

利用土壤宏基因组技术定向筛选抗生素产生菌的方法学建立

栗若兰 郑智慧* 路新华 张华 蒋沁

(华北制药集团新药研究开发中心 微生物药物国家研究工程中心 河北 石家庄 050015)

摘要: 为了快速从土壤中定向筛选抗生素产生菌, 本研究利用宏基因组技术进行了土壤中抗生素产生菌快速筛选方法的探索。对 6 种不同土质的土壤利用液氮冷冻法提取土壤基因组 DNA 并用 PVPP 柱层析法进行纯化, 每克湿土可得到 32.25–61.25 μg DNA, 片段大小为 23 kb 左右, 说明宏基因组 DNA 样品完整, 16S rDNA 的 PCR 结果证明了该基因组 DNA 纯度可用于后期的分子操作。利用 Herbimycin 产生菌掺入法进行了抗生素产生菌筛选方法学的验证。结果证明, 每克湿土掺入 10^3 个 Herbimycin 产生菌时, 利用 Herbimycin 合成基因簇的特定引物即可从所提取的土壤基因组 DNA 中扩增出目标条带, 并且可以利用传统菌种分离方法从土壤中重新分离出来被掺入到土壤的 Herbimycin 产生菌。这些结果证明本研究建立的定向抗生素产生菌筛选方法, 具有快捷、灵敏的特点, 大大减少传统筛选方法的工作强度和时间的, 为微生物新药的研发建立一种全新的研究方法。

关键词: 土壤宏基因组, DNA 提取, DNA 纯化, 基因筛选

A method of screening for antibiotic microorganism producing strains from soil by metagenomics

LI Ruo-Lan ZHENG Zhi-Hui* LU Xin-Hua ZHANG Hua JIANG Qin

(New Drug Research and Development Center of North China Pharmaceutical Corporation, National Microbial Medicine Engineering Research Center, Shijiazhuang, Hebei 050015, China)

Abstract: A new method was developed to screen for antibiotic microorganism producing strains from soil using metagenomics. Six different environmental soils metagenomics DNA were extracted with liquid nitrogen freezing method and purified by polyvinylpyrrolidone (PVPP) column chromatography. Soil DNA of 32.25–61.25 μg with DNA length about 23.1 kb can be extracted from 1 g sample. 16S rDNA can be amplified from the purified soil DNA which proved that the extracted soil DNA is

基金项目: 国家科技重大新药创制专项(No. 2010ZX09401-403); 国家科技重大新药创制专项(No. 2008ZX 09401-05); 国家科技重大新药创制专项(No. 2009ZX9302-004)

* 通讯作者: Tel: 86-311-85992995; ✉: z_zhihui2003@yahoo.com.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
收稿日期: 2010-12-02; 接受日期: 2011-03-29

suitable for following experiments. In addition, the sensitivity and feasibility of this screening method is evaluated by addition of Herbimycin producing strain into a negative soil. The result showed that when the soil contains 10³ CFU/g of Herbimycin producing strain, the Herbimycin biosynthesis gene can be detected by PCR and the incorporated known strains can also be isolated. These results suggest that soil metagenomics can be applied for screening certain antibiotic microorganism producing strains which is sensitive and rapid, and is more efficient than the traditional methods.

Keywords: Soil metagenomics, DNA extraction, DNA purification, Gene screening

宏基因组 (Metagenomics) 又称环境基因组 (Environmental genomics)、群体基因组 (Community genomics), 是利用现代基因组技术直接研究自然状态环境中的微生物群落, 绕过纯培养对环境微生物进行遗传学和功能学的研究^[1]。目前, 宏基因组学在土壤微生物研究中的应用主要包括两方面^[2-3], 土壤微生物生态学方面的研究以及土壤微生物基因资源的开发。利用分子生物学技术, 从土壤环境样品中直接提取微生物基因组 DNA, 再结合不同的筛选技术, 可从中筛选生物活性物质产生菌。

