

牙菌斑培养菌群宏基因组文库构建及 抗生素耐药基因筛选

吴丹¹ 程功² 李晶² 朱宝利² 魏世成^{1*}

(1. 北京大学 口腔医学院 口腔交叉学科实验室 北京 100081)

(2. 中国科学院微生物研究所 环境微生物基因组中心 北京 100101)

摘要: 【目的】构建牙菌斑培养菌群宏基因组文库, 筛选牙菌斑生物膜中细菌的抗生素耐药基因。【方法】采集 20 例无龋健康人的集合牙菌斑并进行厌氧培养。提取牙菌斑培养菌群宏基因组构建 Fosmid 文库。用卡那霉素、四环素及氨苄西林对文库进行筛选, 并对筛选到的抗性 Fosmid 克隆进行末端测序、亚克隆构建、亚克隆测序和序列分析。【结果】构建了牙菌斑培养菌群宏基因组 Fosmid 文库, 插入片段长度在 36–48 kb 间约有 15 120 个克隆, 插入片段长度小于 36 kb 的约有 3 360 个克隆。筛选获得一个氨基糖苷类双功能修饰酶 AacA-AphD 基因、一个核糖体保护蛋白型四环素耐药基因 *tet* (M) 及一个 C 家族 β -内酰胺酶基因。【结论】证实了可以通过构建宏基因组文库的方法来筛选牙菌斑培养菌群中的抗生素耐药基因。

关键词: 牙菌斑生物膜, 宏基因组, Fosmid 文库, 抗生素耐药

Screening antibiotic resistance genes of cultured dental plaque with a metagenomic approach

WU Dan¹ CHENG Gong² LI Jing² ZHU Bao-Li² WEI Shi-Cheng^{1*}

(1. Laboratory of Interdisciplinary Studies, School and Hospital of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China)

(2. CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30973317)

*通讯作者: Tel: 86-10-82195780; ✉: sc-wei@pku.edu.cn

收稿日期: 2012-09-05; 接受日期: 2012-11-26

Abstract: [Objective] Fosmid library of cultured human dental plaque samples was constructed and screened for antibiotic resistance genes. **[Methods]** Dental plaques from 20 individuals were obtained and cultured anaerobically *in vitro*. Bacteria DNA was extracted and Fosmid library was constructed. Antibiotic resistant clones were selected by plating on LB agar containing one of the three antibiotics: kanamycin, tetracycline, and ampicillin. Inserts conferring resistance were sequenced and annotated. **[Results]** A metagenomic Fosmid library was generated, which contained approximately 18 480 clones. Three antibiotic resistance genes were obtained through functional screening, including one kanamycin resistance gene encoding bifunctional aminoglycoside modifying enzyme AacA-AphD, one tetracycline resistance gene *tet* (M) and one ampicillin resistance gene encoding class C beta-lactamase. **[Conclusion]** It turns out that it is possible to construct fosmid libraries using cultivated dental plaque samples to screen antibiotic resistance genes.

Keywords: Oral microbiota, Metagenomics, Fosmid library, Antibiotic resistance

抗生素的发现和应用使人类的平均寿命延长了 23 年以上^[1], 然而, 随着抗菌药物的不断发展与应用, 病原菌对常用抗菌药物的耐药性也不断增加。病原菌的耐药严重地威胁着人类身体健康, 细菌耐药问题也日益受到人们的重视, 成为全球关注的热点^[2-3]。

在以抗生素耐药基因为切入点的研究中, 重要的方法之一是宏基因组学方法^[4], 简言之, 就是提取环境中微生物的 DNA 样本, 构建宏基因组文库, 用目的抗生素对文库克隆进行筛选并对筛选到的文库克隆进行测序和序列分析。应用该方法, 不断有新的耐药基因被发现。2003 年, Diaz-Torres 等^[5]通过构建人唾液宏基因组文库, 筛选到一种新的四环素耐药基因 *tet* (37); 2008 年 Mori 等^[6]通过活性污泥宏基因组文库的构建, 筛选获得了两种不同的博来霉素耐药基因。

