

# 转基因鱼试验湖浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系

李学梅<sup>1,2</sup>, 余育和<sup>1</sup>, 冯伟松<sup>1</sup>, 颜庆云<sup>1,2</sup>, 敖鸿毅<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**对转基因鱼试验湖 7 个采样点的浮游生物群落进行了 PCR - DGGE 指纹分析, 并进而探讨了 DNA 指纹与理化因子的关系。结果表明: (1) PCR - DGGE 指纹图谱中共含 104 谱带, 其中原核谱带 58 条, 真核谱带 46 条, 其多态性位点分别为 87.9% 和 82.6%。(2) 各站点的理化因子中, I 站的 TP 含量最高(0.10 mg/L), TN 含量在 III 站最高(0.34 mg/L), 且各站点波动较大, V 站的透明度最低(63.00 cm); NO<sub>3</sub> - N、NH<sub>4</sub> - N、pH、DO、COD 及电导率在各站点变化不大。基于原核生物图谱的相似性聚类分析表明, 浮游生物群落 VI 和 VII、IV 和 V、II 和 III 相似度分别较高, I 站有别于其它各站, 单独为 1 枝; 基于真核生物图谱的聚类分析显示, I、II 站聚为 1 枝, IV、V、VI 和 VII 依次相聚后与 III 站聚为另 1 大枝, I、II 站与 III 站相距较近; 理化因子的主成分分析结果与之基本吻合。因此, 浮游生物群落 DNA 多态性与环境理化因子是密切相关的, 这类资料的积累将为在分子水平上建立水质预测预报体系奠定基础, 为评价转基因鱼生态安全性提供依据。

**关键词:**PCR - DGGE; 理化因子; DNA 多态性; 浮游生物群落; 转基因鱼试验湖

**中图分类号:**X826, Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1674 - 3075 (2008)01 - 0020 - 05

浮游生物是水中营漂浮生活的微小生物, 包括浮游细菌、浮游植物和浮游动物。浮游细菌是水体生态系统的分解者, 主要分解水体中的有机物质, 同时也是有机颗粒的重要生产者; 浮游植物主要是指自养型的藻类, 它们是水体中的初级生产者, 为初级生产力做出主要贡献(孙书存和陆健健, 2001); 浮游动物包括原生动物、轮虫、枝角类和桡足类, 它们以细菌和藻类为食, 同时又是水体中鱼、虾等的天然饵料, 故在食物链中具承上启下的重要作用。浮游生物作为水体中重要功能类群, 对理化环境变化高度敏感。Anderies 和 Beisner (2000) 认为环境中的生物和非生物因子决定浮游生物的群落结构, 环境波动将导致生物群落的变化; Devetter (1998) 指出, 水库中轮虫种群的季节性变化与环境中的 46 个变量相关联; 许木启和王子健 (1996) 发现, 浮游动物结构和功能参数的变化与重金属的含量关系密切, 其多样性指数与水体中铜的含量存在一定的回归关系。

传统上对浮游生物与周围环境关系的研究主要是依据浮游生物形态特征、数量、生物量、多样性等来反映环境状况。然而, 由于传统方法耗时多、需要专业知识背景较广, 且无法区分无显著特征的微小生物, 故大大制约了群落结构、功能与环境理化因子的研究。伴随着分子生物学技术的发展, 群落层面的分子研究为越来越多的微生态学家所关注。Muzyer 等 (1993) 首次将变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术应用到微生物生态学研究, 更加完整和准确地描述了微生物种群多样性、数量比例和系统进化等; 之后, 该技术也被运用到群落与环境关系的研究中来, Ferris 和 Ward (1997) 采用 DGGE 技术研究了热泉微生物膜中温度梯度变化时微生物群落的分布变化。Frederickson 等 (2003) 通过 DGGE 技术研究发现哥伦比亚海湾的噬蓝藻体病毒种群结构受水温和盐度的影响。余育和等 (2004) 在大量探索研究的基础上, 提出了 DNA 指纹技术在浮游生物群落级应用的可行性, Yan QY 等 (2007) 在此基础上探讨了东湖和三峡水库浮游生物群落 DNA 指纹结构与理化因子的关系, 获得了有意义的结果。

