

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20120051302040

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

南海西部海域沉积物细菌多样性的初步研究

Preliminary Study on the Bacterial Diversity in the Sediments of
Western Area in South China Sea

张国政

指导教师姓名: 郑天凌 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2009年8月

论文答辩时间: 2009年9月

学位授予日期: 2009年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009年08月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人:

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

声明人：

年 月 日

目 录

摘 要.....	i
Abstract.....	ii
第一章 绪论.....	1
1.1 海洋细菌研究概况.....	1
1.2 海洋细菌的活性及其群落结构与功能.....	2
1.3 微生物群落结构分析方法的发展.....	3
1.3.1 传统微生物纯培养技术的局限性.....	3
1.3.2 微生物培养技术的改进策略.....	4
1.4 微生物分子生态学涉及的主要研究方法.....	6
1.4.1 标记核酸探针杂交技术.....	6
1.4.2 基于 PCR 技术的研究方法.....	7
1.4.3 微生物基因组中特异 DNA 片段的序列分析.....	9
1.4.4 DNA 扩增片段电泳检测技术.....	9
1.4.5 环境基因组 DNA 提取方法.....	10
1.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术及其应用.....	10
1.5.1 DGGE 基本原理及其在微生物群落结构分析中的应用.....	10
1.5.2 DGGE 技术在微生物生态学研究中的应用.....	12
1.5.3. DGGE 技术自身存在的不足及实验控制.....	14
1.6 对南海西部海域沉积物细菌进行研究的意义.....	14
第二章 材料与方法.....	16
2.1 材料.....	16
2.1.1 样品采集.....	16
2.1.2 菌株和质粒.....	16
2.1.3 主要试剂.....	17
2.1.4 试剂盒和工具酶.....	17
2.1.5 引物.....	17
2.1.6 主要仪器.....	18
2.1.7 培养基.....	19
2.1.8 溶液配制.....	20
2.1.9 分析软件.....	22
2.2 方法.....	22

2.2.1 沉积物中细菌的培养和分离纯化.....	22
2.2.2 液体培养后细菌多样性检测.....	23
2.2.3 平板培养后细菌鉴定.....	26
2.2.4 产物的回收和测序.....	26
2.2.5 感受态细胞的制备.....	29
第三章 结果与讨论.....	31
3.1 沉积物中细菌多样性分析.....	31
3.2 沉积物中细菌的鉴定.....	32
3.2.1 DNA 提取、扩增及 RFLP 分型.....	32
3.2.2 细菌生理生化实验结果.....	36
3.2.3 基于 16SrDNA 序列的同源性分析以及系统发育树的构建.....	38
3.3 结论与展望.....	41
参考文献.....	42
附 录.....	48
附录 1 16S rDNA 测序结果.....	48
附录 2 DNA 分子量标准.....	61
附录 3 缩略语对照表.....	62
附录 4 攻硕期间参加的科研项目.....	63
附录 5 攻硕期间发表及待发表论文.....	63
致 谢.....	64

Contents

Abstract(In Chinese)	i
Abstract(In English)	ii
1 Introduction	1
1.1 General situation on marine bacteria	1
1.2 Marine bacteria community structure and its ecological function	2
1.3 Progress in researches of bacteria community structure	3
1.3.1 Limitation of traditional pure culture technique.....	3
1.3.2 Improved strategies of microbial culture technique	4
1.4 Application of molecular ecology techniques and methods.....	6
1.4.1 Molecular hybridization	6
1.4.2 Genetic fingerprinting techniques based on PCR.....	7
1.4.3 Sequence analysis of special DNA fragment from microbial genome.....	9
1.4.4 Amplified DNA fragment electrophoresis	9
1.4.5 Extraction of nucleic acid from environment.....	10
1.5 Introduction and application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).....	10
1.5.1 Basic principle of DGGE	10
1.5.2 Application of DGGE in research of microbial ecology	12
1.5.3 Limitation of DGGE technique and its resolvent.....	14
1.6 Content,purpose and significance of the research	14
2 Materials and methods	16
2.1 Materials.....	16
2.1.1 Sample collection	16
2.1.2 Strains and plasmids.....	16
2.1.3 Main reagents.....	17
2.1.4 Restrictive endonucleases and other enzymes.....	17
2.1.5 Primers	17
2.1.6 Instruments.....	18
2.1.7 Culture media	19
2.1.8 Solutions.....	20
2.1.9 Softwares.....	22
2.2 Methods.....	22
2.2.1 Cultivation and isolation of sediments	22
2.2.2 Analysis of bacterial diversity of the enrichment samples cultured by liquid media	23

