

# 海链藻目核糖体 RNA 基因片段的扩增及多样性分析

李海涛, 杨官品, 刘永健

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 海链藻目 (Thalassiosirales) 的海链藻属 (*Thalassiosira*) 和骨条藻属 (*Skeletonema*) 微藻是形成春季赤潮的主要种类。为利用分子生物学方法分析表层海水主要赤潮形成藻的动态变化、快速鉴定赤潮形成藻种, 设计了海链藻目特异引物, 扩增了胶州湾近岸表层海水海链藻目 18S 核糖体 RNA 基因片断。随机测定 10 个序列, 其中 4 个与海链藻属的 *Thalassiosira concavuscula* 的完全相同, 其余的可确定属于海链藻属。表明该引物对能选择性地扩增海链藻目 18S 核糖体 RNA 基因片断。

**关键词:** 海链藻目 (Thalassiosirales); 18S 核糖体 RNA 基因; 多样性

**中图分类号:** Q344; Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)05-0040-05

海洋浮游植物是海洋初级生产力的重要组成部分, 也是海洋环境指示生物。水体的理化性质影响浮游植物种类和数量, 而浮游植物群落结构变化又可指示海水质量。赤潮是藻类大量繁殖导致的海水变色现象, 现已成为最严重的海洋环境灾害。海链藻目 (Thalassiosirales) 的海链藻属 (*Thalassiosira*) 和骨条藻属 (*Skeletonema*) 微藻是近岸极常见的浮游性硅藻, 也是形成高纬度海岸春季赤潮的主要种类<sup>[1]</sup>。以往对胶州湾的浮游植物调查表明, 骨条藻属中的中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 是胶州湾的常见种, 长年在数量上都占有很大优势; 海链藻属的种类则较少, 数量上也不多<sup>[2~5]</sup>。

近年来, 在中国发生了多起海链藻目微藻引发的赤潮, 如 1998 年胶州湾中肋骨条藻赤潮<sup>[6]</sup>, 2001~2002 年秋冬季节东南沿海双环海链藻 (*Thalassiosira diporocyclus*) 赤潮<sup>[7]</sup>等。因此, 分析表层海水海链藻目微藻动态变化、快速鉴定海链藻目微藻藻种是研究赤潮形成过程的重要内容。为使用分子生物学方法分析主要赤潮形成藻的群落变化、快速鉴定赤潮形成藻种, 作者设计了海链藻目特异引物, 并通过胶州湾近岸海水海链藻目 18S 核糖体 RNA 基因 (18S rDNA) 片断的扩增, 检验了所设计引物的特异性。

## 1 材料和方法

### 1.1 引物设计

从 GenBank 下载海链藻目 18S rRNA 基因全长或近全长序列 45 条, GenBank 收录号为: AJ 810854 ~ AJ 810859, AY 485526, AY 485499, AY 485494,

AY 485473, AY 485472, AY 485469, AY 485452, AY 485445, X 85398, AJ 535166 ~ AJ 535172, AJ 535165, AJ 536450, AY 496206 ~ AY 496213, AF 374477 ~ AF 374482, AF 462058 ~ AF 462060, X 85393 ~ X 85397, 同时也参考了一些与海链藻目具有较近亲缘关系及胶州湾常见藻类的序列。用 DAMBE 对这些序列进行对位排列, 找到海链藻目的保守区段, 根据这些区段用 Primer 5.0 设计引物。用在线 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 分析了所设计引物对海链藻目的特异性和覆盖面, 确定 18SF 5'-GCA TTA AGT TGT CGG GCA GG-3' 和 18SR5'-CCA GGA CAT CTA AGG GCA TC-3' 为海链藻目 18S 核糖体 RNA 基因片断扩增引物。

### 1.2 海水取样及海水浮游生物混合 DNA 提取

于 2004 年 7 月中旬采青岛栈桥附近近岸海水, 立即带回实验室, 用 0.22 μm 混合纤维素膜过滤收集浮游生物。用液氮研磨后, 用 CTAB 法<sup>[8]</sup>抽提浮游生物混合 DNA, 酚、氯仿纯化备用。2 倍 CTAB 提取液组分为: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 mol/L NaCl;

收稿日期: 2004-10-26; 修回日期: 2004-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40176028)

