

# 聚合酶链式反应(PCR)技术在环境监测中的应用

高琼 (山西省环境监测中心站, 山西太原 030027)

**摘要** 聚合酶链式反应(PCR)技术因其特异性强、灵敏度高以及快速简便等优点,广泛应用于环境监测。综述了改进PCR新技术:逆转录PCR、多重PCR、实时定量PCR、免疫捕捉PCR以及PCR-DGGE的原理及其在环境监测中的应用现状。PCR技术在分子水平上进行环境微生物监测、污染物的生物损伤作用、群落结构多样性分析提供了有力的试验手段,具有广泛的应用前景。

**关键词** 聚合酶链式反应;环境监测;应用

**中图分类号** S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)36-12825-04

## Application of Polymerase Chain Reaction (PCR) Technology in Environmental Monitoring

**GAO Qiong** (Shanxi Environmental Monitoring Center Station, Taiyuan, Shanxi 030027)

**Abstract** Because of polymerase chain reaction (PCR) technology's specificity, high sensitivity, as well as the advantages of quick and easy detection is widely used in the environment monitoring. The principles and the application status quo in environmental monitoring of the improved PCR new technologies such as the reverse transcription PCR, the multiplex PCR, the real-time quantitative PCR, the immunocapture PCR, as well as the denaturing gradient gel electrophoresis technique was reviewed. PCR technology as a powerful experimental tool used for environmental microbial testing, biological damage, microbial structure and diversity analysis at the molecular level, has a broad application prospect.

**Key words** Polymerase chain reaction; Environmental monitoring; Application

随着现代工农业经济发展,环境污染与生态破坏引起了生物个体的基因水平,生物的重组以及环境中物种分布、种群的变化,严重威胁人类和其他生物的正常生存与发展。环境的各个组成部分中,生物是核心,最具有能动性和灵敏性。应用生物指标监测环境污染,能反映出环境污染对生物的直接影响,更有益于对环境的综合评价。随着现代分子生物学技术的发展,环境污染监测技术也逐渐由宏观向微观转变,在分子水平上研究致病微生物与指标微生物、有害物质在生物体内的损伤机理、微生物群落的变化。

聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是20世纪80年代中期发展起来的体外核酸扩增技术,该技术具有快速、敏感、简便、产率高、自动化、特异性强、原始样品质量要求低等优点,得到了生命科学界的普遍认可。近年来,随着PCR技术的不断发展与完善,PCR已从只能单纯扩增已知两端序列之间的DNA片段,发展到应用于各个领域的几十种PCR研究方法。笔者就目前应用广泛的PCR技术及其在环境监测方面的应用进行了综述。

## 1 PCR技术基本原理

PCR技术是一种在生物体细胞外通过酶促合成特异DNA或DNA片段的方法,又称多聚酶链反应、无细胞克隆技术等<sup>[1]</sup>。该技术利用两段寡核苷酸作为反应引物,以及4种脱氧核苷三磷酸dNTP、DNA聚合酶作为反应物,将提取到的DNA(称为模板DNA)片段精确扩增的方法。

PCR反应包括双链DNA(模板DNA)加热变性为单链、引物与模板DNA单链结合以及在DNA聚合酶作用下的引物延伸3个阶段。其基本过程<sup>[2-4]</sup>为:环境样品中微生物经预处理后取得DNA样板,加热,在温度通常高于90℃的情况下,使待扩增DNA变性,双链解旋为单链DNA;接着在低温下,一对引物分别与2条DNA的两端互补性结合,此时两

引物的3'端相对,5'端相背,称为引物与模板的杂交;之后,在介于前面2种温度之间的合适温度下,加上适当的pH及离子强度等,由DNA聚合酶催化引物引导的DNA由5'端向3'端延伸(即以待扩增的DNA为模板合成新的DNA);从而完成一个变性-复性-延伸的PCR循环,至此完成了PCR的第一轮反应,而后反复进行变性、复性和延伸的循环,从而使扩增DNA产量呈指数上升。如此经过20~30个PCR循环,理论上能产生 $10^6 \sim 10^9$ 个待扩增DNA拷贝。PCR扩增产物可用琼脂糖凝胶电泳进行转化和检验,对被扩增的序列作定性或定量研究;也可以对PCR产物进行克隆用于转化或测序。

