

天然红树林土壤微生物大片段宏基因组文库的构建

蒋云霞^{1,3}, 郑天凌^{1,2,3*}

(1. 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005; 2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005; 3. 厦门大学生命科学学院应用与环境微生物研究所, 厦门 361005)

摘要:采用改良及优化后的原位裂解法提取红树林土壤环境 DNA, 通过脉冲场电泳图谱显示所得 DNA 片段主要集中于 23 ~ 50 kbp 范围, 表明大片段 DNA 在总 DNA 中的比率明显提高; 对改良后的原位裂解提取法与不同 DNA 纯化方法的组合进行比较分析, 确定电洗脱为最佳纯化方法; 运用改良后的原位裂解提取法与电洗脱纯化法联用实验方案, 构建了 4 个季节天然红树林土壤 Cosmid 宏基因组文库。随机挑取克隆子, 提取质粒后经 *Bam*HI 酶切验证, 平均插入片段均大于 35 kbp, 且片段类型各不相同, 推测该文库至少包含了 335 Mbp 潮间带微生物基因组信息。该方法的建立使得开发红树林湿地生态系统的特色微生物资源成为可能, 并为探索其它生境的未培养微生物资源提供借鉴。

关键词:红树林土壤; 宏基因组文库; 未培养微生物

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)11-2609-06

Construction of Large Fragment Metagenome Library of Natural Mangrove Soil

JIANG Yun-xia^{1,3}, ZHENG Tian-ling^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Institute of Applied and Environmental Microbiology, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Applying our optimized direct extraction method, the percentage of large fragment DNA in the total extracted mangrove soil DNA was significant increased. The large fragment metagenome library derived from natural mangrove soil over four seasons was successfully constructed by the optimized DNA extraction and electro elution purification method. All of the clones had recombinant Cosmids and each differed in their fragment profiles when Cosmid DNA was extracted from 12 randomly picked colonies and digested with *Bam*HI. The average insert size for this library was larger than 35 kbp. This culturing-independent library at least encompassed 335 Mbp valuable genetic information of mangrove soil microbes. It allowed mining of valuable intertidal microbial resource to become a reality. It is a recommended method for those researchers who have still not circumvented the large insert environmental libraries or for those beginning research in this field, so as to avoid them attempting repetitive, fussy work.

Key words: mangrove soil; metagenome library; uncultured microorganisms

环境宏基因组文库的构建过程中, 原位裂解提取法较间接提取法所获得的环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 具有产量高, 更真实代表环境中微生物群落信息等优势。目前, 已有许多基于原位裂解提取法的小片段 (3 ~ 10 kbp) 环境宏基因组文库的报道^[1~5]。然而, 至今通过直接裂解法获得能满足于构建大片段文库质量所需 DNA 的报道很少^[6], 在原位裂解法的基础上构建大片段环境宏基因组文库仍然存在一定困难, 当研究对象为粘质及有机质含量高的土壤样品时, 更加困难^[7]。具体表现为: ①即使采用最温和的裂解方法, 所得的土壤 eDNA 片段大小仍无法突破 100 kbp^[6,7]。裂解微生物细胞所释放的 DNA, 尤其是大片段的 DNA 极易重新吸附于土壤颗粒 (clay) 并易遭受核酸酶袭击, 造成 eDNA 产量虽高, 实际上大片段 DNA 所占比率低下, 不足以构建宏基因组文库; ②土壤中腐殖酸、黄腐酸

及腐殖酸类等抑制性物质与 eDNA 共提取、共纯化问题难以解决^[8~11]。当前商业化的 eDNA 提取试剂盒也不能彻底解决这些问题, 通过试剂盒得到的 eDNA 片段往往小于 20 kbp, 最终只能产生小片段的环境宏基因组文库^[3,5]。

红树林土壤微生物处于“海洋-陆地”交汇处的潮间带特殊生境, 孕育了产生新颖次级代谢产物的可能途径, 是拓展新型抗生素的天然宝库^[12]。由于其属于高粘质、高有机质含量类型土壤, 从中难以获得适于筛选编码抗生素完整基因簇的高品质 eDNA。迄今为止, 仅有数篇小片段 (3.2 kbp) 红树林土壤质粒型文库的报道^[13]。

