

刺参池塘底栖真核生物 DGGE 指纹结构 与环境理化因子的相关性分析

廖梅杰 荣小军 李 彬 张 正 王印庚* 陈贵平 王 岚

(青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

摘 要 采用基于 18S rDNA PCR-DGGE 技术对刺参池塘养殖系统底栖真核生物群落结构与环境理化因子进行分析。结果表明,刺参养殖池塘系统中附着基真核生物 DNA 指纹图谱均呈现出了丰富的多样性,成参养殖池塘分别获得 26、25、25 条扩增条带,幼参养殖池塘分别获得 20、22 条扩增条带;刺参养殖池塘中叶绿素、总磷、总氮、溶氧分别为 2.037~5.383 $\mu\text{g/L}$ 、0.016~0.039 mg/L 、1.863~3.562 mg/L 、4.06~6.18 mg/L ,成参养殖池塘的各项理化指标值均高于幼参养殖池塘。通过指纹图谱和理化因子的聚类分析可以看出,附着基底栖真核生物 DGGE 指纹图谱与环境理化因子聚类分析图相吻合,说明不同刺参养殖池塘底栖真核生物群落 DNA 指纹与养殖环境的理化因子密切相关。本研究通过 DGGE 技术分析刺参池塘附着基底栖真核生物指纹图谱,进而分析与环境中理化因子的关系,为建立底栖真核生物群落 DNA 指纹结构与水体理化指标之间的关系提供科学依据。

关键词 刺参养殖系统 PCR-DGGE 底栖真核生物 理化因子

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)06-0025-06

DNA fingerprinting structure of benthic eukaryotic structure and its relations to environmental physical and chemical factors in sea cucumber culture ponds

LIAO Mei-jie RONG Xiao-jun LI Bin ZHANG Zheng
WANG Yin-geng* CHEN Gui-ping WANG Lan

(Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

ABSTRACT DNA fingerprinting structure of benthic eukaryotic community and its relations to environmental physical and chemical factors in sea cucumber culture ponds were studied. The DNA fingerprinting structure was measured using PCR-DGGE technique and the physical and chemical factors of sea cucumber ponds were analyzed with general methods. Then the relationship were assessed with cluster analysis. The number of amplified DGGE bands for adult sea

国家自然科学基金项目(30901120)、科研院所技术开发研究专项项目(2011EG34219)、青岛市科技计划项目(11-1-1-11-hy)和山东省农业良种工程重大课题共同资助

* 通讯作者。E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn; Tel: (0532)85841732

收稿日期: 2011-05-30; 接受日期: 2011-09-27

作者简介: 廖梅杰(1981-), 女, 博士, 主要从事水产动物生态与疾病学研究。E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn; Tel: (0532)85841732

cucumber in three culture ponds and juveniles in two ponds were 26, 25, 25 and 20, 20 respectively, which indicated that the ponds culturing adult sea cucumber had richer eukaryotic-diversity. Physical and chemical factors including chlorophyll content, total phosphorus, total nitrogen and dissolved oxygen in sea cucumber culture ponds were 2.037~5.383 $\mu\text{g/L}$, 0.016~0.039 mg/L, 1.863~3.562 mg/L, 4.06~6.18 mg/L, respectively. All of the physical and chemical factor values in ponds culturing adult sea cucumber were higher than that of ponds culturing juvenile sea cucumber. The result of cluster analysis of environmental physical and chemical factors was similar with that of the benthic eukaryotic community based on PCR-DGGE, which suggested that the benthic eukaryotic community was closely associated with the physical and chemical factors in sea cucumber ponds.

