



# 中华人民共和国水产行业标准

SC/T 9451—2025

## 淡水池塘底质微生物菌群结构多样性 测定 变性梯度凝胶电泳法

Determination of the diversity of microbial community structure in the  
sediment of freshwater ponds by denaturing gradient  
gel electrophoresis method

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部 发布





## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会渔业资源分技术委员会(SAC/TC 156/SC 10)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院淡水渔业研究中心、上海海洋大学、全国水产技术推广总站。

本文件主要起草人：孙盛明、戈贤平、胡红浪、朱健、张成锋。



# 淡水池塘底质微生物菌群结构多样性测定 变性梯度凝胶电泳法

## 1 范围

本文件描述了用变性梯度凝胶电泳法测定淡水养殖池塘底质微生物菌群结构多样性的原理、试剂和材料、仪器设备、样品、试验步骤、数据处理。

本文件适用于淡水养殖池塘的底泥微生物菌群结构多样性检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法
- GB/T 24769 工业用丙烯酰胺
- GB/T 32725 实验室测定微生物过程、生物量与多样性用土壤的好氧采集、处理及贮存指南
- SC/T 9102.3 渔业生态环境监测规范 第3部分：淡水

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**变性梯度凝胶电泳 denatured gradient gel electrophoresis, DGGE**

根据 DNA 片段的熔解性质而使之分离的凝胶系统。

## 4 原理

首先提取样品总 DNA，再利用 PCR 扩增 DNA 样品中的 16S rDNA 基因片段。扩增的 DNA 片段通过变性处理，使其变性梯度凝胶电泳分离。已经扩增和变性的 DNA 样品通过电泳在凝胶中移动并形成 DNA 条带。对变性梯度凝胶进行染色和可视化，可以观察到不同的 DNA 条带，每个 DNA 条带代表一个具有特定 DNA 序列的微生物。通过比较不同样品中的 DNA 条带，可以推断微生物群落的差异和结构。

## 5 试剂和材料

**警示——丙烯酰胺具有神经毒性，按照 GB/T 24769 规定的注意事项和保存事项操作。**

除非另有说明，在分析中仅使用分析纯及以上的试剂，以及符合 GB/T 6682 规定的一级水。

### 5.1 试剂

- 5.1.1 氯化钠(NaCl)。
- 5.1.2 丙烯酰胺(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO)。
- 5.1.3 双丙烯酰胺(C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。
- 5.1.4 蛋白酶 K(C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O)。
- 5.1.5 氢氧化钠(NaOH)。
- 5.1.6 过硫酸铵(H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>)。
- 5.1.7 十二烷基硫酸钠(SDS)。
- 5.1.8 尿素(CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O)。

- 5.1.9 硝酸银( $\text{AgNO}_3$ )。
- 5.1.10 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)。
- 5.1.11 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 5.1.12 乙二胺四乙酸(EDTA)。
- 5.1.13 琼脂糖:电泳级。
- 5.1.14 氯仿( $\text{CHCl}_3$ )。
- 5.1.15 异戊醇( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ )。
- 5.1.16 异丙醇( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ )。
- 5.1.17 乙酸( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )。
- 5.1.18 乙醇( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ )。
- 5.1.19 四甲基乙二胺(TEMED)。
- 5.1.20 甲酰胺( $\text{CH}_3\text{NO}$ ):去离子。
- 5.1.21 福尔马林:含 37%~40%甲醛。
- 5.1.22 盐酸( $\text{HCl}$ ):优级纯,浓度 36%。
- 5.1.23 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP):2.5 mmol/L。

