

# 环境样本中总DNA的提取及PCR条件的优化

吴玉清<sup>1</sup>, 王永会<sup>1\*</sup>, 李祥<sup>1</sup>, 宋新贺<sup>1</sup>, 罗辑<sup>2</sup>

<sup>1</sup>鸿灌环境技术有限公司, 江苏 苏州

<sup>2</sup>苏州市吴江生态环境局, 江苏 苏州

收稿日期: 2021年9月8日; 录用日期: 2021年10月11日; 发布日期: 2021年10月18日

## 摘要

本文用两种方法提取被污染河流底泥中的总DNA, 比较两种方法的提取效果, 研究环境样本DNA的PCR扩增的引物选择、对反应体系及反应程序进行相应的优化, 得出适合PCR的最佳条件; 研究表明氯仿-异丙醇提取法可以提取出含污染物质较少的总DNA; 同时筛选出一些可扩增DNA模板的相关特异性引物; 针对PCR扩增程序及体系都进行了一定程度上的优化。

## 关键词

DNA提取, 纯度, PCR, 优化

# DNA Extraction from Environmental Samples and Optimization of PCR Conditions

Yuqing Wu<sup>1</sup>, Yonghui Wang<sup>1\*</sup>, Xiang Li<sup>1</sup>, Xinhe Song<sup>1</sup>, Ji Luo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hongguan Environmental Technology Co., Ltd., Suzhou Jiangsu

<sup>2</sup>Suzhou Wujiang Ecological Environment Bureau, Ltd., Suzhou Jiangsu

Received: Sep. 8<sup>th</sup>, 2021; accepted: Oct. 11<sup>th</sup>, 2021; published: Oct. 18<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

In this paper, two methods were used to extract the total DNA from the contaminated river sediment, compare the extraction effect of the two methods, study the primer selection for PCR amplification of environmental sample DNA, optimize the reaction system and reaction procedure ac-

\*通讯作者。

cordingly, and arrive at the best conditions for PCR; the study shows that the chloroform-isopropyl alcohol extraction method can extract the total DNA containing less contaminated material. The specific primers which can amplify DNA template were selected, and the PCR amplification procedure and system were optimized to some extent.

## Keywords

DNA Extraction, Purenness, PCR, Optimization

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

利用分子生物学技术对环境样本中的微生物进行研究, 成为目前研究的趋势和潮流。而这一切研究的基础都依赖于其 DNA 的提取质量和对其特异性片段的 PCR 扩增效果, 因此对某一环境样本中的总 DNA 的提取方法的选择和 PCR 条件的选择的研究就显的很有意义。本论文将针对常州市河河流底泥 DNA 的提取及 PCR (聚合酶链式反应 polymerase chain reaction) 条件的优化展开研究[1] [2]。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

样本采集: 常州市河元丰桥、金谷庄园河段的泥质沉积物(样本采集于 2012 年 3 月进行, 采集位于河流表层 0~20 cm 处的底泥, 随后将采集完成的底泥样品转移至无菌袋内, 在 4℃ 条件下立即运回实验室, 并置于-80℃ 下保存)。

### 2.2. 实验设备

实验设备如下表 1。

**Table 1.** Experimental equipment  
**表 1.** 实验设备

名称	型号
冷冻离心机	GmbH D-37520
台式离心机	TGL-16C
数显恒温水浴锅	HH-S4
分析天平	LA204
制冰机	BILON
医用净化工作台	SW-CJ
稳压稳流电泳仪	EPS-300
水平电泳槽	HE-120

## Continued

超微量分光光度计	OD-1000*
脱色摇床	TY-80R
PCR 仪	ABI 2720
凝胶成像系统	BioSens SC 810

## 2.3. DNA 的提取[3]-[9]

### 2.3.1. 试剂盒提取法[10]

采用生工生物工程(上海)公司土壤基因组 DNA 快速抽提试剂盒来提取底泥样品中的总 DNA, 而后将得到的总 DNA 溶解于 50  $\mu$ L TE Buffer, 再置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 2.3.2. 氯仿 - 异丙醇法提取 DNA 方法[11] [12] [13] [14]

