

研究简报

四种臂尾轮虫 rDNA 16S-23S 基因间隔区的序列测定与分析

席贻龙^{1,2} 陈月琴³ 诸葛燕¹ 黄祥飞¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072;

2. 安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000;

3. 中山大学生命科学学院, 广州 510275)

SEQUENCE ANALYSIS OF rDNA 16S-23S INTERGENIC SPACER REGIONS FROM *BRACHIONUS CALYCIFLORUS*, *B. BIDENTATA*, *B. DIVERSICORNIS* AND *B. ANGULARIS* IN LAKE DONGHU, CHINA

XI Yi-Long^{1,2}, CHEN Yue-Qin³, ZHUGE Yan¹ and HUANG Xiang-Fei¹

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000;

3. College of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

关键词: 莲花臂尾轮虫; 双棘臂尾轮虫; 裂足臂尾轮虫; 角突臂尾轮虫; rDNA; 基因间隔区; 序列分析

Key words: *Brachionus calyciflorus*; *B. bidentata*; *B. diversicornis*; *B. angularis*; rDNA; Intergenic spacer regions; Sequence analysis

中图分类号: Q959.181 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)04-0427-04

轮虫是一类小型无脊椎动物, 在水生态系统中具有重要的作用。有关轮虫的分类, 以往的研究手段主要局限于传统的外部形态和内部特征的比较。但轮虫由于个体较小(一般小于 200 μm), 形态上的鉴定和分类存在一定的困难, 并且某些保守性的形态特征仍具有一定的可变性, 一些形态上十分接近种类的鉴定常常因为环境条件的变化或生长阶段的不同出现同物异名或异物同名现象, 因此种的形态界定标准仍存在模糊不清之处。

近几年来, 随着分子生物学技术的飞速发展, 诸如 DNA 序列分析等分子生物学手段已逐步应用到生物系统学研究中。尽管结合分子生物学特征开展轮虫系统生物学研究的工作仍较少^[1], 但从分子水平上认识轮虫各类型群的遗传特征、确定轮虫种间鉴定的分子指标已是轮虫分类学的趋势之一。本研究以实验室培养方法较为成熟的臂尾轮虫为对象, 对四种臂尾轮虫的 rRNA 基因间隔区进行序列测定和分析, 以弄清其分子差异; 同时建立起以单个轮虫作为材料进行 rRNA 基因间隔区序列测定的方法, 为轮虫分类学和系统学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 研究所涉及的莲花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*), 双棘臂尾轮虫 (*B. bidentata*), 裂足臂尾轮虫 (*B. diversicornis*) 和角突臂尾轮虫 (*B. angularis*) 均采自中国武汉东湖, 实验室内分别进行“克隆”培养以用于分子生物学研究。

1.2 DNA 的制备及 rDNA ITS 区的 PCR 扩增反应 在显微镜下挑取 1 或几个轮虫于 0.5 mL 的 Eppendorf 管中(含 70% 乙醇), -20°C 保存。乙醇保存的样品经离心处理后, 加入 25 μL 提取缓冲液: 1% SDS, 10 mmol/L EDTA pH8.0, 10 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 10 mmol/L NaCl;), 上下倒置数次; 采用中山大学生命科学学院分子生物学实验室研制的 DPS 纯化系统直接从提取缓冲液中获取微量 DNA 用于 PCR 扩增, PCR 扩增反应程序为: 94°C 变性 5 min, 然后 94°C 1 min, 45°C 1.5 min, 72°C 2 min, 30 个循环。PCR 引物为: LH2 5' GTCGAATTCTCGAG-GTGAACCTGCGGA AGGATCA3', D1am 5' CCTGCAGTCGACA (TG) ATGCITAA (AG) TTCAGC (AG) GG 3', 分别对应于 18s rDNA 3' 末端和 28s rDNA 5' 末端区域, 于中国科学院上海生

