

微生物分子生态学研究方法的新进展

吕昌勇 陈朝银* 葛 锋 刘迪秋 孔祥君

(昆明理工大学生命科学与技术学院 昆明 650500)

摘要 环境中微生物的群落结构及多样性和微生物的功能及代谢机理是微生物生态学的研究热点,长期以来,由于受到研究技术的限制,对微生物的群落结构和多样性的认识还不全面,微生物的功能及代谢机理方面了解也很少。随着高通量测序、基因芯片等新技术的不断更新,微生物分子生态学的研究方法和研究途径也在不断变化。高通量测序技术改变了微生物多样性、宏基因组学和宏转录组学的研究方法,GeoChip 高密度覆盖海量已知功能的基因探针于单张芯片,能快速确定微生物和已知功能基因的存在与否。总结和比较了目前最新的研究手段,并归纳了这些方法的适用性和优缺点。

关键词 微生物分子生态学 高通量测序技术 GeoChip 宏基因组 宏转录组
中图分类号 Q819

微生物生态学 (microbial ecology) 是指特定生境中,微生物与其他生物和非生物环境相互作用及规律的学科。环境中微生物的群落结构及多样性和微生物的功能及代谢机理一向是微生物生态学的研究热点。传统的纯培养法 (culture-dependent) 经历了百余年的发展和完善,从环境中直接分离鉴定菌种方面的科研工作已经接近极限^[1],然而现代分子生物学证实大多数的微生物依然没有得到纯培养,以至于长期以来对未分离微生物的了解很少^[2],它们的功能和代谢方面的研究也因此受到很大的限制^[3]。目前常见的微生物分子生态学的研究方法有:基于 PCR 的构建克隆文库方法、变性/温度梯度凝胶电泳 (Denature/Temperature Gradient Gel Electrophoresis, DGGE/TGGE)、随机引物扩增产物多态性分析 (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、末端限制性长度多态性 (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP) 及荧光原位杂交 (Fluorescent in situ Hybridization, FISH) 等,这些方法克服传统微生物学分离培养方法的不足,从分子水平反映环境中微生物多样性和群落结构,在微生物学的研究中取得了较为广泛的应用。

近几年,随着分子生物学发展,尤其是以新一代测

序技术、GeoChip 等高通量技术的研发及应用和传统实验方法的改进优化,为微生物分子生态学的研究方法、研究策略注入了新的力量,本文就微生物分子生态学研究方法的新进展展开叙述,并对这些方法进行简要的评价。

1 利用高通量测序技术的微生物分子生态学研究方法

DNA 测序技术已经广泛应用于生物学研究的各个领域,很多生物学问题都需要借助于 DNA 测序技术,在微生物分子生态学的研究中进行序列的测定更是非常重要的一步。以大规模平行测序平台 (massively parallel DNA sequencing platform)^[4-5] 完成高通量测序的新一代测序技术 (next-generation sequencing technology) 具有产出通量高^[6],费用低廉^[7],测序过程基本由机器完成等优点。目前高通量测序平台以 Illumina 公司的 Solexa, ABI 公司的 SOLid, 和 Roche 公司的 454 技术应用最为广泛。Roche 454 最大优点是测序单序列读长长 (目前升级后的 GS FLX⁺ 最长可达到 1000bp), 测序结果不经过拼接就能进行一定的微生物分子生态学的分析; Illumina 测序技术单次测序获得的数据量大,产生高覆盖率的测序量所需费用低,可检测到更多低丰度的转录本,在对已知基因组序列的物种测序分析更

收稿日期: 2012-03-13 修回日期: 2012-05-06

* 通讯作者, 电子信箱: chaoyinchen@163.com

具优势; SOLiD 基于双碱基编码系统的纠错能力以及较高的测序通量, 适合转录本研究以及比较基因组学特别是 SNP 检测等, 但是测序片段长度太短; 其中, 目前在微生物分子生态学中应用最多的是 Roche 454 测序。高通量测序技术的出现与应用, 改变了在微生物多样性、宏基因组和宏转录组等方面研究的基本策略, 简化了研究步骤, 缩短了研究周期, 同时得到的数据更加丰富^[4, 8]。

