

南沙群岛微型与超微型真核藻类遗传多样性的初步研究*

袁洁¹ 邵鹏¹ 陈月琴^{1**} 蔡创华² 屈良鹄¹¹中山大学基因工程教育部重点实验室 广州 510275)²中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

提要 用分子生物学方法建立了南沙海域5号采样点附近海域的微型、超微型真核藻类18S rDNA文库,采用RFLP和基因测序的手段对其遗传多样性进行了初步探讨。研究表明南沙海域的微型、超微型藻类的遗传多样性十分丰富,而且尚有大量未获培养的、分类位置未知的物种有待研究。

关键词 南沙,微型、超微型藻类,18S rDNA,遗传多样性

中图分类号 Q11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)07-0043-05

南沙群岛是我国南海诸岛中位置最南、岛礁最多的一个群岛。其广阔的水域又是我国惟一接近赤道的热带海区。该海区蕴藏着丰富的海洋生物资源,是世界海洋生物分布中最富有特色的海区之一,从海面到海底深层蕴藏着数量惊人的生物、能量、矿产、空间资源。目前研究表明,广泛分布于世界各地的热带、温带、寒带海域中的微型和超微型藻类在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着十分重要的作用。尤其是在热带、亚热带寡营养海域微型与超微型藻类是重要的初级生产者,并对其所在海域的生物量的贡献十分巨大^[1]。而且,超微型浮游植物在维持生态系统稳定性中亦起着重要作用;同时也可作为环境指示生物。然而,由于受到远海海水采样的限制,人们对南沙海区的海洋微生物的遗传多样性的了解还不深入。加之微型、超微型藻类个体微小,用传统的分类方法鉴定非常困难,而且许多微型、超微型藻类目前在实验室中难以培养。由于这些因素的限制,人们对于分布在该海区的微型与超微型藻类的遗传多样性的认识还是十分有限的。本研究采用分子生物学的方法,构建了核糖体小亚基18S rRNA基因的rDNA文库,利用核糖体小亚基RNA基因(18S)随机对来自南沙不同深度水样的微型、超微型藻类的遗传背景进行了比较分析,并且对其18S rDNA进行了RFLP分析,初步探讨了该海域微型、超微型真核藻类的遗传多样性特征。

1 材料和方法

1.1 材料来源

海水样品采自中国南海南沙群岛环境综合调查

站5号站(114°E, 11°N, 0 m深和100 m深)。2 L自然海水,经过0.45 μm的滤膜过滤,将过滤所得物连同滤膜保存于-20℃,送实验室进一步处理。

1.2 藻类总DNA的制备

将样品连同滤膜放入藻类提取Buffer(1% SDS, 10 mmol/L EDTA pH=8.0, 10 mmol/L Tris-HCl pH=7.5, 10 mmol/L NaCl)中,加入适量石英砂,剧烈涡旋,并做液氮到65℃冷热处理,使样品的细胞破壁。反复数次后,用等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提后取上清,加入1/10体积的3 mol/L pH 5.2 NaAc,混匀后加入3倍体积的无水乙醇,于-20℃沉淀过夜。离心弃上清后用TE回溶。

1.3 PCR反应及目的片段的纯化

将藻样总DNA经简单的稀释后,直接用于目的片段的扩增。20 μL PCR反应液中含2.0 mmol/L MgCl₂, 12.5 mmol/L dNTPs, 2 μL 10×buffer, 0.5 U Ex-Taq DNA聚合酶(宝生物工程公司 TaKaRa Biotechnology),采用扩增真核生物18S rRNA基因通用引物

