

# 元转录组学在微生物群落研究中的应用

金迪 王加启\* 赵圣国 卜登攀 孙鹏 周凌云

(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)

**摘要:** 环境微生物多样性复杂庞大, 蕴藏着丰富的基因资源, 随着分子生物学研究工具的出现, 对未培养微生物的研究愈加深入。元转录组学(Metatranscriptomics)是在元基因组学之后新兴的一门学科, 目前已渗透到了当前许多的技术和领域, 对于了解微生物代谢等生物过程中所涉及的基因和途径是一种很重要的工具。综述了元转录组学的基本概念, 讨论了其与目前被用于基础和应用研究的元基因组学相比的优势, 对元转录组学的研究方法及其在微生物研究中的应用进行了重点描述。

**关键词:** 元转录组学, 研究方法, 微生物, 应用

## Application of metatranscriptomics in the research of microbial population

JIN Di WANG Jia-Qi\* ZHAO Sheng-Guo BU Deng-Pan SUN Peng  
ZHOU Ling-Yun

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

**Abstract:** It is well accepted that microbial population from the environment is complex and contains high abundance of gene resources. Researches on uncultured microbes can be done more profoundly with the advent of molecular tools. Metatranscriptomics, a recently developed technology, is one of the important tools that can be used for understanding biologically active functional genes and their pathways. In this mini-review, we described the concept of metatranscriptomics and its advantages over metagenomic approaches, with emphasis on the research methods for metatranscriptomics and its applications.

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CB100804)

\*通讯作者: Tel: 86-10-62815833; 信箱: wang-jia-qi@263.net

收稿日期: 2011-08-01; 接受日期: 2011-11-01

**Keywords:** Metatranscriptomics, Research methods, Microorganisms, Application

众所周知,自然界中微生物具有复杂的多样性特点<sup>[1]</sup>,据估计只有1%的微生物能进行分离纯培养,绝大部分微生物无法用纯培养的手段进行研究<sup>[2-4]</sup>。随着元基因组学的发展,越来越多的基因组测序已完成,但也出现了新问题,如基因的功能无法获知,基因调控和基因间互作不清楚。虽然 mRNA 不是基因表达的最终产物,但转录是最开始的一步,研究转录组信息有助于理解基因调控网络。因此,在挖掘微生物所有基因的同时,更应注重分析基因功能<sup>[5]</sup>。

元转录组学(Metatranscriptomics)是在元基因组学之后新兴的一门学科,是针对所有微生物细胞产生的全部转录本或 mRNA 而提出的术语。由于细胞中包含所有 mRNA 的转录本,元转录组学可以反映在任一时间进行表达的基因。元转录组学的任务是利用基于微阵列的高通量技术,检测所给微生物细胞群的 mRNAs 的表达水平<sup>[6]</sup>。因此,元转录组学对于了解生物功能过程中所涉及的基因和途径是一种很重要的工具。

## 1 元转录组学的概念

元转录组学(Metatranscriptomics),是研究自然环境中全部微生物的转录组,包括可培养和未培养的微生物转录组信息。它是一门在整体水平上研究细胞中基因转录情况及转录调控规律的学科。简言之,元转录组学是从 RNA 水平研究基因表达的情况,研究整个微生物群落在一功能状态下基因组产生的全部转录物的种类、结构和功能、不同微生物构成的群落及其相互关系。Poretsky 等在 2005 年率先开展了元转录组学研究工作,他们从环境中提取了微生物总 RNA,利用减除杂交法去除 rRNA 从而富集了 mRNA,然后利用随机引物反转录获得 cDNA 模板,通过对

cDNA 模板扩增构建了 cDNA 文库。他们所使用的环境元转录组学的研究方法,成功地对海洋和淡水的浮游细菌群落进行了基因表达分析,为后续大量的元转录组学研究工作奠定了基础<sup>[7]</sup>。

