

应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析

邢德峰,任南琪*

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院 哈尔滨 150090)

摘 要:变性梯度凝胶电泳(DGGE)是通过核酸片段对微生物群落进行研究,可以监测未培养细菌及其功能基因,被广泛地应用于微生物群落多样性和动态分析,并成为微生物分子生态学研究中的重要手段之一。文中论述了 DGGE 操作过程中遇到的常见问题,并提出了相应的解决方法。全面分析了样品预处理过程和 PCR 扩增效果对 DGGE 分析的影响,探讨了 DGGE 图谱的优化过程和图谱分析方法,并对 DGGE 的应用前景进行了综述。

关键词:DGGE;微生物群落;微生物分子生态学;图谱分析;排序

中图分类号:Q938.1 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)02-0331-05

变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术^[1]。1993 年 Muzer 等^[2]首次将 DGGE 技术应用于微生物生态学研究,并证实了这种技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性。DGGE 是通过核酸信息对微生物群落进行表征,比传统的菌种分离培养技术更快捷,并可以鉴定出未培养细菌。由于自然界中只有 0.1%~1% 的微生物通过常规方法能被培养^[3],所以与传统方法相比 DGGE 技术能够快速、准确地鉴定在自然生境或人工生境中的微生物种群,并进行复杂微生物群落结构演替规律、微生物种群动态、基因定位、表达调控的评价分析。由于 DGGE 具有可靠性强、重现性高、方便快捷等优点,短短的十年内,已经成为微生物群落遗传多样性和动态分析的强有力工具,并被广泛用于活性污泥、生物膜、土壤、底泥等环境样品中的微生物多样性检测和种群演替的研究^[4]。

DGGE 技术检测核酸序列是通过不同序列的 DNA 片段在各自相应的变性剂浓度下变性,发生空间构型的变化,导致电泳速度的急剧下降,最后在其相应的变性剂梯度位置停滞,经过染色后可以在凝胶上呈现为分散的条带。该技术可以分辨具有相同大小片段的序列差异,可以用于检测单一碱基的变化,微生物群落遗传多样性以及 PCR 扩增 DNA 片段的多态性。该技术主要操作过程如下:①样品预处理;②样品 DNA(或 RNA)提取及纯化;③16S rDNA 或基因片段的 PCR(或 RT-PCR)扩增;④预实验(DGGE 条件优化);⑤制胶;⑥样品的 DGGE 分析;⑦图谱分析;⑧条带序列分析。

应用 DGGE 分析微生物群落时,主要包括两个方面的内容,一是获得高分辨率的图谱,另外就是对图谱信息进行合理的生物学解释。近年来,许多研究人员在利用 DGGE 分析微生物群落时,经常遇到一些类似的问题。我们根据 DGGE

的操作过程,对一些常见问题进行了整理和分析,并提出了相关的解决办法。

1 DGGE 图谱的优化

利用 DGGE 分析复杂样品时,获得高分辨率的图谱是重要的前提条件。影响 DGGE 分辨率的因素很多。如 DNA(或 RNA)提取效果、PCR(或 RT-PCR)扩增效果、电泳时间、电泳温度、凝胶浓度、变性剂梯度、染色方法等。在 DGGE 的操作过程的每一个环节都会对后续分析产生影响并导致误差的产生,因此为了获得 DGGE 的最大分辨率,必须对全部环节进行优化。

1.1 样品处理

细胞是否充分裂解,以及核酸降解等因素,都会影响 DNA 或 RNA 的提取效果。选择适宜的核酸提取方法不仅可以提高产率,更重要的是可以更准确的反应微生物的实际群落构成状况,不同提取方法获得的 DNA,经 PCR-DGGE 分析可能会获得不同的群落结构指纹图谱。污泥或土壤的核酸提取通常包括粗提取和纯化两个步骤。根据细胞的裂解效率、DNA 得率、DNA 纯度和 DNA 的大小等指标来评价^[5]。裂解缓冲液的选择,对抑制物的去除和核酸的产率有影响。缓冲液中含有 EDTA 或高浓度的盐离子有助于提高 DNA 的产量,但纯度会有所降低。通常加聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)或十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)都可有效地降低腐殖酸的污染,CTAB 对 DNA 产量没有太大影响,但 PVPP 会导致 DNA 得率减少。细胞裂解的方法包括机械法(如玻璃珠、超声波和冻融等)、化学法(如 SDS、苯酚等)和酶法(如溶菌酶、蛋白酶 K 等)。Kreck 等^[6]认为玻璃珠+溶菌酶+SDS 组合可从土壤中获得较高产量和纯度的 DNA。应用溶菌酶不但可提高 DNA 的产量和纯度,也可减少腐殖酸的影响。蛋白酶 K 在有的实

