

可用于相关亚历山大藻(*Alexandrium affine*)检测的一个寡核苷酸探针^{*}

唐祥海^{1,2} 于仁成¹ 陈 洋^{1,2} 张清春¹ 王云峰¹ 颜 天¹ 周名江¹

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071;

2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

提要 针对分离自南海的相关亚历山大藻, 在进行核糖体大亚基 DNA(LSU rDNA)全序列测序及比对的基础上, 设计了针对其核糖体大亚基 RNA(LSU rRNA)D10 区的一个新的荧光素(FITC)标记寡核苷酸探针, 并建立了相应的荧光原位杂交检测方法。在 GenBank 数据库中, BLAST 检索的结果显示所设计的探针具有较高的特异性。杂交实验的结果也表明, 这条探针对相关亚历山大藻的标记具有特异性, 且标记效率可以达到 100%, 标记信号清晰明亮。本研究结果为相关亚历山大藻的监测及其种群动态研究提供了方法学依据, 也为其它微藻特异性探针的设计提供了新的思路。

关键词 相关亚历山大藻, 寡核苷酸探针, 核糖体 RNA, 荧光原位杂交

中图分类号 X55

近年来, 有害赤潮发生的频率、规模有逐渐增加的趋势, 已经成为全球性的海洋环境问题(Hallegraeff, 1993; 周名江等, 2001)。在常见的有害赤潮原因种中, 亚历山大藻属的部分藻种由于能够产生麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poison, PSP)而成为关注的热点。然而, 随着研究的深入, 人们发现该藻属中一些不能产生 PSP 毒素的藻种也有可能对海洋生物及近海生态系统造成不利影响。相关亚历山大藻曾在日本、印度尼西亚及葡萄牙等国引起过赤潮(Nakanishi *et al.*, 1996; Wagey *et al.*, 1998; Moita *et al.*, 2003), 大多数研究表明这一藻种不能产生麻痹性贝毒, 但在越南沿海分离的一株相关亚历山大藻中曾检测到少量的麻痹性贝毒毒素(Nguyen, 2004)。该藻种在东海及南海均有分布(Wang *et al.*, 2006)。本实验室以往的研究发现, 相关亚历山大藻对轮虫(如褶皱臂尾轮虫)、枝角类(如蒙古裸腹溞)、甲壳类(如黑褐新糠虾)和贝类幼体(海湾扇贝、文蛤及太平洋牡蛎)的存活、繁殖和发育存在不利影响(Wang *et al.*, 2005; 陈桃英等, 2006,

2007; 张彬等, 2008), 因此, 对于这一藻种在赤潮监测中也应予以充分重视。

传统的分类学及浮游植物调查和研究方法在有害赤潮研究中具有一定的局限性, 因此, 分子生物学技术和方法近年来逐渐应用于有害赤潮的研究和监测, 取得了许多重要的进展(Godhe *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2006)。其中, 荧光原位杂交技术(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)得到了广泛的应用(Sako *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2005; 于仁成等, 2006), 已成为有害赤潮研究与监测的最具潜力的技术之一。在我国, 针对亚历山大藻的分子生物学检测方法研究也已开展(黄邦钦等, 2003)。2006 年, 在系统分析我国沿海 9 株亚历山大藻的部分核糖体 DNA 序列后发现, 我国近海至少存在三种亚历山大藻的核糖体型, 即塔玛/链状亚历山大藻复合种的亚洲温带核糖体型、相关亚历山大藻核糖体型和微小亚历山大藻的新西兰核糖体型(唐祥海等, 2006)。在此基础上, 通过设计针对核糖体大亚基 RNA (LSU rRNA)D1—D2 区的特异性寡

^{*} 中国科学院知识创新工程重要方向性项目, KZCX2-YW-208 号; 国家高技术研究发展计划项目(863)资助, 2006AA09Z178 号。唐祥海, 博士, E-mail: txianghai@126.com

通讯作者: 于仁成, 博士, 研究员, E-mail: rcyu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2007-08-17, 收修改稿日期: 2007-10-23