用氯仿 - 异丙醇法提取的底泥样品总 DNA, 得到的 DNA 可以存储在 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 下长期储存。

## 2.4. DNA 浓度和纯度的检验

利用微量分光光度计对用试剂盒和氯仿 - 异丙醇法提取出的元丰桥和金谷庄园河段底泥样本总 DNA 纯度进行测定, 然后根据 A260/A280、A260/A230 和 DNA 产量的值, 对 DNA 中的蛋白质、酚等进行定量分析。

## 2.5. DNA 的纯度分析

纯度分析首先需要采用琼脂糖凝胶电泳来处理提取得到的底泥总 DNA, 再采用凝胶成像系统来拍摄胶体, 之后便可以直观的得到实验结果。

## 2.6. PCR 的优化[15] [16] [17] [18]

### 2.6.1. 引物的选择

本研究所采用的引物为生工生物工程(上海)有限公司生产的相关引物, 引物序列见表 2。其中, 通用引物 1 可以扩增近乎细菌中含有的所有 16SrRNA 的序列; 通用引物 2 和通用引物 3 是 16SrDNA 的 V3 区的通用引物[19]。

**Table 2.** General primer sequences

**表 2.** 通用引物序列

引物	引物序列
通用引物 1	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 5'-TAGGGTTAACCTTGTTACGACTT-3'
通用引物 2	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
通用引物 3	5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

如表 2 所示, 在本实验中通过用 3 种不同的引物对提取出的底泥样品总 DNA 进行 PCR 扩增, 并比较扩增后的 DNA 的量和纯度, 检验其扩增特异性, 找出适于该研究河段的扩增引物。Watanabe 等[20]

研究结果表明, 通过采用不同的引物对 16SrDNA 靶序列进行扩增, 可使得其在 DGGE 分析中的结果不同。在实验中主要研究 V3 区的扩增特异性, 而通用引物 1 是可以几乎可以扩增细菌中所有 16SrRNA 序列的引物。

### 2.6.2. 反应体系的优化

PCR 反应体系在一定程度上会受到提取得到的总 DNA 中的所含有的微量杂质的影响。如若反应体系中所含有的杂质过高或过低, 都会导致 PCR 反应效果不佳。综上, 确定最适的 DNA 模板浓度将会是优化 PCR 反应体系的重点之一。

### 2.6.3. PCR 反应体系

PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 具体试剂量如表 3。

**Table 3.** The first PCR amplification template matching table  
**表 3.** PCR 扩增模板—配比表

名称	配比试剂量
2 $\times$ Taq Master mix	12.5 $\mu\text{L}$
上游引物	0.5 $\mu\text{L}$
下游引物	0.5 $\mu\text{L}$
DNA 模板	1 $\mu\text{L}$
DDH <sub>2</sub> O	10.5 $\mu\text{L}$

### 2.6.4. PCR 扩增条件

扩增程序[21] [22] [23]: 首先进行时长为 4 min 且温度为 94 $^{\circ}\text{C}$ 的预变性, 随后再进行 30 个循环, 各个循环主要包括时长为 1 min 温度为 94 $^{\circ}\text{C}$ 的变性, 再于 55 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 1.5 min 的退火, 最后再于 72 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 1 min 的延伸, 待循环结束后再于 72 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 10 min 的延伸。

### 2.6.5. 反应程序的优化

根据相关文献可知退火温度在一定程度上会影响 PCR 的特异性。当完成变性实验第一步后, 反应系统温度会快速下降至 40 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 之间, 进而有可能会引物与模板发生结合。鉴于模板 DNA 较引物的复杂程度要高一些, 因此引物与模板之间的碰撞结合率会远高于模板互补链间的碰撞。退火温度及时间的变化在一定程度上会受到引物、靶基序列的长度, 碱基组成及其浓度的影响。退火温度范围可由  $T_m$  5 $^{\circ}\text{C}$  以上跨越至  $T_m$  10 $^{\circ}\text{C}$  以下, 如果条件允许, 退火温度的降低可以是 1 $^{\circ}\text{C}$  或 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

