

巢湖微囊藻产毒株的分离、保存及种属 特异性鉴定

刘杨 查向东* 李玉成

(安徽大学生命科学学院 安徽省生态工程与生物技术重点实验室 安徽 合肥 230039)

摘要: 利用平板划线结合液体培养的方法从巢湖分离得到一个藻株, 命名为 Chaohu-1。甲醇粗提该藻株所产生的藻毒素(MCs), 经固相萃取、HPLC 检测, 证实该藻株产生毒性最强的 Microcystin-LR。藻细胞呈绿色球状, 群体为无规则网状。全细胞 PCR 扩增藻蓝蛋白基因间隔序列(PC-IGS), 结果与 GenBank 中已有的铜绿微囊藻属序列相似性达 99%。综合形态学和分子生物学的分析结果, 表明我们首次从巢湖分离得到 1 个产毒的铜绿微囊藻藻株。同时我们摸索出该藻株冻存及复苏方法, 为藻株的长期保存及后续研究打下了基础。

关键词: 铜绿微囊藻, 分离纯化, 产毒特性, 种属鉴定, 冻存复苏

Isolation, Preservation, and Species Identification of a Toxigenic Strain of Microcystis from Chaohu Lake

LIU Yang ZHA Xiang-Dong* LI Yu-Cheng

(Key Laboratory of Ecological Engineering and Biotechnology of Anhui Province, School of Life Science, Anhui University, Hefei, Anhui 230039, China)

Abstract: We isolated and purified a Microcystis strain, Chaohu-1, from Chaohu Lake by the method of plate streaking and liquid culture. After the successive steps of methanol extraction and solid-phase extraction, it was confirmed that the algae strain produces MC-LR as analyzed by HPLC. The algae cells were green and spherical, while the population displayed a random reticulate form. The phycocyanin intergenic spacer region (PC-IGS) was amplified by whole-cell PCR, cloned and sequenced. The PC-IGS sequence showed a degree of similarity of 99% with those of Microcystis aeruginosa strains downloaded from GenBank. A combination of the analysis results both at morphological and molecular levels indicated that for the first time we have isolated a Microcystis aeruginosa strain in Chaohu Lake, and we named it Chaohu-1. Moreover, we established an effective method for its cryopreservation and cell resuscitation, which laid foundation for the long-term preservation and the future research.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*, Isolation, Toxigenic, Species identification, Cryopreservation and re-suscitation

微囊藻(*Microcystis*)是蓝藻门(*Cyanophyta*)、色球藻纲(*Chroococrophyceae*)、色球藻目(*Chroococcales*)、色球藻科(*Chroococcaceae*)的一属,是全球性分布的藻类,在富营养化的水体中易形成水华,带来严重的水生态环境问题,其中的产毒株产生的微囊藻毒素(MCs)更是对水生生物乃至人类健康构成潜在威胁^[1],迫切需要进行诸如藻株生理生化特性、毒素合成基因及表达调控在内的基础与应用研究^[2]。

目前我国已有许多地域的微囊藻经分离纯化得到了纯藻株,如东湖^[3]、太湖^[4]、滇池^[5]、松花湖^[6]和西流湖^[7]等地的微囊藻,尚未见有分离纯化巢湖微囊藻的报道。本实验从安徽巢湖分离得到纯藻株 chaohu-1, HPLC 法检测了其产毒特性,并利用藻蓝蛋白基因间隔序列(Phycocyanin intergenic spacer, PC-IGS)在不同种属间存在差异性的特点,PCR 扩增该序列,鉴定了其种属特异性,摸索出了该藻株的冻存复苏方法,为后续产毒机制及去毒处理等深入研究提供了保障。

1 材料与方法

1.1 微囊藻分离纯化

1.1.1 藻种来源及培养条件: 2009年4月从巢湖采样,采回后8000 r/min离心5 min,取表层藻液用无菌水重悬,反复几次至EP管底部基本无深黑绿色沉淀。取表层藻液接种至BG-11蓝藻通用培养基^[8]中预培养,培养条件:2500 lux,光周期为12 h:12 h,温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,静置培养7-10 d。

1.1.2 藻细胞分离纯化: 剧烈振荡预培养液并反复吹吸,在含1.5%琼脂糖的BG-11平板上用接种环划线,倒置培养。7-10 d后挑取单藻落至新鲜BG-11液体培养。培养条件均同上,重复几次。显微镜下观察藻细胞形态特征。