收稿日期: 2007-05-19; 修订日期: 2007-07-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40576054, 40476047); 长江学者和创新团队发展计划项目 (40521003)

作者简介: 蒋云霞 (1973 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: jiangyuxia@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn

本研究的主要目的是建立一种快速、经济、高效构建红树林土壤大片段宏基因组文库的实验方案,以加快红树林土壤未培养微生物药用基因的开发步伐。

1 材料与方法

1.1 菌株的生长条件及克隆载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* EPI-100 所用培养基为 LB 肉汤及 LB 琼脂,均添加氨苄西林(终浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),培养温度为 37°C 。

克隆载体为 pWEB™,购于 Epicentre 公司。

1.2 红树林土壤样品采集

红树林土壤采集于福建省云霄县东厦镇境内的福建省漳江口红树林国家级自然保护区,该保护区地处东经 $117^\circ24'07'' \sim 117^\circ30'00''$,北纬 $23^\circ53'45'' \sim 23^\circ56'00''$,海拔 $-6 \sim 8 \text{ m}$,总面积 $2\,360 \text{ hm}^2$ 。1 年中 4 个季节均采样。具体采样方案为:退潮后,在红树林区设置 9 个采样位点(低、中、高潮带,各潮带分别设 3 个采样点),每个采样点设置 $1 \text{ m} \times 1 \text{ m}$ 的样方,除去表面约 1 cm 厚的薄层后,用专用采泥器钻取得到 $5 \sim 50 \text{ cm}$ 层次的土壤样品,随机多点钻取的土样拣去根系并混合均匀后装入做好标记的灭菌塑料袋中,密封,为 1 个位点样品,所有采样点泥样均匀混合成为 1 个季节样品,随冰块带回实验室分析。剩余样品于 -80°C 保存。所有采样器具均事先灭菌处理。每个季节采样时,所有采样点保持一致。

1.3 红树林土壤 eDNA 的提取

无菌操作台中,称取每个季节土壤样品各 5 g (湿重),分别置于 50 mL 无菌离心管中,每管加入 13.5 mL DNA 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl [pH 8.0], 100 mmol/L sodium EDTA [pH 8.0], 100 mmol/L sodium phosphate [pH 8.0], 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB, 2% PVPP [polyvinylpyrrolidone]),剧烈漩涡 $5 \sim 10 \text{ min}$,使土壤颗粒充分分散于缓冲液中。将上述样品置 37°C , 225 r/min ,水平振摇 45 min ,使得土壤匀质化。每管加入 1.5 mL 20% SDS,上下颠倒混匀, 65°C 水浴 3 h ,其间尽可能温和颠倒混匀。水浴裂解过程结束后,立即加入预冷的氯仿/异戊醇($24:1$,体积比),上下颠倒,充分混和均匀后,室温下,离心 15 min ($8\,216 \text{ r/min}$)。收集上清,加入 0.6 倍体积的预冷的异丙醇,室温下沉淀 1 h 后,离心 20 min ($10\,000 \text{ r/min}$)收集沉淀。核酸沉淀用 70% 冰乙醇洗涤 2 次,重悬于 $100 \mu\text{L}$ 无菌 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。4 个季

节的红树林土壤样品,eDNA 总量为 $400 \mu\text{L}$ 。

1.4 插入片段的选择、回收、纯化

①通过脉冲场电泳(gene navigator electrophoresis system)分离、选择大小合适的插入片段(1.5% 的琼脂糖胶; $0.15 \times \text{TBE}$ 缓冲液;电压: 250 V ;脉冲值: 8 s ;电泳时间: 4 h)。

②电泳结束后,切下两侧带 DNA marker 的胶带,于 $0.15 \times \text{TBE/EB}$ 缓冲液染色 20 min ,紫外灯下做好标记,以识别目的片段在胶块上的位置。

