

实时荧光定量 PCR 及其在微生物生态学中的应用

张 晶^{1,2}, 张惠文¹, 张成刚¹

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:定量描述微生物群落的组成,在微生物生态学的许多研究领域都是非常重要的。然而由于可培养技术的局限性,定量描述微生物群落成为比较困难的事情。最近包括 PCR 技术在内的分子生物学技术为人们提供了有力的工具,使对微生物群落的分布、丰度等有了进一步的了解。实时荧光定量 PCR 技术作为核酸定量检测技术,自从发明以来在微生物生态学研究逐渐得到了广泛的应用。从微生物生态学角度,综述了实时荧光定量 PCR 技术的原理、发展、优缺点及其在微生物生态学研究中的应用与研究进展,并探讨了实时荧光定量 PCR 技术的发展和前景。

关键词:实时荧光定量 PCR 技术;SYBR Green I ;荧光探针;微生物生态学

文章编号:1000-0933(2005)06-1445-06 中图分类号:Q938.1 文献标识码:A

Real-time fluorescent quantitative PCR and its application in microbial ecology
ZHANG Jing^{1,2}, ZHANG Hui-Wen¹, ZHANG Cheng-Gang¹ (1. *Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, 110016, China*; 2. *the Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039, China*). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(6): 1445~1450.

Abstract: The quantitative description of microbial community, especially the dominant groups and the groups that play some biological functions, is very important in some aspects of microbial ecology. However, conventional cultivation techniques cannot be used to fully characterize most soil microorganisms in respect that most of environmental species cannot be cultured, so it brings us some obstacles and makes us not thoroughly study the microbial communities. Fortunately, some molecular biological techniques including PCR technique give us new ways to understand the distribution and abundance of microbial community.

Since the invention of real-time fluorescent quantitative PCR as a quantitative technique of nucleic acid, due to its high sensitivity and high accuracy, it has been more and more widely applied in the field of microbial ecology. Using real-time fluorescent quantitative PCR profile to characterize microbial community can overcome the limitation of traditional technique, moreover accurate information about the microbial community can be got. The development of real-time fluorescent quantitative PCR, its principle and advantages and disadvantages were described in detail, furthermore the application and advances of real-time PCR in this field were reviewed. Future trends of real-time PCR techniques in microbial ecology were also discussed.

Real-time PCR is a powerful tool for analysis of microbial communities. In order to get the more accurate and full information, it is better to combine with other molecular and microbiological techniques to give us a more clearly detailed view of microbial community structure, composition and abundance. At the same time, how to overcome some factors that affect the result of real-time PCR is another challenge we have to confront with. With the development of real-time PCR technique, the study strives for realizing absolute quantification and universal quantification in the future.

Key words: real time fluorescent quantitative PCR; SYBR Green I ; fluorescent probe; microbial ecology

基金项目:中国科学院知识创新工程前沿领域探索资助项目(C12MGSCX-MS-0107)

收稿日期:2004-04-07; **修订日期:**2004-09-19

作者简介:张晶(1979~),女,辽宁营口人,博士生,主要从事环境微生物分子生态学研究。E-mail:zhangjing79847984@hotmail.com

Foundation item: The Project of Knowledge Innovation of CAS(No. C12MGSCX-MS-0107)

Received date:2004-04-07; **Accepted date:**2004-09-19

Biography: ZHANG Jing, Ph. D. candidate, mainly engaged in environmental microbial and molecular ecology. E-mail: zhangjing79847984@hotmail.com

量化微生物群落的组成,确定群落的优势类群^[1,2]或具有某种生物学功能微生物类群^[3]的丰度,在微生物生态学的许多研究领域都是非常必要的。然而许多环境微生物是不可培养的,这给人们的研究带来了一些障碍。最近包括 PCR 在内的许多分子生物学方法,提供了不依赖于培养的新技术,使人们对环境微生物群落组成和丰度有了进一步了解。实时荧光定量 PCR 技术作为一种核酸定量的手段,以其高灵敏性、高特异性、高精度、实时性、污染少等优点,在微生物生态学中逐渐得到广泛的应用。与其他的分子生物学技术^[4~6]的联合应用,使我们不仅可以定性,也可以定量研究微生物群落结构组成及数量变化,深入探索微生物群落与环境因子之间的相互作用及其动态变化过程。

