

宏基因组学:土壤微生物研究的新策略*

钮旭光** 韩梅 韩晓日

(沈阳农业大学土地与环境学院 沈阳 110161)

摘要 土壤中多数微生物不可培养,这限制了微生物资源的开发利用。宏基因组学方法在开发和利用不可培养微生物资源方面有巨大潜力,可以将其运用到土壤微生物学研究中。对土壤宏基因组 DNA 的提取、宏基因组文库的构建和筛选等方面的研究现状和进展进行了简要综述。

关键词 土壤微生物,宏基因组学,文库

中图分类号:Q939.96 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0576-04

Metagenomics New Strategy for Soil Microbiology Research

NIU Xu-Guang** HAN Mei

(College of Land and Environmental science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract Most of the soil microorganisms are unculturable, which limits the exploitation and application of microbial resources. Metagenomics has great potential in the research of unculturable microorganisms in soil. Progress on the research of metagenomic DNA purification, metagenomic library construction and screening of soil microorganisms are reviewed briefly.

Key words Soil microorganisms, Metagenomics, Library

土壤是各种微生物生活的大本营,据估计 1g 土壤中有 4000 ~ 7000 种近 10 亿的细菌,生物量可达 300kg/ha ~ 30000kg/ha^[1]。土壤微生物的研究曾一度仅限于一部分可培养的微生物。实际上,许多环境样品中的优势菌株都是不可培养的,通过培养方法估计的土壤微生物多样性只占总量的 0.1% ~ 1%^[2]。近年来发展起来的宏基因组学利用分子生物学的研究方法绕过培养方法来研究微生物的多样性及功能,为土壤微生物研究开辟了新的道路,本文对这一研究领域的最新进展进行简要综述。

1 宏基因组学概述

宏基因组学的概念在 1998 年首先由 Handelsman 等提出,其定义为“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,而不需要经过分离、培养单一种类的微生物”^[3]。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:一是进行土壤微生物及其基因资源的挖掘,目前的研究工作中已经得到大批新基因,特别是对一些极端环境中的微生物宏基因组的研究有望得到一些有特殊应用

价值的功能酶基因;另一方面是进行微生物生态学方面的研究,揭示土壤中微生物的多样性及其与环境之间的关系。

宏基因组学的基本策略包括(如图 1):从环境样本中直接提取微生物 DNA,将 DNA 片段克隆到载体上,转化宿主菌,构建宏基因组文库。然后对文库进行随机序列测定以研究微生物群落的组成或筛选文库以发现特异的基因。

2 土壤宏基因组学研究现状

2.1 土壤微生物 DNA 提取

土壤宏基因组文库的构建从样品的采集开始,表土层比其它位置取样容易。在微生物量比较丰富的地点所取样品的生物多样性较高,而极端环境中的微生物多样性尽管较低,却可能含有一些特殊的功能产物,可以根据不同的研究目的来确定取样地点^[4]。由于土壤样品中微生物数量比较大,因此取样量一般比较少($\leq 500g$)^[5]。另外,取样中应尽量避免对土壤的干扰,缩短保存和运输的时间,使样品能更好地代表自然状态下的土壤。用于 RNA 提取的土壤样品可以加入 RNAlater 避免 RNA 的降解^[6]。

* 辽宁省自然科学基金(No.20052003)