收稿日期: 2002-03-18; 修订日期: 2003-01-20

基金项目: 中国科学院生物分类学系学科发展特别支持项目

作者简介: 席贻龙(1965—), 男, 安徽肥东人; 博士, 教授; 研究方向: 浮游动物生态学

物化学研究所合成;PCR 反应液:20—30μl 反应体积含 1—1.5U 的 Taq polymerase (Sangon, 上海), 200μmol/L dNTP (华美公司), 2—2.5mmol/L 的 MgCl₂ 及痕量轮虫 DNA (小于 10⁻⁹g)。扩增完成后, PCR 产物用乙醇沉淀或 DPS 系统纯化, 沉淀晾干后加适量 TE 溶解, 取 2μl 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查, 其余—20℃保存备用。

1.3 rDNA ITS 区 PCR 扩增产物的克隆及序列测定 PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统纯化后, 与质粒载体连接, 质粒载体为 pTZ19, 按文献操作进行。用 Qiagen 公司的质粒提取试剂盒提取所要的克隆子质粒 DNA, 377 型自动测序仪 (ABI PRISM) 进行序列测定。

1.4 序列比较分析 按照最大同源性的原则将所测得序列进行排列, 序列见图 1。序列中引入适当数量的空位 (Gap), 以便达到最大可能的同源性。采用计算机分析软件包 PC gene 6.0 进行序列的比较分析。

2 结果

2.1 DNA 的制备及 PCR 扩增

采用单个细胞 DNA 快速制备法获得的痕量 DNA (小于 10⁻⁹g) 直接用于专一性引物的 PCR 扩增反应, PCR 产物长度基

<i>B. calyciflorus</i>	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCCTTTGCGTT-TGTGT-CGCTA-ATGCGATT
<i>B. bidentata</i>	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCCTTTGAAATTGTGC-TGCTTCAAA-GCTCAA
<i>B. diversicornis</i>	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCCTTTGTGTA-GTGTGCACTGCATACTTGA
<i>B. angularis</i>	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCCTTTGGTGTAGTTGCATTATGCATACTATA
<i>B. calyciflorus</i>	CACTCGCTAATTAAAACAC ACTATGAGTT-TAGATGC ATCTTCTAAAATTCGGCGTA
<i>B. bidentata</i>	CAATTATTAAACAA-ACTC ATCTT-TGACTATAGATGC ATTTTTATAGTCATAGCTT
<i>B. diversicornis</i>	CACTTTAGCATTTACACAC ACTATGTATCTATAATGC TGTTTATAGATGCATGCTTG
<i>B. angularis</i>	CACTATAGCTTTCACACAC ACTATGCATCTATAATGCTGTTATAGACGCAGGC---
<i>B. calyciflorus</i>	TAAAAA---ATCCATGCATGCTCTT---GTATGA---GTCGGGTACCTTATTT---AAGC
<i>B. bidentata</i>	TAAAATCA---TGCAAATTCTATCATAGTTGACATGTCGGGTACCTACTTT---AAGC
<i>B. diversicornis</i>	TAAAACAAAATCATGCATGCTCGTATAGTATGACATGTCGGGTACCTATTTTGTAAGC
<i>B. angularis</i>	-----TAAAATCATGTATGCTCGTATAGCATTGTCGGGTACCTA---TTA-AAGCG
<i>B. calyciflorus</i>	GATCT---TGCTTTG-TCGTGTGGTTGAAGATAGTCATCC-CAT---GTGAACCTAC
<i>B. bidentata</i>	GATTCTCGC-AATCTATGATCGTGTGGTTGAAGATAGTTATTCCTC---TAAT-AACTAC
<i>B. diversicornis</i>	GATCCGAGCCTAATTATGGTCGTGTGGTTGAAGATAGTCATTCTCATACAGTGAACCTAC
<i>B. angularis</i>	ATCCGAGCTAAAACAGGATCGTGTGGTTGAAGATAGTCATTCTCATATAGTGAACCTAC
<i>B. calyciflorus</i>	GCCCAG-TGAATTGCATAAAATTATAACATT---TATAAAACTCTATTCTAGTGTGTTG
<i>B. bidentata</i>	GCCCGCTTAGC---ATTAAATTCTATCACATTCCATTAAACCATTTGTTT---TGTGTTG
<i>B. diversicornis</i>	GCCCGC-TCACTATGCCAAACTAAACTATATTATTTACCATGTTGTATGTGTTG
<i>B. angularis</i>	GCCCGCATAATTAGCAAAACATTAAACTACATTATTTACCATGTTGTATGTGTTG

