

# cpcHID 操纵子序列用于钝顶节旋藻品系分类与鉴定的研究

杨灵勇, 汪志平\*, 曹学成, 陈晓燕, 徐步进

(浙江大学原子核农业科学研究所 杭州 310029)

**摘 要** 克隆并测定 7 株钝顶节旋藻品系的 cpcHID 操纵子序列, 以及 16S rRNA 和 16S-23S rRNA 转录单元内间隔区 (ITS) 序列, 进一步通过生物信息学和分子系统学等研究发现 (1) 7 株品系的 cpcHID 序列, 以及 16S rRNA 和 ITS 序列具有很高的相似性。(2) 基于 7 株品系 cpcHID 序列的 GC 含量绝对偏差平均值、碱基变异率和遗传距离系数普遍比基于 16S rRNA 和 ITS 序列的大。(3) 基于 cpcHID 序列的分类结果与基于 16S rRNA 和 ITS 序列的十分相近。因此, cpcHID 可作为节旋藻等蓝细菌分类与鉴定的一种新的分子标记, 特别是以其丰富的信息量而在品系水平的分类鉴定中占有优势。

**关键词**: 节旋藻; cpcHID 操纵子; 16S rRNA; 16S-23S rRNA ITS; 分类

**中图分类号**: Q93 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)06-1003-04

节旋藻 (*Arthrospira*) 和螺旋藻 (*Spirulina*) 均为光合放氧、无异形胞、不分枝、呈规则螺旋形的原核丝状蓝细菌 (cyanobacteria)<sup>[1,2]</sup>。多年来, 该类群的属种划分、鉴定及命名, 主要以其形态学特征为依据。但由于形态学分类标准的优先权不统一, 以及藻丝形态随生长环境变化而呈现多形性变异 (Polymorphism) 等原因, 致使节旋藻与螺旋藻在属水平, 以及属内种或品系水平上的分类与命名长期存在争议<sup>[1-3]</sup>。这种混乱状况不仅影响着该类群的理论研究与学术交流, 而且严重制约着国内外节旋藻产业 (因历史原因商业界仍习惯称为“螺旋藻产业”) 的进一步发展<sup>[1,4]</sup>。因此, 迫切需要寻求并建立能准确反映物种之间自然的系统发生关系, 有效区分该类群属、种、品系水平的标记。

国内外已从脂肪酸、蛋白质的组成及含量等生理生化水平对该类群的分类与鉴定作了一些有意义的探索<sup>[3-5]</sup>。特别是利用 RAPD, 以及有“生物进化分子钟”之称的 16S rRNA 基因序列分析等分子生物学技术, 在该类群分类与鉴定方面取得了研究成果<sup>[1,2,6-8]</sup>, 为修正以形态特征为主的传统分类体系、建立该类群以形态和生理生化特征为基础、以分子遗传标记为依据的新的分类体系, 提供了必要的理论依据与技术方法。值得指出的是, 近年来人们利用蓝细菌等少数藻类所特有的捕光色素蛋白——藻胆蛋白亚基的基因 (如 *cpcB*, *cpcA*, *cpcB-cpcA* 间隔区) 序列, 对节旋藻等藻类所作的分类学研究取得的结果不仅与基于 16S rRNA 序列的分类结果相吻合, 而且所取得的分类信息比 16S rRNA 基因序列的更为丰富<sup>[9-11]</sup>。在藻胆蛋白分子中除亚基外, 还有 3 种起连接作用的棒状连接多肽, 所对应的 3 个基因 *cpcH*、*cpcI* 和

