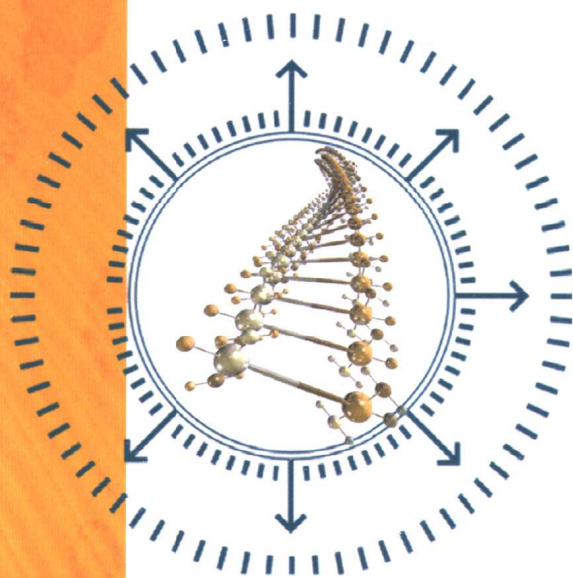


张洪勋 庄绪亮 主编

# 微生物生态学研究进展

——第五届微生物生态学学术研讨会论文集



气象出版社

# 微生物生态学研究进展

——第五届微生物生态学术研讨会论文集

张洪勋 庄绪亮 主编

气象出版社

## 内 容 简 介

本书收集了中国生态学会微生物生态专业委员会主持召开的 2003 年第五届学术研讨会论文 36 篇,内容涉及微生物生态学研究的诸多方面,包括微生物分子生态学、微生物多样性和应用微生物生态学等。论文集部分反映了我国近年来微生物生态学的研究热点和动态以及微生物生态学工作者的研究成果。

本书可供微生物生态学及其相关学科的科研人员、大专院校师生和管理人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

微生物生态学研究进展/张洪勋,庄绪亮主编.-北京:  
气象出版社,2003.10  
ISBN 7-5029-3673-4

I. 微… II. ①张…②庄… III. 微生物生态学-  
学术会议-文集 IV. Q938.1-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 099520 号

## 微生物生态学研究进展

——第五届微生物生态学术研讨会论文集

张洪勋 庄绪亮 主编

责任编辑:王桂梅 庄绪亮 终审:袁信轩

封面设计:阳光图文工作室 责任技编:陈红 责任校对:张敏

\* \* \*

气象出版社出版

(北京市海淀区中关村南大街 46 号 邮编:100081)

北京市兴怀印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行 全国各地新华书店经销

网址:<http://cmp.cma.gov.cn> E-mail:qxchs@263.net

\* \* \*

开本:787×1092 1/16 印张:14.625 字数:374 千字

2003 年 12 月第一版 2003 年 12 月第一次印刷

定价:34.80 元

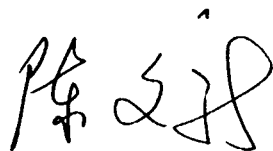
ISBN 7-5029-3673-4/X·0086

## 序

微生物生态学研究微生物与周围生物和非生物环境之间的相互关系,作为一门学科出现在 20 世纪 60 年代。20 世纪 70 年代后期,随着环境污染日益严重并不断给人类生存和生态平衡构成严重威胁,环境生态治理成为社会热点。由于微生物在地圈、水圈、大气圈、生物圈物质循环转化中不可替代的作用,微生物生态学开始得到了迅速发展;80 年代后,蓬勃发展的分子生物学技术开始向微生物生态学渗透,同时由于化学分析方法的不断改进以及数学概念和方法的引进,分子生态学成为研究前沿,已涉及到微生物代谢对环境的影响、污染环境中的微生物学、复杂环境条件下各种类型微生物检测和鉴定的基因芯片研究(如功能基因芯片、群落基因组芯片以及用于亲缘关系研究的寡聚核苷酸芯片)、利用数学模型模拟的微生物群落生态学、极端环境条件下的微生物学研究等,并同近几年来兴起的微生物功能基因组学紧密结合,为利用生物芯片探求新的功能基因发挥重要作用。

微生物生态与人类环境密切相关,人类生产活动产生的环境污染物,无论是有机化学物或无机金属,均有可能通过微生物的降解、代谢或富集而去除,在人类为保护环境而采取的种种处理措施中,包括生活污水、工业废水、固体废弃物以及废气的处理等,都离不开微生物及其酶的作用。微生物基因组简单,很容易通过基因工程技术进行遗传改造,为构建污染物降解的高效工程菌提供了可能。

微生物生态学研究的最终目的是利用微生物保护和改进环境质量并一直是该学科的研究热点,尤其是由于 90 年代现代分子生物学技术(如荧光标记蛋白技术,荧光定位杂交技术,PCR-RFLP,PCR-SSCP,PCR-DGGE,磷脂脂肪酸谱图分析等)的引进和发展,使微生物分子生态学迅速崛起,并为环境化学和宏观生态学的研究注入新的生机和活力。在这种背景下,为集中交流我国近年来微生物生态科学工作者的科研成果,经各方人士的努力,“中国生态学会微生物生态专业委员会第 5 次学术讨论会”顺利召开,会议论文集也正式出版发行了,我谨对本书的出版发行表示热烈的祝贺。



