

DNA 指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性

余育和 张文静 颜庆云

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: DNA 指纹分析是一种关于整体遗传结构分析的强有力的分子生物学技术, 广泛应用于种群及个体水平层次生命系统。本文以东湖浮游生物为对象, 用随机引物和特异引物进行扩增探讨了 DNA 指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性。实验表明: 取自分别处于超富营养水平、富营养水平和中营养水平的 I、II、III 站样本的模板 DNA, 无论是以随机引物 M-01、M-02、M-03、M-18 及 M-19 还是特异引物 CW15946/47、EGMS6、EGMS4、ITS1 及 HSP 扩增均获得清晰且稳定的图谱; 各站间浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构存在明显的表观差异: 居中营养水平的 III 站谱带较多, 而分别居富营养水平、超富营养水平的 II 站和 I 站较少; 各站既有特异性谱带也有共有的谱带, III 站包含了 II 站和 I 站 33%—100% 的谱带。本文还结合现有有关物种生物多样性及理化方面的资料, 对所获得群落 DNA 指纹图谱的生物学意义进行尝试性的、定性的讨论。

关键词: DNA 指纹分析; 群落生命系统; 浮游生物; 武汉东湖

中图分类号: Q178.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)05-0457-07

DNA 指纹是指生物基因组 DNA 经限制性酶切、聚合酶链式反应(PCR)扩增或两者组合处理后电泳以揭示基因组 DNA 特征的分子遗传标记技术。与形态标记、细胞标记、生化标记、免疫学标记相比, DNA 指纹具有许多优点: 多态性高; 信息量大; 多为共显性; 广泛可比性; 可用于不同发育时期、个体以及个体以下等级结构^[1-4], 因此, 它自 Condziber 等创建始就受到研究者的广泛关注与厚爱。三十年来, DNA 指纹分析技术发展非常迅速, 形成了许多相关分析方法^[5-7]。现在, DNA 指纹分析技术已广泛应用于许多研究领域, 如: 种质资源分类演化、基因分离测序、作物品种及纯度鉴定、杂交育种、遗传图谱构建、生物多样性分析^[8-11]等。

然而, 从应用等级结构来看, DNA 指纹分析研究大都局限于种群、个体、器官、组织或细胞等群落级以下生命系统^[12], 尽管对细菌这类原核生物的群落有些探索性的工作^[13-14]。群落是生态系统中的一个重要结构层次和功能类群, 本文选择在水体生态系统的物质转化和能量流动中起重要作用的浮游生物群落为对象, 探索 DNA 指纹分析在群落级生命系统的应用可能性以期积累各种类型水体生态系统中浮游生物遗传多样性资料, 进而从分子水平解读某些生态学

困惑和建立一种监测水资源质量的分子生物学方法。

1 材料与方法

1.1 采样点 采样点为武汉东湖 I、II 及 III 站, 分别位于东湖的水果湖区、郭郑湖区与汤林湖区(图 1)。2003 年 9 月, 利用采水器从各站采取 1L 表层水作为制备浮游生物 DNA 水样。

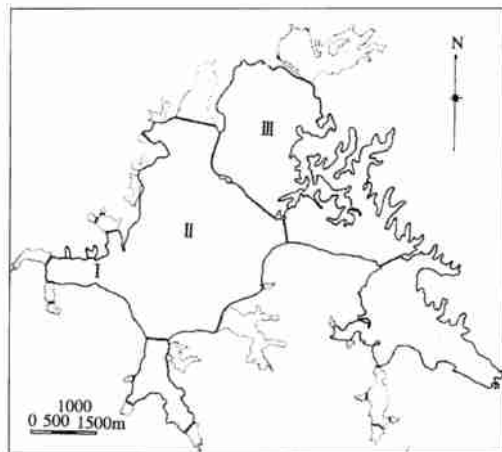


图 1 武汉东湖采样点分布图

Fig 1 Distribution of sampling station in Lake Donghu(WuHan)