作者简介: 李海涛 (1981-), 男, 硕士生, 研究方向: 分子生态学, E-mail: lihaitao1981@hotmail.com; 杨官品, 通讯作者, 电话: 0532-2031636, E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn

20 mmol/L EDTA ,pH8.0;20 g/L CTAB ;1 g/L PVPP

### 1.3 18S rDNA 片段扩增、变异类型文库构建及序列分析

用约 50 ng DNA 作模板扩增 18S rDNA 片段。PCR 反应终体积为 50  $\mu$ L。其中包括 0.25  $\mu$ L Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L,大连宝生物),dNTP 各 0.2 mmol/L,正反向引物各 0.2  $\mu$ mol/L,1xPCR 缓冲液(Mg<sup>2+</sup> plus)。扩增程序为:95 预变性 3 min;94 变性 1 min,53 复性 1 min,72 延伸 1 min,共 30 个循环;72 延伸 10 min。割胶回收 PCR 扩增产物,与载体 pMD18-T(大连宝生物)连接,转化感受态 JM109,获得 18S rDNA 变异类型文库。随机挑选重组子测序。用 DAMBE 软件进行多序列对位排列,用 MEGA2 软件构建系统树。将核苷酸测序结果提交到 GenBank,获得收录号为:TJ Z 01,A Y 785164; TJ Z 02,A Y 785165; TJ Z 03,A Y 785166; TJ Z 04,A Y 785167; TJ Z 05,A Y 785168; TJ Z 06,A Y 785169; TJ Z 07,A Y 785170; TJ Z 08,A Y 785171; TJ Z 09,A Y 785172; TJ Z 10,A Y 785173。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物覆盖面及特异性分析

引物 18SF 能覆盖 27 条海链藻目的序列,该引物对海链藻目微藻的覆盖率 > 60%。引物 18SR 覆盖 39 条海链藻目的序列,海链藻目覆盖率为 86.7%。引物 18SF 和 18SR 能同时覆盖 23 条海链藻目微藻序列,覆盖率为 51.1%。从数据库下载的 45 条序列中,有 35 条来源于海链藻属,引物对覆盖其中的 20 条,覆盖率为 62.9%;有 10 条序列来自骨条藻属,引物对覆盖其中的 3 条,其中 2 条为数据库中仅有的中肋骨条藻近全长序列。数据库中存在同一个种重复提交的情况,引物对的实际覆盖率可能会有变化。数据库中海链藻目微藻的序列还比较少。另外,海链藻目物种组成复杂,同一物种不同地理类型也可能存在变异。因此,基于数据库序列的分析只能是一种参考。

### 2.2 海水 18S rDNA 多样性分析

用 CTAB 法提取的浮游生物混合 DNA 分子均一,分子量在 21 kb 左右(图 1)。18S rDNA 基因片段扩增条带均一(图 2)。150 ng PCR 产物与 50 ng 载体连接,获得 200 个左右的重组子。随机挑选 10 个重组子测序,获得的序列长度均为 743 bp,序列两两之间最多存在 16 个碱基差异。

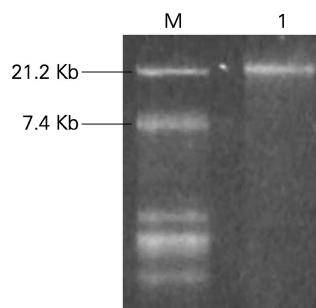


图 1 海洋浮游生物总 DNA

Fig. 1 Total DNA extracted from marine plankton mixture

M:DNA 分子量标记;1: 总 DNA

M:DNA marker ( $\lambda$ DNA/ EcoR );1: total DNA extracted

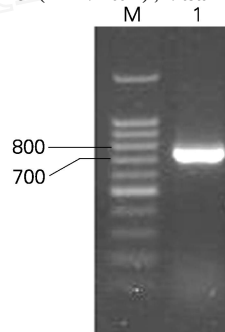


图 2 PCR 扩增的海链藻目 18S rDNA 片段

Fig. 2 PCR amplified 18S ribosomal RNA gene fragments from the total DNA of marine plankton mixture

