

水华蓝藻产毒特性的 PCR 检测法

潘 卉 宋立荣 刘永定 朱运芝 沈 强

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 特异引物对 (TOX 1P/1F; TOX 2P/2F) 用于检测微囊藻毒素合成酶基因 *mcyB* 片段在 38 种水华蓝藻中的分布情况。结果显示, 所有能产生微囊藻毒素的微囊藻都有特异扩增条带, 非产毒株则没有。几种常规的毒性检测方法验证了 PCR 方法所获结果的准确性。本研究发展了以全细胞 PCR 法检测 *mcyB* 片断, 说明全细胞 PCR 检测法适用于不同来源的蓝藻材料。结果证明以 DNA 为基础鉴别产毒和非产毒微囊藻及其他水华蓝藻的方法是可行和实用的。

关键词: 全细胞 PCR; 水华蓝藻; 微囊藻; 微囊藻毒素; *mcyB*; 基因

中图分类号: Q94922 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)02-0159-08

蓝藻水华持续大面积的发生, 极大地危害水体生态系统的结构和功能, 某些水华种类产生的藻毒素对人类的健康也构成了直接或潜在的影响。产生微囊藻毒素 (Microcystin, MC) 的藻类主要是微囊藻属 (*Microcystis*), 其他如鱼腥藻属 (*Anabaena*)、念珠藻属 (*Nostoc*)、颤藻属 (*Oscillatoria*)、节球藻属 (*Nodularia*) 的某些种或株系也产生微囊藻毒素^[1-3]。自然水体中, 影响水华毒性大小的主要因子之一是构成水华的有毒株、无毒株的比例。以日本的 Kasumigaura 湖为例, 从 1978 年到 1989 年, 微囊藻水华的毒性变化与从水华分离的产毒或非产毒微囊藻藻株占优势是对应的^[4-7]。澳大利亚和英国的湖泊也有类似的报道^[8,9]。消除微囊藻水华及其毒素的影响, 研究构成水华的产毒微囊藻和非产毒微囊藻, 就有必要开展产毒微囊藻的快速分析技术研究。

初步研究表明, 特殊的多肽合成酶基因——*mcyB* 仅存在于产毒微囊藻藻株中^[10-15]。本研究结果为发展区分产毒和非产毒微囊藻株的 PCR 技术提供了现实可行性。但是, 现有方法的特异性仍有待加以证实, 其灵敏性也有待进一步提高; 另一方面, 常规 DNA 样品制备程序相对复杂, 限制了该方法的推广应用。

用特异引物对 (TOX 1P/1F; TOX 2P/2F) 检测了微囊藻毒素合成酶基因 *mcyB* 片段在不同水华蓝藻中的分布情况。在此基础上, 发展了水华蓝藻产毒特性的全细胞 PCR 检测法, 为快速鉴定产毒和非产毒微囊藻提供了可行的技术, 为产毒水华的早期预报和防治提供了新的技术途径。

收稿日期: 2000-09-18; 修订日期: 2000-10-24

基金项目: 国家自然科学基金 (项目号 No. 39730380); 国家科技部项目 (No. DCH-01-001)

作者简介: 潘 卉 (1975—) 女, 湖北省武汉市人; 硕士, 实习研究员; 研究方向: 藻类分子生物学

通讯作者: 宋立荣

1 材料与方 法

1.1 藻种及培养 藻种均由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB-Collection)提供(表1)。选用MA^[16]培养基,培养温度25—30℃,光照强度20—40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,白光连续光照,静止培养。以下干藻粉样品均由冰冻干燥法制备:*M. w*574 1998年制备;*M. a*8641 1996年制备;*M. a* PCC 7820 1988年制备;*M. v*(滇池-1) 1998年制备;*M. a*(滇池-1) 1998年制备;*O. ruciborskii*(大冶-1) 1999年制备。

