

[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 200710069961.8

[43] 公开日 2008年8月13日

[11] 公开号 CN 101240242A

[22] 申请日 2007.7.9

[21] 申请号 200710069961.8

[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 黄 晖 杨灵勇 曹学成

[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 5 页

[54] 发明名称

螺旋藻工厂化培植优良品系的筛选方法

[57] 摘要

一种筛选螺旋藻工厂化培植优良品系的方法。通过设计特定引物，利用 PCR 等分子生物学方法克隆并测定了 7 株螺旋藻品系 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4、Sp-5、Sp-6 和 Sp-7 的相应基因序列，并利用 DNASTar v6.13 软件将该基因翻译成氨基酸后进行多重序列联配发现，根据 1~80 位氨基酸序列的第 7、20、30、56、72 位点，7 株品系可以分为两大类：其中 Sp-1、Sp-2 和 Sp-6 为一类；Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 为另一类；将候选品系的第 1~80 位氨基酸序列进行比对，若与 Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 品系相同，则可能生产性状优良，适合大规模生产；若与 Sp-1、Sp-2 和 Sp-6 品系一致，则可能不可用于工厂化生产。

1、一种筛选用于螺旋藻工厂化培植的优良品系的方法,其特征是将7株螺旋藻品系 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4、Sp-5、Sp-6、Sp-7 分成两类,一类是 Sp-1、Sp-2 和 Sp-6,另一类是 Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7;与候选螺旋藻品系的第1~80位藻蓝蛋白连接多肽 I 氨基酸序列,按 SeqNO.1 的第7、20、30、56、72 位点进行多重比对,比对结果,如与前一类相同,其性状为劣质;如与后一类相同则其性状为优质。

2、按权利要求1所述筛选优质螺旋藻品系的方法,具体采用下列操作步骤:

(1) 选用材料为7株螺旋藻品系,即 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4、Sp-5、Sp-6 和 Sp-7;

(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;克隆载体 pMD18-T、dNTP、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、RNase A 均为日本 TaKaRa 公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒购于 Invitrogen 公司;PCR 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,测序用美国 ABI 公司的 3730 型测序仪;

(3) PCR 引物设计与扩增

引物根据 GenBank 上相应的序列 AF164139,利用 Primer 5.0 引物设计软件得到上游引物 PF: 5'-TTTAGCAGAAGCAAGTCGCC-3',下游引物 PR: 5'-CGTATTATCGGTAGTCATCGG-3', 25 μ L PCR 反应体系中含引物 PF 和 PR 各 0.5 μ mol/L, 4 种 dNTP 各 1 μ mol/L, 2.5U 的 *Taq* DNA 聚合酶, 10 倍的 PCR 缓冲液 2.5 μ L, 100ng 基因组 DNA, PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min;

(4) 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;

(5) 序列翻译与多重联配

采用 DNASTar v1.63 软件将藻蓝蛋白连接多肽 I 基因序列翻译成氨基酸序列,并利用 ClustalX 1.81 软件对所得序列进行多重联配。

螺旋藻工厂化培植优良品系的筛选方法

技术领域

本发明属于筛选优质螺旋藻的技术。

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]。因此，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、低成本的筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系的新方法。

藻蓝蛋白连接多肽 I 为蓝藻等少数藻类所特有，在藻胆体的组装过程中起着至关重要的作用 (Yu *et al.*, 1982; Mac Coll, 1998)。我们通过设计特定引物，利用 PCR 等分子生物学技术克隆并测定了 7 株螺旋藻品系 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4、Sp-5、Sp-6 和 Sp-7 的相应基因序列，并利用 DNASTar v6.13 软件将该基因翻译成氨基酸后进行多重序列联配。依据相似性程度，7 株品系可以分为两大类：即 Sp-1、Sp-2 和 Sp-6 为一类；Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 为

