

宏基因组技术在开拓天然产物新资源中的应用*

许晓妍¹ 崔承彬^{1,2} ** 朱天骄¹ 顾谦群¹ 刘红兵¹

(海洋药物教育部重点实验室中国海洋大学海洋药物研究所 青岛 266003)¹

(军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)²

摘要: 微生物代谢产物具有巨大的化学多样性, 是多种抗生素和其它药物的重要来源。由于现有培养手段的局限性, 可培养的微生物不到微生物总数的 1%, 使绝大部分微生物资源的开发利用受到制约。近年来, 直接提取环境样品中混合微生物总基因组 DNA, 利用可培养的宿主细菌构建宏基因组文库, 通过筛选目的克隆, 寻找活性代谢产物, 取得瞩目进展。对这一新领域的研究进展结合我们的研究概况进行了简要综述。

关键词: 非可培养微生物, 宏基因组, 微生物天然产物, 活性代谢产物, 基因工程

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0108-05

Using Metagenome to Explore Natural Products from Environmental Microbiology *

XU Xiao-Yan¹ CUI Cheng-Bin^{1,2} ** ZHU Tian-Jiao¹ GU Qian-Qun¹ LIU Hong-Bing¹

(Key Laboratory of Marine Drugs of Ministry of Education, Marine Drug and Food Institute, Ocean University of China, Qingdao 266003)¹

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, AMMS, Beijing 100850)²

Abstract: Secondary metabolites of the culturable microorganisms in nature have been becoming a most important source of some medicinal products and also have been being a very important resource for the screening of new bioactive compounds for medicinal usage. It has been known, however, that only less than 1% of total microorganisms in nature are culturable by traditional pure culture technique, yet the absolute majority of microbes in nature have not been studied and utilized. In the past few years, novel strategic and new technical studies have achieved rapid progress on accessing, exploring and exploiting the gene resource of non-culturable microorganisms in the environment by the use of metagenomic eDNA libraries. Without cultivation, metagenomic library construction provided a powerful tool for exploring and accessing the genetic information and functional diversity of non-culturable microorganisms in the environment, which is also useful, through facilitating the cloning and expressing of the aimed foreign DNA in the culturable host microbes, to obtain bioactive metabolites encoded by the gene (s) of uncultured microbes. In this paper, we review the novel strategy and the latest advances, together with a brief introduction of our research, in this research field.

Key words: Nonculturable microorganism, Metagenome, Microbial natural products, Bioactive metabolites, Genetic engineering

1 用传统培养方法研究环境微生物中活性物质的局限性

自从 Fleming 发现微生物产生青霉素以来, 微生物成为生物活性物质的一个重要来源, 为天然产物化学提供了丰富资源。过去几十年, 人们在研究和开发微生物活性产物

* 国家自然科学基金 (No. 39825126 和 30171102), 国家高技术发展计划 863 项目 (No. 2001AA628020), 国家高技术发展计划 863 青年基金项目 (No. 2002AA628130), 山东省自然科学基金重点项目 (No. Z2001C01), 山东省科技攻关计划项目 (No. 0121100107), 国家教育部长江学者奖励计划基金资助项目

** 联系人 Tel: 0532-2032065, E-mail: cuicb@sohu.com.cn

收稿日期: 2004-03-25, 修回日期: 2004-07-11

上倾注了极大的精力和热情,获得了众多的活性物质,其中有些已开发成药物,如四环素、红霉素、头孢霉素等。随着微生物活性产物的广泛研究和深入开发利用,从可培养微生物中筛选到新活性物质的几率逐步下降^[1,2],其原因是可培养微生物往往被重复培养和筛选。因此,如何开拓微生物的新资源成为微生物天然产物研究的重要课题。

