

不同 16S rDNA 靶序列 PCR - DGGE 分析油页岩细菌多样性

蒋绍妍¹, 王文星^{1,2}, 薛向欣¹, 杨寿浩²

(1. 东北大学 材料与冶金学院, 辽宁 沈阳 110819; 2. 东北大学 生命科学与健康学院, 辽宁 沈阳 110819)

摘 要: 为全面了解油页岩细菌群落组成结构,同时筛选出适于油页岩 PCR - DGGE 的最佳引物,采用改进 SDS 高盐提取法,提取抚顺西露天矿油页岩微生物总 DNA,并用 968F/1401R, 338F/518R, 341F/907R 和 1055F/1406R,对 16S rDNA V6 - V8, V3, V8 和 V9 区进行 PCR - DGGE 分析. 结果表明,4 组引物均能较好扩增出目的基因,但不同靶序列对多样性检出有显著影响($P < 0.001$);与其他引物相比,968F/1401R 和 338F/518R 获得的指纹图谱物种丰富度更高,检出细菌类群更丰富,较适合油页岩样品. 油页岩细菌群落组成较简单,优势细菌包括不动杆菌属、假单胞菌属和埃希氏菌属,同时还有假单胞菌目和肠杆菌目尚未被鉴定的一些种类.

关 键 词: 油页岩; 16S rDNA; PCR - DGGE; 细菌多样性; 靶序列

中图分类号: TP 274

文献标志码: A

文章编号: 1005 - 3026(2014)07 - 1033 - 06

Analysis of Bacterial Diversity in Oil Shale by PCR-DGGE with Different 16S rDNA Target Sequences

JIANG Shao-yan¹, WANG Wen-xing^{1,2}, XUE Xiang-xin¹, YANG Shou-hao²

(1. School of Materials & Metallurgy, Northeastern University, Shenyang 110819, China; 2. School of Life & Health Sciences, Northeastern University, Shenyang 110819, China. Corresponding author: XUE Xiang-xin, E-mail: xuexx@mail.neu.edu.cn)

Abstract: For a comprehensive understanding of bacterial community structure of the oil shale from Fushun west open-pit mine in China and screening out best prime for PCR-DGGE analysis of oil shale, an improved SDS-high-salt extraction method was used to extract microbial total DNA from the oil shale. Four-set primers (968F/1401R, 338F/518R, 341F/907R and 1055F/1406R) of 16S rDNA high variable target regions, V6-V8, V3, V8, V9, were compared to obtain the optimal target sequences suitable for PCR-DGGE. The results from PCR-DGGE patterns showed that four-set primers can amplify the target sequences, but different target sequences of primers have a significant effect on the detection of the bacterial diversity ($P < 0.001$). Compared with the other primers, 968F/1401R and 338F/518R are more suitable for the bacterial diversity analysis of oil shale samples due to higher finger-print species richness and abundant bacteria group obtained from their PCR-DGGE. The community structure of bacteria in oil shale is not much rich. *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Escherichia* are the dominant bacterial communities, as well as some unidentified bacterium which belong to Pseudomonadales and Enterobacteriales.

Key words: oil shale; 16S rDNA; PCR-DGGE; bacterial diversity; target sequences

油页岩是一种具有微细层理、可以燃烧的细粒沉积岩. 微生物转化技术在油页岩领域的研究尚属起步阶段^[1-2], 为了加快这一技术的应用步伐, 对微生物多样性的研究是一个基础性前提. 沉

积岩有许多特殊性质对微生物的生长代谢不利, 而本源微生物在长期进化中具备了代谢复杂古代有机质的能力, 国外相继有关于天然沥青^[3]、原油^[4]和黑页岩^[5]本源微生物的报道. 变性梯度凝

胶电泳是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术. 2001 年 Watanabe 等报道,不同 16S rDNA 靶序列 PCR - DGGE 对反映群落微生物的多样性有明显影响^[6],即引物序列的差异可产生相似却存在差异的条带图谱^[7],因此,对于不同样品通常需要进行优化选择.本研究以抚顺油页岩(西露天组)为研究对象,选用不同的通用引物对微生物总 DNA 进行 PCR - DGGE,旨在了解我国油页岩生态环境中细菌群落的遗传多样性和菌属组成结构,以及筛选出适合油页岩样品 PCR - DGGE 的最佳引物.

