

油气田土壤甲烷氧化菌实时荧光定量 PCR 检测技术的建立与应用

刘雅慈^{1,2,3} 何泽^{2,3} 张胜^{2,3} 殷密英^{2,3} 宁卓^{2,3} 张翠云^{2,3*}

(1. 中国地质科学院研究生院 北京 100037)

(2. 中国地质科学院水文地质环境地质研究所 河北 石家庄 050061)

(3. 河北省地下水污染机理与修复重点实验室 河北 石家庄 050061)

摘要:【目的】建立快速检测甲烷氧化菌含量的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术,用于油气微生物勘探。【方法】以含有甲烷氧化菌功能基因 *pmoA* 片段的重组质粒为标准品,优化实验条件,建立标准曲线,进行敏感性、重复性和特异性评价,并将该技术用于实际样品的检测。【结果】该技术标准曲线的相关系数 R^2 为 0.999 9,扩增效率为 99.976%,检测范围为 3.897×10^1 – 3.897×10^9 copies/ μ L,检出限约为 40 copies/ μ L,重复性实验中 C_T 值的变异系数优于 3%,对 12 种非甲烷氧化菌均没有扩增,显示该技术具有很好的敏感性、重复性和特异性。利用该技术对气田、油田和非油气田土样进行了检测,发现气田具有明显的异常高值。【结论】为油气田的勘探建立了一种高效、特异、灵敏、准确的甲烷氧化菌荧光定量 PCR 检测技术,同时为其它指示菌检测技术的建立提供了参考。

关键词: 甲烷氧化菌, 实时荧光定量 PCR, *pmoA* 基因, 油气田土壤

Development and application of a fluorescent quantitative real-time PCR technique for detection of methane-oxidizing bacteria in oil and gas field soil

LIU Ya-Ci^{1,2,3} HE Ze^{2,3} ZHANG Sheng^{2,3} YIN Mi-Ying^{2,3} NING Zhuo^{2,3}
ZHANG Cui-Yun^{2,3*}

(1. Graduate University of Chinese Academy of Geological Sciences, Beijing 100037, China)

(2. The Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050061, China)

(3. Hebei Key Laboratory of Groundwater Remediation, Shijiazhuang, Hebei 050061, China)

Abstract: [Objective] We developed a rapid SYBR Green I fluorescent quantitative real-time PCR technique for detection of methane-oxidizing bacteria for microbial prospection of oil and gas. [Methods] The recombinant plasmid containing *pmoA* gene was used as standards to optimize the

基金项目: 地质调查项目(No. 1212011120268); 中国地质科学院水文地质环境地质研究所基本科研业务费项目(No. SK201214)

*通讯作者: Tel: 86-311-67598571; ✉: zcygeology@163.com

收稿日期: 2013-07-10; 接受日期: 2013-10-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

experimental conditions and generate a standard curve. The sensitivity, reproducibility and specificity of the technique were evaluated, and practical soil samples were detected using the technique. **[Results]** The correlation coefficient (R^2) of the standard curve was 0.999 9 and the amplification efficiency was 99.976%. The detection range was from 3.897×10^1 to 3.897×10^9 copies/ μL and the sensitivity was about 40 copies/ μL . All variable coefficients of C_T values in the reproducibility test were better than 3%. In addition, no amplification was observed in the templates of 12 non-methane-oxidizing bacteria. The technique showed good sensitivity, specificity and reproducibility. Soil samples collected in the gas field, the oil field and the non-oil and gas field were detected using the technique, and the gas field had high anomalies of methane-oxidizing bacteria. **[Conclusion]** The fluorescence quantitative real-time PCR technique developed here could rapidly and exactly detect methane-oxidizing bacteria for oil and gas exploration. At the same time, this technique could contribute to detection of other indicator bacteria in oil and gas field soil.

Keywords: Methane-oxidizing bacteria, Fluorescence quantitative real-time PCR, *pmoA* gene, Oil and gas field soil

在油气藏压力的驱动下, 油气藏的轻烃气持续向地表作垂直扩散和运移, 土壤中的专性微生物以轻烃气作为唯一碳源在油气藏正上方的地表土壤中非常发育, 形成微生物异常, 通过检测微生物异常可以预测下伏油气藏的存在^[1-2]。向上运移的轻烃气中含量最多的是甲烷, 甲烷氧化菌是以甲烷为唯一碳源的甲基营养型微生物, 因此甲烷氧化菌是非常重要的油气藏指示菌, 而建立简便、快速、准确的甲烷氧化菌检测技术是油气微生物勘探的关键。

传统检测甲烷氧化菌含量的方法是培养后计数, 计数方法主要是 MPN (Most-probable-number) 法^[3]和 CFU (Colony-forming units) 法^[4-5]。培养法存在的问题是, 实验室条件很难模拟自然环境, 导致只有部分微生物被检测, 低估其数量。此外, 培养法操作繁琐, 劳动强度大, 培养时间长, 费时费力, 不能满足大批量样品快速检测要求。实时荧光定量 PCR 是一种快速定量环境微生物的新方法, 具有灵敏度高、特异性强、重复性好和自动化程度高等特点。该方法是通过 16S rRNA 基因或功能基因检测环境样品中微生物含量^[6-9]。甲烷氧化菌的功能基因包括 *pmoA*、*mmoX* 和 *mxoF*, 分别编码颗粒状甲烷单加氧酶、可溶性甲烷单加氧酶以及甲醇脱氢酶。其中可溶性甲烷单加氧酶只存在于部分甲烷氧化菌中, 甲醇脱氢酶存在于所有已知的甲基营养菌中, 不仅限于甲烷氧化菌^[10], 而颗粒状甲烷单加氧酶存在于除 *Methylocella* 以外所有已知的甲烷氧

化菌中。另外, 分别基于 *pmoA* 和 16S rRNA 基因构建的系统发育树显示出良好的相关性^[11]。因此, *pmoA* 基因可以用于甲烷氧化菌的检测^[12-14]。研究表明荧光定量 PCR 方法比传统培养方法更能准确的检测环境中微生物的数量^[15]。

