

几种饵料微藻基因组 DNA 的提取及其特异性引物的设计

周海波, 徐继林*, 朱 鹏, 严小军

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 用改良 CTAB 法提取我国沿海东南部滩涂贝类常见的 4 种饵料微藻的基因组 DNA, 结果发现提取的 DNA 产率高、完整性好, 认为是一种简便而高效的微藻基因组 DNA 提取方法. 对其 18S rRNA 基因(18S rDNA)进行克隆与测序, 并利用序列比对软件 MEGA 5.0 对各微藻的 18S rDNA 序列进行两两比对, 设计出了能够用于快速区分此 4 种饵料微藻的特异性 PCR 引物(Cha.F/Cha.R、Iso.F/Iso.R、Pla.F/Pla.R 及 Nan.F/Nan.R). PCR 扩增验证实验结果显示, 4 对引物均具有很强的特异性, 无交叉扩增现象. 扩增片段大小范围为 100~200 bp, 满足实时荧光定量 PCR 的实验要求, 在检测滩涂贝类对此 4 种饵料微藻的摄食选择性研究方面具有重要意义.

关键词: 滩涂贝类; 饵料微藻; CTAB; 18S rDNA; 特异性引物

中图分类号: S917.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 03-0011-06

海洋微藻种类多, 繁殖速度快, 作为海洋生态系统中的主要初级生产者, 在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着极其重要的作用^[1-4]. 许多海洋微藻富含多种多不饱和脂肪酸, 对沿海滩涂贝类具有很好的营养价值^[5], 并且具有生长繁殖迅速、对环境适应能力强、容易培养等特性^[6-9], 目前已广泛用于沿海滩涂贝类人工育苗产业的人工饵料^[10-12]. 作为滩涂贝类稚贝人工培育的饵料微藻, 牟氏角毛藻(*Chaetoceros calcitrans*)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)和青岛大扁藻(*Tetraselmis helgolandica*)已被广泛用于我国浙闽沿海一带滩涂贝类人工育苗产业中, 而眼点微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)因其具有极易培养且在阴雨天气仍然能够保持生长繁殖的特性, 也被多数贝类育苗场作为替补饵料进行培养.

在沿海滩涂贝类人工育苗的生产与实践中, 不同的稚贝对于不同饵料微藻有着不同的摄食选择性^[13-16], 而稚贝摄食选择性的研究对育苗过程中饵料的选择培养、贝类幼体的正常发育有着重要意

义^[17]. 但目前这种选择性分析基本上还停留在经验、显微观察或粒度计数的层面, 研究方法传统且准确性不足.

近年来, 随着分子生物学技术的发展, 利用分子生物学方法来进行分类学鉴定已得到越来越广泛的应用. 鉴于真核生物在其 18S rDNA 序列之间既具有保守性又在科、属、种水平上存在特异性序列的特性, 对 18S rDNA 差异性序列设计引物, 并通过 PCR 技术检测便能判断某种特定真核生物的存在与否, 这种利用分子生物学技术来区分和鉴别不同物种的方法具有快速、灵敏、准确等优点, 已得到广泛应用^[18-21].

笔者对贝类人工育苗中常见的 4 种饵料微藻基因组 DNA 进行有效提取, 克隆并测序得到了上述 4 种微藻 18S rDNA 序列, 分析比对后设计出能够利用 PCR 技术快速区分此 4 种饵料微藻的特异性引物, 为今后用于快速检测分析稚贝体内及稚贝摄食水体中残存饵料微藻的研究打下基础, 进而为研究稚贝对饵料微藻的摄食性现象提供必要的

收稿日期: 2013-03-01.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(31172448); 浙江省自然科学基金(Y3100534, Z3100565); 浙江海洋技术创新团队项目(2012R10029); 宁波市海洋藻类技术创新团队项目(2011B81007).

第一作者: 周海波(1987-), 男, 江西抚州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 生物饵料营养. E-mail: nh10705@126.com

*通信作者: 徐继林(1965-), 男, 江苏泰州人, 研究员, 主要研究方向: 海洋生物化学. E-mail: xujilin@nbu.edu.cn

技术保障.