收稿日期: 2004-04-28; 修订日期: 2004-06-25

基金项目: 科技部 973 项目(2002CB412308); 中国科学院创新基金(220207)资助

作者简介: 余育和(1956—), 男, 湖南汨罗人; 研究员; 研究方向: 原生动物学

1.2 样品的预处理 经充分混匀后,各取 50mL 水样于培养皿中沉淀 1h,然后,去除杂质、离心(8000r/min,5min)。将沉淀移入一新的微量离心管,用灭菌双蒸水清洗 3 次,每次清洗后 8000r/min 离心 3min,以去除黏附于浮游生物表面的水溶性杂质和细菌。

1.3 总 DNA 的提取 生物体沉淀加入 600μL 裂解液(4% SDS; 250mmol/L Tris·Cl, pH= 8.0; 60mmol/L Na₂EDTA)和 Proteinase K(0.2mg/mL),于室温下裂解 1h 后,离心(6500r/min, 10min)。将上清转入另一离心管中,经等体积酚抽提后,再用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提一次。加入 2/3 体积的冷异丙醇沉

淀 3h,离心(13000r/min, 10min)、空气中干燥 5min,然后,用 70% 冷乙醇清洗沉淀 2 次,待干燥后悬于 600μL TE 中,于- 20℃贮存备用。

对所提取总 DNA 用 0.7% 的琼脂糖凝胶(含 0.5μL/mL 的 EB)进行电泳评估制备效果,用 BECKMAN DU 530DNA/Protein Analyzer 测定 DNA 浓度与纯度(OD₂₆₀、OD₂₈₀值及其比值 OD₂₆₀/OD₂₈₀)。

1.4 RAPD 扩增 PCR 扩增仪为 PE 公司 9600 型;Taq 酶、dNTP 为 MBI 公司产品。

随机引物购自上海博亚生物技术有限公司(表 1)。

表 1 随机引物及其序列
Tab 1 Random oligonucleotide primers and their sequences

引物 Operon 编号 The Operon number of primers	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	引物 Operon 编号 The Operon number of primers	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
M-01	GTTGGTGGCT	M-11	GTCCACTGTG
M-02	ACAACGCCTC	M-12	GGGACGTTGG
M-03	GGGGGATGAG	M-13	GGTGCTCAAG
M-04	GGCGGTTGTC	M-14	AGGGTCGTTC
M-05	GGGAACGTGC	M-15	GACCTACCAC
M-06	CTGGGCAACT	M-16	GTAACCAGCC
M-07	CCGTGACTCA	M-17	TCAGTCCGGG
M-08	TCTGTTCCCC	M-18	CACCATCCGT
M-09	GTCTTGCGGA	M-19	CCTTCAGGCA
M-10	TCTGGCGCAC	M-20	AGGTCTTGGG

扩增反应总体积为 25.0μL,其中 10×buffer2.5μL, 25mmol/L MgCl₂2μL, 2mmol/L dNTP 1.5μL, 1.5ng/μL 引物 1μL, 5u/μLTaq 酶 0.4μL, 模板 DNA 2μL(约 40ng,三个站基本保持一致), ddH₂O 16.6μL。充分混匀后稍离心将反应液集中于管底,在 PCR 仪上进行扩增,反应程序为:94℃预变性 5min,然后循环 40 次,94℃ 20s、36℃ 30s、72℃ 120s,最后于 72℃延伸 2min。以 1.4% 的琼脂糖凝胶(含 0.5μg/mL 的 EB)对扩增产物进行电泳(每个样品取 5.0μL),Image UVP 凝胶处理系统检测 RAPD 扩

增结果并拍照。

1.5 PCR 扩增 利用实验室已有关于纤毛虫和鞭毛虫的特定 DNA 片段的特异引物(表 2)对 3 个站的浮游动物群落 DNA 进行选择性的扩增,并不断优化。反应程序为:94℃预变性 5min,然后循环 35 次,94℃变性 60s, X℃(因引物而异,表 2)退火 55s, 72℃延伸 55s,最后于 72℃延伸 10min。扩增产物用 1.4% 的琼脂糖凝胶(含 0.5μL/mL 的 EB)电泳(每个样品取 5.0μL)检测扩增结果。