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

油页岩样品于 2011 年 6 月采自抚顺西露天矿(123°57′ E,41°50′ N,海拔 75.9 m).采样时徒手(佩戴无菌手套)去除表面沉积岩,选择深褐色油页岩碎块,并且避开聚集在局部的黑色页岩,无菌锤就地粉碎并充分混匀后过 4 mm 无菌筛.每样品按五点法采集,重复 3 次,四分法取适量放于 50 mL 无菌离心管,与冰袋一起装入保温盒带回实验室,采用改进 SDS 高盐提取法提取微生物总 DNA^[8].

1.2 不同 16S rDNA 靶序列的 PCR - DGGE

采用 968F/1401R,338F/518R,341F/907R 和 1055F/1406R 共 4 组引物分别对 16S rDNA 进行 PCR 扩增.扩增时总体系均为 25 μ L,其中 DNA 模板 40 ~ 50 ng,上下游引物浓度均为 10 μ mol \cdot L⁻¹,并用无菌去离子水补足体系;使用 Bio - Rad 公司的 Dcode System 电泳仪对 PCR 产物进行水平 DGGE,上样量 1 500 ng,1 \times TAE 电泳体系,8% 聚丙烯凝胶,并用 1:10 000 sybre green 染胶 30 min;使用 TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit 进行 PCR 产物回收纯化;使用 Bioteke 公司的通用型 pUM - T 快速克隆试剂盒进行连接转化,感受态细胞为 DH5 α Chemically Competent Cell (Bioteke).采用 Bio - Rad Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行分析.引物合成和测序由上海生物工程技术有限公司完成,序列与 GenBank 和 EzTaxon 数据库比对,并用 Clustal X 和 MEGA 4 以邻位连接 (Neighbour - Joining) 算法和 p - distance 模型构建系统发育树.

以 968F (GC):5′ - (CGCCCGCCGCGCC - CCGCGCCCGGCCCGCCGCCCC) AACGCG -

AAGAACCTTAC - 3′和 1401R:5′ - GCGTGT - AGTACAAGACCC - 3′为引物,扩增 440 bp 左右的 16S rDNA V6 - V8 区. PCR 体系: Mix (Bioteke) 12 μ L,引物各 1.5 μ L; PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min,57 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min. DGGE 变形范围为 38% ~ 55%, 60 $^{\circ}$ C 80 V 电泳 12 h 30 min.

以 338F (GC):5′ - (CGCCCGCCGCG - CGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG) CCTACGGGAGGCAGCAG - 3′和 518R:5′ - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3′为引物,扩增 200 bp 左右的 16S rDNA V3 区. PCR 体系: Mix 8 μ L,引物各 1 μ L; PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min. DGGE 变形范围为 30% ~ 60%, 60 $^{\circ}$ C 150 V 电泳 6 h.

以 341F (GC):5′ - (CGCCCGCCGCGC - CCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCC) C - CTACGGGAGGCAGCAG - 3′和 907R:5′ - CC - GTCAATTCCTTTGAGTTT - 3′为引物,扩增 630 bp左右的 16S rDNA V8 区. PCR 体系: Mix 8.5 μ L,引物各 0.7 μ L; PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min. DGGE 变形范围为 30% ~ 60%, 60 $^{\circ}$ C 150 V 电泳 6 h 40 min.

以 1055F:5′ - ATGGCTGTCGTCAGCT - 3′和 1406R (GC):5′ - (CGCCCGCCGCGCC - CCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCC) AC - GGGCGGTGTGTAC - 3′为引物,扩增 400 bp 左右的 16S rDNA V9 区. PCR 体系: Mix 7 μ L,引物各 1 μ L; PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min. DGGE 变形范围为 30% ~ 53%, 60 $^{\circ}$ C 150 V 电泳 6 h 40 min.