1.1 利用高通量测序进行微生物多样性的研究

16S/18S rRNA 基因、核糖体内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 等兼具保守和高变特性的序列, 是微生物多样性的研究常用的理想指针序列^[9], 对提取的总 DNA 进行 16S/18S rRNA 基因、ITS 扩增, 扩增后的不同的序列就代表不同的物种, 然后构建特征基因片段文库, 再测序分析, 但是这种方法非常繁琐, 为了简便流程, 对 PCR 的产物通过特定限制性内切酶酶切 (如 T-RFLP)、随机引物扩增 (如 RAPD)、变性梯度电泳 (如 DGGE) 等方法, 也能够达到对 PCR 出来的特异片段进行间接的“分离”, 但是这些方法以破坏特异片段的完整为代价, 所以结果的准确性有所降低。

高通量测序可以进行大规模平行测序, 可以同时众多序列片段进行测序且互不干扰^[5], 这种不经过人为的分离, 就能得到混杂在一块的多条核酸片段序列的测序方法, 非常适用于对 16S/18S rRNA 基因、ITS 的 PCR 产物的测序, 特别是 Roche 454 测序平台测序读长比 rRNA 基因的特定高变区或 ITS 的区域长, 因此 454 测序在微生物多样性的研究中应用很广^[10]。高通量测序不需要传统的基因克隆这一步骤, 可以避免在 PCR 过程中产生的异源双链核酸分子 (heteroduplexes)^[11] 在载入载体进行克隆时, 由于大肠杆菌宿主的修复而产生本来并不存在序列造成的分析结果放大。此外, 结合 Barcoded PCR^[12], 即在普通 PCR 引物 5' 端标记一段区分不同样品的核苷酸序列, 就可以在一次测序运行中实现大规模多样本同时测序, 进而进行样本间比较分析。目前高通量测序广泛应用于土壤、海洋、活性污泥、矿井、人体肠道和发酵食品中的微生物群落结构及多样性的研究中^[13]。

由高通量测序带来的微生物多样性研究方法的变革, 产生了前所未有的实验数据, 一些微量微生物也渐渐被人类所检测, 在诸多领域的微生物多样性的研究方面有了不少新的发现。例如 2006 年, Sogin 等^[14] 采

用 454 测序法检测深海中微生物多样性的研究结果表明, 北大西洋海底和热泉中的微生物总量要比以前了解的高 10 ~ 100 倍, 多样性也要复杂了很多; 2011 年, Jaenicke 等^[15] 把 454 测序用于分析沼气发酵罐中微生物的多样性, “意外” 发现了 *Sterptococcus*, *Gelria* 等属菌的存在; 2011 年, Zhang 等^[16] 用 454 测序法和克隆文库法分别确定了用于降解喹啉的生物反应器中的微生物菌群组成, 研究表明用克隆文库法获得的 OTUs (Operational Taxonomic Units) 在高通量测序的数据中都有所体现, 但是却有高通量测序所产生的 OTUs 在克隆文库中并没有完全体现, 说明利用高通量测序研究 16S rRNA 基因的高变区在检测细菌多样性得到的结果更为全面。

