

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0020-24

褶累枝虫 16S rRNA 基因分析^{*}

陈月琴¹, 徐润林¹, 赵 锦¹, 屈良鹄¹, 沈韫芬²

(¹中山大学生命科学学院, 广州 510275; ²中国科学院水生生物研究所)

摘 要: 以缘毛目褶累枝虫为研究材料, 探索和建立了适用于较难培养的单细胞原生动物的分子生物学研究方法, 并测定了褶累枝虫 16S rRNA 基因 3' 端 1 115 个核苷酸。通过比较分析, 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, 为进一步重构原生动物的系统图提供最基本的资料。

关键词: 褶累枝虫, 16S rRNA 基因, 序列分析

分类号: Q 959.117, Q 751 **文献标识码:** A

原生动物是一类多系进化、高度多样化的单细胞真核生物, 其多样性和系统进化研究一直是倍受关注的焦点。然而, 原生动物多样性和系统进化有机联系的研究却凤毛麟角, 从 Van Leeu-Wenhoek 时代到 20 世纪, 原生动物的系统发育研究几乎不涉及血缘, 评价较高级阶元的唯一标准就是生物的形态相似性, 而这种单细胞生物直接感受环境的压迫, 其形态和生理易受培养条件的影响, 因此研究结果可能带上人为的雕刻。90 年代以来, 由于分子生物学技术的发展, 使得人们通过比较来自各种生物某一信息大分子的序列来建立原生生物系统发育树成为可能^[1, 2]。但是, 从目前已报道的结果来看, 许多学者用于分子生物学研究的材料多选用下毛类或膜口类纤毛虫作为实验材料。这与下毛类和膜口类纤毛虫容易培养和纯化有关。而缘毛类纤毛虫, 如缘毛目 (Peritrichida) 的分子系统学研究仅有很少的报道^[3]。本文以生活在淡水中的缘毛目褶累枝虫 *Epistylis plicatilis* 为研究材料, 探索和建立适用于较难培养的单细胞原生动物的分子生物学研究方法, 包括用“原位”方法获取少量样品直接用于 PCR 扩增的微量法, PCR 引物的选择等等。并通过测定和分析褶累枝虫以及其它纤毛虫的 16S rRNA 基因序列, 从分子水平探讨它们的亲缘关系, 为进一步重构原生动物缘毛目 (Peritrichida) 的系统图及更科学准确的阐明缘毛类纤毛虫各属间亲缘关系提供最基本的资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

褶累枝虫 *Epistylis plicatilis* (Ciliophora) 用挂片法采自广州中山大学校园内池塘中, 光

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39730070); 国家杰出青年基金 (39525007)

收稿日期: 1998-06-15 第一作者简介: 陈月琴, 女, 33 岁, 博士后

镜下鉴定种类 (400 ~ 1 000×). 缘毛目 (Peritrichida) 的另外 2 个种环毛后游虫 *Opisthonec-ta henneguyi* 和沟钟虫 *Vorticella convallaria*, 以及膜口目 (Hymenostomatia) 的弯豆形虫 *Col-pidium campylum* 和瞬目虫 *Glaucoma chattoni* 的 16S rRNA 基因序列从 Genbank 中获取.

1.2 16S rDNA 的 PCR 扩增反应及序列测定

在体视镜下用解剖针和眼科镊子挑取呈群体生活的褶累枝虫, 移到一干净载片上, 用蒸馏水反复清洗多次, 直到光镜下未见有其它真核生物止. 然后从显微镜下挑取褶累枝虫于 0.5 mL 的 Ependorf 管中, 加入 25 μL 提取缓冲液 (φ 为 1% SDS, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L NaCl); 采用本实验室研制的 DPS 纯化系统 (玻璃粉, NaI 等) 直接从提取缓冲液中获取微量 DNA 用于 PCR 扩增, PCR 扩增反应条件等见参考文献^[3]. PCR 引物, 18N5: 5' TGGTGCCAGCAGCCGCGGTA 3', 18N11R: 5' CTCAG TAAGCTTGATCCTTCCG CAGGTT CACC 3', 分别对应于 16S rDNA 610 ~ 630 位和 3' 末端的保守区域. 为真核生物通用引物. 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 [4] 操作. 采用美国 Life Science Sequenase Version 2.0 (USB) 测序试剂盒直接测定重组质粒的 DNA 序列.

