

用于分子生态学的堆肥 DNA 提取方法

杨朝晖, 肖勇, 曾光明, 刘云国, 邓久华

(湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082)

摘要: 分子生态学为堆肥微生物的研究提供了新的技术手段, DNA 的提取是该技术的基础, 但由于腐殖酸类物质的污染, 增加了堆肥微生物总 DNA 的提取难度. 采用了 3 种不同的方法(溶菌酶法、超声波破碎法和蛋白酶 K-CTAB 法)从堆肥中提取微生物的总 DNA, 使用核酸和蛋白质分析仪检测后表明 3 种提取方法获得的 DNA 产量均较高; 琼脂糖凝胶电泳结果表明其长度约为 23 kb; 使用细菌 16S rRNA 基因通用引物(27F 和 1495R)对总 DNA 进行 PCR 扩增, 都获得了几乎全长的 16S rDNA 序列(约 1.5 kb); 利用限制性内切酶(*Hae* III 和 *Alu* I)对纯化后的 PCR 产物进行 RFLP 分析, 结果表明 3 种方法提取的 DNA 反映了比较一致的微生物多样性. 虽然 3 种方法各有优缺点, 但其提取的 DNA 都可以用于堆肥微生物的分子生态学研究, 可以根据实际需要选用某一种方法用于提取堆肥总 DNA.

关键词: 堆肥; 分子生态学; 16S rRNA; DNA 提取; RFLP

中图分类号: X172; Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)08-1613-05

DNA Extraction Methods of Compost for Molecular Ecology Analysis

YANG Zhao-hui, XIAO Yong, ZENG Guang-ming, LIU Yun-guo, DENG Jiuhua

(College of Environmental Science & Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: Molecular ecology provides new techniques for studying compost microbes, and the DNA extraction is the basis of molecular techniques. Because of the contamination of humic acids, it turns to be more difficult for compost microbial DNA extraction. Three different approaches, named as lysozyme lysis, ultrasonic lysis and proteinase K lysis with CTAB, were used to extract the total DNA from compost. The detection performed on a nucleic acids and protein analyzer showed that all the three approaches produced high DNA yields. The agarose gel electrophoresis showed that the DNA fragments extracted from compost had a length of about 23 kb. A eubacterial 16S rRNA gene targeted primer pair (27F and 1495R) was used for PCR amplification, and all the samples got almost the full length 16S rDNA sequence (about 1.5 kb). After digested by restriction endonucleases (*Hae* III and *Alu* I), the restriction map showed relatively identical microbial diversity in the DNA, which was extracted by the three different approaches. All the compost microbial DNA extracted by the three different approaches could be used for molecular ecological study, and researchers should choose the right approach for extracting microbial DNA from compost based on the facts.

Key words: compost; molecular ecology; 16S rRNA; DNA extraction; RFLP

分子生态学是应用分子生物学方法研究生态学和种群生物学的一门新学科^[1], 利用分子生态学技术, 研究者可以对环境中绝大多数无法进行培养研究^[2~4]且处于动态变化的微生物群落进行研究^[5], 目前已有研究者将分子生态学技术引入堆肥微生物生态研究^[6~9], 以期能充分认识堆肥的微生物学原理, 从而为改进工艺、提高效率提供依据.

DNA 的提取是分子生态学研究的基础工作^[10], 所提取的 DNA 质量直接影响到研究结果的可信度. 堆肥中微生物种类繁多, 而且混杂有大量腐殖酸等污染物, 因此, 在堆肥 DNA 提取中有效裂解微生物细胞和尽量减少腐殖酸类物质的污染从而获得高产量和高质量的 DNA 是堆肥微生物分子生态学研究的基础工作. 目前仅有国外研究者在堆肥 DNA 提取方面有少量的研究^[11, 12], 国内尚无这方面的研究报道. 本文针对堆肥中微生物种类繁多且

含有大量腐殖酸类物质的特点, 在对堆肥样品进行洗涤后, 设计和改进了 3 种不同的方法裂解细胞, 并从细胞裂解效率、提取速度、DNA 产量和腐殖酸含量以及 PCR 可扩增性与 PCR 扩增产物的 RFLP 等多方面对 3 种方法进行了比较研究, 目的是建立起一套适合堆肥微生物分子生态学研究的 DNA 提取方法体系.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品来源

堆肥取自一个 20 L 的实验室规模的堆肥装置,

收稿日期: 2005-09-01; 修订日期: 2005-11-03

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2004AA649370); 国家自然科学基金项目(50478053); 湖南省自然科学基金项目(04JJ3004)