核苷酸探针, 建立了基于荧光原位杂交技术的塔玛/链状亚历山大藻复合种亚洲温带核糖体型的检测方法(于仁成等, 2006)。

本研究中, 作者针对中国近海的相关亚历山大藻, 测定了其核糖体大亚基 RNA 基因全序列信息, 并在序列比对的基础上设计了特异性的寡核苷酸探针, 建立了相关亚历山大藻的荧光原位杂交检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验藻株及培养条件

本实验中所用的藻株及其来源如表 1 所示。其中, 将相关亚历山大藻(AC-1 藻株)作为目标藻种, 其它亚历山大藻藻株及常见的赤潮藻种作为非目标藻种, 用来检验探针的特异性。所用藻种在中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室内保种培养。培养液采用 *f/2*-Si 配方, pH 值为 7.9 ± 0.1 , 盐度为 30

± 1 。实验藻种培养温度为 (21 ± 0.5) , 光照约为 4000 lx, 光暗比(L : D)为 14h : 10h。

1.2 探针设计与合成

本方法中的寡核苷酸探针系针对相关亚历山大藻 LSU rRNA 设计。根据作者所测定的目标藻 LSU rDNA 序列信息, 结合 GenBank 中所有已知的亚历山大藻的相关序列信息, 通过序列对比找出适合探针设计的区域, 以 Oligo 6 软件设计探针, 并手工对比优化。探针设计完成后, 以 GenBank 数据库中的 BLAST 程序进行相似查找。寡核苷酸探针 AF-1(5'-AGTTCCAAAACCTTACAAGTGAGT-3')的 5' 端以荧光化合物 FITC 标记。另外, 实验中还使用了针对亚历山大藻属的一条保守探针(CONS-PROBE)和针对塔玛/链状亚历山大藻复合种亚洲温带核糖体型藻株的一条特异探针(SPEC-PROBE2)(于仁成等, 2006), 以进行探针杂交效果的比较分析。所有探针均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 实验中所用藻种的名称及株系
Tab.1 Species and strains of algae used in the experiment

种名	株系	分离地	来源	PSP
<i>A. tamarense</i>	ATHK	南海	暨南大学	+
<i>A. tamarense</i>	AT-6	未知	美国伍兹霍尔海洋研究所	-
<i>A. affine</i>	AC-1	南海	暨南大学	-
<i>A. minutum</i>	AM	台湾	台湾大学	+
<i>A. lusitanicum</i>	AL-1	未知	德国海果兰海洋生物研究所	-
<i>Prorocentrum micans</i>	PM-1	胶州湾	中国科学院海洋研究所	-
<i>Prorocentrum donghaiense</i>	PD-G12	东海	中国科学院海洋研究所	-
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	ST-D6	东海	中国科学院海洋研究所	-
<i>Heterosigma akashiwo</i>	HA-1	胶州湾	中国科学院海洋研究所	-

1.3 藻细胞标记和探针特异性检验

实验中采用的藻细胞荧光原位杂交技术, 系参照于仁成等(2006)提出的方法, 但对实验过程进行了进一步的优化和简化, 更换了缓冲液, 并略去了探针的高温处理步骤。实验步骤简要描述如下: 取目标藻株和非目标藻株培养液各 5ml, 离心收集(6000r/min $\times$ 2min); 以含有 4%多聚甲醛的 PBS 溶液(685mmol/L NaCl, 14mmol/L KCl, 40.5mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 7.5mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.5)重新悬浮, 置于冰上固定 5—10min; 再次离心收集藻细胞, 并加入 500 μl 80%乙醇溶液进行脱水(冰上放置 30min); 加入杂交缓冲液[40%甲酰胺, 4 $\times$ SSPE (600mmol/L NaCl, 40mmol/L NaH_2PO_4 , 4mmol/L EDTA, pH 7.4)] 500 μl 于 40 $^\circ\text{C}$ 预杂交 10min; 更换杂交缓冲液(40%甲酰胺, 4 $\times$ SSPE, 其

