

微囊藻毒素合成酶基因的 PCR 检测方法

谢数涛¹, 龙思思¹, 韩博平^{1*}, 林少君¹, 钟秀英², 林桂花²

(1. 暨南大学水生生物研究中心, 广州 510632; 2. 广东省水文局, 广州 510150)

摘要:针对微囊藻毒素合成酶基因簇的核酸序列, 筛选特异性引物, 探索一种适用于自然水样中微囊藻产毒潜能检测的全细胞 PCR 方法。经灵敏度测试表明, 这种 PCR 方法的检测下限相当于 100 cells。该方法不需要提取基因组 DNA, 检测所需水样量少, 具有操作简便、快速、成本低、灵敏度高优点, 能应用于水库等饮用水源水体中具有产毒潜能的微囊藻的检测。

关键词: 微囊藻; 微囊藻毒素; PCR; *mcyB*; 水库

中图分类号: Q949.22

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)04-0315-04

A PCR Method for Detection of Microcystin Synthetase Gene

XIE Shu-tao¹, LONG Si-si¹, HAN Bo-ping¹, LIN Shao-jun¹, ZHONG Xiu-ying², LIN Gui-hua²

(1. Research Center of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Hydrology Bureau of Guangdong Province, Guangzhou 510150, China)

Abstract: Based on the sequences of *mcy* genes from *Microcystis*, a specific primer pair was determined. PCR-mediated detection of *mcyB* gene was developed and applied to the identification of potential microcystin produced from *Microcystis* strains in natural water bodies. The sensitivity of PCR method was investigated, and the detection limit was as few as 100 cells per reaction. The method does not require extraction of the genomic DNA of *Microcystis*, and does not need large volume of water samples. It is simple, sensitive, rapid and economical, which can be used for the detection of the toxic *Microcystis* strains in water sources for human consumption.

Key words: *Microcystis*; Microcystin; PCR; *mcyB*; Reservoir

微囊藻毒素是一种危害很大的藻类毒素, 其在自然环境中分布不均, 同一水体中其毒性大小及有无也不恒定^[1]。近年来对微囊藻毒素毒理的研究以及肝炎、肝癌的流行病学的调查发现, 饮用水源受微囊藻毒素污染可能是某些地区肝炎、肝癌高发的原因之一^[2]。因此对饮用水源水体中的产毒微囊藻进行检测非常必要。

目前, 用于微囊藻毒素的检测手段主要有小鼠法、HPLC、ELISA 以及细胞毒性监测法等。小鼠法、HPLC 以及细胞毒性监测法对实验条件要求较高, 不能推广到基层水文单位使用。ELISA 法具有特异性强、灵敏度较高、结果直观等优点, 可以直接用于微囊藻毒素的检测, 但由于对微囊藻毒素多种同系

物的识别需要广谱抗体, 这极大地限制了该方法的实际应用。此外, 上述方法都是针对微囊藻毒素进行检测, 因此不能在微囊藻毒素产生之前, 对水体中微囊藻的产毒潜能进行判断或预测, 从而难以满足水文部门有效监测饮用水源质量的要求。

自 1999 年 Nishizawa 等发现了 3 个与微囊藻毒素合成有关的基因后^[3], 用 PCR 方法对微囊藻的产毒潜能进行检测成为可能。Fergusso 等^[4]和潘卉等^[5]的研究表明, PCR 方法可以运用于微囊藻产毒潜能的检测; 针对微囊藻毒素合成酶基因的 PCR 检测结果与 ELISA、HPLC 以及小鼠法对微囊藻毒素的检测结果具有很好的一致性。本文针对微囊藻毒素合成酶基因簇的核酸序列, 筛选特异性引物, 探