实时定量 PCR 技术的荧光基团加入法, 主要有染料法和荧光探针法。与荧光探针法相比, 荧光染料法的特点是, 对不同模板 DNA 不需特别定制不同的荧光染料, 检测方法简便, 成本低。不足之处是检测特异性仅依赖于引物特异性, 当 PCR 反应中有非特异性扩增时, 荧光染料也可与非特异性 dsDNA 产物(如引物二聚体)结合, 产生荧光干扰, 使实验容易产生假阳性信号。针对这种情况, 可以通过熔解曲线分析来区分非特异性产物和引物二聚体而排除假阳性^[16]。

本研究在 SYBR Green I 荧光定量 PCR 技术的基础上, 以甲烷氧化菌功能基因 *pmoA* 为靶基因, 探索建立快速、灵敏、特异的油气田土壤甲烷氧化菌定量 PCR 检测技术。通过敏感性、重复性和特异性检测评价该技术性能, 并将该技术用于油区、气区和非油气区土样的检测, 进一步评价该技术应用效果。

1 材料与方法

1.1 土样的采集

气田和油田土样分别取自川西气田孝泉采气区和华北油田西柳采油区一个 2.5 m 不同深度的包气带剖面, 取样点距采油井井口约 50 m, 取样点坐

标分别为 31°14'51" N、104°19'38" E 和 38°40'50" N、115°50'52" E, 取样深度分别为 0.05、0.20、0.40、0.50、1.00、1.50、2.00 和 2.50 m。非油气田土样采自河北省正定县北关农田一个 2.5 m 不同深度包气带剖面, 取样点坐标为 38°09'52" N, 114°34'27" E, 取样深度分别为 0.05、0.20、0.50、1.00、1.50、2.00 和 2.50 m。取样时洛阳铲取芯, 采用无菌小刀从岩芯中部挖取土样, 装入经高温灭菌的铝盒, 现场冰块保温箱保存, 尽快运回实验室 4 °C 保存备用。

1.2 非甲烷氧化菌菌株来源

12 种非甲烷氧化菌菌株均为本实验室保存的苯胺降解菌、喹啉降解菌、乙磺酸降解菌和石油降解菌等菌种。

1.3 主要试剂和仪器

荧光染料 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 和 ROX Reference Dye 购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 产物纯化试剂盒为 Promega 公司的 Gel Extration Kit 试剂盒; 基因组 DNA 提取试剂盒为美国 MOBIO 强力土壤 DNA 提取试剂盒 (PowerSoil[®] DNA Isolation Kit); 质粒提取试剂盒为 BIOTEKE 的高纯质粒小量制备试剂盒; 荧光定量 PCR 仪采用的是 Applied Biosystems StepOne[™] Real-Time PCR System; Biodropsis BD-2000 型超微量紫外分光光度计, 德国 Eppendorf 5333 PCR 仪, DYY-12 型电泳仪。

1.4 指示菌功能基因引物

甲烷氧化菌功能基因 *pmoA* 引物对^[10,17]为: A189f (5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3')和 mb661r (5'-CCGGMGCAACGTCYTACC-3')。扩增片段长度为 508 bp, 由上海英俊生物有限公司合成。

1.5 土样总 DNA 提取

每个土样称取 0.5 g 左右, 按 DNA 提取试剂盒说明提取样品总 DNA。

1.6 荧光定量 PCR 条件的优化

荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 染料法, 在荧光定量 PCR 仪上进行扩增和数据分析。先按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒的反应体系和程序

进行扩增, 根据得到的扩增曲线、标准曲线和溶解曲线的结果进一步做相应的条件优化。

1.7 质粒标准品的制备

1.7.1 目的基因的扩增: 利用甲烷氧化菌功能基因 *pmoA* 引物 A189f (5'-GGNGACTGGGACTTC TGG-3')和 mb661r (5'-CCGGMGCAACGTCYTACC-3')对孝泉气田 0.5 m 深度的土样总 DNA 进行 *pmoA* 基因扩增。反应体系为: 10×Buffer 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μL, dNTPs (10 mmol/L) 2.5 μL, BSA (20 g/L) 0.2 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, 加入引物各 20 pmol 和 2 μL DNA 模板, ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 3 min, 扩增 20 个循环, 每个循环退火温度降低 0.5 °C; 50 °C 10 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后, 取 5 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测扩增结果。

1.7.2 重组质粒的构建、测序与浓度测定: *pmoA* 基因的 PCR 扩增产物经电泳、胶回收纯化后, 与 pGEM-T Easy 载体连接, 转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 平板培养挑选长出的白斑菌落进行单克隆培养, PCR 鉴定筛选阳性克隆子并测序。测序结果与 GenBank 数据库比对, 验证阳性克隆子的插入片段是否为 *pmoA* 基因。序列正确的阳性克隆子利用试剂盒提取质粒作为标准品, 超微量紫外分光光度计测定浓度, 存-20 °C 备用。根据测定的核酸浓度, 计算质粒标准品中甲烷氧化菌 *pmoA* 基因片段拷贝数。

1.7.3 标准曲线的建立: 将制备好的质粒标准品 10 倍梯度稀释, 得到 10 个稀释度的标准模板。每个稀释度 2 个平行样, 记录结果, 取平均值, 绘制灵敏度曲线, 进行敏感性评价。以定量 PCR 反应的循环数为横坐标, 以不同模板拷贝数的对数为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.8 重复性评价

将质粒标准品进行系列梯度稀释, 取高、中、低 3 个浓度梯度进行荧光定量 PCR 检测, 各浓度重复测定 6 次, 分析梯度内的 C_T 值、标准差和变

异系数,对实时荧光定量 PCR 体系的检测重复性进行评价。

1.9 特异性评价

以标准质粒为阳性对照,以无菌蒸馏水为阴性对照,将优化的荧光定量 PCR 反应体系用于扩增孝泉气田土壤 DNA 和 12 种非甲烷氧化菌基因组 DNA,对实时荧光定量 PCR 体系的检测特异性进行评价。

