

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180620001

http://www.yykxjz.cn/

李苗, 单秀娟, 王伟继, 吕丁, 戴芳群, 丁小松, 吴欢欢. 中国对虾生物量评估的环境DNA检测技术的建立及优化. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 12-19

Li M, Shan XJ, Wang WJ, Lü D, Dai FQ, Ding XS, Wu HH. Establishment and optimization of environmental DNA detection techniques for assessment of *Fenneropenaeus chinensis* biomass. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 12-19

# 中国对虾生物量评估的环境 DNA 检测技术的建立及优化\*

李 苗<sup>1,3</sup> 单秀娟<sup>2,3</sup> 王伟继<sup>2,3①</sup> 吕 丁<sup>3</sup>  
戴芳群<sup>2,3</sup> 丁小松<sup>1,3</sup> 吴欢欢<sup>3,4</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 近年来, 环境 DNA(Environmental DNA, eDNA)技术作为一种新的水生生物调查方法发展迅速, 在水生生态系统的研究领域被广泛应用到物种检测、生物多样性评价、生物量评估等方面。然而, 很少有研究专门评价 eDNA 技术操作流程中不同的 eDNA 富集方法与提取方法对研究结果的影响, 从而针对具体研究对象建立一套最佳的 eDNA 技术操作流程。此外, 由于物种间生活习性的差异, 不同物种释放到环境中的 DNA 量及 DNA 片段大小不同, 因而, 针对不同研究对象需采用不同的 eDNA 富集与提取方法。本研究以中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为研究对象, 采用滤膜法富集 eDNA, 结合血液与组织 DNA 提取试剂盒提取 eDNA。选取直径为 47 mm 的玻璃纤维膜、硝酸纤维膜、聚碳酸酯膜、尼龙膜共 4 种材质的滤膜, 每种滤膜根据其孔径大小设置 0.45、0.8、1.2、5 μm 共 4 个梯度, 取样水量设置 500 ml、1 L、2 L 共 3 个梯度。结果显示, 滤膜材质、滤膜孔径大小及取样水体体积均对中国对虾的定性分析与定量分析具有一定的影响, 其中, 0.45 μm 的玻璃纤维滤膜过滤 2 L 水样能够检测到的 DNA 拷贝数最多, 并依据此建立了一套中国对虾 eDNA 技术的操作流程, 提高了中国对虾的检出率, 为后续中国对虾的分布监测及生物量评估提供了基础。

**关键词** 中国对虾; eDNA; 建立; 优化

**中图分类号** S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)01-0012-08

保护多样性是生态学和保护生物学的主要目标 (Vermeulen *et al*, 2002), 也是政府制定相关保护措施与政策的根本依据。然而, 精确评价生物多样性、掌

握目标种的分布与生物量需要花费大量的人力、物力和财力, 尤其对于水生生物而言, 其特殊生存环境更是增加了研究的困难。

\* 国家重点基础研究发展计划(2015CB453303)和国家重点研发计划(2017YFE0104400)共同资助 [This work was supported by the National Basic Research Program of China (2015CB453303), and the National Key R&D Program of China (2017YFE0104400)]. 李 苗, E-mail: limiao0417@126.com

① 通讯作者: 王伟继, 研究员, E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-06-20, 收修改稿日期: 2018-07-18

随着分子生物学的高速发展,可以直接从环境样品中提取 DNA 片段,然后利用高通量测序及荧光定量 PCR 等技术进行物种定性或定量分析,即 eDNA (Environmental DNA, eDNA)技术(Ficetola *et al.*, 2008; Haile *et al.*, 2009; Bohmann *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2017; 单秀娟等, 2018), 这种技术作为一种新的物种监测方法应用到水生生物调查中。然而,由于物种之间的差异,其释放的 eDNA 量的多少与 eDNA 片段的大小各不相同(Geerts *et al.*, 2018)。因此,针对不同的研究对象应采用不同的 eDNA 富集与提取方法,以期达到最佳的研究效果。

自 20 世纪 80 年代以来,中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)资源严重衰退,目前其捕捞产量主要来源于增殖放流(袁伟等, 2015)。放流初期,其个体较小、游泳能力较弱,其群体数量相对较少,传统的方法难以准确监测。因此,为了能够准确掌握中国对虾的分布与资源量状况,合理开发利用其资源,本研究以渤海中国对虾为研究对象,采用滤膜法富集 eDNA,结合 DNeasy Blood and Tissue kit 提取 eDNA,最后应用实时荧光定量 PCR(绝对定量)分析 DNA 样品,建立了一套适于中国对虾研究的 eDNA 技术操作流程,旨在为中国对虾分布监测及其资源评估提供一种新的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 特异性引物设计