微生物药物合成菌的定向筛选是指从众多的微生物菌种中筛选特定次生代谢产物产生菌的筛选方法。该方法目前多采用传统的药物筛选策略, 从产生菌的种类、形态特征并结合目标化合物的活性进行筛选。已有的研究证实微生物次级代谢产物生物合成基因具有呈簇排列的特征, 即与特定产物合成相关的结构基因、调节基因、耐药性基因和转运蛋白等集中位于染色体的一段连续区域^[4]。经过科学家的努力, 大量各类抗生素合成基因簇也得到了深入的研究, 如聚酮类化合物的聚酮类化合物合成酶 (PKS) 生物合成基因簇^[5], 井冈霉素生物合成基因簇^[6], 南昌霉素生物合成基因簇^[6]等等。这为微生物次级代谢产物药物的研究打下了坚实的基础。

本研究结合土壤宏基因组技术和抗生素生物合成基因簇的研究结果, 建立了一种快速从土壤环境中筛选特定类型抗生素合成菌的现代分子生物学筛选方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样: 采自全国各地不同生境的土壤样品,

未经预处理, 保藏于 4℃, 取 6 份颜色、土质、取样地点差别明显的土样, 见表 1。

1.1.2 菌株: 本实验室保存 Herbimycin 产生菌 (*Streptomyces hyg-rosopicus*, N02Z507)。

1.1.3 其他材料: Tris-HCl、EDTA、NaCl、SDS、Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、乙醇均为国产分析纯; 聚乙烯聚吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone, PVPP), Sigma; *Taq* DNA 聚合酶, TaKaRa; 引物合成自英骏公司。

表 1 不同土样差别 Table 1 The differences of six soil samples			
	取样地点 Sampling spot	土质 Soil texture	颜色 Colour
土样 1 Soil sample 1	厦门乐土亚热带雨林	粘	红
土样 2 Soil sample 2	丽江老君山	较粘	棕红
土样 3 Soil sample 3	湖南张家界	较粘	棕黄
土样 4 Soil sample 4	北京松山	松软	褐
土样 5 Soil sample 5	西藏八宿, 江达	松软	黑
土样 6 Soil sample 6	贵州药用植物园	松软	棕褐

1.2 方法

1.2.1 土壤 DNA 提取方法^[7-8](液氮冷冻法): 0.5 g 土样中加入 400 μL TE, 液氮中冷冻, 37℃融化, 循环 4 次; 加入 400 μL 2×TENS (100 mmol/L Tris, pH 8.0; 40 mmol/L EDTA; 200 mmol/L NaCl; 10% SDS), 涡旋; 加入 800 μL 酚氯仿, 涡旋; 12 000×g 离心 3 min, 得到 DNA 粗提液。

1.2.2 DNA 纯化方法(PVPP 柱层析法^[9]): 1 mL 注射器底部垫玻璃棉, 注入 1 mL 10% PVPP, 1 000 g 离心 2 min, 制成纯化柱。取 50–100 μL DNA 粗提

液上柱, 700×g 离心 2 min, 1 000×g 离心 2 min, 等体积酚氯仿异戊醇(25:24:1, *V/V/V*)抽提 1 次, 氯仿抽提 1 次, 异丙醇沉淀, 70%乙醇清洗, DNA 干燥后溶于 50–100 μL TE。纯化后的 DNA 用 Hoechst33258 检测 DNA 含量^[10]。

1.2.3 PCR 检验纯化后的土壤 DNA 质量: PCR 引物为原核 16S rDNA 通用引物(扩增片段为 16S rDNA 中 290 bp 的片段), 正向引物为 5'-AACGCGAAG AACCTTAC-3', 反向引物为 5'-TGTACCGGCCA TTGTAG-3'。反应体系(25 μL): 1 μL 纯化后的模板, 0.2 μmol/L 引物, 1×PCR buffer (含 1.5 mmol/L MgCl₂), 200 μmol/L dNTPs, 1.2 U *Taq* DNA 聚合酶, 30 μL 矿物油。

