

胶州湾浮游桡足类 18S 核糖体 RNA 基因 (18S rDNA) 扩增及序列变异初步研究*

门荣新 杨官品¹⁾ 刘永健 管晓菁

(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

提要 采用 PCR 扩增、文库构建、限制性片段长度多态性分析、序列分析和系统学分析等方法,初步研究了夏季胶州湾上层海水浮游桡足类核糖体小亚基 RNA 基因(18S rDNA)约 1.5kb 片段的序列变异。从浮游生物混合 DNA 中选择性扩增桡足类 18S rDNA,建立桡足类 18S rDNA 变异类型文库,并从文库中随机挑选的 30 个克隆进行分析。结果表明, *Vsp I* 限制性内切酶能将这些克隆分成频率分别为 0.17、0.23 和 0.6 的 3 种操作分类单元(OTUs),遗传多样性指数达到 0.95。3 条 OTU 代表克隆序列与甲壳纲桡足亚纲核苷酸差异数在 75.4—97.8 之间,而与其他亚纲的差异都高于 100。3 条 OTU 代表克隆序列均属于桡足亚纲,其中,AY437861 和 AY437862 属于哲水蚤目。3 条 OTU 代表克隆序列可分为 2 个高变异区和 3 个相对保守区,其 GC% 分别为 47.37%、48.16% 和 48.57%。研究结果表明,混合 DNA 提取方法简单,设计的引物可选择性地扩增浮游桡足类 18S rDNA,根据 18S rDNA 序列变异描述浮游桡足类多样性是可行的。研究结果也为在浮游桡足类分类中引入 18S rDNA 序列奠定了基础。

关键词 18S 核糖体 RNA 基因,桡足类,序列变异

中图分类号 Q178.51

浮游动物是海洋生态系统物质循环和能量传递的重要环节。无论是种类还是数量,桡足类都是浮游动物的主要组成部分之一,在河口、海湾、寒冷、暖温带海域都有分布。桡足类是甲壳纲的亚纲之一,主要包括哲水蚤目、剑水蚤目和猛水蚤目。与细菌、浮游植物以及经济贝类、鱼类等相比(刘亚军等, 2002; 权洁霞等, 1999),海洋浮游动物分子遗传多样性研究很少,目前的研究主要集中在桡足类少数种线粒体基因变异的分析(Bucklin *et al.*, 1996, 1999, 2000; Burton *et al.*, 1994)。

DNA 序列差异是生物体间最本质的差别。根据某类生物共有基因的序列变异描述遗传多样性,因数据以文字形式记载,可方便地比较和整合,也能克服研究经验的限制。另外,在获取特定

海域足够的序列数据后,还能建立基于 DNA 序列差异的群落结构快速分子生物学剖分方法,以便在 DNA 层次分析桡足类多样性及其与环境的相关性。作者设计了桡足类特异引物,选择性扩增了胶州湾上层海水桡足类 18S 核糖体小亚基 RNA 基因,并对该基因序列变异进行了初步分析。本文是报道有关分析结果。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2003 年 8 月,用小型浮游生物网(网径为 200 μ m)采集胶州湾初级生产力观测站 1 和 2[见刘瑞玉(1992),本研究取样点未精确定位]附近的浮游生物,静置 30min 后,倾去上层水,用预冷消毒海水清洗,经 50 μ m 网径分样筛过滤收集浮游生物并转移到少量海水中,4 $^{\circ}$ C 静置 2h。取 5ml 离

* 国家自然科学基金资助项目,40176028 号。门荣新,硕士, E-mail: rxmen023@hotmail.com

1) 通讯作者,杨官品,博士,教授,博士生导师, E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn

收稿日期: 2003-10-21, 收修改稿日期: 2004-01-08

心收集浮游生物, 加少量灭菌蒸馏水悬浮, 再低速离心收集, 重复一次。将收集物悬浮在 190 μ l 蒸馏水中, -84°C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

用碱煮法提取基因组 DNA。在 -84°C 室温冻融两次, 加 12 μ l 5mol/L NaOH, 混匀后于 25°C 水浴放置过夜 ($\geq 8\text{h}$)。 99°C 处理 7min (干浴或 PCR 仪上) 后冷却至室温, 依次加入 40 μ l 1mol/L HCl, 100 μ l 0.5mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 50 μ l 2% (V/V) Triton X-100 混匀, 再在 99°C 处理 7min, 置冰上迅速冷却。取 10 μ l 与 λ DNA/EcoR I 分子量标记一起在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 检测 DNA 提取效果。所提取的 DNA 为单链分子, pH = 8-9, 可直接用于 PCR 扩增。

