

玻璃质壳类底栖有孔虫卷转虫属 *Ammonia* spp. 的 DNA 保存方式和提取效能比较研究*

吕曼^{1,3} 类彦立¹ 李铁刚^{1,2}

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生物分类与系统演化实验室 青岛 266071; 2. 国家海洋局第一海洋研究所海洋沉积与环境地质国家海洋局重点实验室 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋地质过程与环境功能实验室 青岛 266061; 3. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 对有孔虫的 DNA 进行有效保存及提取是开展有孔虫分子鉴定工作的前提。本研究以探索适合玻璃质壳类底栖有孔虫的 DNA 保存及提取方法为目的, 以中国近海优势属——玻璃质壳类底栖有孔虫卷转虫属(*Ammonia* spp.)为模式生物, 考察不同温度(20—120°C, 间隔 10°C)烘干、冷冻(-20°C、-80°C, 有水、无水)以及脱氧胆酸钠裂解液(Na deoxycholate, 简称 DOC)处理(含和不含 EDTA)保存有孔虫 DNA 方法, 同时进行了 DOC 裂解液法和 Guanidine 裂解液法对 *Ammonia* spp. DNA 提取效能的比较。结果显示, 烘干保存法中 20°C 组和 30°C 组显著优于 40°C 组($P < 0.05$); 冷冻保存法中无水组显著优于有水组($P < 0.05$); DOC 裂解液保存法各组间无显著差异($P > 0.05$)。三种保存方法综合效果表现为冷冻组显著优于烘干组和裂解液组($P < 0.05$); 两种 DNA 提取方法的提取效果都很好, 但 DOC 法更廉价且操作简便。本文给出了一套适用于玻璃质壳类有孔虫的 DNA 保存和提取的优化方案。

关键词 玻璃质壳; 底栖有孔虫; 分子生物学; *Ammonia*; DNA 提取; 保存

中图分类号 Q-33; Q959.114+.4 doi: 10.11693/hyhz20150400097

有孔虫(Foraminifera)门隶属于原生动物界, 目前已知化石种约 36000 种, 现生种约 4000—6000 种, 大部分为海洋底栖种类(Sen Gupta, 1999)。有孔虫因其壳体可长期保存在海洋水体及沉积物中, 因此在古海洋学等学科研究中有重要价值(汪品先等, 1980, 1988)。另外在环境指示(Eichler *et al*, 2012)、生态评估(Boucheta *et al*, 2012)以及海洋生态系统的能量流动与物质循环中, 都扮演着重要角色。

现生有孔虫有钙质玻璃壳、钙质瓷质壳、砂质壳(胶结壳)和无壳(蛋白质膜)等多种类型。其中玻璃质壳类底栖有孔虫 *Ammonia*(Brünnich, 1772)是中国近海重要的优势类群, 常以优势种出现, 在中国各海域均

见报道(汪品先等, 1980; 成鑫荣, 1987; 李保华等, 2008; 赵泉鸿等, 2009; 李小艳等, 2010; 类彦立等, 2015)。这类有孔虫常被用来指示滨岸和低盐等海洋环境, 具有重要的生态价值(郝谄纯等, 1980; 汪品先等, 1980)。

Ammonia 是最早被确定为有孔虫的一个属, 其种类之多、形态变异之大使得这类有孔虫的分类鉴定尤为困难和混乱(Holzmann *et al*, 2000; Hayward *et al*, 2004), 同样的困难也存在于其他类群的有孔虫。而分子技术的应用为解决这一难题提供了新的思路(Pawlowski *et al*, 2010, 2014, 2013)。有孔虫分子生物学研究已经有较长的历史(Langer *et al*, 1993), 对于

* 国家自然科学基金项目, 41476043 号, 41230959 号, 41176132 号; 中国科学院战略性先导科技专项(A 类)项目, XDA11030104 号; 大陆架科学钻探项目, GZH201100202 号; 国家海洋局全球变化与海气相互作用专项项目, GASI-03-01-03-01 号, DOME(PMEA)-01-01-E 号; 中华人民共和国科学技术部项目, 2014FY110500 号。吕曼, 硕士研究生, E-mail: lvmanabm@163.com

通讯作者: 类彦立, 研究员, E-mail: leiyanli@qdio.ac.cn

通讯作者: 李铁刚, 研究员, E-mail: tgli@fio.org.cn

收稿日期: 2015-04-03, 收修改稿日期: 2015-04-21

Ammonia 属的分子鉴定多基于对编码核糖体 RNA 基因的序列分析, 这方面的工作在国外已经有很多报道(Pawlowski *et al*, 1994b, 1995; Hayward *et al*, 2004), 而国内的开展尚未普及(徐美香等, 2004; 李保华等, 2005, 2007): 技术应用的不成熟、相关数据库信息量太少等都是其限制因素。

众所周知, 有孔虫很难在实验室培养并且繁殖, 而且野外采样也受到时间和空间的限制。因此, 如何有效保存有孔虫的 DNA 以用于后续研究, 是有孔虫分子生物学研究能够广泛开展的前提。海洋生物常用的保存方式有冷冻、乙醇固定及福尔马林固定等。但有研究指出后两种化学固定方法并不适用于有孔虫(Holzmann *et al*, 1996)。