*cpcD* 组成一个操纵子 cpcHID<sup>[12,13]</sup>, 它们和藻胆蛋白亚基的基因均由一个被称为“TEA”的祖先基因演化而来<sup>[14,15]</sup>。基于 cpcHID 与藻胆蛋白亚基基因在系统演化方面的同源关系, 本文探索了利用 cpcHID 操纵子基因序列对钝顶节旋藻进行品系间分类与鉴定的可行性, 以期对节旋藻和螺旋藻等蓝细菌的分类、鉴定与命名提供信息量更丰富的新的分子标记。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料** 所选的 7 株钝顶节旋藻品系中, Sp-1 由中国农业大学毛炎麟先生馈赠, Sp-2 由中国科学院植物研究所顾天青先生馈赠, Sp-3、Sp-5、Sp-9 和 Sp-10 为中国南方规模养殖品系, Sp-11 为中国北方规模养殖品系。上述藻株均经单细胞分离培养而得到, 现保存于本所生物资源与分子工程实验室。参照李晋楠等<sup>[6]</sup>的方法进行培养及显微形态观察。

**1.1.2 试剂和仪器** *Taq* DNA 聚合酶和琼脂糖为 Sangon 公司产品; 克隆载体 pMD18-T, 以及 dNTP、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均为 TaKaRa 公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒购于上海博亚公司; PCR 引物由上海博亚公司合成。其它试剂均为分析纯。序列扩增用 Hybaid Limited 公司的 HBPXB 6-B Thermal Cycler PCR 仪, 测序用 Applied Biosystems 公司的 3730 型测序仪。

### 1.2 PCR 引物设计与扩增

根据 GenBank 上的 cpcHID 操纵子序列 (AF164139) 利用 Primer 5.0 引物设计软件得到上游引物 PF: 5'-CAATACATCTTCGCCGATTF-3', 下游引物 PR: 5'-CGTATTATC

基金项目 国家自然科学基金 (30000010)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-571-86971021; E-mail: zhpwang@zju.edu.cn

作者简介 杨灵勇 (1982-) 男, 浙江人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物技术。E-mail: akuyly@126.com

其他作者 李雪斌, 黄 晖

收稿日期 2006-01-06 接受日期 2006-03-17 修回日期 2006-05-27

GGTAGTCATCGG-3'。25 $\mu$ L PCR 反应体系中含引物 PF 和 PR 各 0.5 $\mu$ mol/L 4 种 dNTP 各 1 $\mu$ mol/L, 2.5U 的 *Taq* DNA 聚合酶, 10 倍的 PCR 缓冲液 2.5 $\mu$ L, 50ng 基因组 DNA (按照文献 [6] 的方法提取)。反应程序 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8min。

扩增 16S rRNA 基因及 16S-23S rRNA 转录单元内间隔区 (Internally Transcribed Spacer, ITS) 的引物参照 Willmotte 等 [17] 所设计的引物 1 (5'-AGAGTTTGATCTCTGGCTCAG-3') 和引物 18 (5'-TTTGGCGCCGCTCTGTGCTAGGTATCC-3')。反应体系除所用引物不同外, 其它与 *cpcHID* 的扩增体系相同。反应程序 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8min。

### 1.3 PCR 产物的克隆及测序

将经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化感受态 *E. coli* TG1, 蓝白斑法筛选阳性克隆, 提取质粒并作酶切鉴定, 将含有目的片段的重组质

粒进行测序。

### 1.4 序列分析、系统进化树构建

序列分析采用 BioEdit 7.0 软件, 多重序列比对采用 Clustal X 1.81 软件, 遗传距离分析及系统发生树的构建采用 Phylip 3.65 软件包。

## 2 结果和讨论

### 2.1 扩增序列的基本结构及 GC 含量比较

藻株 Sp-10、Sp-2、Sp-9、Sp-1、Sp-11、Sp-3 和 Sp-5 的基因组 DNA 分别经 *cpcHID* 操纵子, 以及 16S rRNA 与 ITS 的特定引物 PCR 扩增与克隆, 并测得相应的序列。各藻株 *cpcHID* 序列在 GenBank 上的注册号依次为 DQ279774、DQ279775、DQ279776、DQ279777、DQ279778、DQ279779、DQ279780, 16S rRNA 和 ITS 序列在 GenBank 上的注册号依次为 DQ279767、DQ279768、DQ279769、DQ279770、DQ279771、DQ279772、DQ279773。

表 1 7 株品系序列的碱基数与 GC 含量  
Table 1 The number of base and GC content in seven strains