1.10 实际样品检测

以重组质粒作为阳性对照,以无菌水作为阴性对照,每批样品带一组系列稀释的标准品,对气区、油区和非油气区 2.5 m 深的剖面土样进行定量检测。

2 结果与分析

2.1 土样 *pmoA* 基因的 PCR 扩增

选择孝泉气田 0.5 m 深度处的土样 DNA 为模板,采用 *pmoA* 引物扩增,成功扩增出一条大约 500 bp 的特异片段,与预期结果 508 bp 相吻合(图 1)。

2.2 质粒标准品的构建和测序

挑选 10 个阳性克隆子放大培养后提取质粒,将重组质粒进行 PCR 鉴定的,结果显示,重组质粒均扩增出大约 500 bp 的特异性片段,与预期结果 508 bp 相吻合(图 2)。说明目的基因已成功克隆到载体中。经上海英骏生物技术有限公司测序,目的基因与不可培养的环境细菌克隆 Uncultured bacterium clone F05-FW300-98 (DQ917359.1)的 *pmoA* 基因的碱基序列一致(99%的相似性)。

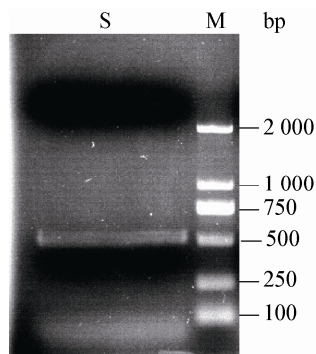


图 1 土样 *pmoA* 基因 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification results of soil *pmoA* gene

注: M: 2 000 bp 的 DNA 标记; S: 土壤样品。

Note: M: 2 000 bp DNA marker; S: Soil sample.

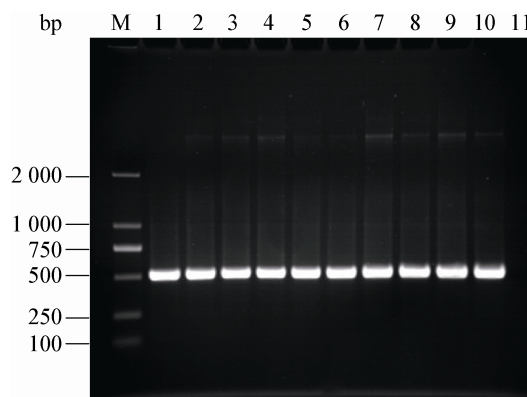


图 2 重组质粒的 *pmoA* 基因 PCR 扩增结果

Figure 2 PCR amplification results of recombinant plasmid *pmoA* gene

注: M: 2 000 bp 的 DNA 标记; 1-10: 阳性克隆子; 11: 阴性对照。

Note: M: 2 000 bp DNA marker; 1-10: Positive clones; 11: Negative control.

2.3 荧光定量 PCR 条件优化结果

20 μ L 的总反应体系: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 \times) 10 μ L、Forward primer (10 μ mol/L) 0.2 μ L、Reverse primer (10 μ mol/L) 0.2 μ L、ROX reference dye (50 \times) 0.4 μ L、ddH₂O 7.2 μ L、DNA 模板 2 μ L, 采用二步法扩增程序: 第一阶段 95 $^{\circ}$ C 30 s; 第二阶段 95 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、84 $^{\circ}$ C 15 s (收集荧光信号) 扩增 40 个循环; 第三阶段绘制熔解曲线 95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 60 s、60–95 $^{\circ}$ C 每升高 0.3 $^{\circ}$ C 读数, 读数时间 15 s 进行熔解曲线分析。

2.4 敏感性试验结果

利用核酸定量仪测定质粒浓度,进而计算得到甲烷氧化菌基因片段的拷贝数为 3.897×10^9 copies/ μ L。将质粒提取液 10 倍系列稀释得到 10 个稀释度的标准模板,各取 2 μ L 稀释标准品作为荧光定量 PCR 的模板进行扩增,得到扩增曲线和熔解曲线(图 3、4)。从图 3 可以看出,当标准模板 DNA 浓度在 3.897×10^1 – 3.897×10^9 copies/ μ L 范围内时,扩增曲线的线形很好,熔解曲线具有特异性的峰,扩增产物的 T_m 值非常均一,为 89.92 $^{\circ}$ C。但是当模板浓度低至 3.897 个拷贝时,没有检测到扩增曲线,并且熔解曲线也没有特异性的峰,因此判断该方法对甲烷氧化菌的最低检出浓度为 3.897×10^1 copies/ μ L。