中探针终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$), 重新悬浮预杂交后的藻细胞, 40 $^\circ\text{C}$ 下杂交 30min, 期间每 10min 将藻细胞悬浮一次; 待杂交反应完成后, 以 500 μl 1 $\times$ SSPE 溶液在 40 $^\circ\text{C}$ 洗涤两次, 每次 5min; 离心后的藻细胞以 1 $\times$ SSPE 溶液重悬浮, 并置于 4 $^\circ\text{C}$ 下黑暗中保存。

杂交后的藻细胞以荧光显微镜(Eclipse 50i, Nikon)观察杂交效果, 并记录阳性标记率。在观察 FITC 荧光标记的藻细胞时应用蓝色滤色块 B-2A(EX450-490, DM505, BA520)。阳性标记率以观察的多个视野中标记藻细胞占细胞总数的比例表示。

2 结果

2.1 探针设计

通过比较不同核糖体型亚历山大藻的 LSU

rDNA 序列, 选择核糖体大亚基 rRNA 的 D10 区作为探针设计的靶区域(图 1)。图中, 序列 AF 是指相关亚历山大藻(*A. affine*); 序列 TA 是指塔玛/链状亚历山大藻复合种的亚洲温带核糖体型; 序列 WE 是指塔玛/链状亚历山大藻复合种的西欧核糖体型; 序列 PO 是指微小亚历山大藻的葡萄牙核糖体型; 序列 NZ 是指微小亚历山大藻的新西兰核糖体型; 从图 1 中可以看出, 所选的区域特异性较好。并且, 对此段序列的溶解温度及二级结构等参数的分析表明, 这一区域适合探针的设计。使用 BLAST 程序, 在 GenBank 数据库中进行相似查找的结果显示, 除 *A. affine* 的相关序列外, 无其它序列与探针相匹配。

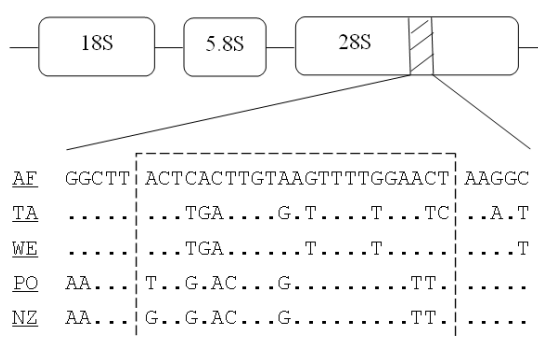


图 1 探针 AF-1 设计所针对的核糖体大亚基区域及其序列信息

Fig.1 The region and sequence information used for design of probe AF-1

2.2 荧光显微镜检测结果

应用所设计的探针 AF-1 及其它两条探针(本实验中用作阳性对比的保守性探针 CONS-PROBE 和用作阴性对比的 SPEC-PROBE2), 通过全细胞荧光原位杂交方法对各个实验藻株进行了标记, 标记效果如图 2 所示。可见, 荧光标记探针 AF-1 能够特异性地标记目标藻种相关亚历山大藻 AC-1 藻株, 而在其它亚历山大藻藻细胞中没有荧光标记信号。用作阴性对比的 SPEC-PROBE2 探针没有在相关亚历山大藻中产生标记信号, 只标记了其目标藻塔玛亚历山大藻 ATHK 藻株。与两条特异性探针相比, 用作阳性对比的亚历山大藻属保守探针 CONS-PROBE 在所有亚历山大藻中都产生了明亮的绿色荧光信号。这三条探针在选用的非亚历山大藻实验藻种中(表 1)均未产生标记信号。结果表明, 作者所设计的 AF-1 探针能够特异性地标记相关亚历山大藻。

实验发现, 探针对目标藻的标记效率均可达到 100%。被标记的藻细胞内部荧光信号明亮, 充满整个藻体, 显示该探针对胞质中普遍存在的 rRNA 进行了很好的标记。

3 讨论

由于生物细胞中存在多拷贝的 rRNA, 因此, 基于分子生物学的检测方法常常以 rRNA 作为检测的靶目标。rRNA 是 rDNA 的转录产物, rDNA 存在于所有

