

DNA 稳定同位素探针技术在宏基因组学中的应用及前景

刘威, 魏晓, 袁静, 黄留玉

军事医学科学院疾病预防控制中心, 北京 100071

摘要: DNA 稳定同位素探针 (DNA-SIP) 是一种新兴的技术, 通过将同位素稳定结合到特定的底物来确定环境中微生物的作用。DNA-SIP 与宏基因组学结合可以让某些微生物的特性与其特殊新陈代谢联系在一起, 不仅可以从宏基因组库里检测到低含量的微生物, 而且加速了对新的酶类和其他生物活性物质的发现。以下总结了 SIP-宏基因组学技术的原理、应用及研究进展, 并讨论了其在环境微生物学和生物技术的应用前景。

关键词: 宏基因组学, 同位素探针, 微生态, DNA-SIP

Applications and perspectives of DNA stable-isotope probing in metagenomics: a review

Wei Liu, Xiao Wei, Jing Yuan, and Liuyu Huang

Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: DNA stable-isotope probing (DNA-SIP) is a recently developed method with which the incorporation of stable isotope from a labeled substrate is used to identify the function of microorganisms in the environment. The technique has now been used in conjunction with metagenomics to establish links between microbial identity and particular metabolic functions. The combination of DNA-SIP and metagenomics not only permits the detection of rare low-abundance species from metagenomic libraries but also facilitates the detection of novel enzymes and bioactive compounds. We summarize recent progress in SIP-metagenomic techniques and applications and discuss prospects for this combined approach in environmental microbiology and biotechnology.

Keywords: metagenomics, stable-isotope probing, microecosystem, DNA-SIP

基因序列的研究大致经历了 3 个过程, 早期主要关注对 16S rRNA 基因的分析^[1], 后来开始关注长 DNA 片段和整个群落基因序列的分析, 随着高通量基因测序技术的发展, 现在则以宏基因组作为

Received: August 11, 2010; **Accepted:** October 29, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA02Z118), National Natural Science Foundation of China (No. 30771809).

Corresponding author: Liuyu Huang. Tel: +86-10-66948301; E-mail: huangliuyuly@163.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA02Z118), 国家自然科学基金 (No. 30771809) 资助。

分析研究的对象^[2]。宏基因组学的研究方法目前已经应用到各种各样的生态环境中,从人类肠道微生物到土壤微生物^[3-5],从深海微生物到室内空气微生物^[6-7]。传统的宏基因组学直接研究从环境样品中提取的 DNA,但最近发展起来的 DNA-SIP 技术则像一个滤器一样可以筛选感兴趣的微生物 DNA^[8-9]。DNA-SIP 最早用来研究环境中微生物新陈代谢作用,通过小规模的原位孵育把稳定同位素标记的化合物(例如 ^{13}C , ^{15}N) 结合到环境样品中的微生物 DNA 上^[10],再通过等密度超速离心技术分离标记的重 DNA,这样可以轻易获得目的基因,避免了从浩瀚基因库里一个个筛选目的基因的烦劳工作。目前宏基因组学结合 DNA-SIP 技术的应用已经从概念变成了现实,并引起了众多科学家的广泛关注。

1 宏基因组学

宏基因组是由 Handelsman 等^[11]1998 年首先提出,指的是环境样品中全部微小生物遗传物质的总和。宏基因组学就是一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象,以功能基因筛选和测序分析为研究手段,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。从环境样品中直接提取基因组 DNA,一方面可以通过克隆 DNA 片段到合适的载体(质粒、粘粒等)而建立宏基因组库,也可以直接对 DNA 进行高通量测序^[12]。宏基因组文库既包含了可以培养的微生物基因,又包含了不能培养的微生物基因,避开了微生物分离培养的问题,极大地扩展了微生物资源的利用空间,增加了获得新的微生物物种和生物活性物质的机会,为新的医药产业和新的生物技术提供丰富的基因文库,并有利于环境微生物有机群体的分布和功能的研究。