退火温度的选择方面主要体现在降落 PCR 中相当于对降落起始温度的选择。参考大量文献中所叙述的 PCR 反应程序, 来设计相关对比试验再进行相应的验证。采用 3 种不同的退火温度, 起始温度分别为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$  和 65 $^{\circ}\text{C}$ , 每个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$ , 20 个循环后降低 10 $^{\circ}\text{C}$ , 而后将温度稳定, 再相应的持续增加几个循环。同时每组循环各设置共 3 个平行样, 并加入分别为 10 倍、100 倍的稀释液以及空白对照的三个不同浓度的模板。

### 2.6.6. PCR 反应体系

PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 具体试剂量如表 4。

**Table 4.** PCR amplification template matching table  
**表 4.** PCR 扩增模板配比表

名称	配比试剂量
2×Taq Master mix	12.5 μL
上游引物	0.5 μL
下游引物	0.5 μL
DNA 模板	1 μL
DDH <sub>2</sub> O	10.5 μL

## 2.7. PCR 扩增条件

扩增程序一：首先进行时长为 4 min 且温度为 94℃ 的预变性，随后再进行 30 个循环，各个循环主要包括时长为 1 min 温度为 94℃ 的变性，再于 55℃ 下进行 1.5 min 的退火，最后再于 72℃ 下进行 1 min 的延伸，待循环结束后再于 72℃ 下进行 10 min 的延伸。

扩增程序二：首先进行时长为 4 min 且温度为 94℃ 的预变性，随后再进行 30 个循环，各个循环包括 1 min 的 94℃ 变性，再于 60℃ 下进行 1.5 min 的退火，最后再于 72℃ 下进行 1 min 的延伸，待循环结束后再于 72℃ 下进行 10 min 的延伸。

扩增程序三：首先进行时长为 4 min 且温度为 94℃ 的预变性，随后再进行 30 个循环，各个循环主要包括时长为 1 min 温度为 94℃ 的变性，在 65℃ 下进行 1.5 min 的退火，在 72℃ 下继续延伸 1 min，待循环结束后再于 72℃ 下进行 10 min 的延伸。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 样本 DNA 提取结果

用试剂盒提取的底泥样品总 DNA 在干燥后是不可见的，当用 TE Buffer 溶解后金谷庄园的溶液呈浅褐色，元丰桥的溶液呈无色透明；而用氯仿—异丙醇法提取的底泥样品总 DNA 在干燥后，可以清楚的看到白色颗粒，金谷庄园颗粒边缘有褐色物质。之后，用 TE Buffer 溶解后元丰桥的溶液呈无色透明，金谷庄园的溶液呈浅褐色。由此可见，氯仿—异丙醇法提取的底泥样品总 DNA 比试剂盒提取的 DNA 的量多。金谷庄园河段的沉积物所还的杂质较多，提取出的总 DNA 不够纯，所含的腐殖质含量较多。

经比较，可证明氯仿—异丙醇法提取的 DNA 含量明显。但是最后金谷庄园处的总 DNA 溶液有明显的变色，这就说明了两种方法提取的 DNA 都不够纯。DNA 中的褐色物质就是明显的未去除干净的腐殖质。由于河流底泥中成分复杂如含有大量有机物、腐殖质等难去除物质，所以在以后提取河流底泥样本总 DNA 的实验中应当先进行去腐殖质的相关工作。

