

# 黄海潮间带和浅海表层沉积物中植物 DNA 提取和 PCR 扩增的方法学探索\*

陈家鑫<sup>1,3</sup> 刘佳文<sup>1,3</sup> 法文龙<sup>1,3</sup> 李浩天<sup>1,3</sup> 类彦立<sup>1,2,3</sup>

(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 青岛市海洋生物多样性与保护重点实验室 山东青岛 266071;  
2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(珠海) 广东珠海 519082; 3. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** 海洋沉积物中的植物信息具有重要的生态学和古环境意义,但传统方法只能通过研究沉积物中的孢粉获取植物信息。随着分子生物学的进步,探索利用海洋沉积物中的植物分子多样性解释全球变化成为了一种新的尝试。文章首次尝试了对海洋沉积物中的植物 DNA 进行提取与 PCR 扩增,通过使用不同的 DNA 提取方法(DNA 提取试剂盒)和 PCR 扩增条件[2 倍浓缩的 PCR 扩增预混合溶液(Mix)退火温度、循环数、DNA 模板量以及引物],探索海洋沉积物中植物 DNA 提取和 PCR 扩增的方法,并在采自黄海潮间带以及浅海表层的沉积物中进行了检验。共尝试了 32 种方法,结果表明:强力土壤微生物 DNA 提取试剂盒(DNeasy PowerSoil)以及 2× TransTaq HiFi PCR SuperMix I 是较好的 DNA 提取与扩增条件;对于潮间带表层沉积物样品,最佳退火温度为 55 °C,最佳循环数为 55 个循环;而对于浅海表层沉积物样品,最佳退火温度为 59 °C,最佳循环数为 45 个循环;此外,相对于 rbcL 引物,gh 引物的扩增结果更好。这项研究首次成功提取并扩增了海洋沉积物中的植物 DNA,以期应用于海洋沉积物中植物分子多样性的分析,为研究全球环境变化和陆地植被变化提供一种新的技术途径。

**关键词** 分子生物学; 海洋沉积物; 植物 DNA; 方法学

中图分类号 P714+.5 doi: 10.11693/hyhz20220900229

在古海洋学研究中,海洋沉积物中记录的信息是反演海洋和陆地气候与环境变化的重要载体(Corinaldesi *et al.*, 2008),海洋环境的变化一般通过有孔虫进行指示(Chen *et al.*, 2008; Muhong *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2018, 2019a, 2019b; Jian *et al.*, 2019, 2020; Li *et al.*, 2021a<sup>2,3</sup>; Zhang *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022; Xiong *et al.*, 2022),陆地环境的变化则一般通过沉积物中的植物孢粉信息指示(Voldstad *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020b<sup>2</sup>, 2021<sup>3</sup>; Li *et al.*, 2021b<sup>2</sup>)。植物是自然界中物质循环与能量交换的重要环节(张佳华等, 2000),它们提供了许多宝贵的生态系统服务(Costanza *et al.*, 2014)。植物群落的动态与气候变化有

明显的相关性(Farrell *et al.*, 2015),这些植被由于气候变化的影响,在全球范围内正处于不断下降的趋势(Kern *et al.*, 1992; Erb *et al.*, 2018; Cuni-Sanchez *et al.*, 2021)。虽然植物群落对气候环境变化具有良好的指示作用,但是到目前为止,对于检测植被变化、评价人类活动影响的有效且高效的方法十分匮乏。

植被分布情况的获得一般依赖于野外调查(Chytrý *et al.*, 2011)、分析沉积物中的孢粉(Yang *et al.*, 2020b)<sup>3</sup>或遥感数据(Qi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002)。研究者可以通过遥感数据和野外调查来评估从米到千米的空间变化(Taubert *et al.*, 2018),对沉积物中的孢粉进行分析可以重建古植被的分布与变化(Yang *et al.*,

\* 国家自然科学基金资助项目, U1906211 号; 国家自然科学基金资助项目, 41976058 号; 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 2021WHZZB0804 号; 山东省泰山学者工程专项经费资助支持, TS20190963 号。陈家鑫, 硕士研究生, E-mail: cjx000606@163.com

通信作者: 类彦立, 博士生导师, 研究员, E-mail: leiyanli@qdio.ac.cn

收稿日期: 2022-09-06, 收修改稿日期: 2022-10-13

2021)<sup>6</sup>。然而, 野外调查与遥感观测需要随着时间的推移进行多次调查和观测, 以生成用于变化检测的时间序列记录(Ahl *et al.*, 2006; Adole *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2020), 这种持续观察的成本高昂并且非常耗时(Danovaro *et al.*, 2016), 孢粉分析同样耗时耗力, 样品处理与定种需要相当专业且丰富的经验(Hubbard *et al.*, 1983)<sup>2-3</sup>。植物分子生物学的发展很好地解决了上述方法中存在的缺陷(Pagani *et al.*, 2009<sup>1-4</sup>; Erb *et al.*, 2018<sup>1-3</sup>)。Thompson 等(2014)的研究指出, 分子分类学工具的成本比野外调查的成本低 37%; 有研究提出在缺氧和有水存在的环境中可以较好地保存植物分子材料(Brown *et al.*, 1993), 而海洋沉积物正是可以保存海相和陆相植物分子材料的极佳环境(Bálint *et al.*, 2018; Estrada *et al.*, 2018)。

到目前为止, 研究者已从大于 55 ka BP 的湖泊沉积物中提取并分析了植物 DNA, 表明对湖泊沉积物的植物 DNA 进行的研究可能跨越晚更新世和全新世(Willerslev *et al.*, 2003)。此外, 对从沉积物中提取并扩增的植物 DNA 进行分析可以反演周边植被情况(Willerslev *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2020b<sup>6</sup>, 2021<sup>8</sup>; Li *et al.*, 2021a<sup>4</sup>)。因此, 沉积物中的植物 DNA 是一种非常理想的长期监测植被情况的材料。大量关于沉积物中植物 DNA 提取及其应用的相关研究被报道(Willis *et al.*, 1999; Estrada *et al.*, 2018; Lézine *et al.*, 2019), 然而, 多数关于沉积物中植物 DNA 的研究都集中在湖泊、冻土等沉积物类型中(林清等, 2002; 严东娜等, 2019; 马瑞丰等, 2020), 截至目前, 尚无从海洋沉积物中提取植物 DNA 的研究。

海洋沉积物中提取 DNA 的研究也存在一定局限性, 即便是在较为理想的环境下保存的 DNA 仍然会随着时间的推移受到严重的损伤和降解(Roberts *et al.*, 2013), 因此, 如何对海洋沉积物中短片段、低浓度的 DNA 进行提取和 PCR 扩增是非常具有挑战性的课题。目前, 商用试剂盒被广泛应用于提取沉积物中的 DNA (Larsen *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2018), 且聚合酶链反应(PCR)可以在大约 3~4 h 内实现超过 100 万倍的 DNA 扩增(Compton, 1991)。一般认为, 植物叶绿体基因具有非常保守的特点, 是一种理想的 DNA 条形码(Chung *et al.*, 2003; Heinze, 2007)。因此, 基于植物叶绿体基因开发的引物在应用于扩增植物 DNA 时具有更好的效果(Li *et al.*, 2011)。由于扩增出的条带质量除了与引物有关外(沈阳阳等, 2020; 法文龙等, 2022), 还与 PCR 体系中的

2 倍浓缩的 PCR 扩增预混合溶液(Mix)、退火温度、循环数以及加入 DNA 模板的量等因素有关(Saiki *et al.*, 1988), 因此, 在方法探索过程中要根据需要对上述条件进行摸索优化。

基于上述背景, 本文着重探讨海洋沉积物中的植物 DNA 能否被成功提取和扩增? 若能够成功扩增, 那么能否通过优化提取和扩增条件来实现高效提取和扩增? 本实验对采自黄海潮间带和浅海的表层沉积物样品进行 DNA 提取方法探索, 并确定最适提取方法。此外, 使用不同的 PCR 特异性引物对植物叶绿体基因的部分序列进行 PCR 扩增方法探索并对结果进行比较分析, 最终探索出最适 PCR 扩增条件。本文旨在探索沉积物中植物 DNA 的提取方法并通过选择合适的引物验证海洋沉积物中植物叶绿体 DNA 的 PCR 扩增效能, 从而为涉及不同海区类型沉积物中植物 DNA 的提取和 PCR 扩增以及海洋沉积物中植物的分子多样性和分子生态学等研究提供更加可靠的实验方法和参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本实验采用的表层沉积物样品分别采自黄海潮间带和浅海(图 1)。首先, 选取潮间带未受外界扰动的区域, 根据离岸的远近选取 3 个站位, 3 个站位均位于中潮带, 采样当日的最高潮为 3.75 m, 最低潮为 2.17 m。使用一次性采样勺刮取表层 0~2 cm 的沉积物, 再将沉积物样品分别装到不同的样品袋中并编号, 放入可携带式冰盒保温取样箱中。回到实验室后, 将样品铺平后放入-80 °C 冰箱中冷冻保存。2019 年 6 月 11 日搭乘“科学三号”考察船, 使用箱式采泥器采集黄海南部区域(图 1)的沉积物样品。样品采集步骤如下: 使用一次性采样勺刮取表层 0~2 cm 的沉积物, 放入干净的密封袋中并标号记录站位信息, 将样品铺平并放置于-80 °C 冰箱中保存。本研究选取了浅海 6 个站位的样品(3500-04、3500-05、3500-06、3500-07、3500-08、3500-10)进行实验。