研究表明,一般环境中可培养的微生物所占比例仅为微生物总数的 1% ~ 10%, 多达 90% ~ 99% 的微生物采用传统的方法无法分离培养。这部分称作未培养 (uncultured) 或叫非可培养 (non-culturable) 的微生物才是环境微生物的主体^[3,4], 是一个极具利用潜力的巨大种群,其可能富于无限多样的次生代谢产物是生物学家和化学家开拓新资源的目标。显然,传统的分离培养方法无能为力,只能采用一种不分离培养的新方法来尝试研究和开发其次级代谢产物^[5]。现代基因工程领域日新月异的多学科综合进展恰恰为此提供了新的技术手段、机遇和研究的可能性。本文对这一崭新领域的最近研究进展结合我们的研究情况进行简要综述。

2 环境微生物总基因组 DNA 的直接提取表达

宏基因组 (metagenome) 最初用来定义土壤总体细菌的混合总基因组。1998 年以来,国际上开始了一项旨在用新技术揭示土壤细菌宏基因组特点并用于发现新药物的研究计划。其依据是,由于目前为止所发现的抗生素的生物合成基因都是成簇排列的,因此有可能克隆到完整的次级代谢产物合成基因簇,使其在异源宿主中表达;其方法是,避开土壤微生物的分离培养,首先从土壤环境样品中直接提取分离大片段的混合微生物总基因组 DNA,再通过采用可培养的微生物宿主构建宏基因组文库,不依赖分离培养而直接表达。文库中的活性克隆可依据宿主细菌获得的抗生素耐性等新功能进行筛选,也可采用已知的探针分离目的基因片段,加上表达调控元件后使目的基因表达,从而获得新产物^[2]。该研究策略克服了多数土壤微生物无法分离培养的难题。开始时有关研究主要集中于探索微生物的基因及其功能多样性上,着重通过 16S rRNA 基因序列的系统进化研究,使环境微生物的多样性分析趋于完整客观^[5]。Goodman 和 Handelsman 等人^[6]采用这种方法,通过利用可插入大片段 DNA 的细菌人工染色体载体 (BAC vector),构建了插入平均片段分别为 27.0、44.5、98.0 kb 等大小不同的不同土壤细菌宏基因组文库。该文库 16S rRNA 基因序列的系统发生学分析结果表明,文库中的 DNA 包含来源于不同分类学门的许多新微生物,提示微生物的极广泛的多样性,同时,外源基因的显形相关活性筛选 (抗生素抗性,生产黄色素,抗细菌活性,脂肪酶、淀粉酶、核酸酶、卵磷脂酶活性及溶血活性等) 结果表明,部分克隆的确能够从插入子中表达外源基因,表明 BAC 载体可用于维修、表达和分析环境微生物来源的 DNA^[7]。

这些研究结果表明,采用直接从环境微生物总基因组 DNA 着手,开发利用未培养或非可培养微生物,从方法学的研究策略到实验技术上都是基本可行的。

3 研究现状

2000 年 8 月,Brady 和 Clardy 等人^[8]构建了一个含有约 700,000 个重组子的环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 粘粒文库,筛选出具有抗芽孢杆菌活性的克隆 65 个,并从其中一个克隆 CLS12 发酵物中分离出一系列具有抗菌活性的长链 N-酰基酪氨

酸类新化合物 1-13 (图 1)。长链 N-酰基氨基酸系列化合物是一个正在得到发展的新的细菌天然产物家族, 该研究通过对 eDNA 克隆序列的分析, 首次发现和报道了长链 N-酰基氨基酸的合成基因。