表1 藻种及其来源

Tab 1 Strains used in this study

藻种 Strains	来源 Sources	藻种 Strains	来源 Sources
<i>Microcystis aeruginosa</i> Kutz. PCC 7806	法国	<i>M. aeruginosa</i> Kutz. (五大二池)	中国(黑龙江 五大连池)
<i>M. aeruginosa</i> Kutz. PCC 7820	法国	<i>M. aeruginosa</i> Kutz. (五大二泉)	中国(黑龙江 五大连池)
<i>M. aeruginosa</i> Kutz. NIES-90	日本	<i>M. aeruginosa</i> Kutz. (淀山湖)	中国(上海 淀山湖)
<i>M. aeruginosa</i> Kutz. NIES-101	日本	<i>M. aeruginosa</i> Kutz. (保安湖)	中国(湖北 大冶)
<i>M. elabens</i> Kutz. NIES-42	日本	<i>M. aeruginosa</i> Kutz. (滇池-1)	中国(云南 滇池)
<i>M. holsatica</i> Lemm. NIES-43	日本	<i>M. aeruginosa</i> Kutz. (滇池-3)	中国(云南 滇池)
<i>M. aeruginosa</i> Kutz. NIES-98	日本	<i>M. viridis</i> Lemm. (滇池-1)	中国(云南 滇池)
<i>M. aeruginosa</i> Kutz. UTEX-2061	美国	<i>M. viridis</i> Lemm. (滇池-2)	中国(云南 滇池)
<i>M. sp.</i> UTEX-469	美国	<i>M. wesenbergii</i> Kom. 574	中国(江苏 无锡)
<i>M. sp.</i> UTEX-434	美国	<i>M. sp.</i> 20	南非
<i>M. aeruginosa</i> Kutz. 8641	中国(武汉 东湖)	<i>M. sp.</i> 10	日本
<i>M. aeruginosa</i> Kutz. 86	中国(武汉 东湖)	<i>Oscillatoria ruciborskii</i> Wolos. (大冶-1)	中国(湖北 大冶)
<i>M. sp.</i> 575	中国(江苏 无锡)	<i>O. planktonica</i> 708	中国
<i>M. sp.</i> 573	中国(江苏 无锡)	<i>O. sp.</i> NIES-610	日本
<i>M. sp.</i> 572	中国(江苏 无锡)	<i>O. sp.</i> NIES-595	日本
<i>M. sp.</i> 525	中国(武汉 东湖)	<i>Anabaena flos-aquae</i> Breb. UTEX-1444	美国
<i>M. sp.</i> 526	中国(武汉 东湖)	<i>A. sp.</i> PCC 7120	法国
<i>M. sp.</i> 569	中国(武汉 东湖)	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> Ralfs 44-1	美国
<i>M. sp.</i> 502	中国(武汉 东湖)	<i>Synechococcus elongata</i> 410	中国

1.2 水样采集 用采水器采集表层水样。水样采自无锡太湖仙岛北岸、西岸、蠡园内湖、外湖。采样时间为1999年12月5日,水温10℃,pH值7.0。

1.3 藻细胞基因组DNA提取 收集50mL对数生长期培养物,10 000r/min离心10min,加裂解液(含250mmol/L TRIS-HCL (pH8.0),60mmol/L EDTA-Na₂ (pH8.0),4% SDS 400 μL ,50 μL 蛋白酶K,65℃水浴1h以上,破除伪空胞。镜检细胞破裂情况。离心,上清液移入新管,加等体积酚:氯仿:异丙醇(25:24:1),温和混合10min。离心,将上清液小心移入新管中,加入等体积氯仿,温和混合10min。离心,将上清液移入新管中,加入两倍体积的冰无水乙醇。-20℃沉淀过夜。离心,去上清。75%乙醇洗管壁。干燥后加适量TE溶液溶解。

1.4 PCR 检测法 PCR 扩增条件参见文献[15]。使用的热循环仪为 GeneAmp2400 (Perkin-Elmer Cetus Corporation, Emeryville, California)。总体积 50 μ L 的反应液中包括:10 \times amplification buffer(含 1.5mmol/L MgCl₂), 0.2 μ mol/L dNTPs, 引物各 20pmol, 1 U Taq DNA Polymerase, 3—5ng 经纯化的蓝藻基因组 DNA。

