

瘤胃微生物多样性及功能性研究方法概述

李 旦¹ 王加启¹ 卜登攀^{1*} 刘开朗¹ 赵圣国^{1,2} 于 萍¹ 李长皓¹ 魏宏阳¹ 周凌云¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室 北京 100193)

(2. 甘肃农业大学 兰州 730070)

摘 要: 庞大的瘤胃微生物群系之间存在着共生关系,影响着宿主的代谢,是反刍动物营养学的研究热点之一。通过基于 16S rRNA 的分子生物学方法,如探针法、实时定量 PCR 法、DGGE/TGGE、RAPD 和 RFLP 技术等研究瘤胃微生物多样性及组成结构,应用宏基因组学如建立 YAC 文库、BAC 文库等研究方法对瘤胃微生物功能特征进行更深入的研究,实现改善反刍动物乳、肉产品品质的目的。

关键词: 瘤胃微生物, 多样性, 功能性, 研究方法

Advances in Methodologies of Ruminant Microbial Ecology and Functionality

LI Dan¹ WANG Jia-Qi¹ BU Deng-Pan^{1*} LIU Kai-Lang¹ ZHAO Sheng-Guo^{1,2}
YU Ping¹ LI Chang-Hao¹ WEI Hong-Yang¹ ZHOU Ling-Yun¹

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

(2. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Abstract: There is a symbiotic relationship between the huge ruminant microflora, which plays a crucial role in the metabolic mechanism of ruminant animal. This makes the ruminant microflora as a hotspot. Using methods of molecular biology such as probe methods, Real-time PCR DGGE/TGGE, RAPD and RFLP to study ruminant microbial ecology and metagenomic methods including YAC library and BAC library to study ruminant microflora functionality would attain the aim to approve the quality of milk and meat, meanwhile to explore the abundant resources of ruminant microflora.

Keywords: Ruminant microflora, Diversity, Functionality, Methodology

1 引言

对于瘤胃微生物研究的认识,限于研究条件,在不同的时期重点不同。但是,提高畜产品产量,改善反刍动物的乳、肉产品的品质一直是研究者追求

的目标。随着分子生物学技术的发展,现阶段又增添了不少新的内容。现在,许多研究者将瘤胃微生物看作一种资源,探讨在新基因和工农业生产其它方面中的应用;将瘤胃微生物看作一个群体,去研究整个群体中一些菌所起的作用,研究不同微生物

基金项目: 国家“十一五”科技攻关奶业重大专项(No. 2006BAD04A00, No. 2006BAD12B08); 动物营养学国家重点实验室自主研究课题[No. 2004DA12584(团)0801]

* 通讯作者: Tel: 010-62810458; ✉ burdenpan@gmail.com

收稿日期: 2008-06-20; 接受日期: 2008-09-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

代谢和次生代谢之间的关系等, 最终期望组建有明确目的的微生物群体等等。在畜产品产量与质量方面, 通过基因及分子层次上的研究, 寻找可行的定向调控技术将是一个新的发展方向。

2 瘤胃微生物的研究简史

瘤胃微生物不仅数量大, 种类多, 微生物之间、微生物与宿主之间存在密切的相互作用, 另外瘤胃微生物区系还受到日粮成分、饲养方式以及季节等多种因素的作用。因此, 认识瘤胃微生物的功能及其活动规律十分复杂而困难。20 世纪 50 年代初, 发明了厌氧箱后, Hungate RE^[1]设计了RGCSA培养基(瘤胃液+葡萄糖+纤维二糖+淀粉+琼脂), 开始了瘤胃微生物的分离、培养、计数、形态鉴定与分类。60 年代, 研究的主要内容是对占优势的瘤胃微生物纯培养, 鉴别其生理生化特性。研究者逐渐认识到纯培养不能完整地反映瘤胃微生物群落的原位状态, 应当把瘤胃微生物作为一个完整的生态系统, 并将它与所赖以生存的瘤胃环境联系起来。事实上, 尽管人们已经知道了大多数重要的微生物种, 但瘤胃微生物的鉴别计数工作仍在继续, 未来还会发现新的微生物。直到 20 世纪 70 年代末, 才发现瘤胃内一个重要的微生物类群, 厌氧真菌^[2]; 最近, 仍有诸多新的微生物种分离出来, 如 *Lachnobacterium bovis*^[3]和 *Eubacterium pyruvativorans*^[4]。进入 20 世纪 70 年代后, 瘤胃微生物的研究逐渐进入生物技术阶段, 主要以瘤胃微生物的遗传物质—DNA 为对象, 对其进行生态、分类、遗传特性、功能及其进行改造、重组等分子技术操作, 将人工改造的外来种或瘤胃固有优势菌经改造再导入等手段来调控瘤胃发酵等。20 世纪 70 年代以来, 基因工程的手段被引用于纤维素酶的提取、分离; Howard等^[5]将白色瘤胃球菌纤维素酶基因在大肠杆菌噬菌体上克隆成功; Xue^[6]也将厌氧瘤胃真菌 *Neocallimastix patriciarum* 上的多功能纤维素酶基因克隆在大肠杆菌上。但是, 由于瘤胃生态系统稳定性高, 重组菌的生存能力不足以与固有种类竞争, 难以在瘤胃中定殖^[7]。20 世纪 90 年代, 将瘤胃作为一个整体甚至动物的一个器官来研究瘤胃微生物间、微生物与动物机体间以及微生物与上皮细胞间作用的“共生代谢”。Hattori等^[8]首次通过纯培养与免培技术, 分离得到 39 株瘤胃微生物, 它们分属于 3 个门即 Proteobacteria、