2 结果分析与讨论

2.1 总 DNA 及其 PCR 扩增

图 1 为微生物总 DNA 和各靶序列 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳,图中 1,2,3 为平行实验.由图 1 可知,微生物总 DNA 长度约 23 kb,较为完整;各靶序列的 PCR 产物条带均明亮单一,且与目的基因长度吻合,说明 4 组引物均较好地扩增出了目的基因.

2.2 各靶序列的 PCR - DGGE

4组引物968F/1401R,338F/518R,341F/

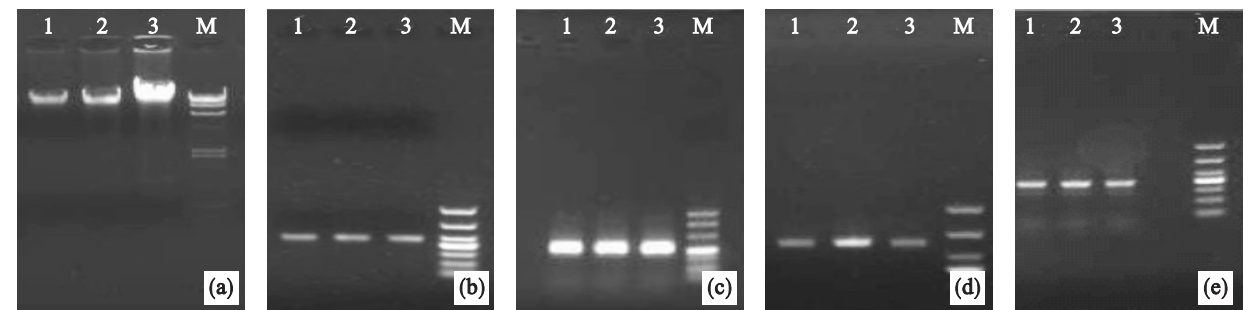


图 1 微生物总 DNA 和各靶序列 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoreses of total microbial DNA and PCR products of different target sequences

(a) —提取的微生物总 DNA, M - λ - Hind III digest DNA Marker; (b) —以 DNA 为模板扩增 16S rDNA V6 - V8 区, M - DL1000 DNA Marker; (c) —以 DNA 为模板扩增 16S rDNA V3 区, M - DL500 DNA Marker; (d) —以 DNA 为模板扩增 16S rDNA V8 区, M - DL1000 DNA Marker; (e) —以 DNA 为模板扩增 16S rDNA V9 区, M - DL1000 DNA Marker.

907R 和 1055F/1406R 的 PCR - DGGE 信号强度均较好,物种丰富度指数,即 DGGE 指纹图谱中分离得到条带数分别为 16,16,11 和 14(图 2). 每一个条带可能代表一种微生物,通常被看作一个 OTU(操作分类单元,operational taxonomic units). 使用引物 968F/1401R 得到的 16 个 OTU 分为三属(分离条带按图 2 由上至下顺序编号):V6 - 8 - 1 至 V6 - 8 - 12 为不动杆菌,V6 - 8 - 16 为假单胞菌,V6 - 8 - 13 至 V6 - 8 - 15 为未鉴定细菌;使用引物 338F/518R 得到的 16 个 OTU 同样分为三属:V3 - 15 及 V3 - 2 至 V3 - 7 为不动杆菌,V3 - 11 和 V3 - 16 为埃希氏菌,V3 - 1 及 V3 - 8 至 V3 - 10,V3 - 12 至 V3 - 14 为未鉴定细菌;使用引物 341F/907R 得到的 11 个 OTU 均为假单胞菌;使用引物 1055F/1406R 得到的 14 个 OTU 均为不动杆菌. 与 341F/907R 和 1055F/1406R 两组引物相比,利用 968F/1401R,338F/518R 得到的 DGGE 指纹图谱不仅条带数量更多,检出的细菌种类也更丰富,因而能够更全面地反应细菌群落的多样性;两者比较而言,338F/518R 的靶序列只有 200 bp 左右,而 968F/1401R 的靶序列为 440 bp 左右,后者系统发育分类信息相对更为丰富,但两者对菌属的分离检出上有差异,所以如果想获得全面的实验结果最好结合使用. 341F/907R 仅分离得到 11 个 OTU,这可能与该引物的靶序列较长有关,通常认为 DGGE 在分离片断大小为 200 ~ 500 bp 时效果较好;而 1055F/1406R 为引物进行 PCR 时,需要较高的退火温度,这可能是导致某些类群细菌被优先扩增的原因之一. 利用 SPSS18.0 软件,以 DGGE 分离得到的菌属为检验变量,以不同的靶序列为分组变量,经 Kruskal - Wallis H 检验表明:不同引物

的靶序列对该油页岩样品细菌多样性的检出有显著影响($P < 0.001$).