结合 Barcoded PCR, 不同环境之间的微生物群落的比较及某一环境微生物多样性的动态变化可以在同等测序条件下完成, 可以减少实验中人为因素导致的偶然误差。2009 年, Turnbaugh 等^[17] 运用 454 技术对 154 例肥胖和非肥胖的双胞胎肠道菌群进行 16S rRNA 基因的 V2 和 V6 区测序, 结果发现肠道菌群在组成的个体差异性非常大, 肥胖人群的肠道菌群在多样性上低于非肥胖人群, 这为以后相关医学方面的研究提供了更加准确的理论支持。2012 年, Alegria 等^[18] 利用 454 确定在奶酪发酵过程中的菌群变化; 2011 年, Chen 等^[19] 对三处不同区域的珊瑚礁进行 10 个月的跟踪采样, 以此来检测寄居在珊瑚上面的两种最主要微生物协作者, 细菌和海藻共生体的组成变化; 上海交通大学赵立平实验室利用高通量测序来检测和监控肠道微生物的菌群结构, 分析肠道微生物群落与疾病可能具有的关系^[20-23], 通过诱导小鼠癌变, 检测小鼠在癌变发生的进程中微生物的群落结构的变化, 发现一些体内含有大量的异常隐窝灶 (aberrant crypt foci, ACF) 但是在整体上表现为健康的小鼠的肠道内菌群结构与对照组有明显的不同, 从而为癌症的预防和前期诊断提供一个思路^[20], 还通过对 56 位健康人体与 46 位患有结肠直肠癌患者肠道内的细菌 16S rRNA 基因的 V3 区测序, 发现丁酸生产菌 (butyrate-producing bacteria) 的减少和条件致病菌 (opportunistic pathogens) 的增加是人类结肠直肠癌患者肠道内菌群的一个显著特征^[22], 这些肠道内的微生物分子生态学的研究对于认识、预防和治疗疾病方面的进一步研究都有很重要的指导意义。

基于高通量测序的微生物多样性分析方法也有不足, 由于其测序的样本是 PCR 扩增后的产物, 而 PCR

过程所用的“通用引物”并不能对所有微生物进行等效扩增,有的微生物并没有扩增出来^[24],在某些具有简并引物的 PCR 扩增中更加倾向于扩增包含 G 或者 C 的简并位点^[25],这些原因的存在可能导致分析结果在一定程度上失真。

1.2 利用高通量测序进行宏基因组学的研究

宏基因组 (metagenome) 是指生境中全部微生物遗传物质的总和^[26],在高通量测序出现之前,其主要研究过程包括提取样品中的微生物总 DNA;构建宏基因组文库;目标基因的筛选和序列分析等过程^[27],进行的测序过程采用繁琐的传统 sanger 测序技术。由于需要大量的数据才能保证得出结论的全面和客观,在高通量测序出现以前,这种研究方法由于成本太高,在研究中的应用极其有限^[28]。随着高通量测序的出现,可以直接对提取的总 DNA 进行测序,得到特定环境中宏基因组序列,这些序列即包括用于微生物鉴定的特征序列,还包括一些编码功能蛋白的功能基因序列,通过比对相关数据库不仅能得到微生物多样性和丰度的信息,同时还可以对微生物的功能和代谢方面进行分析研究。

利用高通量测序研究宏基因组学的步骤包括:提取样品中微生物总 DNA;进行高通量测序;数据统计和生物信息学分析。在过去的几年中,宏基因组学的研究呈越来越多的趋势。2011 年, Jung 等^[29]利用 454 GS FLX Titanium 系统对发酵过程中的泡菜进行动态宏基因组测序,将测序结果对比 RDP II 数据库,有 0.17 到 0.67% 的序列可以认为是 16S rRNA 基因的序列,并以此分析泡菜中的菌群结构;平均有 45.09% 的序列可以与 SEED 功能分类的数据库相匹配进而进行功能注释分析。2011 年,华大基因的研究人员 Qin 等^[30]利用基于 illumina 的测序方法对 124 个欧洲人的排泄物进行人体肠道微生物的宏基因组测序,得到 5767 亿个碱基序列,通过基因注释得到 3299822 个开放阅读框 (ORFs),研究估计人肠道中存在约 1000 到 1150 种细菌,平均每个体内约含有 160 种优势菌种,并且这些细菌是绝大部分个体所共有的。2011 年, Durso 等^[31]对牛粪便中的微生物进行宏基因组测序,共得到 273 960 条序列,其中有 100 945 条序列可以与 SEED 的蛋白质数据库相匹配,并主要对相关毒性及耐药性有关的功能基因进行分析,从而对畜牧业及食品安全生产方面提供指导。