本工作通过参考前人研究结果(徐美香等, 2004; 李保华等, 2005, 2007; Pawlowski *et al*, 1994b, 1995;), 最终选出 3 种保存方法, 即烘干法、冷冻法和裂解液法, 进行了更为系统的有孔虫 DNA 保存方法的实验研究。另外, 由于不同壳质类型的有孔虫所适用的 DNA 提取方法不尽相同(Pawlowski, 2000)。本实验还比较了 DOC 裂解液法和 Guanidine 裂解液法对 *Ammonia* 属 DNA 提取效能的不同, 以期筛选出最适合玻璃质壳类底栖有孔虫的 DNA 保存和提取方法, 提供适合野外采集及实验室等不同环境下的最优方案。进而为分子生物学在这类有孔虫研究中的应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 活体有孔虫材料准备 实验所用的有孔虫材料是 2014 年 2 月份采自青岛湾潮间带的底栖优势类群, 卷转虫属 *Ammonia* spp. 经形态鉴定, 主要为 *Ammonia aomoriensis* (Asano, 1951) 与 *Ammonia beccarii*(Linnaeus, 1758)的混合种。把沉积物样品置于 14°C 左右的培养箱中孵化 2 天, 挑选爬到沉积物表面、壳体完整、大小均一、房室呈棕黄色、体表黏附有颗粒物的 *Ammonia* spp., 这样的有孔虫活性较好(Holzmann *et al*, 1996; Schweizer *et al*, 2005)。放到盛有过滤海水的培养皿中, 投喂硅藻, 在实验室培养 1 周。将有孔虫小心转移到灭菌过滤海水中, 在体视显微镜下, 用毛笔仔细清洗壳体表面的杂质, 准备进行 DNA 提取和保存实验。

1.1.2 试剂准备 DOC 裂解液(0.1mol/L Tris-HCl pH8.5, 4mmol/L EDTA pH8.0, 1%DOC, 0.2%TX-100);

Guanidine 裂解液(4mol/L Guanidinium isothiocyanate, 0.05mol/L Tris-HCl pH7.6, 0.01mol/L EDTA, 0.068mol/L Sarkosyl=N-Lauroylsarcosine sodium salt, 1%β-巯基乙醇)(Pawlowski, 2000); 异丙醇; 70%乙醇; 1×TE Buffer; 琼脂糖; TAE 电泳缓冲液; 2×PCR Mix(TIANGEN Golden Easy PCR System); ddH₂O; PCR 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.1.3 仪器准备 PCR 仪; 凝胶成像分析系统; 电泳仪; 干燥箱; 高速冷冻离心机; -20°C、-80°C 冰箱; 恒温水浴锅。

1.2 DNA 提取方法

采用 DOC 裂解液和 Guanidine 裂解液两种处理方法提取 *Ammonia* DNA, DOC 裂解液法设置 2 个平行组, Guanidine 裂解液法设置 3 个平行组, 每个平行组均为单个样本。实验操作如下:

1.2.1 DOC 裂解液法 取一只清洗过的 *Ammonia* 实验样品放置在含 50μL DOC 裂解液的 1.5mL 无菌离心管中, 研磨使壳破碎。于 60°C 水浴孵化 1h。10000 r/min 离心 5min, 去除不溶物。所得即为基因组 DNA, 于 -20°C 保存(Holzmann *et al*, 1996; Pawlowski, 2000)。

1.2.2 Guanidine 裂解液法 取一只清洗过的 *Ammonia* 实验样品放置在含 50μL Guanidine 裂解液的 1.5mL 无菌离心管中, 研磨使壳破碎。60°C 加热 15min, 或室温过夜。8000 r/min 离心 1min, 取上清液。加入与第一步中 Guanidine 裂解液等量的异丙醇, 混匀。在 -20°C 沉淀至少 2h, 或过夜。最大转速离心 15min, 移去上清液, 注意不要扰动沉淀。用 100μL 70%乙醇洗涤沉淀物, 最大转速离心 1min, 移去上清液。将沉淀物真空干燥 5—10min, 或者室温下干燥更长时间。用 15—20μL 1×TE Buffer 溶解沉淀物, 在 4°C 放置至少 1h, 或过夜, 期间取出涡旋数次。所得即为基因组 DNA, 于 -20°C 保存(Pawlowski, 2000)。

1.3 DNA 保存方法

对实验样品分别进行烘干、冷冻和裂解液保存等 3 种方法处理。鉴于预实验以及 Holzmann 等(1996)的实验结果, 加之实验样品数量限制, 为了最大限度进行实验研究, 进行如下实验设计: 烘干法共 11 个处理组, 未设平行组; 冷冻法共 4 个处理组, 每个处理设 2 个平行组; 裂解液法共 6 个处理组, 每个处理设 2 个平行组。采用 1.2.1 中介绍的 DOC 法提取 DNA。具体操作如下:

