

野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌多样性研究

兰阿峰^{1,2}, 杨曼¹, 郭素芬^{1*}, 邓百万^{1,2}

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西汉中 723001)

摘要 [目的]了解野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌的组成及其多样性。[方法]提取野生秦岭羚牛瘤胃内容物总DNA, 选用产甲烷菌特异性引物 Met86F 和 Met1340R, 对总DNA进行16S rRNA 特异性扩增, 构建秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌16S rRNA 克隆文库, 对阳性克隆进行PCR-RFLP(限制性内切酶片段长度多态性)分析, 并对Hae III 酶切带谱不同的菌株进行测序, 构建系统发育树。[结果]根据酶切带谱分析和测序结果的不同, 将随机挑取的105个阳性克隆归为14个不同的可操作分类单元(OTUs)。系统发育分析表明, 这些克隆序列均位于广域古菌门(Euryarchaeota), 隶属甲烷杆菌科(Methanobacteriaceae, 65.71%)、Methanomassiliicoccus(29.52%)和Methanosarcinaceae(4.76%)3个科。其中有57个序列与可培养菌相似度在97%以上, 分属于Methanobrevibacter millerae、Methanobrevibacter olleyae 和Methanobrevibacter thaueri。其余48个序列与未培养菌相似度较高, 占11个OTUs。[结论]野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌多样性比较丰富, 且可能存在新的分类单元。

关键词 野生秦岭羚牛; 瘤胃; 产甲烷古菌; 分子多样性

中图分类号 S852.6; Q939 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)08-0088-04

Study on the Diversity of Methanogenic Archaea in the Rumen of Wild *Budorcas taxicolor bedfordi*

LAN A-feng^{1,2}, YANG Man¹, GUO Su-fen¹ et al (1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001; 2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong, Shaanxi 723001)

Abstract [Objective] To investigate the composition and diversity of methanogenic archaea in the rumen of wild *Budorcas taxicolor bedfordi*. [Method] Total DNA was extracted from rumen content of wild *B. taxicolor*. A pair of methanogenic archaea's specific PCR primers were used for 16S rRNA specific amplification and a clone library was constructed for the DNA samples. Positive clones were analyzed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and the clones with unique Hae III patterns were selected for sequencing and constructing 16S rRNA gene phylogenetic tree. [Result] Based on Hae III digestion and sequencing results, a total of 105 positive clones randomly screened from the library were classified into 14 operational taxonomic units (OTUs). Phylogenetic analysis showed that these clone sequences belonged to Euryarchaeota and they were divided into three families: Methanobacteriaceae, Methanomassiliicoccus and Methanosarcinaceae. The similarity between 57 sequences and cultured archaea was above 97% and they belonged to *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter olleyae* and *Methanobrevibacter thaueri*. Other 48 sequences had a higher similarity with uncultured archaea, containing 11 OTUs. [Conclusion] The methanogenic archaea in the rumen of wild *B. taxicolor* had an abundant diversity methanogens and there might be a new taxon.

Key words Wild *Budorcas taxicolor bedfordi*; Rumen; Methanogenic archaea; Molecular diversity

秦岭羚牛(*Budorcas taxicolor bedfordi*), 隶属偶蹄目牛科, 属于国家一级保护动物, 与大熊猫、金丝猴、朱鹮并称为“秦岭四宝”^[1]。野生秦岭羚牛可采食多种植物, 食物结构丰富^[2]。瘤胃是一个含有大量微生物的厌氧生态系统, 在反刍动物的食物消化与营养代谢中起着非常重要的作用^[3]。Wright等^[4]研究表明反刍动物瘤胃中含有细菌、古菌、原虫、真菌和病毒。瘤胃古菌主要是产甲烷菌(Methanogens), 产甲烷菌在清除瘤胃发酵过程中产生的氢气方面扮演着重要角色, 它能将氢气、甲酸、乙酸等转化成甲烷和CO₂, 并从中获取能量^[5]。目前瘤胃产甲烷菌的研究日益受到重视, 对其分子多样性的研究主要是通过古菌特异性引物进行16S rRNA的克隆分析^[6-8]。Wright等^[7]以引物Met86F和Met1340R对西澳大利亚绵羊瘤胃的产甲烷菌进行克隆, 发现Methanobrevibacter、Methanotorris 和Methanosphaera 3个属的产甲烷菌。裴彩霞等^[8-9]以3对产甲烷菌引物对晋南牛瘤胃产甲烷菌多样性进行了研究, 发现引物Met86F和Met1340R克隆较为全面, 又利用该引物研究了山羊瘤胃产甲烷菌, 发现甲烷短杆菌(Methanobrevibacter)为优势菌群。关于野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌的研究鲜见报道。笔者采用引物

