

基于高通量测序的三七微生物群落结构特征分析

刘珍珍¹, 谷萌萌¹, 张 臣¹, 马明莉¹, 朱润琪², 马 轩³, 许妍妍¹, 陈 辰¹, 叶晓婉¹, 席 宇¹, 朱大恒^{1*}

1. 郑州大学生命科学学院, 河南 郑州 450000

2. 华中科技大学药学院, 湖北 武汉 430000

3. 郑州安图生物工程有限公司, 河南 郑州 450000

摘 要: 目的 获得鲜三七和干三七菌群结构信息。方法 以鲜三七和干三七为研究材料, 利用 Illumina MiSeq 平台, 采用高通量测序并进行数据分析。结果 鲜三七和干三七共获得 637 个操作分类单元 (OTUs), 其中 15 个 OTU 为共有, 鲜三七和干三七特有的 OTU 数量分别为 484、123 个。新鲜三七中占比较大的菌门为变形菌门 (Proteobacteria, 59.7%)、厚壁菌门 (Firmicutes, 40.1 %); 干三七中占比较高的菌门为厚壁菌门 (Firmicutes, 99.8%)。鲜三七中占比较大的菌属为肠杆菌属 (*Enterobacter*, 37.4%)、嗜碱菌属 (*Alkaliphilus*, 11.5%); 干三七中占比较大的菌属是芽孢杆菌属 (*Bacillus*, 54.6%), 类芽孢杆菌 (*Paenibacillus*, 44.9%)。KEGG 功能预测表明干三七的萜类化合物和聚酮类化合物代谢功能菌群的相对丰度高于鲜三七。结论 鲜三七菌群多样性高于干三七; 干三七中的萜类化合物和聚酮类化合物代谢功能菌群丰富度高于鲜三七, 这为三七发酵皂苷菌株筛选提供了重要参考。

关键词: 鲜三七; 干三七; 多样性; 功能菌群; Illumina MiSeq

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)01-0204-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.027

Analysis of microbial community characteristics of *Panax notoginseng* based on high-throughput sequencing technology

LIU Zhen-zhen¹, GU Meng-meng¹, ZHANG Chen¹, MA Ming-li¹, ZHU Run-qi², MA Xuan³, XU Yan-yan¹, CHEN Chen¹, YE Xiao-wan¹, XI Yu¹, ZHU Da-heng¹

1. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

2. College of Pharmacy, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China

3. Zhengzhou Antu Biological Engineering Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective The purpose of this study was to obtain the bacterial communities structures of fresh and dry *Panax notoginseng*. **Methods** The bacterial were sequenced by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology, and the biological information was analyzed. **Results** A total of 637 OTUs were obtained, of which 15 were in common, 484 were from fresh *P. notoginseng* and 123 were from dry *P. notoginseng* respectively. The larger phylum of fresh sample was Proteobacteria (59.7%) and Firmicutes (40.1%) while the dry sample were Firmicutes (99.8%). The main genus of fresh sample was *Enterobacter* (37.4%) and *Alkaliphilus* (11.5%), while dry sample were *Bacillus* (54.6%) and *Paenibacillus* (44.9%). The functional prediction of KEGG showed that the population of bacteria metabolizing terpenoids and polyketones of dry sample was higher than that of fresh sample. **Conclusion** The diversity of microbiota in fresh *P. notoginseng* was higher than that of dry sample; The species with the metabolic function of interpenoids and polyketones of dry *P. notoginseng* was higher than that of fresh sample, which provides an important reference for screening the microorganism for biotransformation of saponins in *P. notoginseng*.