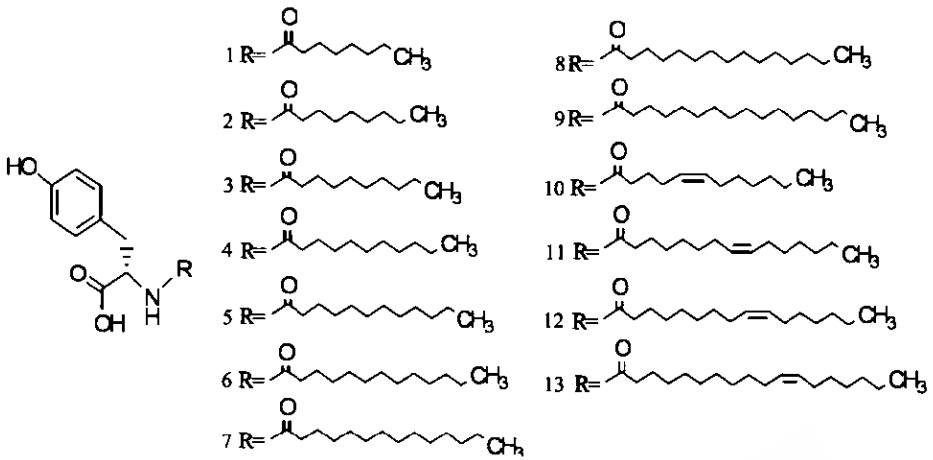


图 1 化合物 1-13 的化学结构式

2001 年 5 月, Brady 和 Chao 等人^[9]构建了土壤 eDNA 粘粒文库, 从中筛选得到生产蓝色色素的一株克隆 CSL51, 并从其发酵产物中分离得到蓝色化合物 Violacein (14) 和 Deoxyviolacein (15) (图 2)。其中, 化合物 14 具有抗菌 (白色假丝酵母, 芽孢杆菌属, 链球菌属) 和诱导成纤维细胞凋亡等生物活性。他们还同时报道了 Violacein (14) 的 eDNA 基因簇全序列 (6.7 kb)。

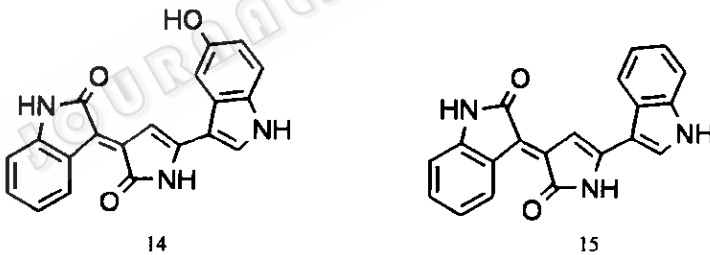


图 2 化合物 14 和 15 的化学结构式

2002 年 5 月, Brady 等人^[10]又得到一株具有抗菌活性的 eDNA 克隆 CSLC-2, 该克隆可代谢生产 3 个系列的长链酰基苯酚类化合物。其中一个系列与 CSL12 克隆生产的长链 N-酰基酪氨酸类化合物^[9] 1-13 (图 1) 相同。而另外两个系列则为新的长链酰基

苯酚类天然产物 16-17 (图 3), 这两个系列长链酰基苯酚类化合物的侧链为 C_{10} 到 C_{18} 不同长度的饱和或不饱和脂肪酸。作者从 CSLC-2 中还同时发现了一个合成基因簇, 该基因簇可以使长链 N-酰基酪氨酸类化合物 (图 1) 转化为另外两个系列的长链酰基苯酚类天然产物 16-17 (图 3)。

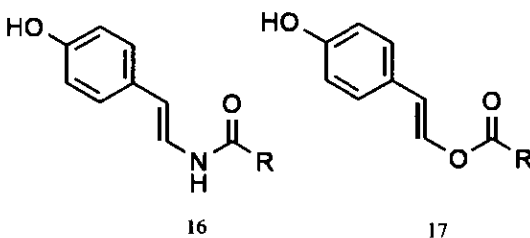


图 3 化合物 16 和 17 的化学结构式

R = $C_{10} \sim C_{18}$ (不同长度的饱和或不饱和脂肪酸链)

