

# PCR-DGGE 技术及其在环境微生物领域中的应用

于 洁,冯 焱,解玉红,刘淑琮

(天津理工大学 环境科学与安全工程学院,天津 300384)

**[摘要]** 变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术目前已被广泛应用于环境微生物领域。介绍了 DGGE 的基本原理和技术步骤,分析了该方法的主要影响因素及其优点和存在的问题;概述了 PCR-DGGE 技术在环境微生物领域,包括在微生物处理技术、微生物生态多样性研究和功能菌种优化筛选中的应用现状,并展望了其应用前景。

**[关键词]** 变性梯度凝胶电泳;微生物处理;微生物多样性;菌种筛选

**[中图分类号]** Q93-33

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2010)06-0227-08

## PCR-DGGE and its application in the research of environmental microbiology

YU jie, FENG xin, XIE Yu-hong, LIU Shu-cong

(College of Environmental Science and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) has been proven to be widely used in the microbial environment, including the microbial treatment, microbial diversity and the screening of the function bacterium. In this paper, the principle and technical route of DGGE is briefly introduced, including its main causing factors, the excellence and the limitation. The future of this technology is also expected.

**Key words:** DGGE; microbial treatment; microbial diversity; bacterium screening

变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术,是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术<sup>[1]</sup>。此后, DGGE 技术一直被较多地应用于基因突变的检测<sup>[2-3]</sup>,以及癌症和遗传病的筛查及诊断中。1993 年, Mulyer 等<sup>[4]</sup>首次将 DGGE 技术应用于研究微生物菌苔和生物膜系统的群落多样性,证实了这种技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性。在此之后, DGGE 技术开始在环境微生物研究中应用并得到发展<sup>[5-6]</sup>。该法在应用中除其自身具有的明显优势外,也出现了一些不足之处。本文对 DGGE 技术原理和技术步骤进行了分析,并对该技术在环境微生物领域中的应用情况进行了整体评述,以期

为 DGGE 技术更好地应用于环境微生物研究提供更多的理论依据。

### 1 PCR-DGGE 技术的基本原理

PCR-DGGE 技术是基于核酸序列的不同,将片段大小相同的 DNA 序列分开的一种技术方法<sup>[4]</sup>。在进行变性梯度凝胶电泳时,序列不同的 DNA 片段因为碱基组成和排列的差异,在聚丙烯酰胺凝胶中解链时需要不同的变性剂浓度,并会发生空间构型的变化,最终导致电泳迁移率的差异。将通过 PCR 扩增之后得到的等长双链 DNA 分子,在含梯度变性剂(如尿素、甲酰胺)的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳时,电泳迁移率的差异会使不同序列的 DNA 片段停留在凝胶的不同位置,从而形成相互分开的

\* [收稿日期] 2009-12-04

[基金项目] 2009 年天津市自然科学基金重点项目(09JCZDJC26200);天津市科委自然科学基金项目(043611111)

[作者简介] 于 洁(1985-),女,山东东营人,在读硕士,主要从事环境微生物研究。E-mail:gracyyu\_621@163.com

[通信作者] 冯 焱(1961-),男,北京人,教授,硕士生导师,主要从事生物化学与环境微生物研究。

E-mail:xfeng2100@tjut.edu.cn

条带图谱<sup>[1]</sup>。从理论上讲,只要选择的电泳条件足够精细,就可以分开仅有 1 个碱基差异的 DNA 片段<sup>[7]</sup>。

## 2 PCR-DGGE 技术的操作步骤

PCR-DGGE 的主要操作步骤如下:(1)样品总 DNA 的提取与纯化;(2)对样品片段的 PCR 扩增;(3)DGGE 电泳。

### 2.1 样品总 DNA 的提取与纯化

PCR-DGGE 是基于总遗传信息基础上的分析,获得高质量的 DNA 对后期结果至关重要。然而无论是从自然生态环境,还是从活性污泥、生物膜等人工环境中提取的样品,其微生物种类都很复杂,且混杂有大量的杂质,需要经过样品预处理、细胞裂解、DNA 沉淀等步骤,这些步骤容易造成菌种数量和 DNA 含量的变化,从而使后期的 PCR-DGGE 分析结果产生偏差<sup>[8]</sup>。

对样品进行预处理,目前普遍使用的是间接法<sup>[9]</sup>,即通过梯度离心、离心洗涤等步骤去除样品中的杂质,然后再收集和裂解细胞。这一步骤避免了直接对样品处理时,样品中杂质对 DNA 的污染,但容易造成微生物种类和数量的丢失。

为了获得样品中高品质的总 DNA,还要保证使所有的微生物细胞裂解而充分释放出核酸物质,并使得其中的 DNA 得到充分的提取。近年来,除传统的酶法、化学法和机械法裂解之外,不少新的细胞裂解方法被逐渐应用,如微珠振荡法、超声波法<sup>[10]</sup>和微波法等。不同 DNA 提取方法会导致微生物的不同裂解度,所释放的核酸数量不尽相同,使得能够作为 PCR 模板的 DNA 数量在不同方法中并不一致<sup>[11]</sup>,从而对最终的 DGGE 图谱产生影响。

