

## 利用 18S rDNA 基因序列鑑定綠球藻及擬球藻

蘇惠美<sup>1</sup>、李俊輝<sup>2</sup>、張銀戀<sup>1</sup>、陳紫嫻<sup>1</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所生物技術組

<sup>2</sup>國立屏東科技大學水產養殖研究所

綠球藻與擬球藻均為綠色，大小約 5 微米之小球藻，單從形態、藻色難以區別。本研究室保存編號為 CHLS1-S7 之小球藻，依型態暫定為 marine *Chlorella* spp.，其各有不同之脂肪酸組成。利用分子生物技術，如聚合酶鏈鎖反應 (PCR)，可讓特殊 DNA 於體外進行放大。由於核糖體基因 (ribosomal RNA gene, rDNA) 具高度重覆性序列 (圖 1)，同時在所有物種之中有相同的功能，以及在演化過程中會產生保守性及可變性區域，成為分子分類的主要依據。本研究將利用細胞核 18S rDNA 基因序列來加以鑑定，以建立微藻分生鑑定技術，並取得海水綠球藻遺傳基因資訊。

本實驗流程如圖 2，利用市售植物全基因萃取組 (Viogene ; Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System) 抽取藻類總基因組 DNA。採用 Huss and Sogin (1989) 所設計的引子組 (F: 5'-aacctggttgatcctgccagt-3' ; R: 5'-ttgatccttctgcaggttcacctac-3')，以聚合酶連鎖反應擴增待鑑定藻類的 18S rDNA 片段 (圖 3)。再將該擴增片段和 PCR 選殖載體

(pGEM-T EZ vector)，在 4°C 進行接合 (ligation) 後再轉形 (transformation) 至勝任細胞 (Top10F)，經 14-16 小時培養，挑取白色菌落，以 PCR 檢測確認，經確認後的菌落接種到 5 mL LB 帶有 Amp 選別培養基中培養，以質體純化藥組 (Mini-M Plasmid DNA Extraction System) 抽取質體後，再次以核酸限制酶 Eco RI 確認，將含有疑似 18S rDNA 片段基因之菌落，委由生物科技公司進行序列分析。定序後之基因序列，先以 DNA Star 軟體中之 MegAlin 及 EditSeq 作序列比對，確認 2 株菌株 (pGEMT vector T7 端) 結果是相同後，再挑選一株菌株做 pGEMT vector SP6 端插入之定序，並告知作反轉。最後利用 NCBI Gene Bank 中，所登載之 18S rDNA 基因序列資料進行比對。結果 (表 1) 顯示 1983-1991 收集保存之 5 株 marine *Chlorella* spp. 中，不含 EPA 之 S1、S7 同為 *Chlorella* sp. SAG 211-18，S3 為 *Chlorella kessleri*，而含 EPA 之 S2 及 S6 分別為 *Nannochloropsis* sp. 之二株。

