

学校编码: 10384  
学 号: 200426043

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

红树林沉积物细菌多样性分析及其功能  
基因筛选

Bacterial diversity analysis and functional gene screening  
for the mangrove sediment

陈跃庆

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: 2007 年 6 月 25 日  
论文答辩时间: 2007 年 7 月 23 日  
学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 闵航 教授  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 ( ), 在 年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ( )

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

# 目 录

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	II
<b>1 前 言</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 红树林区微生物资源概况</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 红树林区的特点.....	1
1.1.2 红树林区微生物资源研究进展.....	1
1.1.3 红树林沉积物微生物纤维素酶系研究.....	2
<b>1.2 环境微生物宏基因组研究</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 宏基因组概念的提出.....	3
1.2.2 宏基因组技术的原理及其要素.....	5
1.2.2.1 环境总 DNA 的提取及其纯化.....	7
1.2.2.2 载体的选择.....	10
1.2.2.3 宿主的选择.....	11
1.2.2.4 宏基因组文库的分析.....	11
<b>1.3 宏基因组技术的应用</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 细菌的多样性研究.....	16
1.3.1.1 细菌多样性分析的分子生物学进展.....	16
1.3.1.2 宏基因组技术在细菌多样性分析中的应用.....	18
1.3.2 利用宏基因组技术寻求生物活性物质的表达.....	19
1.3.2.1 宏基因组技术在生物活性筛选中的应用优势.....	19
1.3.2.2 宏基因组技术在生物活性筛选中的应用实例.....	20
1.3.2.3 利用宏基因组技术克隆纤维素酶基因.....	21
<b>1.4 论文研究的目的和意义</b> .....	<b>22</b>
<b>2. 材料与amp;方法</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 材料</b> .....	<b>23</b>
2.1.1 样品来源.....	23
2.1.2 菌株和质粒.....	23

2.1.3 主要试剂.....	23
2.1.4 PCR 引物.....	23
2.1.5 主要仪器.....	23
2.1.6 主要培养基.....	24
2.1.7 溶液配制.....	25
2.1.8 序列分析软件.....	26
<b>2.2 基本方法 .....</b>	<b>26</b>
2.2.1 红树林沉积物 16SrDNA 文库的构建 .....	26
2.2.1.1 沉积物总 DNA 提取.....	26
2.2.1.2 总 DNA 大片段的纯化.....	27
2.2.1.3 16S rDNA 基因片段的 PCR 扩增.....	27
2.2.1.4 PCR 产物纯化.....	28
2.2.1.5 PCR 产物与 T-vector 连接.....	28
2.2.1.6 感受态细胞的制备.....	28
2.2.1.6.1 CaCl <sub>2</sub> 法 .....	28
2.2.1.6.2 Inoque 法 .....	29
2.2.1.6.3 转化率的测定.....	29
2.2.1.7 转化.....	29
2.2.1.8 文库保存.....	30
2.2.1.9 文库中阳性克隆子筛选及 RFLP 分析.....	30
2.2.2 红树林沉积物宏基因组文库的构建.....	30
2.2.2.1 环境总 DNA 提取.....	30
2.2.2.2 总 DNA 不完全酶切.....	30
2.2.2.4 DNA 定量.....	31
2.2.2.5 质粒 pUC19 的提取.....	31
2.2.2.6 质粒酶切.....	31
2.2.2.7 线性质粒 DNA 回收.....	32
2.2.2.8 线性质粒 DNA 去磷酸化.....	32
2.2.2.9 载体与目的 DNA 连接.....	32

