

# 土壤宏转录组样本制备

## Soil Sample Preparation of Microbial Communities for Metatranscriptomics

贝水宽<sup>1,2</sup>, 彭静静<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>资源与环境学院/植物-土壤相互作用教育部重点实验室, 中国农业大学, 北京; <sup>2</sup>国家农业绿色发展研究院, 中国农业大学, 北京

\*通讯作者邮箱: [jingjing.peng@cau.edu.cn](mailto:jingjing.peng@cau.edu.cn)

**摘要:** 系统水平上揭示特定环境和时期的微生物群落结构和基因表达过程对于理解活跃微生物的生物学功能具有重要意义。近年来, 分子生物学技术飞速发展, 宏转录组学研究已广泛用于环境、医学等相关领域的微生物研究。本文以土壤环境为研究对象, 系统介绍了土壤总 RNA 提取 (SDS-Phenol 法)、纯化、mRNA 富集及文库构建等土壤宏转录组样本制备过程, 为相关研究者提供技术参考。

**关键词:** 微生物, 土壤宏转录组, mRNA 富集, 文库构建

### 材料与试剂

1. 微型玻璃珠 (Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 货号: Z250465 和 G1145, 室温保存)
2. 水饱和酚 (生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: A504195, 冷藏保存)
3. Tris (赛默飞世尔科技有限公司, 货号: AM9851, 室温保存)
4. Tris-HCl Buffer (赛默飞世尔科技有限公司, 货号: 15567027, 室温保存)
5. Polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 货号: 81400)
6. MgCl<sub>2</sub> (国药集团化学试剂有限公司, 常温保存)
7. TE 缓冲液 (赛默飞世尔科技有限公司, 货号: AM9849, 室温保存)
8. 十二烷基硫酸钠 (SDS) (生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: A50022, 室温保存)
9. 苯酚 (生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: A601971, 冷藏保存)
10. TPM 缓冲液 (见溶液配方)
11. PBL 缓冲液 (见溶液配方)

31 12. Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) (生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: B54  
32 8137, 室温保存)

33 13. 苯酚-氯仿-异戊醇混合物 (国药集团化学试剂有限公司, 货号: K7761701,  
34 冷藏保存)

35 14. 氯仿-异戊醇混合物 (Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公  
36 司, 货号: C0549, 冷藏保存)

37 15. 乙酸钠 (生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: A100602, 常温保存)

38 16. 异丙醇 (生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: A507048, 常温保存)

39 17. 无水乙醇 (生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: A500737, 常温保存)

40 18. 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水 (赛默飞世尔科技有限公司, 货号: AM9916,  
41 冷藏保存)

42 19. Recombinant DNase I (TaKaRa 生物工程有限公司, 货号: 2270A, 冷  
43 冻保存)

44 20. 0.5 M EDTA 溶液 (生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: B540625,  
45 常温保存)

46 21. Glycogen (碧云天生物, 货号: D0812, 冷冻保存)

47 22. RNeasy MinElute Cleanup Kit (凯杰企业管理 (上海) 有限公司, 货  
48 号: 74204, RNeasy MinElute spin columns 冷藏保存, 其余试剂室温保存)

49 23. Ribo-Zero rRNA removal Kit (Illumina 有限公司 (美国), 货号: MRZ  
50 MB126, 磁珠和磁珠缓冲液冷藏保存, 其余试剂于 -80 °C 保存)

51 24. RNA 6000 Pico Chip (安捷伦科技 (中国) 有限公司, 货号: 5067-151  
52 3, 保存期 4 个月)

53 25. NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (安  
54 诺伦 (北京) 生物科技有限公司, 货号: NEB #E7420S, 冷冻保存)

55 26. NaCl (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯, 常温保存)

## 56 仪器设备

57 1. 快速核酸提取仪 (安倍医疗器械贸易 (上海) 有限公司 (MP Biomedicals),  
58 型号: FastPrep®-24)

