

# 微生物菌群多样性分析方法的研究进展

许文涛<sup>1,2</sup>, 郭 星<sup>1</sup>, 罗云波<sup>1</sup>, 黄昆仑<sup>1,2,\*</sup>

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院食品安全检测与风险评估实验室, 北京 100083;

2. 农业部转基因产品检验监督测试中心(北京), 北京 100083)

**摘 要:** 随着现代科学技术的进步, 对微生物多样性的研究已经提升到了一个新的高度, 特别是由于分子生物学在该分支学科中的应用, 使得在微生物菌群多样性的研究中克服了传统培养的缺点, 使分析方法取得了长足的进步。本文主要介绍了微生物多样性研究的多种方法, 将其简要划分为三大部分: (1)传统纯培养技术; (2)现代分子生物学技术; (3)上述两种方法的联合使用, 并重点阐述了这些方法的优缺点, 展望了微生物多样性研究方法的发展前景。

**关键词:** 微生物; 菌群; 多样性; 分子生物学方法

## Research Progress on Analysis Methods of Diversity of Microbial Flora

XU Wen-tao<sup>1,2</sup>, GUO Xing<sup>1</sup>, LUO Yun-bo<sup>1</sup>, HUANG Kun-lun<sup>1,2,\*</sup>

(1. Laboratory of Safety Detection and Risk Assessment, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Supervision, Inspection and Testing Center of Genetically Modified Organisms, Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China)

**Abstract :** With the development of modern science and technology, especially due to application of molecular biology, the research on microbial diversity has been elevated to a higher level, the shortcomings of the traditional culture has been overcome and more considerable progress occurred in the analysis methods of diversity of microbial flora. In this paper, various research methods of diversity of microbial flora were presented in the following three parts: (1) traditional pure culture techniques; (2) modern molecular biology techniques; (3) the joint use of the above two methods, and the features and the prospect of these methods were focused on.

**Key words:** microorganism; flora; diversity; molecular biological methods

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)07-0258-08

所谓微生物的多样性, 即是指一个集合群落中, 众多不同类型微生物的变化以及它们之间相对的丰度<sup>[1]</sup>。物种丰度(即群落中物种的数量)和物种均匀度(即群落中物种种群量的大小)是研究群落结构及微生物多样性的两个最基本参数。地球上以往人们感兴趣的微生物主要是那些模式菌群及具有直接经济价值的种群, 而那些被忽视的大多数未知种群也蕴藏着目前无法估量的资源。因而研究微生物的生物多样性是十分必要的, Tiedje<sup>[2]</sup>总结为如下理由: (1)对极端环境微生物的研究不仅使人类了解和探索生命的策略和极限, 而且为超常物质开发利用提供了资源; (2)微生物可用于监控环境变化, 它们的群体通常对环境状况反应迅速, 因而是一个地区或历史环境变迁的良好记录; (3)微生物在高等生物的保护和恢复生物学中起重要作用, 如菌根真菌可以帮助植物成功地

将根定植在土壤中, 从而实现本地区的森林再造; 人和动物的微生物生态学则是建立在人体正常菌群和人体建立的和谐的基础上的学科; (4)微生物可作为阐明生态和生物进化原理的模式。

微生物在生物圈的化学平衡和生态平衡中都起着十分重要的作用, 例如近年来对肠道菌群的研究很热, 其研究主要着眼于肠道菌群对宿主的消化以及对免疫和抗病等功能的重要影响, 过去的研究表明, 人的肠道菌群结构具有显著的个体差异, 借助分子手段 ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus) 就可以用于寻找健康肠道共有菌群的分子标记从而对肠道疾病做出更加准确的诊断<sup>[3]</sup>; 在食品研究中, 由于食品中耐药菌的出现, 食品被粪便细菌污染, 饮水, 食品和饲料添加剂以及兽药残留对肠道菌群的影响, 益生菌在预防

收稿日期: 2008-03-11

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10Z440); 农业部“948”项目(2007-Z8)

作者简介: 许文涛(1979-), 男, 讲师, 主要从事食品安全分子检测与风险评估研究。E-mail: xuwentao1111@sina.com

\* 通讯作者: 黄昆仑(1968-), 男, 副教授, 博士, 主要从事生物安全评价与检测技术的研究。E-mail: hk1009@163.com

和治疗胃肠道菌群紊乱中的应用等原因,使人们对肠道菌群的微生态研究越来越关注<sup>[4]</sup>。对于土壤微生物菌群结构的研究同样具有很大的开发潜力,例如用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)及温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)在明确土壤中微生物组成以及动态变化的具体信息的同时,也对实际问题的诊断、作物生长跟踪监测、根际效应以及秸秆还田等农事操作都具有重要理论和实用价值<sup>[5]</sup>。在湖泊生态系统中,微生物对物质循环和能量流动发挥着巨大的作用,为了有效研究微生物的作用就必须对其群落进行分析,得到丰富的微生物多样性信息,有研究采用从玄武湖、莫愁湖和太湖沉积物中直接提取微生物总DNA,然后通过DGGE指纹图谱来分析湖泊表层沉积物中微生物群落结构的差异性,结合条带回收、扩增、序列测定,从而了解不同湖泊和相同湖泊不同位点的微生物群落结构的多样性<sup>[6]</sup>。通过研究前克拉玛依油田一中区原油储层中主要微生物群落组成,可为该油田下一步微生物提高原油采收率的现场应用提供很多有价值的信息<sup>[7]</sup>。但我们对于维持这种平衡的微生物生态系统的构造和动力学参数知之甚少,其中最大的原因就是:分析生态系统中微生物群体的多样性及群落结构的经典方法是分离、培养以及鉴定,需要进行一系列繁杂的形态特征和生理生化实验,相关的实验做得越多,得到的结果就越可靠。这种方法最大的缺点是,即使最复杂的实验组合也不能对分离物进行精确的鉴定,而且不能反映分离物间的系统发育关系<sup>[1]</sup>,并且传统的研究方法是通过纯培养获得菌株后才能对其特性进行描述,然而在自然环境中能够纯培养的微生物菌株的数量还不到自然界微生物总数的1%<sup>[8]</sup>。DNA杂交技术和微生物分子系统学的发展使得我们可以摆脱纯培养条件的束缚,开辟了一条更客观的探索环境微生物多样性的新思路,它们与传统的分离培养方法不仅不相矛盾,而且可以相互补充相互比较。这些分子生物学方法包括(G+C)%、16S rDNA序列分析、DGGE、TGGE、荧光原位杂交(fluorescence in-situ hybridization, FISH)等<sup>[1]</sup>。本文经过对本领域相关资料的研究总结出了各种分析微生物菌群多样性的方法以及它们各自的应用前景。