与元基因组不同的是,元转录组的定义中包含了时间和空间的限定。同一细胞在不同的生长时期及生长环境下,其基因表达情况是不完全相同的。目前,元转录组学已被用于表征微生物群落的基因表达及种群结构<sup>[8]</sup>,并渗透到了当前许多的技术和领域,其中包括蛋白组学、基因组学和环境科学,这标志着基因组学的研究由结构基因组学进入了功能基因组学时期。转录组学研究是功能基因组学研究的一个重要手段,从信使 RNA 的表达模式上,转录组学能够鉴定功能相关的基因簇,并且在蛋白水平上提供了在何时、何地、何种水平上特殊的蛋白积累信息<sup>[9]</sup>。元转录组学作为一种宏观的整体论方法,改变了以往选定单个基因或少数几个基因零打碎敲式的研究模式<sup>[10]</sup>,将基因组学研究带入了一个全新的高速发展时代。

## 2 元转录组学与元基因组学的优势比较

基因组学和元基因组学研究的是一个特殊有机体或微生物群落的基因潜力。转录组学和元转录组学研究的是在特定环境条件下被转录的基因亚群。因此,转录组学和元转录组学是快速捕获存在于特殊生态位基因的有力工具<sup>[11]</sup>。

元基因组学描述了研究总基因组 DNA 的途径及方法,进而揭示了微生物群落所包含的代谢潜能。元基因组文库中目的克隆的筛选主要采用功能筛选和序列筛选的方法<sup>[12]</sup>,这两种方法也存在一定的问题。对于序列筛选法来说,主要是测

序的速度和费用的问题; 对于功能筛选法, 因为存在着基因在转录水平上的剪切修饰等加工过程, 目前从几万或几十万个克隆中只能筛选到几个有活性的基因<sup>[13]</sup>。因此, 基于基因组 DNA 的微生物群落结构分析没有考虑微生物的活力及代谢状态<sup>[14]</sup>。

在“组学”研究中, 元转录组学是元基因组学发展的下一个阶段, 通过 cDNA 直接克隆的方法研究环境样品中 RNA 转录本的组成, 能够直接检测转录的活性基因, 最重要的是聚焦于样品中的活性群落, 降低了群落的复杂度, 这也是元转录组学与基于 DNA 的元基因组学相比的优势所在<sup>[15]</sup>。基于 RNA 的群落分析更能够描述微生物群落中的代谢活性成员, 因为细胞中产生的 rRNA 量与细菌生长活性有直接关系<sup>[16]</sup>。元转录组学的目标定位在研究微生物群落功能基因的表达上, 并且为鉴定和分析微生物群落特异性变种的关键功能基因提供了新方法<sup>[17]</sup>。与基因组或宏基因组分析相比, 元转录组学只需要对较少量的转录本进行测序, 这对于低编码密度的真核生物基因组更为确切。Rohwer 等认为大规模的 RNA 测序方法将逐渐取代微阵列技术, 而成为元转录组学研究的重要手段<sup>[18]</sup>。

### 3 元转录组学的分析流程

整个元转录组学的工作流程包括提取分离微生物 mRNA, 构建 cDNA 文库及对产生的 cDNA 进行测序。Gilbert 等曾详细叙述了从土壤和海水中收集样品、提取 RNA 及富集 mRNA 的方法, 同时对于元转录组学数据的生物信息分析方法进行了专门的描述<sup>[19]</sup>。通常在收集完特定的微生物样品后, 用于高通量测序的 cDNA 的准备包括必须的 3 步: (1) 总 RNA 提取; (2) rRNA 的移除及 mRNA 的富集; (3) cDNA 的合成<sup>[11]</sup>。如图 1 所示。

