

元基因组文库分析技术研究进展

李 武¹ 赵 勇² 王玉炯^{1,*}

(1. 宁夏大学生命科学学院西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021 2. 上海水产大学食品科学学院, 上海 200090)

摘要 随着新的分析技术的不断出现和成熟,促进了微生物分子生态学及相关学科的诞生和迅速发展。其中,元基因组文库分析技术即是近年来微生物分子生态学研究领域兴起的一种新的分析技术。就元基因组分析技术诞生的背景及该技术的原理进行了讨论,着重阐述了元基因组文库分析技术在寻找新基因、开发新的生物活性物质、研究群落中微生物多样性、人类元基因组测序等方面的应用。另外,归纳总结了目前国际上常用的诸如 PCR 为基础的筛选、荧光原位杂交 (fluorescent *in situ* hybridization, FISH)、底物诱导的基因表达筛选 (substrate induced gene expression screening, SIGEX)、基因芯片等元基因组文库筛选方法,并就不同方法的优缺点进行了分析和讨论,指出了目前元基因组文库分析技术存在的主要问题并对今后该技术的发展进行了展望。

关键词 微生物分子生态学,元基因组文库分析技术

文章编号: 1000-0933 (2007) 05-2070-07 中图分类号: Q78 Q938 文献标识码: A

Advances in metagenomic clone library analysis methods

LI Wu¹ ZHAO Yong² WANG Yu-Jiong^{1,*}

1 Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

2 College of Food Sciences, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (5) 2070 ~ 2076.

Abstract : The developing of modern molecular biology have been widely applied in the development of novel technologies and approaches used in the studies of microbial diversity, which have been accelerating the formation of new research fields such as modern molecular microbial ecology and its related subjects. The technology of Metagenomic Clone Library Analysis is one of such technologies recently used in the study of microbial ecology. In this review, we systematically reviewed and discussed the backgrounds of formation, principle and applications of this technology in the microbial ecological studies. Furthermore, the applications of this method in the discovery of new gene and novel biocatalysts, in the study of human metagenomics and microbial biodiversity in a community were extensively discussed here. We also summarized different approaches currently used in screenings of metagenomic clone library including PCR-based screening, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), substrate induced gene expression screening (SIGEX) and microarray. The advantages and disadvantages of above screening approaches were compared and the future direction of development of this technology was also discussed in this article.

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30560110); 宁夏大学科研基金资助项目 (ZR0604)

收稿日期 2006-04-04; 修订日期 2007-02-10

作者简介 李武 (1979 ~) 男, 宁夏隆德人, 硕士, 主要从事微生物分子生态学研究. E-mail: li_w@nxu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wyj@nxu.edu.cn

Foundation item The project was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30560110); The Natural Science Foundation of Ningxia University

Received date 2006-04-04; **Accepted date** 2007-02-10

Biography LI Wu, Master. mainly engaged in molecular microbial ecology. E-mail: li_w@nxu.edu.cn

Key Words : molecular microbial ecology ; metagenomic clone library analysis

微生物分子生态学是研究生态环境中微生物与其周围生物以及微生物与环境之间相互关系的学科。它主要以微生物基因组 DNA 的序列信息为依据,通过分析样品中 DNA 分子的种类和数量来反映微生物区系的组成和群落结构及其变化,进而研究微生物与生物环境、微生物与非生物环境之间的相互关系及其分子机制^[1]。随着新的分析技术的不断出现和发展,促进了微生物分子生态学及相关学科的诞生和迅速发展,这些技术对促进微生物分子生态学的发展发挥着巨大的作用,元基因组文库分析技术即是近年来微生物分子生态学研究领域兴起的一种新的分析技术。本文将对元基因组分析技术的原理、应用及元基因组文库筛选策略等展开论述。

1 背景介绍

微生物是地球上已知种类最多、数量最大、分布最广泛的生物类群,自然界中仅原核微生物的总量大约在 $4 \times 10^{30} \sim 6 \times 10^{30}$ 个^[2]。如何开发和利用地球上丰富的微生物资源是科学家长期不懈的追求目标。一直以来,人们对微生物世界的认识主要依靠传统的分离培养方法,由于自然界中的微生物只有很少一部分能被现有方法分离培养,如海水中只有 0.001% ~ 0.1% 的微生物可以被培养^[3],土壤中只有 0.3%^[4],而在一些极端环境中生存的微生物其可培养性更低^[5],这在很大程度上限制了人们对微生物世界的认识。

随着分子生物学技术的发展,一种新的技术,即 16S rRNA 基因克隆文库分析技术的诞生,使得研究者突破了传统分离培养方法的限制,加快了人们对微生物世界的认识。但是由于该方法本身诸多不足,如 PCR 扩增本身及引物设计带来的偏差,16S rRNA 基因本身在原核生物基因组中只占总基因组的 0.05% 左右,因此,不能完全解析生态系统中微生物多样性,也不能由此获得这些微生物种群的详细的生理生化、遗传、生态和功能多样性方面的信息^[6,7]。随着研究的需要,一种新的技术即元基因组文库分析技术在近年来得以形成,该技术目前正处在发展阶段,并将不断成熟。

2 元基因组概念及元基因组文库分析技术原理

元基因组 (metagenome) 是指一个群落中的不同微生物基因组的总和,也叫环境基因组或群落基因组^[8]。它是通过直接提取环境样品总 DNA,并用合适的限制性内切酶对 DNA 进行切割,获得大片断的环境样品 DNA 后直接与载体连接构建克隆文库,然后对文库进行筛选或者直接进行高通量测序的分析技术。和 16S rDNA 文库不同,元基因组文库是直接对全基因组 DNA 进行的克隆,理论上可以获得对研究样品中所有的微生物的全基因组的序列信息^[7],因此获得的遗传信息远大于 16S rDNA 文库。同时元基因组文库选用的是能容纳大片断的载体,如 BAC 载体可以保证大于 100kb 的 DNA 片断在 *Escherichia coli* 不丢失^[9]。正是由于插入片断大小的提高,加之在原核细胞中,多数基因及其调控因子成簇排列在染色体上^[10],这就可以通过克隆大片断 DNA 的策略,直接捕获编码酶、蛋白等的基因或基因簇,借助外源启动子使其在宿主中表达^[11]。因此,元基因组文库中有大量有用的可供开发的基因资源,如果用合适的方法加以筛选,就可以发现新的基因和新的代谢途径及产物等。所以,元基因组文库构建技术将使人们对自然环境中的微生物有全新的认识^[12,13]。

3 元基因组分析技术的应用

3.1 寻找新基因,开发新的酶等生物活性物质

通过不同的筛选策略对元基因组文库进行筛选,进而发现新基因及其代谢产物等,在酶的发现、新药开发等方面有广阔的应用前景^[14,15]。Venter^[16]等人构建了马尾藻海的微生物群落元基因组文库,用随机鸟枪法 (whole-genome shotgun sequencing) 进行测序,一共测定了 10.45×10^8 个碱基的序列,从中鉴定了 1.2×10^6 个以前未知的基因。Rondon 等人^[17]对一个农田土壤样品用两种方法构建了 2 个 BAC 文库 (SL1 和 SL2),其中 SL1 含有 3648 个克隆,SL2 含有 24576 个克隆,通过向培养基中加入不同酶的水解底物,然后根据酶的水解特性,如克隆表面颜色变化等来对 SL1 中的蛋白酶、DNA 酶、几丁质酶和抗菌物质等进行筛选,从中筛选到了 12 个有活性的克隆,而 SL2 中仅对具有溶血活性的克隆进行初步筛选,就得到了 29 个目标克隆。Beja 等人构建

了蒙特里海湾表层水的 BAC 文库,以 16S rRNA 基因为标记对文库进行筛选,发现了一个含 140kb 插入片断的克隆,该片断属于 γ -proteobacteria 的一个尚未被培养的 SAR86 类群^[13]。对该片断的深入研究发现 SAR86 类群可能具有新的获能方式,而这种获能方式一直被认为只有古菌才具有^[13,18]。

3.2 研究群落中微生物多样性,解析群落结构和功能

通过构建元基因组文库进行高通量测序,从而发现新的尚未被培养的微生物,了解环境样品微生物多样性,并对其功能进行预测,进而研究微生物群落结构和其生态学功能之间的关系。Tyson^[9]等人构建了一个处理矿山酸性排水的生物膜上的微生物元基因组文库,并用鸟枪法对群落进行测序,从中鉴定出了 *Leptospirillum* group II 和 *Ferroplasma* type II 2 个几乎完全的基因组和其他 3 个基因组的部分序列,并根据微生物之间的基因的功能互补揭示了它们的碳氮固定和产生能量的代谢过程和这些微生物在极端环境中的生存策略。同年美国科学家 Venter^[6]等人启动了迄今为止最大的 1 项元基因组项目,他们对马尾藻海的微生物群落进行了序列测定,根据序列拼接信息,这些序列来自 1800 个不同微生物种群的基因组 DNA,其中 148 个是未知细菌种群的。由于元基因组文库中含有大量的序列信息,这些大片的基因组 DNA 序列能够提供给人们尚未培养微生物的生理生化、遗传、生态和功能多样性方面的大量信息。通过序列对比,有时还能在带有 16S rRNA 基因的克隆中发现其他的功能相关的开放读码框 (open reading frames, ORFs) 或者是操纵子 (operons),这样就可以把基于 16S rRNA 的系统进化和功能基因联系起来^[20]。

3.3 人类元基因组测序

人类元基因组即人体内共生微生物的元基因组。它是通过构建大插入片断文库,尽可能的将人体内全部微生物全基因组进行克隆,从而对该元基因组文库做进一步的分析。2005 年 10 月 27~29 日,“人类元基因组计划圆桌讨论会议”在巴黎法国科学院召开,共有美、英、法、中等 13 个国家的 80 余名代表出席了会议,会议围绕对人体内共生微生物群落进行全序列测定的核心议题,针对测序策略和方法、项目对医学和健康领域的作用和影响、项目对生物技术产业的作用和影响等方面进行了 2d 的充分讨论和交流。“人类元基因组计划”被称为“人类第二基因组计划”,但其规模和广度将远远超过人类基因组计划,预计把人体内共生菌群的基因组序列测定出来其测序工作量至少相当于 10 个人类基因组计划。“人类元基因组计划”有可能发现超过 100 万个新的基因。这些基因的发现对于阐明许多疾病的发生机理、研究新的药物、控制药物毒性等都将发挥巨大的作用。因此,“人类元基因组计划”将是继人类基因组计划以后又一项宏大的国际科学工程,而元基因组文库分析技术将会在该工程的实施过程中发挥巨大作用。

目前,不同的实验室已经通过构建文库和测序获得了大量的基因片断,元基因组分析技术的一项长期目标将是通过不同 DNA 片断间重叠部分 (overlapping fragments) 及染色体步移 (walking) 和亚克隆 (clone to clone) 等手段重建那些尚未培养微生物的基因组^[21]。同时,面对文库中丰富的基因资源,如何用最有效的筛选手段发现它们,从而更加深入的研究未培养微生物,更好的开发和利用它们的代谢产物等,是研究的热点之一。

4 元基因组文库筛选方法

元基因组文库中往往有成千上万甚至上百万的克隆,而其中可以直接根据其表型特性如克隆颜色或常规方法筛选的克隆很少,如 Henne^[22]等人在从文库中筛选具有分解脂肪能力的克隆时,仅从 7.3×10^5 个克隆中筛选出了 1 个目标克隆。因此好的筛选方法将会使筛选工作事半功倍,以下对目前比较成熟的筛选方法进行简述。

4.1 以 PCR 扩增为基础的筛选

以 PCR 为工具,用进化相关基因如 16S rRNA 基因,或功能基因如 *recA*、*amoA* 等的序列信息设计引物对文库进行 PCR 扩增是比较常用的文库筛选策略。如 Wexler^[23]等人对 1 个废水处理系统元基因组文库用 16S rRNA 基因为标记构建亚克隆文库,随机从文库中挑了 42 个克隆进行测序并在 RDP 数据库中比对,发现这 42 个克隆中 16S rRNA 基因全是比较新的,且有 1/5 的序列和 *Syntrophus* 序列比较接近。另外,也可以用酶的编

码基因如氨单加氧酶基因、铵氧化酶基因、苯酚羟化酶基因等的序列信息设计引物等进行筛选^[24,25]。该法的不足是引物设计需要序列信息已知,文库中那些和现有基因序列完全不一样的基因无法被筛选^[26]。另外,PCR 扩增长度有限,一般只能获得基因或基因簇的一部分,为了得到完整基因的序列信息还需要后续工作,为此也发明了不少新的 PCR 技术来获得全长序列^[27,28],但筛选工作比较费时费力。后来又有人提出了一种全新的思路,即利用整合子(integrans)的特性设计 PCR 引物进行扩增,得到比较新的基因,该法在新基因发现上将起到比较重要的作用^[29,30]。