本研究通过 PCR - DGGE 指纹技术来探讨转基因鱼试验湖中不同站点的浮游生物群落结构与理化因子的关系, 试图探究浮游生物群落遗传多样性与环境理化因子的关系, 为评价转基因鱼的生态安全奠定基础。

收稿日期: 2008 - 09 - 16

基金项目: 973 项目 (2007CB109205) 和国家自然科学基金项目 (30490232, 30770298) 联合资助。

通讯作者: 余育和, E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

作者简介: 李学梅, 女, 1985 年生, 硕士研究生。E-mail: lanqian1985@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

多福转基因鱼试验湖坐落于湖北省梁子湖畔,是为其为生物背景构建的一个半自然水体生态系统,平均水深 2 m,面积 6.7 hm<sup>2</sup>,2007 年在湖中依据水深及水生植被情况设置 I ~ VII 号采样点(图 1)。用采水器于表层和底层各采 0.5 L 水样装入 1L 白色塑料瓶中充分混匀,用于群落总 DNA 的抽提。

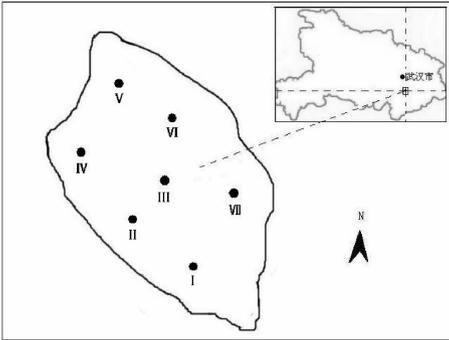


图 1 转基因鱼试验湖采样点分布示意

Fig. 1 Distribution of the sampling sites in the artificial lake for transgenic fish

### 1.2 理化指标的测定

理化因子参照《水环境分析方法标准工作手册》和《环境监测技术规范》规定的方法测定,包括总氮(TN)、总磷(TP)、硝态氮(NO<sub>3</sub>-N)、氨态氮(NH<sub>4</sub>-N)、溶解氧(DO)、化学耗氧量(COD)、pH、透明度和电导率。

### 1.3 群落 DNA 抽提

取 500mL 充分混合的水样经 GF/C 滤膜(孔径 1.2 μm)过滤,并将滤膜在无菌条件下剪碎。加入 3 mL 裂解液(30 μL PK, 30 μL Tris - Cl, pH = 8.0, 150 μL SDS, 600 μL EDTA 和 2 190μL 双蒸水),于 55℃ 水浴裂解 12 h;待其恢复室温后,离心取上清液经酚:酚:氯仿:异戊醇(25: 24: 1)和氯仿 3 次抽提;用 2 倍体积的无水乙醇和 0.1 倍体积的 NaCl (3M)沉淀 3 h,再以 70% 的乙醇清洗、干燥后溶于 40μL TE 溶液,存于 -20℃ 备用。总 DNA 用 0.7% 的琼脂糖凝胶(含 EB)进行电泳以评估制备效果,并用 BECKMANDU 530 DNA/Protein Analyzer 测定 DNA 含量和纯度。

### 1.4 16S rDNA 和 18S rDNA 扩增

选用 16S rRNA 基因和 18S rRNA 基因的特异性引物分别进行 PCR 扩增,引物序列为(Van Hanne E J et al, 1998): F357GC: 5' - CGCCCGCCGCGC

CCCCGCGCCCGGCCCCGCGCCCCCGCCCCCTACGG GAGGCAGCAG - 3', R518: 5' - ATTACCGCGGCTGC TGG - 3' (Muyzer G et al, 1993); F1427GC: 5' - CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGCCCC GCCCCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGG - 3', R1616: 5' - GCGGTGTGTACAAAGGGCAGGG - 3'。

