

系统生物学在工业微生物研究中的应用*

徐晓宇^{1**} 刘和²

(江南大学图书馆 无锡 214122) (江南大学生物工程学院 无锡 214122)

摘要 功能基因组学以揭示基因组的功能及调控机制为目标,是21世纪最热门的研究领域之一。近来功能基因组学领域的研究被用于工业微生物的研究中,该文对功能基因组学在工业微生物中的应用做了简单综述。

关键词 功能基因组学, 蛋白组学, 代谢组学, 转录组学

中图分类号: Q93-31 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)04-0765-04

Application of Systems Biology in Industry Microbial*

XU Xiao-Yu^{1**} LIU He²

(Library, Southern Yangtze University, Wuxi 214122)

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122)

Abstract Functional genomics is one of the hot points in 21 century which focuses on elucidating the function and regulation of genes. Functional genomics have been used in increase productivity in the manufacture of industrial biochemicals. In this review, comprehensive the application of functional genomics in industry microbiology.

Key words Functional genomics, Proteomics, Metabolomic, Transcriptomic

功能基因组学(Functional genomics)往往被称为后基因组学(Postgenomics),它利用结构基因组所提供的信息和产物,发展和应用新的实验手段,通过在基因组或系统水平上全面分析基因的功能,使得生物学研究从对单一基因或蛋白质的研究转向多个基因或蛋白质同时进行系统的研究。研究内容包括基因功能发现、基因表达分析及突变检测^[1]。近年来,随着功能基因组学等生物技术的飞速发展,对传统的发酵工业产生了极大的冲击,它被用于工业微生物的改进、工业微生物翻译过程的剖绘以及建立新的工业微生物发酵过程中,推动了工业微生物研究的发展。

目前所应用的功能基因组学研究技术可粗略分为4类:1)系统地改变基因结构,并通过进一步的表型分析研究基因的功能和调控特性;2)对基因转录过程的系统监测,例如芯片(Microarray)技术可以同时分析数千个基因转录子(transcriptomic);3)对基因编译的蛋白系统监测,例如各种蛋白组学

(proteomic)技术,以及4)对细胞代谢过程中各种代谢中间或终产物的系统分析,例如代谢组学(Metabolomic)技术。

本文就功能基因组学在工业微生物研究中的应用作一简单综述。

1 比较基因组研究

比较基因组学是基于基因组图谱和测序基础上,对已知的基因和基因组结构进行比较,来了解基因的功能、表达机理和物种进化的学科。常用的方法是比较基因组杂交(CGH)和用DNA芯片法。*L. lactis*是工业上重要的微生物之一,被广泛的开发应用于代谢物和蛋白质的生产中^[2]。研究人员分离出植源性乳酸菌KF147和KF282,对其基因组中的内含子进行了鉴定。并将这些基因组片断和*L. lactis* subsp. *Cremoris* SK11和*L. lactis* subsp. *lactis* IL1403的基因组进行了比较^[3]。菌株KF147有一个额外的基因簇fbp-galR-aga-galKT用于利用 α -半乳糖

* 国家自然科学基金资助项目(No. 50508014)

** 通讯作者 Tel: 0510-85919951, E-mail: xjst@sytu.edu.cn

收稿日期: 2006-09-19, 修回日期: 2006-11-13

昔与 *Lactococcus raffinolactis* ATCC43920^[5] 基因具有高度的相似性(92%氨基酸序列的一致)。这个基因簇可以从 KF147 菌株和其他的植源性 *L. lactis* 菌株之间转移^[4]。Manolis Kellis 等通过计算机程序,比较了 *Saccharomyces cerevisiae*、*S. bayanus* 等 4 个酵母品种的基因组序列。结果表明啤酒酵母确切的基因数目应该是 5538。同时在这项研究中找到了 70 余个调控基因活动的序列,其中包括控制基因开启的基因和发送转录信息的基因^[6]。Jan Ihmels 应用 1000 多个酿酒酵母的全基因组的基因表达谱以及 198 个假丝酵母的全基因组表达图谱,通过生物信息学比较发现了核糖体蛋白的表达调控规律。他们搜索了 ORF 上游 600bp 的区域,最终找到了 AATTTT 序列元件,定义为快速生长元件(RGE)。RGE 元件在假丝酵母的线粒体核糖体蛋白基因中存在,在酿酒酵母中丢失。揭示在基因组复制后,线粒体核糖体蛋白基因中 RGE 的广泛丢失^[7]。Thomson 也对同样的工作做了报道^[8]。