样品采集完毕后首先要进行 RNA 的提取, 与 DNA 相比 RNA 稳定性很差, 许多转录本的存在时间都短于 1 min<sup>[7]</sup>。RNA 酶是导致 RNA 降解最主要的物质, 并且 RNA 提取的质量也会影响 cDNA 文库的构建, 因此对于 RNA 的提取要注意环境 RNA 酶的影响。Kang 等曾对 4 种 RNA 提取方法进行了比较, 同时比较了每种方法的 RNA 回收率及纯度, 并对瘤胃微生物 RNA 的提取方法进行了改进<sup>[20]</sup>。

在细菌中 mRNA 只占总 RNA 的 1%–5% 左右<sup>[21]</sup>, 因此 RNA 提取完成后需进行 mRNA 的富集。目前主要有两种方法可用于 rRNA 的移除及

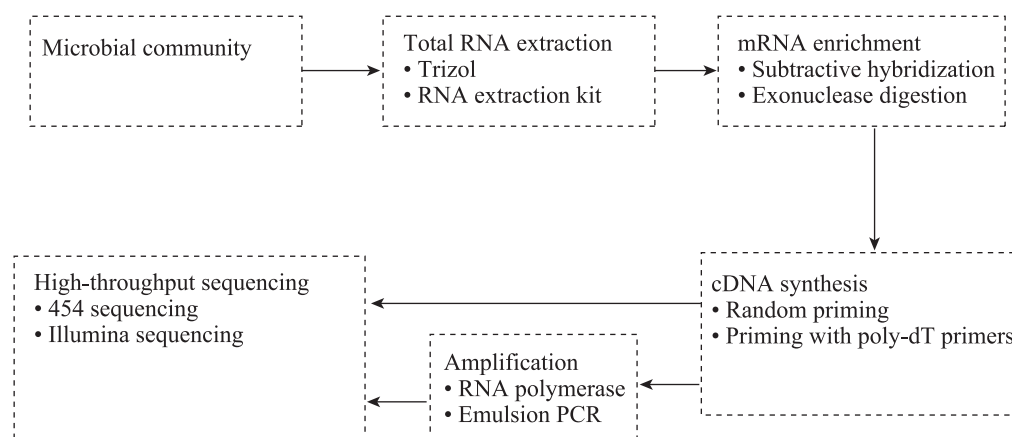


图 1 微生物群落元转录组学分析的工作流程<sup>[10]</sup>

Fig. 1 Workflow of metatranscriptomics from microbial communities<sup>[10]</sup>

mRNA 的富集,即减除杂交法和外切核酸酶消化法。减除杂交法主要是利用 rRNA 特异性探针实现的,利用减除杂交能够捕获 rRNAs 特异的 16S、23S 的寡核苷酸类,此种方法在细菌分离群和环境样品中均已得到应用。而外切核酸酶能够首先降解带有 5'-单磷酸的 RNAs,这些 RNAs 大部分被认为是 rRNAs。两种方法也可以联合使用来提高 rRNA 的移除效果<sup>[22-23]</sup>。Shrestha 等在进行 RT-PCR 和 cDNA 克隆之前,利用减除杂交法成功富集了样品中的 mRNA<sup>[24]</sup>。Stewart 等利用样品特异性探针对细菌 rRNA (16S 和 23S)进行减除杂交,此种方法降低了 40%–58% 的细菌 rRNA 转录丰度,使非 rRNA 序列增加 4 倍(从总数的 12%–20%到 40%–49%)<sup>[25]</sup>。He 等对两种常用方法及两种方法结合使用的有效性和精确度进行了鉴定,通过对 5 个微生物群落的大量平行测序,发现在这些处理中 rRNA 移除对微生物群落及 RNA 完整性起作用,仅减除杂交法引入了相对转录丰度的最小偏差,但外切核酸酶消化法及两种方法的联合处理显著的抵制了 mRNA 丰度<sup>[26]</sup>。