1.5 全细胞 PCR 反应 扩增反应直接使用藻细胞(培养物、干藻粉或自然水样), 或将培养物或水样经无菌去离子水洗涤 3 次以上(离心和振荡), 用一定体积的无菌去离子水悬浮均匀, 再为扩增所用。扩增用 PCR 仪为 GeneAmp2400 或 GeneAmp9600(Perkin-Elmer Cetus Corporation, Emeryville, California)。PCR 反应体系(每 20 μ L 总体积包括): BSA (0.1mg/mL); 10 \times PCR buffer(含 1.5mmol/L MgCl₂); 0.2 μ mol/L dNTPs; 引物各 20pmol; 0.5U Taq DNA Polymerase; 6 μ L 藻细胞或新鲜水样或 1 $\times 10^{-4}$ mg 干藻粉作为 PCR 反应底物。全细胞 PCR 反应条件同常规 PCR。

1.6 其他测定方法 生物测试法。取 10mL 藻样(干或鲜), 取 1mL 测干重。将余下的 9mL 藻样稀释成相差两倍浓度的梯度, 反复冻融三次, 对 KM 小白鼠进行腹腔注射。统计 4h 内死亡的小鼠, 记录死亡的时间及致死浓度, 计算该浓度对应的藻粉干重。最小致死剂量计算: 藻粉干重 g/鼠重 kg。

酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)和微囊藻毒素的高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)测定藻样的微囊藻毒素详见报道方法^[16-18]。

水样微囊藻毒素的测定: 采集自然水体中的水样(4000mL), 然后酸化(按取样体积的 4% 加入乙酸), 用玻璃滤膜过滤, 再用 C18 柱过滤, 先用 8—10mL 20% 的甲醇水溶液洗脱, 再用 8—10mL 的纯甲醇将毒素洗脱下来。此样品上硅胶柱后, 先用 8—10mL 纯甲醇淋洗, 后用 10% 的水—0.1% 三氟醋酸(TFA)的甲醇将毒素洗脱, 此洗脱下来的毒素溶液用旋转蒸发器蒸干, 加入定量的(通常是 0.4—0.5mL)的 HPLC 流动相, 即可在 HPLC 中测定。

2 结果

2.1 PCR 检测法鉴定产微囊藻毒素藻株

引物对 TOX 1P/1F 和 TOX 2P/2F 扩增的目的片段大小分别约为 1300bp 和 350bp^[15]。分别用两对引物检测表 1 中列出的 38 株蓝藻藻株。检测结果表明, 19 株产毒微囊藻藻株都分别获得 1300bp 和 350bp 左右的扩增产物, 而 11 株非产毒微囊藻则没有扩增产物。PCR 扩增结果确认藻株的毒性与用其他三种方法(HPLC、ELISA、Bioassay)检测藻株的毒性是一致的。但 *M. a* 526 的 PCR 结果呈阳性, ELISA 结果却显阴性。引物对 TOX 2P/2F 扩增结果无非特异性条带, 比 TOX 1P/1F 检测效果更好。

无毒的 *Anabaena flos-aquae* 1444, *Anabaena* sp. 7120, *Aphanizomenon flos-aquae* 44-1, *Oscillatoria planktonica* 708 和 *Oscillatoria raciborskii*(大冶-1)等其他蓝藻没有扩增出目的条带。值得指出的是, 两株有毒颤藻 *Oscillatoria* sp. NIES-595、*Oscillatoria* sp. NIES-610, 无特异的 PCR 扩增产物。以上结果说明, 有毒微囊藻藻株有微囊藻毒素合成酶 *mcyB*, 无毒微囊藻和其他不产微囊藻毒素的蓝藻没有 *mcyB*。

2.2 全细胞 PCR 法鉴定产微囊藻毒素藻株

全细胞 PCR 的方法检测已用常规 PCR 法检测过的藻株培养物,其结果和常规 PCR 检测的结果一致(图 1A)。即产毒的微囊藻藻株得到特异的扩增条带,无毒的藻株则没有。其他不产毒蓝藻检测结果也呈阴性。