针对中国对虾的线粒体细胞色素酶氧化亚基 I (CO I)基因设计特异性引物。在 GenBank 数据库中

检索中国对虾 CO I 基因序列,利用 BioEdit 和 MEGA7 软件进行序列比对,使用 Primer Premier 6 与 Beacon Designer 8 软件设计引物与探针,并在 NCBI 网站上进行引物特异性测试。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详细信息见表 1。

### 1.2 中国对虾肌肉组织 DNA 提取及 PCR 扩增

中国对虾肌肉组织取自 2016 年 7 月渤海渔业资源调查捕获的中国对虾,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

DNA 提取采取传统的酚-氯仿-异戊醇方法,具体参照闫晗等(2012)的方法并做相应的改进,最后将提取的 DNA 溶液稀释到  $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ ,用  $1.5\text{ ml}$  无菌离心管  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。PCR 25  $\mu\text{l}$  体系:  $10\times\text{Taq Buffer}$   $2.5\text{ }\mu\text{l}$ , dNTPs(各  $2.5\text{ mmol/L}$ ) $0.5\text{ }\mu\text{l}$ , 正反向引物(CO I PF/CO I PR) ( $10\text{ mmol/L}$ )各  $0.5\text{ }\mu\text{l}$ , *Taq DNA Polymerase* ( $5\text{ U}/\mu\text{l}$ )  $0.5\text{ }\mu\text{l}$ , 模板 DNA( $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ )  $1\text{ }\mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$  ( $25\text{ mmol/L}$ )  $1.5\text{ }\mu\text{l}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$   $18\text{ }\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性  $3\text{ min}$ ;  $94^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  退火  $30\text{ s}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\text{ min}$ , 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  复延伸  $10\text{ min}$ 。引物对 CO I DF/CO I DR 的反应体系与反应条件与引物对 CO I PF/CO I PR 相同。

### 1.3 重组质粒标准品的制备

将 1.2 中的 PCR 产物纯化,连接到 pMD-18-T 质粒载体上,转化入大肠杆菌感受态细胞中,在 LB 固体平板培养基上过夜培养,挑取单菌落扩大培养进行质粒 DNA 提取,将质粒 DNA 稀释到特定浓度,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

表 1 中国对虾 mtDNA CO I 基因 PCR 扩增引物信息

Tab.1 Primer pairs for mtDNA CO I of *F. chinensis*

| 引物<br>Primer | 引物序列<br>Primer sequence (5'~3')          | 退火温度<br>Annealing temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 片段大小<br>Size (bp) |
|--------------|--|--|-------------------|
| CO I PF      | TTGTAGTTACAGCCCACGCT                     | 56.4   | 597               |
| CO I PR      | AAATTATCCCGAAGGCGGGT                     | 56.7   |                   |
| CO I DF      | AGGGGTAGGAACAGGATGAAC                    | 57.7   | 106               |
| CO I DR      | GACACCAGCTAGATGCAGCG                     | 59.1   |                   |
| Probe        | FAM-TCAGCTAGAATTGCTCATGCCGAGCTTCAGT-BHQ1 | 66.2   | 106               |

**1.3.1 PCR 产物纯化** 将 1.2 中 PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,选择电泳条带单一且明亮的产物使用 Gel Extraction Kit(OMEGA)试剂盒进行切胶回收,纯化的 PCR 产物  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。具体实验步骤参照说明书。

**1.3.2 质粒连接转化** 将经过纯化的 PCR 产物连接到 pMD-18-T 质粒载体(TaKaRa)上(具体操作详见说明书);将  $10\text{ }\mu\text{l}$  连接产物加入  $100\text{ }\mu\text{l}$  DH5 $\alpha$  感受态细胞(TaKaRa)中,冰浴  $30\text{ min}$ ;  $42^{\circ}\text{C}$  热激  $1\text{ min}$ , 将

重组质粒转化入感受态细胞;加入  $1\text{ ml}$  SOC 培养基,  $37^{\circ}\text{C}$   $150\text{ r/min}$  振荡培养  $1\text{ h}$ ;取  $150\text{ }\mu\text{l}$  菌液将其涂布在 LB 固体培养基上(含 Amp、X-gal、IPTG)上,  $37^{\circ}\text{C}$  倒置过夜培养;挑取 6 个白色单菌落分别置于  $1.5\text{ ml}$  离心管中培养,菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序;选取连接转化成功的菌液扩大培养。

**1.3.3 标准品制备** 将经过扩大培养的菌液使用 Plasmid Mini Kit(OMEGA)试剂盒进行质粒 DNA 提取(具体操作参照说明书),提取完成后,用紫外分光光

度计检测 DNA 浓度, 并将其稀释为  $10^8$  copies/ $\mu\text{l}$  的标准品,  $-80^\circ\text{C}$  保存。