2. 台式超速离心机 (Eppendorf 中国有限公司)
3. 微型离心机
4. PCR 核酸扩增仪 (美国 Bio-Rad (伯乐) 有限公司)
5. 恒温混匀仪
6. 电泳仪 (美国 Bio-Rad (伯乐) 有限公司)
7. 凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad (伯乐) 有限公司)
8. Qubit 4 荧光计 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 型号: Q33239)
9. 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博迅医疗生物仪器有限公司)
10. Bioanalyzer (安捷伦科技 (中国) 有限公司, 型号: 2100)
11. 磁力试管架 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 型号: 12321D)

## 实验步骤

### 1. 总 RNA 提取

- 本研究的 RNA 提取方法参考 (Mettel 等, 2010; Ma 等, 2012; Peng 等, 2017; 2018), 以 SDS-Phenol (Sodium dodecyl sulfate-Phenol) 法为例。
- 1.1 称取 0.5 g 新鲜土壤样品于 2 mL 离心管中。加入同等重量玻璃珠 (0.5 mm: 0.1 mm = 3:2, Sigma) 和 700  $\mu$ L 预冷的 TPM 缓冲液。
  - 1.2 将混合液样品管放入快速核酸提取仪, 以  $6.0 \text{ m s}^{-1}$  的速度裂解细胞 35 s。
  - 1.3  $4^\circ\text{C}$ ,  $20,000 \times g$ , 离心 5 min。转移上清液至新的 2 mL 离心管中。加入预冷的 PBL 缓冲液 700  $\mu$ L, 再次震荡离心。最后将两次裂解所得的上清液混合, 弃沉淀样品。
  - 1.4 在得到的上清液中加入 500  $\mu$ L 水饱和酚, 颠倒 30 s 充分混匀后以  $20,000 \times g$  离心 3 min, 将水相转移至新的 2 mL 离心管中。依次加入 500  $\mu$ L 酚-氯仿-异戊醇混合液和氯仿-异戊醇混合液, 步骤同上。最后吸取水相 500  $\mu$ L 至新的 1.5 mL 离心管。
  - 1.5 将所得水相与 0.1 体积的 3 M 乙酸钠溶液 (pH 5.7) 和 0.7 体积的异丙醇混合, 室温下静置孵育 5 min。随后在  $12,000 \times g$  和  $4^\circ\text{C}$  条件下离心 30 min (可通过延长离心时间 (最长 1 h) 来提高 RNA 产量)。

1.6 沉淀中加入 400  $\mu\text{L}$  预冷的 70%乙醇，轻摇（使乙醇覆盖沉淀）数次，离心 5 min。用移液枪吸走残留乙醇溶液，并于超净工作台中自然风干（5-10 min）。最后加入 50  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解，混匀 RNA 样品。

1.7 使用 Recombinant DNase I（Takara）去除 RNA 样品中的 DNA 污染，主要体系（50  $\mu\text{L}$ ）如下：

总 RNA	1-5 $\mu\text{g}$
10 $\times$ DNase I Buffer	4.5 $\mu\text{L}$
Recombinant DNase I	2.5 $\mu\text{L}$
RNase Inhibitor	20 U
DEPC 水	补齐至 50 $\mu\text{L}$

1.8 混合液于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。加入 2.5  $\mu\text{L}$  0.5M EDTA，混匀，于 80  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 min，移至新管。用 DEPC 水定容至 100  $\mu\text{L}$ （试剂盒说明书下载地址如下：<https://www.takarabiomed.com.cn/Download/2270A.pdf>）。

1.9 以 RNA 提取物为模板，对细菌 16S rRNA 进行 PCR 扩增，通过琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 中 DNA 是否去除。

## 2. 总 RNA 纯化

利用 RNeasy MinElute Cleanup kit（Qiagen），按照说明书（<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=0acfc1c7-a1f8-4425-9aaf-b0d98b81bd1f&lang=en>）去除 5S rRNA 和盐，具体操作步骤如下：