收稿日期: 2004-12-03 接受日期: 2005-03-18

基金项目: 广东省水文局重点项目 GSWJ-03-04 资助

* 通讯作者 Corresponding author

索一种适用于饮用水源水体中微囊藻产毒潜能检测的 PCR 方法,并应用该方法对广东部分水库水样中的微囊藻进行了毒素基因检测。

1 材料和方法

材料来源 实验藻株由暨南大学生物研究中心分离,分属于水花微囊藻 (*Microcystis flos-aquae*)、铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)、具缘微囊藻 (*Microcystis marginata*)。水库水样分别采自汤溪水库、大镜山水库、沙田水库、高州水库、契爷石水库、深圳水库和新丰江水库。水样为表层水,采集后低温保存,带回实验室-20℃冷藏备用。

培养藻株藻细胞的收集 选取生长状况良好,处于对数生长期的藻株作为实验材料,藻密度经镜检计数为 $1.0 \times 10^7 - 1.0 \times 10^8$ cells ml⁻¹。取藻液 0.1 ml 至离心管中,加 H₂O 至 1 ml,7 200 ×g 离心 10 min,弃上清;沉淀用 H₂O 1 ml 悬浮,重复洗涤两次。沉淀的藻细胞用 100 μl 无菌双蒸水重悬备用。

水库水样藻细胞的收集 将水样解冻后,充分混匀;取 2 ml 水样于离心管中,7 200 ×g 离心 10 min,弃上清。取 30 μl H₂O 重悬沉淀备用。

基因组 DNA 的提取 取 10 ml 藻株培养液,2 500 ×g 离心 15 min,弃上清;沉淀用 0.5 ml H₂O 悬浮后,按 Qiagen 基因组 DNA 提取试剂盒 (DNeasy Tissue Kit) 中的操作程序提取藻株基因组 DNA。

灵敏度测试的实验材料准备 取处于对数生长期的藻株,于光学显微镜下观察、计数。离心收集藻细胞后,从藻样中取 20 μl,用无菌双蒸水稀释至 200 μl;按此方法进行 10 倍比系列稀释。

PCR 引物 针对微囊藻毒素合成酶基因簇的两对引物序列:

MAR (5'-TGCAGATAACTCCGCAGTTG-3')

和 MAF (5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3');

MBR (5'-CACTAACCCTATTTTGGATACC-3')

和 MBF (5'-GGATATCCTCTCAGATTCGG-3')。

针对藻胆蛋白基因的引物对序列:

PcR (5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3')

和 PcF (5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3')。

PCR 反应 PCR 反应体积为 50 μl,其中引物各 50 pmol, Taq 酶 2 U (上海申能博彩公司), dNTP 各 10 pmol, BSA (5 g L⁻¹, 广州宝龙公司) 1 μl (全细胞 PCR 时加入)。PCR 反应循环参数: 95℃ 10 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 10 s, 共 35

个循环,最后 72℃ 8 min。扩增结束后,取 PCR 产物 6 μl, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外下观察。以 DGL 2000 DNA marker 作 PCR marker (北京鼎国公司)。

PCR 产物测序 PCR 产物经回收、纯化后,由上海博亚公司用 3730 型自动测序仪进行序列测定。

2 结果

2.1 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

随机选取实验室分离的一株微囊藻 (铜绿微囊藻菌株 002 株) 进行扩大培养,取培养液 10 ml,离心沉淀藻细胞后,按 DNeasy Tissue Kit 中的说明,提取藻株基因组 DNA。以此为模板,分别以 MAR/F、MBR/F 和 PcR/F 为引物,进行 PCR 扩增。扩增产物经电泳后如图 1 所示。

微囊藻毒素合成酶 *mcyA* 和 *mcyB* 基因的两对特异性引物 MAR/F 和 MBR/F 未能扩增出阳性结果。在相同的 PCR 反应体系和反应条件下,藻胆蛋白基因的扩增结果为阳性,其扩增产物电泳后位于靠近 750 bp DNA 分子量标记处,与目标基因片段大小相符。

对藻胆蛋白基因的扩增产物回收、纯化后,由上海博亚公司测序。测序结果在 GenBank 注册,注册号为 AY568036。用 BLASTn 软件将所测序列与 GenBank 中已知藻胆蛋白核酸序列进行比较,相似性达 98%。表明扩增产物是目的片段。

