Bioprocess 生物过程, 2013, 3, 23-28
http://dx.doi.org/10.12677/bp.2013.33004 Published Online September 2013 (http://www.hanspub.org/journal/bp.html)

Molecular Biology Technology and Its Application in Soil Microbial Diversity*

Wanju Cao[1], Xin Sui[2,3#], Shijie Han[2], Yun Wang[4], Jingong Li[4], Jie Wang[4]

[1]Baihe Forestry Bureau of Jilin Province, Baihe
[2]Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang
[3]University of Chinese Academy of Sciences, Beijing
[4]Nature Reserve Management Center of Chaingbai Mountains in Jilin Province, Baihe
Email: bhlyjcwj@163.com, #xinsui117@sina.cn

Received: Jul. 5th, 2013; revised: Jul. 15th, 2013; accepted: Jul. 30th, 2013

Copyright © 2013 Wanju Cao et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Microorganism plays a key role in ecosystem, the structure and function of microbial diversity, to a certain extent, reflects the status of ecosystem. It is unilateral to study microorganism with traditional cultural method, which could not reflect the real situation of microorganism in ecosystem. Recently, the molecular biology technology breaks the limitation of traditional cultural method and tremendously promotes the development of microbiology and ecology. So, this paper introduces several molecular biology methods which are applied in microbial diversity research.

Keywords: Microbial Diversity; Research Method; Molecular Biology; Ecosystems

分子生物学技术在土壤微生物多样性中的应用*

曹万举[1]，隋　心[2,3#]，韩士杰[2]，王　云[4]，李金功[4]，王　洁[4]

[1]吉林省白河林业局，白河
[2]中国科学院沈阳应用生态研究所，沈阳
[3]中国科学院大学，北京
[4]吉林省长白山自然保护管理中心，白河
Email: bhlyjcwj@163.com, #xinsui117@sina.cn

收稿日期：2013 年 7 月 5 日；修回日期：2013 年 7 月 15 日；录用日期：2013 年 7 月 30 日

摘　要：微生物在生态系统中占据着很重要的作用，其结构和功能的多样性及变化在一定程度上反映了生态系统的基本状态。传统的微生物培养和鉴定方法得到的微生物信息很片面，不足以代表微生物在生态系统中的真实情况。近几十年发展起来的分子生物技术突破了传统方法的限制，极大地促进了微生物学和生态学的发展。本文介绍了现在常用的几种分子生物学方法在微生物多样性研究中的应用现状。

关键词：微生物多样性；研究方法；分子生物学；生态系统

1. 引言

土壤微生物包括从原核到真核的不同类群的生物，主要有：真菌、细菌、放线菌、原生动物、藻类和病毒，是生物多样性的重要组成部分。土壤微生物是土壤生态系统中最活跃的部分，是生态系统养分的源和汇，在凋落物的分解、养分循环与平衡、土壤理化性质改善中起着重要的作用，一个高质量的土壤应

*基金项目：国家重点基础研究发展计划 973 项目(2011CB403200)和国家自然科学基金(40930107)资助。
#通讯作者。

该具有良好的生物活性和稳定的微生物种群组成[1,2]。

过去，传统的方法是利用选择性的平板培养基来分离环境样品中的可培养的微生物，然后使用显微镜观察分离微生物形态、数目以及一些生理生化指标来反映微生物的种类多少，此方法廉价而快速，可以提供活的、不同生活类型的种群信息，特别是在水环境样品中，利用这种方法已分离了一些具有一定功能的特殊目标物种，获得许多很有应用价值的微生物种类。这种方法操作简单，但是由于这种方法人为限定了一些培养条件，无法全面模拟微生物生长的自然条件，常常造成选择性地富集一些微生物，而不能获得另一些微生物，导致了自然界中的绝大多数微生物仍然不能通过传统微生物培养方法被人们所认识。因此应用传统的研究方法反映的微生物信息较少，大量有应用价值的微生物信息无法获得。所以，现在传统培养方法只能作为一种辅助手段，常与与其他先进方法联合起来应用，这样才能较为客观而全面地反映环境样品微生物群落组成和结构的真实信息。