Key words: fresh *Panax notoginseng*; dry *Panax notoginseng*; diversity; functional microbiota; Illumina MiSeq

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 又名 人参属植物^[1]。其药用记载要追溯到 600 年前^[2]。田七、滇三七、参三七等, 在分类学上属于五加科 三七是我国药用历史较长的名贵中药, 具有活血通

收稿日期: 2019-05-03

基金项目: 河南省教育厅重点科研项目: 三七内生菌分离筛选及其在药渣皂苷生物合成中的应用 (19A180031)

作者简介: 刘珍珍 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中草药内生菌。Tel: 15736990257 E-mail: 2461083769@qq.com

*通信作者 朱大恒, 男, 教授, 研究方向为中草药内生菌与生物转化。E-mail: zhudaheng2000@aliyun.com

络、软化血管、降血压、调血脂、提高免疫力等功效^[3-5]；是云南白药、复方丹参滴丸、复方三七口服液等中药的主要成分。现在以三七为配方进入《国家基本药物目录》的中药制剂已经有 20 多种^[6]。

三七内含有的有药用价值的成分主要是皂苷类化合物^[6]，对三七皂苷的研究一直是三七研究的重点。迄今为止，从三七中发现的皂苷类化合物已有 80 余种，这个数字仍在不断增加。三七中各种皂苷成分的含量受很多因素如种植的环境、气候、干燥加工等的影响，其中三七的干燥流程是三七生产环节中非常重要的一部分。干燥过程对三七中皂苷含量的影响已有一些文献报道^[7-10]。干制过程无疑也会影响到三七中微生物菌群的变化，但有关干制过程对三七微生物菌群的影响尚未见文献报道。

微生物与宿主植物相互作用合成的化合物往往可能是新化合物，这些化合物中常具有新的生物活性的骨架，在生理活性物质研究中往往可以作为先导化合物，对医药、农药和兽药等方面的开发具有十分重要的意义^[11-13]。这是一个潜力巨大、尚待开发的微生物新资源。微生物菌群可以在生长代谢过程中通过许多特有的生理生化反应提供很多种酶类，催化药材内部的药用成分不断转化，利用微生物发酵转化三七皂苷、人参皂苷，提高药用活性已引起关注^[14-16]。因此研究三七药材微生物菌群以及干制对群落特征的影响，将为进一步探索三七药材微生物菌群对活性成分的合成、转化机制提供理论依据，同时为揭示三七药材微生物菌群多样性、筛选功能菌、功能基因、皂苷生物转化奠定基础。

高通量测序技术相对于传统的 Sanger 测序技术而言，对加速生物学的研究有显著的推动作用，已经广泛运用于微生物菌群多样性研究分析^[17-18]。目前用于微生物群落多样性研究的高通量测序平台有罗氏公司的 454 法、ABI (applied biosystems) 公司的 SOLiD (supported oligo ligation detection) 法和 Illumina 公司的 Solexa 法。本实验利用 Illumina MiSeq 平台，对鲜三七和晾干后三七的菌群进行差异探究，了解其菌群优势，旨在了解三七药材菌群多样性、探索新鲜三七和干燥三七菌群结构及功能差异，为三七药材菌群资源开发、皂苷生物转化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜三七块根和干三七块根购自云南文山种植

基地，经郑州大学朱大恒教授鉴定为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen。QIAamp DNA Mini kit (Qiagen 公司)；Q5 高保真 DNA 聚合酶 (NEB 公司)；AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen 公司)；荧光试剂 (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 公司)。

1.2 微生物组总 DNA 提取

鲜三七、干三七经流水洗去表面泥土，采用 QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) 进行总 DNA 提取，通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量，采用紫外分光光度计对 DNA 进行定量。

1.3 目标片段 PCR 扩增及测序文库制备

PCR 扩增采用 NEB (New England Biolabs) 公司的 Q5 高保真 DNA 聚合酶，以微生物核糖体 RNA 等能够反映菌群组成和多样性的目标序列为靶点，根据序列中的保守区域设计相应引物并添加样本特异性 Barcode 序列，进而对 rRNA 基因可变区 (单个或连续的多个) 或特定基因片段进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测，并对目标片段进行切胶回收，回收采用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen 公司)。参照电泳初步定量结果，将 PCR 扩增回收产物进行荧光定量 (荧光试剂，Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit)。根据荧光定量结果，按照每个样本的测序量需求，对各样本按相应比例进行混合后制备测序文库。