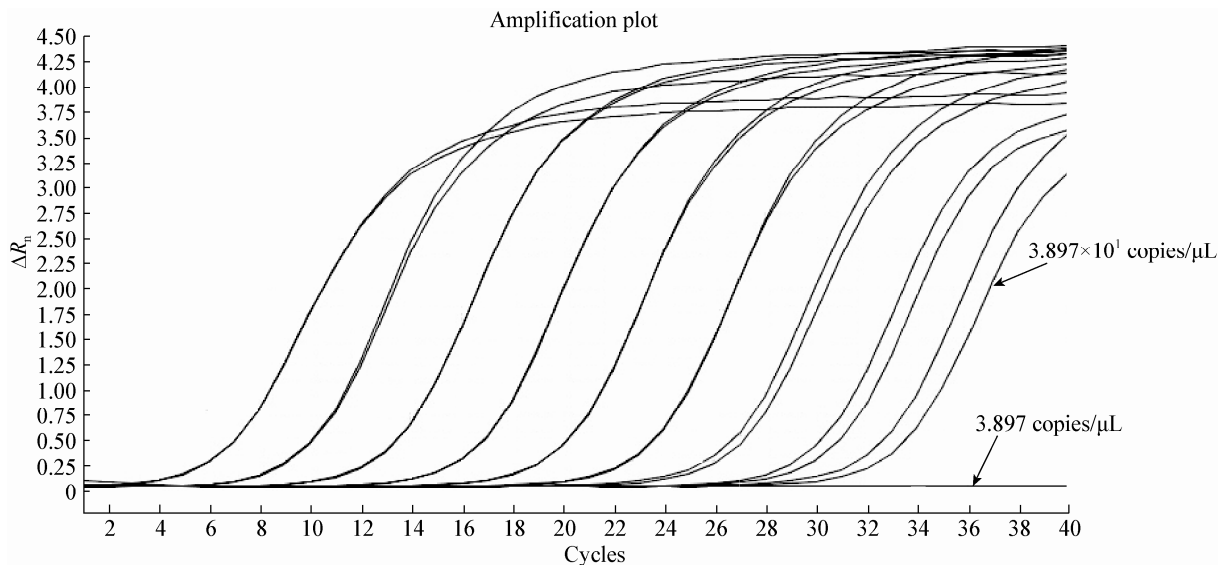


图3 荧光定量 PCR 敏感性评价扩增曲线

Figure 3 Amplification curve of fluorescence quantitative PCR sensitivity evaluation

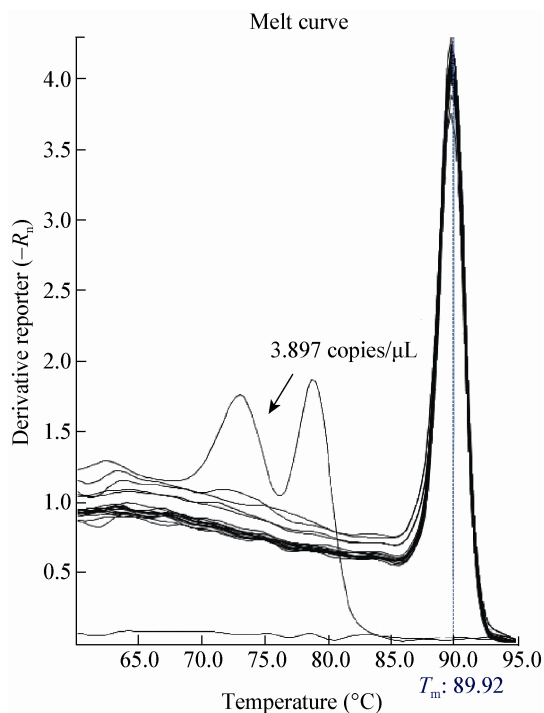


图4 荧光定量 PCR 敏感性评价熔解曲线

Figure 4 Melting curve of fluorescence quantitative PCR sensitivity evaluation

2.5 标准曲线的绘制

标准模板 DNA 浓度在 3.897×10^1 – 3.897×10^9 copies/μL 范围内, 以标准质粒 DNA 浓度的对数为横坐标, 以 C_T 值为纵坐标, 建立的甲烷氧化菌定量 PCR 检测的标准曲线如图 5 所示。标准曲线方程为: $C_T = -3.322 \lg X + 39.532$ 。直线斜率 k 为 -3.322 , 截距为 39.532 , X 为模板浓度, 单位是 copies/μL。曲线的相关系数 R^2 为 0.9999 , 表明模板浓度与 C_T 值之间有良好的相关性。根据 $k = -1/\lg(1+E)$ (E 为荧光定量 PCR 反应的扩增效率), 得荧光定量 PCR 扩增效率为 99.976% , 达到荧光定量 PCR 对扩增效率的要求^[18]。

2.6 重复性试验结果

取标准质粒高、中、低 3 个浓度梯度 (3.897×10^5 、 3.897×10^3 、 3.897×10^1 copies/μL) 进行荧光定量 PCR, 每个浓度 6 次重复测定, 结果如表 1 所示, 随着模板浓度的降低, C_T 值增大, 同种浓度间的 C_T 值差异加大。 C_T 值的变异系数也在逐渐增大, 但是都小于 3% , 在误差允许范围内, 说明建立的荧光定量 PCR 检测方法对高、中、低不同浓度甲烷氧化菌的检测结果均有很好的重复性。

