

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710069962.2

[43] 公开日 2008 年 1 月 16 日

[11] 公开号 CN 101104870A

[22] 申请日 2007.7.9

[21] 申请号 200710069962.2

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38
号浙大应用生物科学系

[72] 发明人 汪志平 张巧生 李雪斌 黄 晖
杨灵勇

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 陈祯祥

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

螺旋藻品系生产性状优劣的鉴别方法

[57] 摘要

一种螺旋藻品系生产性状优劣的鉴别方法。通过提取 5 株螺旋藻 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-10 和 Sp-NC 的总 DNA，通过电泳分析发现，根据总 DNA 中染色体外 DNA (exDNA) 的数量 5 株品系可以分为两大类：其中 Sp-1、Sp-2、Sp-10 和 Sp-NC 为一类，仅含一条 exDNA；Sp-3 为另一类，含有 2 条 exDNA。若候选品系总 DNA 中含 2 条 exDNA 时，可能为生产性状较好的品系，适合大规模生产；若总 DNA 中仅含 1 条 exDNA 时，可能为生产性状差的品系，不可用于工厂化生产。

1、螺旋藻品系生产性状优劣的鉴别方法，其特征是利用螺旋藻总 DNA 中 exDNA 的条带数，来筛选候选品系中优质螺旋藻；当候选品系总 DNA 中含 2 条 exDNA 时其性状为优质可用；而当 DNA 中含 1 条 exDNA 时则其性状为劣质不能用。

2、按权利要求 1 所述选择螺旋藻品系的方法，其特征是采用下列操作步骤：

(1) 选用材料为公知的 5 株螺旋藻品系，即 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-10 和 Sp-NC；

(2) 试剂和仪器

琼脂糖为上海生工生物工程公司产品；RNase A 均为日本 TaKaRa 公司产品，其它试剂均为分析纯；

(3) 螺旋藻总 DNA 提取

①取约 200 mg 新鲜藻泥或-20℃冷冻保存的藻泥，转入 5 ml 事先经灭菌的离心管中，先用液氮对样品冻融处理 2~3 次后，加入 2 ml 预热至 65℃的 CTAB 提取液：1.5% CTAB，50 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，10 mmol/L EDTA，0.7 mol/L NaCl，1% (V/V) β -巯基乙醇使用前加入，并加入适量的蛋白酶 K 溶液至终浓度 200 μ g/ml；再将样品颠倒混合均匀，于 62℃水浴 1 h，期间每隔 10 min 左右将样品轻轻摇匀一次；

②室温下 10,000 rpm 离心 5 min 除去细胞碎片等杂质，上清液加入等体积氯仿 / 异戊醇为 24 : 1，轻轻反复颠倒混匀后于 12,000 rpm 离心 10 min；

③取上清液于另一灭菌离心管中，加入 3 倍体积的-20℃预冷无水乙醇及 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 4.8)，轻轻颠倒几次后于-20℃下放置 1 h，使 DNA 充分沉淀；

④12,000 rpm 离心 10 min。沉淀用 70%的乙醇洗涤，真空抽干，溶于 500 μ l TE-蛋白酶 K 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μ g/ml，pH 8.0，于 50℃水浴 1 h 并不时轻轻摇动，直至溶液澄清；

⑤加入等体积的酚 / 氯仿 / 异戊醇为 25 : 24 : 1，轻轻颠倒混匀，12,000 rpm 离心 10 min；

⑥取上清液，加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 3 倍体积-20℃预冷的无水乙醇，于-20℃放置 1 h；

⑦12,000 rpm 4℃离心 10 min，沉淀用 70%的乙醇洗涤 2 次，真空抽干，加入 100 μ l TE-RNase 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，50 μ g/ml RNase，pH 8.0，在 37℃

水浴中保温 30 min, 使 DNA 溶解, 然后置-20℃下保存备用;

(4) 电泳分析和观察

将扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶上电泳, 电压 4 V/cm。电泳完后用 EB 染色约 30 min, 再在 VersaDoc™ Imaging System 3000 凝胶成像系统 Bio-Rad, USA 观察并照相, 经过观察, 如果被筛选的螺旋藻品系与 SP-3 相同, 含有 2 条 exDNA, 则其生产性状为较好的品系, 适合大规模生产。

螺旋藻品系生产性状优劣的鉴别方法

技术领域

本发明属于螺旋藻开发应用的技术

背景技术

螺旋藻 (*Spirulina*), 是一种光合放氧、呈规则螺旋的原核丝状微藻, 系蓝藻门 (Cyanophyta)、颤藻目 (Oscillatoriales)、颤藻科 (Oscillatoriaceae) 的一个属[武汉植物学研究, 1997, 15(4): 369-374]。因富含优质蛋白和多种生物活性物质而受到国内外的极大关注, 并已在大量研究的基础上形成了庞大的螺旋藻产业, 成为目前全球研究开发规模最大, 应用前景最广泛的经济微藻。值得指出的是, 众多的实验研究与长期的生产实践表明, 螺旋藻不同品种 (系), 对温度、光质、光照强度, 以及培养液的盐度、pH 和营养成分等环境因子的要求与适应性存在显著差异, 由此产生的经济效益也相差甚远[水生生物学报, 1999, 23(1): 59-64]。所以, 与其它农业与生物技术产业一样, 选育品性兼优的品种 (系) 是有效提升当前螺旋藻产业经济效益、切实解决生产实际问题, 最直接而重要的途径之一。

