

文章编号: 1673-1689(2011)02-0261-06

SSCP 方法的条件优化与榨菜低盐 腌制微生物多样性分析

翁佩芳^{1,2}, 吴祖芳^{*1,2}, 龚业^{1,2}, 张锐^{1,2}, 沈锡权^{1,2}

(1. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江宁波 315211; 2. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江宁波 315211)

摘要: 应用单链构象多态性(SSCP)方法研究榨菜低盐腌制条件下的微生物群落结构与变化。研究了凝胶质量浓度、电泳前处理、银染操作条件对SSCP分析方法的影响。结果表明,在凝胶质量浓度为22 g/dL、丙烯酰胺与双丙烯酰胺质量比为29:1,并加入体积分数6%的甘油,4℃条件下1×TBE缓冲液中250 V电泳18 h,通过强碱性显影液和甲醛作还原剂的银染方法显色,可以获得理想的SSCP图谱。对榨菜低盐腌制不同时期样品的SSCP图谱分析结果,发现在榨菜腌制初期优势菌群为肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*),随后转变为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)占优势;腌制后期主要存在的优势菌群为植物乳杆菌和*Lactobacillus versmoldensis*,结合感官分析证实这些优势乳酸菌对保持制品高品质具有功能作用。

关键词: 榨菜; PCR-SSCP; 电泳图谱; 条件优化; 微生物多样性

中图分类号: TS 255

文献标识码: A

Optimization of SSCP Condition and Diversity of Microbial Community in Pickled Mustard Tuber with Low Salinity

WENG Peifang^{1,2}, WU Zufang^{*1,2}, GONG Ye^{1,2}, ZHANG Rui^{1,2}, SHEN Xiquan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Microbial community and its changes in pickled mustard tuber were investigated at the low salinity by using single-strand conformation polymorphism (SSCP) method. Effects of gel concentration, glycerol addition, foretreatment of electrophoresis and silver staining methods on SSCP pattern were also examined in this manuscript. The results demonstrated that an ideal SSCP method was obtained as the optimum conditions, gel concentration of 22 g/dL at the crosslinking degree of 29:1 (a ratio of acrylamide and bisacrylamide), glycerol concentration of 6%, voltage of 250 V, electrophoresis buffer of 1×TBE, electrophoresis at 4℃ for 18 hours, and using silver staining method of strong alkaline solution and formaldehyde as reducing agent.

收稿日期: 2011-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071582); 浙江省自然科学基金项目(Y3080231); 浙江省钱江人才计划项目(2009R10033); 浙江省科技计划重点项目(2007C12015)。

作者简介: 翁佩芳(1963-), 女, 上海人, 副教授, 主要从事农产品加工方面的研究。

* 通信作者: 吴祖芳(1963-), 男, 浙江奉化人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。Email: wuzufang06@yahoo.com.cn

Based on the optimized SSCP method for pickled leaching liquid measurement, it was found that the *Leuconostoc mesenteroides* is the dominant microorganism in the initial stage of pickling, then *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* grown up with the alteration of environmental conditions. At the later stage, the dominant microorganism are *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus versmoldensis*, respectively. The contribution of lactic acid bacteria was confirmed by microbial community structure analysis in pickled mustard tuber with low-salinity, which is carried out by combining the sensory evaluation method.

Key words: mustard tuber, PCR-SSCP, electrophoresis pattern, condition optimization, microbial diversity

传统的榨菜腌制加工由于采用高盐浓度来抑制微生物繁殖,由此加工方式带来的高盐废水对环境产生污染或带来很高的处理成本,不利于现代蔬菜加工向绿色、健康与高效益的生产方向发展^[1-2];研究表明^[2-3],在低盐腌制条件下经合适的生产条件,可改善蔬菜风味、增进食欲,提高腌制菜的营养价值。其中的微生物(乳酸菌)对蔬菜的保藏与品质维持发挥重要作用^[2-4],乳酸菌是保持腌制菜较高营养价值和质的主要微生物。但如果条件控制不当,腌制过程中也会出现杂菌污染或过量繁殖导致产品的劣败^[5]。到目前为止,在低盐条件下榨菜腌制保存不同阶段的微生物群落组成、优势菌群及变化规律仍不明确,研究蔬菜腌制过程中微生物区系的多样性并揭示其功能可为榨菜加工产业实现清洁生产新工艺提供微生物学证据。