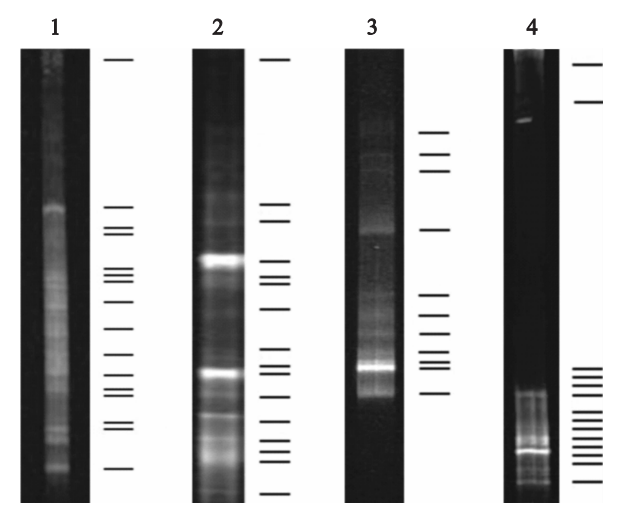
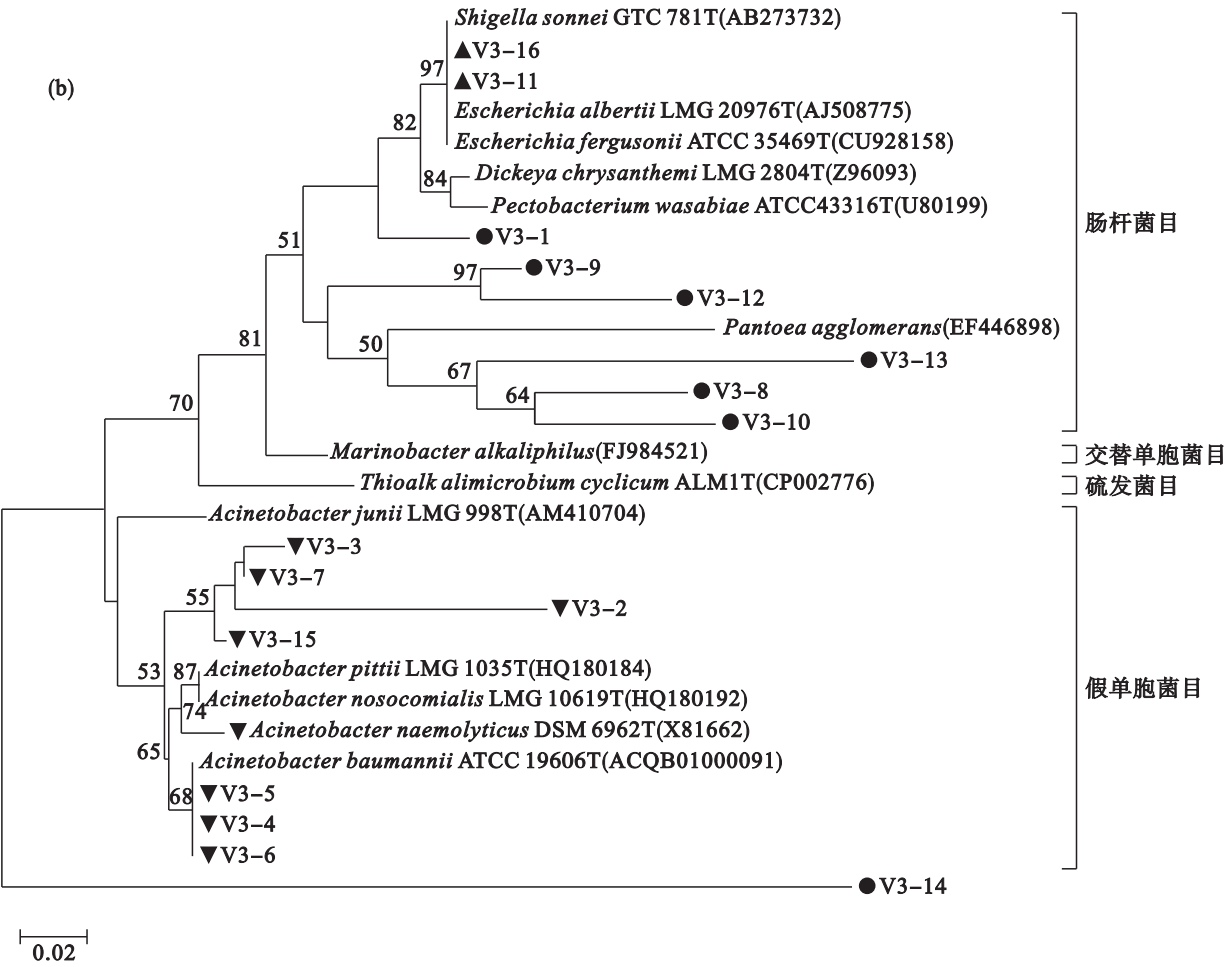
