

现代分子生物技术在湖泊沉积物古 DNA 研究中的应用

严东娜^{1,3*} 徐海^{2,5} 侯卫国⁴

(¹中国科学院地球环境研究所黄土与第四纪地质国家重点实验室, 西安 710061; ²天津大学表层地球系统科学研究院, 天津 300072; ³中国科学院大学, 北京 100049; ⁴中国地质大学(北京)生物地质与环境地质国家重点实验室, 北京 100083; ⁵西安交通大学人居环境与建筑工程学院, 西安 710061)

摘要 分子生物学技术的发展,为从分子生物学角度探讨湖泊生态系统演化提供了一个新窗口。依据湖泊沉积物中古 DNA 研究,从古微生物、动植物群落结构组成及数量变化等方面开展研究,可进一步反演湖泊及周边的气候环境变化,探讨生物与气候、人类活动之间的关系。本文首先介绍了湖泊沉积物中古 DNA 来源、保存特点以及提取方法,其次比较分析了现代分子生物技术在湖泊沉积物古 DNA 中的应用特点,并阐述了湖泊沉积物古 DNA 在重建古气候、古生态以及人类活动对古环境影响方面的应用,最后对目前湖泊沉积物古 DNA 研究方法存在的一些问题进行了总结。

关键词 古 DNA; 湖泊沉积物; DGGE; 高通量测序; 荧光定量 PCR

Application of modern molecular biotechnology in studying ancient DNA of lake sediments.

YAN Dong-na^{1,3*}, XU Hai^{2,5}, HOU Wei-guo⁴ (¹State Key Laboratory of Loess and Quaternary Geology, Institute of Earth Environment, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710061, China; ²Institute of Surface-Earth System Science, Tianjin University, Tianjin 300072, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ⁴State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Beijing 100083, China; ⁵School of Human Settlements and Civil Engineering, Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061, China).

Abstract: In recent years, the development of new techniques in molecular biology offers a new way for understanding the evolution of lake ecosystem. Ancient DNA could well record the migration and evolution of animals, plants, algae and even microbes, and thus has become an effective tool to reconstruct paleoclimate and paleoenvironment. Studies on the ancient DNA preserved in lake sediments have provided abundant information and high-resolution data that are needed for reconstruction of ancient microbial, plant, or animal community, as well as the ancient environmental conditions. Here, we firstly introduced the preservation characteristics of the ancient DNA and DNA extraction methods from lake sediments, and then reviewed the latest molecular biology techniques for studying ancient DNA preserved in lake sediments. We also discussed the application of ancient DNA in lake sediments including reconstruction of paleoclimate, paleoecology and the impacts of human activities on paleoenvironment. Finally, some problems and possible trends on the research of ancient DNA in lake sediments were summarized.

Key words: ancient DNA; lake sediment; DGGE; high-throughput sequencing; qPCR.

DNA 作为重要的遗传信息载体,能够从分子水平反映生物表现性状的异同以及生物谱系演化,记录动植物、微生物、人类的进化与迁移过程以及它们对环境 and 气候变化的响应(申慧彦等,2008;Torti *et al.*, 2015;盛桂莲等,2016)。一些已死亡的生物个体或者群体由于保存环境较理想,其少量的遗传信息会以微量的高片段化古 DNA 形式保存下来,从而

为历史时期生物群落结构组成及遗传组成研究提供分子数据(Pääbo *et al.*, 2004; 盛桂莲等, 2016)。古 DNA 研究从 20 世纪 80 年代开始发展至今, 在人类的起源与演化、人类的迁移模式、人类群体遗传关系结构研究、动植物的驯化历史、生物的系统演化以及古生物群落结构组成等方面取得了一系列进展, 对人类学、考古学、生物学、地质学等学科产生了重大影响(Higuchi *et al.*, 1984; Hofreiter *et al.*, 2001; Willerslev *et al.*, 2003, 2005; Fu *et al.*, 2014; 盛桂莲等, 2016; Lendvay *et al.*, 2018)。

湖泊沉积物作为第四纪地质学研究领域的重要载体之一, 记录了区域气候变化、人类活动、生态演化、环境演变等丰富的信息。湖泊沉积物中古 DNA 研究最早开始于 Coolen 等(1998)对加拿大 Mahoney 湖沉积物中提取的全新世(距今约 11 ka) 硫氧化细菌 DNA 片段研究, 其在短短的十几年中已取得了巨大进展, 主要集中在利用藻类古 DNA 重建古气候、古生态以及湖泊营养状态演变(Coolen *et al.*, 2004b, 2011; Domaizon *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2014; Monchamp *et al.*, 2018), 利用植物古 DNA 恢复流域植被状况(Parducci *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2013; Niemeyer *et al.*, 2017; Parducci *et al.*, 2017), 利用好氧微生物 DNA 探讨湖泊水文演变历史以及重建古微生物群落结构多样性(Coolen *et al.*, 1998, 2004b; Belle *et al.*, 2014; Poulain *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015), 利用动物 DNA 研究动物的驯化历史以及追溯人类的放牧历史等(Limburg *et al.*, 2002; Matisoo-Smith *et al.*, 2008; Giguët-Covex *et al.*, 2014)。

湖泊沉积物古 DNA 研究取得的一系列成果与分子生物学技术的发展有密不可分的联系。因此, 有必要对沉积物中古 DNA 研究方法以及应用进行回顾与展望。本文主要介绍了现代分子生物技术包括变性梯度凝胶电泳结合克隆测序、高通量测序、第三代单分子实时测序、荧光定量 PCR、数字 PCR 等在湖泊沉积物中古 DNA 研究领域中的应用特点, 比较分析了它们之间的优缺点, 并讨论了湖泊沉积物古 DNA 在重建古气候、古生态以及人类活动对环境影响方面的应用进展。

