

文章编号: 0529-6579 (2000) S2-0132-05

分子生物学技术在原生动物系统 进化中的应用和进展*

施海琼, 白庆笙, 陆勇军

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 随着研究方法的进步, 分子生物学技术在原生动物研究中得到了越来越广泛的应用。综述同工酶、PCR、RAPD、序列测定及核酸原位杂交在原生动物研究中的应用。

关键词: 原生动物; 分子生物学技术

中图分类号: Q959.110.1 **文献标识码:** A

近几十年来, 分子生物学技术极大地推动了生命科学的发展。随着分子生物学技术的不断发展和完善, 现在该技术已经迅速、广泛地渗透到了生命科学的各个分支学科。原生动物学研究在许多领域已取得很大的进步。然而由于传统研究方法的局限性, 影响了这一学科的进一步发展。分子生物学技术的应用赋予原生动物学研究新的内容和取得突破性进展的可能性。本文将介绍一些常用的分子生物学方法在原生动物研究中的应用及进展。

1 原生动物学的研究意义和概况

原生动物是最原始、最简单、最低等的单细胞动物。构成原生动物的单个细胞, 具有一般细胞所具有的基本结构和维持生命和持续后代所必需的一切功能, 是一个复杂的、高度集中的生命单位, 是一个完整的有机体^[1]。

原生动物的种类繁多, 在地球上分布极为广泛。从海洋、江、河、湖泊到土壤、苔藓, 只要有水的地方, 都会有原生动物的存在。这形成了原生动物高度的生物多样性。

原生动物学自创立以来, 获得了巨大的发展, 为工业、农业、水产业、畜牧业、医学的进步做出了贡献。原生动物是单细胞的生物, 因此在研究生命起源和进化中是十分重要的一个环节。大多数寄生原生动物对人类和家畜造成很大的危害, 并且对于畜牧业和渔业来说也是惨重的损失。同时, 原生动物在生态系统的物质循环中占有重要的地位。而且, 原生动物对环境变化敏感, 因此在污水和水质监测方面是很好的指示生物^[1-3]。300 多年前, 人们就开始利用显微镜对原生动物进行观察和描述, 并且对原生动物的研究在鉴别、形态描述和一般生物学方面已经发展形成了经典的理论系统。随着认识和研究手段的不断

* 基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (39900006; 39730070)

收稿日期: 2000-10-15; 作者简介: 施海琼 (1977~), 女, 研究生。

进步, 各种新技术和方法的引进, 原生动物学向微观与宏观两方面不断地发展, 并在细胞生物学和分子生物学方面取得了很大的进展。

2 分子生物学技术在原生动动物系统进化中的应用

60年代以前, 分类学家都是依靠对形态学和行为学特征分析来建立生物类群的系统关系。然而原生动物分类学与系统发育研究仅借助于经典的形态学方法是不够的。80年代起, 分子生物学技术开始应用于原生动物的研究中, 并立即体现了其快速、客观、准确的优点。分子生物学方法以生物大分子作为标准, 是对传统方法的完善和发展。当然, 分子生物学技术包括了很多方面的内容, 无法一一尽述。本文将关于同工酶、PCR及RADP、克隆测序等方面的应用分别进行阐述。

2.1 同工酶技术

同工酶是指功能相同但结构不同的一类酶。其研究是从基因产物认识基因的存在及表达, 可以从蛋白质水平检测不同种/亚种间多种酶的差异。该方法对于确定原生动物的分类地位以及鉴定它们种的特异性有了更深层次的突破, 所得遗传相似系数和聚类分析图谱在种群间的遗传差异和生物多样性研究方面较传统方法有更大的说服力^[4,5]。但是由于原生动物个体微小, 而同工酶的提取需要依赖虫体培养技术的不断完善, 许多种类会因此而不易获得高纯度、低污染的同工酶; 更关键的是, 多数同工酶带谱数量不多^[6]。

余育和等利用聚焦电泳法比较研究了上海四膜虫(*Tetrahymena shanghaiensis*)与梨形四膜虫复合种其他14个种的8种同工酶, 根据酶谱分析了各种同工酶等电点的相似系数(S_m), 结果表明有7个系数值在0.440以上, 其中最大的达0.770(*T. pigmentosa*与*T. canadensis*), *T. shanghaiensis*与所用各种四膜虫间的 S_m 均小于上述值, 除与*T. australis*间的 S_m 为0.438, 其余均为0.368以下, 从而证实*T. shanghaiensis*是与*T. australis*亲缘关系较接近的一新种^[7]。冯荪莲等将上海S1株四膜虫与12种具小核梨形四膜虫(*Tetrahymena*)的4种同工酶(Ace, Idh, Goh, To)进行电泳图谱分析表明该株为梨形四膜虫的一新种^[8]。