2 改变基因结构,分析其功能和调控特性

Mikito Ito 等分析研究了 *Escherichia coli* 的 1440 个单一的基因敲除的突变体,在敲除文库中,有 1044 个突变体中的 γ -基因没有功能。采用 GeneSpringTM 软件对原数据中基因相关性进行聚类分析。发现一个已知的基因与这个基因簇可以聚为一类。研究者认为这种研究方法可以对于研究没有表现功能的 γ -基因。基因树反映基因功能之间的相关性^[9]。

来自酵母细胞的蛋白酶 A 可能消化有助于啤酒泡沫稳定性的蛋白质,同时产生没有起泡性能的多肽或者导致泡沫蛋白质分子分解,导致最终成品啤酒中泡沫稳定性变弱。新疆农业大学食品学院的周建中的等人尝试用基因工程的手段改良酵母,采用醋酸锂转化法,将一段目的基因转入到酵母体内,破坏酵母 PEP4 基因的表达。通过对目的基因的扩增和羧肽酶 Y 酶活检测验证基因敲除情况,并通过传代抗性试验与传代发酵稳定性实验验证突变株遗传稳定性良好^[10]。

3 转录组学与蛋白质组学研究

转录组即转录后的所有 mRNA 的总称。Wendisch 对 *C. glutamicum* 的转录组研究的进展进

行了综述^[11]并介绍转录组技术如何用于提高缬氨酸生产菌株的效率。最近两年有很多人采用转录组分析的方法对 *C. glutamicum* 各种生理学方面进行了研究,包括硫^[12]、氮^[13]、磷^[14]的调控和碳代谢^[15],以及添加乙胺丁醇^[16]和温度改变^[17]触发的谷氨酸的生产、赖氨酸的生成^[18]和丝氨酸的代谢^[19]。镁^[20]和铁^[21]的利用等等。蛋白质组学是功能基因组学的核心。有人提出用 2D-PAGE 方法研究 *Corynebacterium glutamicum* 蛋白质^[22-23],并使用细胞中各个部分蛋白质的办法进行研究^[24],例如包括溶解蛋白、膜蛋白和分泌蛋白,其中 Schaffer 等通过 N-末端微量测序和特异抗血清的 Western blotting 和质谱的方法鉴定了 42 个蛋白质、采用窄范围 pH 梯度和膜蛋白质谱建立起一个最初的关于细胞质和膜相关的蛋白质高分辨率图谱^[25]。在这个工作中,鉴定了 152 个细胞质蛋白和 13 个细胞膜蛋白。同样的工作也应用到其他工业微生物如 *B. subtilis* 和 *Clostridium aceto-butylcum* 及 *E. coli* 当中^[26-31]。2D-PAGE 法被用于研究氮的限制对 *C. glutamicum* 的影响^[32],及其鉴定丙酸盐诱导的生长条件下的蛋白质^[33],比较葡萄糖和乙酸盐生长下的细胞的蛋白质组^[34],分析加入缬氨酸对外表的影响和检验热击条件诱导下的蛋白质等等^[35]。

近来有人建立了另一个可供选择的方法来对 *C. glutamicum* 的内膜蛋白进行分离和鉴定。包括通过阴离子交换色谱(AIEC),紧接着采用 SDS-PAGE 两相分离,内在膜次蛋白质体的富集和采用溴化钠洗涤,去除可溶性的膜相关蛋白等步骤。Daniela 等采用这种方法鉴别了 170 个不同的内膜蛋白,其中 50 个是膜结合蛋白,13 个跨膜螺旋,这个数字相当于已测定的膜蛋白组的 7.5%^[36]。