1 实时荧光定量 PCR 技术概述

1.1 实时荧光定量 PCR 技术的发展

PCR 技术发明以来,研究人员一直致力于用其进行核酸精确定量。1991 年 Holland 等^[7]首次运用不可延伸的寡核苷酸杂交探针与模板结合,然后利用 DNA 聚合酶的 5'→3' 核酸外切酶活性将探针切断,使探针的能量传递结构被破坏发出荧光来定量 PCR 产物。1992 年 Higuchi 等^[8,9]在 PCR 反应管中加入 EB,反应进行过程中,PCR 产物增加,EB 与 DNA 双链结合发出荧光强度也逐渐增加。他们通过连续照相动态观察荧光强度的变化,并以此定量 PCR 产物的多少,成为最早的实时定量 PCR。1996 年 Heid^[10]等首先报道了 Taqman PCR 的原理及方法。同年,美国 Applied Biosystems 公司推出商用实时定量 PCR (Taqman PCR) 系列。之后,人们又设计出不同的荧光探针,如分子信标技术 (molecular beacon)^[11]、Lightcycler PCR^[12,13] 等。随着研究的不断进展,研究人员不仅定量 DNA 分子,还定量 RNA 分子,从而进一步定量基因的表达^[14]。

1.2 实时荧光定量 PCR 技术的基本原理

所谓实时荧光定量 PCR 技术,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。其常用机制包括荧光染料检测和水解探针检测。

(1) SYBR Green I 检测 SYBR Green I 是一种只与双链 DNA 小沟结合的具有绿色激发波长的染料。当它与 DNA 双链结合时,发出荧光,当 DNA 解链成为单链时,它从链上释放出来,这时荧光信号急剧减落。其最大吸收波长约为 497nm,发射波长最大约为 520nm。SYBR Green I 的优点是不必因为模板不同而特别定制,因此设计的程序通用性好,且价格相对较低,缺点主要是由引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性。通过升高温度后测量荧光的变化可以帮助降低非特异产物的影响。由解链曲线来分析产物的均一性有助于分析由 SYBR Green I 得到的定量结果。

(2) Taqman 探针检测 Taqman 水解探针主要是利用 Taq 酶 5'→3' 外切核酸酶活性,并在 PCR 反应体系中加入一个荧光标记探针。探针的 5' 端标记报告基团 FAM (6-羧基荧光素), 3' 端标记淬灭基团 TAMRA (6-羧基四甲基罗丹明)。探针结构完整时, 3' 淬灭基团抑制 5' 荧光基团的荧光发射。随着 PCR 反应的进行,由于 Taq 酶 5'→3' 外切核酸酶活性,当合成的新链移动到探针结合位置时, Taq 酶将探针切断,探针的完整性遭到破坏,能量传递结构亦被破坏, 5' 端 FAM 荧光报告基团的荧光信号被释放出来。模板每复制一次,就有一个探针被切断,同时伴有一个荧光信号的释放。产物与荧光信号产生一对一的对应关系,随着产物的增加,荧光信号不断增强。如图 1 所示当信号增强到某一阈值 (根据荧光信号基线的平均值和平均标准差,计算出以 99.7% 的置信度大于平均值的荧光值,即为阈值), 此时的循环次数即循环阈值 C_t (cycle threshold)。该循环参数 C_t 和 PCR 体系中起始模板数的对数之间有严格的线性关系,利用不同的标准模板扩增的 C_t 值和标准模板数经过对数拟合作图,制成标准曲线,再根据待测样品的 C_t 值可以准确地确定起始模板的数量^[8,10]。图 2 显示了 Taqman 探针反应原理。

