

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620101152424

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**三株海洋菌的多相分类和印度洋沉积物  
PKSI KS domain 克隆基因文库多样性分析**

**Polyphasic taxonomic of three marine strains and  
Phylogenetic analysis of the PKSI KS domain from Indian  
Ocean deep-sea sediments**

任慧慧

指导教师姓名: 徐 洵 研究员

张改云 副研究员

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2013 年 07 月

论文答辩时间: 2013 年 08 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2013 年 7 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目录

目录.....	I
Contents .....	VI
英文缩略表.....	a
中文摘要.....	ii
Abstract.....	v
第一章 前言.....	1
1 大洋环境概况.....	1
2 细菌多相分类研究概况.....	2
2.1 细菌分类学的发展.....	2
2.2 细菌多相分类研究的具体方法.....	3
2.2.1 传统分类.....	3
2.2.2 化学分类.....	4
2.2.2.1 磷酸类脂分析.....	4
2.2.2.2 细胞壁特征氨基酸分析.....	4
2.2.2.3 醌类型分析.....	5
2.2.2.4 脂肪酸组分分析.....	5
2.2.3 分子指征分析.....	6
2.2.3.1 基因组 DNA(G+C)mol%分析.....	6
2.2.3.2 基因组 DNA-DNA 杂交.....	6
2.2.3.3 16S rRNA 序列分析.....	6
2.2.3.4 DNA 指纹分析.....	7
2.3 现在细菌分类学研究的特点及其发展趋势.....	7
2.3.1 当今细菌分类学的研究特点.....	7
2.3.1.1 细菌分离方法改进, 发现新属新种.....	7
2.3.1.2 利用多相分类搞清各属之间的亲缘关系.....	8
2.3.1.3 细菌分类学和细菌资源研究的联系.....	8
2.3.2 细菌分类学的发展趋势.....	8

3 PKS 研究的现状 .....	9
3.1 聚酮化合物合成酶 PKS .....	9
3.2 PKS 的组合生物学前景 .....	11
4 本文研究的目的及意义 .....	11
第二章 三株海洋菌的多相分类 .....	13
1 引言 .....	13
2 材料和方法 .....	14
2.1 材料 .....	14
2.1.1 样品来源 .....	14
2.1.2 菌株与质粒 .....	14
2.1.3 引物 .....	14
2.1.4 主要试剂 .....	14
2.1.5 培养基 .....	15
2.1.5.1 分离培养基 .....	15
2.1.5.2 生理生化实验培养基 .....	15
2.1.6 主要溶液 .....	17
2.1.7 主要仪器 .....	18
2.1.8 分析软件 .....	18
2.2 实验方法 .....	19
2.2.1 培养特征 .....	19
2.2.2 显微特征 .....	19
2.2.3 生理生化特征 .....	19
2.2.3.1 pH, 温度和 NaCl 耐受实验 .....	19
2.2.3.2 酶学特性实验 .....	19
2.2.3.3 试剂盒实验 .....	22
2.2.4 化学组份分析 .....	22
2.2.4.1 全细胞氨基酸组分分析 .....	22
2.2.4.2 全细胞糖组份分析 .....	24
2.2.4.3 极性脂分析 .....	24



2.2.4.4 醌组分分析.....	26
2.2.4.5 脂肪酸分析.....	27
2.2.5 分子分类分析.....	28
2.2.5.1 DNA G+Cmol%的测定.....	28
2.2.5.2 16S rRNA 系统发育进化树的构建.....	30
2.2.5.3 DNA — DNA 同源性分析.....	30
3 三株海洋菌菌的多相分类鉴定结果和分析.....	32
3.1 一株北极来源芽孢八叠球菌多相分类鉴定结果和分析.....	32
3.1.1 形态学研究的结果.....	32
3.1.2 生理生化实验结果.....	33
3.1.3 全细胞壁氨基酸分析结果.....	34
3.1.4 全细胞壁糖分析结果.....	35
3.1.5 极性脂分析结果.....	36
3.1.6 甲基萘醌分析结果.....	37
3.1.7 脂肪酸分析结果.....	38
3.1.8 DNA G+Cmol%的测定结果.....	40
3.1.9 基于 16S rRNA 系统发育进化树的构建.....	41
3.1.10 菌株 1111S-42 <sup>T</sup> 杂交结果.....	42
3.2.11 1111S-42 <sup>T</sup> 的鉴定结果.....	42
3.2 一株深海来源两面神菌的多相分类鉴定结果和分析.....	45
3.2.1 形态学研究的结果.....	45
3.2.2 生理生化实验结果.....	45
3.2.3 细胞壁化学组分的定性分析结果.....	46
3.2.4 极性脂分析结果.....	47
3.2.5 甲基萘醌分析结果.....	48
3.2.6 脂肪酸分析结果.....	48
3.2.7 DNA (G+C)mol%的测定结果.....	50
3.2.8 基于 16S rRNA 系统发育进化树的构建.....	51
3.2.9 菌株 0704P10-1 <sup>T</sup> 杂交结果.....	52