1.4 高通量测序

由上海派森诺科技股份有限公司测序及数据分析。

2 结果与分析

2.1 OTU (operational taxonomic units) 划分和分类地位鉴定

对原始序列进行筛选处理后，得到鲜三七有效序列 40 912 条，干三七有效序列 55 446 条，所得到的有效序列长度基本都在 400 bp 以上，说明目标序列的分离和扩增都比较稳定。使用 QIIME (quantitative insights into microbial ecology) 软件，调用 UCLUST 序列比对工具 (Edgar, 2010)，对前述获得的序列按 97% 的序列相似度进行归并和 OTU 划分^[19-20]。由表 1 可知鲜三七在各分类水平的 OTU 数均大于干三七，从 Venn 图 (图 1) 中可以清楚地发现干三七和新鲜三七的共有 OTU 有 15 个，新鲜三七的菌群中独有的 OTU 为 484 个，是干三七 OTU 的 3.93 倍。鲜三七的多样性高于干三七，

表 1 OTU 划分和分类地位鉴定结果统计

Table 1 Statistical table of OTU division and classification status identification results

样品	OUT 数						
	门	纲	目	科	属	种	未分类
鲜三七	499	499	498	498	479	177	0
干三七	138	138	138	138	124	12	0

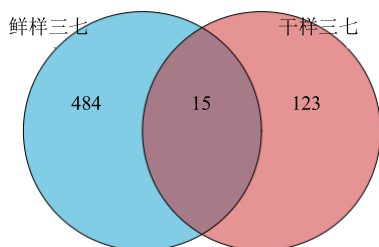


图 1 共有 OTU 的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of common OTU

且鲜三七和干三七都具有自己独有的菌群。

2.2 α 多样性分析

由图 2 可以得出在测序条数达到 20 000 条以上时稀释性曲线趋向平稳,表明测序数据量合理,能够代表物种的丰富度^[21]。由表 2 可知新鲜三七菌群的 Chao1 和 ACE 指数为 499.00,而干三七菌群的这 2 个指数为 172.87 和 187.98,说明新鲜三七群落的丰富度要远高于干三七的群落丰富度;而且新鲜三七群落的 Shannon 指数为 5.98,干三七群落的 Shannon 指数为 2.05,前者远远高于后者。从 Simpson 多样性指数来看,新鲜三七群落的 Simpson 指数为 0.96,而干三七的群落的 Simpson 指数为 0.61。由这 4 个指数分析可以得出新鲜三七的群落丰度和多样性显著高于干三七。

2.3 各水平分类学组成分析

2.3.1 各分类水平的微生物类群数统计 根据鉴定

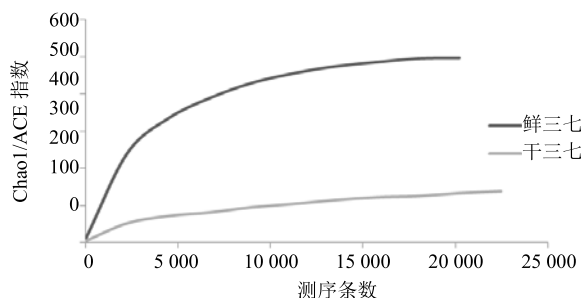


图 2 OTU 数的稀疏曲线

Fig. 2 Sparse graph of OTU number

表 2 菌群微生物多样性指数

Table 2 Index table of microbial diversity

样本	Chao1	ACE	Simpson	Shannon
鲜三七	499.00	499.00	0.96	5.98
干三七	172.87	187.98	0.61	2.05

