

发酵床垫料中微生物 16S rDNA PCR 反应条件的建立与优化

杜东霞, 尹红梅, 张德元, 刘 标, 许 隽, 王 震, 贺月林*

(湖南省微生物研究院, 湖南 长沙 410009)

摘要:为探讨发酵床垫料中微生物 16S rDNA 基因扩增实验中诸多因素对实验结果的影响,采用单因素法对 16S rDNA 基因扩增时 PCR 反应体系中的 5 个潜在因素(Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq 酶、模板 DNA) 5 水平上进行优化实验,并进一步优化了反应程序中的退火温度、循环次数。结果表明:25 μ L 的最佳反应体系为:10 \times PCR buffer 2.5 μ L、 $MgCl_2$ 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 、dNTP 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ 、引物 0.2 μ mol $\cdot L^{-1}$ 、Taq DNA 聚合酶 0.5 U、模板 DNA 50 ng;最佳反应程序为:在 94 $^{\circ}C$ 下进行 4 min 预变性;随后循环扩增 25 个循环(包括 94 $^{\circ}C$ 变性 45 s, 53.7 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 90 s);最后在 72 $^{\circ}C$ 下延伸 10 min。

关键词:发酵床垫料; 16S rDNA; 单因素法; 退火温度

中图分类号: Q93-331

文献标志码: A

文章编号: 2095-6819(2014)05-0470-06

doi: 10.13254/j.jare.2014.0102

Establishment and Optimization of Microbial 16S rDNA PCR Reaction Conditions in Fermentation Bed Padding Material

DU Dong-xia, YIN Hong-mei, ZHANG De-yuan, LIU Biao, XU Jun, WANG Zhen, HE Yue-lin*

(Hunan Academy of Microbiology, Changsha 410009, China)

Abstract: In order to study the influence of several potential factors on 16S rDNA PCR reaction conditions in fermentation bed padding material, five factors (Mg^{2+} , dNTP, primer, Taq DNA polymerase and DNA template) were optimized by single factor experiment at 5 concentration levels. Annealing temperatures and amplification cycle numbers were also optimized. The results showed that the optimum 25 μ L reaction system comprised 10 \times PCR buffer 25 μ L, $MgCl_2$ 2.0 $mmol \cdot L^{-1}$, dNTP 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$, primer 0.2 μ mol $\cdot L^{-1}$, Taq DNA polymerase 0.5 U and DNA template 50 ng; and the optimum PCR procedure was as an initial pre-denaturing at 94 $^{\circ}C$ for 4 min, which preceded 25 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}C$ for 45 s, annealing at 53.7 $^{\circ}C$ for 30 s, and extension at 72 $^{\circ}C$ for 90 s, with a final extension at 72 $^{\circ}C$ for 10 min.

Keywords: fermentation bed padding material; 16S rDNA; single factor experiment; annealing temperature

随着规模化养猪产业的迅速发展,养殖场造成的环境污染问题显得日益突出。而发酵床养殖技术是依据自然生态理念和微生态原理,集畜禽粪尿无害化处理与科学饲养于一体的新型环保养猪技术^[1]。该养殖技术是以猪舍内铺设谷壳、米糠、锯末等原料组成的基质垫料作为培养基,人为接种一些环境益生菌,猪饲养过程中所排放的粪尿在猪舍内经微生物原地发酵迅速降解、消化,从而达到零污染、零排放,从源头

实现环保、无公害的养殖目的^[2]。

发酵床养殖技术的精髓是微生物的发酵和代谢作用,起主要作用的微生物群落结构十分复杂,除了发酵床垫料中的土著微生物外,还包含人为添加的一些功能微生物菌群,在饲养环境下,微生物在相互作用过程中,其群落结构和数量此消彼长,处于不断变化过程中,最终会产生一些优势菌群,主导着畜禽粪便的无害化过程^[1,3]。因此,有必要弄清楚成分复杂的发酵床垫料中微生物的种类、数量、亲缘关系以及群落的演替规律,有助于开发出新型、高效、安全、稳定的微生物菌剂,促进发酵床养殖技术的进一步发展。然而,近几年来,发酵床垫料中的微生物群落动态及分子生态学的研究显得十分的薄弱,一方面是由于许多功能微生物无法在实验室培养,传统的微生物纯培