3.2.10	0704P10-1 <sup>T</sup> 的鉴定结果.....	52
3.3	一株深海来源微杆菌的多相分类鉴定结果和分析.....	54
3.3.1	形态观察.....	54
3.3.2	生理生化实验结果.....	55
3.3.3	细胞壁化学组分的定性分析结果.....	56
3.3.4	极性脂分析结果.....	57
3.3.5	甲基萘醌分析结果.....	58
3.3.6	脂肪酸分析结果.....	58
3.3.7	DNA (G+Cmol)%的测定结果.....	60
3.3.8	基于 16S rRNA 系统发育进化树的构建.....	60
3.3.9	菌株 0704C9-2 <sup>T</sup> 杂交结果.....	63
3.3.10	0704C9-2 <sup>T</sup> 的鉴定结果.....	63
第三章	印度洋沉积物 I 型聚酮合酶 KS domain 多样性分析.....	65
1	引言.....	65
2	材料与方法.....	65
2.1	材料.....	65
2.1.1	样品来源.....	65
2.1.2	菌株与质粒.....	65
2.1.3	引物.....	66
2.1.4	主要试剂.....	66
2.1.5	主要仪器.....	66
2.1.6	分析软件.....	67
2.2	实验方法.....	67
2.2.1	印度洋沉积物样品中总 DNA 的提取.....	67
2.2.2	印度洋沉积物样品总 DNA PKS I 基因扩增.....	67
2.2.3	琼脂糖凝胶中扩增 DNA 片段的回收.....	67
2.2.4	TA 克隆.....	67
2.2.5	印度洋沉积物样品 PKS I KS domain 基因克隆文库构建.....	68

2.2.6 文库中克隆的 RFLP 分型 .....	68
2.2.7 序列分析.....	68
3 结果与分析.....	69
3.1 印度洋深海沉积物总 DNA 的提取.....	69
3.2 PKS1 KS domain 的扩增.....	69
3.3 PKS1 KS domain 克隆基因文库构建及 RFLP 分型 .....	70
3.4 印度洋深海沉积物 PKS1 KS 克隆基因文库多样性分析.....	71
3.4.1 印度洋深海 TVG03、TVG04、TVG05 样品克隆 PKS KS 基因文库中序列分析.....	71
3.4.2 印度洋深海 TVG03、TVG04、TVG05 样品 PKS KS 克隆 基因文库中系统发育分析.....	73
4 讨论.....	78
参考文献.....	80
致谢.....	84
发表文章.....	85

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

Contents .....	I
English contents .....	VI
English abbreviated table .....	a
Chinese abstract .....	i
English abstract .....	iv
Chapter 1 Preface .....	1
1 The ocean environment verview .....	1
2 Bacteria polyphasic taxonomy overview .....	2
2.1 The development of bacterial taxonomy .....	2
2.2 The method of bacteria polyphasic taxonomy study .....	3
2.2.1 The traditional taxonomy .....	3
2.2.2 Chemotaxonomy .....	4
2.2.2.1 Lipid phosphate analysis .....	4
2.2.2.2 Cell wall characteristics amino acid analysis .....	4
2.2.2.3 Menaquinons analysis .....	5
2.2.2.4 Fatty acid analysis .....	5
2.2.3 Genotypic taxonomy .....	6
2.2.3.1 Genomic DNA (G+C)mol% analysis .....	6
2.2.3.2 Genomic DNA-DNA 杂交 .....	6
2.2.3.3 16S rRNA sequence analysis .....	6
2.2.3.4 DNA-fingerpriniing techniques .....	7
2.3 The characteristics and development trends on bacterial taxonomy .....	7
2.3.1.1 Bacteria separation method is improved to find new genus and new species .....	7
2.3.1.2 Analysis of the genetic relationship of genuses by polyphasic taxonomy .....	8
2.3.1.3 The relationship of bacterial taxonomy and bacteria	