4 代谢组学研究

代谢组研究是对所能获取的全部胞内和胞外代谢产物进行鉴别和定量分析。代谢组学研究主要对选择性分析技术对能观察到的代谢物进行开发分类、代谢图谱研究和定性研究。通过对中央代谢的分子定量研究可以让人们了解代谢的关键节点。同样也可以用于分子中央代谢旁支的代谢基础的靶标分析。为了定量氨基酸和羧酸,Villas-Boas 采用气相色谱-质谱法(GC-MS)结合统计学方法对 *S. cerevisiae* 的胞内和胞外代谢物进行定性和

定量分析^[37]。从孤立的4个生物条件下代谢物水平的信号的差异进行统计研究,他们观察到新陈代谢特性的差别,提示将来可以采用此方法结合比较omic分析。Panagiotou等运用这种方法分析检测厌氧和好氧的培养条件对*Fusarium oxysporum*代谢情况的影响^[38]。

Blank等研究了30多个*S. cerevisiae*的突变株在葡萄糖中生长时的潜在的适应反应。将这些检测结果与数学建模结合起来,揭示了代谢网络在单个基因被敲除的条件下仍然具有生机,同时发现许多不重要的的可选择途径的基因的基因大量冗余^[39]。这种方法进一步研究137个被完全破坏的*Bacillus subtilis*突变株在其加入其首选的培养基中的大范围的系统流量分析^[40]。上述研究方法是一个揭示基因调控网络和表现型之间的相互影响的结构和功能的强有力的策略。

Oldiges等通过LC-MS/MS方法,葡萄糖泵、代谢图谱,和统计数据分析,对不同的酪氨酸营养缺陷型生产L苯基丙氨酸的*Escherichia coli*菌株的芳香族氨基酸的代谢动力学进行激活、监测和分析^[41]。van Winden等运用快速取样和淬火的方法对*S. cerevisiae*中胞内代谢物进行直接分析,而不会被代谢物的较高的代谢物周转率所阻碍^[42]。

5 采用几种手段结合的方法了解微生物生产过程

人们将基因组分析,转录组和蛋白质组等手段结合起来,了解微生物某些产物的生产过程。Yoon SH等采用将转录组学和蛋白质组学分析结合起来的方法了解在*E. coli*细胞高密度培养时的新陈代谢和生理学变化^[43]。编码三羧酸循环的酶和NADH脱氢酶及ATP酶的基因表达在指数生长期被上调,而随后则受到抑制。然而,包括糖酵解和戊糖及磷酸盐途径的基因在延滞期即被上调,在细胞密度增加时表达氨基酸合成的基因则受抑制,人们认为这是在高密度细胞培养中减少特异的组合蛋白质的主要原因。Choi JH等采用芯片的方法来研究重组*E. coli*在期HCDC发酵过程中生产类似胰岛素生长因子I的融合蛋白(IGF(f))的转录组剖绘^[44]。在诱导以后529个基因的表达水平被显著的改变。在IGF(f)生产过程中经诱导以后大约200个基因被上调。编码磷酸核糖焦磷酸合成酶的基因和一个丙

三醇转运体(*glpF*)的基因被从这个群体中选择出并在*E. coli*生产IGF(f)时进行联合表达。一些编码核苷酸,氨基酸及其丙三醇利用的合成途径的酶的过度表达,使容积生产率提高一倍。这种方式成为一个很有利用前景的方法。