PCR 反应体系为 50μL, 组分如下: 10 × PCR buffer 5μL, 25mM MgCl<sub>2</sub> 溶液 4μL, dNTPs 1.4μL, 正反向引物 20 pmol, Taq 酶 3 U, 模板 DNA 约 40 ng, 最后加灭菌双蒸水补齐至 50μL。PCR 扩增反应在 Perkin Elmer™ 9600 仪上进行,各循环参数反应前需进行优化,16S rDNA 反应条件: 94℃ 预变性 5min, 前 10 个循环为 94℃、30 s, 65 ~ 56℃、30 s 和 72℃、1 min(每个循环后退火温度降低 1℃), 后 22 个循环为 94℃、30 s, 55℃、30 s 和 72℃、1 min, 最后 72℃ 延伸 10 min, 终止于 4℃。18S rDNA 反应条件的递降温度范围为 68 ~ 59℃, 之后于 58℃ 进行 19 个循环, 其它条件与 16S rDNA 相同。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以此来决定 PCR - DGGE 的上样量。

### 1.5 PCR - DGGE 分析

DGGE 在 INGENYphorU - 2 系统中进行, 聚丙烯酰胺(丙烯酰胺: 双丙烯酰胺 = 37.5: 1) 胶浓度为 9% (W/V), 电泳在 1 × TAE 缓冲液中进行。凝胶中加入变性剂甲酰胺和尿素, 使变性梯度为 35% ~ 50%, 以 60 mA 的恒定电流在 60℃ 电泳 10h。电泳结束后, 凝胶用 1 × SYBR Gold 染色 30min, 然后用 1 × TAE 缓冲液漂洗 1 次。在 UVP 成像系统(UVP Inc. CA, USA) 中观察电泳结果并拍照。

### 1.6 数据分析

PCR - DGGE 图谱用凝胶分析软件(Quantity One 4.2. 3, Bio - Rad) 进行分析。各站谱带关系以 1/0 矩阵(1 代表有, 0 代表无) 输出, 之后用 XLSTAT - Pro 软件建立相似性聚类图。各站点间理化因子的主成分分析也通过 XLSTAT - Pro 软件完成。

## 2 结果

### 2.1 不同站点的理化性质

如图 2A 所示, 各站点总氮(TN) 含量波动较大, 在 III 站达到最高值(0.34 mg/L), 氮是生物生命活动的必需元素, 氮含量的增加会提高各种生物的繁殖力; 总磷(TP) 含量在 I 站最高(0.10 mg/L), 然后有下降的趋势; 图中还显示硝态氮(NO<sub>3</sub>-N) 和氨态氮(NH<sub>4</sub>-N) 与总氮的变化趋势不一致, 说明

它们对总氮影响不大。7 个站点间的 pH 值相差不大,都呈弱碱性,其中 I 站碱性最强(pH 8.04);另外,溶解氧(DO)和化学耗氧量(COD)在各站点间相差也不大,分别在 6.50 mg/L 和 5.00 mg/L 左右

(图 2B)。各站点的电导率基本保持一致,平均值为 83.51  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ;透明度从 I 到 V 站逐渐下降,V 站达到最低值(63.00 cm),之后上升(图 2C)。

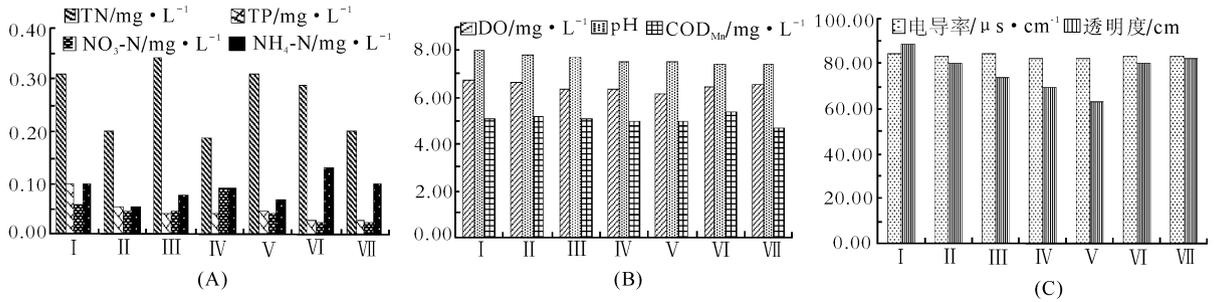


图 2 各站点理化指标的变化情况

Fig. 2 Physicochemical factors in seven stations of the artificial lake

## 2.2 PCR - DGGE 指纹分析

PCR - DGGE 图谱中共获得 104 条扩增谱带,其中原核谱带 58 条,真核谱带 46 条(图 3)。原核生物的多态性位点为 87.9%,仅出现在 1 个站点的谱带有 6 条,占总谱带 10.3%;真核生物的多态性位点为 82.6%,仅出现在 1 个站点的谱带有 7 条,占总谱带 15.2%。