resources research .....	8
2.3.2 The development trend of bacterial taxonomy .....	8
3 PKS research Status .....	9
3.1 PKS .....	9
3.2 Combinatorial Biolog of PKS prospect .....	11
4 Aims and significance of this thesis .....	11
Chapter 2 Polyphasic taxonomic of three bacteria .....	13
1 Introduction .....	13
2 Materials and Methods .....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Sample source .....	14
2.1.2 Strain and plasmid .....	14
2.1.3 Primers sequences .....	14
2.1.4 Reagents .....	15
2.1.5 Medium .....	15
2.1.5.1 Isolation medium .....	15
2.1.5.2 Physiological and biochemical experiment medium .....	15
2.1.6 Reagents .....	17
2.1.7 Instruments .....	18
2.1.8 Analysis Software .....	18
2.2 Experimental methods .....	19
2.2.1 Characteristics of strain culture .....	19
2.2.2 Microscopic features .....	19
2.2.3 Physiological and biochemical .....	19
2.2.3.1 pH, temperature and NaCl tolerant .....	19
2.2.3.2 Enzymology characteristics experiment .....	20
2.2.3.3 Kit .....	22
2.2.4 Chemotaxonomy .....	22
2.2.4.1 Chemical components of whole cell wall AA .....	22

2.2.4.2	Chemical components of whole cell wall sugars .....	24
2.2.4.3	Lipid phosphate.....	24
2.2.4.4	Menaquinons.....	26
2.2.4.5	Fatty acid.....	27
2.2.5	Genotypic taxonomy .....	28
2.2.5.1	DNA (G+C)mol% .....	28
2.2.5.2	Phylogentic neighbour-joining tree based on the 16S rDNA gene .....	30
2.2.5.3	Hybridization .....	30
3	Polyphasic taxonomic results and analysis of three strains .....	32
3.1	Polyphasic taxanomy of a <i>Sporosarcina</i> sp. ....	32
3.1.1	Morphologic.....	32
3.1.2	Physiological and biochemical .....	33
3.1.3	Chemical components of whole cell wall AA.....	34
3.1.4	Chemical components of whole cell wall sugars.....	35
3.1.5	Lipid phosphate.....	36
3.1.6	Menaquinons.....	36
3.1.7	Fatty acid.....	37
3.1.8	DNA(G+C)mol% .....	39
3.1.9	Phylogentic neighbour-joining tree based on the 16S rDNA gene .....	40
3.1.10	Hybridization result of strain 1111S-42 <sup>T</sup> .....	41
3.2.11	The identification results of 1111S-42 <sup>T</sup> .....	41
3.2	Polyphasic taxanomy of a <i>Janibacter</i> sp. from.....	44
3.2.1	Morphologic.....	44
3.2.2	Physiological and biochemical .....	44
3.2.3	Chemical components of whole cell wall AA.....	45
3.2.4	Lipid phosphate.....	46
3.2.5	Menaquinons.....	47

3.2.6 Fatty acid.....	47
3.2.7 DNA(G+C) mol% .....	49
3.2.8 Phylogentic neighbour-joining tree based on the 16S rDNA gene .....	50
3.2.9 Hybridization result of strain 0704P10-1 <sup>T</sup> .....	51
3.2.10 The identification results of 0704P10-1 <sup>T</sup> .....	51
3.3 Polyphasic taxanomy of a <i>Microbacterium</i> sp.....	53
3.3.1 Morphologic.....	53
3.3.2 Physiological and biochemical .....	54
3.3.3 Chemical components of whole cell wall AA.....	55
3.3.4 Lipid phosphate.....	56
3.3.5 Menaquinons.....	56
3.3.6 Fatty acid.....	57
3.3.7 DNA(G+C)% Content.....	58
3.3.8 Phylogentic neighbour-joining tree based on the 16S rDNA gene .....	59
3.3.9 Hybridization result of strain 0704C9-2 <sup>T</sup> .....	61
3.3.10 The identification results of 0704C9-2 <sup>T</sup> .....	61
Chapter 3 Phylogenetic analysis of the PKS1 KS domain from Indian Ocean deep-sea sediments.....	63
1 Introduction.....	63
2 Materials and Methods.....	63
2.1 Materials .....	63
2.1.1 Samples source.....	63
2.1.2 Strain and plasmid.....	63
2.1.3 Primers .....	64
2.1.4 Reagents.....	64
2.1.5 Instruments.....	64
2.1.6 Analysis software .....	65



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库