

环境微生物群落功能研究的新方法和新策略

魏 力, 杨成运, 李友国 *

(农业微生物学国家重点实验室 华中农业大学, 武汉 430070)

摘要:微生物群落在驱动生物地球化学循环中扮演着重要角色, 传统的研究方法可对微生物群落进行遗传结构的解析, 但不能有效地与功能研究耦联。概述了近年发展起来的基于核酸和蛋白质水平的分子生物学新方法——环境 mRNA 和 rRNA 同时荧光原位杂交 (FISH)、寡核苷酸微阵列技术 (Oligonucleotide Microarray)、稳定性同位素联合宏基因组学 (SIP-enabled Metagenomics) 和环境蛋白质组学 (Metaproteomics) 在环境微生物群落功能研究中的应用, 并且对其发展趋势进行了分析和展望。

关键词:微生物群落功能; 荧光原位杂交; 寡核苷酸微阵列; SIP-宏基因组学; 环境蛋白质组学

文章编号: 1000-0933(2008)09-4424-06 中图分类号: Q146, Q938 文献标识码: A

New approaches and strategies for studying functions of environment microbial communities

WEI Li, YANG Cheng-Yun, LI You-Guo *

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(9): 4424 ~ 4429.

Abstract: Microbial communities play critical roles in global biogeochemistry cycling of many elements. However, the classical methods for studying such communities can only provide incomplete genetic structure data, but cannot effectively link microbial community structures to their functions. This mini review summarizes the recent developments and applications of some biomolecular methods. These include the use of mRNA and rRNA simultaneous fluorescence *in situ* hybridization, oligonucleotide microarrays, stable isotope enrichments, and other aspects of Metagenomics and Metaproteomics. Furthermore, future trends and perspectives are also discussed.

Key Words: functions of microbial communities; fluorescence *in situ* hybridization; oligonucleotide microarray; stable isotope enabled metagenomics; metaproteomics

微生物群落在地球生物化学循环中起着非常重要的作用, 它是营养循环、生物地化循环及天然和人源废物降解的主要驱动者^[1]。然而, 由于微生物生理和遗传的分析主要是针对可培养微生物的研究, 因此人们对群落结构和活性的认识是非常有限的。在地球各种生境中, 微生物表现出极大的多样性。然而相比人们基

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划研究专题资助项目 (2006AA06Z350); 华中农业大学人才启动费资助项目 (2005XRC026)

收稿日期: 2007-06-02; 修订日期: 2008-01-07

作者简介: 魏力 (1980 ~), 男, 内蒙古通辽人, 硕士生, 主要从事环境微生物和分子微生物生态学研究。E-mail: weili2000168@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liyouguo2001@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was financially supported by National High Technology Research and Development 863 Program of China (No. 2006AA06Z350) and Initial Support Foundation of Huazhong Agricultural University (No. 2005XRC026)

Received date: 2007-06-02; **Accepted date:** 2008-01-07

Biography: WEI Li, Master candidate, mainly engaged in environmental microbiology and molecular microbial ecology. E-mail: weili2000168@yahoo.com.cn

于培养法了解的微生物,绝大多数种类的微生物因尚未得到纯培养而无法了解。有数据表明,各种生境中大约只有 1% 的微生物是可培养的,多达 99% 的微生物在现有实验条件和技术下尚未得到纯培养,其中蕴含着巨大的应用潜能微生物和基因资源^[2]。这就需要新的技术方法来揭示微生物群落遗传结构和功能的多样性。

分子生物学方法的广泛应用使得人们对环境微生物群落的组成和生理有了更深刻的认识。然而,如何将微生物群落与其功能联系起来,仍然是在环境微生物分子生态学的研究中一个倍受关注的科学热点问题^[3]。传统的方法如基于微生物群体 DNA 的聚合酶链反应 PCR 的随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD)、限制片段长度多态性(RFLP)、单链构象多态性(SSCP)、梯度凝胶电泳(DGGE/ TGGE)和 rRNA 荧光原位杂交(FISH)等方法,使人们对微生物遗传多样性的认识大大提高。但通过这些方法取得的结果仍难以提供有关群落微生物间相互作用及其代谢功能的直接信息,特别是在群落中的原位功能更难以体现。本文综述了近年发展起来的分子生物学新方法——环境 mRNA 和 rRNA 同时荧光原位杂交(simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA)、寡核苷酸微阵列技术(oligonucleotide microarray)、稳定性同位素联合宏基因组学(SIP-enabled metagenomics)和环境蛋白质组学(metaproteomics)在环境微生物群落功能研究中的应用及其基本原理。