高通量测序为宏基因组学研究打开了新的大门。

但是,宏基因组学的研究方法也具有自身局限性,在宏基因组中 rRNA 基因所占有的比例很低(现有的研究表明有关 rRNA 基因序列不到 1%),需要进行较为深度的测序才能得到较为完整的微生物多样性信息,但是深度的测序又为数据分析带来了新的挑战;同时,宏基因组学以 DNA 为研究对象,所得到的功能分析结果只能说明其具有某种功能基因的存在,并不能对相关基因是否表达及表达程度给出明确的结论。

1.3 利用高通量测序技术进行宏转录组学的研究

宏转录组 (Metatranscriptome) 即指特定环境、特定时期、特定状态下群体细胞转录的所有 RNA (包括 mRNA 和非编码 RNA) 的类型及拷贝数。宏转录组学能将特定条件下的生物群落及其功能联系起来,对群落整体进行各种相关功能的研究^[32]。2005 年 Poretsky 等^[33]对水体浮游细菌群落中的 mRNA 构建了克隆文库和测序,明确指出通过环境中宏转录组的分析是了解环境微生物群落及其功能基因的极为有力的工具。

利用高通量测序研究宏基因组学包括:提取样品中微生物总 RNA;总 RNA 反转录成 cDNA;进行高通量测序和生物信息学分析。而宏转录组学的研究对象为正在进行代谢的 RNA,方法目的更加明确。在总 RNA 中大部分是 rRNA,利用 rRNA 进行的微生物的群落结构和多样性分析,还可以说明微生物的活力大小,由于 mRNA 是蛋白质翻译的模板, mRNA 可以直接代表这些微生物正在进行的代谢过程,可以利用 mRNA 进行功能分析,所需要的测序量也相对较少,需要克服的主要问题是在某些环境中提取总 RNA 的过程需要极为小心,同时 mRNA 只占到总 RNA 1% ~ 5%,还极易降解,所以在进行宏转录组操作的时候一般要对 mRNA 进行富集^[34]。

高通量测序的出现极大地加速了宏转录组学的研究,现已广泛应用于海洋^[35]、土壤^[36]、人体及动物肠道^[37-38]等环境中的微生物群落结构和多样性分析,并对代谢功能等方面进行了较为系统的研究。在代谢比较复杂的发酵样品中, Zakrzewski 等^[39]使用 GS FLX 系统对生产规模的生物沼气池采样进行宏转录组高通量测序,研究发现有较多的广古菌门 (*Euryarchaeot*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 微生物的存在;通过 mRNA 序列比对数据库,发现有编码水解酶、酸化酶、醋酸化酶和产甲烷酶的基因片段,进而构建产甲烷菌群的代谢途径,并认为在以后的生产中可以利用对微生物群落的监控以

达到对生产过程中的沼气关键代谢的监控。利用宏转录组高通量测序所研究的是微生物正在进行的代谢过程,得到的微生物多样性还能比较好地说明微生物的活力大小,进行的功能分析可以说明这种功能已经表达及分析表达量的多少,随着总 RNA(特别是 mRNA)在某些环境中不容易提取这一难题的进一步解决,宏转录组的研究将会在越来越多的环境中展开。

2 利用基因芯片新技术的微生物分子生态学研究方法

高通量测序的出现使得基因芯片的市场受到了不小的影响,甚至有人断言基因芯片会因此退出历史的舞台,但是高通量测序也并非完美^[40],比如,读长偏短、仪器设备昂贵、后期数据处理复杂等也是其不足之处。而基因芯片在芯片制备后,实验费用低,而且不需要花费大量时间进行数据处理^[41],有些对特定功能基因或种群的研究中,并不需要对其全基因组进行测序,只需要对其特定的基因片段进行重点研究,此时基因芯片便更有优势^[42]。