表 2 特异引物及其序列
Tab. 2 Specific primers and their sequences

引物 Primer	来源 Source	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	退火温度 X(℃) Anneal temperature
CW15946/47	纤毛虫 SSrDNA	正向:GACAGTCAGAGGTGAAATTCT 反向:TCCTTCTGCAGGTCACTAC	52
EGMS6	裸藻微卫星	正向:CATCCAGCAACACTGGCA	51

续表			
引物 Primer	来源 Source	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	退火温度 X(℃) Anneal temperature
EGMS4	裸藻微卫星	反向: ACATCTAGGGAGAGCTCC	51
		正向: GTCTCTGTTGCCACCAC	
ITS1	纤毛虫 ITS1	反向: CACCTGAGTCACATTGGAG	49
		正向: AACAAGTTACCGAGAAAGAAGAA	
HSP	纤毛虫 HSP	反向: ATCGTAACCGTGCATCTGCCAGTTT	49
		正向: GGAATTGACTTGGAAGTAC	
		反向: TCGTTGAAGT AAGCTGG	

2 结果

2.1 DNA 抽提

从水样中浮游生物提取的总 DNA 用 BECKMAN DU530 DNA/Protein Analyzer 测定其浓度和纯度, DNA 的产率较高, 纯度好, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.85—2.0 之间, 经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳后呈现单一区带(图 2), 表明该方法提取的 DNA 具有较高的纯度, 符合作为 PCR 扩增反应模板的质量要求。

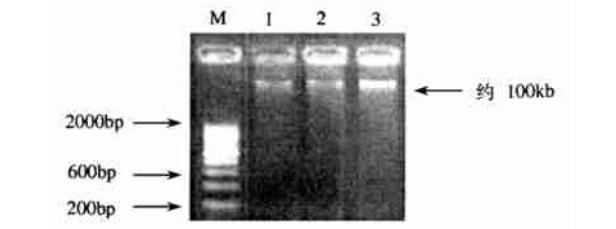


图 2 浮游生物基因组 DNA 电泳图谱

Fig 2 Electrophoretogram of Planktonic genomic DNA M: 200bp marker; Lanes 1, 2, 3: Planktonic genomic DNA of station I , II , III

2.2 RAPD 扩增

以 I 站浮游生物群落 DNA 为模板, 用 20 个随机引物(表 1)进行了试探性 RAPD 扩增研究, 重复 3 次。除 M-08 引物扩增不出条带外, 其他 19 个引物均可获得数条 0.3—4.0kp 的 DNA 谱带。从上述引物中, 筛选出 5 个扩增结果稳定且条带清晰的引物, 即 M-01、M-02、M-03、M-18、M-19 对 3 个站点的浮游生物群落 DNA 多态性进行了 RAPD 指纹分析, 结果见图 3 和表 3。

从图 3 和表 3 可看出: 5 个随机引物对所有站浮游生物群落 DNA 模板均能扩增出产物, 形成清晰的条带。每一引物的扩增产物在大小和数量上随浮游生物群落 DNA 站点来源不同而不同。对于引物 M-01, II 站获得 6 条带, 而 I 站、II 站则相对少些, 分别为 4 条和 3 条。I 站、II 站、III 站都有 1200 与 600bp 两条带, II 站包含 I 站与 II 站的所有条带; 对于引物 M-02, II 站获得 5 条带, 而 I 站、II 站也相对少些, 分别为 3 条和 2 条。I 站、II 站、III 站都有 720bp

