

构建用于相关基因筛选的 微小亚历山大藻产毒株基因组文库

杨翠琪¹ 赵力超^{1,2} 李 献¹ 王 丽^{1,2,*}

(1.华南农业大学食品学院, 广东广州 510642;

2.暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

摘要: 麻痹性贝毒素(paralytic shellfish poisonings, PSP)严重威胁海产食品质量安全,其主要是由水体中的甲藻代谢产生。利用分子生物学和生物信息学技术构建微小亚历山大藻 ATMW02 基因组文库,探求与 PSP 产生相关的基因群。经过与无毒亚历山大藻 L35 对比筛选,获得 ATMW02 株系特异性的 DNA 片段,然后,利用反向 PCR 扩展该片段的旁侧序列,分析其序列特征和功能,探讨有可能引起藻株致毒的关键酶。通过序列分析获得一段去除了内含子的 240 bp 大小的核苷酸序列,这条核苷酸序列在终止密码子之外的非编码区突变了三个碱基,并且存在三个非常保守的铜离子结合区。其对应的氨基酸序列翻译的对象是甲硫氨酰氨肽酶(methionine amino peptidase, MAP),氨基酸比对分析,其与芬地亚历山大藻 MAP 氨基酸序列相似性达到 97%。研究结果为深入研究亚历山大藻产毒机制奠定了理论基础,同时,为加强海产品监控和质量安全提供有力的技术支持。

关键词: 亚历山大藻,麻痹性贝毒素,基因组文库,分子生物学

Construction of genomic library of strains producing *Alexandrium Minutum* algae for the screening of related genes

YANG Cui-qi¹ ZHAO Li-chao^{1,2} LI Xian¹ WANG Li^{1,2,*}

(1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2.Institute of Food Safety and Nutrition in Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Paralytic shellfish poison(PSP), which is mainly produced by dinoflagellates of water, is a serious threat to Marine food quality and safety. *Alexandrium minutum* ATMW02 genomic library was built to search the related gene group in PSP by using molecular biology and bioinformatics technology. After compared with non-toxic *Alexandrium* L35, a specificity fragments of the DNA in ATMW02 was obtained and the flanking sequences were expanded through reverse PCR. By analyzing the sequence features and functions, the key enzymes were explored that might cause the poison also obtained a 240 bp nucleotide sequence without intron. This nucleotide sequence mutated three bases outside the termination codon and existed three conservative copper-binding domain, which could be translated into MAP and 97% match with the *Alexandrium fundyense* MAP. The results of this study provided a theoretical foundation for further research on *Alexandrium* toxin-producing mechanisms. In the meantime, it could provided technical support to enhance marine food quality and supervision.

Key words: *Alexandrium minutum*; paralytic shellfish poison; genomic library; molecular biology

中图分类号: TS254.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)06-0179-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.06.026

海洋中的某些藻类,例如有毒亚历山大藻(*Alexandrium*),其分泌的有毒物质-麻痹性贝毒素(paralytic shellfish poisoning, PSP),是目前分布最广、危害最大的一种藻毒素^[1],在鱼、虾、贝类等生物体内蓄积,对海产品安全有严重影响^[2]。PSP 会麻痹人的神经,轻度中毒会出现口唇部位发麻,重则引发呼吸

困难、心脏功能紊乱。现已知海洋中有 13 种单细胞甲藻可产生麻痹贝毒素,我国沿海发现的有毒甲藻主要有三种^[3]: 贝玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)、微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)、链状亚历山大藻(*Alexandrium acatenella*)。随着基因工程技术的迅速发展,人们对

收稿日期: 2016-07-25

作者简介: 杨翠琪(1995-),女,大学本科,研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 2744243473@qq.com。

* 通讯作者: 王丽(1980-),女,博士,副教授,研究方向: 食品微生物生态与质量安全, E-mail: wangli_scau@scau.edu.cn。

基金项目: 广东省科技计划项目(2016A040403103); 国家自然科学基金项目(31301445); 国家星火计划(2015GA780080); 广东省级“质量工程项目”-精品资源共享课“食品微生物检验学”。

生物体基因的结构、功能表达及其调控机理的研究逐渐深入到分子水平,构建基因组文库已成为遗传研究实验室的常规策略。它对于分离特定的基因片段,研究基因的表达调控、基因组的结构和功能,以及人类和动植物的基因组工程等都有极其重要的作用。

大量的生理生态学和遗传学研究结果认为,毒素基因具有成块性,一旦某个特定毒素合成的基因被定位,可以采用某些分子生物学手段,如基于 PCR 的引物步移(Primer walking PCR)法分离出完整的毒素合成基因组。现在已经知道一个基因的表达在很大程度上是由它的旁侧序列调控的,克隆基因的旁侧序列已经成为分子生物学研究中的常规工作之一。在测定已知基因片段的旁侧基因序列方法上,常用的有染色体 DNA 步移、锚定引物 PCR、加入衔接头等方法^[4-8]。其中应用染色体 DNA 步移的方法以其准确性高而常用。反向 PCR 技术是 DNA 步移方法的一种,它可以对一个已知序列 DNA 的两侧未知序列进行扩增和研究,在分子生物学研究中有广泛应用。