### 3.2. DNA 浓度及纯度的相应检验结果

DNA 的浓度及纯度检测的结果可见表 5，用氯仿—异丙醇法提取的底泥样品总 DNA 比用试剂盒提取的总 DNA 纯度高且含量多。试剂盒提取的总 DNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值均小于 1.60，这表明提取的总 DNA 受到了蛋白质、腐殖质等污染。上述的两种提取方法 OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 的比值均要低于 2.0，其结果表明样品在一定程度上受到了有机溶剂的污染。用试剂盒法提取的总 DNA 受到严重污染，对后续实验有不利影响。

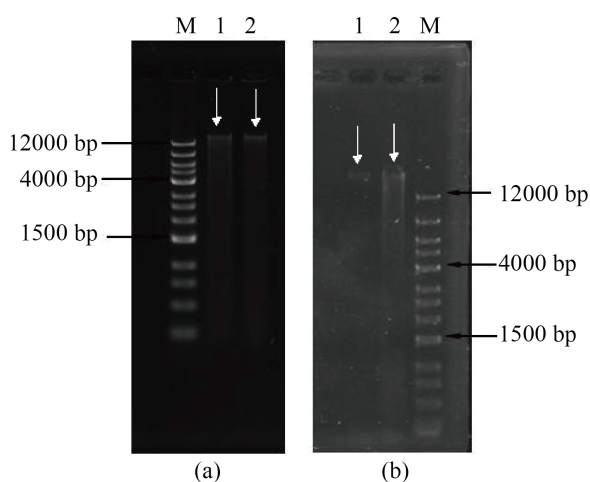
**Table 5.** Different methods for the DNA concentration and purity  
**表 5.** 不同方法所得 DNA 浓度及纯度

DNA 样品	A	B	C	D
样品量(g)	3	3	0.3	0.3
OD260/OD280	1.64	1.72	1.47	1.52
OD260/OD230	1.93	1.89	1.34	1.52
DNA 产量(ng/ $\mu$ L)	75.92	75.97	57.32	58.73

注: 表 5 中 DNA 样品 A 和 B 分别为氯仿-异丙醇法提取的金谷庄园底泥样品总 DNA、元丰桥底泥样品总 DNA、C 和 D 试剂盒提取的金谷庄园底泥样品总 DNA 和元丰桥底泥样品总 DNA。虽然氯仿-异丙醇法提取的底泥样品总 DNA 纯度和含量较高, 但是其纯度还是受到蛋白质、酚、腐殖质的影响。试剂盒提取的底泥样品总 DNA 纯度不是很理想。所以在提取环境样本总 DNA 时需要注意减少蛋白质、腐殖质、酚等物质的污染。

### 3.3. DNA 的纯度分析结果

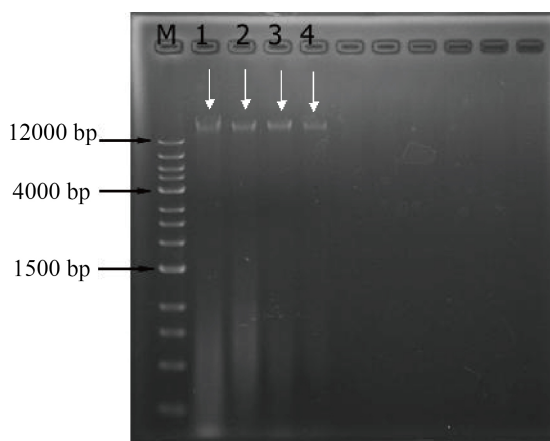
两种方法提取的总 DNA 样品凝胶电泳图如图 1 所示。A 是利用氯仿-异丙醇法提取的底泥样品总 DNA, B 是利用 DNA 提取试剂盒提取的 DNA。其中 M 是标记(NormalRunTM1kb-11), 1 是元丰桥处的底泥样品总 DNA, 2 是金谷庄园底泥样品总 DNA。