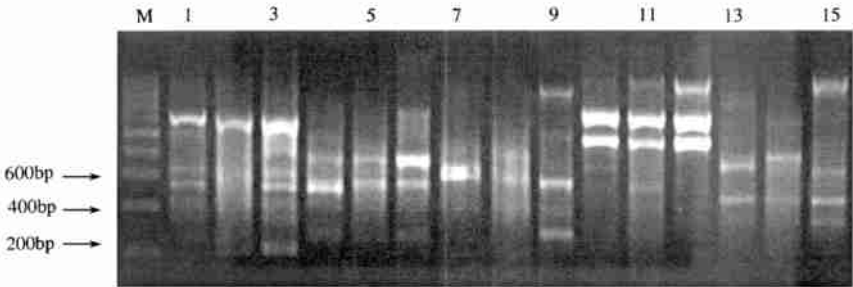


图 3 RAPD 电泳图谱

Fig 3 Electrophoretogram of RAPD

M: 200bp marker; Lanes 1, 4, 7, 10, 13: the amplified results of primers M-01, M-02, M-03, M-18, M-19 at station I ; Lanes 2, 5, 8, 11, 14: the amplified results at station II in the same order of primers; Lanes 3, 6, 9, 12, 15: the amplified results at station III in the same order of primers

表 3 五种随机引物扩增各模板 DNA 片段
Tab. 3 Length of DNA fragments amplified by five random primers

引物 Primer	不同引物对东湖各站 DNA 的扩增片段 DNA fragments amplified by different primers in total DNA of each station								
	I 站(bp) Station I			II 站(bp) Station II			III站(bp) Station III		
M-01	1200	1000	600	1200	800	600	1200	1000	800
	520						600	520	250
M-02	1200	720	520	720	580		3500	1400	1200
							720	580	
M-03	800	600	400	800	600		1600	800	340
M-18	1400	1000		2000	1400	1000	2000	1400	1000
				580					
M-19	1800	1600	720	1400	800	520	2000	1400	800
	600	520					720	600	520

注: 表中数字为片段大小(bp)。
Note: Length of DNA fragments are in the table.

条带; 对于 M-03 引物, I 站除了获得 II 站的所有条带 (800bp 和 600bp) 外还有一条 400bp 的带, II 站尽管也是 3 条, 但与 I 站没一条是相同的; M-18 引物则在三个站都有 1400bp 和 1000bp 的带, 并且 II 站包括了 I 站和 II 站的所有条带; 至于引物 M-19, II 站共获得 6 条带, 其中包括了 II 站的全部 (分别为 1400、800、520bp), 同时 II 站的这 6 条带与 I 站的 5 条带相比, 也有 2 条相同的带。

2.3 PCR 扩增

在对浮游生物群落 DNA 多态性作 RAPD 指纹

分析后, 利用实验室已有关于纤毛虫和鞭毛虫的特定 DNA 片段的特异引物(表 2)对三个站的浮游生物群落 DNA 进行了 PCR 指纹分析。首先, 仍以 I 站浮游生物群落 DNA 为模板, 摸索出反应最佳条件。然后, 依据所确立的条件用 CW15946/47、EGMS6、EGMS4、ITS1 与 HSP 这 5 个特异引物对 3 个站点的浮游生物群落 DNA 进行 PCR 指纹分析, 结果见图 4 和表 4。

从图 4 和表 4 可看出: 各引物在所有站中均获

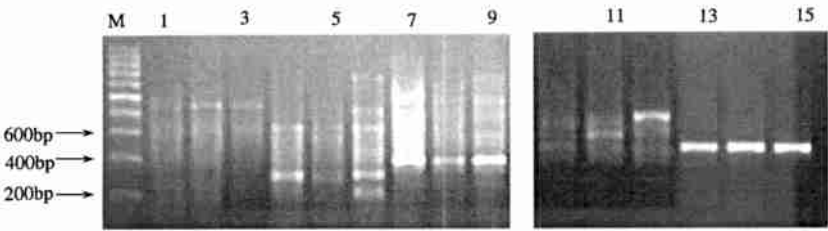


图 4 特异引物的 PCR 扩增图谱
Fig. 4 Electrophoretogram of PCR amplified results by specific primers
M: 200bp marker; Lanes 1, 4, 7, 10, 13: the amplified results of primers CW 15946/47, EGMS6, EGMS4, ITS1, HSP at station I; Lanes 2, 5, 8, 11, 14: the amplified results at station II in the same order of primers; Lanes 3, 6, 9, 12, 15: the amplified results in station III at the same order of primers