1.2 MCs 提取及检测

1.2.1 MCs 提取制备: 取分离纯培养的藻液约250 mL,8000 r/min离心10 min,上清 4°C 保存待用,沉淀冻融数次,加入20 mL 5%乙酸超声破碎,工作条件400 W,破碎3 s,间隔3 s。8000 r/min离心10 min,合并上清。残渣用20 mL 40%甲醇抽提20 min,重复1次,合并上清。 70°C 旋转蒸发,浓缩液过0.45 μm 滤膜,滤液用 C_{18} 固相萃取柱纯化(柱体先用10 mL、100%甲醇活化,加样后用40%甲醇淋洗杂质,然后以80%甲醇和0.02% TFA 混合液洗

脱 MCs)。提取液 70°C 旋转蒸发浓缩至2 mL。

1.2.2 MCs 的 HPLC 检测: 提纯的 MCs 使用 Agilent HPLC 1100 仪,流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}} = 60:40$,流速0.7 mL/min,柱温 40°C ,紫外检测波长238 nm,进样量10 μL 。

1.3 形态学鉴定

观察每次在固体平板上长出的单个藻落,记录颜色、大小及生长规模。挑取单藻落至液体培养基后,多次镜检细胞形态特征,并注意是否染菌。

1.4 分子生物学鉴定

1.4.1 藻细胞处理: 分离纯培养的藻液经血球计数板统计细胞数约为 1×10^6 个/mL,中速离心后用无菌水重悬,超声破碎后 4°C 保存待用;或用无菌水重悬后 -20°C 冻存,室温融化后再次冷冻,反复数次,均可作为模板。

1.4.2 引物设计: PCR 扩增藻蓝蛋白基因间隔序列(PC-IGS)以鉴定所纯化藻株的种属特异性。以铜绿微囊藻、颤藻(*Oscillatoria*)、念珠藻(*Nostoc*)、鱼腥藻(*Anabaena*)等已知序列为参考依据,设计简并引物。正向引物 Pcb ($5'$ -TGATCGTTGCTTAAATGG TCT-3')和反向引物 Pca ($5'$ -GGTGGTGTAGGGGTA YTTKT-3')由北京三博远志生物技术公司合成。

1.4.3 PCR 反应体系及程序: PCR 仪为 Biometra Tgradient, 反应体系20 μL , 包含 $10 \times$ Buffer 2.0 μL , MgCl_2 (25 mmol) 1.2 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各1.0 μL , dNTPs (10 mmol) 1.0 μL , Taq 酶0.5 μL , 模板2.0 μL , 其余部分用无菌水补足。反应程序为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, $49^{\circ}\text{C}/55^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72°C 1 min, 34个循环; 72°C 10 min。扩增产物用1%琼脂糖电泳, Bio-Rad 凝胶成像系统检测。

1.4.4 PC-IGS 克隆测序: PCR 产物用 Axygen 胶回收试剂盒纯化,将纯化产物与 pMD18-T (TaKaRa)载体连接,转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,菌液 PCR 检测后送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.5 微囊藻保存及复苏

将处于稳定期的纯培养藻液冰浴预冷,取适量藻液 EP 管中,分别加入 5%、10%和 15%终浓度的灭菌甘油,分别用 -70°C 一步冻存和 -20°C 降温1 h后 -70°C 冻存2种方法冻存处理藻样。复苏时取出 EP 管立刻置于冰浴、 25°C 、 30°C 、 35°C 和 40°C 5种条件升温活化。待完全融化后8000 r/min离心2 min 去除甘油,新鲜培养基重悬,重复离心1次,

弃上清, 转接到新鲜 BG-11 培养基, 光照恒温箱培养, 培养条件同上。

2 结果

2.1 微囊藻分离纯化培养结果

藻种在 BG-11 培养基中预培养约 15 d 即能见到较多绿色细胞团, 这说明采集到的野生藻样已经适应该培养环境。在固体平板上划线 7-10 d 可见半球形绿色单藻落, 挑取单藻落转接至新鲜液体培养基后再次划线, 反复几次, 能得到同样的单藻落。经显微镜镜检形态特征基本一致, 群体深绿色, 细胞球形或椭圆形, 细胞分布均匀且密贴; 中实且有空泡; 胶被质地均匀, 透明无色或微黄色^[9]。多次镜检未见杂菌, 说明分离得到了单藻株, 如图 1 所示。

