

海洋微生物学及实验

第28章 海洋微生物多样性研究方法 ——PCR技术

参考书:

Munn. Marine Microbiology (MM): Chapter 2

Prescott's Microbiology (PM): Chapters 2, 29



课程内容与重点:

回顾——

海洋微生物多样性样研究方法

- 富集培养
- 筛选分离（平板稀释法、划线法等）
- 显微镜技术（光学显微镜、荧光显微镜、电镜等）

本节课——

DNA分子鉴定的方法:

- 理解**PCR**基本原理**
- 初步了解PCR在海洋微生物分子鉴定的应用

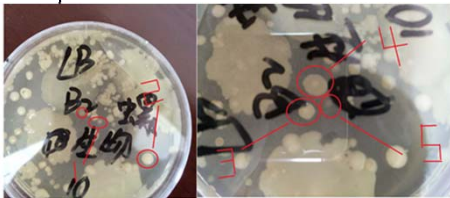
为什么需要DNA分子鉴定？



- 菌落大小、颜色相近
- 细胞小 **1~10 μm**
- 形态生理生化特征相近

形态特征

- 大小
- 颜色



生理生化特征

- 碳源的利用
- 酶活性

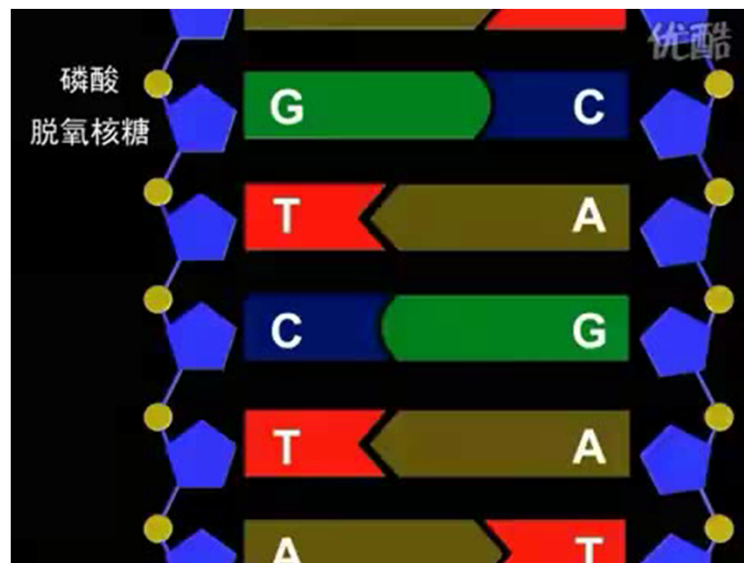
系统发生体系

- **DNA**序列

➔ DNA序列差异

↓
物种间的相似性
Similarity

DNA基础知识的回顾

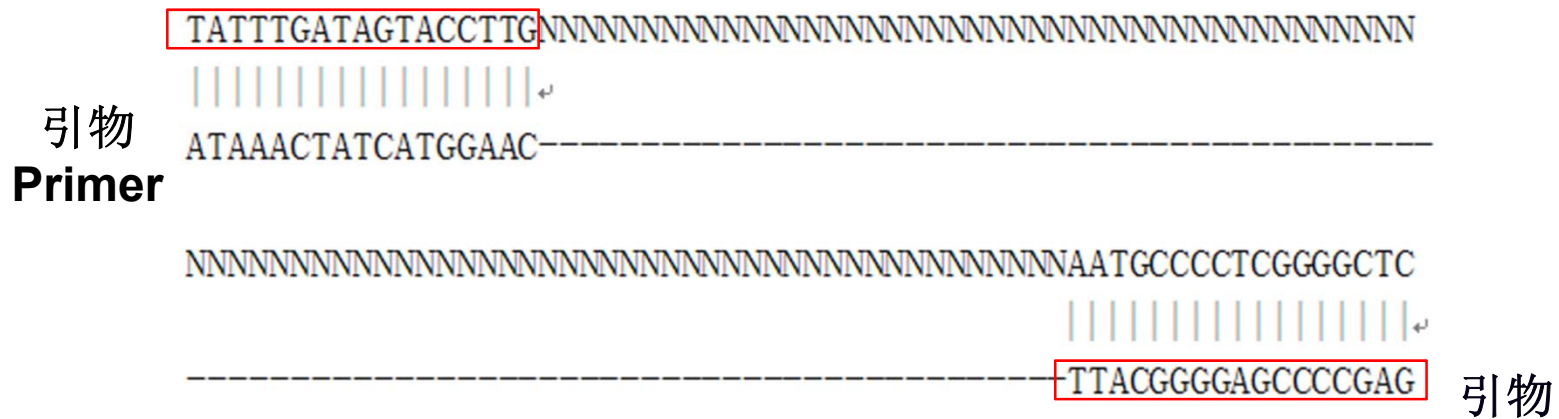


DNA (脱氧核糖核酸, DeoxyriboNucleic Acid)

- DNA, 由四种脱氧单核苷酸A(腺嘌呤, Adenine)、T(胸腺嘧啶, Thymine)、C(胞嘧啶, Cytosine)、G (鸟嘌呤, Guanine)组成, 简称为 碱基