## 1 微生物菌群多样性研究方法的分类

1.1 根据研究技术类型,微生物多样性的研究方法大体上可分为两类:基于生物或化学的方法和基于现代分子生物学技术的方法。

生物或化学方法包括传统的平板计数法、荧光染色法、Biolog微平板分析、磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)谱图分析方法、脂肪酸甲酯(fatty acid methyl esters, FAME)谱图分析方法等。

分子生物学方法可归纳为三方面:一是基于分子杂

交技术的分子标记法<sup>[9]</sup>,如荧光原位杂交、同位素标记技术等,可对微生物在特定环境中的存在与否、分布模式及丰度等情况进行研究,具有较高的灵敏性和特异性。二是基于PCR技术的研究方法,这些方法可以将极微量的DNA进行大量扩增,通过比较分析基因序列的特异性来研究微生物的多样性。如随机扩增多态性DNA技术(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性技术(amplified restriction fragment polymorphism, AFLP)、限制性片段长度多态性技术(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和末端限制性片段长度多态技术(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、单链构象多态性技术(single-strand conformation polymorphism, SSCP)、DGGE和TGGE、核糖体基因间区分析(ribosomal intergenic spacer analysis, RISA)等。三是基于DNA序列测定的研究方法,分析具体碱基序列的突变情况,通过与生物信息学结合,进行数据比较分析,找出微生物多样性的遗传进化线索,如元基因组测序技术,成为对难培养微生物或不可培养微生物的系统发育和功能研究的重要方法。

1.2 根据分析对象范围,微生物多样性的研究方法大体上可分为两类:一类是用于分析可培养的微生物群落;另一类是用于分析整个微生物群落。

第一类分析方法基于微生物的形态判别和微生物的脂肪酸甲酯谱等;第二类群落水平的生理特性分析、磷脂脂肪酸方法和核酸分析等方法(不需要培养微生物)。

1.3 从研究的层次上划分,微生物多样性的研究方法大体上可分为三类:遗传多样性、物种多样性和功能多样性。

微生物类群即细菌、真菌和放线菌这三大类群的数量及其比例组成来描述微生物多样性,或者按照微生物在生态系统中的作用将其划分成不同的功能群,通过某一功能群中物种的分类及其数量来研究微生物多样性。

上述各种方法应用范围不同,精度也不同,各有优缺点。如由于环境中大多数微生物处于“存活但不能培养的状态”,因此传统培养法有很大局限性,难以准确研究微生物多样性与其生态功能的关系;磷脂脂肪酸和脂肪酸甲酯分析方法主要应用于微生物群落动态变化的定量分析;Biolog微平板法主要用于异养微生物群落结构多样性的研究,操作快速简便,但精度一般,只能鉴别能在Biolog系统内生长的微生物;荧光原位杂交用于分析原核微生物的群落结构,精度高,但其应用受到环境样品微生物的生理状态的影响,而且事先要根据已知种属设计探针,不能检测出环境样品中的未知种属;近年来兴起的基于PCR技术的分子生物学研究方法如:RAPD、AFLP、RFLP、SSCP、DGGE等技术已经较为成熟,能鉴定出大部分土壤微生物,且精度高,目前被广泛应用于微生物生态学研究,但这些方

法也有不足: (1)每次核酸提取的效率不同, 造成结果可重复性差; (2)引物对不同样品的扩增效率不同, 引起丰度估计偏差; (3)由于对真核生物核糖体的编码基因及复杂调节机制的研究还不透彻, 目前在真核微生物生态学的分析中应用得还较少。因此, 将多种技术综合使用可避免由于方法原理本身所带来的不可避免的偏差, 可提供更加全面准确的微生物多样性变化的信息。

## 2 微生物菌群多样性的传统研究方法

传统的微生物群落分析方法建立在微生物分离、纯种培养的基础上, 通过对纯种微生物进行显微观察和生理生化特性研究来认识群落结构的, 以及近年来针对上述需培养方法的局限性逐渐发展起来的几类非培养方法进而研究微生物的种类和数量, 这些方法大体上分为生物化学、生理学等<sup>[10]</sup>, 尽管如此但是还是由于生态系统中菌群存在的多样性和复杂性以及传统方法自身的局限性极大地制约了对微生物多样性的进一步研究探索。

### 2.1 传统的分离培养方法

从混杂微生物群体中获得只含有某一种或某一株微生物的过程称为微生物分离与纯化。平板分离法普遍用于微生物的分离与纯化, 其基本原理是选择适合于待分离微生物的生长条件, 如营养成分、酸碱度、温度和氧等要求造成只利于该微生物生长, 而抑制其他微生物生长的环境, 从而淘汰一些不需要的微生物, 并且微生物在固体培养基上生长形成的单个菌落, 通常是由一个细胞繁殖而成的集合体, 因此可通过挑取单菌落而获得一种纯培养。其基本流程: 倒平板→制备梯度稀释液→涂布(或划线法)→培养→挑单菌落→保存→根据细菌的生理生化, 生态和遗传特征等对其鉴定。但是由于环境中微生物群落结构非常复杂, 物种多样性极高, 纯种分离富集培养的方法不但费时费力, 而且存在致命的方法学上的缺陷: (1)自然界大量微生物的不可培养性, 使人类无法培养自然界中所有的微生物; (2)分离富集培养方法具有强烈的选择性, 使培养得到的微生物在种类数量和功能上都无法反映自然状态下微生物群落的真实情况<sup>[11]</sup>。