Met86F和Met1340R对野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌的16S rRNA进行克隆并构建系统发育树, 分析其瘤胃产甲烷菌的多样性, 以期对瘤胃微生物多样性的研究提供数据支持, 也为更好地掌握瘤胃代谢和微生物相互之间的关系, 为合理应用饲料、开辟新的饲料资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料。采集野生秦岭羚牛瘤胃内容物, 冻存于-80℃冰箱待用。

1.1.2 主要仪器和试剂。凝胶扫描成像系统(美国Bio-rad)、高速冷冻离心机(Centrifuge 5424R, 德国Eppendorf)、PCR扩增仪(TC4000, 英国TECHNE)、核酸测定仪(Bio Photometer plus, 德国Eppendorf)、美国Mo Bio公司Ultra Clear® Fecal DNA Isolation Kit提取试剂盒、感受态细胞制备试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)、pMD19-T Vector (TaKaRa)、Sanprep柱式DNA胶回收试剂盒、PCR产物快速克隆试剂盒、Taq DNA聚合酶、PCR引物、X-gal、IPTG等试剂均购自上海生工。

1.2 瘤胃产甲烷古菌16S rRNA克隆文库的构建

1.2.1 材料的获得。试验材料取自陕西省佛坪自然保护区, 通过胃管采集野生秦岭羚牛瘤胃内容物, 冻存于-80℃冰箱待用。

1.2.2 总DNA提取。总DNA的提取按照Ultra Clear® Fe-

基金项目 陕西理工学院人才引进启动项目(SLGQD-8)。

作者简介 兰阿峰(1978—), 男, 陕西宜川人, 讲师, 博士, 从事肠道微生物多样性研究。

收稿日期 2017-11-13; **修回日期** 2017-11-16

cal DNA Isolation Kit 提取试剂盒说明书进行。

1.2.3 16S rRNA 扩增。产甲烷古菌 16S rRNA 通用引物的选择参考裴彩霞等^[8-9]和 Wright 等^[10]的研究,采用引物 Met86F(5'-GCTCAGTAACACGTGG-3')和 Met1340R(5'-CGGTGTGTGCAAGGAG-3')进行扩增,预期扩增长度在 1 260 bp 左右(含引物长度)。PCR 反应体系(50 μL)如下:2 × Taq Master Mix 25 μL,上、下游引物各 2 μL,模板 DNA 4 μL,ddH₂O 17 μL。PCR 反应程序如下:95 °C 5 min;94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 2 min,共 34 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选。Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒将扩增后 1 260 bp 左右的目的条带切胶纯化回收。纯化产物与 pMD-19T vector 连接,连接产物转化到大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,阳性克隆子的初步筛选参照文献[11]:将转化后的细胞涂布含氨苄青霉素(100 mg/L)、X-gal、IPTG 的 LB 琼脂平板 37 °C 避光培养 12~16 h 进行蓝白斑筛选。

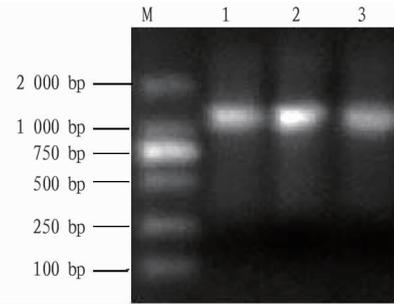
1.3 PCR-RFLP 分析 挑取阳性克隆子用 pMD19-T Vector 载体通用引物 M13-47 和 M13-48 对插入片段进行菌落 PCR 扩增,PCR 产物电泳检测对目标插入片段进一步进行验证。菌落 PCR 体系(20 μL):2 × Taq Master Mix 10 μL,上、下游引物各 1.5 μL,ddH₂O 6 μL,菌液 1 μL。菌落 PCR 反应程序:95 °C 5 min;94 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 1.5 min,共 34 个循环;72 °C 10 min。利用限制性内切酶 *Hae* III 对菌落 PCR 产物于 37 °C 下酶切 4 h,酶切体系(20 μL)如下:10 × Buffer 2 μL,*Hae* III 1 μL,PCR 产物 5 μL,ddH₂O 12 μL。酶切产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。酶切图谱用 Quantity One 软件进行分析,选取酶切带型不同的代表克隆对应的菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司,进行测序。将 *Hae* III 酶带谱切分析不同且测序结果也不同的克隆归为 1 个 OTUs。克隆文库覆盖率计算公式如下: $C = [1 - (n/N)] \times 100\%$ ^[12]。式中, n 代表在 16S rRNA 克隆文库仅出现一次的 OTU 数量, N 代表 16S rRNA 克隆文库的总数。