另一类。在这两大类品系中，同一大类内部品系间序列基本相同，而在不同大类品系间差异主要表现在1~80位氨基酸序列的第7、20、30、56、72位点。经过长期大量的实验研究与生产实践表明，Sp-3、Sp-4、Sp-5和Sp-7这4株品系在实际生产养殖中表现优良，而Sp-1、Sp-2和Sp-6因适应能力差而不用于工厂化生产养殖。研究证明，螺旋藻的藻蓝蛋白连接多肽I氨基酸序列特征与生产性状存在相关性，其第1~80位氨基酸序列可用作优质螺旋藻品系筛选的分子标记。即候选品系的第1~80位氨基酸序列的第7、20、30、56、72位点若与Sp-3、Sp-4、Sp-5和Sp-7的相同，则生产性状优良，可应用于大规模生产；若与Sp-1、Sp-2和Sp-6的一致，则生产性状差，不用于工厂化生产。

本发明的显著优点：

本发明所建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。

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7株螺旋藻品系，即Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4、Sp-5、Sp-6和Sp-7（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、Sp-5和Sp-7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和Sp-6因适应能力差而不用于工厂化生产。

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；克隆载体pMD18-T、dNTP、DNA限制性内切酶、T4 DNA连接酶、RNase A均为日本TaKaRa公司产品；DNA凝胶回收试剂盒购于Invitrogen公司；PCR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，测序用美国ABI公司的3730型测序仪。

3、PCR引物设计与扩增

引物根据GenBank上相应的序列AF164139，利用Primer 5.0引物设计软件得到上游引物PF：5'-TTTAGCAGAAGCAAGTCGCC-3'，下游引物PR：5'-CGTATTATCGGTAGTCATCGG-3'。25 μ L PCR反应体系中含引物PF和PR各0.5 μ mol/L，4种dNTP各1 μ mol/L，2.5U的Taq DNA聚合酶，10倍的PCR缓冲液2.5 μ L，100ng基因组DNA[提取方法参考——浙江大学学报. 2002, 28 (5): 533~536]。PCR反应程序为94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，65 $^{\circ}$ C 1.5 min，72 $^{\circ}$ C 3 min，30个循环；最后72 $^{\circ}$ C延伸8 min。

4、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。

5、序列翻译与多重联配

采用 DNASTar v1.63 软件将藻蓝蛋白连接多肽 I 基因序列翻译成氨基酸序列, 并利用 ClustalX 1.81 软件对所得序列进行多重联配。经过比对, 如果被筛选的螺旋藻品系的第 1~80 位氨基酸序列的第 7、20、30、56、72 位点与 Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 品系相同, 则可能生产性状优良, 适合大规模生产。

结果与分析

藻蓝蛋白连接多肽I前80位氨基酸序列多重联配

Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-4、Sp-5、Sp-6 和 Sp-7 的基因组 DNA 分别经藻蓝蛋白连接多肽 I 基因序列的特定引物 PCR 扩增与克隆, 测得相应序列后利用 DNASTar v1.63 软件翻译成氨基酸序列, ClustalX 1.81 软件的多重序列联配结果如 SeqNO.1 所示。

长期的实验研究与生产实践表明, Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 这 4 品系在实际生产养殖中表现优良, 而 Sp-1、Sp-2 和 Sp-6 因适应能力差而不能用作工厂化生产。由此可见, 藻蓝蛋白连接多肽 I 氨基酸序列特征与螺旋藻生产性状存在相关性, 因此, 第 1~80 位氨基酸序列可以作为优质螺旋藻品系筛选的分子标记, 即候选品系的第 1~80 位氨基酸序列的第 7、20、30、56、72 位点若与 Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 的相同, 则可能生产性状优良, 适合大规模生产; 若与 Sp-1、Sp-2 和 Sp-6 的一致, 则可能不可工厂化生产。

作为实例, 如 SeqNO.2 所示, 我们选取了 Sp-8、Sp-9 和 Sp-10 这 3 株品系来验证本发明的实用性。其中, Sp-9 和 Sp-10 是适用于大规模生产养殖的良种, 而 Sp-8 品系因适应性差而不能用于大规模生产。通过克隆并测定这 3 株品系的藻蓝蛋白连接多肽 I 基因序列, 利用 DNASTar v1.63 软件翻译成氨基酸序列, ClustalX 1.81 软件的多重序列联配结果如 SeqNO.2 所示。Sp-9 和 Sp-10 的第 1~80 位藻蓝蛋白连接多肽 I 氨基酸序列的第 7、20、30、56、72 位点与 Sp-3、Sp-4、Sp-5 和 Sp-7 的相同, 而 Sp-8 的第 1~80 位藻蓝蛋白连接多肽 I 氨基酸序列的第 7、20、30、56、72 位点与 Sp-1、Sp-2 和 Sp-6 的完全一致。上述结果进一步说明, 第 1~80 位藻蓝蛋白连接多肽 I 氨基酸序列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。