KEY WORDS Sea cucumber *Apostichopus japonicus* DGGE
Benthic eukaryotic community Physical and chemical factors

真核生物是食物网中重要的组成成分,在物质循环和能量流动过程中发挥着重要作用(Liu *et al.* 2005),群落结构和功能的变化直接或间接反映着池塘水质状况与生态系统的稳定性。在刺参池塘养殖过程中,底栖真核生物还是刺参的重要饵料,养殖动物的放养密度和健康状况与真核生物的多样性指数和生物量密切相关。因此,研究附着基真核生物与养殖环境的关系对刺参养殖有重要的意义。传统生物群落结构的研究以形态学分类为基础,效率低,依赖经验,数据比较和整合困难,很大程度上制约了群落多样性与环境相关性研究(刘瑞玉等 1992)。

近年来随着分子生物技术的迅速发展,DNA 指纹分析技术广泛应用于水体环境微生物多样性的研究中(刘新春等 2005;张振东等 2008;马悦欣等 2003),已经成为研究生物群落多样性的重要工具。21 世纪初,分子生物学方法开始应用于分析真核生物多样性研究。2001 年,Moon-van de Staay 等首次利用分子技术分析太平洋海水中微型真核生物的多样性。目前真核生物多样性研究中使用的分子生物学方法主要包括克隆文库的构建、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、多聚酶链式反应、宏基因组学等(汪 岷等 2007)。DGGE 技术是基于 rDNA 的保守性和特异性,将长度相同而碱基不同的 DNA 片段分离开,此项技术已经在分析环境中细菌群落结构多样性的研究中得到广泛应用,而对真核生物群落多样性的研究较少。本研究利用 DGGE 技术对刺参养殖池塘附着基底栖真核生物群落结构与环境因子的关系进行分析,以期建立生物群落 DNA 指纹拓扑结构与水体理化指标之间的关系,为刺参的健康养殖提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

2008 年 11 月中旬,对青岛胶南市室外刺参养殖池塘进行调查,采样位置 35°39'N,119°50'E,采样选 5 个池塘,池塘长 400 m、宽 100 m、水深 1.8 m。用无菌勺刮取刺参养殖池塘瓦片附着基表面附着的底栖生物,每个池塘随机取 3 个附着基,采样后 -20℃ 保存。

1.2 基因组 DNA 提取

取收集的附着基底栖生物样品,先用灭菌双蒸水清洗,然后 5 000 r/min 离心,将沉淀悬浮于灭菌的 TENP 缓冲液(6.2 g/L Tris-HCl,7.4 g/L EDTA,5.8 g/L NaCl,10.0 g/L PVP)中振荡混匀,离心去除上清液,灭菌双蒸水清洗沉淀,然后再次离心,最后将沉淀悬浮于灭菌双蒸水中,加入少许玻璃珠涡旋,加入 500 μl CTAB 提取液、5 μl 10% 的 SDS 混匀,65℃ 水浴 60 min,每隔 10 min 轻轻颠倒混匀一次;加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)颠倒混匀,室温下 12 000 r/min 离心 10 min,小心将上清液转入另一离心管中,等体积氯仿:异戊醇

(24 : 1)重复抽提 2~3 次,加入 2/3 体积异丙醇混匀, -20℃ 静置 1 h, 室温下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀并吹干; 将粗提 DNA 沉淀溶解于适当体积的 TE(pH 8.0) 缓冲液中, 再次用酚、氯仿抽提纯化得到高纯度 DNA。

1.3 PCR 扩增

用真核生物 18S rDNA 基因的特异性引物 F1427-GC(5'-CGCCCGCCGCG CCCC CGCC GGCCCGCCG CCCCC GCCCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGG-3') 和 R1616 (5'-GCGGTGTGTA-CAAAGGGCAGGG-3') 进行 PCR 扩增(Paul 2001)。PCR 采用 50 μ l 反应体系: 1 \times Buffer, 引物 0.2 μ mol/L, dNTP 200 μ mol/ml, *Taq* DNA 聚合酶 4 U, DNA 模板 50 ng, 灭菌水补充至 50 μ l。18S rDNA PCR 条件为: 94℃ 预变性 5 min, 前 10 个循环为 94℃ 30s, 69~60℃ 0.5 min, 72℃ 1 min(其中每个循环复性温度下降 1℃), 后 18 个循环为 94℃ 0.5 min, 60℃ 0.5 min, 72℃ 1 min, 72℃ 延伸 10 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