**Figure 1.** Different methods to extract DNA  
**图 1.** 不同方法提取的 DNA

由图 1 可知, 图 1(a)和图 1(b)是提取底泥样品总 DNA 的两种不同的方法, 采用不同的提取方法所提出的 DNA 的纯度及量在一定程度上也会有所不同。去除掉大量细胞裂解及杂质是贯穿 DNA 提取过程的关键点, 其中用试剂盒(图 1(b))提取的样品 1, DNA 提取物在整体上呈现出褐色, 图中可以明显的看出较其它泳道而言, 其泳道的背景色显得更深, 该结果表明腐殖酸等一系列杂质对提取物有较大的干扰作用。当粗提物的颜色变得越深, 表明杂质的干扰作用越大。氯仿-异丙醇法(图 1(a))中 1, 2 号泳道也有较明显扩增条带, 但其泳道 DNA 条带比较亮, 都有清晰条带, DNA 提取量较大, 而图 1(b)图的扩增条带不够清晰)。所以用氯仿-异丙醇法和试剂盒分别提取的 DNA 含量不同, 亮度有所差别。

如图 2 所示此图是氯仿-异丙醇法和试剂盒法提取底泥 DNA 的重复性实验, 其中 M 是标记(NormalRunTM1kb-11), 1、3 是氯仿-异丙醇法提取的底泥 DNA, 2、4 是试剂盒提取的底泥 DNA。1、2 是金谷庄园的底泥 DNA 样品, 3、4 是元丰桥的底泥 DNA 样品。



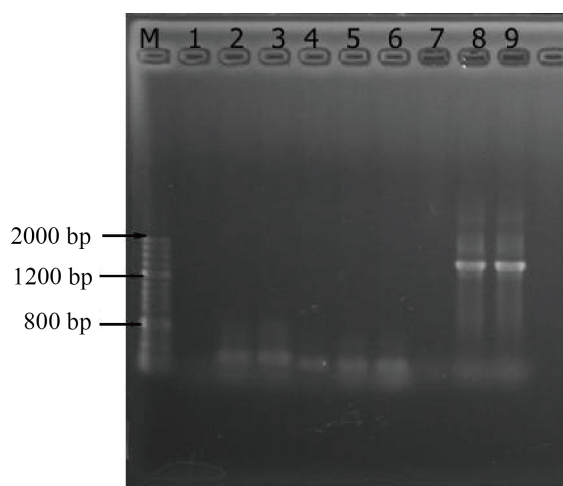
**Figure 2.** Extraction sediment DNA repetitive experiments  
**图 2.** 提取底泥 DNA 的重复性实验

由图 2 也可以清楚的看到 1、2 号泳道颜色较深，这证明金谷庄园的底泥 DNA 样品中含有较多的腐殖酸、蛋白质等物质。通过条带 1 和条带 3 的对比以及条带 2 和条带 4 的对比，1、2 条带明显比 3、4 条带清晰。由此可知氯仿-异丙醇法提取的 DNA 含量要比试剂盒提取的含量高。由实验结果可知金谷庄园河段底泥所含的微生物和腐殖质较多，但提取的总 DNA 不够纯。而元丰桥河段底泥所含的微生物和腐殖质较少，所以提取总 DNA 较纯。由此可知在提取底泥样品总 DNA 之前最好先做去腐处理。