2.2.3 Identification of the Bacteria purified from solid media	26
2.2.4 Recycle and sequence of PCR products	26
2.2.5 Preparation of Competent cells	29
3 Results and analysis	31
3.1 Analysis of bacterial diversity of the enrichment samples cultured by liquid media	31
3.2 Identification of the Bacteria purified from solid media	32
3.2.1 Extraction of DNA、 PCR amplification and RFLP analysis	32
3.2.2 Results of physiology biochemistry experiment	36
3.2.3 16SrDNA molecular identification and phylogenetic analysis	38
3.3 Conclusions and prospect.....	41
References	42
Appendix	48
1 Sequence of 16S rDNA	48
2 DNA marker	61
3 Abbreviations.....	62
4 List of Projects participated in	63
5 List of published papers	63
Acknowledgements.....	64

摘 要

海洋环境中蕴藏着丰富而独特的微生物资源,许多海域的微生物资源尚待进一步挖掘。本研究结合富营养培养和寡营养培养的措施,从南海西部海域分离得到一批细菌,并进行了初步研究,为这批菌株的进一步利用奠定了基础。主要结果如下:

1、采用 NB、DNB、R₂A、DR₂A、2216E、D2216E、LB 等多种培养基从南海西部海域沉积物中分离得到 140 株细菌;

2、综合菌落、菌体形态特征观测、生理生化实验和限制性酶切片段长度多态性 (RFLP) 实验分型的结果,挑取 17 株代表性菌株,扩增其 16S rDNA 并进行测序。测序结果表明,测序成功的 14 株菌分属 *Bacillus*、*Micrococcus*、*Halobacillus*、*Stenotrophomonas* 等几个属,其中芽孢杆菌有 10 株,该属细菌具有较高的多样性。

3、采用液体培养基富集培养,通过聚丙烯酰胺变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 检测发现,富集培养后微生物多样性较低。

4、生理生化实验表明,所分离得到的 17 株细菌中,多数可产淀粉酶、酯酶,且部分菌株具有较高的酶活,说明这些细菌对糖类物质和脂类物质具有较高的降解利用能力,在原位环境中碳的生物地球化学循环可能发挥着重要作用,并可能具有一定的工业利用价值。

关键词: 细菌多样性; 16S rDNA; 南海; 沉积物

Abstract

In this research, we improved the pure culture technique, and the denaturing gradient gel electrophoresis technique was applied to study the bacterial diversity variation of the enriched samples from the sediments of western area in South China Sea to evaluate the improved pure culture technique. In the same time, we extracted the 16S rDNA of strains purified by solid media, after cloning, sequencing, the phylogenetic relationship of the bacteria was analysed. The main results were as follows:

1. 140 bacterial strains was isolated from the sediments of western area in South China Sea by 7 kinds of solid media(NB、DNB、R₂A、DR₂A、2216E、D2216E、LB).

2. 16S rDNA was extracted from the enrichment samples cultured with 7 kinds of solid media were sequenced. The results revealed that the 14 bacterial strains was from *Bacillus*、*Micrococcus*、*Halobacillus* and *Stenotrophomonas*.

3. After extraction of DNA from enrichment samples cultured in liquid media, the V3 region of 16S rRNA gene was amplified using the primers (GC-341F and 517R). The PCR products, about 200 bp were separated by DGGE.. Analysis of the DGGE profiles showed the information of bacteria diversity of the enrichment samples cultured in different conditions.

4. The results of physiology biochemistry experiment showed that most of 17 strains could produce kinds of enzyme. So, these strains perhaps have some industrial values.

Key Words: Bacterial diversity; 16S rDNA; South China Sea; sediment

第一章 绪论

1.1 海洋细菌研究概况

海洋沉积物覆盖了地球表面超过 2/3 的面积。直接的细胞证据表明洋底以下 800m 沉积物中还有微生物的活动。据估计,海底沉积物中的原核生物生物量占全球原核生物生物量的 1/2~5/6,占全球生物总生物量的 1/10~1/3^[1]。目前的研究表明,海洋微生物不仅在海洋生态环境和物质循环中具有极其重要的作用,也是各种新型生物活性物质的潜在来源。由于世界面临严重的资源、环境和人口问题,海洋生物资源包括海洋微生物资源的开发与多样性的研究已成为各沿海国家和地区关注的热点。

