

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240705002

http://www.yykxjz.cn/

张磊, 许星鸿, 刘志鸿, 吴彪, 周丽青, 李转转, 马培振, 孙秀俊. 菲律宾蛤仔幼虫 DNA 的高效提取及在遗传分析中的应用. 渔业科学进展, 2025, 46(4): 192–200

ZHANG L, XU X H, LIU Z H, WU B, ZHOU L Q, LI Z Z, MA P Z, SUN X J. An efficient DNA extraction method from *Ruditapes philippinarum* larvae and its application in genetic analysis. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(4): 192–200

菲律宾蛤仔幼虫 DNA 的高效提取 及在遗传分析中的应用*

张磊^{1,2,3} 许星鸿¹ 刘志鸿^{2,3} 吴彪^{2,3} 周丽青^{2,3}
李转转^{2,3} 马培振^{2,3} 孙秀俊^{2,3①}

(1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 连云港 222005;

2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所) 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266237)

摘要 本研究以菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的 D 形幼虫和壳顶幼虫为研究对象, 建立快速、高效的单个幼虫基因组 DNA 提取方法, 并成功应用于菲律宾蛤仔的遗传学鉴定和单倍型分析。此方法的原理在于通过物理和化学手段破坏细胞结构, 释放 DNA, 并通过热变性和快速冷却步骤实现 DNA 的收集。进行实验时, 先将分离的单个幼虫转移到 PCR 管中, 加入 10 μ L PCR 缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 迅速转移到冰盒中, 并加入 0.5 μ L 蛋白酶 K, 并振荡混匀, 在 PCR 仪 55 $^{\circ}$ C 条件消化 60 min, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 后, 4 $^{\circ}$ C 离心并保存 DNA。经超微量紫外可见光分光光度仪检测、琼脂糖凝胶电泳分离和 DNA 序列比对, 评价幼虫 DNA 的质量。结果显示, 以幼虫 DNA 为模板, 设计用于扩增 16SrRNA 和 COX1 基因的引物, 扩增获得 PCR 产物的电泳条带清晰, 测序验证准确, 表明 16SrRNA 和 COX1 均能对菲律宾蛤仔幼虫进行遗传鉴定和单倍型分析, COX1 共获得单倍型 14 个, 单倍型多样性为 0.937; 16SrRNA 共得到单倍型 13 个, 单倍型多样性为 0.705。研究结果证实, 该方法可从几百微米大小的贝类幼虫中提取高质量的基因组 DNA, 为贝类幼虫的物种鉴定和遗传学分析提供了一种准确、高效和可靠的方法, 在贝类幼虫生态学和遗传育种领域具有广阔的应用前景。

关键词 基因组 DNA; D 形幼虫; 遗传分析; COX1; 16SrRNA; 菲律宾蛤仔

中图分类号 Q953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)04-0192-09

贝类早期发育阶段主要包括担轮幼虫、面盘幼虫(D 形幼虫和壳顶幼虫)和稚贝等。面盘幼虫(浮游幼虫)是大多数贝类早期发育过程中的重要阶段, 体型较小, 壳长通常为 100~300 μ m 左右, 营浮游生活, 幼虫贝壳和肌肉系统在此阶段逐渐发育形成和完善(Sun

et al, 2019; Wu et al, 2022; 王婷等, 2022; Huan et al, 2024)。在海洋中, 贝类浮游幼虫的自然分布和扩散范围直接影响贝类种群的定居和繁衍(Jablonski et al, 1983; Johnson et al, 2001; Piggott et al, 2008; Cowen et al, 2009)。在贝类育苗生产中, 贝类幼虫的健康状

* 国家重点研发计划(2023YFD2401705)、国家自然科学基金(32273107)、崂山实验室科技创新项目(LSKJ202203803)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2023TD30)共同资助。张磊, Email: z182workfort@163.com

① 通信作者: 孙秀俊, 研究员, Email: xjsun@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-07-05, 收修改稿日期: 2024-08-26

况是决定贝类苗种生长和存活的关键(Nascimento-Schulze *et al*, 2021)。多年来, 国内外学者对贝类幼虫生长发育开展了大量的研究工作, 主要集中在环境对贝类幼虫生长发育和附着变态的影响等方面(王国栋等, 2003; 宁军号等, 2015; 李浩浩等, 2017; 王涛等, 2018; 邓正华等, 2019; 方佳峰等, 2020; 刘洋等, 2020; 杜美荣等, 2020)。

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)是广温、广盐、广分布的海产双壳贝类, 主要生活在滩涂、浅海区域, 在我国北至辽宁、南至南海均有分布, 是一种适合于人工高密度养殖的滩涂贝类, 也是中国四大养殖贝类之一。然而, 长期以来, 我国南方育苗和北方养殖的产业模式可能对当地野生种群基因资源和群落结构产生一定影响(胡利莎等, 2016; 谭月等, 2021; 王松林等, 2023; Wei *et al*, 2023; Zheng *et al*, 2023)。在菲律宾蛤仔人工苗种培育过程中, 由于亲本种质来源混杂, 导致出现苗种生产不稳定性、批次效应、质量参差不齐等问题。这些问题直接关系到菲律宾蛤仔的苗种稳定生产, 对蛤仔养殖产业的绿色可持续性发展造成不良影响。因此, 建立菲律宾蛤仔苗种的高效 DNA 提取及遗传鉴定方法, 对于早期苗种的质量筛查和批次鉴定具有重要意义。

