

凌云,王晶,王越菲,等. 不同裂解方式对微生物 DNA 提取的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):61-64.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.015

不同裂解方式对微生物 DNA 提取的影响

凌云,王晶,王越菲,彭自然

(上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要:分子生物学试验中的细胞裂解及 DNA 提取是试验的第 1 步,但是由于细胞种类多样、细胞壁成分复杂, DNA 提取的效果容易受到提取方法的影响。针对以上问题,主要研究溶菌酶、蛋白酶 K、十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)等 4 种化学方法对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌以及大肠杆菌 3 种代表性细菌细胞的裂解效果。结果表明:溶菌酶 + SDS 法对 3 种微生物的裂解效果都不错,但可能造成蛋白质污染且 DNA 碎片较多;溶菌酶 + 热冻法对于金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的裂解效果较好且蛋白质污染较少;蛋白酶 K + CTAB 法仅对金黄色葡萄球菌的裂解提取效果较好;溶菌酶 + 蛋白酶 K 法的提取效果最差。在试验中可以根据需要选择不同的裂解方式,从而达到操作性、重现性及经济性的统一。

关键词:微生物细胞裂解;DNA 提取;溶菌酶法;混合法;热冻法

中图分类号: S182;Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0061-03

由于细胞壁结构的不同,细菌可分为革兰氏阳性菌(G^+)、革兰氏阴性菌(G^-)^[1]。革兰氏阳性菌的细胞壁主要成分是肽聚糖,其上附有磷壁酸;革兰氏阴性菌的细胞壁分为内壁层、外壁层,内壁层由肽聚糖组成,外壁层主要由脂多糖、蛋白质组成。细胞破碎的方法有很多^[2],有机机械法(如珠磨法、高压匀浆法、超声波法)和非机械法(如溶酶法、渗透压冲击、干燥法、化学渗透法)。由于提取细胞内物质如 DNA、RNA、活性物质等多数需要将细胞破碎,而机械法容易导致 DNA 断裂,因此相关报道更多地集中在使用有机溶剂、抗生素、表面活性剂、螯合剂、变性剂等化学试剂进行细胞破碎^[3-5]。本试验以金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌 3 种实验室常用细菌为研究对象,采用溶菌酶、蛋白酶 K、十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)等 4 种常见化学试剂的不同组合对其细胞进行裂解,通过结合提取裂解后细胞破碎所释放出 DNA 的效果,比较这些方法对不同类型细菌的裂解效果,尝试寻找适合的方法,以期对细胞裂解及提取 DNA 的研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

试验所用菌株为笔者所在实验室中原有冷藏保存的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Bacillus coli*)。

收稿日期:2015-10-22

基金项目:水体污染控制与治理科技重大专项(编号:2014ZX07101-012-04)。

作者简介:凌云(1978—),男,浙江湖州人,博士,副教授,主要研究方向为微生物生态学。Tel:(021)61900431;E-mail:yling@shou.edu.cn。

通信作者:彭自然,硕士,讲师,主要研究方向为环境化学。Tel:(021)61900431;E-mail:zrpeng@shou.edu.cn。

1.2 试验试剂

试验中所用到的主要试剂有三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(简称 Tris-HCl)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,简称 EDTA)、CTAB、SDS、NaCl、NaAc、蛋白酶 K、溶菌酶、无水乙醇、溶菌酶、酚、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇等。

1.3 试验仪器

试验中所用的主要仪器:DNP-9052 型电热恒温培养箱、DK-S22 型电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;RJ-TGL-16G 台式离心机,无锡市瑞江分析仪器有限公司;DYY-6C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;BioPhotometer 生物分光光度计,德国艾本德(Eppendorf)股份公司;Biostep 凝胶成像分析系统,德国 Biostep 公司。

1.4 试验方法

将枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌接种于放有培养基并已灭菌的培养皿中,于 25℃ 培养箱中培养 24 h,并按相应方法裂解细菌细胞并提取 DNA。所用培养基为上海疾控华康科技开发公司生产的营养琼脂,其主要成分为蛋白胨、牛肉膏粉、氯化钠、琼脂粉,pH 值为 7.3±0.2。