1 湖泊沉积物中古 DNA 来源、保存状况及影响因素

相比于有孔虫、孢粉、脂类大分子化合物等, DNA 更不稳定, 其在环境中因受到氧化和水解作用等破坏会发生不同程度的降解, 使得古 DNA 总是以

高度片段化的形式存在于样品中(Höss *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 2005)。古 DNA 的保存状况与样品的年代无直接联系, 而是埋藏环境如温度、pH 值、腐植酸含量、离子强度等会直接影响其降解速率(盛桂莲等, 2016)。Torti 等(2015)指出, 矿物和有机大分子对 DNA 有很强的吸附性, 可以保护 DNA 并使其降解程度降低。沉积环境条件如低温、缺氧、高盐度、粘土矿物含量丰富等, 可能会有利于 DNA 的保存(Hofreiter *et al.*, 2001; Willerslev *et al.*, 2005; Toritet *et al.*, 2015), 湖泊沉积环境往往具有上述特点。Coolen 等(2004b)从古老的湖泊沉积物中提取出全新世末(距今约 9.4 ka)的藻类古 DNA, 并成功地扩增了硅藻 18S rDNA 序列片段。Pedersen 等(2013)从湖泊沉积物中提取出全新世末(距今约 10 ka)的植物古 DNA, 并扩增和测序了植物光合作用基因 *rbcl* 片段。近年来, 众多研究表明, 湖泊沉积物等样品中包含已保存数千年甚至长达数百万年以来的古 DNA(表 1)。

2 湖泊沉积物 DNA 的提取

湖泊沉积物是一类特殊的生态环境, 其组成及来源复杂多样, 含有大量与 DNA 理化性质和分子大小较为相近且对 DNA 具有较强吸附力的腐殖质, 并且这些腐殖质能够阻碍 DNA 的提取、分离以及抑制某些物质的活性。笔者曾对程海沉积物岩芯中的 DNA 进行提取研究(未发表数据), 发现两方面关键因素: 一方面为 DNA 能否被完全释放出来, 这直接影响生物多样性组成以及对某一生物量进行定量的准确性与可靠性; 另一方面为提取溶液中的腐殖酸、蛋白质、RNA 等杂质能否被清除掉, 因为这些物质会严重影响下游实验进行。

湖泊沉积物中古 DNA 提取多是采用沉积物中总 DNA 提取方法, 常用方法为使用商业化的土壤 DNA 提取试剂盒(如 FastDNA Spin Kit for Soil, MP; Powersoil DNA Isolation Kit, Mo Bio; Omega Soil DNA Kit; E.Z.N.A.™ Soil DNA Kit)。古 DNA 与现代 DNA 的区分并不能通过提取解决, 其区分主要是利用分子生物技术。目前还未有一种能够良好提取沉积物中 DNA 尤其是针对古 DNA 的方法, 在提取方法及技术优化方面仍有待进一步提升。Pedersen 等(2013)利用湖泊沉积物中保存的植物 DNA 信息恢复了历史时期植被组成, 并与沉积物中保存的花粉、植物大化石进行对比分析, 表明三者反映物种组

表 1 近几年湖泊沉积物中古 DNA 研究
Table 1 Researches of ancient DNA preserved in lake sediments over the past few years

研究地点	研究对象	研究方法	参考文献	
Ace Lake (68.472°S,78.187°E)	浮游植物	Haptophyte;Diatom populations	DGGE 克隆文库;qPCR	Coolen <i>et al.</i> ,2004b
Lakes in the French Alps		Cyanobacteria;Toxic Planktothrixrubescens	qPCR	Savichtcheva <i>et al.</i> ,2015
Naivasha Lake in USA		Diatom	DGGE 克隆文库	Epp <i>et al.</i> ,2011
Bourget Lake (45.75°N,5.867°E)		Synechococcus	DGGE 克隆文库;qPCR	Domaizon <i>et al.</i> ,2013
Kusai Lake (35.55°N—35.833°N,92.616°E—93.05°E)		Cyanobacteria;Eukaryotic algae	DGGE 克隆文库	Hou <i>et al.</i> ,2014
Bourget Lake (45.73°N,5.85°E)		Eukaryotic algae	高通量测序	Capo <i>et al.</i> ,2015
Van Lake (38°N,43°E)		Haptophyte	DGGE 克隆文库;qPCR	Randlett <i>et al.</i> ,2014
Lakes in the Søndre Strømfjord region		Algae	克隆文库	D'Andrea <i>et al.</i> ,2015
Lakes in Siberian		Diatom	DGGE 克隆文库	Stoof-Leichsening <i>et al.</i> ,2015
Three Lakes in Canada		Cyanobacteria	qPCR	Pal <i>et al.</i> ,2015
Elorn River Estuary (48.39°N,4.38°W)		Dinoflagellate	qPCR	Klouch <i>et al.</i> ,2016
Southern Sweden Lake		Aquatic floral	高通量测序	Ahmed <i>et al.</i> ,2016
Qinghai Lake (36.533°N—37.25°N,99.6°E—100.783°E)		Phytoplankton;Diatom	高通量测序;qPCR	Li <i>et al.</i> ,2016
Ten European peri-Alpine lakes		Cyanobacteria	高通量测序	Monchamp <i>et al.</i> ,2018
Mahoney Lake in Canada	微生物	Chromatiaceae	DGGE 克隆文库	Coolen <i>et al.</i> ,1998
Ace Lake (68.472°S,78.187°E)		Green Sulfur Bacteria	DGGE 克隆文库	Coolen <i>et al.</i> ,2005
Chaka Lake in Tibetan Plateau		Bacteria	qPCR	Jiang <i>et al.</i> ,2007
Cadagno Lake in Swiss Alps		Phototrophic Sulfur Bacteria	qPCR	Ravasi <i>et al.</i> ,2012
Narlay Lake (47.06°N,6.52°E)		Methane-Oxidizing Bacteria (MOB-meth-anotrophs)	qPCR	Belle <i>et al.</i> ,2014
Lanskie Lake (53.5675°N,20.49°E)		Human-specific Bacteroides strain HF 183	DGGE 克隆文库	Madeja,2015
Aquatuk,Hawley and North Raft lakes in Canada		Bacteria	qPCR	Poulain <i>et al.</i> ,2015
Qinghai Lake (36.533°N—37.25°N,99.6°E—100.783°E)		Ammonia-Oxidizing Archaea (AOA)	高通量测序;qPCR	Yang <i>et al.</i> ,2015;杨渐等,2016
Belauer See Lake in German;Windermere and Esthwaite Mere Lake in UK	动物	Daphnia	克隆文库	Limburg <i>et al.</i> ,2002; Reid <i>et al.</i> ,2002
Terrasovoje Lake (70.55°S,68.033°E) Reid Lake (69.383°S,76.383°E) Terrasovoje Lake in Antarctica		Copepod	DGGE 克隆文库	Andrew <i>et al.</i> ,2005; Bissett <i>et al.</i> ,2005
Round lake in New Zealand		Fish	DGGE 克隆文库	Matisoo-Smith <i>et al.</i> ,2008
Great Wall Bay and Xihu Lake in the Antarctica		Copepod	克隆文库	Xu <i>et al.</i> ,2011
Great Wall Bay and Xihu lake in the Antarctica Peninsula		Copepod	DGGE 克隆文库	Xu <i>et al.</i> ,2011
Anterne lake in North French Alps		Sheep;Cowherds	高通量测序	Giguet-Covex <i>et al.</i> ,2014;Pansu <i>et al.</i> ,2015
Holtjärnen Lake in central Sweden	植物	Pollen	克隆文库	Parducci <i>et al.</i> ,2005
Great Lakes in North America		Ancient Plant	DGGE 克隆文库	Anderson-Carpenter <i>et al.</i> ,2011
Comarum Lake (61.14°N,45.535°W)		Ancient Plant	DGGE 克隆文库	Pedersen <i>et al.</i> ,2013
Lakes in the eastern Africa		Ancient Plant	高通量测序	Boessenkool <i>et al.</i> ,2014
Anterne lake in North French Alps		Plant community	高通量测序	Giguet-Covex <i>et al.</i> ,2014;Pansu <i>et al.</i> ,2015
Skartjørna Lake (77.96167°N,13.81958°E)		Ancient Plant	高通量测序	Alsos <i>et al.</i> ,2015
Bliss Lake (83°N,28°W)		Vascular Plants	高通量测序	Epp <i>et al.</i> ,2015
Karakul Lake in Tajikistan		Macrophytes	高通量测序	Heinecke <i>et al.</i> ,2016