Tyson 等首次应用宏基因组学的技术研究微生物生态^[13],他们用于一个不太复杂的环境——以美国铁

山酸性矿山排水系统作为模型,采用宏基因组测序的方法对细菌进行了 16S rRNA 基因克隆分析,发现在排水系统中主要存在两类细菌;他们随即用了鸟枪法测序技术,从 100 Mb DNA 序列信息里,重建了这两种优势微生物的完整基因组,同时也部分重建了其他 3 种非优势微生物的基因组,把这个相对简单的生态系统的新陈代谢途径整合到一起,阐明了细菌在环境中所扮演的角色。此后,科学家们开展了大批关于群落微生物鸟枪法测序的工作,这些技术为探索非培养的环境微生物潜在新陈代谢途径提供了丰富的信息^[3,14-17]。此外,宏基因组学的应用可以发现和描述新的生物催化剂及制药中的重要化合物^[18-19]。许多中小型公司(例如 Diversa)已经将一些以宏基因组学为手段发现的生物活性化合物以及感受态建立的方法、克隆的策略以及高通量的筛选方法申请了专利。

然而对于复杂的环境样品,则要求很高的宏基因组 DNA 片段整合能力,传统的宏基因组学方法往往难以解决这个问题。如在研究马尾藻海洋生物多样性时,Venter 等^[20]发现只能从最优势的菌种中富集浓度较高的染色体组 DNA,并且大部分通过鸟枪法获得的序列不能确定具体的微生物,也就是说在预测群落低丰度成员方面很有限,因此为了获得对低丰度群落成员的了解,需要开展强度更大的测序。此外,稀有生物微生态在特定功能上具有非凡意义(例如海洋里的一种细菌能以甲基为营养物质,但其本身含量很低),用传统宏基因组学方法都无法进行捕获^[21],这就需要新的技术来解决这个问题。

2 DNA-SIP 的技术原理

DNS-SIP 是研究环境生物特性与特定功能之间的联系且不需分离培养的方法之一^[22]。相对于 RNA-SIP 和 PLFA-SIP^[23-24],它的敏感性较低,但是仍然可以获得感兴趣微生物的 DNA。在进行 DNA-SIP 实验之前,需要准备 3 台仪器:一是可以测定培养基利用活性的仪器;二是可以进行等密度

离心的超速离心机;三是一台分析天平。接着要准备的是特殊培养基,这种培养基里含有稳定同位素 ^{12}C 或 ^{14}N 标记的某种营养物质,可以从公司购买得到。在进行 SIP 孵育之前需要测定目标培养基对同位素的利用活性,实验发现在同位素标记 DNA 孵育的时候,对每克土壤或沉淀物来说 $50\ \mu\text{mol}\ ^{13}\text{C}$,对每克水溶液来说 $5\ \mu\text{mol}\ ^{13}\text{C}$ 是比较合适的。然后把样品放在含有 ^{12}C 或 ^{14}N 培养基里进行 SIP 孵育,微生物通过摄取培养基的营养物质而将同位素标记在其 DNA 上,事实上,样品中很难完全避免不同微生物消耗同一营养物质的问题,在 SIP 孵育时应尽可能满足目标微生物得到足够的稳定同位素标记的营养物质。在一些情况下,可以通过营养物质的代谢途径来追踪碳的流量,进而解决稳定同位素标记时不同微生物消耗同一营养物质的问题。接着通过等密度超速离心的方法可以把稳定同位素标记的 DNA (也就是重 DNA) 从未标记的 DNA 中分离出来,如果需要长的重 DNA 片段,就尽量避免采用可能破坏 DNA 片段完整性的方法;如果样品中存在高浓度腐质,就需要在等密度离心前纯化 DNA。分离出来的重 DNA 就可以进行测序及代谢途径的重建,或者建立宏基因组库以及进行以序列和功能为基础的染色。