近年来,PCR技术得到了快速发展,其改进形式多种多样,根据扩增模板、引物序列来源及反应条件不同,目前应用于环境监测中的主要PCR技术有原位PCR、逆转录PCR、多重PCR、不对称PCR、锚定PCR、反向PCR、不对称PCR、实时定量PCR、免疫捕捉PCR以及多态性分析技术PCR-DGGE等<sup>[5-7]</sup>。这些方法已经在灵敏度、特异性和微型化方面有了很大的发展,为分子生物学在环境监测的发展提供了便利,在科研领域表现出明显的优越性。

## 2 PCR技术在环境监测中的应用

**2.1 应用PCR技术监测环境中的微生物** 在众多环境污染中,生物污染(病原菌、病毒及蓝藻等其他一些有害微生物)直接威胁着人类健康和生态平衡。传统的检测方法需要对样品进行分离培养,往往要花上几天乃至数周,且有些微生物难以人工培养,给快速准确监测带来困难。由于在微生物中具有一些很强保守性的编码rRNA基因,因此可用PCR扩增相应的DNA片段,来监测环境样品中是否存在此种微生物。王中民等<sup>[8]</sup>建立检测Mip基因的PCR方法对6株嗜肺军团菌进行扩增,经典的培养方法时间较长,培养难度大,环境标本中往往存在活的非可培养状态的军团菌,该方法扩增出650 bp的条带,而4株非嗜肺军团菌和4株非军团菌未

**作者简介** 高琼(1986-),女,山西吕梁人,助理工程师,硕士,主要从事环境土壤与微生物方面研究。

**收稿日期** 2014-11-10

见条带,表明该方法具有较高的特异性。陈樑<sup>[9]</sup>利用 PCR 技术建立了能在 12 h 内快速检测大肠杆菌的体系,比标准 MF 法快 60 h,2 种方法的检出率基本一致。

**2.2 应用 PCR 技术研究环境污染物对生物损伤作用** 当水体、空气、土壤等环境要素受到污染后,生物不可避免地吸收污染物,并在体内迁移、蓄积,从而遭受污染。因此以生物指标评价环境污染物浓度水平,以及污染物对生物的损伤作用是一个重要的研究课题。侯彦峰等<sup>[10]</sup>采用实时定量 RT-PCR 方法,对暴露 60 d 雌二醇的雄性青鳉鱼肝脏内卵黄蛋白原和卵壳前体蛋白基因表达进行研究。结果表明,雌二醇使肝脏内 VTG-I、VTG-II、CHG-L 和 CHG-H 基因表达被显著诱导,其中 VTG-I 显示出较好的剂量-效应关系,在 0.1 ng/L 雌二醇暴露组 VTG-I 和 VTG-II 的表达量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),表明该方法可以有效分析环境样品中微量雌激素物质。王琪等<sup>[11]</sup>也利用实时定量 RT-PCR 研究雌二醇对青鳉鱼肝细胞基因表达的影响,证明该方法灵敏度高于其他已发表的方法。

**2.3 应用 PCR 技术研究特定环境中微生物的群落结构、种群丰度以及群落动态** 微生物以群落的形式存在于各种环境中,发挥着重要的生态功能。微生物群落的种群结构决定其生态功能。依据微生物基因组 DNA 的序列信息,通过分析环境样品中 DNA 分子的种类和数量,可以反映微生物的区系组成和群落结构<sup>[12]</sup>。通过提取环境样品中所有微生物的基因组总 DNA,依据核苷酸序列的不同,分析这些 DNA 的种类和相对数量,即可反映微生物的种类组成以及多样性信息,从而反映水体、土壤等环境污染状况。该方法避免了传统方法检测周期长、工作繁重、检测速度慢、制约因素多等局限性。罗海峰等<sup>[13]</sup>提取不同农田土壤微生物基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 进行分离分析,结果能很好地反映土壤微生物的群体多样性。而传统的平板培养分离方法能分离出的微生物种类只占微生物种类总数的 0.1% ~ 1.0%,且不能反映出土壤微生物多样性的原始状态,PCR-DGGE 技术能够更精确地反映出土壤微生物多样性。KASUGA 等<sup>[14]</sup>利用 PCR-DGEE 技术对津久井湖进行周期性检测,分析了该湖微生物群落结构的季节性变化,发现赤潮暴发中主要存在的蓝细菌带。

