

分子生物学技术在生物海洋学研究中的应用*

PERSPECTIVE OF MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES APPLIED IN BIOLOGICAL OCEANOGRAPHY

梁俊 李道季 张经

(华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062)

本世纪 70 年代,由于限制性内切酶的发现、DNA 重组技术的建立、DNA 序列快速测定方法的发明,分子生物学及其技术以迅猛的速度发展。80 年代,PCR 技术的产生和发展,加速了分子生物学技术在生物学各研究领域的广泛应用。分子生物学技术应用于海洋生物学及生物海洋学研究始于 80 年代中期,近年来此技术在国外发展十分迅速。我国学者在此领域的研究尚处在起步阶段,本文将就国际上相关的研究及发展做一些简要的讨论。

1 分子生物学技术在生物地球化学循环研究中的应用

1.1 关于海洋生物固氮

固氮作用是固氮微生物将不太活泼的氮分子转变为生物体所能够利用的氨的过程,这一环节一直被认为是整个氮循环中的主要瓶颈。在海洋中生物的固氮作用显得尤为重要,因为固氮效率的高低会直接影响到整个自然界的氮循环及其平衡。目前我们对于海洋中生物体(主要是一些微型藻类,如:蓝细菌、绿细菌等)固氮作用的研究还只局限于测定不同生物体的固氮效率,以及运用传统的比较学及形态学方法来研究影响固氮作用的化学因子。但是除了影响固氮作用的化学因子之外,这些固氮生物体自身的生长还依赖于其它一些必需的化学因子。这些因子有可能成为限制因素,并对固氮效率的测定起到干扰作用。传统的方法比较复杂而且精度差,难以排除干扰因子的影响。这样,一种新的更精确的研究方法也就因运而生了。

科学家们发现大多数海洋固氮生物中(如:古细菌、绿细菌、蓝细菌等)都具有固氮酶的结构基因(*nif* HDK 或 *nif* HDGK)。这样我们就可以利用 DNA 探针来

探测 *nif* 基因或 *nif* 基因产物的存在,进而确定固氮生物体的存在。

这项技术的理论依据在于:尽管大多数的海洋固氮生物在进化过程中沿着不同的进化路线,在遗传上及形态上发生了变异,但是它们编码各自固氮酶的基因却是高度保守的。也就是说,即使是遗传距离相当大的两个固氮微生物,它们固氮酶的 DNA 线性顺序仍是一致的,固氮酶的氨基酸顺序也是相同的。正因为有了上述理论,我们就可以利用同位素或荧光标记的 DNA 探针来探测生物体内固氮酶或固氮还原酶的存在及活性,并进一步检测其固氮效率。这种新技术的出现为我们提供了一个绝好的工具来研究固氮微生物的分布及固氮酶基因在转录、转译过程中的限制因素。

此外,Zehr 等人还利用 PCR 技术扩增出了不同固氮生物体内的 *nif* H 基因,最近又扩增出了 *nif* D 基因^[7]。他们将扩增后的 DNA 片断克隆并测序,然后比较与未知的固氮微生物 DNA 顺序上的细微差别并在此基础上绘制出它们之间的种系发生关系。这种方法用于探测未知的固氮生物体并确定它们的遗传学关系要比传统的形态学、比较学方法精确得多。

* 国家重点基础研究规划项目第 G1999043705 号;教育部骨干教师计划项目。

第一作者:梁俊,出生于 1978 年,硕士研究生,目前在研课题项目:中国沿海鳗鲡遗传结构的研究。通信地址:华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062, E-mail: junliang@public4.sta.net.cn