在 DNA 的提取过程中,一般使用乙醇、异丙醇和聚乙二醇等一些对 DNA 具有一定优先选择性的有机溶剂,来沉淀样品中的 DNA 分子。不同 DNA 提取方法导致抑制剂的残留水平不同,从而在不同程度上影响 PCR 的特异性扩增<sup>[12]</sup>;其产生的 DNA 小片段数量也不同,会影响 PCR 扩增的敏感性<sup>[13]</sup>,同时也增加了嵌套作用的可能性<sup>[14]</sup>,也可能对 DGGE 的结果产生影响。

很多学者对各种方法的提取效果进行了比较,结果表明,采用已有的不同提取方法获得的 DNA 模板,均能进行 16S rDNA V3 区特异性片段扩增<sup>[13]</sup>,但不同提取方法对相同生境菌群总 DNA 的提取量及 DGGE 指纹图谱存在显著影响<sup>[15]</sup>。由此

可见,采用微生物分子生态学工具对不同生境进行菌群结构分析时,需提前优化 DNA 提取方法<sup>[15]</sup>,以提高 DGGE 的效果。

### 2.2 对样品片段的 PCR 扩增

PCR 扩增是 PCR-DGGE 技术中至关重要的步骤。PCR 包括 3 个基本环节:双链 DNA 加热变性为单链;在低温下引物与模板 DNA 单链互补配对;在适宜温度下, *Taq* DNA 聚合酶催化引物沿着模板 DNA 延伸。即反复进行变性、退火和延伸的循环,使扩增 DNA 产量呈指数上升,经 25~35 个循环后,扩增倍数可达  $10^6$  倍,从而完成对模板 DNA 的 PCR 扩增。影响 PCR 扩增的主要因素有引物的选择和扩增体系等。

**2.2.1 PCR 扩增引物的选择** 在分析微生物群落时,通常选择 16S rDNA 中的保守序列进行 PCR 扩增反应。这是由于任何一种原核生物都具有 16S rDNA,其序列长短适中且非常保守。应用最广泛的 16S rDNA 通用引物是 341f/534r(V3 区)、341f/926r(V3-V5 区)和 968f/1401r(V6-V8 区)<sup>[16]</sup>,其中以使用 V3 区引物后的 PCR-DGGE 条带数最多、分离效果最好<sup>[17]</sup>。为避免因为单一引物扩增偏嗜性造成的偏差,可以选用多对引物同时对混合 DNA 进行 PCR 扩增<sup>[18]</sup>。选用不同引物对目的基因进行扩增,然后比较 DGGE 图谱的差异,可以降低共迁移的发生频率<sup>[19-20]</sup>。

为使扩增产物在 DGGE 中的解链程度更完全,在 PCR 扩增目的片段时,人为地在其某一引物的 5' 端掺入一段约 40 个碱基的 GC 序列,称为“GC 夹”或“GC 帽”,使目的序列的解链行为发生在最高解链温度区域,从而完全解链<sup>[7]</sup>。试验证明,使用“GC 夹”之后,PCR 产物在 DGGE 胶版上的分离效率大大提高。目前,“GC 夹”技术已经被广泛地应用于 PCR-DGGE 技术中。

**2.2.2 PCR 扩增体系的完善** 在 PCR 扩增体系中,不同模板含量、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、dNTP 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度和退火温度等,对 PCR 反应结果都有不同程度的影响。

周怀谷等<sup>[21]</sup>研究了 PCR 扩增体系的体积减少对 DNA 分析的影响,发现小体积的扩增体系容易出现等位基因丢失、额外等位基因产生等现象,并提出在检材情况较差时,应慎用小体积的扩增体系。在 PCR 扩增体系中, *Taq* DNA 聚合酶的品质和保真性对扩增产物也有较大影响。

PCR 扩增体系较为复杂,影响因素众多,优化

起来较为繁琐。已经有研究人员通过优化组合,提出了针对不同种类微生物的稳定可靠的 PCR 扩增体系<sup>[22]</sup>,具有一定的实用价值。

### 2.3 变性梯度凝胶电泳

当对 PCR 的扩增产物进行 DGGE 时,温度或变性剂的浓度开始较小,不能使双链 DNA 片段最低的解链区域解链,此时 DNA 片段的迁移行为与在一般聚丙烯酰胺凝胶中相同。然而一旦 DNA 片段迁移到某一特定位置,其温度或变性剂浓度恰好能使双链 DNA 片段最低的解链区域解链时,该区域立即发生解链,部分解链的 DNA 片段在凝胶中的迁移速率会急剧降低。因此,长度相同但序列不同的 DNA 片段,会在凝胶中不同位置达到各自的解链温度,导致迁移速率大大下降,从而使不同的 DNA 片段区分开来。

通常根据 PCR 扩增出的基因片段大小,来确定聚丙烯酰胺凝胶的浓度。如 V3 区片段大小约为 300 bp,选择浓度为 8%~10%的变性剂<sup>[23]</sup>。