### 3 改进 PCR 新技术

**3.1 逆转录 PCR** 逆转录 PCR (reverse transcription PCR) 是以组织或细胞中的总 RNA 中的 mRNA 作为模板,采用 oligo(dT) 或随机引物,利用逆转录酶反转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,从而获得目的基因或检测基因表达<sup>[15]</sup>。逆转录 PCR 使 RNA 检测的灵敏性提高了几个数量级,是目前灵敏度最高的 RNA 检测技术,使一些极为微量 RNA 样品的分析成为可能。

张崇森等<sup>[16]</sup>建立了一种通用引物逆转录 PCR 技术检测水中肠道病毒,该检测方法的灵敏度为 38 CCID<sub>50</sub>,具有较强的抗干扰性,通过考察 3 种不同水体成分的环境样品发现,检测灵敏度基本一致,该方法可应用在实际环境的肠道病毒

检测中。林怡雯等<sup>[17]</sup>以大肠杆菌和粪肠杆菌作为研究对象,建立一种逆转录定量 PCR 方法,研究表明该方法与传统培养法之间有较好的线性相关性(大肠杆菌, $R^2 = 0.930$ ;粪肠球菌, $R^2 = 0.948$ ),可以用于实际水样活性病原菌的检测。

**3.2 多重 PCR** 多重 PCR (multiplex PCR, 又称多重引物 PCR 或复合 PCR),是在同一 PCR 反应体系里加入 2 对或 2 对以上引物,如果存在与各对引物特异性互补的模板,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应<sup>[18]</sup>。多重 PCR 微生物检测主要有 2 个方向:一是在同一反应管内同时对多个目的基因进行扩增分析,可同时检测一种或几种微生物的存在,因此可以大大节省监测时间和试剂;二是针对某一微生物的多个基因进行多重检测,可以减少假阳性结果的出现,为环境监测提供更多更准确的信息。

范宏英等<sup>[19-20]</sup>应用多重 PCR 技术对 10 个属的 30 株细菌进行引物特异性检测。结果表明,5 对寡核苷酸引物都具有较高的特异性和专一性,多重 PCR 检测灵敏度达到  $10^1 \sim 10^2$  cfu,检测需 5 ~ 6 h,在水样检测的初步应用中得到了均一、稳定、清晰的结果。何伟等<sup>[21]</sup>建立同时检测大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌 5 种土壤常见肠道致病菌的多重 PCR 检测技术,结果表明,5 对寡核苷酸引物都具有较高的特异性和专一性,检测限达到  $10^4$  cfu/g,分析时间仅需 3 ~ 4 h,极大地缩短了检测时间,降低了检测成本,对控制病原菌的传播具有重要意义。王晶<sup>[22]</sup>对屏障系统微生物气溶胶中的易感菌类建立了多重 PCR 快速检测方法,该方法能有效检出金黄葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和肺炎链球菌等。

**3.3 实时荧光定量 PCR** 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR) 是将荧光能量传递技术 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 应用于常规 PCR 仪中,指在 PCR 反应体系中加入荧光基团或荧光染料,利用荧光信号积累,从而实时监测整个 PCR 过程,最后通过标准曲线对未知模板浓度进行定量分析的方法<sup>[23]</sup>。实时荧光定量 PCR 克服了许多常规 PCR 的缺点,主要有以下几个特点:①特异性好。实时荧光定量 PCR 针对靶序列设计特异性探针,具有很高的准确性,假阳性低;②灵敏度高。实时荧光定量 PCR 检测技术综合了荧光标记技术、PCR 技术、光谱技术、显像技术,大大提高了检测灵敏度;③精确性高。利用 PCR 扩增进入指数期的 Ct 值与荧光信号之间的线性关系,实现了精确的定量检测;④操作简单安全、自动化。由于扩增和检测在全封闭统一容器内,实现了动态检测,同时降低了溴化乙锭的污染;⑤测试时间短,效率高。可在 2 ~ 3 h 内完成整个样品分析。因此实时荧光定量 PCR 在环境监测领域中有广泛的应用。

