

球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)叶绿体 *psaA* 基因片段的序列分析

杨泽民¹, 章群^{1*}, 谢数涛¹, 韩博平¹, 吕颂辉¹, Hodgkiss²

(1. 暨南大学水生生物研究所, 广东广州 510632; 2. 香港大学生物多样性系, 香港)

摘要: 根据 GenBank 中检索到的南极棕囊藻(*Phaeocystis antarctica*) *psaA* 基因序列设计 *psaAL* 和 *psaAR* 引物, 对球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)的 *psaA* 基因片段进行 PCR 扩增并测序, 获得了 629 bp 的 DNA 序列。应用 Clustal X 对球形棕囊藻 P1、P2 株系和南极棕囊藻的 *psaA* 基因片段序列进行比对, 结果表明, 球形棕囊藻 *psaA* 基因片段序列无插入/缺失, 核苷酸差异率为 3.34%。应用 DNASTAR 分析软件推断球形棕囊藻和南极棕囊藻的 *psaA* 基因对应的氨基酸序列和 RNA 二级结构, 发现它们的氨基酸序列差异不大, 序列中 209 个氨基酸只有 1 个发生了变化, 其氨基酸变异率为 0.48%; 除部分结构域比较相似外, RNA 二级结构上体现一定程度的差异, 这可能对棕囊藻的分子分类研究有参考价值。因所获得的 *psaA* 基因片段序列及氨基酸序列具有种的极端保守性, 不适宜用作 *Phaeocystis* 属种间的分子分类研究。

关键词: 球形棕囊藻; 南极棕囊藻; *psaA* 基因; DNA 序列; 氨基酸序列; RNA 二级结构; 藻类

中图分类号: Q949.261

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)05-0435-05

Sequence Analyses of Chloroplastic *psaA* Gene Fragment from *Phaeocystis globosa*

YANG Ze-min¹, ZHANG Qun^{1*}, XIE Shu-tao¹, HAN Bo-ping¹, LÜ Song-hui¹, Hodgkiss²

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of Biology Diversity, Hongkong University, Hongkong)

Abstract: Based on the complete *psaA* gene sequence of *Phaeocystis antarctica* in GenBank, two primers *psaAL* and *psaAR* were designed to amplify *psaA* gene sequence fragment of *Phaeocystis globosa*. An unambiguous sequence of 629 bp was gained, which was aligned with the complete *psaA* gene of *Phaeocystis antarctica* in Clustal X. The corresponding nucleotide dissimilarity of the two sequences was only 3.34%, and no insertion/deletion was found. The relative amino acid sequence and RNA secondary structure were concluded in DNASTAR. The concluded amino acid sequence was also conservative, and there was only one distinct base among 209 amino acids, with the difference of 0.48%. However, the concluded RNA secondary structures were quite unlike, apart from a few conservative domains. Perhaps the secondary structure of RNA may benefit the study on taxonomy of *Phaeocystis*. It is considered that the DNA sequences and amino acid sequences of *psaA* are conservative, which is unadvisable to use for molecular interspecific classification of the genus *Phaeocystis*.

Key words: *Phaeocystis globosa*; *Phaeocystis antarctica*; *psaA*; DNA sequence; Amino acid sequence; Secondary structure of RNA; Algae

棕囊藻属(*Phaeocystis*)隶属定鞭金藻纲(Prymnesiophyceae 或 Haptophyceae), 是有害赤潮藻, 能产生二甲基硫化物(DMS)和溶毒素等有害物质, 给

海洋水产业、海洋生态环境和自然景观造成严重的破坏。从1997年10月至1998年2月我国东南沿海首次爆发大规模棕囊藻赤潮以来, 1999年7月在饶

收稿日期: 2004-03-10 接受日期: 2004-06-04

基金项目: 国家自然科学基金(40106014); 广东省自然科学基金(000760)资助

* 通讯作者 Corresponding author

平、南澳等海域再次爆发了棕囊藻赤潮^[4]。近年来棕囊藻赤潮爆发的频率有加快的趋势,规模也不断扩大。以前作为温带和寒带海域的优势种球形棕囊藻(*P. globosa*)^[5]目前正不断地向热带和亚热带扩散,2003年8月和12月在广东饶平和珠海相继发生了两次赤潮,给我国沿海养殖业造成严重的危害。