* 国家自然科学基金项目39970063号、40076031号;广东省自然科学基金011208号、01213号。

** 通讯作者。

第一作者:袁洁,出生于1978年,硕士研究生,研究方向:基因结构与进化。Email: lsbrc04@zsu.edu.cn; 电话: 020-84036952。

收稿日期:2002-12-12;修回日期:2003-04-17

18N1: 5' AACCTGGTTGATCCTGCCAGT 3' 和 18N11R: 5' CTCAGTAAGCTTGATCCTTCCGCAGGTTACAC 3'。扩增 18S 全基因。扩增程序为: 94 ℃ 4 min 后 94 ℃ 变性 1 min; 50 ℃ 退火 1 min; 72 ℃ 延伸 2 min; 30 个循环后 72 ℃ 延伸 10 min。于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳并割胶纯化。目的片段(约 1.8 kb)用 Qiagen 公司的割胶纯化试剂盒(QIA quick Gel Extraction Kit)纯化。

1.4 文库构建与筛选

割胶纯化后的目的片段连接入 pMD 18-T 载体(宝生物工程公司 TaKaRa Biotechnology), 转化入感受态大肠杆菌 DH5 α 细胞中。在涂有 X-gal 的 Amp^r 2YT 平板上 37 ℃ 培养 14 h。挑取白色单菌落编号保种。

挑取已经编号的菌落直接进行菌落 PCR, PCR 反应体系与最初扩增目的片段的 PCR 体系相同。对于经检验呈阳性的克隆子进行 RFLP 分析。用限制性内切酶 MspI 对插入片段进行酶切。

1.5 18S 部分序列的测定

将筛选好的克隆子用于测序反应。所用测序仪为 377 型自动测序仪 (ABI PRISM)。测序引物为质粒上的引物: M13/ pUC Sequencing Primer(-47): 5' CGCCAGGGTTTCCAGTCAACGAC 3' 和 M13/ pUC Sequencing Primer(-48): 5' AGCGGATAACAATTTCA-CACAGGA 3'。

2 结果与分析

2.1 藻类样品总 DNA 提取和 PCR 结果

样品总 DNA 的提取采用本实验室改进的微量藻类 DNA 提取方法^[2]。PCR 反应则分别试验了各种 Mg²⁺ 浓度梯度、模板梯度和退火温度, 进行了多种条件变化的 PCR 反应条件组合实验, 以便找出最适扩增条件。扩增结果见图 1。

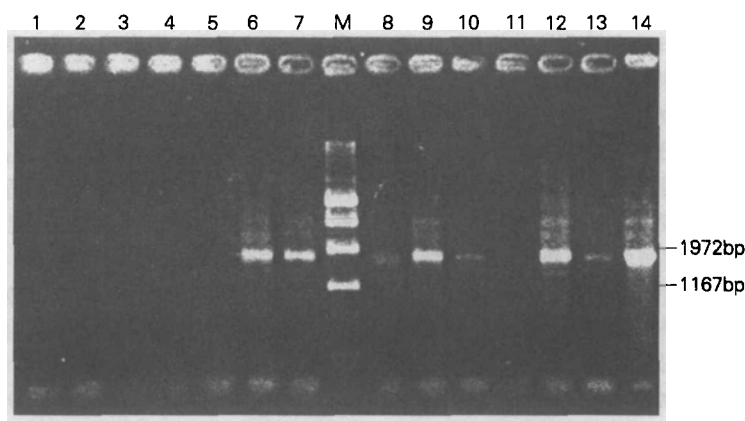


图 1 5 号站 0 m 和 100 m DNA 样品的 PCR 反应结果

Fig. 1 PCR amplification results of the DNA samples from 0 m depth and 100 m depth of No. 5