2.2.2.10 感受态细胞制备及转化.....	33
2.2.2.11 宏基因组文库的保存和评估.....	33
2.2.3 产纤维素酶克隆子的筛选及其分析.....	33
2.2.3.1 产纤维素酶克隆子的筛选.....	33
2.2.3.2 产纤维素酶克隆子的酶活鉴定.....	33
2.2.3.3 产纤维素酶克隆子插入片段的分析.....	34
<b>3 结果与分析 .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 红树林沉积物细菌 16SrDNA 文库的构建.....</b>	<b>35</b>
3.1.1 沉积物总 DNA 的提取和纯化.....	35
3.1.2 16SrDNA 的扩增 .....	36
3.1.3 16SrDNA 的连接和转化 .....	37
3.1.4 16SrDNA 文库阳性克隆子筛选及 RFLP 分析.....	37
3.1.5 红树林沉积物细菌多样性分析.....	39
<b>3.2 红树林沉积物宏基因组文库 (3-10kb) 的构建 .....</b>	<b>44</b>
3.2.1 总 DNA 的提取及其纯化.....	44
3.2.2 总 DNA 的不完全酶切及其 3—10k 片段的回收纯化.....	44
3.2.3 连接载体 pUC19 的准备.....	45
3.2.4 载体与目的 DNA 的连接与转化.....	45
3.2.5 宏基因组文库的构建.....	47
3.2.6 宏基因组文库的评估.....	47
<b>3.3 红树林宏基因组文库中产纤维素酶基因的筛选 .....</b>	<b>48</b>
3.3.1 产纤维素酶克隆子的获得.....	48
3.3.2 产纤维素酶克隆子的酶活鉴定.....	49
3.3.3 产纤维素酶克隆子的插入片段分析.....	51
<b>4 讨论.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 红树林沉积物微生物资源的开发 .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 红树林沉积物细菌 16SrDNA 文库的构建与分析.....</b>	<b>53</b>
4.2.1 沉积物细菌 16SrDNA 文库的构建 .....	53
4.2.2 红树林沉积物优势细菌组成分析.....	56

<b>4.3 红树林沉积物宏基因组文库（3-10kb）构建及其活性筛选 .....</b>	<b>57</b>
4.3.1 宏基因组文库的构建.....	57
4.3.2 红树林沉积物宏基因组文库的活性物质筛选.....	58
<b>5 结论与展望 .....</b>	<b>660</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>62</b>
<b>附 录.....</b>	<b>72</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>75</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Catalogue

<b>Abstract(in Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract(in English)</b> .....	<b>II</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Microbial resources in mangrove sediment</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Characterization of mangrove sediment .....	1
1.1.2 Advance in the study on the microbes in mangrove sediment.....	1
1.1.3 Study on the cellulolytic enzymes in the mangrove sediment.....	2
<b>1.2 Environmental metagenomic research</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Concept of metagenomic strategy.....	3
1.2.2 Principle and elements of metagenomic strategy.....	5
1.2.2.1 Total DNA isolated from environment and its purification .....	7
1.2.2.2 Vector .....	10
1.2.2.3 Host.....	11
1.2.2.4 Evaluation of metagenomic library.....	11
<b>1.3 Application of metagenomic strategy</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Study on the bacterial diversity in the environment .....	16
1.3.1.1 Advance in the molecular methods for the analysis of bacterial diversity .....	16
1.3.1.2 Application of metagenomic strategy in the bacterial diversity analysis.....	18
1.3.2 Searching for the biocatalysts with metagenomic strategy.....	19
1.3.2.1 Advantage of metagenomic strategy for biocatalysts searching .....	19
1.3.2.2 Successful application examples of metagenomic strategy .....	20
1.3.2.3 Screening for the cellulolytic genes with metagenomic strategy.....	21
<b>1.4 Objectives and significance of this study</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Materials and methods</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>23</b>
2.1.1 Samples.....	23
2.1.2 Strains and plasmids .....	23



2.1.3 Reagents.....	23
2.1.4 Primers.....	23
2.1.5 Instruments.....	23
2.1.6 Media.....	24
2.1.7 Solutions.....	25
2.1.8 Softs for DNA sequence analysis.....	26
<b>2.2 Methods.....</b>	<b>26</b>
2.2.1 16SrDNA library construction.....	26
2.2.1.1 Total DNA isolation from sediment.....	26
2.2.1.2 Purification of total DNA.....	27
2.2.1.3 PCR amplification of 16S rDNA gene.....	27
2.2.1.4 Purification of PCR products.....	28
2.2.1.5 Ligation of PCR products and T-vector.....	28
2.2.1.6 Preparation of competent cells.....	28
2.2.1.6.1 Preparing with CaCl <sub>2</sub> .....	28
2.2.1.6.2 Inoque methods.....	29
2.2.1.6.3 Determination of transformation efficiency.....	29
2.2.1.7 Transformation.....	29
2.2.1.8 Preservation of genomic library.....	30
2.2.1.9 RFLP analysis of 16SrDNA library.....	30
2.2.2 Metagenomic library (3-10kb)constrcution from mangrove sediment.....	30
2.2.2.1 Total DNA isolation.....	30
2.2.2.2 Incomplete digestion of total DNA.....	30
2.2.2.4 Quantificaiton of DNA.....	31
2.2.2.5 Preparation of plasmid pUC19.....	31
2.2.2.6 Digestion of plasmid.....	31
2.2.2.7 Recovery of linear plasimd DNA.....	32
2.2.2.8 Dephosphorylation of plasmid DNA.....	32
2.2.2.9 Ligation of vector and target DNA.....	32
2.2.2.10 Preparation of competent cells and transformation.....	33