1.4 克隆文库发育分析 测序结果使用 DNAMAN 6.0 软件去除载体序列后提交到 NCBI 网络进行 Blast 检索^[13],下载同源性较高的模式菌株的数据,生成 Fasta 格式文件。使用 Clustal X 软件对所得序列进行人工校正及比对分析。利用 Mega 5 软件,按照 Neighbor-Joining 法聚类选择 1 000 个重复进行 Bootstrap 值分析后,构建系统发育树。将所得 16S rRNA 序列提交 GenBank 数据库,申请登陆号为 KM103518~KM103520 和 KM073422~KM073435。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取及 16S rRNA 特异性扩增 提取野生秦岭羚牛瘤胃内容物总 DNA,用产甲烷古菌 16S rRNA 通用引物进行特异性扩增,得到约 1 260 bp 的目标片段(图 1)。

2.2 PCR-RFLP 分析 从构建的 16S rRNA 克隆文库中随机挑选 150 个阳性克隆,以质粒通用引物进行菌落 PCR 扩



注:M. DL2000 Marker;1~3. 产甲烷古菌 16S rRNA 基因片段

Note:M. DL2000 Marker;1~3. 16S rRNA gene fragment of methanogens

图 1 野生秦岭羚牛瘤胃内产甲烷古菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification results of 16S rRNA gene fragment of methanogens from the rumen of wild *Budorcas taxicolor bedfordi*

增,扩增产物(大于 1 200 bp)用限制性内切酶 *Hae* III 进行插入目的片段的 RFLP 分析,挑选酶切带谱不同的克隆(共 118 个)送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序部测序。将测序结果去除嵌合序列,并排除重复序列后共得到 14 个 OTUs(代表 105 个有效序列)。根据公式,计算出克隆文库的覆盖率 C 为 97.1%,可以代表野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌的多样性。

2.3 产甲烷古菌 16S rRNA 系统发育分析 选取不同酶切带谱对应的阳性克隆进行测序,根据序列比对结果可将 105 个阳性克隆(去除嵌合体 and 重复序列)归为 14 个 OTUs。序列比对结果表明,这些序列均位于广域古菌门(Euryarchaeota),分属于 Methanobacteriaceae、Methanomassiliicoccus 和 Methanosarcinaceae 3 个科。54.29% (代表 57 个序列)的序列与可培养菌相似度在 97% 以上,分属于 *Methanobrevibacter millerae*(42 个序列)、*Methanobrevibacter olleyae*(12 个序列)和 *Methanobrevibacter thaueri*(3 个序列),相似度从 99.00% 到 96.91% 不等。另有 48 个序列与未培养菌相似度较高(与已培养菌的序列比对相似度低于未培养菌),分属 11 个 OTUs,其中 1 个 OTUs(DQ445723)所占比例最高(33.33%,代表 16 个序列),这 16 个序列与 DQ445723 的相似度从 97.27% 到 97.02% 不等。在所有序列(105 个序列)中,77 个序列的比对结果相似度在 97% 以上,占总序列的 73.33%(表 1)。

根据产甲烷古菌 16S rRNA 序列构建的系统发育树见图 2。由图 2 可知,系统发育树共分为 3 支,其中一支与甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter*)聚在一起,未培养古菌 G53 和 G98 也聚在这一支;另一支为未培养古菌,未能确定种属;G16 单独一支,与甲烷食甲基菌属(*Methanomethylovorans*)聚在一起,代表可能有新的操作分类单元。

3 结论与讨论

该研究获得了野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌的 16S rRNA 序列,序列比对结果表明甲烷短杆菌属为最优势菌群,占总克隆的 54.29%,与裴彩霞等^[9]的山羊瘤胃产甲烷杆