PCR 循环条件: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.4 提取土壤中接种的目标菌株 DNA 检验方法的灵敏度: 验证菌株的掺入^[11–12]: 本实验室保存 *Herbimycin* 产生菌经 HPLC 检验其产物中含 *Herbimycin*。将菌株培养至 *OD* 值为 0.8 时(菌数 1.5×10^6 个/mL), 离心收集菌体, 无菌水清洗 1 次, 悬浮于等体积无菌水中, 将菌悬液做 10 倍梯度稀释, 取 1 mL、0.1 mL 及 10^{-2} – 10^{-4} 稀释度分别掺入 1 g 经验证不含该菌的土壤样品中(每个梯度 3 个平行), 土样涡旋混合 30 s, 室温放置 30 min, 使菌体与土壤结合, 取 1 g 未掺入菌液的土壤作为阴性对照, 以上土壤样品用液氮冷冻法提取 DNA, PVPP 柱层析法纯化。并将不同稀释度的菌液涂布平板计数(每个梯度 3 个平行)。

PCR 扩增: *HbmN* 基因是 *Herbimycin* 产生菌的产物代谢途径中一段基因簇^[5], PCR 引物设计取其中一段 543 bp 的基因片段。正向引物为 5'-GAGCG GCGTACGGAACCTCGGC-3', 反向引物为 5'-CAGG GTGAGGAACCGCTGCTCCC-3'。反应体系(50 μL): 1 μL 纯化后的模板, 0.2 μmol/L 引物, 1×PCR buffer (含 1.5 mmol/L MgCl₂), 200 mmol/L dNTPs, 10% DMSO, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶。

PCR 循环条件: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 12 个循环, 每个循环退火温度降低 0.5 °C; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min,

18 个循环; 72 °C 10 min。

掺入不同稀释度菌液的土样加无菌水, 涂布平板, 倒置培养。挑取不同形态的菌落, 放大培养(培养基: 4.7%葡萄糖, 0.38%日本蛋白胨, 0.1%酵母粉, 0.38%牛肉膏, pH 7.0), 28 °C 培养 7 d 后, 微波炉法提取 DNA^[13]作为模板, PCR 检验是否能扩增出 *HbmN* 基因的目标条带。以验证所挑取的菌是否是所掺入的 *Herbimycin* 产生菌。

2 结果

2.1 土壤 DNA 的提取

为了确定高效的土壤宏基因组的提取方法, 本研究经过多种方法^[14]的比较后采用液氮冷冻法从 6 份土质差异较大的土壤样品中均可提取出 DNA, DNA 片段在 23 kb 左右, 如图 1 所示。实验步骤简单、易于操作, 无需特殊仪器。

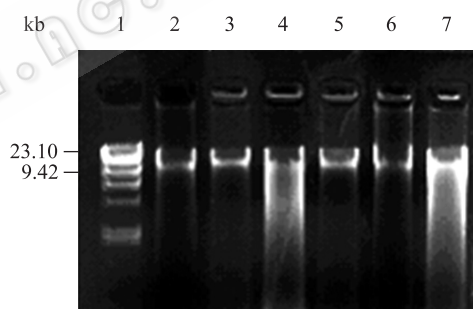


图 1 液氮冷冻法提取 6 份土壤宏基因组

Fig. 1 Electrophoretic analysis for soil metagenomics from 6 different environmental soils extracted by liquid nitrogen refrigeration method

注: 1: DNA 分子量标准(λ DNA/*Hind* III); 2–7: 土壤宏基因组。

Note: 1: λ DNA/*Hind* III marker; 2–7: Soil metagenomics.

2.2 土壤 DNA 粗提液的纯化

由于土壤中所含的金属离子、腐殖酸等杂质较多, 成份复杂, 并且 DNA 浓度通常不很高, 土壤 DNA 粗提液必须进一步纯化才能用于后续的 PCR 等操作。纯化直接决定了后续实验的成败, 因此选择效率高、损失少的纯化方法是非常必要的。DNA 粗提液经 PVPP 柱层析纯化后, 变为无色、透明、澄清的 DNA 溶液。PVPP 柱层析的纯化电泳结果如图 2 所示, 回收后 DNA 片段在 23 kb 左右, 每克湿土可得到 32.25–61.25 μg DNA。