棕囊藻由于具有复杂的异型生活史^[4,6],且形体微小、地理差异显著,缺少可靠而有效的鉴别特征,种类鉴定困难。棕囊藻属一般分为6种:*P. pouchetii*、*P. globosa*、*P. antarctica*、*P. cordata*、*P. scrobiculata*、*P. jahni*^[6],并且新的命名还在不断出现。由于棕囊藻分类的混乱,严重影响了信息和情报交流,给赤潮的预测和相关研究带来了困难。

随着分子标记技术的发展,DNA分子是区分不同类群的有效手段。目前应用于棕囊藻分子分类的DNA序列有ITS、18S rRNA、28S rRNA、5.8S rRNA、*rbcl*等,但都不很理想。叶绿体*psaA*基因是编码光反应中心蛋白A的基因,中心蛋白A因其能结合反应中心色素 P_{700} ,故又称 P_{700} 脱辅基蛋白,它是由叶绿体基因组编码的,位于大单拷贝区中央。Hwan等^[7]曾在研究*psaA*基因的系统发育时对南极棕囊藻(*P. antarctica*)的*psaA*基因序列有过报道,但有关球形棕囊藻的*psaA*基因研究还未见报道。本文报道球形棕囊藻P1株和P2株的*psaA*基因序列,并将其与南极棕囊藻的*psaA*基因序列进行比较,希望能找到一种有效的分子分类标准,以便为棕囊藻的分子分类和鉴定提供理论依据。

1 材料和方法

藻种来源 球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*) P1株和P2株由香港大学生物多样性系藻种室提供,采自香港将军澳水域。

DNA的提取 采用改良的CTAB(十六烷基三甲基溴化铵 Cetyltrimethylammonium bromide)法进行DNA提取。取少量藻液加入300 μ l CTAB和1%的蛋白酶K,50℃水浴3h,加入等体积的氯仿与异戊醇(24:1)抽提两次,在上清液加入5 μ l的玻璃粉,静置15–30 min,加3倍体积的Ultra-Sep™ Binding Buffer(Ultra-Sep Gel Extraction Kit-Omega),摇匀放置15–30 min,10 000 \times g离心10 min沉淀DNA,沉淀物用DNA Wash Buffer(Ultra-Sep Gel Extraction Kit-Omega)500 μ l冲洗两次,室温晾干,加40 μ l AE溶液(Ac/EDTA缓冲液)溶解1h以上,

离心去沉淀,DNA在-20℃保存备用。

***psaA*基因的扩增** 引物*psaAL*:5'-TGGATTAGTCAAGCATATTTCCACGGTGC-3';*psaAR*:5'-AGCATTTGGAGCAGTATTACCTGGAGC-3'。PCR反应在UNOII Biometra仪(德国Biometra产)上进行,20 μ l反应体系中含10 \times Ex Taq Buffer(Takara)2.0 μ l,dNTP(Takara)1.5 μ l,引物为0.8 μ mol/L,DMSO 1.5 μ l,Ex Taq polymerase(Takara)0.4 U,1 μ l模板DNA,灭菌蒸馏水。PCR反应条件:95℃变性4 min;然后29个循环,每个循环:95℃30 s,58℃45 s,72℃1 min,最后72℃延伸10 min。PCR扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳,EB(溴化乙锭 Ethidium Bromide)染色,在2F-90型暗箱式紫外透射仪下观察。

采用PCR产物直接测序,引物为*psaAL*和*psaAR*。序列分析在上海博亚公司PE ABI PRISM 377 DNA自动测序仪上进行。

数据分析 将实验测得的序列与从GenBank获得的南极棕囊藻*psaA*基因序列用Clustal X软件进行比对。用DNASTAR软件包推断基因片段的RNA二级结构。