1.3 实时荧光定量 PCR 的优缺点

1.3.1 优点 与其他基于 PCR 定量方法相比,实时荧光定量 PCR 有着显而易见的优点:

- ① 灵敏性 光谱技术和计算机技术的联合使用,大大提高了检测的灵敏度,甚至可以检测到单拷贝的基因。
- ② 精确性 由于 PCR 的平台效应,传统 PCR 不能进行精确的定量,而实时荧光定量 PCR 不受扩增效率和试剂损耗的影响,利用扩增进入指数增长期的 C_t 值来定量起始模板量。
- ③ 特异性 荧光探针是针对靶序列设计,相当于在 PCR 的过程中自动完成了 Southern 杂交,具有高特异性。
- ④ 安全、快速性 实时荧光定量 PCR 是在全封闭状态下实现扩增和产物分析的,降低了溴化乙锭的污染,同时可以检测多个样品,有效减少了劳动量。

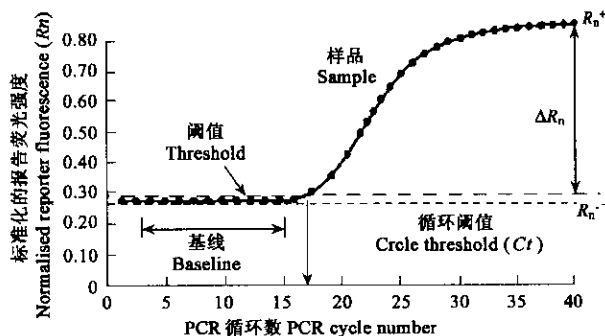


图 1 C_t 值的确定^[36]

Fig. 1 Definition of C_t Value

⑤动态性 实时荧光定量 PCR 可以在 PCR 反应的同时,检测反应的进程。

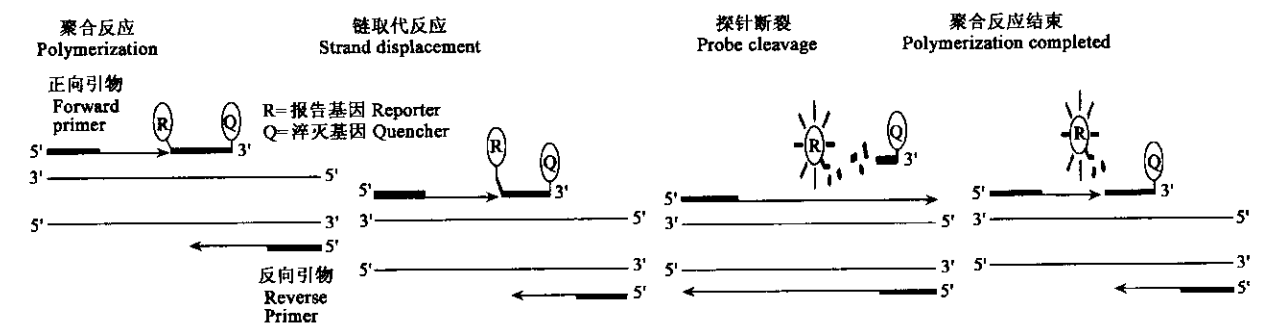


图 2 Taqman 探针反应原理图^[36]

Fig. 2 Principle of Taqman probe reaction

1. 3. 2 缺点 实时荧光定量 PCR 技术需要特殊的热循环仪和试剂,这些都比较高贵。同时操作时要考虑以下几个影响因素,包括同源和异源 DNA 背景^[15]、寡核苷酸杂交特异性^[15]、Taqman 探针比例^[15]、细胞裂解效率^[1]、mRNA 的部分降解^[16]、SYBR Green I 的浓度大小^[14]、PCR 产物的长度长短^[14],这些都可能会引起实时荧光定量 PCR 反应在定量上的偏差,因此在进行操作时需要条件的最优化研究。另外,标准曲线的制作可能也存在一定的问题。例如在定量一些不可培养微生物时,可能要用质粒 DNA 的拷贝数来换算才能得到某一微生物种类的丰度,其准确性则值得探讨。