2.2 PCR

PCR, 是一种选择性体外扩增DNA或RNA片段的方法。其特异性是由两个人工合成的引物序列决定的。整个扩增过程分三步: ①变性: 加热使模板DNA双链间的氢键断裂而形成两条单链; ②退火: 突然降温后模板DNA与引物按碱基配对原则互补结合; ③延伸: 在DNA聚合酶及酶离子等存在的条件下, 从引物的3'端开始, 结合单核苷酸, 形成与模板链互补的新DNA链。上述三步为一个循环, PCR就是在合适条件下的这种循环的不断重复^[9,10]。

PCR具有快速、灵敏、操作简便等的优点, 因此得到广泛的应用: 它不仅用于基因的分离、克隆和DNA序列分析; 用于突变体和重组体的构建、基因表达与调控的研究; 还可以用于生物基因多态性的检测。在具体应用中PCR还包括了嵌套PCR(nested PCR), RT-PCR(逆转录酶介导的PCR)和定量PCR(quantitative PCR)等内容。周金林和李培英使用PCR方法来检测奶牛粪便中鼠隐孢子虫, 这种方法具高敏感性和强特异性^[11]。Cynthia和Carol利用PCR和嵌套PCR方法检测废水中的*Giardia*和*Cryptosporidium*^[12]。Simon和John应用PCR方法鉴定环境中存在的*Naegleria fowlei*(一种自由生活的变形虫)^[13]。PCR技术非常灵敏, 为研究者提供了一种检测和量化特定的结构基因的表达的强有力工

具。该技术的应用为环境监测开辟了一条新的途径,相信将在这一领域发挥越来越大的作用。

2.3 RAPD

RAPD 技术是用短的(通常 9~10 bp)随机序列 DNA 作为引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增而产生的多态性 DNA 片段。扩增 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性^[14]。对每一个引物而言,检测基因组 DNA 多态性的区域是有限的,但利用一系列引物则可使检测区域几乎覆盖整个基因组,因此, RAPD 可以对整个基因组 DNA 进行多态性检测。该方法可以在对物种没有任何分子生物学研究的情况下对其进行 DNA 多态性分析,具有检测效率高、样品用量少、灵敏度高和检测容易的优点,已广泛运用于动植物的品系鉴定、基因定位、构建基因图谱及种群多样性等方面的研究,而且在原生动系统学方面的研究开始了广泛的应用和迅速的发展。

黄念等对累枝虫属(Genus *Epistylis*)的 3 个种进行 RAPD 分析,计算出遗传相似度和变异度,即遗传距离,初步确立相互间的进化关系^[11]。缪伟等用 RAPD 方法对原生动物缘毛目中独缩虫属(Genus *Carchesium*)、累枝虫属(Genus *Epistylis*)和钟虫属(Genus *Vorticella*)间的遗传相似度进行研究比较,得出其进化关系^[11]。孙种等对 3 个地域螅状独缩虫(*Carchesium polypinum*)群体进行遗传多样性分析,显示 3 个不同地区的螅状独缩虫群体彼此存在着明显的差异,3 个地域群体的遗传相似度平均值为 0.4776,遗传变异度高达 1.5224(即 52.24%)^[11]。

2.4 分子克隆测序

分子生物学的研究,从一开始的蛋白质、核酸大分子研究,已逐步更趋向于碱基序列的测定。序列测定最具说服力,且可延伸到属级甚至科级阶元的多样性检测,而且最充分揭示 DNA 多样性的方法是 DNA 序列分析。核糖体碱基作为目前已知生物体的最小单位,其组成和排列顺序,在根本上决定了该个体相应结构的功能,因此,测得特定片段碱基序列,可以从根本意义上了解该生物在生理特征、进化地位、遗传变异、种间/内差异等方面的信息^[9,15]。

以前用放射性标记和自显影,现在越来越普遍用荧光标记的自动测序仪,有软件供序列比较。

由于 rDNA 的极其保守和稳定性,其碱基序列可以很好地用于生物多样性的检测,同时,16S 至 23S 的间隔区序列已完全可以说明问题,因而可以不必测得其齐全序列^[15]。人们在原生动物特定结构的测序工作已有部分进展,如 α -、 β -、 γ -微管蛋白、中心蛋白、16S rDNA 等结构的序列测定,极大的丰富了人们对该大类生物的了解。谭明和梁爱华对八肋游仆虫的 γ 微管蛋白 cDNA 序列进行了分析^[11]。陈月琴和徐润林等对缘毛目褶累枝虫的 16S rDNA 基因 3' 端 1115 个核苷酸进行序列测定和分析,从分子水平探讨了累枝虫属与缘毛目其它属之间的亲缘关系^[16]。

2.5 原位杂交

核酸原位杂交(nucleic acid hybridization in situ)技术是特定标记的已知顺序核酸作为探针与细胞或组织切片中核酸进行杂交并对其实行检测的方法,是分子生物学和组织化学成功结合的产物。原位杂交不需要从组织中提取核酸,对于组织中含量极低的靶序列有极高的敏感性,并可完整地保持组织与细胞的形态,更能准确地反映出组织细胞的相互关系