全细胞 PCR 同样能用于检测自然水样中的产毒微囊藻藻株。无锡太湖的两个水样检测结果都是有毒的。无锡蠡园外湖通往太湖,水样检测结果呈阳性,内湖是人工湖,水样没有毒。PCR 结果准确地反映了水样毒性。

将水样稀释成浓度梯度,测试该反映的检测下限。随着样品的稀释倍数增加,目的扩增产物信号减弱,非特异性扩增产物信号增强。该检测下限对应水样中的微囊藻细胞数在 2000cells/mL 以下(图 1)。

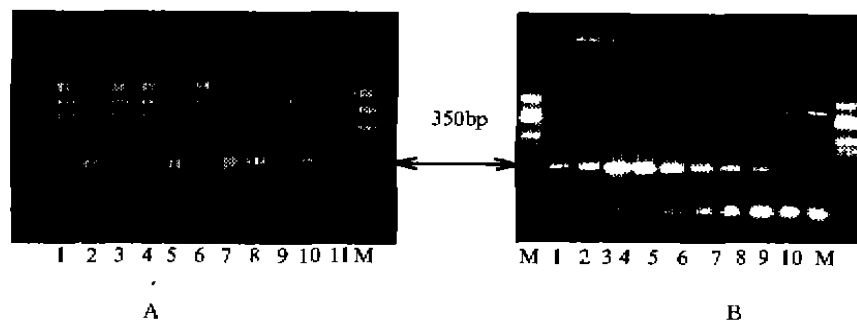


图 1 全细胞 PCR(引物对 Tox2P/2F)鉴定培养物(A)及自然水样(B)中产毒微囊藻

Fig.1 Discrimination of toxic *Microcystis* cells by whole cells PCR in cultures(A) and in natural samples(B)

- A: 1. *M. sp.* 575 2. *M. sp.* 434 3. *M. sp.* 573 4. *M. sp.* 572 5. *M. sp.* 526 6. *M. sp.* 469
7. *M. sp.* 525 8. *M. sp.* 569 9. *M. sp.* 502 10. *M. a* (五大二泉) 11. *M. a* (滇池-3)
- B: 1. *M. a* PCC 7806 的基因组 DNA 为反应底物 2. 未经处理的原浓度新鲜水样为反应底物
3. 经无菌去离子水处理的原浓度新鲜水样为反应底物 4. 水样稀释 5 倍 5. 水样稀释 10 倍
6. 水样稀释 50 倍 7. 水样稀释 100 倍 8. 水样稀释 500 倍 9. 水样稀释 1000 倍 10. 水样稀释 2000 倍 M: PCR Marker

全细胞 PCR 检测 5 种微囊藻干粉,结果显示都有毒,而阴性对照 *O. raciborskii* (大冶-1)干藻粉则没有阳性结果。干藻粉的检测下限低于 1×10^{-4} mg。

2.3 HPLC、ELISA 及 Bioassay 检测结果

三种检测法分别确认了藻株、水样、干藻粉的毒性,检测结果相互吻合(图 2、表 2)。

ELISA 检测法对于产毒、非产毒藻株的区分标准是:微囊藻毒素的含量 > 50 ng/L(水样体积)的藻株为产毒株,小于这个值的为非产毒株。也有以 20 ng/L 为标准的^[17]。本试验采用前一种区分标准。MC 标准稀释梯度作为对照,根据其检测结果计算本次检测的相关系数 $R = 0.951$,显著性差异 $P < 0.001$ 。表 2 显示了不同藻株的 ELISA 定性检测结果。韦氏微囊藻的微囊藻毒素含量介于 20—50 ng/L 之间。与生物测试的结果相符,说明它是低毒株。*M. sp.* 526 的阴性结果及 *O. sp.* 595 与 PCR 检测的结果不太一致。其他藻株 ELISA 法检测结果与 PCR 检测结果相符合。