2 结果和讨论

2.1 DNA的提取

本实验采用了改进的CTAB法提取DNA,获得了较好的结果,PCR扩增出来的条带亮且整齐,可能是棕囊藻能够形成囊状群体,细胞外周有一胶质层,含有较多的糖类次生物质,在加入CTAB裂解细胞时加入少量的蛋白酶K有助于细胞的裂解和DNA的释放,其次,在经过醇的抽提后,不是用盐直接沉淀,而是与试剂盒里的玻璃粉结合以纯化DNA,这样得到的DNA较纯,对以后的PCR反应干扰较少,有助于产量的提高。同时本方法未使用有毒物质酚,这样沉淀DNA时可大大节约时间,且对藻的量要求不高。因此,本实验方法对次生物质含量比较多且量较少的藻类和细菌的DNA提取可能是一种比较理想的方法。

2.2 *psaA*基因比较

DNA序列比较 经PCR扩增后测序表明,球形棕囊藻P1株和P2株的*psaA*基因序列完全相同(图1),无任何碱基替换,其中球形棕囊藻P1序列有516 bp,P2序列有629 bp,这说明从香港海域

不同地理环境中分离出的球形棕囊藻 P1 株和 P2 株的 *psaA* 基因序列非常保守。由此, 针对球形棕囊藻 P2 的 *psaA* 序列, 我们在 GenBank 中采用 BLAST 进行搜索, 发现同源性最高的南极棕囊藻 *psaA* 基因序列 (AY119720), 把它们的序列用 Clustal X 软件比对后得到 629 bp 的有效可比序列 (图 1)。再应用 DNASTAR 分析, 结果显示球形棕囊藻 P2 的碱基含量为: A(169) 26.91%、C(108) 17.20%、G(135) 21.50%、T (216) 34.39%, A+T 含量为 61.31%, C+G 含量为 38.69%; 南极棕囊藻的碱基含量为: A(172) 27.39%、C (103) 16.40%、G(132) 21.02%、T(221) 35.19%, A+T 含量为 62.58%, C+G 含量为 37.42%。两者 A、T 含量都明显高于 G、C 含量。大量实验证明线粒体中基因碱基 A、T 含量高于 G、C 含量^[8-10], 本实验显示叶绿体中 *psaA* 基因的碱基含量也具有类似的特点。在分析 *psaA* 基因的密码子时还发现其密码子第二位和第三位上是 A 或 T 的比例都在 60% 以上, 这与高等植物叶绿体 *psaA* 基因和其他基因表现出高度的一致性^[11]。 *psaA* 基因 A、T 含量高可能与其本身

的表达有关, Link^[12]和 Gilmarin 等^[13]研究发现 *psaA* 基因受光敏色素介导, 在转录水平上受光的调控, 而其 A、T 含量高, 则自由能相对较低, 从而更能迅速对环境的变化做出反应, 这也是生物进化的一种表现。

由两个序列比对结果可以看出, 球形棕囊藻 P1 株和 P2 株的 *psaA* 基因序列间无插入 / 缺失; 核苷酸差异数为 21, 核苷酸差异率为 3.34%, 其中 16 个位点为转换 (C-T 转换 12 个, A-G 转换 4 个), 5 个位点为颠换 (A-T 颠换 1 个, G-T 颠换 4 个)。核苷酸差异率明显大于两者在编码 PS II 的光反应中心 D1 蛋白 *-psbA* 基因 (1.88%) 中的差异 (待发表), 但由于对 *psaA* 基因所获得的序列不完全, 其是否适合用于棕囊藻种上水平的分子分类分析, 还需进一步的研究。

氨基酸序列比较 GenBank 中检索到的南极棕囊藻 *psaA* 完整基因序列已经包含起始密码子, 所以我们可以容易得到开放读框 (ORF)。选用 GenBank 中细菌和植物质粒密码子表, 将球形棕囊



图 1 球形棕囊藻 P1、P2 与南极棕囊藻 *psaA* 基因序列比对

Fig. 1 *psaA* gene sequences alignment of *P. globosa* P1, P2, and *P. antarctica*

“*”表示三者序列碱基相同, 空格表示有差异, “-”表示碱基缺失 Asterisk, space and short dash indicate base identical, different and absent, respectively.