1.2.2 18S rRNA 基因 PCR 扩增

提取的 DNA 为浮游生物混合 DNA。为了选择性地扩增桡足类 18S rRNA 基因, 作者根据有限的数据库序列设计了多对能扩增桡足类 18S rRNA 基因的 PCR 特异引物。其中, 界定序列最长的引物对是 247F: 5'-TCA ACT GTC GAC TGT GGG 3' 和 1701R: 5'-TTA CTT CCF CTA AAC GCF 3' (引物位置按 *Tigriopus californicus* 序列计算, GenBank 序列号为 AF363306)。扩增片段长度大约为 1.5kb。将提取的 DNA 稀释 20 倍, 取 2 μ l 作模板。PCR 扩增反应体系为 25 μ l, 包含 0.2 μ mol/L 引物 (每种), 2 μ l 模板 DNA, 0.2mmol/L dNTP (每种), 3.0mmol/L MgCl₂, 1U *Taq* DNA 聚合酶和 1 倍反应缓冲液。PCR 循环条件为 95°C , 预变性 4min, 接 94°C 1min, 54°C 1.5min, 72°C 1.5min 30 个循环, 并于 72°C 延伸 10min。收集 10 管 PCR 产物, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收扩增产物, 溶于 20 μ l T.E 缓冲液, -20°C 保存。取一定体积的 DNA 与定量 100bp 梯度分子量标记一起电泳, 根据亮度估计浓度。

1.2.3 文库构建与测序

固定 PMD18-T 载体 (大连宝生物) 为 50ng, 调整 PCR 产物量, 使其与载体摩尔比分别为 5: 1 和 10: 1, 16°C 连接 12h 以上, 转化感受态 *E. coli* JM109, 获得海水 18S 核糖体 RNA 基因片段不同变异类型文库。经蓝白菌落筛选和 PCR 再扩增鉴定重组子。随机选择 30 个重组子, 扩增插入片段, 用 *V_φ* I 酶切确定 RFLP (或者 OTU) 类型。每类型选择一个克隆进行序列测定。分别用两个扩增引物和 5'-AGG TGG TTG ATT CTT GCG 3' 进行测序反应, 拼接获

得 3 条约 1.35kb 长的序列。这些序列已提交 GenBank, 收录号分别为 AY437861、AY437862 和 AY437863。

1.2.4 序列分析与系统树重建

修剪原始序列, 并与甲壳纲接近全长的 18S 核糖体 RNA 基因序列一起, 用 DAMBE 软件 (<http://aix1.uottawa.ca/>) 进行多序列对位分析 (multiple alignment), 用 Mega2 软件 (<http://www.megasoftware.net/>) 构建系统树, 计算核苷酸序列多样性和核苷酸差异数。采用邻接 (neighbor-joining) 法和最大约简 (maximum parsimony) 法构建系统树, 重复 500 次计算靴带 (bootstrap) 值, 选择线虫 (*Caenorhabditis elegans*, GenBank 序列号 X03680) 18S 核糖体 RNA 基因序列作外族群 (outgroup)。根据 OTU 覆盖克隆频率用香农氏多样性指数 (Shannon's diversity index) $H = -\sum f_i \times \ln f_i$ 计算浮游桡足类遗传多样性, f_i 为某 OTU 覆盖克隆数占总数的百分比。

2 结果与分析

2.1 DNA 分离和 PCR 扩增反应条件

小型动物总 DNA 提取可采用蛋白酶 K 法 (Schizas *et al.*, 1997) 或使用试剂盒 (董云伟等, 2002)。本研究需要分离的是混合样 DNA。为使 DNA 分离方法更简单易行, 作者借鉴了提取单只线虫 DNA 的碱煮法。该方法已成功应用于环境水样细菌、真菌等生物的 DNA 提取 (杨官品等, 2000; Wang *et al.*, 1996; Redecker *et al.*, 1997)。提取的 DNA 为单链, 不容易判断分子长短。但是, 根据判断 cDNA 合成质量的经验, 作者认为提取的 DNA 有很宽的长度分布范围 (图 1)。另外, 后续研究证明提取的 DNA 可以不经过任何纯化步骤, 直接用于 PCR 扩增反应。

为成功扩增需要的基因, 从镁离子浓度、模板 DNA 用量、复性温度等三方面优化了 PCR 反应条件 (图 2)。研究表明, 最佳镁离子浓度为 3mmol/L, 最佳模板用量为 2 μ l, 提取 DNA 20 倍稀释物, 最佳复性温度为 54°C 。

2.2 文库构建

每 50ng 载体可获得约 300 个白色菌落。进一步用特异引物进行 PCR 筛选, 发现含完整插入片段的重组子在 85% 以上, 共获得约 500 个重组子。同一个基因序列变异较小, PCR 过程、克隆过程和重组子选择都是随机的, 因此, 作者认为文库能反映群落中基因的实际组成。需要特别指出的

是,在 DNA 层进行分析,计数单位不是个体,而是基因拷贝数。

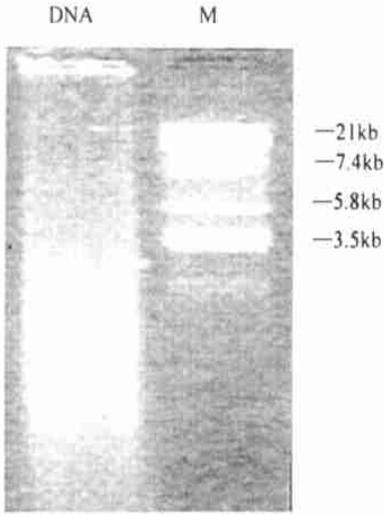


图 1 用碱煮法分离的胶州湾浮游生物混合 DNA
Fig. 1 Mixed genomic DNA of Jiaozhou Bay seawater plankton isolated using alkaline boiling method
M 为 λ DNA/*EcoR* I 分子量标记