#### 1.4 eDNA 样品采集

实验水样取自中国水产科学研究院黄海水产研究所水产遗传育种中心的中国对虾养殖池, 养殖池长 5.5 m、宽 3.6 m、高 1.2 m, 养殖水体体积为  $14\text{ m}^3$ 。其中, 对虾平均体重为 27 g, 每池 180 尾虾(中国对虾的体重及数量数据由基地工作人员收集)。

实验水样采集方案设计如下: 选取直径为 47 mm 的玻璃纤维膜、硝酸纤维膜、聚碳酸酯膜、尼龙膜共 4 种材质的滤膜, 每种滤膜根据其孔径大小设置 0.45、0.8、1.2、5  $\mu\text{m}$  共 4 个梯度, 取水量设置 500 ml、1 L、2 L 共 3 个梯度, 同一样本(即使用同一孔径与同一材质的滤膜过滤相同体积的水样)做 3 次技术重复。此外, 在养殖池入水口取 6 个平行样本作为阴性对照, 共计 150 个样本。取养殖池表层水, 采用无菌真空抽滤装置进行过滤, 每次过滤之前用无菌水冲洗过滤漏斗, 防止交叉污染。过滤完成后, 将每张滤膜单独卷起来, 放入 1.5 ml 离心管中并做好标记,  $-20^\circ\text{C}$  保存直至进行 DNA 提取。

#### 1.5 eDNA 提取

利用 DNeasy Blood and Tissue Kit(Qiagen, 德国)试剂盒提取 DNA, 参照 Renshaw 等(2015)的方法并加以改进。将滤膜取出解冻后, 用剪刀将滤膜剪成细条状, 放入 2 ml 的离心管中, 加入 570  $\mu\text{l}$  Buffer ATL 和 60  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K, 涡旋混匀, 恒温水浴 3 h (期间每隔 15 min 轻轻颠倒混匀); 加入 630  $\mu\text{l}$  Buffer AL, 涡旋震荡混匀; 加入 630  $\mu\text{l}$  无水乙醇, 涡旋震荡混匀; 将 2 ml 离心管中的混合液分 3 次转移到 DNeasy 离心柱中(离心柱每次能承载液体为 700  $\mu\text{l}$ ), 室温 8000 g 离心 1 min, 弃滤液及收集管; 将离心柱放入新收集管, 加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW1。室温 8000 g 离心 1 min, 弃滤液及收集管; 将离心柱放入新收集管中, 加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW2。室温 12000 g 离心 3 min, 弃滤液及收集管; 将离心柱放入新 1.5 ml 离心管中, 在离心柱中部加入 50  $\mu\text{l}$  Buffer TE, 室温孵育 1 min, 室温 8000 g 离心 1 min; 重复上一步骤以增大 DNA 产量。

#### 1.6 eDNA 的定量分析

所有提取的 eDNA 样品采用 BBI 生命科学有限公司的 2 $\times$  TaqMan Fast qPCR Master Mix (Low Rox) 实时荧光定量 PCR 试剂盒进行定量分析。PCR 反应体系采用 20  $\mu\text{l}$  体系: 10  $\mu\text{l}$  2 $\times$ TaqMan Fast qPCR

Master Mix, 0.4  $\mu\text{l}$  正向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.4  $\mu\text{l}$  反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.4  $\mu\text{l}$  探针(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 2  $\mu\text{l}$  模板 DNA, 6.8  $\mu\text{l}$  PCR 水。扩增反应程序采用两步法: (1)94 $^\circ\text{C}$  预变性 3 min; (2)94 $^\circ\text{C}$  变性 5 s, 60 $^\circ\text{C}$  退火延伸 34 s, 40 个循环。

标准品及每个 eDNA 样品做 3 个重复, 即每一采样类型 9 个重复(即使用同一孔径与同一材质的滤膜过滤相同体积的水样)(3 个 qPCR 重复 $\times$ 3 次取样重复), 每个 96 孔板做 3 个无模板空白对照以检测污染问题, 标准品浓度从  $10^7$  copies/ $\mu\text{l}$  以 10 倍为梯度稀释到  $10^2$  copies/ $\mu\text{l}$ 。最终的 eDNA 拷贝数取平均值, 实验数据采用绝对定量法分析。使用 Applied Biosystems ABI 7500 型定量 PCR 仪和 96 孔板(Thermo Fisher)进行 qPCR 扩增, 应用系统软件 SDS1.4.0.25 自动计算  $C_t$  值及生成标准曲线与扩增曲线。

#### 1.7 数据分析

数据分析与处理在 R.3.0.2 软件上进行, 使用 GAM 进行曲线拟合, 误差控制在 95% 的置信区间以内。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物特异性