1.3.1 烘干保存法 取清洗好的 *Ammonia* 实验

样品放置在 1.5mL 无菌离心管中, 每管一只。分别在温度为 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110 和 120°C 烘干 30min, 每个温度组烘干 11 只。每个温度组各取一只, 立即提取 DNA。其余的在室温下保存, 之后每周取每个温度组的一个样本提取 DNA, 连续进行 10 周实验。每次实验均取一只活的 *Ammonia* 提取 DNA 作为阳性对照, 另用无菌水做空白对照。

1.3.2 冷冻保存法 取清洗好的 *Ammonia* 实验样品放置在 1.5mL 无菌离心管中, 每管一只。设以下 4 个冷冻组: 在无水和 50 μ L 无菌过滤海水中分别在 -20°C 和 -80°C 下冷冻。之后每周对每个冷冻组提取 DNA, 连续进行 8 周实验, 提取前需要解冻并排出海水。设置阳性和空白对照。

1.3.3 裂解液保存法 为比较裂解液中是否含有 EDTA 对于 *Ammonia* DNA 保存效果的差异, 进行如下实验。取清洗好的 *Ammonia* 实验样品放置在 1.5mL 无菌离心管中, 每管一只。设以下 6 个实验组: 分别在 2 种裂解液(含 4mmol/L EDTA 的 DOC 以及不含 EDTA 的 DOC)、3 种温度(室温、4°C、-20°C)下对样品进行保存实验。之后每周对每个实验组提取 DNA, 连续进行 8 周实验。设置阳性和空白对照。

1.4 DNA 检测方法

基于核糖体 RNA(rRNA) 基因大亚基 (large subunit, LSU) 片段的序列分析在 *Ammonia* 属种类鉴定等方面的研究中已经有很好的应用 (Pawlowski *et al.*, 1994a, 1995; Holzmann *et al.*, 1996, 2000; Schweizer *et al.*, 2011)。

本实验运用 PCR 技术, 对所有实验组提取的 DNA, 扩增其 LSU rRNA 基因片段(大约 750bp), 取 4 μ L 扩增产物, 经 1.0% 琼脂糖凝胶 (TAE 缓冲液, 110V) 电泳 20min、EB 染色 10min, 然后用凝胶成像分析系统拍照。通过分析电泳条带质量判断所提取的 DNA 质量。DNA 提取方法组的比较, 是直接观察电泳图条带的质量并结合后期测序结果; DNA 保存方法组的比较, 是在获得电泳图之后, 用 ImageJ 软件对电泳图中目的条带的亮度进行定量分析, 用“灰度值”表示定量分析的结果, PCR 条带的亮度或者灰度值可用于间接反映 DNA 保存的质量 (宋锋等, 2010)。

PCR 引物: 正向 2TA(5' CACATCAGCTCGAGT GAG3'), 反向 L1F(5' ACTCTCTCTTTCCTCC3')。反应体系: 25 μ L (2 \times PCR Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 的正反向引物各 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 9.5 μ L)。反应

条件: 95°C 预变性 60s; 94°C 变性 30s、52°C 退火 30s、72°C 延伸 90s, 共 34 个循环; 72°C 延伸 3min。

1.5 数据统计分析

对电泳条带的亮度量化后, 用 SPSS19.0 软件包中有关的方差分析做数据统计分析, 采用 LSD 检验。比较 *Ammonia* DNA 的保存效果在不同处理方法、不同保存时间组之间的差异。

2 结果与结论

2.1 DNA 提取方法比较

由图 1 可以看出, 经 DOC 裂解液法和 Guanidine 裂解液法提取到的 DNA, 在 PCR 扩增之后都能得到整齐、单一、明亮的、与目标条带大小一致的条带, 且后续测序结果证实是目标条带。证明这两种方法所提取的 *Ammonia* 属有孔虫 DNA 的浓度和纯度都能满足后续 PCR 的需求。但是 DOC 裂解液法比 Guanidine 法操作更简单, 试剂更便宜, 所以前者更适合 *Ammonia* 属有孔虫 DNA 的提取。

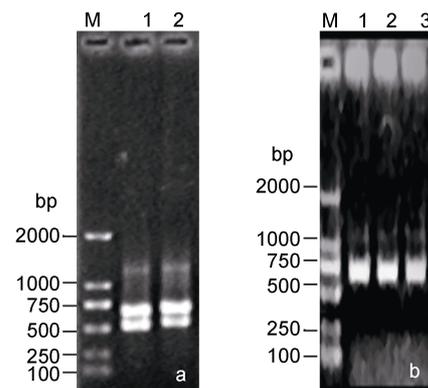


图 1 两种 DNA 提取方法的 PCR 扩增电泳图谱

Fig.1 Gel electrophoreses of PCR products obtained from two methods of DNA extraction
图 a1、2 为 DOC 法, 长带为目标条带; 图 b1、2、3 为 Guanidine 法; M: DNA molecular maker