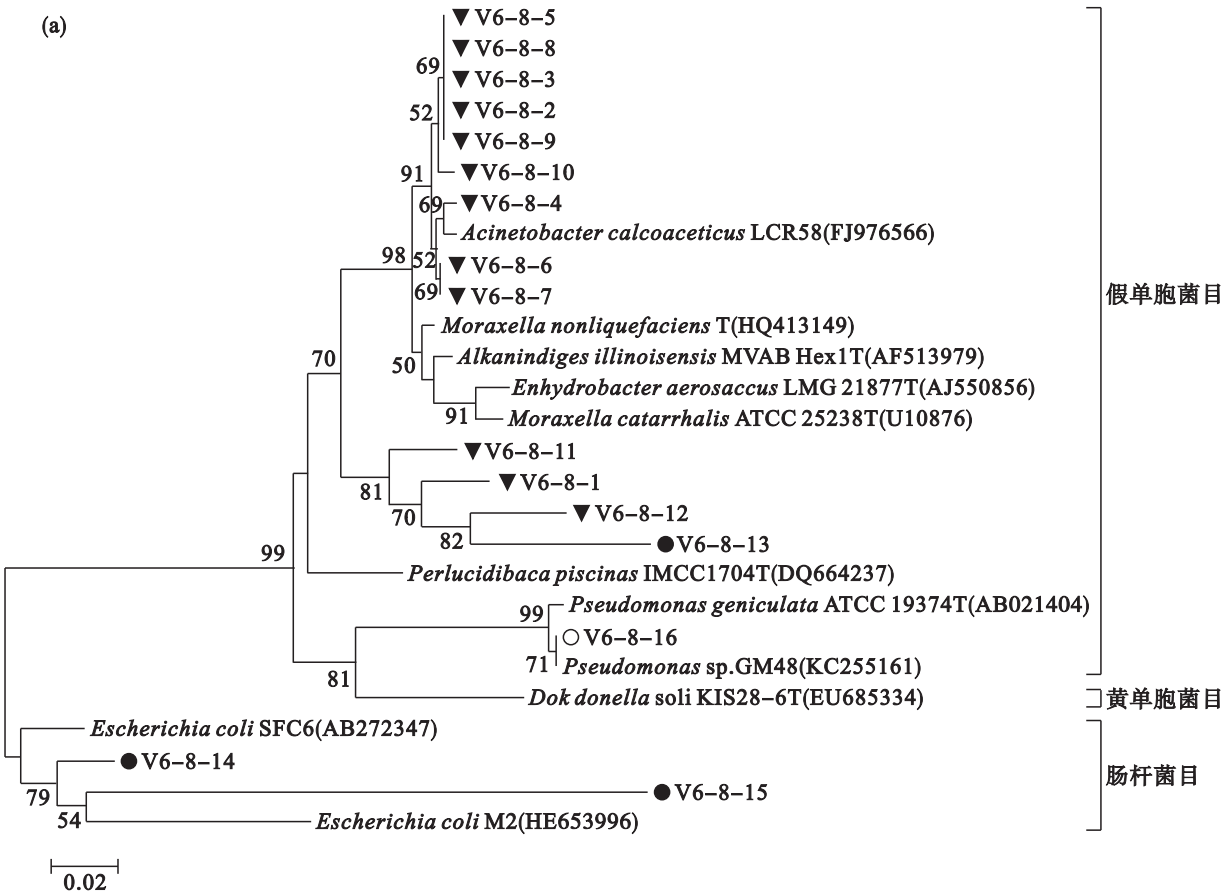