### 1.2 实验设计

实验通过采用不同 DNA 提取试剂盒、不同品牌 Mix、改变 PCR 退火温度、循环数及 DNA 模板量和使用不同引物(表 1, 2)来比较 DNA 提取效果和 PCR 扩增效率。在预实验中发现, gh 引物的扩增效果较差, 而 rbcL 引物在初始条件下就可以扩增出质量较高的条带, 因此实验条件的摸索仅针对 gh 引物。

### 1.3 DNA 提取

使用两种试剂盒分别提取三个潮间带和六个浅海表层沉积物样品的环境 DNA。每次称取约 0.25 g 沉积物样品, 每 5 个样品设置一个空白对照。此方法的所有提取步骤均按照说明书进行, 涡旋震荡时间为 20 min, 洗脱液体积为 100  $\mu$ L。完成 eDNA 提取后, 利用 Qubit

@3.0 荧光计(Thermo Scientific)检测 eDNA 的浓度。

### 1.4 PCR 扩增

将用不同试剂盒提取的两组 DNA 进行 PCR 扩增实验。PCR 扩增实验采用的是 25  $\mu$ L 的扩增体系, 该体系包括 12.5  $\mu$ L 的 Mix、0.5  $\mu$ L 的 10  $\mu$ mol/L 引物(gh 引物和 rbcL 引物的具体信息见表 3)、2  $\mu$ L 的 DNA

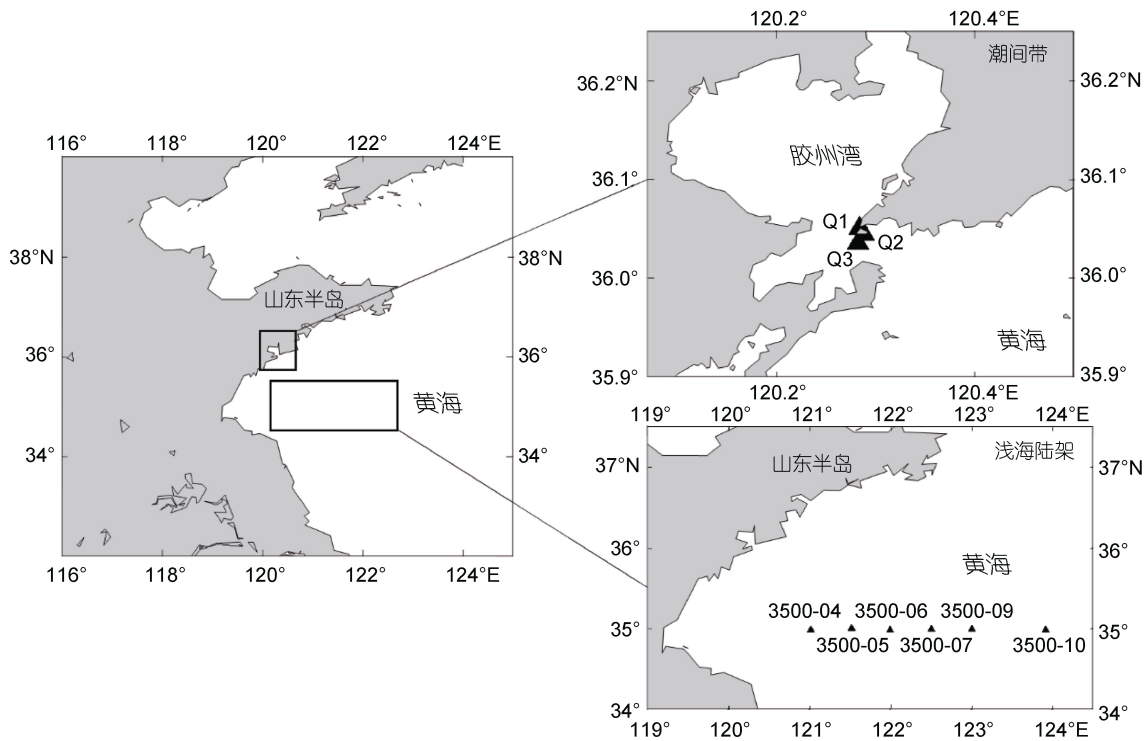


图 1 采样站位区域分布图

Fig.1 Distribution of the sampling sites

注: 图中“▲”是实验采样站位

表 1 潮间带样品的尝试方法汇总

Tab.1 Summary of the methods tested for intertidal samples

样品类型	引物	试剂盒	Mix	模板量	退火温度	循环数	变量	
方法 A1	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	55 $^{\circ}$ C	55 ×	试剂盒
方法 A2	潮间带	gh	DM	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	55 $^{\circ}$ C	55 ×	
方法 A3	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	50 $^{\circ}$ C	55 ×	
方法 A4	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	52 $^{\circ}$ C	55 ×	退火温度
方法 A5	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	54 $^{\circ}$ C	55 ×	
方法 A6	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	56 $^{\circ}$ C	55 ×	
方法 A7	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	58 $^{\circ}$ C	55 ×	
方法 A8	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	60 $^{\circ}$ C	55 ×	
方法 A9	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	62 $^{\circ}$ C	55 ×	循环数
方法 A10	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	56 $^{\circ}$ C	60 ×	
方法 A11	潮间带	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	56 $^{\circ}$ C	55 ×	
方法 A12	潮间带	rbcL	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 $\mu$ L	60 $^{\circ}$ C	45 ×	引物

注: 本研究设计的针对潮间带样品中植物 DNA 的提取和扩增方法, 其中 DS 代表 DNeasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒, DM 代表 DNeasy PowerMax 土壤 DNA 提取试剂盒

表 2 浅海样品的尝试方法汇总

Tab.2 Summary of the methods tested for shallow sea samples

	样品类型	引物	试剂盒	Mix	模板量	退火温度	循环数	变量
方法 B1	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	55 °C	45 ×	试剂盒
方法 B2	浅海陆架	gh	DM	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	55 °C	45 ×	
方法 B3	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	52 °C	45 ×	退火温度
方法 B4	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	53 °C	45 ×	
方法 B5	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	54 °C	45 ×	
方法 B6	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	56 °C	45 ×	
方法 B7	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	58 °C	45 ×	
方法 B8	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	59 °C	45 ×	
方法 B9	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	60 °C	45 ×	循环数
方法 B10	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	61 °C	45 ×	
方法 B11	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	59 °C	45 ×	Mix
方法 B12	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	59 °C	50 ×	
方法 B13	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	59 °C	55 ×	DNA 模板量
方法 B14	浅海陆架	gh	DS	DreamTaq Green PCR Master Mix	2 μL	59 °C	45 ×	
方法 B15	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	59 °C	45 ×	引物
方法 B16	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	59 °C	45 ×	
方法 B17	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	4 μL	59 °C	45 ×	
方法 B18	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	6 μL	59 °C	45 ×	
方法 B19	浅海陆架	gh	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	59 °C	45 ×	
方法 B20	浅海陆架	rbcL	DS	2×High-Fidelity PCR Master Mix	2 μL	60 °C	45 ×	

注: 本研究设计的针对浅海陆架样品中植物 DNA 的提取和扩增方法, 其中 DS 代表 DNeasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒, DM 代表 DNeasy PowerMax 土壤 DNA 提取试剂盒

模板和 9.5 μL 的双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)。实验中, 当改变 DNA 模板量时, 通过调整 ddH<sub>2</sub>O 的体积维持扩增体系体积的不变。优化前 gh 引物的 PCR 扩增程序 (简称程序 a) 和 rbcL 引物的扩增程序 (简称程序 b) 如表 4 所示。将得到的 PCR 产物与 1×loading buffer 等体积

混合, 并在浓度为 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 将凝胶放置在凝胶成像系统进行检测。每次实验前用核酸清洁剂彻底清洁实验台面和仪器周围空间, 喷洒核酸清洁剂到超净台面并开启紫外灯杀菌, 排除其他环境 DNA 对本实验的干扰。

表 3 引物具体信息

Tab.3 Specific information of primers

引物名称	序列(5'~3')	目的片段长度	文献来源
g	GGGCAATCCTGAGCCAA	40 bp	Bradley <i>et al.</i> , 2007
h	CCATTGAGTCTCTGCACCTATC		
rbcLZ1	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGCAAGT	157 bp	Taberlet <i>et al.</i> , 2007
rbcL19b	CTTCTTCAGGTGGAACCTCCAG		

表 4 优化前的 PCR 扩增程序

Tab.4 PCR amplification procedure before optimization

	引物	预变性	变性	退火	延伸	循环数	最后延伸	文献来源
程序 a	gh	95 °C/10 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	55 ×	72 °C/10 min	Bradley <i>et al.</i> , 2007
程序 b	rbcL	94 °C/10 min	92 °C/15 s	60 °C/1 min	72 °C/1 min	45 ×	72 °C/10 min	Taberlet <i>et al.</i> , 2007