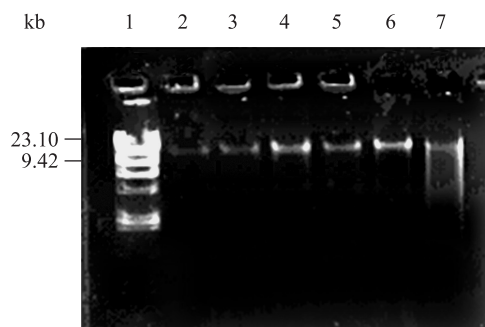


图2 PVPP 柱层析法纯 6 份土壤宏基因组

Fig. 2 Electrophoretic analysis for soil metagenomics purified by PVPP column chromatography

注: 1: DNA 分子量标准(λ DNA/*Hind* III); 2-7: 纯化的土壤宏基因组。

Note: 1: λ DNA/*Hind* III marker; 2-7: Purified soil metagenomics.

2.3 PCR 检测土壤 DNA 纯度

土壤 DNA 样品中的腐殖酸、金属离子、SDS、酚等杂质均会抑制 *Taq* 酶的活性, 从而影响后续的基因操作。因此, PCR 验证已经成为对土壤 DNA 质量的一种检验手段。本研究以原核 16S rDNA 通用引物对经过液氮冷冻法提取、PVPP 柱层析法纯化的 DNA 进行 PCR 验证, 扩增的产物取 5 μ L 进行电泳分析, 结果如图 3 所示。以 6 份纯化后的土壤 DNA 为模板, PCR 均可扩增出 290 bp 大小的目标片段, 说明 DNA 质量可用于 PCR 等操作。

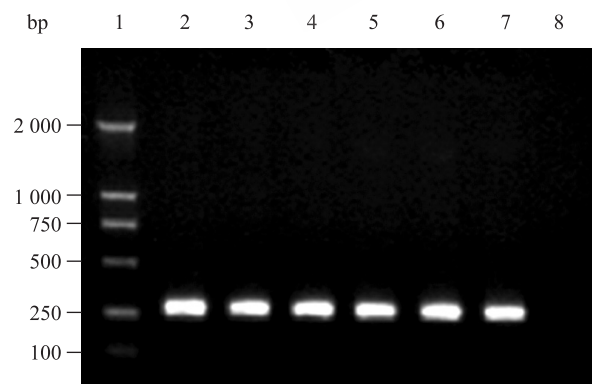


图3 以 16S 原核通用引物扩增的 PCR 对土壤宏基因组纯度的验证

Fig. 3 PCR amplification of 16S rDNA from purified soil metagenomics

注: 1: DNA 分子量标准(DL2000); 2-7: PCR 产物; 8: 阴性对照。
Note: 1: DL2000 marker; 2-7: PCR production; 8: Negative control.

2.4 提取土壤中接种的目标菌株 DNA 检验方法的灵敏度

为了进一步验证方法的灵敏性和可行性, 本研究进行已知菌的掺入验证实验, 将 10^2 - 10^5 个 *Herbimycin* 产生菌分别掺入 1 g 经验证不含有该菌的土样中, 经液氮冷冻法提取, PVPP 柱层析纯化基因组 DNA, 并利用 *Herbimycin* 合成基因簇的引物进行 *HbmN* 基因片段的 PCR 扩增检验本筛选方法的灵敏度和可行性。从电泳结果(图 4)可以看出本方法可以从每克掺入 10^3 以上个菌的土样所提取的 DNA 中扩增出目标条带。

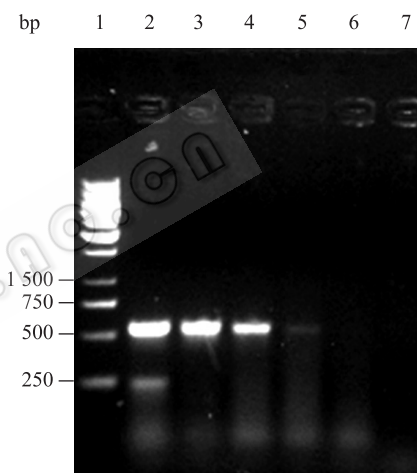


图4 掺入梯度稀释菌液土样提取 DNA 为模板的 PCR 产物

Fig. 4 PCR amplification of *hbmN* from soil metagenomics

注: 1: DNA 分子量标准(Gene ruler 1 kb DNA ladder); 2: 阳性对照; 3: 每克土壤掺入 10^5 个 *Herbimycin* 产生菌; 4: 每克土壤掺入 10^4 个 *Herbimycin* 产生菌; 5: 每克土壤掺入 10^3 个 *Herbimycin* 产生菌; 6: 阴性对照。

Note: 1: Gene ruler 1 kb DNA ladder marker; 2: Positive control; 3: 10^5 CFU/g soil of *Herbimycin* producing strain; 4: 10^4 CFU/g soil of *Herbimycin* producing strain; 5: 10^3 CFU/g soil of *Herbimycin* producing strain; 6: Negative control.