构建亚历山大藻产毒株基因组文库并从中筛选与毒素产生相关的基因片段,可为采取对应措施提供背景知识。一般认为,麻痹性贝毒素的表达受中间合成酶的影响,有基因群参与其中^[9-10]。通过研究产毒株与无毒株的基因差别来了解 PSP 相关基因群。目前已经分离得到产毒株微小亚历山大藻 ATMW02 和无毒株 L35。本文通过构建微小亚历山大藻 ATMW02 的基因组文库,使其含有与 PSP 产生相关基因群,经过与无毒株 L35 对比筛选,获得 ATMW02 株系特异性的 DNA 片段,然后,利用反向 PCR 研究特异性片段的旁侧序列,分析其序列特征和功能,探讨有可能引起藻株致毒的关键酶,进一步验证与 PSP 毒素产生的关系。研究结果将对有毒藻产毒机理或者产毒藻株的快速基因鉴定具有理论参考作用,同时对保障海产品消费安全至关重要。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蛋白酶 K、Taq 酶、T4 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶 大连宝生物公司; Xho I、Sau3AI、Hind III 酶 Takara 生物技术有限公司; DNA 凝胶纯化试剂盒 美国 MBI 公司; DGL2000 DNA 分子量标准 北京鼎国生物技术有限责任公司; X-Gal、IPTG、氨苄青霉素 北京鼎国生物技术有限责任公司; PMD-18T 质粒、有毒微小亚历山大藻 ATMW02 和无毒塔玛亚历山大藻 L35 由暨南大学水生生物研究所提供; 大肠杆菌 DH5 α 鼎国生物工程有限公司,甘油冻存在 -80℃; 甘油 上海生工生物工程有限公司,分析纯; f/2 培养基 参考文献[11]配制。

GeneAmp PCR system 9700PCR 仪 美国 ABI 应用生物系统公司; WFH-20ZB 紫外投射分析仪 上海精科实业有限公司; FC-16C 高速冷冻台式离心机 方统生物技术有限公司; GE-100 核酸电泳仪 杭州生物科技有限公司; Gel Doc EQ 凝胶成像

系统 美国 BIO-RAD 公司。

1.2 实验藻株处理

藻种的鉴定已通过光学显微镜及扫描电镜形态观察,结合 rDNA 序列比较等方法确定。单藻种培养在含 500 mL f/2 培养液的 1000 mL 锥形瓶中,接种密度约为 160 cells/mL,培养温度(20±1)℃,光照强度为 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,由白色荧光灯供光,光:暗=12 h:12 h。每天定时晃动锥形瓶 2 次,每周更换培养基 1 次。每天早上 9:00,取藻液滴于浮游生物计数框上,在光学显微镜下镜检计数。

1.3 实验方法

1.3.1 亚历山大藻基因组 DNA 提取 利用冻融-CTAB 方法提取基因组 DNA^[11]。

1.3.2 插入片段制备 在灭菌的、洁净的 PCR 反应管中,用限制性内切酶 Sau3A I 部分酶切基因组 DNA,酶切体系见表 1。

表 1 亚历山大藻基因组 DNA 酶切体系
Table 1 *Alexandrium* genome DNA digested
by restriction endonuclease enzyme

组份	体积(μL)
基因组 DNA	10
10×H Buffer	2
Sau3A I 酶	1
灭菌超纯水	7
总体积	20

轻混后,37℃酶切 2 h 后,75℃、15 min 失活 Sau3AI 酶。酶切结束后用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提一次,氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次,小心吸出水相并加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH5.2)和两倍体积的冰预冷的无水乙醇,于-20℃中静置数小时。然后在 4℃下最大转速离心,沉淀用冰预冷的 70%乙醇洗一次,待乙醇挥发完全后,溶于适量无菌超纯水中保存于-20℃。

1.3.3 酶解 DNA 片段克隆至 T 载体

1.3.3.1 插入片段的量 连接反应中需要的插入片段的量采用以下公式:

插入片段的量(ng) = 加入载体的量(ng) × 插入片段的大小(kb) × 插入片段和载体的摩尔比/载体大小

式中的 PMD-18T 载体系统插入的 DNA 片段和载体的摩尔比 3:1 的连接比例。加入载体的量为 50 ng。插入片段大小为 200 bp~2 kb。载体大小为 2.6 kb,浓度为 50 ng/ μL 。

1.3.3.2 插入片段与供体载体的体外连接 反应前将 2×快速连接缓冲液混匀,在灭菌的 0.2 mL PCR 反应管中依次按照表 2 加入组分。

连接反应:在 16℃条件下,反应过夜。

1.3.4 制备大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 参照文献[11]。

1.3.5 转化子质粒提取 在过夜培养的生长有白色菌落和蓝色菌落 LB/氨苄/IPTG/X-Gal 平板上,用无菌的接种针挑取白色菌落,接种在含有 100 mg/mL

表2 连接反应体系
Table 2 Ligation reaction

组分	体积(μL)
T4 DNA 连接酶的 2 × 快速连接缓冲液	5
T4 DNA 连接酶	1c
PMD-18T 载体(50 ng)	1
Insert DNA	X μL(0.1~0.3 pmol)
加无菌双蒸水至终体积为	10

氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 在相应的每个白色菌落做上标记。提取质粒, 通过凝胶电泳确认是否含有质粒及其质粒的大小。

1.3.6 序列测定及特异性鉴定 将提取的含有插入片段的质粒进行序列测定, 去除质粒本身 DNA 序列, 得到插入片段的 DNA 序列。根据测序结果, 设计合成扩增引物, 分别扩增产毒微小亚历山藻 ATMWO2 和无毒藻塔玛亚历山大藻 L35 基因组 DNA 根据扩增结果进行特异性鉴定。