2 实时荧光定量 PCR 在微生物生态学中的应用

2. 1 用于环境中微生物群落变化的动态监测

实时荧光定量 PCR 技术的一个显著特性就是可以同时多个样品进行分析,因此适合于检测环境中微生物在时间和空间上的动态变化。Tay 等^[17]利用特异性 16S rDNA 引物扩增两种甲苯降解菌,观测河流中这两种甲苯降解菌的群落动态,荧光定量 PCR 结果显示:*Xanthobacter autotrophicus* 和 *X. mycobacterium* 在甲苯污染地区的丰度比非污染地区的高,这与早期可培养调查结果一致。但 *X. autotrophicus* 只在污染地区夏季有相对短暂的繁盛,而 *X. mycobacterium* 数量持续增高的时间超过 5 个月,从而产生与早期传统单一时间点细菌培养实验不同的结论,表明分枝杆菌在甲苯降解方面比想象的更为重要。Feris 等^[5]在研究重金属污染梯度高流变区微生物群落时,利用荧光定量 PCR 技术量化 16S rRNA 基因拷贝数和 α -, β -, γ -proteobacteria, cyanobacteria 四个系统进化类群。发现淤泥中重金属离子梯度与类群 III 正相关,与类群 II 负相关,与类群 I 或 IV 无相关性,从而为预测河流重金属污染的长期效应提供了进一步研究的基础。Boon 等^[4]应用实时荧光定量 PCR 研究了污染物 3-氯苯胺(3-CA)短期刺激下活性污泥反应器功能效应。发现 3-氯苯胺的添加造成无生物放大作用反应器中铵的积累,反应器中氨氧化细菌数量显著下降,群落组成改变且无法恢复。而在加入 3-CA 降解菌株具有生物放大作用反应器中氨氧化微生物群落的结构、活性和丰度可以恢复,从而验证生物放大作用加快了有毒氯化物的降解,对反应器中微生物群落有保护功能。Seghers 等^[5]发现阿特拉津和莫多草等杀虫剂的长期慢性作用并没有造成玉米非根际土壤 I、II 型甲烷杆菌丰度的降低,即土壤系统甲烷杆菌总丰度保持平衡。

草食动物的瘤胃是一个复杂的共生微生物区。瘤胃中的微生物群落会随地理位置、季节、饮食、寄主动物的健康状况、抗生素使用的变化而改变。然而早期受纯培养技术的局限,研究结果缺乏内在的联系,新的灵敏和精确的分子检测方法使这一领域有新的进展。Tajima 等^[2]通过实时荧光定量 PCR 监测了饮食改变后牛瘤胃细菌种群的变化。饮食从干草变成谷类后,在干草饮食占优势的 *Fibrobacter succinogenes* 在第 3 天下降了 20 倍,第 28 天降低了 57 倍。*Ruminococcus flavefaciens* 在第 3 天减少了约 10%,第 28 天时维持这一水平。这与可培养技术的结果相一致。在转换期(第 3 天),瘤胃中两种 *prevotella* DNA 增长相当大,分别增长了 7 倍和 263 倍。28d 后,与原来草食比,*P. ruminicola* 却下降了 3 倍,但 *P. bryantii* 仍然增多了 10 倍。*Eubacterium ruminantium* 在饮食转换后下降了 14 倍,28d 后仍然保持这一水平。瘤胃螺旋菌 *Treponema bryantii* 减少并不激烈,在第 28 天时稳定在较原来下降 7 倍的水平。*Streptococcus bovis* 在第 3 天时增长 67 倍,而第 28 天时比原来的水平又下降了一些。*Selenomonas ruminantium-M* 在第 3 天增加了 8 倍,到第 28 天时稳定在原数量 2 倍水平。上述结果揭示了传统培养实验无法揭示的现象,说明饮食的改变对瘤胃微生物群落的影响是显著的。Einspanier 等^[18]也通过实时荧光定量 PCR 技术对胃肠道不同部分(包括瘤胃、皱胃、空肠、结肠)的叶绿体、玉米转化酵素、玉米蛋白和 Bt 毒素基因片段进行定量分析。发现牛饲用转 Bt176 基因玉米 4 周后,高中度植物基因片段丰度的显著变化取决于驻留时间和原始基因拷贝数,从而为进一步评价新型转基因饲料在胃肠道中的归宿提供了补充数据。