变性剂的梯度范围一般根据垂直 DGGE 试验结果确定,垂直试验曲线斜率较大的部分代表解链区域的  $T_m$ (解链温度),此时低温解链区的不同分子分离状态最佳。通常选择水平胶的变性剂梯度范围相差 30%,对于不同的样品还需要进行调整。对于大多数 DNA 片段,比较适宜的温度是 50~65℃。

电泳时间取决于样品的片段大小、凝胶浓度、变性剂梯度、电泳时的电压等因素。与普通电泳一样,DGGE 胶版上的 DNA 谱带在染色后才能观察。常用的染色剂有溴化乙锭(EB)、SYBR Green I、SYBR Gold 和银。EB 和 SYBR 染料只对双链 DNA 着色,单链 DNA 几乎不显色<sup>[24]</sup>。其中 EB 染色最为常用,但聚丙烯酰胺对 EB 有熄灭作用,致使灵敏度低,导致低估环境样品中微生物的种类。SYBR 染料价格昂贵,但其灵敏度高,能更好地消除染色背景;银染法对单、双链 DNA 均能着色,但不能用于后续分子操作。

## 3 PCR-DGGE 技术在环境微生物研究中的应用

### 3.1 微生物处理技术

在生物处理系统中,微生物群落的种群结构和动态性分析对研究生物降解过程及污染物转化途径具有重要意义,同时还能优化处理工艺条件和提高处理效率提供可靠的理论依据<sup>[16]</sup>。传统的微生

物种群分析方法(如形态比较法)步骤繁琐、工作量大,难以模拟微生物生长繁殖的真实条件,不足以反映微生物环境中的真实情况,具有很大的局限性。PCR-DGGE 技术具有可靠、方便快捷、重现性好等优点,能够更好地分析生物处理系统中的微生物特性,因而在生物处理系统中得到了广泛应用。

孙赛武等<sup>[25]</sup>在比较不同进水模式对生物膜反应器性能影响的研究中指出,分散式进水模式表现出了更好的脱氮效率及更高的抗冲击负荷能力。通过 DGGE 技术,得出不同方式下序批式生物膜(SB-BR)中微生物的种类和数量,验证了分散进水模式下单位体积内的有效微生物数量相对充足,对反应器的负荷能力相对较高。

张洪军等<sup>[26]</sup>在研究 A/O 工艺膜生物反应器处理生活污水的脱氮特性时,采用了 PCR-DGGE 技术,发现随着系统时间的延长,硝化细菌的数量逐渐增加,并且不同菌种的丰度也发生了变化。

牟丽婷等<sup>[27]</sup>在总结序列间歇式活性污泥(SBR)中好氧颗粒污泥的生物学特性时,也引用了一些关于 DGGE 技术的结果,表明在形成好氧颗粒污泥的过程中,污泥中的微生物在种群和数量上都会发生很大变化。好氧颗粒污泥中的菌群种类与接种的厌氧污泥有显著差异。

孙宝盛等<sup>[28]</sup>在实际工程中比较了用膜生物反应器(MBR)处理不同水质后微生物的 DGGE 图谱,分析了不同 MBR 中微生物群落多样性的特点,结果表明,不同水质条件的 MBR 在长期稳定运行后,形成了各自特定的生态群落结构,既有共同的优势种群,也有因水质的不同经过长期演替而产生的各自特有的种群。

欧阳科等<sup>[29]</sup>在利用膜生物反应器(MBR)与传统活性污泥反应器(CAS)处理相同生活污水的研究中,采用 DGGE 技术考察了 MBR 和 CAS 中微生物的群落结构及其动态变化,结果表明,MBR 的种群数量始终高于 CAS,从而说明 MBR 的群落具有更好地适应环境因素变化的能力,为 MBR 抗冲击负荷能力较强提供了解释。

Moura 等<sup>[30]</sup>采用 16S rDNA 的 DGGE 技术,分析了 2 个污水处理厂曝气池中微生物菌群的变化,DGGE 图谱显示,在春冬和夏秋季节收集的样品中,微生物的变化很大,温度、pH、溶解氧(DO)等因素均能影响微生物群落的结构,并进一步确定了所研究样品中的主要微生物种群。

Ji 等<sup>[31]</sup>在对升流式反应床生物反应器的研究

中,通过 DGGE 技术判断获得了一个由非自养和自养生物形成的相对稳定的微生物群落,该群落能够使反应器中硫化物的去除效率达到 92% 以上,并发现了该群落中主要微生物的种类。

王晓丹等<sup>[32]</sup>在对北京翠湖湿地污水塘、表流湿地和潜流湿地 3 个单元的 PCR-DGGE 分析中发现,北京翠湖表流和潜流湿地改变了水体中总的微生物数量及可培养的细菌数量,随着湿地单元的逐级处理,总的微生物数量呈逐渐上升趋势,且表流和潜流湿地处理改变了水体中细菌的优势群落结构,发现了某些可能对水质造成危害的类群。

在我国,80% 的污水处理厂都在采用活性污泥法处理污水<sup>[33]</sup>,以活性污泥为有机污染物转化主体,其中微生物菌群的结构和功能决定了活性污泥的生物活性,从而决定了一个污水处理厂的污水处理能力。随着现代研究方法的发展,虽然活性污泥中的微生物菌群越来越多地被人们发现和认识,但是还没有被完全认识,有些重要的菌群还未被发现<sup>[34]</sup>。使用 PCR-DGGE 等现代分子生物学手段,分析污泥微生物的菌群,可为活性污泥的认识和优化利用提供依据,在国内尚有很广阔的应用前景。