等密度离心后确定重 DNA 的方法有 6 种,应用的方法越多,数据也就越详实。这些方法是:1) 最直接的方法就是用同位素比率质量光谱法 (IRMS) 检测 DNA 标记的程度 (就是 ^{13}C 含量),该方法需要 IRMS 设备和大量的 DNA 样本。2) 溴化乙啶 (EtBr) 染色法。早期的 SIP-DNA 实验就是用 EtBr 将重 DNA 和轻 DNA 染色,直接从荧光显微镜下观察。目前为了增加灵敏度,大都采用 SYBR safeTM 来进行重 DNA 和轻 DNA 染色^[25]。3) 指纹分析法。指纹分析 (例如变性梯度凝胶电泳,末端限定的片段呈多态性) 可以对比不同片段的图像分辨重 DNA 片段。一旦重 DNA 被确定,就可以用标准的方法沉淀,然后作进一步分析。4) 测定每一碎片的密度。

在等密度离心和分馏法后可以测定每一碎片的密度。根据重 DNA 的理论密度,或者用高纯度克隆的 ^{12}C -DNA 和 ^{13}C -DNA 混合物控制等密度离心。5) 使用 DNA 载体。 ^{13}C 载体 DNA (例如酵母菌和古生菌的 ^{13}C -DNA) 也可以用来确定重 DNA^[26]。6) 通过半定量 PCR 来确定目标基因的数量。DNA 的每个片段沉淀下来,可以通过实时 PCR 确定目标基因的数量 (例如 16S rRNA 基因)^[27]。往往在低密度时出现一个较大的峰,表明大部分未标记背景 DNA 的位置,形成的第二个峰 (往往是在主要峰旁边出现一个小小的角) 是被标记的重 DNA。

开展整个 SIP 实验详细的方法和步骤请参阅资料^[21-28,32-33,36-37]。

3 DNA-SIP 宏基因组学技术的研究进展

以鸟枪法测序为基础的宏基因组学无法确定微生物的多样性,因为它不能完全说明复杂的群落。Schloss 和 Handelsman 认为 DNA-SIP 与宏基因组学上的结合应用可以减少样品的复杂性^[28],因为 SIP 可以作为一个滤器富集携带特殊功能的 DNA。Dumont 等第一次提出来 DNA-SIP 与宏基因组学结合的概念,他们采用这种方法对森林土壤嗜甲烷细菌进行了研究^[8],用 $^{13}\text{CH}_4$ 标记森林土壤的样本并获得重 DNA,还建立了其中一个细菌的人工染色体组 (BAC) 库。通过对 2 300 个克隆 (平均大小为 25 kb) 筛选后,找到了一个含 pmoCAB 操纵子的 BAC 克隆,它编码甲烷单加氧酶的 3 个亚基,这是分解甲烷通路上的一个重要的酶。通过对非 SIP 的研究^[8]可以看出 DNA-SIP 的优势非常明显,在非 SIP 的实验中要找到一个 pmoCAB 操纵子需要 250 000 个福斯质粒克隆 (平均大小 40 kb)。

DNA-SIP 在孵育的时候需要高浓度的 ^{13}C 复合物,这样才能保证在孵育一定时间后同位素能稳定结合到 DNA 上,但培养基中同位素标记的营养物质浓度过高或过低会抑制有些生物的生长,而且由于共生同位素的标记物可能被一个微生物吸收后又被

另一个吸收^[8-29]。2008年, Neufeld等通过对海洋中嗜甲醇微生物的研究确定了合适的标记培养基的浓度^[21], 用1 μmol/L ¹³C标记甲醇, 嗜甲醇菌相关的微生物便可以在海洋水里消化甲醇, 但在DNA-SIP试验中只发现了毫微克的重DNA, 所以需要多重置换扩增获得足够DNA的量以便建立福斯质粒文库; 通过PCR筛选福斯质粒文库, 在宏基因组库里发现了一个新的甲醇脱氢酶簇, 很明显这来自于一个细菌, 而且和嗜甲醇菌 *Methylophaga* 相关, 这也就表明这些细菌在海洋环境里具有消化甲醇的能力。环境微生物学家最近开始用MDA (Multiple displacement amplification) 方法^[30], 2008年, Chen等发现可以在建立福斯质粒文库之前通过用一系列酶来处理MDA产生DNA^[31], 这样就不会影响MDA产生的DNA的大小。以上两项研究表明, 可以在尽量接近原始条件培养基的情况下, 把DNA-SIP和宏基因组学结合到一起来全面地研究低丰度成员的功能。美国能源部联合基因组研究所利用其高通量快速测序的优势做了一个很好的试验, Kalyuzhnaya等着重研