细菌的全基因组测序及分析表明, 许多抗生素耐药菌株的耐药基因是通过基因水平转移获得的^[7]。人体生物膜作为基因转移易发生的场所, 可能是一个巨大的抗生素耐药基因储存库, 并可

能将耐药基因转移至病原菌^[8-11]。口腔生物膜是人体最为复杂的生物膜之一, 有 700 多种细菌^[12-14]。许多学者对口腔生物膜的耐药基因情况进行了研究, 2006 年 Diaz-Torres 等用牙菌斑、龈沟液和唾液样本构建了宏基因组文库, 分别用四环素、庆大霉素和阿莫西林对其进行了筛选, 证明了用宏基因组方法进行口腔细菌耐药分析是可行的^[15]。2009 年 Sommer 和 Dantas 等用唾液样本构建宏基因组文库, 用 13 种抗生素对其进行筛选, 从中获得了大量耐药基因信息^[16]。与上述研究所用的小片段文库相比, 大片段文库如 Fosmid 文库可涵盖完整代谢途径的多基因簇, 因而广泛应用于对生物活性物质功能性筛选的研究中^[17], 但用该方法筛选抗生素耐药基因的报道尚少见。然而, 考虑到 Fosmid 文库片段长度和容量上的优势, 应用 Fosmid 文库的方法可能利于抗生素耐药基因的筛选和分析。

因此本研究通过构建宏基因组 Fosmid 文库的方法, 以牙菌斑样本厌氧培养物作为文库 DNA 片段来源, 用卡那霉素、四环素和氨苄西林

3 种抗生素筛选其中的耐药基因相关序列, 并进行测序和序列分析, 初步探索牙菌斑中细菌抗生素耐药基因情况。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

志愿者纳入标准: 年龄为 25-30 岁, 性别不限, 为口腔检查正常且无龋, 即龋失补牙面数 DMFS=0, 身体精神情况正常, 3 月内未全身使用抗生素, 2 h 内未进食, 用无菌牙签采集志愿者全口集合牙菌斑, 共采集 20 例。

1.2 样本富集培养

将 20 例样本分别用非选择性培养基进行富集培养, 在二氧化碳孵箱(37 °C 5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂)中培养 24 h。非选择性培养基成分为: 牛心脑提取液 BHI (BD-Difco, U.S.A.), 0.1% 蔗糖 (Amresco, U.S.A.), 0.1% 葡萄糖 (AMRESCO, U.S.A.), 0.1% D-甘露糖 (AMRESCO, U.S.A.), 0.5 mg/L 维生素 K1 (Wako, Japan), 5 mg/L 猪氯化血红素 (Mobitec, German)。

1.3 牙菌斑培养菌群基因组提取

用酶解法提取培养物 DNA。培养物 13 000×g 离心 4 min, 收集沉淀加入溶菌酶缓冲液(10.3% 蔗糖, 25 mmol/L sodium EDTA, 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)振荡混匀, 加入溶菌酶至终浓度 400 mg/L, 37 °C 水浴 1 h, 加入 SDS 至终浓度 0.5%, 加入蛋白酶 K 至终浓度 400 mg/L, 52 °C 水浴 1 h, 加入等体积 Tris 平衡酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1, V/V/V), 13 000×g 离心 10 min。移取上清液, 加入 0.3 体积 NaAc-HAc 缓冲液(pH 5.0, 3 mol/L), 2 倍体积无水乙醇。静置后挑取可见的絮状 DNA, 干燥后, 双蒸水重溶。