2007年俄克拉荷马州大学的华人科学家周集中的科研团队研发一种用于分析微生物群落并研究其群落结构对生态系统作用的功能基因芯片(Functional Gene Array, FGA)—GeoChip^[43],该芯片包括了编码参与主要地球化学循环(如,碳循环、氮循环、金属抗性、有机物降解、硫循环和磷循环等)的超过24000个微生物基因的寡聚核苷酸探针,涵盖了150个功能区组的10000个基因。紧接着GeoChip不断扩充升级,并加入了*gyrB*基因的探针,可以在种/株水平上检测所含物种的多样性^[44],在GeoChip4.0中包含了超过152000个基因的寡聚核苷酸探针,涵盖了410个功能区组的84000个基因,此外GeoChip4.0采用原位合成技术来合成探针,它在一块普通玻片上可以分析12个样品。

利用GeoChip进行研究主要包括以下步骤:样品采集并提取DNA;提取DNA的全基因组放大;目标标记(Target labeling)和杂交(hybridization);芯片扫描和成像;数据处理的标准化及统计学分析。近些年来,GeoChip在土壤^[45]、水体^[46]、油田^[47]、生物反应器^[48]、矿厂^[49]等环境中比较广泛的应用。这一系列的研究中,GeoChip能够在功能基因水平上研究微生物群落结构和功能,进而推断环境中可能存在或变化的生态功能。

与其他宏基因组学技术相比,其优势为在高通量

的同时检测速度比较快,灵敏度高,通过研究实验表明GeoChip的错检率只有0.0036~0.025%^[44],结果直观,数据分析简单易操作,但是该芯片中使用的各种基因探针都是基于已知序列设计,并不能用以研究环境中存在的大量未知功能基因或未知类群的微生物。随着人类对各种功能基因了解的深入,各类型的功能基因数据库的扩充,未知功能基因或未知类群渐渐变为已知,GeoChip的容量必将随之扩展,从而将会更全面地进行微生物生态学的研究。

目前基因芯片另外一类值得关注的就是序列捕获芯片(Sequence capture),其原理与一般的芯片类似,只是长度稍长些,捕获后的序列还可以进行高通量测序,其捕获过程为:打断基因组DNA;与定制的序列捕获芯片杂交;冲掉没有杂交上的片段;洗脱富集的目标群体。一块芯片最多可以捕获5MB的指定区域,且特异性和覆盖度都很高,同时芯片上包含了对照探针用于检验系统的性能,此外,芯片上的探针还可以自行选择,捕获区域可以是连续或者非连续的基因组长片段、全外显组或其他任何区域。这种方法实现了不需要特异性引物设计和PCR就能得到目的片段的富集,改变了传统的只能利用PCR来对特定序列的扩增,能够精确地捕获成百上千的目的基因组区域,使得大规模片段筛选的研究省钱省事省时省力。目前序列捕获芯片在外显子的筛选上技术非常成熟,利用一张芯片就能识别并筛选出几百种致病基因的外显子^[50]。目前,这项技术在微生物学中的应用中崭露头角,2011年,Kent等^[51]把这项技术用于检测胞内共生菌*Wolbachia*内噬菌体的转移,随着基因组研究的进一步深入,越来越多的功能基因和特异片段被发现,序列捕获芯片可以对某些或某类感兴趣的微生物基因片段进行富集、筛选和回收,将会在微生物生态学的研究中发挥巨大作用。

3 经典实验手段的改进

传统PCR所用的聚合酶要求引物的长度必须是20~30个碱基,这就使得必须在相对保守的目标区域中有相应长度的序列^[52],但是符合这个条件后通用引物并不能对所有的目标微生物rRNA基因序列进行扩增,也就是说通用引物并不是真正的通用。