中国农业大学生物学院 教授  
中国科学院 院士

2003 年 10 月

## 前 言

中国生态学会微生物生态专业委员会旨在建立一个平台,开展微生物生态研究学术交流,以促进该学科的发展。本着这一指导思想,微生物生态专业委员会主持召开了第五届微生物生态学术研讨会,并出版了此论文集。论文集共收集论文 36 篇,内容涉及微生物生态学研究的诸多方面,包括微生物分子生态学、微生物多样性和应用微生物生态学等,部分反映了我国近年来微生物生态学的研究热点和动态以及微生物生态学工作者的研究成果。

本人代表微生物生态专业委员会衷心地感谢全体论文作者,感谢会议组成员庄绪亮博士、顾红燕和齐鸿雁同志为编辑论文所做的许多工作,感谢中国生态学会和中国科学院生态环境研究中心对会议组织工作的支持。特别感谢中国科学院生态环境研究中心和中心环境生物技术室对该文集出版经费的支持。

由于论文涉及面广,时间仓促,编者水平所限,书中疏漏之处在所难免,敬请读者批评指正。

张洪勋

中国生态学会微生物生态专业委员会主任

2003 年 10 月于北京

## 目 录

序  
前言

## 上编 研究报告

- 硝化细菌的 PCR 方法检测和定量研究 ..... 谢冰等(3)
- 白腐真菌的 DNA 提取和 RAPD 研究初探 ..... 马丽华等(10)
- 利用鼠疫耶尔森氏菌全基因组 DNA 芯片对比较基因组学、进化基因组学  
与生态位适应的研究 ..... 周冬生等(14)
- 16S rRNA 技术用于硝化过程中微生物种群结构分析初探 ..... 李红岩等(27)
- PCR-DGGE 方法的建立及其在微生物生态群落分析中的应用探讨  
..... 刘新春等(32)
- 不同 DNA 聚合酶对 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性的影响  
..... 罗海峰等(41)
- 土壤重金属污染对丛枝菌根真菌产孢量的影响 ..... 冯固等(47)
- 用磷脂脂肪酸(PLFA)技术分析汞对黑壤微生物群落的影响 ..... 薛凯等(55)
- PCR-DGGE 方法检测不同微生态制剂——益生菌样品中乳酸菌的群落  
组成 ..... 王晓谊等(62)
- 磷化氢含量与某些环境因子的关系 ..... 刘志培等(67)
- 利用液相色谱-大气压化学电离源-质谱分析活性污泥中的微生物呼吸醌  
..... 张昱等(75)
- 呼和浩特市大气微生物数量的时空分布 ..... 赵吉等(80)
- 稀释平板技术应用于红树林区土壤微生物数量研究的方法学改进  
..... 张瑜斌等(85)
- 青藏高原冻土微生物的初步研究 ..... 冯虎元等(94)

10/11/10

- 环境因子对 NG—1 真菌降解 NG 染料的影响 ..... 梁利华等(101)
- 降解非离子表面活性剂嗜冷菌的筛选及其降解性能的初步研究 ... 张敏等(105)
- 活性污泥凝絮体的形成过程 ..... 李培睿等(111)
- 微生物絮凝剂絮凝机理研究 ..... 宫小燕等(116)
- 开放式空气 CO<sub>2</sub> 浓度增高对冬小麦 VA 菌根侵染率和根系活力的影响  
..... 李杨等(121)
- 人体肠道菌群构成及重要代谢产物的研究 ..... 张敏等(125)
- 一种新型微生态制剂——噬菌体的分离及治疗鸡腹泻病的研究  
..... 谢慧君等(131)
- 生物预处理麦草化学机械法制浆的研究 ..... 卢雪梅等(135)
- 优势混合菌主要木质素降解酶的协同效应研究 ..... 李宗义等(140)
- 南戴河和天津大港地区海洋微生物的分离与杀虫活性筛选 ..... 熊利霞等(145)
- 朝鲜蓟提取物的抑菌作用研究 ..... 朱显峰等(151)
- 运用原生质体融合技术构建内醚糖乙醇发酵菌株的初步研究 ... 余志晟等(156)

## 下编 研究综述

- 应用共生微生物遗传防治水稻虫媒疾病的研究进展 ..... 钟江等(167)
- 植物病害微生态防治研究进展 ..... 王莉等(172)
- 分子生态学与微生物群落的动力学监测、结构解析及功能调控 ..... 赵立平(178)
- 嗜热菌及嗜热酶的研究应用 ..... 梁利华等(184)
- 冰川微生物的研究进展 ..... 马晓军等(192)
- 淡水藻类对地表水体的影响及其控制 ..... 王梅梅等(197)
- 食品分子加工技术生物学原理和应用 ..... 牛天贵等(205)
- 生物催化铁、锰离子及其氧化物的循环转化 ..... 李浩然(211)
- 污水处理系统中微生物生态群落分析技术进展 ..... 杨清香等(215)
- 脱水内醚糖生物利用进展 ..... 李林等(222)