沈阳农业大学青年教师科研基金资助。

** 通讯作者 Tel: 024-88487155, E-mail: xuguang74@sina.com

收稿日期:2006-07-25,修回日期:2006-11-08

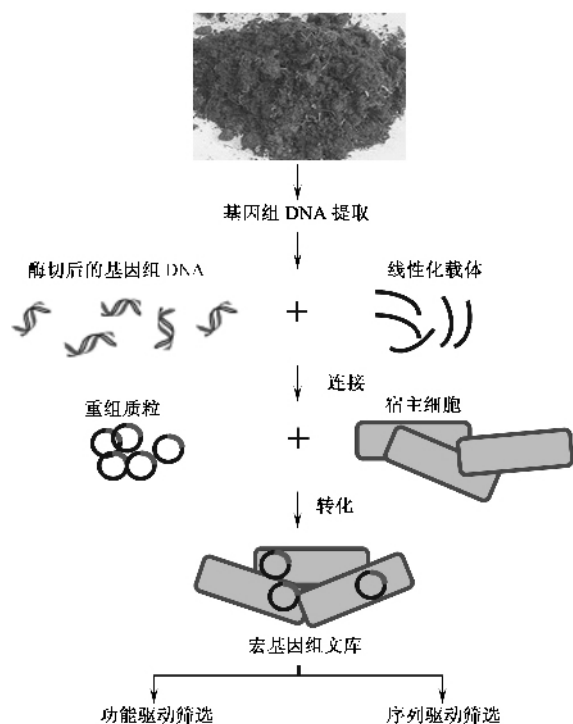


图1 土壤微生物宏基因组构建及筛选步骤

土壤本身的异质性、微生物的多样性及其对土壤颗粒的黏附使 DNA 的提取比较困难^[7]。提取中常出现的腐殖质污染会干扰随后的限制性酶切和 PCR 扩增等过程,影响克隆效率、转化效率和杂交的特异性^[8]。土壤的异质性使任何现存的方法都不能通用于所有的土壤,应根据土壤的性质和特点选择适宜的提取方法。土壤 DNA 提取方法可分为两种:原位裂解法采用酶、高温以及去污剂处理或一些机械破碎方法直接裂解样品中的细胞,然后提取 DNA^[9,10];异位裂解法先从样品中分离细胞,再对细胞进行裂解^[11]。原位裂解方法得到的 DNA 量较多^[12],而且可同时提取 DNA 和 RNA^[13]。异位裂解法处理条件温和,所得 DNA 纯度较高,但此法操作繁琐,成本高,DNA 得率也较低。DNA 的提取方法也会影响所构建文库的代表性,不同的方法所反映的土壤细菌群落状况不同^[14]。通常认为原位裂解法得到的 DNA 能更好地代表样品微生物的多样性^[15],目前构建土壤 DNA 文库多采用原位裂解法。

土壤微生物多样性较高,平均 1g 土壤中有 2000 种基因型,每种基因型出现的几率只有 0.05%^[11]。为了增加目标微生物出现的概率,可以参照传统的选择性富集方法,在文库构建之前利用选择性培养基或培养条件对样品进行富集。另外,可以用超速离心来富集高 GC 含量的微生物 DNA^[16],溴脱氧尿嘧啶核苷和稳定同位素探针(stable-isotope probing, SIP)可用于富集代谢比较活跃的微生物的 DNA^[17]。经过以上方法富集的样品中微生物多样性降低,但可以增加阳性克隆的数量,简化从复杂的土壤样品中提取高质量

DNA 及新基因的过程。

另外,有些样品,如被污染土壤中的微生物含量较少,可以在构建文库之前进行全基因组扩增(whole genome amplification, WGA),以得到充足的 DNA 用于文库构建。Abulencia 等利用多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)技术首先扩增污染土壤的基因组 DNA,然后构建宏基因组文库并进行生物多样性分析^[18]。该方法在扩增时引入了一些误差,但其对原基因组的覆盖率可以达到 90% 以上。对于微量微生物样品宏基因组学研究来说,不失为一种很好的方法。

2.2 土壤宏基因组文库构建

土壤文库的构建在理论上很简单,但土壤宏基因组较大,要覆盖全部基因组必须构建高质量的宏基因组文库。土壤宏基因组文库的构建及随后的筛选工作能否成功取决于以下因素:土壤样品的组成和理化性质、样品的采集和保存、DNA 提取方法以及所选用的宿主-载体系统等。根据插入片段的大小可以将宏基因组文库分为两类:一类是构建于质粒载体的小插入片段文库,该文库质粒拷贝数高,对土壤 DNA 质量要求低,操作简单,而且可以直接进行重组克隆的活性表达,缺点是插入片段小($< 15\text{kb}$),只适合筛选单基因或小的操纵子产物^[19],所需筛选的克隆数量较大;另一类是大插入片段文库,一般以细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)和粘粒(cosmid)为载体,插入片段大(BAC 可达 350kb),适于克隆较大的基因簇^[4],所需筛选的克隆数量较小,缺点是拷贝数低,基因的扩增和表达产物的获得以及操作较困难^[20]。载体系统的选择取决于所分离的土壤 DNA 的质量、文库目的插入片段的平均大小、所需的载体拷贝数、所采用的宿主以及筛选策略,而这些因素均由研究目标决定。据估计,在土壤中的所有微生物种类丰度相同的前提下,覆盖 1g 土壤中全部原核生物的基因组至少需要 10^7 个质粒克隆(5kb 插入片段)或 10^6 个 BAC 克隆(100kb 插入片段)^[21]。而为了真实的代表土壤中数量比较少的类群的基因组,文库的容量需要达到 10000Gb DNA(10^{11} 个 BAC 克隆)^[22]。