收稿日期:2001-04-29;修回日期:2001-08-18

1.2 关于海洋中碳循环的研究——海洋微生物生物量的估算

海洋是一个高度复杂的生态系统,要研究这样一个复杂的系统,必须抓住海洋生态系统的两个基本属性:(1)活性生物体的生物量;(2)生物体的代谢活性^[2]。这是因为生物量是活性生物体存在的基石,而生物体的代谢过程是生物地球化学循环的驱动力量。在海洋中微生物无论是从种类上还是数量上都在系统中占支配地位。而作为海洋中能流和物流的驱动力量,微生物的生长、发育及代谢过程可以通过微生物生物量的变化观察到。因此,海洋中微生物生物量的估算就成了研究海洋生态系统能流、碳循环及微生物新陈代谢的重要手段。

用于估算微生物生物量的新方法不断涌现,估测的精度及专一性也不断提高,分子生物学技术也开始应用于这一领域。比如,运用 ATP、叶绿素 a(chl a)、磷酸化的磷脂细胞膜(PLP)、磷脂酸膜(PLFA)、麦角脂醇(Ergosterol)、脂多糖(LPS)、胞壁酸(MA)、DNA 等作为分子生物标志物来估测海洋中微生物的生物量^[2]。利用 DNA 作为分子生物标志物估算微生物生物量的方法,其依据在于所有的活性生物体体内都含有 DNA,而且在生物体内 C/DNA 的比率是恒定的,这样我们就可以先用过滤器收集颗粒状的 DNA,然后利用电量计来分析 DNA 在生物体内的含量。但是,这种方法也有其局限性。首先,它是一种非专一性的生物量估测方法,因为 DNA 在细菌、古细菌及真核生物中都有分布;其次,许多可溶性的以及无活性的 DNA 颗粒遍布整个海洋中,这样对测定结果的精度将产生影响。

国外科学家已经将上述方法用于研究微生物的生长代谢过程。他们首先利用同位素标记的方法将含有^[3H]U 或^[3H]A 的嘧啶碱加入异养细菌的培养基中培养,以便含标记物的嘧啶碱参与微生物整个的 DNA 合成过程。然后,利用上面提到的方法通过样品中放射性活度的测定来计算生物体内 DNA 的含量及 RNA/DNA 的比率。这种改进提高了测量精度,可以更精确地估算微生物的生长代谢情况。为了将细胞中的 DNA 与岩屑中的 DNA 相区别,Winn 和 Karl 在 1986 年提出了一种方法:由于腺嘌呤(A)是大多数生物体必需的一种核酸,因此他们就用^[3H]标记了一定量的 A,并加入样品中示踪,然后比较全部微生物样品中的

放射性强度和细胞内 dAMP 的放射性强度。如果颗粒状 DNA 全部是活性生物体内的,那么在单位时间内前者的放射性强度与后者的放射性强度之比应为 1:2;如果不是 1:2 的关系那就可以通过放射性强度的差异来确定不进行复制的 DNA(无活性 DNA)的量。这样一来就很好地解决了上述的干扰现象。

总之,运用 DNA 与生物量的关系来确定海洋中微生物的生物量仍然是一种不太完善但又充满吸引力的方法,目前有关学者也正在努力完善这一方法并设法使其真正成为实用的工具。

2 分子生物学方法在海洋生物系统发育学研究中的应用

系统发育学是研究生物遗传学关系及其进化史的学科。生命起源于海洋,因此海洋中的生物进化及遗传关系自然成了科学研究的热点问题。国外科学家很早就将分子生物学方法应用于海洋系统发育学的研究,并在此基础上形成了一门新兴学科——分子系统发育学。分子系统发育学是通过研究生物大分子的基本结构来重新认识生物大分子的进化史。他们通过比较携带遗传信息的生物大分子的线性序列,经分析后给出不同物种之间的进化关系。这种方法的理论依据在于:生物体进化过程中,生物体内的任何突变都会造成生物体细胞内核苷酸顺序的变化而被生物体本身记录下来,而且这种随机发生突变的累积频率在一个较长时间尺度上是恒定的,我们就能以核苷酸顺序的变化来推断生物体之间的遗传关系及生物进化史。

