

萼花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*) 非混交雌体与雄体基因组 DNA 的 RAPD 分析

李大命, 陆建明, 杨家新, 许晓凤

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 采用 RAPD 分析技术对萼花臂尾轮虫 2 种不同性别个体的基因组 DNA 进行对比分析, 探讨萼花臂尾轮虫非混交雌体和雄体性别分化的遗传背景。所用的 30 条随机引物中, 有 10 条引物在两者基因组中扩增出多态性片段, 其中有二者共有条带, 也有二者差异条带, 显示了萼花臂尾轮虫非混交雌体和雄体遗传背景上的差异。其中引物 B15 和 B18 扩增条带具有良好的稳定性和重复性, 进一步选取了用此二引物扩增出的雌雄特异性片段各一条进行回收、克隆和测序, 测序结果已提交到 GenBank 数据库, 序列号分别为: AY907696 和 AY898611, 同源比较未发现具有高同源性的已知序列与之匹配, 表明它们可能是 2 条新的 DNA 序列。

[关键词] 萼花臂尾轮虫, RAPD, 非混交雌体, 雄体, 遗传背景

[中图分类号] Q959.181 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)03-0109-04

RAPD Analysis of Genome DNA on the Amictic Female and Male of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera Monogononta)

Li Daming Lu Jianming Yang Jiaxin Xu Xiaofeng

(School of Life Science Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract In order to acquire the knowledge of the genetic backgrounds which lead to the sex differentiation of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera), the genomic DNA of amictic female and male of *Brachionus calyciflorus* was analyzed by RAPD technology. One or more special bands was generated by 10 primers of 30 tested primers in amictic female or male rotifer and it showed the genetic backgrounds difference between amictic female and male. By repeated testing special bands can be produced stably by primers B15 and B18 respectively in amictic female and male rotifer. The special band was separated, cloned and sequenced. The sequence results were submitted to GenBank and the accession numbers were AY907696 and AY898611. We found there were no any high homology sequence matching to the two sequences and it showed that they could be new DNA sequence.

Key words *Brachionus calyciflorus*, RAPD, amictic female, male, genetic background

萼花臂尾轮虫是常见的淡水浮游动物, 在水中常成为优势种群, 由于其自身的生物学特性, 萼花臂尾轮虫成为淡水水产养殖的重要生物饵料^[1]、水生态毒理学常用的受试生物^[2]、进化生物学研究的良好实验材料^[3]。萼花臂尾轮虫生活史具有典型的世代交替现象, 在一定条件下, 萼花臂尾轮虫由无性生殖转变进行有性生殖形成的机制一直没有确切定论。部分学者认为环境压力诱导非混交雌体变异形成混交雌体, 进而促成有性生殖形成; 种群密度、温度刺激、饥饿、pH 升高或降低、光照周期的长短和光照强度的变化可诱导混交雌体形成。但不同学者间的研究结果之间有差异, 甚至出现了矛盾的结果^[4, 5]。也有学者认为混交雌体的产生受外源性因素和内源性因素的共同影响。遗传因素, 母体年龄, 轮虫孤雌生殖累积的世代数均可对混交雌体的产生和混交百分率产生一定的影响^[6]。还有人认为混交雌体形成是物种进化的结果, 有性生殖是轮虫在进化过程的一种适应。种群繁殖到一定的代数后, 无论条件多么适宜, 混交雌体仍然

收稿日期: 2007-12-30

基金项目: 国家自然科学基金 (30371093) 资助项目。

通讯联系人: 杨家新, 教授, 博士生导师, 研究方向: 轮虫繁殖学研究与水域生态学。E-mail: yangjiaxin@njnu.edu.cn

会出现^[7]. 那么, 萼花臂尾轮虫性别分化究竟是由单纯的环境变化引起, 还是通过遗传背景的改变才能发生? 非混交雌体和雄体轮虫在遗传的物质上存在哪些差异? 鉴于尚未见有这方面的研究报道, 而非混交雌体、雄体遗传物质基础上的差异又是解决萼花臂尾轮虫性别分化的一个不可回避的问题, 因此本研究试图通过对萼花臂尾轮虫非混交雌体和雄体基因组 DNA 的 RAPD 分析, 以揭示两者在遗传结构上的异同, 为进一步研究轮虫性别分化的分子机制奠定基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