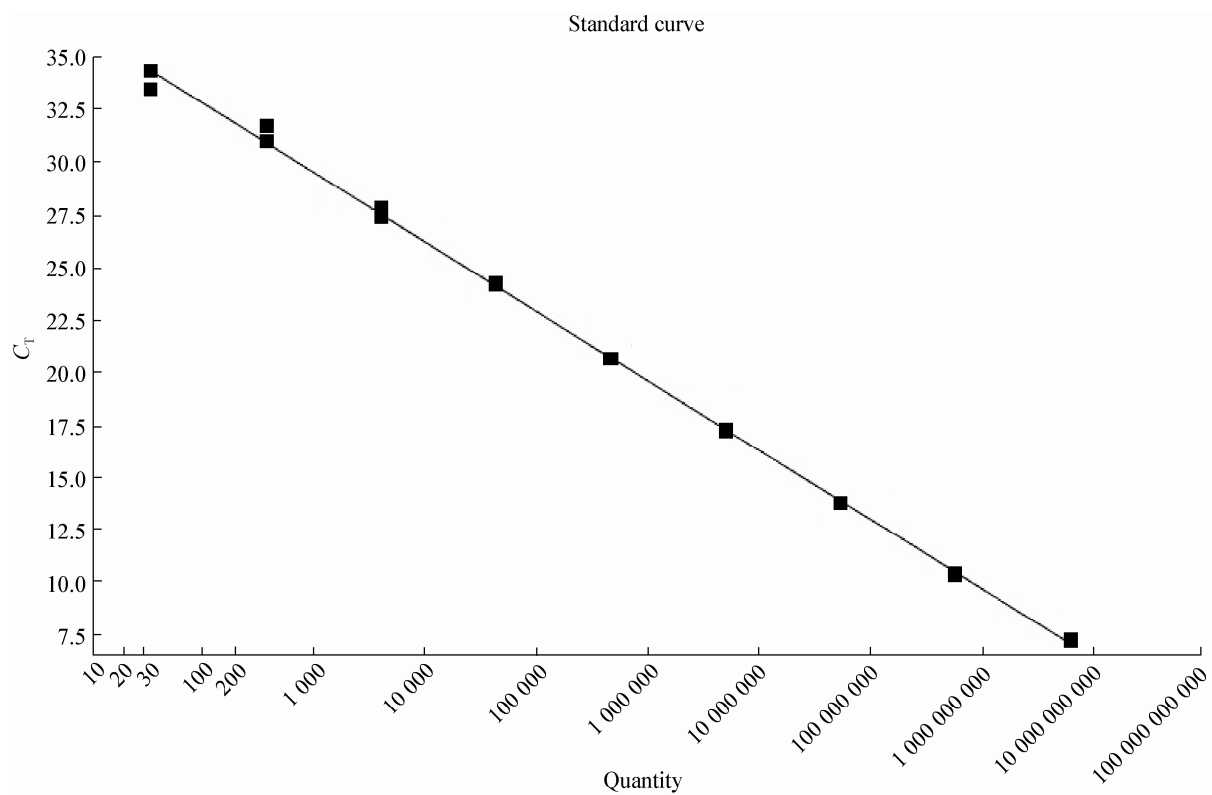


图 5 荧光定量 PCR 敏感性评价标准曲线

Figure 5 Standard curve of fluorescence quantitative PCR sensitivity evaluation

| 表 1 重复性试验结果 | | | | | | | | | |
|---|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Table 1 Results of reproducibility evaluation | | | | | | | | | |
| 浓度 Concentration (copies/μL) | C _T 值 C _T value | | | | | | 平均值 Mean value | 标准差 Standard deviation | 变异系数 Variable coefficient (%) |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| 3.897×10 ⁵ | 18.55 | 18.69 | 18.34 | 18.26 | 18.16 | 18.19 | 18.36 | 0.21 | 1.14 |
| 3.897×10 ³ | 25.76 | 26.11 | 26.08 | 26.10 | 25.54 | 25.65 | 25.87 | 0.26 | 1.00 |
| 3.897×10 ¹ | 32.77 | 31.78 | 32.11 | 31.73 | 31.88 | 33.95 | 32.37 | 0.86 | 2.66 |

2.7 特异性试验结果

特异性试验结果显示 ,标准质粒和孝泉气田土壤 DNA 呈 S 型扩增曲线 ,显示为阳性 ,而 12 种非甲烷氧化菌均没有出现 S 型扩增曲线 ,显示为阴性(图 6) ;在熔解曲线中 ,甲烷氧化菌的熔解温度 T_m 值为 89.93 °C ,而非甲烷氧化菌的熔解温度

T_m 值在 74 °C 左右(图 7) ,荧光收集温度 84 °C 高于非甲烷氧化菌的 T_m 值 ,此时非甲烷氧化菌形成的 DNA 双链解链为单链 ,荧光信号消失 ,因此非甲烷氧化菌的荧光信号不会对检测结果造成影响。由此可知所建立的方法特异性高 ,能够准确检出甲烷氧化菌 ,同时排除非甲烷氧化菌的干扰。

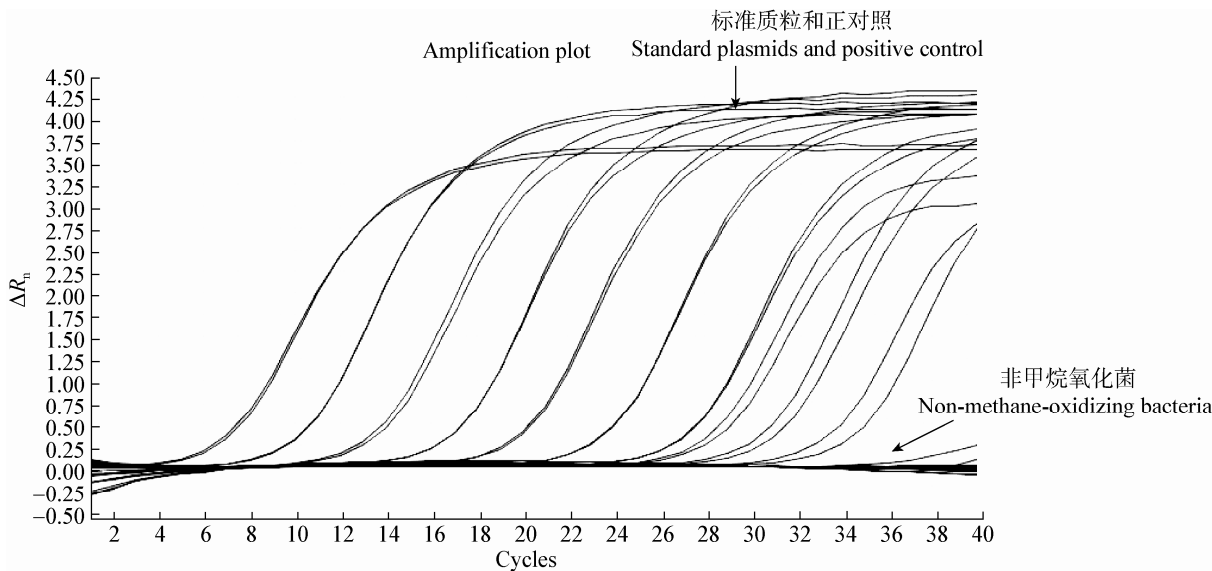


图 6 荧光定量 PCR 特异性评价的扩增曲线

Figure 6 Amplification curve of fluorescence quantitative PCR specificity evaluation