最后要以 mRNA 为模板,经反转录酶催化,在体外反转录成 cDNA, cDNA 的合成主要包括 cDNA 第一链的合成,双链 cDNA 的合成及 cDNA 的甲基化等,目前常用方法有随机引物法和 poly-dT 引物合成法两种,若获得的 cDNA 量太低不够直接测序,可以先进行扩增再进行高通量测序。

与 rRNA 移除类似,也有多种方法可用于转录本的扩增。Frias-Lopez 等利用随机六聚体引物和 T7 RNA 聚合酶进行了转录本的扩增<sup>[27]</sup>,他们利用纯培养及 DNA 微阵列证实了扩增偏倚性的存在。Gilbert 等利用多重链置换扩增获得了足量的 cDNA 以用于测序<sup>[28]</sup>。另外还有一个不会引起 DNA 或 cDNA 扩增偏倚性的方法是乳化 PCR

(Emulsion-PCR)技术<sup>[29]</sup>。乳化 PCR 技术是指将 PCR 体系分散在有机相中乳化,以达到单分子扩增的目的。

通过以上方法获得足量 cDNA 后即可进行高通量测序。高通量测序技术能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,并且一般读长较短。主要有以下几种:454 测序、Illumina (Solexa)测序和 Solid 测序等。高通量测序技术是对传统测序一次革命性的改变,一次对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,同时高通量测序使得我们可以对物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析。

元基因组学和元转录组学数据使我们能够对从自然栖息地中获得的多种多样的微生物物种进行分子进化分析。Stewart 等对从海洋和森林土壤获得的微生物 DNA 和 RNA 进行鸟枪法焦磷酸测序来检测基因表达水平和序列保守性之间的关系。结果表明,对于所有的样品, RNA 样品中能够表达的基因转录本与未表达的基因相比序列更加保守,并且与参考数据库中的序列更加匹配。在这些基因片段中还存在一个氨基酸使用情况的差异,所表达的基因倾向于富含 GC 的氨基酸,这与此基因池中存在高水平的功能限制的假说一致。因此,对于自然环境中的各种微生物分类群,基因的表达水平与进化速率有密切的关系。尽管他们非常复杂,但是元基因组学和元转录组学能够从分类学、功能和环境群落多样性上揭示蛋白序列保守型的广泛进化模式<sup>[30]</sup>。

## 4 元转录组数据获得和分析方法

目前,用于元转录组数据获得和分析的方法主要有基于杂交技术的芯片技术,主要包括 cDNA 芯片和寡聚核苷酸芯片,基于序列分析的基因表达系列分析(Serial analysis of gene expression, SAGE)和大规模平行信号测序系统

(Massively parallel signature sequencing, MPSS)。

#### 4.1 基于杂交技术的芯片技术

基因芯片(DNA microarray), 是指高密度固定于固相支持物表面的单链 DNA 的微点阵<sup>[31]</sup>。该技术的基本思想为将已知的 DNA 序列作为探针, 通过原位合成或显微打印的方式将探针固化于支持物表面, 然后将标记的 RNA 或 DNA 样品与探针 DNA 进行杂交, 通过荧光检测仪或激光扫描装置来检测芯片表面的荧光信号, 从而定量或定性分析杂交模式<sup>[32]</sup>。

基因芯片的分类较多, 根据储存的生物信息类型, 基因芯片可分为 cDNA 芯片和寡核苷酸芯片。cDNA 芯片和寡核苷酸芯片的主要原理类似, 都是通过碱基互补配对原则进行杂交, 来检测对应片段是否存在及存在量的多少。它与 cDNA 芯片的本质差别在于寡聚核苷酸芯片固定的探针为特定的 DNA 寡聚核苷酸片段, 而后者为 cDNA。基于 DNA 微阵列表达型分析的弊端是: 在功能微点阵芯片制造前需要基因甚至是完整的基因组序列及相应的注释<sup>[33]</sup>。对于利用 DNA 微阵列的其他局限还包括其探测灵敏度的准确性和定量可靠性两个方面<sup>[33-34]</sup>。

#### 4.2 基于序列分析的基因表达系列分析

SAGE 用一个相对短的诊断序列标签分离、串连、克隆、测序, 提供了一个广泛适用的定量分类和各种状态中表达基因比对的有力工具<sup>[35]</sup>。其快速、灵敏、高丰度、高通量和易于发现未知序列等优点使它在众多基因差异研究技术中脱颖而出, 一问世就得到了极大的关注<sup>[36]</sup>。

SAGE 技术最大的优势在于对基因性质预先不了解的前提下研究由微生物转录变化引起的生物现象, 在较短时间内检测微生物所表达的几乎所有的 mRNA, 得到其拷贝数, 同时可以发现潜在的未知基因。SAGE 可以定量分析已知基因及未知基因表达情况, 可以帮助获得微生物的完

整转录组学图谱、发现新的基因及其功能、作用机制等信息。另外, SAGE 技术还可区分转录本的不同变体和反义转录本, 因输出的信息是数字形式而提供了一个数据平台, 其他研究者可直接运用数据做进一步研究。但限于技术流程复杂、工作量巨大、耗资大、标签确定困难等缺陷, 在国内 SAGE 技术还未全面推广, 但它仍然是目前获得特定组织的全部表达基因的最好方法。因此, 明确 SAGE 的优势和缺陷, 在实际研究中根据不同目的, 选用合适的技术或者相互融合、联合使用对构建接近完美的设计具有十分重要的意义。

#### 4.3 大规模平行信号测序系统

MPSS 是对 SAGE 的改进, 它能在短时间内检测微生物群落全部基因的表达情况, 是功能基因组研究的有效工具, 是进行深入的表达模式分析的最新工具之一。MPSS 是通过对每个基因产生的单个 mRNA 分子进行计数, 来分析一个样品全部基因表达水平的开放平台。在进行实验前没有必要对基因进行鉴定和表征。在每个细胞少量 mRNA 分子水平上, MPSS 有一个常规敏感性; 并且数据集是以数字的形式简化了数据的处理与分析。因此, 在当前众多可利用的微阵列和非微阵列技术中, MPSS 在全部数据集的形式生成上具有许多优势, 这有利于我们在数字生物时代进行假设推动试验<sup>[37]</sup>。因其需要配套的软硬件较为昂贵, 目前国内外的相关应用报道不多。该技术在研究微生物基因组功能方面及其相关领域研究中将会发挥巨大的作用。

### 5 元转录组学在微生物研究中的应用

元转录组学是探索自然环境微生物群落功能基因表达未知序列的一种方法, 同时提供了一种获得群落特异变种功能关键基因的新方法。元转录组学已被用于解释微生物群落对环境变化的

反应,通过分析群落中活性组分的丰度和组成变化,能够快速捕捉群落特定时间的基因组成<sup>[19]</sup>,已在海洋、土壤、动物胃肠道微生物等诸多环境微生物的研究中发挥了广泛作用。

### 5.1 水体微生物

人们利用元转录组学技术已经获得了大量海洋微生物的转录组信息。Gilber 等利用 GS-FLX 焦磷酸测序技术获得了一个复杂海洋元转录组的全 mRNA 序列,并对此进行研究,发现元转录组学靶点高效的表达了较新的序列<sup>[28]</sup>。对相关元基因组的分析证实在元转录组中有更高的组装水平,并且大基因家族有更高的产量,这些成员中约 91%是新的<sup>[28]</sup>。