本实验设计的引物成功扩增出了 597 bp 和 106 bp 的特异性目的片段, 与预期结果完全一致, 其测序结果在 NCBI 网站上经过 Blast 比对分析, 其结果显示与原始序列片段同源性达 100%。同时, 引物特异性通过对虾肌肉组织 DNA 的 PCR 扩增与琼脂糖凝胶电泳检测得到验证, 其目的条带单一且明亮, 结果如图 1 所示。

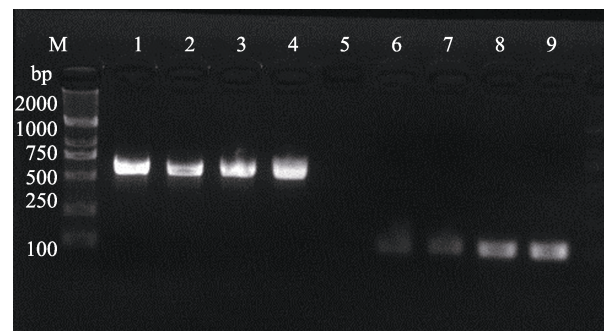


图 1 中国对虾 mtDNA CO I 的扩增结果

Fig.1 Amplification of mtDNA CO I of *F. chinensis*

M: DNA Marker DL 2000; 泳道 1~4: 引物 CO I PF/PR 的 PCR 产物; 泳道 5~9: 引物 CO I DF/DR 的 PCR 产物  
M: DNA Marker DL 2000; Lane 1~4: PCR products of CO I PF/PR; Lane 5~9: PCR products of CO I DF/DR

## 2.2 环境 DNA 样品采集

共采集 132 个样本: 养殖池入水口出 6 个; 玻璃纤维膜与硝酸纤维膜均取 36 个, 无堵塞现象出现; 聚碳酸酯膜为 30 个, 此材质的孔径大小为  $0.45\ \mu\text{m}$ , 在过滤 300 ml 水样后便被堵塞; 尼龙膜为 24 个, 此材质的孔径大小为  $0.45\ \mu\text{m}$ , 在过滤 150 ml 水样后堵塞, 而孔径大小为  $0.8\ \mu\text{m}$  的滤膜, 在过滤 350 ml 水样后堵塞。

在整个环境 DNA 水样采集过程发现, 用不同材质、相同孔径的滤膜过滤同一体积的水样, 用玻璃纤维膜过滤所用时间最短, 主要原因在于玻璃纤维膜的通透性最强。

## 2.3 DNA 检测

提取的中国对虾肌肉组织 DNA 纯度及浓度均较高, 其 PCR 产物电泳检测目的条带单一(图 1)。

eDNA 提取完成后, 紫外分光光度计检测显示, DNA 浓度最小值为  $12.23\ \text{ng}/\mu\text{l}$ , 最大为  $173.68\ \text{ng}/\mu\text{l}$ , 且大部分 DNA 样品的  $A_{260\ \text{nm}}/A_{280\ \text{nm}}$  值在 1.8~2.0 之间。此结果与已有研究结果相比, eDNA 浓度及纯度均较高, 这与取样的养殖池中国对虾密度较大且物种单一有关。此外, 物种之间的差异也导致了不同的 eDNA 释放速率与释放量。

## 2.4 标准曲线的制备

通过实时荧光定量 PCR 扩增, 系统根据荧光值的变化自动生成中国对虾 CO I 基因的标准曲线与扩增曲线(图 2)。曲线的相关系数  $R^2=0.993$ , 回归方程为  $Y=-3.531x+40.975$ , 说明本研究在稀释的质粒标准品浓度范围内具有良好的线性关系, 所建立的标准曲线能够正确反映出中国对虾 CO I 基因的扩增。