菌的研究结果相一致^[9]。克隆中有 48 个序列与未培养菌相似度较高,占 11 个 OTUs,未能确定种属;另有一个 OTUs 在发育树中形成独立分支。

表 1 野生秦岭羚牛产甲烷古菌 16S rRNA 序列比对结果

Table 1 Sequence alignment results of 16S rRNA of methanogenic archaea in the rumen of wild *Budorcas taxicolor bedfordi*

类群 Group	克隆数量 Clone numbers	代表克隆 Representative clones	最相似菌株 The most similar strains	相似度 Similarity // %
Methanobacteriaceae(68.57%)	42	G97	<i>Methanobrevibacter millerae</i> (AY196673)	98.89
	12	G2	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> (AY615201)	98.49
	3	G50	<i>Methanobrevibacter thaueri</i> (U55236)	99.00
	11	G53	Uncultured bacterium (DQ123883)	97.07
	3	G98	Uncultured bacterium (DQ402025)	96.50
	1	G134	Uncultured bacterium (EU413625)	96.79
	3	G4	Uncultured bacterium (DQ445723)	97.27
Methanomassiliicoccus(27.62%)	4	G59	Uncultured bacterium (EF055550)	98.65
	1	G17	Uncultured bacterium (AY995282)	97.37
	2	G125	Uncultured bacterium (DQ372972)	99.59
	3	G9	Uncultured bacterium (DQ123862)	95.94
	2	G112	Uncultured bacterium (DQ402028)	91.10
	1	G136	Uncultured bacterium (EF055546)	96.50
	4	G16	Uncultured bacterium (AJ606403)	95.39