RFLP) 类型,或称操作分类单元(operational taxonomy unit, OTU), 3 种 OTU 频率分别为 0.17、0.6 和 0.23, 由此计算的遗传多样性指数 H 为 0.95。

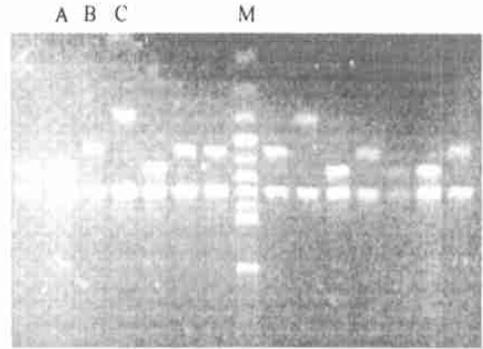


图 3 克隆片段经 *Vsp* I 酶切的 RFLP 类型
Fig. 3 *Vsp* I RFLP types of 18S rDNA clones
M 为分子量标记, A、B、C 为 3 种 OTU 类型

2.3 18S 核糖体 RNA 基因变异

从每种 OTU 覆盖的克隆中各选择一个进行序列测定, 获得 3 条 OTU 代表序列。这 3 条序列两两之间的核苷酸差异数范围为 60—121, 占序列全长的 4.8%—9.9%, 平均为 7.5%。将这 3 条序列分别与甲壳纲的不同亚纲进行比较, 发现这 3 条序列与桡足亚纲核苷酸平均差异数分别为 96.6、75.4 和 97.8, 没有超过 100, 而其他亚纲核苷酸差异数都在 100 以上, 最高达到 214.7 个。同时, 任意两亚纲之间核苷酸差异数都在 100 以上, 说明作者分离的序列与桡足亚纲最接近(表 1)。

对桡足亚纲的 18S 核糖体 RNA 基因各核苷酸含量统计表明, 它们的 GC% 含量在 47.57%—51.70% 之间, *Neocalanus* 和 *Calanus* 属内 GC% 含量差异小于 1%。本实验所获得的 3 条序列的 GC% 含量分别为 47.37%、48.16%、48.57%, 与现有桡足亚纲的 18S 核糖体 RNA 基因核苷酸含量一致。

以 *Neocalanus plumchrus* 18S 核糖体 RNA 基因序列为参照, 对桡足亚纲 18S 核糖体 RNA 基因序列进行对位分析, 可以发现核苷酸变异位点及具体的核苷酸类型的一些特点。从图 4 可以发现, 哲水蚤目序列相似性非常高, 核苷酸变异位点少, 而桡足亚纲其他目的序列变异大, 与哲水蚤目差异非常明显。本研究获得的 3 条序列中, 有两条与哲水蚤目序列相似, 有一条与其他目的序列相似。这与核苷酸差异数分析结果是一致的。

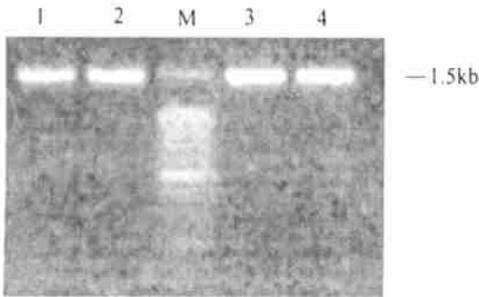


图 2 不同镁离子浓度下 PCR 扩增产物
Fig. 2 PCR products amplified in the mixtures containing different concentrations of Mg^{2+}
M: 100bp 梯度 DNA 长度标记; 1、2、3、4 分别为在 PCR 体系中 Mg^{2+} 浓度为 1、2、3、4mmol/L 时的扩增情况。PCR 产物长度约为 1.5kb

如果分析的序列数恰当, 序列变异类型的组成应能反映群落组成。在对浮游桡足类群落组成未知的情况下, 很难确定用多少个克隆能在给定概率水平上覆盖 18S 核糖体 RNA 基因的变异类型。作为初步研究, 作者随机选择了 30 个克隆做序列变异分析。将这些克隆所含的插入片段再用 PCR 扩增出来, 用限制性内切酶 *Vsp* I 酶切(图 3), 发现存在 3 种不同的限制性酶切片长度多态性(restriction fragment length polymorphism,