萼花臂尾轮虫采用单克隆培养, 保证试验材料纯洁度. 小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 作为轮虫食物, 投喂密度 2×10^6 Cell/mL. 光照强度约为 4000 lx, 光照时间 L:D=12:12, 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$. 非混交雌体收集前用蒸馏水冲洗 2 遍, 放置过夜, 除去其体内藻类食物和排泄物, 然后离心收集. 采用温度和密度双因子诱导轮虫有性生殖发生, 获得雄体材料, 具体方法参考 [8]. 雄体不需要前处理, 灭菌蒸馏水冲洗 2 遍, 直接离心收集. 所获试验材料用于基因组 DNA 提取.

1.2 引物

本实验所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物号及序列见表 1.

表 1 随机引物碱基序列

Table 1 Sequence of arbitrary primers

引物号	序列	引物号	序列	引物号	序列
B01	GTTTCGCTCC	B11	GTAGACCCGT	A01	CAGGCCCTTC
B02	TGATCCCTGG	B12	CCTTGACGCA	A02	TGCCGAGCTG
B03	CATCCCCCTG	B13	TTCGCCCGCT	A03	AGTCAGCCAC
B04	GGACTGGAGT	B14	TCCGCTCTGG	A04	AATCGGGCTG
B05	TGCGCCCTTC	B15	GGAGGCTGTT	A05	AGGGTCTTG
B06	TGCTCTGCCC	B16	TTTGCCCGAG	A06	GGTCCCTGAC
B07	GGTGACGCAG	B17	AGGGAACGAG	A07	GAAA CGGGTG
B08	GTCCACACGG	B18	CCACA GCAGT	A08	GAAA CGGGTG
B09	TGGGGGACTC	B19	ACCCCCGAAG	A09	GGGTAACGCC
B10	CTGCTGGGAC	B20	GGACCCTTAC	A10	GTGATCGCAG

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取

主要步骤: (1) 向装有轮虫 1.5 mL 的离心管中加入核裂解液 (核裂解液: 375 μL TE (pH 8.0), 5 μL PK (20 mg/mL), 100 μL SDS (10%), 20 μL EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0)), 55°C 消化过夜. (2) 加入等体积饱和酚抽提 15 min, 然后 4°C 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液. (3) 酚: 氯仿: 异戊醇 = (25: 24: 1) 等体积抽提 15 min, 然后 4°C 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液. (4) 氯仿: 异戊醇 = (24: 1) 等体积抽提 15 min, 然后 4°C 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液. (5) 加入 1/10 体积醋酸钠 (3 mol/L), 2.5 倍体积冰无水乙醇, 混匀, 4°C 放置 30 min, 12000 r/min 离心 20 min, 弃上清. (6) 加入 300 μL 体积分数 70% 乙醇洗涤, 8000 r/min 离心 10 min, 倒去乙醇, 室温放置 10~15 min, 使乙醇挥发, DNA 干燥, 加 dH_2O 溶解, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA. -20°C 保存备用.

1.3.2 引物筛选

用表 1 所列 30 条随机引物以非混交雌体、雄体的 DNA 为模板进行 RAPD 扩增. PCR 扩增反应总体积为 25 μL , Taq 酶为 1 个酶单位, 模板 DNA 量约 10 ng. PCR 循环程序为: 94°C 变性 3 min 后进行 40 个循环: 94°C 变性 1 min, 36°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 最后在 72°C 保持 10 min. 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测. 筛选出重复性好、带型清晰明亮且雌、雄性基因 DNA 有差异的随机引物.

1.3.3 目的片段的克隆和序列测定

切下琼脂糖凝胶板上的目的片段 (非混交雌体、雄体特异性条带各 1 条), 用维特洁公司生产的 DNA 凝胶回收试剂盒回收 RAPD 特异片段. 纯化后的产物用 pMD18-T Vector Kit (TaKaRa) 载体进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞后, 涂布于含 IPTG 和 X-gal 的选择平板上, 倒置培养过

夜. 挑白斑, 纯化质粒, 并以质粒为模板进行 PCR 扩增检测, 将 PCR 扩增获得阳性结果的重组质粒送往上海博亚公司测序.

