



(21) 申请号 202111595111.8  
(22) 申请日 2021.12.23  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114480132 A

(43) 申请公布日 2022.05.13  
(83) 生物保藏信息  
CGMCC NO.23075 2021.12.17

(73) 专利权人 海南大学  
地址 570228 海南省海口市人民大道58号  
海南大学

(72) 发明人 姚雪梅 乔立君

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227  
专利代理师 李婉

(51) Int.Cl.  
G12N 1/12 (2006.01)  
G12N 1/02 (2006.01)  
G12R 1/89 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 101538535 A, 2009.09.23  
CN 110373329 A, 2019.10.25  
姜峰等. 福建东山造礁石珊瑚资源现状及其保护. 资源科学. 2011, 第33卷(第2期), 第364页右栏最后一段.

审查员 王炜晨

权利要求书1页 说明书6页  
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种及其分离纯化方法、培养方法

(57) 摘要

本发明涉及海洋生物学中珊瑚共生藻研究领域,特别涉及造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种及其分离纯化方法、培养方法。本发明根据珊瑚与虫黄藻共生的特点和相应生理机制,针对性地对珊瑚体内的虫黄藻进行了分离,纯化和体外培养,根据其紧密地共生关系,在培养初期不进行杂质的去除,以保证藻体能逐渐适应体外培养的环境,在进入指数增长后期后,再进行分离纯化,得到了纯净的造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种。本发明的研究成果为推进虫黄藻生理功能,珊瑚与虫黄藻共生关系的研究,为保护珊瑚礁生态系统,提供切实可行的思路。

1. 造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种,其特征在于,其保藏编号为:CGMCC 23075。
2. 如权利要求1所述的造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种在珊瑚与虫黄藻共生关系的研究、珊瑚生理学研究或生态保护中的应用。

## 造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种及其分离纯化方法、培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及海洋生物学中珊瑚共生藻研究领域,特别涉及造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种及其分离纯化方法、培养方法。

### 背景技术

[0002] 虫黄藻是一种广泛共生于珊瑚、砗磲、海绵等海洋无脊椎动物中的单细胞甲藻。在珊瑚礁生态系统中,这种互惠共生的关系是珊瑚礁生态系统的基础,是珊瑚生理生命活动的重要组成部分。虫黄藻自身的光合作用可以为珊瑚提供氧气,同时固定的碳被转移到珊瑚体内合成生命活动所需的各种物质。作为交换,珊瑚可以为虫黄藻提供保护,并提供给虫黄藻相应的代谢产物作为光合作用的原材料。这种合作关系使得珊瑚能够更好的适应在寡营养水体中生存。然而,这种共生关系又非常容易被破坏,微小的环境变化就可能导致虫黄藻的流失或色素的破坏,从而导致珊瑚白化,甚至死亡。因此,对于虫黄藻的研究成为了珊瑚研究和保护的重要一环,但由于自然状态下的虫黄藻与珊瑚紧密共生,其相关研究难以展开,受各种因素干扰较大。

[0003] 虫黄藻包含多个系群,目前,研究较为深入的是主要共生于砗磲体内的E系群(Effrenium),已经实现了分离和体外大规模培养(张跃环等,2018)。但对于广泛共生于造礁石珊瑚体内的A、B、C、D等系群,到2014年,全球范围内仅仅有一株珊瑚虫黄藻实现了离体培养,且仅限于实验室培养阶段(Lin等,2014)。因此,对珊瑚内共生虫黄藻进行分离和体外培养能够降低虫黄藻相关研究的难度,切实推进虫黄藻生理功能,珊瑚与虫黄藻共生关系的研究,为保护珊瑚礁生态系统,提供切实可行的思路,具有重要的现实意义。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供了造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种及其分离纯化方法、培养方法,为推进虫黄藻生理功能,珊瑚与虫黄藻共生关系的研究,为保护珊瑚礁生态系统,提供切实可行的思路。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 第一方面,本发明提供了造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种,其保藏编号为:CGMCC 23075。

[0007] 第二方面,本发明还提供了所述造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种在珊瑚与虫黄藻共生关系的研究、珊瑚生理学研究或生态保护中的应用。