基金项目:国家 973 项目(G2000026402)、国家自然科学基金(30470054)、国家杰出青年科学基金(50125823)

* 通讯作者。Tel 86-451-86282110 Fax 86-451-86282008 E-mail: rnfq@hit.edu.cn, ixdf@yahoo.com.cn

作者简介:邢德峰(1977-),男,黑龙江人,博士研究生,研究方向为环境生物技术。E-mail: ixdf@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-10-25;接受日期:2005-12-05;修回日期:2005-12-13

验中提高了 DNA 得率,但重复性不好^[7]。Frostegård 等^[5]发现超声和冻融法结合可有效的提取土壤 DNA。在使用超声波时需要考虑剪切作用对 DNA 的破坏。目前,这 3 种细胞裂解方法很少被单独使用,通常适当的组合可以获得更好的效果。在污泥和土壤样品核酸提取后由于一些腐殖酸等抑制物的干扰,导致在 PCR(或 RT-PCR)扩增困难,因此在核酸提取时需要对样品进行清洗,尽量降低抑制物浓度。如果在粗提后无法获得 PCR 扩增产物,需要进行核酸的纯化。为了降低提取过程的 DNA 损失和抑制物的干扰,也出现了一些替代方法,如用 Tris 和 Tween-20 对样品进行清洗后,直接 PCR 扩增,获得了较好的效果^[8]。

1.2 PCR 扩增优化

在 PCR(或 RT-PCR)扩增中,引物的选择、扩增程序和 PCR 产物的质量都会造成群落结构的分析偏差。在考虑扩增特异性时,也要保证扩增效率,应使所有模板以均等的几率被扩增,并且避免异源双链和单链 DNA 等人工产物的形成。对于复杂的环境样品采用降落 PCR 能够获得良好的特异条带。在分析微生物群落时,目前被广泛使用的细菌 16S rDNA 通用引物是 341f/534r(V3 区)、341f/926r(V3~V5 区)和 968f/1401r(V6~V8 区)。Watanabe 等^[9]报道利用不同的引物扩增 16S rDNA 靶序列,在 DGGE 分析中的结果是不同的,并且发现一部分种属的细菌,在 16S rDNA 的保守区域通常发生一定的变化,因此在引物中加入一些兼并性较好的稀有碱基,可以扩增出这些细菌的 16S rDNA。可见,在分析不同样品时通常需要选择适宜的引物,否则达不到预期的效果。扩增片段大小对 DGGE 分析影响也较大,200bp 左右的片段(V3 区)分离效果较好,但是在系统发育分析中往往是分类信息缺乏。450~500bp 左右片段(V3~V5 区或 V6~V8 区)的分类信息相对更为丰富,如果对于分类水平要求较高的,应该选择 968f/1401r 或 341f/926r,如果想获得更全面的实验结果也可以同时进行多组引物的 DGGE 分析。常规的 DGGE 电泳技术对于长度超过 500bp 的 DNA 片段的序列变化情况,只能有 50% 的检出率^[10]。应用“GC 夹板”技术可使检出率提高到 100%^[10,11]。设计种属或群的 16S rDNA(功能基因)特异引物,结合巢式 PCR-DGGE 技术,也被应用于种群的特异检测^[12]。在利用简并性引物扩增混合样品的功能基因时,进行巢式 PCR 扩增可提高特异性,减小偏差。