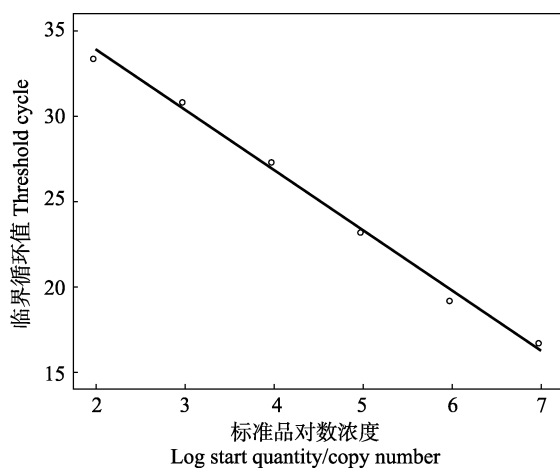


图 2 中国对虾 CO I 基因的 qPCR 标准曲线

Fig.2 The standard curve of qPCR of *F. chinensis* CO I gene

## 2.5 最佳滤膜及取水量筛选

通过实时荧光定量 PCR 的检测发现(图 3、图 4), 在滤膜未出现堵塞的情况下, 用同一材质、同一孔径的滤膜过滤不同体积的水样, 过滤的水样体积越大, 所提取的 DNA 浓度(copies/ $\mu\text{l}$ )及产量(copies)越大。在滤膜未出现堵塞的情况下, 用同一材质、不同孔径的滤膜过滤相同体积的水样, 滤膜孔径越大, 提取的 DNA 浓度及产量越小。通过对所有样品的检测, 结果显示, 使用  $0.45\ \mu\text{m}$  的玻璃纤维滤膜过滤 2 L 的水样能够提取到的 DNA 的浓度最高, 为  $1750\ \text{copies}/\mu\text{l}$ , 且其 eDNA 产量也最大。理论上, 随着取样水量的成倍增加, 所提取 eDNA 的浓度及产量的平均值均应该呈倍数关系增加, 但由于在实验操作的过程中存在一定的误差, 导致最终提取的 eDNA 浓度及产量并非呈严格的倍数关系递增。

## 3 讨论

与传统调查方法相比, eDNA 技术具有经济高效、省时省力、灵敏度高等特点, 对于资源衰退严重的物种, 此方法能更准确地反应其分布与资源量状况, 但不同水样采集方法、eDNA 富集方法及 eDNA 的提取方法均会对物种定性定量分析产生影响(Minamoto *et al*, 2016; Geerts *et al*, 2018)。

### 3.1 水样采集

Moyer 等(2014)对池塘表层水、中层水、底层水分析发现, 表层水与底层水的效果较好, 但海洋生态环境复杂, 不同于池塘, 已有研究采集的水样从 15 ml 至 10 L 不等, 以 1 L 与 2 L 为主(Rees *et al*, 2014)。本研究发现, 在滤膜没有堵塞之前, 采集水样体积越大, 获得 DNA 拷贝越多, 后期分析越有利, 由于海上调查时受时间限制, 建议过滤 2 L 水样为宜。

### 3.2 eDNA 富集方法

eDNA 富集方法通常有酒精沉淀(Thomsen *et al*, 2012)、离心(Klymus *et al*, 2015)及过滤(Jerde *et al*, 2011)三种方法。酒精沉淀法和离心法适合于小体积水样的 eDNA 富集, 主要用于养殖池及其他人工水体等静水生态系统。由于目标种检出率受生物量影响, 相对于人工水体, 自然生态系统中目标种密度相对较小, 为了避免假阳性结果产生, 建议采用滤膜法采集水样, 以增加目标种的检出率, 尤其适合中国对虾这种资源衰退严重的物种。此外, 选用滤膜法更有利于样品保存, 有效防止 eDNA 的降解。