成方面存在一定的差异,这可能与 DNA 提取方法的有效性有关。因此,如何有效地将沉积物中古 DNA 提取出来并且较好的去除腐植酸等杂质显得尤为重要,对湖泊沉积物中古 DNA 进一步研究及应用具有重要的影响。

3 研究湖泊沉积物中地质时期生物多样性及变化的分子生物学技术

研究湖泊沉积物中生物群落结构多样性组成的分子生物技术主要分为两种,即基于聚合酶链式反

应(PCR)的技术和不依赖于聚合酶链式反应(PCR)的技术。基于PCR的分子方法目前应用比较广泛,包括变性梯度凝胶电泳(DGGE)、温度梯度凝胶电泳(TGGE)、末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)等结合第一代克隆测序技术,以及目前流行的宏基因组(Metagenomics)等第二代测序技术。不依赖于PCR的分子方法是以单分子荧光测序和纳米孔测序为代表的第三代测序技术,但该技术 在湖泊沉积物中还未广泛使用。定量研究湖泊沉积物中某一类生物量的变化,主要是依靠荧光定量PCR(如SYBR Green法,TaqMan探针法等),以及数字PCR技术(dPCR)等。

3.1 变性梯度凝胶电泳(DGGE)结合克隆测序技术

DGGE 是由 Fischer 等(1979)提出的一种电泳技术,基于DNA在不同浓度的变性剂中解链行为不同而导致电泳迁移率发生变化,从而将片段大小相同而碱基组成不同的DNA片段分开。分离的目地条带结合克隆测序技术可获得序列信息,将序列与基因数据文库(如NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>; EMBL: <https://www.embl.org>; DDBJ: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>)进行比对可确定生物的种类及建立生物系统发育谱树图,并基于DGGE图谱可计算生物多样性指数(图1)。第一代克隆测序技术具有测序读长长(1000 bp)、准确性高等优势,在过去十几年中,湖泊沉积物中地质时期微生物群落动态结构演化及恢复多是利用DGGE结合克隆测序技术(表1)。单国彬等(2006)指出,

DGGE 结合克隆测序可以用于分析不同微生物群落之间的差异以及某种微生物随时间和环境条件变化的特点,适用于对生物群落中数量大于1%的优势种群进行分析,但由于其敏感性较低,对低丰度物种很难进行全面检测,从而会低估生物多样性。因此,其还不能完全反映一些含量极低的古DNA所包含的物种信息。

3.2 高通量测序技术

宏基因组(Metegenome)这一概念是由 Handelsman 等于 1998 年首次提出 (Handelsman *et al.*, 1998),具体是指特定环境中全部生物的遗传物质DNA总和。目前流行的宏基因组测序主要是利用新一代高通量测序技术对环境样品中全部微小生物的基因组DNA进行测定(Knight *et al.*, 2012),来分析生物群体的多样性组成及丰度,解读生物群体的基因组成及功能多样性,探索生物与环境之间的关系。在研究地质时期生物多样性时多是利用核糖体基因rDNA或者其他功能基因片段进行PCR扩增,纯化PCR扩增产物并进行文库制备用于后续测序分析。测序数据经过预处理和质量控制后进行OTU聚类和注释从而获得生物多样性组成及丰度信息,与功能测序数据库进行比对分析获得某种功能基因丰度信息,结合环境因子关联分析找出环境驱动因子(图2)。近几年,随着第二代测序技术的普及,该技术在湖泊沉积物古DNA研究中已得到广泛应用(表1)。相比于克隆测序技术,高通量测序技术在大大降低了测序成本的同时,还大幅提高了测序速度,并且保持了较高准确性,为湖泊沉积物中历史时期微生物的研究提供更准确和更丰富的信息。但高通量测序技术测序列读长短,后期数据拆装、拼接麻烦。与此同时,如何从海量数据中提取有效数据,如何利用生物信息学中构建模型和网络空间分析方法在湖泊沉积物古DNA研究中加入应用,已成为关键性问题,这些问题的解决对湖泊生态系统演变历史及机制研究将会有指导性的意义。

3.3 第三代测序技术

第三代测序技术依原理可分作纳米孔测序和单分子荧光测序两类,相比于第二代测序技术,其避开了PCR扩增的弊端,真正实现了对每一条DNA分子的测序(盛桂莲等,2016)。第三代测序技术是一种集高通量、速度快、读长长等为特点的新型测序技术,其单次反应能够测得的序列可长达100 kb,减少了后期基因组拼接和注释的工作量(周晓光等,