收稿日期: 2014-04-24

基金项目: 湖南省农业产业技术体系“湖南省生猪产业技术体系生猪产业规模养殖与环境控制岗位”

作者简介: 杜东霞(1981—),女,硕士,助理研究员,主要从事环境微生物学及分子生物学研究。E-mail:xiaxia414@126.com

*通信作者: 贺月林 E-mail: yyqhmm@163.com

养无法反映发酵床垫料中微生物的丰度;另一方面用分离微生物的方法研究微生物群落动态变化规律工作十分繁重,而且对了解微生物实际群落变化比较困难^[2]。

近年来,随着现代生物技术和微生物分子生物学的迅速发展,基于 DNA 分析的分子生态技术为解决该难题提供了强有力的工具。通过菌群的 DNA 分析可以比较全面地了解发酵床垫料中微生物群落的结构变化,极大地促进发酵床垫料中微生物多样性的研究。它既可以绕开传统分离方法复杂和繁琐的操作,又可以鉴定纯培养方法难以鉴定的菌种^[4-5]。但该方法的应用必须以获得能真实反映原环境样品中微生物实际组成状况的总 DNA 及高质量的 PCR 产物为基础,鉴于此,本文对发酵床垫料中微生物总 DNA 的提取方法进行了探索,同时建立与优化了微生物 16S rDNA PCR 反应条件,为揭示发酵床垫料中微生物群落的动态变化规律及研制高效专一的发酵床复合菌剂奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 发酵床垫料

来源于唐人神养殖场,在发酵床垫料 30 cm 处“Z”字形 5 点取样,混合均匀后作为实验样本,塑料袋密封低温保存。

1.1.2 主要试剂和设备

土壤总 DNA 提取试剂盒(Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit),购于美国 MOBIO 公司;PCR 仪(Mastecycler pro)购于 Eppendorf 公司;Cary50 紫外可见分光光度计购自美国 VARIAN 公司;5424R 小型台式高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;DYY-6C 型电泳仪购自北京六一仪器厂;Bio-Rad Gel Doc 2000 型凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵床垫料中微生物总 DNA 提取

参照文献[6]的方法并进行了适当修改。

1.2.1.1 发酵床垫料样品预处理

新鲜垫料经液氮研磨之后,称取 5 g 于 30 mL 离心管中,用 TENP 缓冲液洗涤,直到上清液清澈透明,离心的沉淀用于 DNA 提取。

1.2.1.2 发酵床垫料中微生物总 DNA 提取

采用以下 2 种方法对制备的发酵床垫料样品进行微生物总 DNA 的提取。

(1)SDS-CTAB 结合法:①称取 2 g 沉淀置于 30 mL 洁净离心管中,在沉淀中加入 15 mL SDS 裂解液,200 μ L 蛋白酶 K 和 0.8 mL 异硫氰酸胍洗液,轻轻颠转混匀,65 $^{\circ}$ C 温育 1 h;②6 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,转移上清液至 30 mL 洁净离心管;③加入 0.2 倍体积的醋酸钠溶液和 1.7 倍体积的 10% PEG8000 溶液,-20 $^{\circ}$ C 下静置 15 min;④10 000 $r \cdot \min^{-1}$,4 $^{\circ}$ C,离心 10 min,留沉淀;⑤往沉淀中加入 15 mL CTAB 裂解液,65 $^{\circ}$ C 温育 15 min;⑥加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),轻轻混匀,10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min;⑦将上清液转移到新的 30 mL 离心管中,加入 2 倍体积的无水乙醇,置于 4 $^{\circ}$ C 过夜;⑧12 000 $r \cdot \min^{-1}$,4 $^{\circ}$ C,离心 10 min,弃上清液,留沉淀。用 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀,转移到 1.5 mL 离心管中。14 000 $r \cdot \min^{-1}$,4 $^{\circ}$ C,离心 3 min,弃上清液,留沉淀。再重复洗涤 1 次,超净台吹干,之后加入 300 μ L 无菌水溶解 DNA,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2)土壤总 DNA 提取试剂盒法:该实验步骤严格参照说明书进行操作。