由微核糖体 RNA 序列差异造成生理多样化菌株生态型的演替,解释了微小红色藻青菌在深湖自养微小浮游生物中占优势的原因。而在相似系统发育生物混合体中,特定生态型和基因型的丰度必须先被确定。Becker 等^[15]发现在系统发育相近的菌株混合物背景中,微生物群落丰度受到背景 DNA 浓度、PCR 引物和寡核苷酸探针特异性、Taqman 探针与扩增产物比例等因素的影响,从而造成生态学分析的偏差。他以两种分类学水平设计探针和引物,计量已知所有蓝细菌类基因组和代表富含藻红蛋白的蓝细菌菌株 BO8807 单一基因型基因组,研究了康士坦茨湖年季变化过程中小型自养浮游生物优势种蓝细菌群落丰度和深度分布动态。发现清水期有较高的生物相对丰度,同时发现了取样过程和检测中存在的一些问题,推测可能有一个蓝细菌类群没被检测到^[19]。Kurmayer 等^[20]也通过对藻青蛋白操纵子基因间隔区和微囊藻素合成酶 *mcyB* 基因定量微囊藻素基因型,观测微囊菌基因型在整个种群的季节更替中的变化,发现季节更替过程中微囊藻素基因型的平均比例是稳定的。

2.2 用于微生物群落生理代谢的研究

通过对微生物代谢功能基因的定量研究,可以加深人们对代谢途径的了解。Wikstrom 等^[16]研究硝基芳香族化合物污染的地下水微生物群落变化时,发现微生物代谢外源烃类与内源烃类的能力不同。荧光定量 PCR 结果显示:儿茶酚-2,3-双加氧酶基因相对丰度与萘和酚的降解有关,与 2,4-二硝基甲苯降解无关。说明微生物对水体中的外源烃类代谢有选择作用,而对与生长相关的内源烃类的降解无选择作用。He jianzhong 等^[21]研究了氯化物脱氯的微生物降解过程,发现在添加氯乙烯的培养基连续培养 40d 后,培养物失去利用三氯乙烯、四氯乙烯作为代谢载体的能力。实时荧光定量 PCR 结果确定了 *Dehalococcoides* 是依赖氯乙烯生长类群,微生物利用氯乙烯、二氯乙烯作为电子受体而不是三氯乙烯、四氯乙烯。

Baldwin 等^[22]将芳香族加氧酶(包括萘双加氧酶、联苯双加氧酶、甲苯双加氧酶、二甲苯单加氧酶、酚单加氧酶、羟甲基苯酚单加氧酶)大亚基基因作为指示基因,通过多重 PCR 和实时荧光定量 PCR 扩增来检测和量化芳香族化合物分解代谢途径,扩展了对芳香族污染物生物降解相关的基因型的量化能力,从而对自然退化、污染地生态调查和生物修复条件优化提供辅助评价。Hristova 等^[3]利用荧光定量 PCR 技术检测甲基-4-二丁醚(MTBE)污染地下水中自然存在的 MTBE 降解菌 PM1 的数量,发现缺氧环境中 PM1 的数量在检测线以下,在有氧环境在 $10^3 \sim 10^4$ 个/ml,在 $10 \mu\text{g}$ MTBE/L 微宇宙体系中土著 PM1 细菌数量增加到约 10^5 个/ml。同时在发生 MTBE 降解的沉积物中,菌株 PM1 的密度也增加。大田实验中随 O_2 和 MTBE 浓度增加,土著 PM1 菌株数量也增加。说明 O_2 和 MTBE 的存在使菌株 PM1 的代谢旺盛。

