

## 免培养法对大鲵肠道微生物多样性的研究

兰阿峰<sup>1,2</sup> 杨曼<sup>1</sup> 郭素芬<sup>1</sup> 丁小维<sup>1,2</sup> 邓百万<sup>1,2\*</sup> 顾东升<sup>3</sup>

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院 陕西 汉中 723001)

(2. 陕西省食药菌工程研究中心 陕西 汉中 723001)

(3. 陕西省勉县第一中学 陕西 勉县 724200)

**摘要:**【目的】了解大鲵肠道内生细菌的组成及多样性。【方法】采用美国 Mo Bio 公司试剂盒提取大鲵肠道内容物总 DNA, 选用细菌通用引物 799F 和 1492R 对总 DNA 进行 16S rRNA 基因特异性扩增, 构建大鲵肠道内容物内生细菌 16S rRNA 基因克隆文库, 对阳性克隆进行限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)分析, 并对 *Hae* III 酶切带谱不同的菌液进行测序, 构建系统发育树。【结果】根据酶切带谱分析和测序结果的不同, 将随机挑取的 101 个阳性克隆归为 28 个不同的可操作分类单元(OTUs), 系统发育分析表明这些克隆序列分别属于变形菌门(Proteobacteria)、梭菌门(Clostridia)、芽孢杆菌门(Bacilli)和衣原体门(Chlamydiae) 4 个门。其中, 变形菌门(Proteobacteria, 占克隆总数的 92.08%)为最优势类群。序列比对结果表明这些克隆序列分别与已报道的 20 个属具有较高的相似性。此外, 还有一个 OTU 在系统发育树上形成独立分支且未能确定其分类。【结论】大鲵肠道内生细菌多样性丰富, 并且可能存在新的分类单元。

**关键词:** 免培养, 大鲵, 肠道微生物, 多样性

## Culture-independent analysis of intestinal microbial diversity from Chinese giant salamander

LAN A-Feng<sup>1,2</sup> YANG Man<sup>1</sup> GUO Su-Fen<sup>1</sup> DING Xiao-Wei<sup>1,2</sup> DENG Bai-Wan<sup>1,2\*</sup>  
GU Dong-Sheng<sup>3</sup>

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

(2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

(3. The First Mianxian Middle School of Shaanxi Province, Mianxian, Shaanxi 724200, China)

**Abstract:** [Objective] The composition and diversity of intestinal microbial diversity of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) were investigated. [Methods] The composition and diversity of intestinal microbial diversity of Chinese giant salamander were analyzed by culture-independent method. The total DNA were extracted by Fecal DNA Isolation Kit of Mo Bio company. The 16S rRNA gene of intestinal microbial diversity of Chinese giant salamander were amplified by universal PCR primers. Positive clones were analyzed by PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and the clones with unique *Hae* III patterns were selected for sequencing and

基金项目: 陕西省科技厅科技统筹创新计划项目(No. 2012HBGC-20); 陕西理工学院人才引进启动项目

\*通讯作者: 2210309868@qq.com

收稿日期: 2013-09-06; 接受日期: 2013-12-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-11

constructing 16S rRNA gene phylogenetic tree. **[Results]** A total of 101 positive clones that randomly screened from the library were fall into 28 operational taxonomic units (OTUs) based on the result of *Hae* III digestion and sequencing. These clone sequences were divided into 4 phyla with phylogenetic analysis, which consisted of the Proteobacteria, Clostridia, Bacilli and Chlamydiae, of which Proteobacteria accounting for 92.08% of the total number of clones was the absolutely dominant group. Sequence alignment showed these clone sequences have high similarities with 20 genus that had been reported. In addition, one OTU on phylogenetic tree is independent and failed to determine its classification. **[Conclusion]** The intestinal microbial diversity of Chinese giant salamander harbors a diversity endophytic bacterial and maybe existence new OTUs.