分子系统发育学得以迅速应用于海洋生物学各领域的主要原因在于:它为我们提供了一种直接的方法来探测和区别不同时空范围内的生物。过去我们一般用人工培养的方法来分离海洋中的微生物,并借助于比较学和形态学方法来区分这些生物体。但是海洋中生物的多样性比陆地生态系统丰富得多,在如此复杂的海洋生物集体中,仅通过这些非定量的方法来研究海洋生物的遗传和进化显然很难有所突破。相比之下基于分子生物学技术的 DNA 序列比较分析使得上述研究深入到了遗传、进化现象的本质层面,并且能够量化地描述生物体内的这些变化。这样一来分子生物学方法在这一领域便有了用武之地。

首先,最直接的方法自然是比较不同生物体的氨基酸或核苷酸顺序,然后根据生物体之间的遗传距离

绘制出它们的遗传关系。目前,利用分子系统发育学方法已经构建出了一些物种的种系发生关系,如:海洋微藻^[4,5]、鳗鲡^[6]等等。随着 DNA 测序技术的发展及免疫学方法的引入,直接比较法已经被更多的人所接受,因为这是一种最为可靠、可信的方法。但是由于直接比较大分子物质的线性序列,技术上太复杂、太费时,并不是每一位研究人员都能接受这种方法。

为了在不影响精度的前提下减少工作量,科学家们发展出了一种被称为限制片长多态性分析 (RFLP) 的方法。这种方法首先将 DNA 从不同的生物体内分离出来,并用同一种限制性内切酶消化;这样就在各个识别位点将 DNA 切成很多片段,接下来就可以通过电泳将这些片段按不同的长度分离;由于各物种的遗传密码(DNA 序列)存在高度保守的区域,而这些保留的区域就可以作为一种标识物制成同位素或荧光标记的 DNA 探针与上述片段进行杂交,并找出与标识物同源的基因。得到这些数据后我们就能借助数理统计的方法及计算机程序来绘制出不同物种的进化关系^[3]。

除上述两种方法之外,还有利用核酸杂交(rRNA/DNA, DNA/DNA 杂交)和比较分析法来分析不同物种的遗传距离、进化关系。这些方法都大同小异,这里就不再详细讨论了。

另一种在海洋生物系统发育学研究中应用得极为广泛的分子生物学方法是 rRNA 序列比较。我们知道,rRNA 的两个亚基都带有大量的进化信息,而这些信息可以通过分析和比较 rRNA 的碱基顺序来获取。由于 rRNA 在生物体内的大量分布,而且许多 rRNA 的碱基顺序是高度保守的,因此这些序列可以作为靶物质用于核酸杂交分析。国外科学家已经利用荧光标记 rRNA 作为探针与不同的生物体进行原位荧光杂交 (FISH),并以此为基础描绘出不同物种之间的遗传学关系^[3]。

3 运用分子生物学方法研究海洋生物的生长、发育过程

生物学领域中,研究生物体的生长、发育过程始终是一个热点问题。因为这对于提高水产品(包括淡水水产品和海水水产品)的产量和品质有至关重要的作用。

在过去的 20 年中,人们逐步发现,尽管大多数动物具有受精卵、幼体、成体等不同的生长阶段,并且在

这些不同阶段具有各自不同的形态,但控制这些生长、发育过程以及细胞功能的基因却是高度保守的。正是因为这种“高度保守性”使我们有可能运用 DNA 重组、分子杂交等分子生物学方法来分离和分析特定的基因。80 年代末,随着 PCR 技术的出现和发展,大大加快了分离和分析特定基因的效率。目前,国外一些科学家已经将这一技术应用到了海洋生物学领域,并且在许多不同种类海洋动物中分离并分析了这种生长调节基因。