1 材料与方法

1.1 微藻

本研究所用 4 种饵料微藻藻种由宁波大学应用海洋技术重点实验室藻种室提供, 分别为牟氏角毛藻(*Chaetoceros calcitrans*)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)、青岛大扁藻(*Tetraselmis helgolandica*)及眼点微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*). 将藻种至于 500 mL 锥形瓶中, 在 $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $18\sim 27\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 条件下, 采用“NML3 号”配方($100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KNO}_3$, $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, $20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{SiO}_3$, $0.25\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{EDTA-Na}_2$, $2.50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $6\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{VB}_1$, $0.05\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{VB}_{12}$)的培养液对微藻进行人工培养, 每天摇瓶 1~2 次, 静置培养 1 周左右的时间.

1.2 微藻基因组 DNA 的提取

采用改良十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide, CTAB)法对上述 4 种饵料微藻的基因组 DNA 进行提取. 所用试剂浓度及配方如下: CTAB 提取缓冲液, 内含 2% CTAB (w/v)、 $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Tris-HCl}$ (pH 8.0)、 $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{EDTA}$ 、 $1.4\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaCl}$ 及 1%~2%(v/v)的 β -巯基乙醇(灭菌后冷却加入); PCI 抽提液(苯酚:氯仿:异戊醇为 25:24:1); 异丙醇或 95%的乙醇; 75%的乙醇及无菌水.

提取的步骤为: (1)取 10 mL 处于指数生长期的微藻培养液, $9\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2.5 min, 弃上清; (2)加入 600 μL CTAB 缓冲液, 混匀后 65°C 水浴 45 min, 每隔 5 min 轻轻混匀 1 次; (3)水浴结束后, 在冰上迅速冷却 3~5 min, 加入等体积的 PCI 抽提液, 混匀; (4)冰上静置 5 min, 4°C 下离心 10 min ($12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$); (5)取上清液并转入新的离心管内, 加入等体积的 PCI 抽提液, 混匀后再离心 10 min; (6)将上清液转入新离心管内, 加入 0.8 倍体积异丙醇, 混匀后冰上静置 30 min; (7) 4°C 下离心 20 min ($12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 弃废液; (8)用 75%的乙醇清洗沉淀 2 次, 每次清洗后于 4°C 下离心 1 min ($12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$); (9)用无菌双蒸水溶解 DNA 沉淀, -18°C 下保存.

1.3 微藻 18S rDNA 片段的克隆与测序

用真核生物 18S rDNA 通用引物(18sF: 5'-GCT

CGNMWYWARGRTTAAGCCATGC-3', 18sR: 5'-A CCTTGTTASGWCTTCACCYTCCTC-3')扩增上述微藻的基因组 DNA. PCR 反应体系(25 μL)中含: dd H_2O 18.3 μL 、 $10\times\text{PCR Buffer}$ 2.5 μL 、dNTP 2.0 μL 、引物 $2\times 0.5\ \mu\text{L}$ 、模板基因组 DNA 1.0 μL 、Taq 酶 0.2 μL . 相应 PCR 扩增程序为: 95°C 预变性 4 min 30 s、 94°C 变性 50 s、 48.5°C 退火 30 s、 72°C 延伸 1 min 30 s, 循环 30 次, 72°C 延伸 10 min.

将扩增出的 18S rDNA 片段割胶回收, 与 T 载体进行连接, 并完成 TA 克隆, 次日转化到 100 μL DH5 α 感受态细胞中, 加入 800 μL 的 LB 液体培养基, 37°C 震荡培养 1 h. 取 200 μL 菌液在含 Amp 的 LB 固体培养基的平板上进行涂板, 37°C 倒置培养过夜. 挑出单个菌落, 转至含 5 mL 左右 LB 液体培养基(带 Amp)的试管内进行扩大培养过夜(7 h 左右为宜), 取 1 000 μL 菌液提交 Invitrogen 公司测序.

1.4 特异性引物的设计与验证

用软件 MEGA 5.0 对 Invitrogen 公司发回的 4 种目标饵料微藻 18S rDNA 序列进行比对, 找出其各自差异性区域, 利用引物设计软件 Primer 5.0 针对该区域设计引物(选择合适的 T_m 值和 GC 含量等, 并防止错配与二聚体等情况发生), 使得上下游引物扩增出的片段大小能保持在 100~200 bp 的范围, 以便引物能够用于实时荧光定量 PCR 分析. 设计完成后, 分别用其中某个微藻的特异性引物与上述 4 种微藻基因组 DNA 模板进行同步扩增, 以检验其特异性强度是否符合实验要求.