1 环境 mRNA 和 rRNA 同时荧光原位杂交

Giovannoni 等^[4]在 1988 年首次将荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)引入细菌学的研究,当时使用的是放射性标记 rRNA 寡核苷酸探针来检测微生物。随着荧光标记的发展,放射性标记被非同位素染料代替。1989 年,DeLong 首次使用荧光标记寡核苷酸探针检测单个微生物细胞^[5],荧光标记寡核苷酸探针比放射性探针更安全和具有更好的分辨力,并且不需要额外的检测步骤。荧光原位杂交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(confocal laser scanning microscope, CLSM)下观察荧光信号,来确定与特异探针杂交后被染色的细胞或细胞器的形态和分布,或者是结合了荧光探针的 DNA 或 RNA 分子在染色体或其它细胞器中的定位。其基本步骤包括:①样品固定;②样品制备和预处理;③预杂交;④探针和样品变性;⑤用不同的探针杂交以检测不同的靶序列;⑥漂洗去除未结合的探针;⑦检测杂交信号,进行结果分析。

由于荧光原位杂交可在细胞水平上分析微生物的群落结构,因此被广泛用于微生物群落结构分析。由于 rRNA 在微生物体内的拷贝数较高、分布广泛、功能稳定,而且在系统发育上具有适当的保守性,因此通常使用 rRNA 作为探针,但以 rRNA 作为探针的 FISH 只能分析群落的遗传结构,不能明确揭示群落结构与功能的关系。Annelie pernthaler 等^[6]将 rRNA 和 mRNA 同时 FISH 来研究环境细菌结构和某一代谢活性之间的关系,作为一个例证研究,同时检测环境微生物 mRNA 和 rRNA,他们研究了 *pmoA*(编码甲烷单氧化酶 A 亚基)基因的在环境中的表达,很好地与群落功能活性联系起来。可见,将环境 rRNA 和 mRNA 同时 FISH 来研究微生物群落功能是可行的。

FISH 技术可确定细胞和组织中特异性转录物定位及其表达的相对水平,它是用一标记生物素或地高辛的非同位素探针,和所制备样本中的 RNA 进行杂交。地高辛内标记的反义多聚核苷酸探针,在反转录过程中杂交到细菌细胞中,这一技术将是研究复杂群落环境中原位基因表达较为有利的手段。另外,结合报告基因分析的 FISH 技术对于复杂微生物群落的结构与功能分析也是十分方便有利的^[7]。在微生物群落研究中利用 FISH 技术将原位杂交与功能研究结合是必然的发展趋势,可以进行基因表达和代谢水平的研究。

2 微阵列技术

微阵列技术自 1995 年由 Schena 创立以来^[8],已逐渐发展成为功能基因组学研究的最有力的工具之一。它作为一种强有力的基因技术,被广泛地用于研究生物过程。虽然微阵列技术已被成功用于分析纯培养全基因的表达,但是由于特异性、灵敏度和定量等问题,它在环境微生物群落研究中仍存在挑战。根据探针的类型可将环境研究中的微阵列分为 3 类:功能基因微阵列(functional gene arrays, FGAs)、群落基因组微阵列

(community genome arrays, CGAs) 和系统发育寡核苷酸微阵列^[9]。其中,功能基因微阵列以代谢途径中关键基因作为探针,研究微生物群落中的功能菌群在环境中的功能活性及其代谢途径。为了构建含有大片段 DNA 的 FGAs,需要通过 PCR 方法从环境样品的克隆中扩增制备探针,因此,对于得到不同环境样品的克隆仍具有挑战性。

由于寡核苷酸微阵列特异性高,便于构建,它可能是微生物生态学研究的重要方法^[10]。不过,虽然它在环境微生物群落功能研究中大有希望,但是这种微阵列技术并未得到严格的测试和环境中应用的验证。Rhee 等^[11]发展了一个 50 个碱基的寡核苷酸微阵列技术,用来自 2402 个已知的生物降解和重金属抑制有关基因中的 1 657 个探针研究了环境群落生物降解潜力和功能活性。结果证实 50 个碱基的寡核苷酸微阵列的开发为微生物群落功能研究提供了新的快速、强大、高通量分析工具,可用于监测生物修复潜力及功能活性。