M: DNA 分子量标记;1: PCR 扩增片断

M:100 bp DNA ladder;1: amplification product

将已知海链藻目微藻 18S rDNA 序列与测序所得序列进行多序列对位排列,构建系统树(图 3)。TJ Z 02,TJ Z 05,TJ Z 06,TJ Z 10, *Thalassiosira concaviscula* 与 TJ Z 07 为姊妹类群,支持率为 72。TJ Z 03,TJ Z 09 与 *Thalassiosira pseudonana* 最相似,它们与 *Thalassiosira tenera* 形成姊妹类群,支持率为 96。TJ Z 01,TJ Z 04,TJ Z 08 与 *Thalassiosira curviseriata* 形成姊妹类群,支持率为 78。序列中没有发现属于骨条藻属的序列。TJ Z 02,TJ Z 05,TJ Z 06,TJ Z 10 与 *Thalassiosira concaviscula* 的序列完全相同,作者断定这 4 个序列代表的就是 *Thalassiosira concaviscula*,同时也表明该种在胶州湾占有较高的丰度。

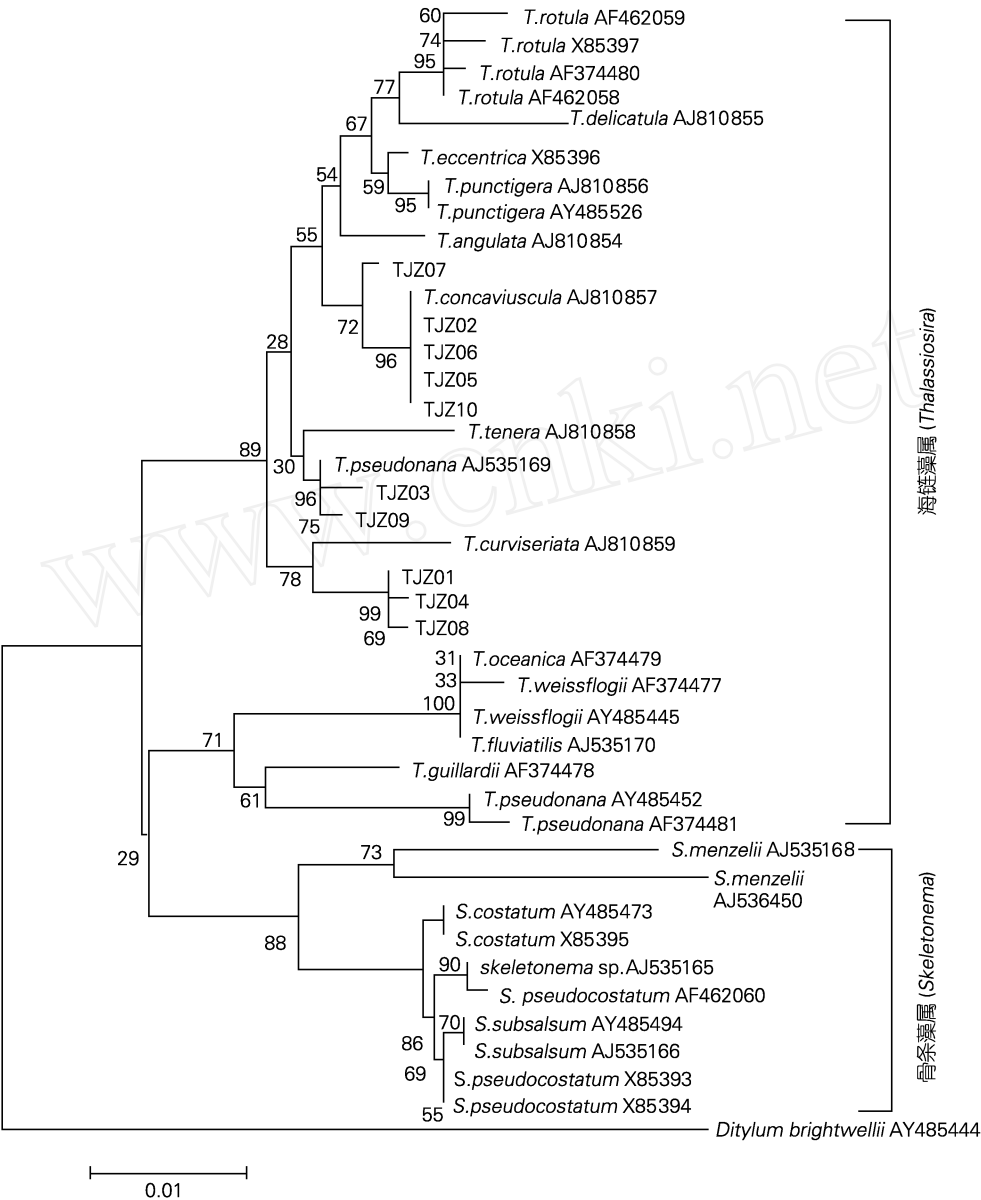


图 3 基于 18S RNA 基因序列用邻接法构建的系统树

Fig. 3 Neighbor-joining tree constructed using 18S ribosomal RNA gene sequences

1 000 次重复计算靴带值, 以 *Ditylum brightwellii* 为外群

*Ditylum brightwellii* was selected as the out-group. Bootstrap values were calculated with 1 000 repeats

3 讨论

采用分子生物学方法, 在 DNA 层次上剖分赤潮

藻群落结构, 探讨赤潮藻种类组成及其与环境因子的相互关系是一个发展趋势。然而, 形成赤潮的藻类组成复杂, 分属不同门类, 很难通过一对引物实现对所