1.5 特异性引物用于实时荧光定量 PCR 的尝试

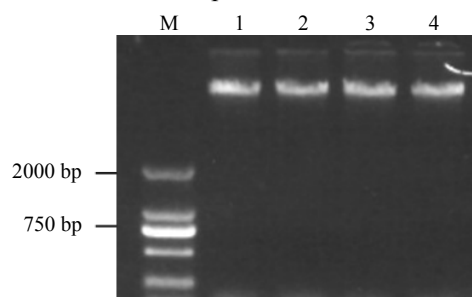
对于设计出的 4 对饵料微藻的特异性引物, 其应用价值更能体现于基于实时荧光定量 PCR 技术对样品中残存的上述饵料微藻定性定量分析研究中. 因此, 可将特异性引物用于实时荧光定量 PCR 的标准曲线制作, 以明确其实际应用价值.

2 结果

2.1 4 种微藻基因组 DNA 的提取结果

采用改良 CTAB 法提取 4 种目标饵料微藻的基因组 DNA 时, 微藻样品无需任何前期处理(如超声破碎、液氮研磨等)即可进行基因组 DNA 快速提取, 此方法简便、高效. 提取的微藻基因组 DNA 经过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 检测结果显示, 4

种饵料微藻的基因组 DNA 条带清晰可见, 纯度高, 其大小远大于 2 000 bp, 为微藻的基因组 DNA。



M 为 DL 2 000 marker; 1 为角毛藻(*Cha.*); 2 为球等鞭金藻(*Iso.*); 3 为青岛大扁藻(*Tet.*); 4 为微绿球藻(*Nan.*)

图 1 4 种饵料微藻基因组 DNA 的提取结果

2.2 4 种微藻 18S rDNA 序列分析

利用软件 DNAMAN 对上述 4 种饵料微藻的 18S rDNA 进行多序列比对分析, 结果显示: 4 种饵料微藻 18S rDNA 序列间的差异百分比为 8.32%~20.42%, 平均差异度为 11.14%。说明 4 种微藻 18S rDNA 之间存在一定的差异, 能够进行特异性引物的设计。分析比对其两两差异性区域(图 2), 利用引物设计软件 Primer 5.0 设计 4 对引物(表 1), 并使其扩增片段大小在 100~200 bp 的范围。

2.3 特异性探针特异性强度的验证

为避免 4 对特异性引物中某对引物与 4 种饵料微藻中其他 3 种微藻的基因组 DNA 发生交叉扩增,

表 1 利用 Primer 5.0 设计出的 4 种饵料微藻的特异性引物

引物名称	温度/°C	引物序列(5'-3')
Cha.F	62.0	ATGACTTTTCATTGGCGATGGTT
Cha.R		GCCTCTCGGCCAAGGTTTATG
Iso.F	61.5	AACCCCTGTTGGGGCTC
Iso.R		ACCTCTCGGTCAAGGGAGACG
Pla.F	62.0	GTTACTCTACTTTGGTAGGAGGTGAAC
Pla.R		GGACCTCTCGGTCAAGGTTAGG
Nan.F	62.5	TAATCTTCAACGAGGAATGCCTAG
Nan.R		GGTCGCCAATCCGAACACT

分别以某个微藻的特异性引物与所有目标微藻基因组 DNA 进行普通 PCR 扩增的验证性实验, 利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 图 3 的检测结果显示, 4 对特异性引物只能与其对应的微藻基因组 DNA 发生扩增现象(对应泳道编号分别为“11”“22”“33”“44”), 与非对应的微藻不发生交叉扩增, 同时阴性对照组(不含模板 DNA)亦无扩增现象, 说明设计的 4 对引物具有很强的特异性, 能够将 4 种微藻通过简单的 PCR 手段加以区分于鉴定, 符合后续荧光定量 PCR 的实验要求。