目前国内外筛选适合大规模生产螺旋藻品种 (系) 的一般常规方法如下: 1、对新分离到的品种 (系) 进行编号; 2、在实验室条件下作多种环境因子的交叉组合培养试验, 并根据所测定的生长曲线、光合放氧、生化组成等指标作初步筛选; 3、对实验室初筛到有生产养殖潜力的候选品种 (系) 在不同季节、气候及营养条件下进行养殖小试、中试与生产性试验, 再筛选出目标品种 (系)。这一方法虽然实用、有效, 但程序繁琐、工作量大、周期长、成本高。因此, 有必要建立简单、快速、有效的评价与筛选方法, 以满足当前国内外螺旋藻产业不断发展的实际需要。

发明内容

本发明目的是提供一种简单、快速、有效的筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系的新方法。

我们提取了 5 株螺旋藻 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-10 和 Sp-NC 的总 DNA, 通过电泳分析发现, 根据总 DNA 中染色体外 DNA (exDNA) 的数量 5 株品系可以分为两大类: 其中 Sp-1、Sp-2、Sp-10 和 Sp-NC 为一类, 仅含一条 exDNA; Sp-3 为另一类, 含有 2 条 exDNA。长期

的实验研究与生产实践表明，Sp-3 品系在实际生产养殖中表现优良，而 Sp-1、Sp-2、Sp-10 和 Sp-NC 因适应能力差而不能用作工厂化生产养殖。由此可见，螺旋藻总 DNA 中 exDNA 与螺旋藻生产性状存在相关性，可以作为优质螺旋藻品系筛选的分子标记，即若候选品系总 DNA 中含 2 条 exDNA 时，可能为生产性状较好的品系，适合大规模生产；若总 DNA 中仅含 1 条 exDNA 时，可能为生产性状差的品系，不可用于工厂化生产。

本发明的显著优点：

本发明所建立的筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系的方法与常规方法相比，不仅简单、快速、有效，而且成本低，并适合大规模、高通量筛选。

附图说明

图 1 为 4 株螺旋藻品系的总 DNA 电泳图；

M：标准分子量；1~5：分别对应 Sp-3，Sp-NC，Sp-1，Sp-2，Sp-10

图 2 为被鉴别藻株 Sp-5 和 Sp-9 的总 DNA 电泳图。

M：标准分子量；6 和 7：分别对应 Sp-5 和 Sp-9

具体实施方式

本发明的详细技术方案可以通过以下步骤实施：

1、选用材料为公知的 5 株螺旋藻品系，即 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-10 和 Sp-NC（浙江大学原子核农业科学研究所生物资源与分子工程实验室也有保存）。其中，Sp-3 对环境适应能力强，在大规模生产养殖中被广泛应用，而 Sp-1、Sp-2、Sp-10 和 Sp-NC 因适应能力差而不能用作工厂化生产。

2、试剂和仪器

琼脂糖为上海生工生物工程公司产品；蛋白酶 K 为 Merck 公司产品；RNase A 均为日本 TaKaRa 公司产品。其它试剂均为分析纯。

3、螺旋藻总 DNA 提取

(1) 取约 200 mg 新鲜藻泥或-20℃冷冻保存的藻泥，转入 5 ml 事先经灭菌的离心管中，先用液氮对样品冻融处理 2~3 次后，加入 2 ml 预热至 65℃的 CTAB 提取液[1.5% CTAB, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA, 0.7 mol/L NaCl, 1% (V/V) β -巯基乙醇（使用前加入）]，并加入适量的蛋白酶 K 溶液至终浓度 200 μ g/ml；再将样品颠倒混合均匀，于 62℃水浴 1 h，期间每隔 10 min 左右将样品轻轻摇匀一次。

(2) 室温下 10,000 rpm 离心 5 min 除去细胞碎片等杂质，上清液加入等体积氯仿 / 异戊醇 (24 : 1)，轻轻反复颠倒混匀后于 12,000 rpm 离心 10 min。

(3) 取上清液于另一灭菌离心管中，加入 3 倍体积的-20℃预冷无水乙醇及 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 4.8)，轻轻颠倒几次后于-20℃下放置 1 h，使 DNA 充分沉淀。

(4) 12,000 rpm 离心 10 min。沉淀用 70%的乙醇洗涤，真空抽干，溶于 500 μl TE-蛋白酶 K 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μg/ml, pH 8.0)，于 50 °C 水浴 1 h 并不时轻轻摇动，直至溶液澄清。