本一致, 约 850 个碱基(包括 18S 3'末端和 28S 5'末端 rDNA 部分序列)。说明以单个细胞 DNA 制备法获得的痕量 DNA 用于 PCR 扩增, 具有较好的重复性。

2.2 PCR 产物的克隆及序列测定

PCR 产物以 DPS 系统纯化, 并连接到 pTZ19 的 *Sma*I 位点上, 通过 PCR 和限制性内切酶等方法检查转化子, 采用末端终止法测定重组质粒的 DNA 序列, 四种轮虫 rDNA ITS 区长度分别为: 莲花臂尾轮虫为 758bp, 双棘臂尾轮虫 792bp, 裂足臂尾轮虫 802bp, 角突臂尾轮虫 745bp(不包括 18S 3'末端和 28S 5'末端 rDNA 部分序列), 各包含 5.8S rRNA 基因, 约 167bp。其中, 18S rDNA 与 5.8S rRNA 基因的间隔区(简称 ITS1)长度分别为 298, 332, 325 和 294bp; 而 5.8S rRNA 基因与 28S rDNA 间隔区(简称 ITS2)分别为 293, 293, 310 和 284bp。测定不同克隆子, 得到相同的结果, 序列见图 1。

2.3 轮虫属内种间 rDNA 基因间隔区的序列比较和分析

目前, 国际上对轮虫的研究主要集中在 18S rRNA 及 rDNA 的序列比较分析, 用于各大类群之间的比较与系统演化关系研究^[1,2]。对轮虫属内种间的研究尚未见有报道, 也未见有关基因间隔区的报道。用计算机分析软件对所获得的序列进行比较分析, 结果表明: 四种轮虫之间, 序列间核苷