1.4.1 方法 1(溶菌酶 + 蛋白酶 K 法) 参照刘晓侠等的方法^[6]并稍作改动:将菌体用 500 μL TE (10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.0;1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0)重悬于 2 mL 离心管中,加入 10 μL 20 mg/mL 溶菌酶,37℃ 水浴 20 min;加入 2.5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K 混匀,37℃ 水浴 1 h。

1.4.2 方法 2(溶菌酶 + SDS 法) 参照陈敏的方法^[7]并稍作改动:将菌体用 100 μL TE,50 μL 20 mg/mL 溶菌酶重悬于 2 mL 离心管中,于 37℃ 水浴 1 h;加入 10 μL 10% SDS,混匀后于室温放置 5 min;加入 66 μL NaCl (5 mmol/L),混匀后于 12 000 r/min 离心 10 min。

1.4.3 方法 3(溶菌酶 + 热冻法) 参照宋培勇的方法^[8]并稍作改动:将菌体置于 2 mL 离心管中,加入 150 μL 裂解液 I (0.15 mol/L NaCl,0.1 mol/L EDTA, pH 值 8.0)、150 μL 20 mg/mL 溶菌酶,混匀后于 37℃ 水浴 2 h;加入 200 μL 裂解

液Ⅱ(0.1 mol/L NaCl,0.5 mol/L Tris-HCl,10% SDS,pH 值 8.0),反复冻融(冰浴 5 min 与沸水浴 5 min 交替进行各 3 次),于 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液于 1 支新离心管中。

1.4.4 方法 4(蛋白酶 K+CTAB 法) 参照刘敏等的方法^[9]并稍作改动:将菌体用 500 μL TE 重悬于 2 mL 离心管中,加入 50 μL 10% SDS、20 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K,混匀后于 37 ℃ 水浴 1 h;加入 200 μL 5 mol/L NaCl,充分混匀;加入 100 μL CTAB-NaCl 溶液(0.7 mol/L NaCl,10% CTAB),混匀后于 65 ℃ 水浴 1 h。

1.5 裂解效果的检验

通过对裂解后提取到的 DNA 浓度、纯度以及琼脂糖凝胶电泳检测来评估各种方法裂解细菌细胞的效果。

1.5.1 DNA 的浓度与纯度检测 取 10 μL DNA,稀释 20 倍,测定其 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$,通过 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值来检测所提取 DNA 的纯度。根据以下公式来检测所提取的 DNA 浓度:

$$\text{DNA 浓度}(\mu\text{g/mL})=50\times D_{260\text{ nm}}\times \text{稀释倍数}。$$

$D_{260\text{ nm}}=1$,相当于约 50 μg/mL 双链 DNA。通常情况下纯 DNA 样品 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值约为 1.8;若 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值 > 1.9,可能有 RNA 污染;若 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值 < 1.8,可能有蛋白质污染^[10]。

1.5.2 琼脂糖凝胶电泳检测 将提取得到的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,电泳时间约为 45 min,电泳完毕后用紫外凝胶成像系统进行成像分析和拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度与浓度

由表 1 可见,方法 1 对于金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 相近且效果相对较好, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值高于 1.8,但低于 1.9,表明 DNA 浓度较高且几乎不存在 RNA 污染;但

是枯草芽孢杆菌的 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 都相对较低,说明释放出的 DNA 与蛋白质相对较少, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值高于 1.9,说明其中有 RNA 污染。

方法 2 对试验细菌细胞的裂解非常充分,相对于其他方法,所获得的 DNA 产量最高,DNA 浓度也最大,但同时蛋白质产率也最高。推测原因为该方法中加入大量溶菌酶并使用 SDS,但未使用蛋白酶;该方法对于大肠杆菌的提取效果不如其他 2 种菌,其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值只有 1.55,远远低于一般纯度 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值,虽然有大量 DNA,但也因存在过多蛋白质而造成污染。