**Keywords:** Culture-independent, Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*), Intestinal microbial, Biodiversity

中国大鲵(*Andrias davidianus*)俗名“娃娃鱼”,属于两栖纲,有尾目,隐鳃鲵科,是现存个体最大的两栖动物,是我国珍稀名贵特产,属于国家二级保护动物<sup>[1]</sup>。我国大鲵主要分布在长江中上游、珠江中上游及汉水上游深山峡谷的溪流当中<sup>[1-3]</sup>。中国大鲵是肉食性捕食动物,幼体以螃蟹、昆虫等小型水生动物为食;成体以青蛙、鱼、螃蟹等为食<sup>[4-5]</sup>。

动物肠道寄生着大量的微生物,这些微生物与寄主消化吸收及健康状况密切相关。动物肠道是一个相对密闭的系统,其内部生长的微生物大多是一些厌氧或兼性厌氧的微生物<sup>[6-8]</sup>。传统的培养方法分离到的微生物数量很少,有报道称传统方法分离到的微生物物种只有微生物总量的 1%-5%左右,而其余 95%-99%微生物种群还仍然未被分离和识别<sup>[9]</sup>。免培养方法是一种基于分子生物学的方法,与传统的分离鉴定方法完全不同,能够有效解决传统培养方法无法获取微生物的缺点<sup>[10]</sup>。目前利用免培养方法研究微生物多样性的报道较多,其好处在于不需要对微生物进行培养,只要提取其 DNA,设计微生物 16S rRNA 的引物,利用该引物扩增后测序,并进行序列比对,就可以知道微生物的种类及各个物种之间的亲缘关系<sup>[11-12]</sup>。大鲵作为珍稀保护动物,目前对其肠道微生物的研究鲜有报道。本研究利用免培养方法对大鲵的肠道微生物多样性进行研究,以期为大鲵保护工作提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试材料:** 中国大鲵采自陕西省留坝县,样品总数 12 尾,最小样品 1.7 kg,最大样品 2.5 kg,样品平均重量 1.9 kg。将供试动物采集后,带回实验室放入 -70 °C 冷冻保存。

**1.1.2 主要仪器和试剂:** 凝胶扫描成像系统(Gel Doc), 美国 Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机(Centrifuge 5424R), 德国 Eppendorf 公司; PCR 扩增仪(Mycycler), 美国 Bio-Rad 公司; 核酸测定仪(Bio Photometer plus)、移液器系列(Eppendorf), 德国 Eppendorf 公司。Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物快速克隆试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 引物、X-gal、IPTG 等均购自上海生工。

### 1.2 大鲵肠道内生菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建

**1.2.1 材料总 DNA 提取:** 解剖大鲵后将其肠道内容物收集到灭菌的 1.5 mL EP 管中。总 DNA 的提取使用美国 Mo Bio 公司生产的 Ultra Clear® Fecal DNA Isolation Kit 试剂盒。按照试剂盒说明提取 DNA 后将其干燥,加入 20  $\mu$ L TE 缓冲液溶解 DNA, -20 °C 保存备用。

**1.2.2 16S rRNA 基因的扩增:** 细菌 16S rRNA 通用引物选择参考邱服斌<sup>[13]</sup>、李振东<sup>[14]</sup>的研究,采用 799F (5'-AACAGGATTAGATACCCTG-3')和

1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行扩增,预期扩增长度为 730 bp 左右。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq Master Mix 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 53  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 共 33 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 1.0%的琼脂糖电泳检测。

**1.2.3 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选:** 用 Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒将扩增后 730 bp 左右的目的条带切胶纯化回收。纯化产物与 pMD18-T vector 连接,连接产物转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞。阳性克隆子的初步筛选参照文献[15],将转化后的细胞涂布含氨苄青霉素 (100 mg/L)、X-gal、IPTG 的 LB 琼脂平板 37  $^{\circ}$ C 避光培养 14–16 h 进行蓝白斑筛选。