## 2 实验结果

### 2.1 海洋沉积物中植物 DNA 的提取方法探索——提取试剂盒的比较

使用方法 A1 和方法 A2 分别提取潮间带 3 个站位的表层样品(0~2 cm), 共获得 6 组 DNA 序列, 其中, 使用方法 A1 提取的 DNA 为 1~3 号泳道, 使用方法 A2 提取的 DNA 为 4~6 号泳道。6 组 DNA 序列使用程序 a 进行扩增。再分别使用方法 B1 和方法 B2 提取浅海 3 个站位(3500-04、3500-05、3500-06)的样品, 获得 6 组 DNA (分别对应 7~9 号泳道和 10~12 号泳道)。在使用方法 B1 对浅海 3500-4 站位

提取 DNA 时, 分别加入 2 和 3 g 的沉积物样品以比较加入不同样品克数时的提取与扩增质量, 样品泳道标号为 13 和 14。使用程序 a 进行 PCR 扩增, 得到的条带如图 2 所示。

根据凝胶电泳图像, 可以观察到不同方法提取的 DNA 的 PCR 产物凝胶电泳条带存在亮度差异。为了进一步比较两者的差异, 使用 Image J 处理上述胶图, 并获得了各个条带的灰度值(表 5)。结果表明, 方法 A1 和方法 B1 明显优于方法 A2 和方法 B2, 即 DNeasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒的效果好于 DNeasy PowerMax 土壤 DNA 提取试剂盒。

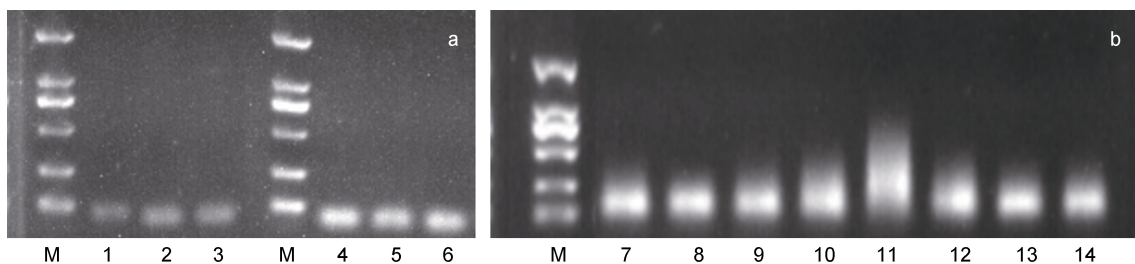


图 2 黄海潮间带和浅海沉积物样品使用不同试剂盒的扩增结果

Fig.2 Amplification results of the Yellow Sea intertidal zone and shallow sea sediment samples using different kits

注: 图 a 为潮间带样品; 图 b 为浅海陆架样品

表 5 目的条带灰度值  
Tab.5 The gray value of the target bands

泳道编号	灰度值	泳道编号	灰度值	泳道编号	灰度值	泳道编号	灰度值
1	25 777	6	1 4656	11	19 887	16	27 819
2	22 361	7	25 698	12	25 587	17	19 461
3	23 019	8	26 461	13	24 235	18	28 736
4	18 736	9	23 186	14	21 568	19	26 844
5	14 584	10	20 132	15	13 077	20	27 656

注: 对无法直接观察到目的条带质量差别的泳道进行了灰度值分析以确定最优条件

### 2.2 海洋沉积物中植物 DNA 的扩增方法探索——PCR 退火温度的比较

使用方法 A3~A9 对潮间带样品进行 PCR 扩增退火温度的探索, 不同退火温度下获得的凝胶电泳图如图 3 所示。将所获得的电泳图用 Image J 图像软件分析, 得到各条带的灰度值(表 5)。实验结果表明, 方法 A6 明显优于其他方法, 即 56 °C 为潮间带样品使用 gh 引物的最佳退火温度。使用方法 B3~B10 对浅海 3500-04 站位进行 PCR 扩增的退火温度探索, 27~29 号泳道扩增效果无明显差别(图 4a), 因此为了进一步验证这三种方法的效果, 使用方法 B8~B10 对浅海其他 5 个站位(3500-5、6、7、8 和 3500-10)的样品进行实验。获得凝胶电泳图如图 4b 所示。结果表

明, 方法 B8 明显优于其他方法, 即 59 °C 为浅海样品使用 gh 引物的最佳退火温度。

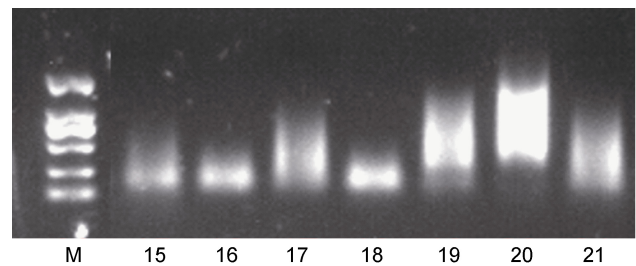


图 3 黄海潮间带样品不同退火温度下的扩增结果

Fig.3 Amplification results of intertidal samples from the Yellow Sea at different annealing temperatures

注: 15~21 号泳道分别为退火温度为 50~62 °C 时的扩增结果



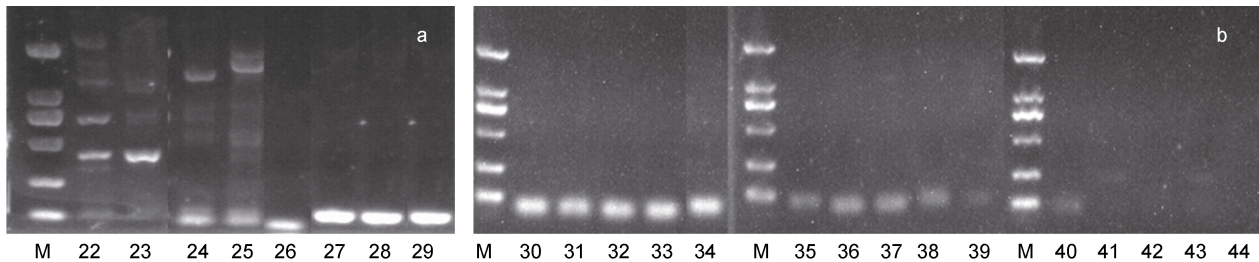


图 4 黄海浅海样品不同退火温度下的扩增结果

Fig.4 Amplification results of shallow sea samples from the Yellow Sea at different annealing temperatures

注: 图 a 为 3500-04 站位样品, 退火温度依次为 52、53、54、56、58、59、60 和 61 °C; 图 b 为 59、60、61 °C 的退火温度下其余 5 个站位的结果

### 2.3 海洋沉积物中植物 DNA 的扩增方法探索——PCR 循环数的比较

使用方法 A10 对潮间带样品进行 PCR 循环数的探索。使用方法 B11~B13 对浅海 4 个站位的样品 (3500-4、3500-5、3500-6、3500-7) 进行 PCR 循环数的探索。获得凝胶电泳图如图 5 所示。由结果可知, 方法 A10 出现了明显的拖带现象, 因此 55 次循环数为潮间带样品的最适循环数。对于浅海样品, 方法 B11 明显优于其他方法, 并得出最适循环数为 45 次的结论。

### 2.4 海洋沉积物中植物 DNA 的扩增方法探索——Mix 的比较

分别使用方法 B14、B15 对浅海 6 个站位的样品进行 PCR 体系中 Mix 的探索, 获得的凝胶电泳条带

如图 6a 所示。由电泳结果可知, 方法 B15 明显优于方法 B14, 因此 2×High-Fidelity PCR Master Mix 为最佳 Mix。

### 2.5 海洋沉积物中植物 DNA 的扩增方法探索——PCR 模板量的比较

使用方法 B16~B18 对浅海 6 个站位的样品进行 PCR 体系中模板量的探索, 获得凝胶电泳图如图 6b 所示。结果表明, 方法 B16 明显优于其他方法, 因此, 确定 2 μL 为最适模板量。

### 2.6 海洋沉积物中植物 DNA 的扩增方法探索——引物的比较

使用方法 A11、A12 对潮间带样品进行引物效果的比较(图 7a, 图 8), 使用方法 B19、B20 对浅海样品的

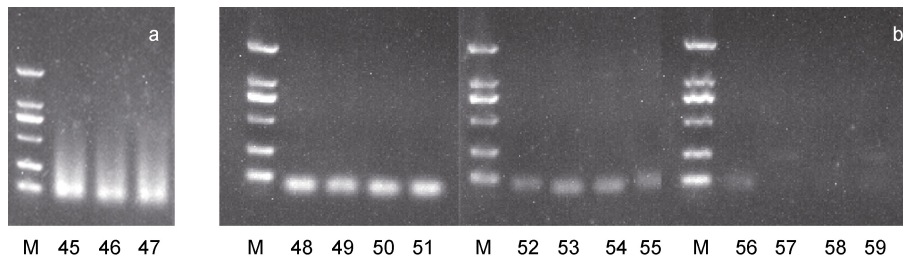


图 5 黄海潮间带样品和浅海样品不同循环数下的扩增结果

Fig.5 Amplification results of intertidal samples and shallow sea samples from the Yellow Sea in different numbers of cycling