2.2 DNA 保存方法比较

2.2.1 烘干保存法 经 ImageJ 软件分析各组的 PCR 条带所得灰度值见表 1。用 SPSS19.0 做单因素方差分析, 采用 LSD 检验。结果显示 20°C 组和 30°C 显著高于 40°C 组 ($P < 0.05$), 从均值图看 20°C 组结果最好, 但未与 30°C 组产生显著差异 (图 2)。综合考虑实验的简便性和保存结果的优异性, 建议 20°C 为最佳烘干温度。另外, 比较第 0、1、2 周的结果发现, 三组间没有显著差异 ($P > 0.05$), 表明烘干后立即提取 DNA 和保存一段时间之后提取的结果无显著差异。

表 1 烘干保存各实验组 PCR 条带的灰度值
Tab.1 The gray value of PCR products amplified from samples preserved in air-dry method

烘干温度	灰度值										
	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周
20°C	8722.36	7215.77	10750.31	6194.18	10696.48	7706.23	9268.13	14646.64	459.99	604.08	8227.96
30°C	10961.77	8792.77	8415.60	10119.48	10566.06	6875.23	7975.36	12058.30	1520.74	391.53	3055.71
40°C	505.11	7674.48	1684.21	2686.84	10165.06	8041.53	3606.48	3192.81	1176.55	6748.31	1703.02
50°C	7408.18	7951.06	9905.89	10123.31	7137.01	6131.60	6945.06	8082.61	6631.91	1330.82	2327.60
60°C	7464.31	10360.43	2478.26	7579.77	3200.77	7352.48	7300.36	13941.18	11268.00	2730.06	2853.38
70°C	7124.18	11933.89	361.77	7803.89	400.65	8305.41	9074.77	7750.23	7261.37	3475.77	7382.55
80°C	310.48	10008.13	6323.77	6030.36	8531.77	4415.48	8514.77	1156.72	3489.92	1435.01	8407.08
90°C	2569.36	9597.31	6125.65	6768.48	4274.89	3997.41	7277.18	1406.08	6343.28	3404.60	6107.38
100°C	1000.89	9100.84	1840.23	7436.48	7102.18	7753.77	9269.18	14679.86	5302.58	8171.53	8124.59
110°C	7936.77	9790.50	871.16	9234.89	10871.31	6497.06	8409.13	3189.57	4944.66	3944.72	11199.76
120°C	3991.31	1400.06	274.36	9219.31	6808.08	7292.94	4688.55	14098.03	8141.54	5967.06	2290.94

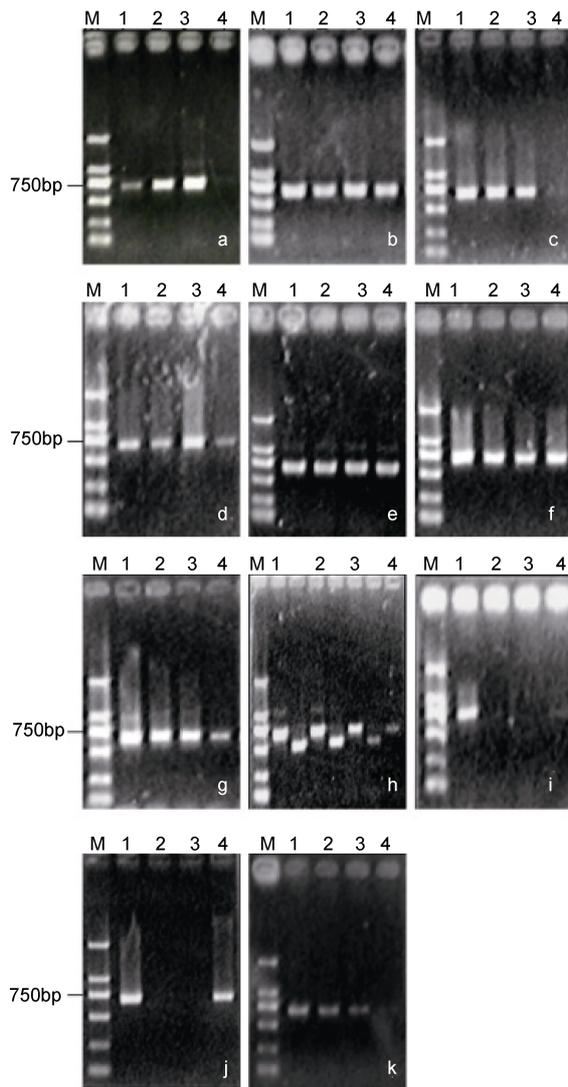


图 2 烘干保存法的 PCR 扩增电泳图谱

Fig.2 Gel electrophoreses of PCR products preserved in air-dry method

图 a—k 分别为第 0—10 周; M: DNA molecular maker; 1 为阳性对照; 2—4 分别为 20、30、40°C 组

到第 10 周灰度值有显著下降($P < 0.05$), 说明保存时间超过 10 周样品 DNA 可能会有显著降解。

2.2.2 冷冻保存法 各组的 PCR 条带灰度值见表 2(以均值表示)。用 SPSS19.0 作 3 因素单变量方差分析, 不同时间组采用 LSD 检验。结果显示 -80°C 组均值高于 -20°C 组, 但未达到统计上的显著水平($P > 0.05$)。无水组结果显著好于有水组($P < 0.05$)。不同保存时间之间没有显著差异, 直到第 8 周, 各组依然有较好的结果(图 3)。因此, 采用 -20°C 或 -80°C 无水条件对 *Ammonia* 属有孔虫进行冷冻处理, 至少 8 周以内其 DNA 都有较好的保存效果。