	11111111	1111111111	1111222222	2222222222	2222222222	2333333333	3333333333
	335567899	9991222224	4444557777	7788133444	5677888888	8888999999	9000000011
	9793814701	3788345673	4567090235	6746789368	6069012345	6789012345	6034578901
Nplum	CTAAAACAAC	GGTATCCAGC	TGGACTACGC	CCTCCGAAA	TTGTCTCGGC	AGTCTGAGGG	CTGTCTGCTA
Ncris							
Nflem			T.				
Cfinm	T	A.				G. A.	C.
Cpaci	T	A.				G. A.	
AY437861		AG.	CT. T.		AA.	C. TGAA.	AA. TG.
AY437862	T	A. G.				G. A.	
AY437863	.GGT. TCGT	.AC. A. C.	G. T. . T. TT	AAAAT.	C.	GAGTA. G.A. TGCT.
Lsalm	.GGT. G. GT	.A-. AG. C.	G. TT. . T. TT	AAAA.	CC. . T.	GAGTAAC. A. G.	CTGTT. G. A. G.
Tcali	.GGT. G. CGT	AAC. A. C.	G. T.	TT AA. C.	T C. TC.	G. GT. . GT. T	.C. AATT. G
Eserr	.GGT. . CG.	A. C. . A. CAT	G. T. . CT. TT	AAAC. TT. A. CT. TG. A. G.	CCATATT. G
Cplum	.GGTC. . CGT	.AC. . A. C.	G. T. . . T. TT	AAAA.	G. C.CC. CTCT. C	.CGC. GTAAG
AF530545	TGGT. . . CGT	.AC. . A. C.	G. T. . . T. TT	AAAA.	T. C.	G. GTA. G.C. TAT. . G
	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333444	4444444444	4444444455
	2233333333	3444444445	5555555566	7777788888	8889999122	2333333444	5667889900
	8901235678	9023457891	2345678967	0123512345	6780124223	4234569289	1675024902
	4690816901						
Nplum	AGACT-TAGT	---TTTCCAA	GGTTTTAGTC	AATCACTGGG	ATGTGGATCA	ATATT-CCAT	CAGATTGCCA
Ncris							
Nflem							
Cfinm	. T. C-		CGA.		C.		G. C. A. T
Cpaci	. T. C-		CG.		C.		
AY437861	. G. -. GC.	---.	TG.	AG.	G.	TCT.	CA.
AY437862	. T. C-		CG. A		C.		
AY437863	TT. . C. GT.	---. . A. G.	GCC. T		G. T.		C. T. A.
Lsalm	T. T. . CCGT.	--T. . CA.	CGACT	C. AAGTC. A. TG. T. AAT.	AGA.
Tcali	GT. . CC. GTA	TTTGG. TGG.	T. . GCGT.	C.	AC. CA CCA. T. AC. TC.
Eserr	TTG. GT. TT.	--T. . AG. G.	AT. CC. T.	CGC.	T.	G. C. C. TC C. AC.
Cplum	C. GGGT. GT.	ACC. . G. GG	. C. CGG.	C. C.	CCT.	GC. C. T.	GCT. AC. . G
AF530545	TT. . CC. GT.	---. . A. G.	CC.	C. C.	C. T. T. ACAT. T.
	5555555555	6666666667	7777777777	7777777777	7777777777	7788888888	8999999999
	4444788888	1245788880	0000001111	1122222223	3334455667	8801223358	8011236899
	1569701567	2517423450	3567891456	7901356780	3892757265	3602053672	5235777345
	5901234567						
Nplum	TTTATAAAAA	ATGTCAAACA	TCCGACTTTT	TGTAATCGGA	ATCGCCTTAA	AGGGCACTGT	ATTAGGGGTG
Ncris							
Nflem							
Cfinm	A. . GC. . TG.	G. . C.		G. . C.	T. . T. . C.		A.
Cpaci		A. T.	G.	C.	A.		
AY437861			TG.	A C.	A.		GA. T.
AY437862		A. TCCCT.	G.	C.	A.		
AY437863	A.	T.	CTA. . TC.	C. . T. G	TG. G. G.	G. . . TC. C.
Lsalm	A. . GC. . T.	C.	C. A. TT. A.	TAC. . . T. G	T. G.
Tcali	. . CGCGC.	C.	C. A. G. . . A.	GC. T. G	ATT. . G.	TTT. . . C.
Eserr	A. G6CCCT.	G. . C.	A. C.	GC. T.	G.	CTCTC
Cplum	AC. GC. . T. C	G CAA. CT. . C	TTG C.	T. CGG G.	C. C. C.
AF530545	A. . GC. . T.	C. C.	C. A. T. . . A	GA. T. G	T. G. G. C.
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
	0000000000	0000000000	0000000001	1111111111	1111111122	2222222222	2223333333
	1222222223	3333557777	7778888890	3344555667	7788899900	0023345666	7885555666
	9023457890	1235121234	6782345833	4924457785	6745646834	6756906468	026235902
Nplum	--TCTTTGAG	CAGCAAGCGA	TCTTTCGCGTC	CACCTAATCT	TCGAAACCCC	TAGACCTGCC	AGCCCCCTT
Ncris		. G.					
Nflem		. G.					
Cfinm		. C. T.	A.			
Cpaci							
AY437861							
AY437862				A			
AY437863							
Lsalm	AT. T. . . . C.	TTA. TT. T. G	GTCC. A.	TG. GG. TG	G. TTC. T.	CC.	A. T. ATATTCA
Tcali	TC. GAA. . C.	. . G. . A.	AT.	T. G.	G. . GCGCTG	CT.
Eserr	ACA. . GCCT	. GC-. . A. AG	ATCCT. T. G.	TGTTGG. TG	A. TCC.	CCA. TGA.	TATT. . G
Cplum	C-.	T. T. A. AA. C.	G ATC. G. AGCC.	C.	CT. CG. GA.	TATT. . G
AF530545	--. T. . . . C.	TT. A.	G GTCC.	TG. GGC. T.	TA. . C. TT	CC.	A. T. TAT. . G