Strains	Sequences of <i>cpcHID</i>		Sequences of 16S rRNA and ITS region	
	Size (bp)	G + C content (mol%)	Size (bp)	G + C content (mol%)
Sp-10	1492	48.06	1958	53.78
Sp-2	1492	47.99	1957	53.76
Sp-9	1492	48.12	1959	53.75
Sp-1	1492	47.99	1957	53.76
Sp-11	1492	48.39	1958	53.67
Sp-3	1492	47.65	1960	53.88
Sp-5	1492	47.65	1961	53.80

通过序列比对和分析发现, 所扩增的 *cpcHID* 序列的长度均为 1492bp, 包含 *cpcH* 基因的部分序列、*cpcI* 和 *cpcD* 基因的全部序列, 以及 2 个基因间隔区 (IGS1, IGS2), 其排列方式为 *cpcH*-IGS1-*cpcI*-IGS2-*cpcD*; 16S rRNA 和 ITS 序列的长度为 1957bp~1961bp, 包含几乎全长的 16S rRNA 基因和完整的 ITS 区 (含 *rRNA<sup>16S</sup>* 和 *rRNA<sup>16S</sup>* 两个 *rRNA* 基因), 其排列方式为 16S rRNA-ITS1-*rRNA<sup>16S</sup>*-*rRNA<sup>16S</sup>*-ITS2。同时, 节旋藻属和螺旋藻属 ITS 序列的排列方式一般不同, 前者即为上述所测的 7 株品系的排列方式, 后者的排列方式则为 16S rRNA-ITS1-*rRNA<sup>16S</sup>*-ITS2 [11], 这进一步表明本文所用的 7 株品系确均为节旋藻。

GC 含量分析 (表 1) 显示, 7 株品系 *cpcHID* 序列的 GC 含量为 47.65mol%~48.12mol%, 16S rRNA 和 ITS 序列的 GC 含量为 53.75mol%~53.88mol%; 前者的绝对偏差平均值为 0.1877, 显著大于后者的 0.0261。这表明节旋藻 *cpcHID* 在进化过程中的变异程度可能比 16S rRNA 和 ITS 的更高, 也许可作为藻株间分类与鉴定的一种新的分子标记。

### 2.2 基于 *cpcHID*、16S rRNA 及 ITS 的差异位点数比较

运用 BioEdit 7.0 软件分别对 7 株节旋藻品系的 *cpcHID*、16S rRNA、ITS 作序列对齐分析, 统计得到藻株间碱基的差异位点数。由表 2 可知, 基于 *cpcHID* 除 Sp-1 和 Sp-2 之间无差异位点外, 其余两两藻株间的差异位点数为 1~63; 基于 16S rRNA, Sp-1 和 Sp-2 之间也无差异位点, 其余两两藻株间的差异位点数为 1~12; 基于 ITS, Sp-1、Sp-2、Sp-9、Sp-10 两两之

间, 以及 Sp-3 和 Sp-5 之间无差异位点, 其余两两藻株间的差异位点数为 1~46; 若同时基于 16S rRNA 和 ITS, 除 Sp-1 和 Sp-2 之间无差异位点外, 其余两两藻株间的差异位点数为 1~56。

上述结果显示, 节旋藻品系之间, 16S rRNA 序列的差异性虽较为普遍, 但差异位点数较少, 7 株品系共有 16 个差异位点, 而 ITS 的差异性虽较小, 但差异位点数则较多, 7 株品系共有 46 个差异位点。根据 16S rRNA 序列和 ITS 在差异性及其差异位点数方面的这一互补特性, 作者在计算遗传距离和构建系统发生树时, 将 16S rRNA 基因序列和 ITS 综合起来进行统计, 以便为钝顶节旋藻品系间的分类鉴定提供足够的信息。但即便如此, 7 株品系间 16S rRNA 序列和 ITS 的总差异位点数也只有 62, 变异率为 3.2%, 而 7 株品系间 *cpcHID* 序列的差异性不仅普遍, 而且总差异位点数达 72, 变异率为 4.8%。因此, 从序列的差异位点看, *cpcHID* 序列具备用作节旋藻分类与鉴定的优势。