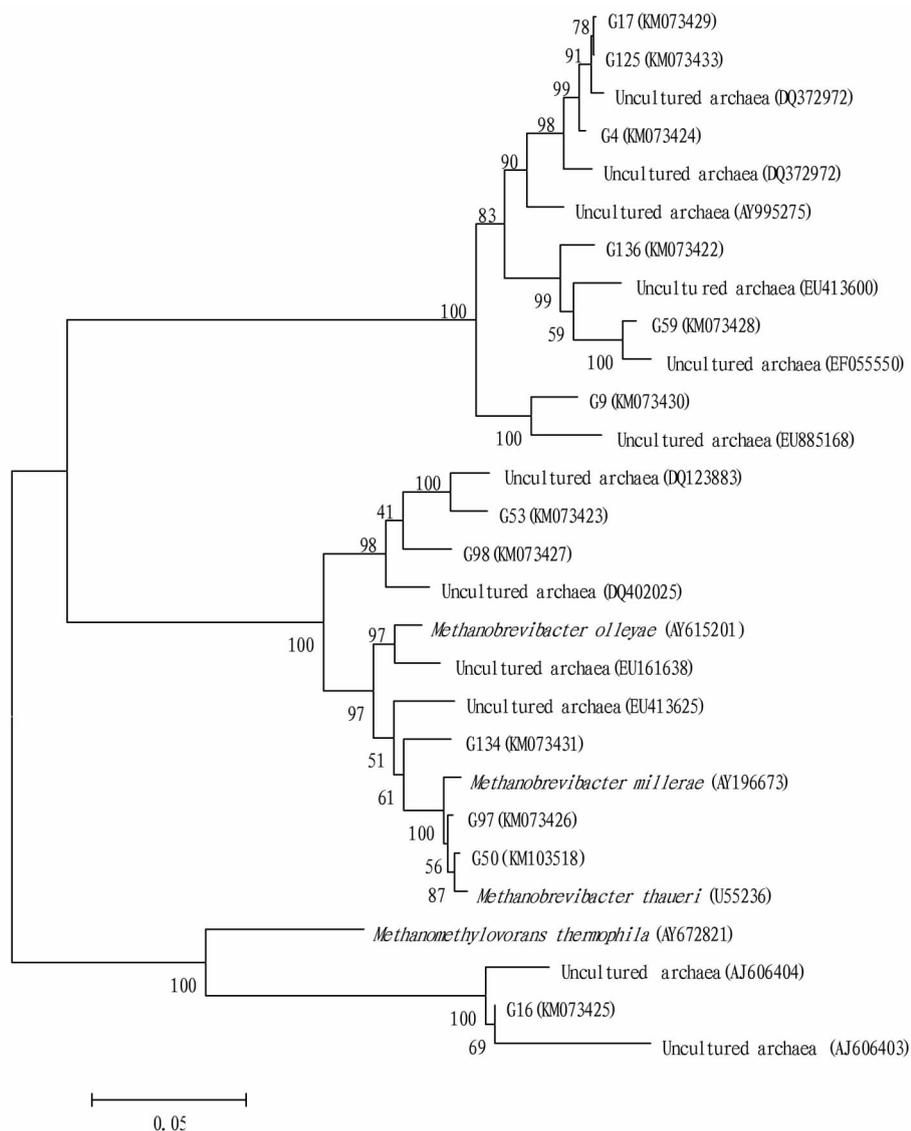


图 2 野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌 16S rRNA 克隆文库系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis based on 16S rRNA gene clone library of methanogenic archaea in the rumen of wild *Budorcas taxicolor bedfordi*

综合比较目前的研究报道发现,许多研究出现相同试验对象,不同试验所获得的瘤胃产甲烷菌的多样性不同,笔者认为其结果主要是由以下原因造成的:①引物的不同造成克隆多样性的不同。目前对瘤胃产甲烷菌的分子多样性的研究对象主要有山羊^[9,14]、绵羊^[15-16]和奶牛^[17-18]等。Tajima等^[6]对荷斯坦奶牛瘤胃产甲烷菌的多样性进行探究,结果表明引物 0025cF/1429R 较引物 D30/D33 探测到的产甲烷菌多样性多。裴彩霞等^[9]研究表明引物 Met86F 和 Met1340R 克隆比其他 2 对引物(1Af/1100Ar 和 Arch364/Archr1386)较为全面。引物的不同导致克隆多样性也有所区别。引物退火温度及扩增效率的不同,引物结合部位周围的结构以及不同扩增模板的特性都会导致不同引物优先扩增的菌群不同,因而造成多样性的差异。因此,对于羚牛瘤胃产甲烷古菌的多样性,还需用不同引物进行研究。②动物所采食日粮的不同,造成瘤胃内微生物的组成不同^[15,19]。日粮可能通过影响瘤胃发酵类型等因素对瘤胃微生物多样性和数量产生影响。该试验中羚牛是在陕西佛坪自然保护区内自然放牧,取得瘤胃内容物的时间是冬季,其野生状态及取样时间同样是影响其瘤胃内产甲烷菌多样性的重要因素。

参考文献

- [1] 麻应太,王西峰. 秦岭羚牛资源现状与保护[J]. 陕西林业科技, 2008 (2): 80-83.
- [2] 曾治高,宋延龄,钟文勤,等. 秦岭羚牛的食性[J]. 动物学杂志, 2001, 36 (3): 36-44.
- [3] KOIKE S, KOBAYASHI Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 204(2): 361-366.
- [4] WRIGHT A D G, KLIEVE A V. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? [J]. Animal feed science & technology, 2011, 166/167(7): 248-253.

(上接第 79 页)

业经济活动,林地有所增加,全区呈点状分布。

自然与人类社会共同造就了现今的土地覆盖/利用格局,在社会经济迅速发展,城市面貌日新月异的当代中国,历史与变革造就了复杂的土地覆盖/利用模式,其变化紧密联系生态环境与经济发展整个过程,而且我国的政策(如新农村建设^[16])向来对这种格局造成严重影响。笔者基于 RS 与 GIS 技术,结合土地覆盖/利用变化的内外驱动力分析,以变化的视角进行探讨,是实现我国快速城市化背景下人与生态环境和谐发展的有效途径。

参考文献

- [1] FOLEY J A, DEFRIES R, ASNER G P, et al. Global consequences of land use [J]. Science, 2005, 309(5734): 570-574.
- [2] LI X B. A review of the international researches on land use/land cover change [J]. Acta geographica sinica, 1996, 51(6): 553-558.
- [3] PIELKE R A. Land use and climate change [J]. Science, 2005, 310(5754): 1625-1626.
- [4] 黄波,赵涌泉. 多源卫星遥感影像时空融合研究的现状及展望[J]. 测绘学报, 2017, 46(10): 1492-1499.
- [5] 姜毅,季相星. 基于遥感影像的连云港市生态环境质量状况[J]. 污染