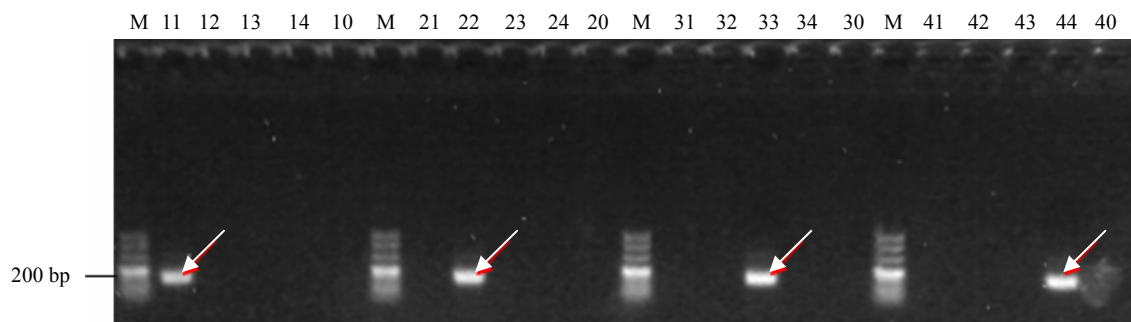
2.4 特异性引物用于实时荧光定量 PCR 所得到的标准曲线及融解曲线

分别以 4 种目标饵料微藻 18S rDNA 所构建的

Cha.	GTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTGCTGGTTAATTCGGTTAACGAACGAGACCCAGCCT	1304
Iso.	GTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTGCTGGTTAATTCGGTTAACGAACGAGACCCAGCCT	1309
Pla.	GTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTAGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCT	1311
Nan.	GTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTAGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCT	1312
Cha.	GCTAAATAATCAGCGGAATGACTTTTCATTGGCGATGGTTTCTTAGAGGGACATCTAGTA	1364
Iso.	GCTAAATAATGTTCC...CAACCCCTGTTGGGCTCGCTTCTTAGAGGGACAACTTGTCT	1366
Pla.	GCTAAATAATGTTCTC...CTACTTTGGTAGGAGGTGAACCTTCTTAGAGGGACTATTGGCG	1368
Nan.	GCTAAATAATCAGCG...CCTCTCCGGGGGCCGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCG	1369
Cha.	CAAAGCTACAGGAAGATTGGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGAACC	1424
Iso.	TTCAACAAGTGGAGTTTCGGCGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCC	1426
Pla.	TTTAGCAATGGAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCC	1428
Nan.	ACTAGCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCC	1429
Cha.	GCACGCGGTGTACACTGACGCAATTCACGAGCA.TAAACCTTGCCGAGAGGCCCTGGGAA	1483
Iso.	GCACGCGCGGTACACTGATGCATTCAGCGAGTCTCTCCCTTGACCGAGAGGTCGGGTA	1486
Pla.	GCACGCGCGGTACACTGATGCATTCACGAGCC...TAAACCTTGCCGAGAGGTCGGGTA	1486
Nan.	GCACGCGCGGTACACTGATGCATTCACGAGCC...TAGCCTTGCCGAGAGGCCCTGGGTA	1487
Cha.	ATCTTGTAAACGTCGTCGTGATAGGGATAGATTATTGCAATATTATTAATCTTCAACGAGG	1543
Iso.	ATCTTGCAACTTGATCGTGATCGGGATAGATTATTGCAATATTATTAATCTTCAACGAGG	1546
Pla.	ATCTT.TGAACCTGATCGTGATCGGGATAGATTATTGCAATATTATTAATCTTCAACGAGG	1545
Nan.	ATCTT.TGAACCTGATCGTGATCGGGATAGATTATTGCAATATTATTAATCTTCAACGAGG	1546

黑色部分为同源序列, 灰色和白色部分为差异性区域

图 2 用于特异性探针设计的 4 种微藻 18S rDNA 对应区域



M 为 DL 500 marker; 11~14 为引物 *Cha.* 分别与 *Cha.*、*Iso.*、*Tet.*、*Nan.* 基因组 DNA 扩增结果; 21~24 为引物 *Iso.* 分别与 *Cha.*、*Iso.*、*Tet.*、*Nan.* 基因组 DNA 扩增结果; 31~34 为引物 *Tet.* 分别与 *Cha.*、*Iso.*、*Tet.*、*Nan.* 基因组 DNA 扩增结果; 41~44 为引物 *Nan.* 分别与 *Cha.*、*Iso.*、*Tet.*、*Nan.* 基因组 DNA 扩增结果; 10、20、30、40 分别为 4 对引物的阴性扩增对照组。角毛藻、球等鞭藻、青岛大扁藻及微绿球藻分别表示为 *Cha.*、*Iso.*、*Tet.*、*Nan.*，其中 11 扩增产物大小为 155 bp、22 扩增产物大小为 154 bp、33 扩增产物大小为 131 bp、44 扩增产物大小为 169 bp