2.1 利用 DEPC 水调节获得的 RNA 样品体积至 100  $\mu\text{L}$ ，加入 350  $\mu\text{L}$  RLT 缓冲液，混匀。

2.2 加入 250  $\mu\text{L}$  100%乙醇，移液枪吹打混合均匀。

2.3 将步骤（2）获得样品转移至含有 RNeasy MinElute 柱的 2 mL 离心管中。以  $\geq 8,000 \times g$  速度离心 15 s，丢弃液体。

2.4 将 RNeasy MinElute 柱子放入新的 2 mL 离心管中。添加 500  $\mu\text{L}$  RPE（确保已加入要求体积的乙醇）缓冲液以  $\geq 8,000 \times g$  速度离心 15 s 来洗涤柱膜，丢弃液体。

2.5 在 RNeasy MinElute 柱中加入 500  $\mu\text{L}$  80%乙醇。以  $\geq 8,000 \times g$  离心 2 min。

2.6 将 RNeasy MinElute 柱放入新的 2mL 离心管，以最大的速度离心 5 min，弃液体和收集管。

2.7 将 RNeasy MinElute 柱放入新的 1.5 mL 离心管中。加入 14  $\mu$ L DEPC 水至膜柱中心。以最大转速离心 1 min 来洗脱 RNA（可洗脱两次提高 RNA 量）。

2.8 通过琼脂糖凝胶电泳，评判总 RNA 质量（是否还有第三条条带（5S rRNA）），利用荧光计（Qubit<sup>®</sup>, ThermoFisher, USA）及 Qubit<sup>™</sup> RNA BR Assay 试剂盒测定 RNA 浓度。

### 3. mRNA 富集

mRNA 只占原核细胞总 RNA 的 1-5%，对 mRNA 进行富集可以显著提高转录组覆盖率和图谱的分辨率。本文利用 Ribo-Zero rRNA removal Kit（Illumina），按照说明书（[https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/ribosomal-depletion/ribo-zero/ribo-zero-reference-guide-15066012-02.pdf](https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/ribosomal-depletion/ribo-zero/ribo-zero-reference-guide-15066012-02.pdf)）对 mRNA 进行富集。主要步骤如下：

3.1 清洗磁珠。每个样品取 225  $\mu$ L 磁珠溶液，添加到 1.5 mL 离心管中。利用磁力试管架吸附磁珠直到液体变清（约 1min）。小心移除所有上清液，添加 225  $\mu$ L DEPC 水，涡旋充分清洗磁珠。重新吸附磁珠弃上清。向磁珠中添加 65  $\mu$ L 磁珠缓冲液，涡旋混匀，于室温下放置。

*注：磁珠于 2 °C – 8 °C 温度下保存。在室温条件下使用磁珠。*

3.2 探针与样品 rRNA 杂交。将 1-5  $\mu$ g 总 RNA、8-10  $\mu$ L Ribo-Zero Removal 溶液、4  $\mu$ L Ribo-Zero 反应缓冲液加入到 0.2 mL 离心管中，用 DEPC 水补齐至 40  $\mu$ L。68 °C 孵育 10 min。短暂离心后于室温下孵育 5 min。

*注：探针杂交前，RNA 样品必须经过纯化，无 DNA 污染。*

3.3 移除 rRNA。将获得的 40  $\mu$ L RNA 样品添加含有清洗过的磁珠的离心管中，用移液枪轻轻吹打混匀。涡旋 10 s 后于室温孵育 5 min。然后置于 50 °C 恒温仪孵育 5 min。置于磁力试管架吸附磁珠，直到液体变清（约 1min）。转移 85 - 90  $\mu$ L 富集的 mRNA 上清液移至 1.5 mL 收集管中，冰上放置。

3.4 乙醇沉淀法去除盐分和缓冲液。向获得的 mRNA 上清液中加入 DEPC 水，调节溶液体积为 180  $\mu$ L。依次加入 18  $\mu$ L 3 M 乙酸钠、2  $\mu$ L 糖原（10 mg mL<sup>-1</sup>）