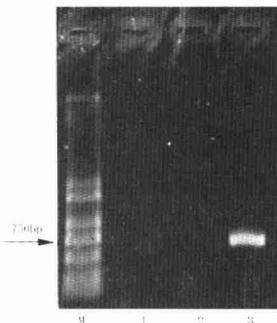


图 1 002 藻株基因组 DNA PCR 扩增结果 (引物对 MAR/F、MBR/F 和 PcR/F)

Fig. 1 PCR amplification products of cultured *M. aeruginosa* strain 002 with primers MAR/F, MBR/F and PcR/F
M: DNA Marker; 1: MAR/F; 2: MBR/F; 3: PcR/F

2.2 藻胆蛋白基因全细胞 PCR 扩增

取处于对数生长期的 5 株 (006、017; 铜绿微囊藻; 015; 水花微囊藻; 023、029; 具缘微囊藻) 微囊藻的培养液 0.1 ml, 经无菌水洗浴后, 以 PcR/F 为引物, 直接进行 PCR 扩增 (此时在 PCR 反应体系中加入 BSA)。扩增产物经电泳后如图 2 所示。

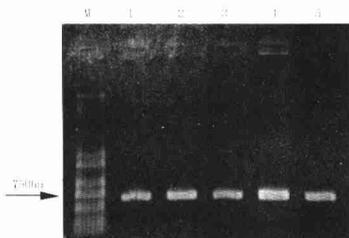


图 2 实验室培养藻株藻胆蛋白基因的 PCR 扩增结果
Fig. 2 PCR amplification products of cultured *Microcystis*
(*M. aeruginosa*: 006 and 017; *M. flos-aquae*: 015,
M. aeruginosa: 023 and 029) for phycoerythrin gene
M: DNA Marker: 1: 006; 2: 015; 3: 017; 4: 023; 5: 029

PCR 产物经电泳后位于近 750 bp DNA 分子量标记一侧, 与目标片段大小相符。表明在本文所设计的样品前处理及 PCR 反应条件下, 微囊藻细胞不需经藻细胞基因组 DNA 提取, 即能直接进行 PCR 扩增。

2.3 微囊藻产毒基因全细胞 PCR 扩增

取上述 5 株微囊藻培养液 0.1 ml, 经无菌水洗浴后, 分别以 MBR/F 和 PcR/F 为扩增引物, 以与藻胆蛋白全细胞 PCR 反应条件相同的 PCR 反应参数, 进行 PCR 扩增。扩增产物经电泳后如图 3 所示。

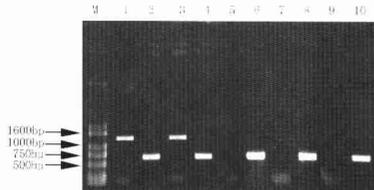


图 3 实验室培养藻株 *mcysB* 基因及藻胆蛋白基因的 PCR 扩增结果
Fig. 3 PCR amplification products of cultured *Microcystis*
(*M. aeruginosa*: 006 and 017; *M. flos-aquae*: 015,
M. aeruginosa: 023 and 029) for *mcysB* and
phycoerythrin gene
M: DNA Marker; 1, 2: 006; 3, 4: 015; 5, 6: 017; 7, 8: 023; 9, 10:
029. 其中 1, 3, 5, 7, 9 为 *mcysB* 基因, 2, 4, 6, 8, 10 为藻胆蛋白基因,
1, 3, 5, 7 和 9 为 *mcysB* gene; 2, 4, 6, 8 和 10 为 phycoerythrin gene.