2.2.3 裂解液保存法 各组的 PCR 条带灰度值见表 2(以均值表示)。统计分析方法与“冷冻保存组”相同。均值比较结果显示 4°C 组效果比室温和 -20°C 组好, 含 EDTA 组比不含 EDTA 组效果好, 但都没有达到统计上的显著水平($P > 0.05$)。不同保存时间之间没有显著差异, 直到第 8 周, 各处理组依然有较好的结果(图 4)。因此, 若采用 DOC 裂解液保存 *Ammonia* 属有孔虫的 DNA, 建议选择 4°C 含 EDTA 的裂解液, 至少 8 周以内对 DNA 都有较好的保存效果。

2.2.4 三种方法总体比较 分别选取烘干法、冷冻法和裂解液法中保存效果最好的组, 比较它们之间的差异。烘干法选取 20°C , 1—8 周组; 冷冻法选取 -80°C 无水, 1—8 周组; 裂解液法选取 4°C 含 EDTA, 1—8 周组。结果显示组间有显著差异: 冷冻法优于烘干法, 烘干法优于裂解液法($P < 0.05$)。因此, 最适合钙质玻璃壳底栖有孔虫的 DNA 保存方法为 -80°C 无水条件下冷冻; 若 -80°C 冷冻条件不可得, 可用 -20°C 冷冻代替, 但对样品的有效保存时间可能不如 -80°C 条件下长。

表 2 冷冻保存及裂解液保存各实验组 PCR 条带的灰度值
Tab.2 The gray value of PCR products amplified from samples preserved in freezing and lysis buffer method

保存温度	是否含水或 EDTA	灰度值							
		1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周
-20°C	有水	7218.38	11138.79	4589.06	3959.82	3453.85	11466.00	9761.12	11605.06
	无水	12472.94	8121.99	10689.38	13652.52	8361.29	11227.83	13160.89	6342.59
-80°C	有水	10105.47	12540.71	4958.68	11165.19	7730.23	10000.73	11657.47	5670.83
	无水	14939.51	6883.08	12424.96	13779.38	9237.97	11683.46	11736.07	8793.17
室温	含	827.48	935.88	6089.00	5910.54	5239.21	436.07	3285.16	6054.63
	不含	4753.62	1048.18	2214.69	409.54	234.19	343.54	2688.41	9463.50
4°C	含	6377.43	11689.29	5864.43	5173.39	4357.78	6652.73	6190.98	3283.45
	不含	3476.33	8009.09	7305.46	503.96	406.29	504.31	266.96	251.19
-20°C	含	1828.63	1620.78	3354.20	4078.32	3171.03	5776.95	502.03	2452.11
	不含	3681.19	8526.68	925.36	4183.92	2209.59	657.23	13441.25	193.17

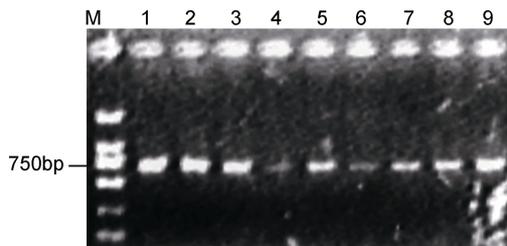


图 3 冷冻保存 8 周的 PCR 扩增电泳图谱

Fig.3 Gel electrophoreses of PCR products preserved in freezing method for 8 weeks

M: DNA molecular maker; 1: 阳性对照; 2、3: -20°C 有水; 4、5: -20°C 无水; 6、7: -80°C 有水; 8、9: -80°C 无水

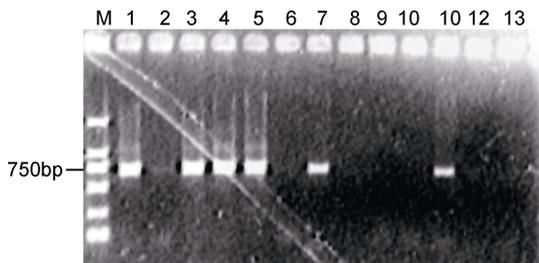


图 4 裂解液保存 8 周的 PCR 扩增电泳图谱

Fig.4 Gel electrophoreses of PCR products preserved in lysis buffer for 8 weeks

M: DNA molecular maker; 1: 阳性对照; 2、3: 室温含 EDTA; 4、5: 室温不含 EDTA; 6、7: 4°C 含 EDTA; 8、9: 4°C 不含 EDTA; 10、11: -20°C 含 EDTA; 12、13: -20°C 不含 EDTA

3 讨论

玻璃质类底栖有孔虫是我国近海最常见的优势有孔虫类群之一, 在潮间带该类群可占整体有孔虫群落的 30%—70%, 其群落结构有重要的生态指示意义(Murry, 1991; 李保华等, 2008; 李小艳等, 2010)。对有孔虫准确的分类鉴定是研究其群落结构的前提; 尤其是对 *Ammonia* 属为代表的玻璃质有孔虫, 形态