图 4 桡足亚纲 18S 核糖体 RNA 基因核苷酸变异位点

Fig. 4 Nucleotide variation sites of copepod 18S rDNA sequences

字母代号分别表示为: Nplum, *Neocalanus plumchirus*; Ncris, *N. cristatus*; Nflem, *N. flomeri*; Cfinm, *Cdanus firmarchicus*; Cpaci, *C. pacificus*; Lsalm, *Lepophtheirus salmonis*; Tcali, *Tigriopus californicus*; Eserr, *Eucyclops serrulatus*; Cplum, *Carrincola plumipes*. AY437861, AY437862 和 AY437863 为本研究获得的序列

表 1 不同组间核苷酸差异数
Tab. 1 Number of nucleotide difference between any two groups

	AY437861	AY437862	AY437863	桡足亚纲	介形亚纲	软甲亚纲
AY437861						
AY437862	60					
AY437863	121	109				
桡足亚纲	96.6*	75.4	97.8			
介形亚纲	202.3	214.7	208.3	206.6		
软甲亚纲	177.0	176.0	169.5	168.2	166.5	
鳃足亚纲	186.3	187.9	183.9	179.4	166.5	127.4

* 当一组包含多条序列时,核苷酸差异为平均值。

将桡足亚纲所有序列(包括本研究获得的 3 条)的核苷酸变异位点进行展示,获得图 5 中变异位点分布密度。根据核苷酸变异位点分布情况,桡足亚纲 18S 核糖体 RNA 基因序列可分为 1—278bp(C1)、588—699bp(C2)、837—993bp(C3)和 1287—1351bp(C4)四个相对保守的区域和 279—394bp(V1)、395—587bp(V2)、700—836bp(V3)、994—1286bp(V4)四个变异区。核苷酸序列变异

程度最高的区域是 V1 和 V4,其中 V1 变异程度最高。根据序列计算序列多样性, V1 区达到了 0.369,而 V2、V3 和 V4 区的序列多样性分别仅为 0.078、0.086 和 0.105。保守区的序列多样性在 0 和 0.058 之间。高变异区的存在为设计属或种特异的引物或探针提供了可能,同时,仅根据高变异区序列信息也可能进行多样性分析,以减少测序长度,节省分析费用。

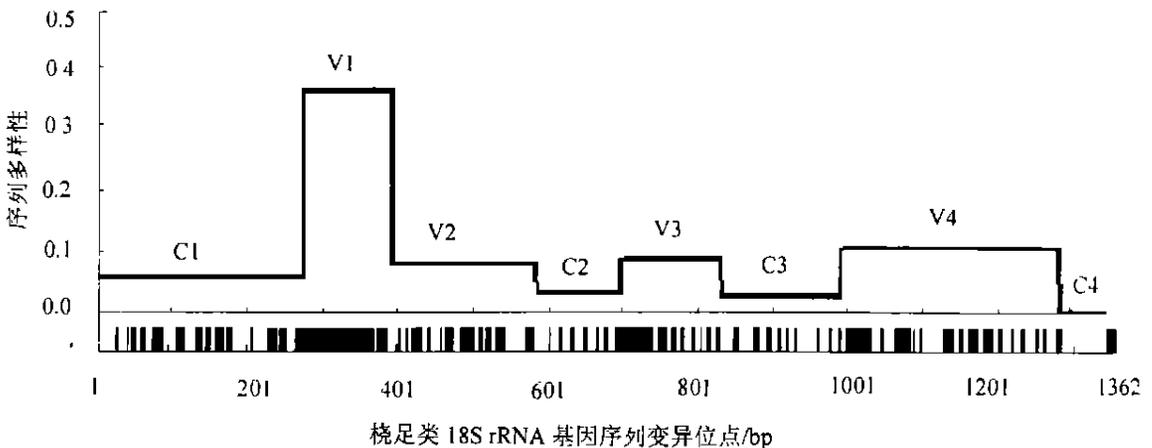


图 5 桡足类 18S 核糖体 RNA 基因序列变异位点分布及不同区段序列多样性

Fig. 5 The nucleotide variation sites of copepod 18S rDNA and the sequence diversities of different regions
横坐标反映核苷酸位置和变异位点,短竖线代表一个变异位点。V 为变异区; C 为保守区

2.4 系统学分析

将接近全长的甲壳纲 18S rRNA 基因序列和本研究获得的 3 个 OTU 代表序列一起,以线虫 *Caenorhabditis elegans* 18S 核糖体 RNA 基因序列作外族群,构建系统树。最大简约法和邻接法构建的系统树拓扑结构基本相同,只在靴带值上略有差异。图 6 是用邻接法构建的系统树。由图 6 可知,3 个 OTU 代表序列以很高的支持率分在桡足