环境样品中微生物组成及数量变化测定的传统方法是采用平板培养方法^[6-7],但由于自然样品中多种微生物很难培养,给这些方法带来很大的局限性,从而造成微生物区系分析的误差。目前已有较多的文献报道用分子鉴定方法检测乳酸菌^[8-10],随着分子生物学技术的发展,单链构象多态性(Single Strand Conformation Polymorphism, 以下简写 SSCP)技术也已发展成为一种高通量、使用简便快速及准确性较高的方法而被应用于微生物群落结构等的分析^[11-13]。其基本原理是经过 PCR 扩增的 DNA 片段,经变性解链产生的 DNA 单链依据各自不同的碱基序列进行配对折叠成一定的空间构象,不同碱基序列 DNA 单链在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时,因其构象的差异会引起迁移率的改变,显色后就会得到不同的带型,即多态性。因此,该方法在检测基因突变方面有较为广泛的应用,但针对不同来源样品 SSCP 方法的结果也易受各种因素的影响,而出现诸如条带不清、难以辨认等各种情况^[14]。

作者从聚丙烯酰胺凝胶组成与质量浓度、添加

物、电泳前处理及银染等方面对 SSCP 方法进行优化,通过优化 SSCP 操作条件,旨在研究榨菜低盐腌制体系的微生物群落结构与优势菌群的变化规律,从而可阐明不同种类乳酸菌在榨菜腌制保藏中所发生的作用及功能定位,为进一步优化生产工艺和产品质量的控制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

腌制样品液:榨菜腌制与腌制汁液的制备按文献[3]方法进行。分别取榨菜腌制过程4个不同时间点(腌制开始后的第2天、5天、15天、35天)的腌制液,记为1-4号样品。

主要试剂:APS、TEMED、丙烯酰胺,Tris-碱、二水二乙胺四乙酸二钠、氢氧化钠、碳酸钠和硼酸等:由生物工程(上海)有限公司提供;N,N'-亚甲基双丙烯酰胺:由国药集团化学试剂有限公司提供;二甲苯菁和硝酸银:由BIO BASIC, INC 提供;甲醛:由宜兴市第二化学试剂厂提供;以上试剂均为分析纯。乙酸,化学纯,由宜兴市第二化学试剂厂提供。

乳酸菌检测培养基和细菌平板计数培养基:分别为MRS培养基和普通营养琼脂培养基^[3],pH调至6.8,115℃灭菌20min。

1.2 主要仪器与设备

梯度PCR仪和5424型高速离心机,德国汉堡Eppendorf;WD-9405B型水平摇床、DYY-8C型电泳仪、24EN型制胶器等。北京六一仪器厂制造;LRH-190-S型恒温恒湿培养箱:广东省医疗器械厂制造。

1.3 方 法

1.3.1 样品总DNA的提取与PCR的扩增 将腌制液样品用无菌纱布过滤,10000g离心5min,去上清液。用改进的SDS高盐提取法提取样品总

DNA。将样品中加入 500 μ L 裂解缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, 1.5 mol/L NaCl, 1 g/dL CTAB; pH 8.0), 20 μ L 溶菌酶(25 mg/mL), 于 37 $^{\circ}$ C 处理 40 min; 加入 5 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL) 于 37 $^{\circ}$ C 处理 40 min; 再加入 120 μ L SDS (10 g/dL), 65 $^{\circ}$ C 处理 2 h; 粗提的 DNA 由酚/氯仿/异戊醇(体积比 25:24:1)法提取^[15-16]。