宿主的选择主要考虑到转化效率、宏基因的表达、重组载体在宿主细胞中的稳定性以及目标性状的筛选等。目前多采用大肠杆菌作为宿主,也可以用穿梭粘粒或 BAC 载体将构建于大肠杆菌的文库转入其它宿主,如链霉菌(*Streptomyces*)或假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[23]。在细菌宿主中进行的表达仅限于原核基因,但土壤宏基因组 DNA 也可能包含一些真核基因,因此也可以真核生物作为宿主。另外,还可以对一些菌株进行遗传改造以提高筛选效率。*rep* 基因能增加链霉菌(*Streptomyces*)次生代谢产物的合成,因此可利用转 *rep* 基因的链霉菌(*Streptomyces*)作为宿主来筛选次生代谢产物合成基因^[24]。一些缺陷突变体也可作为宿主来进行文库的功能筛选。例如,利用土壤文库与苜蓿根瘤菌

(*Sinorhizobium meliloti*) *bdhA* 突变体的互补分离 3-羟基丁酸酯分解基因^[25]。

2.3 宏基因组文库筛选

土壤宏基因组文库的筛选通常有两种方法:功能驱动筛选和序列驱动筛选。功能驱动筛选法根据重组克隆产生的新活性进行筛选,可以发现全新的基因或活性物质,利用该方法已成功分离了一些降解酶、抗生素抗性和抗生素编码基因^[5,22,25]。通常采用一些简单的活性筛选方法,在固体培养基中加入化学染料和酶的不溶性或含发色团底物衍生物来检测单克隆的酶活。例如,在含有三油酸甘油酯和荧光染料罗丹明 B 的培养基上筛选脂肪水解酶克隆^[19]。序列驱动筛选有两种方法:一种是根据已知保守序列设计引物或探针,通过 PCR 或杂交来筛选目的克隆^[22,26],这一策略只限于分离已知基因家族的新成员和含有高度保守区的酶基因,如聚酮合成酶^[22];另一种方法是对含有 16S rRNA 等系统进化锚定基因的克隆进行测序或对文库随机测序^[18,27]。该方法可以拓宽对一些序列信息了解比较少的微生物的研究,例如利用 16S rRNA 序列分析发现了酸杆菌门的许多新成员^[28]。Schloss 等开发了一种可以对 16S rRNA 文库进行统计分析的软件——*LIBSHUFF*,利用该软件可以发现不同微生物群落间的差异,可用于微生物生态学的研究^[29]。随机测序方法不确定性高,工作量大,但可以分离到一些与已知基因亲缘关系比较远的有价值的新基因。

除此之外,一些新的筛选方法也逐渐被用于宏基因组文库的筛选。例如,群体感应(quorum sensing, QS)可以被用于抗生素等生物活性分子的筛选。许多抗生素分子和其它生物活性分子能诱导 QS 基因的表达,据此构建了 *luxR* 启动子—*gfp* 质粒载体,宏基因组 DNA 的编码产物如果对 QS 有诱导作用,那么就会激活 *gfp* 的表达,根据发出的绿色荧光可进行克隆的筛选^[30],该方法用于 QS 抑制分子的筛选同样有效。Williamson 等利用该方法从洪涝土壤文库中筛选到 13 个与 QS 有关的基因,其中一个经测序与已知的 QS 激活分子 *LuxI* 有 62% 的同源性^[31],表明该筛选系统在生物活性分子的筛选上很有效。