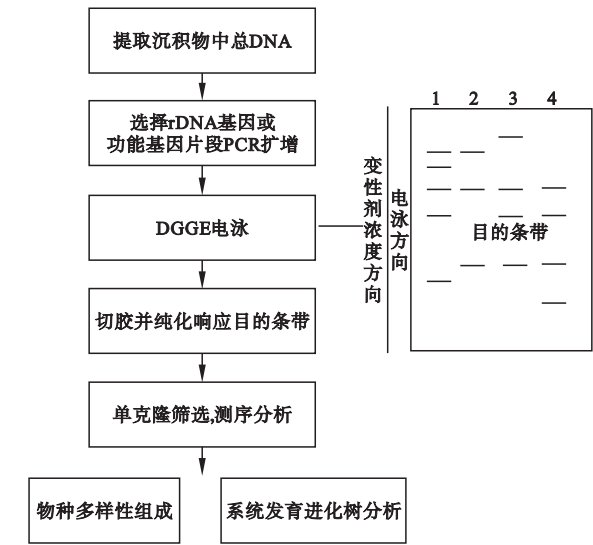


图1 DGGE法流程图
Fig.1 Research workflow of DGGE

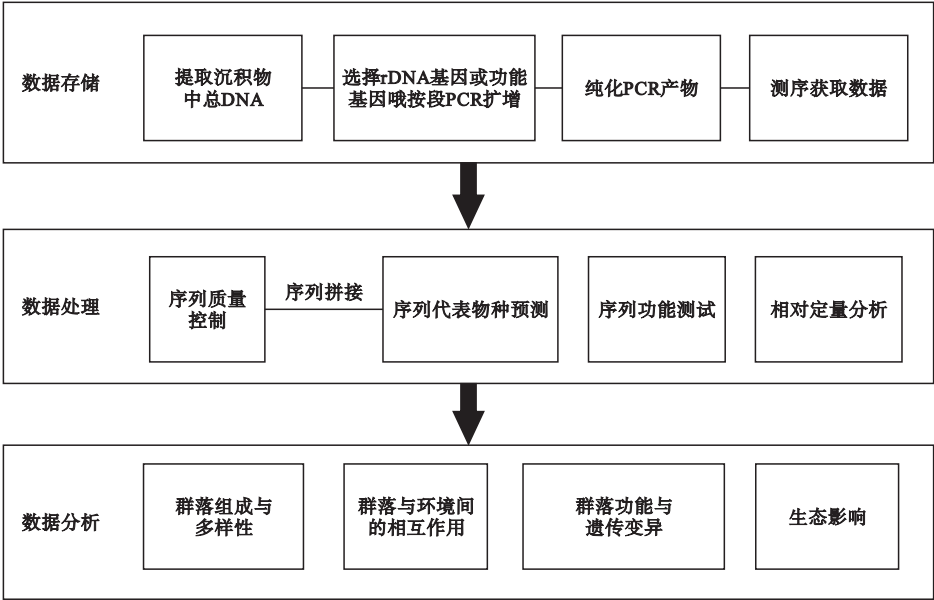


图 2 高通量测序的数据产生及处理流程图

Fig.2 High-throughout sequencing data generation and processing flow charts

据魏子艳等,2015 修改。

2010)。该技术能够直接测 RNA 序列,并且能够识别甲基化位点,在鉴定新的病原体以及细菌的基因组测序方面得到了应用。Orlando 等(2013)运用 HeliScope 单分子测序平台实现了对冻土中保存的晚更新世的古马古基因组的测序,主要是通过调整模板的变性温度和加入磷酸酶于提取物中,使得目标古 DNA 分子相对外源 DNA 更容易变性成单链并可作为测序模版(Ginolhac *et al.*, 2012)。第三代测序技术目前还初在发展阶段,在湖泊沉积物古 DNA 方面还未得到应用,可能与单读长的错误率偏高、测序成本高以及后期生信分析的软件的缺失有关。

3.4 荧光定量 PCR(qPCR)技术

荧光定量 PCR 也称 Real-Time PCR,是美国 PerkinElmer 公司 1995 年研制出来的一种核酸定量技术,其通过在 PCR 反应体系中加入荧光基团(染料或者探针),利用荧光信号积累实时检测整个反应过程,然后通过标准曲线对未知模板的拷贝数进行定量分析。在荧光定量 PCR 中,有两个基本概念很重要:即荧光阈值(threshold value)和阈值循环数(threshold cycle, Ct)。其中,荧光阈值是扩增曲线上人为设定的一个值,一般为 3~15 个循环时荧光信号标准差的 10 倍;Ct 值是指在 PCR 扩增过程中,每个反应管中荧光信号达到设定阈值的循环数。荧光定量 PCR 是建立在模板初始拷贝数的对数与 Ct 值呈线性关系的基础上,并且模板初始拷贝数越多,荧

光信号达到阈值的循环数就越少,即 Ct 值越小(王玉倩等,2016)。因此,利用已知拷贝数的标准样品绘制标准曲线(一般选择带有目的基因片段的质粒做标准品),对未知样品的荧光信号进行实时监测即可获得未知样品的 Ct 值,并进一步通过标准曲线计算得到样品的初始拷贝数。

荧光定量 PCR 技术可分为两大类:即 DNA 结合染料(SYBR Green I)和荧光染料标记序列特异性寡聚核苷酸引物或探针(如分子信标, TaqMan 探针, Eclipse 探针, Amplifluor、Scorpions、LUX、BD QZyme 引物),最常用的两种方法为 DNA 结合染料 SYBR Green I 和 TaqMan 探针。SYBR Green 法因相对于简单的操作,无需设计多个探针即可快速检验多个基因,以及较低的初始成本,受到广大研究者的青睐,在定量研究湖泊沉积物中某类生物量变化方面已得到广泛的应用(表 1)。例如,杨渐等(2016)通过该方法定量研究了青海湖沉积物中保存的过去 1.8 万年 Dinoflagellate 藻丰度变化。但该方法最大的缺点是缺乏特异性,PCR 反应中非特异性产物的出现会增加荧光值,影响定量结果的准确性。针对这一问题,通常需要通过熔解曲线和凝胶电泳技术鉴定扩增产物的特异性。TaqMan 探针法是通过使用一条序列特异的、荧光标记的寡聚核苷酸探针与目的基因结合,从而特异地监测目标产物的含量。因此, TaqMan 探针具有特异性高、信噪比高以及可

以进行多重反应的特点,但由于其初始成本高以及实验设计复杂,在湖泊沉积物古 DNA 研究中的应用并不普遍。目前,只有少数学者利用该技术进行了相关研究,如 Domaizon 等(2013)通过设计一条关于聚球藻的特异性探针,定量研究了 Bourget 湖过去 100 多年聚球藻属的数量及变化。