及功能状态。核酸杂交具有极高的特异性和灵敏度, 可以用来检测和定量环境中某种基因, 进而可以鉴别特定微型生物种群或种系的数量、分布及其变化趋势。原位杂交对于原生动动物这类个体微小的单细胞动物来讲, 无疑是发展研究不可缺少的一部分, 并具有很大的发展空间。Dorothee 等构建了嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 的一个 16S rRNA 标记的寡核苷酸探针, 并利用原位杂交方法来分析嗜肺军团菌与其宿主 (纤毛虫和阿米巴) 之间的关系^[17]。

3 分子生物学技术在原生动动物的研究中的应用前景

由于原生动动物个体微小, 并且许多种类形态上极其相似, 仅仅依靠传统的形态观察和银染技术, 无法准确确定其在有系统演变中的进化地位, 以及其系统分类上还存在许多的混乱。这些局限性是传统的方法难以突破的, 分子生物学方法可揭示出研究对象的许多新的特征且不受制于研究对象形态, 并已广泛应用于原生动动物分类学与系统进化的研究。随着对遗传机制分子基础的阐明, 生物大分子在系统进化的研究中发挥了越来越重要的作用。分子生物学技术的应用在最大程度上摒弃了主观因素, 并且可以从分子和基因水平提供有益的补充和佐证, 使之有了新的进展。

分子生物学技术在原生动动物研究中的应用是从近 20 年开始发展的, 这种新的研究方法立即体现了其可靠、准确的特点, 并正在不断加速原生动动物学的发展。该技术除了在系统进化中得到了应用和发展; 原生动动物在环境中的监测作用也突破了传统的方法, 各种分子生物学技术的不断应用也为环境监测开辟了一条新的途径。而且原生动动物与周围的微生物及其内共生体的研究, 通过分子生物学方法也得到了新的思维和发展的空间。分子生物学技术对于我们研究原生动动物开拓了新的内容和方向。

同时, 我们也认识到分子生物学技术在原生动动物的应用研究起步较晚, 且多数仅涉及淡水种类, 关于海洋种类的研究仍很缺乏。例如 AFLP 是一种优良的多态性分子标记技术, 可产生丰富而稳定的遗传标记, 可用于遗传分析的各个方面^[18], 如分类、系统发育、种类鉴别及遗传图谱构建等的研究。然而国际间使用这种方法对原生动动物系统分类的研究仍为空白。相信分子生物学的各项技术在这个新的领域中的应用将会有很大的发展空间, 并且原生动动物学和生命科学也会随之有更快更大的发展。

参考文献:

- [1] 沈韞芬. 原生动动物学. 北京: 科学出版社, 1999. 1~10.
- [2] 宋微波. 等. 原生动动物学专论. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999. 1~8.
- [3] 沈韞芬. 等. 微型生物监测新技术. 北京: 中国建筑工业出版社, 1990. 16.
- [4] 沈锡祺. 原生动动物生物化学. 上海: 华东师范大学出版社, 1990.
- [5] 熊全沫. 同工酶电泳数据的分析及其在种群遗传上的应用. 遗传, 1986 (8): 1~5.
- [6] 陈子桂, 宋微波. 分子标记在纤毛虫原生动动物系统学研究中的应用. 青岛海洋大学学报, 2000, 30 (2): 237~243.
- [7] 中国原生动动物学学会第五次学术讨论会论文摘要汇编, 1990.
- [8] 中国原生动动物学学会第三次学术讨论会论文摘要汇编, 1985.
- [9] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社, 1992.
- [10] 林万明. PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社, 1993.

- [11] 中国原生动物学会第十次学术讨论会论文摘要汇编, 1999.
- [12] CYNTHIA L M, CAROL J P. Evaluation of PCR, nested PCR and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62 (6): 2081 ~ 2085.
- [13] SIMON K, JOHN B. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowlei* from the environment. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61 (10): 3764 ~ 3767.
- [14] 陆朝福, 朱立煌. 植物育种中的分子标记辅助选择. *生物工程进展*, 1995, 15 (4): 11 ~ 17.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 340.
- [16] 陈月琴, 徐润林, 赵锦, 等. 褶囊枝虫 16S rDNA 基因分析. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1999 (38): 20 ~ 24.
- [17] DOROTHEE G, et al. Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (7): 2686 ~ 2690.
- [18] 尹佟明, 黄敏仁. AFLP 分子标记及其在植物育种上的应用. *生物工程进展*, 1997 (17): 6 ~ 11.

Application and Evolvment of Molecular Biological Technique to the Studies on Protozoan System Evolution

SHI Hai-qiong, BAI Qing-sheng, LU Yong-jun *

Abstract: Along with the advancement of studying methods, it's more and more extensive application of molecular biological technique to the studies on protozoan research. And it is summarized about the application of isozyme, PCR, RAPD, sequencing technique and nucleic acid hybridization in situ to the protozoan research.

Keywords: Protozoa; molecular biological technique

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China