# 上编 研究报告





# 硝化细菌的 PCR 方法检测 和定量研究<sup>①</sup>

谢冰 刘江健 徐亚同

(华东师范大学环境科学与技术系, 上海 200062)

**摘 要:**用两种不同的方法对曝气池中的活性污泥进行了总 DNA 的提取,通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法测定,CTAB 法提取出来的总 DNA 的完整性和纯度都较好,以某硝化细菌的引物进行 PCR 扩增,确定合适的扩增条件,可以扩增出特异性的 DNA 片断。本文将聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)与最大几率数(Most Probable Number, MPN)相结合的 MPN-PCR 法对曝气池中硝化细菌进行了定量检测的研究探讨,为实现对生物曝气池污水中的硝化细菌的快速、稳定的定量检测提供可能。

**关键词:**硝化细菌 DNA 提取 PCR 扩增 MPN-PCR 法 检测 定量

## The Detection and Quantitative Examination of Nitrobacteria by Using PCR Technique

XIE bing LIU Jiangjian XU Yatong

(Dept. of Environmental Science, East China Normal University, Shanghai, 200062)

**Abstract:** The total DNA of activated sludge was extracted by using two methods, and detected by agarose gel electrophoresis and U. V photometry. The results showed that the purity and integrity of the total DNAs extracted by CTAB method were relatively good, and could be served as template for PCR amplification; The certain primers of nitrobacteria could generate a specific DNA fragment. The PCR-MPN method, based on the combination of PCR (Polymerase Chain Reaction) and MPN (Most Probable Number) were applied for the quantitative examination of nitrobacteria in activated sludge of biological aeration tank, which the purpose is to establish a rapid sensitive and stable method for the quantitative detection of nitrobacteria in wastewater of biological aeration tank.

**Key words:** Nitrobacteria, DNA extraction, PCR amplification, PCR-MPN technique, Detection, Quantitative examination

硝化细菌(*Nitrobacteria*)是一大类在自然界氮素循环和废水生物脱氮中起着重要作用的

<sup>①</sup> 本文受上海市环保局课题(02JG05030)资助;上海市生态学重点学科以及中科院生态研究中心水化学重点实验室开放基金部分资助。

菌群。硝化细菌是一类好氧化能自养细菌,能够利用还原态无机氮化合物进行自养生长。自维诺格拉斯基(Winogradsky)发现硝化细菌以来,人们一直是通过其形态特征和特殊的氧化步骤来认识它们的。由于硝化细菌在纯培养过程中生长缓慢且分离困难,运用传统的研究方法对它们进行进一步的探究受到限制<sup>[1]</sup>。

聚合酶链式反应(PCR)是一种在体外快速扩增靶 DNA 的技术,该技术灵敏度高,已被用于检测食品、临床及环境样品中的各种微生物。近年来,国内、外已有学者应用聚合酶链式反应技术对硝化细菌的快速检测进行研究。用 PCR 技术对硝化细菌进行定量检测的方法尚处于起步的摸索阶段<sup>[2~5]</sup>。

本文主要研究了活性污泥微生物总 DNA 的提取以及用 PCR 技术对硝化细菌进行检测的定量研究,目的是建立生物处理系统中的硝化细菌的快速、灵敏、稳定的检测和定量方法。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 硝化细菌总 DNA 的提取方法

本实验采用了两种不同的硝化细菌总 DNA 的提取方法:

一种是采用高盐试剂盒法,试剂盒组成如下:

- (1)25ml TE(无菌)。
- (2)40ml Solution Cl。
- (3)60ml Solution P。
- (4)20ml 1.2mol/L NaCl(无菌)。

操作步骤如下:

- (1)取 1.5ml 样品 10 000 g 离心 10 min。
- (2)弃去上清液,沉淀加入 200 $\mu$ l TE,用吸管反复吹打使之悬浮。再加入 400 $\mu$ l Solution Cl,混匀后,置于 55 $^{\circ}$ C 1h。中途上下混几次。降解完全的样品应为半透明粘稠液体,否则应继续保温处理。

(3)加入 600 $\mu$ l 氯仿,混匀,不能太剧烈,以保证 DNA 的完整性。

(4)10 000r/min 离心 3min,此时应分成三层,基因组 DNA 在上层溶液中,如未能分层,表明样品和氯仿未混匀。取 500 $\mu$ l 上层清液,置于无菌 1.5ml 离心管中。