[0008] 第三方面,本发明还提供了所述造礁石珊瑚虫黄藻藻种的分离纯化方法,包括如下步骤:

[0009] 步骤1:获得珊瑚组织,与缓冲液混合研磨,获得原始悬浊液;

[0010] 步骤2:取所述原始悬浊液镜检,确定所述原始悬浊液含有游离的单胞藻;

[0011] 步骤3:取所述原始悬浊液接种于F/2培养基中,于6000lx光照,26℃,30转/min低速振荡培养10~15天,得到指数增长期藻液;

[0012] 步骤4:取所述指数增长长期藻液镜检,待有鞭毛的游动个体后,进行稀释分离,即用毛细管吸取单个藻分别放入装有200 $\mu$ L的F/2培养基的1.5mL离心管中,吸取30次以上,获得稀释分离的至少30个单胞藻种;

[0013] 步骤5:60001x光照,26 $^{\circ}$ C,可静置培养3~5天。镜检有分裂的细胞,并且无原生动物等。

[0014] 步骤6:取所述单胞藻培养管中全部转入3mL的玻璃试管中,并改用无菌小棉塞塞紧管口,期间每天添加20微升新鲜培养基。60001x光照,26 $^{\circ}$ C,30转/min低速振荡培养继续培养5~7天。镜检浓度度可达到上百个/毫升,且无原生动物。

[0015] 步骤7:得到纯净的虫黄藻藻液,逐级扩增,用于下一步实验或生产。接种比例按藻液:F/2培养基=1:1~1:2。

[0016] 第四方面,本发明还提供了所述造礁石珊瑚虫黄藻藻种的体外培养方法,包括如下步骤:

[0017] 步骤1:获得珊瑚组织,与缓冲液混合研磨,获得原始悬浊液;

[0018] 步骤2:取所述原始悬浊液镜检,确定所述原始悬浊液含有游离的单胞藻;

[0019] 步骤3:取所述原始悬浊液接种于F/2培养基中,于60001x光照,26 $^{\circ}$ C,30转/min低速振荡培养10~15天,得到指数增长长期藻液;

[0020] 步骤4:取所述指数增长长期藻液镜检,待有鞭毛的游动个体后,进行稀释分离,即用毛细管吸取单个藻分别放入装有200 $\mu$ L的F/2培养基的1.5mL离心管中,吸取30次以上,获得稀释分离的至少30个单胞藻种;

[0021] 步骤5:60001x光照,26 $^{\circ}$ C,可静置培养3~5天。镜检有分裂的细胞,并且无原生动物等。

[0022] 步骤6:取所述单胞藻培养管全部转入3mL的玻璃试管中,并改用无菌小棉塞塞紧管口,期间每天添加20微升新鲜培养基。60001x光照,26 $^{\circ}$ C,30转/min低速振荡培养继续培养5~7天。镜检浓度度可达到上百个/毫升,且无原生动物。

[0023] 步骤7:得到纯净的虫黄藻藻液,逐级扩增,用于下一步实验或生产。接种比例按藻液:F/2培养基=1:1~1:2。

[0024] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤1中所述缓冲液包括EDTA缓冲液或无菌海水,珊瑚组织与缓冲液的体积比约为1:10。

[0025] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤2中所述原始悬浊液中含有从虫体组织粘液内游离出的单胞藻的细胞为圆形,甲片不明显,无横沟,整体为黄色,偏亮棕油色,大小在10~30 $\mu$ m,看不到鞭毛,无活动能力(如图1所示)。

[0026] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤3和步骤4中所述指数增长长期藻液,指数增长期的标志为出现有活动能力的单细胞,约8~20 $\mu$ m,光学显微镜下整体为绿色,略带黄色,单个个体有自由活动阶段,甲片不明显,但横沟较明显(如图2所示),游动状态可见横沟处的鞭毛(如图3所示),静止时为球形。

[0027] 在本发明的一些具体实施方案中步骤5所述的分裂期细胞为二分裂的葫芦形(如图4、图5所示)。

[0028] 在本发明的一些具体实施方案中步骤6此时的培养液中呈现多种细胞形态(葫芦形,游动细胞形,静止形等)混杂。所述培养的60001x光照,26 $^{\circ}$ C,30转/min低速振荡培养继