然而, 目前, 在大多数海洋贝类研究过程中, DNA 通常是从闭壳肌等组织中提取, 采用苯酚-氯仿、DNA 提取试剂盒等传统方法提取基因组 DNA。这些传统方法对样品组织需求量大, 繁琐耗时, 提取试剂有强刺激性, 不适于贝类幼虫 DNA 的提取。特别是对于单个幼虫个体的 DNA 提取, 由于其体积微小, 体内 DNA 含量有限, 传统的提取方法无法满足贝类群体遗传学和幼虫生态学等方面分析研究的需要(张凤梅等, 2020; 陈一等, 2023)。因此, 建立一种单个贝类幼虫 DNA 的高效提取方法, 对贝类的物种鉴定和遗传学分析, 深入认识海洋贝类种群之间的连通性以及贝类种质资源的管理和保护具有重要价值(Johnson *et al*, 2001; Piggott *et al*, 2008; 徐梦珍等, 2023), 在贝类分子育种和群体遗传学等领域具有广阔的应用前景(赵庆等, 2018; 王玲等, 2018; 于红等, 2022; Qi *et al*, 2022)。

针对海洋贝类幼虫 DNA 提取及鉴定技术薄弱的问题, 本研究以我国重要滩涂贝类菲律宾蛤仔为研究对象, 基于 16SrRNA 和 COX1 基因, 通过 PCR 技术和单倍型分析技术, 建立一种准确、高效的 DNA 提取及遗传鉴定方法, 以期为菲律宾蛤仔种质资源的保护与评价、人工苗种质量鉴定等方面提供理论依据和必要的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

菲律宾蛤仔苗种繁育实验在福建中灵农业发展有限公司贝类育苗场进行。苗种培育期间, 所用海水经砂滤池过滤, 盐度为 25~30, 水温为 23~26 °C。每天投喂金藻(*Chrysophyta*)和角毛藻(*Chaetoceros*)的混合藻水, 每 2 d 换水一次。幼虫样本为山东与广东种群的杂交 F₁ 代以及莱州群体的自繁后代。从幼虫培育池中取 6 L 海水, 用 500 目筛绢过滤, 对少量蛤仔幼虫在显微镜下进行形态学观察和发育时期鉴定。所需样本为 D 形幼虫和壳顶幼虫, D 形幼虫的铰合部呈直线, 外形呈现字母“D”的形状; 壳顶幼虫的铰合部稍稍隆起呈弧形, 壳面观壳顶接近左右对称。使用一次性吸管精确吸取滤网内的幼虫样本, 并将 D 形幼虫和壳顶幼虫分别收集至装有 700~800 μL 海水的 1.5 mL 离心管中, 用吸管吸取少量(约 10 滴) 7.5% MgCl₂ 试剂, 混匀后静置 1~2 min, 待幼虫全部下沉, 将海水吸干, 加入无水乙醇反复清洗, 直至无絮状物出现。于无水乙醇中保存, 用于 DNA 提取。用吸管将幼苗吸出, 置于显微镜下, 使用接种针将单个幼虫分离开来, 再将单个幼虫转移到 200 μL PCR 管中备用。

1.2 幼虫的 DNA 提取及质量评价

在装有幼虫的 PCR 管中, 加入 10 μL PCR 缓冲液[500 mmol/L KCl、100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、15 mmol/L MgCl₂ 和 5 mmol/L (NH₄)₂SO₄]。将 PCR 管置于 PCR 仪上, 在 100 °C 条件下加热 5 min, 以实现 DNA 的失活处理。将含有幼虫 DNA 的 PCR 管转移到冰盒中, 并加入 0.5 μL 蛋白酶 K, 之后密封并振荡混匀, 在 55 °C 条件下继续加热 60 min。随后, 经 100 °C 处理 10 min, 于 4 °C 离心并保存 DNA。收集菲律宾蛤仔 30 个 D 形幼虫和 30 个壳顶幼虫, 分别提取基因组 DNA, 使用超微量紫外可见光分光光度计 NanoDrop 2000 和琼脂糖电泳检测 DNA 的质量和浓度。

1.3 PCR 扩增及产物测序分析

以幼虫 DNA 为模板, 构建 50 μL PCR 体系, 其中包括 2×Taq Plus Master Mix II (Dye Plus) 25 μL、COX1 正向引物 2 μL、COX1 反向引物 2 μL、灭菌水 16 μL 和模板 DNA 5 μL。扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 10 min。取 2 μL PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中, 130 V 电泳 30 min, 验证条带位于相应片段大小的位置上且条带单一。扩增产物由生工生物工程(上

海)股份有限公司进行单向测序。采用 MEGA 6.06 软件剪切拼接测得序列,以 NCBI 数据库中菲律宾蛤仔 DNA 数据为参考,使用 GeneDOC 和 MEGA 软件中的 ClustalW 进行比对。采用 Neighbor-Joining(邻接法)构建个体系统发育树。测试菲律宾蛤仔序列与数据库记录序列在同一分支,则此测试的幼苗为菲律宾蛤仔幼苗。采用 DNAsp 6.0 软件进行单倍型分类和统计。用 GeneDOC 软件对所测序列进行基因比对分析。采集不同批次的 D 形幼虫和壳顶幼虫,利用 MEGA 6.06 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取质量以及 PCR 产物纯度检测

本研究对菲律宾蛤仔的 30 个 D 形幼虫和 30 个壳顶幼虫分别进行 DNA 提取及质量和浓度检验。由表 1 可见,2 个时期的贝类幼虫提取的 DNA 浓度为 (26.14 ± 9.32) ng/ μ L, $A_{260/280}$ 值为 1.16 ± 0.08 。将提取的

表 1 菲律宾蛤仔幼虫基因组 DNA 质量和浓度
Tab.1 The quality and concentration of genomic DNA from *R. philippinarum* larvae

样品 Sample	DNA 浓度/(ng/ μ L) DNA concentration	$A_{260/280}$
D-shaped larvae-2	17.9	1.00
D-shaped larvae-11	18.4	1.21
D-shaped larvae-15	20.4	1.18
D-shaped larvae-17	21.7	1.26
Umbo larvae-6	30.7	1.17
Umbo larvae-11	43.5	1.14
Umbo larvae-4	30.4	1.15
Umbo larvae-7	49.5	1.27