3.5 数字 PCR (dPCR) 技术

数字 PCR 是核酸定量和检测的一种新方法,以更高准确性、更高灵敏度实现绝对定量。其工作原理是将反应样品进行极限稀释并且分配到芯片或微滴中,使每个反应孔中含有的目标 DNA 数不超过 1 个,这些微孔在相同条件下进行 PCR 扩增,通过读取荧光信号的有或无进行计数,经过统计学泊松分布的校准进行绝对定量(图 3;Singh *et al.*, 2016;冯兆民等,2017)。相对于荧光定量 PCR (qPCR),数字 PCR 不依靠标准曲线或者参考基因进行核酸定量,而是直接对样品中 DNA 分子数进行计数,是对起始样品的绝对定量。因此,该技术特别适用于低拷贝数,依靠 Ct 值不能分辨的领域,如转基因植物检测、拷贝数变异、单细胞基因表达以及环境微生物等方面。Singh 等(2016)分别利用 dPCR 和 qPCR 技术对沉积物中沙门氏菌属(*Salmonella* sp.)含量进行检测,表明这两种技术测出该种属在沉积物中含量具有极高的相关性,但 dPCR 对低拷贝数表现更高的灵敏度。dPCR 技术具有单分子定量技术的潜力,伴随着商业化 dPCR 仪器的出现,其在沉积物中

微生物群落结构组成及含量方面的应用将会得到推广,这可能会对沉积物中含量较低的古 DNA 研究具有重要的意义。

4 古 DNA 在湖泊沉积物中应用研究进展

生物是如何响应气候变化和人类活动的,前人大多是依据湖泊沉积物中的硅藻、颗石藻、有孔虫、孢粉等形态学分析,或者保存在沉积物中的脂类大分子化合物类型分析,恢复重建湖泊中的浮游植物群落结构或者湖泊流域的植被。但在利用这些指标时,一方面不能全面重建过去生物群落面貌,另一方面只能在较高的分类水平上进行鉴定。那些在沉积物中难以留下形态结构鉴定的物种,古 DNA 更是具有无可比拟的优势(侯卫国等,2016)。因此,湖泊沉积物中古 DNA 研究为更好的理解陆地或者水生生态系统的过去环境变化提供了一个新窗口。其一方面帮助我们认知生物群落功能多样性以及湖泊水文状况演变历史;另一方面可探讨生物与气候、人类活动之间的相互关系。

4.1 利用古 DNA 重建古气候,古生态,湖泊古水文状况

湖泊沉积物中古 DNA 研究主要集中在藻类、植物、动物、微生物等方面(表 1)。藻类对气候变化响应非常敏感,沉积物中保存的藻类 DNA 可以作为古气候研究的一种重要指示手段(Coolen *et al.*, 2004b; Domaizon *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2014; 杨渐等, 2016; Gregory-Eaves *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Monchamp *et al.*, 2018)。Li 等(2016)利用高通量测序技术重建了青海湖 1.8 万年以来的藻类群落结构演化,并提出了藻类温度指标,利用该指标重建青海湖地区的温度变化趋势与 An 等(2012)重建的夏季风指标具有很好的相关性。全球或者区域的气候变化事件会对湖泊生态有重要的影响,Hou 等(2014)应用 DGGE 结合克隆测序技术对青藏高原库塞湖沉积物中保存的藻类群落结构研究,指出聚球藻(*Synechococcus* sp.)和等鞭金藻(*Isochrysis* sp.)的丰度变化与亚洲季风、太阳黑子变化具有很好的相关性,认为是季风强度变化驱动湖泊中营养盐和温度的变化并进一步影响湖泊的藻类群落结构组成。利用沉积物中保存的藻类 DNA 还可以指示湖泊的营养状态演变历史,研究影响生物多样性的因素。Domaizon 等(2013)对湖泊沉积物中保存的聚球藻属(*Synechococcus* sp.)DNA 应用

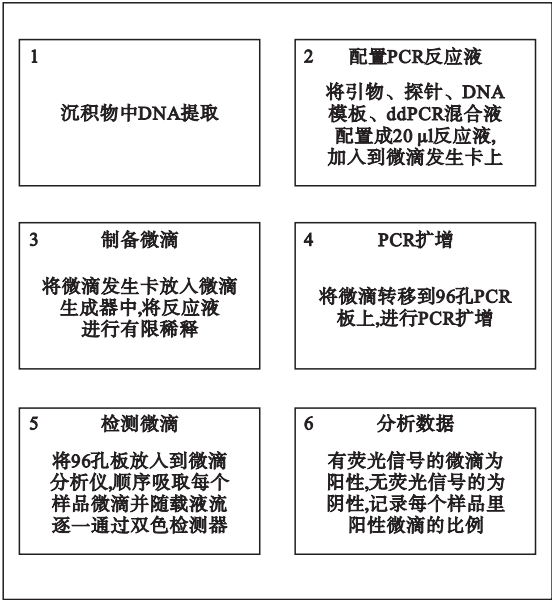


图 3 ddPCR 原理流程图
Fig.3 Schematic diagram of ddPCR

荧光定量 PCR 以及克隆测序技术进行了研究,恢复了该湖泊过去 100 年聚球藻多样性和动力学结构的演化,指出该湖泊经历了寡营养化、富营养化、再次寡营养化的演变,并认为湖泊营养状态和全球变暖是背后驱动藻类多样性变化的主要因素。

除了沉积物中保存的藻类外,沉积物中保存的好氧微生物、光合细菌等的 DNA 片段含量变化可用以探讨湖泊水文演变历史。Yang 等 (2015) 通过荧光定量 PCR 技术对青海湖 1.8 万年以来氨氧化古菌 DNA 含量变化进行了研究,其结果很好地指示了青海湖水位和营养盐变化,并认为降雨量增加导致湖泊处于富营养以及高水位状态从而抑制氨氧化古菌的生长,相反,干冷气候条件下会使湖泊处于寡营养以及低水位状态从而促进氨氧化古菌的大量生长。沉积物中保存的一些植物 DNA 片段则可以用来恢复流域植被演化历史 (Willerslev *et al.*, 2003; Anderson-Carpenter *et al.*, 2011), 并可以与孢粉、植物大化石等相互补充对比 (Birks *et al.*, 2016)。Epp 等 (2015) 通过对格陵兰湖泊沉积物中保存的维管束植物、苔藓类植物、藻类、桡脚类动物等的 DNA 研究,表明植物和藻类共同直接记录了早全新世的夏季高温事件,一些植物如岩高兰 (*Empetrum nigrum*) 只是在冰消期短暂存在。