国际上对海洋细菌的研究始于 19 世纪。1838 年德国人 Ehrenberg 首次分离并报道描述了第一株海洋细菌——折叠螺旋体(*spirochaeta plicatilis*)。1914 年前苏联科学家 Issatchnko 出版了第一部海洋细菌学专著《北冰洋细菌的研究》(Investigation on the Bacteria of the Glacial Arctic Ocean)。1939 年版的《伯杰氏细菌鉴定手册》(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)中 1335 种细菌中有 86 种细菌是从海洋中分离出来的^[2]。Zobell 对海洋微生物作了大量研究工作,基本确立海洋微生物学的研究方法。Kriss(1959)又发表了有关深海微生物学的著作。

南海具有典型的边缘海特征,不仅与大洋水体如太平洋、印度洋不同,同时又与同样是边缘海的黄海、东海也有很大的区域差别。其位于西太平洋边缘,靠近西太平洋暖池区,是一半封闭性的具有广阔的陆架区的海域,北面为亚洲大陆,东面为菲律宾群岛,东南面为巴拉望岛和加里曼丹岛,南面为印度尼西亚,西面则是位于中南半岛的越南。南海的面积约达 $3.5 \times 10^6 \text{km}^2$,平均水深超过 1 800 m。它仅通过少数海峡与外海相通,除了吕宋海峡的最大水深超过 3 000m,其余海峡均较浅,多数深度不足 100m,水文地理环境复杂,在多个区域存在上升流,兼具开阔大洋和边缘海的特征,几乎包括了各类典型的海洋生态系统,如河口生态系、陆架生态系、上升流生态系、珊瑚礁生态系和红树林生态系等。南海西部海域指南海西部陆缘地区(东经 115° 以西海区),其北侧、西侧和南侧分别为华南大陆、中南半岛、马来半岛与加里曼丹岛所环绕。海底地形地貌复杂,西部的中南半岛东部陆架相对窄长,呈带状分布,海水深度变化大。

1.2 海洋细菌的活性及其群落结构与功能

海洋微生物是海洋生态系统中的重要组成部分，在海洋生物地球化学循环中起着重要的作用，是海洋微食物环的重要组分，作为分解者和二次生产者，影响着颗粒有机物的溶解与沉降、溶解有机物的形成和消耗、无机营养盐的形成等生态过程。细菌群落结构是其整体功能的基础，在海洋环境中有着重要的意义，一直是微生物生态学研究的重点问题。首先，群落结构决定了生态功能的特性和强弱；其次，群落结构的高稳定性是实现生态功能的重要因素；再次，群落结构变化是环境变化的重要标记，是群落功能改变的需求。作为微食物环核心的异养细菌在海域中的群落结构特征与其在海洋环境中的活性特征密切相关，是研究的热点问题。海洋环境中异养细菌的数量分布、群落结构特征存在着时空的差异^[3, 4]，其群落结构的控制因素尚不清楚，但可以肯定的是在一定的海区，异养细菌的群落结构特征受某一种或者几种但不是全部环境因素的调控。Benjamin 等^[5]运用 T-RFLP 分析了东亚北太平洋区的细菌的 16SrRNA 基因，并将细菌群落结构变化和海区化学生物等海洋参数进行了比较，结果发现，异养细菌结构稳定，但依赖于浮游植物生产力和光，这和 Gonza Lez(2000)^[6]和 Suzuki 等^[7](2001)的研究结果类似，他们发现异养细菌的群落结构特征和叶绿素 a 的水平相关联。Benjamin 在随后研究了异养细菌在外加几种营养物质氨基酸、N-乙酰葡萄糖胺、几丁质之后的变化，发现异养细菌并不对所有营养物质都有响应，说明一种特殊的 DOM 对它们起重要作用，类似于 Moore 和 Kirchman(1999)^[8]、Cottrell 和 Kirchman(2000)^[9]、Wood, L. YU 和 Kirchman (2000)^[10]、Zubkov(2001)^[11]等在不同海域的研究结果。充分表明了异养细菌的群落结构特征受特定海域某种关键因素的控制，同时也是对该海域物质和生态状况的反映。对于异养细菌本身的代谢活性及其对海域的生态功能的研究也是海洋微生物在碳的生物地球化学循环中重要作用研究中的重要方面。