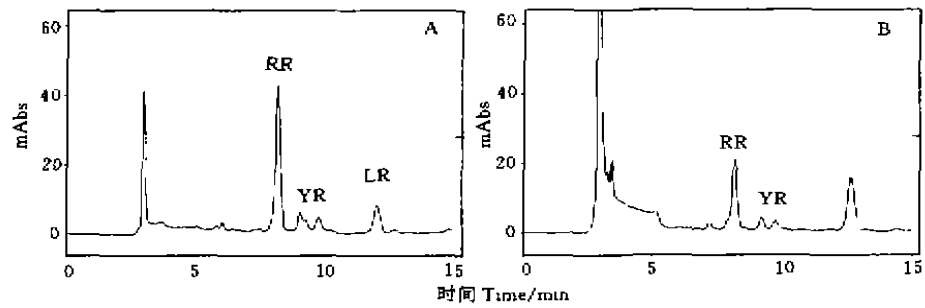


图 2 HPLC 检测法检测微囊藻菌株微囊藻毒素的色谱图

Fig. 2 High-performance liquid chromatograms of *Microcystis* strainsA: *M. a* (保安湖) B: *M. a* (淀山湖)

表 2 ELISA 法检测不同微囊藻菌株微囊藻毒素含量

Tab. 2 Detection of microcystins by ELISA

Strain	MC (ng/L)	Strain	MC (ng/L)	Strain	MC (ng/L)
<i>M. a</i> PCC 7806	>50	<i>M. sp.</i> 569	>50	<i>M. sp.</i> 573	<20
<i>M. a</i> PCC 7820	>50	<i>M. sp.</i> 469	50-20	<i>M. sp.</i> 572	<20
<i>M. a</i> 90	>50	<i>M. sp.</i> 502	50-20	<i>M. v</i> (滇池-2)	>50
<i>M. a</i> 101	<20	<i>M. sp.</i> 563	>50	<i>M. w</i> 574	50-20
<i>M. e</i> 42	<20	<i>M. sp.</i> 524	<20	<i>M. sp.</i> 525	>50
<i>M. h</i> 43	<20	<i>M. a</i> (五大二池)	>50	<i>M. sp.</i> 526	<20
<i>M. a</i> 98	<20	<i>M. a</i> (五大二泉)	>50	<i>M. sp.</i> 20	50-20
<i>M. a</i> 8641	>50	<i>M. a</i> (淀山湖)	>50	<i>M. sp.</i> 10	>50
<i>M. a</i> 86	>50	<i>M. a</i> (保安湖)	>50	<i>O. r</i> 大冶-1	<20
<i>M. a</i> 2061	<20	<i>M. a</i> (滇池-1)	>50	<i>O. p</i> 708	<20
<i>M. sp.</i> 575	<20	<i>M. a</i> (滇池-3)	>50	<i>An. f</i> 1444	<20
<i>M. sp.</i> 434	>50	<i>M. v</i> (滇池-1)	>50	<i>An. sp</i> 7120	<20
<i>O. sp.</i> 595	>50				

3 讨论

世界各国都积极开展有关产毒藻类的生物学、毒素的化学(分子结构及衍生物)、毒理学以及预防对策的研究。针对某一特定水体的蓝藻水华,人们首先关心的是各种水华藻类是否产毒?其毒性如何?各种分析产毒微囊藻的常规方法如 HPLC、ELISA、Bioassay、蛋白磷酸酶抑制法、FABMS 等都有不同局限性^[1]。因此,建立快速准确鉴定产毒微囊藻的方法和技术是水华蓝藻研究和控制的重要一步。本文描述的全细胞 PCR 方法,能准确灵敏地检测出培养物、自然水样及冻干藻粉中的产毒微囊藻细胞。

用 PCR 方法检测来源不同的 30 株微囊藻藻株,它们的毒性能通过直观的有无扩增条带表现出来。检测结果与 HPLC、ELISA、Bioassay 结果一致。Borner^[15]用同样的两对引物检测 10 株微囊藻藻株的 *mcyB* 基因分布。其中 5 株产毒微囊藻藻株中获得阳性检