4.2 古 DNA 在人类活动对环境影响方面的应用

在人类活动引起全球性环境问题日益显著的背景下,“人类世”(Anthropocene)概念由大气化学奖诺贝尔奖得主 Crutzen 与生态学家 Stoermer 于 2000 年提出 (Crutzen *et al.*, 2000; 刘学等, 2014)。目前越来越多的学者开始关注人类世方面的研究,并指出人类活动作为一种地质营力,其对河流湖泊系统、大气系统等产生不可磨灭的影响 (刘学等, 2014), 如改变流域的植被状况、加速某些物种的灭绝或者降低生物多样性、加速湖泊富营养化过程 (刘学等, 2014; Pansu *et al.*, 2015; Lendvay *et al.*, 2018; Monchamp *et al.*, 2018), 湖泊沉积物中古 DNA 可能会将这些信息记录。Giguet-Covex 等 (2014) 通过对阿尔卑斯山上 Anterne 湖沉积物中牛、羊等哺乳动物以及植物的古 DNA 研究,恢复重建了新石器时代以来人类的放牧历史,并指出当湖泊周边植被茂盛时,牛、羊等家畜活动强度较大,而此时人类活动强度也较大并且会明显加重植被的水土流失。Lendvay 等 (2018) 通过对挪威湖泊沉积物中保存的云杉 (*Picea abies*) 古 DNA 研究并与现代比较,表明云杉多样性

在距今 2000 年以前明显高于 19 世纪和 20 世纪,并认为引起多样性丢失的因素可能与人类砍伐森林等有关。Monchamp 等 (2018) 通过对欧洲多个湖泊沉积物中保存的蓝藻 DNA 研究,指出过去 100 年人类活动的增强以及温度增加造成蓝藻生物多样性降低以及区域之间蓝藻物种多样性差异的减少。笔者曾利用高通量测序和荧光定量 PCR 等分子生物方法对程海沉积物中保存的藻类群落结构与蓝藻生物量进行恢复,探讨过去 100 年蓝藻与气候变化、人类活动之间的关系,发现湖泊中蓝藻生物量的增加与人类活动输入的营养盐增加以及导致的湖泊水位降低密切相关 (Yan *et al.*, 2019)。

微生物对人类活动响应很敏感,通过对湖泊沉积物中一些与人类活动密切相关的细菌如 human-specific *Bacteroides* strain HF 183 研究,可以探讨人类何时开始在湖周边居住以及对湖泊水体有何种影响 (Madeja *et al.*, 2015)。汞被认为是一种与人类活动排放污染物密切相关的金属, Poulain 等 (2015) 通过荧光定量 PCR 测定沉积物中汞还原酶基因 (*merA*) 含量,发现该基因片段含量从 200 年以前开始大幅度的增加与工业革命有关。Belle 等 (2014) 通过荧光定量 PCR 技术对 Narlay 湖泊沉积物中对过去 1600 年以来保存的好氧甲烷细菌群落结构组成及变化进行了研究,表明在近 400 年以来好氧甲烷细菌的丰度明显增加可能是由于人类活动增强导致更多的营养盐输入湖泊中,引起产甲烷作用增强。在湖泊富营养化成为全球性问题的趋势下,可以尝试通过微生物群落的变化研究湖泊水体的状态并预测湖泊未来的演化方向。

5 总 结

过去十几年中,分子生物学技术的飞速发展使得我们能够从分子生物学角度研究湖泊沉积物中保存的历史时期藻类和动植物等的数量、分布和种类,为阐明生物群落的物种组成以及演化、群落与环境相互作用提供了丰富的信息,同时在重建古气候、古生态以及人类活动对环境影响等方面得到了很好的应用。但湖泊沉积物中古 DNA 研究方法方面仍存在一些关键问题,可以概括为以下两方面:

湖泊沉积物虽有利于古 DNA 的保存,但其中目标古 DNA 分子数量往往有限,以及现代 DNA 的污染、DNA 分子的降解、抽提液中其他成分如腐植酸对 DNA 聚合酶的抑制作用等都会影响对沉积物中

古 DNA 研究。因此,如何最大限度有效地将沉积物中古 DNA 提取,对后续的古 DNA 研究具有举足轻重的作用。

传统的 DGGE 结合克隆测序技术因测序读长长(1000 bp)、准确性高等特点,在湖泊沉积物中古 DNA 研究中得到了广泛的应用。但该方法操作繁琐、成本高,随着高通量测序技术的普及,可能会慢慢淡出人们的视野。高通量测序技术以成本低、数据量大、速度快为特点,成为时代的新宠儿,但与此同时如何从海量数据中提取有效数据,如何利用生物信息学中构建模型和网络的方法在湖泊沉积物古 DNA 研究中加以应用,已成为关键性问题。荧光定量 PCR 技术在定量某一类生物数量变化时发挥了举足轻重的作用,但无论是 Taqman 探针还是 SYBR Green 法在针对研究目的基因片段含量极低情况下,其定量的准确性与可靠性值得进一步检验,可能要考虑多种分子生物方法相结合加以衡量。目前正在兴起的第三代单分子实时测序技术以及数字 PCR(dPCR)技术等,虽然还未在湖泊沉积物中广泛应用,但这些技术的开展可能会为沉积物中保存的低含量古 DNA 研究开辟另一片天地。

致谢 感谢上海大学环境与化工学院杨明老师和天津大学表层地球科学系统研究院王宝利老师对本稿提供的宝贵意见。感谢审稿人及编辑对本稿的修改以及提供的宝贵意见。

参考文献

单国彬,金文标,林信侃,等. 2006. 变性梯度凝胶电泳在环境微生物生态学中的应用. *生态学杂志*, **25**(10): 1257-1264.

刘学,张志强,郑军卫,等. 2014. 关于人类世问题研究的讨论. *地球科学进展*, **29**(5): 640-648.

侯卫国,董海良,蒋宏忱,等. 2016. 沉积物中古 DNA 在古生态、古环境和古气候研究中的应用. *地学前缘*, **24**(2): 286-291.

周晓光,任鲁凤,李运涛,等. 2010. 下一代测序技术: 技术回顾与展望. *中国科学: 生命科学*, **40**(1): 23-37.

盛桂莲,赖旭龙,袁俊霞,等. 2016. 古 DNA 研究: 35 年回顾与展望. *中国科学: 地球科学*, **46**(12): 1564-1578.