<i>B. calyciflorus</i>	TTTTTTAATTAAAAAA—TAAGTGC-TTCG----GTACTTATGA-TTTAACTAAAATACA
<i>B. bidentata</i>	TGTTTGTGTTGGTGAGCTTTAACACTTCATAGTGTATTAGACTAACAAAATACA
<i>B. diversicornis</i>	TATTCGTAAGCTGTAAA—TACACACGTTATGTGTGTTGTAA-ACAACCTAAAATACA
<i>B. angularis</i>	TATTAGTAAGATGTAAAAACCGCGTGCACTTGTGCTCGTGTGCA-ACAACCTAAAATACA
<i>B. calyciflorus</i>	ACCCTATGCGGTGGATCACTTGGCTCGCAGTCGATGAAGAGCGCAGCAAACGTGCGTGAATT
<i>B. bidentata</i>	ACCCTATGCGGTGGATCACTTGGCTCGCAGTCGATGAAGAGCGCAGCAAACGTGCGTGAATT
<i>B. diversicornis</i>	ACCCTATGCGKGGAATCACTTGGCTCGCAGTCGATGAAGAGCGCAGCAAACGTGCGTGAATT
<i>B. angularis</i>	ACCCTATGCGGTGGATCACTTGGCTCGCAGTCGATGAAGAGCGCAGCAAACGTGCGTGAATT
<i>B. calyciflorus</i>	AATGTGATTGCAAGGACACATTGATCATCGATATCTGAACGCATTGCGGTTATGGATCG
<i>B. bidentata</i>	AATGTGATTGCAAGGACACATTGATCATCGATATCTGAACGCATTGCGGTTATGGATCG
<i>B. diversicornis</i>	AATGTGATTGCAAGGACACATTGATCATCGATATCTGAACGCATTGCGGTTATGGATCG
<i>B. angularis</i>	AATGTGATTGCAAGGACACATTGATCATCGATATCTGAACGCATTGCGGTTATGGATCG
<i>B. calyciflorus</i>	CTTCCATGACCACGCCCTGCTGAGGGTCGGTATTAAATATGTAAAATCGTAATAGTGC—
<i>B. bidentata</i>	CTTCCATGACCACGCCCTGCTGAGGGTCGGTATTCAATATGTAAAATCGTGAGAAGTACAGCA
<i>B. diversicornis</i>	CTTCCATGACCACGCCCTGCTGAGGGTCGGTATTAAATATGTAAAATCGTAATAGTGC—
<i>B. angularis</i>	CTTCCATGACCACGCCCTGCTGAGGGTCGGTATTAAATATGTAAAATCGTGAGAAGTGTGCTA
<i>B. calyciflorus</i>	TTGCACTATTGTTGGTCG-TTAAATTAA—ACTATTATCGACTTITAGATGTGTT-T-
<i>B. bidentata</i>	ATGTTCTCTGCTCGTCGTAAAAGTGT—AAGCT-TTATCGATTTAACATGCGTAGCTG
<i>B. diversicornis</i>	TTGCACTATTGTTGGTCGGTTAAATTAA—ACTATTATCGACTTITAGATGTGTT-T-
<i>B. angularis</i>	TCACACTTTGTTGGTTG-TTAAATTGTTCACACAATTATCGACTTITAGATACTGCTGGT-
<i>B. calyciflorus</i>	TAACTAATCGGTATTAGTT-AAGTCATT-TTATTCAATATCA-TA—GAAATTGCAAATGCA
<i>B. bidentata</i>	TGATTAATCC-TACATTAGTCACAAATGCATTGCTTTCATT—ATCCAATGAATAC
<i>B. diversicornis</i>	TAACTAATCG-TATATTAGTT-AAGTCATT-TTATTCAATATCA-TA—GAAATTGCAAATGCA
<i>B. angularis</i>	TAACTAATCG-TATATTAGTT-AAGTCATTGCTATTCAATATCGAAATGAATAG
<i>B. calyciflorus</i>	GCTCA-GCTTGCTTG-GCAAACAAAATTGCGTAGCTTATCTCCATATTGTTGCATT
<i>B. bidentata</i>	GAGCAAG—ACACAAACAAAATTGCAAAGATTCTCTT—TATTATTG—TTT
<i>B. diversicornis</i>	GCTCA-GCTTGCTTG-GCAAACAAAATTGCGTAGCTTATCTCCATATTGTTGCATT
<i>B. angularis</i>	GCACATGCTGCTAACACAAACAAAATTGCAAAGCTTATCT—ATTGTTCGTGCTG
<i>B. calyciflorus</i>	A—AGTGTGTTGCTGTGTTAGTCATTCAAGCTTAATGTTATGAATTAAACAAACGATGCA
<i>B. bidentata</i>	GGT—CGGCAA—GTATTCA-TAGCT—AATTGGATATTGAAAGCCTTGAAAGATGCA
<i>B. diversicornis</i>	A—AGTGTGTTGCTGTGTTAGTCATTCAAGCTTAATGTTATGAATTAAACAAACGATGCA
<i>B. angularis</i>	AGTAATGCTTAGTGTCTTATTGAAGTTCGATATAAAAGCGGATATTGAATATCGGACAAG
<i>B. calyciflorus</i>	AT—AATGAATTAACTTCAT—TCATTTGACCTCAGATCAGACGAGATTACCGCTGA
<i>B. bidentata</i>	ATTCAA—ATTGTGAAATTAT—TTTCGACCTCAGATCAGACGAGATTACCGCTGA
<i>B. diversicornis</i>	AT—AATGAATTAACTTCAT—TCATTTGACCTCAGATCAGACGAGATTACCGCTGA
<i>B. angularis</i>	ATGCAAACGATTATCATAATCATCATTGACCTCAGATCAGACGAGACTACCGCTGA
<i>B. calyciflorus</i>	ATTTAAGCATATAACTAAGCGGAGGAAAAGAAAACTAACCAGGATTCTTTAGTAACGACGA
<i>B. bidentata</i>	ATTTAAGCATATAACTAAGCGGAGGAAAAGAAAACTAACCAGGATTCTTTAGTAACGGCGA
<i>B. diversicornis</i>	ATTTAAGCATATAACTAAGCGGAGGAAAAGAAAACTAACCAGGATTCTTTAGTAACGGCGA