PCR 扩增采用引物为 f341(5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 及 r533(5'-TTACCGCGGCTGCTGGCA-3'), 其中反向引物 r533 的 5' 端采用磷酸标记, 由上海英骏生物技术有限公司合成并标记。PCR 反应体系为: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 1.0 μ L, DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, 用超纯水补足反应总体积至 25 μ L。

1.3.2 加热变性与酶切 经上步扩增得到的 PCR 产物与上样缓冲液(体积分数 95% 的去离子甲酰胺、10 mmol/L NaOH、20 mmol/L EDTA 和 0.02 g/dL 溴酚蓝及 0.02 g/dL 二甲苯菁)混匀后, 在高温下变性数分钟后马上冷却以保持单链构象。酶切: 由 λ 核酸外切酶 2 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, PCR 产物 30 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温浴 4 h。后经 72 $^{\circ}$ C 灭活 10 min λ 核酸外切酶, 此酶切过的 PCR 产物与上样缓冲液混匀, 即可进行点样操作。

1.3.3 凝胶制备与预电泳 实验设计了 3 个凝胶质量浓度(分别为 22、14、9 g/dL), 质量浓度为: (ACR 体积/总体积) \times 30%, 其中 ACR(丙烯酸酰胺 29 g, N,N'-亚甲基双丙烯酸酰胺 1 g, 水 100 mL, 交联度为 29:1)。再向其中加入 3.36 mL 的 5 \times TBE (54 g Tris 碱, 27.5 g 硼酸, 20 mL 0.5 mol/L 的 pH 值为 8.0 的 EDTA, 定容至 1 L), 80% 的甘油 1.032 mL, 10% 的 APS 115.2 μ L, TEMED 12.0 μ L, 最后用 ddH₂O 使各浓度混合液的体积一致。在没有样品情况下 250 V 电压下预电泳 30 min。

1.3.4 银染 采用两种不同的银染方法, 分别为采用 3 g/dL NaCO₃ 200 mL, 加 100 μ L 硫代硫酸钠, 4~10 $^{\circ}$ C 显色 3 min 和显影液(NaOH 粉末 6 g, 37% 甲醛 1 mL, 双蒸水 200 mL) 显影, 比较条带显色效果。

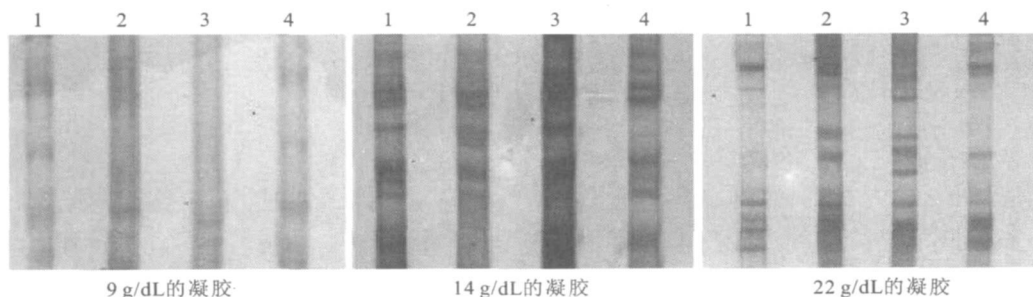
1.3.5 条带的分离、克隆与测序 特异条带由 EZ Spin Column PAGE Gel DNA Extraction Kit(上海生工生物公司)进行回收。取回收的 DNA 1 μ L 为模板, 以 f341 和 r533 为引物, 采用前体系和 PCR 程序进行扩增, 琼脂糖电泳, PCR 产物切胶纯化(纯化试剂盒由上海生工生物公司提供), 按产品说明书克隆进 T-载体(pMD-18-T, 宝生物(大连)有限公司)。采用蓝白斑及 PCR 方法筛选转化子, PCR 直接以白斑菌落为模板, 采用能与 T-载体插入点两侧特异结合的 M13 通用引物进行检测。每条带选取 2~3 个克隆, 同样以 M13 通用引物进行测序, 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。通过 Blast 软件, 将测序获得的序列与 GenBank 进行比对, 得到相似性大小。