和 600  $\mu\text{L}$  100% 乙醇，涡旋混匀。在  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  至  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 1 h 后  $10,000\times g$ ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下离心 30 min，弃上清。沉淀中加入 200  $\mu\text{L}$  新配制的 70% 乙醇， $10,000\times g$ ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下离心管 5 min，弃上清，重复该步骤。室温下干燥 5 min，加入适量 DEPC 水溶解沉淀。

3.5 检测 mRNA 样品产量和质量。利用荧光计（Qubit<sup>®</sup>，ThermoFisher，USA）定量 mRNA 浓度。使用 Agilent bioanalyzer 2100 仪器和 RNA 6000 Pico Chip 检测 mRNA 质量。

#### 4. 宏转录组文库构建

基于 NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> Directional RNA Library Prep Kit for Illumina（New England Biolabs，USA）试剂盒，按照说明书（<https://international.neb.com/protocols/2015/06/09/protocol-for-use-with-purified-mrna-or-ribosome-depleted-rna-e7420>）进行宏转录组文库构建。主要步骤如下：

4.1 将纯化后的 mRNA 反转录为单链 cDNA。体系为：5  $\mu\text{L}$  mRNA（10-100 ng）、4  $\mu\text{L}$  NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer（5X）和 1  $\mu\text{L}$  Random Primers，体系总体积为 10  $\mu\text{L}$ 。

4.2 根据 RNA 的完整度，在  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  下孵育 7-8 min（RIN 为 2-6）或 15 min（RIN  $> 7$ ）。转移离心管至冰上。

4.3 体系中加入 0.5  $\mu\text{L}$  Murine RNase Inhibitor、5  $\mu\text{L}$  Actinomycin D（ $0.1\text{ }\mu\text{g}\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ ）、1  $\mu\text{L}$  ProtoScript II Reverse Transcriptase、3.5  $\mu\text{L}$  DEPC 水，使最终体系为 20  $\mu\text{L}$ 。用移液枪轻轻吹打混匀。依次在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 10 min， $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min， $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min。

4.4 合成双链 cDNA。向孵育结束后的离心管中加入 8  $\mu\text{L}$  Second Strand Synthesis Reaction Buffer（10 $\times$ ）、4  $\mu\text{L}$  Second Strand Synthesis Enzyme Mix 和 48  $\mu\text{L}$  DEPC 水，体系最终体积为 80  $\mu\text{L}$ 。反应液用移液枪轻轻吹打混匀，在 PCR 仪上以  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min（热盖温度为  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）。

4.5 纯化双链 cDNA。添加 144  $\mu\text{L}$ （1.8 $\times$ ）AMPure XP Beads 悬浮液至上述体系中，涡旋混匀后于室温孵育 5 min。快速离心，用磁力架吸附磁珠。待溶液澄清后（约 5 min），小心去除上清液。加入 200  $\mu\text{L}$  新配制 80% 乙醇，室温下孵育 30 s 后小心移去上清液，重复该步骤。开盖干燥磁珠 5 min（注：切记不要



过长时间干燥磁珠，以免降低 cDNA 产量)。以上步骤均在磁力架上进行。离心管从磁力架移下，添加 60  $\mu\text{L}$  0.1 $\times$  TE 缓冲液或 10 mM Tris-HCl，涡旋混匀，从而将 cDNA 从磁珠上洗脱。短暂离心后于室温孵育 2 min，置于磁力架上至溶液清晰。转移 55.5  $\mu\text{L}$  含有 cDNA 的上清液至新 PCR 管。