图 2 PCR - DGGE 指纹图谱

Fig. 2 DGGE fingerprint profile of PCR amplified products

1—以 16S rDNA V6 - V8 区为靶序列; 2—以 16S rDNA V3 区为靶序列; 3—以 16S rDNA V8 区为靶序列; 4—以 16S rDNA V9 区为靶序列.

系统发育树用来表征 DGGE 图谱中分离菌株与基因数据库中近似菌株的遗传进化关系. 如图 3 所示,未鉴定细菌 V6 - 8 - 13 与假单胞菌目细菌同源关系较近,而 V6 - 8 - 14,V6 - 8 - 15 以及 V3 - 1,V3 - 8 至 V3 - 10,V3 - 12,V3 - 13 与肠杆菌目细菌同源关系较近;V3 - 14 则与其他分离菌株均不在同一支上,说明它与其他菌株的基因序列相似度较低,在进化较早期便与其他菌株产生了差异. 本研究表明不动杆菌属、假单胞菌属和埃希氏菌属细菌是抚顺油页岩的优势细菌类群,其均为 γ - 变形菌,未鉴定细菌则主要为假单胞菌目和肠杆菌目的种类,群落多样性较为单一.



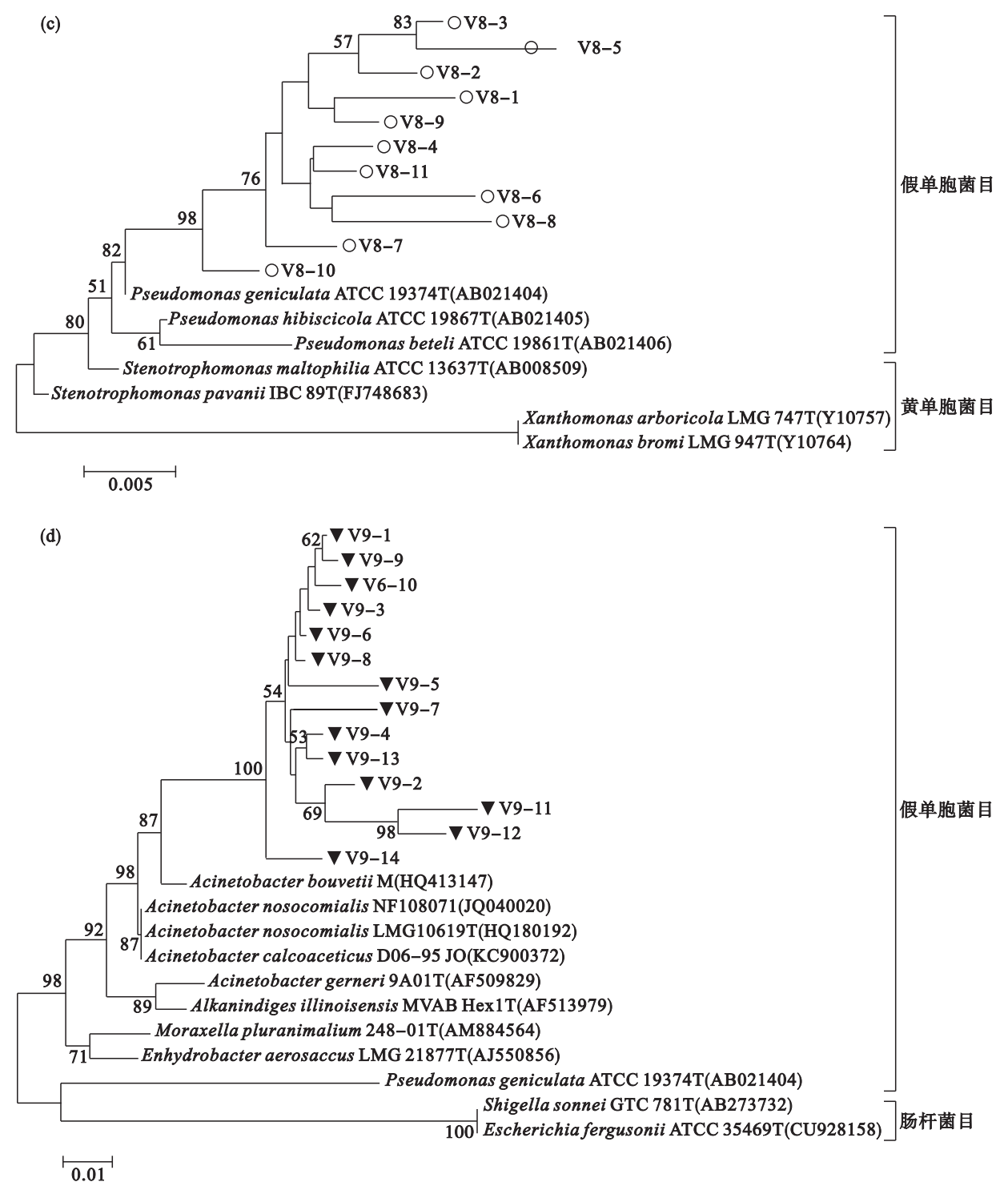


图 3 根据 16S rDNA 构建的系统发育树
Fig. 3 The phylogenetic tree based on 16S rDNA
(a) —以 V6 - V8 区为靶序列；(b) —以 V3 区为靶序列；(c) —以 V8 区为靶序列；(d) —以 V9 区为靶序列。
标注 ▲, ▼, ○ 条带分别为埃希氏菌属、不动杆菌属和假单胞菌属 (与 NCBI 和 EzTaxon 数据库中近似菌株的 Pairwise Similarity > 94%) ; 标注 ● 为未鉴定细菌。

3 结 论

1) 不动杆菌属、假单胞菌属和埃希氏菌属是抚顺西露天矿油页岩的优势细菌类群,其均为 γ - 变形菌,未鉴定细菌则主要为假单胞菌目和

肠杆菌目细菌,群落细菌组成较简单,多样性较单一。
2) 四组通用引物 968F/1401R, 338F/518R, 341F/907R 和 1055F/1406R 均能较好地扩增出 16S rDNA 目的基因,但不同靶序列对油页岩细菌多样性的检出有显著影响 ($P < 0.001$)。