续培养5~7天。镜检浓度度可达到上百个/毫升,且无原生动物。

[0029] 在本发明的一些具体实施方案中步骤7中扩增所述浓度最终可达到>10万个/mL。

[0030] 本发明根据珊瑚与虫黄藻共生的特点和相应生理机制,针对性地对珊瑚体内的虫黄藻进行了分离,纯化和体外培养,根据其紧密地共生关系,在培养初期不进行杂质的去除,以保证藻体能逐渐适应体外培养的环境,在进入指数增长期后,再进行分离纯化,得到了纯净的造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种。本发明为推进虫黄藻生理功能,珊瑚与虫黄藻共生关系的研究,为保护珊瑚礁生态系统,提供切实可行的思路。

[0031] 生物保藏说明

[0032] 生物材料:中华扁脑珊瑚(*Platygyra sinensis*)体内的共生藻(虫黄藻);分类命名:*Cladocopium* sp.HNPS-C1-A;于2021年12月17日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏中心地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所;保藏编号为CGMCC NO.23075。

### 附图说明

[0033] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0034] 图1示步骤2中原始悬浊液中游离的单胞藻;

[0035] 图2示步骤3和步骤4中培养10~15天后的指数增长期藻(带有横沟);

[0036] 图3示步骤3和步骤4步骤4中培养10~15天后的指数增长期藻(带鞭毛);

[0037] 图4示步骤5中分裂的藻细胞;其中,A示分裂的细胞(30微米直径单细胞);B示分裂的细胞(10微米直径单细胞);

[0038] 图5示不同温度对共生藻密度的影响。

### 具体实施方式

[0039] 本发明公开了造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种及其分离纯化方法、培养方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0040] 本发明提供了造礁石珊瑚虫黄的分离纯化和体外培养方法,包括以下步骤:

[0041] a. 灼烧镊子、研磨杵和研钵,备用;

[0042] b. 用镊子夹取珊瑚组织,在研钵中加入缓冲液,研磨均匀,得到原始悬浊液A1;

[0043] c. 在显微镜下对A1进行观察,确定悬浊液中有游离的单胞藻;

[0044] d. 取1ml悬浊液接种于9mlF/2培养基中,在3000lx光照,28℃,培养10-15天,得到指数增长期藻液B1;

[0045] e. 培养至指数增长期后,取藻液B1置于显微镜下观察,待观察到有鞭毛的游动个体后,进行稀释分离;

[0046] f. 即用毛细管吸取单个藻分别放入装有200μL的F/2培养基的1.5mL离心管,重复取30次以上,分别获得稀释分离的至少30管藻种,获得单胞藻;

[0047] g. 60001x光照, 26℃, 可静置培养3~5天。镜检有分裂的细胞, 并且无原生动物等。

[0048] h. 取所述单胞藻培养管全部转入3mL的玻璃试管中, 并改用无菌小棉塞塞紧管口, 期间每天添加20微升新鲜培养基。60001x光照, 26℃, 30转/min低速振荡培养继续培养5~7天。镜检浓度度可达到上百个/毫升, 且无原生动物。

[0049] i. 得到纯净的虫黄藻藻液, 逐级扩增, 用于下一步实验或生产。逐级扩增, 接种比例按藻液:F/2培养基=1:1~1:2。

[0050] 在本发明的一些具体实施方案中, 所述的步骤a中的灼烧是用95%酒精烧灼表面, 并等待物品冷却后方可使用, 上述过程尽量在超净工作台进行。

[0051] 在本发明的一些具体实施方案中, 所述的步骤b中的缓冲液为EDTA缓冲液或无菌海水。

[0052] 在本发明的一些具体实施方案中, 所述的步骤c中的单胞藻特征为光学显微镜下, 分离的成熟细胞为圆形, 甲片不明显, 整体为黄绿色, 大小在10~30μm, 看不到鞭毛, 无活动能力。

[0053] 在本发明的一些具体实施方案中, 所述的步骤d中的培养基为F/2。藻细胞进入指数增长期的标志为出现有活动能力的单细胞, 约8~20μm, 光学显微镜下整体为绿色, 略带黄色, 单个个体有自由活动阶段, 甲片不明显, 横沟较明显, 游动状态可见鞭毛, 静止时为球形。