4.6 cDNA 文库制备。向纯化后的双链 cDNA 中 (55.5  $\mu\text{L}$ ) 加入 6.5  $\mu\text{L}$  NEBNext End Repair Reaction Buffer (10 $\times$ ) 和 3  $\mu\text{L}$  NEBNext End Prep Enzyme Mix，体系最终体积为 65  $\mu\text{L}$ 。反应程序为：热盖，75  $^{\circ}\text{C}$ ；20  $^{\circ}\text{C}$ ，30 min；65  $^{\circ}\text{C}$ ，30 min；4  $^{\circ}\text{C}$ ，保持。

4.7 进行接头连接。PCR 管中配置接头连接体系：65  $\mu\text{L}$  上述反应液、15  $\mu\text{L}$  Blunt/TA Ligase Master Mix、1  $\mu\text{L}$  稀释至 1.5  $\mu\text{M}$  的 NEBNext Adapter，最后用 2.5  $\mu\text{L}$  DEPC 水补齐体系至 83.5  $\mu\text{L}$ 。用移液枪吹打混匀，经短暂离心后置于 20  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min。

*注：配置连接体系前，切勿预混以上试剂，以免形成接头二聚体。*

4.8 纯化连接反应。

- 1) 向上述连接液中加入 DEPC 水使其体积为 100  $\mu\text{L}$ ，然后加入 100  $\mu\text{L}$  重悬 AMPure XP Beads，涡旋混匀，于室温下孵育 5 min。
- 2) PCR 管经短暂离心后放于磁力架上，分离磁珠和溶液。待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移除上清，从而去除非目的片段。
- 3) 加入 200  $\mu\text{L}$  新制备的 80%乙醇，放于磁力架，室温孵育 30 s，轻轻移去上清液，重复该步骤。
- 4) 短暂离心后将 PCR 管放于磁力架上，开盖干燥 5 min (切忌干燥时间过长)，完全去除残留乙醇。
- 5) PCR 管从磁力架上移去，添加 52  $\mu\text{L}$  0.1 $\times$  TE 或 10 mM Tris-HCl，涡旋充分混匀，将 cDNA 从磁珠上洗脱，室温孵育 2 min。
- 6) 重新放置 PCR 管于磁力架直至溶液澄清。转移 50  $\mu\text{L}$  上清液至新 PCR 管，加入 50  $\mu\text{L}$  (1.0 $\times$ ) 重悬 AMPure XP Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。
- 7) 重复步骤 2) - 步骤 4)。

8) PCR 管从磁力架上移除, 添加 19  $\mu\text{L}$  0.1 $\times$  TE 或 10 mM Tris-HCl, 涡旋充分混匀, 室温孵育 2 min。重新放置 PCR 管于磁力架直至溶液澄清。

9) 轻轻转移 17  $\mu\text{L}$  上清液至新 PCR 管进行 PCR 扩增富集, 注意勿扰动磁珠。

#### 4.9 PCR 扩增富集接头连接 DNA。

1) 向步骤 4.8 获得 cDNA (17  $\mu\text{L}$ ) 中加入 3  $\mu\text{L}$  NEBNext USER Enzyme、25  $\mu\text{L}$  NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix、2.5  $\mu\text{L}$  Index (X) Primer 和 2.5  $\mu\text{L}$  Universal PCR Primer, 体系最终体积为 50  $\mu\text{L}$ 。

2) PCR 反应程序如下:

37  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min; 98  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s 和 65  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 循环 12-15 次; 65  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ , 保持。

#### 4.10 利用 Agencourt AMPure XP Beads 纯化 PCR 反应。

1) 向步骤 4.9 中获得的反应液中加入 45  $\mu\text{L}$  重悬 AMPure XP Beads, 涡旋混匀, 于室温下孵育 5 min。

2) PCR 管经短暂离心后放于磁力架上, 分离磁珠和液体, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心移除上清。

3) 加入 200  $\mu\text{L}$  新制备的 80%乙醇, 于磁力架上室温孵育 30 s, 轻轻移去上清液, 重复该步骤。

4) 短暂离心后将 PCR 管放于磁力架上, 开盖干燥 5 min, 完全去除残留乙醇。

5) PCR 管从磁力架上移去, 加入 23  $\mu\text{L}$  0.1 $\times$  TE。涡旋充分混匀, 将 cDNA 从磁珠上洗脱, 短暂离心后室温孵育 2 min。重新放置 PCR 管于磁力架直至溶液澄清。