掺入 *Herbimycin* 产生菌 10^3 菌/克土壤的土样涂布平板的结果和 PCR 检验的结果如图 5、图 6 所示。从平板中分别挑取不同形态的单菌落, 放大培养后微波炉法提取 DNA 为模板, 做 PCR 扩增 *HbmN* 基因片段, 1-8 号单菌落分别对应第 1-8 泳道。1、6、7 泳道扩增出了目标条带, 结果为阳性, 其余显示阴性结果。表明 1、6、7 号菌落为掺入土壤中的

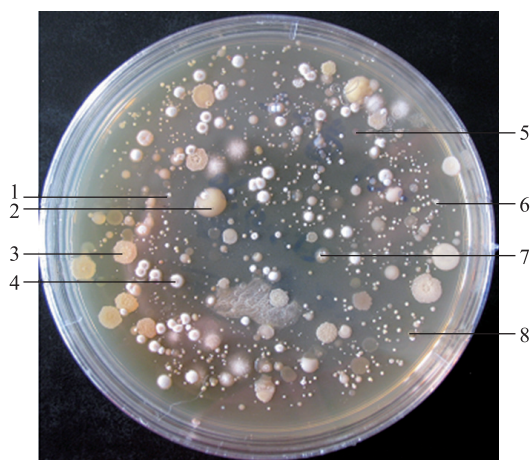


图5 掺入菌株的土壤稀释涂布平板

Fig. 5 Spread plate of soil incorporated Herbimycin producing strain

注: 1-8: 挑取的 1-8# 菌落.

Note: 1-8: 1-8# colony.

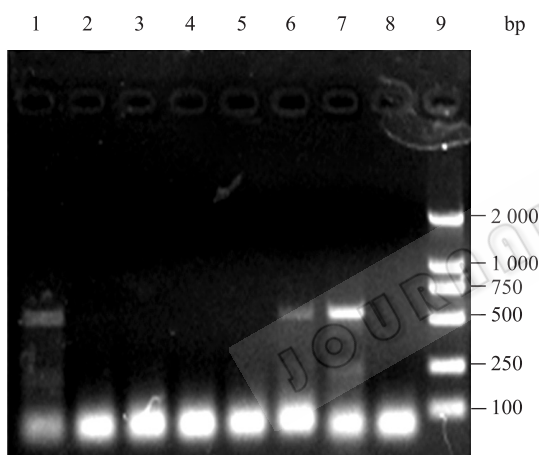


图6 挑取菌落为模板 PCR 扩增结果

Fig. 6 PCR amplification production of colony DNA

注: 1-8: 菌落 1-8# 的 PCR 产物; 9: DNA 分子量标准(DL2000).

Note: 1-8: PCR production of colony 1-8#; 9: DL2000 marker.

Herbimycin 产生菌, 并且该菌可以被重新分离纯化出来。该掺入法模拟了整个的筛选过程, 从而充分证明了从土壤中筛选新抗产生菌的方法的可行性。

3 讨论

土壤中生活着丰富的微生物类群, 是一个天然的微生物资源宝库。众所周知微生物由于种类繁多, 次生代谢产物多样, 物种可塑性强等特点, 成为了世界范围内开展新药研究取之不尽的最主要的资源

宝库, 从微生物次级代谢产物中寻找药物一直是药物发现的热点之一。传统的微生物药物筛选方法必须经过从环境中分离培养微生物, 并对纯培养进行发酵以获得特定生理条件下的次级代谢产物, 最后对产物中的活性成分进行分离、纯化和结构确认。