1.3.7 反向 PCR 法分析与产毒相关 DNA 片段上游未知序列 常规 PCR 技术是扩增两个引物之间的 DNA 片段, 而反向 PCR 是用反向的引物来扩增两引物之外的 DNA 片段。其目的是扩增一般已知目的顺序旁侧的 DNA^[9-13]。由于反向 PCR 可用于研究与已知 DNA 片段相连的未知 DNA 序列, 因此又被称为 DNA 步移。此法所选择的引物虽与已知 DNA 序列互补, 但两引物 3' 端是反向的。反向 PCR 扩增前, 先用限制性内切酶酶切 DNA, 然后用连接酶使带有粘性末端的 DNA 片段进行自身环化, 最后用一对反向引物进行 PCR 扩增, 得到的线性 DNA 将含有两引物外侧的未知序列, 如图 1 所示。

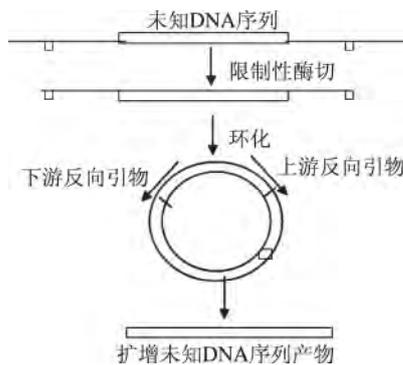


图1 反向 PCR 扩增特异性片段两端未知序列原理图

Fig.1 Process of amplification of the two ends of specific DNA fragment by inverse PCR

1.3.7.1 引物设计和限制性内切酶选择 反向 PCR 中, 上游引物应该靠近序列 3' 端, 下游引物应该偏向序列 5' 端。限制型内切酶的酶切位点应该在已知下游序列前, 而且必须保证引物之间和上游引物后面无该限制性内切酶的酶切位点。另外, 限制性内切酶的选择还应该考虑: 酶切识别位点不可有简并位点, 因为可能会影响下一步的连接反应; 避免选择稀有的内切酶, 一来价钱过高, 二来往往这种内切酶浓度较低, 影响酶切效果; 尽量避免识别位点较短的内

切酶, 因为酶切后能够获得的序列可能过短, 需要的目的序列信息过少。在本实验中, 以插入片段序列信息为已知序列的模板, 设计反向引物获得旁侧未知序。

1.3.7.2 限制性内切酶酶切消化染色体 DNA 酶切消化的反应体系见表 3。轻混后, 37 °C 反应 2 h。反应后将 PCR 管放于 75 °C, 15 min 灭活内切酶。酶切产物放于 -20 °C 或直接进行下一步实验。

表3 PCR 产物酶切反应体系

Table 3 PCR product digested by restriction endonuclease enzyme

组分	体积(μL)
10 × 酶切反应缓冲液	2
染色体 DNA 模板	5
限制性内切酶	1
加无菌双蒸水至终体积为	20

1.3.7.3 酶切产物的自身环化 用 T4 连接酶进行酶切产物的自身连接环化, 反应体系见表 4。环化条件: 在 PCR 仪中 16 °C 反应过夜。94 °C 反应 15 min, 来终止反应。

表4 自身环化反应体系

Table 4 Self-ligation reaction

组分	体积(μL)
T4 DNA 连接酶	1
10 × 连接缓冲液	2.5
酶切产物	8
加无菌双蒸水至终体积为	25

1.3.7.4 反向 PCR 反应 将引物均溶解并稀释至 10 μmol/L 浓度。反向 PCR 反应体系见表 5。

表5 反向 PCR 扩增体系

Table 5 Inverse PCR amplification

组分	体积(μL)
10 × ExTaq Buffer	5
自身连接产物	6
dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)	4
引物(各 10 μmol/L)	3
ExTaq DNA 聚合酶	1.25
加无菌双蒸水至终体积为	50

按照下列程序进行 PCR 扩增: 第一步 94 °C 变性 5 min; 第二步, 按照下列参数重复 30 个循环, 94 °C 变性 0.5 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min; 最后延伸 72 °C, 7 min。该反应程序是第一类限制性内切酶反向 PCR 程序, 其他反向 PCR 的退火温度因设计的引物不同而有所改变。

浓度为 1% 的琼脂糖进行凝胶电泳, 电压为 100 V 时间为 30 min。

1.3.7.5 扩增片段测序及序列分析 直接将反向 PCR 的扩增产物进行测序。测序的结果用 contig1、chromas 进行序列拼接。使用 DNATool 软件对 DNA 序列进行分析, 在 <http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-e.html> 网站应用 BLASTN 程序对获得的基因片

段进行同源性检索。用 Gene tool 软件去除序列中的内含子,然后用计算机软件 BioEdit 将拼接后的核苷酸序列翻译成氨基酸序列。将其他物种的氨基酸序列(来自 GenBank)用 BioEdit 包含的 Clustal W package 进行多序列对位分析,并预测获得的该部分氨基酸的二级结构功能位点。

2 结果与分析

2.1 插入片段制备结果

按本文方法,共获得 150 μg 亚历山大藻 ATMW02 和 L35 基因组 DNA, $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 为 1.80,电泳结果表明获得的基因组 DNA 为大分子量,质量较好。经酶切后,DNA 大片段被降解,制备的插入片段大小大部分介于 200 bp~2 kb 之间,连续片段分布符合载体插入片段要求。