## 2.3 聚类分析

PCR - DGGE 指纹分析的相似性聚类如图 4 所示。对于浮游生物群落中的原核生物来说, I 站与其它各站点的相似性最低,成为单独的 1 枝; III 站和 II 站也分别成为单独的 1 枝,然而这 2 站在图中显示的距离比较近, IV 站与已经先聚为 1 枝的 V、VI 和 VII 站聚在一起(图 4A);而对于真核生物, 7 个站点可聚为 2 大枝: IV、V、VI 和 VII 首先相聚,再与 III 站聚为 1 大枝, I、II 站聚为另 1 大枝, III 站位于 I、II 站之下,与它们的距离较近(图 4B)。基于理化因子的主成分分析中 I 站与其它各站相聚较远, II 和 III 站相近, IV 和 V 站相近, VI 和 VII 站相近(图 4C),与上述 2 个聚类图大体一致。

## 3 讨论

变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)可分离具有不同碱基序列的 DNA 片段,所得电泳条带将指纹基因可视化,可不经培养来检测一个环境样品中的微生物群落,因此能够高效、真实、稳定的反映生物群落遗传多样性和动态变化,已经被广泛地应用到环境生态学中微生物的研究(王小芬等,2006)。然而,PCR - DGGE 指纹技术也存在自身的不足之处,如只能分离较小

的基因片段(500 bp 以下),对于较长片段分离率会下降;有时还会出现序列不同的 DNA 片段迁移在同一位置的共迁移现象,Vallaey 等(1997)曾发现,尽管不同的甲烷氧化菌有实质的序列差异,但其 16S rDNA 片段不能通过 DGGE 进行分离。为尽量减少结果出现的误差,本研究就 DNA 模板量、引物浓度、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度及 PCR 循环参数等条件进行了优化组合,另外对 DGGE 电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等因素也进行了优化,获得较理想图谱(图 3),并进一步探索了浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系。

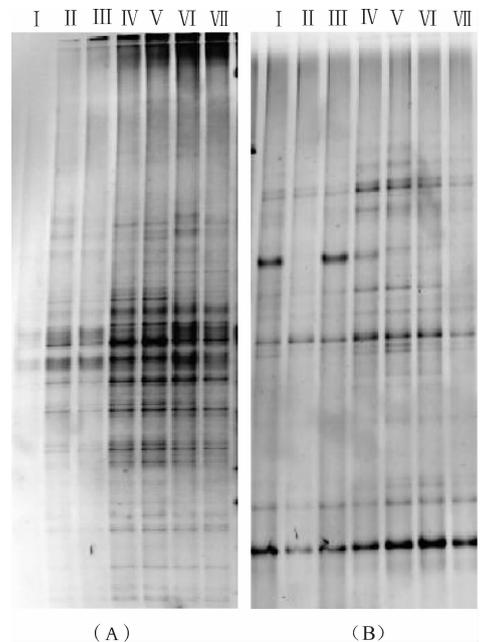


图 3 16S rDNA (A) 和 18S rDNA (B) PCR - DGGE 指纹图谱

Fig. 3 PCR - DGGE profiles of 16S rDNA (A) and 18S rDNA (B)