2.2 MCs 检测结果

提纯的 MCs 经 HPLC 检测, 出峰时间是 5.303 min, 标样 MC-LR 出峰是 5.304 min, 如图 2 所示。C₁₈ 固相萃取柱并不能完全除去杂质, HPLC 能显示出其余杂峰, 但样品主峰和标样的出峰时间基本一致, 可以说明该纯化的藻株产毒, 且为毒性较大的 LR。

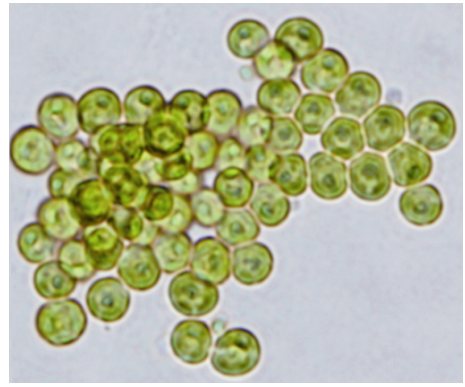


图 1 藻细胞形态

Fig. 1 Morphological characteristic of the algae cells

2.3 PC-IGS 鉴定结果

利用简并引物, 超声破碎(图 3A)和反复冻融(图 3B)两种方法处理藻细胞均能扩增出略小于 500 bp 的目的条带, 与目的条带 469 bp 相符。超声破碎 T_m 值为 55°C, 冻融处理 T_m 值为 49°C。冻融处理全细胞 PCR 效果及重复性好于超声破碎处理模板, 这跟超声波破坏 DNA 完整性有很大关系。胶回收目的条带, 连接 pMD18-T 载体, 挑取单克隆后菌液 PCR 检测, 样品送南京金思瑞生物科技有限公司测序。

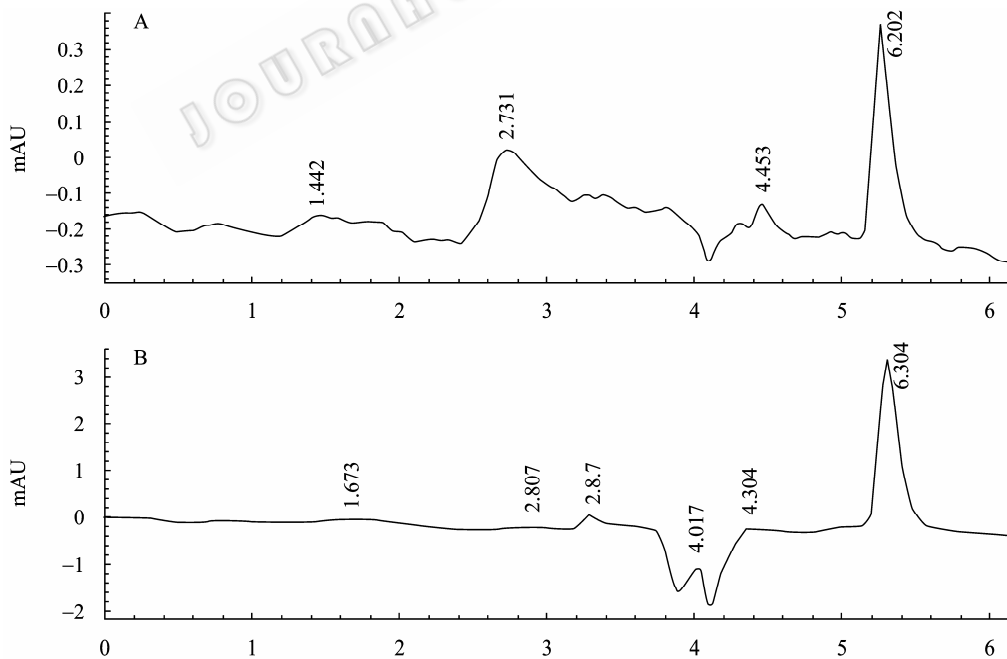


图 2 MCs 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of MCs

注: A: 样品; B: MC-LR 标准品。

Note: A: Sample; B: Standard MC-LR.