图 3 4 对特异性引物 PCR 验证结果

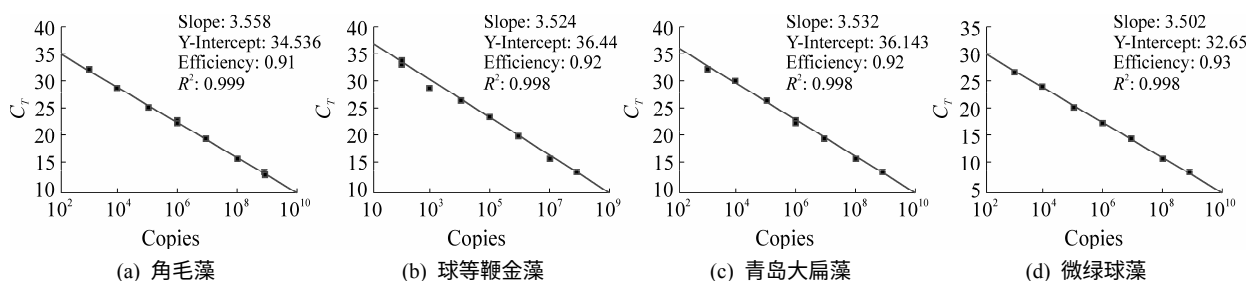


图 4 4 种饵料微藻的 FQ-PCR 扩增的标准曲线

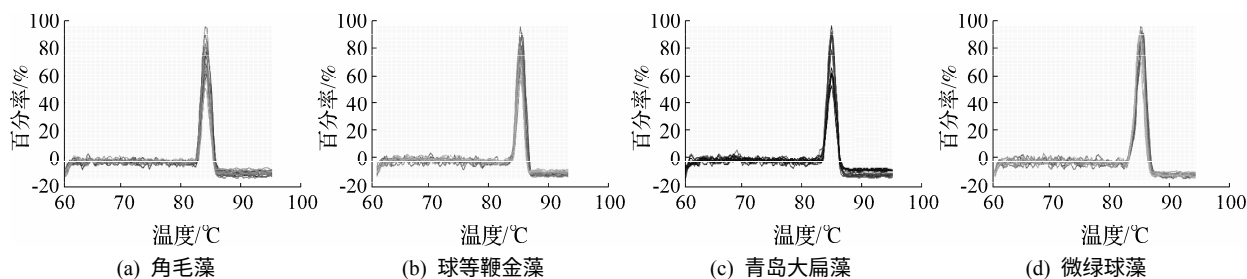


图 5 4 种饵料微藻 FQ-PCR 对应的融解曲线

重组质粒标准品为模板,与所设计的 4 对特异性引物构建 25 μ L 反应体系,在德国 Eppendorf 仪器公司生产的 Mastercycler ep realplex 荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR 扩增,对仪器输出的实验数据进行分析整理,得到 4 对特异性引物所扩增出的标准曲线及融解曲线(图 4 及图 5)。

3 讨论

3.1 微藻基因组 DNA 提取方法的选择

相对传统植物基因组 DNA 提取试剂盒,笔者所采用的 CTAB 法^[22-23]在提取上述海洋饵料微藻基因组 DNA 方面具有明显的优势,所提取的基因组 DNA 可用于后续 PCR 扩增等分子生物学实验研

究。由此可见,改良 CTAB 法更适合简便、有效地提取海洋饵料微藻基因组 DNA,而且实验成本更低,适合推广。

3.2 4 种饵料微藻特异性引物设计及特异性验证

鉴于海洋微藻与绝大多数真核植物一样,其 18S rDNA 具有高保守性,其核糖体大小亚基基因、5.8S 区、ITS1 和 ITS2 区均常被选作 PCR 扩增的目标区域^[24-26],这是利用分子生物学方法对不同物种鉴定和区分的基础。同时,不同物种 18S rDNA 之间必然存在特异性,这也是该技术对不同物种进行区分的先决条件。目标区域(差异性区域)的选择主要考虑其在研究物种中的变异程度及特异性和灵敏性的要求,这在区分形态上极为相近