作者简介: 杨朝晖(1963~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: yzh@hnu.cn

堆肥材料主要为 10 kg 菜市场剩余,并添加了 5 kg 菜园土壤,采样点为堆肥表面以下 3 cm,样品时间为 16 d,温度为 22 ℃(已达到了最高温度 46 ℃),pH 为 6.8,含水率为(43.4±0.5)%,有机质含量为(1.62±0.3)%。其中,pH 用玻璃电极法测定,含水率在 105 ℃下烘烤至恒重测定,有机质含量根据重铬酸钾法测定。

1.1.2 样品的初处理

在提取 DNA 之前,对所有样品都进行了洗涤,以减少胞外 DNA 和可溶性有机物尤其是腐殖酸类物质的污染。将 1.0 g 样品加入到 4 mL 120 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH8.0)中,150 r/min 匀速震荡 15 min,然后以 4 700 r/min 离心 10 min;沉淀再次洗涤后用于后续实验。

1.2 研究方法

1.2.1 总 DNA 的提取

针对堆肥中污染杂质较多的特点,通过设计和改进得到了 3 种不同的堆肥总 DNA 提取方法。

方案 1 为溶菌酶法。取洗涤过的堆肥样品悬浮在 1.5 mL 的溶菌酶溶液中(0.15 mol/L NaCl,0.1 mol/L Na₂EDTA,10 mg/mL 溶菌酶,pH 8.0)。混合物 37 ℃下 225 r/min 振荡 1 h,然后加入 0.5 mL 裂解缓冲液(10% SDS,0.1 mol/L NaCl,0.5 mol/L Tris-HCl,pH 8.0),0.5 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L,pH 8.0),0.5 mL 氯仿-异戊醇(24:1)。离心管置漩涡混合器上 2 800 r/min 振荡 10 min;裂解液以 4 700 r/min 离心 3 min,上清转入另一离心管;原管加入 0.5 mL 去离子水重新离心 10 s;2 次离心的上清混合,13 000 r/min 离心 5 min,收集水相留用;水相加入 0.6 倍体积异丙醇沉淀 1 h,然后 15 000 r/min 离心 10 min;沉淀以 70% 冰预冷的乙醇重复洗涤后风干,加入 600 μL TE 缓冲液溶解 DNA,取 100 μL 作 DNA 浓度测定或其他分析,其余的贮存于-20 ℃。

方案 2 为超声波破碎法。在 50 mL 离心管中加入 10 mL 异丙醇,然后加入洗涤过的堆肥样品,混匀后用 Model450 超声波破碎仪(Branson, USA)破碎 10 min(破碎 5.4 s,停 2.6 s,振幅 40%);破碎后的堆肥样品以 13 000 r/min 离心 5 min,沉淀转入 5 mL 离心管,并加入 0.5 mL 裂解缓冲液(10% SDS,0.1 mol/L NaCl,0.5 mol/L Tris-HCl,pH8.0),0.5 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L,pH8.0),0.5 mL 氯仿-异戊醇(24:1);离心管中加入 1.0 g 玻璃珠(0.2 mm),以 2 800 r/min 漩涡振荡 10 min;后续步骤与

方案 1 相同。

方案 3 为蛋白酶 K-CTAB 法。这是一种常用的 DNA 提取方法^[13,14],本文将其进行了一些改进。洗涤过的堆肥样品与 1.5 mL DNA 提取液(0.1 mol/L Tris-HCl,0.1 mol/L EDTA,0.1 mol/L Na₃PO₄,1.5 mol/L NaCl,1% CTAB,pH8.0)混合,再加入 10 μL 蛋白酶 K(10 mg/mL);225 r/min 摇床上 37 ℃摇动 20 min;加入 200 μL 10% SDS,65 ℃水浴 1.5 h,每隔 15~20 min 轻轻颠倒几下。室温 4 700 r/min 离心 5 min;上清转移到新 5.0 mL 离心管中。沉淀再加入 0.5 mL 提取液和 50 μL 10% SDS;以 2 800 r/min 涡旋振荡 10 s,65 ℃水浴 10 min;室温 4 700 r/min 离心 5 min,收集上清合并于上次上清。重复上述操作,3 次上清合并。上清中加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),轻微颠倒混合;室温 4 700 r/min 离心 5 min;吸取水相转移至新的 5.0 mL 离心管中,水相加入 0.6 倍体积异丙醇沉淀 1 h,然后 15 000 r/min 离心 10 min;沉淀以 70% 冰预冷的乙醇重复洗涤后风干,加入 600 μL TE 缓冲液溶解 DNA,取 100 μL 作 DNA 浓度测定或其他分析,其余的贮存于-20 ℃。