测结果,而5株非产毒微囊藻藻株呈阴性结果。Neilan^[14]使用另外一对根据 *mcyB* 设计的引物对 FAA/RAA 检测 *mcyB* 基因与藻株毒性之间的相关性,10株有毒微囊藻藻株 PCR 结果呈阳性,6株无毒微囊藻藻株中5株 PCR 结果阴性,1株结果阳性。

非产毒株出现阳性结果可能因为所产毒素在检测限以下或 *mcyB* 序列发生变异。Borner^[15]报道了相同的现象,引物对 Tox 1P/1F 在另外两株产微囊藻毒素的颤藻藻株中没有获得 PCR 阳性结果。综合比较有关的结果,说明这个方法在微囊藻藻株中特异性更高一些,在其他产微囊藻毒素的蓝藻藻株中有关微囊藻毒素合成酶基因还需详细研究。对比其他研究者发表的结果,可以看出, *mcyB* 基因单元可以作为特殊的分子标志物,鉴定产毒和非产毒微囊藻藻株。

许多有机体完整的细胞可用来做杂交、同工酶分析、克隆的筛选、PCR 反应。本文首次报道用蓝藻液体培养物包括分离株及无菌株、自然水样及干藻粉做 PCR 反应底物。全细胞 PCR 检测结果与常规 PCR、HPLC、ELISA、Bioassay 检测结果一致说明了其准确性。检测下限低于 100cells/mL 说明该方法的灵敏度很高。一般认为自然水样中往往有许多杂质抑制 PCR 反应,而所用的太湖水样中有绿色微囊藻,韦氏微囊藻,具缘微囊藻,还有星芒藻,小球藻,颤藻,硅藻,盘星藻等,还有一些枝角类、桡足类浮游动物。实验证明自然水样不经任何处理就可以直接用于 PCR 反应。水样经无菌水洗涤几次,PCR 结果更清晰,消除了非特异性条带影响。由此看来,非特异性条带来自杂质的干扰,而不是来自藻细胞本身。通过改进反应底物和引物的浓度比例,优化其他反应条件,就能进一步降低检测限。理论上,全细胞 PCR 法可检测痕量的样品。还可以根据信号的强弱粗略地了解产毒微囊藻藻细胞的数量。全细胞 PCR 反应的关键是反应体系中加入了 BSA。实验证明,不加 BSA 的全细胞 PCR 反应得不到任何结果。常规 PCR 反应中加入 BSA 也不影响反应结果。

全细胞 PCR 不依赖各种微囊藻毒素异构体,只要有产毒能力的藻细胞都能检出。类似于韦氏微囊藻这类低毒株也能被灵敏准确地检测出毒性^[19]。结果表明,全细胞 PCR 方法对测试材料要求不高,实验室培养物、自然水样或干藻粉等不同的材料均有较好的扩增效果。用它来检测产毒微囊藻省时省力,简单易行,检测下限低,准确灵敏,特异性强,对操作和仪器的要求不高且成本低廉,结果直观易于解释,每次反应的检测量大。上百个样品同时检测,从处理样品到电泳完毕 2h 左右就够了。本方法的局限之一是不能定量检测藻株毒性大小,区分微囊藻毒素的各组分。其次,它只能测细胞产毒能力而不能测出水中溶解的微囊藻毒素。

综上所述,全细胞 PCR 方法不仅可用于实验室产毒微囊藻的鉴定、筛选,如果加上产毒细胞数与水体毒性大小的相关性,还可建立以产毒细胞数为标准的不同层次的警报系统,及时监测自然水体里的产微囊藻毒素的微囊藻藻株。此方法应用于研究湖泊产毒和非产毒种类的分布及数量也是可行的。

参考文献:

- [1] Watanabe M F, Harada K, Carmichael W W, et al. Toxic Microcystis [M]. New York: Boca Raton CRC Press 1996