### 3.2 微生物生态多样性研究

在自然生态环境下,许多微生物处于贫营养状态,而培养基中充足的营养不适宜大量的贫营养微生物生长,其测定结果误差大,用传统的方法如平板计数法得到的多样性结果,来代表自然环境中的微生物多样性,是非常片面的<sup>[35]</sup>;碳素利用法(Biolog 系统)仅能鉴定快速生长的部分微生物,Biolog 板空空的碳源不能完全代表土壤生态系统中的实际碳源类型,而且 Biolog 板内是近中性的缓冲体系,高浓度的碳源及其生物毒性的指示剂均可能影响测试效果<sup>[36]</sup>;而以 PCR-DGGE 技术为代表的分子生态学方法,因为无需培养且检验时间较短,相对较为先进和可靠。

林曦等<sup>[37]</sup>以南极中山站排污口土壤为研究对象,用 DGGE 技术对样品中微生物宏基因组 DNA 中的 16S rDNA 基因 V3 可变区进行分析,结果显示,排污口土壤样品与相同生境对照样品中的微生物类群组成相似,但在排污口土壤样品中检出了传染性微生物毛球菌属(*Trichococcus*)、狡诈菌属(*Dolosigranulum*)的菌种以及丰富的小球藻(*Chlorella*),说明污水的排放已经对该地微生物群落造成明显影响。在南极地区,没有发现不同地区化学物质有明显区别,然而不同地区的土壤微生物分布却

不同。Chong 等<sup>[38]</sup>通过 DGGE 技术,研究了南极地区西格尼岛上不同位置的土壤微生物多样性,结果表明,各个不同地区发现的优势菌种多属于拟杆菌门,并通过多种环境因素解释了引起微生物分布差异的原因。

潘雪莲等<sup>[39]</sup>对黄土高原土壤中细菌群落结构的多样性进行了分析,并针对黄土高原土壤微生物的特点,进行了 DGGE 条件的优化;对 DGGE 图谱进行聚类分析,得到了不同地区和同一地区不同深度土层土壤细菌群落的多样性,同时推测不同深度土壤中的菌群群落结构可能与季风性气候引起的温湿环境变化及冰期有关。靳正忠等<sup>[40]</sup>采用传统培养、脂肪酸鉴定和 PCR-DGGE 方法,分别研究了塔里木沙漠公路防护林地土壤微生物的多样性,结果表明,虽然塔里木沙漠公路防护林的建设,促进了风沙土土壤微生物的发育,随着防护林定植年限的增加,微生物多样性明显增大,林地土壤生物活性有所增强,有利于林地土壤养分循环与利用,从微生物学角度为塔里木沙漠公路防护林的管理提供了理论依据。刘永军等<sup>[41]</sup>采用 PCR-DGGE 技术,研究了石油集输系统原油和油田产水中的微生物群落结构,得出油田产水中的微生物群落远比原油中的菌群丰富的结论。Li 等<sup>[42]</sup>通过 PCR-DGGE 指纹识别技术,分析了中国扬子江流域 8 个不同湖泊内浮游生物群落结构特征,并进一步分析了不同样本水环境中的水质和营养状态对微生物群落结构的影响。

在微微型真核生物研究方面,尽管我国已经开展了丰度检测研究,但微微型真核生物分子多样性研究才刚刚起步。江岷等<sup>[43]</sup>利用 DGGE 等技术,对南沙群岛附近海域和厦门海域等中国亚热带海域微微型真核生物的多样性进行了初步研究,结果发现,这些海域中微微型真核生物多样性丰富,有绿藻、甲藻、Stramenpiles 等主要种类,并有大量未分类可操作分类单元(OTUs)的存在。

随着现代科技的进步,人们开始越来越多地关注和研究以往不能到达的各种极端环境下的微生物生态;随着生态修复工作的大量展开,针对被污染的生态环境进行的微生物多样性分析也越来越多。PCR-DGGE 作为一种先进的微生物多样性分析技术,必将得到更多的应用和发展。

### 3.3 功能菌种的优化筛选

在使用传统方法对微生物物种进行优化分析时,主要依赖的是经典培养技术,其步骤繁琐且工作量大,而且难以正确区别和鉴定生理生化特性相似

的菌株,对于生态环境中不可培养的微生物则容易被遗漏<sup>[44-45]</sup>。近年来,PCR-DGGE 技术已经发展成为研究微生物群落组成及亲缘关系的主要分子工具之一<sup>[46-47]</sup>,其不依赖于培养过程,大大缩短了样品的分析时间,而且还能显示环境样品中不可培养的微生物的遗传信息<sup>[48]</sup>。

马俊孝等<sup>[5]</sup>利用 DGGE 技术结合传统平板培养法,对其自主研发的微生物生态菌剂 WS-401,在连续转接过程中的细菌种群组成进行了动态变化分析,结果发现,随着转接次数的增加,微生物菌群的种类减少,且微生物的营养基质及培养条件对微生物制剂在传代过程中的菌群组成和动态变化有重要影响。