### 2.2 生物化学方法的代表——磷脂酸法(PLFA)

PLFA 存在于细胞膜中, 由于不同的微生物具有不同的 PLFA 种类和数量, 因此可以作为了解自然环境中微生物种类组成和数量变化的指标。但 PLFA 模式并不能给出一个实际的微生物种类组成, 仅是群落结构的概图。在有的情况下, 某种 PLFA 的浓度改变与某些特异的微生物类群的改变密切相关<sup>[12]</sup>。PLFA 的分析结果有时要结合生态因子进行综合评价, 才能获得准确的信息。此方法主要应用于微生物群落动态变化的定量分析, 虽然能够快速有效地从环境样品中提取大部分脂肪酸, 但只能鉴别到属的水平, 且受人为因素干扰强烈。

### 2.3 生理学的方法——Biolog 微量分析

Biolog 微量板分析系统是由 Biolog 公司开发, 用来测定微生物对 95 种碳源的利用情况并据此来对化能异养细菌进行鉴定的系统。Biolog 依据的原理很简单, 在分析板上有 96 个孔, 一个孔没有含任何碳源作对照, 其余 95 个孔每孔含有一种碳源和氧化还原染料四氮哇蓝。底物利用产生的氧化还原电势的变化可导致染料的颜色发生变化, 变化的速率和程度代表了底物被利用的速率和程度。微生物群落结构不同, 95 个孔的颜色变化方式就不同, 这样可以知道不同样点微生物区系的差异。如 Garland 等<sup>[13]</sup>首先报道了这种碳源利用信息可把一些不同种类的土壤和水体的微生物区系区别开。Zak 等<sup>[14]</sup>把这种系统作为一种定量方法用来评价与 6 种植物区系相关的微生物群体的功能多样性。但是, 由于不同的微生物对同一碳源的利用能力是有差异的, 微生物对不同单一碳源的代谢指纹差异并不能简单地归纳为微生物群落数量和结构的差异, 而且土壤微生物在 Biolog 系统中生长时, 由于温育环境的改变引起微生物对碳底物实际利用能力的改变, 使得 Biolog 方法在准确性方面受到一定限制, 但 Biolog 方法因快速、简便而受到人们的欢迎。

## 3 现代分子生物学方法

主要分为以下三类: 以电泳技术和分子杂交技术为核心的 RFLP 技术和 DNA 指纹技术, 前者主要是以低拷贝序列为探针进行杂交, 后者是以重复序列包括串联重复序列(如小卫星 DNA 和微卫星 DNA)和散布重复序列(转座子、逆转座子)为探针进行杂交; 以电泳和 PCR 技术为核心的 RAPD 技术、SSR 技术、SSCP 技术、AFLP 技术等; 以 DNA 序列分析为核心的 ITS(internal transcribed spacers)测序分析技术。

### 3.1 核酸探针杂交技术(分子杂交技术)

分子杂交技术: 互补的核苷酸序列通过 Watson-Crick 碱基配对形成稳定的杂合双链分子 DNA 分子的过程称为杂交。杂交过程是高度特异性的, 可以根据所使用的探针已知序列进行特异性的靶序列检测。杂交的双方是所使用探针和要检测的核酸, 它是通过各种方法将核酸分子固定在固相支持物上, 然后用放射性标记的探针与被固定的分子杂交, 经显影后显示出目的 DNA 或 RNA 分子所处的位置。该检测对象可以是克隆化的基因组 DNA, 也可以是细胞总 DNA 或总 RNA。如今核酸杂交技术除了传统的应用于克隆基因的筛选、酶切图谱的制作等还广泛的应用于对微生物生态多样性的研究<sup>[15]</sup>, 其中尤以荧光原位杂交, 实时荧光定量 PCR、RFLP 应用较为普遍, 以下就对研究微生物多样性时应用较多的核酸杂交技术做进一步的介绍。

#### 3.1.1 荧光原位杂交(FISH)

该技术是一种利用非放射性的荧光信号对原位杂交样本进行检测的技术。荧光原位杂交技术的原理是



dsDNA 变性后和带有互补序列的同源单链退火配对形成双链结构的过程。退火复性形成的可以是 DNA/DNA 或 DNA/RNA 异质双链分子, 带有荧光标记的探针与固定在玻片或纤维膜上的组织或细胞中特定的核苷酸序列进行杂交, 探测其中所有的同源核酸序列, 结果可直接在共聚焦激光扫描显微镜或荧光显微镜下观察, 无需单独分离 DNA 或 RNA, 从而对染色体或基因异常的细胞、组织样本进行检测和诊断, 为各种基因相关疾病的分型、预前和预后提供准确的依据, 荧光原位杂交技术近几年也已经成为微生物生态学研究中的热点<sup>[16]</sup>。由于其灵敏、快速、使用安全、特异性好等特点, 被用于分析复杂环境的微生物群落结构, 是一种监测和定量化复杂的环境样品中微生物群落动态的有效方法, 也为人工创建生物处理系统的最佳工况条件提供了理论依据<sup>[17-20]</sup>。在微生物多样性的研究中大多以荧光染料标记的 16S rDNA 和 16S rRNA 寡核苷酸序列作为探针, 按照两个核酸的碱基序列互补原则, 将标记的探针直接原位杂交到染色体或 DNA 纤维切片上, 由于与荧光素分子偶联的单克隆抗体和探针分子特异性结合, 能激发杂交探针的荧光信号, 通过荧光检测系统和图形分析技术对染色体或 DNA 纤维上的 DNA 序列进行定位、定性和相对定量分析, 就能实现原位样品中的目标细菌的探测。此技术包括如下步骤: 样品固定、样品的制备与预处理、预杂交、探针和样品的变性、杂交、漂洗和检测信号等<sup>[21]</sup>。