Davey 等^[12](2001)在北大西洋东北海域中对不同区域和不同深度海水中的 β -葡萄糖苷酶、氨肽酶和碱性磷酸酶活性的分布以及不同区域细菌群落结构进行了研究，结果表明细菌胞外酶活性和细菌群落结构存在着空间分布的差异，并且两者之间有一定的关联。随着研究的深入，研究人员倾向于在细菌群落中寻找出具有特定生态功能的细菌，这些细菌有可能是在微食物环中起主要作用的生态功能菌。Cottrell 和 Kirchman 等^[9, 13](2000)开始尝试用 FISH 技术对一些系统发育上

特殊的群落进行研究,发现它们也有着特殊的功能。Cho 和 Giovannoni(2004)^[14]通过对海洋贫营养海域的 γ -变型杆菌在不同温度和碳浓度条件下的生长特性的研究,发现它们的活性特征和它们的系统发育地位密切相关。在可培养和不可培养技术结合确定微生物群落中特殊种群技术建立的基础上^[15, 16, 17],研究人员开始了对具有特殊功能的特殊种研究这一基础性的工作^[18],相关的研究表明在一定的细菌群落结构中起关键作用的是该群落中处于优势地位的种属。因此,由群落结构的整体作用和特性的研究到其活性和主要生态功能类群的研究,是对海洋环境微生物的活性与其群落结构关系研究的深入,是微生物在微食物环中重要作用研究的重要方面。

1.3 微生物群落结构分析方法的发展

微生物群落结构和多样性解析技术的发展大致可以分为 3 个阶段。在 20 世纪 70 年代以前主要依赖传统的培养分离方法,依靠形态学、培养特征、生理生化特性的比较进行鉴定和计数。在环境中的微生物大多难以分离纯化,海洋中可培养的微生物种类不到 1%^[19],因此培养方法对海洋环境微生物群落结构及多样性的认识是比较片面的。20 世纪 70~80 年代通过对微生物化学成分分析建立起来的生物标志法^[20, 21, 22]加强了对环境微生物群落结构及多样性认识,但此方法对微生物的分类水平较低,且复杂环境样品中不同微生物种属之间脂肪酸组成的重叠和外来生物的污染也限制了生物标志法的可靠性。20 世纪 90 年代以来,现代分子生物学技术的相关成果融入到环境微生物的研究中,由此产生的分子生态学技术是目前最为有效的环境微生物群落结构分析方法^[23]。

自然界中的微生物分布广、种类多、资源极其丰富。自从科赫(Robert Koch)于 1881 年^[24]介绍固体培养基及将混合培养物进行纯化的纯培养技术以来,人们采用各种纯培养方法从自然环境中分离得到众多微生物的纯培养^[25]。这种传统的纯培养技术在实验室里常规的用于分离、纯化、活细胞计数和培养微生物,一直是微生物学研究的基石。但是随着研究的深入,人们发现用传统方法从自然环境中分离得到的微生物远远不能代表自然环境中微生物的全部种类,迄今已发现的微生物物种仅为自然界中微生物总数的 1%左右。

1.3.1 传统微生物纯培养技术的局限性

自然界中绝大多数微生物(99%)处于未培养和未研究状态,这些微生物可

能并不是真的不可培养,而是处于 VBNC(viable but nonculturable micro-organisms) 状态^[26],即不可培养(活)微生物,它包括那些可获得纯培养,但是在环境因子的胁迫下不能生长、处于休眠状态下的微生物。VBNC 状态微生物包括一下三种类型^[27]:第一种是在现有的常规培养条件下无法分离培养得到的微生物,它们实际上是可以生长繁殖的,因为不了解其合适的生长繁殖的条件,所以分离培养不成功,需要深入研究探索适合于它们的培养条件,才可能实现这类菌的可培养性;第二种是由于生长环境等条件的改变使其从原本的存活状态转变成无法繁殖的状态,但在适当的条件下可以恢复其分裂能力;第三种是无论给予任何条件都不能恢复其生长繁殖,即最终只有走向死亡。研究者希望通过对培养技术的研究和优化,能够提高前两种生理状态微生物的可培养性。

1.3.2 微生物培养技术的改进策略

1.3.2.1 加富培养

在基础培养基上额外添加营养成分制成的培养基即加富培养基。不同的微生物生理类群,其代谢过程不同,相应的对反应的底物要求也不尽相同。添加不同的特殊物质,如血液、血清、酵母浸膏、动植物组织液和土壤浸出物等营养物质,或者某些可供应微生物代谢需要的特殊底物,如葡萄糖、丙酮酸钠、 α -酮戊二酸等,可以有助于微生物新陈代谢反应的进行和帮助微生物的正常生长。研究表明,将新颖的底物应用到微生物培养中,可以发现未知的微生物^[28, 29]。