鉴定较为混乱(类彦立等, 2015), 分子鉴定手段的应用对弥补传统形态学分类的不足具有重要作用(Pawlowski *et al.*, 1994b, 1995)。然而国内在现生有孔虫分子生物学方面的研究还几乎处于空白期。工作的一大难点在于分子技术的应用, 例如 DNA 提取方面, 由于经常有微生物与有孔虫共生等原因导致很难获得纯的有孔虫 DNA(Holzmann *et al.*, 1996; Pawlowski, 2000)。加之作为单细胞原生动物, 有孔虫 DNA 拷贝量比起其他多细胞动物要小得多, 使用单个样本提取出满足 PCR 要求的基因组 DNA 困难较大; 而对多样本提取 DNA 时很难保证所有样本是同一个种, 尤其对于像 *Ammonia* 这样的形态鉴定疑难类群。研究中常常需要在对样品提取 DNA 的同时, 借助 SEM 等技术进行形态鉴定。因此, 干燥之后的样品还能稳定提取 DNA, 并且满足后续 PCR 扩增, 对于有孔虫分子生物学研究非常重要。另外, 某些有孔虫类群的 rRNA 基因有高度的细胞内变异, 给 DNA 测序工作带来了一定的困难(Pawlowski, 2000)。

对有孔虫 DNA 进行有效保存是进行后续分子鉴定的前提。Holzmann 等(1996)对 *Ammonia* 的 DNA 保存方法进行了一些研究, 但除了 30°C 干燥保存外, 其余方法所探索的保存时间都不超过 5 周。国内未见有专门研究有孔虫 DNA 保存方法的报道。本研究进行了更多的保存方法以及更长的保存周期(8 至 10 周)的实验探索, 各种方法各有优缺点, 以期满足不同保存时间以及不同条件下(如野外或实验室等)的需求。

有孔虫基因结构的一些独特之处, 例如 SSU rRNA 和 LSU rRNA 基因序列不仅拥有不同寻常的长度, 而且存在很大的种内变异(Pawlowski, 2000), 使

得一些种类的核糖体基因很难成功扩增。另外个体大小、虫体活性、有壳等因素都限制了有孔虫 DNA 提取的成功率。因此, 即使是对新鲜样品直接提取 DNA, 也不一定能够成功进行 PCR 扩增。这也可能是导致相同实验条件下结果相差很大的原因(例如图 3 中 4、5 号条带以及图 4 中 2、3 号条带)。

由于本实验中使用了 2TA-L1F 和 2TA-L7 两对引物进行巢式 PCR 扩增(Schweizer *et al.*, 2011), DOC 裂解液法提取 DNA 后 PCR 结果出现双带(如图 1a 中 1、2 号条带所示)。有研究显示 *Ammonia* 属 LSU rRNA 基因的扩增可能不需要巢式 PCR(Holzmann *et al.*, 1996)。本研究通过对扩增出的双带进行测序, 表明它们分别是引物 2TA-L1F 及 2TA-L7 扩增的产物, 从而证实 *Ammonia* 属 LSU rRNA 基因的扩增不需要巢式 PCR。

有报道指出 EDTA 对有孔虫的壳有破坏作用(Seears *et al.*, 2014)。在本实验过程中, 每次提 DNA 之前均对样品镜检, 发现用含 EDTA 裂解液保存的 *Ammonia* 样品的壳溶解程度比不含 EDTA 组的更严重; 在室温和 4°C 保存的 *Ammonia* 样品的壳溶解程度比-20°C 组的更严重。推测随着壳的逐渐溶解, 原本由壳保护着的核物质可能会受到某种影响。为了探索这种影响对 *Ammonia* DNA 保存效果造成的差异, 本实验分别检验了含与不含 EDTA 的裂解液对于 *Ammonia* DNA 的保存效果, 前者效果普遍比后者好。

综上所述, 本研究以玻璃质壳类底栖有孔虫的代表类群 *Ammonia* spp. 为材料, 比较了 3 种 DNA 保存方法(烘干、冷冻、DOC 裂解液)以及 2 种 DNA 提取方法(DOC 裂解液法、Guanidine 裂解液法)。实验结果表明: (1) 烘干保存法中 20°C 为最佳烘干温度, 保存时间超过 10 周样品 DNA 可能会有显著降解; 冷冻保存法中-20°C 和-80°C 冷冻保存直至第 8 周样品 DNA 依然较完好; DOC 裂解液保存法中样品用含 EDTA 的裂解液在 4°C 保存效果较好, 至少可以保存 8 周。(2) 从对有孔虫 DNA 保存效果来看, -80°C 无水条件下冷冻效果最佳; 烘干保存法使得有孔虫形态鉴定与分子鉴定可以更好地结合; 裂解液法保存则可以很方便地直接进行后续 DNA 提取实验, 较适合短期保存。3 种保存方法各有优缺点, 可根据不同实验需求进行选择。(3) DOC 裂解液法和 Guanidine 裂解液法对玻璃质类有孔虫 DNA 提取效果都很好, 但前者更经济且操作简便。