### 1.3 限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)分析

挑取阳性克隆子用 pMD18-T 载体通用引物 M13-47 和 M13-48 对插入片段进行菌落 PCR 扩增,PCR 产物电泳检测对目标插入片段进一步进行验证。限制性内切酶 *Hae* III 对菌落 PCR 产物进行酶切,酶切体系 20  $\mu$ L: 10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L, *Hae* III 1  $\mu$ L, PCR 产物 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 酶切 4 h。酶切产物用 2.5%的琼脂糖电泳检测。酶切图谱用 Quantity One 软件进行分析,选取酶切带型不同的代表克隆对应的菌液送往上海生工进行测序。将 *Hae* III 酶切带谱分析不同,且测序结果也不同的克隆的归为 1 个 OTU。克隆文库覆盖率统计分析应用公式:  $C=[1-(n/N)]\times 100\%$ <sup>[16]</sup>, 这里  $n$  代表在 16S rRNA 基因克隆文库仅出现一次的 OTU 的数量,  $N$  代表 16S rRNA 基因克隆文库的总数。

### 1.4 克隆文库发育分析

测序结果用 Vector Screen 去除载体序列后提交到 EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim et al., 2012)进行 BLAST 检索,下载同源性较高的模式菌株的数据,生成 Fasta 格式文件。用 ClustalX 软件对所得序列进行人工校

正及比对分析。利用 MEGA 5,按照 Neighbor-Joining 法聚类,选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析,构建系统发育树。所得的 16S rRNA 基因序列已提交 GenBank 数据库,登录号分别为: KF163106–KF163128 和 KF202051–KF202094。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增

提取大鲵肠道微生物的总 DNA 较完整,大于 23 kb,条带较为清晰,可用于下游实验。应用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行特异性扩增,得到约 730 bp 的目标片段,见图 1。另外还可看到位于 1 000–2 000 bp 之间较模糊的条带,推测可能为大鲵肠道微生物线粒体 18S rRNA 基因片段。切胶纯化回收位于 730 bp 的目标条带可避免其影响。

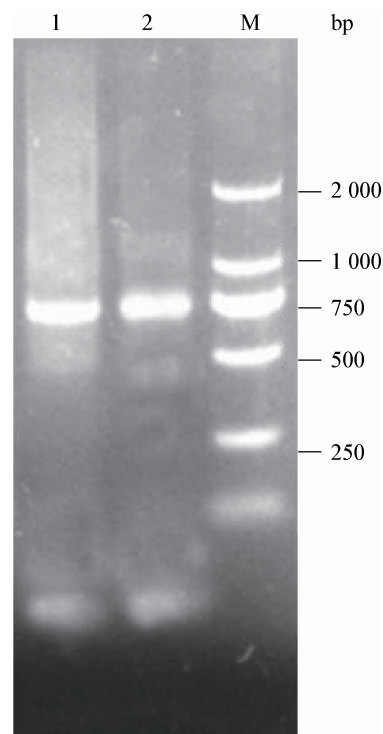


图 1 大鲵肠道内生细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增图

Figure 1 Amplification results of 16S rRNA gene of endophytic bacteria from the Chinese giant salamander

Note: M: DL2000 marker; 1, 2: Bacterial 16S rRNA gene products.

## 2.2 PCR-RFLP 分析

从构建的 16S rRNA 基因克隆文库中随机挑选 172 个阳性克隆, 以质粒通用引物进行菌落 PCR 扩增, 扩增产物(>900 bp)用 *Hae* III 进行插入目的片段的 RFLP 分析, 初步获得了 32 个酶切带谱不同的克隆。部分片段检测结果见图 2。由图 2 可见酶切较为充分, 条带均在 100–750 bp 之间, 其总和均接近菌落 PCR 产物大小。将 101 个带谱对应的克隆对应的菌液送往上海生工进行测序。测序结果去除嵌合序列(共 74 个序列, 代表 4 个 OTUs), 并排除重复序列后共得到 28 个 OTUs (代表 74 个有效序列)。根据公式, 计算得克隆文库的覆盖率 *C* 为 72.28%, 基本可以代表大鲵肠道内生细菌的多样性。