2002 年 9 月, Brady 等人^[11]构建了

一个含有 24,546 个重组子的土壤 eDNA 文库,并从中筛选出可生产深褐色色素的 3 个克隆株 P57G4、P89C8 和 P214D2。他们从 P57G4 培养物的上清液中分离得到一个红色色素和一个橙色色素,经结构分析揭示为含有三芳基阳离子的新化合物,分别命名为 Turbomycin A 和 B (18 和 19) (图 4),二者都表现出广谱抗菌活性。

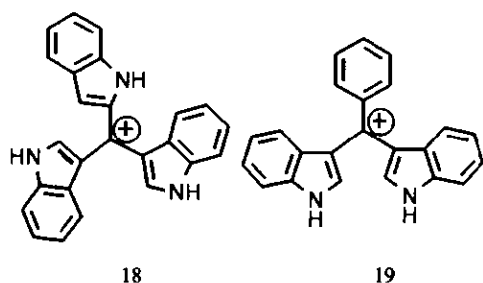


图4 化合物18和19的化学结构式

上述研究大多采用通用宿主大肠杆菌来表

2000年3月, Wang等人^[12]首次以链霉菌为宿主构建了土壤样品宏基因组文库, 并从中分离得到了外源基因的表达产物 Terragigine A-E (20-24) 和 Norcardamine (25) (图5)。其中, Terragigine 类为首次从 eDNA 重组微生物产物中发现的新类型的化合物。

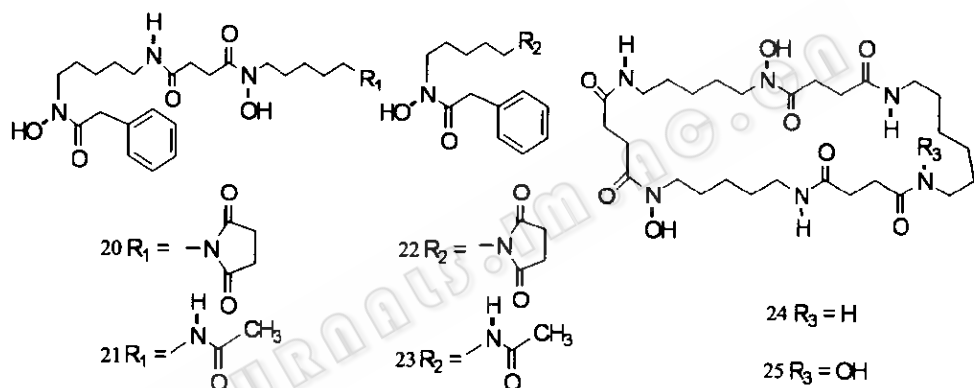


图5 化合物 20-25 的化学结构式

2003年1月, Courtois 等人^[13]构建了土壤 eDNA 的穿梭粘粒载体文库, 得到了 5,000 个克隆, 从中发现了 11 个新的聚酮合酶 I (PKS I) 的基因, 同时采用 HPLC 技术发现了新化合物 26 和 27 (图 6)。他们还用不同宿主做了比较实验, 当用大肠杆菌做宿主时得到一个具有抗卡那霉素活性的克隆 a8E12。该 a8E12 重组粘粒虽然在宿主大肠杆菌中能稳定生产抗卡那霉素活性, 但在链霉菌中则无此活性, 表明采用多种不同的宿主可以提高外源基因表达生产不同活性物质的几率。

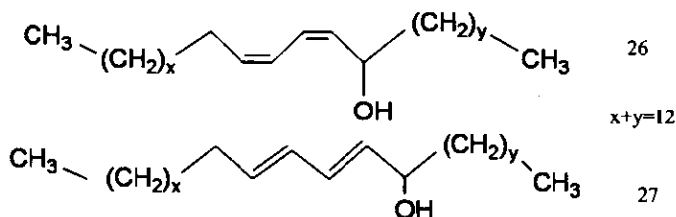


图6 化合物26和27的化学结构式

4 结语与展望

上述研究提示我们, 避开传统经典的微生物的分离培养, 采用直接开发环境微生物功能基因的方法, 能够最大限度地开发利用未培养 (uncultured) 或非可培养 (non-culturable) 微生物的功能基因, 直至获得这些基因表达生产的次级代谢活性产物。该领域的迄今研究结果表明, 自然界中非可培养微生物作为巨大基因库是可以发掘利用的宝贵资源, 通过基因工程手段从中寻找新的活性次级代谢产物是可行的。