毛跃建等<sup>[49]</sup>从废水处理装置的微生物群落中,分离出了较难分离的功能菌 *Thauera*,并采用 PCR-DGGE 技术进行了鉴定。

胡佳俊等<sup>[50]</sup>在对非光合 CO<sub>2</sub> 同化微生物菌群的选育及其群落结构的分析中,应用了 PCR-DGGE 技术,发现添加不同电子供体后,固碳微生物菌群的优势种发生了显著变化,在发现的 16 个优势菌种中,有 11 个是不可培养微生物,即其只能以共生方式存在。推测菌群混合培养时的固碳效率可能是多种菌共同作用的结果,从而着手优化固碳培养物菌群的结构和配比,以提高其固碳效率。

Satsuma<sup>[51]</sup>从天然水生态系统中分离出了一种对莠去津(一种除草剂)有生物降解作用的微生物菌群,利用 DGGE 技术确定了该菌群的稳定性和菌种数量,并进一步确定了菌群成分。

刘长莉等<sup>[52]</sup>使用 DGGE 技术,检测常温条件下加速木质纤维素腐解过程中菌群的动态变化,根据图谱中各泳道上条带的颜色深浅和位置变化,将菌群组成变化分为 3 个阶段,得到了一组功能和结构稳定的菌群,并测序探明了菌群的组成。

Sooksanguan 等<sup>[53]</sup>在研究稻米耕种对土壤中氮循环及硝化细菌菌群结构的影响时,采集了 0 和 10 cm 土层的土壤样品,培养得到各层的微生物样品;采用 PCR-DGGE 技术,通过获得图线的变化,得出改变营养成分和优势菌群数量可以提高水稻产量的结论。

在我国“可持续发展”的方针政策指导下,使用微生物制剂代替物理方法和化学试剂对环境中的问题进行治理,以及通过微生物方法进行新的可代替能源的研究,已经成为热点,并具有广阔的应用前景。PCR-DGGE 技术为功能菌的快速、准确检测

和鉴定,及高效稳定的微生物功能菌种或菌群的获得,提供了很好的技术支持,并得到了广泛的应用。目前,很多有效的微生物功能菌尚有待人们发现,届时,PCR-DGGE 在该领域将会得到更广泛的利用。

## 4 问题与展望

目前 PCR-DGGE 技术本身还存在一些不足,比如需要专门的设备,需要进行预试验,需要昂贵的“GC 夹板”以及需要用含有毒性物质的甲酰胺梯度凝胶,且对区分的 DNA 片段大小限制在 100~500 bp。Okubo 等<sup>[54]</sup>通过对土壤微生物种群结构的分析,进行了不同分子指纹识别方法的比较,结果显示,因为同一谱线中可能混有不同的 DNA 片段,DGGE 技术条带数量最少,尽管如此,其仍能最明显地显现不同微生物物种之间的区别,显示出该方法极高的灵敏度。并且该技术具有重复性高、快速和容易操作等优点,能够弥补传统方法的不足,应用前景仍然十分广阔。

近年来,已经有研究者在 DGGE 的基础上提出了双梯度-变性梯度凝胶电泳(DG-DGGE)技术<sup>[55]</sup>、依赖培养的 DGGE<sup>[56-57]</sup>等,能使 DNA 形成的谱带更清晰、更真实,但对这类新方法的应用国内尚不多见<sup>[58-59]</sup>。可见,PCR-DGGE 技术在对复杂环境样品的微生物研究中,不但是一种很有力的分子生物学技术,也具有很强的生命力。PCR-DGGE 技术还可以与越来越多的其他分子生物学技术和方法相结合,使其在环境微生物领域中的应用结果更加客观、真实和有效。

无论是在传统的微生物处理工艺中,还是对更新、更先进的功能菌剂的开发研究中,抑或是在对被污染环境的生物修复及对未知环境的分析探知中,PCR-DGGE 技术都将有更广泛的应用,伴随着其自身技术的发展,PCR-DGGE 技术将对环境微生物的研究做出更大贡献。

## [参考文献]

- [1] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 127-141.
- [2] 周晓柳,傅继梁. PCR 技术在基因突变研究中的应用 [J]. *癌变·畸变·突变*, 1990, 2(3): 49-52.  
Zhou X L, Fu J L. PCR technique in the study of gene mutation [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis* [J]. 1990, 2(3): 49-52. (in Chinese)