### 2.3 基于 *cpcHID* 及 16S rRNA 和 ITS 的遗传距离矩阵与系统发生树比较

将所测得 7 株钝顶节旋藻品系的 *cpcHID* 序列, 以及 16S rRNA 和 ITS 序列分别进行多重序列比对, 并将比对结果导入 Phylip 3.65 软件包的 dnadist 程序, 采用 F84 模型计算遗传距离 (表 2)。同时, 采用极大似然法 (Phylip 3.65 软件包的 dnaml 程序) 构建 7 株品系的系统发生树 (图 1), 并利用 bootstrap 进行置信度检验, 自举次数为 100。

表 2 7 株品系 cpcHID、16S rRNA 和 ITS 的差异位点数(左下部)及遗传距离矩阵(右上部)  
Table 2 The number of different sites (below the diagonal) and genetic distance matrix (above the diagonal) of cpcHID, 16S rRNA and ITS region among seven strains

Strains	Sp-10	Sp-2	Sp-9	Sp-1	Sp-11	Sp-3	Sp-5
Sp-10		0.00067 (0.00000)	0.00336 (0.00102)	0.00067 (0.00000)	0.01013 (0.00771)	0.04084 (0.02826)	0.04156 (0.02611)
Sp-2	1 (1.0)		0.00268 (0.00102)	0.00000 (0.00000)	0.00944 (0.00771)	0.04012 (0.02827)	0.04084 (0.02613)
Sp-9	5 (3.0)	4 (4.0)		0.00268 (0.00102)	0.01216 (0.00874)	0.04295 (0.02933)	0.04367 (0.02717)
Sp-1	1 (1.0)	0 (0.0)	4 (4.0)		0.00944 (0.00771)	0.04012 (0.02827)	0.04084 (0.02613)
Sp-11	14 (5.10)	13 (6.10)	17 (8.10)	13 (6.10)		0.04007 (0.02555)	0.04079 (0.02342)
Sp-3	59 (7.46)	58 (8.46)	62 (10.46)	58 (8.46)	58 (12.36)		0.00269 (0.00204)
Sp-5	60 (6.46)	59 (5.46)	63 (5.46)	59 (5.46)	59 (9.36)	4 (5.0)	

Below the diagonal, the figures outside brackets were the number of different sites based on multiple pair-wise comparison of cpcHID, and the figures inside brackets were the number of different sites based on multiple pair-wise comparison of 16S rRNA and ITS region, respectively. Above the diagonal, the figures outside brackets were the genetic distance coefficients based on cpcHID, and the figures inside brackets were the genetic distance coefficients based on 16S rRNA and ITS region.

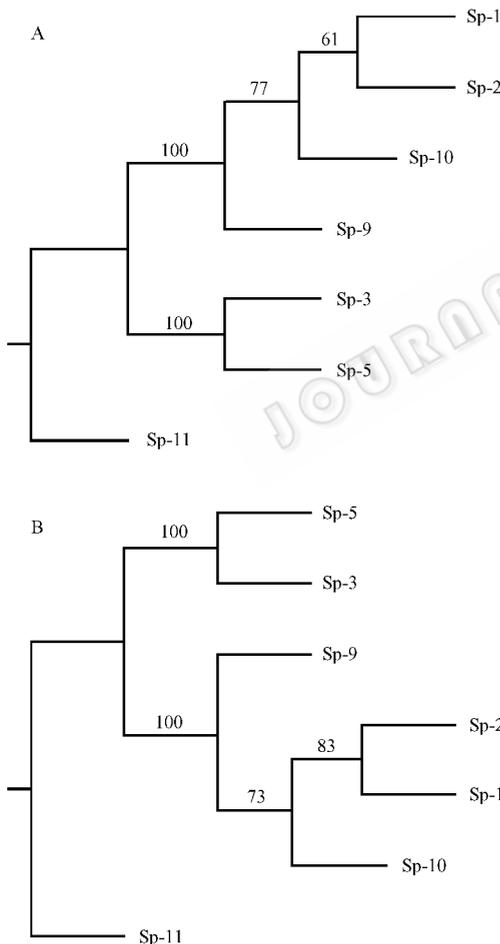


图 1 采用极大似然法构建的系统发生树

Fig.1 Phylogenetic dendrogram constructed by the maximum likelihood method. A: Based on cpcHID; B: Based on 16S rRNA and ITS region. Numbers at branch point were bootstrap support values obtained from 100 replicates.