[0054] 在本发明的一些具体实施方案中, 所述的步骤e中可利用稀释法得到含个位数藻细胞的纯净藻液。

[0055] 在本发明的一些具体实施方案中, 所述的步骤f中离心管控制培养基含量在200微升左右, 不断补充, 每天添加20微升。

[0056] 在本发明的一些具体实施方案中, 所述的步骤g中的藻液C中不能有杂藻、原生生物、珊瑚组织碎片等杂质。

[0057] 在本发明的一些具体实施方案中, 所述的步骤h中逐级扩增时间应该间隔10~15天。

[0058] 本发明根据珊瑚与虫黄藻共生的特点和相应生理机制, 针对性地对中华扁脑珊瑚体内的虫黄藻进行了分离, 纯化和体外培养, 根据其紧密地共生关系, 在培养初期不进行杂质的去除, 以保证藻体能逐渐适应体外培养的环境, 在进入指数增长期后, 再进行分离纯化, 得到了纯净的造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种。为推进虫黄藻生理功能, 珊瑚与虫黄藻共生关系的研究, 为保护珊瑚礁生态系统, 提供切实可行的思路。

[0059] 本发明提供的造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种及其分离纯化方法、培养方法中, 所用原料及试剂均可由市场购得。

[0060] 下面结合实施例, 进一步阐述本发明:

[0061] 实施例1

[0062] 取扁脑珊瑚活体于托盘上, 实验过程中注意泼洒海水, 以免影响珊瑚健康。点燃酒精灯, 对研钵, 镊子等工具进行消毒。消毒后, 选取饱满, 无损伤的珊瑚虫进行掏取, 取出的组织等放入研钵中研磨, 研磨中加入缓冲液, 缓冲液不宜超过5ml, 研磨至均匀, 得到组织悬浊液。将组织悬浊液倒入试管中, 剧烈振荡。取1ml悬浊液接种于9mlF/2培养基中, 在30001x光照, 28℃, 培养10-15天, 得到指数增长期藻液。培养至指数增长期后, 取藻液置于显微镜

下观察,待观察到有鞭毛的游动个体后,利用稀释分离得到单胞藻。将单胞藻置于1.5ml离心管中培养,每天观察生长状况,添加培养基。10-15天后,观察到藻细胞明显增多,且无其他杂质时,扩种至5ml试管,继续培养,再扩种至25ml锥形瓶,得到可进行下一步实验的藻种。

[0063] 16SrDNA测序结果如SEQ ID No.1所示。

[0064] 实施例2造礁石珊瑚虫黄藻的分离纯化和体外培养

[0065] a. 灼烧镊子、研磨杵和研钵,备用;

[0066] 灼烧采用95%酒精烧灼表面,并等待物品冷却后方可使用,上述过程尽量在超净工作台进行;

[0067] b. 用镊子夹取珊瑚组织,在研钵中加入缓冲液(EDTA缓冲液或无菌海水),研磨均匀,得到原始悬浊液A1;

[0068] c. 在显微镜下对A1进行观察,确定悬浊液中有游离的单胞藻;

[0069] 单胞藻特征为光学显微镜下,分离的成熟细胞为圆形,甲片不明显,整体为黄绿色,大小在10~30 $\mu\text{m}$ ,看不到鞭毛,无活动能力;

[0070] d. 取1ml悬浊液接种于9mlF/2培养基中,在60001x光照,26 $^{\circ}\text{C}$ ,培养10-15天,得到指数增长长期藻液B1;

[0071] 藻细胞进入指数增长期的标志为:出现有活动能力的单细胞,约8~20 $\mu\text{m}$ ,光学显微镜下整体为绿色,略带黄色,单个个体有自由活动阶段,甲片不明显,横沟较明显,游动状态可见鞭毛,静止时为球形;

[0072] e. 培养至指数增长后期后,取藻液B1置于显微镜下观察,待观察到有鞭毛的游动个体后,进行稀释分离;