2 结果与分析

2.1 非混交雌体、雄体基因组 DNA 提取结果

本实验采用饱和酚法, 对收集活体轮虫直接进行了基因组 DNA 的提取. 提取结果经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 电泳图谱显示: DNA 带型整齐, 基本呈线形, 无拖尾, 说明 DNA 降解很少, 较为完整, 能够满足 RAPD-PCR 扩增的需要.

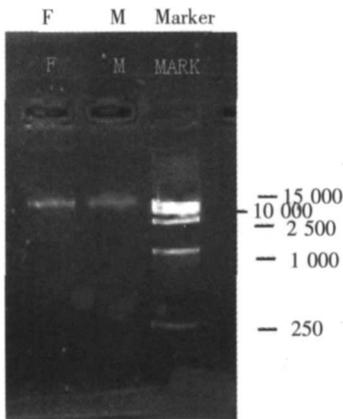
2.2 RAPD-PCR 扩增结果

用 30 条随机引物对萼花臂尾轮虫非混交雌体和雄体基因组 DNA 进行扩增, 大多数引物扩增出 4~10 条清晰可辨的条带, 少数引物只扩增出 1~3 条带, 扩增条带可以分为 3 种类型: ①非混交雌体和雄体共有条带; ②非混交雌体中特有的条带; ③雄体中特有的条带. 对照组未产生任何条带, 表明实验未受污染. 其中 10 条引物在非混交雌体和雄体的扩增条带具体情况见表 2 经多次重复, 筛选出重复性好、带型清晰明亮且雌雄个体有差异的引物 B15 和 B18 两引物分别在萼花臂尾轮虫非混交雌体和雄体中能稳定扩增出特异性片段 (图 2).

表 2 10 条随机引物序列及其扩增片段情况

Table 2 Random primers and their amplified results

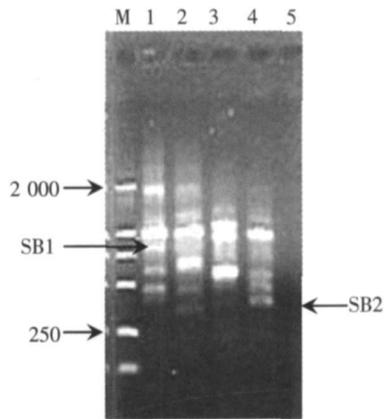
引物号	非混交雌体扩增条带 / 特异性条带	雄体扩增条带 / 特异性条带
B01	7/1	6/0
B02	6/1	5/0
B04	5/0	6/1
B07	5/1	4/0
B12	8/1	8/1
B14	6/1	6/1
B15	6/1	5/0
B17	7/2	5/0
B18	4/0	5/1
A10	5/1	5/1



F: 非混交雌体; M: 雄体

图 1 萼花臂尾轮虫非混交雌体和雄体基因组 DNA 电泳图

Fig.1 The result of agarose gel electrophoresis of genomic DNA of *B. calyciflorus* amictic female (F) and male (M)



M-2000 DNA marker; 1, 2: 随机引物 B15 扩增非混交雌体、雄体产物; 3, 4: 随机引物 B18 扩增非混交雌体、雄体产物; 5: 阴性对照; SB1-引物 B15 扩增非混交雌体得到的特异性条带; SB2: 引物 B18 扩增雄体得到的特异性条带.

图 2 使用引物 B15 和 B18 RAPD 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.2 The result of agarose gel electrophoresis of RAPD with primers B15 and B18

2.3 特异条带的克隆和测序

测序结果表明, 引物 B15 扩增非混交雌体产物中的特有片段, 大小为 767 bp (序列提交到 GeneBank, 序列号 AY907696). 另一个是引物 B18 扩增雄体产物的特有片段, 大小为 388 bp (序列提交到 GeneBank, 序列号 AY898611). 在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上, 利用 BLAST 对 2 序列进行同源性序列搜索, 结果显示 2 条序列与 GenBank 数据库的其它序列同源性均很低. 表明测序片段可能是新的序列, 有必要对其进行深入研究.