2 结果与分析

2.1 凝胶质量浓度对 SSCP 结果的影响

聚丙烯酰胺在凝胶中的不同比重会影响凝胶中水分的质量分数, 从而直接导致泳动率的改变。试验设置 3 个质量浓度 9、14、22 g/dL, 取榨菜腌制液 1~4 号样品, 分别以总 DNA 扩增产物作为样品进行垂直电泳, 实验结果见图 1。

从图 1 可以看出, 9 g/dL 的凝胶条带分散, 颜色浅淡, 虽然分离度较好, 但条带模糊不清, 不易于观察, 凝胶本身韧性不好, 容易在显色过程中破碎, 影响结果分析, 也增加了操作难度; 14 g/dL 的条带较多, 但分离效果欠佳, 难于分辨; 22 g/dL 的凝胶分离效果较为理想, 条带也较清晰, 多样性好, 条带有较好的可读性。综上结果, 取 22 g/dL 为最佳的凝胶质量浓度。



1、2、3、4 分别为 1~4 号样品

图 1 凝胶质量浓度对 SSCP 影响的效果对比图

Fig. 1 Effect of gel concentration on SSCP results

从图1可以看出, 9 g/dL 的凝胶条带分散, 颜色浅淡, 虽然分离度较好, 但条带模糊不清, 不易于观察, 凝胶本身韧性不好, 容易在显色过程中破碎, 影响结果分析, 也增加了操作难度。14 g/dL 的条带较多, 但分离效果欠佳, 难于分辨; 22 g/dL 的凝胶分离效果较为理想, 条带也较清晰, 多样性好, 条带有较好的可读性。综上所述, 取 22 g/dL 为最佳的凝胶质量浓度。

2.2 甘油体积分数对 SSCP 结果的影响

甘油具有保湿的作用, 对单链 DNA 在凝胶中的泳动速度及提高条带的分辨率可能产生影响。结合文献[14], 设定甘油的体积分数为 6%, 以空白作对照, 比较条带分离效果, 结果见图 2。

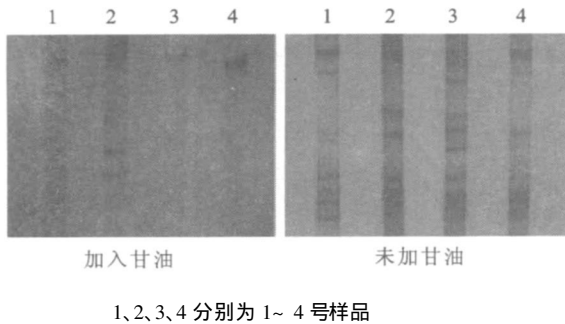


图 2 凝胶中添加体积分数 6% 甘油对 SSCP 影响
Fig. 2 Effect of 6% glycerol in gel on SSCP results

从图 2 可以看出, 加入 6% 甘油的凝胶电泳效果 (图 2 左侧) 明显优于后者, 不仅条带清晰, 分离效果好, 泳道也较为匀称, 泳动时间缩短; 而对照组未加入甘油的凝胶条带模糊, 不利于进一步的回收操作。

2.3 预电泳对 SSCP 图谱的影响

预电泳是指将凝固好的凝胶先不直接进行点样操作, 而是先放入装有电泳缓冲液的电泳槽中, 在没有样品的情况下以电泳时采用的电压电泳一段时间。本试验中, 预电泳时间设置为 30 min, 实验效果见图 3。