水生生物释放到环境中的有效 DNA 片段集中在

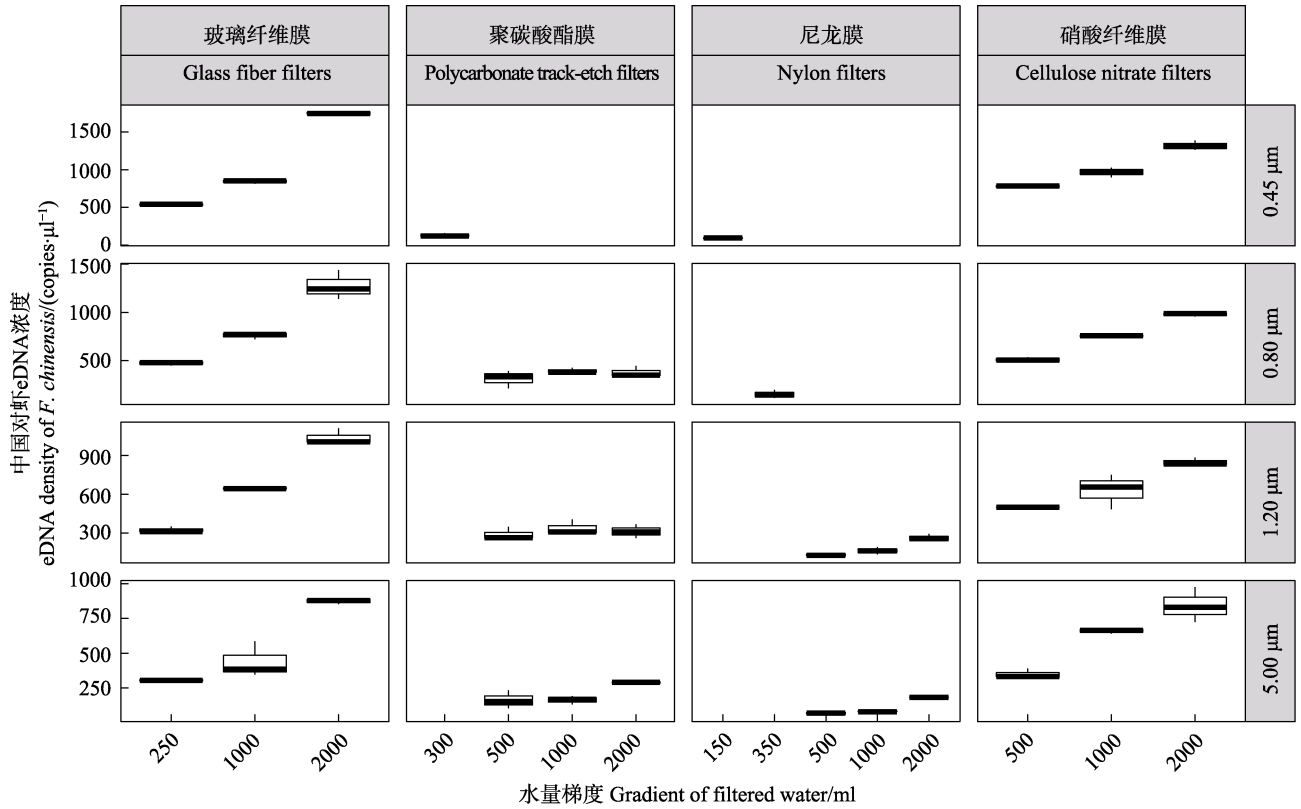


图3 不同滤膜类型及过滤水量所富集的 eDNA 的浓度

Fig.3 Concentration of eDNA enriched by different membrane and volume of filtered water

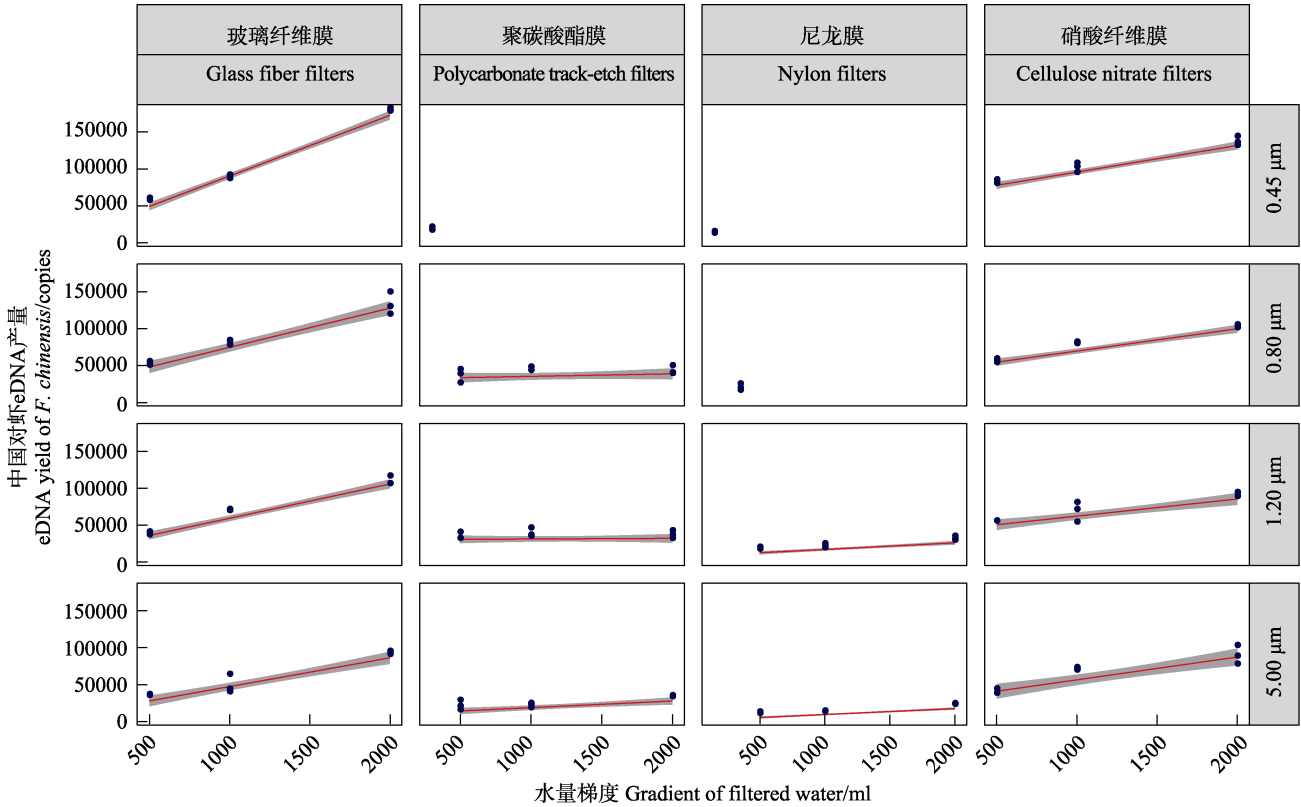


图4 不同滤膜类型及过滤水量所富集的 eDNA 的产量

Fig.4 Output of eDNA enriched with different membrane and volume of filtered water