用于分离 18S rDNA 片段 DGGE 电泳条件为: 9%(w/v) 聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺 : 双丙烯酰胺 = 37.5 : 1), 变性梯度浓度范围为 30%~70%, 将 PCR 产物与 2 \times Loading Buffer 按 1 : 1 进行混合, 每个加样孔上样量为 30 μ l, 100V 60℃ 电泳 12 h。使用 1% GeneFinder 对凝胶进行染色, UVP 凝胶影像分析系统分析并拍照。

1.5 水质理化因子的测定

参照《水环境分析方法标准工作手册》规定的方法, 对叶绿素、总磷、总氮、溶氧、pH 进行测定(国家环境保护局科技标准司 2000)。

1.6 数据处理

利用 Quantity One 软件进行 DGGE 图像的聚类分析和相似性分析, SPSS 17.0 对水体理化指标进行分析。

2 结果

2.1 18S rDNA PCR 扩增

本实验在提取附着基生物总 DNA 的过程中, 首先用 TENP 缓冲液对样品进行预处理, 以便除去腐殖酸等杂质, 提高 DNA 的提取效率, 降低后续 PCR 扩增过程中腐殖酸等分子对 *Taq* 酶的抑制, 多次酚-氯仿抽提提高了 DNA 纯度。如图 1 所示, 以附着基底栖生物样品基因组 DNA 为模板, 用真核生物 18S rDNA 基因通用引物 F1427-GC/R1616 进行 PCR 扩增, 扩增条带亮度和特异性均较好, 未出现非特异性扩增条带, 通过与 DNA Marker 对比, 其片段大小约为 200 bp 左右。

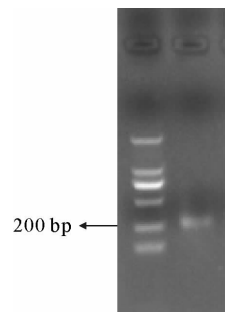
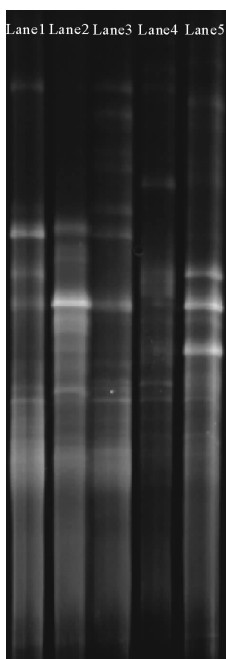


图 1 18S rDNA 的 PCR 产物
Fig. 1 PCR products of 18S rDNA

2.2 各养殖池塘底栖真核生物的 DGGE 指纹图谱及图谱分析结果

DGGE 指纹图谱分析过程中, 通常将一个单独的条带定义为一个分类单元(赵兴青等 2006), 条带的多少可以反映出群落生物种类的多样性, 条带信号强弱, 可以反映各物种的丰度(罗 鹏等 2009)。由各养殖池塘的底栖真核生物 DGGE 图谱可知(图 2), 来自不同池塘附着基样品的 PCR 产物在变性剂梯度凝胶中能被有效分离, 不同养殖池塘附着基样品中条带数目及其条带的相对位置存在着差异, 说明不同池塘附着基样品真核生物种类存在差异, 成参养殖池塘分别获得 26、25、25 条可见条带, 幼参养殖池塘分别获得 20、22 条可见条带, 说明成参养殖池塘真核生物多样性较丰富。



Lane 1, lane 2, lane 3: 成参池塘样品(5 #、7 #、13 #); Lane 4, lane 5: 幼参池塘样品(19 #、20 #)

Lane 1, lane 2, lane 3: sample of adult Sea cucumber culture ponds(5 #、7 #、13 #); Lane 4, lane 5: sample of juvenile Sea Cucumber culture ponds(19 #、20 #)

