

构建用于相关基因筛选的微囊藻产毒株基因组文库

周晓明 姚露洋 俞顺章

【摘要】 目的 构建含有微囊藻毒素(MC)表达相关基因的基因组文库,用于分离 MC 相关基因或鉴别 MC 表达藻株。方法 使用 MC 产毒藻株 NIES-90,获取基因组 DNA,酶切制备片段,克隆到质粒 pUC18 中,转化 JM109 构成基因组文库。结果 建成容量覆盖蓝绿藻基因组 10 倍以上,插入片段介于 200~700 bp 的 NIES-90 基因组文库,其中获得至少一段序列具有 NIES-90 特异性,可能为 MC 相关基因。结论 构建文库成功,可用于后续 MC 特异性基因研究。

【关键词】 微囊藻毒素;基因组文库

NIES-90 microcystin producing algae strain genome library construction and one isolated gene analysis
ZHOU Xiaoming, YAO Luyang, YU Shunzhang. Institute of Preventive Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To construct a plasmid microcystin genome library for microcystin (MC) pertaining gene family screening or microcystin strain specific gene screening. **Methods** Extracting genome DNA from MC producing strain NIES-90, then digesting DNA by Hind III and ligating to CIPase treated pUC18/ Hind III fragment which later transformed to JM109. After checking the library by Xgal/Antibiotics plate, clones isolation, a few clones were sequenced and specific primers synthesized; finally, PCR was used to testify clone's NIES-90 strain specificity. **Results** Successfully constructed a NIES-90 genome plasmid library with following functions: a) cloning efficiency more than 95% by comparing the white/blue clones ratio in Xgal Plate; b) 200-700 bp average insert length with 3×10^5 independent clones by independent clones analysis; c) 10 times more coverage of original NIES-90 genome; d) strong strain specificity by cross PCR analysis of some clone's sequence in two different microcystin strains compared with FACHB-469. **Conclusion** We successfully constructed a NIES-90 MC producing microcystin strain's genome plasmid library which could be used for screening MC pertaining gene family because of high strain specificity of some clones.

【Key words】 Microcystin; Genome plasmid library

每年夏秋季的蓝绿藻爆发已成为我国各大水体湖泊的一大环境问题,不但影响观瞻亦可能对饮用水体的动物和人类造成健康危害^[1]。在我国占优势比例的蓝绿藻种为微囊藻,流行病学调查发现其次生代谢物微囊藻毒素(MC)对动物及人体有毒害作用^[2],因此了解毒素的产生及毒理过程可为采取对应措施提供背景知识。一般认为 MC 的表达受中间合成酶的影响,有基因群参与其中。我们希望研究 MC 产毒与无毒藻株的基因差别来了解 MC 相关基因群。我们已经分离到产毒株 NIES-90 和无毒株 FACHB-469。通过构建 NIES-90 的基因组文库,使其含有 MC 相关基因群,经与 FACHB-469 对比

筛选,获得 NIES-90 株系特异性的基因,进一步验证与 MC 毒素产生的关系,可作产毒机理研究或作产毒藻株的快速 PCR 基因检定用。以下描述过程,以及初步筛选获得的一段 DNA 序列的情况。

材料和方法

1. 藻种与培养 :NIES-90 微囊藻 MC 产毒藻种来源于日本国立环境健康研究所。使用 HGZ 培养基,28℃ 200 流明,12 h 间隔光照,培养至藻体浓度为 3×10^6 /ml。FACHB-469 微囊藻 MC 不产毒藻株来源于中国科学院水生生物研究所。毒素的产生情况经酶联免疫吸附试验(ELISA)鉴定。