0.1~10  $\mu\text{m}$  之间(Turner *et al.*, 2014), 选取合适的滤膜孔径对于富集 eDNA 至关重要。目前, 最常用的滤膜有 4 种: 玻璃纤维膜(Jerde *et al.*, 2011)、硝酸纤维膜(Goldberg *et al.*, 2011)、聚碳酸酯膜(Takahara *et al.*, 2012)、尼龙膜(Thomsen *et al.*, 2012)。各种滤膜对 eDNA 的富集效果取决于具体研究对象, 不同研究对象的最适合滤膜也不同。本研究发现, 使用同一孔径、不同材质的滤膜过滤同一体积水样的时间不同, 其中, 0.45  $\mu\text{m}$  的玻璃纤维膜通透性最强, 时间最短, 对中国对虾 eDNA 的富集效果最佳。

### 3.3 eDNA 的提取

目前, eDNA 提取主要采用酚-氯仿-异戊醇法(Costas *et al.*, 2007; Deiner *et al.*, 2014)与商业化的试剂盒提取(Minamoto *et al.*, 2012; Sigsgaard *et al.*, 2017)。酚-氯仿-异戊醇法与试剂盒法相比价格低, 由于其在提取过程中 DNA 损耗较多, 用于生物量丰富的物种定性检测尚可, 定量分析则不能正确反映物种生物量。对于濒危物种及稀有物种而言, 其在自然水域中密度非常小, 释放到水环境中的 DNA 属于微量, 为了更有效地对目标种进行物种监测与生物量评估, 建议使用商业化试剂盒提取 eDNA。对于试剂盒的选用, 使用最多的主要有 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, 德国)与 PowerWater DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, 美国)两种试剂盒。有学者就各类试剂盒对 eDNA 的提取效果做过对比分析(Deiner *et al.*, 2015; Eichmiller *et al.*, 2016), 普遍认为 DNeasy Blood and Tissue Kit 效果较好, 同一试剂盒对不同目标种可能存在差异。因此, 研究者应针对所选取的研究对象做 eDNA 技术操作流程各个步骤的优化。

### 3.4 eDNA 的定量分析

目的基因的选择及荧光定量 PCR 中荧光标记方法均是影响荧光定量 PCR 结果准确性的主要因素。Hebert 等(2005)研究表明, 在 eDNA 浓度较低的情况下, 细胞中的线粒体拷贝数要远大于核 DNA, 更易于被检测到。基于长度差异与进化速率的考虑, mtDNA 中 *CO I* 基因更适于用来分析亲缘关系较近的分类类群(焦明超等, 2011)。同时, 荧光标记方法有扩增序列非特异和序列特异两类检测, 其中, TaqMan 探针法较染料法具有更强的特异性, 能够排除假阳性结果的产生。考虑到渤海虾类组成及周边对虾养殖业可能产生的影响, 建议选择 *CO I* 基因作为扩增的目的基因, 同时采用 TaqMan 探针法进行荧光定量 PCR。

## 4 小结

本研究通过实时荧光定量 PCR 进行检测, 确定采用 0.45  $\mu\text{m}$  的玻璃纤维滤膜过滤 2 L 水样结合 DNeasy Blood and Tissue Kit 试剂盒提取 eDNA, 能够检测到的 DNA 拷贝数最多, 初步建立了一套针对中国对虾 eDNA 技术的操作流程。

**致谢:** 感谢中国水产科学研究院黄海水产研究所水产遗传育种中心陈宝龙老师与课题组项目聘用人员王惠宾在取样工作中给予的莫大帮助!

## 参 考 文 献

- Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP, *et al.* Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, 29(6): 358–367
- Costas BA, McManus G, Doherty M, *et al.* Use of species-specific primers and PCR to measure the distributions of planktonic ciliates in coastal waters. *Limnology & Oceanography Methods*, 2007, 5(6): 163–173
- Deiner K, Altermatt F. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88786
- Deiner K, Walser JC, Mächler E, *et al.* Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 2015, 183(9): 53–63
- Eichmiller JJ, Miller LM, Sorensen PW. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(1): 56–68
- Evans NT, Lamberti GA. Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. *Fisheries Research*, 2017
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423–425
- Geerts AN, Boets P, Heede SVD, *et al.* A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. *Ecological Indicators*, 2018, 84(84): 564–572
- Goldberg CS, Pilliod DS, Arkle RS, *et al.* Molecular detection of vertebrates in stream water: A demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22746
- Haile J, Froese DG, Macphee RDE, *et al.* Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*,