1.2.2 DNA 浓度和纯度的测定方法

用紫外分光光度法分别测定不同方法提取的 DNA 溶液在不同波长处的吸光度(OD_{260} 、 OD_{230} 、 OD_{280}),根据公式:[dsDNA] = $50 \times OD_{260} \times$ 稀释倍数,计算 DNA 的浓度(单位为 μ g \cdot mL $^{-1}$),分别用 OD_{260}/OD_{230} 、 OD_{260}/OD_{280} 估算所提取 DNA 的纯度。

1.2.3 发酵床垫料中微生物 16S rDNA PCR 反应体系的建立

引物:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACCTTGTTACGACTT-3')扩增细菌 16S rDNA;

PCR 扩增体系:10 \times PCR buffer 2.5 μ L,dNTPs 2 μ L,上下游引物(10 μ mol \cdot L $^{-1}$)各 1 μ L,DNA 模板稀释液 1 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U \cdot μ L $^{-1}$)0.2 μ L,其余用无菌水补齐至 25 μ L;

PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,(94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,53 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s)30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.4 发酵床垫料中微生物 16S rDNA 的 PCR 反应条件优化

退火温度的选择:对扩增程序中最为关键的退火温度进行优化,分别设置为:48.3、50.0、51.8、53.7、55.5 $^{\circ}$ C。

循环次数的选择:在确定最佳退火温度后,选择不同循环次数进行扩增。循环次数分别为 20、25、30、

35、40、45 个。

引物浓度的选择:引物浓度梯度设置为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

dNTPs 浓度的选择:dNTPs 浓度梯度设置为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

不同 Taq DNA 聚合酶用量的选择:Taq DNA 聚合酶浓度梯度设置为 0.5、0.75、1.0、1.5、2 U。

模板 DNA 浓度的选择:模板 DNA 浓度梯度设置为 20、30、40、50、60、70 ng。

Mg^{2+} 浓度的选择: Mg^{2+} 浓度梯度设置为 1、1.5、2、2.5、3.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

PCR 扩增产物用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 发酵床垫料中微生物总 DNA 的纯度和浓度检测结果

将不同方法处理提取的垫料微生物总 DNA 通过紫外分光光度计测定的数据见表 1。DNA 纯度是衡量垫料微生物总 DNA 提取的重要指标,一般用 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值分别检测提取 DNA 样品中蛋白质和腐植酸杂质的污染程度^[7-8]。 A_{260}/A_{230} 比值越大,DNA 越纯;反之 A_{260}/A_{230} 比值越低,腐植酸污染越严重。一般来说,当 A_{260}/A_{280} 比值大于 1.7 时,DNA 较纯,否则有蛋白质污染^[2,9]。

表 1 不同方法提取的垫料 DNA 的纯度和浓度

Table 1 Purification and concentration of extracted DNA from gaskets by different methods

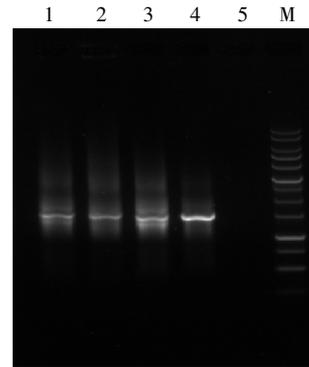
提取方法	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	DNA 浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
SDS-CTAB 法	1.74	1.54	198.0
土壤试剂盒法	1.21	0.33	65.40

