

新疆泥火山细菌群落 PCR-SSCP 分析

路盼盼 李建辉 张亚平*

(石河子大学生命科学学院 新疆 石河子 832003)

摘要: 采用单链构象多态性(SSCP)技术, 以 16S rDNA 基因的 V3 区为靶对象, 分析泥火山细菌多样性及其群落结构。通过对泥火山不同月份的不同深度土样 DNA 提取后, 针对 16S rDNA 进行 PCR 扩增出 236 bp 大小片段, 通过 SSCP 电泳对泥火山细菌进行季节性多样性分析, 并对主要条带进行克隆分析。结果显示: 新疆泥火山细菌不同季节多态性明显, 而且这种多态性容易受生态和气候的影响; 假单胞菌属是泥火山土壤优势菌群, 在泥火山区土壤中广泛分布, 受生态和气候环境影响较小。

关键词: 泥火山, PCR-SSCP, 16S rDNA

PCR-SSCP analysis bacterial community of Mud Volcano in Xinjiang

LU Pan-Pan LI Jian-Hui ZHANG Ya-Ping*

(College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: A technology single-strand conformation polymorphism (SSCP) and a target 16S rDNA gene on V3 region were used to analyze mud volcano microbial community and structure. After extracting DNA samples from different mud depth and month, get a 236 bp fragment by PCR. The fragment was used to analyze the microorganisms seasonal diversity of mud volcano by SSCP, and some target fragments were analyzed clone. Results showed: the bacteria polymorphism in Xinjiang mud volcano soil is significant, which is vulnerable to ecological and climatic factors. *Pseudomonas* is a dominant microorganism in Xinjiang mud volcano, it distributes widely in mud volcano and was affected little by ecological and climatic.

Keywords: Mud volcano, PCR-SSCP, 16S rDNA

新疆乌苏具有亚洲最大的泥火山群, 而且多数处于活动状态中。泥火山地质特殊环境恶劣, 是研究极端微生物的理想场所^[1]。周围有丰富的矿藏和

油气资源, 拥有发展生物技术产业的资源优势, 这些特殊多样的微生物资源, 具有巨大的潜在利用价值。本研究拟通过 16S rDNA 的 PCR-SSCP 分析, 初

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30860001)

* 通讯作者: Tel: 86-993-2057388; E: xhsl-001@163.com

收稿日期: 2010-09-07; 接受日期: 2010-11-23

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

步探讨泥火山极端微生物的多样性及丰富度,为探索泥火山微生物资源奠定基础。

单链构象多态性分析技术(SSCP)是新近发展起来的一门分子生物学技术。利用DNA单链构象具有多态性在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳差异来检测单链碱基突变。PCR-SSCP操作的基本流程是首先采用特异性引物进行PCR扩增待测DNA片段,然后对扩增产物进行变性处理,得到具有二级构象的单链DNA;最后在非变性的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,根据电泳条带所显示的亮度、丰度、条带位置和清晰度等基本信息进行SSCP图谱分析,然后确定不同菌株类型及其相对数量关系等^[2-3]。

1 材料与方 法

1.1 材料采集和预处理

选取乌苏白杨沟泥火山为土样采集地,采取Z字划线采样法确定了5个采样点,而且每个采样点分5个深度梯度,每个梯度采集大概200g土样放入无菌袋中。选取喷发剧烈而且特征显著的泥火山口采集泥浆水,每个喷发口600mL。采取冰盒保存运回实验室进行研究。采样日期分别为09年5月、8月、9月。

1.2 基因组DNA的提取

改良后的DNA提取法:CTAB法^[4-7]:称取充分研磨的5g土样,加入13.5mL DNA提取液(100mmol/L Tris, 100mmol/L EDTA, 100mmol/L Na₃PO₄, 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB, pH 8.0)和20颗直径为3mm左右的玻璃珠,振荡3min。加500μL溶菌酶(50g/L),振荡30s, 37℃水浴30min。加入20μL蛋白酶K(20g/L),振荡30s, 37℃水浴30min。加入1.5mL 10% SDS后, -20℃放置1h, 65℃水浴1h(期间每隔15min上下颠倒晃动几次),重复2次。6000r/min离心10min,取上清液,用等体积苯酚和氯仿:异戊醇(24:1, V/V)各抽提2次,12000r/min离心15min,取上清。加入0.6倍体积的异丙醇,室温放置2h或过夜,12000r/min离心15min,弃上清。沉淀加5mL预冷的70%乙醇,12000r/min离心20min,收集DNA沉淀,风干,适

量双蒸水溶解。

1.3 PCR扩增和电泳检测^[8]

PCR扩增采用通用引物:第1次扩增引物序列8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-CGGTTACCTTGTACGACTT-3',扩增出1500bp左右的片段。第2次扩增引物序列F339: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'和R518: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3',扩增出260bp左右的片段。