对于微囊藻株 006 号和 015 号, MBR/F 均能扩增出预期大小的 DNA 片段, 并且无非特异性条带出现。将 015 号藻株的扩增产物回收、纯化后, 由上海博亚公司测序。测序结果在 GenBank 注册, 注册号为 AY568035。

用 BLASTn 软件将所测序列与 GenBank 中已知微囊藻毒素合成酶 *mcysB* 基因的核酸序列进行比较, 相似性达 99%, 表明扩增片段是目标序列。99% 的相似性也表明该基因片段的变异性非常小, 适于用作毒素合成酶基因 PCR 检测的目的片段。

2.4 PCR 检测法的灵敏度测试

取处于对数生长期水花微囊藻 015 藻株培养液 20 μ l, 加无菌水配制成连续 10 倍稀释梯度藻样, 以 MBR/F 为引物, 取模板 10 μ l, 进行 PCR 扩增。原始藻浓度经镜检约为 1.0×10^7 cells ml^{-1} 。

由表 1 可见, 在 50 μ l 反应体系中, 原藻液 (藻浓度约为 1×10^7 cells ml^{-1}) 稀释了 10^1 倍 (藻浓度约为 1×10^6 cells ml^{-1}) 时, 可扩增出特异性 DNA 目的片段; 稀释了 10^4 倍 (藻浓度约为 1×10^3 cells ml^{-1}) 后, 扩增结果为阴性。

表 1 PCR 检测微囊藻毒素合成酶 *mcysB* 基因的灵敏度测试
(引物为 MBR/F)

Table 1 The sensitivity test by PCR method for *mcysB*
with primers MBR/F

样品编号 Sample	1	2	3	4	5	6	7
稀释倍数 Fold of dilution	1	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
藻细胞浓度 Cell concentration of algae (cells ml^{-1})	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
PCR 检测结果 Result	+	+	+	+	-	-	-

+: 阳性 Positive; -: 阴性 Negative

2.5 部分水库水样的 PCR 检测结果

对广东地区部分饮用水水库水样进行采集, 从各水样中分别吸取 2 ml 进行离心浓缩, 终体积为 30 μ l; 取 10 μ l 为模板, 以 MBR/F 为引物, 进行 PCR 扩增。检测结果见表 2。

结果表明, 针对微囊藻毒素合成酶 *mcysB* 基因的全细胞 PCR 检测方法, 可以用于水库等饮用水水体中具有产毒潜能微囊藻的检测。

表 2 水库水样微囊藻毒素合成酶 *mcyB* 基因的 PCR 检测Table 2 PCR amplification of water samples from different reservoirs for *mcyB*

水库名称 Reservoirs	采样时间 Sampling date	样点名称 Sampling sites	检测结果 Detection
高州水库 Gaozhou	2003.07.08	大坝 Dam	-
高州水库 Gaozhou	2003.07.08	库中 Center	-
汤溪水库 Tangxi	2003.07.14	新桥 Xinqiao	+
深圳水库 Shenzhen	2003.07.22	入水口 Infall	-
沙田水库 Shatian	2003.09.16	大坝 Dam	-
汤溪水库 Tangxi	2003.11.04	溪头 Xitou	+
汤溪水库 Tangxi	2003.12.02	新桥 Xinqiao	-
大沙河水库 Dashahc	2003.12.15	副坝 Dam	-
新丰江水库 Xinfengjiang	2003.12.06	码头 Dock	-
契谷石水库 Qiyeshi	2003.12.22	九乡 Jiuxiang	-
契谷石水库 Qiyeshi	2004.02.17	新龙 Xinlong	-

+: 阳性 Positive; -: 阴性 Negative

3 讨论

由于本文在研究开展之前尚无确定的产微囊藻毒素的阳性藻株, 无法通过以阳性藻株为正对照, 建立产毒微囊藻的全细胞 PCR 检测方法。故利用微囊藻藻胆蛋白基因的高保守性, 以藻胆蛋白基因内的一段 DNA 作为目的片段, 通过对待检样品的前处理以及 PCR 反应体系进行不断调整、优化, 首先建立适用于藻胆蛋白基因的全细胞 PCR 检测方法, 以此为基础, 再建立针对微囊藻毒素合成酶基因的全细胞 PCR 检测方法。实验结果表明, 这一策略获得了成功。我们后来用本文方法对本实验室分离的广东共 12 个水库的 30 株微囊藻进行了检测, 发现 11 株微囊藻为阳性; 用 HPLC 和 ELISA 进行了部分阳性藻株的毒素检测, 结果与 PCR 一致 (另文报道)。

经多次 PCR 扩增发现, 引物对 MBR/F 具有较好的特异性。另一对引物 MAR/F, 经多次调整 PCR 反应体系及其它 PCR 反应条件, 在其目的扩增片段之前, 靠近溴酚蓝一端常出现一条非特异性扩增片段。因此本文舍弃 MAR/F, 确定以 MBR/F 作为微囊藻毒素基因 PCR 检测的特异性引物对。

根据毒素基因全细胞 PCR 检测的灵敏度实验结果可知, 按本文所采用的取样方法及反应体系 (反应体积为 50 μl 、模板体积为 10 μl), 被测藻细胞浓度在 1×10^4 cells ml^{-1} 以上就可检出阳性结果, 检测下限相当于 100 cells/反应。此外, 我们还以 MBR/F 为引物, 对本实验室所培养的其它藻株进行了 PCR 检测, 如斯氏藻 (*Scrippsiella*)、扁藻

(*Tetraselmis*)、绿色巴夫藻 (*Pavlovaviridis*)、盐藻 (*Dunaliella*)、三角褐脂藻 (*Phaeodactylum tricorutum* Bonlin)、角毛藻 (*Chaetoceros*) 和 *Paanalella virid* 等, 其检测结果均为阴性, 表明此对引物具有良好的特异性 (结果未列出)。

目前, 水库已成为广东及我国许多地区的主要饮用水源^[6], 微囊藻是水库水体中的常见藻种, 产毒微囊藻产生的微囊藻毒素能对人体及家畜肝脏造成损害。因此有必要对水库水体中产毒微囊藻的存在与否、产毒微囊藻的时空分布等情况进行调查或监测, 这就需要提供一种快速、简便、灵敏的产毒微囊藻检测方法。国内外对于湖泊水体中微囊藻的毒素合成酶基因 PCR 检测结果表明, PCR 法对于微囊藻产毒潜能的预测与用 ELISA 等传统方法对于微囊藻毒素的直接检测结果高度一致^[4,5]。此外, 与 ELISA 相比, PCR 方法成本低、灵敏度更高, 而且不需要进行大体积水样采集与藻细胞浓缩、毒素提取等步骤, 具有快速、简便的特点, 因此在理论上可以用于水库水体中微囊藻产毒潜能的监测。

本文运用 PCR 方法对广东地区部分水库水样进行检测, 获得初步成功。本文的产毒微囊藻全细胞 PCR 检测法不需要提取基因组 DNA, 对 2 ml 水库水样进行简单的洗涤、浓缩后, 即可直接用于 PCR 检测。该方法具有操作简便、快速、成本低等优点, 经进一步优化、简化及特异性检验后, 可望在基层水文单位使用。

参考文献

- [1] Yan H (闫海), Pan G (潘纲), Zhang M M (张明明). Advances in the study of microcystin toxin [J]. Acta Ecol Sin (生态学报), 2002, 22(11):1968-1975. (in Chinese)
- [2] Liu G M (刘桂明), Deng Y M (邓义敏), Li Y (李怡). Microcystins research [J]. Yunnan Environ Sci (云南科学环境), 2002, 21(2): 7-9. (in Chinese)
- [3] Nishizawa T, Asayama M, Fujii K, et al. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. [J]. J Biochem, 1999, 126(3):520-529.
- [4] Fergusson K M, Saint C P. Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5):4145-4148.
- [5] Pan H (潘卉), Song L R (宋立荣), Liu Y D (刘永定), et al. Characterization of toxic waterbloom-forming cyanobacteria by modified PCR [J]. Acta Hydrobiol Sin (水生生物学), 2001, 25(2):159-166. (in Chinese)
- [6] Lin Q Q (林秋奇), Han B P (韩博平). Reservoir limnology and its application in water quality management: An overview [J]. Acta Ecol Sin (生态学报), 2001, 21(6):1034-1040. (in Chinese)