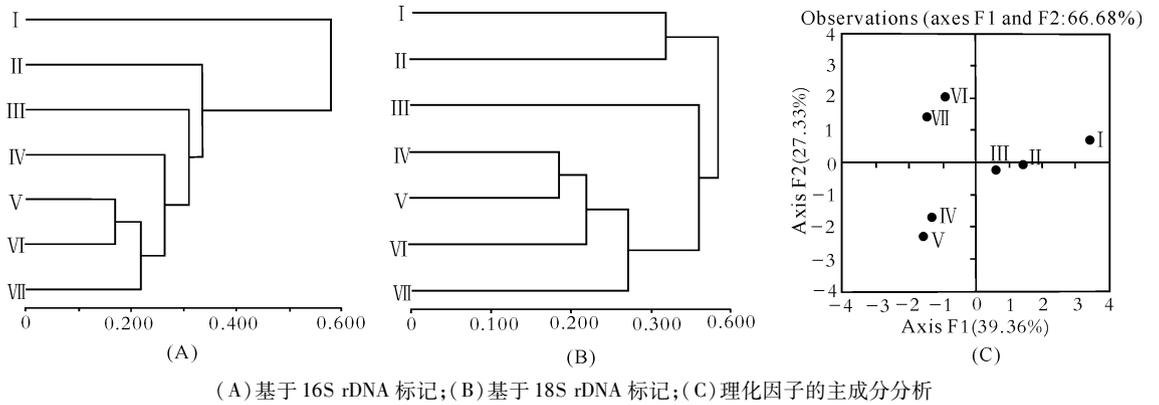


图 4 浮游生物群落 PCR-DGGE 指纹相似性聚类和理化因子主成分分析

#### Fig. 4 Similarity clustering based on PCR-DGGE fingerprints and principal component analysis of physicochemical factors

理化因子能够对生物的生长、发育、繁殖以及其它生命活动产生重要影响,特定环境物种组成通常被认为与其环境理化因子相关,不同环境的水体常存在其对应物种。有研究表明,不同的湖泊环境,其浮游生物的组成存在明显差异(Beaver JR & Crisman TL, 1989);同时,有实验证明群落物种组成与群落 DNA 的多态性是相互关联的(颜庆云等, 2005)。那么,如果能够跳过物种的桥梁作用而找到群落遗传结构与环境理化因子的直接对应关系,那将为水资源管理提供有力的依据。

本研究通过 PCR-DGGE 指纹技术分别对原核生物和真核生物进行分析并聚类,原核生物聚类结果显示 V、VI 和 VII 站相似性较高,最先聚为 1 枝,之后与 IV 站、II 站和 III 站依次聚类, I 站与其它各站的相似性最低,成为单独的 1 枝(图 4A);真核生物聚类结果中, I 站、II 站聚为 1 枝,剩下的 IV、V、VI、VII 站依次相聚后与 III 站聚为另 1 大枝;然而, III 站和 I、II 站的距离在图中显示比较近(图 4B)。理化因子的主成分分析显示, VI、VII 站距离较近, IV、V 站与 II、III 站也分别较近, I 站位于较远处,但与 II、III 站相对较近(图 4C)。3 个聚类图的 I、II 和 III 站有差异,原核生物聚类分析与理化因子分析结果一致,都显示 II 站和 III 站距离较近,与 I 站相距较远,而真核生物聚类分析中 I、II 站聚为 1 枝,之后与 III 站相聚,其原因可能是浮游生物群落中的原核生物结构更简单、生活周期更短,对理化因子的变化也就更加敏感,而真核生物的敏感性则相对较弱;其它 4 个站点在 3 个图中的聚类结果相似, VI 和 VII 距离较近, IV 和 V 距离较近。这说明本文研究对象——转基因鱼试验湖中的浮游生物群落与理化因子是相互关联的,因而用 DNA 多态性的变化来表征环境状况是可信的。已有研究表明,洞庭湖浮游生物群落 DNA 指

纹的聚类结果与理化因子——泥沙有密切关系,泥沙含量为浮游生物分布的主要限制因子,其中泥沙含量高的站点 DNA 指纹与其它站点有较大差异(颜庆云等, 2005)。另外,张翔等(2008)在研究污水处理系统中的浮游生物群落时发现,各阶段浮游生物群落 DNA 指纹的改变趋势与理化指标变化相符,长期连续监测可能会找出污水处理系统中环境指示种。