1.4 Fosmid 文库构建和质量分析

按照 CopyControl™ Fosmid library production 试剂盒说明书(CopyControl™ Fosmid Library

Production Kit (Cat. No. CCFOS110) Epicenter Biotechnologies, U.S.A.)构建牙菌斑培养菌群基因组 Fosmid 文库。将 20 例牙菌斑培养菌群 DNA 样本按质量比 1:1 混合, 将混合后的 DNA 片段进行脉冲场电泳观察长度, 密度集中区域的片段长度比试剂盒对照的片段长度稍大, 为提高文库效率, 用微量记样器(10 μL)吹打剪碎, 使 DNA 片段密度集中区域与试剂盒对照大体一致。所得片段再经脉冲场电泳 CHEF-DRIII system (Bio-Rad)后, 根据 Marker 条带量取 36-48 kb 位置, 用手术刀片切下 0.5 cm 左右条带, 再向下切 0.5 cm 左右条带, 进行电洗脱回收, 分别作为长度 48-36 kb 之间和 36 kb 以下文库的 DNA 插入片段来源。补平片段末端, 连接到 pCC1FOS Fosmid 载体上, 连接产物包装入噬菌体, 之后转染到 *E. coli* EPI300 中。转染物涂布于含有氯霉素的 LB 琼脂培养基上, 37 °C 培养 12 h, 计数平板上菌落数, 估算文库容量。文库用 20%甘油冻存于-70 °C。随机挑取 9 个文库中克隆, 用质粒提取试剂盒 (Omega, U.S.A.)提取质粒后, 分别用限制性内切酶 *Hind* III (TaKaRa, Japan)和 *Eco*R I (TaKaRa, Japan)酶切后电泳观察。

1.5 文库扩增和筛选

将文库涂于 LB 固体培养基上, 培养基中含 12.5 mg/L 氯霉素 (Sigma, U.S.A.), 进行扩增, 37 °C 培养 36 h 后用玻璃棒将平板上菌落刮下并用 20%甘油保种, -70 °C 保存。制备 3 种含有抗生素的 LB 固体培养基, 浓度分别为: 卡那霉素 (Cat. No. K1377-5G, Sigma, U.S.A.) 50 mg/L, 氨苄西林 (Cat. No. A0166-5G, Sigma, U.S.A.) 100 mg/L, 四环素 (Cat. No. 268054-25G, Sigma, U.S.A.) 20 mg/L, 分别在其上涂布扩增的文库, 37 °C 培养 24 h。筛选到的阳性克隆用含有目的抗生素和氯霉素的 LB 固体培养基传代 3 次确认耐药性。确认后的阳性克隆用质粒试剂盒 (Omega, U.S.A.)

提取 Fosmid DNA, 用限制性内切酶 *Hind* III (TaKaRa, Japan) 酶切后, 根据电泳图谱判断其是否为同一质粒。

1.6 抗性克隆的亚克隆及序列分析

用质粒提取试剂盒(Omega, U.S.A.)提取抗生素耐药的 Fosmid DNA, 再用限制性内切酶 *Sau*3A I (TaKaRa, Japan) 部分酶切后(37 °C 水浴 1 h), 切胶回收 1–3 kb 的片段, 用质粒 pUC118 和质粒 pHSG298 分别作为克隆载体, pUC118 含有氨苄西林标记, 因此用作卡那霉素和四环素耐药 Fosmid DNA 的亚克隆, 而 pHSG298 具有卡那霉素标记, 因此用作氨苄西林耐药 Fosmid DNA 亚克隆之用。T4 连接酶(TaKaRa, Japan)连接载体和回收片段, 将连接产物转染到转化态细胞 DH5 α (Transgen, China)中, 构建亚克隆文库, 用含有质粒抗生素和目的抗生素的 LB 固体培养基筛选亚克隆。

将阳性克隆进行 Fosmid 末端测序和阳性亚克隆质粒测序, 测序工作委托中国农业科学院开放实验室进行。末端测序为单向测序, 引物使用 T7 Promoter Primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), 将结果在 NCBI BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行相似性比对。阳性亚克隆提取质粒后使用亚克隆质粒上的通用引物 [M13F (-47), 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' 和 M13R (-48): 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'] 进行双向测序, 利用测得序列设计引物步移, 直至将整个亚克隆质粒测通, 使用 BLASTp 程序对耐药序列中所有预测的编码框进行蛋白比对。