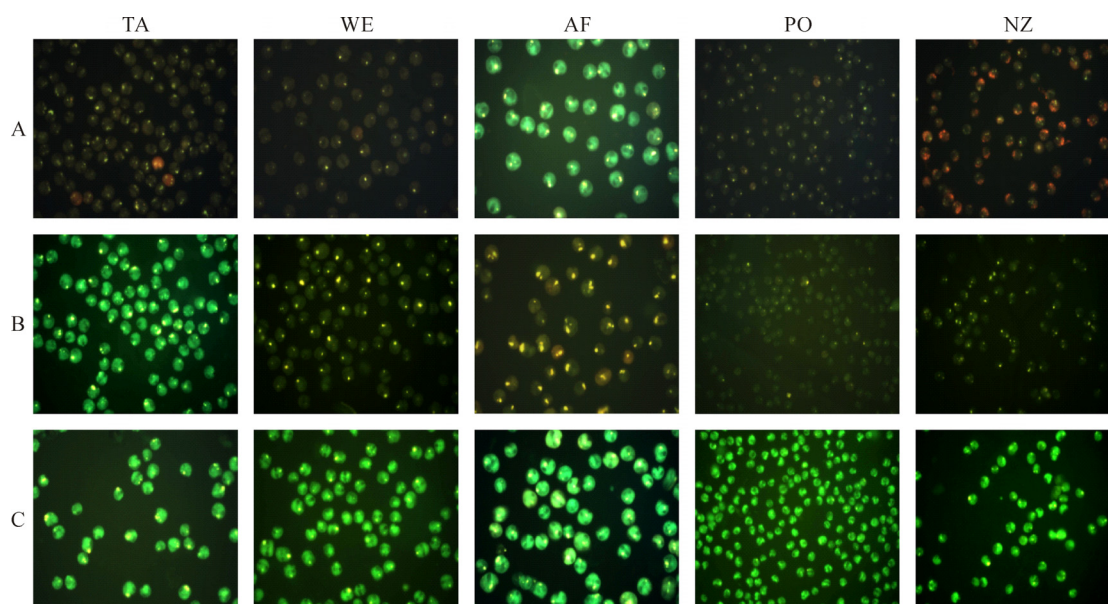


图 2 三条探针对五种核糖体型亚历山大藻的检测结果对比

Fig.2 Comparison of labeling results on five ribotypes of *Alexandrium* spp. using three fluorescent probes
A: 应用探针 AF-1 的检测结果; B: 应用探针 SPEC-PROBE2 的检测结果; C: 应用探针 CONS-PROBE 的检测结果

的生物细胞中, 并且具有相似的结构和功能, 是可用于对几乎所有生物进行比较分析的分子指标。在 rDNA 的保守区中, 存在着与属、种等相对高级分类阶元有一定对应关系的核苷酸序列; 而在其高变区中, 则有可能存在着与种、亚种甚至地理株等相对应的核苷酸序列。这些特征性核苷酸序列应当可以作为传统分类学的辅助, 对生物进行简便、快速和可靠的鉴定。根据 rDNA 特异性序列, 可以设计针对 rRNA 的特异性探针, 实现特定藻种的检测。

标记相关亚历山大藻的特异性探针, 以往主要依据 LSU rDNA D2 区中的种特异性序列设计(Kim *et al*, 2005)。本次实验中, 作者首先测定了该藻种 LSU rDNA 的全序列, 然后在其 D10 区找到这一特异性较好的区域。针对这一区域所设计的探针改善了对相关亚历山大藻和塔玛/链状亚历山大藻西欧核糖体型藻株的分辨率, 由原来的 3/20(其中 1 个位于末端; 另外 2 个相邻且位于序列中间, 两侧为大片段的一致序列)提高到 5/23(分布较分散)。针对该区域设计种特异性探针的工作, 尚属首次。实验证明, 该区适合探针的设计, 且探针的杂交效率较高。