- [3] 蔡平,李怀义. 基因突变的检测 [J]. 癌变. 畸变. 突变, 1992, 4(4):55-56.  
Cai P, Li H Y. Detection of gene mutation [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis, 1992, 4(4): 55-56. (in Chinese)
- [4] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rDNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3):695-700.
- [5] 马俊孝,孔健,季明杰. 利用 PCR-DGGE 技术分析微生态制剂在传代过程中的菌群变化 [J]. 山东大学学报:理学版, 2008(7):56-60.  
Ma J X, Kong J, Ji M J. PCR-DGGE analysis of the use of probiotics in the passage in the process of change in flora [J]. Journal of Shandong University: Science Edition, 2008(7): 56-60. (in Chinese)
- [6] 李怀,关卫省,欧阳二明,等. DGGE 技术及其在环境微生物中的应用 [J]. 环境科学与管理, 2008(10):93-96, 99.  
Li H, Guan W S, Ouyang E M, et al. DGGE technology and its application of micro-organisms in the environment [J]. Environmental Science and Management, 2008(10): 93-96, 99. (in Chinese)
- [7] 吴高峰,李文刚,高卫科,等. PCR-DGGE 的原理及在动物肠道菌群分析中的应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(6):37-39.  
Wu G F, Li W G, Gao W K, et al. PCR-DGGE principle and in the animal intestinal flora analysis [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2008, 35(6): 37-39. (in Chinese)
- [8] Rochelle P A, Cragg B A, Fry J C, et al. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis [J]. FEMS Microbiol Ecology, 1994, 15(1/2):215-226.
- [9] Robe P, Nalin R, Capellano C, et al. Extraction of DNA from soil [J]. European Journal of Soil Biology, 2003, 39(4): 183-190.
- [10] 万晶晶,张汝嘉,邢德峰,等. 超声波破碎法提取活性污泥 DNA 及其 DGGE 分析 [J]. 哈尔滨工业大学学报, 2008, 40(4):559-563.  
Wan J J, Zhang R J, Xing D F, et al. Ultrasonic broken DNA extraction and DGGE analysis of activated sludge [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2008, 40(4): 559-563. (in Chinese)
- [11] Luo P, Hu C, Zhang L, et al. Effects of DNA extraction and universal primers on 16S rDNA gene-based DGGE analysis of a bacterial community from fish farming water [J]. Chin J Oceanol Limnol, 2007, 25(3):310-316.
- [12] 徐晓宇,闵航,刘和,等. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(3):377-381.  
Xu X Y, Min H, Liu H, et al. Total soil microbial DNA extraction methods [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2005, 13(3):377-381. (in Chinese)
- [13] Kuske C R, Banton K L, Adorada D L, et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:2463-2472.
- [14] Chandler D P, Frederickson J K, Brockman J. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries [J]. Mol Ecol, 1997, 6:475-482.
- [15] 何凤旭,周志刚,姚斌,等. 3 种 DNA 提取方法对养殖池塘不同生境菌群 PCR-DGGE 分析的影响 [J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(1):73-79.  
He S X, Zhou Z G, Yao B, et al. Effects of three different DNA extraction methods on the analysis of bacteria community from different micro-ecological environments in a farming pond by PCR-DGGE [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 11(1):73-79. (in Chinese)
- [16] 卢永,陈秉娟,申世峰,等. PCR-DGGE 在水处理微生物群落多样性分析中的应用 [J]. 化学与生物工程, 2009, 26(5):55-59.  
Lu Y, Chen B J, Shen S F, et al. The application of PCR-DGGE in the analysis of microbial community diversity in water treatment system [J]. Chemistry & Bioengineering, 2009, 26(5):55-59. (in Chinese)
- [17] 许春红,买文宁,赵继红,等. PCR-DGGE 研究厌氧复合床反应器中微生物种群多样性 [J]. 河南科学, 2006, 24(5):754-756.  
Xu C H, Mai W N, Zhao J H, et al. Application of PCR-DGGE to analyzing microbial diversity in up flow blanket filter [J]. Henan Science, 2006, 24(5):754-756. (in Chinese)
- [18] Fontana C, Vignolo G, Cocconcelli P S. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinian dry fermented sausages [J]. Microbiol Methods, 2005, 63(3):254-263.
- [19] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(15):1205-1208.
- [20] Yang C H, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(1):345-551.
- [21] 周怀谷,平原,徐庆文,等. PCR 扩增体系的体积减少对 DNA 分析的影响 [J]. 法医学杂志, 2002(3):155-159.  
Zhou H G, Ping Y, Xu Q W, et al. Effect of PCR reaction volume on the accuracy of human identification tests [J]. Journal of Forensic Medicine, 2002(3):155-159. (in Chinese)
- [22] 段新华,刘诚明. 关于 PCR 扩增体系优化的实验研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2004, 12(4):294-298.  
Duan X H, Liu C M. The study of a stable PCR system [J]. Journal of Modern Oncology, 2004, 12(4):294-298. (in Chinese)
- [23] 王芳,杨季芳,谢和. 变性梯度凝胶电泳技术在海洋微生物