在方法 3 中,有 2 种细菌 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值高于 1.9,表明存在 RNA 污染;相对于其他 2 种菌,大肠杆菌的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值为 1.87,所得到的 DNA 纯度相对较好;3 种菌中枯草芽孢杆菌的 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 均低于金黄色葡萄球菌、大肠杆菌,表明释放出的 DNA、蛋白质都相对较少。

在方法 4 中,金黄色葡萄球菌的 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 均比其他 2 种菌高,所释放出的 DNA、蛋白质都较多,因而虽然 DNA 浓度相对较高,但 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值只有 1.58,远低于 1.8,存在较多蛋白质污染。与之前 3 种方法相比,用方法 4 来裂解金黄色葡萄球菌细胞并提取 DNA 的效率较低,而用该方法提取的枯草芽孢杆菌, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值高于 1.9,表明存在 RNA 污染。

如果以方法归类,从提取的 DNA 量来看,对于金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌这 3 种细菌而言,方法 2(溶菌酶+SDS)提取得到的 3 种细菌的 DNA 的量都明显大于方法 1、方法 3、方法 4 所提取的 3 种细菌的 DNA 量($P<0.05$);同时,方法 2(溶菌酶+SDS 盐)最终提取的 DNA 质量浓度也明显高于方法 1、方法 3、方法 4 所提取的 3 种细菌的 DNA 浓度($P<0.05$)。

表 1 3 种细菌不同裂解方法提取得到的 DNA 纯度与浓度的比较

方法编号	菌种	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	DNA 质量浓度 (μg/mL)
1	金黄色葡萄球菌	0.097±0.003	0.053±0.004	1.89±0.08	96.00±2.83
	枯草芽孢杆菌	0.043±0.005	0.022±0.004	1.97±0.12	43.00±4.24
	大肠杆菌	0.098±0.031	0.053±0.014	1.85±0.08	98.00±15.11
2	金黄色葡萄球菌	0.499±0.032	0.279±0.016	1.79±0.01	499.00±41.53
	枯草芽孢杆菌	0.434±0.091	0.220±0.049	1.96±0.06	433.00±50.72
	大肠杆菌	0.226±0.022	0.146±0.011	1.55±0.04	226.00±36.63
3	金黄色葡萄球菌	0.162±0.011	0.084±0.005	1.94±0.00	162.00±6.31
	枯草芽孢杆菌	0.059±0.037	0.032±0.025	1.98±0.35	58.00±18.77
	大肠杆菌	0.108±0.004	0.058±0.004	1.87±0.16	108.00±2.83
4	金黄色葡萄球菌	0.209±0.021	0.150±0.065	1.58±0.34	209.00±49.72
	枯草芽孢杆菌	0.056±0.017	0.029±0.008	1.93±0.04	56.00±11.97
	大肠杆菌	0.077±0.006	0.043±0.006	1.80±0.09	77.00±7.07

2.2 细菌细胞形态差异对提取结果的影响

由表 2 可见,金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌同为革兰氏阳性菌(G^+),根据查阅的资料^[1],革兰氏阳性菌对于溶菌酶比较敏感,革兰氏阴性菌则相对不敏感,因此溶菌酶对革兰氏阳性菌裂解效果应较好。但从实际结果比较来看,枯草芽孢杆菌效果明显较差。有的细菌在其生活史的一定阶段,于所影响的细胞内形成 1 个圆形、椭圆形或柱形的结构,称为芽

孢^[1],因此推测此时正值枯草芽孢杆菌存在芽孢的阶段,而芽孢对外界不良环境具有很强的抵抗能力,因此大大影响了裂解效果,释放出的 DNA 量也就相对较少。而属于革兰氏阴性菌的大肠杆菌裂解效果与金黄色葡萄球菌相近,应是溶菌酶的浓度比较高的原因造成的,实际所用浓度为相关报道^[6]中的 2 倍。

大量高浓度的溶菌酶使得方法 2 的裂解效果大大优于原

文献中提到的裂解效果^[9],再加上 SDS 分离蛋白质的作用,使该方法成为所有方法中裂解效果最好的,但是将通常与 SDS 搭配使用的蛋白酶 K 换成了溶菌酶,大量分离出来的蛋白质得不到充分降解,使得蛋白质的含量也是 4 种方法中最高的。同时,革兰氏阳性菌对于溶菌酶较革兰氏阴性菌敏感的特点在该方法中得到体现。