4.2 以基因表达产物为基础的筛选

该法主要是根据基因表达产物特性来对文库中的克隆进行筛选。如某些酶水解培养基中某一成分产生色素,某些克隆有抗生素抗性等。该方法在抗生素筛选、酶的发现,抗性相关基因研究等方面有很重要的应用。Diaz-Torres 等人^[31]分析了 20 个健康人口腔样品混合物中微生物的元基因组文库,通过在培养基中加入四环素来筛选有四环素抗性的克隆,共从 450 个克隆中得到了 18 个目标克隆,他们还对这些克隆中插入片段序列做了深入的分析。Lee 等人^[32]构建了一个森林土壤样品的 fosmid 文库,共得到 33700 个克隆,他们通过向 LB 培养基中加入底物三丁酸甘油酯来筛选脂肪分解酶类,最后通过克隆表型筛选得到 8 个目标克隆,并对这 8 个克隆 DNA 进行限制酶切和后续酶活性试验,再对这 8 个进行亚克隆,最后成功的得到了 6 个可水解脂肪的克隆,对这 6 个克隆的序列分析发现,他们和已知脂肪分解酶的基因相似性在 34%~40% 之间,说明这些酶是比较新的脂肪分解酶。类似的方法也被用于淀粉酶^[33]、木聚糖酶^[34]等的筛选研究中。

该法的优点是筛选过程比较简单、快速,只要基因能表达,就可以根据基因表达特性进行筛选,不需要复杂的实验过程。而且,该方法得到的基因往往是全长序列或完整代谢相关基因。不足之处是这种筛选方法依赖于目的基因在新的宿主中表达,有些基因可能在新宿主中不表达,这样对宿主也有较高的要求,有时可能要尝试对宿主进行挑选。而且要求克隆到基因或基因簇的全长,一旦克隆过程中破坏基因某个组件将使得基因没法表达,也就不能根据表型得以筛选。

4.3 用荧光原位杂交(FISH)技术进行筛选

FISH (fluorescent *in situ* hybridization)是利用荧光标记的特异核酸探针与细胞内相应的靶 DNA 分子或 RNA 分子杂交,通过在荧光显微镜或共聚焦激光扫描仪下观察荧光信号,来确定与特异探针杂交后被染色的细胞。FISH 技术已经用于不同生态系统的研究中^[35],该技术也开始被用于元基因组文库的筛选中。如 Leveau 等人^[36]构建了 *Collimonas fungivorans* 的 fosmid 文库,得到 3200 个克隆,并随机选取 768 个克隆,用 *Collimonas* 特异性探针 CTE 998-10155 去筛选其中的 16S rRNA 基因,发现其中有 12 个克隆为阳性克隆,该结果证明用 FISH 技术筛选大插入片段元基因组文库的可行性。FISH 技术的不足之处是该技术要求细胞具有良好的通透性,如果通透性不好,那么探针就很难进入到细胞内部和靶序列杂交^[37]。另外,探针设计需要序列信息已知,对序列全新的基因无能为力。

4.4 底物诱导的基因表达筛选(substrate induced gene expression screening, SIGEX)

该法是由 Watanabe 研究小组首次提出来的^[38],由于与微生物基础代谢相关的基因的表达一般是受底物或代谢中间产物等诱导的,这样,在文库筛选时,加入某种底物就可能诱导基因表达,反之亦然。根据这一原理研究者构建了一种特殊的基因表达载体 p18FGFP^[38],该载体含有 *lac* 启动子和绿色荧光蛋白结构基因 *gfp*,当外源基因片断插入 *lac* 启动子和 *gfp* 基因之间时,用底物加以诱导 *lac* 启动子启动外源基因表达,同时 *gfp* 也跟着表达,然后借助荧光激活的细胞分选技术(Fluorescence-activated cell sorting, FACS)进行筛选。Watanabe 等人^[38]用 SIGEX 技术筛选了一个地下水微生物群落的元基因组文库,用两种底物诱导,共从 152000 个克隆中筛选出了 35 个目标克隆。

SIGEX 技术报道以后,de Lorenzo 立即在 Nature 上发表了一篇评论文章对其不足之处进行了讨论^[39],de Lorenzo 指出,有些基因的表达除了受底物诱导外,还可能受其他因子的诱导,而且有些基因并不需要诱导,是本底水平表达的,同时,有些可诱导基因在新的宿主中有可能不可被诱导表达。但是考虑到元基因组文库中