自然水体中, 不同的亚历山大藻藻种可能同时存在, 但它们的产毒特征有明显差异, 危害效应和机理也有很大差别。因此, 为预判特定种群增殖及扩散所造成的生态学效应, 就需要发展新的技术和方法, 尽早对藻种进行种类判别。在苏格兰东海岸, 能够产生 spirolide 毒素的亚历山大藻 *A. ostenfeldii* 与产 PSP 毒素的亚历山大藻 *A. tamarense* 同时存在, 德国学者设计了针对二种亚历山大藻的特异性探针, 能够在监测中对两个藻种加以区分(John *et al*, 2003)。2005 年, 他们又针对塔玛/链状亚历山大藻复合种, 分别设计了无毒的西欧核糖体型、无毒的地中海核糖体型和产 PSP 毒素的北美核糖体型的特异性探针(John *et al*, 2005)。作者在以往的研究中发现, 不产 PSP 毒素的相关亚历山大藻与产 PSP 毒素的塔玛亚历山大藻、链状亚历山大藻在东海和南海均有分布(唐祥海等, 2006), 极有可能影响亚历山大藻赤潮监测的准确性。2006 年, 作者通过设计特异性的寡核苷酸探针, 应用荧光原位杂交技术, 实现了对塔玛/链状亚历山大藻复合种亚洲温带核糖体型的特异性标记和检测(于仁成等, 2006)。本文中针对相关亚历山大藻设计特异性的探针, 为进一步甄别两种亚历山大藻以及开展对相关亚历山大藻的监测和种群动态研究提供了重要的方法学依据。

实验中, 作者对原有的荧光原位杂交方法也进行了修订: 更换了缓冲能力更强的杂交缓冲液, 防止其中的甲酰胺降解所导致的溶液 pH 值升高; 去掉探针高温处理的步骤, 因为它可能会对探针的杂交效果带来影响。实验发现, 探针对目标藻细胞的荧光标记效率可以达到 100%, 且标记信号清晰明亮。

4 结论

本文中针对分离自南海的相关亚历山大藻, 设计了针对核糖体大亚基 RNA(LSU rRNA)D10 区的一条新的荧光标记寡核苷酸探针, 并建立了相应的荧光原位杂交检测方法, 实验结果表明, 该探针对相关亚历山大藻的标记效率可以达到 100%, 标记信号清晰明亮。本实验的结果为相关亚历山大藻的监测及其种群动态研究提供了重要的方法学依据, 也为其它微藻特异性探针的设计提供了新的思路。

致谢 本实验中所用的部分藻种来自暨南大学、台湾大学、美国伍兹霍尔海洋研究所、德国海果兰海洋生物研究所, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 于仁成, 唐祥海, 张清春等, 2006. 应用荧光原位杂交方法检测中国沿海塔玛/链状亚历山大藻复合种(亚洲温带基因型). 环境科学学报, 26(4): 646—651
- 张 彬, 颜 天, 周名江, 2008. 一株非 PSP 产毒的亚历山大藻对黑褐新糠虾的急性和慢性毒性影响. 水产学报, 32(1): 111—116
- 陈桃英, 颜 天, 刘利平等, 2006. 相关亚历山大藻对文蛤和太平洋牡蛎胚胎和幼虫发育的影响及机制. 海洋与湖沼, 37(增刊): 197—204
- 陈桃英, 颜 天, 刘利平等, 2007. 亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响及致毒机制研究. 中山大学学报(自然科学版), 46(2): 77—81
- 周名江, 朱明远, 张 经, 2001. 中国赤潮的发生趋势和研究进展. 生命科学, 13(2): 54—59
- 唐祥海, 于仁成, 颜 天等, 2006. 中国沿海亚历山大藻(*Alexandrium*)核糖体 rDNA 部分序列分析及该藻属分子系统进化研究. 海洋与湖沼, 37(6): 529—535
- 黄邦钦, 陈纪新, 焦念志等, 2003. 应用荧光原位杂交和特异性寡核苷酸探针检测亚历山大藻属(*Alexandrium*)和塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*)的探索. 高技术通讯, 13(增刊): 90—95
- Anderson D M, Kulis D M, Keafer B A *et al*, 2005. Identification and enumeration of *Alexandrium* spp. from the Gulf of Maine using molecular probes. Deep-Sea Research II, 52: 2467—2490
- Cai Q S, Li R X, Zhen Y *et al*, 2006. Detection of two *Prorocentrum*