另一种高通量筛选策略—底物诱导基因表达克隆 (SIGEX, substrate-induced gene expression cloning) 可被用于代谢途径编码基因的分离^[32]。该方法的原理是:编码分解代谢途径的基因通常存在于一些受底物诱导的操纵子中,并受附近的调控元件控制。首先构建一个操纵子陷阱—*gfp* (绿色荧光蛋白) 表达载体,这个载体可将宏基因组 DNA 克隆到 *gfp* 基因上游,使 *gfp* 基因的表达受到宏基因组 DNA 片段中的启动子调控。当外加目标底物时,可以影响 *gfp* 的表达,进而可以通过荧光激活细胞定位来分离相关基因。SIGEX 可用于复杂土壤微生物群落的文库筛选工作。

微阵列技术也可用于土壤宏基因组文库的分析。Sebat

等利用微阵列技术研究了土壤氮素循环中的亚硝酸还原酶基因、氨单加氧酶基因和甲烷单加氧酶基因在土壤样品中的分布特点,为土壤微生物群落的组成和功能研究提供了信息^[33]。作为一种高通量的分析方法,微阵列技术在基因分离上的灵敏度比 PCR 方法低,这限制了其在低丰度微生物的序列分析上的应用^[34]。以后的研究需进一步提高微阵列技术的灵敏性和专一性,同时还可以将蛋白质阵列和蛋白质组学的研究方法应用于复杂的土壤宏基因组文库分析。

3 结语与展望

土壤中蕴含着丰富的微生物资源,但目前人们对土壤微生物的基因组、代谢和多样性所知甚少,土壤宏基因组学将推动这方面的研究工作。目前已有比较成熟的技术从土壤中提取高质量的 DNA 并进行文库的构建,但要筛选得到功能基因还面临着较大的挑战。需要解决的主要问题是文库的质量,目前已发表的文库很少能够覆盖整个土壤宏基因组,这需要进一步优化土壤 DNA 的提取及克隆方法。另外需要一个高通量的有效筛选平台,目前从几万或几十万个克隆中只能筛选到几个有活性的基因,这主要是由于土壤微生物多样性高,宏基因组比较复杂,以及外源基因在宿主菌中的表达障碍等等。因此,一方面可以利用富集等方法简化宏基因组,另一方面需要发展新的载体和宿主菌,提高异源表达效率,同时建立更为敏感的高通量筛选方法。另外,目前的土壤宏基因组学研究主要集中于原核生物,对真菌等真核生物研究较少,所构建文库多为 DNA 文库, cDNA 文库较少。由于真核生物基因组中存在大量内含子,不能采用直接提取 DNA 构建表达文库的策略,而需要建立 cDNA 文库,另一方面,利用 cDNA 文库可以进行基因时空表达特点的分析。这其中首要解决的是土壤样品中真核微生物的裂解方法以及 RNA 的分离方法,目前已有一些 cDNA 文库构建及基因克隆的相关报道,但技术还很成熟^[6]。

总之,宏基因组学为土壤微生物研究提供了新的策略,应该将序列和功能筛选相结合,不同类型的文库相结合来进行土壤宏基因组学研究,充分挖掘土壤微生物的多样性并发挥其潜力。

参考文献

- [1] Torsvik V, Goksøyr J, Daae F L. Appl Environ Microbiol, 1990, **56** (3): 782 ~ 787.
- [2] Torsvik V, Daae F L, Sandaa R A, et al. Curr Opin Microbiol, 2002, **5**: 240 ~ 245.
- [3] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Chem Biol, 1998, **5**: 245 ~ 249.
- [4] Rhee, Jin-Kyu, Ahn, et al. Appl Environ Microbiol, 2005, **71**: 3817