- 2009, 106(52): 22352–22357
- Hebert PD, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 2005, 54(5): 852–859
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, *et al.* “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 2011, 4(2): 150–157
- Jiao MC, Zhao DX, Ouyang S, *et al.* Application prospect of DNA barcode technology in taxonomy. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(5): 886–890 [焦明超, 赵大显, 欧阳珊, 等. DNA 条形码技术在生物分类学中的应用前景. *湖北农业科学*, 2011, 50(5): 886–890]
- Klymus KE, Richter CA, Chapman DC, *et al.* Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation*, 2015, 183: 77–84
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, *et al.* Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 2012, 13(2): 193–197
- Minamoto T, Naka T, Moji K, *et al.* Techniques for the practical collection of environmental DNA: Filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 2016, 17(1): 23–32
- Moyer GR, Diaz-Ferguson E, Hill JE, *et al.* Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103767
- Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ, *et al.* The detection of aquatic animal species using environmental DNA – A review of eDNA as a survey tool in ecology//Dynamic 3D Imaging, DAGM 2009 Workshop, Dyn3D 2009, Jena, Germany, September 9, 2009. *Proceedings. DBLP*, 2014, 110–125
- Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, *et al.* The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 168–176
- Shan XJ, Li M, Wang WJ. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 23–29 [单秀娟, 李苗, 王伟继. 环境 DNA(eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 23–29]
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Carl H, *et al.* Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology*, 2017, 164(6): 128
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, *et al.* Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35868
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41732
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2565
- Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, *et al.* Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology & Evolution*, 2014, 5(7): 676–684
- Yan H, Dong J, Huang J, *et al.* Study on the DNA extraction from shrimp specimens by different methods. *Applied Chemical Industry*, 2012, 41(3): 548–551 [闫晗, 董君, 黄静, 等. 不同固定剂处理的对虾基因组 DNA 提取方法研究. *应用化工*, 2012, 41(3): 548–551]
- Yuan W, Lin Q, Wang J, *et al.* Assessment of enhancement effectiveness of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* stock in the Laoshan Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 27–34 [袁伟, 林群, 王俊, 等. 崂山湾中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)增殖放流的效果评价. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 27–34]
- Vermeulen S, Koziell I. Integrating local and global biodiversity values: A review of biodiversity assessment. 2002-IIED, 2002

(编辑 冯小花)

## Establishment and Optimization of Environmental DNA Detection Techniques for Assessment of *Fenneropenaeus chinensis* Biomass

LI Miao<sup>1,3</sup>, SHAN Xiujuan<sup>2,3</sup>, WANG Weiji<sup>2,3</sup><sup>①</sup>, LÜ Ding<sup>3</sup>, DAI Fangqun<sup>2,3</sup>,  
DING Xiaosong<sup>1,3</sup>, WU Huanhuan<sup>3,4</sup>

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In recent years, environmental DNA (eDNA) technology has developed rapidly as a new method for investigation of aquatic organisms and has been widely used in the field of aquatic ecosystem research for species detection, biodiversity evaluation, and biomass assessment. However, few studies have specifically evaluated the effects of different eDNA enrichment and extraction methods on the results of the eDNA technology operation process to establish a set of optimal eDNA technology operation procedures for specific research subjects. In addition, because of differences in living habits between species, the amount of DNA released from different species and the size of DNA fragments are different. Therefore, different eDNA enrichment and extraction methods should be adopted for different research subjects. In this study, *Fenneropenaeus chinensis* was used as the research object, and eDNA was enriched by the membrane method, and eDNA was extracted by combining a blood and tissue DNA extraction kit. A filter membrane with a diameter of 47 mm, a nitrocellulose membrane, a polycarbonate membrane, and a nylon membrane were used, and each membrane was set to 0.45  $\mu\text{m}$ , 0.8  $\mu\text{m}$ , 1.2  $\mu\text{m}$ , and 5  $\mu\text{m}$  according to pore size. With 4 gradients, the sampling water volume was set to three gradients of 500 ml, 1 L, and 2 L. The experimental results showed that the membrane material size, pore size of the membrane, and the volume of the sampled water had certain influences on the qualitative and quantitative analysis of *F. chinensis*. The 0.45  $\mu\text{m}$  glass fiber membrane filter and 2 L water sample detected the greatest DNA copy number. Based on this, a set of operational procedures for *F. chinensis* prawn eDNA technology was established to improve the detection rate of *F. chinensis*, which provided the basis for subsequent distribution monitoring and biomass assessment of *F. chinensis*.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Environmental DNA; Establishment; Optimization

① Corresponding author: WANG Weiji, E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn