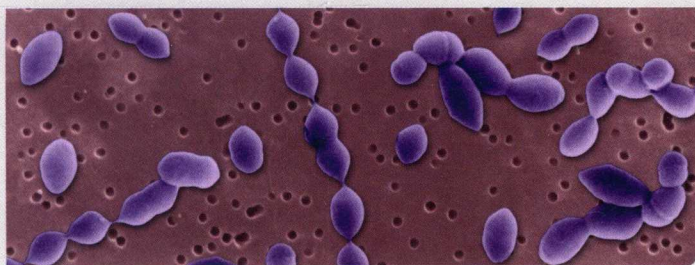




普通高等教育“十三五”规划教材

高级微生物学

ADVANCED MICROBIOLOGY



何培新 主编



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位

普通高等教育“十三五”规划教材

高级微生物学

何培新 主编



中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

高级微生物学/何培新主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2017. 8
普通高等教育“十三五”规划教材
ISBN 978-7-5184-1526-7

I. ①高… II. ①何… III. ①微生物学—高等学校—教材
IV. ①Q93

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 185086 号

责任编辑: 王 朗 车向前 责任终审: 唐是雯 封面设计: 锋尚设计
策划编辑: 江 娟 责任校对: 吴大鹏 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)
印 刷: 三河市万龙印装有限公司
经 销: 各地新华书店
版 次: 2017 年 8 月第 1 版第 1 次印刷
开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 34.25
字 数: 770 千字
书 号: ISBN 978-7-5184-1526-7 定价: 80.00 元
邮购电话: 010-65241695
发行电话: 010-85119835 传真: 85113293
网 址: <http://www.chlip.com.cn>
Email: club@chlip.com.cn
如发现图书残缺请与我社邮购联系调换
160311J1X101ZBW

本书编写人员

主 编 何培新

参编人员(按汉语拼音排序)

迟 雷	郭法谋	韩 丽	何培新	胡晓龙
刘苏萌	刘 伟	宋丽丽	孙新城	魏 涛
张俊杰	张 勇	郑 燕		

前言

微生物学 (Microbiology) 是在分子、细胞或群体水平上研究各类微生物形态结构、生长繁殖、生理代谢、遗传变异、生态分布和分类进化等生命活动的基本规律,并将其应用于工业发酵、医学卫生和生物工程等领域的科学。微生物学一直处于生命科学发展的前沿,与医学、农业、食品、能源和环保等相关学科的发展息息相关;微生物学通常也处于新技术发明和发展的前沿。生命科学、化学、物理学、数学、信息科学等学科技术的发展和进步,促进了微生物学的发展,拓展了其研究内容和应用领域,促进了学科之间的交叉与融合。20 世纪末诞生的组学技术,使微生物学研究发生了革命性的变化;微生物学进入“组学”发展阶段。“组学”阶段是信息和知识的大整合时期,生命整体将成为大的研究对象,并为相关学科的进一步发展提供了新的机遇。微生物学及相关学科理论与技术的发展,产生了大量新知识、新理论、新技术和新应用开发领域。

我国在 20 世纪末进行了本科专业调整,多数院校本科阶段不再设立微生物学专业。目前,微生物学是高等院校生物类专业必开的一门主要专业基础课程,该课程是高等院校生物类专业发展的基石之一。多数高等院校的相关专业只开设一门微生物学课程,学生难以系统和深入地学习微生物学丰富的理论和技术。进入研究生培养阶段,一些学生的微生物学知识和技能存在着缺陷,直接导致创新能力和意识不足,限制了其在相关学科领域持续发展的潜力。这是很多研究生阶段高级微生物学教学遇到的普遍问题。