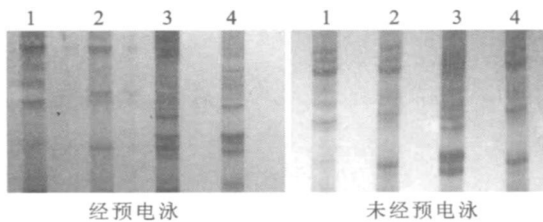


图 3 预电泳对 SSCP 图谱结果的影响
Fig. 3 Effect of prerunning on SSCP electrophoresis map

从图 3 可以看出, 电泳之前经过预电泳处理的凝胶, 得到的条带比较直, 清晰度高, 效果明显好于对照组。通过预电泳处理, 可能是由于可除去凝胶中没有聚合的单体及聚合引发剂, 从而提高了条带

的清晰度。

2.4 银染方法对 SSCP 图谱的影响

银染操作是 SSCP 分析方法中最常用的染色方法, 该方法不需要对引物或 dNTP 做任何修饰, 也不用专门的检测设备, 结果直观, 用肉眼即可观察。作者采用硝酸银染色法, 方法之一是其中的还原剂为甲醛与硫代硫酸钠, 在银染之前需用甲醛处理 5 ~ 10 min; 另一方法是每步银染操作前后均插入洗脱步骤, 显影液为强碱性, 还原剂为甲醛, 显色时间为 20 ~ 30 min, 实验结果见图 4。从图 4 的 SSCP 图谱结果可以看出, 采用方法一进行显色时 (图 4 左侧), 凝胶在显色液中迅速变色, 背景不断加深, 而未见明显的条带, 约 2 min 后 DNA 条带隐约可见, 但此时整个背景已呈青黑色, 需在强光条件下, 才能对条带进行观察。该方法对水的去离子状态要求相当严格, 容易造成聚丙烯酰胺凝胶背景过深, 影响判读。而银染操作中插入洗脱步骤, 强碱性的显色液, 显色结果为胶的背景清亮, 条带清晰 (图 4 方法二), 有利于结果的判读, 而且这种方法对水的去离子要求不严格, 因此, 采用方法二银染操作。

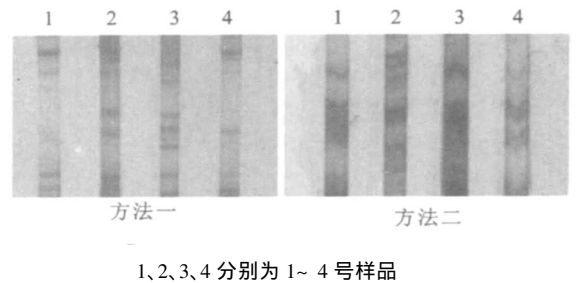
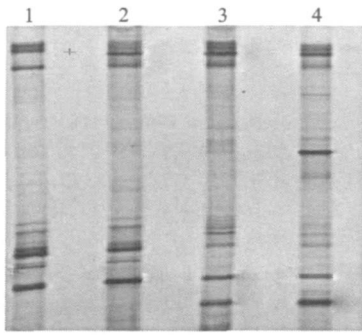


图 4 银染方法对 SSCP 图谱的影响效果图
Fig. 4 Effect of silver staining method on SSCP electrophoresis map

2.5 优化的 SSCP 方法对低盐腌制榨菜过程微生物群落结构多样性分析

由以上分析 SSCP 图谱效果的重要影响因素的实验结果, 对各因素进行优化组合, 试验条件为凝胶质量浓度为 22 g/dL、丙烯酰胺与双丙烯酰胺质量比为 29:1, 并加入体积分数 6% 的甘油, 98 °C 变性 10 min, 4 °C 条件下 1×TBE 缓冲液中 250 V 电泳 18 h, 使用强碱液作显色剂。对在最优工艺条件下制作的低盐腌制榨菜不同阶段样品 (样品 1~4) 进行微生物群落结构及变化分析, 试验结果见图 5。