藻 P2 *psaA* 基因 DNA 序列转化为相应的氨基酸序列,用 BLAST 的 CD (conserved domain)搜索氨基酸序列,发现在位点 67-76 之间有各种生物 *psaA* 基因共有的富含 L (5/10) 的保守结构域。将球形棕囊藻 P2 与南极棕囊藻(AAM62028)的氨基酸序列用 Clustal X 比对后(图 2),可以看出,在 209 个氨基酸序列中只有 1 个发生了变化,氨基酸变异率为 0.48%。在 21 个碱基替换中,大部分碱基变化发生在密码子的第三位上(18 个),由于密码子的兼并性没有引起氨基酸的变化,仅有 3 个碱基替换发生在密码子的第一位上,并且只有一个碱基的替换(位点 337)引起了氨基酸的变化(D-Y),在氨基酸序列中的第 113 个氨基酸上球形棕囊藻 P2 为不带电的天冬氨酸(D),南极棕囊藻为带负电的酪氨酸(Y)。这种差异可能与其生活的环境有着密切的

关系,球形棕囊藻 P2 主要生活在温带和亚热带的水域中,光照较强,光合作用也较活跃,其最佳生长温度为 25℃,而南极棕囊藻则仅分布在南极水体中,其最佳生长温度为 4.5℃,光合作用也相对较弱^[9]。

从球形棕囊藻 P2 和南极棕囊藻的氨基酸序列比较可以看出,氨基酸作为基因的表达产物和功能的执行者,其序列更加保守,这也从另一方面证明了 *psaA* 基因可能不适合用于棕囊藻种间水平的分子分类研究。

2.3 棕囊藻 *psaA* 基因 RNA 二级结构的分析

应用 DNASTar 软件包,根据获得的基因片段推断其 RNA 二级结构(图 3),由图可知,由于球形棕囊藻 P2 与南极棕囊藻 *psaA* 基因的碱基差异分布比较分散,其 RNA 二级结构总体差异较大,但是球形

```

P2          SGVQVTSGFFELWRAAGITNETELYWTAMGALGMSALMVFAGWFHYHKAAPKLEWFQNVESMMNHLAGLLGLGCLSWSGHQIHISLPINKLLDAGVAPQEIPLPH
P. antarctica  SGVQVTSGFFELWRAAGITNETELYWTAMGALGMSALMVFAGWFHYHKAAPKLEWFQNVESMMNHLAGLLGLGCLSWSGHQIHISLPINKLLDAGVAPQEIPLPH
*****
P2          ELLFNQDLMAQLYPSFKKGLLPFFTLNWSEYDFLTFKGGLNPITGSLWLTDAQHHHLALAVLFI FAGHMYRTNWSIGHSMKEILEAHKGPLTGECHKGLFEI
P. antarctica  ELLFNQDLMAQLYPSFKKGLLPFFTLNWSEYDFLTFKGGLNPITGSLWLTDAQHHHLALAVLFI FAGHMYRTNWSIGHSMKEILEAHKGPLTGECHKGLFEI
*****
  
```

图 2 球形棕囊藻 P2 和南极棕囊藻 *psaA* 基因编码的肽链氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acid sequence coded by amplified *psaA* gene fragments of *P. globosa* P2 and *P. antarctica* “*”表示两序列氨基酸相同,空格表示有差异 Asterisk and spaces indicate amino acid identical and different, respectively.