- 物分子生态学中的应用[J]. 浙江万里学院学报, 2009, 22(2):72-77.
- Wang F, Yang J F, Xie H. Application and development of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques in marine molecular microbial ecology [J]. Journal of Zhejiang Wanli University, 2009, 22(2):72-77. (in Chinese)
- [24] 官曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用[J]. 微生物学报, 2004, 44(6):845-848.
- Gong M L, Ren N Q, Xing D F. DGGE/TGGE technology and its application in molecular ecology of microbial [J]. Journal of Microbiology, 2004, 44(6):845-848. (in Chinese)
- [25] 孙赛武, 杨朝晖, 曾光明, 等. 进水模式对 SBBR 性能及氮形态转化的影响[J]. 环境科学, 2009, 30(1):120-126.
- Sun S W, Yang C H, Zeng G M, et al. Effect on the performance of SBBR and the form transformation of nitrogen by different influent pattern [J]. Environmental Science, 2009, 30(1):120-126. (in Chinese)
- [26] 张洪军, 朱彤. A/O 工艺膜生物反应器处理生活污水的脱氮特性及硝化菌群的分子检测[J]. 环境污染与防治, 2009, 31(1):47-50.
- Zhang H J, Zhu T. Molecular detection of nitrifying bacteria for characterization of nitrogen removal of domestic sewage treatment in A/O membrane biological reactor [J]. Environmental Pollution & Control, 2009, 31(1):47-50. (in Chinese)
- [27] 牟丽娉, 黄钧. SBR 中好氧颗粒污泥及其脱氮功能的研究进展[J]. 中国给水排水, 2009, 25(2):21-26.
- Mu L P, Huang J. Research on aerobic granular sludge and its denitrification function in sequencing batch reactor [J]. China Water & Waste Water, 2009, 25(2):21-26. (in Chinese)
- [28] 孙宝盛, 张斌, 吴卿, 等. 应用 PCR-DGGE 技术解析 MBR 中微生物群落多样性[J]. 天津大学学报, 2008, 41(3):356-361.
- Sun B S, Zhang B, Wu Q, et al. Application of PCR-DGGE to analysis of microbial community diversity in MBRs [J]. Journal of Tianjin University, 2008, 41(3):356-361. (in Chinese)
- [29] 欧阳科, 刘俊新. 膜生物反应器与传统活性污泥反应器内生物群落特征[J]. 环境科学, 2009, 30(2):499-503.
- Ouyang K, Liu J X. Analysis of characteristics of microbial communities in membrane bioreactor and conventional activated sludge process [J]. Environmental Science, 2009, 30(2):499-503. (in Chinese)
- [30] Moura A, Tacao M, Henriques I, et al. Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR-DGGE analysis [J]. Microbiological Research, 2009, 164(5):560-569.
- [31] Ji G D, Liao B, Tao H C, et al. Analysis of bacteria communities in an up-flow fixed-bed (UFB) bioreactor for treating sulfide in hydrocarbon wastewater [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(21):5056-5062.
- [32] 王晓丹, 翟振华, 赵爽, 等. 北京翠湖表流和潜流湿地对细菌多样性的影响[J]. 环境科学, 2009, 30(1):280-288.
- Wang X D, Zhai Z H, Zhao S, et al. Effect of free surface flow wetland and subsurface flow wetland on bacterial diversity in Beijing Cuihu wetland park [J]. Environmental Science, 2009, 30(1):280-288. (in Chinese)
- [33] 冯权, 邢新会, 刘则华. 以剩余污泥减量化为目标的废水生物处理技术研究进展[J]. 化工进展, 2004, 23(8):823-836.
- Feng Q, Xing X H, Liu Z H. Mini review on wastewater treatment technology aimed at minimization of excess sludge [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2004, 23(8):823-836. (in Chinese)
- [34] 洪安安, 刘德华, 刘灿明. 活性污泥的主要微生物菌群及研究方法[J]. 工业水处理, 2009, 29(2):10-14.
- Hong A A, Liu D H, Liu C M. Main microbial community in activated sludge and the research method of it [J]. Industrial Water Treatment, 2009, 29(2):10-14. (in Chinese)
- [35] 叶姜瑜, 罗固源. 微生物可培养性低的生态学原因与对策[J]. 微生物学报, 2005, 45(3):478-482.
- Ye J Y, Luo G Y. Ecological interpretation and related strategies for low culturability of microorganisms [J]. Journal of Microbiology, 2005, 45(3):478-482. (in Chinese)
- [36] 王莹. 重金属污染土壤的微生物多样性研究进展[J]. 杭州农业与科技, 2009(1):35-37.
- Wang Y. Heavy metal contamination of soil microbial diversity in progress [J]. Agriculture and Technology of Hangzhou, 2009(1):35-37. (in Chinese)
- [37] 林曦, 曾润颖. 南极中山站排污口土壤中微生物群落的 DGGE 分析[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2):253-257.
- Lin X, Zeng R Y. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of microbial community in sewage contaminated soil from the Antarctic Zhongshan Station [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2008, 14(2):253-257. (in Chinese)
- [38] Chong C W, Dunn M J, Convey P, et al. Environmental influences on bacterial diversity of soils on Signy Island, maritime Antarctic [J]. Polar Biology, 2009, 32(11):1571-1582.
- [39] 潘雪莲, 黄晟, 方昊, 等. 黄土高原土壤中细菌群落结构多样性的 PCR-DGGE 分析[J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25(3):39-43, 48.
- Pan X L, Huang S, Fang H, et al. Diversity of bacterial community structure in soils of loess plateau [J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2009, 25(3):39-43, 48. (in Chinese)
- [40] 靳正忠, 雷加强, 徐新文, 等. 极端干旱区防护林地土壤微生物多样性[J]. 生态学报, 2009(8):4548-4559.
- Jin Z Z, Lei J Q, Xu X W, et al. Microbial diversities of shelter-forest soils in the extreme arid area [J]. Acta Ecologica Sinica, 2009(8):4548-4559. (in Chinese)
- [41] 刘永军, 郑昕, 金鹏康. 石油集输系统中微生物群落结构研究[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(5):25-31.
- Liu Y J, Zheng X, Jin P K. Bacterial communities in crude oil gathering and transferring system [J]. Journal of Microbiology, 2009, 29(5):25-31. (in Chinese)
- [42] Li W, Yu Y H, Zhang T L, et al. PCR-DGGE fingerprinting a-