**FISH 检测的特点:** (1)假阴性: 虽然大多数细菌含有高的 rRNA 丰度, 但 rRNA 丰度变异不仅仅发生在种属间, 亦发生在同一菌不同生长阶段, 生长率慢的细菌含有低的 rRNA 丰度; 有些微生物细胞壁渗透性差, 使探针不能充分进入细胞内与 rRNA 分子杂交, 这些都将导致假阴性结果。(2)假阳性: 在 FISH 检测中现存数据库的不断扩大和所报道序列的非精确性, 此外, 一些微生物本身具有荧光性, 会对 FISH 检测产生干扰。荧光探针具有以下优点: ①安全; ②分辨率好且不需要额外的检测步骤; ③荧光探针可以用发射不同波长的染料标记, 从而在一个检测步骤中可同时处理多目标序列。最近迅速而敏感的 FISH 技术已经成为微生物系统发育、微生物生态学、传染病和医学诊断以及环境微生物研究中强有力的分析工具<sup>[22]</sup>。

### 3.1.2 菌落原位杂交

菌落原位杂交是将细菌从一主平板转移到硝酸纤维素滤膜上, 然后将滤膜上的菌落裂解以释放出 DNA, 将 DNA 烘干固定于膜上与 <sup>32</sup>P 标记的探针杂交, 放射自显影检测菌落杂交信号、并与主平板上的菌落对位。对分散在若干个琼脂平板上的少数菌落(100~200)进行克隆筛选时, 可采用本方法。此方法将这些菌落归并到一个琼脂主平板以及已置于第二个琼脂平板表面的一张硝酸纤维素滤膜上。经培养一段时间后, 对菌落进行原位裂解。主平板应贮存于 4℃ 直至得到筛选结果。

### 3.1.3 Southern 杂交

Southern 杂交可用来检测经限制性内切酶切割后的 DNA 片段中是否存在与探针同源的序列(RFLP 的后期工作则结合使用了 Southern 杂交), 它包括下列步骤: (1)酶切 DNA, 凝胶电泳分离各酶切片段, 然后使 DNA 原位变性; (2)将 DNA 片段转移到固体支持物(硝酸纤维素滤膜或尼龙膜)上; (3)预杂交滤膜, 掩盖滤膜上非特异性位点; (4)让探针与同源 DNA 片段杂交, 然后漂洗除去非特异性结合的探针; (5)通过显影检查目的 DNA 所在的位置。

### 3.1.4 Northern 杂交

Northern 杂交此技术与 Southern 杂交很相似, 主要区别是被检测对象为 RNA, 其电泳在变性条件下进行, 以去除 RNA 中的二级结构, 保证 RNA 完全按分子大小分离。变性电泳主要有 3 种: 乙二醛变性电泳、甲醛变性电泳和羟甲基汞变性电泳。电泳后的琼脂糖凝胶用与 Southern 转移相同的方法将 RNA 转移到硝酸纤维素滤膜上, 然后与探针杂交。

### 3.2 PCR 特异性扩增技术

在环境检测中, 靶核酸序列往往存在于一个复杂的混合物如细胞提取液中, 且含量很低, 对于探测这种复杂群体中的特异微生物或某个基因, 杂交就显得不敏感, 使用 PCR 技术可将靶序列放大几个数量级, 再用探针杂交探测对被扩增序列作定性或定量研究分析微生物群体结构。PCR 技术常与其他技术结合起来使用, 如 RT-PCR、实时荧光定量 PCR、槽式 PCR、RAPD、SSCP 等。

#### 3.2.1 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光积累信号实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。(1)在食品微生物研究中的应用: 利用实时荧光定量 PCR 技术可对食品微生物代谢功能基因进行定量研究, 从而了解其代谢途径。如在食品发酵过程中绝大多数活菌都不能体外培养, 难以估计产物中的细菌种类和数量, 利用该技术可不经培养直接分析发酵产物中的微生物种群; Baldwin 等<sup>[23]</sup>通过多重 PCR 和实时荧光定量 PCR 扩增来检测和量化芳香族化合物分解代谢途径, 扩展了对芳香族污染物生物降解相关的基因型的量化能力, 从而对自然退化、污染地生态调查和生物修复条件优化提供辅助评价。此外, 该技术可作为微生物生理代谢、菌群分布的研究工具。(2)在食品病原微生物监测中的应用: 此技术的一个显著特点就是可以同时多个样品进行分析, 因此适合于检测食品中微生物在时间和空间上的动态变化; 同时具有很高的检测灵敏度、强的特异性和快速便捷性, 因而在致病病原分析检测中有很好的发展前景<sup>[24]</sup>。在未来的研究中, 如何能够更加准确定量(绝对定量)及对不同环境中微生物定量(普遍定量)成为研究者最关心的

问题。目前的实时荧光定量 PCR 反应通常针对 16S rDNA 或功能基因来量化环境微生物的相对数量丰度, 由于功能基因在不同的微生物种类中拷贝数不同, 可能造成扩增反应特异性较高但定量不准确的结果。