2. 几种常见的分子生物学方法

近年来，许多以分子生物学技术为基础的方法应用到土壤微生物多样性的研究中。促进了人们对土壤微生物群落组成以及功能的了解。这些方法包括变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和温度梯度凝胶电泳(Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、末端限制性片段长度多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、克隆文库、随机扩增 DNA 多态性分析(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)、单链构象多态性分析(Single strain conformation polymorphism, SSCP)、荧光原位杂交技术(FISH)、基因芯片(Microarry)、稳定同位素探针(SIP)、宏基因组学、实时荧光定量 PCR、转录基因组学技术等，为揭示土壤中微生物种群结构和遗传多样性提供了重要手段。

2.1. 变性梯度凝胶电泳

DGGE 是由 Fischer 等[3]1979 年首先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术，其分辨力比琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳高，是一种很常用的单碱基突变筛查检测方法。1993 年，Muzyer 开始利用这个技术来研究微生物的遗传多样性，目前该技术已被广泛用于土壤、污泥、水体、食品、人类肠道菌群等样品中微生物多样性分析、微生物鉴定和变异以及种群演替等方面研究[4-7]，其在揭示自然界微生物群落遗传多样性和种群差异方面具有一定的优越性。TGGE 是与 DGGE 相似的方法，称为温度梯度凝胶电泳技术，近十多年来，DGGE/TGGE 技术已成为研究微生物多样性的重要手段[8,9]。此技术可直接对提取的环境样品总 DNA 进行微生物多样性分析，通过 PCR 扩增微生物 16S rRNA 基因或功能基因，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对其产生的 DNA 片段混合物进行分离。同样大小的 DNA 序列由于含有的 GC 碱基含量不同，各片段的 Tm 值也就不同，甚至一个碱基对的不同，都会引起 Tm 很大的差异。DGGE/TGGE 就是应用这种差异来区分不同的基因序列，为了使亲缘关系接近的微生物分离，通常会使目的片段全部解链，但为了防止单链 DNA 分子互相分离，通常会在设计引物时加 40 个左右的 GC 碱基序列(GC 夹)，这样通过 DGGE 或 TGGE 分离，收集不同的 DNA 条带，再分别建立克隆文库，进行测序，序列与基因文库中的现有序列比较，即可确定微生物的种类[10,11]。PCR-DGGE/TGGE 技术的优点是可靠、重现性好、方便快捷，适合于大量样品快速分析。可用于不同微生物群落之间的差异分析，也可进行同一种微生物群落随时间和环境变化演替规律的研究，是微生物群落遗传多样性和动态分析的有力工具。此技术也存在一定局限性，DGGE 法只能对微生物群落中数量大于 1%的优势种群进行分析，还不能完整地反映复杂环境中微生物的群落；对于 DNA 片段长度也有要求，最适范围为 100 bp~500 bp，其分辨率可达到 1 个碱基，在 200 bp~900 bp 检测效果还好，但超出此范围的片段难以检测[12]，若电泳条件不适宜，则不能完全保证将有序列差异的 DNA 片段分开，容易发生共迁移现象[13,14]。

2.2. 末端限制性片断长度多态性(T-RFLP)

末端限制性片断长度多态性(T-RFLP)，又称为 16S rRNA 基因的末端限制性片段(Terminal Restriction Fragment, TRF)分析技术，具有非常广阔的应用前景。该技术建立在 PCR 的基础之上，已被成功的应用到了菌种鉴定、微生物群落的对比分析、微生物群落

Copyright © 2013 Hanspub

多样性及结构特征分析等领域[15-18]。根据目的基因的保守区设计通用引物，其中一个引物的 5’端用荧光物质标记，常用的荧光物质有 HEX，TET，FAM 等[19]。提取待分析样品的总 DNA，以它为模板进行 PCR 扩增，所得到的 PCR 产物一端就带有这种荧光标记。然后将 PCR 产物用合适的限制性内切酶消化，一般选用酶切位点为 4 bp 的限制性内切酶。由于在不同微生物的扩增片段内存在核甘酸序列的差异，酶切位点就会存在差异，酶切后就会产生许多不同长度的限制性片段。消化产物用自动测序仪(选用 gene marker 或 gene scan 功能)进行检测，只有带有荧光标记的片段能被检测到，而其它没有带荧光标记的片段则检测不到[20,21]。这些末端标记的片段就可以反映微生物群落组成情况，因为不同长度的末端限制性片段必然代表不同的细菌，也就是说一种末端限制性片段至少代表一类细菌；通过比较峰的数量、峰高、峰面积，再经一些统计学软件分析，可知不同处理间微生物群落组成的差异[22,23]。