表 2 菲律宾蛤仔幼虫基因组 PCR 产物质量和浓度
Tab.2 The quality and concentration of PCR products of the genomic DNA from *R. philippinarum* larvae

引物 Primer	样品 Sample	产物浓度 Product concentration /(ng/ μ L)	$A_{260/280}$
16SrRNA	D-shaped larvae-2	524.8	1.28
	D-shaped larvae-11	539.9	1.28
	Umbo larvae-6	525.6	1.27
	Umbo larvae-11	514.6	1.26
COX1	D-shaped larvae-15	522.1	1.26
	D-shaped larvae-17	537.7	1.26
	Umbo larvae-4	514.8	1.27
	Umbo larvae-7	517.2	1.26

DNA 分别用 16SrRNA 和 COX1 引物进行 PCR 扩增,均获得特异性 PCR 产物,扩增引物序列见表 3, PCR 产物的电泳结果见图 2。采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳对提取的幼虫基因组 DNA 进行分析(图 1),结果显示, DNA 条带明显,未观察到非特异性条带,验证了该方法在 DNA 提取过程中的高纯度和高回收率,可为后续分子生物学研究提供可靠的 DNA 模板。

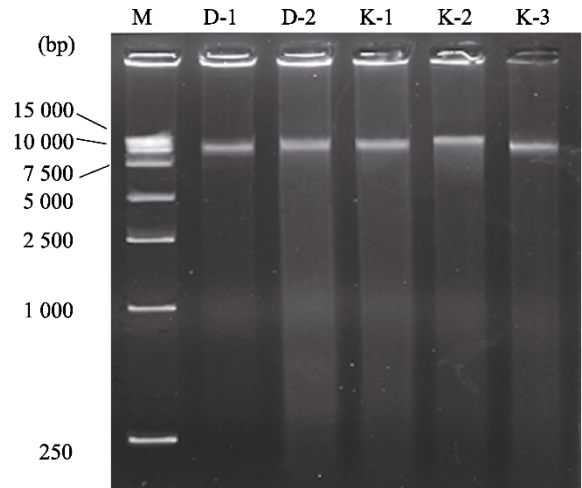


图 1 菲律宾蛤仔幼虫基因组 DNA 电泳
Fig.1 The gel electrophoresis results of DNA extracted from *R. philippinarum* larvae

D: D 形幼虫; K: 壳顶幼虫; M: Marker。下同。
D: D-shaped larvae; K: Umbo larvae; M: Marker.
The same below.

2.2 系统发育关系及物种鉴定

基于 COX1 序列采用 NJ 邻接法构建了 28 个菲律宾蛤仔幼虫的系统进化图。基于 COX1 构建的 NJ 图将 28 个个体分为 2 个主要分支(图 3A),其中,Umbo larvae 8~15 为莱州苗种,聚集成一个独立的分支,而其余 16 个个体则聚集成另外一个分支。基于 16SrRNA 构建的系统进化图(图 3B),由 34 个幼虫个体组成,系统发育树分为 1 个大分支和 3 个小分支,其中,Umbo larvae 15~29 为莱州群体的自繁后代,其余为杂交苗种。

2.3 菲律宾蛤仔幼虫基因序列比对和单倍型分析

D 形和壳顶幼虫 DNA 扩增获得的序列,与 NCBI 数据库中菲律宾蛤仔数据库进行比对,结果见图 4,证实所有幼虫样品均为菲律宾蛤仔,比对准确率在 99%以上。经 MEGA 和 GeneDOC 进行 DNA 序列分析,发现 COX1 扩增序列能够对不同遗传背景的菲律宾蛤仔幼虫进行准确鉴别,置信度为 98.4%(图 4A); 16SrRNA 也能对不同批次菲律宾蛤仔幼虫进行准确

表 3 菲律宾蛤仔幼虫 DNA 的 PCR 扩增引物序列
Tab.3 PCR primer sequence for amplification of *R. philippinarum* larvae DNA

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	片段长度 Fragment length/bp
COX1	F: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG R: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	500
16SrRNA	F: CGCCTGTTTATCAAAAACAT R: CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	625

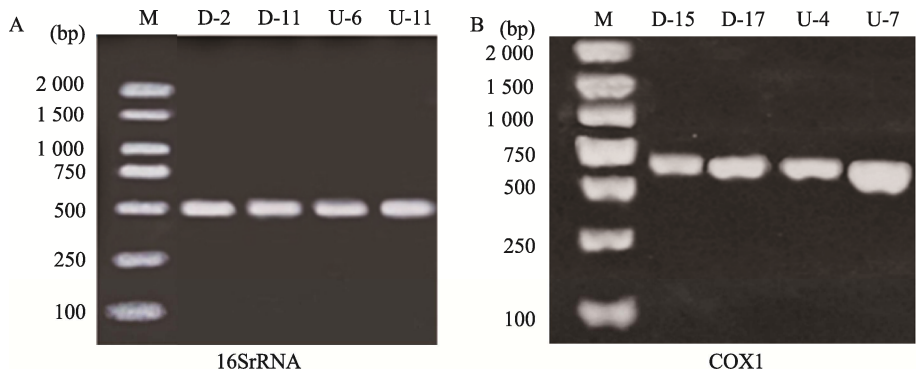


图 2 菲律宾蛤仔幼虫 DNA PCR 产物电泳(A: 16SrRNA; B: COX1)
Fig.2 Electrophoresis of the PCR products of the *R. philippinarum* larvae (A: 16SrRNA; B: COX1)