有赤潮藻的特异性扩增。因此,针对形成赤潮的不同种属的藻类设计出种或属特异性引物,一组一组地监测赤潮藻的动态变化成为必然选择。特异性扩增特定藻类群,结合实时定量 PCR、基因芯片等技术剖分群落结构、鉴定种属,可以实现快速、高通量分析。PCR 反应的特异性主要由引物的 3' 端决定,3' 端或 3' 端上游 2~4 个碱基位点内出现的单碱基错配可以降低甚至完全抑制 PCR 反应的进行<sup>[9~11]</sup>。本研究中,海链藻目区别于其它藻类的选择性位点就设计在引物的 3' 端,实验结果也证明所设计的引物能对海链藻目进行特异性扩增。海洋环境样品 18S rRNA 基因序列一方面可以揭示海洋浮游生物的多样性,另一方面也可以发现一些用常规方法难以观察到的新物种<sup>[12,13]</sup>。

物种形态除受遗传控制外,还受环境影响。自然或人工培养的藻类有时会发生形态上的变异,区分一些复合种需要精细的形态学指标。物种鉴定极大地依赖研究者经验。核糖体 RNA 基因已广泛应用于藻类品种鉴定<sup>[14]</sup>、遗传多样性<sup>[15,16]</sup>和系统发育学研究<sup>[17~19]</sup>,是传统工作的重要补充。海链藻目种类繁多,仅海链藻属就有超过 100 种,目前区分这些种的主要依据是硅质壳面的构造、对称性,以及唇型或支撑突起的类型和数量<sup>[20]</sup>。但是,水域中硅含量、pH 值、温度、水流等理化因子都可造成硅藻的形态变异<sup>[21]</sup>,因此十分必要在它们的鉴定中引入 DNA 序列信息。目前赤潮藻的分类一般都采用形态鉴定和分子生物学相结合的方法<sup>[22]</sup>。

引物应覆盖骨条藻属序列,特别是中肋骨条藻序列,但分析中没有发现来源于骨条藻属的克隆。这可能是测序样本较少,骨条藻属的种类所占比例较低引起的,也可能是因为作者的参考种类和胶州湾的种类属不同的地理类群、序列存在差异引起的。此外,作者分析的只是一个地点的一个时间点样品。样品间的差异也可能是原因之一。因此,关于引物的特异性和覆盖面还需要用更多的样品进行证明。

已知物种的序列不够丰富,尤其是中国沿海藻种的序列更少<sup>[12]</sup>。因此,确定一个序列的物种来源非常困难。在进行形态鉴定的同时,获得特定基因的序列,不仅可建立形态分类与基因序列间的桥梁,也是形态分类的重要补充。分离培养中国沿海微藻,对这些藻进行形态鉴定并同时获取其某些标记基因序列是以后进一步的工作。