2.2 插入片段大小

选择 PMD-18T 载体系统进行 DNA 未知片段的克隆,该载体可用于 PCR 产物的克隆,含有 T7 和 SP6 RNA 聚合酶启动子,其侧翼和多克隆位点区相接,多克隆位点区位于 β 半乳糖苷酶的 α 肽编码区内。 α 肽插入失活允许在指示培养基用颜色直接筛选重组克隆。插入片段成功克隆至 PMD-18T 载体中,可阻断 β 半乳糖苷酶的编码序列,因而重组克隆可在指示培养基上通过颜色进行筛选,选择白斑菌落作为可能的转化子。

在过夜培养的生长有白色菌落和蓝色菌落 LB/氨苄/IPTG/X-Gal 平板上,用无菌的接种针挑取白色菌落,接种在含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,在相应的每个白色菌落做上标记。全部提取质粒,通过凝胶电泳确认是否含有质粒及其质粒的大小。阳性质粒电泳图见图 2,具体插入 DNA 片段大小通过测序分析获得。

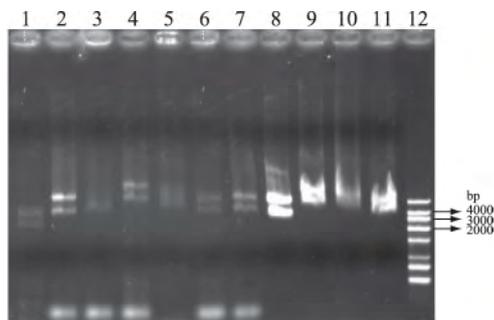


图 2 提取的部分质粒电泳图

Fig.2 Partial plasmids extracted from transformants

注:1:质粒载体;2~11:从平板上挑选的

部分白色菌落提取的质粒;12:DL4000 Marker。

2.3 序列测定及特异性鉴定结果

通过质粒测序,其中获得一段长度为 1014 bp 大小的 DNA 片段。根据这段序列的测序结果,设计一对引物,分别扩增有毒微小亚历山大藻 ATMW02 基因组 DNA 和无毒塔玛亚历山大藻基因组 L35 的 DNA,判断这段序列的特异性。同时,扩增两株亚历山大藻属特异性核糖体保守区域。根据获得的 DNA 片段设计的序列特异性引物为:A-U:5'-TAACC

GAGGTTAAAGCTAAGC-3';A-D:5'-GATTCACCG GCAACCCGACT-3'。同时,利用甲藻 18S rDNA 专一性引物:B-U:5'-TGTGTGAAAGATTAAGCCATG-3';B-D:5'-ACTTCTCCTTCCTCTAAGTGA-3',PCR 扩增两株亚历山大藻 ATMW02 基因组作为背景对照。根据获得的 DNA 片段设计的引物退火温度 T_m 为 52 $^{\circ}\text{C}$,属特异性引物退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,扩增结果见图 3,结果显示引物对为属特异性引物两者均有扩增,ATMW02 有强烈的扩增反应,而 L35 没有扩增迹象。

麻痹性贝毒素(PSP)是一类嘌呤化合物,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,再由酶作用合成 PSP。微小亚历山大藻 ATMW02 为 PSP 产毒藻株,应含有 PSP 产生过程完整的相关基因群,无毒藻株 L35 则相关基因群至少不完整。因此,分离 PSP 相关基因群一个特征为相对于无毒藻株的有毒株株系特异性。从图 3 结果看出,两种藻株均可以扩增出甲藻专一性 DNA 片段。而利用本文获得的特异性 DNA 片段设计的引物可以在 ATMW02 基因组中扩增出 1000 bp 左右大小的特异性条带有强烈扩增信号,而在 L35 基因组中不能扩增出相应的特异性条带,说明这段序列具有产毒株特异性,可能为产麻痹性贝毒素(PSP)相关的 DNA 片段。两种藻株中都能扩增的条带说明是亚历山大藻背景条带,与 PSP 毒素产生关系不大。

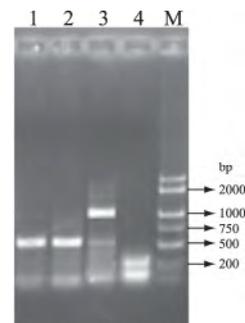


图 3 筛选片段的 ATMW02 与 L35 的株系特异性

Fig.3 Strain specificity of gene

fragment between ATMW02 and L35

注:1,2:引物对为属特异性引物;3,4:引物对为本文分析序列。

2.4 反向 PCR 引物设计与限制性内切酶选择

已知特异性 DNA 片段可能与产毒有关,通过反向 PCR 方法探知其旁侧 DNA 序列,寻找与产毒相关的基因群。对特异性片段 DNA 序列分析后选择 *AsuII* 和 *XhoI* 这两种限制性内切酶分别对特异性 DNA 片段进行酶切。酶切后,两个粘性末端会结合成环,未知的 DNA 序列环于环中。根据酶切位点设计引物,引物与已知 DNA 序列互补,但两引物 3' 端是反向的。针对限制性酶 *AsuII* 设计的反向 PCR 引物为:上游引物 *AsuII*-U:5'-TCGCCATCAGTAGTTCGCTC-3';下游引物 *AsuII*-D:5'-GCAACGAGTTAAACAACGAG-3'。针对限制性酶 *XhoI* 设计的反向 PCR 引物为:上游引物 *XhoI*-U:5'-TCGGTGCCGCTACTGCCCGC-3';下游引物 *XhoI*-D:5'-GCACATCCGGTGATCTTGA-3'。序列及引物分析结