2 结果与分析

2.1 牙菌斑样本富集培养和文库构建

牙菌斑样本经 37 °C、24 h 厌氧培养后, 部分细菌被富集, 光镜下观察可见球形、棒状及链状等不同形态的细菌(数据未展示)。

脉冲场凝胶电泳结果显示, 提取的混合宏基因组 DNA 大小集中在 48 kb 附近, 符合构建 Fosmid 文库的要求(图 1)。切胶回收合适大小的 DNA 片段(图 2)经电洗脱及补平后用于 Fosmid 文库的构建, 最终获得的克隆总数约 18 480; 其中, 插入片段长度在 48–36 kb 之间的克隆约 15 120 个, 插入片段长度在 36 kb 以下的克隆约有 3 360 个。

2.2 文库质量评价

随机挑取 9 个文库克隆, 用酶切的方法评价文库插入片段多样性, 电泳结果显示, 文库中插入片段的多样性较好(图 3)。

2.3 抗生素耐药克隆筛选

使用卡那霉素、四环素及氨苄西林 3 种抗生素筛选扩增后的牙菌斑宏基因组 Fosmid 文库, 获得卡那霉素耐药克隆 9 株, 四环素耐药克隆 40

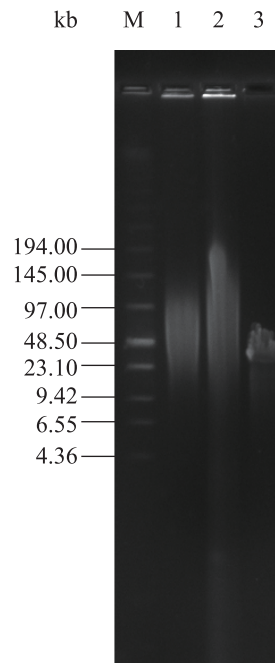


图 1 宏基因组 DNA 脉冲场凝胶电泳图

Fig. 1 Pulse field gel electrophoresis of extracted DNA
注: M: PFGE ladder; 1, 2: 牙菌斑培养菌群总 DNA; 3: 36 kb 对照 DNA.

Note: M: PFGE ladder; 1, 2: The DNA extracted from the cultured samples; 3: 36 kb control DNA.

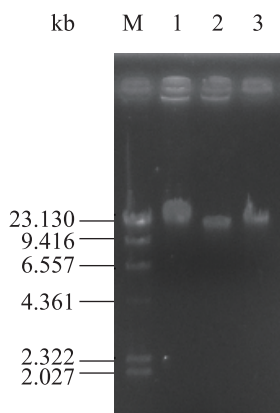


图2 切胶回收并补平片段末端后电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of end repaired DNA

注: M: λ /Hind III marker; 1: 48–36 kb 切胶回收的 DNA 片段; 2: 36 kb 以下切胶回收的 DNA 片段; 3: 36 kb DNA 对照。

Note: M: λ /Hind III marker; 1: End repaired DNA length between 48 and 36 kb; 2: End repaired DNA under 36 kb; 3: 36 kb control DNA.

株以及氨苄西林耐药克隆一株。酶切鉴定结果显示每类阳性克隆均为同一质粒, 因此得到携带卡那霉素、四环素及氨苄西林耐药 Fosmid 克隆

各一种。

2.4 序列测定及分析

对筛选到的3种抗生素耐药 Fosmid 质粒做了单向末端测序和序列的 BLASTn 比对(表1), 并且分别对这3种 Fosmid 质粒的阳性亚克隆进行测序, 使用 BLASTp 程序对所有预测的编码框进行蛋白比对, 比对结果见表2。

3 讨论

随着抗生素耐药基因研究的不断深入, 该领域不断涌现出新的成果, 为人类重新审视抗生素问题 and 对抗细菌感染提供了新的思路^[18]。而在众多研究方法中, 宏基因组学方法是最为有力的手段之一。通过构建宏基因组文库, 再结合功能性筛选的方法, 大量抗生素耐药基因信息被发现。目前大部分研究倾向于构建小片段质粒文库, 但与小片段文库相比, Fosmid 文库有明显的优点, 因其插入片段长度原因, 单个