申慧彦,李世杰. 2008. 湖泊沉积物中 DNA 提取与 PCR 扩增. *地球科学进展*, **23**(4): 433-438.

魏子艳,金德才,邓晔. 2015. 环境微生物宏基因组学研究中的生物信息学方法. *微生物学通报*, **42**(5): 890-901.

王玉倩,薛秀花. 2016. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用. *生物学通报*, **51**(2): 1-6.

冯兆民,舒跃龙. 2017. 数字 PCR 技术及其应用进展. *病毒学报*, **33**(1): 103-107.

杨渐,蒋宏忱,吴耿,等. 2016. 青海湖 1.8 万年以来甲藻 Dinoflagellate 群落变化及其古气候环境的指示意义. *盐湖研究*, **24**(2): 84-91.

Ahmed E, Han L, Pedersen MW, et al. 2016. Ancient DNA in lake sediments: Shotgun metagenomic analyses. Conference: SciLifeLab mini-symposium: Ancient Environmental DNA.

Alsos IG, Sjögren P, Edwards ME, et al. 2015. Sedimentary ancient DNA from Lake Skartjørna, Svalbard: Assessing the resilience of arctic flora to Holocene climate change. *Holocene*, **26**: 189-192.

An Z, Colman SM, Zhou W, et al. 2012. Interplay between the Westerlies and Asian monsoon recorded in Lake Qinghai sediments since 32 ka. *Scientific Reports*, **2**: 619.

Anderson-Carpenter LL, McLachlan JS, Jackson ST, et al. 2011. Ancient DNA from lake sediments: Bridging the gap between paleoecology and genetics. *BMC Evolutionary Biology*, **11**: 88-95.

Andrew B, John AE, Simon NJ, et al. 2005. Isolation, amplification, and identification of ancient copepod DNA from lake sediments. *Limnology and Oceanography: Methods*, **3**: 533-542.

Belle S, Parent C, Frossard V, et al. 2014. Temporal changes in the contribution of methane-oxidizing bacteria to the biomass of chironomid larvae determined using stable carbon isotopes and ancient DNA. *Journal of Paleolimnology*, **52**: 215-228.

Birks JB, Birks HH. 2016. How have studies of ancient DNA from sediments contributed to the reconstruction of Quaternary floras? *New Phytologist*, **209**: 499-506.

Bissett A, Gibson JAE, Jarman SN, et al. 2005. Isolation, amplification, and identification of ancient copepod DNA from lake sediments. *Limnology & Oceanography Methods*, **3**: 533-542.

Boessenkool S, McGlynn G, Epp LS, et al. 2014. Use of ancient sedimentary DNA as a novel conservation tool for high-altitude tropical biodiversity. *Conservation Biology*, **28**: 446-455.

Capo E, Debroas D, Arnaud F, et al. 2015. Is planktonic diversity well recorded in sedimentary DNA? Toward the reconstruction of past protistan diversity. *Microbial Ecology*, **70**: 865-875.

Coolen MJL, Muyzer G, Rijpstra WIC, et al. 2004b. Combined DNA and lipid analyses of sediments reveal changes in Holocene haptophyte and diatom populations in an Antarctic lake. *Earth and Planetary Science Letters*, **223**: 225-239.

Coolen MJL, Muyzer G, Schouten S, et al. 2005. Sulfur and methane cycling during the Holocene in Ace Lake Antarctica revealed by lipid and DNA stratigraphy. *Nature Science*, **64**: 41-65.

Coolen MJL, Overmann J. 1998. Analysis of subfossil molecular remains of purple sulfur bacteria in a lake sediment. *Applied & Environmental Microbiology*, **64**: 4513-4521.

Coolen MJL. 2011. 7000 years of *Emiliania huxleyi* viruses in

- the black sea. *Science*, **333**: 451–452.
- Crutzen PJ, Stoermer EF. 2000. The “Anthropocene”. *IGBP NewsLetter*, **41**: 17–18.
- D’Andrea WJ, Lage M, Martiny JBH, *et al.* 2015. Alkenone producers inferred from well-preserved 18S rDNA in Greenland lake sediments. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, **111**: 397–399.
- Domaizon I, Savichtcheva O, Debroas D, *et al.* 2013. DNA from lake sediments reveals the long-term dynamics and diversity of *Synechococcus assemblages*. *Biogeosciences*, **10**: 3817–3838.
- Epp LS, Gussarova G, Boessenkool S, *et al.* 2015. Lake sediment multi-taxon DNA from North Greenland records early post-glacial appearance of vascular plants and accurately tracks environmental changes. *Quaternary Science Reviews*, **117**: 152–163.
- Epp LS, Stoof-Leichsenring KR, Trauth MH, *et al.* 2011. Molecular profiling of diatom assemblages in tropical lake sediments using taxon-specific PCR and Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (PCR-DHPLC). *Molecular Ecology Resources*, **11**: 842–853.
- Fischer SG, Lerman LS. 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, **16**: 191–200.
- Fu Q, Li H, Moorjani P, *et al.* 2014. Genomes of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature*, **514**: 445–449.
- Giguet-Covex C, Pansu J, Arnaud F, *et al.* 2014. Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA. *Nature Communications*, **23**: 3211.
- Ginolhac A, Vilstrup J, Stenderup J, *et al.* 2012. Improving the performance of true single molecule sequencing for ancient DNA. *BMC Genomics*, **13**: 177.
- Gregory-Eaves S, Pal I, Pick FR. 2015. Temporal trends in cyanobacteria revealed through DNA and pigment analyses of temperate lake sediment cores. *Journal of Paleolimnology*, **54**: 1–15.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, *et al.* 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, **5**: 245–249.
- Heinecke L, Epp LS, Mischke S, *et al.* 2016. Geochemical analyses of macrophytes (*Potamogeton* sp.) and ancient DNA from Lake Karakul, Tajikistan. *Geophysical Research Abstracts*, **18**: EGU2016–13233.
- Higuchi R, Bowman B, Freiburger M, *et al.* 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, **312**: 282–284.
- Hofreiter M, David S, Hendrik N, *et al.* 2001. Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, **2**: 353–362.
- Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, *et al.* 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, **24**: 1304–1307.
- Hou WG, Dong HL, Li GY, *et al.* 2014. Identification of photo-synthetic plankton communities using sedimentary ancient DNA and their response to late-Holocene climate change on the Tibetan Plateau. *Scientific Reports*, **4**: 6648.
- Jiang H, Dong H, Yu B, *et al.* 2007. Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. *Environmental Microbiology*, **9**: 2603–2621.
- Klouch KZ, Schmidt S, Andrieux-Loyer F, *et al.* 2016. Historical records from dated sediment cores reveal the multidecadal dynamic of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* in the Bay of Brest (France). *FEMS Microbiology Ecology*, **92**: 101–118.
- Knight R, Jansson J, Field D, *et al.* 2012. Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature Biotechnology*, **30**: 513–520.
- Lendvay B, Miklós B, Ilona P, *et al.* 2018. Plant macrofossils from lake sediment as the material to assess ancient genetic diversity: Did deforestation influence Norway spruce (*Picea abies*) in the South Carpathians. *Quaternary International*, **30**: 106–116.
- Li GY, Dong HL, Hou WG, *et al.* 2016. Temporal succession of ancient phytoplankton community in Qinghai Lake and implication for paleo-environmental Change. *Scientific Reports*, **6**: 19769.
- Limburg PA, Weider LJ. 2002. ‘Ancient’ DNA in the resting egg bank of a microcrustacean can serve as a palaeolimnological database. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **269**: 281–287.
- Madeja J. 2015. A new tool to trace past human presence from lake sediments: The human-specific molecular marker *Bacteroides* strain HF 183. *Journal of Quaternary Science*, **30**: 349–354.
- Martínez EG, Antoniadou D, Bonilla S, *et al.* 2014. Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic cyanobacteria in subtropical freshwater ecosystems. *Molecular Ecology*, **23**: 5791–5802.
- Matisoo-Smith E, Roberts K, Welikala N, *et al.* 2008. Recovery of DNA and pollen from New Zealand lake sediments. *Quaternary International*, **184**: 139–149.
- Mitchell D, Willerslev E, Hansen A. 2005. Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research*, **571**: 265–276.
- Monchamp ME, Spaak P, Domaizon I, *et al.* 2018. Homogenization of lake cyanobacterial communities over a century of climate change and eutrophication. *Nature Ecology Evolution*, **2**: 317–322.
- Niemeyer B, Epp LS, Stoof-Leichsenring KR, *et al.* 2017. A comparison of sedimentary DNA and pollen from lake sediments in recording vegetation composition at the Siberian treeline. *Molecular Ecology Resources*, **17**: 46–57.
- Orlando L, Ginolhac A, Zhang G, *et al.* 2013. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*, **499**: 74–78.
- Pääbo S, Poinar H, David S, *et al.* 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Reviews of Genetics*, **38**: 645–679.