注: 图 a 为潮间带 3 个站位 60 次循环的扩增结果; 图 b 为浅海 4 个站位 45、50、55 次循环的扩增结果

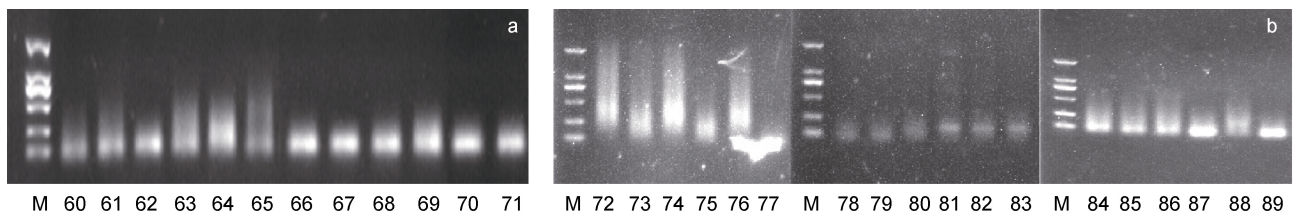


图 6 黄海浅海样品不同实验条件下的扩增结果

Fig.6 Amplification results of shallow sea samples from the Yellow Sea under different experimental conditions

注: 图 a 为使用不同 Mix 扩增的结果, 60~71 号; 图 b 为使用不同 DNA 模板加入量的扩增结果, 72~77 号泳道为 6 μL DNA 模板, 78~83 号为 4 μL DNA 模板, 84~89 为 2 μL DNA 模板

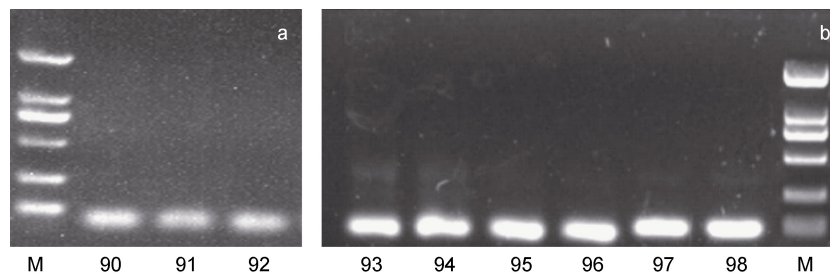


图 7 黄海潮间带和浅海样品使用优化后的组合条件下 gh 引物的扩增结果

Fig.7 Amplification results of gh primers under optimized combination conditions for intertidal and shallow sea samples from the Yellow Sea

注: 图 a 为潮间带样品的扩增结果; 图 b 为浅海样品的扩增结果

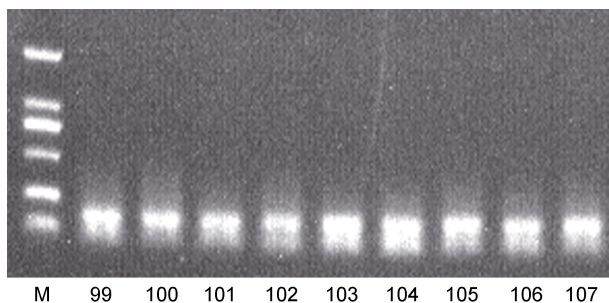


图 8 黄海潮间带和浅海样品使用 rbcL 引物的扩增结果

Fig.8 Amplification results of rbcL primers for intertidal and shallow sea samples from the Yellow Sea

注: 99~101 号泳道为潮间带样品的扩增结果, 102~107 号泳道为浅海样品的扩增结果

进行引物效果的比较(图 7b, 图 8)。由实验结果可知, 方法 A11 明显优于方法 A12, 表明优化条件后的 gh 引物为潮间带样品最适引物。同样地, 方法 B19 明显优于方法 B20, 说明优化条件后的 gh 引物同样为浅海样品的最适引物。

### 3 讨论

到目前为止, 本课题组已经对海洋沉积物中的古海洋环境变化指示生物——有孔虫进行了较为系统的研究(Lei *et al.*, 2014, 2015, 2017; Dong *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020), 同时也对海洋沉积物中的古代陆地环境变化指示生物——植物进行了孢粉分析研究(Yang *et al.*, 2020b<sup>2-6</sup>, 2021<sup>2-8</sup>)。但孢粉分析耗时耗力(Hubbard *et al.*, 1983<sup>2-3</sup>; Pagani *et al.*, 2009<sup>1-4</sup>; Erb *et al.*, 2018<sup>1-3</sup>)且目前国内外尚无从海洋沉积物中提取植物 DNA 的研究。基于此, 本实验对采自黄海潮间带和浅海表层沉积物样品进行植物 DNA 的提取和扩增方法探索, 从而为涉及不同海区类型沉积物中植物 DNA 的提取和 PCR 扩增以及海洋沉积物中植物的分子多样性和分子生态学等研究提供重要的实验方法和参考依据。

### 3.1 实验条件的探索

一般地, 通过凝胶电泳可以有效判断 DNA 提取与扩增结果的好坏和引物的优劣(Zhang *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2007; 王爱娜等, 2012; Shang *et al.*, 2013; 徐鹏昊等, 2018)。基于此, 本研究通过对不同的实验条件进行优化、对比和选择, 将不同条件下提取的 DNA 以及使用 gh 引物进行 PCR 扩增得到的产物进行凝胶电泳分析, 进而得到提取 DNA 的最佳方法以及 gh 引物的最适条件。

#### 3.1.1 海洋沉积物中植物 DNA 的提取方法探索

由图 2a 可知, 两种试剂盒(即 DNeasy PowerSoil 试剂盒与 DNeasy PowerMax)均能成功提取黄海潮间带表层样品的植物 DNA。其中, DNeasy PowerSoil 试剂盒需要添加 0.25 g 样品(Evans *et al.*, 2018; Lear *et al.*, 2018; Mattei *et al.*, 2019; Pearman *et al.*, 2020a; Temesgen *et al.*, 2020; 蔡杰等, 2022), 而 DNeasy PowerMax 试剂盒需要添加 10 g 样品(Lee *et al.*, 2010; Jarosz *et al.*, 2021)。对比可知, DNeasy PowerSoil 试剂盒提取出的 DNA 的扩增条带更加明亮清晰, 所以 DNeasy PowerSoil 试剂盒的提取效能优于 DNeasy PowerMax 试剂盒。为了进一步验证这一结果是否具有通用性, 用上述两种试剂盒分别提取黄海浅海表层沉积物样品的 DNA 并进行比较, 得到的结果与黄海潮间带的规律一致(图 2b)。并且, 考虑到样品量的问题, 一般情况下没有必要使用 10 g 样品提取 DNA (Tamarapu *et al.*, 2001; 陈立等, 2004; Zhang *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2017), 因此, 推荐使用 DNeasy PowerSoil 试剂盒进行植物 DNA 提取。DNeasy PowerSoil 试剂盒不仅能成功提取海洋沉积物中的植物 DNA, 而且其操作流程简单且耗时更短(Song *et al.*, 2021), 是一款理想的从海洋沉积物中提取植物 DNA 的试剂盒(Pearman *et al.*, 2020b; van der Loos *et al.*, 2021)。

### 3.1.2 海洋沉积物中植物 DNA 的扩增方法探索

由图 3 和表 4 可知, 16 和 18 号泳道的条带较亮且没有拖带, 且 18 号泳道的 PCR 产物条带最亮, 由此可得出, 56 °C 是针对潮间带沉积物样品扩增的最佳退火温度。由图 4a 可知, 退火温度为 59 °C 及以上时, 浅海沉积物样品的提取结果没有杂带和拖带现象, 且 PCR 扩增的特异性较好(Broude *et al.*, 2001; Korbie *et al.*, 2008; 李海阔等, 2009; 左丽娟等, 2011; Daher *et al.*, 2014)。若退火温度过高, 则会引起引物与模板结合不完全, 从而影响引物的扩增效率, 导致出现的目的条带变暗甚至没有目的条带(Osborne, 1992; Hamajima *et al.*, 2002; 冉姝等, 2008; 程远霞等, 2008)。因此, 本研究选择 59 °C 作为扩增浅海沉积物样品的最佳退火温度。除此之外, 本文还针对潮间带沉积物样品进行了 PCR 循环数的比较, 由图 5a 可知, 当把 PCR 循环数增加至 60 次, 出现了明显的拖带现象, 目的条带也不够明亮, 这可能是由非特异性产物增多造成的(Mishra *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2005; Sipos *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009, 2011a, 2011b; He *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2017), 因此仍然延续原程序中的 55 次循环数。而对于浅海沉积物样品, 分别对 45 次、50 次和 55 次的 PCR 扩增循环数结果进行比较, 根据图 5b 可知 45 次循环数的表现最好且最稳定, 因此将 45 次循环数确定为最适合浅海沉积物样品的 PCR 扩增条件。综上所述, 即使是同一对引物, 在扩增不同样品时的最佳退火温度和循环数等条件也可能不同(Quirós *et al.*, 1998; Chaudhry *et al.*, 1999; Omori *et al.*, 2000; 龙平等, 2013; 王彦坤等, 2020), 因此在进行实验前需要进行相关预实验以探索适合实验样品的 PCR 扩增条件(Lemmer *et al.*, 2004; Leli *et al.*, 2019)。