6) 转移 20  $\mu\text{L}$  上清液至新的 PCR 管, 储存于 -20  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 4.11 文库质量评估。用 10 mM Tris 或 0.1 $\times$ TE 稀释 2-3 $\mu\text{L}$ cDNA。利用 Agilent bioanalyzer 2100 检测 cDNA 电泳分布。

## 结果与分析



## 1. RNA 质量评价- 基于 bioanalyzer 电泳图

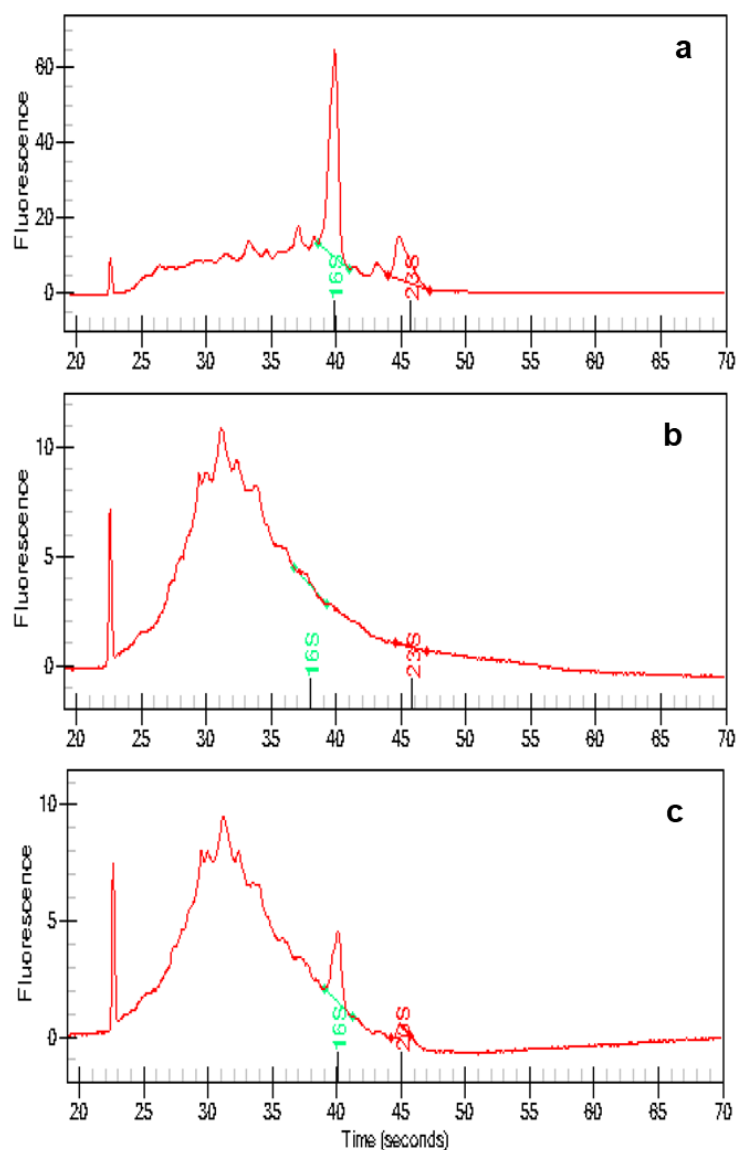


图 1. 水稻总 RNA (a) 和富集 mRNA (b 和 c) 电泳图 (Peng et al., 2017)。

图 1 为 bioanalyzer 分析原核生物 mRNA 富集前后电泳图对比，可以清晰地看到不同样品中 mRNA 富集程度差异（即 16S rRNA 和 23S rRNA 去除程度）。b 图样品中 16S rRNA 和 23S rRNA 去除程度高，mRNA 富集程度好，适合进行下游反转录和宏转录组文库构建，而 c 图样品中 16S rRNA 和 23S rRNA 残留程度相对较高，mRNA 富集程度较差。