刘永军等<sup>[24-25]</sup>通过实时荧光定量 PCR 方法对西安市 5 处地表水体中肠道病原细菌的细胞密度进行连续检测,结果显示,实时荧光定量 PCR 法可信度为 94%,实时荧光定量 PCR 检测结果与大肠菌群、细菌总数以及粪大肠杆菌 CFU 均呈显著正相关,秩相关系数分别为  $r = 0.983$ ,  $r = 0.908$  和  $r$

=0.948。徐德顺等<sup>[26]</sup>采用建立的实时荧光定量 PCR、常规 PCR 及传统细菌培养法 3 种方法,同时对单核细胞增生性李斯特菌等细菌进行检测。结果表明,实时荧光定量 PCR 检测的灵敏度可达 19 cfu/ml,且有很高的特异性,对英诺克李斯特菌等 10 种相关细菌均无交叉反应,从细菌核酸提取至完成检测仅需 3 h 左右。

徐恒省等<sup>[27]</sup>建立实时荧光定量 PCR 定量检测铜绿微囊藻的方法,检测速度快(整个过程在 2 h 内完成),能准确定量(与显微镜计数相比两者有良好的—致性),灵敏度高(最低检测限度约为 1 个细胞),有利于处理大量的样本。可以用于水华时对铜绿微囊藻定量检测,且可用于低密度时对该藻的实时监测。朱金余等<sup>[28]</sup>建立了一种检测水中铜绿微囊藻浓度的定量 PCR 方法,经定量 PCR 扩增得到的标准曲线  $R^2$  为 0.968,可以用来检测样品中铜绿微囊藻的浓度。

赛霖霖等<sup>[29]</sup>运用实时荧光定量 PCR 方法,证明壬基酚对成体青鳉鱼 VTG-I、VTG-II、CHG-H 和 CHG-L 的基因表达有显著诱导,说明实时荧光定量 PCR 能够检测 1  $\mu\text{g/L}$  壬基酚的环境雌激素效应,具有在现实环境中应用的前景。

赵传鹏等<sup>[30]</sup>应用实时荧光定量 PCR 法,建立了总细菌及假单胞菌属的标准曲线,并以环境样本中假单胞菌属与总细菌的比值反映其细菌丰度。该方法可有效定量假单胞菌属在环境样本中的丰度。

**3.4 免疫捕捉 PCR** 免疫捕捉 PCR (immunocapture PCR)<sup>[31]</sup>是将免疫捕捉和 PCR 扩增结合起来的一种检测方法,其检测对象是完整的病原体,通过固相化的特异抗体捕捉特定的抗原微生物,再利用其基因组序列特异的引物进行 PCR 扩增,通过对扩增产物的检测和分析达到对完整病原体的检测,这不仅提高了特异性,而且检测样本的体积也可增大,从而大大提高了检测的灵敏度。

杨万等<sup>[32]</sup>将免疫捕捉 PCR 成功用于水中轮状病毒的检测。研究发现,该方法灵敏,快速,检测限为  $1 \times 10^4$  copies/ml,检测仅需 5 h,检测结果与细胞病变试验检测结果有良好的线性相关关系 ( $R^2 = 0.9816$ ),表明其能较好地表征水样的病毒感染风险,可用于污水处理厂二级出水、再生水、地表水、自来水等水样中轮状病毒的检测。周纯<sup>[33]</sup>建立了免疫 PCR 测定 4 种多环芳烃的方法,该方法比高效液相色谱的线性范围宽几个数量级,且检测线也低,只需将环境样品简单预处理后即可直接用于测定。

**3.5 变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE)** 变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术是 DNA 指纹技术,是多态性分析技术的一种,其原理<sup>[34]</sup>:DNA 进行电泳时使用具有化学变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶,该凝胶能够有区别地解链 PCR 扩增产物。长度相同而在碱基序列上存在差异的不同 DNA 在进行变性梯度凝胶电泳时,双链的解链需要不同的变性剂浓度,序列不同的 DNA 片段就会在各自相应的变性剂浓度下变性,发生空间构型的变化。在聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速度将会急剧下降,以至停留在其相应的不同变性剂梯度位置,染色后可以在凝胶上呈