为了拓展相关专业研究生微生物学的知识面、提高学生的科研能力和创新意识,编者组织具有丰富教学经验的教师从微生物学快速发展的实际出发,结合研究生所在专业的多样性,编写了《高级微生物学》。在编写过程中贯穿了以下指导思想:①突出一个“新”字,关注学科发展的前沿,拉近学生与科学技术发展的距离。由于目前微生物学已经发展到“组学”阶段,在内容安排上体现了“组学”阶段微生物学的最新研究和应用成果,如编写了“‘组学’时代的微生物学”“微生物基因组学”“代谢组学技术”“‘组学’时代的微生物生态学”“组学技术在食品安全中的应用”和“宏基因组学在食品工业中的应用”等专题内容;介绍了分子定向进化育种、基因组定点编辑技术和噬病毒体、病毒生态学等最新理论和技术成果。②突出一个“实”字,考虑一些学生在微生物分类和鉴定等实际科研中难以按照学科规范要求进行研究活动,在相关章节中,增加了细菌、放线菌和酵母菌分类鉴定实例的内容,并介绍了真菌分类与鉴定的指导性内容,对学生系统地从事微生物分类和鉴定研究工作具有实际指导价值;在微生物生理部分,着重介绍了微生物代谢体系、代谢途径的调控和代谢流分析等内容,为学生从事代谢工程研究提供了扎实的基础理论保障;在微生物遗传部分,着重介绍了分子定向进化育种和基因组定点编辑技术,为相关技术应用奠定了基础。③突出微生物学的系统性和完整性。本书没有采取各个专题单独成章的编排方式,而是从学科本身的系统性和完整性出发,安排微生物类群、生理、遗传、生态和分类各自成章,注重章节之间的有机衔接和结构的合理性。④突出微生物学的应用性。微生物学是一门应用性很强的学科,本书在基础理论和技术章节之后,将

微生物学在食品、医药、环保、能源和农业中的应用各自成章，以加强学生理论联系实际、综合应用知识的能力，了解微生物的应用范围、问题和前景。总之，本书注重知识的理论性、适用性、先进性和系统性，理论与应用并举，突出“新”和“实”，反映了国内外微生物学理论和技术的最新进展，对理论研究和技术开发等具有切实的指导价值。

本书分为十三章，具体编写分工：“第一章 绪论”由何培新和刘伟编写，“第四章 无细胞结构生物——病毒”由孙新城编写，“第五章 微生物的代谢”由迟雷编写，“第八章 微生物的分类与鉴定”由张俊杰编写，“第十章 微生物与医药”由韩丽编写，“第十一章 微生物与环境保护”由张勇编写，“第十二章 微生物与能源”由宋丽丽编写，其余章节由不同的作者合作编写，全书由何培新统稿。本书引用了大量国内外科技文献，在此向相关文献作者表示敬意。本书的编写得到了郑州轻工业学院食品与生物工程学院、学校相关部门的大力支持，在此表示感谢。

由于编写时间紧迫，再加上作者才疏学浅，书中肯定存在着不少错误和不当之处，恳请广大读者批评指正，以便再版时修正。

何培新
2017年5月

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 技术创新促进微生物学的进步与发展	(1)
第二节 微生物学研究技术	(3)
第三节 “组学”时代的微生物学	(6)
第二章 原核生物	(11)
第一节 原核生物的分类与系统学	(11)
第二节 细菌	(15)
第三节 古生菌	(31)
第四节 极端微生物	(48)
第三章 真核微生物	(54)
第一节 真核微生物的分类与系统发育	(54)
第二节 酵母菌	(61)
第三节 霉菌	(66)
第四节 蕈菌	(80)
第四章 无细胞结构生物——病毒	(96)
第一节 概述	(96)
第二节 噬病毒体	(98)
第三节 病毒生态学	(105)
第四节 新生病毒	(113)
第五章 微生物的代谢	(121)
第一节 微生物的代谢体系	(121)
第二节 代谢途径的调控	(134)
第三节 代谢流分析	(142)
第六章 微生物的遗传与育种	(177)
第一节 微生物基因组学	(177)
第二节 分子定向进化育种	(196)
第三节 基因组定点编辑技术	(208)
第七章 现代微生物生态学	(228)
第一节 现代微生物生态学的研究方法	(228)
第二节 微生物的多样性与微生物资源利用	(247)
第三节 微生物与生物地球化学循环	(257)
第四节 组学时代的微生物生态学	(279)
第八章 微生物的分类与鉴定	(287)
第一节 细菌种与物种形成	(287)