(5)加入 500 $\mu$ l Solution P,混匀,室温放置 2min。室温高速离心,10 000r/min,2min。

(6)吸掉溶液,注意不要抽走沉淀。立即加入 100 $\mu$ l 1.2mol/L NaCl,轻轻振荡直至 DNA 样品完全溶解。

(7)加入 300 $\mu$ l 冷乙醇,-20 $^{\circ}$ C 放置 2h。10 000r/min,高速离心 3~4min。吸走或倒掉乙醇,用 70%乙醇洗一次。倒置于干净的滤纸上,室温干燥 10min。DNA 用 TE 溶解。

另一种方法是 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)-NaCl 破壁+蛋白酶 K 裂解,加酚/氯仿/异戊醇抽提。经过比较其它方法后改进部分步骤,具体步骤见文献<sup>[6~7]</sup>。

### 1.2 提取的硝化细菌总 DNA 的浓度和完整性分析

在本实验中采用紫外分光光度法对提取的硝化细菌总 DNA 进行定量测定,分别测定 230,260 和 280nm 的吸光度。提取的 DNA 完整性可以通过琼脂糖凝胶电泳来观察。在电泳图

中,若仅出现提取的 DNA 的条带而在泳道上没有亮带,则说明提取的 DNA 完整,没有破碎。若泳道上出现比较明显的亮带,则说明提取的 DNA 破碎比较严重,完整性不好。

### 1.3 提取的硝化细菌总 DNA 的 PCR 扩增

#### 1.3.1 硝化细菌的部分种属引物序列

本研究采用的硝化细菌的部分种属引物序列见表 1。

表 1 硝化细菌部分种、属引物序列

引物	序列(5'-3')	靶位点	特定种属
AF363288-1	AAACACGGCCCAAACCTCCTAC	267~287	<i>Nitrobacter winogradsky</i>
AF363288-2	CACTAACGGCTGGCATTTCATC	753~733	<i>Nitrobacter winogradsky</i>
X90820-1	CACGGCCAGACTCCTACG	314~332	<i>Nitrosospira</i>
X90820-2	TTCGCCATCGGTGTTTCCTC	715~697	<i>Nitrosospira</i>
X82559-1	AACGGGGAGGAAGGTGGGGATGAC	1158~1181	<i>Nitrospira marina</i>
X82559-2	GTGGTGTGACGGGCGGTGTG	1404~1385	<i>Nitrospira marina</i>

#### 1.3.2 PCR 反应条件

反应体系包括:1 $\mu$ l 提取的硝化细菌总 DNA 作为模板,0.5 $\mu$ mol/L(终浓度,下同)引物,5 单位 *Taq* 酶,200 $\mu$ mol/L 的 4 $\times$ dNTPs,10 $\times$ PCR 缓冲液(包括:100 mmol/L KCl,80 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,100 mmol/L Tris·HCl, NP-40, pH9.0),5~2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>(表 2),以去离子水补足总体积 50 $\mu$ l。PCR 反应条件:预变性(95 $^{\circ}$ C)10min,变性(94 $^{\circ}$ C)30s,退火(适当温度)30s,延伸(72 $^{\circ}$ C)30s,35 次循环过程,延伸(72 $^{\circ}$ C)5min。

表 2 PCR 反应的退火温度及 Mg<sup>2+</sup> 浓度

引物	X90820	AF363288	X82559
退火温度( $^{\circ}$ C)	60.1	56.3	57.1
Mg <sup>2+</sup> 浓度(mmol/L)	4.0	3.0	2.0

#### 1.3.3 PCR 产物的检测

PCR 产物的电泳检测使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,80V 的电压(4V/cm),电泳 60min,在浓度为 0.5 $\mu$ g/ml 的染色液染色 30min,在紫外灯下观察并用凝胶电泳图像处理系统拍摄、处理。

### 1.4 MPN-PCR 法对样品硝化细菌进行定量

对抽提的总 DNA 溶液进行 10 倍梯度稀释(10<sup>0</sup>,10<sup>-1</sup>,10<sup>-2</sup>,10<sup>-3</sup>,10<sup>-4</sup>),选取不同稀释度的样品,分别做 3 个平行的 PCR 反应,根据扩增产物的电泳结果来计数样品的阳性反应数,确定数量指标。数量指标由三位数字组成,分别表示 3 个连续的稀释度 PCR 反应阳性的样品数。根据这些指标从 MPN 表中查出相应的硝化细菌的近似值,推算每 ml 样品中硝化细菌的数量。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 硝化细菌总 DNA 提取结果

#### 2.1.1 不同提取方法提取细菌总 DNA 结果

取 1.5ml 的样品(为城市污水处理厂曝气池的混合液),用 CTAB 裂解破壁法与试剂盒法

进行硝化细菌总 DNA 的提取,提取的总 DNA 用 60 $\mu$ l TE 溶液溶解。分别测量其在 230,260 和 280nm 处的吸光度值,结果见表 3。