- analysis of plankton communities and its relationship to lake trophic status [J]. *International Review of Hydrobiology*, 2009, 94(5): 528-541.
- [43] 江 岷, 江雪娇. 海洋微小型真核生物分子多样性的研究方法 [J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(4): 627-632.  
Jiang M, Jiang X J. Molecular diversity of marine pico-eukaryotes research methods [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(4): 627-632. (in Chinese)
- [44] Borneman J, Skroch P W, O'sullivan K M, et al. Molecular microbial diversity of an agriculture soil in Wisconsin [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(6): 1935-1943.
- [45] Amann R J, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbil Rev*, 1995, 59(1): 143-169.
- [46] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141.
- [47] Muyzer G. DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(3): 317-322.
- [48] 马俊孝, 季明杰, 孔 健. PCR-DGGE 技术在微生物物种多样性研究中的局限性及其解决措施 [J]. *食品科学*, 2008, 29(5): 493-497.  
Ma J X, Ji M J, Kong J. Overview of limitation and improving methods of PCR-DGGE [J]. *Food Science*, 2008, 29(5): 493-497. (in Chinese)
- [49] 毛跃建, 张晓君, 张宝让, 等. 专一性 PCR 和变性梯度胶电泳协助从焦化废水处理装置中分离优势功能菌 *Thauera* 属菌株 [J]. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1634-1641.  
Mao Y J, Zhang X J, Zhang B R, et al. Specific-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis assistant isolation of *Thauera* spp. from a coking wastewater treatment plant [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(12): 1634-1641. (in Chinese)
- [50] 胡佳俊, 王磊非. 非光合 CO<sub>2</sub> 同化微生物菌群的选育/优化及其群落结构分析 [J]. *环境科学*, 2009(8): 2438-2444.  
Hu J J, Wang L F. Breeding, optimization and community structure analysis of non-photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation microbial flora [J]. *Environmental Science*, 2009(8): 2438-2444. (in Chinese)
- [51] Satsuma K. Complete biodegradation of atrazine by a microbial community isolated from a naturally derived river ecosystem (microcosm) [J]. *Chemosphere*, 2009, 77(4): 590-596.
- [52] 刘长莉, 朱万斌, 郭 鹏, 等. 常温木质纤维素分解菌群的筛选与特性研究 [J]. *环境科学*, 2009, 30(8): 2458-2463.  
Liu C L, Zhu W B, Guo P, et al. Screening and characteristics of normal temperature lignocellulose-degradation microbial community [J]. *Environmental Science*, 2009, 30(8): 2458-2463. (in Chinese)
- [53] Sooksanguan T, Thies J E, Gypmantasiri P, et al. Effect of rice cultivation systems on nitrogen cycling and nitrifying bacterial community structure [J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 43(1): 139-149.
- [54] Okubo A, Sugiyama S. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure [J]. *Ecological Research*, 2009, 24(6): 1399-1405.
- [55] 宋业颖, 赵丽华, 邢德峰, 等. 利用时间进程法优化活性污泥 DG-DGGE 图谱 [J]. *生物技术*, 2006, 16(2): 43-45.  
Song Y Y, Zhao L H, Xing D F, et al. Optimization of profiles of denaturing gradient gel electrophoresis for activated sludge by time travel [J]. *Biotchnology*, 2006, 16(2): 43-45. (in Chinese)
- [56] Edenborn S L, Sextstone A J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analysis [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(7): 1570-1579.
- [57] 孙晓棠, 姚 青, 刘琼光, 等. 利用 DGGE 评价不同培养基回收番茄根际细菌类群的能力 [J]. *微生物学报*, 2006, 46(3): 482-486.  
Sun X T, Yao Q, Liu Q G, et al. Capacity evaluation of different media for isolating bacteria populations from the rhizosphere of tomato plants with DGGE [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(3): 482-486. (in Chinese)
- [58] 邢德峰, 任南琪, 宋业颖, 等. DG-DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及种群多样性 [J]. *生态学报*, 2005, 25(7): 1818-1823.  
Xing D F, Ren N Q, Song Y Y, et al. Application of DG-DGGE to analyze microbial community diversity and population dynamics in fermentative hydrogen-producing system [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(7): 1818-1823. (in Chinese)
- [59] 陈桐生, 李建国, 岑英华, 等. DG-DGGE 分析除臭生物滤池微生物多样性及富集后的种群结构差异 [J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 1(1): 113-117.  
Chen T S, Li J G, Cen Y H, et al. Analysis of microbial diversity and community composition after enrichment with deodorizing biofilter by DG-DGGE [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 1(1): 113-117. (in Chinese)