由表 2 可知,除 Sp-1 和 Sp-2 间的遗传距离系数为 0 外,其它品系间基于 cpcHID 的遗传距离系数比所对应的基于

16S rRNA 和 ITS 的大。这一结果与前面 GC 含量、差异位点数的分析结果相吻合。同时,基于 cpcHID 所构建的系统发生树与基于 16S rRNA 和 ITS 的非常相似,只是 bootstrap 值略有不同。7 株品系可分为 3 大类:Sp-11 单独为一类;Sp-3 和 Sp-5 为一类;Sp-1、Sp-2、Sp-9 和 Sp-10 为一类。其中,后两类的 bootstrap 值均为 100%。在最后一类中,Sp-1 和 Sp-2 先聚类后与 Sp-10 聚成一组,再与 Sp-9 聚类。上述结果与李晋楠等<sup>[6]</sup>利用 RAPD 分子标记所得的分类结果十分相近。

16S rRNA 基因是存在于所有生物中的一类古老、功能相同、既含保守区又含可变区的序列,其序列变化与进化距离相适应,被称为进化分子钟。16S rRNA 和 ITS 作为一种进化的分子标记,已被广泛用于细菌等生物(包括蓝细菌)的系统学研究<sup>[1,7,16]</sup>。节旋藻和螺旋藻等蓝细菌是地球最早出现的光合生物之一,距今已有 35 亿年的历史<sup>[14,18]</sup>。通过上述对 7 株钝顶节旋藻品系的 cpcHID 序列,以及 16S rRNA 和 ITS 序列的 GC 含量、差异位点数、遗传距离矩阵和系统发生树等比较表明,cpcHID 作为蓝细菌中的古老序列之一,其进化趋势与 16S rRNA 和 ITS 的相适应,可作为节旋藻分类与鉴定的一种新的分子标记,并且以其丰富的遗传差异信息而在种内品系间的分类与鉴定中更具优势。

值得注意的是,波浪形的 Sp-1 和螺旋形的 Sp-2 在形态、生理生态及分子水平均有显著差异<sup>[6]</sup>,但无论基于 cpcHID 还是 16S rRNA 和 ITS,都不能区分这两个品系。这提示我们在进行分类与鉴定时,有必要综合利用和考察形态学、生理生态学、分子生物学等不同水平及多种标记。

参 考 文 献

[ 1 ] 茅云翔,杨官品,张宝红,等. 16S rRNA 基因与 16S-23S rRNA 转录单元内间隔区序列分析及其在节旋藻和螺旋藻分类鉴定中的应用. 高技术通讯, 2001, 6: 12-18.  
[ 2 ] Nelissen B, Wilmotte A, Neefs JM, et al. Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria. System Appl Microbiol, 1994, 17: 206-210.