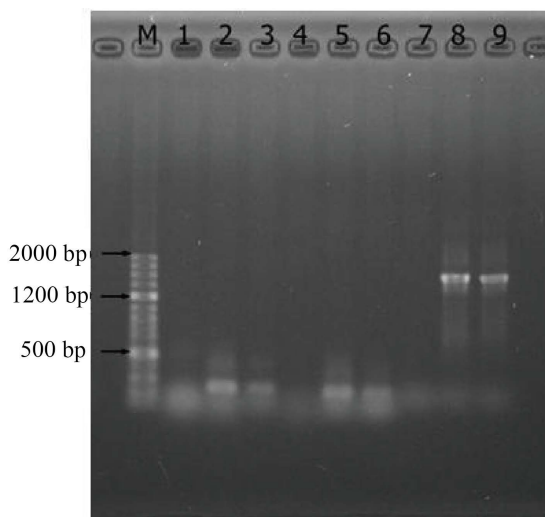
### 3.4. PCR 的优化结果

#### 3.4.1. 反应体系的优化

图 3 为经过 PCR 扩增模板一程序扩增后所得到的 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图。由图中可知，M 是标记(AccurateRunTM100bp-IV DNA Ladder)，1、2、3 分别是空白样、稀释到 10 倍、100 倍用通用引物 3 扩增的 DNA，4、5、6 分别是空白样、稀释到 10 倍、100 倍用通用引物 2 扩增的 DNA，7、8、9 分别是空白样、稀释到 10 倍、100 倍用通用引物 1 扩增的 DNA。



**Figure 3.** A template for PCR amplification, DNA agarose gel electrophoresis  
**图 3.** PCR 扩增模板一 DNA 琼脂糖凝胶电泳图



**Figure 4.** Template for PCR amplification of DNA agarose gel electrophoresis

**图 4.** PCR 扩增模板二 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

图 4 为经过 PCR 扩增模板二扩增后所得的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图。由图可知，M 是标记 (AccurateRunTM100bp-IV DNA Ladder)，1、2、3 分别是空白样、稀释 10 倍、100 倍用通用引物 3 扩增的 DNA，4、5、6 分别是空白样、稀释 10 倍、100 倍用通用引物 2 扩增的 DNA，7、8、9 分别是空白样、稀释 10 倍、100 倍用通用引物 1 扩增的 DNA。

由图 3、图 4 可知，经过 PCR 扩增之后 DNA 模板的浓度及纯度都得到了明显的提高。这说明提取的 DNA 中有与引物相对应的基因片段得到了扩增。由于 DNA 样品稀释后，DNA 样品中的腐殖质、蛋白质等污染物质的浓度显著减少，所以当 DNA 样品稀释到 10 倍、100 倍的时候污染物质对 DNA 扩增时的影响减小，PCR 扩增的效果更好。图 3、图 4 中 1~7 泳道中都没有明显的 DNA 条带，只有 8、9 两条泳道中有明亮条带，条带位置约为 1400 kb。虽然 PCR 扩增程序不同，但图 3、图 4 的明亮条带位置相同，这证明通用引物 1 是可以扩增元丰桥河段底泥 DNA 的特异性引物。

通用引物 1 中的 GC 含量位于 40%~60% 之间，且其核苷长都位于 18~24 个之间，并且它在最后 5 个核苷中含 3 个 A 或 T，上游引物和下游引物溶解温度  $T_m$  值接近[24]。这些条件都使通用引物 1 有效的与靶序列杂交，使该试验得到了有效的 PCR 扩增产物。

通用引物 2 的 GC 含量大于 60%，且在 3' 末端都含有丰富的 GC，这些都能够一定程度上降低引物的及其同目序列杂交的相关稳定性。

相反通用引物 3 的序列较其他引物要长许多，一般情况下杂交可能发生于较长的序列与错误配对序列之间，从而会导致其特异性大幅度降低，同时比短序列的杂交进程要慢很多，最终导致产量下降。

### 3.4.2. 反应程序的优化

由图 5 可知，该图是经过 PCR 扩增后的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图。其中，M 是标记 (Normal RunTM100bp-IV DNA Ladder)，2、5 和 8 是稀释到 10 倍的溶液、3、6 和 9 是稀释到 100 倍的溶液。用通用引物扩增的 DNA，1、4、7 是空白样。7~9 是经过扩增程序一、1~3 是经过扩增程序二、4~6 是经过扩增程序三扩增的总 DNA 样品。

由图可知 PCR 产量会随着起始温度的不断升高而逐渐减少，主要的表现为条带会变得越来越暗，同时证明了 PCR 反应在退火温度太高的情况下进行会较为困难。此外，伴随着温度的升高，PCR 产物的特