究了华盛顿湖淤泥的碳循环^[32], 他们用¹³C₁复合物进行了DNA-SIP试验, 随后利用纯化的重DNA建立了宏基因组库, 通过回收的¹³C-DNA宏基因组库序列几乎重建了嗜甲基菌 *Methylothermobacter mobilis* 的完整染色体组, 这个细菌无疑在华盛顿湖底的C₁循环中扮演着重要的角色^[33]。总之, 全基因组鸟枪测序的宏基因组学方法可以用来重建低丰度微生物的基因组和新陈代谢通路, 但前提是需要应用DNA-SIP技术。

目前, 有许多实验正在用传统以功能为基础的宏基因组学, 致力于改进基因探测的重复性问题, 以提高在提取DNA之前富集培养需要功能的微生物数量^[34-35], 然而这也不可避免地破坏了微生物菌群的多样性, 因为快速生长的微生物可以抑制其他的生物种群。1999年, Urbach等和Borneman运用5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 从生物体中富集目标DNA^[36-37], 通过刺激的方法(比如培养基)使BrdU在代谢过程中结合到刚合成的DNA中, 然后再用抗BrdU的抗体来分离BrdU标记的DNA, 该

表1 传统宏基因组学与DNA-SIP宏基因组学的比较

Table 1 Comparison of conventional metagenomics and DNA-SIP-enabled metagenomics

	Key features	Limitations	Research needs
Conventional metagenomics	1) Allows culture-independent analyses of microbial communities 2) Allows the identification of novel enzymes and bioactive compounds from uncultivated microorganisms in the environment	1) Heavily biased towards the most abundant species in the environment 2) Reconstruction of individual genomes from large-scale sequencing is difficult 3) Cost-ineffective 4) Low success rate of function-based screening for bioactive compounds from metagenome libraries	1) Improved bioinformatics for the reconstruction of metabolic pathways from massive gene-sequence datasets and to assist binning of these sequences for improving sequence assembly 2) Technology development for large-scale sequencing; reducing cost 3) Automated screening methods and technologies for function-based screening for novel enzymes and pharmaceutically relevant compounds 4) Better understanding of genes of unknown function in current databases
DNA-SIP-enabled metagenomics	1) Can establish a direct link between identity and function 2) Less abundant 'rare species' can be targeted with the same sequencing effort 3) Reconstruction of individual genomes is feasible due to reduced complexity 4) Gene-mining 'hit-rate' is improved	1) Isolating sufficient DNA for metagenomic library construction is an issue 2) Relatively low-throughput for DNA-SIP experiments 3) Multiple displacement amplification (MDA) can introduce chimeras 4) Stable-isotope labeled compounds are not always available and can be expensive	1) Prevent chimera formation during MDA of ¹³ C-DNA 2) Development of high-throughput methods for DNA-SIP analysis of multiple samples

方法的缺点是在寻找功能相关的微生物时,同样的刺激有些微生物并没有把 BrdU 合成到其 DNA 中^[36]。从一个宏基因组库里通过功能筛选有意义的克隆的概率是非常低的(往往是 1.14 Gbp 里有 1 个)^[34],因此, Schwarz 等用以下两种方法从环境样本中发现丙三醇的脱水酶类,并做了比较,另一种是富集培养(40 mmol/L ¹²C-丙三醇)获得的 DNA,一种是通过同位素标记(40 mmol/L ¹³C₃-丙三醇)试验获得的重 DNA,分别来建立宏基因组库,结果表明后者基因检测的成功率是前者的 2~3 倍。最近也发表了另一个很相似的研究^[38],从污染的河底获得样品,然后用 ¹³C 标记联苯,再收集重 DNA,得到了联苯双加氧酶序列,与已发现的联苯双加氧酶序列是不一样的,表明这个酶有独特之处。这些研究都表明 SIP 参与的宏基因组学在发现工业相关的生物催化剂方面有极大的潜力。