- [ 3 ] Romano I, Bellitti MR, Nicolaus B, *et al.* Lipid profile : a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. *Phytochemistry* 2000 **54** (3) :289 – 294.
- [ 4 ] 汪志平. 蛋白质 SDS-PAGE 用于螺旋藻分类及突变体鉴定的研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)* 2000 **26** (6) :583 – 587.
- [ 5 ] Cohen Z, Margheri MC, Tomaselli L. Chemotaxonomy of cyanobacteria. *Phytochemistry* 1995 **40** (4) :1155 – 1158.
- [ 6 ] 李晋楠, 汪志平. RAPD 分子标记技术用于螺旋藻 (*Spirulina*) 分类的研究. *海洋与湖沼* 2002 **33** (2) :203 – 208.
- [ 7 ] Neilan BA, Jacobs D, Del Dot T, *et al.* rRNA sequences and evolutionary relationship among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int J Syst Bacteriol* 1997 **47** :693 – 697.
- [ 8 ] Robertson BR, Tezuka N, Watanabe MM. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int J System Evol Microbiol* 2001, **51** :861 – 871.
- [ 9 ] Bittencourt-Oliviera MC, Oliveira MC, Bolch CJS. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria /Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). *J Phycol* 2001, **37** :810 – 818.
- [ 10 ] Manen JF, Falquet J. The cpcB-cpcA locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *Int J System Evol Microbiol* 2002 **52** :861 – 867.
- [ 11 ] Teneva I, Dzambazov B, Mladenov R, *et al.* Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (Cyanoprokaryota) using the cpcB-IGS-cpcA locus. *J Phycol*, 2005 **41** :188 – 194.
- [ 12 ] Bhalerao RP, Lind LK, Persson CE, *et al.* Cloning of the phycobilisome rod linker genes from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301 and their inactivation in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Gen Genet* 1993 **237** (1 – 2) :89 – 96.
- [ 13 ] MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol*, 1998, **124** :311 – 334.
- [ 14 ] Grossman AR, Lemaux PG, Conley PB. Regulated synthesis of phycobilisome components. *Photochemistry and Photobiology* 1986, **44** (6) :827 – 837.
- [ 15 ] Kirk EA, Jackie LC, Grossman AR. Evolution of the phycobiliprotein. *J Mol Biol* 1995 **248** (1) :79 – 96.
- [ 16 ] Crosbie ND, Pockl M, Weisse T. Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-Intergenic spacer sequence analyses. *Appl Environ Microbiol*, 2003 **69** (9) :5716 – 5721.
- [ 17 ] Wilmotte A, Turner S, Van de Peer Y, *et al.* Taxonomic study of marine *Oscillatorian* strains (cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. *J Phycol* 1992 **28** :828 – 838.
- [ 18 ] Wang ZP, Zhao Y. Morphological reversion of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanophyta): from linear to helical. *J Phycol* 2005 **41** (3) :622 – 628.

## cpcHID operon as a new tool for classification and identification of *Arthrospira platensis* strains

YANG Ling-yong, WANG Zhi-ping\*, CAO Xue-cheng, CHEN Xiao-yan, XU Bu-jin  
(Zhejiang University, Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** : *Arthrospira* is a photoautotrophic filamentous cyanobacterium belonging to the family Oscillatoriaceae, phylum Cyanophyta. Morphological criteria alone were inadequate for classification of *Arthrospira*. To develop new molecular markers, in this study, the cpcHID operon, 16S rRNA and 16S-23S rRNA internally transcribed spacer (ITS) of seven *Arthrospira platensis* strains, Sp-10, Sp-2, Sp-9, Sp-1, Sp-11, Sp-3 and Sp-5, were cloned and sequenced. And the results of bioinformatics and molecular phylogenetics analyses with BioEdit 7.0, Clustal X 1.81 and Phylip 3.65 were as follows: (1) The sequences of cpcHID operon, 16S rRNA and ITS from the seven strains were highly homologous to the each corresponding gene based on multiple pair-wise comparison. (2) The mean absolute deviation of the G + C content, the ratio of different sites and the genetic distance coefficient based on the sequences of cpcHID operon in the seven strains were generally greater than that based on 16S rRNA and ITS region. (3) The phylogenetic dendrogram based on the sequences of cpcHID operon was almost same with that based on the sequences of 16S rRNA and ITS region. Therefore, it revealed that cpcHID operon could be applied as a new molecular marker to classification and identification of cyanobacterium, and more appropriate for species or strains determination due to its abundant information.

**Keywords** : *Arthrospira* ; cpcHID operon ; 16S rRNA ; 16S-23S rRNA ITS ; Classification

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30000010)

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-571-86971021 ; E-mail : zhpwang@zju.edu.cn

Other authors : LI Xue-bin, HUANG Hui

Received : 6 January 2006 / Accepted : 17 March 2006 / Revised : 27 May 2006