1.3 序列排列与数据处理

按照最大同源性的原则将所测得序列进行排列, 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 Felsenstein (1995) 的 Phylip Version 3.5 分析软件进行距 离序数计算及树图构建. 膜口目的弯豆形虫 *C. campylum* 和瞬目虫 *G. chattoni* 作为外类群.

2 结果与分析

2.1 褶累枝虫 16S rDNA 的 PCR 扩增及序列测定结果

将“甲藻单个细胞 DNA 制备法”运用于褶累枝虫的 DNA 快速制备, 采用 DNA 快速回 收系统, 在高浓度的 SDS 提取液中, 以少量玻璃粉 吸附微量的褶累枝虫 DNA, 吸附 DNA 的玻璃粉, 除 去 SDS 后直接用于 PCR 扩增反应. 这样, 减少了对 材料的需求, 不需要进行材料的大量培养, 仅从显微 镜下挑取的 1 个褶累枝虫的群体则可得所需要的 PCR 产物. PCR 扩增结果见图 1.



图 1 褶累枝虫 16S rDNA PCR 扩增结果
Fig 1 16S rDNA PCR amplification
result of *Epistylis plicatilis*
0 空白对照; M 2 kb marker;
1 *Epistylis plicatilis*

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, 获得 16S rDNA 1 115 碱基对核苷酸序列, 为 16S rRNA 基因的部分序列 (图 2). 测定不同克隆子, 得到相 同的结果.

CCAGCAGCCG CGGTAATTCC AGCTCCAAAA GCGTATATTA AAGTTGTTGC AGTTAAAAAG	60
CTCGTAGTTG AAATTCTGGC TGATTGGGC CTTTGCTTTC ATGCGAAGGA ACCAGCAGTC	120
ATCCGCTTGC AAGTACATGC TCTTCCTTAA CCGGTAGACT GTATAAGTAA GCATTTTACC	180
TTGAGAAAAA CAGAGTGTT CAGGCAGGTT TGTCCGAAT GCATTAGCAT GGAATAATAG	240
TATGACTGAG GTCGATTAT TGGTTAGAGA CTTTAGTAAT GATTAATAGG AACAATCGGG	300

GGCATTGGTA CTTGTCAGTC AGAGGTGAAA TTCTTGGATT TGACAAAAGAC TAACTGATGC 360
GAAAGCGTTT GTCAAGAATG TTTTCATTAA CAAGAACGAA AGTTAGGGGA TCAAAGACGA 420
TCAGATACCG TCCTAGTCTT AACTATAACT ATACCGACTC GGATTCAGAT GAATATCAAA 480
GTTCAATTGG GACCGTAGGA GAAATCAAAG TCTTTGGGTT CTGGGGGGAG TATGGTCGCA 540
AAGCTGAAAC CTTAAAGGAA TTGACGGTTT TGCACCACCA TGGAGTGGAC GTGCGGCTTA 600
ATTTGACTCA ACACTGGGAA ACTCATCAGG GCAAGAAGAT TTTAGGATTG ACAGATTGAG 660
AGTTCTTTCT TGATTGTCTA GTGGTGGTGC ATGGCCGTTT TTAGTTGGTG GAGTGATTTG 720
TCTGGTTAAT TCCGTTAACG AACGAGACCT TAACCTGCTA ACTAGTACTT TGATTTTCAA 780
TCGGAGTTAC TTCTTAGAGG ACTATGTGAT GTAATCACAT GGAAGTTTGA GGCAATAACA 840
GGTCTGTGAT GCCCTTAGAT GTCTGTAGCT GCACGCGCGC TACAATGACA CATTCAACGA 900
GTAATTCCTG ACCCGAAAGG GCTCGGGTAA TCTTTTTAGT GTGTGTCGTG ATAGGGATAG 960
ATCTTTGTAA TTATGATCTT TGAACGAGGA ATTCTAGTA AGCGCATGTC ATCAGCATGT 1 040
GCTGATTACG TCCCTGCAAA ATGTA CACAC CGCCCGTCGC TATTACCGAT TGGGTGTATA 1 100
GGTGAACCTT CTCGACAGTC GCAAGACTAG AAATTAAGTA AACCTTTACA CCTAGAGGAA 1 160
ATAAAAGTCG TAA CAAGGTT TCCGTA 1 186

图 2 褶皱枝虫 16SrDNA 部分序列

Fig 2 16S rDNA nucleotides of *Epistylis plicatilis* (partial)

2.2 褶皱枝虫与其它 2 种缘毛虫 16SrDNA 的序列比较分析及分子系统图的构建

从 Genbank 中获取 Peritrichida 中 *Opisthonecta henneguyi* 和 *Vorticella convallaria*, 以及 Hymerostomatia 的 *Colpidium campylum* 和 *Glaucoma chattoni* 的 16S rRNA 基因序列, 按照最大同源性的原则将所测得序列进行排列 (序列比较图略). 采用计算机分析软件包 Phylip version 3.5 中的 DNA dist Program 进行距离序数计算, 序列间的核苷酸差异见表 1. 根据序列间的核苷酸差异值, 以 Fitch 法构建树图, 结果见图 3.