结果,可以获得每个样本在各个分类水平的具体物种组成(表 3),并从不同的深度分析菌落的组成结构。门水平上鲜三七和干三七群落数一样,纲水平上鲜三七群落数多于干三七,目水平上鲜三七群落数是干三七的 1.83 倍,科、属、种水平上鲜三七群落数分别是干三七的 1.92、2.33 和 4.92 倍。

2.3.2 群落结构分析 从门的水平来看(图 3),2 个样品细菌主要归属为 2 个门,厚壁菌门(70.0%)和变形菌门(29.9%)。新鲜三七中的占比较大的菌门为变形菌门(59.8%)、厚壁菌门(40.1%)。干三七中占比较高的菌门为厚壁菌门(99.8%)。鲜三七中厚壁菌门和变形菌门为优势门类,干三七中厚壁

表 3 各分类水平的微生物类群数统计

Table 3 Statistics of number of microbiological groups at various levels

样品	门	纲	目	科	属	种
鲜三七	3	5	11	23	56	59
干三七	3	4	6	12	24	12

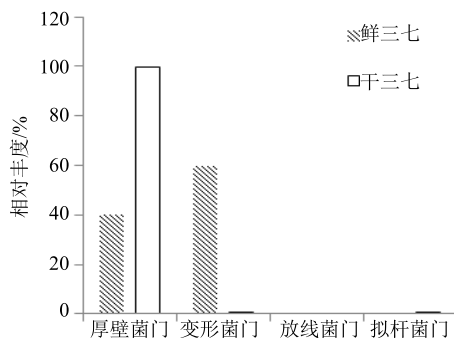


图 3 三七门水平群落组成

Fig. 3 Histogram of phylum community composition

菌门为优势门类。

从纲的水平来看(图 4), 2 个样品中细菌主要归属于 3 个纲, 鲜三七中占比较大的纲属为变形菌纲(Gammaproteobacteria, 59.7%), 梭状芽胞杆菌纲(Clostridia, 27.4%)。干三七中占比较大的菌纲是芽孢杆菌纲(Bacilli, 99.7%)。

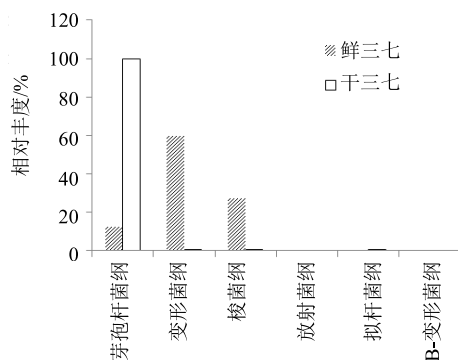


图 4 三七纲水平群落组成

Fig. 4 Histogram of class community composition

从目的水平来看(图 5), 2 个样品中细菌主要归属于 5 个目, 鲜三七中占比较大的菌目为肠杆菌目(Enterobacter, 51.7%), 梭菌目(Clostridiales, 27.4%)。干三七中占比较大的菌属是芽孢杆菌目(Bacillus, 99.7%)。

从科的水平来看(图 6), 2 个样品中细菌主要归属于 20 个科, 比例较高的是芽孢杆菌科(Bacillus, 56.2%)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae, 51.8%)、类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae, 45.8%)。鲜三七中占比较大的菌科为肠杆菌科(Enterobacteriaceae, 51.7%)、梭菌科(Clostridiaceae, 11.5%)。干三七中占比较大的菌科是类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae, 45.1%)。此外, 鲜三七特有的菌科为假单胞菌科(Pseudomonadaceae, 2.0%)、动球菌科(Planococcaceae, 1.7%)。

从属的水平来看(图 7), 2 个样品中细菌主要归属于 4 个属, 鲜三七中占比较大的菌属为肠杆菌属(Enterobacter, 37.4%)、Hoki Horikoshi 定义的嗜碱菌属(Alkaliphilus, 11.5%); 干三七中占比较大的菌属是芽孢杆菌属(Bacillus, 54.6%), 类芽孢杆菌(Paenibacilli, 44.9%)。