3) 利用 968F/1401R 和 338F/518R 进行 PCR – DGGE,物种丰富度指数较高,检出的细菌种类更丰富,较适合油页岩样品的微生物多样性研究;利用 341F/907R 和 1055F/1406R 得到的 DGGE 指纹图谱物种丰富度指数较低,检出的细菌种类较少,不适合油页岩样品.

参考文献:

[1] Bekoski V P, Mili J, Mandi B, *et al.* Removal of organically bound sulfur from oil shale by iron (III)-ion generated-regenerated from pyrite by the action of *Acidithiobacillus ferrooxidans*—research on a model system [J]. *Hydrometallurgy*, 2008, 94 (1/2/3/4) : 8 – 13.

[2] Haddadin M S Y, Arqoub A A A, Reesh I A, *et al.* Kinetics of hydrocarbon extraction from oil shale using biosurfactant producing bacteria[J]. *Energy Conversion and Management*, 2009, 50 (4) : 983 – 990.

[3] Kim J S, Crowley D E. Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar Pits [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (14) : 4579 – 4591.

[4] Permanyer A, Gallego J L R, Caja M A, *et al.* Crude oil

biodegradation and environmental factors at the Riutort oil shale mine, Se Pyrenees [J]. *Journal of Petroleum Geology*, 2010, 33 (2) : 123 – 140.