Degnan 等人主要以无脊椎动物为对象,研究调控其生长、发育基因的表达和识别^[1]。由于控制着无脊椎动物细胞生长、繁殖及抗病性的基因在其组织、细胞内都有表达,所以研究人员就可以通过 RT-PCR 技术,先将基因转录的产物 RNA 逆转录成 cDNA,然后再将此 cDNA 片段进行 PCR 扩增。接下来运用电泳方法,比较扩增后的特定基因在生物体不同生长阶段表达量的差异,并以此为基础来判断不同的基因在生物体不同生长阶段的作用。为了能够扩增出不同的基因家族中的同源框基因。他们设计了一对特殊的引物(简并的核苷酸引物)来完成 cDNA 的 PCR 扩增^[1]。

至于分离和识别这种特定的调节基因,人们采取了两种策略:(1)利用其它无脊椎动物(如:海鞘、鲍鱼等)已经被识别的生长调节基因作为探针来探测海胆细胞内未知的同源框基因。(2)由于编码信号肽、受体、第二信使和促转录因子的基因在生物体内也是高度保守的,因此也可以通过分离上述基因作为探针来识别未知的同源框基因。目前为止,已经有许多信号肽及转录因子的基因已经被分离了出来,如 Wnt 基因、hedgehog 基因、编码 zinc-finger 蛋白的基因及编码 Brachyury(T)蛋白的基因^[1]。

在进一步研究无脊椎动物生长、发育机制的基础上,国外科学家已经运用 DNA 重组和转基因技术改造海洋生物体的基因结构,以期加快生物体的生长、发育进程。Powers 等人运用电穿孔的方法将重组 DNA 导入鲍鱼卵中,并且在此基础上对鲍鱼的促生长基因进行了修饰(重组一部分基因序列使其异位表达)、重新引入后,他们发现鲍鱼的生长速率大大加快了。

此外,人们发现软体动物的神经激素是直接作用于靶物质的,而且其中有一种被称为 MP(molluscan insulin related peptide)的蛋白能够促进软体动物的生长。接着,利用简并引物引导的 RT-PCR 方法分离出了鲍鱼小脑神经节中的 MP 基因,并与启动子融合后导

入鲍鱼细胞^[1]。通过对鲍鱼幼体及成体细胞的基因表达分析证明,MP基因确实被表达,而且加快了生物体的生长速率。这同样为我们提供了一种高产转基因海洋动物的方法。

4 结语

分子生物学技术应用于海洋学的研究仅是近十几年的事,但海洋分子生物学作为一门新兴学科在国外已经蓬勃地发展了起来。相信随着分子生物学技术的进一步发展,这门技术应用在海洋学领域的研究前景必定会更加广阔。

参考文献

- 1 Degan B. M. . Molecular analysis of invertebrate development and growth: Identification of developmentally regulated genes in model and commercially important species. In: Cooksey K. E.ed. Molecular approaches to the study of the ocean. London: Chapman & Hall, 1998.343 ~ 358
- 2 Karl D. M. and Dobbs F.C. . Molecular approaches to microbial biomass estimation in the sea. In: Cooksey K.E.ed. Molecular approaches to the study of the ocean. London: Chapman & Hall, 1998.19 ~ 89
- 3 Long E. F. . Molecular phylogenetics: New perspective on the ecology, evolution and biodiversity of marine organisms. In: Cooksey K.E.ed. Molecular approaches to the study of the ocean. London: Chapman & Hall, 1998. 1 ~ 27
- 4 Purificacion Lopez Garcia, Francisco Rodriguez Valera, Carlos Pedros-Allo and David Moreira. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton, *Nature*, 2001, 409: 603 ~ 607
- 5 Moorvan der Staay Seung Yeo, Wachter Rupert De and Vaulot Daniel. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity, *Nature*, 2001, 409: 607 ~ 610
- 6 Thierry W. and Louis B. . Genetic evidence against panmixia in the European eel, *Nature*, 2001, 409: 1 037 ~ 1 040
- 7 Zehr J.P. and Paerl H. W. . Nitrogen fixation in the marine environment: Genetic potential and nitrogenase expression. In: Cooksey K.E.ed. Molecular approaches to the study of the ocean. London: Chapman & Hall, 1998,285 ~ 301

(本文编辑:刘珊珊)