2.2.2.11 Preservation and evaluation of metagenomic library.....	33
2.2.3 Screening of cellulolytic clones and their inserts analysis.....	33
2.2.3.1 Screening of cellulolytic clones .....	33
2.2.3.2 Cellulolytic activity verification of cellulolytic clones.....	33
2.2.3.3 Sequence of inserting fragments of the cellulolytic clones .....	34
<b>3 Results and analysis .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 16SrDNA library construction from mangrove sediment .....</b>	<b>35</b>
3.1.1 Isolation and purification of total DNA .....	35
3.1.2 Amplification of 16SrDNA gene .....	36
3.1.3 Ligation and transformation of 16SrDNA gene.....	37
3.1.4 RFLP analysis of clones in 16SrDNA library.....	37
3.1.5 Diversity analysis of bacteria in the mangrove sediment .....	39
<b>3.2 Metagenomic library (3-10kb)construction from mangrove sediment.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 Isolation and purification of total DNA.....	44
3.2.2 Incomplete digestion of total DNA and recovery of 3-10kb DNA.....	44
3.2.3 Preparation of plasmid pUC19.....	45
3.2.4 Ligation and transformation of target DNA and vector .....	45
3.2.5 Construction of metagenomic library .....	47
3.2.6 Evaluation of metagenomic library.....	47
<b>3.3 Screening and analysis of cellulolytic clones from the metagenomic library</b>	<b>48</b>
3.3.1 Screening of cellulolytic clones .....	48
3.3.2 Cellulolytic activity verification of cellulolytic clones.....	49
3.3.3 Sequence analysis of inserting fragments in the cellulolytic clones.....	51
<b>4 Discussion.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Exploitation of microbial resources in mangrove sediment.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Construction and analysis of 16SrDNA library .....</b>	<b>53</b>
4.2.1 Construction of 16SrDNA library from mangrove sediment.....	53
4.2.2 Analysis of dominant bacteria in mangrove sediment .....	56
<b>4.3 Construction of metagenomic library and the biocatalysts screening .....</b>	<b>57</b>

4.3.1 Construction of metagenomic library .....	57
4.3.2 Screening of biocatalysts from metagenomic library .....	58
<b>5 Conclusion and future work .....</b>	<b>60</b>
<b>References .....</b>	<b>62</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>73</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>75</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 摘要

红树林是自然分布于热带、亚热带海岸的潮间带的木本植物群落,通常生长在港湾河口地区的淤泥质滩涂上,是海滩上特有的森林类型。红树林沉积物具有强还原性、强酸性、高含盐量、营养丰富等特征,其微生物资源既丰富又不失特色。然而,至今对树林的研究绝大多数集中在植物学、生态学、造林学等领域,在微生物学领域的研究甚少。研究红树林沉积物的微生物组成及其活性物质、功能基因的筛选有重大理论实践意义。

本论文以福建龙海浮宫红树林沉积物样品为研究对象,采用宏基因组技术,克服土壤中绝大部分微生物不可培养的弊端,通过 16SrDNA 文库的构建,分析了浮宫红树林沉积物中细菌的多样性和结构组成;并且,以 pUC19 为载体构建了 3-10kb 小片段宏基因组文库,筛选有纤维素酶活性的功能基因。获得的主要结果如下:

1. 构建了红树林沉积物的 16SrDNA 文库,研究其细菌群落组成。RFLP 分型表明文库中存在丰富的细菌多样性,有 30 种优势菌。对 30 种优势菌的 16SrDNA 序列测序结果表明:优势菌中变形细菌纲(Proteobacteria)占优势(70.0%)。其中, $\alpha$ -Proteobacteria 占 3.3%; $\gamma$ -Proteobacteria 占 26.7%; $\delta$ -Proteobacteria 占 10.0%; $\epsilon$ -Proteobacteria 占 30.0%。除了变形菌外,还检测到未可培养,性质以及分类尚不清楚的细菌,占 20%;浮霉菌纲(Planctomycetacia)、Bacteroidetes(拟杆菌门)和疣微菌门(Verrucomicrobia),分别占 3.3%。