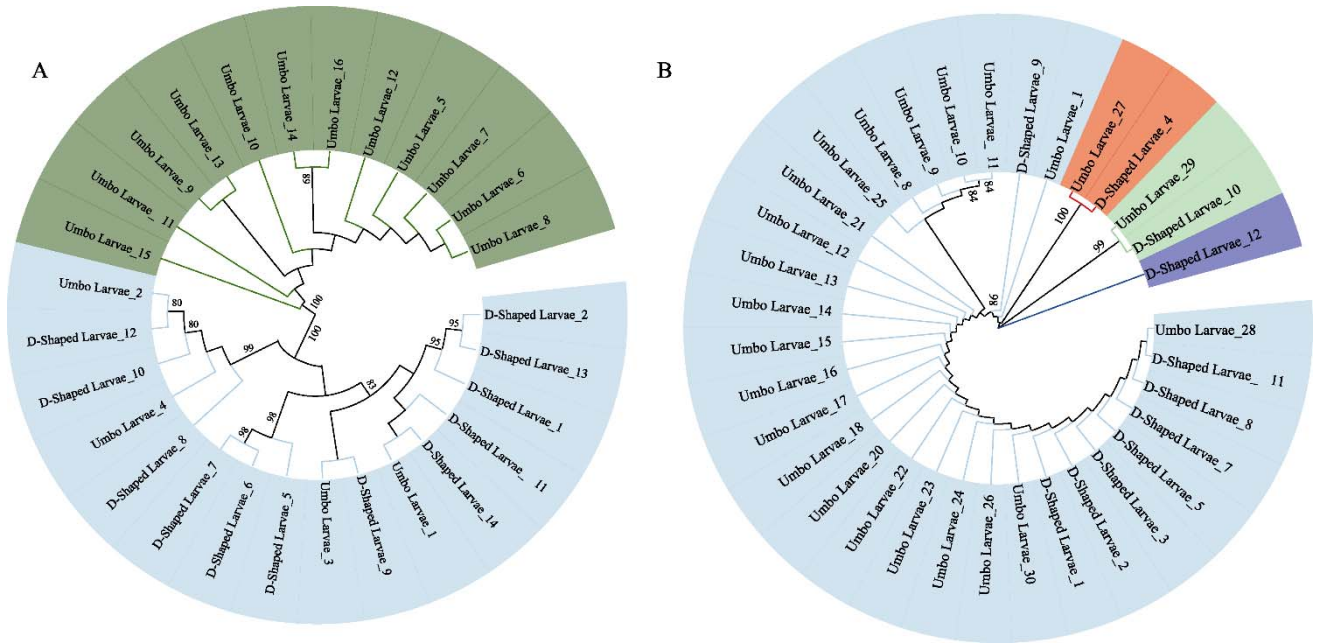


图 3 不同批次菲律宾蛤仔幼虫 Neighbor-Joining 图(A: 16SrRNA; B: COX1)
Fig.3 Neighbor-Joining tree of different batches of *R. philippinarum* (A: 16SrRNA; B: COX1)

鉴别，置信度为 98.2% (图 4B)。表明本方法提取的幼虫能够应用于贝类物种的精准鉴定。

对山东与广东种群的杂交 F_1 代以及莱州群体的自繁后代的壳顶幼虫进行单倍型分析，结果显示，COX1 单倍型共有 14 种 (图 5A)，它们之间的遗传距离为 0.001 2~0.006 2。其中，单倍型 H-3 的个体最多，共有 5 个个体；其次是单倍型 H-1、H-2、H-5 和 H-6，

分别来自 3 个个体，单倍型多样性为 0.937，单倍型多样性水平较高。16SrRNA 共获得 13 种单倍型，各单倍型之间的遗传距离为 0.001 2~0.031 1，以单倍型 H-5 为中心聚集在一起，呈辐射发散状 (图 5B)。其中，含有单倍型 H-5 的个体最多，共有 18 个个体，成为优势单倍型；其次，单倍型 H-2、H-8 和 H-9 分别来自 2 个个体，单倍型多样性为 0.705。