3 讨论

轮虫动物门分为 3 个纲: 蛭态纲、单巢纲和尾盘纲. 三纲之间的最大差异在于生殖方式不同. 蛭态纲轮虫终身进行无性生殖, 单巢纲轮虫进行无性生殖和有性生殖, 尾盘纲则进行有性生殖^[9]. 从进化角度看,

轮虫动物门较好地体现了“无性生殖” \rightarrow “无性生殖 + 有性生殖” \rightarrow “有性生殖”的进化途径. 特殊的生殖方式使轮虫成为进化生物学的理想材料. 根据形态结构和生理特征差异, 单巢纲轮虫个体分为 3 种类型: 非混交雌体、混交雌体和雄体^[10]. 非混交雌体由非混交卵进行有丝分裂发育而成, 而混交雌体和雄体则由混交卵进行减数分裂形成, 在减数分裂过程中, 轮虫基因组 DNA 必定经过一系列复杂的重组、交换等过程, 有可能产生新基因. 雄体中出现的特有条带可能就是减数分裂过程中形成. 混交雌体出现的机理还不清楚, 研究的焦点多集中在混交雌体出现的生态机理方面, 而混交雌体出现的分子机制及 3 种类型个体遗传特征尚未见报道.

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术是迄今研究遗传变异最简单最快速的方法, 运用大量引物可对整个基因组进行地毯式多态性分析, 能够区分 2 个基因组之间的微小差异. 与其它分子标记技术比, RAPD 技术具有很多优点: 所需要的 DNA 量少, 不需要知道基因组结构, 结果分析便捷、廉价^[11]. 本文首次运用 RAPD 技术对萼花臂尾轮虫非混交雌体和雄体基因组 DAN 进行分析, 期望能够从分子水平对轮虫性别分化进行研究. 从 30 条随机引物中筛选出 2 条引物 B15 和 B18 分别从非混交雌体和雄体基因组中扩增出 1 条差异条带, 两引物扩增条带扩增稳定、重复性好, 且每个引物在两基因组中都有特异性条带出现. 这初步证实了非混交雌体和雄体基因基因组上存在的差异, BLAST 对两序列进行同源性序列搜索, 没有检索到相似性序列, 还需要对两序列功能进行深入研究. 但是, 由于 RAPD 自身技术限制, 获得的特异性条带较少, 两条特异性条带是否就是导致非混交雌体和雄体性别分化的原因, 还需进一步研究. 许多工作, 例如用获得的特异性 DNA 片段作为探针进行 Southern 杂交, 进一步证实这 2 个片段是否为两种不同类型所特有对萼花臂尾轮虫核型进行分析, 看是否存在类似高等生物常染色体和性染色体; 或者通过荧光原位杂交(FISH 技术)把这个特异性的片段定位在某个特殊的染色体上等, 这些工作还有待今后深入的研究.

[参考文献]

- [1] 刘建康. 高级水生生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 204-208.
- [2] Snell T W, Janssen C R. Rotifers in ecotoxicology: A review[J]. *Hydrobiologia* 1995, 313/314: 231-247.
- [3] Gregor F, Fussmann S, Elner Nelson G, Hairston Jr. Evolution as a critical component of plankton dynamics[J]. *Proc R Soc Lond B* 2003, 270: 1 015-1 022.
- [4] 杨家新, 黄祥飞, 刘建康. 淡水轮虫繁殖生物学研究进展[J]. *水产学报*, 1999, 23(3): 291-295.
- [5] Gilbert J J. Population density, sexual reproduction and diapause in monogont rotifers: new data for *Brachionus* and a review[J]. *J Lincol* 2004, 63: 32-36.
- [6] Gilbert J J. Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: developmental and population biology[J]. *Evolution & Development* 2003, 5(1): 19-24.
- [7] King C K. Evolution and Genetics of Life Histories[M]. New York: Springer-Verlag, 1982: 121-138.
- [8] 杨家新, 黄祥飞. 温度和密度对萼花臂尾轮虫产卵量和混交雌体的影响[J]. *湖泊科学*, 1996, 8(4): 368-372.
- [9] David B, Mark Welch. Bayesian and maximum likelihood analyses of rotifer-acanthocephalan relationships[J]. *Hydrobiologia* 2005, 546: 47-54.
- [10] Claus-Peter Stelzer. Evolution of rotifer life histories[J]. *Hydrobiologia* 2005, 546: 335-346.
- [11] Hardys H, M Balick B, Schiewater. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology[J]. *Molecular Ecology* 1992, 1: 55-63.

[责任编辑: 孙德泉]