此外, 还针对浅海沉积物样品进行了 PCR 扩增体系中 DNA 模板量以及 Mix 的比较, 由图 6a 可知, 66~71 号泳道的目的条带清晰且明亮, 无杂带和拖带现象, 因此, 使用 2× TransTaq HiFi PCR SuperMix I 进行 PCR 扩增得到的产物明显优于使用 DreamTaq Green PCR Master Mix(2X)进行 PCR 扩增得到的产物。由图 6b 可知, DNA 模板的添加量对 PCR 扩增也具有一定的影响(张部昌等, 2002; 李宗菊等, 2004; Stiller *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014; 田孟祥等, 2015), 本研究中目的条带随 DNA 模板量增加而变浅, 甚至很多层位浅至没有条带, 与预期的模板量越多条带越亮(宋美茹等, 2012)不符。通过比较, 本研究选择加入 2 μL DNA 模板进行 PCR 扩增, 以达到最佳效果。

### 3.2 不同海区类型的最优实验条件

**3.2.1 潮间带** 根据上述对各个实验条件的探索, 本文总结出了黄海潮间带沉积物表层样品的植物 DNA 最佳提取条件和使用 gh 引物时的最佳扩增条件, 即使用 DNeasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒, 使用 25 μL PCR 反应体系(Riera *et al.*, 2010; Barrera *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2016)包括 12.5 μL 2×Taq PCR Master Mix, 正、反引物各 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, 去离子水 9.5 μL; 优化后的 PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 55 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。使用优化后的实验条件对黄海潮间带沉积物表层样品进行 PCR 扩增后的结果如图 7a 所示, 潮间带三个站位的样品均能通过 gh 引物扩增出位置正确、清晰且明亮的条带, 证明 gh 引物能在上述实验条件下正确高效的扩增出潮间带沉积物样品的植物 DNA 片段(Tonooka *et al.*, 2009)。

**3.2.2 浅海** 由上述实验条件探索可知, 黄海浅海沉积物表层样品的植物 DNA 最佳提取条件和使用 gh 引物时的最佳扩增条件为: 使用 DNeasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒加入 2 g 样品进行提取, 使用 25 μL PCR 反应体系(Fishback *et al.*, 1999; Moore, 2005; Lee, 2010; Pan *et al.*, 2010; Saingam *et al.*, 2018)包括 12.5 μL 2× TransTaq HiFi PCR SuperMix I, 正、反引物各 0.5 μL, 2 μL DNA 模板, 去离子水 9.5 μL; 优化后的 PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 45 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。在优化的组合条件下对黄海浅海沉积物样品进行 PCR 扩增, 结果如图 7b 所示。可以看出, 浅海 6 个站位的样品均能通过 gh 引物扩增出位置正确、清晰且明亮的条带, 表明 gh 引物在优化的实验条件下能够正确高效的扩增出浅海沉积物表层样品的植物 DNA 片段(张祥等, 2012)。

### 3.3 引物的对比

使用优化后的实验条件对含有 gh 引物的 PCR 体系进行扩增, 并与 rbcL 引物的扩增结果进行比较。由图 7 和图 8 可以看出, 99~107 号泳道虽然可以扩增出清晰明亮的条带, 但是有引物二聚体(Kolocheva *et al.*, 1993; Kusumoto *et al.*, 2004; Desmarais *et al.*, 2012; Poritz *et al.*, 2014; Satterfield, 2014; Chen *et al.*, 2016; Meagher *et al.*, 2018; Johnston *et al.*, 2019; Hendling *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2022)产生, 尽管后期可以通过切



胶回收去除引物二聚体(Brownie *et al*, 1997; Høgdall *et al*, 1999; 黄天谊等, 2005; Salimullah *et al*, 2009; Li *et al*, 2017; Tian *et al*, 2018; Soares *et al*, 2021), 但在增加了工作量的同时还容易引起不必要的误差(Buck *et al*, 1999; Nybo, 2011; Vandenbroucke *et al*, 2011; Karakuş *et al*, 2017; Yazdi *et al*, 2018; Xie *et al*, 2022); 而 90~98 号泳道的目的条带清晰、明亮且无杂带和拖带现象, 说明利用优化后的组合实验条件对含有 gh 引物的 PCR 体系进行扩增的结果明显优于 rbcL 引物的扩增结果。因此, gh 引物是理想的扩增海洋沉积物中植物 DNA 的引物, 并且该引物具有较好的通用性, 适用于潮间带和浅海沉积物表层样品(彭程等, 2012)。

#### 4 结论与展望

本研究通过对比不同海区沉积物表层样品的 DNA 提取方法以及所选取的两组引物(即 gh 引物和 rbcL 引物)对沉积物中 DNA 进行的 PCR 扩增结果, 得出如下结论:

(1) 对于黄海潮间带表层沉积物样品, 建议使用 DNeasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取, 使用 2× TransTaq HiFi PCR SuperMix I 并加入 2 μL DNA 模板进行 PCR 扩增, 最佳退火温度为 55 °C, 最佳循环数为 55 个循环。

(2) 对于黄海浅海表层沉积物样品, 建议使用 DNeasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取, 样品加入量为 2 g, 使用 2× TransTaq HiFi PCR SuperMix I, 最佳退火温度为 59 °C, 最佳循环数为 45 个循环。

(3) 在引物选择方面, 与 gh 引物相比, rbcL 引物虽然更容易扩增出目的条带, 但同时伴随有引物二聚体产生, 因此针对类似的潮间带和浅海样品, 本文推荐使用 gh 引物进行 PCR 扩增。

综上所述, 本研究探索并优化了海洋沉积物中植物 DNA 的提取和 PCR 扩增条件, 同时证实了海洋沉积物能够有效保存植物的 DNA, 不仅为海洋沉积物中植物分子生物学研究提供了理论和技术支持, 更为陆地植被重建领域开拓了新思路。

#### 参 考 文 献

马瑞丰, 张威, 刘亮, 等, 2020. 沉积植物古 DNA 技术在古植被重建中的应用[J]. 沉积学报, 38(6): 1179-1191.  
王彦坤, 李天楚, 粘景梓, 等, 2020. 通用引物双重 PCR 在节肢动物物种鉴定中的应用[J]. 昆虫学报, 63(1): 97-103.

王爱娜, 王灏, 李殿荣, 等, 2012. 琼脂糖与聚丙烯酰胺凝胶电泳在 SSR 鉴定杂交油菜种子纯度中的比较[J]. 西北农业学报, 21(8): 101-106.  
左丽娟, 高勇, 张庙见, 等, 2011. 植物高度同源重复基因的 PCR 检测[J]. 四川大学学报(自然科学版), 48(3): 679-684.  
龙平, 崔占虎, 李虔全, 等, 2013. 基于位点特异性 PCR 的黄芪与红芪鉴别方法研究[J]. 中国中药杂志, 38(16): 2581-2585.  
田孟祥, 张时龙, 余本勋, 等, 2015. 一种应用 PCR 缓冲液快速制备水稻 DNA 模板的方法[J]. 分子植物育种, 13(2): 438-442.  
冉姝, 周国燕, 王景宇, 等, 2008. 聚合酶链式反应变性及退火温度与产物假阴性之间的关系[J]. 中国生物制品学杂志, 21(11): 1016-1018, 1029.  
严东娜, 徐海, 侯卫国, 2019. 现代分子生物学技术在湖泊沉积物古 DNA 研究中的应用[J]. 生态学杂志, 38(7): 2200-2209.  
李宗菊, 熊丽, 桂敏, 等, 2004. 非洲菊基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增模板浓度优化[J]. 云南植物研究, 26(4): 439-444.  
李海阔, 曹雪雁, 周智磊, 等, 2009. 纳米金增强复杂体系中 PCR 扩增低拷贝基因的反应特异性初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 29(8): 75-80.  
沈阳阳, 类彦立, 李浩天, 等, 2020. 不同 PCR 引物对多种海洋生境沉积物中的有孔虫 DNA 扩增效能的比较研究[J]. 微体古生物学报, 37(4): 368-380.  
宋美茹, 姚萍, 张跃新, 2012. QIAamp 及 Biomed 粪便细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取人肠道细菌基因组 DNA 质量的差异[J]. 中国组织工程研究, 16(11): 2015-2018.  
张佳华, 姚凤梅, 2000. 陆地表面复杂过程中植物生态系统的作用[J]. 水土保持学报, 14(4): 55-59.  
张部昌, 赵志虎, 于秀琴, 等, 2002. 富含 GC DNA PCR 扩增条件的优化[J]. 军事医学科学院院刊, 26(4): 257-261.  
张祥, 李晓博, 谷素美, 等, 2012. 不同肠球菌基因组 DNA 提取方法对 PCR 鉴定的影响[J]. 河南农业大学学报, 46(1): 67-71.  
陈立, 姜莉, 罗阳, 等, 2004. 一种从人血凝块中提取基因组 DNA 的方法[J]. 细胞生物学杂志, 26(5): 548-549.  
林清, 施苏华, 彭平安, 等, 2002. 青藏高原多年冻土沉积物中埋藏植物 DNA 特征的初步分析[J]. 冰川冻土, 24(1): 28-31.  
法文龙, 李浩天, 李青霞, 等, 2022. 黄海沉积物柱状样中有孔虫古 DNA 的提取和 PCR 扩增的方法学初探[J]. 微体古生物学报, 39(1): 70-84.  
徐鹏昊, 罗武松, 何恩明, 等, 2018. 16S rDNA 特异性引物设计优化及其在湛江鲈体表微生物鉴定中的应用[J]. 复旦学报(自然科学版), 57(1): 59-67, 78.  
黄天谊, 王世海, 黎学铭, 等, 2005. 标签引物-套式/多重 PCR 检测恶性疟原虫和间日疟原虫的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 23(3): 140-142.  
彭程, 刘全兰, 王洪光, 等, 2012. 山东鹅观草 SSR-PCR 反应体系的优化和验证[J]. 生物学杂志, 29(2): 91-94.  
程远霞, 刘宝林, 华泽钊, 等, 2008. 变性温度和时间对实时定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 12(44): 8677-8680.