1.2.2 DNA 的纯化

在粗提 DNA 溶液中加入 0.5 倍体积的质量浓度为 50% 的 PEG8000 和 0.1 倍体积的 5 mol/L 的 NaCl 溶液,轻微颠倒将液体混合,在 4 ℃下保存过夜。使用 CB2 离心吸附柱(天为时代,北京)将混合液离心,在吸附柱中加入 0.7 mL 混合液,4 ℃下 13 000 r/min 离心 1 min,弃去收集管中液体;重复多次直至粗提 DNA 溶液全部离心完毕;吸附柱以冰预冷的 70% 乙醇 0.7 mL 洗涤,在 4 ℃下 13 000 r/min 离心 1 min;弃收集管中废液,70% 乙醇重复洗涤;吸附柱风干后,更换新收集管,用 200 μL 加入了核糖核酸酶 A(RNaseA,终浓度 0.5 mg/mL)的 TE 缓冲液将吸附柱上的 DNA 洗脱至收集管,37 ℃恒温消化 2 h 后于 4 ℃保存。

1.2.3 完整细胞的显微计数

采用 Moré 等^[15]的方法,未经细胞裂解的堆肥样品和经细胞裂解的样品用 0.01% 吖啶橙(AO)染色后,使用 Axiolab 荧光/相差显微镜(Zeiss, Germany)进行观察和计数。使用革兰氏染色判定细菌的革兰氏阳性或阴性。

1.2.4 DNA 和腐殖酸浓度的测定

DNA 浓度使用 DU[®]640 核酸和蛋白质分析仪(Beckman Coulter, USA)直接测定;DNA 的

A_{260}/A_{280} 值可以作为评价 DNA 纯度的一个指标, 使用 DU[®]640 核酸和蛋白质分析仪测定。

腐殖酸的吸收波长为 340 nm, 使用一系列浓度 (0.1 ~ 100 ng/μL) 的腐殖酸混合物 (Aldrich Chemical, USA) 作标准曲线, 通过加入 10 ng/μL DNA (Molecular Probes, USA) 和 2 μg/μL 牛血清白蛋白 (Amresco, USA) 以检查 DNA 和蛋白质对腐殖酸浓度测定的影响, 使用紫外分光光度计在 340 nm 波长处测定各个样品的吸光度。

1.2.5 PCR 扩增

选择细菌 16S rDNA 扩增通用引物对 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1495R (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3') 作为 PCR 扩增的引物, 该引物对分别对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 的 8~27 位碱基和 1495~1514 位碱基, 从而可以扩增出近乎全长的细菌 16S rDNA 序列, 约为 1507 bp。50 μL 的 PCR 反应体系为: 1 μL 已纯化 DNA, 5 μL dNTP 混合溶液 (终浓度为 1 pmol/μL), 引物各 1 μL, 10× Buffer 5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (Promega, USA) 0.5 μL, 加无菌去离子水补足 50 μL。扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 接下来是 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 停止于 4 °C。

1.2.6 PCR 产物的限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析

PCR 产物使用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) 进行纯化后, 用限制性内切酶 *Alu* I (识别序列 AG▼CT) 和 *Hae* III (识别序列 GG▼CC) 在 37 °C 下酶切 4 h; 酶切体系为 PCR 产物 12 μL, BSA 溶液 0.2 μL, 10× Buffer 2 μL, 限制性内切酶 3 U, 加无菌去离子水补足 20 μL; 取 10 μL 酶切产物用 3% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.2.7 DNA 回收

9 个 1 g 的堆肥样品灭菌后分为 3 组, 加入脱氧核糖核酸酶 (DNase I,) 和核糖核酸酶 (RNaseA), 37 °C 放置 24 h 后再次灭菌, 然后使用磷酸盐缓冲液 (120 mmol/L, pH8.0) 洗涤后每个样品中加入 20 μg 纯 DNA (生工, 上海), 然后分别按照 3 种方案进行 DNA 提取和纯化, DNA 浓度和纯度使用 DU[®]640 核酸和蛋白质分析仪 (Beckman Coulter, USA) 测定。