随着一些新的热稳定聚合酶的发现,可能会使PCR所需的引物长度有所减短,为此,2008年,Isenbarger等^[52]首次采用改造后的工程酶S-Tbr对

miniprimer PCR 进行了探索性的研究,结果表明 10 碱基的 miniprimer 可以很好识别土壤样品不同 16S rRNA 基因序列,其能得到更多种类的 16S rRNA 基因扩增产物,通过对比 NCBI 的 16S rRNA 基因序列数据库,扩增出的非 16S rRNA 基因序列的与现在所用的常规引物差别不大,表明 miniprimer 在不影响特异性的前提下具有更强的通用性。Xu 等^[53]把 miniprimer 用到 *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* 的鉴定中,这种细菌对于普通 PCR 非常不敏感,很难得到扩增,研究人员基于 miniprimer PCR 的 AFLP 来进行 *P. stewartii* 的遗传学分型,经过验证,它能够很精确地把 31 种已知菌株准确鉴定出来。2011 年, Goh 等^[54]采用普通引物和 miniprimer 分别对温泉微生物多样性进行了研究,得到的结果也与上述结论一致。

Miniprimer PCR 的探索性研究为以后 PCR 技术的改进提供了一个很好的思路, miniprimer 在微生物分子生态学的研究,尤其是 PCR 不敏感菌的研究中很有现实意义。随着更多的聚合酶的发现和开发,可以与其他新出现的方法技术结合使用,根据研究的实际情况选择合适的策略, miniprimer PCR 将有望在微生物分子生态学的研究中发挥一定的作用。

4 展 望

以高通量测序技术和高通量芯片 Geochip 为代表的高通量新技术,给微生物生态学的研究注入了新的血液,改变了传统的研究手段,简化了研究步骤,成果产出速度大幅度增加,新成果、新发现随之源源不断出现。同时传统的技术局限性,比如 PCR,在新的聚合酶发现以后,通过缩短引物的长度,使传统的 PCR 的一些局限性有了较为明显的改观,传统的实验手段通过技术改进,也会给微生物生态学研究提供更多的选择。

虽然高通量新技术为微生物分子生态学研究方法带来了庞大的数据量,但是这些方法都具有一定的局限性,比如高通量宏基因组研究得到的基因序列只能说明在这个环境中的微生物有某种功能的基因序列的存在,关于这种功能基因的表达与否并不能确认;宏转录组的总 RNA(特别是 mRNA)提取不易, mRNA 的含量太少必须经过富集以提高 mRNA 的含量,增加了人为误差的介入; GeoChip 只能对已知片段进行分析;此外,这些方法的数据统计分析所牵涉到的生物信息学方法及分析软件还需要进一步发展,提高分析速度和准确度,相关数据库也需要进一步的扩充。

微生物生态学的研究还必须加强纯培养法的研究,要得到某种具体微生物的分类学地位及其综合的开发利用都离不开得到这种微生物的纯培养,同时通过纯培养的研究验证提供更多有关数据库的参考数据;此外,还要加强宏蛋白质组学和代谢组学的研究,从不同层次不同角度全面地对特定环境中微生物分子生态学的群落结构和功能代谢进行审视。

综上,在研究中应该充分发挥新技术的优势,结合传统研究方法的改进,在实际的研究中选择合适的研究手段,加快生物信息学的发展,配合对微生物的分离纯化,扩充相关数据库,从而形成一个良性的互动,才能使微生物生态学的研究可持续发展并在微生物综合利用上走得更远。

参考文献

- [1] Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes O C, et al. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 100(2): 245-257.
- [2] Lewis K, Epstein S, D' Onofrio A, et al. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*, 2010, 63(8): 468-476.
- [3] 李慧,何晶晶,张颖,等. 宏基因组技术在开发未培养环境微生物基因资源中的应用. *生态学报*, 2008, 28(4): 1762-1773.
Li H, He J J, Zhang Y et al. Application of metagenomic technique in the exploring of uncultured environmental microbial gene resource. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(4): 1762-1773.
- [4] Schuster S C. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature*, 2008, 5(1): 16-18.
- [5] Metzker M L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(1): 31-46.
- [6] Mardis E R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*, 2008, 24(3): 133-141.
- [7] Ansorge W J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 2009, 25(4): 195-203.
- [8] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008, 9: 387-402.
- [9] 李晓然. 基于核糖体 RNA 高通量测序分析微生物群落结构. 上海: 复旦大学, 2011.
Li X R. Using ribosomal RNA pyrosequencing to explore the microbial community structure. Shanghai: College of Life Science, Fudan University, 2011.
- [10] 段墨,肖炜,王永霞,等. 454 测序技术在微生物生态学研究中的