在方法 3 中,冻融作用极冷极热的急速温度变化对细菌细胞壁和细胞膜的破坏作用也是比较强的,这点从金黄色葡萄球菌和大肠杆菌裂解所释放出的 DNA 量能看出,但是对枯草芽孢杆菌不甚理想,推测为其中芽孢的作用。芽孢尤其能耐高温,同时也能抵抗低温,在 -190°C 的液氮中保存 6 个月仍能存活^[1],在进行该方法的试验时一些细菌胞内已形成的芽孢抵御了温度对于细胞的杀伤以及部分化学试剂的破坏。

方法 4 适用于大多数微生物细胞的裂解和 DNA 提取^[6],但相对于其他 2 种菌,对溶菌酶敏感且又不含有芽孢的金黄色葡萄球菌显然裂解效果更好。在抽提时,金黄色葡萄球菌的上清液更易被吸取,而其他 2 种菌的上清液则相对浓稠,难以吸取。正因为如此,金黄色葡萄球菌在试验过程中容易将蛋白质一并吸取上来,造成蛋白质的污染;而其他 2 种菌却是因为上清液吸取的不充分导致 DNA 提取量的减少,影响对裂解效果的评估。

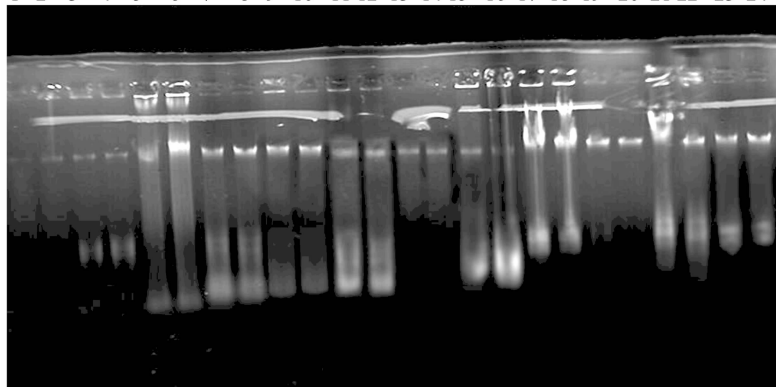
表 2 3 种细菌细胞形态结构的简单比较

菌种	革兰氏染色结果	芽孢
金黄色葡萄球菌	G ⁺	无
枯草芽孢杆菌	G ⁺	有
大肠杆菌	G ⁻	无

2.3 琼脂糖凝胶电泳结果分析

将细胞裂解后提取得到的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳的结果如图 1 所示,可见 1~24 泳道各组呈现不同的亮度,表明 4 种方法对于 4 种细菌都可提取出 DNA,但 DNA 的浓度、含量及片段分布不尽相同,其中 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、16、17、18、21、22、23、24 泳道带相对于其他泳道更亮,说明相对于其他几个样,它们中所含的 DNA 片段量是较高的,特别是 7~12 泳道所属的方法 2,该方法作用的 3 种细菌都释放出较大的 DNA 片段,与 5、6、17、18 泳道相对比也略显得有些暗淡,说明该方法所提取 DNA 片段断裂最少,对于 23 与 24 泳道而言亦是如此。而 5、6、15、16、17、18、21、22 泳道较同样提取方法中的泳道条带更亮且更规则,表明样品 DNA 浓度较大且片段较完整。综合比较条带亮度及其片段分布情况,5、6、15、16、17、18、21、22 泳道,即方法 1 的大肠杆菌、方法 3 的枯草芽孢杆菌、方法 3 的大肠杆菌以及方法 4 的枯草芽孢杆菌提取效果较好,此外方法 2 就总体效果而言也较好。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