Fusobacteria、Firmicute, 并分析证明 39 株瘤胃微生物为减少延胡索酸菌群。

3 瘤胃微生物多样性及功能方面的研究

3.1 基于 16S rRNA 分析瘤胃微生物的多样性

3.1.1 基于 16S rRNA 的核苷酸(基因)探针技术研究瘤胃细菌群体: Stahl^[9]利用小核糖体DNA(16S rRNA)为靶标的种专一性探针(species-specific)研究了荷斯坦奶牛饲喂莫能霉素前后瘤胃微生物区系的变化, 开创了探针技术在瘤胃微生物研究中的先河。随后, 人们利用不同水平的组专一性探针(group-specific)研究瘤胃微生物结构及不同种类生物群体变化规律。Lin^[10]分别以细菌、古菌和真核生物的 16S rRNA为靶标的种专一性基因探针研究了牛、绵羊、山羊和猪胃肠道的微生物区系组成结构。Lin和Stahl^[11]利用属专一性(genus-specific)、种专一性以及亚种专一(subspecies-specific)等不同水平的分类专一性探针(taxon-specific probes)定量地研究了矮种马肠道中 *Fibrobacter* 菌的分布及其多样性, 发现产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)中有明显差异的两类菌株。

专一性基因探针还被用于研究胃肠道微生物功能。Krause和Russel^[7]通过对瘤胃中氨基酸发酵细菌专一性探针的设计, 研究了这些细菌在瘤胃中及在体外对莫能霉素的敏感性及其脱氨作用。Shi^[12]、Weimer^[13]也利用种专一性基因探针研究了白色瘤胃球菌(*Ruminococcus ablus*)和黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefacien*)在体外发酵过程中竞争作用。黄庆生^[14]选用RDP数据库内报道的探针序列进行定量, 研究了酵母添加物对产琥珀酸拟杆菌、黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌的影响, 发现酵母添加物有助于纤维分解菌在瘤胃内的生长和存留时间。

3.1.2 实时定量PCR技术研究瘤胃细菌: 20 世纪 90 年代后, 有关定量PCR的文献和方法才见报道, 其中Real Time PCR技术不仅兼顾PCR优点, 还具有特异性强、定量准确、重复性好、不存在PCR过程中后处理的污染问题等优点, 发展最为迅速。Tajima^[15]首次利用Real-time PCR技术研究了瘤胃中纤维素分解菌、淀粉分解菌、脂肪分解菌和牛链球菌等细菌的数量与日粮的关系。Sylvester^[16]也利用Real-time PCR技术对瘤胃中的原虫进行了定量研究。赵玉华^[17]对瘤胃微生物的Real-time PCR定量技

术进行了系统的研究,涵盖了瘤胃细菌、原虫和古细菌,建立了一套快速、灵敏、准确的瘤胃微生物分子定量方法,并利用Real-time PCR方法研究了植物油对瘤胃*Methanobacterium formicium*、总产甲烷菌、原虫(*Ciliate protozoa*)和溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrivolen*)数量的影响,证实脂肪酸对瘤胃甲烷生成的抑制效应可能主要是通过驱除原虫,从而减少附着于原虫的甲烷杆菌的数量实现的。杨舒黎^[18]建立了瘤胃脂解厌氧弧杆菌(*Anaerovibrio lipolytica*)、白色瘤胃球菌、琥珀酸丝状杆菌、黄色瘤胃球菌的荧光实时定量PCR方法,并运用此技术研究了肉牛与奶牛日粮添加豆油和胡麻油对上述细菌数量的影响。