在利用 16S rDNA 通用引物进行复杂样品扩增过程中,经常会产生大量的 PCR 人工产物(如嵌合体、突变体、异源双链和单链 DNA 分子等),这些 DNA 分子会导致过高的评估生物多样性,对后续分析造成重大的影响。PCR 人工产物产生的频率随着循环数和模板浓度增加而增大,随着延伸时间增加而减小。通常嵌合体产生的频率比突变体低,但是高于异源双链的产生。异源双链 DNA 分子产生的频率随着种群多样性增加而增大。为了去除 PCR 产物中的异源双链 DNA 分子,Qiu 等^[13]采用 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶进行 PCR 产物同源双链纯化。这是基于异源双链的迁移速度比同源双链慢,但是比单链快的原理。Thompson 等^[14]利用修补 PCR

(Reconditioning PCR)的方法降低异源双链和单链分子的产生。该方法是样品在 20 个循环的扩增后,产物进行 10 倍稀释作为模板,在新的反应液中重新进行 3 个循环的修补扩增。由于引物相对模板的浓度较大,可以使引物容易与模板退火,避免异源双链的产生。Zhang 等^[15]比较了酶处理、修补 PCR 和聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化 3 种去除单链 DNA 分子的方法,认为加入 7mol/L 尿素的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(d-PAGE)可以很好的分离双链和单链 DNA 分子,回收双链 DNA 分子后进行 DGGE 分析,取得了良好的效果。此外,不同的 DNA 聚合酶对扩增效果也有影响,建议使用具有校对功能(Proof reading)和高保真(High fidelity)的聚合酶以防止引入人为突变。

1.3 凝胶和变性剂梯度的确定

聚丙烯酰胺凝胶浓度的确定取决于基因片段的大小,片段大小在 200bp 左右时,可用 8% 的凝胶,当片段在 500bp 时 6% 的凝胶是被广泛使用的。DGGE 对大于 500bp 的核酸序列的分离效果会降低。另外,采用一定梯度的聚丙烯酰胺凝胶进行分离,可以在一定程度上提高分辨效果,对于 200bp 的片段,可以采用 6%~12% 的聚丙烯酰胺。变性剂的选择是取决于样品的 T_m 值,复杂样品 T_m 差异较大,要分辨较多样品,变性剂梯度范围则较宽。可以利用垂直变性梯度实验来选择所要研究的 DNA 片段的解链性质,确定变性剂浓度梯度。在一定变性剂浓度梯度范围内,DNA 片段呈现出一条清晰的“S”型曲线。变性剂梯度范围应选曲线斜率较大的部分。通常选择水平胶的变性剂梯度范围为 30%(相当于 T_m 范围 10℃ 左右),对于 16S V3 rDNA 被广泛使用的变性剂梯度范围是 30%~60%,针对不同的样品需要进行调整。

1.4 电泳温度及时间的确定

最佳解链温度是由平行凝胶电泳实验确定的。在聚丙烯酰胺凝胶中对 DNA 片段进行 DGGE 分析时,通常要求电泳的温度要低于样品解链区域的 T_m 值。对大多数 DNA 片段 50℃~65℃ 是比较适合的。目前,一些程序被广泛应用于解链性质预测和模拟。如 WinMelt/MacMelt(<http://www.medprobe.com/es/melt.html>),TGGE-STAR(<http://www.charite.de/bioinf/tgge/>)和 Poland analysis(<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>)等软件^[16]。但是对于复杂的未知样品来说,解链温度通常是比较复杂的,无法利用软件获得一个标准的温度,因此我们通常是在 60℃ 左右进行优化。

电泳时间往往受样品的片段大小、凝胶浓度、变性剂梯度、电泳时的电压等因素的影响。因此如果改变了这些参数,电泳时间必须重新优化和调整,有时即使参数不变,但是样品不同,也需要进行优化。Muyzer 等^[1]建议利用时间进程实验(Time travel experiment)来确定最佳的电泳时间。具体方法是将待测样品以恒定的时间间隔在同一块凝胶上电泳,获得样品最大分辨率的时间为最佳电泳时间。