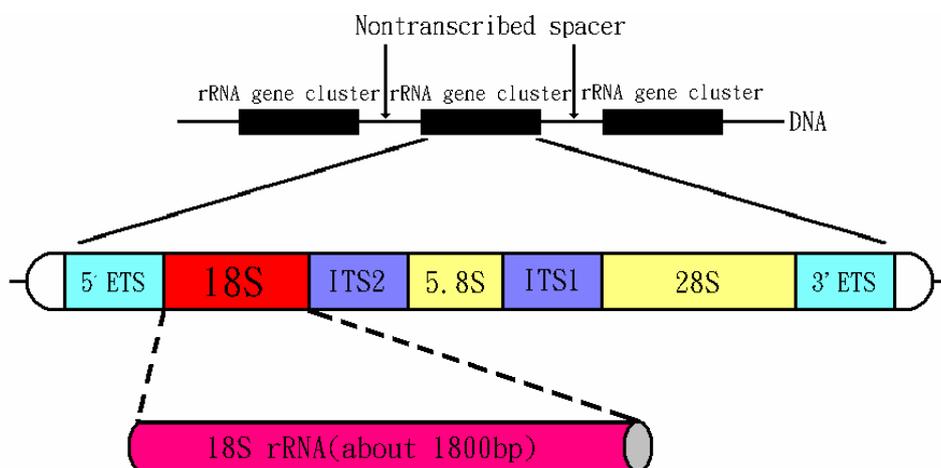


圖 1 核糖體 DNA 基因組成

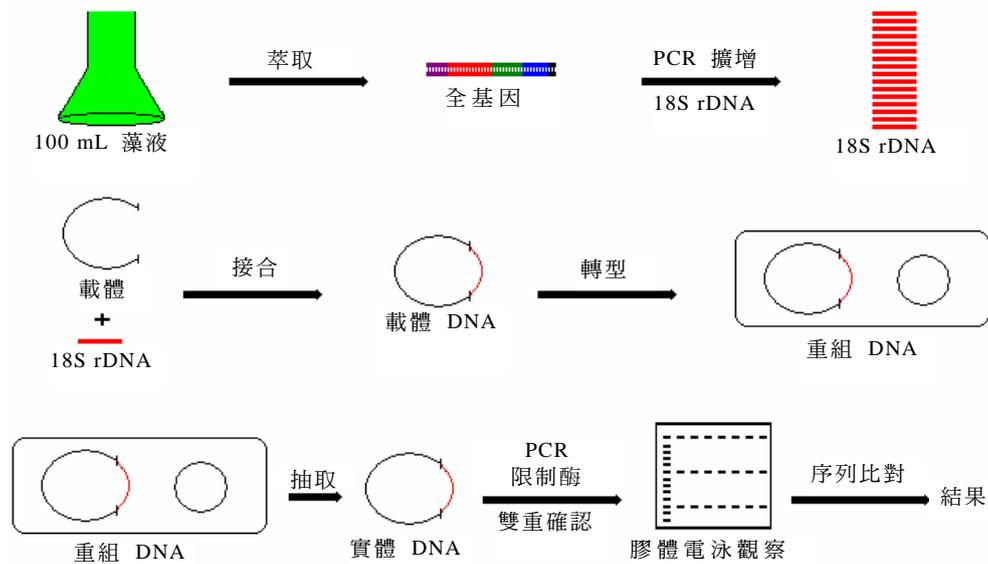


圖 2 小球藻 18S rDNA 基因萃取、聚合酶連鎖反應基因片段擴增、轉殖載體、質體確認與基因序列定序實驗流程

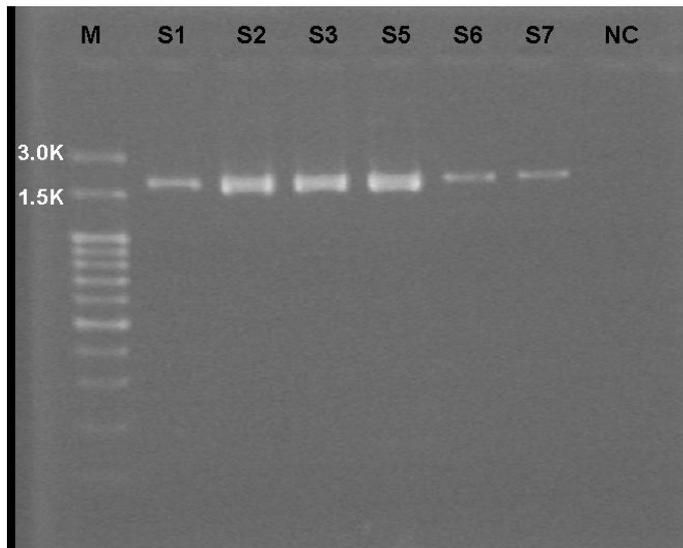


圖 3 聚合酶連鎖反應作出的藻類 18S rDNA 片段

表 1 保存小球藻來源、脂肪酸中二十碳五烯酸 (EPA) 含量及細胞核 18S rDNA 基因序列鑑定結果

收集序號	種名	編號	來源	取得日期	EPA 含量 (脂肪酸%)	序列分析鑑定
TF-2	<i>Chlorella</i> sp. A	CHL-S1	東港養殖池	1983	0	<i>Chlorella</i> sp. SAG 211-18
TF-4	<i>Chlorella</i> sp. B	CHL-S2	東港養殖池	1984	9.54	<i>Nannochloropsis</i> sp. CCAP 211/78
TF-5	<i>Chlorella</i> sp. C	CHL-S3	泰國	1985	0	<i>Chlorella kessleri</i>
TF-7	<i>Chlorella</i> sp. F	CHL-S6	東港養殖池	1985	17.46	<i>Nannochloropsis</i> sp. Strain ILOR
TF-19	<i>Chlorella</i> sp. french	CHL-S7	法國魚苗場	1991	0	<i>Chlorella</i> sp. SAG 211-18