2.4 菌群代谢功能预测

使用 PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 菌群代谢功能预测工具, 通过 16 S rRNA 基

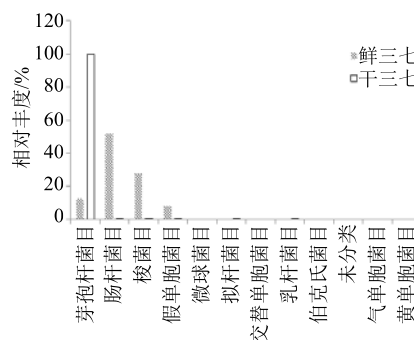


图 5 三七目水平群落组成

Fig. 5 Histogram of order community composition

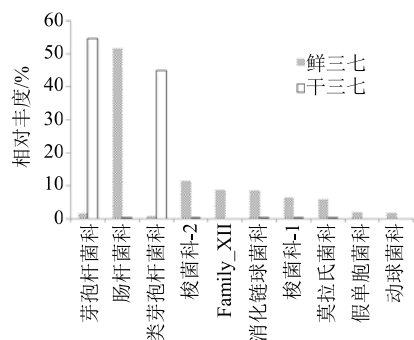


图 6 三七科水平群落组成 (前 10 科类)

Fig. 6 Histogram of family community composition (top 10)

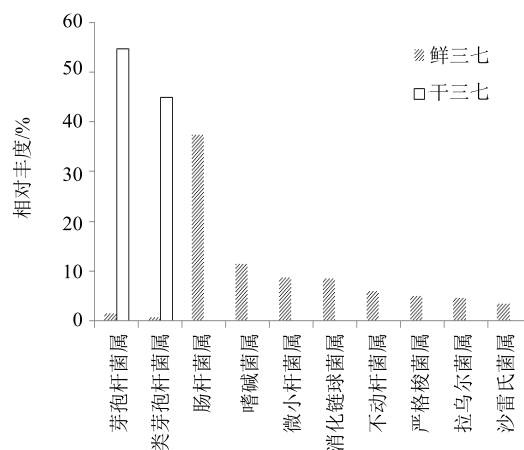


图 7 三七属水平群落组成 (前 10 属类)

Fig. 7 Histogram of genus community composition (top 10)

因的测序结果比对 KEGG (京都基因与基因组百科全书) 数据库, 进行菌群代谢功能的预测。由图 8 可知, 在三七样品中, 具有跨膜运输(membrane transport)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)代谢功能的类群丰度最高, 其相对丰度在 0.08 以上,