微阵列技术已广泛应用于研究废水处理系统以及环境污染物中微生物参与的反应和调节过程和机制、营养物循环和富营养作用的微生物多样性、微生物生态学原理以及生物学过程中与环境胁迫反应相关的基因功能和调节控制研究,并建立了基因表达谱,特别是寡核苷酸微阵列是当前环境微生物群落功能研究中的一种有效手段。

3 稳定性同位素联合宏基因组技术

宏基因组(metagenomics)或环境基因组(environmental genomics)是特定环境内所有生物遗传物质的总和,是一种不依赖于人工培养的微生物基因组分析技术。它于 1998 年首先由 Handelsman 等^[12]提出,与传统方法相比,宏基因组学是一种不依赖于纯培养(cultivation-independent)的技术方法。它直接从环境样品中提取基因组 DNA(environment DNA, eDNA),以获得某一环境或共生体中所有微生物基因组的集合,然后将环境 eDNA 克隆到适当的载体上,通常是质粒、粘粒、细菌人工染色体(BAC)和不同类型的广宿主或穿梭载体,然后让其在在大肠杆菌、链霉菌、假单胞菌或根瘤菌等适宜宿主中表达^[13],构建一个复杂度极高的宏基因组文库,最后运用各种分析手段筛选出功能基因,并可以进一步对功能基因测序,推测活性产物的结构,建立系统发生树等。宏基因组技术路线基本上可以分为 4 个步骤:环境 DNA 提取、宏基因组文库的构建、筛选目标基因、功能基因的表达和产物的分子生理生化鉴定。

宏基因组技术能够基于序列分析得到微生物群落潜在生态功能信息^[14~17],但是,不能够明确预测功能,特别是在特异条件下才表达的基因。而且要从由环境复杂群落构建的宏基因组文库中获得特定的目标基因,需要筛选和测序成千上万的克隆,工作量极大,并需要大量实验经费投入。尽管通过宏基因组学的方法筛选到了一些功能基因^[18~20],但随机性太大。稳定性同位素联合宏基因组技术(SIP-enabled metagenomics)可大大减少克隆的数量^[21],基本过程如图 1。通过稳定性同位素(SIP)实验使参与特定代谢过程(例如甲烷氧化)的生物基因组得到富集,克隆从 SIP 实验中获得的¹³C 标记的核酸,从而构建出在某一特定的环境过程中执行特定代谢功能(如可吸收或转化、代谢特定的标记基质)的环境微生物的功能宏基因组文库,就可重建一个较小、针对性强的目标微生物功能群基因组,从而极大地减少需要筛选的基因克隆数量。并且可直接利用分离出的¹³C-核酸构建宏基因组克隆文库,例如 Dumont 等^[22]在一个验证性实验中,利用从¹³CH₄标记的森林土壤样品中用密度梯度离心提取的¹³C-DNA,纯化后用限制性酶切割连接到细菌人工染色体(BAC)载体,再转入宿主,构建了一个中型的包括 2 300 个克隆的宏基因组文库,插入片段为 10~30kb。通过与 *pmoA* 基因(编

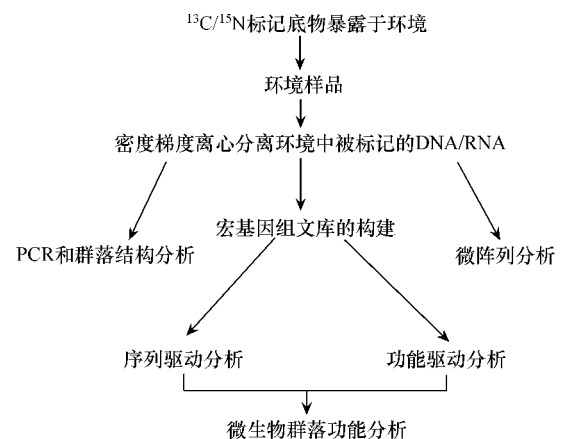


图 1 稳定性同位素联合宏基因组的技术路线示意图^[21]

Fig. 1 Schematic approach of stable isotope enabled metagenomic technique for linking microbial identity to function^[21]

码甲烷单氧化酶 A 亚基)杂交文库进行筛选,对其中一个可与探针杂交的 BAC 克隆的测序分析表明,其序列大小为 15.2kb,包含一个完整的 *pMMO* 基因操纵子和几个侧翼基因(编码一些在单碳化合物上生长所必须的酶的基因)。这就表明通过 SIP 实验直接克隆¹³C-DNA,以及在一个较小的宏基因组克隆文库中获取目的基因是非常可行的。