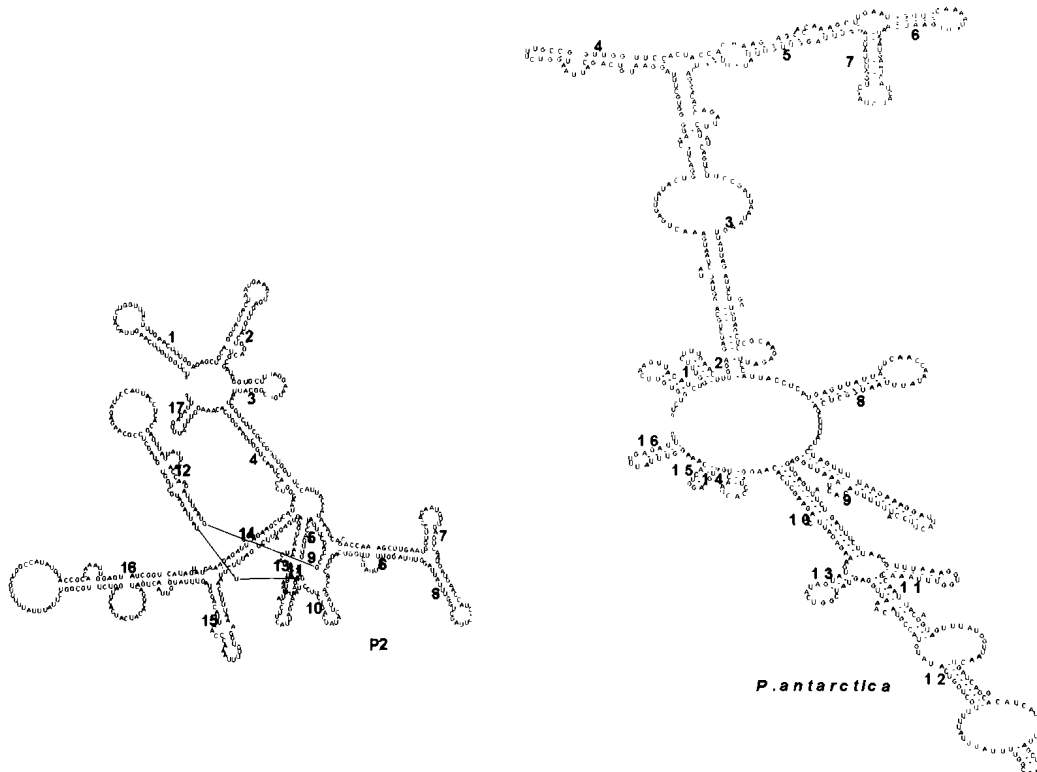


图 3 球形棕囊藻 P2 和南极棕囊藻 *psaA* 基因 RNA 二级结构
Fig. 3 The RNA secondary structures of *P. globosa* P2 and *P. antarctica* *psaA* gene

棕囊藻 P2 的 6、7、8 茎环结构与南极棕囊藻的 5、6、7 茎环结构域却表现出非常明显的相似性(图 3), 并且球形棕囊藻 P2 与南极棕囊藻富含 L(5/10)的保守结构域(位点 198–228)分别在 6、8 和 5、7 茎环中, 其分布也非常相似, 可见这一保守结构域不仅在蛋白质结构上保守, 而且在其 RNA 二级结构上也非常保守。同时, 也显示了不同种、不同地理环境下的棕囊藻, 其 RNA 二级结构也表现出明显的差异性, 这与王见杨等^[14]、Irina 等^[15]报道的家蚕微粒子病原虫和多核巨变形虫具有相同的结果。

综合 DNA 序列、氨基酸序列分析, 我们认为 *psaA* 基因 DNA 序列不适宜用作棕囊藻种间水平的分子分类研究, 但其 RNA 二级结构对于棕囊藻的分子分类分析有较好的参考价值。