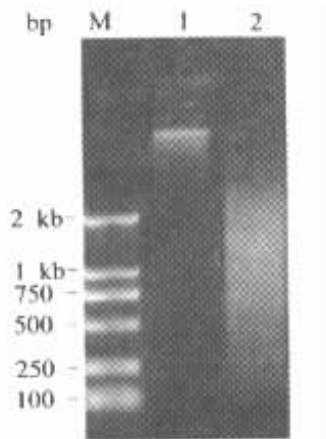
2. 基因组 DNA 提取 :取 200 ml 藻培养液,5 000 g 离心 10 min,取沉淀,以 50 mmol/L Tris·

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39730380)
作者单位 200032 上海,复旦大学预防医学研究所分子流行病学研究室

Cl, 10 mmol/L 乙二胺四乙酸钠 20 ml 重悬, 65°C 20 min 破解细胞, 5 000 g 离心 15 min 弃沉淀, 上清以 50% 异丙醇室温沉淀, 10 000 g 离心 15 min, 去上清, 沉淀真空抽干, 再溶于 2 ml TE 中, 加入 10 ml 上海普洛麦格公司 DNA 纯化树脂, 混合均匀, 加入离心柱中, 真空抽干溶液, 柱子以 25 ml 洗脱液洗涤, 最后以 1 ml TE 1 300 g 5 min 离心洗脱 DNA。

3. 克隆载体制备: 25 μg pUC18 质粒, 以 Hind III 酶切完全, 75°C 15 min 失活, 直接加入 10× 碱性磷酸酯酶缓冲液, 加入 10 U 碱性磷酸酯酶, 37°C 30 min, 补加 10 U 37°C 30 min, 65°C 15 min, 加蛋白酶 K, 65°C 温育 30 min, 以饱和酚抽提, 沉淀后重浮于 10 μl TE 中。

4. 插入片段制备: 取 5 μg NIES-90 基因组 DNA, 加 20 U Hind III 作酶切反应, 75°C 15 min 失活 Hind III, 取 1 μg 备用(图 1)。



M 大连宝生物技术有限公司的 DL2000 分子量标记, 片段大小图中已列出; 1: NIES-90 的基因组 DNA, 显示为大片段; 2: NIES-90 基因组 DNA 经 Hind III 酶切后, 呈现的扩散分布状态(DNA 的电泳条件为 0.75% 琼脂糖凝胶, 100 V 电泳 30 min)

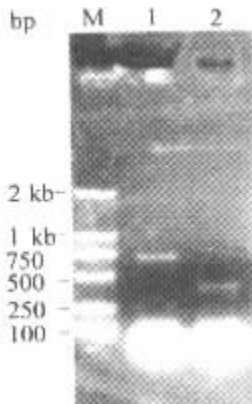
图 1 NIES-90 基因组 DNA 与 Hind III 酶切图谱

5. 连接与转化: 取 1 μg 插入片段, 及 0.2 μg 的载体, 加入 1 mmol/L ATP, 10 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L NaCl, 5 U 连接酶, 室温约 20°C 连接过夜。取 10 μl 连接反应液, 与 50 μl JM109 感受态细菌混合, 按照厂商提供流程转化; 另取 0.01 μg 的 pUC18 作为转化标准, 以同样方法转化 JM109。

6. 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(Xgal)/ 抗生素筛选: 菌液涂布平板采用 LB + 1.5% 琼脂, 其中含 100 μg/ml 氨苄青霉素(Amp), 40 μg/ml 的 Xgal, 40 μg/ml 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷, 涂布平板后, 37°C 倒置培养过夜。

7. PCR 验证插入片段: 分别合成 pUC18/M13

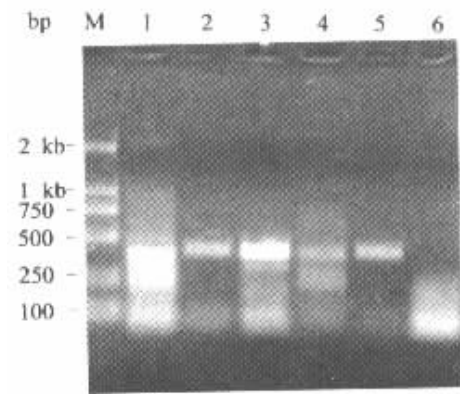
的正、反向引物, 在筛选平板上将白色菌落挑出, 以 2 ml LB 进行 37°C 培养扩增, 取 10 μl 培养液, 加入 50 μl 裂解液, 95°C 裂解 10 min, 取 5 μl 裂解产物作为模板, 加入引物, 在标准 PCR 反应体系中, 以 91°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环扩增插入片段(图 2)。