稳定性同位素联合宏基因组技术可用于环境甲基营养菌(甲烷营养菌和甲醇营养菌)、有机污染物降解菌、根际微生物生态(植物-微生物-微动物相互作用)、厌氧环境中互营微生物等群落结构和特定代谢过程功能分析^[23],在微生物的种类鉴定和功能鉴定间建立了直接的联系。

4 环境蛋白质组技术

“蛋白质组”概念,是由澳大利亚悉尼 Maquarie 大学的 Marc Wilkins 等^[24]学者最先提出的,其定义为:蛋白质组是一个细胞或组织所表达的全部蛋白质组分。现在比较公认的概念是,在一种细胞内存在的全部蛋白质组分。对于微生物群落来讲,蛋白质组学是对生物系统中所有蛋白的综合分析,能够揭示遗传信息是怎样转变为微生物群落功能的多样性。

在后基因组时代,微生物群落分析的一个主要的挑战就是阐述宏基因组的功能,并把微生物群落遗传结构和它们的功能多样性联系起来。除前面所述的环境 mRNA 和 rRNA 同时荧光原位杂交和稳定性同位素联合宏基因组技术外,微生物群落功能也能通过转录组学(Metranscriptome)的方法研究^[3],即提取环境样品中的所有微生物的 RNA,构建 16S rRNA 基因克隆文库或 cDNA 文库,再做进一步研究。然而,由于 RNA 的半衰期较短,在抽提过程中难以去除腐殖质,相似基因在不同群体中有不同的转录动态,RNA 和蛋白质的低相关性,这些阻碍了 Metranscriptome 在土著微生物群落研究中的应用。正是这些限制,才使蛋白质组学的方法逐步在微生物群落研究中开始得到应用。环境蛋白质组学(Metaproteomics)最初由 Wilmes 和 Bond^[25]命名,指大规模鉴定给定时间和地点的环境样品的整个蛋白组分。基本程序包括:环境中总蛋白的提取、通过一维或二维凝胶电泳对蛋白进行分离、质谱分析、数据统计分析将群落遗传结构与功能结构联系起来,同时也可鉴定蛋白进行反向遗传学研究(图 2)。

Wilmes 和 Bond 成功地抽提和纯化了来自优化的生物除磷活性污泥的总蛋白^[25],采用二维聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离和蛋白指纹图谱分析,并将高表达的蛋白质点进行切除,确定了以四级杆-飞行时间质谱从头多肽测序,分离的蛋白质分别被鉴定为外膜蛋白(porin)、乙酰辅酶 A 乙酰转移酶和 ABC 型支链氨基酸运输系统蛋白组分,这些蛋白可能来自于活性污泥中尚未纯培养的积累磷酸盐的微生物(Polyphosphate accumulating organism, PAO) *Rhodocyclus*。Kan 等^[26]分析美国切萨皮克湾微生物群落的蛋白表达谱。这个群落包含有等电点 4~8、分子量在 10~80kDa 的蛋白, MALDI-TOF 分析的高表达蛋白与已知蛋白没有明显相似性,通过 LC-MS/MS 测序和 MSBLAST 搜索,初步鉴定了 3 个切萨皮克湾蛋白,主要是源于海洋微生物且与拟杆菌(*Bacteroides*)和 α -变形菌纲(α -proteobacteria)细菌相关。这是首次将蛋白质组学方法用于研究水生微生物群落。Maron Pierre-Alain 等^[27]对蛋白的抽提和鉴定进行了优化,并对 DNA 和蛋白指纹图谱进行统计分析,建立了一套有效的、灵敏度高、重复性好的蛋白质回收和指纹分析方法。可见,用蛋白质组学的方法研究微生物群落是有效的。

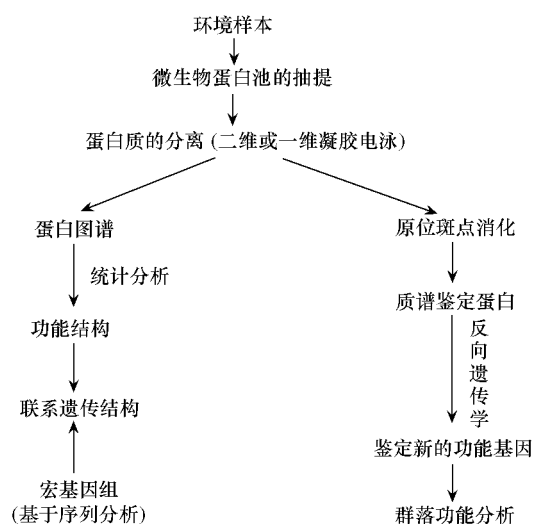


图 2 环境蛋白质组技术的技术路线示意图^[25]

Fig. 2 Schematic approach of metaproteomics technique^[25]

自然界的微生物群落是极其复杂的动态系统,在后基因组时代,基于核酸分析的方法(诸如 Metagenome)不能够揭示微生物群落的原位功能^[28]。大规模研究土著微生物表达蛋白(Metaproteome)能提供微生物在生态系统中的功能信息,它有望把微生物群落的遗传和功能多样性联系起来,更具体地说,对于不同环境的 Metaproteomics 的分析:(1)可以捕捉新的功能基因和代谢途径;(2)鉴定与特异胁迫有关的蛋白。蛋白质组学联合宏基因组数据可以更好地揭示环境群落分类多样性、功能多样性和生物过程。

5 面临的问题和展望

荧光原位杂交技术在微生物群落分析上有一定的应用,但是也存在许多缺陷和干扰因素:如许多霉菌、酵母菌和细菌(如假单胞菌属、军团菌属)会有自身荧光,干扰荧光信号强度;在群落分析时,探针缺乏特异性等。微阵列技术由于实验条件的限制,不能被广泛接受。尽管宏基因组技术从提出到现在已经在一定程度上得到了广泛应用,发现了一些功能基因,但是就这项技术本身仍存在许多限制:(1)环境 DNA 的提取仍旧需要改善,没有一个统一的核酸提取程序,针对不同的环境样品,需要摸索不同提取条件,以提高提取 DNA 的纯度,进一步满足构建文库的需要;(2)克隆的表达效率非常低;(3)需要构建大片段宏基因组文库,以提高筛选完整功能基因簇的效率^[29]。目前报道的宏基因组文库构建绝大多数采用 cosmid、BAC 或 fosmid 为载体,其功能筛选宿主一般局限于大肠杆菌,但其并不是一个很理想的高效表达外源基因的宿主,因而构建广宿主或穿梭宏基因组文库在分离新基因和分析微生物群落结构与功能等研究中尤为重要。采用本研究室长期使用的 pLAFR3 载体,可克隆插入片段约 28kb,且为一个广宿主载体,其能够在 α , β , γ -变型菌纲细菌和蓝细菌中复制,因而所构建的初始文库可接合转移到其它不同属细菌突变株中进行目标基因的筛选与多样性研究,此途径可显著降低或克服外源基因在大肠杆菌中低水平表达的问题,笔者在国外合作研究期间还曾报道根瘤菌比较大肠杆菌更适合外源宏基因的高水平表达。在环境样品的新型功能标记基因分离、多样性和时空表达研究方面也做了一定探索,采用单基因突变体(或缺失)的直接功能互补筛选策略分离鉴定功能新基因,它们可分别参与由多个基因共同完成的、却不能在大肠杆菌中进行的代谢过程-生物固氮。目前正利用固氮菌和根瘤菌的单基因突变(如 *nif*⁻, *nod*⁻, *fix*⁻)株作为宏基因组文库的受体,结合植物盆栽实验直接、高效地筛选能够互补相应缺陷表型的阳性转移接合子。稳定性同位素联合宏基因组技术虽然将文库的构建规模大大减小,但是克隆的表达仍是问题,并且只能针对环境群落中特定的代谢过程进行功能研究。环境蛋白质组学刚刚开始得到应用,还没有形成气候,环境蛋白质的提取和纯化需要不断的完善,为后续的分离和蛋白的鉴定提供条件。将环境基因组学和蛋白质组学联合来研究微生物群落功能或许较为可行,可以将群落组分与功能联系起来,这可能也是生态学家较为关注的内容。