参考文献

- [1] Wang C H(王朝晖), Lü S H(吕颂辉), Chen J F(陈菊芳), et al. Taxonomic studies on red tide causative algae on the Guangdong coast, south China sea [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 1998, 16(4):310–314.(in Chinese)
- [2] He J Y(何家苑), Shi Z X(施之新), Zhang Y H(张银华), et al. Morphologic characteristic and toxins of *Phaeocystis cf. pouchetii* (Prymnesiophyceae) [J]. J Ocean Limnol(海洋与湖沼), 1999, 30(2):172–179.(in Chinese)
- [3] Chen J F(陈菊芳), Xu N(徐宁), Jiang T J(江天久), et al. A report of *Phaeocystis globosa* bloom in coastal water of southeast China [J]. J Jinan Univ(Natl Sci)(暨南大学学报 自然科学版), 1999, 20(3):124–129.(in Chinese)
- [4] Huang C J(黄长江), Dong Q X(董巧香), Zhen L(郑磊). Taxonomic and ecological studies on a large scale *Phaeocystis pouchetii* bloom in the southeast coast of China during late 1997 [J]. J Ocean Limnol(海洋与湖沼), 1999, 30(6):581–590.(in Chinese)
- [5] Riegman R, Boekel W V. The ecophysiology of *Phaeocystis globosa*: a review [J]. J Sea Res, 1996, 35(4):235–242.
- [6] Chen L F(陈丽芬), Zhang Q(章群), Xu Z L(许忠能), et al. The taxonomy of *Phaeocystis* [J]. J Ecol Sci(生态科学), 2003, 22(1):93–94.(in Chinese)
- [7] Hwan S Y, Jeremiah D H, Debashish B. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(18):11724–11729.
- [8] Kong X Y(孔晓瑜), Yu Z L(喻子牛), Liu Y J(刘亚军), et al. Comparative study of mitochondrial *COI* gene fragment between Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and Japanese mitten crab (*Eriocheir japonica*) [J]. J Ocean Univ Qingdao (Natl Sci)(青岛海洋大学学报 自然科学版), 2001, 31(6):861–866.(in Chinese)
- [9] Howland D E, Hewitt G M. Phylogeny of the mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data [J]. Insect Mol Biol, 1995, 41:749–759.
- [10] Spicer G S. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex [J]. J Mol Evol, 1995, 41(6):749–759.
- [11] Gong X S(龚小松), Yan J Z(阎景超), Wu N H(吴乃虎), et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of chloroplast *psaA* gene from sorghum [J]. Chin J Biotechn(生物工程学报), 1992, 8(3):207–212. (in Chinese)
- [12] Link G. Photocontrol of plastid gene expression [J]. J Plant Cell Envir, 1988, 11:329–338.
- [13] Gilmartin P M, Sarokin L, Menelink J, et al. Molecular light switches for plant genes [J]. Plant Cell, 1990, 2:369–378.
- [14] Wang J Y(王见杨), Huang K W(黄可威), Lu C D(陆长德). Analyses of small subunit ribosomal RNA sequence of the microsporidium, *Nosema bombycis* and its secondary structure [J]. Acta Entomol Sin(昆虫学报), 2002, 45(3):290–295.(in Chinese)
- [15] Irina A M, Vladimir V A, Kirill A M. The unusual long small subunit ribosomal RNA gene found in a mitochondriate amoeboid flagellate *Pelomyxa palustris*: its rRNA predicted secondary structure and phylogenetic implication [J]. Gene, 2001, 272:131–139.

欢迎订阅 2005 年《果树学报》

《果树学报》是我国果树专业学术期刊, 着重选发密切结合我国果树(包括西瓜、甜瓜)科研、教学、生产实际、反映学科学术水平和发展动向的优秀稿件, 及时报道重大科研成果、阶段性成果和科研进展情况。栏目设置有专家论坛、研究论文、专论与综述、研究报告、新技术方法及新品种选育快报; 内容包括生物技术、品种与种质资源、生理与栽培、土壤与肥料、植物保护、贮藏加工等。双月刊, 全年 6 期, 国际标准开本, 2005 年起每期增至 96 页码, 定价 8.00 元不变, 全年 48.00 元, 铜版纸印刷, 邮发代号: 36–93, 统一刊号: CN 41–1308/S, 国际代号: BM1107。电话: 0371–5330997, E-mail: chinagsxb@163.com, 地址: 河南省郑州市航海东路南 中国农业科学院郑州果树所《果树学报》编辑部 邮编: 450009