SeqNO.1 7 株螺旋藻品系第 1~80 位藻蓝蛋白连接多肽 I 氨基酸序列的多重联配结果

其中 Sp-1、Sp-2、Sp-6 这 3 株品系与 Sp-3、Sp-4、Sp-5、Sp-7 两两之间的差异位点被标下划线；“*”表示 7 株品系的第 1~80 位藻蓝蛋白连接多肽 I 氨基酸序列的相同位点。

	10	20	30	40	50
Sp-1	MAIT <u>TQ</u> ASRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>L</u>	VELRPNWSR <u>D</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-2	MAIT <u>TQ</u> ASRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>L</u>	VELRPNWSR <u>D</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-6	MAIT <u>TQ</u> ASRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>L</u>	VELRPNWSR <u>D</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-3	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-4	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-5	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-7	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLG <u>NH</u> YLM
	***** **	*****	*****	*****	***** **
	60	70	80		
Sp-1	SSERL <u>T</u> SAES	LLCDGSITVR	EL <u>VRC</u> VAKSE		
Sp-2	SSERL <u>T</u> SAES	LLCDGSITVR	EL <u>VRC</u> VAKSE		
Sp-6	SSERL <u>T</u> SAES	LLCDGSITVR	EL <u>VRC</u> VAKSE		
Sp-3	SSERL <u>I</u> SAES	LLCDGSITVR	EF <u>VRC</u> VAKSE		
Sp-4	SSERL <u>I</u> SAES	LLCDGSIS <u>V</u> R	EF <u>VRC</u> VAKSE		
Sp-5	SSERL <u>I</u> SAES	LLCDGSITVR	EF <u>VRC</u> VAKSE		
Sp-7	SSERL <u>I</u> SAES	LL <u>S</u> DGSITVR	EF <u>VRC</u> VAKSE		
	***** **	** **	* **		

SeqNO.2 10 株螺旋藻品系第 1~80 位藻蓝蛋白连接多肽 I 氨基酸序列的多重联配结果

	10	20	30	40	50
Sp-9	MAIT <u>TQ</u> ASRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>L</u>	VELRPNWSR <u>D</u>	NAQE <u>AIRAI</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-10	MAIT <u>TQ</u> ASRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>L</u>	VELRPNWSR <u>D</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-1	MAIT <u>TQ</u> ASRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>L</u>	VELRPNWSR <u>D</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-2	MAIT <u>TQ</u> ASRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>L</u>	VELRPNWSR <u>D</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-6	MAIT <u>TQ</u> ASRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>L</u>	VELRPNWSR <u>D</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-3	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-4	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-5	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
Sp-7	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLG <u>NH</u> YLM
Sp-8	MAIT <u>TQ</u> SSRL	GT <u>TAFQ</u> ESS <u>P</u>	VELRPNWSR <u>E</u>	NAQE <u>VIRAV</u> Y	RQLLGNDYLM
	***** **	*****	*****	*****	***** **
	60	70	80		

Sp-9 SSERLTSAES LLCDGSITVR ELVRCAKSE
Sp-10 SSERLTSAES LLCDGSITVR ELVRCAKSE
Sp-1 SSERLTSAES LLCDGSITVR ELVRCAKSE
Sp-2 SSERLTSAES LLCDGSITVR ELVRCAKSE
Sp-6 SSERLTSAES LLCDGSITVR ELVRCAKSE
Sp-3 SSERLISAES LLCDGSITVR EFVRCAKSE
Sp-4 SSERLISAES LLCDGSISVR EFVRCAKSE
Sp-5 SSERLISAES LLCDGSITVR EFVRCAKSE
Sp-7 SSERLISAES LLSDGSITVR EFVRCAKSE
Sp-8 SSERLISAES LLCDGSITVR EFVRCAKSE
***** ** * * * * *