2.3. 宏基因组技术

1998 年 Handelman 等[24]首次提出宏基因组(Metagenomics)又称元基因组、环境基因组或群落基因组，是指一个群落中的不同微生物基因组的总和。宏基因组是以功能基因筛选和序列筛选为研究手段，以微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系、及与环境之间的关系为研究目的的新的微生物研究方法[25]。其直接从环境样品中提取总 DNA，通过物理方法直接破碎环境中的 DNA，获得大片段的样品 DNA，与载体连接构建克隆文库，通过对宏基因组文库的筛选来获得新的功能基因和生物活性物质。宏基因组文库既包括了可培养的，又包括了未培养的微生物遗传信息，因此增加了获得新生物活性物质的机会[26-28]。其主要流程首先是环境样品及目的基因组富集，目前预富集技术主要分为基因组水平和细胞水平富集富集，基因组水平富集常用的技术为稳定同位素探针技术(SIP)，细胞水平富集主要是通过利用选择培养基对目的微生物进行富集培养，如底物选择、物理化学指标选择等，为了避免富集培养选择性地富集了快速生长特性的菌群，丧失物种多样性信息，现也常通过先在严格胁迫条件下短期处理，然后改为较温和的处理条件，来克服这种方法的局限性。其次是宏基因组 DNA 的提取，获得高质量的环境样品总 DNA，这是后续分析的基础，也是宏基因文库构建的关键步骤。第三，宏基因组文库的构建，根据 DNA 提取质量、插入片段、质粒拷贝数、宿主菌及筛选方法选择合适的载体系统，常用的载体有质粒、黏粒和细菌人工染色体等[29]。早期宏基因组文库主要以质粒载体为主，一般用于克隆小于 10 kb 的 DNA 片段，适用于单基因的克隆与表达。然而，很多时候，微生物的活性物质是大片段的 DNA，所以插入大片段的 DNA 以获得完整的基因组文库是很有必要的，目前，已经有可以插入 30 kb~40 kb 外源 DNA 的 Cosmid 文库和 Fosmid 文库，细菌人工染色体插入片段可达 350 kb，可用来制备由多基因簇调控微生物活性物质的完整代谢途径的相关片段文库[30]。第四，宏基因组文库筛选，由于宏基因组文库容量较大，最近的生物信息学的研究表明，如果对于一个插入子(<10 kb)的文库，为寻找一个目的基因需要筛选 10^5~10^6 个克隆，这表明从复杂的宏基因组中筛选目的基因一直是宏基因组学技术中的瓶颈。近年来，各种宏基因组文库筛选方法相继建立起来，根据筛选原理大体分为两大类：序列依赖性筛选法和非序列依赖性筛选法[31]。

2.4. 稳定性同位素探测技术(Stable Isotope Probing, SIP)分析技术

稳定性同位素探测技术(Stable Isotope Probing, SIP)是由稳定性同位素标记技术同分子生物学技术相结合而发展起来的，其优势在于除了对环境中微生物群落组成进行遗传分类学鉴定外，还可以确定其在环境过程中的功能，如可以提供复杂群落中微生物相互作用及其代谢功能的相关信息，避免了实验室培养而直接原位探测微生物的种类和功能，是一个很有应用前景的方法[32-34]。其基本原理是运用稳定同位素标记目标化合物，追踪该化合物在环境样品中的行为，并用于表征该化合物在环境中发生的各种生物和非生物反应，通常情况下，为了研究参与该化合物代谢的环境样品中的微生物，将原位的环境样品暴露于稳定同位素标记目标化合物的基质中，如果环境样品中存在的某些微生物能够以基质中的稳定性同位素标记