- 蔡杰, 王博, 胡孙林, 等, 2022. 玻璃珠-涡旋振荡改良法用于硅藻 DNA 提取[J]. 法医学杂志, 38(1): 119-126.
- ADOLE T, DASH J, ATKINSON P M, 2016. A systematic review of vegetation phenology in Africa [J]. *Ecological Informatics*, 34: 117-128.
- AHL D E, GOWER S T, BURROWS S N, *et al*, 2006. Monitoring spring canopy phenology of a deciduous broadleaf forest using MODIS [J]. *Remote Sensing of Environment*, 104(1): 88-95.
- BÁLINT M, PFENNINGER M, GROSSART H P, *et al*, 2018. Environmental DNA time series in ecology [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(12): 945-957.
- BARRERA G, MURCIA J, CERÓN J, *et al*, 2016. PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus [J]. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2): 24-31.
- BRADLEY B J, STILLER M, DORAN-SHEEHY D M, *et al*, 2007. Plant DNA sequences from feces: potential means for assessing diets of wild primates [J]. *Am J Primatol* 69(6): 699-705.
- BROUDE N E, ZHANG L G, WOODWARD K, *et al*, 2001. Multiplex allele-specific target amplification based on PCR suppression [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1): 206-211.
- BROWN T A, ALLABY R G, BROWN K A, *et al*, 1993. Biomolecular archaeology of wheat: past, present and future [J]. *World Archaeology*, 25(1): 64-73.
- BROWNIE J, SHAWCROSS S, THEAKER J, *et al*, 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 25(16): 3235-3241.
- BUCK G A, FOX J W, GUNTHORPE M, *et al*, 1999. Design strategies and performance of custom DNA sequencing primers [J]. *Biotechniques*, 27(3): 528-536.
- CARVALHO I A, SCHWARZ D G G, PIETRALONGA P A G, *et al*, 2016. Presença de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em pacientes brasileiros com doença inflamatória intestinal e em controles [J]. *Sao Paulo Medical Journal*, 134(1): 13-19.
- CHATTERJEE P K, BAKER J C JR, 2004. Preparing nested-deletion template DNA for field inversion gel electrophoresis analyses and position-specific end sequencing with transposon primers [M] // ZHAO S Y, STODOLSKY M. *Bacterial Artificial Chromosomes*. Totowa: Humana Press: 243-254.
- CHAUDHRY U, SALUJA D, 1999. Detection of *Neisseria Gonorrhoeae* by polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 14(2): 135-142.
- CHEN M H, LI Q Y, ZHANG L L, *et al*, 2008. Systematic biotic responses to palaeoenvironmental change in the Late Pleistocene southern South China Sea: a preliminary study [J]. *Journal of Quaternary Science*, 23(8): 803-815.
- CHEN H J, XU Z K, BAYON G, *et al*, 2022. Enhanced hydrological cycle during Oceanic Anoxic Event 2 at southern high latitudes: new insights from IODP Site U1516 [J]. *Global and Planetary Change*, 209: 103735.
- CHEN F, ZHANG D X, ZHANG Q, *et al*, 2016. Zero-background helicase-dependent amplification and its application to reliable assay of telomerase activity in cancer cell by eliminating primer-dimer artifacts [J]. *Chembiochem*, 17(12): 1171-1176.
- CHUNG S M, STAUB J E, 2003. The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4): 757-767.
- CHYTRÝ M, SCHAMINÉE J H J, SCHWABE A, 2011. Vegetation survey: a new focus for *Applied Vegetation Science* [J]. *Applied Vegetation Science*, 14(4): 435-439.
- COMPTON J, 1991. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Nature*, 350(6313): 91-92.
- CORINALDESI C, BEOLCHINI F, DELL'ANNO A, 2008. Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: implications for the preservation of gene sequences [J]. *Molecular Ecology*, 17(17): 3939-3951.
- COSTANZA R, DE GROOT R, SUTTON P, *et al*, 2014. Changes in the global value of ecosystem services [J]. *Global Environmental Change*, 26: 152-158.
- CUNI-SANCHEZ A, SULLIVAN M J P, PLATTS P J, *et al*, 2021. High aboveground carbon stock of African tropical montane forests [J]. *Nature*, 596(7873): 536-542.
- DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, *et al*, 2014. Isothermal recombinase polymerase amplification assay applied to the detection of group B streptococci in vaginal/anal samples [J]. *Clinical Chemistry*, 60(4): 660-666.
- DANOVARO R, CARUGATI L, BERZANO M, *et al*, 2016. Implementing and innovating marine monitoring approaches for assessing marine environmental status [J]. *Frontiers in Marine Science*, 3: 213.
- DESMARAIS S M, LEITNER T, BARRON A E, 2012. Quantitative experimental determination of primer-dimer formation risk by free-solution conjugate electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 33(3): 483-491.
- DONG S S, LEI Y L, LI T G, *et al*, 2020. Response of benthic foraminifera to pH changes: community structure and morphological transformation studies from a microcosm experiment [J]. *Marine Micropaleontology*, 156: 101819.
- ERB K H, KASTNER T, PLUTZAR C, *et al*, 2018. Unexpectedly large impact of forest management and grazing on global vegetation biomass [J]. *Nature*, 553(7686): 73-76.
- ESTRADA O, BREEN J, RICHARDS S M, *et al*, 2018. Ancient plant DNA in the genomic era [J]. *Nature Plants*, 4(7): 394-396.
- EVANS J S, LÓPEZ-LEGENTIL S, ERWIN P M, 2018. Comparing two common DNA extraction kits for the characterization of symbiotic microbial communities from ascidian tissue [J]. *Microbes and Environments*, 33(4): 435-439.
- FARRELL C, SZOTA C, ARNDT S K, 2015. Urban plantings: 'living laboratories' for climate change response [J]. *Trends in Plant Science*, 20(10): 597-599.
- FISHBACK A G, DANZMANN R G, SAKAMOTO T, *et al*, 1999.