#### 参考文献:

- [1] Meldlin L K, Kooistra W H C F, Gersonde R, *et al.* Evolution of the diatoms (Bacillariophyta): . Molecular evidence for the origin of the Thalassiosirales [J]. *NOVA HEDWIGIA*, 1996, 112: 221-234.
- [2] 刘东艳,孙军,唐优才,等. 胶州湾北部水域浮游植物研究:种类组成和数量变动[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(1): 67-72.
- [3] 刘东艳,孙军,张利永. 胶州湾浮游植物水华期群落结构特征[J]. 应用生态学报, 2003, 14(11): 1 963-1 966.
- [4] 刘东艳,孙军,陈洪涛,等. 2001 年夏季胶州湾浮游植物群落结构特征[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(3): 366-374.
- [5] 陈碧鹃,陈聚法,袁有宪,等. 胶州湾北部沿岸浮游植物生态特征的研究[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(2): 34-40.
- [6] Huo W, Yu Z, Zou J, *et al.* Outbreak of *Skeletonema costatum* red tide and its relation to environment factors in Jiaozhou Bay [J]. *Oceanol Limnol Sin*, 2001, 32(3): 311-318.
- [7] 陈善文,高亚辉,杜虹,等. 双环海链藻赤潮[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(2): 130-137.
- [8] Polne-Fuller M. A two-hour method for extraction of DNA from seaweeds [J]. *Phycological Newsletter*, 1991, 23: 2.
- [9] Peteuska J, Goodman M F, Boosalis M S, *et al.* Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85: 6 252-6 256.
- [10] Sommer R, Tautz D. Minimal homology requirements for PCR primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 6 749.
- [11] Kwok S, Kellogg D E, McKinney E, *et al.* Effects of Primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type model studies[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 999-1 005.
- [12] Moon-van der S Y, De Wachter R, Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unexpected eukaryotic diversity[J]. *Nature*, 2001, 409:607-610.
- [13] L Ópez-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alí ÓC, *et al.* Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton [J]. *Nature*, 2001,

- 409: 603-607.
- [14] 陈丽芬, 章群, 谢秋玲, 等. 一株海洋藻类的分子鉴定与分类[J]. 生态科学, 2003, 22(2): 163-164.
- [15] 刘永健, 杨官品, 门荣新. 胶州湾浮游植物分子遗传多样性初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(6): 907-916.
- [16] 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[J]. 海洋科学, 2002, 26(4): 1-4.
- [17] Bart N, Raymond D B, Annick W, *et al.* Phylogenetic relationship of filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis [J]. *J Mol Evol*, 1996, 42: 194-200.
- [18] Kooistra W H C F, De Stefano M. Phylogenetic position of toxarium, a pinnate-like lineage within centric diatoms [J]. *J Phycol*, 2003, 39: 185-197.
- [19] Kooistra W H C F, Forlani G, Frithjof A S, *et al.* Molecular phylogeny and morphology of the marine diatom *Ttalaroneis posidoniae* gen. et sp. (Bacillariophyta) advocate the return of the Plagiogrammaceae to the pinnate diatoms [J]. *Phycologia*, 2004, 43(1): 58-67.
- [20] Meldlin L K, Kooistra W H C F, Gersonde R, *et al.* Evolution of the diatoms (Bacillariophyta): Nuclear-encoded small-subunit rRNA sequence comparisons confirm a paraphyletic origin for the centric diatom [J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(1): 67-75.
- [21] 曹吉祥, 潘震球, 卞伯仲, 等. 偏心海链藻形态变异的观察及原因的初步研究[J]. 海洋科学, 1994, 18(5): 50-52.
- [22] 张宝玉, 王广策, 张炎, 等. 一株赤潮甲藻转录单元内间隔区(ITS)和5.8S rDNA 序列的克隆[J]. 海洋科学, 2004, 28(12): 49-53.

## Amplification and diversity analysis of *Thalassiosirales* 18S RNA gene fragments

LI Hai-tao, YANG Guang-pin, LIU Yong-jian

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Oct., 24, 2004

**Key words:** *Thalassiosirales*; 18S ribosomal RNA gene; Diversity

**Abstract:** Two order *Thalassiosirales*-specific primers were designed with their coverage and specificities determined based on the sequences available in GenBank and tested through selective amplification of 18S ribosomal RNA gene (rDNA) fragments of the microalgae in *Thalassiosirales* from total DNA of seawater plankton. From the library containing all possible rDNA variants of microalgae in *Thalassiosirales*, 10 clones were randomly selected and sequenced. Of them, sequences of TJ Z02, TJ Z05, TJ Z06 and TJ Z10 are identical to that of *Thalassiosira concaviscula*. All the sequences obtained belong to genus *Thalassiosira*.

(本文编辑: 张培新)