Copyright © 2013 Hanspub

目标化合物为碳源或氮源进行物质代谢，那么基质中的稳定性同位素便会被吸收并同化进入微生物体内，参与各类物质如核酸(DNA 和 RNA)及磷脂脂肪酸(PLFA)等的生物合成，通过提取、分离、纯化、分析这些微生物体内稳定性同位素标记的生物标志物，就可以将微生物的组成与其功能联系起来[35-37]。此技术为测定微生物底物利用和功能研究提供了强有力的手段，对于研究植物与土壤生态系统物质流对根际微生物群落结构和功能的影响方面也大有用途，例如根际碳流是土壤微生物生物多样性的主要驱动力，Lu 等用此技术测定了水稻根系的产甲烷古生菌和产乙酸细菌群落[38]。目前此技术已经应用于探测有机污染物的生物分解，如在研究环境样品中具有降解菲能力的微生物时，首先向受试环境供应 ^{13}C 标记底物，在降解和利用 ^{13}C 标记的菲时，其子代 DNA 链骨架中必然出现 ^{13}C，然后从环境提取核酸，用超速离心将核酸分成重核酸(^{13}C 标记)和轻核酸(非 ^{13}C 标记)两部分。用分子生态技术分析 ^{13}C 标记和非标记的核酸，用系统发育分析方法确定“活跃”和“非活跃”微生物的种类，进而可以直接对具有菲降解能力的微生物的 DNA 进行分子生物学方面的研究，确定其分类发育地位等等[39]。SIP 技术存在的主要问题是在培养过程中可能存在交叉取食的风险，即目标微生物死体的分解而使 ^{13}C 通过取食转移到其它微生物体内，现在大多数 SIP 是在实验室条件下人为设置的微宇宙中进行的，因此并不能完全代表微生物生长的实际环境条件[40]。

2.5. 荧光原位杂交技术

荧光原位杂交(FISH)是用带有荧光标记的特异核酸探针与细胞内相应的靶 DNA 或 RNA 分子杂交，然后应用荧光显微镜或共聚焦激光扫描仪(ConfocalLaser Scanning Microscope, CLSM)来观察荧光信号，确定结合了荧光探针的 DNA 或 RNA 分子在染色体或其它细胞器中的位置，同时也可以观察与特异探针杂交后被染色的细胞或细胞器的形态和分布。可以应用此技术来研究微生物群落结构的特征，并实时跟踪微生物种群的动态变化，也可以了解不同功能菌群间的相互作用[41-43]。如利用 FISH 技术监测了河流中微生物群落的动态变化，获知了一些在人工条件下很难培养的菌种以及一些新的微生物信息[44]。应用 CLSM-FISH 研究了厌氧反应器的生物膜中的乙酸氧化细菌、脱硫微菌属、产甲烷细菌、硫酸盐还原细菌的分布情况[45]。当然 FISH 技术也存在一些的问题，容易出现假阳性或者假阴性，许多微生物有自身荧光，如霉菌、酵母菌、假单胞菌属、军团菌属、蓝细菌属和古细菌等均存在荧光特性，这样会导致检测的假阳性；FISH 检测的精确性和可靠性主要依赖于寡核苷酸探针的特异性，因此探针的设计和评价十分重要，若设计上缺乏特异性，也会导致检测的假阳性。同样，有时也会出现假阴性，这主要是因为细胞壁的结构影响探针的穿透力，可能导致杂交信号强度降低，尤其是革兰氏阳性菌，为提高探针的渗透力，必须进行特殊的固定和前处理，相对而言，革兰氏阴性菌通透性较好，即使是多聚核苷酸探针也能很好的穿透到细胞内。此外 rRNA 形成的三维结构及其在细胞中的含量等也会影响到探针杂交的准确性[46]。