表 3 标准裂解破壁法与试剂盒法提取硝化细菌总 DNA 的比较

提取方法		A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>230</sub> /A <sub>260</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	DNA 浓度( $\mu$ g/ $\mu$ l)	
样品批次一	裂解破壁法	1	0.051	0.090	0.043	0.567	2.09	675.0
		2	0.036	0.055	0.028	0.655	1.96	412.5
		3	0.041	0.065	0.034	0.631	1.91	487.5
		4	0.028	0.037	0.021	0.757	1.76	277.5
	试剂盒法	1	0.014	0.011	0.008	1.273	1.38	82.5
		2	0.031	0.043	0.023	0.721	1.87	322.5
		3	0.010	0.004	0.003	2.500	1.33	30.0
样品批次二	裂解破壁法	1	0.016	0.016	0.009	1.000	1.78	120.0
		2	0.054	0.101	0.049	0.529	2.08	757.5
		3	0.024	0.031	0.015	0.774	2.07	232.5
		4	0.030	0.039	0.018	0.769	2.17	292.5
	试剂盒法	1	0.006	0.000	0.001		0.00	0.0
		2	0.009	0.001	0.001	9.000	1.00	7.5
		3	0.031	0.053	0.028	0.585	1.89	397.5
		4	0.017	0.025	0.013	0.680	1.92	187.5

注:A<sub>260</sub>和 DNA 浓度的换算关系为 DNA 浓度 C( $\mu$ g/ml)=A<sub>260</sub>×3×50/0.02=7500×A<sub>260</sub>;1,2,3,4 表示同一方法的平行样。

从这些数据可以看出,对于同一样品,用 CTAB 裂解破壁法比试剂盒法的总 DNA 提取量要大,A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>的比值处于 1.8~1.9 之间,提取的总 DNA 的纯度比较高;同时提取的各平行样的两项比值 A<sub>230</sub>/A<sub>260</sub>和 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比较一致和稳定。因此,采用 CTAB 裂解破壁法来提取硝化细菌的总 DNA,可更好地为后面的 PCR 扩增创造条件。

### 2.1.2 CTAB 破壁法对不同量的样品总 DNA 提取结果

用同一样品(上海城市污水处理厂曝气池污泥),采用 CTAB 破壁法提取总 DNA(表 4),

表 4 CTAB 破壁法提取不同样品量的总 DNA

样 品		A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	C <sub>DNA</sub> (ng/ $\mu$ l)	DNA 产率(ng/ml)
样品量 1.5ml	1	0.038	0.080	0.042	2.105	1.905	600.0	2.40×10 <sup>4</sup>
	2	0.035	0.068	0.035	1.943	1.943	660.0	2.64×10 <sup>4</sup>
	3	0.051	0.090	0.043	1.765	2.093	675.0	2.70×10 <sup>4</sup>
	4	0.056	0.101	0.051	1.804	1.980	757.5	3.03×10 <sup>4</sup>
平均值		0.0450	0.0848	0.0428	1.904	1.980	636.0	2.54×10 <sup>4</sup>
样品量 3.0ml	1	0.160	0.349	0.181	2.181	1.928	2617.5	5.24×10 <sup>4</sup>
	2	0.148	0.325	0.158	2.196	2.056	2437.5	4.88×10 <sup>4</sup>
	3	0.185	0.381	0.192	2.059	1.984	2857.5	5.72×10 <sup>4</sup>
	4	0.192	0.402	0.210	2.094	1.914	3015.0	6.03×10 <sup>4</sup>
平均值		0.1713	0.3643	0.1853	2.127	1.966	2732.25	5.46×10 <sup>4</sup>

做不同的提取量(样品量分别为 1.5 和 3.0ml),以比较提取的 DNA 的纯度和产量。每一组样品的 1,2,3,4 表示这一组的四个平行样。用 60 $\mu$ l TE 溶液溶解提取出的 DNA,测定吸光度值。

对得到 DNA 产量 C<sub>DNA</sub>(或 A<sub>260</sub>)进行偏差分析,结果见表 5。

表 5 产量  $C_{DNA}$  (或  $A_{260}$ ) 的偏差分析

样 品	绝对偏差 $d_i$	相对偏差 $RD$	样 品	绝对偏差 $d_i$	相对偏差 $RD$		
样品量 1.5ml	1	0.007	15.56%	样品量 3.0ml	1	0.0113	6.60%
	2	0.010	22.22%		2	0.0233	13.6%
	3	0.006	13.33%		3	0.0137	8.00%
	4	0.011	24.44%		4	0.0207	12.08%
均 值	0.0085		均 值	0.01725			

理论上, 3.0ml 样品提取的 DNA 量应该是 1.5ml 样品提取量的 2 倍, 即  $C_{DNA}$  的比值大致应等于 2; 两样品的 DNA 产率应该大致相等。但是, 从表 4 和表 5 可以看出, 3.0ml 样品提取的 DNA 量大大高于 1.5ml 的提取量,  $C_{DNA}$  的比值  $> 2$ , 3.0ml 样品 DNA 的产率也要比 1.5ml 样品高出许多。表明样品量小, 提取的 DNA 量较少。从表 5 的偏差分析来看, 1.5ml 样品的提取量的偏差比 3.0ml 样品的大一些, 精密度较差, 可能是由于样品量少, 误差产生的影响大的缘故。所以进行样品 DNA 抽提时应有足够的样品量, 才能保证结果的相对准确性。