表 4 特异引物扩增各模板 DNA 片段
Tab. 4 Length of DNA fragments amplified by specific primers

引物 primer	不同引物对东湖各站 DNA 的扩增片段 DNA fragments amplified by different primers in total DNA of each station								
	I 站(bp) station I			II 站(bp) station II			III站(bp) station III		
CW15946/47	1100	900	600	900			1400	900	
EGMS6	1400	600	580	1100	850	600	1400	850	600
	300	200		580	300		450	300	200

续表

引物 Primer	不同引物对东湖各站 DNA 的扩增片段 DNA fragments amplified by different primers in total DNA of each station								
	I 站(bp) Station I				II 站(bp) Station II			III站(bp) Station III	
EGMS4	1200	1000	800	1600	1100	1000	1400	1000	800
	600	400		550	400		580	400	250
ITS1	600	420		600	520	420	620	520	420
HSP	420			420			420		

注: 表中数字为片段大小(bp)。
Note: Length of DNA fragments are in table.

得清晰的条带, 最少 1 条, 最多达 6 条, 但对同一引物各站之间条带数的差异较少, 最多只相差 2 条, 而引物 HSP 在 3 个站获得的带完全一模一样——仅一条 420bp 的共有带。其他四个引物在 3 个站获得数目不等的条带, 其中既有相同的带, 也有特异性带。对于引物 CW15946/ 47, 3 站共有一条 900bp 的带, I 站的条带比 II 站和 III 站都要多, 分别为 3 条、1 条和 2 条; 对于 EGMS6 和 EGMS4 两个引物, 则在 III 站获得的条带比 I 站和 II 站都多 1 条; 至于 ITS1 引物, II 站和 III 站均获得 3 条, 并且 3 条带大小一样, 都是比 I 站多出 1 条 520bp 的带。

3 讨论

DNA 指纹是指生物基因组 DNA 经限制性酶切、聚合酶链式反应(PCR)扩增或两者组合处理后电泳以揭示基因组 DNA 特征的分子遗传标记技术。这种技术现已广泛应用于群落级以下结构层次的各级生命系统并获得了许多很有意义的成果, 它能否突破层次瓶颈而应用于较高层次的生命系统研究? 作者对此进行了勇敢的探索并取得了积极的进展。

3.1 DNA 指纹分析能否用于群落级生命系统遗传结构研究

DNA 指纹分析能否应用于群落级生命系统遗传结构研究, 主要涉及两个层面的问题。一是打破种群以内应用范围瓶颈拓展至真核生物群落级层次, 理论上是否可行; 二是从复杂的群落样本能否制备合适于 DNA 指纹分析的模板 DNA。

3.1.1 DNA 指纹分析理论上可否拓展至群落 所有 DNA 指纹技术都是揭示研究对象 DNA 的多态性。当分析对象是个体或细胞时, 所揭示的是一个同质的基因组 DNA 的多态性; 如分析的对象是种群时, 则揭示的是非同质的基因组 DNA 的多态性, 因为构成种群的个体间在遗传结构方面是存在差异的。这也就是说, 来自前者与后者的模板 DNA 多样

性是有差别的, 后者提供的模子(模板类型)要比前者多。如果从生物群落获取模板 DNA 的话, 无疑模子会更多, 也就是说具有更高的模板 DNA 多样性。DNA 指纹图谱的拓扑结构, 包括谱带数量和相互位置是扩增产物的函数, 而反应体系中反应产物的成分和产量与模板密切相关。当模板多样性很高时, 则可能会因为模子间对引物和底物的竞争而出现部分模板的扩增产物浓度低于凝胶检测灵敏度的情况。但只要从群落制备高品质的模板 DNA, 就应该可以整体上对群落进行指纹分析。