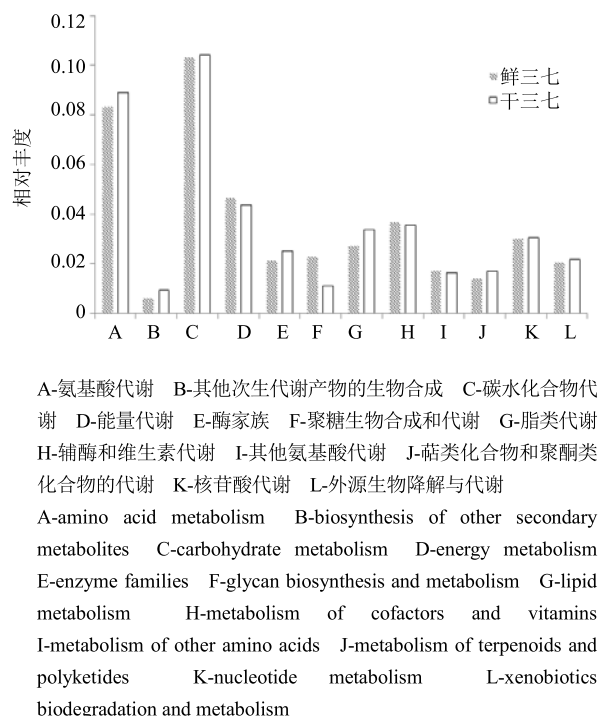


图 8 PICRUSt 预测的 KEGG 第 2 等级分布

Fig. 8 KEGG second grade distribution predicted by PICRUSt

表明无论是新鲜三七还是干三七中各种内生菌生理状态较为活跃。在鲜三七中,有关协同因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)功能、能量代谢(energy metabolism)功能、聚糖生物合成和代谢(glycan biosynthesis and metabolism)功能的类群丰度高于干三七,表明新鲜三七有机物质正在不断合成积累。在干三七中,具有脂质代谢(lipid metabolism)功能、酶家族(enzyme families)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism)功能的类群丰度高于鲜三七,这说明干燥后的三七有机物质已经积累完成。三七内含有的有重要药用价值的成分—皂苷类化合物,为萜类化合物,干三七中萜类化合物和聚酮化合物的代谢功能(metabolism of terpenoids and polyketides)的类群丰度高于鲜三七,这为三七发酵有益菌筛选提供了重要参考。

3 讨论

近年来,高通量测序技术已广泛应用到环境、生物、食品等微生物群落多样性研究中,如浮游细菌^[21]、腊肉^[22]、豆豉^[23]、传统酸奶^[24]等,这种技术为从分子水平准确、高效研究微生物群落结构提供了新的研究手段^[25],已成为中草药微生物菌群资源研究的热点,如石斛、黄芪等^[26-28]。本实验采用 Miseq 高

通量测序技术,首次对新鲜三七和干三七的菌群进行了 16 S rDNA 分子鉴定,较为系统地揭示了三七的群落结构,初步了解鲜三七菌群与干三七菌群的差异,目前尚未见有相关研究报道。

OTU 划分、稀疏曲线、多样性指数表明测序能全面表示三七物种丰富度,分析表明鲜三七的群落丰富度及多样性均大于干三七。群落结构分析显示,在门、纲、目、科、属分类上,鲜三七的丰富度均大于干三七,如在属水平上,鲜三七有 32 个属,干三七为 5 个属,这可能与三七在干燥过程中,经历 50 ℃ 左右高温、干燥处理过程有关;在温度、水分等气热环境变化中,三七微生物菌群结构、优势菌群也发生了相应变化;一部分菌群被破坏、消减,导致干三七丰富度及多样性减少,如肠杆菌属 *Enterobacter*、嗜碱菌属 *Alkaliphilus* 在干燥后基本消失;同时,温度、水分等气热环境变化也使较耐热的芽孢杆菌属 *Bacillus*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* 得到富集,成为干三七的优势菌群。芽孢杆菌属多为益生菌,因此干三七菌群结构更适宜于口服三七粉的制备。从菌群代谢功能分析看,鲜三七与干三七存在差异,干三七合成萜类化合物的群落相对丰度高于鲜三七,更适合于从中分离、纯化皂苷发酵菌株。另一方面,与常规菌群分离方法相比,本研究较全面掌握了三七菌群结构组成多样性,这将为有目的地采用选择培养技术从三七中分离筛选目标菌株提供了菌源信息和理论依据。

参考文献

- [1] 王文采, 梁方文. 《中国高等植物图鉴》编写简史 [J]. 生命世界, 2013(9): 40-41.
- [2] 马金双, 于海英. 中国五加科药用植物资源 [J]. 中草药, 1989, 20(11): 41-44.
- [3] 夏鹏国, 崔秀明, 韦美膺, 等. 三七的生物学特性研究进展 [J]. 中药材, 2012, 35(5): 831-835.
- [4] 陆晓菊. 三七连作障碍土壤微生物多样性研究 [D]. 昆明: 云南师范大学, 2015.
- [5] 居乃香, 孙 静. 三七药理作用的研究进展 [J]. 北方药学, 2014, 11(11): 90-91.
- [6] 夏鹏国, 张顺仓, 梁宗锁, 等. 三七化学成分的研究历程和概况 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2564-2570.
- [7] 张晓倩, 张秀云, 王伟楠, 等. 三七热压处理后皂苷类成分变化研究 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(3): 195-198.
- [8] 马 妮, 高明菊, 周家明, 等. 不同干燥方法对三七切