M 大连宝生物技术有限公司的 DL2000 分子量标记, 片段大小图中已列出; 1: 插入片段长度为 700 bp 的克隆; 2: 插入片段长度为 200 bp 的克隆

图 2 插入片段分别为 700 bp 和 200 bp 的重组子示意图

8. 序列测定与特异性鉴定: 取若干克隆, 以 pUC 18 正向引物进行序列分析。根据结果, 合成扩增引物, 分别扩增 NIES-90 基因组 DNA 和 FACHB-469 基因组 DNA(图 3)。



M 大连宝生物技术有限公司的 DL2000 分子量标记, 片段大小图中已列出; 1、2、3: 以 NIES-90 DNA 为底物的 PCR 反应; 4、5、6: 以 FACHB-90 DNA 为底物的 PCR 反应; 1、4: 引物对为 MeyB 基因片段, 结果显示两者均有扩增; 2、5: 引物对为 PP1 基因片段, 为微藻的保守基因, 两者应当都有扩增; 3、6: 引物对为本文分析序列, 结果显示 NIES-90 有强烈的扩增反应, FACHB-469 没有扩增

图 3 筛选片段的 NIES-90 与 FACHB-469 的株系特异性

结 果

1. 插入片段制备: 按本文方法, 共获得 250 μg NIES-90 和 FACHB-469 基因组 DNA, 0.5 μg/μl 浓

度, A_{260}/A_{280} 为 1.75 ,电泳结果显示为 > 23 kb 的条带 ,表明获得的基因组 DNA 为大分子量 ,质量较好。制备的插入片段显示为从 200 bp 到 23 kb 的连续性片段分布 ,符合基因组中 HindIII 的预期的多酶切位点分布特征。

2. 载体制备 载体制备后 ,进行自身连接反应 ,以未经碱性磷酸酯酶处理的载体连接作对照 ,结果显示对照原 2.6 kb 片段消失 ,增加一大片段 ;碱性磷酸酯酶处理的载体条带没有变化 ,说明载体构建成功 ,连接产物中没有载体的背景连接条带。

3. 连接、转化与平板筛选 :以电泳显示连接反应进行成功。阳性转化菌在 Xgal/Amp 筛选平板上为白色克隆 ,无插入片段的本底连接为蓝色克隆 ,平板上白色克隆数大于 90%。转化文库共获得 3×10^5 个独立克隆 ,转化效率按 pUC18 对照计算为 $1.7 \times 10^7/\mu\text{g}$ 载体 DNA。如按平均插入片段 500 bp 计算 ,文库可覆盖 NIES-90 基因组约 10 倍。