<i>B. angularis</i>	ATTTAAGCATATAACTAAGCGGAGGAAAAGAACTAACCAAGGATTCCCTTAGTAACGGCGA
<i>B. calyciflorus</i>	GTGAACAGGGAA
<i>B. bidentata</i>	GTGAACAGGGAA
<i>B. diversicorni</i>	GTGAACAGGGAA
<i>B. angularis</i>	GTGAACAGGGAA

图 1 四种轮虫 rDNA ITS 区序列比较

Fig. 1 Comparison of rDNA ITS regions of four rotarias

酸有较大的差异性(11.3%-29.4%)。其中,萼花臂尾轮虫和双棘臂尾轮虫差异值为11.3%,双棘臂尾轮虫和裂足臂尾轮虫差异值为15.1%,萼花臂尾轮虫和裂足臂尾轮虫差异值为21.7%;角突臂尾轮虫与前3种轮虫关系较远,差异值为26.3%-29.4%。

3 讨论

3.1 轮虫微量 DNA 制备法的意义

直接从显微镜下挑取少量轮虫,并以上述方法进行微量DNA制备和分析,此方法的建立,使得对轮虫的分子分析并不依赖于轮虫培养技术的完善。尤其是目前尚不能培养的轮虫,可在野外直接采样,分离出1或数个个体保存于SDS提取缓冲液中,然后再利用上述方法进行微量DNA制备及PCR扩增,即可获得所需的基因片段用于进一步分析。中国轮虫种类繁多,许多种类都有待深入研究,轮虫微量样品DNA制备及分析方法的建立及其应用,将为系统地进行轮虫分子分类和系统学的研究提供一种有效的新方法。

3.2 rDNA 16S-23S 基因间隔区序列分析与轮虫的分类学及系统学研究

前述已述,目前国际上对轮虫基因序列的分析主要集中

在18S rRNA^[1,2]。由于18S rRNA基因结构过于保守,因此将其作为分子指标用于同属内种间及种内的分类和鉴定可能是不适宜的^[3,4]。本研究结果表明,臂尾轮虫rDNA 16S-23S基因间隔区具有较高的突变速率,这说明rDNA 16S-23S基因间隔区可以作为一个精细的分子指标用于同属内种间的分子鉴定和系统学分析。随着研究的深入,rDNA基因间隔区将在臂尾轮虫属或轮虫的其他种属的分类和鉴定以及系统学研究中发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Garey J R. Molecular evidence for Acanthocephala as a subtaxon of Rotifera [J]. *J Mol Evol*, 1996, **43**: 287—292
- [2] Aguinaldo A M A. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other molting animals. *Nature*, 1997, **387**: 489—493
- [3] Garey J R. The evolutionary relationship of rotifers and acanthocephalans. *Hydrobiologia*, 1998, **387/388**: 83—91
- [4] Welch D B M. Early contributions of molecular phylogenetics to understanding the evolution of Rotifera. *Hydrobiologia*, 2001, **446/447**: 315—322