果见图 4。

```

1  AAGCGTAACC GAGGTTAAAG CTAAGCTCGT TATTTTCGCC ATCAGTAGIT CGCTCTTCCA
    Asu II
61  GAACCGTATC TTCGAAAGAG AAATCACCAA GGACTACTGC CTCTGTGTTT AACCTGGTTC
121 GATAGITAGG TTGTGAACCG AGAGTCACGA AATAATCAA GTTCCGCTC TGGCCATTGA
181 GTGCAACAGA TCCACCGGGC TGTATCGTAT CGTCTGTGC ATAATTCATT GAGGCTTCGT
241 AAGAGATGCT GTTGAAGAA AGTGCTTCGA ACAGAAACAAC GTTGATTACC TGGCCGCTGC
301 CACCCACATC AAGATCACCG GATGTGCGGC GAATGATCTG AATTTCTCTG ACCTGTGAGG
    Xho I-D
361 TTGGTATCCG CTTAGCAGA CTGCTGGTAG ATTGATTCTT ACCAGCCGTA CGCTTCCGCT
421 TGATCATGAT CTGGTGCCG CTAAGTCCCG CACCTAATCC TCGGCCACCT CGAGTCCGGT
481 TCCCGTGAA TCCCCAGGAG GCTTTACATA AGCGTAAACG AGGTTAAAGC TAAGTCTGTT
541 ATTTTCGCCA TCAGTAGTTC GCTCTTCCAG AACCGTATCG TTAGGTGAGA AATCACCAAG
    Asu II-U
601 GATACTGCTC TCGTGTGTTA ACTCGTTGCG ATAGTTAGGT TGTGAACGCA GATGCAGAA
661 ATAATCAAAG TTGCCGCTCT GCCAATTGAG TGCAACAGAT CCACCGGGCT GTATCGTATC
721 GTCCTGTCCA TAATTCATTG AGGCTTCGTA AGAGATGCTG TTGGAAAGAA GTGCTTCTTA
781 CAGAACACAG TTGATTACCT GGCCGCTGCC ACGCACATCA AGATCACCGG ATGTGCGCGG
841 AATGATCTGA ATTTCTGTA CCTGTGAGGT TGGTATCCGG CTTAGCAGAC TGCTGTGATA
901 TTGATTCTTA CCAGCCGTAC GCTTCCGCTT GATCATGATC TCGGTGCGGC TACTGCCCGC
    Xho I-U
961 ACCTAATCCT CTCGAGCTC GAGTCCGGT GCCGGTGAAT CCCCAGGAG CTTT
    Xho I
    
```

图 4 反向 PCR 引物及内切酶分析

Fig.4 Primers and endonucleases for inverse PCR

注: 内切酶酶切位点以方框标示, 引物序列及方向以箭头标示。

2.5 反向 PCR 扩增产物分析

通过反向 PCR 扩增产毒微小亚历山大藻 *A.minutum* ATMW02 特异性 DNA 片段两侧未知区域, 其中利用 *AsuII* 酶得到 750 bp 左右的片段, 利用 *XhoI* 酶得到 1.0 kb 左右的片段。将反向 PCR 产物送至测序, 测序结果分别是 755 bp 和 1100 bp。将所得的两段 DNA 序列与之前得到的特异性片段进行拼接并去除其中内含子, 获得一段去除了内含子的 240 bp 大小的核苷酸序列。参照 *Alexandrium fundyense* (芬地亚亚历山大藻) 的开放阅读框架^[14], 利用 BioEdit 软件将拼接后的序列翻译成氨基酸。反向 PCR 产物电泳图及序列结构分析结果参见图 5 及图 6。

反向 PCR 扩增结果翻译的氨基酸序列经过在 NCBI 数据库中 Blast 比较分析, 发现其中 471 ~ 710 bp 之间一段氨基酸序列翻译的对象属于甲硫氨酰氨肽酶 (methionine aminopeptidase, MAP) 氨基酸序列的一部分, 通过序列比对发现, 其与芬地亚亚历山大藻 *A.fundyense* MAP 的氨基酸序列的相似性为 97%, 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 相似性为 53%, 与水稻 (*Oryza sativa*) 相似性为 55%, 与牛 (*Bos Taurus*) 的相似性为 51% (图 7)。

甲硫氨酰氨肽酶 (MAP) 广泛存在于从低等到高等的所有生物体中, 在蛋白质加工过程中负责切除

```

A.minutum : VSHGIGEFFHGVQVFEHCRNSDNRRKMQEGTTFTEHVLVBEGSQDWITWDDGWTVAATSDRGRAAQEHTLLITANGCEVMT : 80
A.fundyens : VSHGIGEFFHGVQVFEHCRNSDNRRKMQEGTTFTEHVLVBEGSRDWITWDDGWTVAATSDHGRRAAQEHTLLITANGCEVMT : 80
Arabidopsi : VSHGVGPFVHSEPLIYHYRNDSEPLMVBEGQTTFTEHVLITIGTECVTWPDNWTTLTADGGVAAQEEHTLILITRTGSEILT : 80
Oryza : VSHGVGRIFHSEEMIIYHQRNMMPGQVVEGQTTFTEHVLISMGSIDCDMDWDDGWTVAATTDGSLAAQEEHTLILITKTGAEILT : 80
Bos : VSHGIGSYFHHGPEIWHHANDSNLLMBEGMAPTEHVLVTEGSPPEKVLDSWTVVSLDNQRSAQEEHTVLITSRGAQILT : 80
    
```