4 结论

玻璃质壳类底栖有孔虫 DNA 保存和提取优化方案如下:

DNA 保存:

保存法 1——烘干法:

A. 设备器皿准备:

干燥箱、1.5mL 无菌离心管。

B. 操作步骤:

- (1) 取单只实验样品, 于无菌过滤海水中洗净;
- (2) 虫体置于 1.5mL 无菌离心管中, 于 20—30°C 干燥 30min;
- (3) 在提取 DNA 之前于室温、密封保存。

保存法 2——冷冻法:

A. 设备器皿准备:

-20°C 冰箱、-80°C 超低温冰箱、1.5mL 无菌离心管。

B. 操作步骤:

- (1) 取单只实验样品, 于无菌过滤海水中洗净;
- (2) 虫体置于 1.5mL 无菌离心管中, 密封;
- (3) 在提取 DNA 之前于-20°C 或-80°C 冷冻保存。

保存法 3——裂解液法:

A. 设备和试剂准备:

- (1) 设备器皿: 4°C 冷藏箱、1.5mL 无菌离心管;
- (2) 试剂: DOC 裂解液(Pawlowski, 2000)。

组分:

TRIS 1mol/L pH 8.5	100μL
EDTA 0.5mol/L (pH 8.0)	8μL
DOC (Na deoxycholate) 10%	100μL
TX-100 10%	20μL
H ₂ O	780μL

B. 操作步骤:

- (1) 取单只实验样品, 于无菌过滤海水中洗净;
- (2) 虫体置于 1.5mL 无菌离心管中, 加入含 4mmol/L EDTA 的 DOC 裂解液;
- (3) 在提取 DNA 之前于 4°C 保存。

DNA 提取:

A. 设备和试剂准备:

(1) 设备器皿: 水浴锅、高速离心机、1.5mL 无菌离心管;

(2) 试剂: DOC 裂解液, 组分同“保存法 3”。

B. 操作步骤:

- (1) 取单只实验样品, 于无菌过滤海水中洗净;
- (2) 虫体置于 1.5mL 无菌离心管中, 加入 50μL

DOC 裂解液;

(3) 将虫体彻底研磨碎, 于 60°C 水浴孵化 1h;

(4) 10000r/min 离心 5min, 去除不溶物;

(5) 上清液中即为提取的基因组 DNA, 于-20°C 保存。

致谢 感谢同济大学海洋与地球科学学院的翦知潜教授给予类彦立在有孔虫研究中的无私建议和指导, 另外中国科学院南京地质与古生物研究所李保华研究员曾共同探讨, 感谢 Paul Brönniman Foundation 2015 基金以及 Prof. Dr. Jan W. Pawlowski (University of Geneva, Switzerland) 给予方法学讨论, 中国科学院海洋研究所实验员王雪皎、郑萌萌、曹丽娜协助工作。谨致谢忱。