Okano 等^[23]通过定量氨单加氧酶基因(*amoA*)来确定土壤中氨氧化细菌(AOB)群落大小,同时研究了铵离子浓度对氨氧化细菌群落的影响。发现随着铵离子浓度增加,氨氧化细菌数量也呈不同程度增长,而细菌总数稳定在一定的范围,同时还发现常年施肥的土壤中氨氧化细菌显著增长,甚至在施肥 8 个月以后,说明铵肥对氨氧化细菌群落具有长期影响。

Mayer 等^[14]通过实时反转录 PCR 定量黄曲霉毒素生物合成基因 *nor-1* mRNA 浓度从而监测小麦黄曲霉毒素 B_1 的产生。发现接种第 4 天可以检测到 *nor-1* mRNA,6d 天后达到最大值。之后开始缓慢降解,8d 后非常快速降解直到不可检测水平。同时黄曲霉毒素在第 9 天时达到最大值,之后保持恒定。mRNA 拷贝数与毒素表达之间有很好的相关性。

2.3 用于环境微生物群落分布的研究

由于纯培养和显微技术的不便,人们对土壤中甲烷菌的丰度了解很少。Kolb 等^[1]通过比较甲烷菌 16S rDNA 和甲烷单加氧酶 α 亚基的 *pmoA* 基因系统进化树,发现两者有良好的相关性,并且揭示了变形菌 α 和 γ 亚纲五大甲烷菌群。因此他通过靶定 *pmoA* 基因来定量变形菌 α 和 γ 亚纲五大甲烷细菌群及所有的甲烷细菌,分析了水淹稻田的甲烷细菌数量,指出 *Methylosinus* 类群占优势,同时 *Methylosinus* /*Methylosarcina* 也有较高丰度,而林地甲烷细菌和 *Methylocapsa* 类群的数量低于检测极限。

Matsuki^[24]通过实时荧光定量 PCR 研究了肠内双歧杆菌菌群的分布,发现 *Bifidobacteria. adolescentis*、*B. catenulatum*、*B. longum* 是肠道内的主要类群。同时监测了健康人 8 个月内的双歧杆菌群落组成变化,结果显示其组成基本上是稳定的。Qiyuan 等^[25]利用 *rpoB* 基因作为特定染色体标记物定量来自不同地理位置的炭疽杆菌,该方法无交叉反应,而且时间短,不失为一种对炭疽杆菌检测和定量的好方法。

Grüntzig 等^[26]通过定量反硝化亚硝酸盐还原酶基因(*nirS*)丰度研究施氏假单胞菌种类的丰度,发现海底沉积物中施氏假单胞菌的丰度极低或无法检测,说明这种微生物不是海底主要的反硝化微生物。同时也通过 DNA 阻滞和细胞外加实验证明荧光定量 PCR 能够精确分析环境样品功能基因(*nirS*)的丰度。

Yeager^[27]发现在成熟地壳固氮酶活性分别是科罗拉多高地和池华欢沙漠的 10 倍和 2.5 倍,而成熟和未成熟地壳的固氮微生物组成无显著差异,但相比之下,荧光定量 PCR 结果显示成熟地壳的 *nifH* 基因丰度是未成熟的 7.5 倍,可能由于土壤的不稳定性和水分胁迫限制了固氮微生物的生长,造成成熟与未成熟地壳固氮酶基因丰度的显著差异。

Ochsenreiter 等^[28]用古细菌 16S rDNA 实时荧光定量 PCR 技术,研究来自欧洲和亚洲不同地理区域(包括林地、草原、杂草地、永久冻结带)的 7 个不同类型土壤样品中陆栖 *Crenarchaeota* 的多样性和丰度时,发现 rDNA 在沙土生态系统的相对丰度

为 0.5%~3%,而根际间仅为 0.16%,附近农田土壤的相对丰度为 0.17%。指出土壤 *Crenarchaeota* 种群是一个稳定而特殊的陆栖微生物类群。

