# 宏基因组学在微生物学研究中的应用

来源：网络 作者：梦中情人 更新时间：2024-02-07

*一直以来，自然环境中微生物鉴定识别的唯一途径就是用传统的方法进行分离培养，这不但阻碍了人们认识微生物世界的视野，还限制了生物资源的开发和利用。随着分子生物学技术的快速发展，为了研究不能培养的微生物，一个全新的理念宏基因组学应运而生，宏基因...*

一直以来，自然环境中微生物鉴定识别的唯一途径就是用传统的方法进行分离培养，这不但阻碍了人们认识微生物世界的视野，还限制了生物资源的开发和利用。随着分子生物学技术的快速发展，为了研究不能培养的微生物，一个全新的理念宏基因组学应运而生，宏基因组学技术克服了相关培养技术的困难和限制，跳过传统培养而直接从环境样品中提取总DNA，通过构建宏基因组文库、筛选来获得新的功能基因和生物活性物质。宏基因组学的产生和快速发展已渗透到各个领域，包括海洋、土壤、热液口、热泉、人体口腔及胃肠道等，并在医药、替代能源、环境修复、生物技术、农业、生物防御等各方面显示了重要的价值。

1 宏基因组学的概念

1998年，科学家Handelsman等首次提出了宏基因组（ metagenome）的概念，宏基因组学又称为环境基因组学，或者群落基因组学，它是指环境中全部微生物基因的总和，包含细菌基因组和真菌基因组，所获得的基因是包含了可培养的和还不能培养的微生物的总基因，是目前一种新的微生物研究方法。宏基因组学其显著的特征在于获得环境微生物基因组的方法是非传统培养方法，通过基因筛选和序列分析等手段，来研究环境微生物的功能活性、多样性、种群结构、进化关系，以及它们与环境之间的关系，获得新的酶及生物活性物质，可极大地拓展微生物基因资源的利用空间，研究其功能和彼此之间的关系和相互作用，并揭示其内在规律。

2 宏基因组学发展

早期对微生物群落的研究，主要是根据微生物的生理特性，通过原位染色标记技术来确定微生物群落的分类。可依据其菌落的形态特征、不同的生长媒介和代谢产物等来区分不同微生物的菌群。但此种方法有很大的局限性，它只可检测到那些在实验室生长条件下容易生长的有机体，但对于研究非培养的微生物有很大的限制。

直至发展到免培养技术，即直接从样品中提取总DNA，并用这些DNA来分析物种的多样性，也可描述一个群体不同物种间的关系。早期DNA的方法是通过杂交或者聚合酶链式反应（polymerase chain reaCtion，PCR）扩增特异的靶基因，探索目标群体的DNA，这些研究手段通常能在一个较广泛的层面上描述生物多样性。

最早宏基因组分析实验，只用来研究荧光原位杂交（fluorescent in situ hyhridization，FISH）未检测到且未报道过的DNA菌群，只限定在16SrRNA的标记基因，之后可用它来识别群体特定酶区域的功能基因探针。早期的宏基因组学分析主要针对于细菌和真菌，直至202\_年，BrEitbart等应用宏基因组学方法分析海水中的微生物种群，发现噬菌体是海水中的丰要病毒，这一研究开启了病毒宏基因组学（viral metagenomics）研究，为宏基因组学研究迎来新局面。为了更高效地分析微生物群落，大多数的研究都采用了高通量测序技术。新一代高通量测序技术的广泛应用及性价比较高的DNA测序技术，宏基因组的研究也随之被普及。

3 宏基因组学研究方法

3.1 基因组文库构建

DNA提取，获得高质量的总DNA是宏基因组文库构建的关键因素之一，DNA提取方法主要有2种：一种是直接裂解法，直接裂解环境样品中的微生物细胞进行DNA抽提。另一种是间接裂解法，即先采用差速离心等物理手段，将微生物细胞从环境样品中分离出来，再用较温和的方法来对DNA进行抽提。

3.1.1 载体选择。DNA提取后构建文库，在文库构建过程中，载体是文库构建所必需的因素。载体选择主要考虑是否有利于目标基因扩增、表达，以及在筛选细胞毒类物质时表达量的调控等。目前多采用细菌人工染色体（BAC）和粘粒（Cosmid）或Fosmids载体。1992年SHIZUYA等研究表明，用BAC载体可插入片段，但克隆效率低；用Fosmids载体可插入中等大小片段（38-52kb）克隆，克隆效率较高。

3.1.2 宿主的选择。宿主菌株的选择主要考虑：转化效率、载体在宿主细胞稳定性、宏基因的表达、目标性状筛选等因素。不同微生物种类所产生的活性物质类型有明显差异，因此可根据研究目标的不同选择不同的宿主菌株。目前，构建宏基因组文库最常用的宿主有大肠杆菌、青链霉菌和恶臭假单胞杆菌、根癌土壤杆菌、黄单胞菌、根瘤菌等。