在优化 DGGE 电泳时间时,经常发现各个条带分离的电泳时间往往是不一致的。随着时间进程延续,低 T_m 区域条

带在较短的时间内分离较好,但是高 T_m 区域条带却分离不好。如果延长电泳时间后,高 T_m 区域条带分离较好,但是低 T_m 区域条带分离不好。这是由于随着电泳时间延长,已分离停留的条带还会迁移,在相应变性剂梯度范围出现条带的堆积,导致分离效果降低。另外,低 T_m 区域条带分离较好时,高 T_m 区域条带已经跑出凝胶。因此随着变性剂梯度方向增加一个丙烯酰胺凝胶梯度,形成双梯度-变性梯度凝胶电泳(DG-DGGE)则可以减缓条带的进一步迁移,提高分离效果。另外,16S rDNA 多溶解区域(Multiple melting domains, MMD)的存在会直接影响 DGGE 的分辨率,从而导致分析误差^[17]。

1.5 染色方法的选择

DGGE 电泳后需要进行核酸染色才能呈现出指纹图谱,最常用的是荧光染料染色法和银染法。近年来,新一代核酸荧光染料 SYBR Gold、SYBR Green I 和 SYBR Green II 得到了迅速的应用^[18],这类染料致突变性远低于溴化乙锭(Ethidium bromide, EB),几乎具有银染的灵敏度。由于该染料渗入凝胶的速度极快,无须脱色,因此使染色过程更加简便,并可直接进行凝胶的杂交分析。银染法灵敏度比 EB 高 200 倍,是目前最灵敏的方法。虽然,银染法无法进行后续的杂交分析。但是,银染法仍然是比较完善的染色方法,并被研究者广泛使用。Sanguinetti 法(快染)和 Bassam 法(慢染)两种硝酸银法在 DGGE 分析中应用的最为普遍。在用荧光染料染色后,如果感觉灵敏度太低,可以再进行银染。另外,为了挽救不理想或失败的银染,可以采用 10% ~ 15% 的硝酸溶液清除颜色,然后重新染色^[19]。如果背景过深可适当降低反应温度,延长漂洗时间及适当提前终止时间等等,一般均能获得较好的染色效果。通常可以根据研究的目和实际情况选择适宜的染色方法。

2 DGGE 图谱的分析

在获得 DGGE 图谱后,需要对图谱中条带的核酸序列进行分析,并对图谱进行统计学分析,阐述不同样品间的关系,从而合理的解释复杂的指纹图谱。随着 DGGE 的广泛应用,一些统计学方法也不断应用于图谱的分析。这些分析方法

从不同角度对图谱进行归纳总结。如解释群落结构和演替规律、种群遗传多样性、优势条带的位置和强度分析等。无论选择哪种分析方法,对数据分析时得到的结论都应该是一致的。

2.1 DGGE 图谱的统计分析

目前很多凝胶分析软件都可以对 DGGE 图谱中的条带位置和强度进行简单分析,如 Gel-Pro Analyzer、Quantity One 和 ImageTool 等软件。无论如何,利用条带的强度,是不能代表细菌数量的,只能根据条带的强度表示相对的趋势,但是这种趋势有时还是存在误差的。DGGE 图谱可以作为一个多元变量数据,因此可以应用多元变量的统计学方法分析。应用这些统计学方法对不同微生物群落样品的 DGGE 结果进行分析,可以研究群落之间的相互关系。排序(Ordination)和分类(Classification)是群落生态学中两种主要的多变量分析方法。目前,对 DGGE 图谱分析中,较早应用的是聚类分析(Clustering)方法。聚类分析包括凝聚分层聚类分析、分解分层聚类和分非层聚类。目前,应用较多的是凝聚分层聚类分析中的非加权算术平均法(UPGMA)^[20]。有些凝胶分析系统整合了聚类分析功能(如 Bio-rad Gel Document 3000),通过自动或手动选带,可以生成聚类树。也可以手动选带生成矩阵数据,输入统计软件后完成聚类分析。排序方法也被广泛应用于群落分析,表 1 为常见的排序方法(<http://ordination.okstate.edu/overview.htm>)。近几年,多维尺度分析(Multidimensional scaling, MDS)和主成分分析(Principal-component analysis, PCA)在 DGGE 图谱分析中应用较多^[21]。主坐标分析(PcoA)是经典的公制尺度分析方法,在生物学中应用的较少,非公制多维尺度分析(NMDS)应用较多,而利用主成分分析解释 DGGE 图谱呈上升趋势。根据 DGGE 图谱手动选带后生成矩阵数据,输入统计软件 SAS、SPSS、MiniTab 和 Statistics 等均可以进行 MDS 和 PCA 分析。近来,一些研究者认为,不利用 PCA 等统计分析方法,可以直接观察到 DGGE 图谱不同样本间的显著差异,所以不需要进行统计学分析。如果样本很多, DGGE 条带复杂,很难定义样本间的相似性,这时必须借助于统计学方法。所以要根据研究目的和具体情况选择适宜的分析方法。