实验结果获得的 SSCP 图谱条带较清晰, 达到了理想的效果。然后根据条带的相对亮度、丰度等结合 1.3.5 方法来分析不同腌制阶段的微生物种类及其变化, 经过 Blast 软件和 Genbank 序列比对结果, 共检测到的微生物分别有肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)、植物乳杆菌 (*Lactoba-*



1、2、3、4 分别为 1~4 号样品

图 5 优化的 SSCP 方法下样品的微生物群落分析结果

Fig. 5 Performance of microbial community at the optimum operating condition of SSCP method

cillus plantarum)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、*Lactobacillus versmoldensis*、毕赤酵母属(*Pichia sp.*)、伊萨酵母(*Issatchenkia sp.*) (这些菌种其相似性均达到 100%) 和弧菌属(*Vibrio sp.*) (相似性达 95%) 等。根据被选择条带的信息(丰度、亮度等)得到在腌制发酵初期,肠膜明串珠菌为主要的优势菌群。随着腌制环境条件的变化,出现了植物乳杆菌和短乳杆菌。在腌制保存后期起主导作用的微生物为植物乳杆菌和 *Lactobacillus versmoldensis*。这些实验结果可为进一步分析榨菜低盐腌制过程中质量品质维持相关的乳酸菌类型及功能提供基础。

3 讨论

以前研究表明^[12],SSCP 分析对于小于 400 bp 的 PCR 产物最有效,而本试验所采用的 DNA 来自低盐腌制体系的各个腌制时期,其片段长度均为 200 bp 左右,适合进行 SSCP 法分析。凝胶的组成及配比直接影响到电泳结果,主要是引起凝胶中水分质量分数的改变,DNA 单链在低浓度的凝胶中泳动速度较快,可能会造成条带模糊,只有在合适的凝胶质量浓度下各单链的迁移速度差异较大,可使条带清晰,显示出多态性。从甘油添加对 SSCP 效果影响结果,表明甘油具有加快泳动速度和去除杂带的作用,甘油具有保湿作用,因此凝胶中甘油的加入减少了凝胶中水分的损失,保证泳道通畅,同时也加快了条带的泳动速率,缩短了电泳时间。另一方面,低体积分数的甘油能够稳定单链 DNA 的三维结构,从而提高条带的分辨率,这与文献[17]报道的结果一致。银染操作是 SSCP 图谱获得的必经步骤,采用甲醛与硫代硫酸钠为还原剂显色,容易造成聚丙烯酰胺凝胶背景过深,影响判读,

同时该方法对水的去离子状态要求相当严格;而每一步银染操作前后均插入洗脱步骤,显影液为强碱性,还原剂为甲醛,在这样的条件下可能是被固定剂固定到凝胶的核酸与银染剂中的银离子结合较牢固,再通过还原剂将银离子还原,从而发生银棕色显色反应,标示出核酸的位置,形成较清晰的条带,显色效果较理想。

由不同腌制时期样液的 SSCP 图谱分析结果,榨菜腌制初始阶段,附着在榨菜鲜头上具有兼性和厌氧性微生物,在菜体切割处理及在盐的作用下,榨菜表面渗出的汁液非常适宜肠膜明串珠菌的生长繁殖,肠膜明串珠菌作为优势菌群起到了发酵启动剂的作用,它产生二氧化碳和酸很快使 pH 值下降,阻止了其他有害微生物的生长;同时,肠膜明串珠菌能将多余的糖转化为甘露醇和葡聚糖。这种腌制环境条件的改变,随后其它乳酸菌按一定的顺序生长。中期过程以植物乳杆菌快速生长繁殖、产酸,在榨菜腌制中起主导作用。短乳杆菌能够发酵戊糖,使产品具有独特的风味。整个腌制过程经感官品评产品口感脆嫩、风味浓郁。在腌制后期可发酵性碳水化合物全部被利用完后,加上腌制环境 pH 值太低,乳酸菌的生长繁殖就会受到抑制,发酵的结果是产生乳酸和乙酸。另外,蔬菜原料的缓冲能力和可发酵性碳水化合物的含量是控制乳酸发酵、酵母发酵程度的重要因素。