由于该项研究刚刚起步, 还有许多技术问题有待解决, 如目前选用的拷贝数高的粘粒, 虽易于操作, 但其插入片断较小, 对生物合成比较复杂的化合物, 因其基因簇较大, 则无法完整克隆^[14,15], 而 BAC 载体虽能容纳 100 kb 以上的大插入片断, 但其拷贝数少, 使外源基因表达量较少。因此, 寻找和开发更合适更高效的表达载体, 是直接影响该技术实用性的一个关键环节。另外, 由于外源基因的表达量少, 使次级代谢产物的含量很低, 因此如何高度灵敏且高效率地筛选活性克隆也是本项技术急待解决的关键问题。

我们研究组近年来也采用相关新技术开展旨在开拓非可培养微生物药用基因新资源的研究。我们从陆地、海洋等环境样品中直接提取混合微生物总基因组 DNA, 构建了一系列 eDNA 文库, 并通过组合应用细胞周期抑制及细胞凋亡诱导等活性筛选模型, 筛选到若干活性克隆, 其活性代谢产物正在研究中。另外, 旨在获取海绵共生微生物基因表达产物的研究也按相同的思路正在开展构建和筛选相应宏基因组文库的工作。采用环境微生物总基因组 DNA 的直接提取新技术, 对海洋中占微生物总数 99% 以上的非可培养微生物的巨大基因资源进行直接开发, 将有可能获得常规方法无法得到的许多新的活性代谢产物, 这无疑是开拓海洋天然产物新资源的很好途径。因此, 开展相关开拓环境微生物天然产物基因资源的新技术方法学研究具有重要的科学意义和应用前景, 将有可能成为相关领域的研究热点。

参考文献

- [1] 程元荣, 郑卫. 中国抗生素杂志, 2002, 27 (10): 632 ~ 640.
- [2] 杨官品, 茅云翔. 青岛海洋大学学报, 2001, 31 (5): 718 ~ 722.
- [3] Torsvik V, øvreås L. Curr Opin Microbio, 2002, 5: 240 ~ 245.
- [4] 梁威, 邱东茹, 熊丽, 等. 生命科学, 2002, 14 (3): 142 ~ 144.
- [5] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Chem Biol, 1998, 5: R245 ~ 249.
- [6] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, et al. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (6): 2541 ~ 2547.
- [7] Rondon M R, Raffel S J, Goodman R M, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 6451 ~ 6455.
- [8] Brady S F, Clardy J. J Am Chem Soc, 2000, 122 (51): 12903 ~ 12904.
- [9] Brady S F, Chao C J, Handelsman J, et al. Org Lett, 2001, 3 (13): 1981 ~ 1984.
- [10] Brady S F, Chao C J, Clardy J. J Am Chem Soc, 2002, 124 (34): 9968 ~ 9969.
- [11] Gillespie D E, Brady S F, Bettermann A D. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (9): 4301 ~ 4306.
- [12] Wang G Y S, Graziani E, Waters B, et al. Org Lett, 2000, 2 (16): 2401 ~ 2404.
- [13] Courtois S, Cappellano C F, Ball M. Appl. Environ Microbiol, 2003, 69 (1): 49 ~ 55.
- [14] 秦学斌, 张军, 钟自力. 中国医学科学院学报, 1996, 18 (5): 333 ~ 337.
- [15] 曹更生, 李宁. 农业生物技术学报, 2000, 8 (2): 169 ~ 172.