4. PCR 筛选、序列测定与特异性鉴定 :PCR 验证插入片段分布为 200 ~ 700 bp 之间 ;对其中一段 600 bp 左右的插入片段测定序列如下 :

```
1 5' TATGTGACAGAAAGGCATTCTCGAACCATATCCACT
ACCTAAACCACTGCCATCAATAAC
61 AGCCTGACTTGTACCTAAACTTTTAATCGTGACTTTAC
CACCTGGTAAAATATCCCAATC
121 ACCAGTTTTGGCTGTATTATCCCACAAATCCCCGAAAA
CCATGTTAGTGAGAAAAATAGGT
181 TTGTCCCCTTGCAGTTCGATAATATAATCATTAAATGGT
GTCTGCATTAGCGATTAATAAT
241 CGCATCTCGTAACGACAATCCATTAGTTTTACTCCCATC
ATTTTGATCGGCGGTAGTATT
301 AACGGTAAAAATAATTGGTGCAGATTTTTCTACAGGAA
TATCATTTCCCTGTGATCGTAAT
361 ATTGGCCAAGTCATTTTCAGTTGTAATTCTGTCTAATT
CTTGCGTTGTTAAATCTACTCC
421 ACAAACTAATGCCGAGAAATATTCTCCCTCATCCCCAC
CGTATCCACCGTATTAATTTG
481 AGCATCCACAAAATGCCCAATTTCTTCCAACACCACCGC
AACCAAAGCATCTGAAGTACG.....
```

该序列在基因库中没有同源序列。根据该序列合成引物为 5'CACTG CCATC AATAA CAGCC 3' 反向引物为 5'TGGAT ACGGT GGGGG ATGAG G 3' ,在 NIES-90 基因组中可以扩增出 420 bp 的特异条带 ,在 FACHB-469 基因组中不能扩增出特异条带 ,表明这段序列具有 NIES-90 藻株的特异性 ,可能为 MC 相关基因 ;两种藻株中都有扩增的条带说明为微囊藻背景条带 ,与 MC 产毒关系不大。

讨 论

微囊藻在国内水体中居 90% 以上优势 ,可以产生 MC ,是以环七肽为特征的次生代谢产物^{3]}。MC 可在两阶段致癌模型中高度诱发大鼠发生肿瘤^{4]} ,因此对附近饮水居民的长期健康危害不容忽视。

根据 MC 的化学结构 ,它没有对应翻译的核酸序列 ,是由多种相关基因合成不同的酶 ,再由酶过程合成 MC。NIES-90 为 MC 产毒藻株 ,应含有 MC 产生过程完整的相关基因群 ,MC 无毒藻株 FACHB-469 则相关基因群至少不完整 ,其他生理代谢相关的基因群由于种属亲缘性大部分是一致的。因此分离 MC 相关基因群一个特征为相对于 FACHB-469 无毒藻株的 NIES-90 毒株的株系特异性。

我们希望通过构建 NIES-90 文库 ,筛选具有 NIES-90 阳性、FACHB-469 阴性的株系特异性重组片段 ,进一步鉴别其在多种微囊藻有毒和无毒株系中的分布以及该片段引入无毒株 ,或是在有毒株中缺失该片段后 ,微囊藻株系毒性的变化来判断与 MC 相关的可能。本文描述了对 NIES-90 株进行质粒文库构建的过程 ,根据插入片段、空斑率、文库容量的情况分析 ,表明我们构建的文库覆盖微囊藻的基因组可达 10 倍左右 ,因此更可能包含完整的 MC 相关基因群在内。通过初步筛选分析 ,在文库中发现一段序列具有 NIES-90 株系特异性 ,与文献已有报道的 M_{cy}B 基因的株系特异性更倾向于有毒株系。对 MC 相关基因的分离有待于对该文库进行更广泛的筛选与更深入的追踪。

参 考 文 献

- 1 Falconer IR ,Beresford AM ,Runnegar MT. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga. Med J , 1983 ,1:511-514.
- 2 Ueno Y ,Nagata S ,Tsutsumi T , et al. Detection of microcystins , a blue-green algae hepatotoxin , in drinking water sampled in Haimen and Fusui , endemic areas of primary liver cancer in China , by highly sensitive immunoassay. Carcinogenesis ,1996 ,17:1317-1321.
- 3 Krishnamurthy T , Szafraniec L , Hunt DF , et al. Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA , 1989 ,86:770-774.
- 4 Ding WX , Shen HM ,Zhu HG , et al. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. Mutat Res , 1999 , 442:69-77.

(收稿日期 2000-07-20)
(本文编辑 :张林东)