图 2 各养殖池塘底栖真核生物 DGGE 分析图谱

Fig. 2 DGGE profile of benthic eukaryotes from different ponds

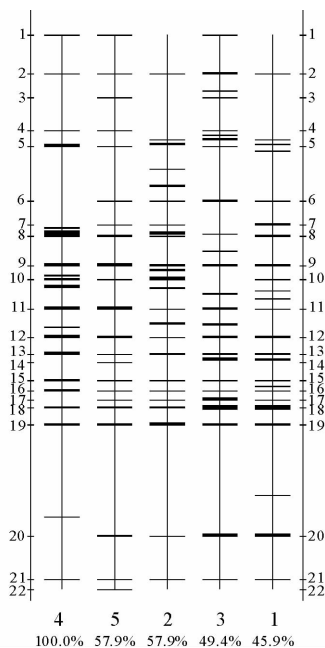


图 3 不同池塘底栖真核生物的 DGGE 的分离图谱

Fig. 3 DGGE sketch map of benthic eukaryotes from different ponds

UPMGA 聚类分析如图 4, 各个样品按相似性程度聚为两簇, 其中两个幼参养殖塘(19 #、20 #)聚为一簇, 相似性分析指数(CS)(表 1)显示 19 #、20 # 池塘的 CS 值较高, 其值为 57.9%, 3 个成参养殖塘(5 #、7 #、13 #)中 5 #、7 # 聚为一簇, CS 值最高达到 57.0%, 13 # 养殖池塘独自聚为一簇。聚类分析和相似性指数反映了不同附着基样品真核生物群落的差异及其相似程度, 成参养殖池塘真核生物的群落结构之间具有高度的相似性, 幼参养殖池塘之间真核生物群落结构具有高度的相似性, 而成参养殖池塘真核生物群落和幼参养殖池塘有明显的差距, 这种差距反映了他们的生物群落结构组成不同。

表 1 PCR-DGGE 指纹图谱相似性分析指数

Table 1 Sorenson's pairwise similarity coefficient (Cs) of PCR-DGGE fingerprints

池塘 Pond	5 # (%)	7 # (%)	13 # (%)	19 # (%)	20 # (%)
5 #	100	57.0	66.6	45.9	58.2
7 #	57.0	100	54.2	57.9	55.3
13 #	66.6	54.2	100	49.4	48.4
19 #	45.9	57.9	49.4	100	57.9
20 #	58.2	55.3	48.4	57.9	100

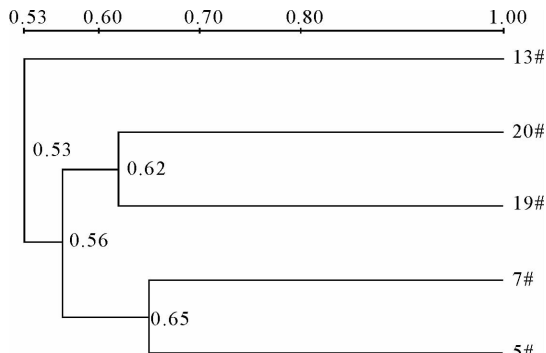


图 4 各养殖池塘底栖真核生物 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of DGGE profile of benthic eukaryotes from different ponds

2.3 叶绿素 a 含量及主要理化特征

对 5 个养殖池塘叶绿素及主要的理化指标测定结果见表 2。刺参养殖池塘中叶绿素、总磷、总氮、溶氧分

别为 2.037~5.383 $\mu\text{g/L}$ 、0.016~0.039 mg/L 、1.863~3.562 mg/L 、4.06~6.18 mg/L ，成参养殖池塘高于幼参养殖池塘。根据测定结果对不同池塘的理化指标进行相似性聚类分析，结果显示(图 5)：5# 和 7# 养殖池塘优先聚为一类，相似度约为 0.62；19#、20# 养殖池塘聚为一类，相似度约为 0.58，13# 养殖池塘单独聚为一类。根据各池塘理化指标所得到的聚类分析结果与 DGGE 指纹图谱条带的聚类结果基本吻合，说明不同刺参养殖池塘底栖真核生物群落 DNA 指纹与养殖环境的理化因子密切相关。