3.2 宏基因组文库的筛选

目前用于宏基因组文库的筛选方法主要有功能筛选法、序列筛选法、化合物结构筛选法和底物诱导基因表达筛选法4种。

3.2.1 功能筛选法。基于克隆子产生新的生物活性进行筛选，通过建立和优化合适的方法，从基因组文库中获得具有特殊功能。如抗菌素耐药性基因、酯酶、脂肪酶、膜蛋白质、几丁质酶、4-羟基丁酸的基因编码酶等常用物质。通过功能性筛选的方法，可以快速地从多个克隆子中鉴定出全长基因，并由此获得这些功能基因的产物，为工业、医药和农业提供一些具有潜在活性的天然产物或蛋白质。该方法限制性在于许多基因不仅在宿主菌株（如大肠杆菌）里表达不明显，所以更新的宿主和更高的表达效率还有待开发。

3.2.2 序列筛选法。基于已知相关功能基因的序列设计探针或PCR引物，通过杂交或PCR扩增筛选阳性克隆；202\_年Stokes等对该该方法进行改进，采用整合子一基因盒系统，由1个整合酶基因和1个含59bp的重组位点组成，基因盒可从这个特异的重组位点插入并将这个位点分隔开与之比邻，被分隔开的这些位点常含有约25bp的保守序列（反向重复序列），以这些保守位点序列作为PCR引物扩增即可获得基因盒中的全长基因，采用该技术巧妙地解决了从复杂的土壤基因组文库中分离到全长基因的难题。

3.2.3 化合物结构筛选法。通过比较转入和未转入外源基因的宿主细胞或发酵液、提取液的色谱图不同进行筛选，但该方法筛选的物质未必具有活性。

3.2.4 底物诱导基因表达筛选法。即利用代谢相关基因或酶基因在有底物存在的条件下才表达，反之则不表达这个原理来筛选目的代谢基因，这种方法可用于活性酶的筛选，现已成功应用于地下水宏基因组中芳香族碳水化合物的筛选。

4 宏基因组学应用研究

随着近年来研究的深入，宏基因组学研究已渗透到各个研究领域，包括食品科学、微生物活性筛选、新基因挖掘、医药领域、替代能源、环境修复、生物降解、农业、生物防御、海洋、土壤、热泉、人体口腔及胃肠道等各方面显示了重要的价值。因研究涉及领域较多，仅例举在食品和微生物活性物质筛选基因组学进行介绍。

4.1 宏基因组学在食品领域的应用

采用宏基因组学的方法，可以提取更多更高效的酶类。目前，多糖修饰酶也是食品工业相当重要的一类酶，如：淀粉酶、水合酶、脂肪酶、蛋白酶、腈水解酶、糖苷酶和肌醇六磷酸酶等已经被成功商业化。到目前为止，研究人员已经利用以功能和序列为基础的方法，通过宏基因组搜寻，鉴定了4-羟基丁酸脱氢酶、L-氨基酸氧化酶、脂肽、核酸酶、葡糖酸还原酶、脂蛋白、具有表面活性的脂多糖等多个这样的新型生物催化剂。欧敏功等通过实验筛选了甲基丙二酸半醛脱氢酶（MMS-DH）。Suenaga等构建的Fosmid文库用邻苯二酚作为基质筛选出雌二醇加双氧酶，产出91个雌二醇加双氧酶。

4.2 微生物活性物质筛选

传统的培养方法限制了生物活性物质的开发和利用，宏基因组学技术的发展，使人们能够进行非培养微生物进行活性物质筛选，加快了生物活性物质开发和利用的步伐。研究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。例如Wang等首次以链霉菌为宿主从土壤中筛选到具有抗菌活性的5种新的小分子生物活性物质。202\_年，Brady等筛选出65个具有抗芽孢杆菌活性的克隆，并从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。202\_年Brady等又筛选到一株产生蓝色色素的克隆，并从中分离到蓝色化合物，该物质具有抗菌和诱导成纤维细胞凋亡等生物活性。202\_年Diaz-Torres等利用人唾液分离到一种新的四环素抗性基因tet。

5 展望

宏基因组学是一个非常有活力的研究领域，克服了传统培养方法限制了很多微生物资源开发和利用，该技术已成为研究免培养微生物的重要手段。运用宏基因组学可分析微生物分类图谱，深入了解微生物的多样性，有可能挖掘和利用99%以上的不可培养微生物，这为功能微生物资源开发利用提供了丰富的研究资源。

目前，运用宏基因组技术对宏基因组中获得功能基因，不仅可以用于新药的研发，而且在新的工业用酶、食品微生物研究、食品快速检测及生物活性物质的筛选等方面均都具有广阔的前景，是基因工程研究的一个主要方向。采用宏基因组技术虽然获得活性物质，但目前并不是很多，在快速发展的高通量测序技术的推动之下，宏基因组学分析的新算法和软件工具也不断被开发和更新，细菌遗传学、分子生物学、基因组学、生物信息学等学科和领域的发展，必将使我们能从各类环境基因组文库中获得更多具有高价值的新酶、抗生素和其他活性产物，宏基因组学技术也必将发挥越来越大的作用，造福人类。

本DOCX文档由 www.zciku.com/中词库网 生成，海量范文文档任你选，，为你的工作锦上添花,祝你一臂之力！