## 2.3 细菌 16S rRNA 基因系统发育分析

选取不同酶切带谱对应的阳性克隆进行测序, 系统发育分析将 101 个阳性克隆归为 4 个类群: 变形菌门(Proteobacteria), 包含 93 个克隆序列, 占总克隆总数的 92.08%, 为本文库的最优势类群; 梭菌门(Clostridia)占总克隆总数的 1.98%, 芽孢菌门(Bacilli)和衣原体门(Chlamydiae)分别占到克隆总数的 1.98%。另外还存在 1.98% 与未培养的细菌 16S rRNA 基因具有较高的相似性, 未能确定种属。这些克隆分别属于气单孢菌科(Aeromonadaceae)、莫拉菌科(Moraxellaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、消化链球菌科(Peptostreptococcaceae)、肠杆菌科

(Enterobacteriaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、衣原体科(Chlamydiaceae)、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)。序列中, 8.2% 的 16S rRNA 基因序列与已知基因序列相似性小于 97%。具体结果见表 1, 根据细菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树见图 3。

## 3 讨论

本研究采用美国 Mo Bio 公司开发的专门针对肠道微生物基因组提取的试剂盒, 获得了高质量的 DNA, 为进一步实验提供了保障。克隆文库的大多数细菌 16S rRNA 序列与已报道的水生动物鱼类<sup>[17]</sup>、蟹类<sup>[18]</sup>和虾<sup>[19]</sup>内生细菌克隆具有较高的相似性, 且优势类群均为变形菌门(Proteobacteria)。然而, 该文库中梭菌门(Clostridia)的 *Virgibacillus koreensis* 是在其他克隆文库所未见到的。另外, 文库中 8.02% 的克隆与已知序列相似度小于 97%, 部分克隆与未培养细菌(Uncultured bacteria)具有较高的相似性, 且 1 个 OTU 在系统发育树上形成独立的分支, 未能确定其种属, 这表明大鲵肠道内生细菌多样性丰富, 并且可能存在新的分类单元或种属。

目前在研究微生物分子生态学时最好的方法是扩增样品中 16S rRNA 几乎全长基因, 然后进行焦磷酸测序。本研究中选择 799F 和 1492R 为引物对细菌 16S rRNA 进行扩增, 其扩增长度大约 730 bp。实验开始时, 我们合成了 29F 和 1492R 全

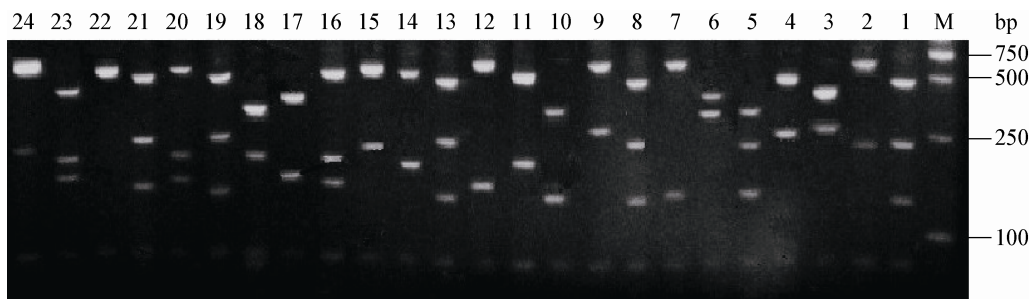


图 2 部分细菌阳性克隆子的 *Hae* III 酶切图谱

Figure 2 *Hae* III restriction patterns of some amplified 16S rRNA genes

Note: M: DL2000 marker; 1–24: Positive clones.

表 1 大鲵内生细菌 16S rRNA 基因序列比对结果  
Table 1 Sequence alignment results of the endophytic bacterium 16S rRNA gene from Chinese giant salamander