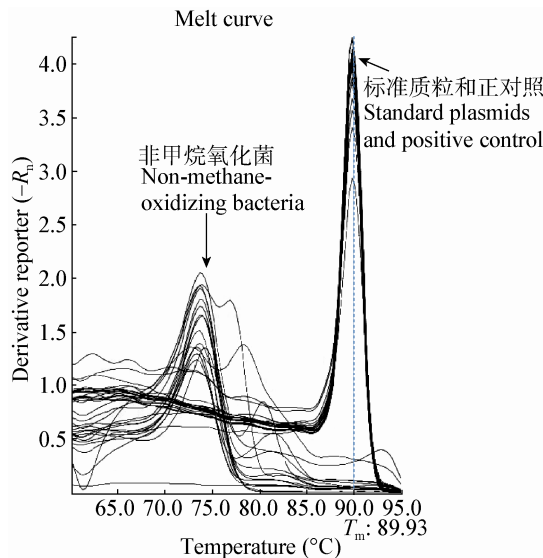


图 7 甲烷特异性评价的溶解曲线

Figure 7 Melting curve of fluorescence quantitative PCR specificity evaluation

通过以上试验,我们建立了灵敏、准确、特异、快速定量甲烷氧化菌的方法。下面将此技术用于油气田和非油气田土样甲烷氧化菌含量的测定,进一步评价该技术应用效果。

2.8 实际样品检测结果

孝泉气田剖面不同深度甲烷氧化菌 *pmoA* 基因含量,除 100 cm 和 150 cm 外($n\times10^3$ copies/g),其余深度含量均很高,达 $n\times10^5$ copies/g (表 2)。

西柳油田剖面深度小于 50 cm 的甲烷氧化菌 *pmoA* 基因含量较高,达 $n\times10^4$ copies/g,大于 50 cm 的含量较低,在 $n\times10^2$ – $n\times10^3$ copies/g 之间(表 3)。

正定北关非油气田剖面,50 cm 处甲烷氧化菌 *pmoA* 基因含量最高,为 1.26×10^5 copies/g,其余深度均较低,在 $n\times10^2$ – $n\times10^3$ copies/g 之间(表 4)。

| 表 2 孝泉气田不同深度土样甲烷氧化菌 <i>pmoA</i> 基因含量 | | | | |
|--|-------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Table 2 Contents of <i>pmoA</i> gene of methane-oxidation bacteria in different depths of Xiaoquan gas field | | | | |
| 样品编号 | 深度 | C_T 均值 | 测定均值 | 基因含量 |
| Number of samples | Depths (cm) | Mean value of C_T | Measured value (copies/ μ L) | Gene content (copies/g) |
| XC6-1 | 5 | 24.04 | 2.72×10^3 | 6.81×10^5 |
| XC6-2 | 20 | 24.04 | 2.74×10^3 | 6.47×10^5 |
| XC6-3 | 40 | 24.90 | 1.53×10^3 | 3.53×10^5 |
| XC6-4 | 50 | 24.80 | 1.54×10^3 | 3.80×10^5 |
| XC6-5 | 100 | 31.93 | 1.38×10^1 | 3.19×10^3 |
| XC6-6 | 150 | 31.88 | 1.64×10^1 | 3.96×10^3 |
| XC6-7 | 200 | 25.64 | 9.28×10^2 | 2.00×10^5 |
| XC6-8 | 250 | 26.04 | 7.08×10^2 | 1.42×10^5 |

表 3 西柳油田不同深度土壤甲烷氧化菌的功能基因含量
Table 3 Contents of *pmoA* gene of methane-oxidation bacteria in different depths of Xiliu oil field

| 样品编号 Number of samples | 深度 Depths (cm) | C_T 均值 Mean value of C_T | 测定均值 Measured value (copies/ μ L) | 基因含量 Gene content (copies/g) |
|---------------------------|-------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|
| XL1-1 | 5 | 28.92 | 6.10×10^1 | 1.09×10^4 |
| XL1-2 | 20 | 28.49 | 7.83×10^1 | 1.54×10^4 |
| XL1-3 | 40 | 24.57 | 2.67×10^2 | 4.75×10^4 |
| XL1-4 | 50 | 25.57 | 1.44×10^2 | 2.76×10^4 |
| XL1-5 | 100 | 29.68 | 7.18×10^0 | 1.33×10^3 |
| XL1-6 | 150 | 28.79 | 1.42×10^1 | 2.79×10^3 |
| XL1-7 | 200 | 33.26 | 1.10×10^0 | 1.77×10^2 |
| XL1-8 | 250 | 28.44 | 1.71×10^1 | 3.55×10^3 |

表 4 非油气田不同深度土壤甲烷氧化菌的功能基因含量
Table 4 Contents of *pmoA* gene of methane-oxidation bacteria in different depths of non-oil and gas field

| 样品编号 Number of samples | 深度 Depths (cm) | C_T 均值 Mean value of C_T | 测定均值 Measured value (copies/ μ L) | 基因含量 Gene content (copies/g) |
|---------------------------|-------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|
| HF1 | 5 | 31.32 | 1.69×10^1 | 3.07×10^3 |
| HF2 | 20 | 33.89 | 3.08×10^0 | 4.47×10^2 |
| HF3 | 50 | 25.80 | 6.90×10^2 | 1.26×10^5 |
| HF4 | 100 | 30.17 | 3.61×10^1 | 6.44×10^3 |
| HF5 | 150 | 31.19 | 1.78×10^1 | 2.31×10^3 |
| HF6 | 200 | 32.28 | 8.75×10^0 | 1.14×10^3 |
| HF7 | 250 | 31.33 | 1.63×10^1 | 2.33×10^3 |

对比气田、油田和非油气田剖面甲烷氧化菌 *pmoA* 基因含量,除 100 cm 深度外,气田剖面甲烷氧化菌 *pmoA* 基因含量明显高于油田和非油气田(图 8),与实际情况一致。孝泉气田气源充足,甲烷是气体的主要成分,导致气田地地表浅部甲烷氧化菌异常发育;西柳油田甲烷氧化菌含量较小,并且在 3 个深度处小于非油气田的基因含量,其可能的