### 3.2.2 RFLP

PFLP 是通过限制性核酸内切酶切片段长度多态性来揭示 DNA 碱基序列组成的异同, 根据不同品种(个体)基因组的限制性内切酶的酶切位点碱基发生突变, 或酶切位点之间发生了碱基的插入、缺失, 导致酶切片段大小发生了变化, 这种变化可以通过特定探针杂交进行检测, 从而可比较不同品种(个体)的 DNA 水平的差异(即多态性), 多个探针的比较可以确立生物的进化和分类关系。所用的探针为来源于同种或不同种基因组 DNA 的克隆, 位于染色体的不同位点, 从而可以作为一种分子标记构建分子图谱。不同限制性内切酶切割基因组 DNA 后, 所切的片段类型不一样, 因此, 限制性内切酶与分子标记组成不同组合进行研究。已被广泛用于基因组遗传图谱构建、基因定位以及生物进化和分类的研究, RFLP 方法同时也常用于微生物群落分析<sup>[25]</sup>; 通用引物 PCR 扩增得到 16S rDNA 片段被限制酶切割, 然后再进行电泳形成不同长度的片断进行分析。RFLP 技术的优点: 第一, 其所获得的谱带更为简单易于分析, 不受菌株是否是纯培养的限制, 不受宿主的干扰, 具有特异性强、效率高的特点, 还可应用于新物种的发现、微生物分类及鉴定、共生菌和病原菌的微生物遗传多样性的检测等; 第二, 标记数目可以是无限的: RFLP 揭示 DNA 水平自然变异, 其数目几乎是无限的; 第三, 大部分标记为共显性: 遵循孟德尔式遗传, 因而 RFLP 标记图也可用传统的基因标图方法来构建; 第四, 任何生育期都可预测, 不受环境影响 DNA 分子水平标记; 第五, 高度变异性: 通常只要有一次有性杂交, 一个作图群体就能构建一个较丰富的 RFLP 图谱。

### 3.2.3 T-RFLP

T-RFLP 即指末端限制酶切片段长度多态性分析, 是一种新兴的研究微生物多态性的分子生物学方法。该技术已经成功应用于各种微生物群落分析比较、研究微生物群落多样性及结构特征等多方面<sup>[26]</sup>。本文介绍的末端限制性酶切片段长度多态性分析就是在 PCR 技术和 RFLP 技术基础上发展起来的微生物群落分析的新技术, 所不同的是在 PCR 扩增 16S rRNA 基因过程中, 其中一个引物用荧光标记, 在计算机程序自动分析时仅分析荧光标记的末端限制片段, 这样使得限制片段长度多态性图谱更为简化, 并且每个可见的条带都代表一个“核型”或一个分类单元<sup>[27]</sup>。这种方法能够得到一个群落的特征指纹图谱, 可用于比较不同群落的相似性和由于污染压力造成的群落结构在时间和空间上的改变, 如 Pett 等<sup>[28]</sup>利用 T-RFLP 技术考察氧化还原电位对土壤菌群

的影响。T-RFLP 的优点: 这种技术克服了基于培养的传统方法的局限性, 相对于其它分子生物学分析技术如 RFLP, DGGE 等, 它具有分辨率高、易于实现自动化等特点, 还可以将微生物群落分析同核糖体数据库计划相结合, 充分利用互联网数据资源共享的优势。

### 3.2.4 RAPD 技术

RAPD 技术建立于 PCR 技术基础上, 利用一系列(通常数百个)不同的随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链(通常为 10 聚体)为引物, 对所研究基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 聚丙烯酰胺或琼脂糖电泳分离, 经 EB 染色或放射性自显影来检测扩增产物 DNA 片段的多态性, 这些扩增产物 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性, 即是用那些对某一特定基因的非特异性的引物来扩增某些片段。RAPD 分析用于探测含有混合微生物种群的各种生物反应器中的微生物多样性。由 Williams 建立的 RAPD 技术, 因具有操作简便、快速和经济等优点而得到了广泛应用<sup>[29]</sup>。张峦等<sup>[30]</sup>在室内培养条件下, 采用 RAPD 分子标记技术研究了重金属镉和多环芳烃菲复合污染对土壤中微生物群落 DNA 序列多样性的影响。结果表明, 培养 15d 和 30d 后, 镉-菲单一和复合污染均导致土壤微生物群落 DNA 序列的丰度、均度和多样性指数增加。RAPD 技术的主要优势: RAPD 方法建立在 PCR 基础之上, 因此具有模板用量少、灵敏度高和特异性强等优点, 但与其他 DNA 多态分析方法相比较, 还有其独特的优势: (1)RAPD 勿需知道模板 DNA 任何序列信息, 对其进行扩增, 构建不同种、不同菌株的基因指纹图谱, 进而分析 DNA 的多态性; (2)鉴别力强; (3)RAPD 技术无需 DNA 探针, 不涉及 Southern 杂交, 放射自显影或其他技术, 实验周期短, 成本较低, 能在较短的时间内筛选大量样品。但是重复性不好是该技术存在的主要问题, 而 DNA 模板的质量与数量、MgCl<sub>2</sub> 和引物浓度的变化都有可能得到不同的图谱。另外, 从条带图谱中无法得到任何微生物系统发育信息。

### 3.2.5 PCR-SSCP

PCR-SSCP 即指单链构象多态性分析, 基本原理是单链 DNA 片段呈复杂的空间折叠构象, 此结构主要是由其内部碱基配对等分子内相互作用力来维持的, 当有一个碱基发生改变时, 会或多或少地影响其空间构象, 使构象发生改变, 空间构象有差异的单链 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶中受排阻大小不同。因此通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 可以非常敏锐地将构象上有差异的分子分离开。其基本过程是: (1)PCR 扩增靶 DNA; (2)将特异的 PCR 扩增产物变性, 而后快速复性, 使之成为具有一定空间结构的单链 DNA 分子; (3)将适量的单链 DNA 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳; (4)最后通过放射性自显影、银染或溴化乙锭显色分析结果。

近年来该方法除了大量地用于检测和肿瘤发生有关的基因突变外还应用于微生物生态学研究,在微生物菌群多样性的研究中,SSCP是与16S rDNA技术结合,对16S rRNA基因扩增产物进行分析的另一种简便有效的方法, Lee等<sup>[31]</sup>首次报道将SSCP技术应用到环境样品微生物群体多样性分析; Holly等<sup>[32]</sup>利用SSCP技术研究发现在植物根际土壤中大量存在古菌(*Crenarchaeot*), 该类微生物以往一直被认为只存在于极端嗜热环境当中; Sabine等<sup>[33]</sup>通过SSCP技术考察了不同盐度(0~20%)土壤中微生物菌群的变化。SSCP特点: 设备简单, 无需专门的电泳设备; 无需带有GC夹子和荧光标记物; 后续研究易进行, 当研究特异类群的动态变化时, 可采用该类群的特异探针与SSCP图谱进行杂交, 进而显示该类群的演替及在群落中的位置。但是SSCP技术重现性较差, 易受胶浓度和电泳温度等条件的影响, 另外SSCP能够有效分离的DNA序列过短(150~400bp)<sup>[34]</sup>。