类群 Group	克隆数量 Clone numbers	代表克隆 Representative clones	最相似菌株 The most similar strains	相似 Identity (%)
Gamma Proteobacteria (92.08%)	93			
	8	Wwy99	<i>Aeromonas punctata</i> (X60408)	100
	1	Wwy104	<i>Aeromonas media</i> (X74679)	99.85
	1	Wwy74	<i>Aeromonas bestiarum</i> (X60406)	99.45
	8	Wwy87	<i>Aeromonas bivalvium</i> (DQ504429)	100
	28	Wwy40	<i>Aeromonas popoffii</i> (AJ224308)	100
	1	Wwy77	<i>Aeromonas encheleia</i> (AJ458409)	100
	12	Wwy6	<i>Aeromonas hydrophila</i> (CP000462)	99.86
	2	Wwy24	<i>Aeromonas jandaei</i> (X60413)	97.25
	6	Wwy86	<i>Aeromonas ichthiosmia</i> (X71120)	100
	7	Wwy93	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (X81663)	100
	1	Wwy72	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> (AJ626712)	98.91
	1	Wwy73	<i>Acinetobacter oleivorans</i> (CP002080)	100
	1	Wwy57	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> (X66025)	99.85
	4	Wwy91	<i>Sphingomonas echinoides</i> (JH584237)	100
	3	Wwy46	<i>Sphingobium xenophagum</i> (X94098)	96.72
	1	Wwy15	<i>Devosia riboflavina</i> (AJ549086)	99.04
	2	Wwy31	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> (EU103629)	99.29
	1	Wwy20	<i>Leclercia adecarboxylata</i> (AB273740)	98.74
	1	Wwy3	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (AJ251467)	100
Clostridia (1.98%)	1	Wwy1	<i>Raoultella planticola</i> (X93215)	92.62
	1	Wwy36	<i>Pantoea conspicua</i> (EU216737)	95.23
	1	Wwy30	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> (AEQV01000157)	95.60
	1	Wwy18	<i>Enterobacter cowanii</i> (AJ508303)	96.44
Bacilli (1.98%)	2			
	1	Wwy88	<i>Clostridium lituseburense</i> (M59107)	98.58
	1	Wwy70	<i>Virgibacillus koreensis</i> (AY616012)	96.41
Chlamydiae (1.98%)	2			
	2	Wwy69	<i>Chlamydomonas abortus</i> (CR848038)	92.98
Uncultured bacteria (1.98%)	2			
	2	Wwy71	Uncultured bacterium (EU773391)	96.34