③根据标记,切下含目的 DNA 片段的胶块。

④采用电洗脱(electro-eluter module system)的方法回收、纯化目的 metagenomic DNA 片段($1 \times \text{TAE}$ buffer;电流: 30 mA ;运行时间: 3 h)。程序完毕后,反转电极,继续运行 3 min ,以释放底部小室膜上所吸附的 DNA 片段。

⑤尽可能吸干装有胶块玻璃小管中的 TAE 缓冲液,以保证小室中 DNA 溶液体积小于 $50 \mu\text{L}$ 。

⑥小心吸取回收的 DNA 溶液于无菌 EP 管,通过普通琼脂糖凝胶电泳评估回收目的 DNA 片段的品质,剩余 DNA 暂时存放于 4°C 冰箱中待用。

1.5 红树林土壤宏基因组文库的构建及保存

上述制备的 DNA($35 \sim 45 \text{ kbp}$)首先进行末端补平反应,产生 blunt 末端,以克隆到 pWEB™载体。连接反应,体外包装反应及宿主细胞的制备均按试剂盒说明书进行,实际操作中连接反应时间延长至 6 h 。

(1)包装效率测定 用 $10 \mu\text{L}$ 已包装的 Cosmids 感染制备好的 $100 \mu\text{L}$ 宿主细胞 *Escherichia coli* EPI-100, 37°C 孵育 20 min ,将感染后的宿主细胞涂布于已添加氨苄西林(终浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 LB 琼脂平板, 37°C ,过夜培养,计算克隆数目。所有生长出的菌落均为阳性克隆。

(2)克隆子插入片段的验证 随机挑取 12 个 LB-氨苄西林平板上的菌落,接种于 5 mL LB-氨苄西林肉汤, 37°C , 225 r/min ,培养 18 h 。提取克隆子质粒^[14],经 0.9% 琼脂糖电泳验证后,用 *Bam*HI 限制性内切酶(TaKaRa),以计算插入片段的大小。

(3)阳性克隆子的保存 每一个阳性 Cosmid 克隆子均接种于 96 孔细胞培养板,每孔含 $150 \mu\text{L}$ LB 肉汤,氨苄西林(终浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 20% 甘油,待克隆子长好后,将每个 96 孔板复制 1 份,均保存于 -80°C 。

2 结果与分析

2.1 红树林土壤大片段 eDNA 的提取

如图 1 所示,用改良后的高盐、高温 SDS-CTAB 原位裂解法所得红树林土壤 eDNA 片段大小多集中在 23~50 kbp,显示大片段 DNA 在总 eDNA 中的比率明显增加.0.9% 普通琼脂糖凝胶电泳估算粗提物产量为 $2.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (湿重).粗提物的颜色呈棕褐色,显示仍有腐殖酸等杂质的污染,必须纯化后才能用于后续实验.

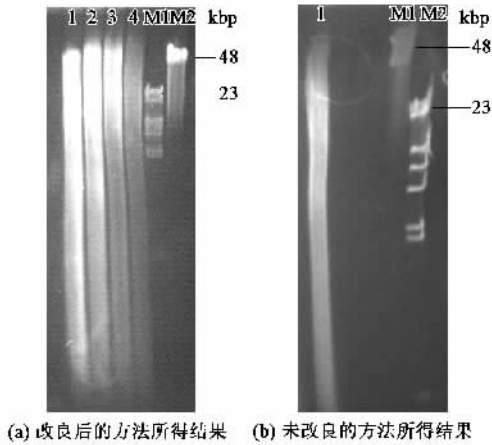


图 1(a),泳道 1~4 为 4 个季节的红树林土壤 eDNA(eDNA 上样量分别为:36、24、12 和 6 μL); M₁, λ -Hind III marker; M₂, λ DNA
图 1(b),泳道 1 为红树林土壤 eDNA(eDNA 上样量为 24 μL); M₁, λ DNA; M₂, λ -Hind III marker

图 1 4 个季节红树林土壤 eDNA 的脉冲场电泳结果

Fig.1 Results of four seasons mangrove soil DNA analysis using pulse field gel electrophoresis

2.2 插入片段的纯化

通过脉冲场电泳选择的目的片段(35~45 kbp)经电洗脱纯化后,琼脂糖电泳图谱显示纯化后的片段大小集中,条带整齐,见图 2,说明无剪接现象发生.估算浓度约为 $23\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (总体积约 50 μL).

