

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710069963.7

[43] 公开日 2008年2月20日

[11] 公开号 CN 101126067A

[22] 申请日 2007.7.9

[21] 申请号 200710069963.7

[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 李晋楠 黄 晖
李雪斌 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 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

[54] 发明名称

确定优质螺旋藻生产品系的方法

[57] 摘要

一种确定优质螺旋藻生产品系的方法。通过设计随机引物,利用 RAPD 等分子生物学方法扩增 5 株螺旋藻品系 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 的特异性条带,聚类分析发现,5 株品系可以分为两大类:其中 Sp-1 和 Sp-2 为一类;Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 为另一类,并且引物 S35 和 S99 扩增图谱中具有能鉴别两类品系的特异性条带,分子量分别为 680bp 和 900bp 的特异性条带仅出现在 Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 品系中,而分子量分别为 900bp 和 650bp 的特异性条带仅出现在 Sp-1 和 Sp-2 品系中。将候选品系用引物 S35 和 S99 扩增出的条带分别为 680bp 和 900bp 者,可能为生产性状较好的品系,适合大规模生产;用引物 S35 和 S99 扩增出的条带分别为 900bp 和 650bp 者,可能为生产性状差的品系,不可用于工厂化生产。

1、确定优质螺旋藻生产品系的方法，其特征是将候选的螺旋藻品系用引物 S35 和 S99 扩增条带，当分子量为 680 bp 和 900 bp 时，其性状为优良可用；而当扩增条带分子量为 650 bp 和 900 bp 时，则其性状为劣不可用。

2、按权利要求 1 所述确定优质螺旋藻品系的方法，其特征是采用下列操作步骤：

(1) 选用材料为 5 株螺旋藻品系，即 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4 和 Sp-5；

(2) 试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶和琼脂糖为上海生工生物工程公司产品；dNTP、DNA 限制性内切酶、RNase A 均为日本 TaKaRa 公司产品；PCR 随机引物由上海英骏公司合成，其它试剂均为分析纯，序列扩增用美国 Hybaid 公司的 Thermal Cycler PCR 仪；

(3) PCR 引物与扩增

随机引物 S35 5'-TTCCGAACCC-3'和 S99 5'-GTCAGGGCAA-3'，25 μ L PCR 反应体系中含 10 倍的 PCR 缓冲液 2.5 μ L，4 种 dNTP 各 1 μ mol/L，引物 0.5 μ mol/L，2.5U 的 *Taq* DNA 聚合酶，100ng 基因组 DNA，PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，36 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 1 min，35 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min；

(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 VersaDocTM Imaging System 3000 凝胶成像系统 Bio-Rad, USA 观察并照相，经过观察对比被筛选的螺旋藻品系用引物 S35 和 S99 扩增出条带的分子量。

确定优质螺旋藻生产品系的方法

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去甚远[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、低成本有效的筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系的新方法。

我们利用 RAPD 技术对 5 株螺旋藻 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 进行多态性扩增, 聚类分析发现, 5 株品系可以分为两大类: 其中 Sp-1 和 Sp-2 为一类; Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 为另一类, 并且引物 S35 和 S99 扩增图谱中具有能鉴别两类品系的特异性条带, 分子量分别为 680 bp 和 900 bp 的特异性条带仅出现在 Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 品系中, 而分子量分别为 900 bp 和

650 bp 的特异性条带仅出现在 Sp-1 和 Sp-2 品系中。经长期大量的实验研究与生产实践表明, Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 这 3 株品系在实际生产养殖中表现优良, 而 Sp-1 和 Sp-2 因适应能力差而不能用作工厂化生产养殖。由此可见, S35 和 S99 扩增的特异性条带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, 即用引物 S35 和 S99 扩增出的条带, 分子量分别为 680 bp 和 900 bp 者, 可能为生产性状较好的品系, 适合大规模生产; 而用引物 S35 和 S99 扩增出的条带分子量分别为 900 bp 和 650 bp 者, 则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 5 株螺旋藻品系中扩增条带的电泳图, 其中 M: 标准分子量; CK: 阴性对照; 1~5: 分别对应 Sp-1~Sp-5;

图 2 为被鉴别藻株 Sp-6 和 Sp-7 扩增条带的电泳图, 其中 M: 标准分子量; CK: 阴性对照; 6 和 7: 分别对应 Sp-6 和 Sp-7。

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-4 和 Sp-5 (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、Sp-4 和 Sp-5 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 和 Sp-2 因适应能力差而不能用作工厂化生产。