4 结语

1) 聚丙烯酰胺在凝胶中的质量浓度控制在 22 g/dL 时具有较好的分离效果,条带清晰具可读性;在凝胶中添加体积分数 6% 甘油其泳道匀称,可缩短电泳时间。

2) 经 250 V、30 min 的预电泳处理的凝胶,得到的条带比较直和清晰度高。银染操作时每一步均插入洗脱步骤,显色液为强碱性,还原剂为甲醛,显色时间为 20~30 min,凝胶显色后条带较清晰。

3) 榨菜腌制液 SSCP 分析方法的优化条件为凝胶质量浓度 22 g/dL,加入体积分数 6% 的甘油,在 98 °C 变性 10 min,4 °C 条件下 1×TBE 缓冲液中经 250 V 电泳 18 h,使用强碱液作显色剂。经优化的 SSCP 方法分析不同阶段腌制液样品的结果:得到榨菜不同腌制阶段(前、中与后期)的优势菌种分别为肠膜明串珠菌、植物乳杆菌和短乳杆菌,最后阶段为植物乳杆菌和 *Lactobacillus versmoldensis*。

致谢:本项目部分得到教育部留学回国基金的资助一并致谢。

参考文献(References):

- [1] 赵红丽, 夏洁如, 李一男, 等. 榨菜产业发展现状及前景[J]. 中国酿造, 2008, 20: 11- 13.
ZHAO Hong li, XIA Jie ru, LI Yi nan, et al. Development of mustard tuber industry[J]. **Chinese Brewing**, 2008, 20: 11- 13. (in Chinese)
- [2] 吴祖芳, 刘璞, 翁佩芳, 等. 榨菜加工中乳酸菌技术的应用及研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(8): 73- 76.
WU Zur fang, LIU Pu, WENG Pei fang, et al. Key technologies and development of lactic acid bacteria application in pickled mustard tuber processing[J]. **Food and Fermentation Industry**, 2005, 31(8): 73- 76. (in Chinese)
- [3] 吴祖芳, 刘璞, 翁佩芳. 传统榨菜腌制加工应用乳酸菌技术的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 2: 101- 103.
WU Zur fang, LIU Pu, WENG Pei fang. Study on application of lactic acid bacteria technology to the processing of traditional pickled mustard tuber[J]. **Sci Tech Food Industry**, 2008, (2): 101- 103. (in Chinese)
- [4] 施安辉, 周波. 蔬菜传统腌制发酵工艺过程中微生物生态学的意义[J]. 中国调味品, 2002, 5: 11- 15.
SHI An hui, ZHOU Bo. The micro ecological significance of the traditional greenstuff pickling process[J]. **Chinese Condi- ment**, 2002, 5: 11- 15. (in Chinese)
- [5] 刘玲, 吴祖芳, 翁佩芳, 等. 乳酸菌低盐腌制榨菜脆性与果胶含量的关系研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 137- 142.
LIU Ling, WU Zur fang, WENG Pei fang, et al. Study on the Relation between pectin content and brittleness of low salt pickled mustard tuber by lactic acid bacteria[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2009, 9(4): 137- 142. (in Chinese)
- [6] 燕平梅, 柴政, 薛文通, 等. 培养和非培养方法分析发酵白菜卤乳酸菌的多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 383- 388.
YE Ping mei, CHAI Zheng, XUE Wen tong, et al. Lactic acid bacteria diversity in fermented cabbage estimated by cul- ture dependent and independent methods[J]. **Acta Microbiological Sinica**, 2009, 49(3): 383- 388. (in Chinese)
- [7] 吴蕊, 田洪涛, 孙纪录, 等. 泡菜中乳酸菌优良菌株的分离鉴定及发酵性能的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2): 51- 54.
WU Rui, TIAN Hong tao, SUN Ji lu, et al. Isolation, Identification and fermentation characteristics study of lactic acid bacteria from pickling vegetable[J]. **Food Research and Development**, 2009, 30(2): 51- 54. (in Chinese)
- [8] 杭晓敏, 范小兵, 张和春, 等. DNA 指纹图谱在乳酸菌分类鉴定中的应用[J]. 中国微生物学杂志, 2005, 17(5): 327- 328.