图 7 微小亚历山大藻 ATMW02 的 MAP 部分氨基酸序列与其他物种的比对结果

Fig.7 The alignment of partial MAP sequences among five species

注: *Alexandrium fundyense*: AAD20316; *Arabidopsis thaliana*: AAG33975; *Oryza sativa*: XP_473849; *Bos Taurus*: AAI13347.1. 比对结果的方框部分是 MAP 铜离子结合区域。

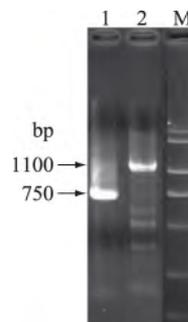


图 5 反向 PCR 产物电泳图

Fig.5 Inverse PCR product

注: Lane M: DL2000 DNA 分子量标准; Lane 1 2: 利用 *AsuII* 酶得到的反向 PCR 产物, 利用 *XhoI* 酶得到的反向 PCR 产物。

```

1  TTGTTAAGA CGGACTACTG CGAAAGGATT TGCCAAAGAT GTTTTCATTG ATCAAGAAGC
61  AAAGTTAAGG GATCGAAGAC GATCAGATAC CGTCTAGTC TTAACCCATA ACCATGCCAA
121 CTAGAGATTG AAGGTTGTTA CTGCTATGAC TTTTTCAGCA CCTATGAGA AATCAAAGTG
181 TTTGGTTCC GGGGGAGTA TGGTCCOAG GCTGAACTT AAAGAAATG ACGGAAGGCC
241 ACCACAGGA GTGGAGCTG CCGCTTAATT TGACTCAACA CGGGAAACT TACCAAGTCC
301 AGACATAATG AGGATTGACA GATTGATACC TTTTCTTGA TTCTATGGT GGTGGTGCAT
361 GCGCGTCTT AGTGGTGGG GTGATTGTC TGGTAAATC CGTAAACGA CGAGAACCTA
421 ACCTGCTAAA TAGTACATG TAATTTGAT TATGTGGCA ACTTCTGATG GTTGTCTATG
    V GH
481 GCATTGGCGA GTTTTTCAT GGAGTGCTC AGGCTTCCA CTGTCGAAAC AGCGCAATC
    G I G E F F H G V P Q V F H C R N S D N
541 GAAAGATCCA GGAAGCAC ACCITCACCC TGGAGCCAGT ACTTACAGAG GGTTCACAGG
    RKM Q E G T T F T L E P V L T E G S Q
601 ATTGATAAC GTGGATGAC GGGTGGACAG TGTCTACAAG TGACCGTGGC CGTGTGCGCC
    DW I T W D D G W T V A T S D R G R A A
661 AATTGAGCA CAGCTGCTG ATCACTGCA ATGCECTGTA GGTCTGACT TGATGCATGT
    QF EH T L L I T A N G C E V M T
721 GCGGGTCC AAGCCAGGT GCAGGATGG ACGCTCGCG TCGAACCCG TACGGCTCG
781 TCCCCAGTC CCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
841 AAAAAA
    
```

图 6 核苷酸序列分析

Fig.6 Nucleotide sequence analysis

注: 方框中部分是核苷酸序列的氨基酸翻译产物。

新生肽链 N 端的起始甲硫氨酸, 这对于对蛋白质的修饰、成熟以及在细胞中的准确定位等极其重要, MAP 活性是正常生理功能所必需的。一般在原核生物中, MAP 单基因单拷贝就能满足细胞的正常生理功能, 但真核生物中却至少存在两种构型的 MAP。Taroncher-Oldenburg 等利用同步化技术和差异显示技术, 发现, 甲硫氨酰氨肽酶有可能参与了麻痹性贝毒素的生物合成, 推测其对应的 *map* 基因与毒素合成有关, 且为表达上调基因^[14]。

MAP 具有金属离子依赖性, 已知在 *A.fundyense* 中该酶具有 5 个铜离子结合位点, 在本文微小亚历山大藻 ATMW02 甲硫氨酰氨肽酶的部分氨基酸序列中发现 3 个区域, 分别为 GHG、LEP 和 EHT, 同时也说明这三个区域在 MAP 中高度保守。

在 <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/>

struc-predict.html 网站上,分析这段氨基酸序列的二级结构及其功能位点,发现该酶具有三个功能区域,分别是:位于 29~34 的 GTTFTL 是 N-14 烷基化位点(N-myristoylation site);位于 47~50 的 TWDD 是酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site);位于 57~59 的 SDR 是蛋白激酶磷酸化位点(protein kinase phosphorylation site)。