(5) 加入等体积的酚 / 氯仿 / 异戊醇 (25 : 24 : 1)，轻轻颠倒混匀，12,000 rpm 离心 10 min。

(6) 取上清液，加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 3 倍体积-20℃预冷的无水乙醇，于-20 °C 放置 1 h。

(7) 12,000 rpm 4℃离心 10 min，沉淀用 70%的乙醇洗涤 2 次，真空抽干，加入 100 μl TE-RNase 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 50 μg/ml RNase, pH 8.0)，在 37 °C 水浴中保温 30 min，使 DNA 溶解，然后置-20℃下保存备用。

4、电泳分析和观察

将扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶上电泳，电压 4 V/cm。电泳完后用 EB 染色约 30 min，再在 VersaDoc™ Imaging System 3000 凝胶成像系统 (Bio-Rad, USA) 观察并照相。经过观察，如果被筛选的螺旋藻品系含有 2 条 exDNA，则可能为生产性状较好的品系，适合大规模生产。

结果与分析

exDNA条带电泳分析

提取了 5 株螺旋藻 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-10 和 Sp-NC 的总 DNA，通过电泳分析发现，根据总 DNA 中染色体外 DNA (exDNA) 的数目不同，5 株品系可分为两大类：其中 Sp-1、Sp-2、Sp-10 和 Sp-NC 为一类，仅含一条 exDNA；Sp-3 为另一类，含有 2 条 exDNA。

长期的实验研究与生产实践表明，Sp-3 品系在实际生产养殖中表现优良，而 Sp-1、Sp-2、Sp-10 和 Sp-NC 因适应能力差而不能用作工厂化生产养殖。由此可见，螺旋藻总 DNA 中 exDNA 的条带数与螺旋藻生产性状优劣存在相关性，可以作为优质螺旋藻品系筛选的分子标记，即若候选品系总 DNA 中含 2 条 exDNA 时，可能为生产性状较好的品系，适合大规模生

产；若总 DNA 中仅含 1 条 exDNA 时，可能为生产性状差的品系，不可用于工厂化生产。

作为实例，我们选取了 Sp-5 和 Sp-9 这 2 株品系来验证本发明的实用性，其中，Sp-5 品系是适用于大规模生产养殖的良种，而 Sp-9 因适应性差而不能用于大规模生产。通过提取 Sp-5 和 Sp-9 的总 DNA，电泳检测发现，Sp-5 含有 2 条 exDNA，而 Sp-9 仅含 1 条 exDNA。上述结果进一步说明，螺旋藻总 DNA 中 exDNA 的条带数可以作为一种分子标记来筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系。

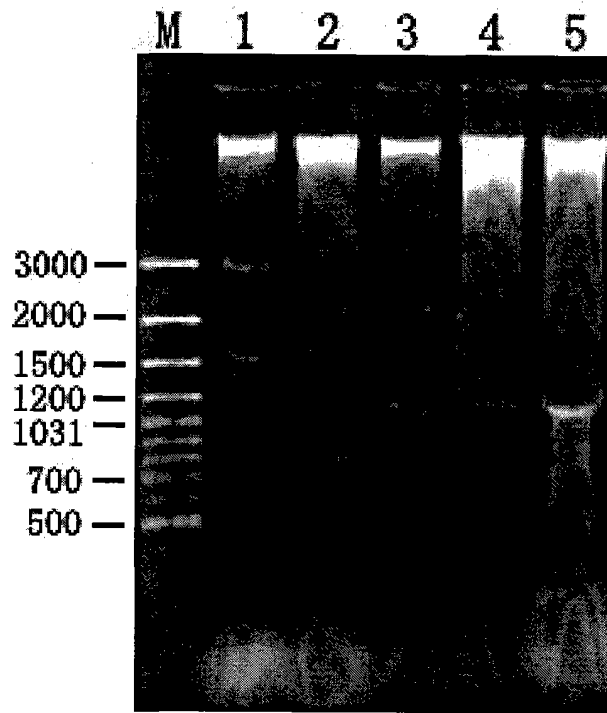


图 1

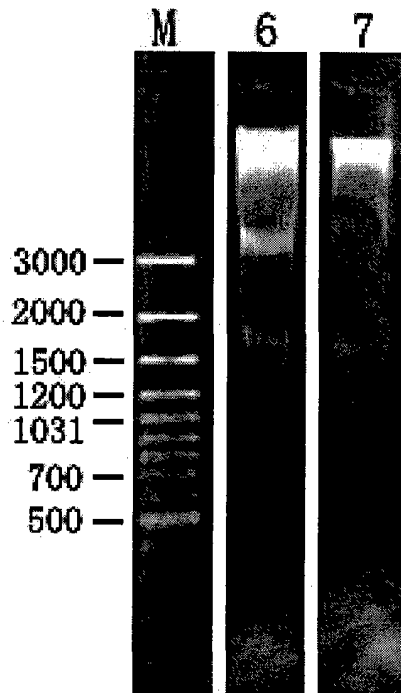


图 2