3.1.3 DGGE和TGGE技术研究瘤胃微生物的组成结构: DNA指纹技术(fingerprinting techniques)也受到微生态研究者的关注。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)是微生物群落多样性研究中的常用方法。DGGE最早用于碱基突变的检测^[19,20],原理是长度相等的不同DNA序列由于碱基组成不同,在特定变性条件(DGGE中尿素浓度和TGGE温度)下变性,在变性梯度凝胶上的特定位置形成泳带,它通过在一端引物上附加富含GC的约40个碱基组成的一段序列(GC夹子),使双链DNA解开但不彻底解离,从而泳带的形成位置具有特异性,因此碱基突变率的检出率很高。Kocherginskaya^[21]用DGGE研究了去势公牛在干草和玉米两种日粮条件下瘤胃细菌群体结构的情况,建立了瘤胃液细菌16S rDNA的v3可变区的两个基因克隆库。一个是DGGE条带的混合体,将条带切割下来回收后进行扩增,然后直接测序;另一个是16S rDNA的v3可变区利用鸟枪法随机获得的基因克隆库。最终研究结果表明玉米日粮的动物瘤胃中细菌群体相对更多样数量更大。Regensbogenova和McEwan^[22,23]通过DGGE方法研究了羊瘤胃中原虫的多态性,有效的鉴别了原虫的多样性。Karnati和Ohene-Adjei^[24,25]应用DGGE技术分别进行了蛋氨酸对瘤胃细菌、原虫多态性影响和瘤胃细菌与原虫共生关系的研究。

3.1.4 RAPD、RFLP技术研究瘤胃微生物多态性: 目前已经开发出几种指纹分析技术用于研究复杂细菌区系变化以及胃肠道不同位点或不同动物间细菌

区系的变化,其中RAPD(random amplified polymorphic), RFLP(Restriction fragment length polymorphism)、T-RFLP(Terminal restriction fragment length polymorphism), AFLP(amplified fragment length polymorphism), RISA(ribosomal intergenic spacer analysis)等被广泛采用。Avgustin^[26]使用RFLP比较了栖瘤胃普雷沃氏菌29种菌株的遗传多样性和系统发生关系,揭示其具有高度的遗传多态性。Wood^[27]依据16S rRNA/rDNA的RFLP确定了瘤胃中拟杆菌和普雷沃菌的遗传因子成分,对来自瘤胃的26种普雷沃菌和6种拟杆菌限定了11种核糖体类型。Pei^[28]根据RFLP方法研究了来自于Jinnan牛的瘤胃古菌的多样性,发现了25个未确定序列属于Euryarchaeota。

3.2 瘤胃微生物宏基因组学功能分析

获取了这些尚不能培养的肠道微生物的基因序列后,研究其基因序列所对应的功能就成了肠道微生态研究的另一个重要方向,其中主要的技术是以序列分析为基础的宏基因组学(metagenomics)方法。宏基因组指的是自然环境中全部微生物的基因组。1998年,Jo Handelsman首次提出了宏基因组学的概念^[29]。

宏基因组学研究的基本研究策略包括:环境基因组大片段DNA的提取和纯化、文库构建、目的基因的筛选和/或大规模测序分析。宏基因组文库中既包含了可培养的又包含了不可培养的微生物基因和基因组,将某个自然环境中的总DNA克隆到可培养的宿主细胞中,从而避开了微生物分离培养的难题。

用于构建文库所选用的载体系统一直是分子生物学中不可或缺的重要工具。数十年中,先后建立了质粒(plasmid)、粘粒(cosmid)、酵母人工染色体(yeast artificial chromosom, YAC)和细菌人工染色体(bacteria artificial chromosom, BAC)等系统。根据选用不同的载体,文库也可以分为相应的几种文库。

3.2.1 质粒(plasmid)文库: 杨瑞红^[30]成功构建了瘤胃微生物基因组质粒文库,构建的质粒文库库容达到了 7.98×10^2 Mb。通过从文库中随机调取转化子测序和同源性比较,结果发现多种可能编码酶和蛋白的新基因,此外还发现了许多不同来源的未知功能或新的蛋白以及不能与任何编码蛋白的DNA序列比对的序列。