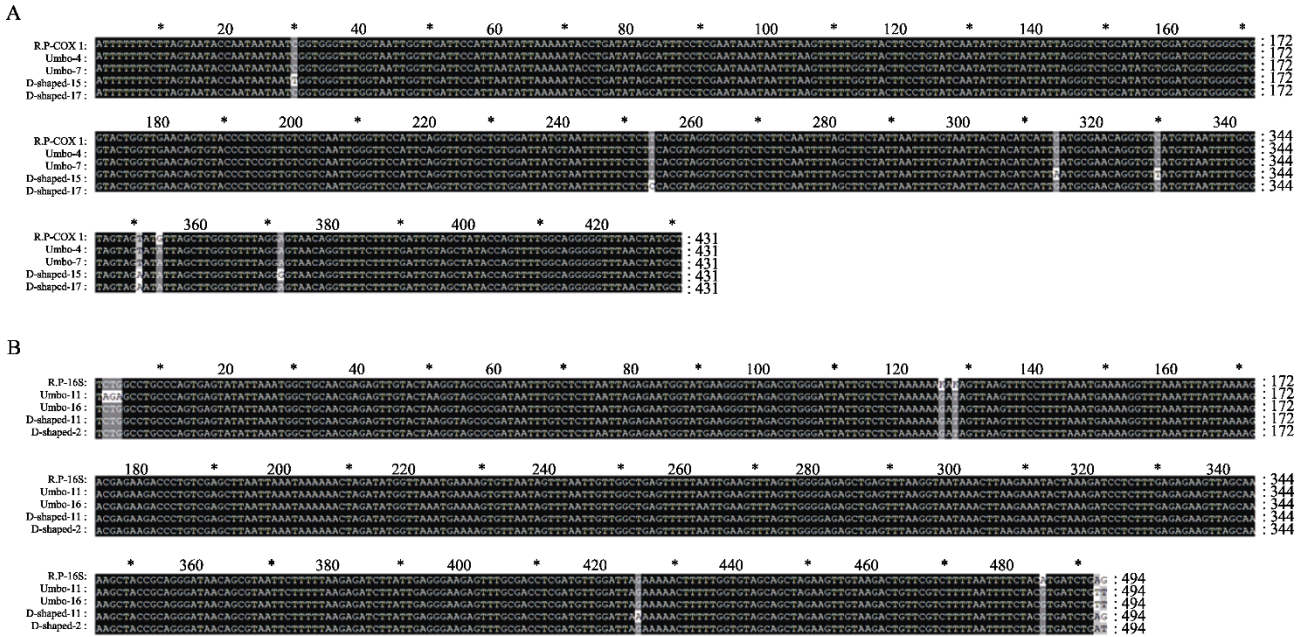


图 4 菲律宾蛤仔样品序列与 NCBI 数据库比对结果
Fig.4 Alignments of COX1 and 16SrRNA sequencing results with NCBI database

A: COX1 序列比对; B: 16SrRNA 序列比对
A: Sequence alignment of COX1; B: Sequence alignment of 16SrRNA

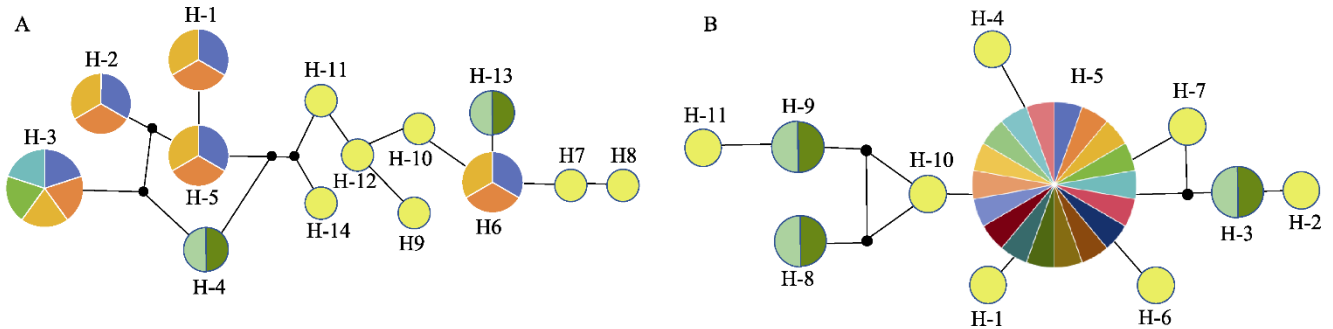


图 5 基于 COX1 和 16SrRNA 序列构建的壳顶幼虫单倍型
Fig.5 Haplotype map for the shell-capped larvae based on COX1 and 16SrRNA sequences

A: 基于 COX1 的单倍型; B: 基于 16SrRNA 的单倍型
每个圆形图案代表一种独特的单倍型, 图案中的颜色表示同一单倍型中的不同个体。
A: Haplotype network for COX1; B: Haplotype network for 16SrRNA.
Each circular motif stands for a unique haplotype, with the colors within the motifs indicating different individuals of the same haplotype.

3 讨论

建立贝类早期幼虫的 DNA 高效提取及遗传鉴定方法, 对于理解海洋贝类浮游幼虫的分布和扩散、种群动态分布特征、物种多样性形成、人工苗种质量筛查和遗传鉴定等方面具有十分重要的理论价值和应用前景。

在对贝类遗传学研究过程中, 目前大多数 DNA 提取均通过采集贝类成体的鳃、外套膜、贝壳等组织,

采用传统 DNA 提取方法获得。传统方法提取贝类 DNA 主要包括十六烷基三甲基溴化铵法(CATB)、十二烷基硫酸钠法(SDS)、胍裂解缓冲液法(GLB)等有机溶剂萃取法(李联泰等, 2005)。本研究提出的方法无需大量有机溶剂和复杂的过程进行萃取, 相对于传统方法更加便捷, 且无需大量的组织样品, 仅需要 200~300 μm 大小的幼虫。传统的 DNA 提取方法可能会对样品造成不同程度的损伤。例如, 在采集长牡蛎(*Crassostrea gigas*)组织时, 使用 MgSO_4 麻醉后取少

量的外套膜组织,虽然获取了完整 DNA,但导致牡蛎的死亡率增加(Wang *et al.*, 2011)。另外,采集软体部以外的组织可减少对贝类的损害,例如,采用有机溶剂萃取法提取珍珠贝(*Pteria penguin*)边缘和足丝的 DNA,浓度较高,但 $A_{260/280}$ 值偏低(陈一等, 2023)。本研究首次从体型微小的菲律宾蛤仔幼虫体内提取单独个体的 DNA,其浓度和纯度可满足后续 PCR 和遗传鉴定的实验需求。

在长牡蛎 DNA 提取实验中,采用了有机溶剂萃取法(OSE)及胍裂解缓冲液法(GLB)对其腹部外缘贝壳进行 DNA 提取,获得的 DNA 产物 $A_{260/280}$ 值分别为 1.320 和 0.970 (Jiang *et al.*, 2019)。在本研究中,幼虫提取 DNA 产物 $A_{260/280}$ 为 1.16 ± 0.08 ,可能是因为提取过程中存在蛋白质和盐分等污染的情况,这与之前的研究结果一致(陈一等, 2023)。此外,研究者开发了一种提取单个鱼卵仔鱼微量总 DNA 的简便快速方法,此方法可对单个鱼卵和仔鱼的 DNA 进行提取(尤锋等, 2011)。尽管如此,相比鱼卵而言,贝类幼虫个体小得多,一般在 $200 \sim 300 \mu\text{m}$ 左右,单个个体所含有的 DNA 量极少,无法通过传统方法提取 DNA。另外,采用环境 DNA (eDNA)技术也可以提取贝类幼虫 DNA,但所提取的 DNA 为混合个体 DNA,无法直接分离出单个幼虫的 DNA,需要使用算法进行分类,较为复杂(徐梦珍等, 2023)。本研究建立的菲律宾蛤仔幼虫 DNA 提取方法,能够通过简单、快捷的步骤获得单个幼虫的高质量 DNA 产物,可以直接作为后续分子生物学和幼虫生态学研究的实验材料。