2. 以红树林沉积物样品为材料,以 pUC19 质粒为载体,DH5 $\alpha$  为宿主菌构建了 3-10Kb 小片段宏基因组文库 pUC19-Hsediment。文库含有 45000 个克隆子,平均插入片段为 5.4kb,包含了约 450Mb 的沉积物样品 DNA。

3. 从该文库筛选到 3 个含有不同插入片段(6.4kb、2.6kb、1.2kb)的具有胞外纤维素酶活性的克隆子。对克隆子插入序列的分析工作正在进行当中。

上述结果揭示了红树林沉积物中蕴藏着丰富的新微生物资源。宏基因组技术在环境微生物资源的开发上是个有力工具。

**关键词:** 红树林沉积物; 宏基因组技术; 纤维素酶

# Abstract

Mangrove swamps are unique inter-tidal wetland ecosystems found in sheltered tropical and subtropical shores, and represent rich and diverse living resources. Special mangrove sediment niches possess valuable microbial resources. Unfortunately, very few researches were carried out on the microbial communities comparing to much achievement on the study of plants in mangrove ecosystem. So far, there is very little knowledge on the mangrove soil microbial communities. It's urgent and significant to investigate the microbial communities and explore its potential resources.

In this research, using the metagenomic strategy, a 16SrDNA gene library was constructed to investigate the bacterial diversity in the mangrove sediment collected in Fugong, Longhai, Fujian Province and a metagenomic library was also constructed to screen the cellulolytic genes. The results were as follows:

1. The bacterial diversity in the mangrove sediment was characterized by analyzing the 16SrDNA gene library. 200 clones with different RFLP patterns showed abundant bacterial diversity in the sediment. Among them, 30 clones representing the dominant species with RFLP patterns occurred frequently were sequenced and phylogenetically identified as belonging to the Proteobacteria(70%), Unknown bacteria(20%), Planctomycetacia(3.3%), Bacteroidetes(3.3%), Verrucomicrobia(3.3%).

2. Using the mangrove sediment sample, the total DNA was isolated directly from environment and a metagenomic library was constructed using the pUC19 plasmid as vector and *E.coli* DH5 $\alpha$  as host. The library was named as pUC19-Hsemident .It contained 45,000 clones with average insert sizes of 5.4kb, covering 450Mb genomic DNA in the sediment.

3. Using the function-driven screening model, 3 clones with extracellular cellulolytic activity were screened .They have inserts of 6.4kb, 2.6kb, 1.2kb respectively .The sequence analysis of these inserts is ongoing.

Concluded from the results, it shows that the mangrove sediment holds great new

microbial resources and the metagenomic strategy can be powerful exploiting the potential microbial resources from the environment.

**Keywords:** mangrove sediment; metagenomic library; cellulolytic activity

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 1 前 言

## 1.1 红树林区微生物资源概况

### 1.1.1 红树林区的特点

红树林是自然分布于热带、亚热带海岸的潮间带的木本植物群落，通常生长在港湾河口地区的淤泥质滩涂上，是海滩上特有的森林类型<sup>[1]</sup>。红树林在热带、亚热带的海岸潮间带构建了一片美丽的海上森林，虽然它占据的陆地面积不到全球陆地面积的千分之一，却以相当于亚马逊热带雨林的高生产力与珊瑚礁、上升流、海滨沼泽湿地组成了四大海洋高生产力生态系统<sup>[2]</sup>。我国现有红树林 15122 公顷，海南、广东、广西是主要分布区，三个地区红树林面积约占全国红树林总面积的 95 %。我国共有红树植物 12 科 27 种，由南部的海南到北部的浙江，红树林植物种数从 25 种降为 1 种，随纬度的提高，红树植物种类数明显减少。海南是我国红树植物种类最多、红树林生长最好的地方。

目前，大多数学者认为红树林在以下方面有主要作用(林鹏等，1995；林鹏，1997)：

(1)过滤陆地径流和内陆带出的有机物质和污染物，吸收与吸附污染物以净化环境。

(2)利用植物本身的生产物，包括木材、薪炭、食物、药材和其他化工原料等。

红树林沉积物具有强还原性、强酸性、高含盐量、营养丰富<sup>[3]</sup>等特征。因此，这里的微生物资源既丰富又不失特色，主要类群为细菌、真菌、放线菌、微型藻类等。在热带红树林中，微生物的组成大致为：细菌和真菌占微生物资源总量的 91 %，藻类和原生动物分别占 7 %和 2 %<sup>[4]</sup>。