- DNA单链按由ATCG组成后, 按碱基配对互补原则 (A&T; C&G) 形成双链 (一级结构); 双链螺旋形成二级结构

AAA TCA GTC AAA AC TTT CAA CAA TGG ATC CTC TTGGT

- **ATCG**四种碱基的排序形成了物种间的多样性 (**Diversity**)
- **DNA**序列相似性越高，亲缘关系就越近；
- **16S rDNA**——核糖体DNA序列，对细菌分类鉴定的标识性序列，长度1500碱基；不同细菌的16S rDNA由**已知保守序列**和**未知可变序列**组成，



- 通过PCR技术，从细菌的全基因组中复制扩增16S rDNA，经测序获得序列信息，到GenBank数据库进行比对，对细菌进行分类鉴定

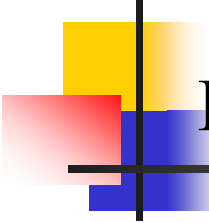
PCR 技术

➤ PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction)定义 聚合酶链式反应，是一种分子生物学技术，用于放大特定的DNA片段，可看作生物体外的特殊DNA复制过程。

➤ PCR基本原理：PCR仪是一个温控设备



1. 变性——95 °C，**待测基因组DNA**解旋，双链呈单链；
2. 退火——降温至55 °C时，**引物**与单链按碱基互补配对原则结合 (A&T G&C)
3. 延伸——升温至72 °C时，**DNA聚合酶**按单链的排序依次添加**脱氧单核苷酸**形成互补链