亚纲分支,其中 AY437862 与太平洋哲水蚤 (*Calanus pacificus*) 亲缘关系极近,可以判定该序列来源于 *Calanus* 属,或者就是太平洋哲水蚤; AY437861 可以确定为哲水蚤目(Calanoida)。系统学分析表明作者分离的序列属于桡足类,也证明了引物的特异性。另外,BLAST 分析表明,与 AY437862 最相似的是太平洋哲水蚤,与 AY437861 最相似的为新哲水蚤属(*Neocalanus*),这再次证明

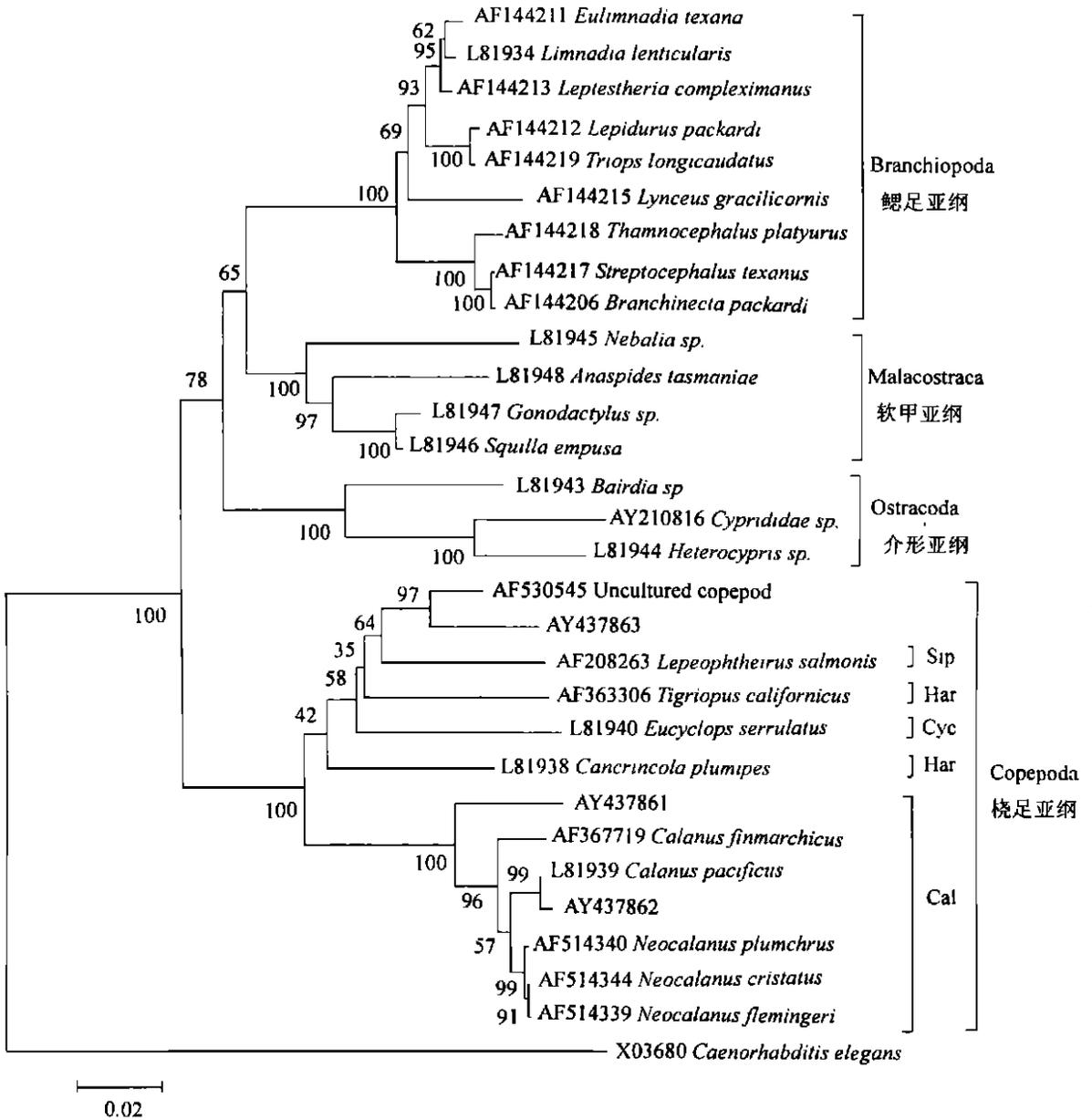


图 6 用邻接法构建的甲壳纲 18S 核糖体 RNA 基因和 OTU 代表序列系统树

Fig 6 Phylogenetic tree of Crustacean 18S ribosomal RNA gene sequences and 3 OTU representative clones constructed using neighbor-joining method

注: 500 次重复计算靴带值。以线虫 *Caenorhabditis elegans* 18S rRNA 基因序列(X03680) 作外族群。

Sip, Har, Cyc, Cal 分别指 Siphonostomatoida 目、猛水蚤目(Harpacticoida)、剑水蚤目(Cyclopoida)和哲水蚤目(Calanoida)