## 2. cDNA 质量评价标准——电泳图

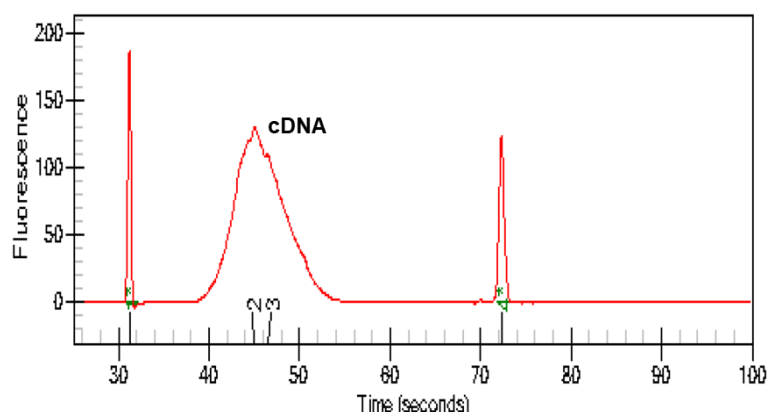


图 2. cDNA 电泳图 (Peng 等, 2018)

图 2 为 bioanalyzer 原核生物 cDNA 典型电泳图。左侧峰为 50 bp 内标物，中间峰为 cDNA，而右侧峰为 1700 bp 内标物。由图可知，该样品中 cDNA 峰较为明显且峰面积大，无拖尾峰、前沿峰、包裹峰及其他的杂乱峰，说明文库质量较高，可满足文库构建和下一步宏转录测序的需要。

## 溶液配方

1. TBM 缓冲液 (pH 7.0): 50 mM Tris-HCl, 1.7% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone 和 20 mM MgCl<sub>2</sub>。
2. PBL 缓冲液 (pH 7.0): 5 mM Tris-HCl, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1% (wt/vol) 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 6% (vol/vol) 苯酚溶液。

## 致谢

感谢国家自然科学基金 (41977038, 42007032) 对本研究的资助。使用本实验方案已发表的文章有: Peng, J., Wegner, C.E., Liesack, W. (2017). Short-term exposure of paddy soil microbial communities to salt stress triggers different transcriptional responses of key taxonomic groups. *Front Microbiol* 8: 400; Peng, J., Wegner, C.E., Bei, Q., Liu, P., Liesack, W. (2018). Metatranscriptomics reveals a differential temperature effect on the structural and functional organization of the anaerobic food web in rice field soil. *Microbiome* 6:169。

## 参考文献

- 264 1. Ma, K., Conrad, R., Lu, Y. 2012. [Responses of Methanogen mcrA Genes and their](#)  
265 [transcripts to an alternate dry/wet cycle of paddy field soil.](#) *Appl Environ Microbiol*  
266 78: 445-454.
- 267 2. Mettel, C., Kim, Y., Shrestha, P. M., Liesack, W. (2010). [Extraction of mRNA from](#)  
268 [soil.](#) *Appl Environ Microbiol* 76: 5995-6000.
- 269 3. Peng, J., Wegner, C.E., Bei, Q., Liu, P., Liesack, W. (2018). [Metatranscriptomics](#)  
270 [reveals a differential temperature effect on the structural and functional](#)  
271 [organization of the anaerobic food web in rice field soil.](#) *Microbiome* 6:169.
- 272 4. Peng, J., Wegner, C. E., Liesack, W. (2017). [Short-term exposure of paddy soil](#)  
273 [microbial communities to salt stress triggers different transcriptional responses of](#)  
274 [key taxonomic groups.](#) *Front Microbiol* 8: 400.
- 275