4 展望

到目前为止, DNA-SIP 与宏基因组学结合的研究报道还很少,但从这些研究可以明显地看出它比传统宏基因组学具有更大的优势,通过运用 DNA-SIP 可以提高新酶类发现的概率,也可以减少鸟枪测序法很难解决种群复杂的问题。传统的宏基因组学需要做大量的序列分析,而这些分析大多数都是无意义的^[39],虽然新一代测序技术大大降低了 DNA 测序的费用,但对于做宏基因组序列分析来说仍然是一个高成本的方法,同时还需要熟练的生物信息学技术。目前宏基因组学研究仅仅是从微生物的 DNA 序列来猜测微生物的代谢过程,必须进行进一步的实验确认。

将 DNA-SIP 与宏基因组学结合技术可以帮助我们种群水平解决目标微生物的功能,这一技术发展非常迅速,其中包括在宏基因组学上应用细胞分选和微流体技术,在单细胞染色体组方面应用激光拉曼光谱显微镜技术^[40],在荧光原位杂交上应用等离子聚焦光谱测定技术^[41]以及放射自显影技术^[42]。

从宏基因组序列上来推断功能所遇到的另一个问题是,大多数公开的数据库中缺少明确的功能分类。一项研究原核生物蛋白多样性的报告指出 30%~60% 的蛋白都不能和已知的数据库相匹配^[12],即便是现在最好的研究模型大肠杆菌,其 50% 基因的功能还是需要试验来确定的^[43]。目前无论是宏基因组还是单个染色体组的功能分类主要是以相同的 Blast 为基础的,这要求目前的数据库要有很高的质量和完整性。一方面序列很相似的基因并不一定产生相同的生物学效应,另一方面功能上的冗余暗示着一个特定的功能可能由若干个不相同的蛋白共同完成^[44]。因此在目前宏基因组学功能分类上以及重建和预测代谢通路时可能存在很大的不精确或错误。

DNA-SIP 在宏基因组学上潜在的应用,在不久的将来会给我们带来很大的提高,尤其是可以解决工业上对新酶类的迫切需求,并可显著地改进基因探测成功率,也大大降低了寻找新酶类的花费。但是这项技术在广泛运用之前还需要解决一系列的问题,如建立一个具高生产能力的生产线进行分析多重 DNA-SIP 孵育和 ¹³C-DNA 分离。生物工业用高产出的方法来筛选多个样品,在 SIP 宏基因组学上应用将能更好地理解我们看不到的大多数微生物,发现大量新酶类。

REFERENCES

- [1] Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol*, 1991, 173(14): 4371-4378.
- [2] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 1998, 5(10): 245-249.
- [3] Gill SR, Pop M, DeBoy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 2006, 312(5778): 1355-1359.
- [4] Li M, Wang BH, Zhang MH, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2117-2122.