- Optimization of semi-automated microsatellite multiplex polymerase chain reaction systems for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 172(3/4): 247-254.
- GOMEZ M, WU X M, WANG Y L, 2005. Detection of BCL2-IGH using single-round PCR assays [J]. *Diagnostic Molecular Pathology*, 14(1): 17-22.
- HAMAJIMA N, SAITO T, MATSUO K, *et al*, 2002. Competitive amplification and unspecific amplification in polymerase chain reaction with confronting two-pair primers [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 4(2): 103-107.
- HE C Z, ZHANG K H, WANG T, *et al*, 2013. Single-primer-limited amplification: a method to generate random single-stranded DNA sub-library for aptamer selection [J]. *Analytical Biochemistry*, 440(1): 63-70.
- HEINZE B, 2007. A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants [J]. *Plant Methods*, 3: 4.
- HENDLING M, BARIŠIĆ I, 2021. Computational design of multiplex oligonucleotide-based assays [M] // MARCHISIO M A. *Computational Methods in Synthetic Biology*. 2nd ed. New York: Humana: 19-30.
- HØGDALL E, BOYE K, VUUST J, 1999. Simple preparation method of PCR fragments for automated DNA sequencing [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 73(4): 433-436.
- HUBBARD R N L B, BOULTER M C, 1983. Reconstruction of Palaeogene climate from palynological evidence [J]. *Nature*, 301(5896): 147-150.
- JAROSZ W, DURANT J F, IRENGE L M W B, *et al*, 2021. Optimized DNA-based identification of *Toxocara* spp. eggs in soil and sand samples [J]. *Parasites & Vectors*, 14(1): 426.
- JIAN Z M, JIANG S J, JORDAN R W, 2020. Progress of micropaleontological research in the western Pacific marginal seas [J]. *Marine Micropaleontology*, 161: 101938.
- JIAN Z M, JIN H Y, KAMINSKI M A, *et al*, 2019. Discovery of the marine Eocene in the northern South China Sea [J]. *National Science Review*, 6(5): 881-885.
- JOHNSTON A D, LU J, RU K L, *et al*, 2019. PrimerROC: accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis [J]. *Scientific Reports*, 9(1): 209.
- KARAKUŞ M, YILMAZ B, ÖZBEL Y, *et al*, 2017. A new cost and time effective method for multilocus microsatellite typing (MLMT) studies: application of *Leishmania tropica* isolates and clinical samples from Turkey [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 141: 97-100.
- KERN R A, SCHLESINGER W H, 1992. Carbon stores in vegetation [J]. *Nature*, 357(6378): 447-448.
- KOLOCHEVA T I, LOKHOVA I A, TANSYKBAEV T A, *et al*, 1993. Recognition of T-T cyclobutane pyrimidine dimers in the form of primers by DNA polymerases [J]. *Molekuliarnaia Biologiia*, 27(6): 1386-1393.
- KORBIE D J, MATTICK J S, 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification [J]. *Nature Protocols*, 3(9): 1452-1456.
- KUSUMOTO R, MASUTANI C, SHIMMYO S, *et al*, 2004. DNA binding properties of human DNA polymerase : implications for fidelity and polymerase switching of translesion synthesis [J]. *Genes To Cells*, 9(12): 1139-1150.
- LARSEN A M, MOHAMMED H H, ARIAS C R, 2015. Comparison of DNA extraction protocols for the analysis of gut microbiota in fishes [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 362(5): fnu031.
- LEAR G, DICKIE I, BANKS J, *et al*, 2018. Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples [J]. *New Zealand Journal of Ecology*, 42(1): 10(1A-50A).
- LEE D S, 2010. Real-time PCR machine system modeling and a systematic approach for the robust design of a real-time PCR-on-a-chip system [J]. *Sensors*, 10(1): 697-718.
- LEE J H, PARK Y, CHOI J R, *et al*, 2010. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory [J]. *Yonsei Medical Journal*, 51(1): 104-110.
- LEI Y L, LI T G, BI H S, *et al*, 2015. Responses of benthic foraminifera to the 2011 oil spill in the Bohai Sea, PR China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 96(1/2): 245-260.
- LEI Y L, LI T G, NIGAM R, *et al*, 2017. Environmental significance of morphological variations in the foraminifer *Ammonia aomoriensis* (Asano, 1951) and its molecular identification: a study from the Yellow Sea and East China Sea, PR China [J]. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 483: 49-57.
- LEI Y L, STUMM K, WICKHAM S A, *et al*, 2014. Distributions and biomass of benthic ciliates, foraminifera and amoeboid protists in marine, brackish, and freshwater sediments [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61(5): 493-508.
- LELI C, DI MATTEO L, GOTTA F, *et al*, 2019. Diagnostic accuracy of a commercial multiplex PCR for the diagnosis of meningitis and encephalitis in an Italian general hospital [J]. *Le Infezioni in Medicina*, 27(2): 141-148.
- LEMMER K, MANTKE O D, BAE H G, *et al*, 2004. External quality control assessment in PCR diagnostics of dengue virus infections [J]. *Journal of Clinical Virology*, 30(4): 291-296.
- LÉZINE A M, IZUMI K, KAGEYAMA M, *et al*, 2019. A 90 000-year record of Afrotropical forest responses to climate change [J]. *Science*, 363(6423): 177-181.
- LI Y, GAO L M, POUDEL R C, *et al*, 2011. High universality of *matK* primers for barcoding gymnosperms [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3): 169-175.
- LI S L, GU Y, LYU Y, *et al*, 2017. Integrated graphene oxide purification-lateral flow test strips (iGOP-LFSTs) for direct detection of PCR products with enhanced sensitivity and specificity [J]. *Analytical Chemistry*, 89(22): 12137-12144.
- LI Q X, LEI Y L, MORARD R, *et al*, 2020. Diversity hotspot and unique community structure of foraminifera in the world's deepest marine blue hole-Sansha Yongle Blue Hole [J]. *Scientific Reports*, 10(1): 10257.
- LI J R, SHI X F, LIU S F, *et al*, 2021a. Frequency of deep-sea turbidity as an important component of the response of a source-to-sink system to climate: a case study in the eastern Middle Bengal Fan since 32ka [J]. *Marine Geology*, 441:

- 106603.
- LI K, STOOFF-LEICHSENBERG K R, LIU S S, *et al*, 2021b. Plant sedimentary DNA as a proxy for vegetation reconstruction in eastern and northern Asia [J]. *Ecological Indicators*, 132: 108303.
- LIM H J, CHOI J H, SON A, 2017. Necessity of purification during bacterial DNA extraction with environmental soils [J]. *Environmental Health and Toxicology*, 32: e2017013.
- MA J, GUAN S C, YAO D, *et al*, 2011a. Problems with and a system to eliminate single-primer PCR product contamination in simple sequence repeat molecular marker-assisted selection in soybean [J]. *Genetics and Molecular Research*, 10(3): 1659-1668.
- MA L, HE S B, HUANG J, *et al*, 2009. Maximizing specificity and yield of PCR by the quantum dot itself rather than property of the quantum dot surface [J]. *Biochimie*, 91(8): 969-973.
- MA J, WANG P W, YAO D, *et al*, 2011b. Single-primer PCR correction: a strategy for false-positive exclusion [J]. *Genetics and Molecular Research*, 10(1): 150-159.
- MATTEI V, MURUGESAN S, AL HASHMI M, *et al*, 2019. Evaluation of methods for the extraction of microbial DNA from vaginal swabs used for microbiome studies [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9: 197.
- MEAGHER R J, PRIYE A, LIGHT Y K, *et al*, 2018. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA [J]. *Analyst*, 143(8): 1924-1933.
- MISHRA R N, SINGLA-PAREEK S L, NAIR S, *et al*, 2002. Directional genome walking using PCR [J]. *Biotechniques*, 33(4): 830-834.
- MOORE P, 2005. Replicating success [J]. *Nature*, 435(7039): 235.
- MUHONG C, LANLAN Z, LILI Z, *et al*, 2008. Preservation of radiolarian diversity and abundance in surface sediments of the South China Sea and its environmental implication [J]. *Journal of China University of Geosciences*, 19(3): 217-229.
- NYBO K, 2011. qPCR: avoiding signals in the no-template control [J]. *BioTechniques*, 50(4): 213-215.
- OMORI Y, TANIGAMI A, SUGANO S, 2000. Comparative PCR: a simple and sensitive method for quantifying low-abundance mRNA species [J]. *Genomics*, 67(2): 140-145.
- OSBORNE B I, 1992. HyperPCR: a Macintosh Hypercard program for the determination of optimal PCR annealing temperature [J]. *Bioinformatics*, 8(1): 83.
- PAGANI M, CALDEIRA K, BERNER R, *et al*, 2009. The role of terrestrial plants in limiting atmospheric CO<sub>2</sub> decline over the past 24 million years [J]. *Nature*, 460(7251): 85-88.
- PAN X Y, JIANG L, LIU K Y, *et al*, 2010. A microfluidic device integrated with multichamber polymerase chain reaction and multichannel separation for genetic analysis [J]. *Analytica Chimica Acta*, 674(1): 110-115.
- PEARMAN J K, KEELEY N B, WOOD S A, *et al*, 2020a. Comparing sediment DNA extraction methods for assessing organic enrichment associated with marine aquaculture [J]. *PeerJ*, 8: e10231.
- PEARMAN W S, WELLS S J, SILANDER O K, *et al*, 2020b. Concordant geographic and genetic structure revealed by genotyping-by-sequencing in a New Zealand marine isopod [J]. *Ecology and Evolution*, 10(24): 13624-13639.
- PORITZ M A, RIRIE K M, 2014. Getting things backwards to prevent primer dimers [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16(2): 159-162.
- QI J, MARSETT R C, MORAN M S, *et al*, 2000. Spatial and temporal dynamics of vegetation in the San Pedro River Basin area [J]. *Agricultural and Forest Meteorology*, 105(1/2/3): 55-68.
- QUIRÓS E, PIÉDROLA G, MAROTO C, 1998. GBV-RNA detection by polymerase chain reaction with several primer pairs [J]. *Microbios*, 95(381): 125-130.
- RAMÍREZ G A, GRAHAM D, D'HONDT S, 2018. Influence of commercial DNA extraction kit choice on prokaryotic community metrics in marine sediment [J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(9): 525-536.
- RIERA M A, ROJAS M E, ZAPATA P D, 2010. Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre [J]. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 12(14): 4-7.
- ROBERTS D A, BIRCHENOUGH S N R, LEWIS C, *et al*, 2013. Ocean acidification increases the toxicity of contaminated sediments [J]. *Global Change Biology*, 19(2): 340-351.
- SAIKI R K, GELFAND D H, STOFFEL S, *et al*, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [J]. *Science*, 239(4839): 487-491.
- SAINGAM P, LI B, YAN T, 2018. Use of amplicon sequencing to improve sensitivity in PCR-based detection of microbial pathogen in environmental samples [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 149: 73-79.
- SALIMULLAH M, KATO S, MURATA M, *et al*, 2009. Tunable fractionation of nucleic acids [J]. *Biotechniques*, 47(6): 1041-1043.
- SANCHEZ O, GASOL J M, MASSANA R, *et al*, 2007. Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer sets for the study of marine bacterioplankton communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18): 5962-5967.
- SATTERFIELD B C, 2014. Cooperative primers: 2.5 million-fold improvement in the reduction of nonspecific amplification [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16(2): 163-173.
- SHANG Y, ZHU P Y, XU W T, *et al*, 2013. Single universal primer multiplex ligation-dependent probe amplification with sequencing gel electrophoresis analysis [J]. *Analytical Biochemistry*, 443(2): 243-248.
- SHAO K K, SHI X H, ZHU X J, *et al*, 2017. Construction and optimization of an efficient amplification method of a random ssDNA library by asymmetric emulsion PCR [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(2): 239-243.
- SIPOS R, SZÉKELY A J, PALATINSZKY M, *et al*, 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community