2.2 最佳退火温度

利用梯度 PCR 对最佳退火温度进行筛选,由图 1 可知,随着退火温度的逐渐升高,所对应泳道的目的条带逐渐明亮、清晰,当退火温度升高至 53.7 $^{\circ}\text{C}$ 时条带达到最亮。但是若温度继续升高至 55.5 $^{\circ}\text{C}$ 时几乎没有目的条带出现。综合考虑,最佳退火温度设置在 53.7 $^{\circ}\text{C}$ 较为合适。

2.3 最佳循环次数

选择合适的循环次数对扩增结果的影响非常大。理论上,循环次数越多,扩增产率越高。保持其他程序设置不变,在退火温度为 53.7 $^{\circ}\text{C}$ 时进行 20、25、30、35、40、45 次循环。由图 2 可知,由 20 至 25 个循环,

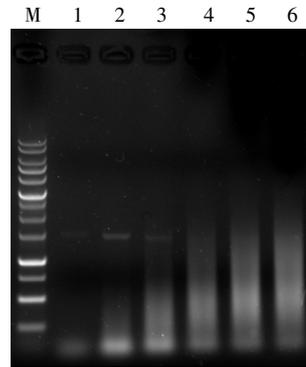


1~5 分别为:48.3 $^{\circ}\text{C}$ 、50.0 $^{\circ}\text{C}$ 、51.8 $^{\circ}\text{C}$ 、53.7 $^{\circ}\text{C}$ 、55.5 $^{\circ}\text{C}$;

M: 1 kb DNA ladder

图 1 不同退火温度对 PCR 效果的影响

Figure 1 Effect of different annealing temperatures on PCR products



1~6 分别为:20、25、30、35、40、45 个循环;M: 1 kb DNA ladder

图 2 不同循环次数对 PCR 效果的影响

Figure 2 Effect of different cycle times on PCR products

扩增产物的量逐渐升高,但循环次数过高则扩增效果并不理想。当循环次数达到 30 个循环时,扩增的量开始降低,当再逐渐升高时,几乎看不到单一条带。由此可知,在该退火温度下的最佳循环次数为 25 个。

2.4 最佳引物浓度

在最佳退火温度和最佳循环次数下,对最佳引物浓度进行了筛选,具体引物浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;由图 3 可知,在 PCR 反应过程中并不是引物的浓度越高越好,随着引物浓度的增加,PCR 产物的扩增量并没有增加,当达到 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,扩增量反而降低。所以在 PCR 反应体系中,引物浓度过高不仅造成试剂的浪费,而且会干扰 PCR 过程。由此可知,最佳引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

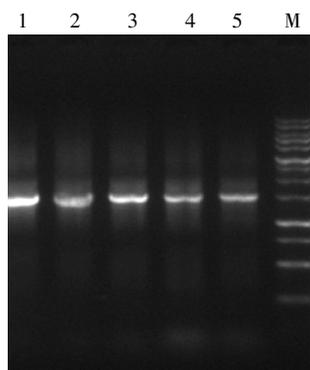
2.5 最佳 dNTP 浓度

已有研究表明,在 PCR 扩增中,过高的 dNTP 浓度可能导致碱基错配而出现非特异性扩增,过低浓度

又可能会因过早地消耗而使产物单链化或产物量不足^[10]。由图 4 可知,当 dNTP 浓度为 0.1~0.3 mmol·L⁻¹ 时,扩增出的谱带较为一致,其中以 0.2 mmol·L⁻¹ 浓度扩增量最多;当 dNTP 的浓度等于或高于 0.4 mmol·L⁻¹ 时,看不出单一的条带。由此可知,该反应体系中 dNTP 的最佳用量为 0.2 mmol·L⁻¹。