PCR (Polymerase Chain Reaction) 聚合酶链式反应



变性
Denaturation
95 °C

退火
Annealing
55 °C

延伸
Extension
72 °C

PCR 体系

Reaction Buffer

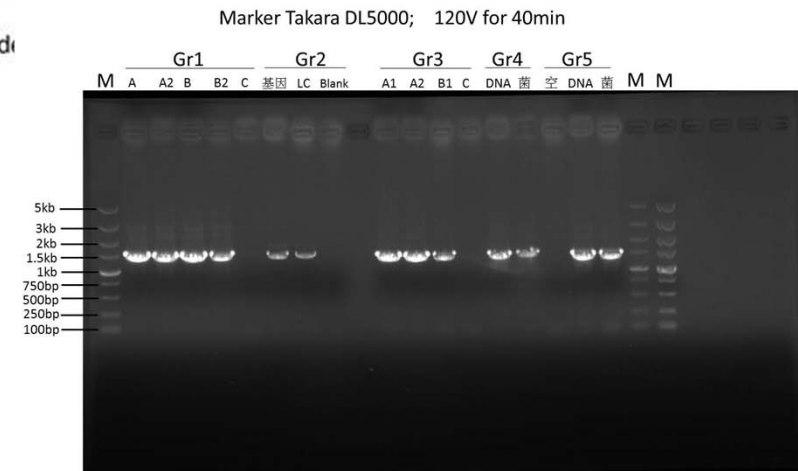
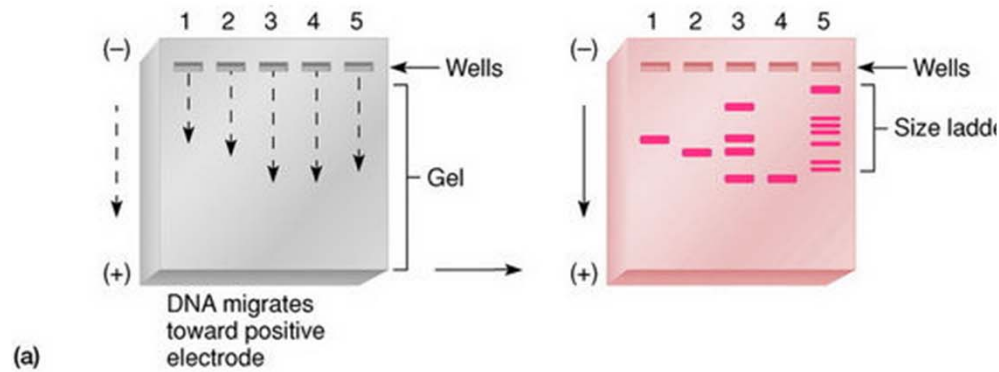
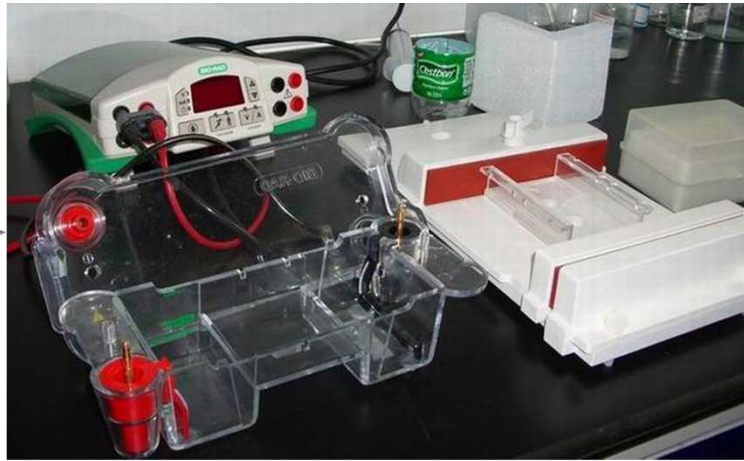
Polymerase

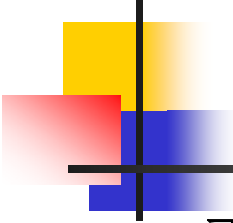
Primers

dNTPs (ATCG)

Template







小结与思考

本节课——

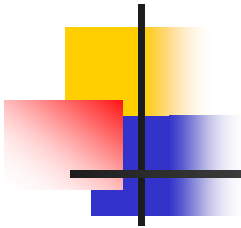
DNA分子鉴定的方法：

➤ 理解**PCR**基本原理**

➤ PCR在海洋微生物分子鉴定的应用

思考题：

利用**PCR**技术扩增目的基因，其原理与细胞内**DNA**复制类似。请回顾你所学的细胞内**DNA**复制过程，指出它们的**异同点**



教学特点与反思

海洋微生物学与实验

- 在零碎知识点的整合与贯通过程中，加强基础知识的理解与掌握
- 在理论知识与教学实验的交叉互作中，提升科研思考、操作能力
- 基础知识理解与实践操作掌握的基础上，英文专业词汇逐步渗入

敬请各位同仁多提宝贵意见！ 谢谢！