Poretzky 等<sup>[7]</sup>通过微生物转录本的直接提取和分析,对海洋和淡水的浮游细菌群落进行了基因表达分析。通过 rRNA 的减差杂交获得了环境总 RNA,分离 mRNA 后进行反转录,通过随机引物进行扩增、克隆,对大约 400 个克隆进行分析,结果表明其中 80%的克隆是由不明 mRNA 衍生的。mRNA 似乎是来自不同的分类群,同时包括细菌和古细菌,许多转录物与环境许多重要的过程相关,如硫磺氧化, C1 复合物的同化作用以及通过多氨降解获得氨等<sup>[7]</sup>。元转录组数据集能够揭示自然界微生物群落的多样性、分类学分布和 sRNAs 丰度的相关信息,同时揭示了包括碳代谢和营养需求等与环境相关的过程。

Shi 等<sup>[38]</sup>从海洋微生物元转录组数据集中检测到的一个大片段的 cDNA 序列除了包含已知的 sRNAs 之外,还包含了之前未被认识的 psRNAs,这些 psRNAs 与从相似的环境中获得的微生物基因组的基因间的序列能很好的匹配,展示了特有的保守的二级结构,并且通常被具有潜在调节功能的基因所包围。同时从优势浮游生物物种中获得的一组 psRNAs 的基因特异图谱揭示了一些新的潜在调节因素<sup>[38]</sup>。此外,他们从北太平洋副热

带环流区域的 ALOHA 站点选择了不同的海水深度并收集了 4 种浮游细菌,并对 4 种样品的总长度为 38 Mbp 的群落元转录组序列和 157 Mbp 的群落元基因组序列进行了测序和比较,分类学分析表明这些样品主要属于 3 个分类群: *Prochlorales*、*Consistiales* 和 *Cenarchaeales* 分类群。在 DNA 和 cDNA 文库中,这些分类群的相对丰度有时差异很大,显示了每个细胞转录活性的相对差异。总之,这些数据对于理解自然栖息地中的微生物群落的分类学和功能学分布提供了 DNA 和 cDNA 的偶联分析<sup>[39]</sup>。

### 5.2 土壤微生物

对于土壤中活性酶产量的微生物调控,也可以通过研究 mRNA 转录组进行评定<sup>[40]</sup>。Leininger 等通过 454 焦磷酸测序对复杂的土壤微生物群落元转录组进行了研究,结果显示在土壤中,古细菌氨氧化关键酶的转录本数量与其他细菌相比要多几个数量级,这表明古细菌是土壤中数量上占优势的氨氧化菌<sup>[41]</sup>。Urich 等进一步分析了这一转录组研究中所获得的 25 Mb 的测序数据,其不经过 PCR 或克隆直接将群体总 RNA 随机的反转录成 cDNA,直接焦磷酸测序获得了大量的 cDNA 探针。并且证实有 8%的起始读长大于 250 kb 的片段是 mRNA 探针<sup>[42]</sup>。

Bailey 等<sup>[17]</sup>利用从森林土壤中提取的多聚腺苷酸 mRNA 构建 cDNA 文库并进行筛选。此文库包含了构成群落的每个不同个体所表达的基因,并且揭示了其元转录组信息。通过对扩增的反转录 RNA 进行 18S rDNA 基因测序来评价群落的多样性,揭示了整个微生物群落对当地环境条件的适应潜能<sup>[17]</sup>。元转录组学技术可用于土壤中新基因和生物活性物质的筛选和挖掘,为研究土壤微生物复杂群落结构提供了十分重要的工具。

### 5.3 动物胃肠道微生物

元转录组学也已被用于分析肠道微生物群

落,为肠道微生物物种提供了系统发育描述及功能分析,并且元转录组学具有揭示环境变化时细胞瞬时反应的能力<sup>[43]</sup>。Silva 等为了了解瘤胃微生物 mRNA 种类的相对丰度及其在营养消化利用中的作用,测序分析了约 80 000 个 mRNA,描绘了一个复杂的代谢功能网络,只有 25%的转录组能够进行有效功能注释,其中 57%的转录组与碳水化合物代谢、氨基酸代谢功能有关<sup>[44]</sup>。Gosalbes 等对 10 个健康的志愿者的肠道微生物进行了元转录组的研究,对从每个样品中获得的微生物 cDNAs 通过 454 技术测序,16S 转录本的分析表明了活性微生物群落的系统发育结构,揭示了肠道微生物的主要功能是碳水化合物代谢、能量生成及细胞成分的合成<sup>[45]</sup>。