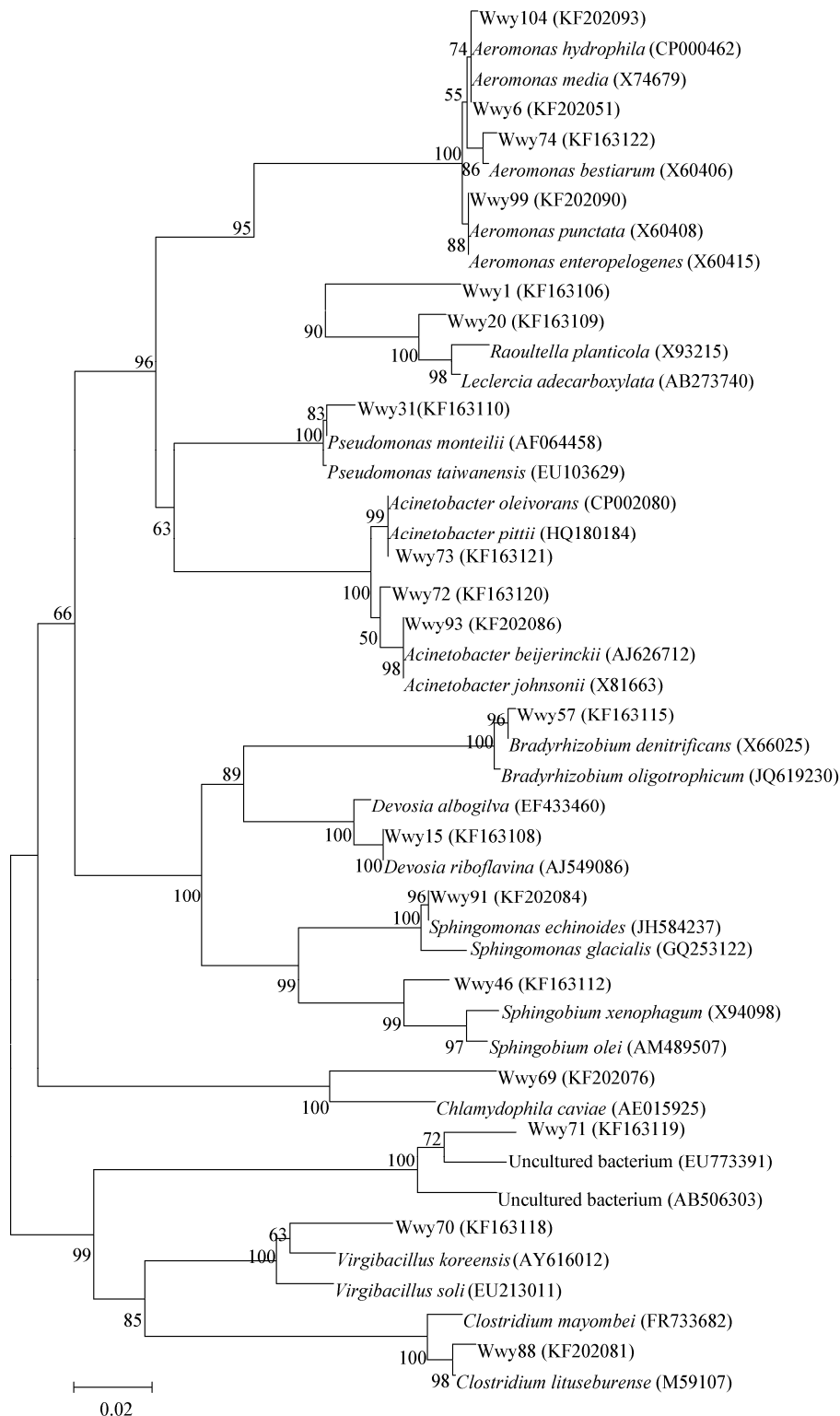


图 3 大鲵肠道内生细菌 16S rRNA 基因克隆文库系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA gene clone library from Chinese giant salamander

Note: Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of intestinal microbial of Chinese giant salamander. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample data sets. The scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

长引物<sup>[20]</sup>, 并进行了扩增, 但只能扩增到很微弱的条带, 测序后发现大鲵肠道内生细菌生物多样性严重不够, 每次测序结果总是那些优势菌种。这说明 PCR 扩增时, 大部分非优势细菌种群 16S rRNA 基因都没有扩增出来。初步分析原因应该 PCR 扩增引物不是很恰当, 导致扩增效率不高。前人研究结果表明细菌 16S rRNA 基因序列全长的 10 个可变区(V1-V10 区)中<sup>[21-22]</sup>, V6-V8 这个区段最具有代表性<sup>[23-25]</sup>, 而我们参照前人设计的引物<sup>[13-14]</sup>, 选择了这对可以扩增大约 730 bp 长度的序列是 16S rRNA 基因序列的 V6-V10 区, 这一长度可以代表细菌多样性, 国内外许多内生菌研究者选择了这一段序列进行内生菌多样性研究<sup>[13-14,23-25]</sup>。实验表明使用这对引物 PCR 扩增的产物条带亮度明显增强, 测序发现细菌生物多样性也明显增加了。说明使用这对引物进行实验, 就可以将原本在细菌总 DNA 中含量极低的一些细菌的序列也扩增出来, 这样增加了细菌生物多样性。

依据近期 Sun D. L.等的研究结果, 在原核生物生态学研究, 基于 16S rRNA 基因的菌群多样性分析会引起一定程度的高估<sup>[26]</sup>; 并发现 16S rRNA 基因不同区域存在不同程度的异质性, 因而利用不同区域的序列进行基于焦磷酸测序的分子生态研究会造成不同程度的多样性高估<sup>[26]</sup>。该研究指出对于经常用来进行焦磷酸测序的区域中, V4-V5 区域显示了最低的高估程度(约为 3%), 而 V6 区域的高估程度最高(约为 13%), 因此在原核生物分子生态研究中 16S rRNA 基因的 V4-V5 区域更适合作为焦磷酸测序的目的片段<sup>[26]</sup>。结合这一实验结果, 本研究所用引物为 V6-V10 区这一段, 包含了可以导致高估程度最高的 V6 区, 因此本研究的结果对细菌的多样性有一定程度的高估。期望在今后的研究中尽量选择 V4-V5 区进行多样性分析, 可以将高估降至最低。