现为分开的条带,如此便能将具有相同长度而序列有差异的 DNA 分子分离开。

DGGE 技术具有以下特点:①分辨率高。可以分辨具有相同或相近分子量的目的片段序列差异,可以用于检测单一碱基的变化和遗传多样性以及 PCR 扩增 DNA 片段的多态性;②操作简便。加入 1~5 ng 的 DNA 或 RNA 即可达到清晰的分离效果,电泳可在 1 h 之内完成,可以同时检测多个样品;③重复性好。电泳条件易于控制。可保证电泳的重现性和结果的重现性。在环境微生物生态学中可以用于分析环境中微生物多样性;研究环境变化所引起的微生物群落的动态变化;跟踪相关基因在环境中的表达,分析和跟踪富集、筛选过程中的菌株。

刘敏等<sup>[35-36]</sup>利用 PCR-DGGE 技术对 2 个季节的黄海冷水团海域和长江口外低氧区的细菌群落组成和优势菌群进行了分析。郭文静<sup>[37]</sup>通过 DGGE 分析成功分离了混合藻,得到 3 种藻的 DGGE 图谱,从而证明 PCR-DGGE 技术是对微藻群进行鉴定的有效方法。李江宇等<sup>[38]</sup>采用 PCR-DGGE 技术分析大量海水浴场排污口与远排污口的细菌群落多样性,并分析浴场中致病菌的丰度。

赵长青等<sup>[39]</sup>采用 PCR-DGGE 分子指纹图谱技术比较南京市玄武湖、莫愁湖和太湖不同位置的表层沉积物微生物群落结构。刘新春等<sup>[40]</sup>应用 PCR-DGGE 方法,对在相同的操作条件下分别用低温菌和常温菌接种的两套活性污泥系统中的微生物群落结构的动态变化进行了追踪。结果表明,PCR-DGGE 方法可以在一定程度上反映出系统以及操作条件对微生物群落结构变化的影响。罗海峰等<sup>[41]</sup>提取不同农田土壤微生物基因组 DNA,进行 PCR-DGGE 检测得到不同数目且分离效果较好的电泳条带。表明 DGGE 能够对土壤样品中不同微生物的 16S rRNA 基因的 V3 区的 DNA 扩增片断进行分离,为这些 DNA 片断的定性和鉴定提供了条件。与传统的平板培养方法相比,PCR-DGGE 技术能够更精确地反映出土壤微生物多样性。滕应等<sup>[42]</sup>提取了重金属污染农田土壤的 DNA,并将其 PCR 产物进行 DGGE 检测,可以明显反映出重金属复合污染导致了农田土壤微生物在基因上的损伤,影响到农田土壤生态系统的细菌丰富度,改变了土壤环境的优势菌群,从而使农田土壤微生物群落结构多样性发生变化。

#### 4 结语

从 PCR 技术在以上几个方面的改进及应用可以看出,PCR 技术本身有着其他监测手段不具有的优势,它在环境监测中应用的广度和深度日益增加,可以对环境的各个方面进行监测。但 PCR 技术相对于传统的检测方法也存在着一些不足如:①假阳性问题。当不相关的核酸分子中存在与模板非常相似的碱基序列时,PCR 很可能作出假阳性的结果,所以为了避免假阳性结果的出现必须细心设计合成引物。②污染问题。由于 PCR 灵敏度高,因而微量靶序列的污染往往对结果造成很大的影响,污染可由试剂引起,也可由试验设备或者操作引起,故操作过程要十分小心。③样品生物活

性问题。从 PCR 理论本身来讲,任何可以提供核酸物质的样品都可以进行 PCR 扩增,不论是死细胞还是活细胞,因此,如何确定检测的微生物是否具有活性,是个值得考虑的问题。随着 PCR 技术的不断发展与成熟,通过和其他分子生物学技术联用,技术上会逐渐完善,肯定会被越来越广泛地应用于环境监测中,从生物角度来监测环境、改善环境。