2 结果与讨论

2.1 细胞裂解效率和 DNA 提取效率

完整细胞的显微计数能够评价各种方法对微生

物细胞的裂解效率。显微计数的结果 (见表 1) 表明, 蛋白酶 K-CTAB 法对细胞裂解效果最好, 溶菌酶法次之, 超声波破碎法最差, 该结果的出现可能是由于长时间的水浴使蛋白酶 K 对细胞壁产生了较大的作用, 而超声波的简单破碎效果则不如溶菌酶, 从而使得超声波破碎法的裂解效率不如溶菌酶法。

使用荧光/相差显微镜对细菌进行显微观察的结果表明, 样品经裂解后, 大部分完整的细胞是圆形, 且个体较小; 革兰氏染色观察的结果表明, 完整细胞中既有革兰氏阳性细菌, 也有革兰氏阴性细菌。以上显微观察结果表明, 3 种细胞裂解方法对细菌细胞壁结构都没有明显的选择性, 影响细胞裂解效率的主要因素是细菌的细胞形态, 尤其是细胞的大小和形状。

表 1 完整细胞的显微计数¹⁾

Table 1 Microscopic counts of intact cells

方案	裂解前/×10 ⁹ 个	裂解后/×10 ⁹ 个	裂解效率/%
P1	8.26 ± 0.85	0.49 ± 0.27	94.1 ± 0.68
P2	8.73 ± 0.91	0.87 ± 0.31	90.0 ± 0.66
P3	8.60 ± 0.93	0.32 ± 0.15	96.3 ± 0.84

1) P1 代表溶菌酶法, P2 代表超声波法, P3 代表蛋白酶 K-CTAB 法, 下同

在溶菌酶法中, 通过一系列的实验验证后, 选择在溶菌酶浓度为 10 mg/mL 时以 225 r/min 振荡 1 h, 与 Howeler 等^[11]使用的 15 mg/mL 溶菌酶温浴 1 h 不同, 因为振荡促进了酶与细胞之间作用, 既最大限度地使酶发挥了作用, 又可以减少酶的用量。超声波的简单破碎对细胞的裂解效果有限, 因此在超声波破碎方法中, 加入了玻璃珠进行涡旋振荡, 以此增强裂解效果。与常用的蛋白酶 K-CTAB 法不同, 经实验证明, 缩短 65 °C 水浴时间至 1.5 h, 10% SDS 的作用与 20% SDS 相同, 从而既缩短实验周期, 又减小了 SDS 对腐殖酸去除的影响^[15]。

总 DNA 片段大小、DNA 回收率和 DNA 产量与纯度是评价 DNA 提取方法好坏的几个重要指标。灭菌的样品使用 DNase I 和 RNaseA 处理后, 可以去除死亡细胞释放的 DNA 和 RNA, 再次灭菌后可去除 DNase I 和 RNaseA, 然后加入纯 DNA 作为对照, 使用同样的方案提取 DNA 并计算其回收率, 可以评价 DNA 提取方法的提取效率并判断细胞裂解过程是否会对已释放的 DNA 片段产生的剪切作用。DNA 回收实验表明, 3 种方法的 DNA 总回收率都达到了 93% 以上 (见表 2); 其中蛋白酶 K-CTAB 法的回收率最高, 可能与该方案中的重复洗涤沉淀

回收 DNA 有关;回收的 DNA 在使用琼脂糖电泳分离后染色并检测,结果表明 3 种方法都没有对 DNA

片段产生大的剪切作用.
2.2 不同方法得到的粗提 DNA

表 2 3 种方法的 DNA 和腐殖酸产量以及 DNA 回收效率
Table 2 DNA and humic acids yields and DNA recovery efficiencies of the three protocols