### 3.2.6 AFLP

AFLP即扩增片段长度多态性技术, 它是一项新的分子标记技术, 是基于PCR技术扩增基因组DNA限制性片段的方法, 基本原理是基因组DNA先用限制性内切酶切割, 然后将双链接头连接到DNA片段的末端, 接头序列和相邻的限制性位点序列, 作为引物结合位点。限制性片段用二种酶切割产生, 一种是罕见切割酶, 一种是常用切割酶。它结合了RFLP和PCR技术特点, 具有RFLP技术的可靠性和PCR技术的高效性<sup>[35]</sup>。由于AFLP扩增可使某一品种出现特定的DNA谱带, 而在另一品种中可能无此谱带产生, 因此这种通过引物诱导及DNA扩增后得到的DNA多态性可做作为一种分子标记, 并且AFLP可在一次单个反应中检测到大量的片段, 所以说AFLP技术是一种新的而且有很大功能的DNA指纹技术。其反应程序主要包括模板DNA制备, 酶切片段扩增及凝胶电泳分析这3个基本步骤。近年来广泛应用于遗传育种研究, 在动物遗传育种、动物基因组研究中有着广泛的应用前景。

### 3.2.7 ERIC-PCR 图谱分析

在肠道细菌中发现的ERIC序列, 肠杆菌基因间的重复共有序列是一段长为126bp的反向重复序列, 定位于基因组内可转录的非编码区域或与转录有关的区域<sup>[36]</sup>, 后来证明这种序列在许多微生物中存在。以ERIC序列设计的特异引物对各种环境下的微生物直接提取的总DNA进行PCR扩增, 通过电泳分析其图谱, 可以快速用来比较微生物的群落组成。ERIC-PCR图谱分析和RAPD方法一样具有简便、快速的特点, 可用于比较不同土壤样品微生物结构的变化。但由于该方法不能反映土壤微生物系统发育方面的信息, 所以无法对土壤微生物的群落结构进行精细的分析。

### 3.3 rRNA 基因同源性分析方法

核糖体DNA是一类中等重复的核内DNA序列, 每个重复单元由非转录间隔区和转录间隔区和3种RNA基因编码区组成。这3个区域的DNA序列有不同的进化率, 编码区非常保守, 适合于构建生命系统的基部分支; 转录间隔区则中度保守, 适合于推断很久以前的事件; 非转录间隔区则进化速度较快, 适合于种间和已有隔离的群体间关系的研究。此外rDNA以一种协同的方式进化, 在个体和群体内有着较好的均质性, 因此有人认为少量个体的抽样就能有效的代表其来源群体DNA的变异情况, 上述特点使rDNA成为真核生物遗传分化研究中的一个有用的核内遗传标志。对于菌群多样性的研究来说也同样使用, 具体原因是细菌16S rDNA由可变区和保守区交叉排列组成, 在保守区之间存在9个或10个变异区(V1~V10), 保守区序列在所有细菌菌种中高度一致, 而可变区序列则随菌种的不同有较大的变化, 利用16S rDNA这一特点, 在保守区设计引物, 则能够扩增所有细菌16S rDNA相应的可变区片段, 不同细菌的扩增产物通过PCR-DGGE分开, 然后利用数据库可以帮助进行序列比较从而显示菌群的多样性<sup>[37]</sup>。基于此原理建立了rRNA基因同源性分析方法, 它是综合应用多项分子生物学技术对细菌中rRNA基因进行分析, 从而揭示生物多样性。rRNA基因同源性分析方法中, 所使用的技术主要包括环境样品总DNA的提取、引物及探针的设计、PCR扩增、梯度胶电泳(包括变性剂梯度电泳DGGE和温度梯度电泳TGGE)、限制性内切酶长度多态、基因文库的筛选、序列测定、序列分析及系统树构建、斑点杂交和全细胞原位杂交及网式探针杂交等, 这些技术可根据研究目的及对象的不同单独使用或选择组合使用<sup>[38]</sup>。rRNA基因分析方法是微生物多样性及微生物生态学研究方法上的革命, 极大地推动了微生物多样性的研究, 使人们对不可培养微生物群体有了全新的认识, rRNA方法还应用到土壤细菌的检测、基因工程菌的安全性检查、环境中微生物间的基因转移等诸多方面。

### 3.4 变性梯度胶电泳(DGGE)技术

变性梯度凝胶电泳的原理是使用一对特异性引物PCR扩增微生物自然群体的16S rRNA基因, 产生长度相同但序列有异的DNA片段的混合物, 然后用DGGE分离产物混合物。DGGE胶是在6%聚丙烯酰胺胶中添加线性梯度的变性剂, 在一定温度下及同一浓度的变性剂下, 序列不同的产物, 其部分解链程度也不同, 而产物解链程度又直接影响其电泳迁移率, 结果不同的产物在凝胶上分离开来。在引物的5'端加上40个碱基左右的G-C串可使DGGE对序列差异的分辨率提高到近100%, 所以DGGE方法可用于微生物群落结构的研究、微生物种群动态的分析、富集培养物及分离物的分析、核糖体RNA同源性的分析。但由于在PCR扩增过程中可能存在碱基插入的错误、不同微生物细胞破壁难易的不同而造成分析结果的偏差。PCR-DGGE的操作步骤<sup>[39]</sup>: (1)核



酸DNA的提取;(2)PCR扩增:根据所选16S rDNA变异区两边的保守区设计特异的引物(其中一条引物的5'端加40bp左右的GC夹子),设计程序时最后可以使用降落PCR从而进一步减少非特异性扩增;(3)DGGE;(4)Electroblotting;(5)杂交分析或者在完成DGGE后可以对分离的胶进行回收,然后再进行二次PCR(用不加GC夹子的引物),将产物回收与T载体连接,转化到DH5a,然后进行酶切验证从而将阳性克隆送到相关公司完成测序。