### 参考文献

- [1] 林梅,宋璐璐,毛国军. PCR 技术的研究进展[J]. 大众科技,2007(11): 109.
- [2] 戴睿,夏四清. PCR 技术在水体微生物检测中的应用[J]. 环境科学与技术,2006,29(9):103.
- [3] 李惠民. PCR 技术在环境监测中的应用[J]. 商洛师范专科学校学报,2005,19(4):37.
- [4] 林秀菊. PCR 技术基本原理及其在环境污染监测中的应用[J]. 福建环境,2000,17(1):37.
- [5] 张丰德,吕宪禹. 现代生物学技术[M]. 2 版. 天津:南开大学出版社,2005:329-345.
- [6] 谢德平,廖宇静. 常用聚合酶链式反应(PCR)技术概述[J]. 生物学教学,2009,34(2):8-10.
- [7] 曹雪雁,张晓东,樊春海. 聚合酶链式反应(PCR)技术研究新进展[J]. 自然科学进展,2007,17(5):580-584.
- [8] 王中民,杨国芬,王武芳,等. 应用 PCR 检测环境水体中的嗜肺军团菌[J]. 实用预防医学,2005,12(2):261-263.
- [9] 陈樑. 水环境中大肠杆菌 PCR 快速检测体系的研究[J]. 环境科技,2010,23(2):52-56.
- [10] 侯彦峰,张照斌,胡建英,等. 定量 RT-PCR 检测雌二醇诱导的青鳉鱼基因表达[J]. 中国环境科学,2006,26(5):599-602.
- [11] 王琪,黄崇,张照斌,等. 实时定量 RT-PCR 方法检测雌二醇诱导原代培养青鳉鱼肝细胞的基因表达[J]. 环境科学学报,2008,28(12):2568-2572.
- [12] 王爱杰,任南琦. 环境中的分子生物学诊断技术[M]. 北京:化学工业出版社,2004:11-15.
- [13] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报,2003,23(8):1570-1575.
- [14] KASUGA LKURO, FYRUMAI HIROAKI, NAKAJIMA FUMIYUKI, et al. Analysis of Seasonal and Structural Changes in Microbial Community including Algae in Tsukui Lake by PCR-DGGE[J]. Journal of Japan Society on Water Environment, 2001,24(12):856-864.
- [15] 谢德平,廖宇静. 常用聚合酶链式反应(PCR)技术概述[J]. 生物学教学,2009,34(2):8.
- [16] 张崇森,刘永军,王晓昌,等. 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术同时检测水中多种肠道病毒[J]. 环境科学研究,2007,20(3):137-140.
- [17] 林台雯,李丹,吴舒旭,等. 基于 RT-qPCR 选择性检测水中活性病原菌[J]. 环境科学,2012,33(11):4040-4045.
- [18] 许一平,成炜,陈福生. 多重 PCR 技术在食源性病原菌检测中的应用[J]. 食品科学,2007,27(2):355-358.
- [19] 范宏英,吴清平,吴若菁,等. 饮用水 5 种致病菌多重 PCR 技术检测研究[J]. 微生物学通报,2005,32(3):102-107.
- [20] 范宏英,寇晓霞,张菊梅,等. 水体污染中常见致病菌的多重 PCR 分子检测研究[J]. 现代预防医学,2007,34(17):3250-3253.
- [21] 何伟,刘燕,李建林,等. 土壤环境中肠道致病菌的多重 PCR 检测研究初探[J]. 环境科学学报,2013(5):1341-1346.
- [22] 王晶. 屏障系统微生物气溶胶监测及 SPF 级实验动物微生物多重 PCR 分析[D]. 南京:南京农业大学,2011.
- [23] 赵焕英,包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2007,16(4):492-497.
- [24] 刘永军,张崇森,王晓昌,等. 环境水体中肠道病原细菌的定量 PCR 检测[J]. 环境科学,2008,29(5):1175-1180.
- [25] 刘永军,张崇森,王晓昌,等. 环境水体中肠道病原细菌定量 PCR 检测与膜过滤分析方法的比较[J]. 环境科学学报,2008,28(7):1482-1488.
- [26] 徐德顺,吴晓芳,程平庆. 实时荧光定量 PCR 法与常规 PCR 法及细菌培养法检测单增李斯特菌的比较[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(5):861-863.
- [27] 徐恒省,李继影,刘孟宇,等. 实时荧光定量聚合酶链反应快速检测产毒铜绿微囊藻[J]. 中国环境监测,2013,29(4):89-94.
- [28] 朱金余,李海波,陈芳,等. 水中铜绿微囊藻定量 PCR 检测方法的建立[J]. 浙江大学学报,2013,40(2):211-217.
- [29] 赛林霖,张照斌,胡建英,等. 实时定量 RT-PCR 方法评价壬基酚的雌激素效应[J]. 环境科学,2006,27(9):1825-1828.
- [30] 赵传鹏,浦跃朴,尹立红,等. 实时荧光定量 PCR 法检测环境假单胞菌属细菌丰度[J]. 东南大学学报:自然科学版,2006,31(1):143-146.
- [31] 高荣凯. 免疫捕捉 PCR 技术及其应用[J]. 国际免疫学杂志,2006,29(4):249-252.
- [32] 杨万,何苗,李丹,等. 免疫磁珠分离与实时定量 PCR 技术联合检测水中轮状病毒的研究[J]. 环境科学,2009,30(5):1368-1374.
- [33] 周纯. 多环芳烃类环境激素的实时定量免疫 PCR 检测方法研究[D]. 上海:东华大学,2008.
- [34] 黄春晓. PCR-DGGE 技术及其在环境工程生物处理中的应用[J]. 中原工学院学报,2007,18(1):72-75.
- [35] 刘敏,朱开玲,李洪波,等. 应用 PCR-DGGE 技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成[J]. 环境科学,2008(4):1082-1091.
- [36] 刘敏,王子峰,朱开玲,等. 应用 PCR-DGGE 技术分析长江口低氧区的细菌群落组成[J]. 环境科学,2008(6):650-656.
- [37] 郭文静. PCR-DGGE 和 RT-PCR 技术在赤潮藻检测中的应用[D]. 天津:天津科技大学,2010.
- [38] 李江宇,樊景凤,穆贵强,等. 利用 PCR-DGGE 分析海水浴场细菌多样性[J]. 海洋环境科学,2013,32(8):523-528.
- [39] 赵兴青,杨柳燕,陈灿,等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J]. 生态学报,2006,26(11):3010-3016.
- [40] 刘新春,吴成强,张昱,等. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析[J]. 生态学报,2005,25(4):842-846.
- [41] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报,2003,23(8):1570-1575.
- [42] 滕应,骆永明,赵祥伟,等. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及其 PCR-DGGE 分析[J]. 土壤学报,2004,4(13):343-346.