- 的应用. 微生物学杂志, 2011, 31(5): 76-81.
- Duan Z, Xiao W, Wang Y X, et al. Application of 454 sequencing technique in microbial ecology. Journal of Microbiology, 2011, 31(5): 76-81.
- [11] Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. Nucleic Acids Res, 2002, 30(9): 2083-2088.
- [12] Parameswaran P, Jalili R, Tao L, et al. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. Nucleic Acids Res, 2007, 35(19): e130.
- [13] 徐晓宇, 刘和. 454 测序法在环境微生物生态研究中的应用. 生物技术通报, 2010, 1: 73-76.
- Xu X Y, Liu H. Application of 454 sequencing in environmental microbial ecology. Biotechnology Bulletin, 2010, 1: 73-76.
- [14] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [15] Jaenicke S, Ander C, Bekel T, et al. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. PLoS One, 2011, 6(1): e14519.
- [16] Zhang X, Yue S, Zhong H, et al. A diverse bacterial community in an anoxic quinoline-degrading bioreactor determined by using pyrosequencing and clone library analysis. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91(2): 425-434.
- [17] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature, 2009, 457(7228): 480-484.
- [18] Alegria A, Szczesny P, Mayo B, et al. Biodiversity in oscypek, a traditional polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(6): 1890-1898.
- [19] Chen C P, Tseng C H, Chen C A, et al. The dynamics of microbial partnerships in the coral *Isopora palifera*. ISME J, 2011, 5(4): 728-740.
- [20] Wei H, Dong L, Wang T, et al. Structural shifts of gut microbiota as surrogate endpoints for monitoring host health changes induced by carcinogen exposure. FEMS Microbiol Ecol, 2010, 73(3): 577-586.
- [21] Zhang C, Zhang M, Wang S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. ISME J, 2010, 4(2): 232-241.
- [22] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. ISME J, 2012, 6(2): 320-329.
- [23] Zhang C, Zhang M, Pang X, et al. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. ISME J, 2012.
- [24] Baker G C, Smith J J, Cowan D A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol Methods, 2003, 55(3): 541-555.
- [25] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3724-3730.
- [26] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem Biol, 1998, 5(10): 245-249.
- [27] 周丹燕, 戴世鲲, 王广华, 等. 宏基因组学技术与挑战. 微生物学通报, 2011, 38(4): 591-600.
- Zhou D Y, Dai S K, Wang G H, et al. The research innovation and challenges in metagenomics. Microbiology China, 2011, 38(4): 591-600.
- [28] 蒋云霞, 艾春香. 环境宏基因组学技术的主要瓶颈及发展. 环境科学, 2007, 28(12): 2861-2866.
- Jiang Y X, Ai C X. Main bottleneck and developments of metagenomic technology. Environmental Science, 2007, 28(12): 2861-2866.
- [29] Jung J Y, Lee S H, Kim J M, et al. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(7): 2264-2274.
- [30] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [31] Durso L M, Harhay G P, Bono J L, et al. Virulence-associated and antibiotic resistance genes of microbial populations in cattle feces analyzed using a metagenomic approach. J Microbiol Methods, 2011, 84(2): 278-282.
- [32] 李晓晖, 李鑫鑫, 张维, 等. 宏转录组学在微生物生态学研究中的应用. 中国农业科技导报, 2011, 13(4): 58-65.
- Li X H, Li X X, Zhang W, et al. Application of metatranscriptomics in microbial ecology. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 13(4): 58-65.
- [33] Poretsky R S, Bano N, Buchan A, et al. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(7): 4121-4126.
- [34] Sorek R, Cossart P. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. Nat Rev Genet, 2010, 11(1): 9-16.
- [35] Stewart F J, Ulloa O, Delong E F. Microbial metatranscriptomics in a permanent marine oxygen minimum zone. Environ Microbiol, 2012, 14(1): 23-40.

