点微囊藻数量相对较少. 证明对底泥微囊藻的分子测定准确有效,同时解决了底泥中微囊藻群体的解体和细胞形态的变化对常规显微计数方法和光合色素定量分析产生的问题,从而为底泥微囊藻生理生态及其越冬、上浮、形成水华机理的研究提供新的思路和研究手段.

致谢:感谢南师大地科院生态修复实验室葛绪广,李振国,王锦旗,潘国权,郭长城在采样中的帮助和支持.

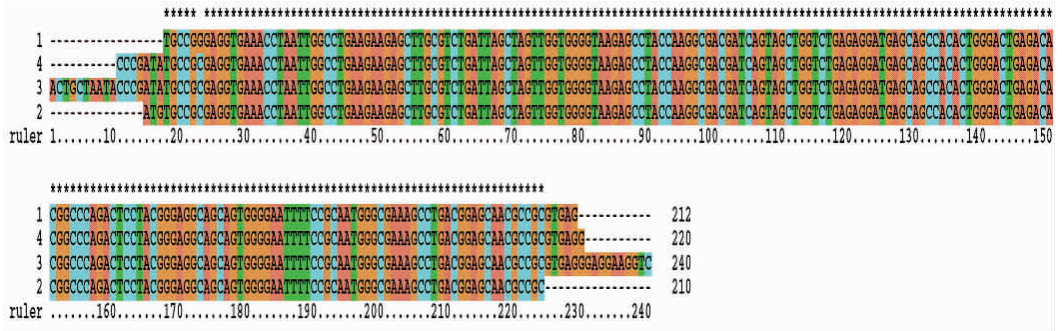


图2 扩增序列与微囊藻基因比对

1:底泥 PCR 序列;2:铜绿微囊藻 (AF139314);3:惠氏微囊藻 (AB023270);4:绿色微囊藻 (AB023277)

Fig.2 Complete alignment between PCR sequences and Genbank sequences,1:sediment PCR sequence;

2:*M. aeruginosa* (AF139314);3:*M. wesenbergii* (AB023270);4:*M. viridis* (AB023277)

3 参考文献

- [1] Guo N and Xie P. Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications. *Environmental Pollution*,2006,**143**(3):513 – 518.
- [2] Chen W, Li L, Gan N Q *et al.* Optimization of an effective extraction procedure for the analysis of microcystins in soils and lake sediment. *Environmental pollution*,2006,**143**:241 – 246.
- [3] Bañares-España E, López-Rodas V, Salgado C *et al.* Inter-strain variability in the photosynthetic use of inorganic carbon, exemplified by the pH compensation point, in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Botany*, 2006,**85**:159 – 162.
- [4] Taş S, Okuş E, Aslan-Yilmaz A *et al.* The blooms of a cyanobacterium, *Microcystis cf. aeruginosa* in a severely polluted estuary, the Golden Horn, Turkey. *Estuarine, Coastal and shelf Science*, 2006,**68**: 593 – 599.
- [5] Agrawal M K, Ghosh S K, Bagchi D *et al.* Occurrence of microcystin-containing toxic water blooms in Central India. *J Microbiology and Biotechnology*,2006,**16**(2):212 – 218.
- [6] 孔繁翔,高 光.大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考.生态学报,2005,**25**(3):589 – 595.
- [7] 张晓峰,孔繁翔,曹焕生等.太湖梅梁湾水华蓝藻复苏过程的研究.应用生态学报,2005,**16**(7):1346 – 1350.
- [8] Cao H S, Kong F X, Tan J K *et al.* Recruitment of Total Phytoplankton, Chlorophytes and Cyanobacteria from Lake Sediments Recorded by Photosynthetic Pigments in a Large, Shallow Lake (Lake Taihu, China). *Int Rev Hydrobiol*, 2005,**90**:347 – 357.
- [9] Rengefors K, Gustafsson S, Stahl-Delbanco A. Factors regulating the recruitment of cyanobacterial and eukaryotic phytoplankton from littoral and profundal sediments. *Aquatic Microbial Ecology*,2004,**36**(3):213 – 226.
- [10] 李阔宇,宋立荣,万 能.底泥中微囊藻复苏和生长特性的研究.水生生物学报,2004,**28**(2):113 – 118.
- [11] Annika S D, Lars-Anders H, Mikael G. Recruitment of resting stages may induce blooms of *Microcystis* at low N:P ratios. *J Plankton Res*,2003,**25**:1099 – 1106.
- [12] Brunberg AK, Blomqvist P. Recruitment of *Microcystis* (Cyanophyceae) from lake sediments: The importance of littoral inocula. *J Phycol*,2003,**39**:58 – 63.

- [13] 刘健康等. 高级水生生物学. 北京: 科学出版社, 1999: 31 - 35.
- [14] Rinta-kanto J M, Ouellette A J A, Boyer G L *et al.* Quantification of toxic *microcystis spp.* during the 2003 and 2004 Blooms in western lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environ Sci Technol*, 2005, **39**: 4198 - 4205.
- [15] Corinaldesi C, Danovaro R, Dell'Anno A. Simultaneous Recovery of Extracellular and Intracellular DNA Suitable for Molecular Studies from Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(1): 46 - 50.
- [16] Soo-Jin K, Bon-Sung K, In-Cheol P *et al.* Evaluation of DNA recovery from soil and sediment samples. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 2004, **47**(4): 194 - 198.
- [17] Frostegård A, Courtois S, Ramišse V *et al.* Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(12): 5409 - 5420.
- [18] Hurt R A, Qiu X, Wu L *et al.* Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol*, 2001, **67**(10): 4495 - 4503.
- [19] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S *et al.* DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(5): 2354 - 2359.
- [20] Ogram A, Sayler G S, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods*, 1987, **7**: 57 - 66.
- [21] Humbert J F, 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. *Microbial Ecology*, 2005, **49**: 308 - 314.
- [22] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 316 - 322.
- [23] Cullen D W and Hirsch P R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial and from soil for PCR. *Soil Biology Biochemistry*, 1998, **30**: 983 - 993.
- [24] 苏振宏, 张德禄, 王高鸿等. 一种从土壤生物结皮中有效提取 DNA 的方法. 水生生物学报, 2006, **30**(4).
- [25] Rudi K, Skulberg O M, Larsen F, Jakobsen K S. Strain characterization and classification of Oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16s rRNA sequences from the variable region V6, V7, and V8. *Appl Environ Microbiol*, 1997: 2593 - 2599.