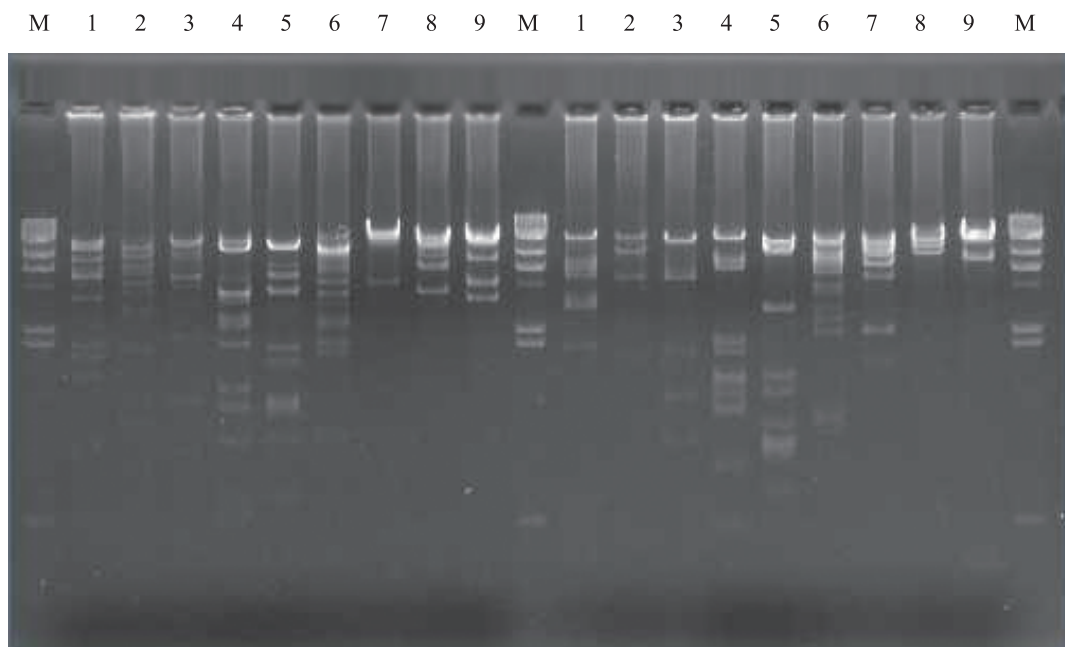


图3 文库克隆酶切电泳图

Fig. 3 Gel electrophoresis of end repaired DNA

注: M: λ /Hind III marker; 前 1–9: 随机克隆 Hind III 酶切后片段; 后 1–9: 随机克隆 EcoR I 酶切后片段。

Note: M: λ /Hind III marker; First 1–9: Fosmid DNAs digested by Hind III; Last 1–9: Fosmid DNAs digested by EcoR I.

表 1 抗生素耐药阳性克隆的 Fosmid 末端测序结果分析
Table 1 Antibiotic resistant clones Fosmid end sequences BLASTn

Sequence	Sequence length (bp)	Accession	Description	Query coverage (%)	E value	Max ident (%)
Kana-end	1 135	FM204884.1	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> H70, complete genome	86	0.0	82
Tet-end	863	CP000725.1	<i>Streptococcus gordonii</i> str. <i>Challis</i> substr. CH1, complete genome	7	3e-08	84
Amp-end	1 179	FP929040.1	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> NCTC 9394 draft genome	96	0.0	97

注: Kana-end: 卡那霉素耐药 Fosmid 末端序列; Tet-end: 四环素耐药 Fosmid 末端序列; Amp-end: 氨苄西林耐药 Fosmid 末端序列。

Note: Kana-end: Kanamycin resistant clone end sequence; Tet-end: Tetracycline resistant clone end sequence; Amp-anti: Ampicillin resistant clone end sequence.