### 2.1.3 提取的 DNA 完整性

提取的 DNA 完整性可以通过琼脂糖凝胶电泳来观察。图 1(a) 是采用 CTAB 法提取, DNA 较完整, 没有破碎, 图 1(b) 采用高盐试剂盒法, DNA 有拖尾现象, 表明完整性不好。

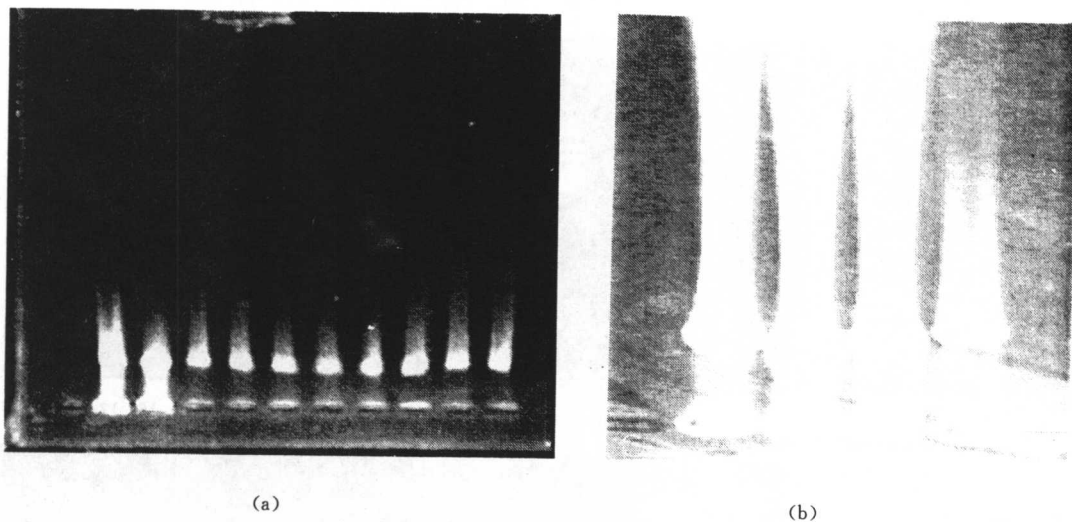


图 1 提取的硝化细菌总 DNA 电泳图  
(a) 采用 CTAB 法提取的 DNA; (b) 采用试剂盒的方法提取的 DNA

## 2.2 PCR 扩增结果

如图 2 所示, 2 和 3 能看到扩增出明显的 2 条特异性的条带, 其大小分别约为 150bp 和 450bp; 引物 X82559 对样品没有扩增, 这可能与样品中没有该种属细菌有关; 7, 8 和 9 是引物 AF363288 扩增出的特异性条带, 特异性条带大小约为 280bp, 条带特异性和清晰度较好, 故后面的定量研究选用该引物进行扩增。

## 2.3 MPN-PCR 定量硝化细菌

对表 4 中, 3.0ml 样品的 1~3 号平行样分别做 MPN-PCR 定量, 其结果如图 3 所示。

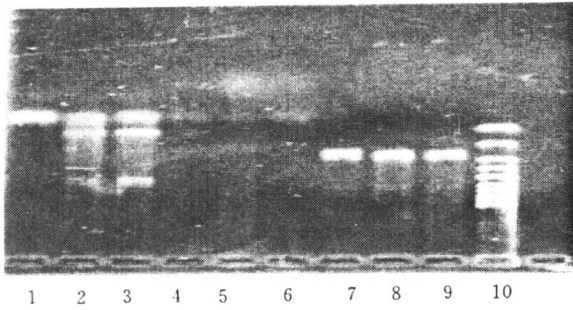


图2 PCR 扩增结果

1,2 和 3 为用引物 X90820 扩增的结果;  
4,5 和 6 为用引物 X82559 的扩增结果;7,8  
和 9 为用引物 AF363288 扩增的结果;10  
为 100bp 的标准 Marker