3.2.2 粘粒和YAC文库: 构建核基因组DNA大片段插入文库对生物的物理作图、图位克隆基因、基

因结构以及功能分析等具有重要作用,人们构建这种大的基因组文库大多数使用 λ 噬菌体和粘粒(cosmid)文库,他们的插入片断可达到 24 kb 和 45 kb,构建效率很高。构建核基因组DNA大片段插入文库已被广泛用于分子生物学的研究,其构建方法主要用于克隆 20 kb~45 kb大小的DNA分子可对基因组进行功能分析^[31],可通过建库测序筛选得到较大的酶基因序列^[32]、研究基因簇(gene cluster)^[33],也可用于研究环境土壤^[34]、海洋^[35]等。

由于插入的DNA片段不够大,克隆的DNA片段不稳定,因此限制了它们在染色体研究中的应用。1995年,Cal^[36]利用YAC作为载体构建了牛的YAC文库,插入片段可高达到 750 kb,但利用YACs作为载体构建文库存在一些缺陷:转化效率低、从克隆中分离插入DNA片段相当困难、YAC克隆常常为嵌和体和YACs容易造成缺失。

3.2.3 BAC文库:1992年,Shizuya^[37]首次利用BAC系统构建了人工基因组的BAC文库,最大插入片段在 300 kb以上。随后BAC文库迅速被一些研究者用于构建人类基因组^[38,39]、动物和植物基因组^[40,41]等真核基因组,与YAC系统相比,BAC系统具有一些无可比拟的优越性,如转化效率高、构建文库简单、嵌和体少、插入片段容易回收、在宿主细胞中DNA片段稳定性好、插入片段较大(一般为 80 kb~200 kb,最大可达到 500 kb)等。朱雅新^[42]构建了瘤胃微生物BAC文库来研究奶牛瘤胃混合微生物。该文库共 15360 个克隆,平均插入片段 54.5 kb,空载体率小于 2%,库容 837 Mb,插入片段的长度高于已报道的土壤环境微生物的 BAC 文库。并且通过对该文库进行部分酶活力筛选,获得具有淀粉酶活性的克隆 16 个,纤维素酶活性的克隆 26 个,对纤维素酶活性的克隆进行多酶活性的筛选,表明每个阳性克隆至少有 2 种酶活性。朱亚新对 2 个 BAC 克隆进一步亚克隆,找到了 2 个新的纤维素酶基因,分别属于第 5 家族和第 8 家族。

4 展望

为了揭开瘤胃这个黑箱的秘密,需要更多新技术和新方法的导入,从不同的层面进行研究。分子生物学的发展为我们提供了许多新技术,在此基础上,如果进一步将其与动物在体内和体外的其它研究手段相结合,则能更好地揭示瘤胃微生物的功能,

从而更好地掌握瘤胃代谢和微生物相互之间的关系,为合理应用饲料、开辟新的饲料资源提供帮助。

参考文献

- [1] Hungate RE. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev*, 1950, **14**: 1-63.
- [2] Bauchop T. The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. *Ann Rech*, 1979, **10**(2-3): 246-248.
- [3] Whitford MF, Teather RM, Forster RJ. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology*, 2001, **1**: 1-5.
- [4] Wallace RJ, McKain N. *Eubacterium pyruvativorans* sp. nov., a novel non-saccharolytic anaerobe from the rumen that ferments pyruvate and amino acids, forms caproate and utilizes acetate and propionate. *Int J Syst Evol Microbio*, 2003, **153**: 965-970.
- [5] Howard GT, White BA. Molecular cloning and expression of cellulase genes from *Ruminococcus albus* 8 in *Escherichia coli* Bacteriophage λ . *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(7): 1752-1755.
- [6] Xue GP, Orpin CG, Gobius KS, et al. Cloning and expression of multiple cellulase cDNAs from the anaerobic rumen fungus neocallimastix patriciarum in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 1992, **138**: 141-1420.
- [7] Krause DO, Russell JB. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(3): 815-821.
- [8] Hattori K, Matsui H. Diversity of fumarate reducing bacteria in the bovine rumen revealed by culture dependent and independent approaches. *Anaerobe*, 2008, **14**(2): 87-93.
- [9] Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR, et al. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 1079-1084.
- [10] Lin C, Raskin L, Stahl DA. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **22**: 281-294.
- [11] Lin C, Stahl DA. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1348-1351.
- [12] Shi Y, Odt CL, Weimer PJ. Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 734-742.
- [13] Shi Y, Weimer PJ. Competition for cellobiose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Appl Envi-*