1.3.2.2 稀释培养

常规的培养方法通常使用高浓度的营养基质,这对微生物的分离培养是不利的,因为大多数微生物的生存环境其营养基质浓度偏低,而且地球上还广泛分布着长期适应贫营养环境的微生物,它们对过高浓度的盐类和有机物敏感,常规的培养方式会造成它们的复苏障碍,降低营养基质的浓度可以减弱这种不利影响。Aagot^[30]发现低浓度基质的培养基培养出的细菌在数量和种类上均多于高浓度基质的培养基;Franklin 等(2001)采用从原液到 10^{-4} 浓度进行系列稀释培养方法来分析和重建一个污水微生物群落,发现每一个稀释梯度都会新分离到 2~3 个独特的类群^[31]。

1.3.2.3 分散培养

微生物在自然界中是聚集生长的,常常形成“絮体”和“颗粒”等,致使处于其内部的微生物由于接触不到外界而不易培养。如果能够在培养前对“絮体”

和“颗粒”进行适度的超声处理，将内部细胞分散后再进行培养，就可以是更多的微生物有机会接触到培养基，从而有可能被培养^[32]。

1.3.2.4 混合培养

微生物群体通常混合共存于环境中，而非单独存在。因为同一生境下的微生物常以互养、共代谢等模式共同生存。在工农业生产中常采用混合培养，如酿造与污水生物处理。从除草剂异丙隆(Isoproturon)污染土壤中富集培养得到了 SRS1 和 SRS2 菌株，将其共培养(Co-culture)时生长率、降解性都比单独培养时高许多。深入研究发现，SRS1 为 SRS2 提供了生长必不可少的氨基酸，成为后者可培养性提高的物质基础^[33]。混合培养能提供微生物在纯培养时无法获得的物质流，是其能增强微生物可培养性的重要原因；从另一侧面也反映出纯培养的微生物实际上已不再是原生态的真实面貌和反映了。

1.3.2.5 模拟自然培养

与传统培养对比，自然生境中的微生物具有多样性、合作性和交流性的特点，如果从生态学角度出发，使得培养环境尽可能接近原生生态环境，可以在一定程度上弥补自然培养和传统培养的部分弱点。1990 年，DeBruyn 等使用悬浮滤膜技术(Floating-filter technique)^[34]有效的增强了嗜酸、铁氧化菌株的可培养性；2002 年，Kaeberlein 等设计了一种称为扩散生长盒(Difusion growth chamber)的培养装置，该装置既允许营养物和内外微生物产生的活性物质透过膜进出生长盒，又可有效防止细菌逃逸，培养出的菌落数高于常规培养所获菌落数的 300 倍左右，还分离到两种以前认为是不可培养的微生物^[35]。叶姜瑜(2004)对现有纯培养装置和方法进行改进，提出了近自然纯培养法(Near-native pure culture technique)^[36]：将微生物培养在内衬有微孔滤膜(0.20 μm ~0.45 μm)的有孔培养装置(有孔培养皿、有孔试管和有孔三角瓶等)中，将该装置放入被培养微生物所需的真实环境或模拟自然生境的外皿中，让内外环境中活性物质相互渗透保持一致，保证被培养的微生物能够同原生环境交流，从而达到增强部分微生物的可培养性、甚至将部分未培养微生物转变为可培养的目的。

近年来，分子生态学技术得到了较大发展，它能够克服微生物培养技术的限制，能对样品进行较客观的分析，能够较精确地揭示微生物种类和遗传的多样性。

[37, 38]

1.4 微生物分子生态学涉及的主要研究方法

分子生物技术的应用克服了传统方法的局限,使得微生物学者可以从基因水平上估计种的丰度、均度,查明种的变异情况等,从而可以更客观地认识环境中微生物天然的生态状况。此外,分子生物技术的应用还具有以下两个主要优点:一是可以从原位水平上来研究微生物之间的相互关系;二是通过分子研究方法及测序可以得到多数微生物的部分系统发育信息,根据这些信息有助于人们分离得到那些目前还未能培养的微生物。分子技术使得我们可以不培养而直接研究和利用它们,但是目前所面临的挑战是如何分离培养通过分子技术检测到的那些新的微生物,以便研究它们的形态和生理特征,只有那样我们才能真正了解各种自然环境的微生物多样性及其生态重要性。