表 2 各养殖池塘叶绿素及主要理化因子指标

Table 2 Physico-chemical factors of each sampling pond

养殖池塘 Pond No.	叶绿素 Chlorophyll ($\mu\text{g/L}$)	总磷 TP (mg/L)	总氮 TN (mg/L)	溶氧 OD (mg/L)
5#	5.383	0.039	3.562	6.18
7#	4.126	0.032	3.217	5.67
13#	3.219	0.028	2.097	5.23
19#	2.037	0.016	2.835	4.06
20#	2.286	0.022	1.863	4.35

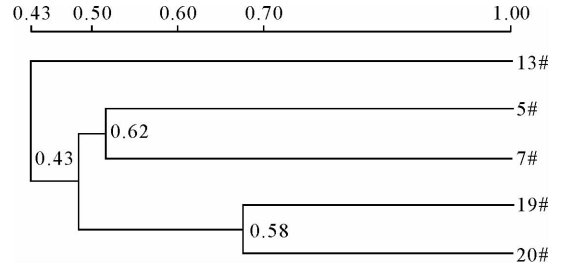


图 5 各养殖池塘水质聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis on physical and chemical factors of water from different ponds

3 讨论

附着基样品中存在许多干扰物质，如腐植酸、类腐植酸化合物、重金属等，这些物质会严重影响 DNA 的提取效率、DNA 的纯度以及后续的 PCR(陈 坚等 2008)。本实验利用改进的 CTAB 法，在提取 DNA 前首先用 TENP 缓冲液对样品进行预处理，去除腐殖酸等杂质，多次酚-氯仿抽提提高了 DNA 纯度。通过对提取的 DNA 进行 PCR 扩增可以看出，获得了单一无拖尾的扩增条带，满足 PCR-DGGE 的要求。

变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术将所有生物保守基因片段，根据 T_m 值不同，在不同浓度梯度胶中分离开，能够高效、真实、稳定地反映生物群落遗传多样性和动态变化，现已广泛应用于自然环境中各种生物群落的遗传多样性研究(吴 利等 2008)。本实验利用真核生物 18S rDNA 片段保守区域所筛选的引物对不同刺参养殖塘附着基上底栖真核生物的遗传结构进行多样性分析，通过获得的 DGGE 指纹图谱可以看出，各池塘真核生物种类丰富，其中成参养殖池塘的图谱带数均多于幼参养殖池塘，表明成参池塘的底栖真核生物种类高于幼参养殖池塘。本研究同时对相应池塘的水质理化因子监测并进行聚类分析，各池塘理化指标所得到的聚类分析结果与 DGGE 指纹图谱条带的聚类结果基本吻合，表明底栖真核生物的群落 DNA 指纹结构与理化因子具有显著的相关性，该结果与颜庆云等(2005)研究的洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系的结果一致。

营养物质是影响底栖真核生物结构组成的重要因子之一，本研究显示不同营养池塘附着基上的真核生物多样性明显不同，这与池塘中营养成分是密切相关的。成参养殖池塘中存在大量残饵和排泄物，有机物的积累比较丰富，因此，总氮和总磷含量较高，其含量分别在 0.028~0.039 mg/L 、2.097~3.562 mg/L 之间。幼参养殖池塘一般是当年清理过的新池塘，池塘底部有机质的积累较少，水体中总氮和总磷的含量较成参养殖池塘中低，其含量分别在 0.016~0.022 mg/L 、1.863~2.835 mg/L 之间，成参养殖池塘和幼参养殖池塘营养物质的不同决定了真核生物群落结构的差异。13# 成参养殖池塘由于在取样时水体底部出现大量大型水草，其生物多样性和水质受到了一定的影响，最终单独聚为一类。

PCR-DGGE 指纹技术具有可重复和容易操作等特点，近年来在微生物多样性研究中应用较多。本研究利用真核生物 18S rDNA 基因的保守区域，利用 PCR-DGGE 技术分析了刺参底栖真核生物多样性与水质因子的关系，为建立底栖真核生物群落 DNA 指纹结构与水体理化指标之间的关系提供依据，由于在 DNA 提取和 PCR 扩增的过程中，一些生物量极少的藻类容易漏掉(邓文娜等 2007)，遗传多样性和物种的多样性之间存