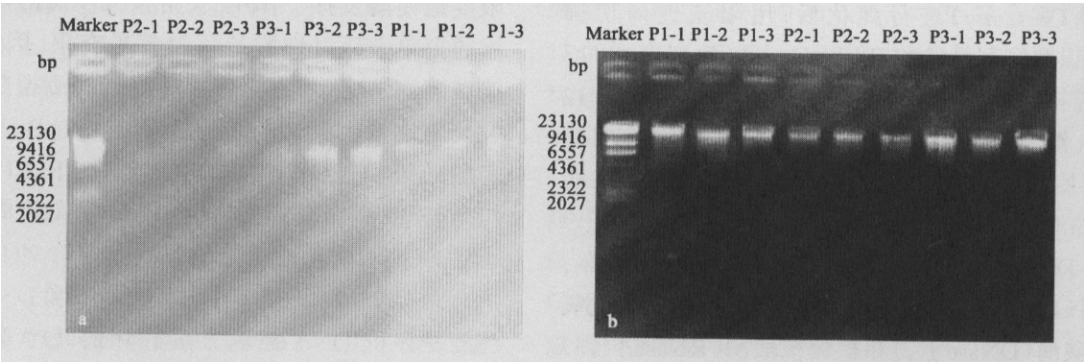
方案	粗提 DNA / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	粗提 DNA 中 腐殖酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	纯化 DNA / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	纯化 DNA 中 腐殖酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	粗提回收的 对照 DNA/ μg	纯化回收的 对照 DNA/ μg	总回收率 / %
P1	62 ± 3.6	29 ± 2.5	53 ± 1.5	1.5 ± 0.2	19.2 ± 0.5	18.8 ± 0.3	94.0 ± 1.5
P2	55 ± 2.9	36 ± 2.8	48 ± 1.8	1.8 ± 0.3	19.0 ± 0.3	18.6 ± 0.3	93.0 ± 1.5
P3	83 ± 4.1	30 ± 3.5	69 ± 2.6	1.6 ± 0.3	19.5 ± 0.5	18.9 ± 0.4	94.5 ± 2.0

使用 Gel Doc2000 凝胶成像系统 (BioRad, USA) 对经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离且以溴化乙锭染色的粗提总 DNA 进行检测,结果见图 1a. 凝胶电泳检测结果表明,3 种方法都得到了主要片段长度约为 23 kb 的堆肥微生物总 DNA,可以作为 PCR 扩增 16S rDNA 序列的模板. 由于粗提 DNA 产量主要与细胞裂解效率有关,因此蛋白酶 K-CTAB 法的产量最高,从每 g 湿堆肥的粗提到的 DNA 达到了(83 ± 4.1) μg ,溶菌酶法的 DNA 产量略高于超声波破碎法,具体数据见表 2. 但是腐殖酸的产量似乎与细胞裂解无关,因为蛋白酶 K-CTAB 法与溶菌酶法的腐殖酸产量很接近,比超声波破碎法的稍低(见表 2),可能是由于 2 种方法中离子浓度相对较高,减少了腐殖酸的污染^[16].

2.3 DNA 的纯化

粗提的 DNA 溶液中含有较多腐殖酸等酶抑制剂,对于后续的 PCR 扩增和限制性酶切不利;同时,

粗提得到的 DNA 浓度过低,因此粗提 DNA 必须经过纯化才能用于下一步的分子生态学研究. 为了去除腐殖酸等酶抑制剂,使用了对于腐殖酸有很好去除效果的 PEG8000^[17] 作为 DNA 沉淀剂;为了进一步去除腐殖酸和回收 DNA,还使用了能特异性吸附 DNA 的离心柱,在离心过程中 DNA 吸附于柱体上,乙醇洗涤后用 TE 缓冲液离心洗脱 DNA. 纯化后的 DNA 浓度和腐殖酸浓度测定结果表明,该纯化方法不仅有较高的纯化效率(均达到了 80% 以上),而且去除了绝大部分的腐殖酸(见表 2). 使用核酸浓度分析仪对纯化的 DNA 检测,结果表明样品的 A_{260}/A_{280} 值均为 1.7~1.8,说明 RNaseA 对去除 RNA 有很好的作用, DNA 纯度较高. 纯化后的 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明其条带单一,没有拖尾现象,浓度升高(见图 1b);直接用于 PCR 扩增,得到了特异性比较好的 PCR 产物(见图 2).



P1-1 代表溶菌酶法提取的第一个 DNA 样品,其他类推

图 1 不同方法得到的粗提的 DNA(a) 和纯化的 DNA(b)

Fig. 1 Crude DNA (a) and purified DNA (b) extracted by different approaches

2.4 RFLP 分析

由于 PCR 扩增使用的是细菌 16S rDNA 通用引物对,且 PCR 扩增的灵敏度较高,因此,PCR 技术能扩增出大部分细菌的 16S rDNA 序列,对其进行 RFLP 分析,能检测模板 DNA 中的遗传多样性^[12]. PCR 扩增产物经试剂盒纯化后,使用 1% 琼

脂糖凝胶电泳检测,结果表明条带单一,可供 RFLP 分析使用. 从 RFLP 图谱(见图 3)可以发现,以 3 种方法所提取的 DNA 作为模板得到的 PCR 扩增产物,得到了一致的酶切图谱,说明虽然 3 种方法所得到的 DNA 产量和质量不同,但是 DNA 中的遗传多样性是比较一致的.