- trum* species using sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay. *Harmful Algae*, 5: 300—309
- Godhe A, Cusack C, Pedersen J *et al*, 2007. Intercalibration of classical and molecular techniques for identification of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) and estimation of its cell densities. *Harmful Algae*, 6(1): 56—72
- Hallegraeff G M, 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32: 79—99
- John U, Cembella A, Hummert C *et al*, 2003. Discrimination of the toxigenic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. *Eur J Phycol*, 38(1): 25—40
- John U, Medlin L K, Groben R, 2005. Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the *Alexandrium tamarense* species complex. *J Plankton Res*, 27: 199—204
- Kim C J, Kim C H, Sako Y, 2005. Development of molecular identification method for genus *Alexandrium* (Dinophyceae) using whole-cell FISH. *Mar Biotechnol*, 7(3): 215—222
- Moita M T, Oliveira P B, Mendes J C *et al*, 2003. Distribution of chlorophyll *a* and *Gymnodinium catenatum* associated with coastal upwelling plumes off central Portugal. *Acta Oecologica*, 24: S125—S132
- Nakanishi K, Adachi M, Sako Y *et al*, 1996. Detection of the red tide-causing plankton *Alexandrium affine* by a piezoelectric immunosensor using a novel method of immobilizing antibodies. *Anal Lett*, 29: 1247—1258
- Nguyen N L, 2004. An autecological study of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium affine* isolated from Vietnamese waters. *Harmful Algae*, 3(2): 117—129
- Sako Y, Hosoi-Tanabe S, Uchida A, 2004. Fluorescence in situ hybridization using rRNA-targeted probes for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella*. *J Phycol*, 40: 598—605
- Wagey G A, Wiadnyana N N, Taylor F J R, 1998. Short note on *Alexandrium affine* (Inoe and Fukuyo) Balech red tide in Ambon Bay, Indonesia. *The South East Asian Harmful Algae Bulletin*, 4(2): 1—2
- Wang D Z, Zhang S G, Gu H F *et al*, 2006. Paralytic shellfish toxin profiles and toxin variability of the genus *Alexandrium* (Dinophyceae) isolated from the Southeast China Sea. *Toxicon*, 48: 138—151
- Wang L, Yan T, Yu R C *et al*, 2005. Experimental study on the impact of dinoflagellate *Alexandrium* species on populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae*, 4(2): 371—382

A OLIGONUCLEOTIDE PROBE FOR DETECTION OF *ALEXANDRIUM AFFINE*

TANG Xiang-Hai^{1,2}, YU Ren-Cheng¹, CHEN Yang^{1,2}, ZHANG Qing-Chun¹,
WANG Yun-Feng¹, YAN Tian¹, ZHOU Ming-Jiang¹

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049)

Abstract Many species in Genus *Alexandrium* were important harmful-algal-bloom causative species for their capability in producing paralytic shellfish poisons (PSPs). *Alexandrium affine*, however, does not produce PSPs, but it can still do harm to the growth, reproduction and development of organisms such as rotifer, cladoceran, crustacean and larvae of molluscan, through a kind of unidentified toxins. Using a strain of *A. affine* (AC-1) isolated from the South China Sea of China, we designed a new oligonucleotide probe (AF-1) based on the analysis of its sequence information of the large sub-unit ribosomal RNA (LSU rRNA) gene and the comparison of the LSU rRNA gene sequence with related species. The probe, specifically targeted on the D10 region of the LSU rRNA, was labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). A fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method for the “whole-cell” identification of *A. affine* was also established. A BLAST analysis of the designed probe in the GenBank database found that the probe AF-1 had a high specificity in identification of *A. affine*. The FISH experiment also confirmed that the probe AF-1 could specifically label the cells of *A. affine*, not the other algal cells used in the experiment. The labeling efficiency of target cells could reach 100%, with bright green signal under fluorescence microscope. These results laid a technical basis for monitoring and studying of *A. affine* and its population dynamics, and offered a new idea for the designation the specific probes for other algae.

Key words *Alexandrium affine*, Oligonucleotide probe, rRNA, Fluorescence *in situ* hybridization