分析这段核苷酸序列,发现在编码区与已报道的核苷酸序列完全相同,主要区别在 3'端的非编码区,本研究得到的这段序列在非编码区末端突变了三个碱基 CAG(见图 6 中标下划线的碱基),并且已报道的研究也发现差别均在终止密码子之外的非编码区。因此,可以判断不可能是由同一转录产物不同加工造成的。据研究,在微小亚历山大藻 ATMW02 中存在至少三个 *map* 基因拷贝,它们分别转录得到三种 *map* mRNA 分子,或者转录得到两种 *map* mRNA 后,由反式拼接或者 RNA 编辑产生第三种 *map* mRNA^[15]。根据序列同源性 MAP 分为 MAP-I 和 MAP-II 两类,两者的区别在于 MAP-II 的 C 端插入了一个约 60 个氨基酸残基组成的 α 螺旋^[16]。通过分析在本文微小亚历山大藻 ATMW02 的 C 端没有发现 60 个左右的氨基酸插入,所以判断微小亚历山大藻 *A. minutum* ATMW02 的 MAP 可能为 I 型酶。

到目前为止,对亚历山大藻的产毒基因和产毒机制的研究还处于刚起步阶段^[17-22],产毒基因和具体产毒机制都不清楚。在原核生物中,MAP 单基因单拷贝就能满足细胞的正常生理功能,但是真核生物中却至少存在两种构型的 MAP。Giglione 发现在细胞的不同空间可能需要不同的 MAP 酶来执行其功能^[23]。亚历山大藻正常生长代谢需要 MAP 的多个基因拷贝,本研究发现的这段非编码区碱基发生突变,根据生物信息学分析,推测其突变可能是由于在生长代谢过程中,MAP 执行了不同的生理功能需求,在转录水平上对毒素的产生进行了调控,*map* 基因通过其编码产物对其他产毒相关基因进行了诱导,使其具有活性表达,开始毒素合成。

3 结论

本文通过构建微小亚历山大藻 *A. minutum* ATMW02 文库,筛选到具有产毒株阳性而无毒株阴性的株系特异性重组片段,并运用反向 PCR 方法扩增及测定特异性片段两端未知 DNA 片段,同时对获得序列的特征和功能进行了分析。用稀有限制性内切酶 *Sau3A I* 酶切微小亚历山大藻 ATMW02 基因组 DNA,通过插入片段与载体的连接、转化以及平板筛选,获得一段 1014 bp 大小的特异性 DNA 片段。然后通过 PCR 验证其在有毒株中有强烈的扩增信号,而在无毒株中无扩增信号,判断该片段具有产毒株系特异性。利用反向 PCR 分析特异性片段旁侧 DNA 序列信息。通过序列分析获得其中一段 240 bp 大小的核苷酸序列,其对应的氨基酸序列翻译的对象是甲硫氨酰氨肽酶(MAP)。氨基酸比对分析发现,其与芬地亚历山大藻 MAP 氨基酸序列相似性达到 97%。获得的氨基酸序列中发现存在三个非常保

守的铜离子结合区,其二级结构存在三个功能区域。

本研究对于深入研究藻毒素产生的机理提供了一种新的思路,运用分子生物学手段和生物信息学分析能够对相关基因群进行有效解析。研究结果对于快速检测有毒藻株、安全有效监测海产食品、防止污染麻痹性贝毒素污染的海产食品流入市场、保障消费者饮食安全等方面都具有积极的促进作用^[24-25]。

参考文献

- [1]陈剑刚,朱炳辉,梁素丹,等.固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定贝类产品中麻痹性贝类毒素[J].中国卫生检验杂志 2016(1):4-8.
- [2]周海霞,韩立民.我国海产品质量安全可追溯体系建设问题研究[J].中国渔业经济 2013 31(1):70-74.
- [3]李政菊,胡蓉,吴霓,等.海南岛近岸海域贝类中的麻痹性贝类毒素[J].海洋环境科学 2016(2):168-173,195.
- [4]Trinh Q,Xu W T,Shi H,et al.An A-T linker adapter polymerase chain reaction method for chromosome walking without restriction site cloning bias[J].Analytical Biochemistry 2012 425(1):62-67.
- [5]Rudi K,Fossheim T,Jakobsen K S.Restriction cutting independent method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences[J].Biotechniques,1999,27(6):1176-1177.
- [6]Tamme R,Camp E,Kortschak R D,et al.Nonspecific,nested suppression PCR method for isolation of unknown flanking DNA[J].Biotechniques 2000(5):895-902.
- [7]Dastur R S,Kachwala M Y,Khadilkar S V,et al.Identification of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene and female carrier status in western India using combined methods of multiplex polymerase chain reaction and multiplex ligation-dependent probe amplification[J].Neurology India,2011,59(6):803-809.
- [8]Krishnamurthy V V,Khamo J S,Cho E,et al.Multiplex gene removal by two-step polymerase chain reactions.[J].Analytical Biochemistry 2015 481:7-9.
- [9]樊立静.亚历山大藻生长和产毒相关基因的基础研究[D].青岛:中国海洋大学 2006.
- [10]董啸天.我国海水养殖产品食品安全保障体系研究[D].青岛:中国海洋大学 2014.
- [11]王丽.近海食源微生物产毒特性的基因分析及其快速检测研究[D].广州:华南理工大学 2008.
- [12]Xiao Y H,Luo M,Fang W G,et al.PCR walking in cotton genome using YADE method[J].Acta Genetica Sinica,2002,29(1):62-66.
- [13]Zhang Z,Gurr S J.Walking into the unknown: a 'step down' PCR-based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA[J].Gene 2000 253(2):145-150.
- [14]Taroncher-oldenburg G,Anderson D M.Identification and characterization of three differentially expressed genes,encoding S-adenosylhomocysteine hydrolase, methionine aminopeptidase, and a histone-like protein in the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* [J].Applied and Environmental Microbiology,2000,66(下转第 194 页)

及鉴定[J].微生物学报 2015(5):635-642.