3.1.2 能否由群落样本制备适用的模板 DNA 制备优质的模板 DNA 是 DNA 指纹分析能否进行的前提。本项研究的样本是水生态系统中的浮游生物群落水样。因此, 首先去除样本中存在着的污染物和悬浮杂质, 然后, 作后续处理。在普遍使用的酚/氯仿抽提方法^[15]的基础上参照土壤微生物化学裂解法^[11]和王江新^[16]等, 建立了适合浮游生物群落 DNA 抽提的方法: 裂解前将水样于培养皿中沉淀 1h 后去除杂质、离心(8000r/min, 5min); 用灭菌双蒸水清洗 3 次以去除黏附于浮游生物表面的水溶性杂质与细菌; 由于水样中生物种类繁多, 为了保证各类群充分裂解和有效去除蛋白质, 在本实验中结合酚/氯仿抽提方法和王江新等的裸藻 DNA 抽提法, 在抽提液(4% SDS; 250mmol/L Tris Cl, pH = 8.0; 60mM/L Na₂EDTA)^[16]中加入 Proteinase K(终浓度为 0.2mg/mL)裂解 1h, 从而保证破细胞的数量, 并有效地使蛋白质变性; 参照土壤微生物的抽提方法在裂解完后 6500r/min 离心 10min 取上清进行后续实验, 这减少了非水溶性腐殖质对酚抽提的影响, 并可提高 DNA 的纯度。经上述步骤所提取的基因组 DNA 具有较高的纯度, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.85—2.0 之间, 0.7% 琼脂糖凝胶上呈现单一区带(图 2), 这表明从浮游生物群落制备的 DNA 可作为指纹分析的模板。

3.2 群落 DNA 指纹图谱拓扑结构的生物学意义

所制备 DNA, 经随机引物与特异性引物扩增后均能获得清晰且多样化的图谱(图 3 和图 4)。结合现有有关物种组成及理化方面的资料, 对所获得群落 DNA 指纹图谱的生物学意义进行尝试性的、定性的论述。

3.2.1 图谱拓扑结构与物种生物多样性 随着分子生物学技术发展、成熟, 遗传多样性研究也逐步走向生物多样性研究领域的中央舞台^[17-18]。遗憾的是, 所有关于真核生物遗传多样性的工作至今几乎都是种群水平以下生命系统的, 且这些工作均是涉及大型生物类型的。而任何生态系统中, 微型生物和中型生物均是多样性最丰富的, 也是功能上最重要的类群。要清点生物多样性的家底和揭示生态功能的机制, 这两大类群生物不应该是被人们遗忘的角落。在本项补遗与探索研究中, 笔者选择了有相当工作积累的东湖 3 个湖区观察站, 即分别位于东湖的水果湖区、郭郑湖区与汤林湖区的武汉东湖 I、II 及 III 站(图 1)。RAPD 指纹分析表明: 3 个采样站的浮游生物群落遗传结构间存在明显的表现差异(图 3, 表 3)。实验中获得的可分辨的 RAPD 电泳谱带数在 III 站最多(23 条), I 站和 II 站较为接近(分别为 17 条和 14 条), 并且 III 站包括了 II 站和 I 站 33%—100% 的条带。从特异引物所获得的图谱来看, 尽管各站之间差异相对要少一些, 但仍是 III 站的多于 I、II 两站(图 4, 表 4)。这说明了 III 站的生物多样性是最高的, 这一结论与谢平等^[19]研究东湖水体富营养化与浮游生物群落多样性时得出的“多数类群(如轮虫和桡足类)的物种多样性是随着水体营养水平的上升而下降的”结论是相符的, 与雷安平等^[20]对东湖硅藻群落多样性的研究得出的结论也是相类似的。这方面的工作, 如果与物种组成研究严格对应进行将是很有意义的。