- [5] 艾丹,郭春华,尹永志,等. 16S rRNA 指纹分析技术在瘤胃微生物研究中的应用[J]. 饲料研究, 2011(2): 10-12.
- [6] TAJIMA K, NAGAMINE T, MATSUI H, et al. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 200(1): 67-72.
- [7] WRIGHT A D G, WILLIAMS A J, WINDER B, et al. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia [J]. Applied and environmental microbiology, 2004, 70(3): 1263-1270.
- [8] 裴彩霞,毛胜勇,朱伟云. 晋南牛瘤胃中古菌分子多样性的研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(1): 8-14.
- [9] 裴彩霞,毛胜勇,朱伟云. 山羊瘤胃产甲烷古菌多样性及与其他动物瘤胃的比较[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(6): 909-914.
- [10] WRIGHT A D G, PIMM C. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S ribotyping [J]. Journal of microbiological methods, 2003, 55(2): 337-349.
- [11] INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids [J]. Gene, 1990, 96(1): 23-28.
- [12] GOOD I J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters [J]. Biometrika, 1953, 40(3/4): 237-264.
- [13] 张晶晶,兰阿峰,邓百万,等. 红豆杉免培养内生细菌多样性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(5): 766-774.
- [14] REGENSBOGENOVA M, MCEWAN N R, JAVORSKY P, et al. A re-appraisal of the diversity of the methanogens associated with the rumen ciliates [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 238(2): 307-313.
- [15] WRIGHT A D G, TOOVEY A F, PIMM C L. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea [J]. Anaerobe, 2006, 12(3): 134-139.
- [16] YANAGITA K, KAMAGATA Y, KAWAHARASAKI M, et al. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicromobium mobile* by fluorescence *in situ* hybridization [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2000, 64(8): 1737-1742.
- [17] WHITFORD M F, TEATHER R M, FORSTER R J. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen [J]. BMC Microbiology, 2001, 1(1): 1-5.
- [18] TAJIMA K, NAGAMINE T, MATSUI H, et al. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 200(1): 67-72.
- [19] 冯仰廉. 反刍动物营养学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 1-130.

防治技术, 2017, 30(5): 11-15.

- [6] 刘康,覃帮勇,牟伶俐,等. 基于多时相遥感影像的围填海动态监测与变化分析:以辽宁省部分沿海县市为例[J]. 海洋环境科学, 2017, 36(6): 911-917.
- [7] 郭程轩,徐颂军,巫细波. 基于地统计学的佛山市土地利用变化驱动力时空分异[J]. 经济地理, 2009, 29(9): 1524-1529.
- [8] 张建平,朱教君,闫巧玲,等. 基于决策树的科尔沁沙地土地利用/覆盖变化监测[J]. 生态学杂志, 2009, 28(9): 1730-1736.
- [9] 崔伟宏,史文中,李小娟. 基于特征的时空数据模型研究及在土地利用变化动态监测中的应用[J]. 测绘学报, 2004, 33(2): 138-145.
- [10] 肖亮明,陈建忠. 无人机航测技术在国土资源管理中的应用[J]. 测绘地理信息, 2017, 42(5): 96-99.
- [11] 宋学森,王蕊,熊雨杰,等. 基于遥感影像的汉寿县土地覆盖动态监测[J]. 环境与可持续发展, 2017, 42(5): 163-164.
- [12] 杨爽,冯晓明,陈利顶. 土地利用变化的时空分异特征及驱动机制:以北京市海淀区、延庆县为例[J]. 生态学报, 2009, 29(8): 4501-4511.
- [13] 顾康康,刘景双,窦鑫磊. 辽中地区矿业城市土地利用变化[J]. 生态学杂志, 2007, 26(8): 1265-1270.
- [14] 赵倩,张小平,袁永坤,等. 1997~2007年上海市青浦区河道表层水氮元素污染特征及其社会经济驱动因子分析[J]. 复旦学报(自然科学版), 2009, 48(5): 604-609.
- [15] 马红利. 基于 RS 和 GIS 的富平县城镇空间扩张演变规律及其驱动力分析[J]. 测绘与空间地理信息, 2017, 40(9): 146-149.
- [16] 龙花楼,刘彦随,唐国平,等. 昆山市土地利用变化与新农村建设[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2007, 43(6): 790-796.