- ron *Microbiol*, 1997, **63**: 743–748.
- [14] 黄庆生. 酵母培养物对瘤胃发酵影响及 16S rRNA 定量分析技术的应用研究. 中国农业科学院硕士论文, 2002.
- [15] Tajima K, Aminov RI, Nagamine T. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2766–2774.
- [16] Sylvester JT, Karnati KR, Yu Z, *et al.* Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *The Journal of Nutrition*, 2004, **134**: 3378–3384.
- [17] 赵玉华, 王加启. 利用实时定量 PCR 对瘤胃甲酸甲烷杆菌定量方法的建立与应用. 中国农业科学, 2006, **39**(1): 161–169.
- [18] 杨舒黎. 日粮添加豆油和胡麻油对奶牛瘤胃微生物及发酵参数的影响. 中国农业科学院博士学位论文, 2007.
- [19] Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1983, **80**: 1579–1583.
- [20] Mayer F, Coughlan MP, Mori Y, *et al.* Macromolecular organisms of the cellulolytic enzyme complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 2785–2792.
- [21] Kocherginskaya SA, Aminov RI, White BA. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistically ecology approaches. *Anaerobe*, 2001, **7**: 119–134.
- [22] Regensbogenovq M, Pristas P, Javorsky P, *et al.* Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Letters in applied microbiology*, 2004, **39**(2): 144–147.
- [23] McEwan NR, Abecia L, Regensbogenova M, *et al.* Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, **41**: 97–101.
- [24] Karnati SK, Sylvester JT, Noftsgar SM, *et al.* Assessment of ruminal bacterial populations and protozoal generation time in cows fed different methionine sources. *Journal Dairy Science*, 2007, **90**(2): 798–809.
- [25] Ohene-Adjei S, Teather RM, Ivan M, *et al.* Post inoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(14): 4609–4618.
- [26] Avgustin G, Wright F, Flint HJ. Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* from the rumen. *Int J Syst Bact*, 1994, **44**: 246–255.
- [27] Wood J, Scott KP, Newbold CJ, *et al.* Estimation of the relative abundance of different bacteroides and prevotella ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(10): 3683–3689.
- [28] Pei C, Mao S, Zhu W. Molecular diversity of rumen Archaea from Jinnan cattle. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2008, **48**(1): 8–14.
- [29] Handelsman JO. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2004, **68**: 669–685.
- [30] 杨瑞红. 免培奶牛瘤胃混合微生物基因组资源的初步研究分析. 新疆农业大学硕士论文, 2005.
- [31] Huang B, Whitchurch CB. A minimal tiling path cosmid library for functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 genome. *Microb Comp Genomics*, 2000, **5**(4): 189–203.
- [32] Christine ML, Joel MJ. The Bartonella henselae sucB gene encodes a dihydrolipoamide succinyltransferase protein reactive with sera from patients with cat-scratch disease. *Med Microbiol*, 2004, **53**: 1221–1227.
- [33] Qiong C, Stuart M, Thomas, *et al.* Genetic analysis of a gene cluster for cyclohexanol oxidation in *Acinetobacter* sp. strain SE19 by *in vitro* transposition. *Bacteriol*, 2000, **182**: 4744–4751.
- [34] Entcheva P, Liebl W, Johann A, *et al.* Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 89–99.
- [35] Béjà O, Koonin EV, 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**: 335–345.
- [36] Cal L, RAYlor JF, Wing RA, *et al.* Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 1995, **29**: 413–425.
- [37] Shizuya H, Birren B, Kim UJ, *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 USA*, 1992, **89**: 8794–8797.
- [38] Kim UJ, Shizuya H, Birren B, *et al.* Selection of chromosome 22-specific clones from human genomic BAC library using a chromosome-specific cosmid library pool. *Genomics*, 1994, **22**(2): 336–339.
- [39] Asakawa S, Abe I, Kudoh Y, *et al.* Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene*, 1997, **191**(1): 69–79.
- [40] Tomkins JP, Davis G. Construction and characterization of a deep-coverage bacterial artificial chromosome library for maize crop. *Science*, 2002, **42**: 928–933.
- [41] Wenzl P, Carling J. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *PNAS*, 2004, **101**: 9915–9920.
- [42] 朱雅新. 荷斯坦奶牛瘤胃微生物宏基因组 BAC 文库的构建与分析. 新疆农业大学硕士论文, 2006.