分离的序列是桡足类的序列。

3 讨论

引物 247F、1701R 的设计充分考虑了特异性与覆盖面的统一。从 GeneBank 下载有限的桡足类 18S rRNA 基因序列, 进行多序列对位分析后, 寻找保守区域并设计成引物。先根据下载的甲壳

纲 18S rRNA 基因序列, 寻找桡足类特异(具有 1 至数个碱基差异)的引物, 再根据 BLAST 分析确定桡足类特异的引物, 即最大限度覆盖桡足类序列、最小限度与桡足类以外的序列重叠的引物。可以认为本研究中使用的引物不能扩增其他生物的 18S 核糖体 RNA 基因。

除特异性外,还需要考虑引物覆盖面。因为数据库序列有限,只能根据对已知序列的覆盖情况进行判断(表2)。3条 OTU 代表序列与桡足亚纲的差异核苷酸数相似,因此作者初步认为该引物对具有较宽的覆盖面。数据库序列资源有限,具有引物区域的序列总数分别为 40(247F)和 21(1701R)。能与引物 247F 完全配对、但不属于桡足类的序列数为涡虫纲的一个序列来源于 *Meara* sp., 在上层海水中一般不存在。能与引物 1701R 完全匹配、但不属于桡足类一个序列来源的棘头动物 *Filisoma bucerium* 是鱼的寄生种。因此,仅根据数据库序列的覆盖情况判断,作者所设计的引物的特异性和覆盖面都比较理想。

表 2 与引物完全配对的数据库序列检索情况

Tab. 2 Online BLAST searching of the sequences matched with primers completely

引物名	完全配对序列数	
	桡足类	非桡足类
247F	39	1
1701R	20	1

在细菌、真菌等类群中,引物特异性和覆盖面有两个判断途径:一是根据已知的分离物种的扩增情况进行判定;二是根据数据库序列的覆盖面进行判定。显然,这两个标准在桡足类中都不好使用。数据库序列有限,但可以分离桡足类个体,先进行形态分类再进行序列分离。

桡足类遗传多样性正受到越来越多学者的关注, Bucklin 等(1999)以线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(mtCOI)基因变异鉴定了 *Calanus finmarchicus*、*C. glacialis* 和 *C. helgolandicus* 等相似种; Bucklin 等(2000)等设计了 mtCOI *Pseudocalanus* 属特异引物,分析了种内变异和不同地理种群的遗传差异; Lee(2000)用线粒体 16S rRNA 基因和 mtCOI 基因变异分析了 *Eurytemora affinis* 种群遗传多样性和生殖隔离问题; Burton 等(1994)利用 H1 和 COI 基因变异研究了 *Tigriopus californicus* 不同地理群的遗传差异;谭树华等(2003)根据等位酶变异分析了东海和黄海中华哲水蚤种群多样性。这些研究都先对单体进行鉴定,或获得纯培养后,再进行分子遗传多样性研究。如果能对单体进行形态鉴定,再根据小核糖体亚基基因序列分析多样性,将能克服现有数据有限的问题,设计特异性和覆盖

面都恰当的引物。

遗传多样性可以在分类基础上进行,也可以是绕过形态鉴定,直接从 DNA 层次描述环境样品某基因的多样性。直接从 DNA 层次研究生物多样性是今后应努力的方向。以 18S rRNA 基因作为指示基因,分析环境样品桡足类 18S rRNA 基因变异是桡足类等浮游生物多样性及其与环境相关性研究的新尝试。积累的数据将有助于高效群落结构分子生物学剖分方法的建立,数据也容易相互比较和整合。

基于 DNA 变异的分子遗传多样性研究以基因为计数单位,而不是以个体为计数单位,研究结果可能与基于形态分类的结果有较大的分歧。个体细胞数可能不同,细胞中基因的拷贝数也可能不同。如何确定基于形态分类的结果与基于 DNA 分析的结果之间的关系还需要深入研究。但是,生命活动的基本单位是细胞,以细胞中基因拷贝为基本计数单位存在较大的合理性,只要遵循同样的规则,直接在 DNA 层次研究多样性是可行的。

参 考 文 献

- 刘亚军, 喻子牛, 姜艳艳等, 2002. 栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究. 海洋与湖沼, 33(5): 477—483 [Liu Ya-Jun, Yu Zi-Niu, Jiang Yan-Yan *et al.*, 2002. Sequence polymorphism of mitochondrial 16s rRNA gene fragment in scallop *Chlamys farreni*. *Ocnologia et Limnologia Sinica*, 33(5): 477—483]
- 刘瑞玉, 1992. 胶州湾生态学和生物资源. 北京: 科学出版社, 170—203
- 权洁霞, 戴继勋, 尚 迅, 1999. 海洋生物遗传多样性研究现状. 青岛海洋大学学报, 29(2): 283—288 [Quan J X, Dai J X, Shang X, 1999. Studies on the genetic diversity of marine organisms: a review. *Journal of Ocean University of China*, 29(2): 283—288]
- 杨官品, 男 兰, 贾海波等, 2000. 土壤细菌遗传多样性及其与植被类型相关性研究. 遗传学报, 27(3): 278—282 [Yang G P, Nan L, Jia H B *et al.*, 2000. Bacterial genetic diversity in soil and their correlation with vegetation. *Acta Genetica Sinica*, 27(3): 278—282]
- 董云伟, 牛翠娟, 鲍 蕾等, 2002. 单只轮虫 DNA 提取及其细胞色素 C 氧化酶 I 亚基部分序列测定. 动物学研究, 23(1): 81—83 [Dong Y W, Nui C J, Bao L *et al.*, 2002. Method for extracting DNA from single rotifer and sequencing partial mitochondria cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. *Zoological Research*, 23(1): 81—83]