的微藻种类时具有重要价值。

用于区分上述4种饵料微藻的特异性引物,可用于普通PCR与实时荧光定量PCR,但只需要通过普通PCR与琼脂糖凝胶电泳的结合便能验证其特异性强度。按照试验设计的初衷,某个特异性引物只能扩增出与之对应的饵料微藻基因组DNA,而不会与其他3种饵料微藻基因组发生扩增的现象,通过琼脂糖凝胶电泳检测,在对应的泳道只可能出现1条条带,且条带对应Marker的大小应该介于100~200 bp(图3)。本实验给出的验证结果符合上述要求,说明该4对引物均具有很强的特异性,可用于区分此4种饵料微藻的普通PCR及实时荧光定量PCR的分析研究。

3.3 特异性引物的应用价值

在贝类人工育苗的实践中,不同稚贝对不同的饵料微藻表现出不同的摄食选择性,稚贝摄食选择性研究对育苗过程中饵料的选择培养、贝类幼体的正常发育有着重要的意义。但目前这种选择性分析基本上还停留在经验、显微观察或粒度计数的层面,对于几十微米至几百微米大小的滩涂贝类幼苗无法做到准确定性,故有必要针对不同的稚贝建立一种灵敏的技术手段,准确分析贝类幼苗对不同饵料微藻的摄食选择性的情况。

实时荧光定量PCR技术具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确等优点,可以很好地满足上述研究要求,但定量PCR技术在待检测样品为多物种混合体系时,若要准确定量每一目标物种,必须具备能够特异性扩增每一物种的特异性引物,这是该技术应用的前提。

通过对上述4种常见饵料微藻18S rDNA的分析比对,设计出了符合定量PCR实验条件的特异性引物,将此4对特异性引物用于实时荧光定量PCR的标准曲线的制作,结果显示4对引物的扩增效率均在0.90~1.05之间,且4条标准曲线的 R^2 值均在0.998以上(图4),说明特异性引物完全能够满足定量PCR的实验要求。此外,从定量PCR扩增的图5融解曲线可以明显看出,4对引物均表现出单一峰,说明4对引物在反应体系中无非特性性扩增,引物特异性强。4对引物的特异性能够满足实时荧光定量PCR的实验要求,为研究贝类尤其是稚贝对不同饵料微藻的摄食选择性现象提供了重

要的技术保障。

4 结论

通过对沿海滩涂贝类育苗产业中常用的4种饵料微藻的18S rDNA进行克隆及序列分析,证实其18S rDNA序列间具有较高同源性,但其非同源性区域(特异性区域)能够符合特异性引物的设计要求并且可扩增出100~200 bp大小的片段,可用于实时荧光定量PCR的分析研究。因此,倘若与实时荧光定量PCR技术相结合,该4对特异性引物可用于快速检测稚贝体内及稚贝滤食水体中残存饵料微藻的含量,并能为研究不同稚贝对不同饵料微藻的摄食选择性差异现象提供强大的技术支持。

参考文献:

- [1] 倪学文. 海洋微藻应用研究现状与展望[J]. 海洋渔业, 2005, 27(3):251-255.
- [2] 张建民, 刘新宁. 海洋微藻的利用现状和开发前景[J]. 齐鲁渔业, 2006, 23(4):6-7.
- [3] 邹树平, 吴玉龙, 杨明德, 等. 微藻的综合开发利用[J]. 水产科学, 2007, 26(3):179-181.
- [4] 梁英, 麦康森, 孙世春. 微藻的应用概述[J]. 海洋湖沼通报, 1999(2):70-82.
- [5] 和玉丹, 邹君彪, 袁金锋, 等. 海洋微藻在动物营养中的应用前景[J]. 饲料研究, 2007, 11:67-69.
- [6] 张建民, 刘新宁. 可利用微藻的种类及其应用前景[J]. 资源开发与市场, 2005, 21(1):65-80.
- [7] 曹健, 漆开华, 高孔荣. 微藻的研究进展[J]. 广州食品工业科技, 1996, 12(4):5-23.
- [8] 王桂芹, 黄权, 张东鸣, 等. 可利用微藻及其应用研究现状[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2001, 2(6):529-533.
- [9] 邹宁, 李艳, 孙东红. 几种有经济价值的微藻及其应用[J]. 烟台师范学院学报: 自然科学版, 2005, 21(1):59-63.
- [10] Leise E M, Froggett S J, Nearhoof J E, et al. Diatom cultures exhibit differential effects on larval metamorphosis in the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta* (Say) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 379:51-59.
- [11] Gordon N, Neori A, Shpigel M, et al. Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae[J]. Aquaculture, 2006, 252:225-233.
- [12] 马斌, 周海波, 徐继林, 等. 缢蛏稚贝优质微藻饲料的