[5] Matlakowska R, Sklodowska A. Biodegradation of kupferschiefer black shale organic matter (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by indigenous microorganisms [J]. *Chemosphere*, 2011, 83 (9) : 1255 – 1261.

[6] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44 (3) : 253 – 262.

[7] Brons J K, van Elsas J D. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (9) : 2717 – 2727.

[8] 蒋绍妍, 王文星, 薛向欣, 等. 油页岩微生物总 DNA 的提取方法 [J]. 东北大学学报: 自然科学版, 2014, 35 (4) : 588 – 592. (Jiang Shao-yan, Wang Wen-xing, Xue Xiang-xin, *et al.* Extraction methods of microbial total DNA from oil shales [J]. *Journal of Northeastern University: Natural Science*, 2014, 35 (4) : 588 – 592.)

(上接第 1027 页)

3 结 论

1) 影响中位径 d_{50} 的最主要因素为反应温度, 其次依次为反应时间、分散剂的量和溶液的 pH 值. 影响分形维数 D 的最主要因素为分散剂的量, 其次依次为溶液的 pH 值、反应温度和反应时间.

2) 结晶动力学研究表明, 硫酸铝与氨水反应过程分为晶核生长期和晶粒长大期两个阶段, 结晶过程动力学方程均符合二级反应速率方程, 两个阶段表观活化能分别为 0. 51 和 1. 27 kJ/mol.

3) 晶体生长机制研究表明, 扩散控制机制是氢氧化铝晶核生长和晶粒长大的主导机制.

参考文献:

[1] 聂福德, 李凤生, 宋洪昌. 超细粉体在液相中的分散性研究进展 [J]. 化工进展, 1996, 8 (4) : 24 – 28. (Nie Fu-de, Li Feng-sheng, Song Hong-chang. The advances in dispersion of ultrafine particle in liquids [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 1996, 8 (4) : 24 – 28.)

[2] Quan K, Liu Y P, Li X B. The development and manufacture of super-fine aluminum hydroxide [J]. *Non-ferrous Mining and Metallurgy*, 2004, 20 (4) : 48 – 51.

[3] 陈肖虎, 张春. 晶种分解法制取超细氢氧化铝粉实验 [J].

贵州科学, 1999, 17 (3) : 190 – 193. (Chen Xiao-hu, Zhang Chun. Ultrafine aluminum hydroxide powder prepared by seed crystal decomposition [J]. *Guizhou Science*, 1999, 17 (3) : 190 – 193.)

[4] Zhang C S, Zhao F, Zhang J. The effect of various prepared factors on structure change of the ultrafine nano-meter alumina [J]. *Chinese Journal of Chemical Physics*, 1999, 12 (3) : 321 – 325.

[5] Hao C, Chen C F, Chen Z G, *et al.* The study on technology of nano alumina powder by chemical synthesis [J]. *Mechanical Engineering Material*, 2002, 26 (7) : 25 – 27.

[6] 赵克, 杨世源, 巢永烈, 等. 牙科纳米氧化铝陶瓷粉体的制备 [J]. 实用口腔医学杂志, 2002, 18 (2) : 99 – 101. (Zhao Ke, Yang Shi-yuan, Chao Yong-lie, *et al.* The dental nano alumina ceramic powder preparation [J]. *Journal of Practical Stomatology*, 2002, 18 (2) : 99 – 101.)

[7] Tyler S W, Wheatear S W. Fractal scaling of soil particle-size distributions; analysis and limitation [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2012, 24 (5) : 326 – 369.

[8] Minem C, Pelizzetti E, Malato S, *et al.* Large solar plant photo catalytic water decontamination: degradation of pentachloropheno [J]. *Solar Energy*, 56 (5) : 411 – 419.

[9] Ginstling A M, Brounshtein B I. Diffusion kinetics of reaction in spherical particles [J]. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2010, 23 (12) : 1327 – 1338.

[10] Luo B, Patfeerson J W. Kinetics of cadmium hydroxide precipitation [J]. *Water Research*, 2012, 26 (8) : 745 – 751.