本研究采用免培养法, 直接提取大鲵肠道总

DNA, 利用细菌 16S rRNA 引物进行特异性扩增, 利用 pMD18-T 载体克隆到宿主细胞中构建细菌克隆文库。构建的文库中检测到 28 个属, 部分科属的菌是利用传统的培养方法所无法得到的, 这就充分体现了免培养方法在挖掘肠道微生物的未能培养或不可培养微生物基因资源的潜力。尽管免培养法能够探知大鲵肠道中存在着大量的未培养细菌类群, 但研究这些类群的生化特征及其功能, 仍需结合传统的纯培养法来共同完成。

## 参 考 文 献

- [1] 章克家, 王小明, 吴巍, 等. 大鲵保护生物学及其研究进展[J]. 生物多样性, 2002, 10(3): 291-297.
- [2] 罗庆华, 刘清波, 刘英, 等. 野生大鲵繁殖洞穴生态环境的初步研究[J]. 动物学杂志, 2007, 42(3): 114-119.
- [3] 罗庆华. 中国大鲵营养成分研究进展及食品开发探讨[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 390-393.
- [4] 宋鸣涛. 中国大鲵食性的研究[J]. 动物学杂志, 1994, 29(4): 38-41.
- [5] 肖汉兵, 刘鉴毅, 林锡芝, 等. 大鲵消化系统的解剖学观察[J]. 动物学杂志, 1995, 30(6): 33-36.
- [6] 李学梅, 余育和, 解爱启, 等. 三种室内饲养鱼类肠道微生物群落 PCR-DGGE 指纹分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(3): 423-429.
- [7] 宋增福, 吴天星. 鱼类肠道正常菌群研究进展[J]. 水产科学, 2007, 26(8): 471-474.
- [8] 高权新, 吴天星, 王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. 动物营养学报, 2010, 22(3): 519-526.
- [9] Amann RI, Ludwig E, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [10] 唐勇, 刘旭, 周定刚. 黄鳝肠道 cDNA 文库构建及营养相关表达序列标签分析[J]. 动物营养学报, 2010, 22(4): 992-999.
- [11] 冯霞, 殷幼平, 王中康. 现代分子生物学技术在动物肠道微生物多样性研究中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 381-387.
- [12] 张惠文, 张倩茹, 周启星, 等. 分子微生物生态学及其研究进展[J]. 应用生态学报, 2003, 14(2): 286-292.
- [13] 李振东. 东祁连山高寒草地优势植物内生细菌多样性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2010.
- [14] 邱服斌. 培养法与非培养方法对人参根际内生细菌的研



- 究[D]. 北京: 首都师范大学博士学位论文, 2006.
- [15] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Gene, 1990, 96(1): 23-28.
- [16] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. Biometrika, 1953, 40(3/4): 237-264.
- [17] 李可俊, 管卫兵, 徐晋麟, 等. 用 PCR-DGGE 分析技术对长江河口八种野生鱼类肠道菌群多样性的比较研究[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(3): 268-272.
- [18] Li K, Guan W, Wei G, et al. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Ercheioir sinensis*)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(3): 675-672.
- [19] 王祥红, 李会荣, 张晓华, 等. 中国对虾成虾肠道微生物区系[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3): 493-498.
- [20] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M]. Chichester: Wiley, 1991: 115-148.
- [21] 李鹏, 马艳娇, 赵云. 16S rRNA、23S rRNA 及16S-23S rRNA 基因在细菌分离与鉴定中的应用[J]. 现代畜牧兽医, 2008, 7: 49-52.
- [22] Michael WG, David S, Robert JC. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA[J]. Nucleic Acids Research, 1984, 14(12): 5837-5852.
- [23] Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(19): 5636-5643.
- [24] Rudi K, Skulberg OM, Larsen F, et al. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8[J]. Applied and Environment Microbiology, 1997, 63(7): 2593-2599.
- [25] Heuer H, Hartung K, Wieland G, et al. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community finger prints[J]. Applied and Environment Microbiology, 1999, 65(3): 1045-1049.
- [26] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environment Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969.



## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。