基于条形码的物种鉴定和单倍型分析不仅有助于理解贝类的遗传结构和进化历史,还对贝类的遗传育种和幼虫生态学具有重要的指导意义(陈军等, 2010; 李双双等, 2018; Johnson *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2023; 吴宙等, 2024)。在本研究中,基于 COX1 和 16SrRNA 可以实现对不同批次菲律宾蛤仔幼虫的遗传鉴定,但 COX1 的鉴别能力略高于 16SrRNA。本研究基于 NCBI 数据库比对分析,16SrRNA 扩增产物序列比对率为 98.2%,COX1 产物序列比对率为 98.4%,表明基于幼虫 DNA 获得的 16SrRNA 与 COX1 片段都具有较高的遗传鉴定能力。此外,COX1 可将本研究的 2 个不同遗传背景的幼虫有效区分,其中 COX1 的 H-5 单倍型形成了置信度很高的单系群,但 16SrRNA 对不同遗传背景的幼虫的区分能力有限。单倍型多样性是研究群体遗传分化的重要指数,能够客观反映群体遗传多样性,单倍型多样性指数越高,表明遗传多样性越丰富(Saitou N *et al.*, 1987; Avise *et al.*, 2000)。根据本研究的单倍型结果,COX1 和

16SrRNA 分别获得 14 种和 13 种单倍型,单倍型多样性分别为 0.937 和 0.705,反映了幼虫单倍型多样性处于较高的水平。杂交群体遗传多样性高于莱州自繁群体,可能是由于杂交群体的杂合度较高导致(高祥刚等, 2008)。

综上所述,本研究建立了一种快速、高效的单个幼虫基因组 DNA 提取方法,可从几百微米大小的贝类幼虫中提取高质量的基因组 DNA,经超微量紫外可见分光光度仪检测、琼脂糖凝胶电泳分离和 DNA 序列比对,获得质量较好的幼虫基因组 DNA,并能成功开展幼虫的遗传学鉴定和单倍型分析,不仅为人工苗种生产过程中的苗种批次鉴定、亲本来源追溯、遗传学评价提供了简单有效的幼虫 DNA 提取方法,而且对于解析贝类幼虫在海洋环境中的分布、动态变化及幼虫与环境的相互作用,具有重要的指导意义和应用价值,在贝类遗传育种学和幼虫生态学领域具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- AVISE J C. Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, 2000
- CHEN J, LI Q, KONG L F, *et al.* COI-based DNA barcoding in Tapetinae species (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) along the coast of China. *Zoological Research*, 2010, 31(4): 345–352 [陈军, 李琪, 孔令锋, 等. 基于 COI 序列的 DNA 条形码在中国沿海缢锦蛤亚科贝类中的应用分析. *动物学研究*, 2010, 31(4): 345–352]
- CHEN Y, LIU E T, ZHAN X, *et al.* Nonlethal DNA extraction methods for *Pteria penguin*. *Marine Sciences*, 2023, 47(2): 55–62 [陈一, 刘二田, 战欣, 等. 企鵝珍珠贝非致死性 DNA 提取方法的研究. *海洋科学*, 2023, 47(2): 55–62]
- COWEN R K, SPONAUGLE S. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, 2009, 1: 443–466
- DENG Z H, LIN X X, CHEN M Q, *et al.* Morphological and organ changes, movement and feeding observation in the metamorphosis of the larvae of *Pinctada fucata*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(5): 1072–1080 [邓正华, 林先鑫, 陈明强, 等. 合浦珠母贝幼虫变态中的形态、器官变化及运动与摄食观察. *水生生物学报*, 2019, 43(5): 1072–1080]
- DU M R, FANG J G, MAO Y Z, *et al.* Effect of benthic diatom filmed substrate on settlement and metamorphosis of scallop. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(1): 125–131 [杜美荣, 方建光, 毛玉泽, 等. 底栖硅藻生物膜附着基对扇贝幼虫附着和变态的影响. *海洋与湖泊*, 2020, 51(1): 125–131]