2.6 最佳 DNA 模板浓度

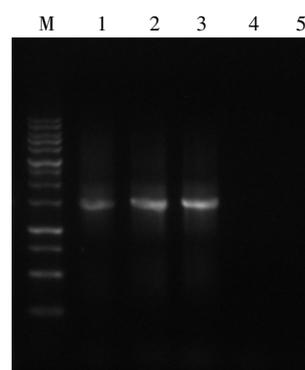
一般来说,DNA 模板的适宜用量有一个较大的范围,在此范围内随着 DNA 量的增加条带更加清晰,但 DNA 模板浓度并不是越高越好,DNA 浓度过高反而增加退火时引物结合的难度,造成 PCR 扩增产量降低。由图 5 可知,随着 DNA 模板浓度由 20~50 ng 的升高,PCR 扩增量也逐渐增多,但当 DNA 模板浓度大于 50 ng 时,PCR 扩增条带开始变弱,因此,本反应体系的最佳 DNA 模板浓度为 50 ng。



1~5 分别为:0.2 μmol·L⁻¹、0.4 μmol·L⁻¹、0.6 μmol·L⁻¹、0.8 μmol·L⁻¹、1.0 μmol·L⁻¹; M: 1 kb DNA ladder

图 3 不同引物浓度对 PCR 效果的影响

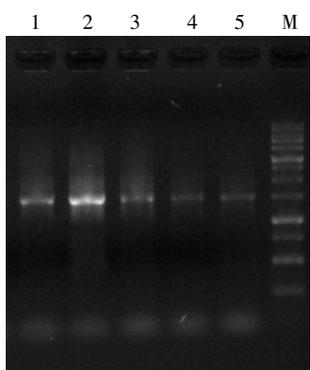
Figure 3 Effect of different primer concentration on PCR products



1~5 分别为:0.1 mmol·L⁻¹、0.2 mmol·L⁻¹、0.3 mmol·L⁻¹、0.4 mmol·L⁻¹、0.5 mmol·L⁻¹; M: 1 kb DNA ladder

图 4 不同 dNTPs 浓度对 PCR 效果的影响

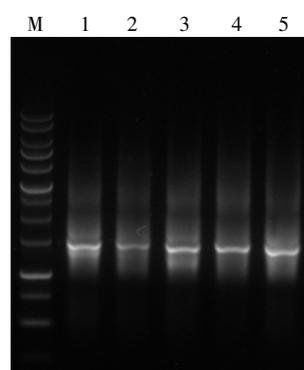
Figure 4 Effect of different dNTPs concentration on PCR products



1~5 分别为:60 ng、50 ng、40 ng、30 ng、20 ng; M: 1 kb DNA ladder

图 5 不同 DNA 模板浓度对 PCR 效果的影响

Figure 5 Effect of different DNA template concentration on PCR products



1~5 分别为:0.5 U、0.75 U、1.0 U、1.5 U、2 U; M: 1 kb DNA ladder

图 6 不同 Taq DNA 聚合酶浓度对 PCR 效果的影响

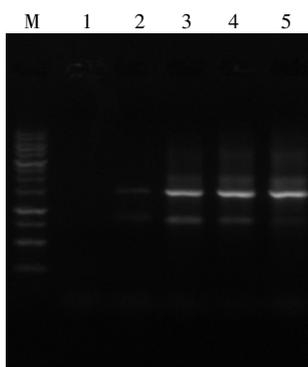
Figure 6 Effect of different Taq DNA polymerase concentration on PCR products

2.7 最佳 Taq DNA 聚合酶浓度

Taq DNA 聚合酶的种类及其浓度是影响 PCR 扩增的关键因素。过高浓度的 Taq 酶不仅会造成不必要的浪费,且使得非特异性扩增产物的几率增大,过低的浓度则会降低合成效率。由图 6 可知,0.5~2.0 U TaqDNA 聚合酶的 5 个泳道均有扩增产物,而且没有太大的差异,因此,结合经济角度和实际观测结果,可确定 0.5 U 为本实验中 Taq DNA 聚合酶的最佳浓度。

2.8 最佳 Mg²⁺浓度

影响 PCR 反应结果的一个重要因素是 MgCl₂ 浓度,它不仅影响引物与模板的结合效率和引物二聚体的形成,还影响 Taq DNA 聚合酶的活性,Mg²⁺浓度对 PCR 扩增的特异性和效率影响很大,通常认为 Mg²⁺的适宜浓度范围在 1.5~2.5 mmol·L⁻¹ 之间^[4,11]。由图 7 可知,Mg²⁺浓度在 1.0~3.0 mmol·L⁻¹ 范围内,除了