扩增体系为20μL体系:10×PCR buffer(含2.5mmol/L Mg²⁺) 3μL, dNTPs(各2.5μmol/L) 0.5μL, 引物各1μL(10μmol/L), Taq DNA聚合酶0.5μL,模板1μL,加ddH₂O补齐至20μL。

第1次PCR反应程序为:94℃ 5min; 94℃ 40s, 55℃ 30s, 72℃ 2min, 35个循环; 72℃ 8min。第2次PCR反应程序退火温度为52℃ 30s, 72℃延伸1min,其余同第1次PCR反应程序。取3μL PCR产物于1%的琼脂糖凝胶上电泳,并与DNA定量Marker DL2000(TaKaRa)比较确定浓度。

1.4 SSCP图谱的产生和分析

电泳采用PowerPac1000型电泳仪(Bio-Rad, CA, USA),采用8%的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺和甲叉配比为10:1),控制在4℃恒温下进行。10L酶解产物与5L变性液混合后,于95℃变性5min,迅速插入冰中,冰浴5min后上样^[9-10]。然后在4℃、80V下,电泳20h结束后,按Bassam等的方法进行银染^[11]。获得的SSCP图谱用Quantity One软件(Bio-Rad)对条带数和亮度进行数字化处理,并依此为依据进行聚类分析。

2 结果与分析

本研究所用引物为真细菌通用引物,反映的是不同月份优势真细菌构成的群落的总体状况。将二次PCR扩增产物与等量变性液混合,高温变性后进行SSCP分离,分别得到不同土壤样品细菌群落的SSCP图谱(图1),不同样品的细菌SSCP图谱的条带数、条带位置和亮度存在一定程度的差异,样品5、10、15的条带数比同月份其它样品稍多,且每个样

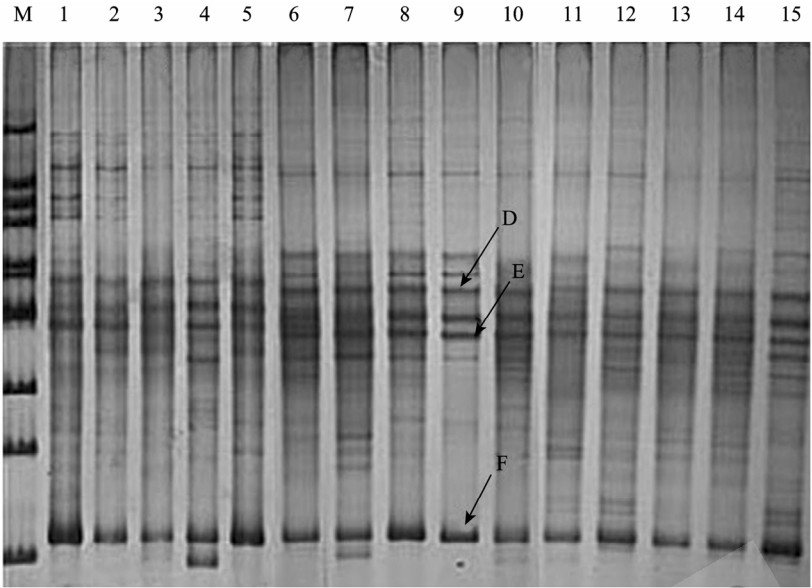


图 1 PCR 产物的 SSCP 电泳图谱
Fig. 1 SSCP profiles of the PCR products

注: 1-5: 五月份 0-10 cm、10 cm-20 cm、20 cm-30 cm、30 cm-40 cm、40 cm-50 cm; 6-10: 八月份的 5 个深度梯度的土样; 11-15: 十月份的 5 个深度梯度的土样。
Note: 1-5: The soil sample in May (0-10 cm, 10 cm-20 cm, 20 cm-30 cm, 30 cm-40 cm, 40 cm-50 cm); 6-10: The soil sample of five depth gradient in August; 11-15: The soil sample of five depth gradient in October.

品也都含有自己的独特条带。进一步利用 Quantity One 软件(Bio-Rad)对 SSCP 图谱进行聚类分析, 得到各个土壤样品之间微生物组成的聚类分析结果(图 2)。

从图 2 我们可以看出, 聚类树亦可以分为 3 支: 第 1 支包含 1、2、3、4 号土样, 我们称其为“五月份”; 第 2 支包括 11、12、13、14、15 号土样, 我们将其称为“十月份”; 最后一支包括 5、6、7、8、9、10 号土样, 我们将其称为“八月份”。从中也可以得出, 同一月份、不同深度泥火山土壤细菌的组成相似性较高; 而不同深度、不同月份及同一深度、不同月份泥火山土壤细菌的组成存在较大差异。

SSCP 图谱中也有部分条带如条带 D、E、F, 在 15 个样品中均有分布, 对这 3 个条带进行回收克隆测序及序列比对(表 1)。4 个条带代表的细菌均为假单胞菌, 这进一步证明假单胞菌属是泥火山土壤优势菌群, 在泥火山区土壤中广泛分布, 受生态和气候环境影响较小。