微生物群落对环境、医疗和工业有着非常重要的意义。迄今,用分子生物学的方法来研究群落主要集中在鉴定物种,即微生物群落结构的遗传结构分析,宏基因组学只能提供潜在的功能,几乎没有能力去证实原位功能。蛋白质组学有潜力研究群落的功能信息,但微生物群落的蛋白质组学正处在萌芽状态,需要不断地改进技术问题。技术上的联合或许是必要的,例如荧光原位杂交和宏基因组的联合,稳定性同位素技术与宏基因组的联合,基因组与蛋白质组的联合等。Metaproteome 和 Metagenome 的研究会促进人们对微生物群落及其在生态系统中作用的认识。通过 Metaproteomics 的方法使从 Metagenomics 得到的信息更有价值,因为 Metaproteomics 能直接揭示功能基因的表达。随着技术的不断完善,微生物群落功能研究必将迈出新的步伐,也将揭示出自然环境微生物群落和人体微生物群落^[30,31]的更多奥秘,为环境保护、工农业应用和新药开发提供有价值信息。结合笔者的研究体验,最后值得特别提醒一点:分子生物学技术对传统微生物生态学理论和研究方法的冲击是巨大的,取得的突破是显著的,但是在研究环境微生物群落结构和功能等分子生态学问题时,应该注意上述分子生物学技术方法本身存在的不足、在研究过程中的不稳定因素和环境样品差异性对实验结果的影响。因此,在利用分子生物学技术手段所取得的结果进行理论分析与探讨时,应该充分考虑到方法的代表性、稳定性和适用范围,最好结合传统微生物生态学分析方法所获得的结果,做出合理的科学判断和解释。

References:

- [1] Zak J C, Willig M R, Moorhead D L, *et al.* Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol Biochem.* ,1994, 9: 1101 — 1108.
- [2] Daniel R. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (6) :470 — 478.
- [3] Maron P A, Ranjard L, Mougél C, *et al.* Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. *Microbiol Ecol.* , 2007, 53 (3) :486 — 93.
- [4] Giovannoni S J, Delong E F, Olsen G J, *et al.* Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J Bacteriol.* , 1988, 170(2) :720 — 726. Erratum in: *J Bacteriol* 1988, 170(5) :2418.
- [5] DeLong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 1989, 243 (4896) :1360 — 1363.
- [6] Pernthaler A, Amann R. Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:5426 — 5433.
- [7] Pace N R. Molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276: 734 — 740
- [8] Schena M, Shalon D. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270: 467.
- [9] Wu L, Liu X, Schadt C W. Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole-community genome amplification. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(7) :4931 — 4941.
- [10] Feng S, Tillier E R. A fast and flexible approach to oligonucleotide probe design for genomes and gene families. *Bioinformatics*, 2007, 23 (10) : 1195 — 1202.
- [11] Rhee S K, Liu X, Wu L, *et al.* Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(7) :4303 — 4317.
- [12] 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) :R245-9.
- [13] Li Y, Wexler M, Richardson D J, *et al.* Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned *trp* genes. *Environ Microbiol.* , 2005, 7(12) :1927 — 36.
- [14] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304 (5667) : 66 — 74.
- [15] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428: 37 — 43.
- [16] Tringe S G, von Mering C, Kobayashi A, *et al.* Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 2005, 308 (5721) : 554 — 557.
- [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] Lammle K, Zipper H, Breuer M, *et al.* Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J Biotechnol.* , 2007, 127(4) :575 — 592.
- [19] Cottrell M T, Moore J A, Kirchman D J. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(6) :2553 — 2557.
- [20] Park H J, Jeon J H, Kang S G, *et al.* Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. *Protein Expr Purif.* , 2007, 52(2) :340 — 347.
- [21] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, *et al.* Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403(6770) , 646 — 649.
- [22] Dumont M G, Murrell J C. Stable isotope probing-linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (6) : 499 — 504.
- [23] Wellington E M, Berry A, Krsek M. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(3) : 295 — 301.
- [24] Wilkins M R, Appel R D, Van Eyk J E, *et al.* Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics*, 2006, 6(1) :4 — 8.
- [25] Wilmes P, Bond P L. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environ. Microbiol.* 2004, 6:911 — 920.
- [26] Kan J, Hanson T E, Ginter J M, *et al.* Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. *Saline Systems*, 2005, 9:1 — 7.
- [27] Pierre-Alain M, Christophe M, Severine S, *et al.* Protein extraction and fingerprinting optimization of bacterial communities in natural environment. *Microbiol Ecol.* , 2007, 53(3) :426 — 434.
- [28] Wilmes P, Bond P L. Towards exposure of elusive metabolic mixed-culture processes: the application of metaproteomic analyses to activated sludge. *Water Sci Technol.* , 2006, 54(1) :217 — 226.
- [29] Lorenz P, Eck J. Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (6) : 510 — 516.
- [30] Pennisi E. Metagenomics. Massive microbial sequence project proposed. *Science*, 2007, 315(5820) :1781.
- [31] Klaassens E S, de Vos W M, Vaughan E E. Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(4) :1388 — 1392.