1~5 分别为: $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; M: 1 kb DNA ladder

图 7 不同 Mg^{2+} 浓度对 PCR 效果的影响

Figure 7 Effect of different Mg^{2+} concentration on PCR products

$1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 浓度没有扩增条带之外, 其他浓度条件下均有扩增产物, 综合考虑, 该反应条件下的最佳 Mg^{2+} 浓度为 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

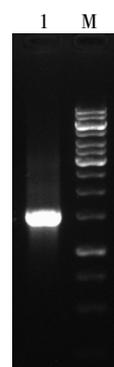
2.9 发酵床垫料中微生物 16S rDNA 的最佳反应体系和反应程序

综上所述, 以发酵床垫料中微生物总 DNA 为模板, 扩增 16S rDNA 反应体系中 5 个因素的最佳浓度为: 总体积为 $25 \mu\text{L}$ 的反应体系包括 MgCl_2 、dNTP 和引物的浓度分别为 2.0 、 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 以及 0.5 U Taq DNA 聚合酶和 50 ng DNA 模板。最适反应程序为先在 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 进行 4 min 预变性; 随后以 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 45 s , $53.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s 为单个循环步骤, 循环扩增 25 次; 最后在 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 下延伸扩增 10 min 。最佳反应体系和反应程序的 PCR 效果见图 8。

3 讨论

基于传统微生物分析方法的制约, Olsen 等^[12]在 1986 年提出运用核糖体 RNA 技术来研究微生物多样性, 从此进入了以分子生物学、生物标记等技术为基础的现代微生物分析时代。在成分复杂的发酵床垫料中含有大量的多糖、多酚、单宁、色素以及腐植酸, 在微生物 DNA 提取过程中, 这些物质的存在会严重影响 DNA 的质量和纯度, 能否有效地去除这些物质关系到整个 DNA 提取过程的成败^[2]。

在以微生物基因组 DNA 为模板, 扩增 16S rDNA 的过程中, 模板 DNA 的质量是决定 PCR 成败与否的关键之一。若模板量太少, 则引物与模板不能有效配对, 扩增效率低下; 而若模板量太高, 在退火过程中由于模板密集导致引物难以找到结合位点, 从而 PCR



1: PCR product; M: 1 kb DNA ladder

图 8 最佳反应体系和反应程序的 PCR 效果

Figure 8 PCR result of the optimum PCR reaction system and procedure

产量过低。引物是得到优质的特异性强 PCR 产物的关键。引物浓度偏高会发生错配和非特异性扩增, 影响靶序列的 PCR 产量和质量, 而且过多引物形成二聚体造成资源浪费; 浓度偏低会导致引物与模板结合效率低, 靶序列 PCR 产物量减少。Taq DNA 聚合酶在 PCR 反应中起到非常关键的作用, 但以适量为止, 过多添加 Taq DNA 聚合酶不仅造成药品的浪费, 而且会产生非特异性扩增, 导致靶序列 PCR 产物产量和质量的下降; 低浓度 Taq DNA 聚合酶会影响合成效率, 导致靶序列 PCR 扩增产物减少。退火温度是 PCR 反应过程中最关键的环节, 受不同靶 DNA 序列 GC 含量的不同, 导致它们 PCR 扩增的退火温度差异较大。通常 GC 含量越高为了有效解链, 需要越高的退火温度。由于循环次数的增加会导致非特异性产物的增加, 所以确定其他反应参数之后进行优化是比较合理的, 以更好地提高靶序列 PCR 产物的质量^[4, 13]。

4 结论

为了更好地研究复杂多变的发酵床垫料中微生物的多样性, 本文对发酵床垫料中微生物总 DNA 的提取方法进行了探索, 同时建立与优化了微生物 16S rDNA PCR 反应条件, 为揭示发酵床垫料中微生物群落的多样性及其动态变化规律奠定了理论基础。