土壤微生物基因组目前主要用于遗传指纹图谱技术对环境群落的分析和宏基因组文库的构建与应用两方面^[15]。本研究对土壤宏基因组的研究进行了方法学的研究和探讨, 建立了一种快速的特定抗生素产生菌的筛选方法。该方法与传统的筛选方法相比, 不必大量地从所有土壤样品中进行早期的菌种分离, 并对所分离到的每一株菌进行筛选, 减少了盲目性, 更加直接、快捷, 大大减少了工作量, 节约成本。适于快速、大量从土壤中筛选新抗产生菌。而且可以推广到用于土壤微生物产生各类抗生素的潜在性的快速评价。

从土壤中提取和纯化微生物的总 DNA 是关键性的第一步, 因为 DNA 的片段大小和纯度直接决定了后续基因操作能否顺利进行。本实验提取土壤宏基因组选择了反复冻融与酚结合的方法, 保证了较好的提取效率。并且提取的 DNA 质量较高, 很少降解, DNA 片段可达 23 kb 左右, 这些均可确保后续实验的进行。DNA 中的杂质会严重影响后期的分子操作, 因此纯化 DNA 也是非常重要的。本实验采取的 PVPP 柱层析法对土壤 DNA 粗提物进行纯化, 方法简便、快速, 纯化效果较好, 可进行 PCR 扩增等分子操作。

方法的验证可以保证一种新建方法的灵敏度和可行性。本实验采取了掺入特定已知菌株的方法对该筛选方法进行了验证, 结果显示该方法的检测限度可达到 10^3 个菌/克土样, 方法较为灵敏。而且在该灵敏度下掺入土壤中的产生菌可以被重新分离出来。该方法模拟了整个筛选流程, 证明了本方法的可行性。

为了加快从微生物中发现有价值的抗生素产生菌, 本研究建立了一种与传统方法不同的, 直接从土壤中提取、纯化微生物 DNA 进行 PCR 扩增特定基因的快速筛选抗生素产生菌的方法。利用模拟整

个筛选流程的实验成功模拟了从提取、纯化、PCR 检测到分离纯化目标菌株并用特异引物 PCR 验证的全过程,验证了筛选方法的可行性。

在将来的实际筛选中,可以针对筛选抗生药的不同,根据微生物抗生药合成基因簇设计不同引物进行 PCR 扩增,从而快速定向筛选土壤中某抗生药产生菌。并从阳性土样中分离纯化该产生菌并进行培养,通过对该菌代谢产物进行高效液相色谱分析从而最终确认特定抗生药产生菌。

参 考 文 献

- [1] 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]. Chem Biol, 1998, 5(10): 245-249.
- [2] 贺纪正, 张丽梅, 沈菊培, 等. 宏基因组学 (Metagenomics) 的研究现状和发展趋势[J]. 环境科学学报, 2008, 28(2): 209-218.
- [3] 李丽娟, 张殿昌, 龚世园. 宏基因组技术在开发未培养微生物资源中的应用[J]. 水利渔业, 2007, 27(3): 7-9.
- [4] Chater KF. The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces*[J]. Nature Biotechnology, 1990, 8(2): 115-121.
- [5] Rascher A, Hu ZH, Buchanan GO, et al. Insights into the biosynthesis of the benzoquinone ansamycins geldanamycin and herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4862-4871.
- [6] 白林泉, 邓子新. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇与药物创新[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(2): 80-86.
- [7] Volossiouk T, Robb EJ, Nazar RN. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(11): 3972-3976.
- [8] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 316-322.
- [9] Berthelet M, Whyte LG, Greer CW. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns[J]. Microbiology Letters, 1996, 138(1): 17-22.
- [10] Cullen DW, Hirsch PR. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR[J]. Soil Biol Biochem, 1998, 30(8/9): 983-993.
- [11] 张福瑞, 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.
- [12] 徐平, 李文均, 张永光, 等. 产生大环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(6): 321-324.
- [13] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波炉法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 3(4): 82-84.
- [14] 栗若兰, 郑智慧, 张华, 等. 从土壤中快速提取纯化 DNA 方法的建立[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2008, 32(1): 98-100.
- [15] 叶姜瑜, 罗固源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5): 111-115.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。