2.6. 实时定量 PCR 技术

实时定量 PCR，指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法，可以实时监测基因的表达量[47]。常用的实时定量 PCR 方法有两种：一种是荧光染料法，常用的染料为 SYBR Green I，它是一种结合于小沟中的双链 DNA 结合染料，在 PCR 反应体系中，染料掺入 DNA 双链后，发射荧光信号，否则不发光，保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。另一种应用较多的是 TaqMan 探针技术，探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团，5’端荧光基团吸收能量后将能量转移给临近的 3’端荧光淬灭基团，因此探针完整时，检测不到该探针 5’端荧光基团发出的荧光。PCR 扩增时，Taq 酶的 5-3’外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步，目前此技术已在很多领域有广泛应用。

上述一些微生物生态学技术让人们发现了许多以前人们未发现的新的微生物种属，然而这些技术都

Copyright © 2013 Hanspub

是从 DNA 水平来研究微生物的群落，无法洞察活动的微生物情况，以及活性功能基因的表达量，转录组学技术从转录水平上研究基因的表达[48]，可以用此方法研究土壤中参与物质代谢活动的微生物，转录基因组学的应用会让我们更加深入地了解环境中的微生物。

3. 展望

本文介绍一些常用的土壤微生物研究的分子生物学方法，但是不同的方法在获取土壤微生物多样性信息方面各有优劣势，因此在实际应用中，常常采用多种方法想结合，互相补充，避免使用单一方法所带来的偏差，尽可能的从多角度对土壤微生物进行分析和研究。

4. 致谢

本文章由国家重点基础研究发展计划 973 项目(2011CB403200)资助和国家自然科学基金(40930107)资助。

参考文献 (References)

[1] 孙波, 赵其国. 土壤质量与持续环境: III. 土壤质量评价的生物学指标[J]. 土壤, 1997, 29(5): 225-234.

[2] D. R. Zak, et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology*, 2003, 84(8): 2042-2050.

[3] S. G. Fischer, L. S. Lerman. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. Cell, 1979, 16(1): 191-200.

[4] D. Ercolini. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 297-314.

[5] E. Lyautey, et al. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: Methodological settings and fingerprints interpretation. Water Research, 2005, 39(2): 380-388.

[6] M. Miletto, P. L. Bodelier and H. J. Laanbroek. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(1): 103-111.

[7] G.-H. Wang, et al. Bacterial community structure in a mollisol under long-term natural restoration, cropping, and bare fallow history estimated by PCR-DGGE. Pedosphere, 2009, 19(2): 156-165.

[8] M. Manzano, et al. A PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) technique to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisiae* strains. International Journal of Food Microbiology, 2005, 101(3): 333-339.

[9] D. Mikkelsen, et al. Probing the archaeal diversity of a mixed thermophilic bioleaching culture by TGGE and FISH. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(7): 501-513.

[10] K. Leung, E. Topp. Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: Molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. Fems Microbiology Ecology, 2001, 38(2-3): 169-177.

[11] M. Sakurai, et al. Analysis of bacterial communities in soil by PCR-DGGE targeting protease genes. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(11): 2777-2784.

[12] 章家恩. 土壤微生物多样性实验研究方法概述[J]. 土壤, 2004, 36(4): 346-350.

[13] J. L. Kirk, et al. Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58(2): 169-188.

[14] G. P. Gafan, D. A. Spratt. Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGEGE)—An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. Fems Microbiology Letters, 2005, 253(2): 303-307.

[15] L. Kerkhof, M. Santoro and J. Garland. Response of soybean rhizosphere communities to human hygiene water addition as determined by community level physiological profiling (CLPP) and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. Fems Microbiology Letters, 2000, 184(1): 95-101.

[16] T. Harder, et al. A bacterial culture-independent method to investigate chemically mediated control of bacterial epibiosis in marine invertebrates by using TRFLP analysis and natural bacterial populations. Fems Microbiology Ecology, 2004, 47(1): 93-99.

[17] D. J. Burke, et al. Ectomycorrhizal fungi identification in single and pooled root samples: Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and morphotyping compared. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(9): 1683-1694.

[18] F. Li, M. A. Hullar and J. W. Lampe. Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (T-RFLP) analysis of human gut microbiota. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68(2): 303.

[19] S. A. Wakelin, et al. Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. Pedobiologia, 2009, 52(4): 237-251.