Lee等采用转录组和蛋白质组的方法对*E. coli* W3110和这一菌株的苏氨酸过度生产菌株进行了整体的分析,他们的研究表明,4290个基因中只有54个基因具有不同的基因表达图谱,这些基因包括乙醛酸支路、TCA循环和氨基酸合成基因。在变异菌株中,它们被显著的上调,而编码膜的组分和核糖体蛋白的基因则被下调^[28]。Ken-ichi Yoshida等结合转录组和蛋白质组学方法研究了*Bacillus subtilis*中葡萄糖抑制基因。在生长在营养产生孢子培养基中,研究对数生长中期的糖酵解向糖异生转换中的基因表达,同时检测葡萄糖抑制基因是否为代谢物控制蛋白(CepA)所调控,将野生型和cepA1细胞同时采用有葡萄糖和无葡萄糖培养基进行培养,它们的蛋白质组和转录组进行比较,最后鉴别出11个蛋白。这些蛋白是在葡萄糖抑制条件下合成的。其中4个蛋白(IolA, I, S and PckA)是不受CepA蛋白控制的^[45]。

6 展望

随着化石资源的日益枯竭,在未来二三十年内将面临着包括石油和天然气在内的各种资源的短缺的一系列问题,我国的环境污染也已到了十分严重的地步,发展无污染的新型工业技术已经成为社会可持续发展的当务之急,此时,大力发展包括功能基因组学在内的工业微生物技术,提高我国工业微生物技术的创新能力,是国家的迫切要求,也是保证国民经济日益增长的需要。在新的世纪生物技术正成为各国科技竞争的焦点。

目前我国在功能基因组研究及应用方面的原始创新成果数量较少,还不能为生物技术产业的发展提供足够的知识和产品。我国应当充分利用我国的丰富的遗传优势,参与到国际竞争中去。为最终解决生物能源核材料的生物制造提供技术支持,这对我国的经济的发展,解决我国的能源短缺问题和加强我国的国际竞争力具有重要的战略意义。