- Pal S, Gregory-Eaves I, Pick FR. 2015. Temporal trends in cyanobacteria revealed through DNA and pigment analyses of temperate lake sediment cores. *Journal of Paleolimnology*, **54**: 87–101.
- Pansu J, Giguet-Covex C, Ficetola GF, *et al.* 2015. Reconstructing long-term human impacts on plant communities: An ecological approach based on lake sediment DNA. *Molecular Ecology*, **24**: 1485–1498.
- Parducci L, Bennett KD, Ficetola GF, *et al.* 2017. Ancient plant DNA in lake sediments. *New Phytologist*, **214**: 924–942.
- Parducci L, Suyama Y. 2005. Single-Pollen genotyping of Holocene lake sediments// Isagi Y, Suyama Y, eds. *Single-Pollen Genotyping*. Springer Japan, Ecological Research Monographs 1, DOI: 10.1007/978-4-431-53901-8_8.: 101–109.
- Pedersen MW, Ginolhac A, Orlando L, *et al.* 2013. A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and macrofossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa. *Quaternary Science Reviews*, **75**: 151–158.
- Poulain AJ, Arisbrosou S, Blais JM, *et al.* 2015. Microbial DNA records historical delivery of anthropogenic mercury. *ISME Journal*, **9**: 2541–2550.
- Randlett MÈ, Coolen MJL, Stockhecke M, *et al.* 2014. Alkenone distribution in Lake Van sediment over the last 270 ka: Influence of temperature and haptophyte species composition. *Quaternary Science Reviews*, **104**: 53–62.
- Ravasi DF, Peduzzi S, Guidi V, *et al.* 2012. Development of a real-time PCR method for the detection of fossil 16S rDNA fragments of phototrophic sulfur bacteria in the sediments of Lake Cadagno. *Geobiology*, **10**: 196–204.
- Reid VA, Carvalho GR, George DG, *et al.* 2002. A technique for the molecular genetic analysis of *Daphnia*, resting eggs from sub-recent lake sediments. *Journal of Paleolimnology*, **27**: 481–486.
- Savichtcheva O, Debroas D, Perga ME, *et al.* 2015. Effects of nutrients and warming on *Planktothrix* dynamics and diversity: Apalaeolimnological view based on sedimentary DNA and RNA. *Freshwater Biology*, **60**: 31–49.
- Singh G, Sithebe A, Enitan AM, *et al.* 2016. Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR for the detection of *Salmonella* and its application for river sediments. *Journal of Water and Health*, **15**: 505–508.
- Stoofleichenring KR, Herzsuh U, Pestryakova LA, *et al.* 2015. Genetic data from algae sedimentary DNA reflect the influence of environment over geography. *Scientific Reports*, **5**: 12924.
- Torit A, Lever MA, Jorgensen BB. 2015. Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine Genomics*, **24**: 185–196.
- Willerslev E, Cooper A. 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, **300**: 791–795.
- Willerslev E, Cooper A. 2005. Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**: 3–16.
- Xu ZH, Jiang XD, Wang GZ, *et al.* 2011. DNA extraction, amplification and analysis of the 28S rRNA portion in sediment-buried copepod DNA in the Great Wall Bay and Xihu Lake, Antarctica. *Journal of Plankton Research*, **33**: 917–925.
- Yan DN, Xu H, Yang M, *et al.* 2019. Responses of cyanobacteria to climate and human activities at Lake Chenghai over the past 100 years. *Ecological Indicators*, ECOIND5442.
- Yang J, Jiang HC, Dong HL, *et al.* 2015. Sedimentary archaeal amoA gene abundance reflects historic nutrient level and salinity fluctuations in Qinghai Lake, Tibetan Plateau. *Scientific Reports*, **5**: 18071.

作者简介 严东娜,女,1991年生,博士研究生,研究方向主要为湖泊微生物学以及第四纪地质与全球变化。E-mail: yandn@ieecas.cn

责任编辑 魏中青