## 5.2 材料

- 5.2.1 Tris-HCl:称取 121 g 三羟甲基氨基甲烷(5.1.11),加 800 mL 水溶解后,用盐酸(5.1.22)调节溶液 pH 至 8.0,加水定容至 1 L。
- 5.2.2 EDTA 溶液:称取 372.2 g 乙二胺四乙酸(5.1.12),加约 800 mL 水溶解后,用盐酸(5.1.22)调节溶液 pH 至 8.0,加水定容至 1 L。
- 5.2.3 DNA 抽提缓冲液:分别称取 12.11 g 三羟甲基氨基甲烷(5.1.11)、7 g 氯化钠(5.1.1)、7.464 g 乙二胺四乙酸(5.1.12)和 20 g 十六烷基三甲基溴化铵(5.1.10),加约 900 mL 水,用盐酸(5.1.22)调节溶液 pH 至 8.0,加水定容至 1 L。
- 5.2.4 蛋白酶 K 溶液:称取 0.2 g 蛋白酶 K(5.1.4),溶于 10 mL 水中,储存于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  下备用。
- 5.2.5 10% SDS:称取 100 g 十二烷基硫酸钠(5.1.7)缓慢加入含有 0.9 L 水的烧杯中,搅拌直至完全溶解,加水定容至 1 L。
- 5.2.6 氯仿-异戊醇(1:24):在通风橱中,量取 240 mL 异戊醇(5.1.15)缓慢加入 10 mL 氯仿(5.1.14)中,混匀。
- 5.2.7 75%乙醇溶液:量取 750 mL 乙醇(5.1.18)缓慢加入 200 mL 水中,摇匀,加水定容至 1 L。
- 5.2.8 TE 缓冲液:分别吸取 10 mL Tris-HCl(5.2.1)和 1 mL 1 mol/L EDTA 溶液(5.2.2)混合均匀。
- 5.2.9 50×TAE 缓冲液:分别称取 242 g 三羟甲基氨基甲烷(5.1.11)和 37.2 g 乙二胺四乙酸(5.1.12),吸取 57.1 mL 乙酸(5.1.17),加水溶解并定容至 1 L,现用现配。
- 5.2.10 1×TAE 缓冲液:吸取 20 mL 50×TAE 缓冲液(5.2.9),加 980 mL 水稀释,现用现配。
- 5.2.11 1%琼脂糖凝胶:称量 1 g 琼脂糖(5.1.13)于锥形瓶中,加入 100 mL 1×TAE 缓冲液(5.2.10),轻摇混匀后微波炉中火加热至沸腾,取出摇匀。
- 5.2.12 40%丙烯酰胺溶液:称取 38.93 g 丙烯酰胺(5.1.2),1.07 g 双丙烯酰胺(5.1.3)于 100 mL 棕色容量瓶中,加水至 60 mL,加热溶解,加水定容至 100 mL。
- 5.2.13 10%过硫酸铵溶液:称取 1 g 过硫酸铵(5.1.6),加水溶解并定容至 10 mL,现用现配。
- 5.2.14 35%变性梯度凝胶:称取 2.94 g 尿素,分别吸取 4 mL 40%丙烯酰胺溶液(5.2.12)、0.4 mL 50×TAE 缓冲液(5.2.9)、2.8 mL 甲酰胺(5.1.20)、120  $\mu\text{L}$  10%过硫酸铵溶液(5.2.13)和 10  $\mu\text{L}$  四甲基乙二胺(5.1.19),混合均匀,加水至 20 mL。
- 5.2.15 55%变性梯度凝胶:称取 4.62 g 尿素,分别吸取 4 mL 40%丙烯酰胺溶液(5.2.12)、0.4 mL

50×TAE 缓冲液(5.2.9)、4.4 mL 甲酰胺(5.1.20)、120  $\mu$ L 10%过硫酸铵溶液(5.2.13)和 10  $\mu$ L 四甲基乙二胺(5.1.19),混合均匀,加水至 20 mL。