3.2.2 图谱拓扑结构与环境理化因子 本项研究的采样站 I、II、III 站分别处于超富营养水平、富营养水平和中营养水平^[19]。从 III 站→II 站→I 站 RAPD 谱带数呈依次降低的趋势, 并且 III 站明显多于 I 站和 II 站, 而 I 站和 II 站相差不太明显(图 3, 表 3)。从差异性来看, 不论是在条带数量上, 还是在片段大小上都是 III 站与 I 站之间的差异比 II 站与 II 站之间的差异要大。这与龚志军等^[21]直接测定的总磷、总氮从 II 站→II 站→I 站依次降低, 且 II 站与 I 站、II 站的差异较大, 而 I 站与 II 站相差不是很明显的这样一变化趋势是一致的。这说明了 DNA 指纹图谱与 TP、TN 等理化因子间存在着一定的联系。

至于更确切的对应关系还有待更进一步的探讨。

综上所述, DNA 指纹分析所获得的东湖 I、II、III 站浮游生物多样性的数据与已有资料是基本吻合的。据此, 作者认为 DNA 指纹分析在群落级生命系统的研究是可行的, 并有可能为推动分子生态学向深层次的发展和在水资源科学管理方法的建立起着一个有力的杠杆作用。

参考文献:

- [1] Antonio M A D, Hillier S L. DNA fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* strain CTV-05 by repetitive element sequence based PCR analysis in a pilot study of vaginal Colonization[J]. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**: 1881—1887
- [2] Archak S, Gaikwad A B, Gautam D, *et al.* Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques(RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India [J]. *Genome*, 2003, **46**(3): 362—369
- [3] Van Haeringen W A, Van de Goor L H P, Panneman H, *et al.* Detection of Universal Variable Fragments as Markers for Genetic Studies: A Novel Technology for DNA Fingerprinting[J]. *Mol. Biotechnol.*, 2003, **23**(2): 117—125
- [4] Morton C O, Mauchline T H, Keny B R, *et al.* PCR based DNA fingerprinting indicates host related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* [J]. *Mycol. Res.*, 2003, **107**(2): 198—205
- [5] Russell R J, Festing M F W, Deeny A A, *et al.* DNA fingerprinting for genetic monitoring of inbred laboratory rats and mice [J]. *Laboratory. Animal Science*, 1993, **43**: 460—465
- [6] Sudo T, Goto N, Mannen H, *et al.* Identification and minisatellite linkage analysis of SMXA recombinant inbred strains of mice by DNA fingerprinting[J]. *Experimental Animals*, 1995, **44**: 87—93
- [7] Wang X. M., Yang X. R., Progress of Studies on the molecular markers[J]. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2000, **7**(1): 21—24[王晓梅, 杨秀荣. DNA 分子标记研究进展. 天津农学院学报, 2000, **7**(1): 21—24]
- [8] Deng Z N, Gentile A, Nicolosi E, *et al.* Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers[J]. *J. Hort. Sci.*, 1995, **70**: 117—125
- [9] Patrick J C, Susan K B, Norman F W. Random amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three cultivars[J]. *J. Amer. Hort. Sci.*, 1997, **122**(3): 350—399
- [10] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. *Curr. Microbiol.*, 1999, **2**: 317—322
- [11] Luo H F, Qi H Y, Xue K., *et al.* A preliminary application of PCR—DCCE to study microbial diversity in soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(8): 1570—1575[罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用. 生态学报, 2003, **23**(8): 1570—1575]
- [12] Frank S, Christoph C T. A new approach to utilize PCR single strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial con-