[0073] f. 即用毛细管吸取单个藻分别放入装有200 $\mu\text{L}$ 的F/2培养基的1.5mL离心管,重复取30次以上,分别获得稀释分离的至少30管藻种,获得单胞藻;

[0074] g. 60001x光照,26 $^{\circ}\text{C}$ ,可静置培养3~5天。镜检有分裂的细胞,并且无原生动动物等。

[0075] h. 取所述单胞藻培养管全部转入3mL的玻璃试管中,并改用无菌小棉塞塞紧管口,期间每天添加20微升新鲜培养基。60001x光照,26 $^{\circ}\text{C}$ ,30转/min低速振荡培养继续培养5~7天。镜检浓度度可达到上百个/毫升,且无原生动动物。

[0076] i. 得到纯净的虫黄藻藻液,逐级扩增,用于下一步实验或生产。逐级扩增,接种比例按藻液:F/2培养基=1:1~1:2。

[0077] 实施例3造礁石珊瑚虫黄藻的广谱适温实验

[0078] 在培养条件为28 $^{\circ}\text{C}$ ,30001x光照,光照周期12光照:12黑暗下,设置四个温度梯度组,分别为18 $\pm$ 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 、22 $\pm$ 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 、26 $\pm$ 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $\pm$ 0.2 $^{\circ}\text{C}$ ,采用F/2培养基,培养体积为100ml。藻细胞初始浓度为 $2 \times 10^3$ 个/ml,培养10天。从实验的第1天开始,每隔2天取0.1mL藻液于0.1mL浮游生物计数框,在显微镜下计数得出细胞密度(个/ml),三个重复取平均。结果如下:

[0079] 表1不同温度对共生藻密度的影响

|        | 时间 (天) | 密度 ( $\times 10^3$ 个/ml) |      |      |      |
|--------|--------|--------------------------|------|------|------|
|        |        | 18°C                     | 22°C | 26°C | 30°C |
| [0080] | 0      | 2                        | 2    | 2    | 2    |
|        | 2      | 3.1                      | 3.2  | 3.4  | 4.1  |
|        | 4      | 5.2                      | 6.7  | 7.1  | 6.9  |
|        | 6      | 6.8                      | 8.2  | 10.4 | 10.6 |
|        | 8      | 7.9                      | 10.1 | 16.7 | 11.5 |
|        | 10     | 8.5                      | 10.4 | 18.2 | 10.3 |

[0081] 分析结果发现,自文昌海域的中华扁脑珊瑚里分离出的共生藻(虫黄藻)其温度适应范围很大,可在18~30°C间生活。其中26-28°C生长速度最快。文昌海域冬季水温受北方寒流影响,可达18-19°C,夏季受赤道暖流影响可达30°C,故珊瑚要具有相当广泛的温度适应性,才能生长存活。而其体内虫黄藻的温度适应性也说明了文昌海域珊瑚对温度的广泛适应性来自于其共生的虫黄藻广适温性。

[0082] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。



- [0001] 序列表
- [0002] <110> 海南大学
- [0003] <120> 造礁石珊瑚共生虫黄藻藻种及其分离纯化方法、培养方法
- [0004] <130> MP21026620
- [0005] <160> 1
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 636
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] ggtgaacctg cggaaggatc attcgcactg attcaatddd gactacgtga atdddggctg 60
- [0013] tgagggatgc ttgcggtgag atatctgctt gcagaactcg agggcgacag atgctcactc 120
- [0014] accaaccctt gttggggctg gtgcgagtgt cgctctgtgg ccatgggtcc gtgttcagcg 180
- [0015] ggccggggaa tgaaggctaa gctgctttag tgacaactgt ctgggaaggg cattgttcca 240
- [0016] acttccacaa ctttcagcga tggatatctt ggctcgggca cctgtgaagg gcgcagcga 300
- [0017] gcgcgatagt ctttgtgaat tgcagaactc cgtgaaccaa tggcctcctg aacgtgcgtt 360
- [0018] gactccttg gatttcctga gagtatgtct gcttcagtgc ttaacttgcc ccaactttgc 420
- [0019] aagcaggatg tgtttctgcc ttgcgttctt atgagctatt gccctctgag ccaatggctt 480
- [0020] gttaattgct tggttcttgc aaaatgcttt gcgcgctggt attcaggttt ctaccttctg 540
- [0021] ggttttactt gagtgacgct gctcatgctt gcaaccgctg ggatgcaggt gcatgcctct 600
- [0022] agcatgaagt cagacaagtg aaccgctga atttaa 636