Poroyko 等通过对全部转录组进行鸟枪法测序,来研究对新生仔猪饲喂母乳和人工乳时肠道微生物的基因表达的差异。首先从每头试验仔猪盲肠内容物中获得微生物 DNA 和 RNA,通过 454 测序系统对 cDNA 文库和 16S RNA 扩增片段进行测序,结果表明微生物群落同门不同属,对筛选的 cDNA 序列进行功能注释,发现两种处理下基因的表达模式是相似的,所有样品均表达了大量与碳水化合物及蛋白代谢相关酶类的转录本<sup>[46]</sup>。此实验所鉴定的大量的转录本代表了仔猪盲肠末端微生物的元转录组,在两种模式下大部分微生物群落的基因表达相似,但也鉴定了一些差异表达的基因簇。

## 6 研究展望

在元转录组学的新领域,利用一些方法来对自然群落里表达的微生物基因测序,可以让我们理解微生物基因的表达形式。目前对各种微生物群落转录本从一个特殊的时间和空间进行深入测序已成为可能,其避免了对可观察的基因数量的限制,靶基因的选择及对探针和引物的需要。

但是在研究过程中仍需要解决一些技术问题,在对微生物群体或个体进行 cDNA 序列分析时,转录组中 mRNA 的富集是主要的技术挑战。然而,毫无疑问,元转录组学技术为微生物的研究和发展提供了很好的策略。在转录本结构研究,非编码区域研究,基因转录水平研究和全新转录区域研究等方面,随着新的科技方法的不断发展,其应用潜能将会得到进一步的发挥与认可。

## 参 考 文 献

- [1] Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(5): 339–348.
- [2] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. *Science*, 1997, 276(5313): 734–740.
- [3] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 2006, 103(32): 12115–12120.
- [4] Torsvik V, Øvreås L, Thingstad TF. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1064–1066.
- [5] Leung YF, Cavalieri D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis[J]. *Trends in Genets*, 2003, 19(11): 649–659.
- [6] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, 102(43): 15545–15550.
- [7] Poretsky RS, Bano N, Buchan A, et al. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(7): 4121–4126.
- [8] Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity[J]. *The Journal of Physiology*, 2009, 587(17): 4153–4158.
- [9] 薛建江, 邱景富. 病原菌感染宿主的转录组学研