- [5] Henne A , Daniel R , Schmitz R A , *et al.* Appl Environ Microbiol , 1999 , **65** : 3901 ~ 3907 .
- [6] Grant S , Grant W D , Cowan D A , *et al.* Appl Environ Microbiol , 2006 , **72** : 135 ~ 143 .
- [7] Martin-Laurent F , Philippot L , Hallet S , *et al.* Appl Environ Microbiol , 2001 , **67** : 2354 ~ 2359 .
- [8] Tebbe C C , Vahjen W . Appl Environ Microbiol , 1993 , **59** : 2657 ~ 2665 .
- [9] Zhou J M , Bruns M A , Tiedje J M . Appl Environ Microbiol , 1996 , **62** : 316 ~ 322 .
- [10] 张于光 , 李迪强 , 王慧敏 , 等 . 应用生态学报 , 2005 , **16** (5) : 956 ~ 960 .
- [11] Holben W E , Jansson J K , Chelm B K , *et al.* Appl Environ Microbiol , 1998 , **54** : 703 ~ 711 .
- [12] Gabor E M , de Vries E J , Janssen D B . FEMS Microbiol Ecol , 2003 , **44** : 153 ~ 163 .
- [13] Richard A H , Qiu X Y , Wu L Y , *et al.* Appl Environ Microbiol , 2001 , **67** : 4495 ~ 4503 .
- [14] Niemi , R M , Heiskanen I , Wallenius K , *et al.* J Microbiol Meth , 2001 , **40** : 155 ~ 165 .
- [15] Leff L G , Dana J R , McArthur J V , *et al.* Appl Environ Microbiol , 1995 , **61** : 1141 ~ 1143 .
- [16] Lorenz P , Schleper C . J Mol Catal B Enzym , 2002 , **19** : 13 ~ 19 .
- [17] Radajewski S , Ineson P , Parekh N R , *et al.* Nature , 2000 , **403** : 646 ~ 649 .
- [18] Abulencia C B , Wyborski D L , Garcia J A , *et al.* Appl Environ Microbiol , 2006 , **72** : 3291 ~ 3301 .
- [19] Yun J , Kang S , Park S , *et al.* Appl Environ Microbiol , 2004 , **70** : 7229 ~ 7235 .
- [20] 许晓妍 , 崔承彬 , 朱天骄 , 等 . 微生物学通报 , 2005 , **32** (1) : 108 ~ 112 .
- [21] Riesenfeld C S , Schloss P D , Handelsman . J . Annu Rev Genet , 2004 , **38** : 525 ~ 552 .
- [22] Martinez A . *et al.* Appl Environ Microbiol , 2004 , **70** : 2452 ~ 2463 .
- [23] Martinez A , Kolvek S J , Hopke J , *et al.* Appl Environ Microbiol , 2005 , **71** : 1638 ~ 1641 .
- [24] Majernik A , Gottschalk G , Daniel R . J Bacteriol , 2001 , **183** : 6645 ~ 6653 .
- [25] Riesenfeld C S , Goodman R M , Handelsman J . Environmental Microbiology , 2004 , **6** : 981 ~ 989 .
- [26] Daniel R . Appl Environ Microbiol , 2003 , **69** : 3048 ~ 3060 .
- [27] Beja O , Aravind L , Koonin E V , *et al.* Science , 2000 , **289** : 1902 ~ 1906 .
- [28] Liles M R , Manske B F , Bintrim S B , *et al.* Appl Environ Microbiol , 2003 , **69** : 2684 ~ 2691 .
- [29] Schloss P D , Larget , B R , Handelsman , J . Appl Environ Microbiol , 2004 , **70** : 5485 ~ 5492 .
- [30] Goh E B , G Yim , W Tsui , *et al.* Proc Natl Acad Sci USA , 2002 , **99** : 17025 ~ 17030 .
- [31] Williamson L L , Borlee , *et al.* Appl Environ Microbiol , 2005 , **71** : 6335 ~ 6344 .
- [32] Uchiyama T , Abe T , Ikemura T , *et al.* Nature Biotechnol , 2005 , **23** : 88 ~ 93 .
- [33] Sebat J L , Colwell , F S , Crawford R L . Appl Environ Microbiol , 2003 , **69** : 4927 ~ 4934 .
- [34] Zhou L , Thompson D K . Curr Opin Biotechnol , 2002 , **13** : 204 ~ 207 .