5.2.16 固定液:分别吸取 50 mL 乙醇(5.1.18)和 2.5 mL 乙酸(5.1.17),均匀混合,加水定容至 500 mL。

5.2.17 银染液:称取 1 g 硝酸银(5.1.9),吸取 0.75 mL 福尔马林(5.1.21),均匀混合,加水定容至 500 mL。

5.2.18 显色液:称取 7.5 g 氢氧化钠(5.1.5),吸取 2.5 mL 福尔马林(5.1.21),均匀混合,加水定容至 500 mL。

5.2.19 终止液:分别吸取 50 mL 乙醇(5.1.17)和 2.5 mL 乙酸(5.1.17),均匀混合,加水定容至 500 mL。

## 6 仪器设备

6.1 变性梯度凝胶电泳仪。

6.2 恒温摇床。

6.3 天平:感量 0.001 g

6.4 凝胶成像分析仪。

6.5 梯度 PCR 仪。

6.6 低温离心机:最低温度不高于 4  $^{\circ}$ C,转速不低于 12 000 r/min。

6.7 网筛:5 mm 网孔。

6.8 微波炉。

6.9 冰箱:−20  $^{\circ}$ C。

6.10 高压灭菌锅。

6.11 恒温水浴锅。

6.12 涡旋振荡器。

## 7 样品

7.1 按照 SC/T 9102.3 规定的方法采集池塘底泥样品,在池塘四角和中央 5 个区域的上层(0 cm~10 cm)、中层(10 cm~20 cm)、下层(20 cm~30 cm)、底层(30 cm~40 cm)底泥分别取样。单次取样不少于 200 g。采集的样品于无菌容器中保存。

7.2 在超净工作台中,按照 GB/T 32725 中的方法对样品进行预处理:首先除去样品中的植物、可见动物和石粒等杂物。将底泥在潮湿状态下过 5 mm 筛网。过筛时缓慢翻动底泥,避免过筛时间过长导致底泥水分丧失。均匀混合每份样品后,应立即开始试验。

7.3 如未能立即检测,预处理后的样品应存于无菌容器中,于−20  $^{\circ}$ C 环境下冷冻保存。

## 8 试验步骤

### 8.1 总 DNA 提取

8.1.1 称取 7.2 处理后底泥样品约 1 g 置于 10 mL 无菌离心管中,加入 4 mL DNA 抽提缓冲液(5.2.3)和 200  $\mu$ L 0.02 g/mL 蛋白酶 K 溶液(5.2.4),充分混匀。37  $^{\circ}$ C,30 min,每隔 10 min 混匀 1 次。

8.1.2 向离心管中加入 800  $\mu$ L 10% SDS(5.2.5),充分混匀。65  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,每隔 15 min 混匀 1 次。室温下,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移至一新的 2 mL 无菌离心管中。

8.1.3 加入与离心管中液体等体积的氯仿-异戊醇(1:24)(5.2.6),充分混匀。室温下,12 000 r/min 离心 10 min。

8.1.4 将上清液转移至一新的无菌离心管中,加入等体积氯仿-异戊醇(1:24)(5.2.6),充分混匀。室温下,12 000 r/min 离心 10 min。

8.1.5 将上清液转移至一新的无菌离心管中,加入离心管中液体 0.6 倍体积的预冷的异丙醇(5.1.15),

充分混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 20 min。室温下, 12 000 r/min 离心 10 min。

8.1.6 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇溶液(5.2.7)洗涤 DNA 沉淀。室温下, 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 风干, 40  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液(5.2.8)溶解 DNA 沉淀, 得到溶液 A。

8.1.7 取 2 mL 溶液 A(8.1.6), 进行琼脂糖凝胶(5.2.11)电泳检测。若提取的样品 DNA 泳道稳定且清晰, 且出现较亮的条带, 表明成功提取到了完整的总 DNA。

8.1.8 剩余的溶液 A(8.1.6)于  $-20^{\circ}\text{C}$  环境下冷冻保存。

## 8.2 PCR 扩增

### 8.2.1 扩增引物

以提取的溶液 A(8.1.6)为模板 DNA, 采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 对 16S rDNA 高变区序列进行扩增。引物核酸序列见附录 A。

### 8.2.2 扩增体系

5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR buffer, 3.2  $\mu\text{L}$  dNTP(2.5 mmol/L)(5.1.23), 0.4  $\mu\text{L}$  rTaq(5 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  GC-338F(20  $\mu\text{mol/L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  518R(20  $\mu\text{mol/L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  模板 DNA 溶液 A(8.1.6), 加无菌水至 50  $\mu\text{L}$ 。