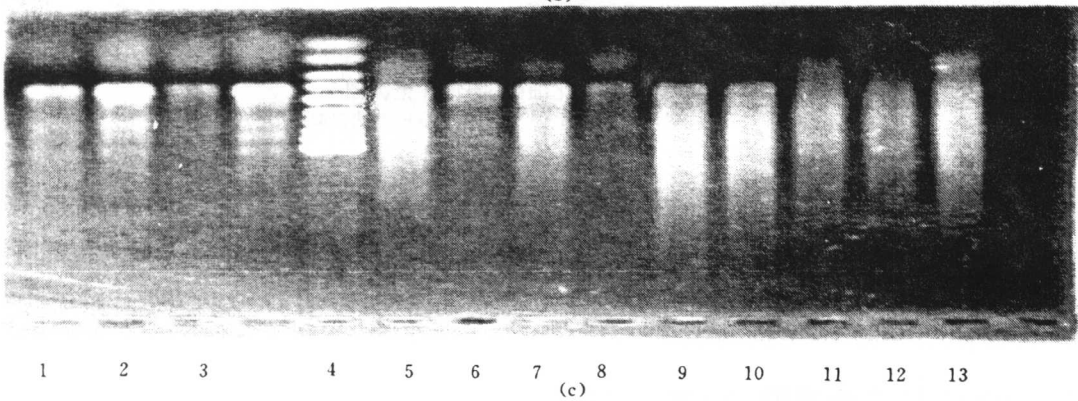
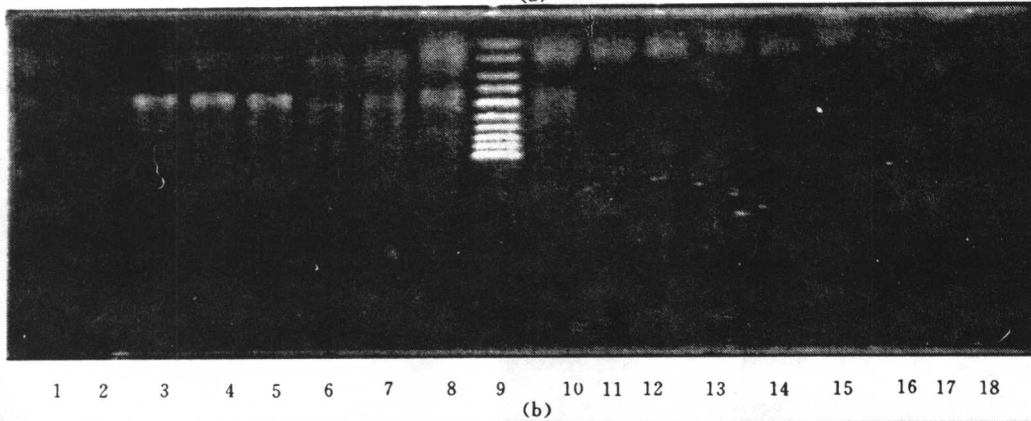
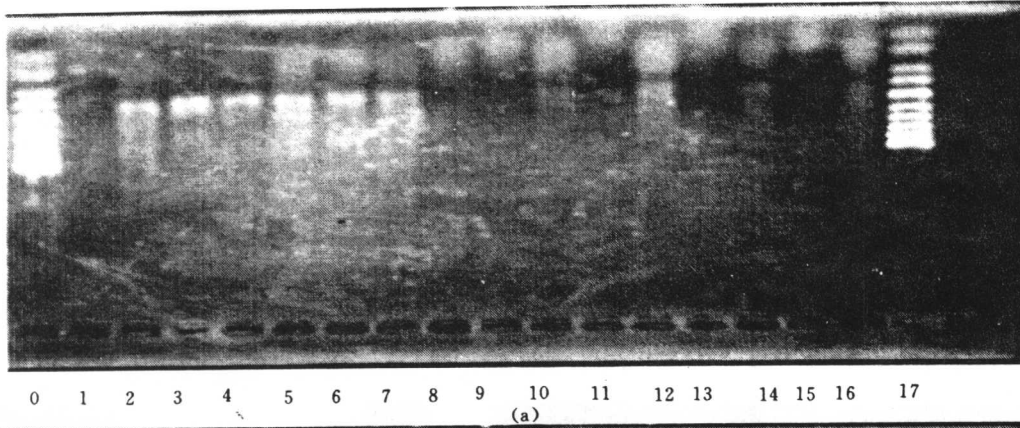


图3 MPN-PCR 法电泳图中(a)~(c)分别代表1~3号样

(a) 0 和 17 是 100bp ladder; 1 是空白; 2~4, 5~7, 8~10, 11~13, 14~16 分别为  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  三个稀释度的三个平行, 扩增出来的条带大约为 450bp, 其反应数分别为 3, 3, 1, 1, 0。(b) 9 是 100bp ladder; 1 和 2 是空白; 3~5, 6~8, 10~12, 13~15, 16~18 分别为  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  三个稀释度的三个平行, 扩增出来的条带大约为 450bp, 其反应数分别为 3, 3, 1, 0, 0。(c) 4 是 100bp ladder; 1~3, 5~7, 8~10, 11~13 分别为  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  三个稀释度的三个平行, 扩增出来的条带大约为 450bp, 其反应数分别为 3, 3, 3, 0。