1、2—方法1(金黄色葡萄球菌); 3、4—方法1(枯草芽孢杆菌); 5、6—方法1(大肠杆菌); 7、8—方法2(金黄色葡萄球菌); 9、10—方法2(枯草芽孢杆菌); 11、12—方法2(大肠杆菌); 13、14—方法3(金黄色葡萄球菌); 15、16—方法3(枯草芽孢杆菌); 17、18—方法3(大肠杆菌); 19、20—方法4(金黄色葡萄球菌); 21、22—方法4(枯草芽孢杆菌); 23、24—方法4(大肠杆菌)

图1 细胞裂解后提取获得的 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

3 讨论与结论

评价一种 DNA 提取方法优劣的主要依据是 DNA 是否量多、纯度好、片段足够完整以及能否准确反映样品中微生物种群的多样性^[10]。仅从 DNA 浓度与纯度看,本研究方法 1 对于金黄色葡萄球菌与大肠杆菌裂解效果较好;方法 2 对于 3 种细菌效果都不错,但对于大肠杆菌提取的 DNA 含量较其他 2 种菌有些偏低;方法 3 对于金黄色葡萄球菌与大肠杆菌相对来说效果较明显;在方法 4 中,金黄色葡萄球菌的裂解提取效果最佳。但如果结合电泳图并考虑提取的 DNA 量多而且片段也相对较大,适合进一步进行其他研究的话,则本试验中最适合金黄色葡萄球菌的裂解提取 DNA 的方法为方法 2,最适合枯草芽孢杆菌裂解提取 DNA 的方法为方法 3,最适合大

肠杆菌裂解提取 DNA 的方法为方法 3。此外,方法 2(溶菌酶 + SDS)在本试验中裂解获得 DNA 的量是最多的,在有关文献中也证实该方法既简便效果又较理想^[11],但从本试验来看, DNA 高释放率的同时也存在大量蛋白质造成污染,以及少量的 RNA,因此该方法若进一步改进,可加入蛋白酶 K 及少量 RNA 水解酶,减少污染、提高提取的 DNA 浓度,则该方法将进一步成为 4 种方法中最优最有效率的方法。而且,过夜等步骤使得试验时间加长,这样 DNA 容易出现降解和断裂的现象^[12],因此,应尽量寻求试验所需时间更短的方法,最大限度地减少提取的 DNA 片段的再次断裂、降解。另外,根据所查阅的部分文献^[13-14],也可考虑增加 PCR 扩增这一步骤,通过对 PCR 产物的检验,不但能使试验结果的显著性进一步提高,也可检验各种方法所提取的 DNA 是否适于进行 PCR

裔传灯,李 玮,王德荣,等. 水稻粒形基因 *GS3* 的功能标记开发与鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):64–67.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2016.12.016

水稻粒形基因 *GS3* 的功能标记开发与鉴定

裔传灯,李 玮,王德荣,蒋 伟,王 颖,周 勇,梁国华,顾铭洪
(扬州大学江苏省作物遗传生理国家重点实验室培育点/粮食作物现代产业技术协同创新中心/
教育部植物功能基因组学重点实验室,江苏扬州 225009)

摘要:籽粒的大小和形状是影响水稻产量和稻米品质的主要性状。在基因 *GS3* 序列分析的基础上,对该基因第 2 外显子 A/C 和第 5 外显子 13 bp Indel 的 2 个变异位点分别开发功能标记,并将其用于 294 份水稻微核心种质和 2007—2013 年江苏省审定的 65 份粳稻品种的基因型鉴定。研究结果表明,第 2 外显子的 A/C 变异在粳粳亚种中有着相似的分布频率,并且都对粒长、粒厚和长宽比有极显著的影响。相对于基因型 C 而言,基因型 A 在粳粳亚种中都有更长的粒长、更薄的粒厚和更大的长宽比。但是第 5 外显子的 13 bp 缺失变异只在粳稻中极低频率(0.74%)出现,属于稀有变异类型,比 13 bp 插入变异有着更短的粒长和更小的长宽比。这些研究结果为水稻产量和品质育种中充分利用基因 *GS3* 的优异等位基因奠定了基础。