图 2 纯化 DNA 的 PCR 产物

Fig. 2 PCR products of the purified DNA

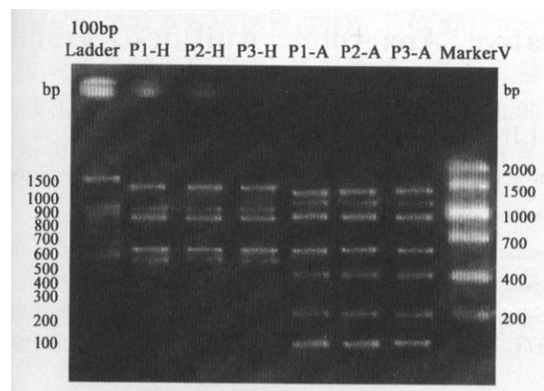
分子量标准的上样量为 6 μ L, 酶切产物的上样量为 10 μ L;H 代表经 *Hae* III 酶切, A 代表经 *Alu* I 酶切.

图 3 PCR 产物的限制性内切酶酶切图谱

Fig. 3 Restriction map of PCR products

3 结论

(1) 针对堆肥中腐殖酸类物质含量高的特点, 使用磷酸盐缓冲液对堆肥样品进行了洗涤, 并且首次使用了 1 种新的 DNA 纯化方法, 即首先使用对腐殖酸类物质有很好去除效果的 DNA 沉淀剂 PEG8000 代替以往惯用的异丙醇沉淀 DNA, 再使用能特异性吸附 DNA 的离心柱回收 DNA, 取得了 95% 以上的腐殖酸去除率和 83% 以上的纯化效率.

(2) 通过从细胞裂解效率、DNA 产量、腐殖酸类物质的产量和 DNA 回收效率以及 PCR 可扩增性和遗传多样性等多方面对 3 种 DNA 提取方法进行比较研究, 结果表明蛋白酶 K-CTAB 法取得了最高的细胞裂解效率、DNA 产量和 DNA 回收效率, 溶菌酶法和超声波破碎法也得到了较高的细胞裂解效率、DNA 产量和 DNA 回收效率, 并且操作更简单, 实验周期更短; 3 种方法得到的 DNA 中腐殖酸类物质含量都很低, 粗提 DNA 经纯化后都可以直接用于 PCR 扩增, 且有近似的遗传多样性.

参考文献:

- [1] Burke T, Seidler R, Smith H. Editorial [J]. *Mol. Ecol.*, 1992, **1**: 1.
- [2] Ward D M, Bateson M M, Weller R, *et al.* Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature[J]. *Adv. Microb. Ecol.*, 1992, **12**: 219~ 286.
- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Micobiol. Rev.*, 1995, **59**: 143~ 169.
- [4] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. *Cur. Opin. Microbiol.*, 2002, **5**: 240~ 245.
- [5] Ishii K, Fukui M, Takii S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis[J]. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, **89**: 768~ 777.
- [6] Patrick D S, Anthony G H, David B W, *et al.* Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes[J]. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 2005, **66**: 457~ 463.
- [7] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, *et al.* Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 930~ 936.
- [8] Dees P M, Ghiorse W C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA[J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, **35**: 207~ 216.
- [9] Cahyani V R, Matsuya K, Asakawa S, *et al.* Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis[J]. *Biol. Fertil. Soils*, 2004, **40**: 334~ 344.
- [10] Bürgmann H, Pesaro M, Widmer F, *et al.* A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil[J]. *J. Microbiol. Methods*, 2001, **45**: 7~ 20.
- [11] Howeler M, Ghiorse W C, Walker L P. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost [J]. *J. Microbiol. Methods*, 2003, **54**: 37~ 45.
- [12] LaMontagne M G, Michel F C Jr, Holden P A, *et al.* Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis[J]. *J. Microbiol. Methods*, 2002, **49**: 255~ 264.
- [13] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 316~ 322.
- [14] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化[J]. *微生物学报*, 2003, **43**(2): 276~ 282.
- [15] Moré M I, Herrick J B, Silva M C, *et al.* Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment[J]. *Appl Environ. Microbiol.*, 1994, **60**: 1572~ 1580.
- [16] Blanc M, Marilley L, Beffa T, *et al.* Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods[J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, **28**: 141~ 149.
- [17] Purdy K J, Embley T M, Takii S, *et al.* Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin column method[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 3905~ 3907.