表 2 抗生素耐药亚克隆测序结果分析
Table 2 Antibiotic resistant clones sequences BLASTp

Subclone ID	Sequence length (bp)	ORF range	Best match (accession No.)	Organism	AA identity (%)
Kana-anti	3 373	141-1 580	Bifunctional aminoglycoside modifying enzyme AacA-AphD (NP_863643)	<i>Staphylococcus aureus</i>	100
		2 077-3 372	Hypothetical protein (ZP_03304641)	<i>Anaerococcus hydrogenalis</i> DSM 7454	96
Tet-anti	3 310	523-2 458	Tetracycline resistance protein TetM (YP_006254057)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ST556	100
		2 820-3 197	Conjugative transposon protein TcpC (CBW38866)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100
Amp-anti	3 441	1-480	AmpR transcriptional regulator, partial (AFU25652)	<i>Enterobacter cloacae</i>	93
		484-1 515	Class C beta-lactamase (ABF29680)	<i>Enterobacter cloacae</i>	99
		1 879-2 574	Uncharacterized protein conserved in bacteria (CBK87393)	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> NCTC 9394	100

注: Kana-anti: 那霉素耐药序列; Tet-anti: 四环素耐药序列; Amp-anti: 氨苄西林耐药序列。

Note: Kana-anti: Kanamycin resistant sequence; Tet-anti: Tetracycline resistant sequence; Amp-anti: Ampicillin resistant sequence.

克隆可能涵盖完整代谢途径的多基因簇,可能更有利于抗生素耐药基因及其周围信息的发现。在研究对象的选取上,针对口腔生物膜有多种多样的取样方法,多数研究采取唾液标本;相比唾液,牙菌斑因其内含的微生物排列有序而且紧密,牙菌斑中的微生物在不断的相互作用下达到种类和数量上的平衡,这种平衡使其成为有序的整体,也使其对外界各种压力包括抗生素处理的抵抗能力加强^[19]。因此牙菌斑样本更能反映以生物

膜方式生长细菌的状况。在抗生素的选择上,本研究只从 3 类抗生素各选择一种: β -内酰胺类的氨苄西林、四环素类的四环素和氨基糖苷类的卡那霉素,均为常见并已经广泛应用、使用历史较长的抗生素;并且在已有的研究中,已证实用这 3 类抗生素筛选宏基因组文库的可行性^[15]。因此本实验选择这 3 种抗生素,意在初步探索牙菌斑细菌的耐药基因情况。

本研究通过构建宏基因组 Fosmid 文库的方

法,以牙菌斑培养物为文库 DNA 片段来源,筛选到 3 种分别具有卡那霉素、四环素和氨苄西林耐药能力的 Fosmid 质粒,经过测序和序列分析,得到 3 条含有已知抗生素耐药基因的序列,并且在四环素耐药序列中含有转座相关序列,而在氨苄西林耐药序列中含有转录调控因子。

在四环素耐药序列中含有转座相关基因(接合转座子蛋白基因),并且这条序列来源的 Fosmid 末端测序显示,它可能是未被测序的序列,可能来自未被测序的微生物,而它所含有的抗生素耐药基因却可能来源于已经被全基因组测序的抗生素耐药致病菌。这说明这种耐药基因通过转座子系统在细菌之间转移的可能性。这种转座子介导的抗生素耐药基因水平转移早有报道并被众多研究证实^[19],本实验间接提示了这种转移在牙菌斑细菌中也有体现。

氨苄西林耐药序列和其 Fosmid 末端序列都来自阴沟肠杆菌某一亚种的基因组。阴沟肠杆菌是临床最常见的条件致病菌之一,由于它对 β -内酰胺类抗生素的耐药性,目前已成为医院内感染的重要病原体,*ampC* 是其结构基因,编码产生 AmpC 酶,广泛存在于阴沟肠杆菌基因组上。本实验筛选到的序列除了含有可诱导 C 家族 β -内酰胺酶基因之外,附近还有一段转录调节因子。可诱导型 *ampC* 正常条件下只产生少量 AmpC 酶,而当有诱导作用的 β -内酰胺类抗生素存在时,AmpC 酶产量可增加 100–1 000 倍^[20],因此该段转录调节因子可能发挥调节 AmpC 酶基因表达的作用。