M: 2 kb 分子量标准; 1: 负对照; 2-7: 5 号站 500 m 样品; 2: [Mg²⁺] 1.5 mmol/L, 模板原液稀释 10 倍; 3: [Mg²⁺] 1.5 mmol/L, 模板原液稀释 100 倍; 4: [Mg²⁺] 1.5 mmol/L, 模板原液稀释 1 000 倍; 5: [Mg²⁺] 2.0 mmol/L, 模板原液稀释 10 倍; 6: [Mg²⁺] 2.0 mmol/L, 模板原液稀释 100 倍; 7: [Mg²⁺] 2.0 mmol/L, 模板原液稀释 1 000 倍; 8: [Mg²⁺] 1.5 mmol/L, 模板原液稀释 10 倍; 9: [Mg²⁺] 1.5 mmol/L, 模板原液稀释 100 倍; 10: [Mg²⁺] 1.5 mmol/L, 模板原液稀释 1 000 倍; 11: [Mg²⁺] 2.0 mmol/L, 模板原液稀释 10 倍; 12: [Mg²⁺] 2.0 mmol/L, 模板原液稀释 100 倍; 13: [Mg²⁺] 2.0 mmol/L, 模板原液稀释 1 000 倍; 14: 正对照

2.2 藻样 18S rDNA 基因文库构建与克隆子筛选结果

用 pMD 18-T 载体进行连接转化大肠杆菌, 经过蓝白斑筛选和菌落 PCR 筛选, 5 号 0 m 和 100 m 两个文库分别得到了阳性克隆子 200 个左右。

2.3 藻样 18S rDNA 基因的 RFLP 分析与测序结果

在藻样 18S rDNA 基因文库中随机选取 36 个阳性克隆子进行 MspI 限制性消化(部分样品 RFLP 分析电泳图见图 2)。发现有 21 种不同的 RFLP 型, 都进行测

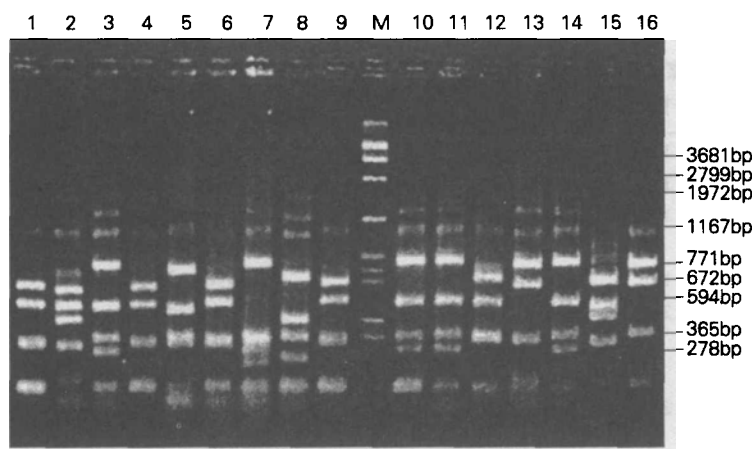


图2 南沙样品 18S rDNA 限制性内切酶 RFLP 分析
 Fig. 2 18S rDNA RFLP of the clones from algae samples in Nansha Islands
 M; 2 kb marker; 1-16: 进行限制性内切酶消化的 18S rDNA 样品

序。把所测得的全部序列输入到国际分子生物学数据库，以 BLAST 程序进行比较分析，结果显示其中 17 种为海洋中的超微型和微型藻类，其余 4 种是大型藻类和后生动物。并且每种 RFLP 型有不同的丰富度（见表 1）。

选取 5 号 100 m 藻样 18S rDNA 基因文库中 226 个阳性克隆子利用限制性内切酶 *MspI* 进行 RFLP 分析，发现带型丰富，除有两种带型反复出现共 100 次以外，其余带型都极少重复，多态性达到 80 种以上。

3 讨论

3.1 特异性引物的选择

本次研究选择了真核生物 18S rRNA 基因的通用引物 18N1 和 18N11R，这一对引物可以扩增出绝大多数真核生物的核糖体 RNA 基因的全序列。所以本次研究所建立的 18S rDNA 文库中没有发现原核生物的核糖体小亚基基因，但是由于该对引物对于原生生物是保守的，所以不可避免地扩增出了后生动物和大型的藻类。但是，由于目前国际分子生物学数据库中已有大量的相关序列可用与进行比较，因此，可以较方便排除后生动物和大型藻类。另外，在处理海水水样时采用两次过滤的方法，先用孔径稍大的（如 20 μm ）滤膜滤掉大型的细胞，再将滤出液用小孔径的（如 0.45 μm ）滤膜过滤，收集第二次滤膜上的细胞作为研