异性并没有发生显著的改善。综上所述，本实验中最为合适的起始退火温度为 55℃。

从结果与分析中可以明显的看出,通用引物 1 是对元丰桥的 DNA 样品进行 PCR 的扩增的最佳引物,扩增产物大概在 1600 bp。10 倍稀释液和 100 倍稀释液都是最适 DNA 模板的浓度,考虑到经济成本在今后的实验中 DNA 模板只要稀释 10 倍即可。而 PCR 扩增的最佳起始退火温度是 55℃。

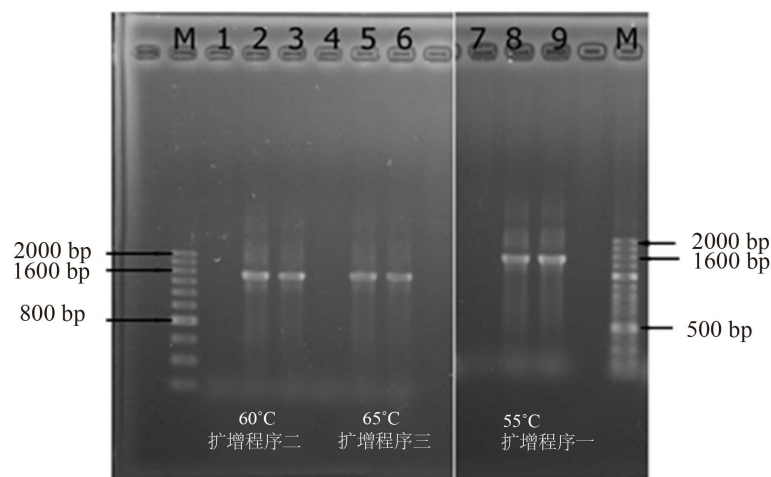


Figure 5. The PCR amplification of DNA gel electrophoresis  
图 5. PCR 扩增 DNA 凝胶电泳图

由图可知 PCR 产量会随着起始温度的不断升高而逐渐减少,主要的表现为条带会变得越来越暗,同时证明了 PCR 反应在退火温度太高的情况下进行会较为困难。此外,伴随着温度的升高,PCR 产物的特异性并没有发生显著的改善。综上所述,本实验中最为合适的起始退火温度为 55℃。

从结果与分析中可以明显的看出,通用引物 1 是对元丰桥的 DNA 样品进行 PCR 的扩增的最佳引物,扩增产物大概在 1600 bp。10 倍稀释液和 100 倍稀释液都是最适 DNA 模板的浓度,考虑到经济成本在今后的实验中 DNA 模板只要稀释 10 倍即可。而 PCR 扩增的最佳起始退火温度是 55℃。

#### 4. 结论

本文以常州北市河元丰桥、金谷庄园河段的泥质沉积物为研究对象,提取总 DNA 采取的方法主要包括以下两种:氯仿-异丙醇法、试剂盒法,比较这两种提取方法的优劣所在。结果表明,由于河流底泥中成分复杂如含有大量有机物、腐殖质等难去除物质,两种方法提取的 DNA 纯度都不够高,氯仿-异丙醇法比试剂盒法对北市河河流沉积物样品 DNA 提取的效果好。

通过用 3 种不同的引物对提取的 DNA 样品进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳的结果对比证明通用引物 1 可以扩增元丰桥河段底泥 DNA 的特异性引物。

分子生物学技术对环境样本中的微生物的研究的基础都依赖于其 DNA 的提取质量和对其特异性片段的 PCR 扩增效果,引物浓度的不同,会影响 PCR 扩增产物的纯度。结果表明,10 倍稀释溶液和 100 倍稀释溶液的扩增效果都比较适合。经过改变退火温度,PCR 扩增的最佳起始退火温度为 55℃。

#### 参考文献

- [1] Courtois, S., Frotegard, A., Goransson, P., *et al.* (2001) Quantification of Bacterial Subgroups in Soil: Comparison of DNA Extracted Directly from Soil or Form Cells Previously Released by Density Gradient Centrifugation. *Environmental Microbiology*, 3, 43. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00208.x>