产肝毒微囊藻素的微囊菌、项圈藻和浮游生物均会造成藻青菌大量泛滥,因此如果缺乏适当的定量方法就很难确定有效的产生者。Vaitomaa 等^[29]通过实时荧光定量 PCR 技术定量湖泊中微囊菌和项圈藻微囊藻素合成酶 E 拷贝数,发现湖泊中主要的微囊藻素产生者是微囊菌,其微囊素合成酶 E 拷贝数是项圈藻的 30 多倍。

Cummings 等^[30]研究了沿湖泊重金属污染浓度梯度中还原铁离子 *Geobacteraceae* 家族的丰度和分布,发现其分布相对均匀,说明在湖泊沉积物中 *Geobacteraceae* 家族分布及丰度不受重金属离子浓度影响。

2.4 用于方法探讨和条件优化研究

应用实时荧光定量 PCR 技术来检测不同生物学方法对研究的影响或条件的优化,从而使研究更好的进一步展开。Hermansson 等^[31]通过实时荧光定量 PCR 发现玻璃珠打击 10~100s 之间土壤氨氧化细菌裂解效率最高。Fykse 等^[32]发现超声波裂解革兰氏阳性细菌 3~5min 时,DNA 的产量最大。Dionisi 等^[33]通过实时荧光定量 PCR 技术确定方法学差异对定量影响最小的样品处理点。针对丰度高的细菌和丰度较低的硝化细菌 *Nitrospira* 16S rRNA 进行分析,发现 DNA 提取对定量 PCR 变异系数影响小,而 PCR 扩增对其影响较大,低丰度的靶序列差异比高丰度的大,分析显示在 PCR 扩增中 3~5 个样品分别对细菌 16S rRNA 基因的 2 倍增加和 *Nitrospira* 的 5 倍增加是必要的。Requena^[34]通过转醛醇酶基因研究了双叉乳杆菌种类的数量。成人排泄物的定量 PCR 检测结果与纯培养的 16S rDNA 或转醛醇酶基因相关性好,而婴儿的 16S rDNA PCR 结果优于转醛醇酶基因来定量双叉乳杆菌类群。

3 结语

实时荧光定量 PCR 技术作为核酸定量方法,在微生物生态学领域中得到了广泛的应用。在未来的研究中,如何能够更加准确定量(绝对定量)及对不同环境中微生物定量(普遍定量)成为研究者最关心的问题。目前的实时荧光定量 PCR 反应通常针对 16S rDNA 或功能基因来量化环境微生物的相对数量丰度,由于功能基因在不同的微生物种类中拷贝数不同,例如氨氧化细菌^[35],可能造成虽然扩增反应特异性较高但定量不准确的结果。另外,在许多生态系统中微生物的丰度较低和细胞中 rDNA 含量较少都会限制杂交的敏感度。同时对一些环境样品微生物定量时,受到非靶序列 DNA 的干扰。如何排除背景的影响,使实时荧光定量 PCR 具有普遍性是人们面临的又一个挑战。

总之,实时荧光定量 PCR 技术,为微生物生态学研究提供了强有力的技术支撑,与其他分子生物学及传统方法相结合,将为微生物生态学开辟出更加广阔的前景。

References:

[1] Kolb S,Knief C,Stubner S,*et al.* Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*,2003,**69**(5):2423~2429.

[2] Tajima K,Aminov RI,Nagamine T,*et al.* Diet-dependent shift in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*,2001,**67**(6):2766~2774.

[3] Hristova K,Gebreyesus B,Mackay D,*et al.* Naturally occurring bacteria similar to the methyl tert-butyl ether (MTBE)-degrading strain PM1 are present in MTBE-contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*,2003,**69**(5):2616~2623.

[4] Boon N,Top EM,Verstraete W,*et al.* Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Applied and Environmental Microbiology*,2003,**69**(3):1511~1520.

[5] Feris K,Ramsey P,Frazar C,*et al.* Differences in hyporheic-zone microbial community structure along a heavy-metal contamination gradient. *Applied and Environmental Microbiology*,2003,**69**(9):5563~5573.