- [36] Baldrian P, Kolarik M, Stursova M, et al. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J*, 2012, 6(2): 248-258.
- [37] Bomar L, Maltz M, Colston S, et al. Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. *MBio*, 2011, 2(2): e11-e12.
- [38] Gosalbes M J, Durban A, Pignatelli M, et al. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17447.
- [39] Zakrzewski M, Goesmann A, Jaenicke S, et al. Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *J Biotechnol*, 2012, 158(4): 248-258.
- [40] Ledford H. The death of microarrays? *Nature*, 2008, 455(7215): 847.
- [41] Roh S W, Abell G C, Kim K H, et al. Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(6): 291-299.
- [42] Chou L S, Liu C S, Boese B, et al. DNA sequence capture and enrichment by microarray followed by next-generation sequencing for targeted resequencing; neurofibromatosis type 1 gene as a model. *Clin Chem*, 2010, 56(1): 62-72.
- [43] He Z, Gentry T J, Schadt C W, et al. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *ISME J*, 2007, 1(1): 67-77.
- [44] He Z, Deng Y, Van Nostrand J D, et al. GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *ISME J*, 2010, 4(9): 1167-1179.
- [45] Lomax C, Liu W J, Wu L, et al. Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms. *New Phytol*, 2012, 193(3): 665-672.
- [46] Van Nostrand J D, Wu W M, Wu L, et al. GeoChip-based analysis of functional microbial communities during the reoxidation of a bioreduced uranium-contaminated aquifer. *Environ Microbiol*, 2009, 11(10): 2611-2626.
- [47] Liang Y, Van Nostrand J D, N'Guessan L A, et al. Microbial functional gene diversity with a shift of subsurface redox condition during *in situ* uranium reduction. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(8): 2966-2972.
- [48] Liu W, Wang A, Sun D, et al. Characterization of microbial communities during anode biofilm reformation in a two-chambered microbial electrolysis cell (MEC). *J Biotechnol*, 2011, 157(4): 628-632.
- [49] Xie J, He Z, Liu X, et al. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(3): 991-999.
- [50] Shen P, Wang W, Krishnakumar S, et al. High-quality DNA sequence capture of 524 disease candidate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(16): 6549-6554.
- [51] Kent B N, Salichos L, Gibbons J G, et al. Complete bacteriophage transfer in a bacterial endosymbiont (*Wolbachia*) determined by targeted genome capture. *Genome Biol Evol*, 2011, 3: 209-218.
- [52] Isenbarger T A, Finney M, Rios-Velazquez C, et al. Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(3): 840-849.
- [53] Xu R, Chen Q, Robleh Djama Z, et al. Miniprimer PCR assay targeting multiple genes: a new rapid and reliable tool for genotyping *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 50(2): 216-222.
- [54] Goh K M, Chua Y S, Abudall R N, et al. A comparison of conventional and miniprimer PCR to elucidate bacteria diversity in Malaysia Ulu Slim hot spring using 16S rDNA clone library. *Romanian Biotechnological Letters*, 2011, 16(3): 8.

The New Development of the Research Method for Molecular Microbial Ecology

LV Chang-yong CHEN Chao-yin GE Feng LIU Di-qiu KONG Xiang-jun

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract Microbial community structure and functional metabolism are the research hotspots of microbial ecology. However, the research method of microbial community structure and functional metabolism has been limited by technique for a long time. With the development of new techniques, the research approaches for

molecular microbial ecology have being changed. High-throughput sequencing technology has ameliorated the research method of microbial diversity, metagenomics and metatranscriptomics. Meanwhile GeoChip which covered large amount of known functional oligonucleotide probes in single chip could determine the presence or absence of microbes and functional genes quickly. The newest research approaches for molecular microbial ecology study were reviewed and compared, and the applicability, advantages and disadvantages of those approaches were discussed.

Key words Molecular Microbial Ecology High-throughput Sequencing Technique GeoChip
Metagenome Metatranscriptome