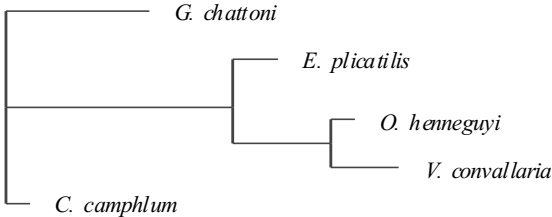


图 3 褶皱枝虫与其它 4 种纤毛虫的分子系统图

Fig 3 The phylogenetic tree *E. plicatilis* and other ciliate species

表 1 褶皱枝虫等 5 种原生动物 16S rDNA 序列比较结果

Tab 1 Pairwise comparisons of 16S rDNA (partial) from *E. plicatilis* and other species

种 名		序列间的核苷酸 K_{nuc} 值				
<i>E. plicatilis</i>	0					
<i>C. campylum</i>	0.244 8	0.000 0				
<i>G. chattoni</i>	0.281 0	0.067 8	0.000 0			
<i>V. convallaria</i>	0.101 9	0.277 2	0.326 6	0.000 0		
<i>O. henneguyi</i>	0.089 1	0.265 7	0.287 1	0.042 8	0.000 0	

从表 1 可以看出, 缘毛目的 *E. plicatilis*, *O. henneguyi* 和 *V. convallaria*, 其 16S rDNA 序列间的核苷酸差异值相对较小, 差异值为 4.3% ~ 10.2%; 同样, 膜口目的 *C. campylum* 和 *G. chattoni*, 核苷酸差异值也仅为 6.8%; 相对来说, 这 2 个目的序列则差异较大, 序列间的核

苷酸差异值 24.5%~32.7%, 说明了形态结构的变化与分子标准的一致性. 图 1 示这 5 个类群之间的相对关系.

3 讨 论

3.1 缘毛类纤毛虫 DNA 的制备

缘毛类纤毛虫, 分布非常广泛. 它们中的许多种类为自由生活种类, 生活习性多样, 在各种淡水水体、河口水域、海洋都有分布. 在纤毛虫分子生物学研究中, 许多学者多选用下毛类或膜口类纤毛虫作为实验材料. 这与下毛类和膜口类纤毛虫容易培养和纯化有关. 与之不同的是, 缘毛类纤毛虫的实验室培养和纯化较为困难. 从国内外的资料来看, 对浮游原生动物进行分子生物学研究, 一般都需要几毫升至数十毫升的培养材料, 这对开展原生动物的分子系统学研究无疑是一个限制因素. 本研究将“甲藻单个细胞 DNA 制备法”运用于褶累枝虫的 DNA 快速制备, 不需要进行材料的大量培养, 用挂片法采集后, 仅从显微镜下挑取的一个褶累枝虫的群体则可获得到微量的 DNA 直接用于专一性引物的 PCR 扩增反应. 该方法的应用使得材料的获得不依赖于原生生物培养技术的完善, 能客观地反应天然状况.

3.2 PCR 引物的选择

最初 PCR 引物是以真核生物通用引物 18N1: 5' AACCTGGTIGATCCTGCCAGT 3' 和 18N11R: 5' TCCTTCTGCAGGTTCACTAC 3' 扩增 16S rDNA 全基因^[3]. 尽管该套引物为真核生物通用引物, 但用于缘毛类纤毛虫中并不适用. 将该引物用于褶累枝虫 16S rDNA 扩增, 采用不同的 PCR 反应条件和程序都未能获得理想的 PCR 扩增结果. 通过比较真核生物的 16S rDNA 的全序列^[6, 7], 选择位于 610~630 (forward) 和 18N11R (reverse) 这 2 段序列作为 PCR 引物, 则可获得较好的扩增产物, 重复性好, 而且对缘毛目不同属种普遍适用. 尽管所获的片段为 16S rDNA 的部分序列, 但根据核糖体 RNA 结构变化规律, 在所选定区域的高变区, 已包含了足够的信息, 用于属间系统学比较分析.