2、试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶和琼脂糖为上海生工生物工程公司产品; dNTP、DNA 限制性内切酶、RNase A 均为日本 TaKaRa 公司产品; PCR 随机引物由上海英骏公司合成。其它试剂均为分析纯。序列扩增用美国 Hybaid 公司的 Thermal Cycler PCR 仪。

3、PCR 引物与扩增

随机引物 S35 5'-TTCCGAACCC-3'和 S99 5'-GTCAGGGCAA-3'。25 μ L PCR 反应体系中含 10 倍的 PCR 缓冲液 2.5 μ L, 4 种 dNTP 各 1 μ mol/L, 引物 0.5 μ mol/L, 2.5U 的 *Taq* DNA 聚合酶, 100ng 基因组 DNA[浙江大学学报. 2002, 28 (5): 533~536]。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min;

94℃ 30 s, 36℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

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用引物 S35 和 S99 扩增出的条带分别为 680 bp 和 900 bp, 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

RAPD扩增特异性条带电泳分析

Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 的基因组 DNA 分别经随机引物 S35 和 S99 RAPD 扩增, 分子量分别为 680 bp 和 900 bp 的特异性条带仅出现在 Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 品系中, 而分子量分别为 900 bp 和 650 bp 的特异性条带仅出现在 Sp-1 和 Sp-2 品系中。

长期的实验研究与生产实践表明, Sp-3、Sp-4 和 Sp-5 这 3 株品系在实际生产养殖中表现优良, 而 Sp-1 和 Sp-2 因适应能力差而不能用作工厂化生产。由此可见, S35 和 S99 扩增的特异性条带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, 即用引物 S35 和 S99 扩增出的条带分别为 680 bp 和 900 bp 者, 可能为生产性状较好的品系, 适合大规模生产; 用引物 S35 和 S99 扩增出的条带分别为 900 bp 和 650 bp 者, 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-6 和 Sp-7 这 2 株品系来验证本发明的实用性, 其中, Sp-7 品系是适用于大规模生产养殖的良种, 而 Sp-6 因适应性差而不能用于大规模生产。Sp-6 和 Sp-7 基因组 DNA 分别经随机引物 S35 和 S99 RAPD 扩增, Sp-7 品系得到特异性条带分子量分别为 680 bp 和 900 bp, 而 Sp-6 品系得到特异性条带分子量分别为 900 bp 和 650 bp。上述结果进一步说明, S35 和 S99 扩增的特异性条带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。

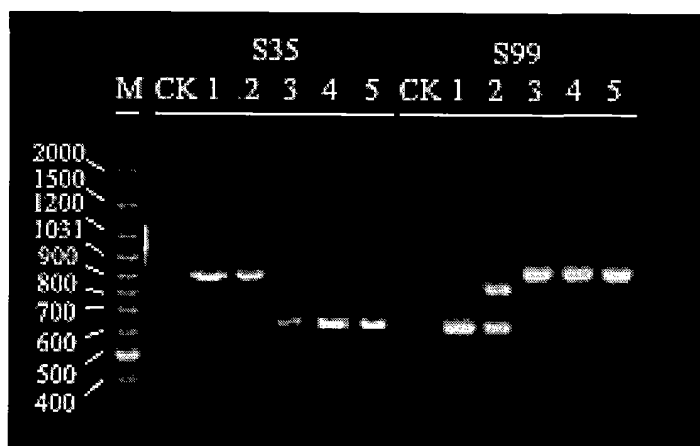


图 1

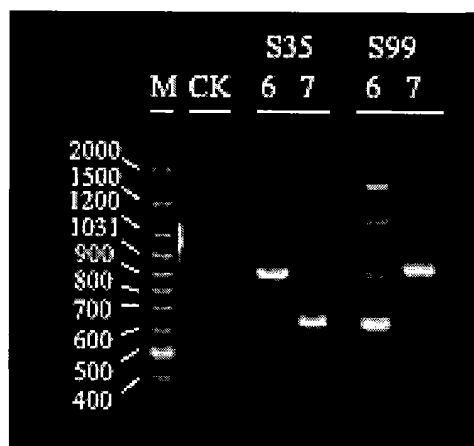


图 2