将 MPN-PCR 得到的结果归纳为表 6。

表 6 MPN-PCR 定量测定硝化细菌结果

样品	不同稀释度的阳性反应数	数量指标	查表数	细菌数(个/ml)
	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$			
1	3, 1, 1, 0	311	7.5	$1.5 \times 10^4$
2	3, 1, 0, 0	310	4.5	$0.9 \times 10^4$
3	3, 3, 0, 0	330	25	$5.0 \times 10^4$

注: 细菌数(个/ml) = 查表数  $\times 102 \times 60 \div 3 = 2040 \times$  查表数。

## 2.4 讨论

对某一对硝化细菌的特异性引物而言, 扩增出来的产物是某个特定种属的硝化细菌, 所得到的数量结果并不能代表所有的硝化细菌数量, 可能会比 G-resis-MPN 法得到的结果要低。如果用氨氧化功能基因引物所进行的扩增就能代表亚硝酸细菌的总量, 用硝酸细菌的功能基因引物扩增代表硝酸细菌。此外, 由于 PCR 反应有其最低检出限, 不同稀释度所含模板 DNA 的量决定了 PCR 反应是否能进行, 所以抽提出来 DNA 的总量对于样品稀释后能否扩增至关重要, 从表 6 中的结果可见, 样品 2 的 DNA 提取量比 1 和 3 低, 得到的计数结果也较低。因此, 在对硝化细菌进行 PCR 定性检测和 MPN-PCR 定量检测的整个过程中, 将硝化细菌总的 DNA 尽可能全部提取成为关键的一步, 有必要做多组平行提取, 以确定 DNA 是否完全提取。这是在此研究中应该注意的问题。

## 参考文献

- [1] 徐亚同. 废水生物脱氮处磷. 上海: 华东师范大学出版社, 1995
- [2] 布坎南 R E, 吉本斯 N E 等. 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1984
- [3] Burrell Paul C, Phalen Carol M, and Hovanec Timothy A. Identification of Bacteria Responsible for Ammonia Oxidation in Freshwater Aquaria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5791-5800
- [4] Orso S, Gouy M, Navarro E, and Normand P. Molecular phylogenetic analysis of nitrobacter spp. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 1994, 44: 83-86
- [5] 明镇寰, 岳春梅. 生物硝化池污水中硝化细菌的快速定量研究. *环境科学学报*, 2002, 11(5): 796-799
- [6] 卢莉琼. 硝化细菌的遗传多样性研究. 华东师范大学硕士毕业论文, 2003
- [7] 卢圣栋等. 现代分子生物学实验技术(第二版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999



# 白腐真菌的 DNA 提取和 RAPD 研究初探<sup>①</sup>

马丽华 谢冰 黄民生

(华东师范大学环境科学与技术系, 上海 200062)

**摘 要:**本文探讨了提取真菌 DNA 的方法,采用改进的蜗牛酶法,液氮研磨+饱和酚抽提法两种方法,从白腐真菌菌丝体中提取 DNA,用电泳、紫外吸收光谱进行鉴定。结果显示:蜗牛酶法 DNA 破碎少,产量高;液氮研磨+饱和酚法,DNA 产量高,但破碎严重。采用 RAPD 技术对两株未知的白腐真菌从 DNA 碱基序列上进行了初步研究,试验了影响 RAPD 结果的一些因素。结果表明,DNA 模板浓度及  $Mg^{2+}$  浓度对扩增影响较大,而 dNTPs 和 *Taq* 酶浓度在小范围内变化不会影响扩增结果。RAPD 扩增结果表明,试验的白腐真菌紫外线诱变前、后 DNA 序列发生了较大的改变。

**关键词:**DNA 提取 RAPD 白腐真菌 紫外诱变

## The Study of DNA Extraction and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of White Rot Fungi

MA Lihua XIE Bing HUANG Minsheng

(Dept. of Environmental Science, East China Normal University, Shanghai, 200062)

**Abstract:** Two methods of breaking the cellular wall, liquid nitrogen grinding and snail enzyme as well as saturation phenol, high-salt deposition were used to extract DNA of white-rot fungi in this paper. The results of UV-spectrum and gel electrophoresis analysis demonstrated that snail enzyme could break the cellular wall of fungi effectively and DNA extracted by this way was the highest in output and was little broken. RAPD was used to study the DNA sequence of two different white fungi. The result showed significant changes of the DNA sequence of two white fungi before and after UV (ultraviolet) mutagenesis.

**Key words:** DNA extraction, Randomly amplified polymorphic DNA, White-rot fungi, Ultra-violet inducement

白腐真菌在环境治理的研究中日益成为研究的热点,近年来分子标记技术已经成为真菌分类学中分子进化以及种群遗传研究的一个重要工具<sup>[1]</sup>。随机扩增多态性(RAPD)技术是一种以 10bp 左右的短寡核苷酸链为随机引物(这些引物所含的 G+C 含量一般为 50%~70%)的 PCR 反应,在较低的退火条件下能与基因组 DNA 中互补顺序配对,启动 DNA 的合成,扩

<sup>①</sup> 本文受国家自然科学基金(50278034)和上海市生态学重点学科基金资助。