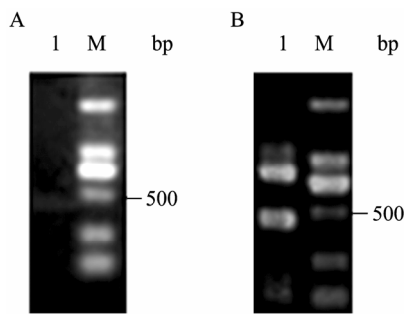


图3 PC-IGS PCR 扩增图谱

Fig. 3 Electrophoretic profile of PC-IGS amplified by PCR

注: A: 超声破碎; B: 冻融。1: PCR 产物; M: 100 bp marker.

Note: A: Ultrasonication; B: Freeze-thaw cycles. 1: PCR products; M: 100 bp marker.

将该藻株命名为 Chaohu-1, 序列提交 GenBank, 登录号为 GU220882。测序结果 BLAST 显示, 扩增得到的序列与 GenBank 中现有的多个铜绿微囊藻序列相似性达到 99%。其 PC-IGS 序列与多个铜绿微囊藻藻株序列多重比对结果完全一致, 如

UAM-AR3G (Spain)、NPLJ-4 (Brazil)、FACHB-907/908/936 (China), 与 PCC7806 (France)仅相差 1 个碱基, 如图 4 所示。

单纯的比较碱基组成尚不能区分微囊藻的种间关系, 利用 PC-IGS 序列的特异性能方便的区分微囊藻种属关系, 藻蓝蛋白 *cpcB* 和 *cpcA* 基因间隔序列是潜在的高变区, 在种属间具有很强的保守性, 可以真实的反应不同种属间的差异^[10], 这在藻类的分子鉴定方面也已得到公认, 国内外均有报道^[11-12]。系统发育分支情况也明确显示该藻株与铜绿微囊藻属的亲缘关系很近, 和其它种属藻类有较大差异如阿氏浮丝藻(*Planktothrix agardhii*)、泥生颤藻(*Oscillatoria limosa*)、水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*)、伯氏鱼腥藻(*Anabaena bergii*)、林氏念珠藻(*Nostoc linckia*), 见图 5。综合形态学与分子生物学的分析结果, 我们认为该藻株可归类为铜绿微囊藻。

<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB-936	TCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAACCG TAGGAAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACA
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB-908	TCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAACCG TAGGAAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACA
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB-907	TCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAACCG TAGGAAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACA
<i>Microcystis aeruginosa</i> chaohu-1	TCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAACCG TAGGAAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACA
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806	TCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAACCG TAGGAAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACA
<i>Microcystis aeruginosa</i> NPLJ-4	TCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAACCG TAGGAAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACA
<i>Microcystis aeruginosa</i> UAM-AR3G	TCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAACCG TAGGAAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACA

图4 chaohu-1 和各铜绿微囊藻藻株 PC-IGS 的序列比对

Fig. 4 The alignment between PC-IGS of Chaohu-1 and *M. aeruginosa*

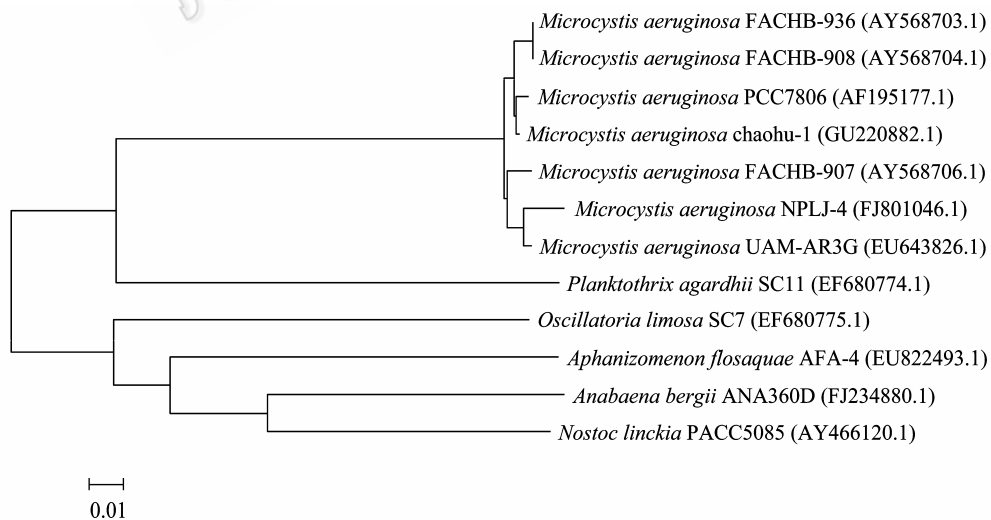


图5 chaohu-1 的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain chaohu-1

注: 线段 0.01 代表分支的序列差异, 括号内序号为 GenBank 中的登录号。

Note: Bar 0.01 represents sequence divergence, the GenBank accession number are showed in parentheses after each strain name.

2.4 藻株冻存复苏结果

通过前述冻存及复苏方法交叉试验发现加入5%终浓度甘油、-70°C 直接冻存1个月,采用冰浴缓慢升温或者30°C水浴急速升温均能复苏藻细胞,将待冻存的藻液冰浴预冷能提高复苏成功率。采用该方法批量重复试验,复苏成活率达到93%,表明成功摸索出该藻株的保存方法。

3 讨论

通过分离纯化培养得到单一的藻株,避免其余产毒藻类的影响,确保了后续试验的准确性。微囊藻的产毒株能产生毒性很大的MCs,通过水体或者食物链富集对哺乳动物有很强的肝毒性^[13],具有强烈的致癌性^[14]。2005年发现MCs的第2个靶器官是无脊椎动物的性腺^[15],鉴于人们对于环保和健康问题的关注,对于产毒藻株的深入研究是目前的热点。基于NOAA/AVHRR卫星资料对巢湖水华情况进行分析显示春夏两季为多发季,4月份和8月份的发生概率分别为19%和39%^[16],本次采集藻种选在4月旨在得到水华暴发中起重要作用的藻类。巢湖藻类群落多样性指数较低,基本构成种类为蓝、绿、隐、硅、裸5个门类,共计26种藻,其中铜绿微囊藻是绝对优势种^[17]。本实验分离得到的藻株chaohu-1形态特征与《中国淡水藻类》^[9]相似,再加上分子鉴定认定其为铜绿微囊藻,这跟铜绿微囊藻在巢湖的群体优势不无关系。传统的藻分离技术如毛细管分离、极限稀释法等技术难度大,或者难以得到无菌藻株,采用固体平板划线和液体培养相结合的方法简便易行,经证明较容易得到纯藻株。

培养方式选用静置培养,静置培养和振荡培养对于BG-11培养基中MC-LR产量无明显影响^[8]。较多文献提及的MCs检测方法主要有生物学检测、免疫学检测和化学检测。其中生物学检测费时、工作量大且准确性不够;ELISA免疫检测则需要单一的抗体且价格昂贵不便于推广。故本实验采用化学分析法最常用的高效液相色谱(HPLC)检测,该方法准确、灵敏,可以方便的鉴定微囊藻的产毒特性。提取制备的纯藻株产生的MCs经由C₁₈固相萃取柱纯化,HPLC检测虽然尚有些杂峰,但和标样LR具有基本相同的出峰时间,这也就证明该藻株至少产生LR。LR是化学结构被最早被阐明的MCs,且是目

前已知生理毒性仅次于二噁英的化合物^[18]。有学者认为微囊藻产毒株和无毒株的毒性是由遗传决定的^[19],该藻株的产毒基因簇决定其能产生MC-LR,这在MCs合成的分子机理等方面的研究中具有典型性。

对于微囊藻的分类一直存在争议,迄今为止国内报道的微囊藻共计26种,其中10种归为微囊藻属,2个变种被合并,6种被归入其他科属,剩余的8种存在疑问,具体分类仍需进一步研究^[20]。传统的藻分类从形态学上鉴定需要专业人员,费时费力,且相近种属的外表差异很难区分。尤其是实验室培养条件下藻的形态特征可能发生变化,应用分子生物学手段可以解决这一难题。本实验扩增得到分离藻株的藻蓝蛋白基因间隔序列,通过多重序列比对可认定本方法纯化得到的藻株是铜绿微囊藻,也进一步证实了PC-IGS作为分子标记的可行性。