- 片皂苷含量的影响 [J]. 特产研究, 2010, 32(3): 40-42.
- [9] 高明菊, 冯光泉, 曾鸿超, 等. 微波干燥对三七皂苷有效成分的影响 [J]. 中药材, 2010, 33(2): 198-200.
- [10] 杨海峰, 武惠斌, 刘 洋, 等. 三七不同加工工艺对其生理指标的影响研究 [J]. 吉林农业, 2011(2): 52-53.
- [11] 张 鹏. 板蓝根发酵制剂对断奶仔猪生产性能和免疫指标的影响 [D]. 沈阳: 东北农业大学, 2013.
- [12] 董建伟, 蔡 乐, 李雪娇, 等. 中药材的微生物发酵改性研究进展 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2018, 40(6): 1207-1212.
- [13] 张 文, 韩广泉, 王 凯, 等. 乳酸菌对中草药的发酵及抑菌活性检测 [J]. 饲料博览, 2014(1): 4-7.
- [14] 赵方允, 虞 泓, 陈自宏, 等. 三七中分离微生物对其转化的初步研究 [J]. 医学研究杂志, 2011, 40(8): 47-50.
- [15] 韩 颖. 土壤微生物转化三七茎叶资源化利用的研究 [D]. 沈阳: 东北大学, 2008.
- [16] 杨婧娟. 三七总皂苷的发酵辅助提取及其活性评价 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [17] Delseny M, Han B, Hsing Y. High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution [J]. *Plant Sci*, 2010, 179(5): 407-422.
- [18] 金 明. 土壤微生物多样性分析方法的研究进展 [J]. 农业技术与装备, 2016(4): 18-20.
- [19] Blaxter M, Mann J, Chapman T, *et al*. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1462): 1935-1943.
- [20] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [21] 张 菲, 田 伟, 孙 峰, 等. 丹江口库区表层浮游细菌群落组成与 PICRUST 功能预测分析 [J]. 环境科学, 2019, 40(3): 1252-1260.
- [22] 王玉荣, 廖 华, 赵慧君, 等. 基于 PCR-DGGE 与高通量测序技术的恩施地区腊肉细菌多样性评价 [J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 208-213.
- [23] 谭强来, 曾 臻, 吴兰兰, 等. 基于高通量测序的江西特色发酵豆豉中微生物群落多样性及其特征分析 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 85-89.
- [24] 玛依乐·艾海提, 西热娜依·阿布力克木, 努尔古丽·热合曼. 应用高通量测序法检测新疆传统酸奶中微生物多样性 [J]. 食品科学, 2018, 39(20): 126-131.
- [25] Galhano V, de Figueiredo D R, Alves A, *et al*. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (*Cyanobacteria*, *Nostocales*) isolated from Portuguese freshwater habitats [J]. *Hydrobiologia*, 2011, 663(1): 187-203.
- [26] 张培良, 王国凯, 梁益敏, 等. 利用 GSS 高通量测序技术分析不同生境下霍山石斛内生真菌菌落的分布 [J]. 安徽中医药大学学报, 2018, 37(1): 77-82.
- [27] 袁学刚, 叶 羊, 赵甲元, 等. 基于高通量测序分析连翘溶液发酵炮制过程中真菌菌群多样性变化 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4259-4268.
- [28] 刘蓬蓬, 陈江宁, 孟 莉, 等. 基于 Illumina MiSeq 高通量测序分析黄芪内生细菌多样性 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2640-2645.