(上接第 12815 页)

- [8] DENG B L, DONG H S. Ectopic expression of riboflavinbinding protein gene *TsR/BP* paradoxically enhances both plant growth and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. J Plant Growth Regul, 2013,32:170-181.
- [9] DENG B L. Antioxidative response of golden agave leaves with different degrees of variegation under high light exposure[J]. Acta physiol Plant, 2012,34:1925-1933.
- [10] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends Plant Sci, 2002,7:405-410.
- [11] GILL S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiol Biochem, 2010, 48:909-930.
- [12] AMIRJANI M. Effect of NaCl on some physiological parameters of rice[J]. Eur J Biol Sci, 2010,3:6-16.
- [13] LEE D, KIM Y, LEE C. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice(*Oryza sativa* L.)[J]. J Plant Physiol, 2001,158:737-745.
- [14] LIN C, KAO C. Effect of NaCl stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves[J]. Plant Growth Regul, 2000,30:151-155.
- [15] VAIDYANATHAN H, SIVAKUMAR P, CHAKRABARTY R, et al. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential responses in salt tolerant and sensitive varieties[J]. Plant Sci, 2003,165:1411-1418.
- [16] WILLEKENS H, CHAMNONGPOL S, DAVEY M, et al. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants[J]. EMBO J, 1997,16:4806-4816.
- [17] SHIM I, MOMOSE Y, YAMAMOTO A, et al. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants[J]. Plant Growth Regul, 2003,39:285-292.
- [18] QUAN L, ZHANG B, SHI W, et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of reactive oxygen species network[J]. J Integr Plant Biol, 2008,50:218.