关键词:水稻;粒形;基因 *GS3*;功能标记;变异

中图分类号: S511.032 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2016)12–0064–04

由于人口数量持续增长、耕地面积日益减少、自然灾害频发和水资源不足等原因,水稻育种研究者不断致力于提高水稻产量水平,确保国家的粮食安全。同时随着生活水平的不

断提高,稻米消费者对稻米品质也提出了更高的要求。水稻的产量和稻米品质都是受多因素控制的复杂性状^[1–2],其中粒形是影响水稻产量和稻米品质的重要因素之一^[3]。目前已经克隆的水稻基因中,通过调节粒形提高水稻产量的基因有 *GS3*^[4]、*qPE9* – *I*^[5]、*GW2*^[6]、*qGL3/GL3*、*I*^[7–8]、*qSW5/GW5*^[9–10]、*GS5*^[11]、*GS6*^[12]、*GW7*^[1]、*GW8*^[3]、*SLG7*^[13] 和 *TGW6*^[14];通过调节粒形改善稻米品质的基因有 *GW7*^[1] 和 *GW8*^[3]。因此粒形状调控机理的研究对水稻的产量育种和品质育种有着重要的参考价值。

GS3 是控制水稻粒形的重要基因。Fan 等研究发现基因 *GS3* 是控制水稻粒长和粒质量的负调控因子,以短粒水稻品种川 7 基因 *GS3* 的基因组序列 DQ355996 为参照,来自长粒

收稿日期:2016–04–06

基金项目:国家自然科学基金(编号:31571624,31071382);国家重点基础研究发展计划(编号:2010CB125904,2013CBA01405);江苏省高校自然科学研究重大项目(编号:15KJA210004);扬州大学大学生学术科技创新基金(编号:x2015616);江苏高校优势学科建设工程项目。

通信作者简介:裔传灯(1973—),男,江苏盐城人,博士,副教授,主要从事水稻遗传育种研究。Tel:(0514)87937619;E-mail:cdyi@yzu.edu.cn。

扩增。

参考文献:

- [1]王家玲,李顺鹏,黄 正. 环境微生物学[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2004:16–17.
- [2]修志龙,姜 炜,苏志国. 细胞破碎技术的研究进展和发展方向[J]. 化工进展,1994(1):15–21.
- [3]Novella I S, Fargues C, Grévilott G. Improvement of extraction of penicillin acylase from *E. coli* cells by a combined use of chemical methods[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44 (3): 379–382.
- [4]Falconer R J, O'Neill B K, Middelberg A P J. Chemical treatment of *Escherichia coli*: 1. extraction of intracellular protein from uninduced cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 53 (5): 453–458.
- [5]Hettwer D, Wang H. Protein releases from *Escherichia coli* cell permeabilized with guanidine – HCl and Triton X100[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1989, 33(7): 886–895.
- [6]刘晓侠,林建平,岑沛霖. 微生物基因组 DNA 提取方法的比较与

- 改进[J]. 嘉兴学院学报,2007,19(3):48–50.
- [7]陈 敏. 土壤样品中 DNA 提取方法的比较[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3):101–104.
- [8]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.
- [9]刘 敏,谢利波,乐超银. 金黄色葡萄球菌 DNA 提取方法的研究[J]. 实用医学进修杂志,2007,35(2):123–125.
- [10]曲艳玲,廖永红,汪 苹,等. 不同细胞裂解方法提取活性污泥总 DNA 研究[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2007, 25(2):13–16.
- [11]Bourrain M, Achouak W, Urbain V, et al. DNA extraction from activated sludges[J]. Current Microbiology, 1999, 38 (6): 315–319.
- [12]宫 强,关道明,王耀兵,等. 大肠杆菌总 DNA 快速提取方法的比较研究[J]. 海洋环境科学,2005,24(4):63–66.
- [13]杨 建,洪 葵. 红树林土壤总 DNA 不同提取方式比较研究[J]. 生物技术通报,2006(增刊):366–371
- [14]苏俊峰,马 放,侯 宁,等. 活性污泥总 DNA 不同提取方法的比较[J]. 生态环境,2007,16(1):47–49.