参 考 文 献

- 成鑫荣, 1987. 长江口表层沉积物中活有孔虫分布的初步研究. 海洋地质与第四纪地质, 7(1): 73—79
- 李小艳, 石学法, 程振波等, 2010. 渤海莱州湾表层沉积物中底栖有孔虫分布特征及其环境意义. 微体古生物学报, 27(1): 38—44
- 李保华, Ertan K T, Hemleben C, 2005. 有孔虫分子生物学研究进展. 自然科学进展, 15(5): 534—538
- 李保华, 王晓燕, 龙江平, 2008. 海南岛近岸沉积物中的有孔虫特征与分布. 微体古生物学报, 25(3): 225—234
- 李保华, 李铁刚, Ertan K T 等, 2007. 西北太平洋浮游有孔虫的 SSU rDNA 序列及其古海洋学意义. 自然科学进展, 17(3): 391—395
- 汪品先, 章纪军, 闵秋宝, 1980. 东海表层沉积物中有孔虫的分布. 见: 海洋微体古生物论文集. 北京: 海洋出版社, 20—38
- 汪品先, 章纪军, 赵泉鸿等, 1988. 东海底质中的有孔虫和介形虫. 北京: 海洋出版社. 1—307
- 宋 锋, 孙 敏, 罗克明, 2010. 一种基于 PCR 技术鉴定单拷贝转基因烟草的方法. 中国生物工程杂志, 30(4): 83—88
- 赵泉鸿, 翦知潜, 张在秀等, 2009. 东海陆架泥质沉积区全新世有孔虫和介形虫及其古环境应用. 微体古生物学报, 26(2): 117—128
- 郝诒纯, 裘松余, 林甲兴等, 1980. 有孔虫. 北京: 科学出版社, 1—224
- 类彦立, 李铁刚, 2015. 奥茅卷转虫 *Ammonia aomoriensis* (Asano, 1951) 与毕克卷转虫 *Ammonia beccarii* (Linnaeus, 1758) (有孔虫) 的分类学以及在黄东海分布的温盐深特征比较研究. 微体古生物学报, 32(1): 1—19
- 徐美香, 赵泉鸿, 肖 湘, 2004. 南海沉积物中有孔虫分子生物学鉴定的初步研究. 台湾海峡, 23(3): 354—359
- Boucheta V M P, Alvea E, Rygg B *et al*, 2012. Benthic foraminifera provide a promising tool for ecological quality assessment of marine waters. Ecological Indicators, 23: 66—75
- Eichler P P B, Eichler B B, Gupta B S *et al*, 2012. Foraminifera as indicators of marine pollutant contamination on the inner continental shelf of southern Brazil. Marine Pollution Bulletin, 64(1): 22—30
- Hayward B W, Holzmann M, Grenfell H R *et al*, 2004. Morphological distinction of molecular types in *Ammonia*-towards a taxonomic revision of the world's most commonly misidentified foraminifera. Marine Micropaleontology, 50(3—4): 237—271
- Holzmann M, Pawlowski J, 1996. Preservation of foraminifera for DNA extraction and PCR amplification. Journal of Foraminiferal Research, 26(3): 264—267
- Holzmann M, Pawlowski J, 2000. Taxonomic relationships in the genus *Ammonia* (Foraminifera) based on ribosomal DNA sequences. Journal of Micropaleontology, 19(1): 85—95
- Langer M R, Lipps J H, Piller W E, 1993. Molecular paleobiology of protists: Amplification and direct sequencing of foraminiferal DNA. Micropaleontology, 39(1): 63—68
- Murry J W, 1991. Ecology and Palaeoecology of Benthic Foraminifera. New York: John Wiley and Sons Inc., 397
- Pawlowski J, 2000. Introduction to the molecular systematics of foraminifera. Micropaleontology, 46(S1): 1—12
- Pawlowski J, Bolivar I, Fahrni J *et al*, 1994b. Taxonomic identification of foraminifera using ribosomal DNA sequences. Micropaleontology, 40(4): 373—377
- Pawlowski J, Bolivar I, Fahrni J *et al*, 1995. DNA analysis of "*Ammonia beccarii*" morphotypes: one or more species?. Marine Micropaleontology, 26(1—4): 171—178
- Pawlowski J, Bolivar I, Guiard-Maffia J *et al*, 1994a. Phylogenetic Position of foraminifera inferred from LSU rRNA gene sequences. Molecular Biology and Evolution, 11(6): 929—938
- Pawlowski J, Holzmann M, 2014. A plea for DNA barcoding of foraminifera. The Journal of Foraminiferal Research, 44(1): 62—67
- Pawlowski J, Holzmann M, Tyszka J, 2013. New supraordinal classification of Foraminifera: molecules meet morphology. Marine Micropaleontology, 100: 1—10
- Pawlowski J, Lecroq B, 2010. Short rDNA barcodes for species identification in foraminifera. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 57(2): 197—205
- Schweizer M, Pawlowski J, Duijnste I A P *et al*, 2005. Molecular phylogeny of the foraminiferal genus *Uvigerina* based on ribosomal DNA sequences. Marine Micropaleontology, 57(3—4): 51—67
- Schweizer M, Polovodova I, Nikulina A *et al*, 2011. Molecular identification of *Ammonia* and *Elphidium* species (Foraminifera, Rotaliida) from the Kiel Fjord (SW Baltic Sea) with rDNA sequences. Helgoland Marine Research, 65(1): 1—10
- Seears H A, Wade C M, 2014. Extracting DNA from within intact foraminiferal shells. Marine Micropaleontology, 109: 46—53
- Sen Gupta B K, 1999. Modern Foraminifera. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1—371

EFFICIENCY OF DNA PRESERVATION AND EXTRACTION FROM BENTHIC HYALINE FORAMINIFERA OF *AMMONIA* SPP.: A METHODOLOGICAL COMPARISON

LYU Man^{1, 3}, LEI Yan-Li¹, LI Tie-Gang^{1, 2}

(1. Department of Marine Organism Taxonomy & Phylogeny, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Key Laboratory of Marine Sedimentology and Environmental Geology, First Institute of Oceanography, SOA, Laboratory for Marine Geology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266061, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract In order to establish efficient methods for extracting and preserving DNA from hyaline benthic foraminifera *Ammonia* spp., two experimental series of DNA preservation were set up including (1) air-dried (at 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, and 120°C) vs frozen (-20 and -80°C, with or without seawater); (2) DOC lysis buffer with vs. without EDTA. In addition, two extraction methods for DNA (DOC lysis buffer and Guanidine lysis buffer) were compared. The results show that the DNA was better preserved under the condition of air-dried under 20°C and 30°C than 40°C ($P < 0.05$); frozen without seawater group was better than with seawater group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the DOC lysis buffer with or without EDTA treatment ($P > 0.05$). However, the optimized condition was obtained in the treatment with frozen samples. Therefore, the two DNA extraction methods are both effective, but DOC lysis method is more economic and convenient. In the last, optimal DNA-preservation and -extraction protocols are summarized.

Key words hyaline; benthic foraminifera; molecular biology; *Ammonia*; genomic DNA extraction; preservation