- 筛选[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2011, 24(4):5-9.
- [13] Riisgard H U. Efficiency of particle and filtration rates in six species of northeast American bivalves[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1988, 45:217-223.
- [14] Shumway S E, Newell R C, Crisp D J, et al. Particle selection in filter feeding bivalve mollusks: A new technique on anole theme[M]//Morton B. *The Bivalvia*, proceedings of a Memorial Symposium in Honour of Sir C M Yonge, Hong Kong: Hong Kong University Press, 1990:151-165.
- [15] Wisely B, Reid B L. Experimental feeding of Sydney rock oysters: Optimum particle sizes and concentrations [J]. *Aquaculture*, 1978(15):319-331.
- [16] Ward J E, Levinton J S, Shumway S E, et al, Particle sorting in bivalves: in vivo determination of the pallial organs of selection[J]. *Marine Biology*, 1998, 131(2):283-292.
- [17] 陈世杰, 陈木, 陈炳能, 等. 鲍苗的饵料——底栖硅藻培养试验初报[J]. *动物学报*, 1977, 23(1):47-52.
- [18] Inagaki Y, Hayashi I Y, Ehara M, et al, Algae or protozoa: phylogenetic position of euglenophytes and dinoflagellates as inferred from mitochondrial sequences[J], *J Mol Evol*, 1997, 45(3): 295-300.
- [19] Zardoya R, Coatas E, Lopez RV, et al, Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences[J]. *J Mol Evol*, 1995, 41: 637-645.
- [20] 庄丽, 陈月琴, 李钦亮, 等. 赤潮叉角藻 18S rDNA 和 ITS 区序列测定与分析[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(2): 148-154.
- [21] 胡自民, 曾晓起, 段德麟, 等. 运用核糖体 18S rRNA 基因序列鉴别两种红藻[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2006, 36(6):946-952.
- [22] 杨泽民, 章群, 谢数涛, 等. 金藻基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增[J]. *生物学杂志*, 2008, 25(1):60-63.
- [23] 张桂和, 徐碧玉, 王珺. 几种海洋微藻基因组 DNA 的分离提取及 PCR 检测[J]. *热带海洋学报*, 2007, 26(1): 68-72.
- [24] 甄毓, 于志刚, 米铁柱. 分子生物学在微藻分类研究中的应用[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(6):875-878.
- [25] 张宝玉, 王广策, 张炎, 等. 一株赤潮甲藻转录单元内间隔区(ITS)和 5.8S rDNA 序列的克隆[J]. *海洋科学*, 2004, 28(12):49-53.
- [26] 乔文文, 姜玮. 4 株扁藻属微藻 5.8S rDNA 和转录间隔区(ITS)的序列分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37 (Sup. II):81-85,

Genomic DNA Extraction from Several Diet Microalgae and the Design of their Specific Primers

ZHOU Hai-bo, XU Ji-lin*, ZHU Peng, YAN Xiao-jun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A modified CTAB method is used to extract genomic DNA from four common diet microalgae of intertidal shellfish found in southeastern coast of China. The results show that this method is very suitable for extraction of high quality and productive genomic DNA from microalgae. By cloning and sequencing of 18S rRNA gene from the four diet microalgae, their sequences are compared with each other using the software MEGA5.0. Four pairs of specific primers which can be used to quickly distinguish the microalgae in samples are designed with the help of Primer 5.0. They are named Cha.F/Cha.R, Iso.F/Iso.R, Pla.F/Pla.R and Nan.F/Nan.R. Verification tests through the PCR amplification indicate that four pairs of the primers are highly distinctive and no cross amplification phenomenon is noted. The size of these amplified fragments ranges from 100 bp to 200 bp, which meets the experimental requirements of the Real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR). These specific primers will be of great help for the study on feeding selectivity for the diet microalgae of juvenile intertidal shellfish in China.

Key words: intertidal shellfish; diet microalgae; CTAB; 18S rDNA; specific primers

(责任编辑 章践立)