PCR 反应过程中各参数是相互依存的, 退火时, 引物与模板 DNA 结合, 在 Taq DNA 聚合酶和 dNTP 存在下进行延伸, Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂。本文从 PCR 反应的稳定性和经济性因素的角度考虑, 确定了发酵床垫料中微生物 16S rDNA PCR 扩增的最佳反应体系和条件, $25 \mu\text{L}$ 的最佳反应体系为: $10 \times \text{PCR}$

buffer 2.5 μL 、 MgCl_2 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、dNTP 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、引物 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Taq DNA 聚合酶 0.5 U、DNA 模板 50 ng;最佳反应程序为:在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 4 min 预变性;随后循环扩增 25 个循环(包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,53.7 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s);最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min。

参考文献:

- [1] 王迪. 猪用生物发酵床垫料中微生物群落多样性变化及芽孢杆菌分离与鉴定[D]. 武汉:华中农业大学, 2012: 12-13.
WANG Di. The change of microbial community diversity in deep-litter system and the isolation and identification of *Bacillus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012: 12-13. (in Chinese)
- [2] 刘云浩, 蓝江林, 刘波, 等. 微生物发酵床垫料微生物总 DNA 提取方法的研究[J]. 福建农业学报, 2011, 26(2): 153-158.
LIU Yun-hao, LAN Jiang-lin, LIU Bo, et al. Extraction methods for bedding microbial DNA from fermentation bed[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 26(2): 153-158. (in Chinese)
- [3] 张邑帆, 卢茵, 黄微, 等. 发酵床垫料复合菌剂优化组合的研究[J]. 现代畜牧兽医, 2012(2): 51-54.
ZHANG Yi-fan, LU Yin, HUANG Wei, et al. Optimized combination of different microorganisms of fermentation mattress[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012(2): 51-54. (in Chinese)
- [4] 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, 14064.
DI Ning, LIU Zhi-min, MA Huan-pu. Optimization of PCR condition in soil microbial diversity study[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(23): 14059-14061, 14064. (in Chinese)
- [5] 毕泗伟, 吴祖芳, 虞耀土. 16S rDNA 基因文库技术分析发酵床细菌群落的多样性[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2013, 26(1): 18-22.
BI Si-wei, WU Zu-fang, YU Yao-tu. The bacteria diversity of fermentation bed in pig-farming by 16S rDNA gene clone library analysis[J]. *Journal of Ningbo University: NSEE*, 2013, 26(1): 18-22. (in Chinese)
- [6] Porteous L A, Armstrong J L. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method[J]. *Curr Microbiol*, 1991, 22: 345-348.
- [7] Ogram A, Saylor G S, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, 7(2-3): 57-66.
- [8] Verma D, Satyanarayana T. An improved protocol for DNA extraction from alkaline soil and sediment samples for constructing metagenomic libraries[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(2): 454-464.
- [9] Yang Zh H, Xiao Y, Zeng G M, et al. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(4): 918-925.
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(第 2 版)[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 458-463.
LU Sheng-dong. Current protocols for molecular biology (2nd edition) [M]. Beijing: China Medical University Publishing House, 1999: 458-463. (in Chinese)
- [11] 郭凌飞, 邹明宏, 曾辉, 等. 澳洲坚果 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学, 2008, 44(5): 160-164.
GUO Ling-fei, ZOU Ming-hong, ZENG Hui, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system in macadamia[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2008, 44(5): 160-164. (in Chinese)
- [12] Olsen G J, Lane D J, Giovannoni S J, et al. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach[J]. *Ann Rev Microbiol*, 1986, 40: 337-365.
- [13] 黄夕洋, 唐辉, 孔德鑫, 等. 广西甜茶 ISSR-PCR 反应条件的建立与优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 526-532.
HUANG Xi-yang, TANG Hui, KONG De-xin, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions in *Rubus suavis* S. Lee[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(4): 526-532. (in Chinese)