本研究的不足之处在于样本选取较少,文库容量不足,用于筛选的抗生素种类较少,因此所筛选到的抗生素耐药序列也较少,如果加大样本量,提高文库容量,并增加抗生素种类,可能会筛选到更多的耐药序列。此外,本研究采用了牙菌斑样本进行富集培养的方法,所用培养基是

用于富集口腔厌氧菌的经典非选择性培养基。培养方法的优点在于易于获得在质和量上都符合构建 Fosmid 文库要求的 DNA 片段,并且培养方法使得优势细菌大量富集,增大了单种细菌中抗生素耐药基因被筛选到的可能性。培养方法的缺点也很明显,它会损失掉大量未培养微生物,这些微生物在现行培养条件下不能存活,因此会损失掉大量信息。因此培养方法得到的基因信息往往是已经被研究过的,这也是培养方法得到的耐药基因序列与已知序列相似性较高的原因^[16]。因此,为了克服培养方法的缺点,应选用对细菌选择性更小的培养基和培养方式,将丢失的未培养微生物种类降到最低。或者改进采样方法,尽可能多而全面地采集口腔生物膜样本,使其既能满足 Fosmid 文库对 DNA 插入片段的要求,又能如实反映口腔生物膜细菌组成情况。

综上所述,本研究证实可以通过构建宏基因组 Fosmid 文库的方法来筛选牙菌斑培养菌群的抗生素耐药基因。

参 考 文 献

- [1] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(11): 5721–5732.
- [2] Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The oral microbiota: living with a permanent guest[J]. *DNA and Cell Biology*, 2009, 28(8): 405–411.
- [3] Chou AF, Yano EM, Doebbeling BN, et al. Structural and process factors affecting the implementation of antimicrobial resistance prevention and control strategies in US hospitals[J]. *Health Care Management Review*, 2008, 33(4): 308–332.
- [4] Davies J. Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria[J]. *EMBO Reports*, 2007, 8(7): 616–621.

- [5] Diaz-Torres ML, McNab R, Spratt DA, et al. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(4): 1430–1432.
- [6] Diaz-Torres ML, Villedieu A, Hunt N, et al. Determining the antibiotic resistance potential of the indigenous oral microbiota of humans using a metagenomic approach[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 258(2): 257–262.
- [7] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chemistry and Biology*, 1998, 5(10): R245–R249.
- [8] Kaneko K, Okamoto R, Inoue M, et al. Gene mutations responsible for overexpression of AmpC β -lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(6): 2955–2958.
- [9] Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease[J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 811–818.
- [10] Mori T, Mizuta S, Suenaga H, et al. Metagenomic screening for bleomycin resistance genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(21): 6803–6805.
- [11] Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation[J]. *Nature*, 2000, 405(6784): 299–304.
- [12] Ohlsen K, Dandekar G, Schwarz R, et al. New trends in pharmacogenomic strategies against resistance development in microbial infections[J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(11): 1711–1723.
- [13] Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(12): 3770–3783.
- [14] Paster BJ, Olsen I, Aas JA, et al. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites[J]. *Periodontology* 2000, 2006, 42(1): 80–87.
- [15] Projan SJ. New (and not so new) antibacterial targets—from where and when will the novel drugs come?[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2002, 2(5): 513–522.
- [16] Ready D, Lancaster H, Qureshi F, et al. Effect of amoxicillin use on oral microbiota in young children[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(8): 2883–2887.
- [17] Salyers AA, Gupta A, Wang YP. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes[J]. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(9): 412–416.
- [18] Singh J, Behal A, Singla N, et al. Metagenomics: concept, methodology, ecological inference and recent advances[J]. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(4): 480–494.
- [19] Sjölund M, Wreiber K, Andersson DI, et al. Long-term persistence of resistant *Enterococcus* species after antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori*[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2003, 139(6): 483–487.
- [20] Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora[J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1128–1131.