2.3 文库的构建

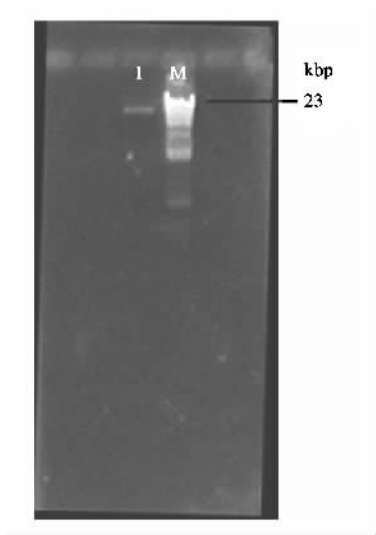
当 10 μL 包装好的 Cosmids 侵染 100 μL 制备好的宿主细胞 *Escherichia coli* EPI100, LB-氨苄西林平板上平均能生长 87 个克隆子.本研究所构建文库的包装效率为 8.7×10^3 ,包装总体积为 1 100 μL , 1.15 μg 目的 DNA 最终产生 9 570 个克隆子.

2.4 Cosmids 克隆子插入片段的准确性验证

所有随机挑选的克隆子质粒经 *Bam*H I 消化后,0.9% 琼脂糖电泳显示每个克隆子的平均插入片段均大于 35 kbp,而且每个插入片段呈现不同带型(见图 3),说明了该文库插入片段的多样性.

3 讨论

3.1 红树林土壤 eDNA 提取方法的改良及优化



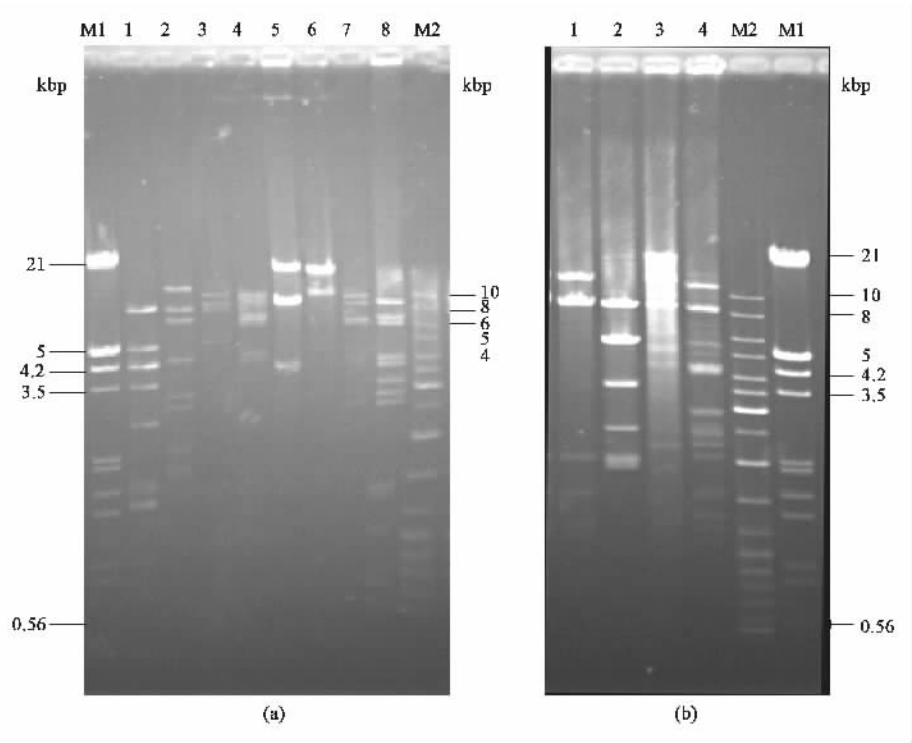
泳道 1, 纯化后的片段; M, λ -Hind III marker
图 2 目的片段经电洗脱纯化后的琼脂糖电泳图谱