原因是:(1) 由油藏本身的性质决定,油田微渗漏烃主要是 C2-C8 的短链烃,甲烷含量较少;(2) 西柳采油区已开采十几年,导致油藏压力下降,轻烃微渗漏减弱,甲烷供应量低。非油气田没有深部气源或很少,导致非油气田地地表浅部甲烷氧化菌含量很低,而 50 和 100 cm 处较高含量甲烷氧化菌可能是生物成因甲烷所致。

3 讨论

随着油气勘探的深入发展,剩余油气资源的分布愈加分散,油气藏越来越小,而且非构造油气藏居多,常规勘探难度增大,勘探成本增高。因此,将油气微生物勘探技术与地质、地球化学和地球物理方法结合起来进行油气勘探,能够对地区进行廉价有效的初期勘探,降低钻探风险,同时在勘探成熟区,这项技术能够划分地震勘探查明的地质构造的各种含烃级别,尤其是对预测非常规油气藏(如隐蔽性油气)和深部油气藏具有重要意义^[19-20]。

传统实验方法为了评价微生物异常一般会进行微生物显微测定、生化反应测定和生长活性测定等,这些测定过程都无法避免传统实验室培养方法

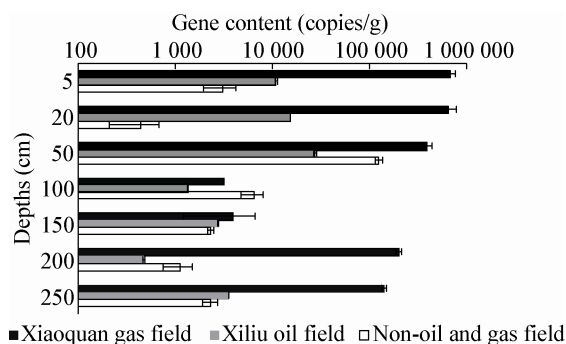


图 8 气田、油田和非油气田包气带剖面沉积物甲烷氧化菌 *pmoA* 基因含量随深度的变化

Figure 8 Change in contents of methanotrophic *pmoA* gene with depth in sediment of the vadose zone profile above the gas field, the oil field and non-oil and gas field, respectively

的弊端,即无法提供完整的甲烷氧化菌群落结构,并且实验繁琐,数据冗长。与之相比,本实验所建立的荧光定量 PCR 技术具有快速、准确、灵敏、自动化程度高等优势,大大简化了实验技术。

SYBR Green I 对双链 DNA 的结合是非特异性的,荧光定量 PCR 中的非特异性扩增产物,特别是引物二聚体(Primer dimers, PDs),也会产生荧光信号并严重干扰对目的基因的定量。为了有效消除引物二聚体(PDs)对实时定量结果的影响,依据 PDs 和扩增产物熔解温度(T_m)不同的特点,可以在延伸步骤之后,增加一个短暂的恒温和荧光检测步骤,使这个步骤的温度高于 PDs 的 T_m ,但低于扩增产物的 T_m ^[21]。因此本实验优化条件中,在延伸步骤之后设定了 84 °C 收集荧光信号 15 s, 84 °C 高于 PDs 的熔解温度,但低于特异性扩增产物的熔解温度,此温度 PDs 完全解链,有效避免了 PDs 对目的基因定量的干扰,大大提高了扩增特异性。

在荧光定量 PCR 扩增实验中,可靠的标准曲线应该符合以下条件^[22]:线性相关系数 $R^2 \geq 0.95$;斜率 k 值范围-3.0~-3.9,理想标准曲线的斜率应该等于-3.32;扩增率 E 值范围 80%~115%。本实验中绘制的标准曲线的线性相关系数 $R^2=0.9999$,斜率为-3.322,同时达到接近 100%的扩增率,表明所构建的曲线是一条理想的标准曲线。最低检出浓度为 10^1 copies/ μ L,重复实验中 C_T 值的变异系数均小于 3%,与同类实验相比^[23-24]灵敏度高、重复性好。

每个甲烷氧化菌细胞大约含有 2 个 *pmoA* 基因^[25], Kolb 等^[17]的研究也进一步证实了此观点。因此针对 *pmoA* 基因的荧光定量 PCR 得到的基因拷贝数大约是细胞含量的 2 倍。

甲烷氧化菌 *pmoA* 基因含量具有随深度增加而减少的趋势,这主要是由于土壤表层含氧量高,同时,土壤表层温度和通气状况利于微生物的生存与繁衍,因而表层土壤甲烷氧化菌含量较大,而随着土层的加深,土壤养分、温度、通气状况不利于甲烷氧化菌的生长,造成了底层的甲烷氧化菌含量减

少^[26]。不仅微生物数量会随着深度变化,土壤深度对微生物的多样性分布也有重要影响^[27]。

在孝泉气田和西柳油田,与其它深度相比,1.5 m 处的甲烷氧化菌 *pmoA* 基因含量较低,这与大港油田相同深度观测的数据^[15]正好相反,可能是地层岩性组合不同所致。若取样处岩性颗粒较粗,而上覆层是致密的粘土,则有利于来自深部气源的甲烷气的保存和甲烷氧化菌的生长繁殖,检测的 *pmoA* 含量高;若取样处为致密的粘土,粘土孔隙直径通常 $<0.2 \mu\text{m}$,而微生物个体通常 $>0.2 \mu\text{m}$,则不利于甲烷氧化菌的生长繁殖,检测的 *pmoA* 含量低。孝泉气田剖面的检测结果正好说明上述情况。取样时发现,200 和 250 cm 处岩性为中粗砂,而 100 和 150 cm 处为粘土;检测结果显示,200 和 250 cm 处 *pmoA* 含量高,100 和 150 cm 处 *pmoA* 含量低。

孝泉气田和西柳油田剖面分析结果显示,深度小于 50 cm (包括 50 cm)的甲烷氧化菌 *pmoA* 含量较深度大于 50 cm 的含量明显高。由于深度小于 50 cm 的土层易受人类活动的影响^[28-30],含量也不稳定,因此,我们确定油气微生物勘探的最佳取样深度为 50 cm。