3.3 缘毛目属间亲缘关系问题

传统的缘毛目纤毛虫分类是依据虫体的生活方式将其分为固着亚目 (Sessilina) 和游泳亚目 (Mobilina). 作为常见种类, 自由生活的缘毛类纤毛虫分布在许多水体环境中, 即使在水分相对较少的土壤环境中, 也有它们的踪迹. 在固着亚目中, 主要根据虫体的柄分枝与否; 柄中是否具有肌丝以及肌丝分布状况和虫体是否具有几丁质的鞘等明显的形态特征, 人们将它们分为钟虫属 (*Vorticella*)、独缩虫属 (*Carchesium*)、聚缩虫属 (*Zoothamnium*)、累枝虫属 (*Epistylis*)、盖虫属 (*Opercularia*) 等几十个属. 本文所涉及的 3 种缘毛类纤毛虫, 根据它们的形态特征, 分别属于 3 个科^[8]. 除了虫体没有柄外, 后游虫与钟虫形态相似, 且为单体. 而累枝虫与上述的两类纤毛虫明显不同在于是群体生活的. 从 16S rDNA 序列比较来看 (表 1), *O. heneguyi* 和 *V. corvallis*, 核苷酸差异值相对较小, 差异值为 4.3%, 而 *E. plicatilis* 与 *O. heneguyi* 和 *V. corvallis* 核苷酸差异值分别为 8.9% 和 10.2%, 表明后游虫属与钟虫属的亲缘关系较与累枝虫属近. 从图 1 也可看出这几个种之间的亲缘关系. 这一结果揭示出形态学变化和分子趋异的相互关系. 也表明了 16S rRNA 基因用于缘毛类纤毛虫系统发育研究的可行性. 本文只是我们在缘毛类纤毛虫系统发育研究中的获得一个初步结果. 对于缘毛类纤毛虫其它科属间的亲缘关系将给予进一步的报道.

参考文献:

- [1] BERNHARD D, LEIPE D D, SOGIN M L, et al. Phylogenetic relationship of the Nassulida within the phylum *Ciliophora* inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Furgasonia blochmanni*, *Obertruria georgiana* and *Pseudomicrothorax dubius*. *J Euk Microbiol*, 1996, 43(5): 126 ~ 141
- [2] GREENWOOD S J, SOGIN M L, LYNN D H. Phylogenetic relationships within the class Oligohymenophorea, phylum *Ciliophora*, inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Colpidium campylum*, *Glaucoma chattoni* and *Opisthonecta henneguyi*. *J Mol Evol*, 1991, 33(2): 163 ~ 174
- [3] 陈月琴, 屈良鹄, 邱小忠, 等. 甲藻单个细胞 DNA 的制备及在赤潮藻类分子鉴定中的应用. *中山大学学报(自然科学版)*, 1997, 36(4): 66 ~ 69
- [4] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996
- [5] SOGIN M L. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. 95 ~ 102
- [6] BENESON D A, BOGUSKI M S, LIPMAN D J, et al. Genbank. *Nucleic Acids Res* 1997, 25: 1 ~ 6
- [7] MAIDAK B L, OLSEN G J, LARSEN N, et al. The RDP(ribosomal database project). *Nucleic Acids Res* 1997, 25: 109 ~ 111
- [8] LEE J J, HUNTER S H, BOVEE E C. Illustrated guide to the protozoa. Lawrence: Allen Press, 1985

Sequence Analyses of 16S rRNA Gene from *Epistylis plicatilis* (Ciliophora)

CHEN Yueqin^{*}, XU Ruilin, ZHAO Jin, QU Lianghu, SHEN Yunfen

Abstract: A method for *In Situ* PCR amplification of protozoa rDNA was developed, which made it possible to analyze natural populations and solve the problems arising from the analysis of rRNA gene for those organisms that are difficult or impossible to propagate in the lab. The 16S rDNA of *Epistylis plicatilis* (Ciliophora) was amplified and sequenced with this method. Using sequence analyses and comparisons, the systematic relationship between *Epistylis plicatilis* and other species of Ciliophora was discussed.

Keywords: *Epistylis plicatilis* (Ciliophora), 16S rRNA gene, sequence analyses

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China