在着差异,用分子生物学对真核生物多样性分析,优化 DNA 的提取技术和 PCR 的扩增条件至关重要。

参 考 文 献

- 马悦欣, Holmstrom, C., Webb, J., Kjelleberg, S. 2003. 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 在微生物生态学中的应用. 生态学报, 23(8): 1 561~1 569
- 邓文娜, 余育和, 冯伟松, 颜庆云, 宋晓红, 刘志新. 2007. 三峡库区浮游生物群落结构与 DNA 多态性比较分析. 湖泊科学, 19(3): 333~339
- 刘瑞玉. 1992. 胶州湾: 生态学和环资源. 北京: 科学出版社
- 刘新春, 吴成强, 张 显, 杨 敏, 李红岩. 2005. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析. 生态学报, 25(4): 842~847
- 吴 利, 余育和, 张堂林, 冯伟松, 颜庆云, 龚迎春, 宋晓红. 2008. 牛山湖浮游生物群落 DNA 指纹结构与理化因子的关系. 湖泊科学, 20(2): 235~241
- 陈 坚, 刘 和, 李秀芬, 华兆哲. 2008. 环境微生物实验技术. 北京: 化学工业出版社, 1~6
- 汪 岷, 江雪娇. 2009. 海洋微小型真核生物分子多样性的研究方法. 中国海洋大学学报, 39(4): 629~632
- 张振东, 王淑芬, 曹宇峰. 2008. DGGE 技术及其在海洋环境微生物多样性研究中的应用. 海洋环境科学, 27(3): 297~300
- 国家环境保护局科技标准司. 2000. 水环境分析方法标准工作手册. 北京: 中国环境科学出版社
- 罗 鹏, 胡超群, 张吕平, 任春华. 2009. 凡纳滨对虾海水养殖系统内细菌群落的 PCR-DGGE 分析. 中国水产科学, 16(1): 31~38
- 赵兴青, 杨柳燕, 陈 灿, 肖 琳, 蒋丽娟, 朱吴巍, 于振洋, 尹大强. 2006. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究. 生态学报, 26(11): 3 610~3 616
- 颜庆云, 余育和, 冯伟松, 梁小民, 谢 平. 2005. 洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系. 水生生物学报, 29(6): 601~606
- Liu, D., Sun, J., and Zou, J. 2005. Phytoplankton succession during a red tide of *Skeletonema costatum* in Jiaozhou Bay of China. Marine Pollution Bulletin, 50(1): 91~94
- Paul, J., H. 2001. Methods in microbiology, Marine Microbiology. San Diego: Academic Press
- Moon-van der Staay, S. Y., Wachter, R. D., and Vaultot, D. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. Nature, 409: 607~610

《海洋水产研究》期刊已于 2009 年 1 月起更名为《渔业科学进展》

各有关单位、各位读者:

经国家新闻出版署 2008 年 11 月 13 日(新出报刊[2008]1324 号文)和山东省新闻出版局 2008 年 12 月 11 日(鲁新出批字[2008]325 号文)批准,从 2009 年 1 月起,《海洋水产研究》期刊更名为《渔业科学进展》(英文名:Progress in Fishery Sciences),ISSN 1000-7075,国内统一刊号:CN 37-1466/S,国内邮发代号:24-153,国外发行代号:4578Q。刊期仍为双月刊。

更名后,本刊栏目包括研究论文、研究综述和研究简报等,内容涵盖各类水域渔业科学研究最新成果,涉及与渔业科技有关的各学科门类的研究进展。本刊主要报道渔业生物学、渔业海洋学、水产增养殖学、水产种质资源与遗传育种、水生野生生物保护、渔业生物病害及其防治、渔业生态环境保护、渔业设施与捕捞技术、渔业装备制造技术、水产品综合利用与质量安全等领域的新发现、新技术和新成果。希望各位领导、各位专家,一如既往地关心和支持我们的工作,踊跃为《渔业科学进展》刊物投稿。

祝愿各位领导、各位专家工作顺利、万事如意!

《渔业科学进展》编辑部

2011 年 12 月 20 日