究对象。

3.2 自然水样中真核微藻文库的特点

经过建立 18S rDNA 文库，并进行了初步筛选，利用限制性内切酶进行 RFLP 分析后，发现文库中酶切图谱带型十分丰富。*MspI* 是 4 碱基内切酶，切点为 C | CCG，结果显示对所研究的藻类 18S 基因片段有很好的分型能力。对文库中的 226 个阳性克隆子进行消化后，互不重复的 RFLP 型有 81 个，结果中除了有 2 种带型多次重复出现以外，其余近 80 种互不相同的 RFLP 型中有 64 种只出现了 1 次。当然，对于用 *MspI* 内切酶进行消化后带型相同的克隆子还有待于用其他酶切位点的内切酶进一步分析，可能会出现更多的多态性。但只从目前结果来看，就已经可以推断出南沙海域的样品的遗传多样性的丰富程度了。

对于不同的采样深度，藻类样品的 18S rDNA 文库也初步表现出物种的差异性。5 号 0、100 m 两种不同深度的 18S rDNA 文库表现出其中的克隆子都存在互不交叉的株系。表明了由于不同的海水深度，造成的压力、光照和温度等环境因素的不同，微藻的种类也不同，

3.3 南海海区真核微藻与其它海区的比较

将所测定的序列与 GenBank 数据库的已知序列进行比较后，发现最相似的物种的采样地点广泛分布在地球上的热带、温带和寒带的各种海域中。例如，

表 1 南沙海域微型、超微型藻类样品 18S rDNA 克隆的部分序列分析

Tab.1 Sequence analysis of the 18S rDNA clone of micro, picoplankton from Nansha oceanic region

克隆编号	丰富度* (个)	测序长度 (bp)	Blast 结果			类群
			比较范围(bp) 及相似度(%)	最相似序列及 Genbank 收录号		
NSD15002	1	557	8~557	92	Eukaryote clone OLI11023 (AJ402335)	
NSD15003	1	613	8~613	94	Eukaryote clone OLI11009 (AJ402348)	
NSD15004	1	518	102~518	99	Uncultured marine alveolate Group II DH147-EKD20(AF290075)	
NSD15020	1	671	8~617	98	Eukaryote clone OLI11511 (AJ402343)	
NSB15103	2	661	103~640	91	Uncultured marine alveolate Group II DH147-EKD3(AF290069)	
			38~41	95		
NSD15149	2	661	121~398	98	Uncultured eukaryote isolate C1-E045(AY046642)	
			460~659	93		
NSD15152	1	621	103~621	95	Uncultured marine alveolate Group II DH147-EKD16(AF290071)	超微 型藻
			5~84	96	Eukaryote clone OLI11001(AJ402327)	
NSD15153	3	594	115~594	94		
NSA15161	2	666	29~571	96	Uncultured eukaryote isolate C1-E045(AY046642)	
NSD15166	1	642	4~642	98	Eukaryote marine clone ME1-20(AF363189)	
NSA15166	2	588	8~588	94	Eukaryote clone OLI11023(AJ402335)	
NSD15168	1	610	8~610	97	Unidentified prymnesiophyte clone OLI151102(AF107092)	
			29~81	96		
NSD15172	1	599	119~428	92	Peridinium umbonatum strain UTEX LB 2255(AF274271)	
			455~595	97		
NSD15005	1	517	8~517	94	Gymnodinium cf. mikimotoi(AF009216)	
NSD15157	1	577	8~174	95	Oxytricha longa(AF508763)	微藻
			225~577	92		
NSD15161	2	597	25~597	97	Favella ehrenbergii clone Fehr99ssu-4(AF399162)	

* 在文库中相同的 RFLP 型个数

27% 的株系分别和来自近赤道的太平洋开放海域 (150°W, 11.5°S) 的超微型藻类的不同株系克隆子中相应部分序列平均有 94% 的相似度^[3]。16% 株系分别和来自靠近南极圈海域 (55°45'11"W, 59°19'48"S) 处超微型藻类不同株系的克隆中的相应序列有 95% 相似^[4]。5% 的株系与来自地中海 (4°15'W, 36°14'N) 超微型藻类新株系的相应序列有 98% 相似度^[5]。还有部分株系与来自 Guaymas vent 南部的 Everest Mound 地区 (约 110°W, 27°N) 海水沉积物表面及沉积物内部的藻类株系克隆的相应部分序列相似度在 92% 以上^[6]。

3.4 多数为未确定的种类, 极富研究价值

在已经测定序列的克隆子中, 只有少数克隆子的已测序部分与 GenBank 上的序列有较高的相似度 (如 NSD15004 为 99%, NSD15020、NSD15166 和 NSD15149 为 98%), 其余已测序部分的序列相似度都在 97% 以下。而且, 在 GenBank 中查找到的相似的基因序列多属于未获培养的、系统分类位置未定的藻类。说明在我国南沙海区, 微型、超微型藻类的研究还非常有限, 对我国南沙海域的藻类多样性的认识还有待进一步加深。

4 结论

从以上的研究结果来看, 本次研究虽然针对南

沙海域 5 号采样点的样品进行了研究,但是由此可以推断南沙群岛周围海域的微型、超微型藻类存在十分丰富的遗传多样性,而且结果中还显示有很多类群的系统位置是未定的。作者将对该海域的不同纬度和深度的海水进行进一步的分析,比较系统地对该海域的微型、超微型藻类的遗传多样性进行考察;进而将对我国不同海域、不同季节、不同垂直深度的海水中存在的微藻遗传多样性进行广泛的调查研究。

参考文献

- 1 Platt T, Subba-Rao D V, Erwin B. Photosynthesis of picoplankton in the oligotrophic ocean. *Nature*, 1983, 301: 702-704
- 2 邵 鹏,袁 洁,陈月琴,等. 自然水样微型藻类遗传多样性的方法学研究. *海洋科学*, 2002, 26(4): 14
- 3 Moon-van der Staay S Y, De Wachter R, Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 2001, 409(6 820): 607-610
- 4 Lopez-Garcia P, Rodriguez-Valera F, Pedros-Alio C, et al. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, 2001, 409(6 820): 603-607
- 5 Diez B, Pedros-Alio C, Massana R. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67 (7): 2 932-2 941
- 6 Edgcomb V P, Kyseia D T, Teske A, et al. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 2002, 99 (11): 7 658-7 662

PRIMARY STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF EUKARYOTIC MICRO AND PICOPLANKTON IN NANSHA ISLANDS

YUAN Jie¹ SHAO Peng¹ CHEN Yue-Qin¹ CAI Chuang-Hua² QU Liang-Hu¹

(¹Key Laboratory of Gene Engineering of Education Ministry, Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou, 510275)

(²South China Sea Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301)

Received: Dec., 12, 2002

Key Words: Nansha Islands, Micro and picoplankton, 18S rRNA genes, Genetic diversity

Abstract

Genetic libraries of 18S rRNA genes of eukaryotic micro and picoplankton from Nansha Islands were constructed by the molecular biological method in the paper. The genetic diversity of the libraries was screened by restriction fragment length polymorphism analysis and genetic sequencing. The results revealed the remarkable genetic diversity of eukaryotic micro and picoplankton from Nansha Islands, and there are an abundance of uncultured, unknown species in this oceanic region.

(本文编辑:张培新)