- analysis [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(2): 341-350.
- SOARES R R G, AKHTAR A S, PINTO I F, *et al*, 2021. Sample-to-answer COVID-19 nucleic acid testing using a low-cost centrifugal microfluidic platform with bead-based signal enhancement and smartphone read-out [J]. *Lab on a Chip*, 21(15): 2932-2944.
- SONG F C, KUEHL J V, CHANDRAN A, *et al*, 2021. A simple, cost-effective, and automation-friendly direct PCR approach for bacterial community analysis [J]. *mSystems*, 6(5): e0022421.
- STILLER M, FULTON T L, 2012. Multiplex PCR amplification of ancient DNA [M] // SHAPIRO B, HOFREITER M. *Ancient DNA: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press: 133-141.
- SUN Z B, HUANG Y, WANG Y Z, *et al*, 2014. Potassium hydroxide-ethylene diamine tetraacetic acid method for the rapid preparation of small-scale PCR template DNA from actinobacteria [J]. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 29(1): 42-46.
- TABERLET P, COISSAC E, POMPANON F, *et al*, 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding [J]. *Nucleic Acids Res* 35(3): e14.
- TAMARAPU S, MCKILLIP J L, DRAKE M, 2001. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products [J]. *Journal of Food Protection*, 64(5): 664-668.
- TAUBERT F, FISCHER R, GROENEVELD J, *et al*, 2018. Global patterns of tropical forest fragmentation [J]. *Nature*, 554(7693): 519-522.
- TEMESGEN T T, BARLAAM A, TYSNES K R, *et al*, 2020. Comparative evaluation of UNEX-based DNA extraction for molecular detection of *Cyclospora cayatanensis*, *Toxoplasma gondii*, and *Cryptosporidium parvum* as contaminants of berries [J]. *Food Microbiology*, 89: 103447.
- THOMPSON K A, NEWMASER S G, 2014. RETRACTED ARTICLE: molecular taxonomic tools provide more accurate estimates of species richness at less cost than traditional morphology-based taxonomic practices in a vegetation survey [J]. *Biodiversity and Conservation*, 23(6): 1411-1424.
- TIAN J J, HUANG K L, LUO Y B, *et al*, 2018. Visual single cell detection of dual-pathogens based on multiplex super PCR (MS-PCR) and asymmetric tailing HCR (AT-HCR) [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 260: 870-876.
- TONOOKA Y, FUJISHIMA M, 2009. Comparison and critical evaluation of PCR-mediated methods to walk along the sequence of genomic DNA [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1): 37-43.
- VAN DER LOOS L M, NIJLAND R, 2021. Biases in bulk: DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved [J]. *Molecular Ecology*, 30(13): 3270-3288.
- VANDENBROUCKE I, VAN MARCK H, VERHASSELT P, *et al*, 2011. Minor variant detection in amplicons using 454 massive parallel pyrosequencing: experiences and considerations for successful applications [J]. *Biotechniques*, 51(3): 67-77.
- VOLDSTAD L H, ALSOS I G, FARNSWORTH W R, *et al*, 2020. A complete Holocene lake sediment ancient DNA record reveals long-standing high Arctic plant diversity hotspot in northern Svalbard [J]. *Quaternary Science Reviews*, 234: 106207.
- WANG P X, CLEMENS S, TADA R, *et al*, 2019a. Blowing in the monsoon wind [J]. *Oceanography*, 32(1): 48-59.
- WANG R H, FAN Z L, ZHANG H Z, *et al*, 2002. Remote sensing analysis of desert vegetation and its landscape changes: the case in Middle reaches of Tarim River Basin, Xinjiang, China [J]. *Science in China Series D: Earth Sciences*, 45(1): 54-58.
- WANG P X, JIAN Z M, 2019b. Exploring the deep South China Sea: retrospects and prospects [J]. *Science China Earth Sciences*, 62(10): 1473-1488.
- WANG R J, POLYAK L, XIAO W S, *et al*, 2018. Late-Middle Quaternary lithostratigraphy and sedimentation patterns on the Alpha Ridge, central Arctic Ocean: implications for Arctic climate variability on orbital time scales [J]. *Quaternary Science Reviews*, 181: 93-108.
- WILLERSLEV E, DAVISON J, MOORA M, *et al*, 2014. Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet [J]. *Nature*, 506(7486): 47-51.
- WILLERSLEV E, HANSEN A J, BINLADEN J, *et al*, 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments [J]. *Science*, 300(5620): 791-795.
- WILLIS K J, KLECZKOWSKI A, CROWHURST S J, 1999. 124 000-year periodicity in terrestrial vegetation change during the Late Pliocene Epoch [J]. *Nature*, 397(6721): 685-688.
- XIE N G, WANG M X, SONG P, *et al*, 2022. Designing highly multiplex PCR primer sets with Simulated Annealing Design using Dimer Likelihood Estimation (SADDLE) [J]. *Nature Communications*, 13(1): 1881.
- XIONG Z F, LI T G, HÖNISCH B, *et al*, 2022. Monsoon- and ENSO-driven surface-water pCO<sub>2</sub> variation in the tropical West Pacific since the Last Glacial Maximum [J]. *Quaternary Science Reviews*, 289: 107621.
- YANG Z B, LEI Y L, ROSENTHAL Y, *et al*, 2021. Late Pleistocene climate induced changes in paleo-vegetation in Borneo: possible implications to human divergence [J]. *Quaternary Science Reviews*, 267: 107109.
- YANG Z B, LI T G, LEI Y L, *et al*, 2020b. Vegetation evolution-based hydrological climate history since LGM in southern South China Sea [J]. *Marine Micropaleontology*, 156: 101837.
- YAZDI S M H T, KIAH H M, GABRYS R, *et al*, 2018. Mutually uncorrelated primers for DNA-based data storage [J]. *IEEE Transactions on Information Theory*, 64(9): 6283-6296.
- ZENG L L, WARDLOW B D, XIANG D X, *et al*, 2020. A review of vegetation phenological metrics extraction using time-series, multispectral satellite data [J]. *Remote Sensing of Environment*, 237: 111511.
- ZHANG L S, BECQUET V, LI S H, *et al*, 2003. Optimization of



- multiplex PCR and multiplex gel electrophoresis in sunflower SSR analysis using infrared fluorescence and tailed primers [J]. *Acta Botanica Sinica*, 45(11): 1312-1318.
- ZHANG D, LI W, ZHANG S, *et al*, 2011. Evaluation of the impact of DNA extraction methods on BAC bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 53(1): 44-49.
- ZHANG T L, WANG R J, XIAO W S, *et al*, 2021. Characteristics of terrigenous components of Amerasian Arctic Ocean surface sediments: implications for reconstructing provenance and transport modes [J]. *Marine Geology*, 437: 106497.
- ZHOU T C, SHI X F, HUANG M, *et al*, 2021. Genesis of REY-rich deep-sea sediments in the Tiki Basin, eastern South Pacific Ocean: evidence from geochemistry, mineralogy and isotope systematics [J]. *Ore Geology Reviews*, 138: 104330.

## METHODOLOGICAL EXPLORATION OF PLANT DNA EXTRACTION AND PCR AMPLIFICATION FROM INTERTIDAL AND SHALLOW SEA SEDIMENTS OF THE YELLOW SEA

CHEN Jia-Xin<sup>1,3</sup>, LIU Jia-Wen<sup>1,3</sup>, FA Wen-Long<sup>1,3</sup>, LI Hao-Tian<sup>1,3</sup>, LEI Yan-Li<sup>1,2,3</sup>

(1. *Laboratory of Marine Organism Taxonomy and Phylogeny, Qingdao Key Laboratory of Marine Biodiversity and Conservation, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*; 2. *Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhuhai), Zhuhai 519082, China*; 3. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract** Information of plant in marine sediments has important ecological and paleoenvironmental significance. However, traditional methods can only obtain plant information by studying sporopollen in sediment. With the progress of molecular biology, exploring the use of plant molecular diversity in marine sediment has become a new attempt to explain global changes. This study is the first attempt to extract and PCR-amplify plant DNA from marine sediment by using different DNA extraction methods (DNA extraction kits) and PCR amplification conditions (Mix, annealing temperature, number of cycles, DNA template Quantities and primer pairs), with which plant DNA extraction and PCR amplification in marine sediments were explored and tested for intertidal and shallow sea surface sediments. A total of 32 methods collected from the Yellow Sea were tested, and the results show that the DNeasy PowerSoil Soil Microbial DNA Extraction Kit and 2× TransTaq HiFi PCR SuperMix I were better for DNA extraction and amplification. For the intertidal surface sediment samples, the optimal annealing temperature was 55 °C, and the optimal number of cycling was 55 cycles; for the shallow sea surface sediment samples, it was 59 °C and 45, respectively. In addition, the amplification results of the *gh* primer were better than that of the *rbcL* primer. In this study, plant DNAs in marine sediments were successfully extracted and amplified for the first time, which provide a new technical approach for the analysis of plant molecular diversity in marine sediments and global environmental changes and terrestrial vegetation changes.

**Key words** molecular biology; marine sediments; plant DNA; methodology