Fig.2 Agarose gel result of purified insert DNA fragment using electroelution

Zhou 等^[7] 针对土壤、沉积物样品所创建的高盐、SDS-CTAB 热裂解原位提取法因其所得 eDNA 产量高、易操作而成为目前环境宏基因组相关研究中,被国内外学者引用最多的方法.但不同样品性质各异,没有一种方法能适用于所有的样品^[10].在构建环境宏基因组文库时,评价 eDNA 提取方法优劣的指标应是所得大片段 DNA 所占比率的高低,而不仅仅是 eDNA 总量的多少.本研究在此方法的基础上进行了改良及创新,以期从红树林土壤中获得高产量的大片段 eDNA.具体改进之处如下:

①由于红树林土壤高腐殖酸含量的性质,为减轻后续纯化过程的困难,在提取缓冲液加入添加 2% PVPP.采取此措施后,土壤中高分子量杂质的共提取量明显降低,此结果在前期研究中已经证实.必须强调的是,土壤加入缓冲液剧烈漩涡混匀后于 37℃ 水平振荡 45 min 一步非常重要,不能省略,因为土壤的匀质化过程、土壤微生物从土壤胶团释放到提取缓冲液体系中的过程及 PVPP, CTAB 对土壤中高分子量抑制物的吸附等过程均在此操作中得以发生.实际操作中发现,若省略此步骤,SDS 65℃ 水浴过程中土壤会出现不均匀的成团的现象,所得 DNA 杂质含量甚高,即使纯化也很难满足后续实验要求.

②首次提出“原位抽提”的概念.已发表的众多文献中^[7, 15~18],土壤 DNA 的提取过程中有关“抽提”步骤是如下描述的,加入 SDS, 65℃ 水浴裂解结束后,将土壤裂解物离心 15 min (8 216 r/min),以沉淀



(a) 泳道 1~8, 随机挑选的克隆子;(b) 泳道 1~4, 随机挑选的克隆子

M₁, λ-*EcoR* I + λ-*Hind* III marker; M₂, 2-Log DNA ladder

图 3 重组 Cosmids 的限制性酶切图谱

Fig. 3 Restriction enzyme digests of recombinant Cosmid DNA

土壤、细胞碎片等物质,取上清液置另一无菌离心管中,加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)抽提,继而将抽提物离心 15 min (8 216 r/min),取上清液进行沉淀等后续步骤.因为微生物细胞裂解所释放的大片段 DNA 具有易重新吸附于土壤颗粒的性质,在第一步离心过程中,部分大片段 DNA 在这个时间段不断地吸附于土壤颗粒,而已经吸附于土壤颗粒大片段 DNA 将随土壤颗粒一起沉淀于管底.本研究提出 65℃水浴裂解结束后,直接往土壤裂解物中加入预冷的等体积氯仿/异戊醇(24:1),进行“原位抽提”,接着呈乳状液的抽提物离心 15 min (8 216 r/min),取上清液进行沉淀.“原位抽提”法的目的是降低大片段 DNA 重新吸附于土壤颗粒的可能性,及时使得更多的大片段 DNA 分配于水相,以提高大片段 DNA 的产量,从而提高大片段文库构建成功的可能性.此外,“原位抽提”法的运用减少了一个离心过程,降低了因人工操作导致 eDNA 分子断裂的风险,大大提高了成功构建大片段宏基因文库的可能性.如图 1 所示,运用改良后的方法所得大片段 eDNA 的比率明显增加.

DNA 的提取过程本身是一个精细的实验过程,

实验操作的每一步必须极其小心,一旦土壤样品的裂解过程发生后,任何剧烈的实验操作都必须严格避免,以降低 DNA 被剪切的可能性.