[20] T. L. Marsh, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. Applied and environmental microbiology, 2000, 66(8): 3616-3620.

[21] S. M. Tiquia, et al. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR-amplified 16S rRNA genes. Applied Soil Ecology, 2002, 21(1): 31-48.

[22] 王洪媛, 管华诗, 江晓路. 微生物生态学中分子生物学方法及 T-RFLP 技术研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(8): 42-47.

[23] E. Schwartz, K. L. Adair and E.A. Schuur. Bacterial community structure correlates with decomposition parameters along a Hawaiian precipitation gradient. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(8): 2164-2167.

[24] J. Handelsman, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & Biology, 1998, 5(10): 245-249.

[25] H. L. Steele, W. R. Streit. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. Fems Microbiology Letters, 2005, 247(2): 105-111.

[26] J. Dupré, M. A. O'Malley. Metagenomics and biological ontology. Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences, 2007, 38(4): 834-846.

[27] M. Schaechter, Encyclopedia of microbiology. Maltham, Academic Press, 2009.

[28] J. H. Kima, T. L. Simmonsa and S. F. Bradya. Unlocking environmental DNA derived gene clusters using a metagenomics approach. Chemistry and Biology, 2010, 2: 455-474.

[29] R. Daniel. The soil metagenome—A rich resource for the discovery of novel natural products. Current Opinion in Biotechnology, 2004, 15(3): 199-204.

[30] M. R. Rondon, et al. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 2000,

Copyright © 2013 Hanspub

66(6): 2541-2547.
[31] 黄循柳. 宏基因组学研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1058-1066.
[32] E. M. Wellington, A. Berry and M. Krsek. 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.
[33] O. Uhlík, et al. DNA-based stable isotope probing: A link between community structure and function. Science of the Total Environment, 2009, 407(12): 3611-3619.
[34] Y. Chen, J. C. Murrell. When metagenomics meets stable-isotope probing: Progress and perspectives. Trends in Microbiology, 2010, 18(4): 157-163.
[35] E. L. Madsen. The use of stable isotope probing techniques in bioreactor and field studies on bioremediation. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(1): 92-97.
[36] D. R. Singleton, et al. Stable-isotope probing with multiple growth substrates to determine substrate specificity of uncultivated bacteria. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(1): 180-187.
[37] D. H. Buckley, et al. $^{15}N_2$-DNA-stable isotope probing of diazotrophic methanotrophs in soil. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(6): 1272-1283.
[38] Y. Lu, R. Conrad. *In situ* stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere. Science, 2005, 309(5737): 1088-1090.
[39] I. R. McDonald, S. Radajewski and J. C. Murrell. Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. Organic Geochemistry, 2005, 36(5): 779-787.
[40] 葛源. 稳定性同位素探测技术在微生物生态学研究中的应用[J]. 生态学报, 2006, 26(5): 1574-1582.
[41] G. Jurgens, et al. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization1. Fems Microbiology Ecology, 2000, 34(1): 45-56.
[42] R. Araya, et al. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. Fems Microbiology Ecology, 2003, 43(1): 111-119.
[43] K.-J. Chae, et al. Analysis of the nitrifying bacterial community in BioCube sponge media using fluorescent in situ hybridization (FISH) and microelectrodes. Journal of Environmental Management, 2008, 88(4): 1426-1435.
[44] J. Liu, L. Leff. Temporal changes in the bacterioplankton of a Northeast Ohio (USA) River. Hydrobiologia, 2002, 489(1-3): 151-159.
[45] M. Domlnaues, et al. Evaluation of thermophilic anaerobic microbial consortia using fluorescence in situ hybridization (FISH). Water Science and Technology, 2002, 45(10): 27-33.
[46] 李华芝, 李秀艳, 徐亚同. 荧光原位杂交技术在微生物群落结构研究中的应用[J]. 中国生物学文摘, 2007, 21(9): 48-49.
[47] M. Hernández, et al. Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I, Amplifluor™ and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. Journal of Cereal Science, 2004, 39(1): 99-107.
[48] K. C. McGrath, et al. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(2): 172-176.

Copyright © 2013 Hanspub