### 1.1.2 红树林区微生物资源研究进展

红树林独特的生态环境和丰富的生物多样性引起了科学工作者的关注。但是绝大多数的研究集中在植物学、生态学、造林学等领域，在微生物学领域的研究很少。国内对红树林区的微生物学研究始于 20 世纪 80 年代末期，同其它方面相比，微生物学研究起步较迟，研究得较为薄弱。在有关红树林研究文献中，红树林的微生物学研究文献所占份额极少。这种研究状况与红树植物种类和面积分布不相称。而在现有的红树林微生物学研究中，多数研究仍集中于红树林的真菌学

研究中，包括真菌分类学研究和真菌区系。在世界红树林区，对细菌类群的研究较少<sup>[5]</sup>，但已报道的结果表明，各地细菌属的组成在沉积物(或土壤)中有一定的相似性，即均以芽孢杆菌占优势。Shome 等<sup>[6]</sup>研究表明，在印度南 Andaman 红树林凋落物及其下表面沉积物的细菌区系中，芽孢杆菌属占 50 %的比例；胡承彪等<sup>[7]</sup>的研究也发现芽孢杆菌属是红树林沉积物中的优势属。而对于其他细菌种类的了解也相对较少。由此可见，红树林的微生物学研究很有必要进一步拓宽研究地域和研究范围，充实研究队伍。

目前对微生物研究较为活跃研究领域有红树林微生物区系研究<sup>[7]</sup>；凋落物分解过程中的微生物学研究<sup>[8]</sup>；红树林的根际放线菌研究<sup>[9]</sup>；红树林区微生物污染生态学研究<sup>[10]</sup>。通过对红树林微生物的不断了解，近年来又形成了一个科研热点，那就是红树林微生物酶资源的研究。

### 1.1.3 红树林沉积物微生物纤维素酶系研究

纤维素是世界上最大的、可再生的有机碳源<sup>[11]</sup>。自然界大部分的纤维素是由藻类和高等植物合成，全世界每年的植物体生成量高达 1500 亿吨干物质.其中纤维素及半纤维素的总量为 850 亿吨。但是由于纤维素本身的结构特点，造成了纤维素在自然界、人工环境里分解上的困难(图 1.1)<sup>[12]</sup>。目前人类还没有合理的方法对这些巨大的资源进行综合利用，很大一部分的纤维素是作为废弃物处理。

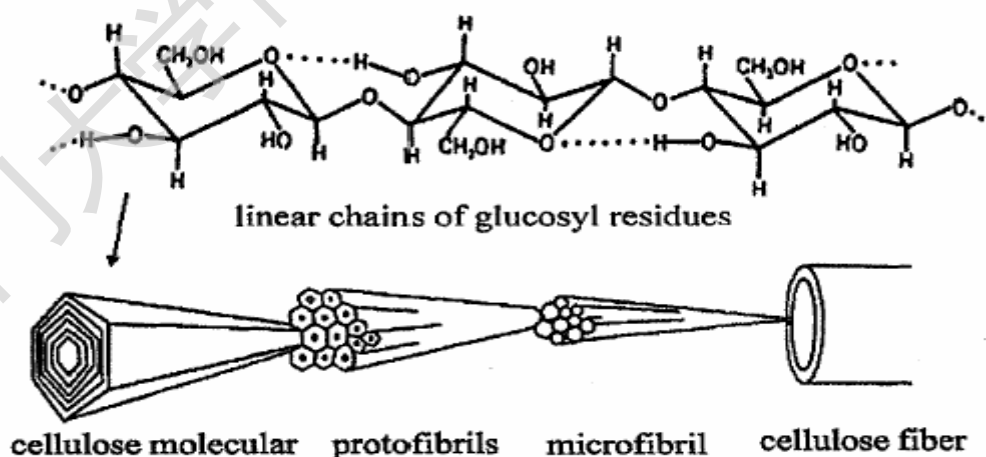


图 1.1 纤维素的结构

Fig.1.1 The structure of cellulose

纤维素的生物降解涉及到一组复合的纤维素酶系，酶系由三种作用方式不



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.