表 1 排序方法

Classification of ordination	Table 1 Ordination methods					
	Indirect gradient	Distance-based	Eigenanalysis -base	Direct gradient	Linear model	Unimodal model
Polar ordination (PO) (Bray-Curtis ordination)	●	●				
Principal coordinates analysis (PcoA)	●	●				
Nonmetric multidimensional scaling (NMDS)	●	●				
Principal components analysis (PCA)	●		●		●	
Correspondence analysis (CA)	●		●			●
Detrended correspondence analysis (DCA)	●		●			●
Redundancy analysis (RDA)				●	●	
Canonical correspondence analysis (CCA)				●	●	
Detrended canonical correspondence analysis (DCCA)				●		●

2.2 DGGE 图谱的核酸序列分析

为了了解微生物群落结构和系统进化关系,通常需切取 DGGE 图谱中的优势条带,获得序列信息。Vallaey 等^[21]发现 DGGE 法并不能对样品中所有的 DNA 片段进行分离。一个条带经常含有多种序列,所以在切取条带重新扩增后,需要对 PCR 产物进行克隆,然后测序。即使采取了 d-PAGE 和修补 PCR 方法,在一个条带中也可能包含共迁移的双链和单链 DNA 分子。另外,在没有人工产物产生时,较长的片段和具有高 T_m 片段,较短的片段和具有低 T_m 片段也会发生共迁移。这时我们无法确定选择多少克隆测序,以及哪个克隆是迁移位置的真实序列,因此,需要对克隆进行进一步验证。从一个切取条带的克隆文库中随机挑选一些克隆用带 GC 夹的引物扩增,每个克隆的 PCR 产物再进行 DGGE 分析,检查与切取条带的迁移位置是否一致,选择一致迁移位置的克隆进行测序分析。如果条带过于复杂,则需要进一步提高 DGGE 的分离效果。也可以选择种属或者菌群的特异引物选择性扩增样品,这样可以降低样品的复杂性,从而降低 DGGE 分析时条带的多样性^[23, 24]。在获得条带的序列信息后,可用 CHECK-CHIMERA 软件(<http://35.8.164.52/cgiis/chimera.cgi?su=SSU>)进行嵌合序列评估,然后在 GenBank 中进行比对分析,搜索最相似的序列。将全部序列对齐后构建系统进化树,得到待测样品的系统进化或分类信息。

3 DGGE 的应用前景

自 Handelsman 等^[25]1998 年提出元基因组学(环境基因组, Metagenomics)后,利用现代基因组技术进行自然或人工环境的微生物群落的研究成为热门方向。目前,元基因组学手段已经被应用于海洋和土壤微生物群落的研究^[26, 27]。来源于环境中未培养微生物的功能基因甚至是基因组学研究拓宽了微生物群落的研究领域。DGGE 技术可以监测复杂环境中特异的功能基因及其表达研究,为元基因组学研究提供有利信息和基因筛选方案。此外 DGGE 分析中获得的核酸序列还可以进一步应用于荧光原位杂交、DNA 芯片和实时定量 PCR(Real-time PCR)等技术,为特异种群的快速检测做出贡献。

尽管 DGGE 电泳技术在研究群落动态和多样性方面存在很多优势,但是该技术无法给出代谢活性、细菌数量和基因表达水平方面的信息。因此必须与其它技术相结合才能弥补不足。Biolog 和酶学分析均可以提供群落代谢活性特征。此外荧光原位杂交技术可以提供细菌的相对数量信息,稳定同位素探针的原位杂交技术,可以提供代谢信息,得到群落结构和功能关系^[28]。通过 16S rDNA 或基因文库也是分析不同种群的相对数量的一种方法。利用 Real-time PCR 扩增特异种属的 16S rRNA 或功能基因,可以对群落的细菌数量和基因表达水平进行定量。因此,与其他分子生物学技术的结合后,可以进一步发挥 DGGE 技术的效能,更好的为微生物群落结构和功能分析服务。