传统的纯培养方法在研究微生物生态时由于培养基及培养条件等的限制从而具有一定的选择性。分子生物技术的应用也同样具有一定的选择性,主要体现在样品的采集、总 DNA 的提取、PCR、克隆等各个环节,由于采用的方法及实验条件的不同最终可能会引起不同程度的偏差。虽然分子生物技术的应用具有快速、探测范围相对广泛等优点,但是如果得不到纯培养,最终也只能是探测到资源的存在而不能完全为人类所利用,因此分子生物技术所具有的优缺点与传统的研究方法正好可以相互补充,从而可以更客观、更充分地认识研究微生物资源。

1.4.1 标记核酸探针杂交技术

原位荧光杂交技术(fluorescent in situ hybridization, FISH)是根据已知微生物不同分类级别上种群特异的 DNA 序列,以利用荧光标记的特异寡聚核苷酸片段作为探针,与环境基因组中 DNA 分子杂交,检测该特异微生物种群的存在与丰度。该方法的特点是可以进行样品的原位杂交,应用于环境中特定微生物种群鉴定!种群数量分析及其特异微生物跟踪检测,是目前在分子微生物生态学领域应用比较广泛的方法之一。

分子杂交及同源性分析(DNA-DNA/DNA-RNA)方法是分子微生物生态学发展初期,在 PCR 技术尚未发明之前的主要研究方法,是研究微生物区系系统发育关系、微生物鉴定、微生物物种之间同源性等分子微生物生态学研究方法的基础。

荧光蛋白质-核苷酸特异探针原位杂交(protide nucle acid,PNA)以荧光标记的特异多肽为探针,通过 PNA 在原位与样品中的 DNA 结合,对样品中的微生物进行鉴定及原位分析。PNA 探针与 DNA 探针相比,PNA 具有探针短,与样品中 DNA

杂交速度快,而且杂交时不依赖于缓冲液盐的浓度等优点,并且 PNA 的两性电解质骨架,使其更适合于原位杂交。该方法代表了微生物区系遗传信息与微生物功能和代谢方式多样性之间相互关系研究方法的发展趋势^[39]。

1.4.2 基于 PCR 技术的研究方法

PCR 是 1985 年由 Mullis 发明的一种聚合酶链式反应技术,主要特点是短时间内在实验室条件下人为地控制并特异扩增目的基因或 DNA 片段,使研究的的目的基因及其环境样品中的微量微生物基因得到无限的扩增,为这些基因和微量微生物种群的研究提供了保证。

限制性酶切片段多态性 RFLP(restriction fragment length polymorphism)方法是利用限制性内切酶特性及其电泳技术,对特定的 DNA 片段的限制性内切酶产物进行分析,对微生物遗传多样性尤其是微生物的种下分类具有重要意义。其原理是:利用能识别特定 DNA 序列的限制性核酸内切酶处理 16S rDNA,基于不同种群 16S rDNA 序列的差异,将得到长度与数量不同的 DNA 片段,通常用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离,并利用溴乙啶等荧光染料进行显色,得到的特异性的电泳图谱称基因的酶切指纹图谱。此法能够反映多个酶切位点所包含的 DNA 序列信息,因此在进行微生物群落物种多样性比较时能提供较丰富的信息,适用于较复杂的群落之间的比较,其缺点是:(1)末端片段所提供的序列信息混杂在其它片段的信息中,无法判断群落中有多少物种;(2)和 DGGE 法相似,DNA 的荧光染色法的灵敏度较低^[40]。

末端限制性片段长度多态性 T-RFLP(terminal restriction fragment length polymorphism)研究方法是利用一定的标记引物对样品中 DNA 进行特异扩增,然后进行限制性内切酶酶切,检测末端限制片段的多样性,主要应用于微生物群落组成和结构、微生物系统发育及其菌种鉴定等研究,是一种应用比较广泛的微生物生态学研究方法。其原理与 RFLP 法相似,只是 PCR 中所用引物一端或两端带有标记,因此酶切所得的末端片段被标记,电泳后通常只分析此末端片段的种类、长度与数量。T-RFLP 法方便快捷,由于使用了荧光或放射性标记,具有较高的灵敏度,Moenseder 等^[41]报道在一个样品中可以鉴别 44 种微生物,Dunbar 等^[42]报道占群落 0.1%~1%的微生物类群即可以被检测出。T-RFLP 法另一优越性在于:由于酶切片段中仅有末端片段长度被测定,每一种长度的末端片段至少代表一种微生物基因型,因此可以直接给出对群落中微生物种群数的最小估计

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库