综上所述,通过分析浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的聚类结果发现,转基因鱼试验湖中浮游生物群落的遗传结构与理化因子存在密切关系,说明浮游生物群落 DNA 的多态性能够反映水体的水质状况。这将为在分子水平上建立简单、快捷的水质预报预测体系奠定基础,为进一步评价转基因鱼生态安全性提供依据。

#### 参考文献:

- 孙书存, 陆健健. 2001. 微型浮游生物生态学研究概述[J]. 生态学报, 21(2): 302-308.
- 王小芬, 王伟东, 高丽娟, 等. 2006. 变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解[J]. 中国农业大学学报, 11(5): 1-7.
- 许木启, 王子健. 1996. 利用浮游生物群落结构与功能特征监测乐安江-鄱阳湖口重金属污染[J]. 应用与环境生物学报, 2(2): 169-174.
- 余育和, 张文静, 颜庆云. 2004. DNA 指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性[J]. 水生生物学报, 28(5): 457-463.
- 颜庆云, 余育和, 冯伟松. 2005. 洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与物种组成对应关系[J]. 生态学报, 25(9): 2221-2226.
- 张翔, 余育和, 冯伟松, 等. 2008. 污水处理厂中浮游生物群落 DNA 指纹及其与水质指标的关系[J]. 环境科学学报, 28(8): 1526-1533.
- Anderies JM & Beisner BE. 2000. Fluctuating environments and

- phytoplankton community structure; a stochastic model [J]. *The American Naturalist*, 155(4): 556 – 569.
- Beaver JR & Crisman TL. 1989. The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems [J]. *Microb Ecol*, 17: 111 – 136.
- Devetter M. 1998. Influence of environmental factors on the rotifer assemblage in an artificial lake [J]. *Hydrobiologia*, 387/388: 171 – 178.
- Ferris MJ, Ward DM. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 63: 1375 – 1381.
- Frederickson CM, Short SM, Suttle CA. 2003. The physical environment affects cyanophage communities in British Columbia Inlets [J]. *Microb Ecol*, 46: 348 – 357.
- Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microb*, 59(3): 695 – 700.
- Vallaey T, Topp E, Muyzer G, et al. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 24: 279 – 285.
- Van Hannen EJ, Van Agterveld MP, Gons HJ, et al. 1998. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *J Phycol*, 34(2): 206 – 213.
- Yan QY, Yu YH, Feng WS, et al. 2007. Genetic diversity of plankton community as depicted by PCR – DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factors in Lake Donghu [J]. *Microb Ecol*, 54(2): 290 – 297.

(责任编辑 万月华)

## Relationship between DNA Fingerprinting Structure of plankton Community and Physicochemical Factors in an Artificial Lake

LI Xue-mei<sup>1,2</sup>, YU Yu-he<sup>1</sup>, FENG Wei-song<sup>1</sup>, YAN Qing-yun<sup>1,2</sup>, AO Hong-yi<sup>1</sup>

- (1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;  
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** To explore the relationship between community composition and physicochemical factors in an artificial lake, plankton communities from the lake for transgenic fish culture were studied by PCR – DGGE fingerprinting. The results as follows: (1) a total of 104 distinct OTUs were identified in the PCR – DGGE analysis, of which 58 were bacterial OTUs and 46 were eukaryotic OTUs, the polymorphism sites were 87.9% and 82.6% respectively; (2) the content of TP at station I was the highest (0.10mg/L), while station III consisted of the most TN (0.34mg/L) and station V had the lowest transparency (63.00 cm); the discrepancy of other measured factors were not obvious in different stations. Cluster analysis based on bacterial OTUs and the principal component analysis of physicochemical factors showed that the similarity of VI and VII, IV and V, II and III were higher, station I was a single cluster; cluster analysis based on eukaryotic OTUs revealed that the seven stations could be grouped into two clusters: the cluster one contained the station I and II, and another cluster consists of the other stations. In conclusion, the DNA fingerprinting of plankton community was closely related to the environmental physicochemical factors, and the data of such kind accumulated will play an important role in constructing a forecast system for water quality, and provide a basis to evaluate the ecological safety of transgenic fish.

**Key words:** PCR – DGGE; physicochemical factors; DNA polymorphism; plankton community; tentative lake of transgenic fish