- 谭树华, 林元烧, 曹文清等, 2003. 黄、东海中华哲水蚤种群遗传的初步研究 I : 等位酶分析. 厦门大学学报, 42(1): 87—91 [Tan S H, Lin Y S, Cao W Q *et al*, 2003. Studies on population genetics of *Calanus sinicus* (Copepod) in Yellow Sea and the East China Sea I : Allozyme analysis. Journal of Xiamen University (Natural Science), 42(1): 87—91]
- Bucklin A, Kocher T D, 1996. Source regions for recruitment of *Calanus finmarchicus* to Georges Bank: evidence from molecular population genetic analysis of mtDNA. Deep-Sea Res II, 43(7—8): 1665—1681
- Bucklin A, Guarnieri M, Hill R S *et al*, 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. Hydrobiologia, 401: 239—254
- Bucklin A, Guarnieri M, McGillicuddy D J *et al*, 2000. Spring evolution of *Pseudocalanus* spp. abundance on Georges Bank based on molecular discrimination of *P. moultoni* and *P. nawmani*. Deep-Sea Res II, 48: 589—608
- Burton R S, Lee B-N, 1994. Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeographic break in the copepod *Tigriopus californicus*. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 5197—5201
- Lee C E, 2000. Global Phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate “populations”. Evolution, 54(6): 2014—2027
- Redecker D, Thieffelder H, Walker C *et al*, 1997. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spaces of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomals. Applied and Environmental Microbiology, 63: 1756—1761
- Schizas N V, Street G T, Coull B C, 1997. An efficient DNA extraction method for small metazoans. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 6(4): 381—383
- Wang H, Kohalmi S E, Cutler A J, 1996. An improved method for polymerase chain reaction using whole yeast cells. Analytical Biochemistry, 237: 145—146

AMPLIFICATION AND VARIATION ANALYSIS OF JIAOZHOU BAY PELAGIC COPEPOD 18S RIBOSOMAL RNA GENE (18S rDNA)

MEN Rong-Xin, YANG Guan-Pin, LIU Yong-Jian, Guan Xiao-Jing
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Zooplankton plays a crucial role in material and energy circulations in marine ecosystem. Copepod are major members of zooplankton in both biomass and species number. DNA descriptions of marine copepod diversity, community structure and community dynamics are therefore very important.

Traditional approaches for copepod diversity evaluation are based on morphological taxonomy. These traditional methods are experience dependent and integration of data from different sources is difficult. Difference in DNA sequence, however, is the most fundamental difference between living beings. Descriptions of diversity based on DNA sequences is more objective and data integration is easier. In order to describe molecular genetic diversity and develop a community structure partitioning method for marine pelagic copepod. The variation within 1.5kb pelagic copepod 18S ribosomal RNA gene (18S rDNA) fragment was determined using molecular biological techniques, including polymerase chain reaction amplification, library construction, restriction fragment length polymorphism analysis, sequencing and systematic analysis.

Pelagic copepod 18S rDNA was amplified from DNA mixture extracted from plankton and ligated into plasmid vector. A library containing all possible 18S rDNA variants of copepod was constructed and from it 30 recombinants were selected randomly for further analyses. The inserts of these 30 recombinants were reamplified, purified and cut with *Vsp* I restriction endonuclease, yielding 3 restriction fragment length polymorphism (RFLP) types, or operational taxonomy units (OTU). The frequencies of clones covered by these three OTUs are 0.17, 0.23 and 0.6 respectively, giving a genetic diversity index of 0.95. The nucleotide differences between OTU representative clone and known sequences of copepod range from 75.4 to 97.8, while those between OTU representative clone and other subclasses of crustacea are higher than 100. Systematic analysis showed that the sequences of three OTU representative clones merge always into copepoda clade, and two of them, AY437861 and AY437862, into calanoida clade. The sequences of three OTU representative clones can be divided into 2 high variable regions and 3 relatively conservative regions according to the concentration of variable nucleotide sites. The GC contents of these three clones are 47.37%, 48.16% and 48.57% respectively.

Results show the DNA extraction method used in this study is both simple and efficient, and the primers designed can amplify pelagic copepod 18S ribosomal RNA gene fragments selectively from mixed plankton DNA. It is feasible that pelagic copepod diversity can be described according to 18S rDNA sequence variations. Our results also provided the basis for the utilization of 18S rDNA sequence in the taxonomy of pelagic copepod.

Key words 18S ribosomal RNA gene, Copepod, Sequence variation