PCR-DGGE的优点:(1)不需要培养。直接从所研究的样品中抽提总DNA,然后对16S rRNA的可变区进行PCR扩增,扩增产物通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)进行分析,能检测到难以培养或不能培养的微生物,发现一些原来没有检测到的新的微生物种类;(2)检测极限低。Muyzer等用这种方法能检测出数量仅占总群落数1%的微生物。Omar<sup>[40]</sup>证实PCR-DGGE技术检测极限大约为1%~3%,如果结合使用rRNA杂交技术,还可使检测极限降至0.1%左右;(3)检测速度快、经济。OMAR等利用该法实时实地研究了墨西哥玉米面团Pozol在发酵过程中不同阶段微生物种类和数量发生了动态变化。(4)结果准确可靠。传统的生化鉴定方法虽然也能对细菌进行鉴定,但会出现假阳性或假阴性结果,主观性比较强,而且会漏掉一些不能培养的微生物。(5)同时检测多种微生物。DGGE凝胶上至少可以区分10个清晰可辨的条带,每个条带可能来自不同的微生物;(6)与其他方法结合。DGGE可以和许多方法结合,从而全面认识微生物的组成、优势菌群等。实际上,这种结合起来的方法目前被认为是研究微生物真正的系统发育的最有力的手段,近些年来,这一观点得到了强调和重视<sup>[41]</sup>。PCR-DGGE可以和传统方法、糖和发酵产物分析、杂交技术、测序技术等结合起来。Cocolin等<sup>[42]</sup>将PCR-DGGE和传统技术结合起来;Sauau<sup>[43]</sup>将PCR-DGGE和杂交分析结合起来,都得到了较好的结果。DGGE技术具有其他技术不可代替的优点,但也有局限性:(1)提取DNA阶段,获得样品中所有种类微生物的rDNA是取得全面结果的前提,但实际微生物细胞壁的坚实度不同,不注意就会选择性地获得那些易破细胞壁的微生物DNA,并且DNA回收率低的样品,会降低重复性;(2)PCR阶段是能够获得微生物指纹基因的重要步骤,但实际PCR扩增过程中不均等扩增、有些微生物rDNA条数不同等都会造成PCR结果的代表性下降。(3)由于不能确切了解样品中大量细菌的系统发育关系和群落的多样性,其敏感度相对较低。并且采样和样品处理可能会使DNA提取产生误差<sup>[44]</sup>,模板和扩增引物的选择、处理片段大小的限制(不超过1kb)以及微生物不同序列16S rDNA基因多拷贝的存在,都会对PCR-DGGE分析结果产生影响。目前认为只有占整个群落细菌数量约1%或以上的类群能够通过DGGE检测到,同时有些细菌具有多操纵子,DGGE能将其在PCR时形成的不同序列分离开,可

能过高的估计环境中的微生物多样性<sup>[39]</sup>。

#### 4 传统培养方法与分子技术结合

对微生物生态系统的研究最终就是要知道系统中由哪些成员组成,各成员的相对数量 and 其所执行的功能。单凭传统培养方法由于其固有的局限性(选择性、自然界中大部分菌为不可纯培养的),不能全面地研究一个生态系统中微生物群落的结构。分子生物学方法,可以简单、快速、高效地得到一个生态系统的微生物群落结构,但单凭分子的方法却不能得到纯菌进而在菌株水平上进行研究。当分子生态学技术快速发展时,人们似乎过分地强调了分子生物学技术的应用价值,对传统的分离方法关注的似乎少一些。然而,对生态系统的研究既希望能够快速地得到群落的整体地结构情况、也希望能够得到系统中在功能上起重要作用的菌群。因此单凭传统培养的方法或现代分子生物学技术研究生态系统,都不能很好的达到对一个生态系统的研究,只有二者结合起来用分子技术指导分离培养的方向,互为补充,才是研究微生物生态的最佳方法。

#### 5 微生物多样性的研究展望

随着人们对微生物多样性研究的不断深入以及分子生物学以及生物信息学的不断发展,今后的研究工作将集中在如下三个方面:(1)新技术新方法的应用:随着分子生物学技术的发展,目前的新型技术如DNA芯片技术、环境全基因组测序技术和稳定同位素标记技术等,为微生物多样性研究提供了新的方法,从而能将微生物在基因层面上所发生的变异与环境因子相结合,为微生物菌群多样性功能与生态系统平衡以及各功能群落结构之间关系的研究提供有力的支持,因此应该大力发展基础科学并将其成果广泛地应用于对微生物菌群的多样性分析,进而推动许多学科快速发展;(2)各种研究方法有机结合:目前对许多单一方法的研究已经基本成熟,今后有必要加强对各种研究方法的灵活应用,根据各种方法的优缺点将其有机结合,取长补短,消除单一方法的误差,提供更加全面准确的微生物多样性变化信息,如本文所述将现代分子生物学间以及其与传统技术有机结合为菌相的分析提供更强有力的工具;(3)将微生物多样性与地区、区域及全球范围的生态学动态分析结合起来:目前人们所能了解的详细的群落多样性信息大部分来自于几类易于研究的群落类型如农田、森林、草地生态系统、岩岸潮间带、温带湖泊等。而对其他类型群落及其相互作用结合起来进行研究,将了解微生物群落结构的普遍模式提供重要帮助。因此,微生物多样性与地区、区域及全球范围的生态学动态分析相结合;扩大微生物多样性研究的群落范围将成为未来微生物多样性研究的热点。

总之,微生物菌群多样性的动态研究将成为未来科学发展的一个方向,对其精确的研究将对医学中的免疫预防、食品安全监测、环境生态学、发酵工程以及微生物新物种的发现等提供理论依据,从而推动有关学科的发展。