气田、油田和非油气田剖面检测结果显示,气田存在明显的甲烷氧化菌含量异常高值,而油田没有出现异常高值,这与满鹏等^[31]的研究结果相似。气田、油田和非油气田的检测结果表明,通过甲烷氧化菌检测可区分气田与油田,但是不能较好地区分油田和非油气田,生物成因甲烷是一个很大的干扰。为了区分油田、气田和非油气田,甲烷氧化菌的检测还必需结合其它指标才能实现,如丙丁烷氧化菌的检测。

4 结论

(1) 所建立的荧光定量 PCR 方法最低检出浓度达到 10^1 copies/ μ L,重复实验中 C_T 值的变异系数均小于 3%,对非甲烷菌没有出现特异性扩增。实验结果表明所建立的定量检测方法具有快速、特

异、灵敏的特点,能够高效、准确地检测土壤中的甲烷氧化菌含量。有效地将现代分子生物学技术与油气勘探技术结合起来,避免了传统培养方法的弊端,为快速检测油气田土壤指示微生物提供参考,为微生物油气勘探技术的应用提供了技术支持。

(2) 在进行微生物油气勘探时,采样深度应该选择含菌量较大,同时避免受人为扰动较大的表层土壤。根据不同深度剖面土壤检测结果,确定最佳采样深度为 50 cm。

(3) 实际样品的检测结果显示,甲烷氧化菌的检测可区分气田与油田,但是不能较好区分油田和非油气田,生物成因甲烷是一个很大的干扰。因此,在利用甲烷氧化菌进行油气勘探时,还必需结合其它指标,如丙丁烷氧化菌的检测,以进一步区分油藏、气藏和非油气区。

参考文献

- [1] 梅博文,袁志华,王修垣. 油气微生物勘探法[J]. 中国石油勘探, 2002, 7(3): 42-53.
- [2] 袁志华,张玉清,赵青,等. 中国油气微生物勘探技术新进展—以大庆卫星油田为例[J]. 中国科学: D 辑, 2008, 38(S2): 139-145.
- [3] Wagner M, Wagner M, Piske J, et al. Case histories of microbial prospecting for oil and gas, onshore and offshore in northwest Europe[J]. AAPG Studies in Geology, 2002(48): 453-479.
- [4] Hitzman DC, Schumacher DC, Lavareau L. Strategies for surface geochemical surveys in southeast Asia: Best practice designs and recent case studies[C]. Indonesian Petroleum Association, Thirty-Third Annual Convention & Exhibition, 2009.
- [5] Shennan JL. Utilisation of C2-C4 gaseous hydrocarbons and isoprene by microorganisms[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006, 81(3): 237-256.
- [6] Hermansson A, Lindgren PE. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(2): 972-976.
- [7] Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfohalobium* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreenTM detection[J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 50(2): 155-164.
- [8] Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 4605-4614.
- [9] Skovhus TL, Ramsing NB, Holmström C, et al. Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 2373-2382.
- [10] McDonald IR, Murrell JC. The methanol dehydrogenase structural gene *mxoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3218-3224.
- [11] Holmes AJ, Roslev P, McDonald IR, et al. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3312-3318.
- [12] 张凡,余跃惠,舒福昌,等. 气库上方土壤中甲烷氧化菌群落研究—以大港油田板873储气库为例[J]. 石油天然气学报, 2010, 32(3): 364-368.
- [13] 刘晓宁,李珍,林国秀,等. 一株甲烷氧化菌的分离鉴定与特性[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1265-1271.
- [14] McDonald IR, Murrell JC. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 156(2): 205-210.
- [15] Zhang F, She YH, Zheng Y, et al. Molecular biologic techniques applied to the microbial prospecting of oil and gas in the Ban 876 gas and oil field in China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(4): 1183-1194.
- [16] 侯宇. 荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(6): 29-32.
- [17] Kolb S, Knief C, Stubner S, et al. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2423-2429.
- [18] Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(4): 611-622.
- [19] 袁志华,梅博文,余跃惠,等. 石油微生物勘探技术在西柳地区的应用[J]. 石油学报, 2002, 23(6): 29-31.
- [20] 袁志华,张玉清. 利用油气微生物勘探技术寻找页岩气有利目标区[J]. 地质通报, 2011, 30(2/3): 406-409.
- [21] 张驰宇,张高红,杨敏,等. 四步法消除 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 中引物二聚体的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(3): 387-392.
- [22] Zhang T, Fang HH. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70: 281-289.
- [23] 杜昕颖,孙宏迪,王玉飞,等. O1 群霍乱弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(5): 686-690.

- [24] 马莉, 谢秀兰, 岳华. 鸡 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(2): 73-75.
- [25] Stolyar S, Costello AM, Peeples TL, et al. Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath[J]. Microbiology, 1999, 145(5): 1235-1244.
- [26] 向廷生, 汪保卫. 油田地表土壤甲烷氧化菌的分离鉴定及活性测定[J]. 石油天然气学报(江汉石油学院学报), 2005, 27(2): 324-326.
- [27] 满鹏, 齐鸿雁, 呼庆, 等. 利用 PCR-DGGE 分析未开发油气田地微生物群落结构[J]. 环境科学, 2012, 33(1): 305-313.
- [28] Seghers D, Siciliano SD, Top EM, et al. Combined effect of fertilizer and herbicide applications on the abundance, community structure and performance of the soil methanotrophic community[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(2): 187-193.
- [29] Stiehl-Braun PA, Powlson DS, Poulton PR, et al. Effects of N fertilizers and liming on the micro-scale distribution of soil methane assimilation in the long-term Park Grass experiment at Rothamsted[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(5): 1034-1041.
- [30] Zheng Y, Zhang LM, Zheng YM, et al. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices[J]. Journal of Soils and Sediments, 2008, 8(6): 406-414.
- [31] 满鹏, 齐鸿雁, 呼庆, 等. 未开发油气田地表烃氧化菌空间定量分布[J]. 环境科学, 2012, 33(5): 1663-1669.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2014-00-00; 接受日期: 2014-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-00-00

(下转 p.1120)

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>