HANG Xiao ming, FAN Xiao bin, ZHANG He chun, et al. The application of DNA fingerprinting in the identification of *Lactic acid bacteria*[J]. **Chinese Journal of Microbiology**, 2005, 17(5): 327- 328. (in Chinese)
- [9] 李海星, 曹郁生. 用于乳酸菌鉴定的几种分子生物学方法[J]. 江西科学, 2004, 22(5): 393- 396.
LI Hai xing, CAO Yu sheng. Molecular biological methods for identification of lactic acid bacteria[J]. **JiangXi Science**, 2004, 22(5): 393- 396. (in Chinese)
- [10] 赵文静, 李妍, 高鹏飞, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在乳酸菌定量检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 433- 437.
ZHAO Wen jin, LI Ye, GAO Peng fei, et al. Application of real time fluorescent quantitative PCR in quantitative detec- tion of lactic acid bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4): 433- 437. (in Chinese)
- [11] Schwiager F and Tebbe C C. A new approach to utilize PCR single strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, 64(12): 4870- 4876.
- [12] Hayashi K. Recent enhancements in SSCP[J]. **Biomolecular Engineering**, 1999, 14: 193- 196.
- [13] 周铭涛, 高洪, 肖鹏, 等. PCR SSCP 技术应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 06: 90- 93.
ZHOU Ming tao, GAO Hong, XIAO Pen, et al. Advance in PCR- SSCP and its application[J]. **Progress in Veterinary Medicine**, 2009, 14: 193- 196. (in Chinese)
- [14] 鲍立新, 李建政, 赵焱, 等. 厌氧活性污泥微生物群落的 SSCP 分析条件优化[J]. 科技导报, 2008, 02: 28- 31.
BAO Li xin, LI Jian zhen, ZHAO Yan, et al. Optimization of single strand conformation polymorphism technology for analyzing microbial community of anaerobic activated sludge[J]. **Science & Technology Review**, 2008, 02: 28- 31. (in Chinese)
- [15] 赵阳国, 任南琪, 王爱杰, 等. SSCP 技术解析硫酸盐还原反应器中微生物群落结构[J]. 环境科学, 2005, 26(4): 171- 176.
ZHAO Liang guo, REN Nan qi, WANG Ai jie, et al. Microbial community structure analyzed by single strand conforma- tion polymorphism technique in sulfate reducing reactor[J]. **Chinese Journal of Environmental Science**, 2005, 26(4): 171- 176. (in Chinese)
- [16] 刘小琳, 刘文君. 生物陶粒与生物活性炭上微生物群落结构的 PCR SSCP 技术解析[J]. 环境科学, 2007, 28(4): 924- 928.
LIU Xiao ling, LIU Wen jun. Microbial community structure in bio ceramics and biological activated carbon analyzed by PCR SSCP technique[J]. **Environmental Science**, 2007, 28(4): 924- 928. (in Chinese)
- [17] 王爱杰, 阚洪晶, 于振国, 等. SSCP 技术分析活性污泥微生物群落结构的条件优化及检验[J]. 微生物学通报, 2008, 07: 1164- 1169.
WANG Ai jie, KAN Hong jing, YU Zhen guo, et al. Optimal conditions and validation of single strand conformation pol- ymorphism technology for the analysis of microbial communities in activated sludge[J]. **Microbiology**, 2008, 07: 1164- 1169. (in Chinese)