### 8.2.3 扩增程序

94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  复性 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环; 最终 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。得到扩增产物 B。

### 8.2.4 产物检测

扩增产物 B 用 1% 琼脂糖凝胶(5.2.11)电泳检测。若电泳条带亮而无拖尾, 证明扩增效果良好。

### 8.2.5 凝胶回收

采用凝胶回收纯化试剂盒从琼脂糖凝胶中回收纯化 PCR 产物, 得到产物 C。

## 8.3 DGGE 分析

8.3.1 取 10  $\mu\text{L}$  产物 C(8.2.5)进行 DGGE 检测。采用 35% 变性梯度凝胶(5.2.14)和 55% 变性梯度凝胶(5.2.15), 化学变性剂为尿素(5.1.8)和甲酰胺(5.1.20), 在 1 $\times$ TAE 缓冲液(5.2.10)中 150 V、60  $^{\circ}\text{C}$  下电泳 4 h。

8.3.2 电泳完毕后, 采用银染法染色, 具体步骤如下:

- 在固定液(5.2.16)中固定 15 min;
- 20 s 和 2 min 各用水清洗一次;
- 在银染液(5.2.17)中染色 15 min;
- 20 s 和 2 min 各用水清洗一次;
- 在显色液(5.2.18)中显色 5 min ~ 7 min;
- 在终止液(5.2.19)中终止反应。

8.3.3 采用凝胶成像系统, 将凝胶放置于紫外光下成像拍照。

## 8.4 成像条带分析

### 8.4.1 条带回收

用灭菌的手术刀切下待回收 DGGE 条带, 采用 PCR 产物纯化回收试剂盒回收目的条带, 得到产物 D。以 2  $\mu\text{L}$  产物 D 为模板, 用不含 GC 夹的 338F/518R 为引物进行 PCR 扩增。

### 8.4.2 条带扩增

PCR 扩增体系: 5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR buffer, 4  $\mu\text{L}$  dNTP(2.5 mmol/L)(5.1.23), 0.5  $\mu\text{L}$  rTaq(5 U/ $\mu\text{L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  338F(20  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  518R(20  $\mu\text{mol/L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  产物 C(8.2.5), 加无菌水至 50  $\mu\text{L}$ 。

PCR 扩增程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 30 个循环; 最后, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。特征条带扩增得到扩增产物 E。

### 8.4.3 条带拍照

紫外线照相系统拍摄产物 E 得到 DGGE 图谱。每条泳道为一个样品, 其条带数反映底泥中细菌种群

的数量,而条带的亮度则反映该种细菌的数量。

9 数据处理

9.1 种类多样性指数

种类多样性指数又称香农-威纳多样性指数,按式(1)计算,计算结果保留小数点后 3 位有效数字。

$$H = - \sum_{i=1}^S (n_i/N) \ln (n_i/N) \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $H$  —— 香农-威纳多样性指数;
- $S$  —— 每个样品的条带数目(丰度);
- $n_i$  —— 为第  $i$  种种群的个体数;
- $N$  —— 单一泳道上所有条带的丰度。

9.2 均匀度指数

均匀度指数按式(2)计算,计算结果保留小数点后 3 位有效数字。

$$E = H/\ln S \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- $E$  —— 均匀度指数;
- $H$  —— 香农-威纳多样性指数;
- $S$  —— 每个样品的条带数目(丰度)。

9.3 丰富度指数

丰富度指数按式(3)计算,计算结果保留小数点后 3 位有效数字。

$$S = \frac{D-1}{\log_2 N} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- $S$  —— 物种丰富度指数;
- $D$  —— 样品中微生物物种总数;
- $N$  —— 样品生物总个体数。

附 录 A  
(资料性)  
扩增引物序列

PCR 扩增引物参考序列：

338F：5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'；

518R：5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'；

GC-338F：5'-CGCCCGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGCCTACG GGAG-GCAGCAG-3'。

---