#### 参考文献:

- [1] 付琳林,李海星.利用变性梯度凝胶电泳分析微生物的多样性[J].生物技术通报,2004(2): 37-40.
- [2] TIEDJE J M. Microbial diversity: Of value to whom [J]. A S M News, 1994, 60: 524-525.
- [3] 魏桂芳.肠道微生物群落结构的分子分析[D].上海:上海交通大学,2005.
- [4] 刘健华,李云.肠道菌群多样性变性梯度凝胶电泳分析法的建立[J].中国兽医科技,2005, 35(6): 145-149.
- [5] 周琳,张晓军. DGGE/TGGE 技术在土壤微生物分子生态学研究中的应用[J].生物技术通报,2006(5): 67-71.
- [6] 赵兴青,杨柳燕,肖琳,等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样研究[J].生态学报,2006, 26(11): 3610-3616.
- [7] 余跃惠,张凡,向廷生,等. PCR-DGGE 方法分析原油储层微生物群落结构及种群多样性[J].生态学报,2005, 25(2): 237-242.
- [8] NORMAN R P. New perspective on the natural microbial world: Molecular microbial ecology[J]. ASM General Meeting in New Orleans, 1996, 62: 463-470.
- [9] 刘志培,杨惠芳.微生物分子生态学进展[J].应用与环境生物学报,1999, 5(1): 43-48.
- [10] 张汉波,段昌群.土壤微生态环境的非培养方法研究[J].生态学杂志,2003, 22(5): 131-136.
- [11] ROSSELL-MORA R, AMANN R. The species concept for prokaryotes [J]. FEMS Micro Rev, 2001, 25(1): 39-67.
- [12] PENNANEN T L. Phospholipid and composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 420-428.
- [13] GARLAND J L, MILLSA L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-comos utilization[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(5): 2351-2359.
- [14] ZARK C J. Functional diversity of microbial communities[J]. SilBzol Brochem, 1994, 26: 1101-1108.
- [15] KELLY J J, TATE R L. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter[J]. Environ Qual, 1998, 27: 609-617.
- [16] 余利岩,姚天爵.微生物生态学研究方法的新进展[J].微生物学通报,2001, 28(1): 89-93.
- [17] 邢德峰,任南琪,李建政.荧光原位杂交在环境微生物学中的应用及进展[J].环境科学研究,2003, 16(3): 55-58.
- [18] 逢兵,蒋学之,倪祖尧,等.荧光原位杂交原理及其在染色体畸变研究中的应用[J].劳动医学,1997, 14(1): 52-56.
- [19] GIOVANNONI S J, DELONG E E, OLSEN G J, et al. Phylogenetic group specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells[J]. J Bacteriol, 1988, 170: 720-726.
- [20] DELONG E F, WICKHAM G S, PACE N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA based probes for the identification of single microbial cells[J]. Science, 1989, 65: 5554-5563.
- [21] ANSUEL F, BRENT R. Short protocols in molecular biology[M]. New York: John Wiley and Sons Inc, 1999: 630-632.
- [22] AMANN R, KRUMHOLZ L, STAHL D A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology[J]. Bacteriol, 1990, 172: 762-770.
- [23] GARCLA-CANAS V, GONZLEZ R, CIFUENTES A. The combined use of molecular techniques and capillary electrophoresis in food analysis [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2004(23): 637-643.
- [24] 李勤,盛占武,孙志高,等.实时荧光定量 PCR 技术在食品微生物检测和研究中的应用[J].四川食品与发酵,2006, 22(6): 118-120.
- [25] 刘婷,陈朱蕾,曹丽,等. 16S rDNA-RFLP 分析六氯苯好氧降解菌群的结构及其多样性[J].微生物学报,2006, 46(5): 758-762.
- [26] 袁三青,薛燕芳,高鹏,等. T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性[J].微生物学报,2007, 47(2): 290-294.
- [27] MARSH T L. Terminal restriction fragment length polymorphism: An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products[J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(3): 323-327.
- [28] PETT R J, FIRESTONE M K. Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 6998-7007.
- [29] WILLIAMS J G K, LIVEK K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful gene marker[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(10): 6531-6535.
- [30] 张雷,沈国清,陆贻通,等. 镉和菲复合污染对土壤微生物 DNA 序列多样性的影响[J].科技通报,2005, 21(6): 763-769.
- [31] LEE D H, KIM S J. Nonradioactive methods to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 3112-3120.
- [32] HOLLY M S, COURTNEY E J. Cultivation of mesophilic soil crenarchaeotes in enrichment cultures from plant roots[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 72(8): 4751-4760.
- [33] SABINE K, VOLKER R. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(5): 3531-3542.
- [34] 董慧明,张颖,张德民,等. DNA 指纹图谱技术在土壤微生物多样性研究中的应用[J].微生物学杂志,2007, 27(1): 45-49.
- [35] 王斌,翁曼丽. AFLP 的原理及其应用[J].杂交水稻,1996(5): 27-30.
- [36] HIGGINS C F, SHARP P M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria[J]. Mol Microbiol, 1991, 5(4): 825-834.
- [37] 刘健华,李云.肠道菌群多样性变性梯度凝胶电泳分析法的建立[J].中国兽医科技,2005, 35(6): 145-149.
- [38] SGHIR A D, MACKIE R I. Design and evaluation of a *Lactobacillus* group-specific ribosomal RNA-targeted hybridization probe and its application to the study of intestinal microecology in pigs[J]. Syst Appl Microbiol, 1998, 21: 291-296.
- [39] MUYER G, WALL D E. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695-700.
- [40] OMAR N B, AMPE F. Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 3664-3673.
- [41] PALLEMNI N J. Anton Van Leeuwenhoek[EB/OL]. [2008-03-11]. <http://www.ucnp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html>.
- [42] COCOLIN L, MANZANO M. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of italian sausages[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 5113-5121.
- [43] SAUAU A, BONNET R. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(11): 4799-4807.
- [44] ZOETENDAL E G, AKKERMANS A D. DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract[J]. Syst Appl Microbiol, 2001, 24(3): 405-410.