- FANG J F, LI Q. Estimation of genetic parameters for growth traits of larvae and juveniles of the orange-shell strain of Pacific oyster. *Periodical of Ocean University of China*, 2020, 50(11): 38–44 [方佳峰, 李琪. 长牡蛎壳橙品系幼虫和稚贝的生长性状遗传参数评估. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(11): 38–44]
- GAO X G, GE L L, LIU W D, *et al.* AFLP analysis of cultured and wild populations of abalone. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 24(S1): 324–330 [高祥刚, 葛陇利, 刘卫东, 等. 皱纹盘鲍野生与养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析. *生物技术通报*, 2008, 24(S1): 324–330]
- HU L S, ZHANG Z, MA P Z, *et al.* The genetic diversity of ten wild populations of *Ruditapes philippinarum*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(3): 549–556 [胡利莎, 张振, 马培振, 等. 10 个菲律宾蛤仔野生群体的遗传多样性研究. *海洋与湖沼*, 2016, 47(3): 549–556]
- HUAN P, LIU B Z. The gastropod *Lottia peitaihoensis* as a model to study the body patterning of trochophore larvae. *Evolution & Development*, 2024, 26(4): e12456
- JABLONSKI D, LUTZ R A. Larval ecology of marine benthic invertebrates: Paleobiological implications. *Biological Reviews*, 1983, 58(1): 21–89
- JIANG Q Y, WEI L, GAI C W, *et al.* An improved extraction method reveals varied DNA content in different parts of the shells of Pacific oysters. *Aquatic Living Resources*, 2019, 32: 5
- JOHNSON M P, ALLCOCK A L, PYE S E, *et al.* The effects of dispersal mode on the spatial distribution patterns of intertidal molluscs. *Journal of Animal Ecology*, 2001, 70(4): 641–649
- LI H H, YU R H, YANG Z P, *et al.* Effects of temperature and salinity on hatching, early larval growth and survival of pen shell *Atrina pectinata*. *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(4): 22–27 [李浩浩, 于瑞海, 杨智鹏, 等. 温度和盐度对栉江珧受精卵孵化及早期幼虫生长与存活的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2017, 47(4): 22–27]
- LI L T, AN X H. Methods for DNA extraction from shellfishes. *Journal of Huaihai Institute of Technology*, 2005, 14(4): 66–69 [李联泰, 安贤惠. 几种海水经济贝类 DNA 提取方法探讨. *淮海工学院学报(自然科学版)*, 2005, 14(4): 66–69]
- LI S S, ZHANG Y X, FAN C M, *et al.* Advances in haplotype analysis technique. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(6): 852–861 [李双双, 张迎新, 范成明, 等. 单倍型分析技术研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(6): 852–861]
- LIU Y, YU R H, ZHANG Z, *et al.* Effects of different pH on embryo development and larval growth of bay scallop (*Argopecten irradians*). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 108–114 [刘洋, 于瑞海, 张哲, 等. 不同 pH 对海湾扇贝胚胎发育及幼虫生长发育的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 108–114]
- NASCIMENTO-SCHULZE J C, BEAN T P, HOUSTON R D, *et al.* Optimizing hatchery practices for genetic improvement of marine bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(4): 2289–2304
- NING J H, PANG Y L, SONG J, *et al.* Development of embryo and larva of *Modiolus modiolus* and effects of temperature on growth and development of the pelagic larva. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(2): 196–203 [宁军号, 庞云龙, 宋坚, 等. 偏顶蛤胚胎和幼虫发育及温度对其浮游幼虫生长和发育的影响. *中国水产科学*, 2015, 22(2): 196–203]
- PIGGOTT M P, BANKS S C, TUNG P, *et al.* Genetic evidence for different scales of connectivity in a marine mollusc. *Marine Ecology Progress Series*, 2008, 365: 127–136
- QI H G, CONG R H, WANG Y J, *et al.* Construction and analysis of the chromosome-level haplotype-resolved genomes of two *Crassostrea* oyster congeners: *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*. *GigaScience*, 2022, 12: giad077
- SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425
- SUN X J, ZHENG Y X, YU T, *et al.* Developmental dynamics of myogenesis in yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 228: 51–60
- TAN Y, QIU M, LI J L, *et al.* Genetic diversity analysis of wild populations of Manila clam *Ruditapes philippinarum* from China, Japan and Democratic People's Republic of Korea based on mitochondrial 16SrRNA gene sequence. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(1): 127–134 [谭月, 邱明, 李金龙, 等. 基于线粒体 16SrRNA 基因序列的中日朝菲律宾蛤仔野生群体遗传多样性分析. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(1): 127–134]
- WANG G D, CHANG Y Q, FU Q, *et al.* Studies on settlement substrata and poly-layer spatfall technics of three species of clams. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2003, 18(2): 104–108 [王国栋, 常亚青, 付强, 等. 3 种滩涂贝类稚贝附着基和多层附苗技术的初步研究. *大连水产学院学报*, 2003, 18(2): 104–108]
- WANG L, LI Q, KONG L F, *et al.* Population genetic structure and demographic history of *Barbatia virescens* along Chinese coast based on mitochondrial COI sequences. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 87–95 [王玲, 李琪, 孔令锋, 等. 基于 COI 基因的中国沿海青蚶野生群体遗传结构及种群动态研究. *海洋与湖沼*, 2018, 49(1): 87–95]
- WANG S L, SUN X J, TU K, *et al.* Genetic parameter evaluation and growth model construction of early growth traits of *Ruditapes philippinarum*. *Periodical of Ocean*