- [5] Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, et al. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 2005, 308(5721): 554–557.
- [6] Martín-Cuadrado AB, López-García P, Alba JC, et al. Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat. *PLoS One*, 2007, 2(9): e914.
- [7] Tringe SG, Zhang T, Liu XG, et al. The airborne metagenome in an indoor urban environment. *PLoS One*, 2008, 3(4): e1862.
- [8] Dumont MG, Radajewski SM, Miguez CB, et al. Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomics analysis. *Environ Microbiol*, 2006, 8(7): 1240–1250.
- [9] Schwarz S, Waschowitz T, Daniel R. Enhancement of gene detection frequencies by combining DNA-based stable-isotope probing with the construction of metagenomic DNA libraries. *World J Microbiol Biotechnol*, 2006, 22(4): 363–368.
- [10] Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403(6770): 646–649.
- [11] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 1998, 5(10): R245–R249.
- [12] Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, et al. Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33(1): 236–255.
- [13] Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428(6978): 37–43.
- [14] Woyke T, Teeling H, Ivanova NN, et al. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature*, 2006, 443(7114): 950–955.
- [15] García Martín H, Ivanova N, Kunin V, et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(10): 1263–1269.
- [16] DeLong EF, Preston CM, Mincer T, et al. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science*, 2006, 311(5760): 496–503.
- [17] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 2006, 440(7085): 790–794.
- [18] Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(5): 955–962.
- [19] Lorenz P, Eck J. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(6): 510–516.
- [20] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304(5667): 66–74.
- [21] Neufeld JD, Chen Y, Dumont MG, et al. Marine methylotrophs revealed by stable-isotope probing, whole genome amplification and metagenomics. *Environ Microbiol*, 2008, 10(6): 1526–1535.
- [22] Wagner M. Single-cell ecophysiology of microbes as revealed by Raman microspectroscopy or secondary ion mass spectrometry imaging. *Annu Rev Microbiol*, 2009, 63: 411–429.
- [23] Boschker HTS, Nold SC, Wellsbury P, et al. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C labelling of biomarkers. *Nature*, 1998, 392(6678): 801–805.
- [24] Bull ID, Parekh NR, Hall GH, et al. Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature*, 2000, 405(6783): 175–178.
- [25] Martineau C, Whyte LG, Greer CW. Development of a SYBR safeTM technique for the sensitive detection of DNA in cesium chloride density gradients for stable isotope probing assays. *J Microbiol Methods*, 2008, 73(2): 199–202.
- [26] Gallagher E, McGuinness L, Phelps C, et al. ^{13}C -carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5192–5196.
- [27] Lueders T, Wagner B, Claus P, et al. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ Microbiol*, 2004, 6(1): 60–72.
- [28] Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(3): 303–310.
- [29] Hutchens E, Radajewski S, Dumont MG, et al. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environ Microbiol*, 2004, 6(2): 111–120.

- [30] Binga EK, Lasken RS, Neufeld JD. Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *ISME J*, 2008, 2(3): 233–241.
- [31] Chen Y, Dumont MG, Neufeld JD, et al. Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated *Methylocystis* in acidic peatlands. *Environ Microbiol*, 2008, 10(10): 2609–2622.
- [32] Kalyuzhnaya MG, Lapidus A, Ivanova N, et al. High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(9): 1029–1034.
- [33] Kalyuzhnaya MG, Bowerman S, Lara JC, et al. *Methylotenera mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family *Methylophilaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(12): 2819–2823.
- [34] Knietsch A, Bowien S, Whited G, et al. Identification and characterization of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(6): 3048–3060.
- [35] Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ Microbiol*, 2004, 6(9): 948–958.
- [36] Urbach E, Vergin KL, Giovannoni SJ. Immunochemical detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 1207–1213.
- [37] Borneman J. Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3398–3400.
- [38] Sul WJ, Park J, Quensen JF 3rd, et al. DNA-stable isotope probing integrated with metagenomics for retrieval of biphenyl dioxygenase genes from polychlorinated biphenyl-contaminated river sediment. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(17): 5501–5506.
- [39] Tringe SG, Rubin EM. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(11): 805–814.
- [40] Huang WE, Ward AD, Whiteley AS. Raman tweezers sorting of single microbial cells. *Environ Microbiol Rep*, 2009, 1(1): 44–49.
- [41] Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, et al. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, 2001, 293(5529): 484–487.
- [42] Wagner M, Nielsen PH, Loy A, et al. Linking microbial community structure with function: fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope arrays. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17(1): 83–91.
- [43] Serres MH, Gopal S, Nahum LA, et al. A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biol*, 2001, 2(9): research0035.1-0035.7.
- [44] Kalyuzhnaya MG, Hristova KR, Lidstrom ME, et al. Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. *J Bacteriol*, 2008, 190(11): 3817–3823.