图1

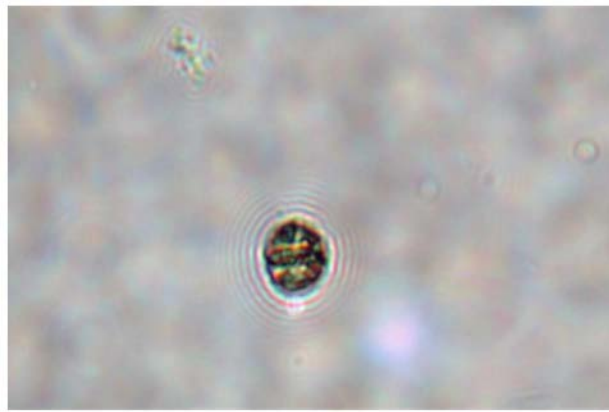


图2



图3

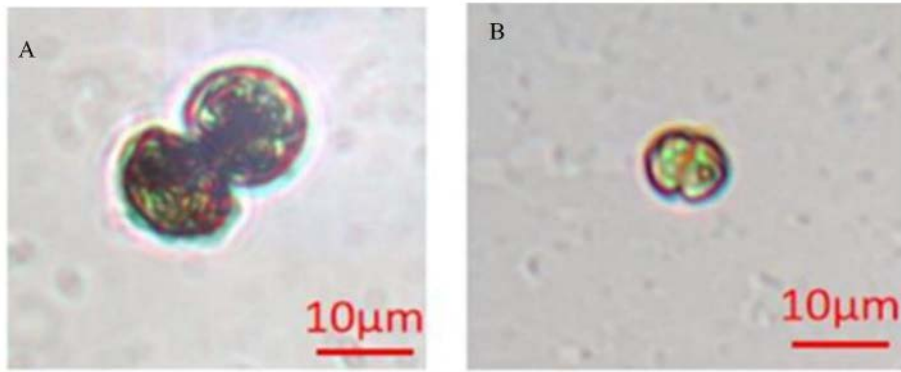


图4

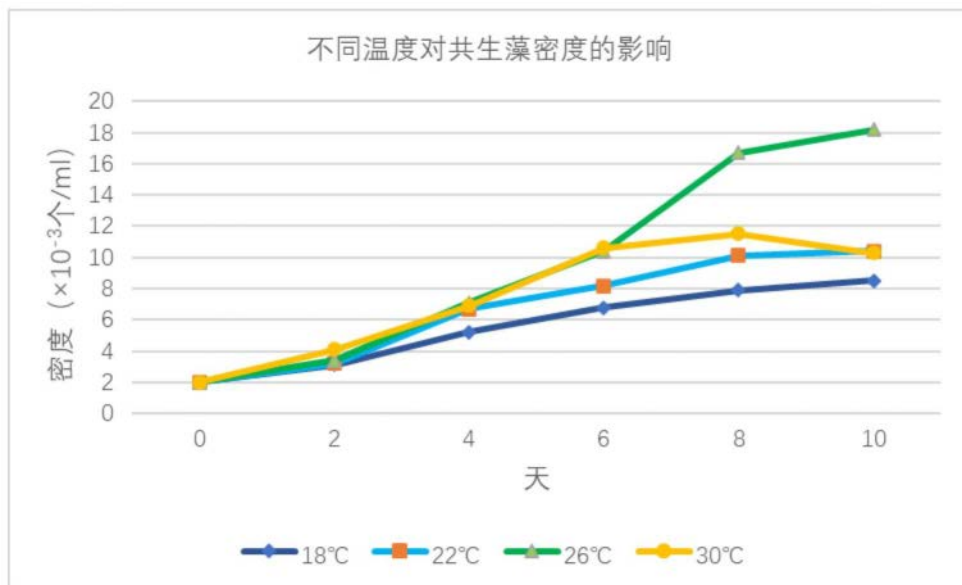


图5