另外,应强调的是,由于本研究构建的是 4 个季节土壤混合基因组文库,红树林土壤样品的保存亦很重要,目前尚未见保存时间和温度对土壤样品中微生物群落结构变化影响的报道,笔者在实际研究中,通过 16S rRNA 基因分析发现,土壤样品在 -20℃保存 6 个月后,有部分微生物多样性丧失现象发生.因此建议土壤样品保存于 -80℃.

3.2 插入片段的纯化

构建环境基因组文库的过程中,大片段的 DNA 很难稳定维持^[3].选择一个切实可行的 DNA 纯化方案,能根本影响克隆的成功性^[19].一个最优的 eDNA 纯化方案既要保证 DNA 的纯度又要保证最小的损失量及最低的剪接程度.基于此原则,比较了几种不同的纯化方式的效果.直接往裂解物中加入酸洗的 PVPP^[20],对 DNA 纯度的阳性作用甚微,而且存在 eDNA 片段断裂的风险;而通过 Gene-Clean kit 纯化后,DNA 片段往往被剪切.低熔点琼脂糖电泳纯化是构建文库中通常被推荐的方案,采用此方法虽可

避免 DNA 片段被剪切,但实际操作过程中,琼脂糖颗粒不易完全去除,残留的琼脂糖颗粒易干扰连接反应等后续实验,导致结果不尽人意,而且其价格昂贵.因此,最终选用电洗脱纯化方式.

3.3 文库的构建

3.3.1 构建文库所用载体的选择

本研究中,构建大片段红树林土壤宏基因组选择 Cosmid 载体,而非 BAC 载体,原因如下:①原位裂解法所得 DNA 片段大小最大不可能超过 100 kbp,且接近 100 kbp 大小的 DNA 片段量较少,若选择 BAC 载体,最终只有少部分两端具有限制性酶切位点的 DNA 片段产生,从而限制了克隆子的数目;②限制性酶切位点在基因组的分布稀少的特点,本质上导致了环境基因组文库中插入片段的多样性的降低;③环境宏基因组学的研究中, BAC 载体实际克隆能力是 37 ~ 44.5 kbp.世界范围内,第一个基于原位裂解法构建的土壤宏基因组文库于 2000 年产生,该文库采用 BAC 载体,克隆子平均插入片段为 44 kbp^[21],目前还没有运用 BAC 载体,插入片段大小超越此文库的报道. Cosmid 载体与目的片段是平端连接的策略,无需经过限制性酶切,并且目的片段的选择方式是随机剪切,从而能够扩大环境宏基因组文库的容量,增加了任一片段出现在文库的可能性.再则, Cosmid 载体选择性连接大小为 35 ~ 45 kbp 的片段.因此,现阶段,运用原位裂解法构建土壤宏基因组文库时,选择 Cosmid 载体在克隆的 DNA 片段大小方面不会逊色于 BAC 载体,而且在克隆片段的多样性方面亦有其优势所在.

3.3.2 本文库的大小及潜力价值

Handelsman 等^[22]曾经计算过,一个要覆盖土壤微生物全部基因信息的基因组文库,所包含的克隆子数目的要求是 10^6 ,且克隆子平均插入片段大小需达到 100 kbp,现有的技术条件下,要达到这个数目是不可能的.本研究中,所构建的红树林土壤文库,克隆子数目为 9 570,覆盖了 335 Mbp 潮间带微生物基因组信息.操作说明有推荐感染后的宿主细胞于 37℃ 水浴 20 min 后,加入 100 μ L LB-氨苄西林肉汤, 37℃ 条件下继续孵育 20 min 再铺板,克隆子数目可能提高 6 ~ 8 倍.实际研究中证实,增加这一操作步会产生很多错误的克隆子.为避免后续筛选工作的繁琐,最终放弃了这一步.将来的研究中,应不断努力发明新的方法以满足不断扩大环境宏基因组文库容量的需求.

研究证实,土壤宏基因组文库的确能产生新的

抗生素.从第一个土壤 Cosmid 文库陆续检测到 long-chain *N*-acyl-L-tyrosine, Violacein 等抗生素的产生^[23,24].第一个土壤 BAC 文库亦产生了新的抗生素 Turbomycin^[25].这些事实充分证明土壤宏基因组文库确实是开发新型天然药物的有力工具.本研究构建的红树林土壤宏基因组文库,包含了 4 个季节潮间带微生物的基因组信息,可预估此文库能产生具有药用功能、生物技术价值的基因.