藻株在长期继代过程中存在染菌风险,易随环境变化发生变异,丧失自身的生理活性和遗传特性,如藻毒素合成酶基因簇 mcy 的部分缺失或者点突变则有可能改变纯藻株的产毒特性^[21-22]。将藻株冻存,在需要的时候复苏可以很好的解决继代培养的种种不便且较为经济。本实验将藻液4°C预冷后加入渗透型保护剂甘油冻存,经证实能提高藻株的复活成功率。加入不同浓度的甘油,通过降温及复苏方式交叉对比发现,-70°C一步降温能达到较好的效果。在藻样解冻后应轻微操作,立即离心并用新鲜培养基洗去甘油,否则在液体培养基中会出现白色絮状沉淀,继而藻株死亡。

综上所述,本实验分离纯化方法得到纯藻株,经由形态学和分子生物学鉴定是铜绿微囊藻,HPLC检测确定为产毒株,并建立了可行的冻存复苏体系。结果对于相关藻类的分子生物学研究和藻种资源的保存具有参考价值。

参 考 文 献

- [1] Chen J, Xie P, Guo LG, *et al.* Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins LR and RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Environ Pollut*, 2005(134): 423-430.
- [2] 查向东, 刘杨, 王作利, 等. 微囊藻毒素生物合成研究进展. 重庆理工大学学报: 自然科学版, 2010, 24(1):

- 23-29.
- [3] 何家苑, 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] 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.
- [5] 陆源, 文建凡, 吕天雯. 滇池铜绿微囊藻的分离培养与总 DNA 提取的改进. 湖泊科学, 2001, **13**(3): 285-287.
- [6] 王霞, 吕宪国, 张学林. 松花湖铜绿微囊藻无菌株的分离及其生长特征. 中国环境科学, 2004, **24**(5): 579-583.
- [7] 班海群, 庄东刚, 朱静媛, 等. 微囊藻的分离纯化培养及产毒特性鉴定. 卫生研究, 2007, **36**(4): 424-426.
- [8] 马小妮, 薛文通, 魏军艳. 不同培养基及振荡对微囊藻生长和产毒的影响. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2009, **29**(2): 157-160.
- [9] 胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类—系统、分类及生态. 北京: 科学出版社, 2006: 61-79.
- [10] Brett A, Neilan BA, Jacobs D, *et al.* Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphism within the phycocyanin locus. *Appl and Environ Microbiol*, 1995(61): 3875-3883.
- [11] 钱开成, 陈迪, 林少君, 等. 两株淡水微囊藻的藻蓝蛋白基因间隔序列(PC-IGS)分析. 生态科学, 2005, **24**(2): 150-153.
- [12] do Carmo Bittencourt-Oliveira M, de Oliveira MC, Bolch CJS. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). *J Phycol*, 2001, **37**(5): 810-818.
- [13] Vasconcelos VM, Pereira E. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Wat Res*, 2001(35): 1354-1357.
- [14] Bstista T, Sousa GD, Suput S, *et al.* Microcystin-LR cause the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquatic Toxicol*, 2003(65): 85-91.
- [15] Chen J, Xie P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon*, 2005(45): 615-625.
- [16] 张红, 黄勇. 基于 NOAA/AVHRR 卫星资料的超乎水华规律分析. 中国环境科学, 2009, **29**(7): 727-732.
- [17] 张良璞. 巢湖藻类群落多样性分析. 生物学杂志, 2007, **24**(6): 53-54.
- [18] 宋立荣, 陈伟. 水华蓝藻产毒的生物学机制及毒素的环境归趋研究进展. 湖泊科学, 2009, **21**(6): 749-757.
- [19] Meißner K, Dittmann E, Borner T. Toxic and nontoxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiology Letters*, 1996(135): 295-303.
- [20] 虞功亮, 宋立荣, 李仁辉. 中国淡水微囊藻属常见种类的分类学讨论—以滇池为例. 植物分类学报, 2007, **45**(5): 727-741.
- [21] Tooming-Klunderud A, Mikalsen B, Kristensen T, *et al.* The mosaic structure of the *mcyABC* operon in *Microcystis*. *Microbiology*, 2008(154): 1886-1899.
- [22] Fewer DP, Rouhiainen L, Jokela J, *et al.* Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evolutionary Biology*, 2007(7): 183.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。