- 究进展[J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2007, 24(5): 63-66.
- [10] Mahan MJ, Slaueh JM, Mekalanos JJ. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues[J]. *Science*, 1993, 259(5095): 686-688.
- [11] Warnecke F, Hess M. A perspective: metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 142(1): 91-95.
- [12] 贺纪正, 张丽梅, 沈菊培, 等. 宏基因组学 (Metagenomics) 的研究现状和发展趋势[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(2): 209-218.
- [13] 冯美琴. 宏基因组学的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(2): 415-416.
- [14] Sessitsch A, Gyamfi S, Stralis-Pavese N, et al. RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 51(2): 171-179.
- [15] Morales SE, Holben WE. Linking bacterial identities and ecosystem processes: can 'omic' analyses be more than the sum of their parts?[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 75(1): 2-16.
- [16] Wagner R. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth[J]. *Archives Microbiology*, 1994, 161(2): 100-109.
- [17] Bailly J, Fraissinet-Tachet L, Verner MC, et al. Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(7): 632-642.
- [18] Rohwer F. Real-time microbial ecology[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1): 10.
- [19] Gilbert JA, Hughes M. Gene expression profiling: metatranscriptomics[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 733: 195-205.
- [20] Kang S, Denman SE, Morrison M, et al. An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase Chain reaction[J]. *Current Microbiology*, 2009, 58(5): 464-471.
- [21] Mcgrath KC, Thomas-Hall SR, Cheng CT, et al. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75(2): 172-176.
- [22] Poretsky RS, Hewson I, Sun SL, et al. Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(6): 1358-1375.
- [23] Hewson I, Poretsky RS, Beinart RA, et al. In situ transcriptomic analysis of the globally important keystone N<sub>2</sub>-fixing taxon *Crocospaera watsonii*[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(5): 618-631.
- [24] Shrestha PM, Kube M, Reinhardt R, et al. Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 960-970.
- [25] Stewart FJ, Ottesen EA, DeLong EF. Development and quantitative analyses of a universal rRNA-subtraction protocol for microbial metatranscriptomics[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(7): 896-907.
- [26] He SM, Wurtzel O, Singh K, et al. Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(10): 807-812.
- [27] Frias-Lopez J, Shi YM, Tyson GW, et al. From the cover: microbial community gene expression in ocean surface waters[J]. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 2008, 105(10): 3805-3810.
- [28] Gilbert JA, Field D, Huang Y, et al. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities[J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e3042.
- [29] Blow MJ, Zhang T, Woyke T, et al. Identification of ancient remains through genomic sequencing[J]. *Genome Research*, 2008, 18(8): 1347-1353.
- [30] Stewart FJ, Sharma AK, Bryant JA, et al. Community transcriptomics reveals universal patterns of protein sequence conservation in natural microbial communities[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(3): R26.
- [31] Ramsay G. DNA chips: state-of-the art[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(1): 40-44.



- [32] Bowtell DDL. Options available-from start to finish-for obtaining expression data by microarray[J]. Nature Genetics, 1999, 21(Suppl 1): 25–32.
- [33] Darby AC, Hall N. Fast forward genetics[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(11): 1248–1249.
- [34] Gao HC, Yang ZK, Gentry TJ, et al. Microarray-based analysis of microbial community rnas by whole-community RNA amplification[J]. Applied Environmental Microbiology, 2007, 73(2): 563–571.
- [35] Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression[J]. Science, 1995, 270(5235): 484–487.
- [36] Boon K, Osório EC, Greenhut SF, et al. An anatomy of normal and malignant gene expression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(17): 11287–11292.
- [37] Reinartz J, Bruyns E, Lin JZ, et al. Massively parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in-depth quantitative gene expression profiling in all organisms[J]. Briefings in Functional Genomics, 2002, 1(1): 95–104.
- [38] Shi YM, Tyson GW, Delong EF, et al. Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean's water column[J]. Nature, 2009, 459(7244): 266–269.
- [39] Shi YM, Tyson GW, Eppley JM, et al. Integrated metatranscriptomic and metagenomic analyses of stratified microbial assemblages in the open ocean[J]. The ISME Journal, 2011, 5(6): 999–1013.
- [40] Wallenstein MD, Weintraub MN. Emerging tools for measuring and modeling the *in situ* activity of soil extracellular enzymes[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(9): 2098–2106.
- [41] Leininger S, Urich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. Nature, 2006, 442(7104): 806–809.
- [42] Urich T, Lanzén A, Qi J, et al. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome[J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2527.
- [43] Kemperman RA, Bolca S, Roger LC, et al. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities[J]. Microbiology, 2010, 156(11): 3224–3231.
- [44] de Silva U, Fernando SC, Krehbiel CR, et al. Community transcriptomics of rumen microflora[A] // Plant and Animal Genomes XVII Conference Abstract, 2009: 10–14.
- [45] Gosalbes MJ, Durbán A, Pignatelli M, et al. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17447.
- [46] Poroyko V, White JR, Wang M, et al. Gut microbial gene expression in mother-fed and formula-fed piglets[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12459.

## 栏目介绍

### 生物实验室

“生物实验室”栏目刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。