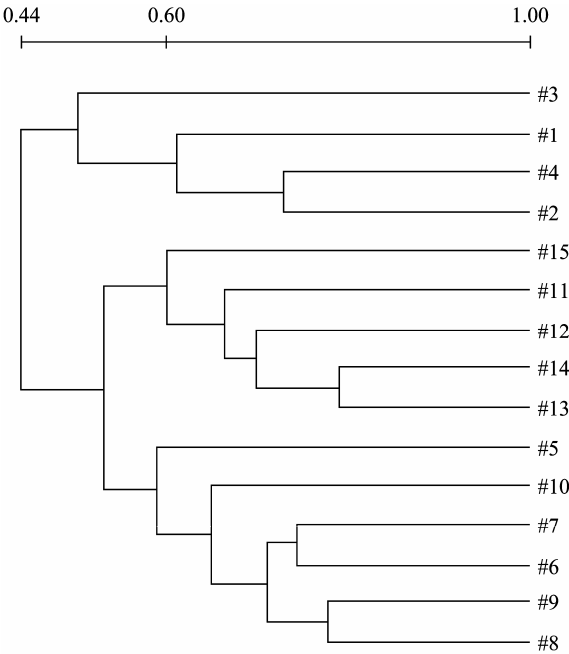


图 2 SSCP 图谱聚类分析
Fig. 2 Dendrogram showing the relatedness of the SSCP banding patterns

表 1 测序结果比对
Table 1 Compared the sequencing results

编号 No.	相似菌株 Most similar sequence	相似度 Similarity (%)	GenBank 登录号 GenBank No.
D	<i>Pseudomonas</i> sp. oral taxon B99 clone LW060 16S ribosomal RNA gene	99	HM192823
E	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. isolate DGGE gel band K17 16S ribosomal RNA gene	98	HM192822
F	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone CHINA4 16S ribosomal RNA gene	100	HM192821

3 讨论

本研究利用 SSCP 技术对新疆乌苏泥火山不同深度和不同月份土壤细菌组成进行了研究,揭示了我国泥火山土壤细菌组成的多态性。由于土壤中微生物分布的不均一性,我们选用改良后的方法,取样量大,更能代表泥火山土壤中微生物的实际分布情况,且结果稳定。采用嵌套式 PCR 进行扩增,提高了 PCR 检测的灵敏度,保证产物的特异性,有利于获得较为清晰的 SSCP 图谱。

通过对 SSCP 图谱的聚类分析,显示新疆泥火山不同深度和不同季节土壤的细菌组成多态性明显。其中五月份各土样细菌多样性最为丰富,相同季节不同深度的细菌组成的相似度较高,这说明新疆泥火山土壤微生物分布可能更易受到生态、气候等因素的影响。特异条带的回收测序结果表明:假单胞菌属是泥火山土壤优势菌群,他们在泥火山土壤中广泛分布,受深度及季节环境影响较小。假单胞菌属于化能有机营养,严格好氧,利用呼吸代谢,广泛存在于高盐碱、低营养的环境中。新疆地下天然气和石油矿藏丰富区域的泥火山区正属于这类极端环境,假单胞杆菌可能参与油藏生态系统 C、N 和 S 代谢,是其为该区域优势菌的一个重要原因,这与大庆油田和大港油田的一个水驱油藏的非培养分析结果一致^[12-14],相关机理有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 马小龙,王芸,杨红梅,等. 新疆泥火山细菌遗传多样

性[J]. 生态学报, 2009, 29(7): 3722-3728.

- [2] 王爱杰, 阚洪晶, 于振国, 等. SSCP 技术分析活性污泥微生物群落结构的条件优化及检验[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1164-1169.
- [3] 桂芳, 张卓然. PCR-SSCP 技术及其在微生物学研究中的应用[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(1): 89-92.
- [4] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
- [5] 蔡曼, 职晓阳, 吴晋元, 等. PCR-SSCP 技术在嗜盐放线菌链单孢菌属快速筛选中的应用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1500-1504.
- [6] 林万明. 分析微生物学专辑[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 88-89.
- [7] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [8] Zumstein E, Moletta R, Godon JJ. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(1): 69-78.
- [9] 王永, 赵新, 兰青阔, 等. 4 种食源性致病菌的 PCR-SSCP 检测技术研究[J]. 天津农业科学, 2009, 15(1): 13-15.
- [10] Lee DH, Zo YG, Kim SJ. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(9): 3112-3120.
- [11] Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196(1): 80-83.
- [12] 袁三青, 薛燕芬, 汪卫东, 等. 胜利油田单 12 高温油藏非培养和富集培养样品的细菌组成特性[J]. 微生物学报, 2008, 48(8): 1082-1087.
- [13] 余跃惠, 张学礼, 张凡, 等. 大港孔店油田水驱油藏微生物群落的分子分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(3): 329-334.
- [14] 赵阳国, 任南琪, 王爱杰, 等. SSCP 技术在微生物群落监测中的应用[J]. 中国给水排水, 2004, 20(11): 25-28.