- [2] Ogram, A., Saylor, G.S., Barkey, T., *et al.* (1987) The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments. *Microbial*, **7**, 57-66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X)
- [3] 宋培勇. 从土壤中提取 DNA 方法比较[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 109-112.
- [4] Torsvik, V.L. and Goksoyr, J. (1978) Determination of Bacterial DNA in Soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **10**, 7-12. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(78)90003-2)
- [5] 朱灵峰, 张乐, 王海燕, 等. 河流沉积物中微生物 DNA 的提取方法比较研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(4): 935-938.
- [6] Roose-Amsaleg, C.L., Gamier-Sillam, E. and Harry, M. (2001) Extraction and Purification of Microbial DNA from Soil and Sediment Samples. *Applied Soil Ecology*, **18**, 47-60. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00149-4)
- [7] 高平平, 赵立平. 可用于微生物群落分子生态研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究[J]. 生态学报, 2002, 22(11): 2015-2019.
- [8] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态研究中总 DNA 的提取[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 854-860.
- [9] 奥斯伯金由辛, 包慧中, 赵丽云. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [10] 黄婷婷, 曹慧, 王兴祥, 等. 一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法[J]. 土壤, 2004, 36(6): 662-666.
- [11] 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, 2005, 13(3): 377-381.
- [12] 丁嫚, 李璐, 邹丽, 等. 活性污泥总 DNA 提取方法的比较[J]. 环境工程学报, 2009, 3(9): 1697-1702.
- [13] 胡元森, 李翠香, 周毅, 等. 两种从土壤中提取 DNA 方法的比较生物技术[J]. 生物学报, 2006, 16(5): 34-36.
- [14] Xing, D.E. and Godfrey, M.H. (2003) Nuclear DNA Analysis in Genetic Studies of Populations: Practice, Problems and Prospects. *Molecular Ecology*, **12**, 563-584. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01773.x>
- [15] Zhang, X., Yan, X., Gao, P., *et al.* (2005) Optimized Sequence Retrieval from Single Bands of Temperature Gradient Gel Electrophoresis Profiles of the Amplified 16S rDNA Fragments from an Activated Sludge System. *Journal of Microbiological Methods*, **60**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.08.015>
- [16] Qiu, X., Wu, L., Huang, H., *et al.* (2001) Evaluation of PCR-Generated Chimeras, Mutations and Heteroduplexes with 16S rRNA Gene-Based Cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 880-887. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.880-887.2001>
- [17] Thompson, J.R., Marcelino, L.A. and Polz, M.F. (2002) Heteroduplexes in Mixed-Template Amplifications: Formation, Consequence and Elimination by "Reconditioning PCR". *Nucleic Acids Research*, **30**, 2083-2088. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.2083>
- [18] 刘新春, 吴成强, 张昱, 等. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析[J]. 生态学报, 2005, 25(4): 842-847.
- [19] 闫晗, 吴祥云, 吴杏伟, 等. 土壤微生物 16SrDNA V6 V8 区 PCR 反应条件优化[J]. 应用化工, 2010, 39(9): 1325-1327.
- [20] Watanabe, K., Kodama, Y. and Harayama, S. (2001) Design and Evaluation of PCR Primers to Amplify Bacterial 16S Ribosomal DNA Fragments Used for Community Fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, **44**, 253-262. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00220-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00220-2)
- [21] 邸宁, 刘志民, 马焕普. 研究土壤微生物多样性的 PCR 条件优化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(23): 14059-14061.
- [22] 李文红, 房振峰. 江蕨总 DNA 提取及其 PCR 扩增方法的建立[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(6): 98-103.
- [23] 杜涛, 黄小毛, 侯明生, 等. 从土壤中提取 DNA 用于 PCR 扩增[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 1-6.
- [24] 黄建华, 袁道强, 陈世峰. 生物化学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 2.