4 结论

经改良后的高盐、SDS-CTAB 热裂解原位提取法与电洗脱纯化方法联用能高效构建红树林土壤微生物大片段宏基因组文库,其包含克隆子的平均插入片段均大于 35 kbp.此方法的建立为开发红树林土壤未培养微生物资源提供了有力工具.同时,在进行其它生境的宏基因组学研究时,本研究结果也是值得借鉴的实验方案.

致谢:感谢厦门大学沈月毛老师、王文清老师、国家海洋局第三研究所徐俊研究员、唐晓敏同学对本研究工作的支持与帮助.

参考文献:

- [1] Henne A, Schmitz R A, Bomeke M, et al. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(7): 3113 ~ 3116.
- [2] Gabor E M, de Vries E J, Janssen D B. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases [J]. Environ Microbiol, 2004, 6(9): 948 ~ 958.
- [3] Yun J, Kang S, Park S, et al. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(12): 7229 ~ 7235.
- [4] Ranjan R, Grover A, Kapardar R K, et al. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(1): 57 ~ 65.
- [5] Ferrer M, Golyshina O V, Chernikova T N, et al. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora [J]. Environ Microbiol, 2005, 7(8): 1996 ~ 2010.
- [6] Patrick R, Renaud N, Carmela C, et al. Extraction of DNA from soil [J]. Eur J Soil Biol, 2003, 39(4): 183 ~ 190.
- [7] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 316 ~ 322.
- [8] Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(7): 2292 ~ 2295.
- [9] Voget S, Leggewie C, Uesbeck A, et al. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(10): 6235 ~ 6242.

[10] Daniel R. The soil metagenome-a rich resource for the discovery of novel natural products[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(3):199 ~ 204.

[11] Pettit R K. Soil DNA libraries for anticancer drug discovery[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, **54**(1): 1 ~ 6.

[12] 蒋云霞,郑天凌,田蕴. 红树林土壤微生物的研究:过去、现在、未来[J]. *微生物学报*,2006, **46**(5):848 ~ 851.

[13] 刘峰,洪葵. 红树林土壤宏基因组文库构建和生物活性筛选[A]. 见:全国海洋生物技术与海洋药物学术会议论文集[C]. 2006. 667 ~ 669.

[14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. (2nd). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[15] 张瑞福,曹慧,崔中利,等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化[J]. *微生物学报*, 2003, **43**(2):276 ~ 282.

[16] 赵晶,张锐,林念炜,等. 深海沉积物中微量 DNA 的提取及应用[J]. *海洋与湖沼*, 2003, **34**(3):313 ~ 321.

[17] 黄婷婷,曹慧,王兴祥,等. 一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法[J]. *土壤*, 2004, **36**(6):662 ~ 666.

[18] 饶志明,赵有玺,李辉,等. 太湖流域土壤微生物基因组总 DNA 分离纯化及其质粒文库的初步构建[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, **10**(6):774 ~ 777.

[19] Rheims H, Rainey F A, Stackebrandt E. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment[J]. *J Ind Microbiol*, 1996, **17**(3-4):159 ~ 169.

[20] Krsek M, Wellington E M. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil[J]. *J Microbiol Methods*, 1999, **39**(1):1 ~ 16.

[21] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6):2541 ~ 2547.

[22] Handelsman J, Rondon M R, Brady S P, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chem Biol*, 1998, **5**(10):245 ~ 249.

[23] Brady S F, Clardy J. Long-chain *N*-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, **122**(51):12903 ~ 12904.

[24] Brady S F, Chao C J, Handelsman J, *et al.* Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA[J]. *Org Lett*, 2001, **3**(13):1981 ~ 1984.

[25] Gillespie D E, Brady S F, Bettermann A D, *et al.* Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(9):4306 ~ 4310.