- munity analysis[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**: 4870—4876
- [13] Vybiral D, Witte A, Velimirov B. Investigation of 0.2 μ m filterable bacterial from the Western Mediterranean Sea using a molecular approach: dominance of potential starvation forms[J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **31**(2): 153—161
- [14] LUKOW T, Danfied P F, Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants[J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **32**: 241—247
- [15] Bozena Z, Robert K, Irenenz M. Genetic and morphological variability among clones of *Euglena Pisciformis* based on RAPD and biometric analysis[J]. *Algological studies*, 1996, **81**: 1—21
- [16] Wang J X., Xie S.L., Zhong J, Y. *et al.*, A modified rapid efficient DNA extraction method of Euglenoids [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(5): 533—536. [谢树莲, 钟家钰, 潘卉, 等. 一种改进的快速有效的裸藻 DNA 抽提方法. 水生生物学报, 1999, **23**(5): 533—536.]
- [17] Xia M. Research progress of biodiversity [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 1999, **30**(1): 94—100. [夏铭. 生物多样性研究进展. 东北农业大学学报, 1999, **30**(1): 94—100]
- [18] Xia M. Research progress of genetic diversity [J]. *Chinese Journal of Ecology*. 1999, **18**(1): 59—65. [夏铭. 遗传多样性研究进展. 生态学杂志, 1999, **18**(1): 59—65]
- [19] Xie P, Zhu G Y, Lu M, *et al.* Effects of the water eutrophic on plankton community diversity [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, **20**(appl): 30—37 [谢平, 诸葛燕, 戴莽, 等. 水体富营养化对浮游生物群落多样性的影响. 水生生物学报, 1996, **20**(增刊): 30—37]
- [20] Lei A P, Shi Z X, Wei Y X. Diversity of the phytoplankton in Donghu lake, Wuhan [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(2): 179—184 [雷安平, 施之新, 魏印心. 武汉东湖浮游藻类物种多样性的研究. 水生生物学报, 2003, **27**(2): 179—184]
- [21] Gong Z J, Xie P, Tang H J, *et al.* The influence of eutrophication upon community structure and biodiversity of macrozoobenthos [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(3): 210—216. [龚志军, 谢平, 唐汇涓, 等. 水体富营养化对大型底栖动物群落结构及其多样性的影响. 水生生物学报, 2001, **25**(3): 210—216.]

THE FEASIBILITY FOR APPLICATION OF DNA FINGERPRINTING TO COMMUNITY-LEVEL LIFE SYSTEM

YU Yu-He, ZHANG Wen-Jing and YAN Qing-Yun

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: PCR-based DNA fingerprinting techniques such as random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) represents a very informative and cost-effective approach for assessing genetic diversity of a wide range of organisms. As a powerful molecular biology technology, DNA fingerprinting is widely applied on the study of integral genetic structure. All DNA fingerprinting techniques can discover the genetic diversity. For an individual or cell, they can discover the diversity of one genome; For population, they can discover the diversity of total DNA including many individuals. If for community, more information for different species can be discovered from many kinds of DNA templates. However, it is restricted to population and individual-level life system. This paper first explored the feasibility for application of DNA fingerprinting to community-level life system with plankton community from three stations of different eutrophic status in Lake Donghu as samples. Total community DNAs were extracted. PCR fingerprinting techniques based on the use of arbitrary primers (RAPD-PCR) have been developed and compared for their ability to generate/fingerprint patterns characteristics. 20 RAPD primers were screened. 5 primers which amplified clear and sharp bands were used to discuss from these total RAPD primers. The results show that (1) we constructed a DNA extraction method adapting to plankton community through a series of getting rid of impurities. The high quality of template DNA is a precondition for DNA fingerprinting analysis. The composition and their concentration are key factors for DNA extraction. The template DNAs extracted from Station of hypertrophication, Station of eutrophication and Station of mesotrophication, respectively, were amplified reproducibly; (2) the resulting amplified maps are clear and stable in both RAPD by random primers M201, M202, M203, M218 and M219, and PCR by specific primers CW 15946/47, EGMS6, EGMS4, ITS1 and HSP, and there were some relationship between the topological structure and trophic status. From RAPD and specific primers PCR amplification, there are many variations among three stations. Station comprising 33%—100% bands of Station or Station. This indicates species biodiversity of Station is the highest. In addition, the DNA fingerprinting maps obtained were tentatively and qualitatively discussed with the available data of species biodiversity and physical chemistry. In the present work, the results of this study will contribute to our understanding of the feasibility for application of DNA fingerprinting to community-level life system in plankton.

Key words: DNA fingerprinting; Community life system; Plankton; Lake Donghu