参考文献

- [1] 陈 彤, 廖祥儒, 杜建芳 等. 生物技术通报 2002 **4** : 1 ~ 6.
- [2] Smit G, Smit BA, Engels WJ. FEMS Microbiol Rev 2005, **29** : 591 ~ 610.
- [3] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, *et al.* Genome Res, 2001, **11** : 731 ~ 753.
- [4] Kelly W, Ward L. Microbiol 2002, **148** : 3332 ~ 3333.
- [5] Boucher I, Vadeboncoeur C, Moineau S. Appl Environ Microbiol 2003 **69** : 4049 ~ 4056.
- [6] Manolis K, Nick P, Matt E, *et al.* Nature, 2003, **15** : 241 ~ 254.
- [7] Ihmels, J, Sven Bergmann, Maryam Gerami-Nejad, *et al.* Science, 2005 **309** : 938 ~ 940.
- [8] Thomson, J. M, Thomson JM, Gaucher EA, Burgan MF *et al.* Nat. Gene, 2005 **37** : 630 ~ 635.
- [9] Mikito I, Tomoya B, Hirotada M, *et al.* Metabolic Engineering 2005, **7** : 318 ~ 327.
- [10] 周建中, 王德良, 王忠民 等. 酿酒 2006 **1** : 62 ~ 64.
- [11] Lange C, Rittmann D, Wendisch VF, *et al.* Appl Environ Microbiol 2003, **69** : 2521 ~ 2532.
- [12] Rey D A, Nentwich S S, Koch D J, *et al.* Mol Microbiol, 2005, **56** : 871 ~ 887.
- [13] Silberbach M, Schafer M, Huser A T, *et al.* Microbiol Appl Environ Microbiol, 2005 **71** : 2391 ~ 2402.
- [14] Rittmann D, Sorger-Herrmann U, Wendisch V F. Appl Environ Microbiol 2005 **71** : 4339 ~ 4344.
- [15] Gerstmeir R, Cramer A, Dangel P, *et al.* J Bacteriol, 2004 **186** : 2798 ~ 2809.
- [16] Radmacher E, Stansen K C, Besra G S, *et al.* Microbiology, 2005, **151** : 1359 ~ 1368.
- [17] Stansen K C, Uy D, Delaunay, *et al.* Appl Environ Microbiol, **71** : 5920 ~ 5928.
- [18] Kromer J O, Sorgenfrei O, Klopprogge K, *et al.* J Bacteriol, 2004, **186** : 1769 ~ 1784.
- [19] Netzer R, Peters-Wendisch P, Eggeling L, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2004b, **70** : 7148 ~ 7155.
- [20] Pallerla S R, Knebel S, Polen T, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2005, **243** : 133 ~ 140.
- [21] Krug A, Wendisch V F, Bott M. J Biol Chem 2005, **280** : 585 ~ 595.
- [22] Hermann T, Pfefferle W, Baumann C, *et al.* Electrophoresis, 2001, **22** : 1712 ~ 1723.
- [23] Schaffer S, Burkowski A, Handbook of Corynebacterium glutamicum. Proteomics. In : Eggeling L, Bott M. (Eds.), CRC Press, 2005, pp. 99 ~ 118.
- [24] Hermann T, Wersich G, Uhlemann E M, *et al.* Electrophoresis, 1998, **19** : 3217 ~ 3221.
- [25] Schaffer S, Weil B, Nguyen V D, *et al.* Electrophoresis, 2001, **22** : 4404 ~ 4422.
- [26] Hecker M. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2003, **83** : 57 ~ 92.
- [27] Mader U, Hennig S, Hecker M, *et al.* J Bacteriol, 2004, **186** : 2240 ~ 2252.
- [28] Lee P S, Lee K H. Biotechnol Bioeng, 2003, **84** : 801 ~ 814.
- [29] Martinez-Antonio A, Salgado H, Gama-Castro S, *et al.* Biotechnol Bioeng 2003 **84** : 743 ~ 749.
- [30] Tummala S B, Junne S G, Paredes C J, *et al.* Biotechnol Bioeng, 2003, **84** : 842 ~ 854.
- [31] Lee P S, Shaw L B, Choe L H, *et al.* Biotechnol Bioeng, 2003, **84** : 834 ~ 841.
- [32] Silberbach M, Schafer M, Huser A T, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2005, **71** : 2391 ~ 2402.
- [33] Claes W A, Puhler A, Kalinowski J. J Bacteriol, 2002 **184** : 2728 ~ 2739.
- [34] Gerstmeir R, Wendisch V F, Schnicke S, *et al.* J Biotechnol, 2003, **104** : 99 ~ 122.
- [35] Barreiro C, Gonzalez-Lavado E, Brand S, *et al.* J Bacteriol, 2005, **187** : 884 ~ 889.
- [36] Daniela S, Frank, Jochen K, *et al.* Proteomics, 2005, **5** : 1317 ~ 1330.
- [37] Villas-Bôas SG, Moxley JF, Akesson M, *et al.* Nielsen J Biochem J, 2005, **388** : 669 ~ 677.
- [38] Panagiotou G, Christakopoulos P, Olsson L. J Biotechnol, 2005, **118** : 304 ~ 315.
- [39] Blank L M, Kuepfer L, Sauer U. Genome Biol, 2005, **6** : R49.
- [40] Fischer E, Sauer U. Nat Genet, 2005, **37** : 636 ~ 640.
- [41] Oldiges M, Kunze, M, Degenring D, *et al.* Biotechnol Progr, 2004, **20** : 1623 ~ 1633.
- [42] van Winden WA, van Dam JC, Ras C, *et al.* FEMS Yeast Res, 2005, **5** : 559 ~ 568.
- [43] Yoon S H, Han M J, Lee S Y, *et al.* Biotechnol Bioeng, 2003, **81** : 753 ~ 767.
- [44] Choi J H, Lee S J, Lee S J, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2003, **69** : 4737 ~ 4742.
- [45] Ken-ichi Y, Kazuo Ki, Yasuhiko M, *et al.* Nucleic Acids Res, 2001, **29** (3) : 683 ~ 692.