参 考 文 献

- [1] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, **73**: 127–141.
- [2] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695–700.
- [3] Ward DM, Bateson MM, Weller R, et al. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv Microb Ecol*, 1992, **12**: 219–286.
- [4] 邢德峰,任南琪,宋业颖,等. DG-DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及其种群多样性. *生态学报*, 2005, **25**(7): 296–301.
- [5] Frostegård Å, Courtois S, Ramisse V, et al. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 5409–5420.
- [6] Krsek M, Wellington EMH. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J Microbiol Methods*, 1999, **39**: 1–16.
- [7] Zhou J, Brouns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 316–322.
- [8] Purohit HJ, Kapley A, Moharikar AA, et al. A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *J Microbiol Methods*, 2003, **52**: 315–323.
- [9] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J Microbiol Methods*, 2001, **44**: 253–262.
- [10] Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**: 3131–3145.
- [11] Sheffield VC, Cox DR, Myers RM. Attachment of a 40bp G + C rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 232–236.
- [12] Shabir AD, Kuenen JG, Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 2325–2330.
- [13] Qiu X, Wu L, Huang H, et al. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 880–887.
- [14] Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 2083–2088.
- [15] Zhang X, Yan X, Gao P, et al. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the

- amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *J Microbiol Methods*, 2005, **60**:1–11.
- [16] 宫曼丽,任南琪,邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用. *微生物学报*, 2004, **44**(6):845–848.
- [17] Kisand V, Wikner J. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J Microbiol Methods*, 2003, **54**:183–191.
- [18] Akkermans AD, Elsas JD, Bruijn FJ. Molecular microbial ecology manual. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [19] 陈涛,刘欣,曹海燕,等. DNA 银染的清除与重染. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27**(4):437.
- [20] Yang Y, Dungan RS, Ibekwe AM, *et al.* Effect of organic mulches on soil bacterial communities one year after application. *Biol Fertil Soils*, 2003, **38**:273–281.
- [21] Araya R, Tani K, Takagi T, *et al.* Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, **43**:111–119.
- [22] Vallaëys T, Topp E, Muyzer G, *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, **24**:279–285.
- [23] Pang X, Ding D, Wei G, *et al.* Molecular profiling of *Bacteroides* spp. in human feces by PCR-temperature gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods*, 2005, **6**:1413–1417.
- [24] Calvo L, Vila X, Abella CA, *et al.* Use of the ammonia-oxidizing bacterial-specific phylogenetic probe Nso1225 as a primer for fingerprint analysis of ammonia-oxidizer communities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**:715–721.
- [25] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 1998, **5**:R245–R249.
- [26] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, **304**:66–74.
- [27] Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, *et al.* Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**:4301–4306.
- [28] Ginige MP, Hugenholtz P, Daims H, *et al.* Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**:588–596.

Common problems in the analyses of microbial community by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

XING De-feng, REN Nan-qi*

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) can describe microbial communities based on partial sequences of nucleic acid and monitor uncultured bacterium and its functional genes. It is well-established molecular tools in microbial molecular ecology that allows the study of diversity and dynamics of microbial communities. Here, common issues in the analyses of microbial community by DGGE were raised, and the feasible resolving methods were introduced in this paper. The effects of samples pretreatment and PCR amplification on DGGE analysis were evaluated. Optimization and statistical analysis of DGGE profiles were discussed. Finally, prospect of DGGE for understanding microbial communities were reviewed.

Keywords : DGGE; Microbial community; Microbial molecular ecology; Profile analysis; Ordination

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G2000026402); National Natural Science Foundation of China (30470054); National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (50125823)

* Corresponding author. Tel: 86-451-86282110; Fax: 86-451-86282008; E-mail: rnq@hit.edu.cn, ixdf@yahoo.com.cn

Received: 25 October 2005/Accepted: 5 December 2005/Revised: 13 December 2005