[6] Seghers D,Verthé K,Reheul D,*et al.* Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*,2003,**46**:139~146.

[7] Holland P M,Abramson R D,Watson R,*et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,1991,**88**:7276~7280.

[8] Higuchi R,Dollinger G,Walsh P S,*et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*,1992,**10**:413.

[9] Higuchi R,Fockler C,*et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*,1993,**11**:1026~1030.

[10] Heid C A,Stevens J,Livak K J,*et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res.*,1996,**6**:986-994.

[11] Tyagi S,Kramer F R. Molecular beacons probes: that fluoresce upon hybridization. *National Biotechnology*, 1996,**14**:303~308.

- [12] Wittwer C T, Herrmann M G, Moss A A, *et al.* Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 1997, **22**: 130~138.
- [13] Wittwer C T, Ririe K M, Andrew R V, *et al.* The lightcycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechnique*, 1997, **22**: 176~181.
- [14] Mayer Z, Färber P, Geisen R. Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(2): 1154~1158.
- [15] Becker S, Böger P, Oehlmann R, *et al.* PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(11): 4945~4953.
- [16] Wikström P, Hagglund L, Forsman M. Structure of a natural microbial community in a nitroaromatic contaminated groundwater is altered during biodegradation of extrinsic, but not intrinsic substrates. *Microbial Ecology*, 2000, **39**: 203~210.
- [17] Tay S T, Hemond F H, Krumholz L R, *et al.* Population dynamics of two toluene degrading bacterial species in a contaminated stream. *Microbial Ecology*, 2001, **41**(2): 124~131.
- [18] Einspanier R, Lutz B, Rief S, *et al.* Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *European Food Research and Technology*, 2004, **218**(3): 269~273.
- [19] Becker S, Fahrbach M, Böger P, *et al.* Quantitative tracing, by *Taq* nuclease assays, of a *synechococcus* ecotype in a highly diversified natural population. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(9): 4486~4494.
- [20] Kurmayer R and Kutzenberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(11): 6723~6730.
- [21] He J Z, Ritalahti K M, Aiello M R, *et al.* Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(2): 996~1003.
- [22] Baldwin B R, Nakatsu C H, Nies L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(6): 3350~3358.
- [23] Okano Y, Hristova K R, Leutenegger C M, *et al.* Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(2): 1008~1016.
- [24] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, *et al.* Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(1): 167~173.
- [25] Qi Y, Patra G, Liang X D, *et al.* Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(8): 3720~3727.
- [26] Grüntzig V, Nold S C, Zhou J Z, *et al.* *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(2): 760~768.
- [27] Yeager C M, Kornosky J L, Housman D C, *et al.* Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado plateau and chihuahuan desert. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(2): 973~983.
- [28] Ochsenreiter T, Selezi D, Quaiser A, *et al.* Diversity and abundance of crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(9): 787~797.
- [29] Vaitoma J, Rantala A, Halinen K, *et al.* Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *microcystis* and *anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(12): 7289~7297.
- [30] Cummings D E, Snoeyenbos-West O L, Newby D T, *et al.* Diversity of Geobacteraceae species inhabiting metal-polluted freshwater lake sediments ascertained by 16S rDNA analyses. *Microbial Ecology*, 2003, **46**: 257~269.
- [31] Hermansson A and Lindgren P E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(2): 972~976.
- [32] Fykse E M, Olsen J S, Skogan G. Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, **55**(1): 1~10.
- [33] Dionisi H M, Harms G, Layton A C, *et al.* Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(11): 6597~6604.
- [34] Requena T, Burton J, Matsuki T, *et al.* Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(5): 2420~2427.
- [35] Klotz M G and Norton J M. Multiple copies of ammonia monooxygenase (*amo*) operons have evolved under biased AT/CG mutational pressure in ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, **168**: 303~311.
- [36] <http://www.genecore.com/chinese/technology/qpcr/service.htm>.