- University of China, 2023, 53(9): 69–76 [王松林, 孙秀俊, 涂康, 等. 菲律宾蛤仔早期生长性状的遗传参数评估及生长模型构建. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2023, 53(9): 69–76]
- WANG T, LI Q. The induction of metamorphosis in Iwagaki oyster (*Crassostrea nippona*). Journal of Fisheries of China, 2018, 42(11): 1729–1736 [王涛, 李琪. 肾上腺素对岩牡蛎幼虫变态的诱导. 水产学报, 2018, 42(11): 1729–1736]
- WANG T, ZHENG J H, HU M H, *et al.* Advances in studies on the physiological and ecological effects of ocean acidification on shellfish. Marine Sciences, 2022, 46(1): 192–202 [王婷, 郑佳慧, 胡梦红, 等. 海洋酸化对贝类的生理生态学影响研究进展. 海洋科学, 2022, 46(1): 192–202]
- WANG X T, LI L, XU F, *et al.* Genomic DNA extraction from *in vivo* sampled tissue of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 2011, 63: S28–S33
- WEI D, ZHENG S C, WANG S L, *et al.* Genetic and haplotype diversity of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in different regions of China based on three molecular markers. Animals, 2023, 13(18): 2886
- WU L, LI L, ZHOU L Q, *et al.* Phalloidin fluorescence and confocal microscopy reveal the musculature development of clam *Ruditapes philippinarum*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 258: 110693
- WU Z, ZHOU L Q, CHI C F, *et al.* Effects of southern culture pattern on population genetic structure of *Haliotis discus hannai* based on mitochondrial CO I and Cytb gene sequences. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(1): 112–122 [吴宙, 周丽青, 迟长风, 等. 基于线粒体 CO I 和 Cytb 基因探讨北鲍南养对皱纹盘鲍群体遗传结构的影响. 水产学报, 2024, 48(1): 112–122]
- XIE H L, LI W, GUO Y Q, *et al.* Long-read-based single sperm genome sequencing for chromosome-wide haplotype phasing of both SNPs and SVs. Nucleic Acids Research, 2023, 51(15): 8020–8034
- XU M Z, YANG Y, ZHANG J H, *et al.* Challenges in invasive mussel monitoring using environmental DNA technology. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(11): 4423–4433 [徐梦珍, 杨瑶, 张家豪, 等. 环境 DNA 技术在贻贝入侵监测中的应用挑战. 生态学报, 2023, 43(11): 4423–4433]
- YOU F, WU Z, WANG W, *et al.* A convenient and rapid method for extracting trace total DNA from individual fish eggs and larvae. 2011 [尤锋, 吴志昊, 王伟, 等. 一种提取单个鱼卵仔鱼微量总 DNA 的简便快速方法. 2011]
- YU H, LIU X, LI Q. Application advances and prospects of genome editing in molluscs. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(4): 636–643 [于红, 刘欣, 李琪. 基因编辑技术在贝类中的应用进展与展望. 水产学报, 2022, 46(4): 636–643]
- ZHANG F M, LIAN S S, LIU S N, *et al.* Efficient extraction of bivalve mollusks shell DNA and its methodological evaluation. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(S1): 41–47 [张凤梅, 连姗姗, 刘思诺, 等. 双壳类软体动物贝壳 DNA 高效提取及方法学评价. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(S1): 41–47]
- ZHAO Q, WU B, LIU Z H, *et al.* Analysis of evolutionary relationships of important shellfish in China based on the DNA barcoding COI gene. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 847–857 [赵庆, 吴彪, 刘志鸿, 等. 利用 DNA 条形码 COI 基因分析我国重要贝类系统进化关系. 中国水产科学, 2018, 25(4): 847–857]
- ZHENG S C, ZHANG T S, TU K, *et al.* Population genetics of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in China inferred from microsatellite markers. Biology, 2023, 12(4): 557

(编辑 冯小花)

An efficient DNA Extraction Method from *Ruditapes philippinarum* larvae and Its Application in Genetic Analysis

ZHANG Lei^{1,2,3}, XU Xinghong¹, LIU Zhihong^{2,3}, WU Biao^{2,3}, ZHOU Liqing^{2,3},
LI Zhuanzhuan^{2,3}, MA Peizhen^{2,3}, SUN Xiujun^{2,3}^①

(1. Marine Science and Fisheries College, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food
Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China)

Abstract *Ruditapes philippinarum*—a marine bivalve mollusc known for its adaptability across a range of temperatures, salinities, and habitats—thrives primarily in tidal flats and shallow marine areas. It is an ideal candidate for high-density cultivation in tidal flats, making it one of the four major cultivated shellfish in China. Genetic exchanges are prevalent among populations in adjacent marine areas, and artificial translocation and cultivation of this species in China have affected the genetic resources of local wild populations, notably altering the genetic structure and ecological balance of these groups. Thus, there is an urgent need for an effective genetic identification method to assess their genetic diversity and germplasm resource status. Efficient extraction of larval DNA is essential for genetic research on shellfish; however, methods for extracting and identifying trace amounts of DNA have not been widely reported. This study addresses these limitations by establishing an efficient method suitable for individual larvae of the marine shellfish, *R. philippinarum*, and other bivalve mollusks. This method can extract high-quality genomic DNA from larvae as small as a few hundred micrometers, with the aim of providing an accurate and efficient DNA extraction method for species identification and genetic analysis of marine shellfish larvae.

Here, D-shaped and umbo larvae were selected for DNA extraction. A rapid and efficient method for extracting genomic DNA from a single larva was developed and successfully applied for genetic identification and haplotype analysis. This method involved the use of physical and chemical means to disrupt the cell structure, and release and collect DNA through thermal denaturation and rapid cooling. A single larva was transferred to a PCR tube containing 10 μ L of PCR buffer, followed by heating at 100 $^{\circ}$ C for 5 min and quick transfer to an ice bath. After adding protease K (0.5 μ L) for digestion at 55 $^{\circ}$ C for 60 min, the tube was heated again at 100 $^{\circ}$ C for 10 min and then centrifuged at 4 $^{\circ}$ C to collect the DNA. The larval DNA quality was evaluated using a NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer, agarose gel electrophoresis, and DNA sequencing.

The results demonstrated that PCR products amplified by 16SrRNA and COX1 showed a single clear band of target products, corroborated by their precise sequences. This suggests that the extracted larval DNA can be effectively used for genetic identification and haplotype analysis using these markers. Haplotype analysis revealed 14 COX1 haplotypes with a diversity of 0.937, and 13 haplotypes detected by 16SrRNA with a diversity of 0.705. These findings indicate that the PCR buffer DNA extraction method can yield high-quality genomic DNA from larvae several hundred micrometers in size. This method offers an accurate, efficient, and reliable approach for species identification and genetic analysis of shellfish larvae, with broad potential applications in genetic research and molecular breeding.

Key words Genomic DNA; D-shaped larvae; Genetic analysis; COX1; 16SrRNA; *Ruditapes philippinarum*

① Corresponding author: SUN Xiujun, Email: xjsun@ysfri.ac.cn