[15]王金花.毒死蜱降解微生物的筛选及其降解特性研究[D].泰安:山东农业大学 2004.

[16]赵紫华,韩雪,王玉营,等.一株高产 β -胡萝卜素红酵母菌株的筛选及发酵工艺研究[J].饲料研究 2015(5):10-14, 18.

[17]陆振群.酒曲中生香酵母的分离及生理生化鉴定[J].酿酒科技 2012(3):37-39.

[18]Watson L P. Preparation of microbiological specimens for scanning electron microscopy[J].SEM 1980(11):303.

[19]胡瑞卿.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1991:11-14.

[20]Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and Identification (Third Edition) [M]. Netherlands: Springer

(上接第184页)

(5):2105-2112.

[15]孙乃恩,孙东旭,朱德熙.分子遗传学[M].南京:南京大学出版社,1990.

[16]Anelia A, Mamoru S, Masahiro S, et al. Molecular cloning, expression and characterization of three distinctive genes encoding methionine aminopeptidases in cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803[J].Arch Microbiol 2003, 180:185-193.

[17]张树刚.亚历山大藻产毒生理及合成机制研究[D].厦门:厦门大学 2006.

[18]卞中园,杨锡洪,解万翠,等.初始密度对微小亚历山大藻生长及产麻痹性贝类毒素的影响[J].水产学报 2013(1):78-85.

[19]黄翔.卤虫对微小亚历山大藻和塔玛亚历山大藻生长及产毒的影响[D].广州:暨南大学 2013.

[20]黄世玉,王雪虹,张丽莉.磷浓度对2种有毒亚历山大藻

(上接第188页)

[10]黄冠华,陈峰.环境因子对异养小球藻脂肪酸组含量和脂肪总酸产量的影响[J].可再生能源 2009(3):69-73.

[11]花凯.激素类物质对小球藻培养的影响研究[D].北京:北京化工大学 2015.

[12]韩菲菲.以高油脂产率为目标的小球藻光养培养工艺优化与初步放大[D].上海:华东理工大学 2013.

[13]胡慧慧,徐年军.不同培养基及组成对2种小球藻生长和油脂的影响[J].生物学杂志 2012(4):12-16.

[14]江怀真.培养条件对海水小球藻生长及油脂积累的影响[D].青岛:中国海洋大学 2010.

[15]吴琼芳,张莹,罗舒怀,等.氮限制对普通小球藻积累油脂过程中生化组成与光合生理的影响[J].植物科学学报, 2016(2):280-288.

[16]Chih-chun yang, Rex Wen, Claire Shen, et al. Using a Microfluidic Gradient Generator to Characterize BG-11 Medium

Netherlands 2001.

[21]张纪忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社, 1990:240-255.

[22]Barros D E, Lopes M A, Soden A, et al. Differentiation and species identification of yeast using PCR[J].Int J Syst Bacteriol, 1998(48):279-286

[23]张丽娜,荣昌鹤,何远,等.常用系统发育树构建算法和软件鸟瞰[J].动物学研究 2013(6):640-650.

[24]罗源华.有机磷农药微生物降解菌的分离与鉴定[D].长沙:湖南农业大学 2005.

[25]刘斌斌,赵永芳,纱亚鹏,等.鲁氏酵母菌 WY-3 降解甲胺磷的性能[J].环境科学 2001 22(4):37-41.

[25]金潇,颜冬云,秦文秀.有机磷农药的微生物降解技术[J].湖南农业科学 2011(9):93-97.

生长和产毒力的影响[J].水生态学杂志 2012(1):107-111.

[21]李昌伟,冯超,江天久.N、P、Fe、Mn对微小亚历山大藻生长及产毒的影响[J].海洋环境科学 2014(3):341-345.

[22]毛丹卉,解万翠,杨锡洪,等.微小亚历山大藻中麻痹性贝类毒素的冻融法提取优化[J].广东农业科学 2015(13):102-108.

[23]Giglioli C, Serero A, Pierre M, et al. Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms [J]. EMBOJ, 2000, 19(21):5916-5929.

[24]孔凡洲,徐子钧,于仁成,等.黄渤海海域贝类麻痹性贝毒的检测与分析[J].中国海洋大学学报:自然科学版 2007(2):305-309.

[25]于仁成,周名江.麻痹性贝毒研究进展[J].海洋与湖沼, 1998(3):330-338.

for the Growth of *Cyanobacteria Synechococcus elongatus* PCC7942 [J]. Molecular Diversity Preservation International (MDPI), 2015 6(11):1755-1767.

[17]Xian-ming shi, Feng Chen, Jian-ping Yuan, et al. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains [J].Kluwer Academic Publishers, 1997 9(5):445-450.

[18]Folch Lee S, M Sloane, Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1957 226(1):497-509.

[19]刘宪夫,孙利芹,王长海.小球藻油脂不同提取方法的比较[J].食品研究与开发 2014(3):28-32.

[20]刘香华,刘雷,曾慧卿.不同碳源及光照对小球藻生长和产油脂的影响[J].安全与环境学报 2012(3):6-10.

[21]陈炜,梁明明,白永安,等.小球藻不同生长时期总脂含量和脂肪酸组成的变化[J].水产科学 2013 32(9):545-548.

一套《食品工业科技》在手， 纵观食品工业发展全貌