含有大量的基因,这其中必然有一部分是可诱导的,因此,是可以被该技术检测到的。同时,由于该方法文库筛选时借助 FACS 技术,是一种半自动化文库筛选方法,在很大程度上节约了时间和成本,而且,筛选用的底物不用同位素等特殊标记,减少了毒副作用,也降低了成本。SIGEX 可能会在以后的工业化筛选中成为很好的筛选技术^[26]。

4.5 用基因芯片技术进行文库筛选

基因芯片技术是 20 世纪 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一,是集微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术。该技术可以将极其大量的探针同时固定于支持物上,所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析,从而解决了传统核酸印迹杂交技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、通量低等不足。由于该技术相比其他的分子技术具有高通量、高灵敏度、低成本、自动化等优势^[40],在微生物分子生态学研究可能发挥极其重要的作用^[41]。目前,该技术在微生物分子生态学中的应用主要包括:(1)系统分类寡核苷酸探针芯片 (phylogenetic oligonucleotide arrays, POAs);(2)功能基因芯片 (functional gene arrays, FGAs);(3)群落基因组芯片 (community genome arrays, CGAs)^[42]。随着元基因组分析技术的发展,基因芯片技术有望成为元基因组文库筛选的有力工具^[43]。如 Sebat^[44]等人在对元基因组文库测序之前,首先用芯片进行初步筛选,这在很大程度上减少了测序量和后续的序列拼接等工作量。

芯片技术在用于元基因组文库筛选时,除了其本身由于交互杂交等导致的特异性低,灵敏度较低等缺点外^[45],由于元基因组文库本身的特点,如 DNA 片断大小大大提高,样品复杂性提高等,这对芯片设计提出了新的要求^[46]。另外,由于基因芯片探针设计需要已知序列信息,这使得对未知的功能基因等筛选几乎不可能。当然,由于芯片技术以其不可替代的优势已经在各种微生物生态系统中得到应用,该技术也有望在元基因组文库筛选中发挥作用。

4.6 其他筛选策略

常规的分子杂交,抗原抗体反应等技术也可以用于筛选,也有公司开发出了专门筛选某些酶、蛋白等的试剂盒,在食品工业、医药等领域有较好的应用前景^[47]。此外,在构建文库之前对样品有目的的进行富集,然后提取样品 DNA 构建文库,这也可以提高目的克隆的数量,如在马尾藻海的微生物群落研究中,在提取样品 DNA 前先用滤膜过滤除去真菌细胞^[16]。也可以根据筛选目的的不同,在提取 DNA 前在目标样品中加入某些底物使得某类微生物快速生长而富集,或加入抑制某类微生物生长的底物,而使其他微生物得以快速生长而富集。

5 展望

元基因组文库的构建和高通量快速测序已经比较成熟,目前元基因组文库分析技术主要面临两大难点,其一是高通量测序后如何对得到的大量序列数据进行正确的拼接从而组建完整基因或完整基因组,其二是如何有效地对文库进行筛选从而获得目的克隆。随着分子生物学、计算机科学、生物信息学、系统生物学等学科及相关技术的发展以及学科的相互交叉,相信必定会促进元基因组分析技术发展,也会有新的技术发明被用于元基因组分析中,使得元基因组文库分析技术在微生物分子生态学研究领域大有作为。

References :

- [1] Giraffa G, Neviani E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, 67 (1-2): 19-34.
- [2] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, 95 (12): 6578-6583.
- [3] Kogure K, Simidu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 1979, 25 (3): 415-420.
- [4] Torsvik V, Goksoyr J, Daee F L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56 (3): 782-787.
- [6] Rodriguez-Valera F. Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ. Microbiol.*, 2002, 4 (11): 628-633.
- [7] Steele H L, Streit W R. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 247 (2): 105-111.
- [8] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, 68 (4): 669-685.