- [2] Carmichael W W. The Toxins of Cyanobacteria [J]. *Scientific American*. 1994, 274(1):78—86
- [3] Carmichael W W. Cyanobacterial Toxins [J]. *IOC Manuals and Guides*. 1996, 33:163—175
- [4] Watanabe M F., Oishi S. Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and moat in Tokyo and adjacent regions [J]. *Jpn J. Limnol.* 1980, 41:5—9
- [5] Shirai M K., Obotake M A. Toxicity and delayed type hypersensitivity caused by *Microcystis* blooms from lake Kasumigaura [J]. *Microbiol Immunol.* 1986, 30:731—735
- [6] Kato T., Watanabe M F., Watanabe M. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference [J]. *Arch. Hydrobiol. Bd.* 1991, 64(Suppl):129—140
- [7] Makoto S., Akio O., Takaki S., Seishiro T. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* sp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures [J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, 4: 1241—1245
- [8] Baker D., Humpage A R., Steffensen D A. Cyanobacterial blooms in the Murray-Basin: Their Taxonomy and Toxicity [M]. *Austr. Center for Water Quality Res.* 1993
- [9] Codd J N., Bettie K A., Lawton L A., et al. Blue-green algal toxins [J]. *British Phycol.* 1993, 27:87
- [10] Dittmann E., Kathrin M., Borner T. Conserved sequences of peptide synthetase genes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Phycologia*. 1996, 35(Suppl.):62—67
- [11] Kathrin M., Dittmann E., Borner T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* sequences homologous to peptide synthetase genes [J]. *FEMS Microbiology Letters*. 1996, 135:295—303
- [12] Dittmann E., Neilan B A., Borner T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 [J]. *Mol Microbiol.* 1997, 126(4): 779—787
- [13] Rohrlack T., Dittmann E., Henning M., et al. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(2):737—739
- [14] Neilan B A., Dittmann E., Borner T. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria [J]. *J. Bacteriol.* 1999, 181.13:4089—4097
- [15] Dittmann E., Neilan B A., Borner T. Peptide synthetase genes occur in various species of cyanobacteria [M]. *The Phototrophic Prokaryotes* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers 1999
- [16] Ichimura T. Media for blue-green algae [M]. *Methods in algalogical studies*. Tokyo, Kyoritsu, 1979
- [17] 董传辉,俞顺章,陈 刚. 某湖周围水厂源水及出厂水微囊藻毒素调查[J]. *卫生研究* 1998, 27, 3:100—102
- [18] 宋立荣,雷腊梅,何振荣. 滇池水华蓝藻铜绿微囊藻和绿色微囊藻的生长生理特性及毒素分析[J]. *水生生物学报*. 1999, 23(5):402—407
- [19] 何家苑,李络平,俞家祿,等. 我国产毒微囊藻的新发现——韦氏微囊藻及其毒性的初步研究[J]. *水生生物学报*. 1996, 20.2:192—194

CHARACTERIZATION OF TOXIC WATERBLOOM-FORMING CYANOBACTERIA BY MODIFIED PCR

PAN Hui, SONG Li-rong, LIU Yong-ding, ZHU Yun-zhi and SHEN Qiang

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract: The present study surveyed the distribution of microcystin-producing gene—*mcyB* by PCR among 38 bloom-forming cyanobacterial strains from FACHB-Collection. The results demonstrated that special amplifications were being gotten only from 19 toxic *Microcystis* strains, whereas it was deficient in nontoxic ones got none. The PCR results showed highly agreement with the toxicity of every strain determined by HPLC, ELISA, and Bioassay respectively. Furthermore, the traditional PCR protocols were simplified by checking the cyanobacteria cells directly instead of the previously used extracted genomic DNA. The whole cells PCR we developed in this study could be successfully applied to cultured algae materials, water samples and lyophilized cyanobacterial cells. Thus, discrimination of toxic and nontoxic *Microcystis* strains by molecular biological technologies proves to be practicable and efficacious.

Key words: Whole cells PCR; Water-blooming cyanobacteria; *Microcystis*; Microcystins; *mcyB*; Gene