- [9] Shizuya H, Birren B, Kim U J, *et al.* Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1992, 89 (18): 8794 – 8797.
- [10] Vining L C. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity — a review. *Gene*, 1992, 115 (1-2): 135 – 140.
- [11] Daniel R. The soil metagenome — a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2004, 15 (3): 199 – 204.
- [12] Beja O, Aravind L, Koonin E V, *et al.* Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 2000, 289 (5486): 1902 – 1906.
- [13] Beja O, Koonin E V, Aravind L, *et al.* Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68 (1): 335 – 345.
- [14] Eysers L, George I, Schuler L, *et al.* Environmental genomics: exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 66 (2): 123 – 130.
- [15] Rodriguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, 231 (2): 153 – 158.
- [16] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304 (5667): 66 – 74.
- [17] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (6): 2541 – 2547.
- [18] Beja O, Spudich E N, Spudich J L, *et al.* Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 2001, 411 (6839): 786 – 789.
- [19] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428 (6978): 37 – 43.
- [20] Wellington E M, Berry A, Krsek M. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003, 6 (3): 295 – 301.
- [21] Schloss P D, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, 14 (3): 303 – 310.
- [22] Henne A, Schmitz R A, Bomeke M, *et al.* Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (7): 3113 – 3116.
- [23] Wexler M, Bond P L, Richardson D J, *et al.* A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environ. Microbiol.*, 2005, 7 (12): 1917 – 1926.
- [24] Futamata H, Harayama S, Watanabe K. Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67 (10): 4671 – 4677.
- [25] Mesarch M B, Nakatsu C H, Nies L. Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (2): 678 – 683.
- [26] Yun J, Ryu S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. *Microb. Cell. Fact.*, 2005, 4 (1): 8.
- [27] Mishra R N, Singla-Pareek S L, Nair S, *et al.* Directional genome walking using PCR. *Biotechniques*, 2002, 33 (4): 2830 – 2834.
- [28] Myrick K V, Gelbar W M. Universal Fast Walking for direct and versatile determination of flanking sequence. *Gene*, 2002, 284 (1-2): 125 – 131.
- [29] Rowe-Magnus D A, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2002, 292 (2): 115 – 125.
- [30] Stokes H W, Holmes A J, Nield B S, *et al.* Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67 (11): 5240 – 5246.
- [31] Diaz-Torres M L, McNab R, Spratt D A, *et al.* Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2003, 47 (4): 1430 – 1432.
- [32] Lee S W, Won K, Lim H K, *et al.* Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 65 (6): 720 – 726.
- [33] Voget S, Leggewie C, Uesbeck A, *et al.* Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69 (10): 6235 – 6242.
- [34] Brennan Y, Callen W N, Christoffersen L, *et al.* Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70 (6): 3609 – 3617.
- [35] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, 59 (1): 143 – 169.
- [36] Leveau J H, Gerards S, de Boer W, *et al.* En Phylogeny-function analysis of (meta) genomic libraries: screening for expression of ribosomal RNA genes by large-insert library fluorescent in situ hybridization (LIL-FISH). *Environ. Microbiol.*, 2004, 6 (9): 990 – 998.

- [37] Wallner G , Fuchs B , Spring S , *et al.* Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* ,1997 ,63 (11) :4223 — 4231.
- [38] Uchiyama T , Abe T , Ikemura T , *et al.* Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat. Biotechnol.* ,2005 ,23 (1) : 88 — 93.
- [39] De Lorenzo V. Problems with metagenomic screening. *Nat. Biotechnol.* ,2005 ,23 (9) :1045.
- [40] Shalon D , Smith S J , Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* ,1996 ,6 (7) :639 — 645.
- [41] Zhou J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* ,2003 ,6 (3) :288 — 294.
- [42] Lagace L , Pitre M , Jacques M , *et al.* Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* ,2004 ,70 (4) :2052 — 2060.
- [43] Bodrossy L , Sessitsch A. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Curr. Opin. Microbiol.* ,2004 ,7 (3) :245 — 254.
- [44] Sebat J L , Colwell F S , Crawford R L. Metagenomic profiling : microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* ,2003 ,69 (8) :4927 — 4934.
- [45] Guschin D Y , Mobarry B K , Proudnikov D , *et al.* Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* ,1997 ,63 (6) :2397 — 2402.
- [46] Urisman A. , Fischer K F , Chiu C Y , *et al.* E-Predict : a computational strategy for species identification based on observed DNA microarray hybridization patterns. *Genome Biol.* ,2005 ,6 (9) :R78.
- [47] Cowan D , Meyer Q , Stafford W , *et al.* Metagenomic gene discovery : past , present and future. *Trends Biotechnol.* ,2005 ,23 (6) :321 — 329.