第二节 微生物分子鉴定技术	(293)
第三节 细菌鉴定实例	(299)
第四节 放线菌鉴定实例	(309)
第五节 酵母菌鉴定实例	(315)
第六节 真菌的分类与鉴定	(320)
第九章 微生物与食品	(326)
第一节 微生物与传统发酵食品	(326)
第二节 食品微生物快速检测技术	(335)
第三节 组学技术在食品安全中的应用	(345)
第四节 宏基因组学在食品工业中的应用	(353)
第十章 微生物与医药	(360)
第一节 抗生素	(360)
第二节 萜类化合物	(370)
第三节 甾体类化合物	(376)
第四节 微生物多糖	(381)
第五节 黄酮类化合物	(391)
第六节 生物活性肽	(395)
第七节 微生物产生的酶及酶抑制剂	(396)
第十一章 微生物与环境保护	(398)
第一节 环境微生物监测技术	(398)
第二节 微生物与水污染	(405)
第三节 微生物与大气污染	(414)
第四节 微生物对环境污染物的降解	(416)
第五节 微生物修复技术	(435)
第十二章 微生物与能源	(440)
第一节 生物质预处理及水解微生物	(440)
第二节 微生物与燃料乙醇	(450)
第三节 微生物与生物柴油	(455)
第四节 微生物与沼气发酵	(462)
第五节 微生物与生物制氢	(470)
第六节 微生物燃料电池	(479)
第十三章 微生物与农业	(486)
第一节 微生物农药	(486)
第二节 微生物肥料	(500)
第三节 微生物饲料	(508)
参考文献	(515)

第一章 绪 论

微生物是形体微小、结构简单的微小生物的总称,包括无细胞结构的病毒、亚病毒因子(卫星病毒、卫星 RNA、朊病毒和噬病毒体等),原核生物的真细菌和古生菌,真核生物的真菌(酵母菌、霉菌和蕈菌等),单细胞藻类和原生动物。其本身的形体微小、种类繁多、代谢类型多样、生长繁殖迅速、容易变异、抗逆性强、分布广泛等特点,决定了微生物成为生物学研究的“明星”。自 20 世纪 40 年代以来,微生物学很快与生物学主流汇合,并被推到了整个生命科学发展的前沿,获得了迅猛的发展。微生物学在医学、农业、能源、气候变化、环境和生态等方面的重要作用已获得学术界的广泛共识,并将为解决 21 世纪人类所面临的资源耗竭、环境污染、人口猛增等问题做出巨大的贡献。

微生物学通常处于新技术发明和发展的前沿。生命科学、化学、物理学、数学、信息科学等科学技术的发展和进步,直接促进了微生物学的发展,拓展了其研究内容和应用领域,促进了学科之间的交叉与融合。20 世纪末诞生的组学技术,使微生物学研究发生了革命性的变化,微生物学进入组学研究阶段。组学阶段是信息和知识的大整合时期,生命整体将成为大的研究对象,并为医学、农业、食品等相关学科的更进一步发展提供了新的机遇。

第一节 技术创新促进微生物学的进步与发展

微生物学的发展历史及其在健康和环境等领域取得的令人瞩目的成就,都与大量技术创新密不可分。在微生物学的先驱荷兰人列文虎克 1676 年利用精细制作的显微镜首次观察到细菌之前,微生物学处于长时间的经验摸索阶段。列文虎克发现了细菌,使微生物学进入微生物形态描述阶段。19 世纪中期,巴斯德和柯赫建立了微生物培养技术,在研究微生物及其性质方面发挥了主要作用,其中包括建立微生物与疾病之间的联系;佩特里发明了培养皿,结合琼脂的使用,使纯培养分离成为可能;维诺格拉斯基和贝杰林克发展了富集培养技术,直接促进了自养微生物研究的发展。这些技术创新,标志着微生物学的奠基,使微生物学进入生理生化研究阶段。1953 年,沃森和克里克等由 X 射线衍射结构分析提出了 DNA 的双螺旋结构模型,至 1995 年完成首个自由生活嗜血流感杆菌(*Haemophilus influenzae*)的全基因组测序,是微生物遗传及分子微生物学研究阶段。在该阶段,出现了许多促进生命科学发展的创新技术,如 20 世纪 70 年代吉尔伯特和桑格分别提出了化学降解法和酶合成法 DNA 测序技术,伯格和科恩等的工作标志着基因工程技术诞生,1982 年穆利斯提出聚合酶链式反应(PCR)技术,1989 年提出微阵列雏形等。大量生物包括微生物全基因组序列的测定,特别是 2001 年完成人类基因组全序列测定,促进了基因组学进入功能基因组学研究阶段。2005 年以后诞生的高通量测序技术,极大地降低了测序成本,提高了测序速度,直接促进了基因组学、代谢组学、转录组学、蛋白质组学、宏基因组学等相关组学技术与学科的发展及应用,使微生物学进入一个全新的“组学”发展阶段(图 1-1)。

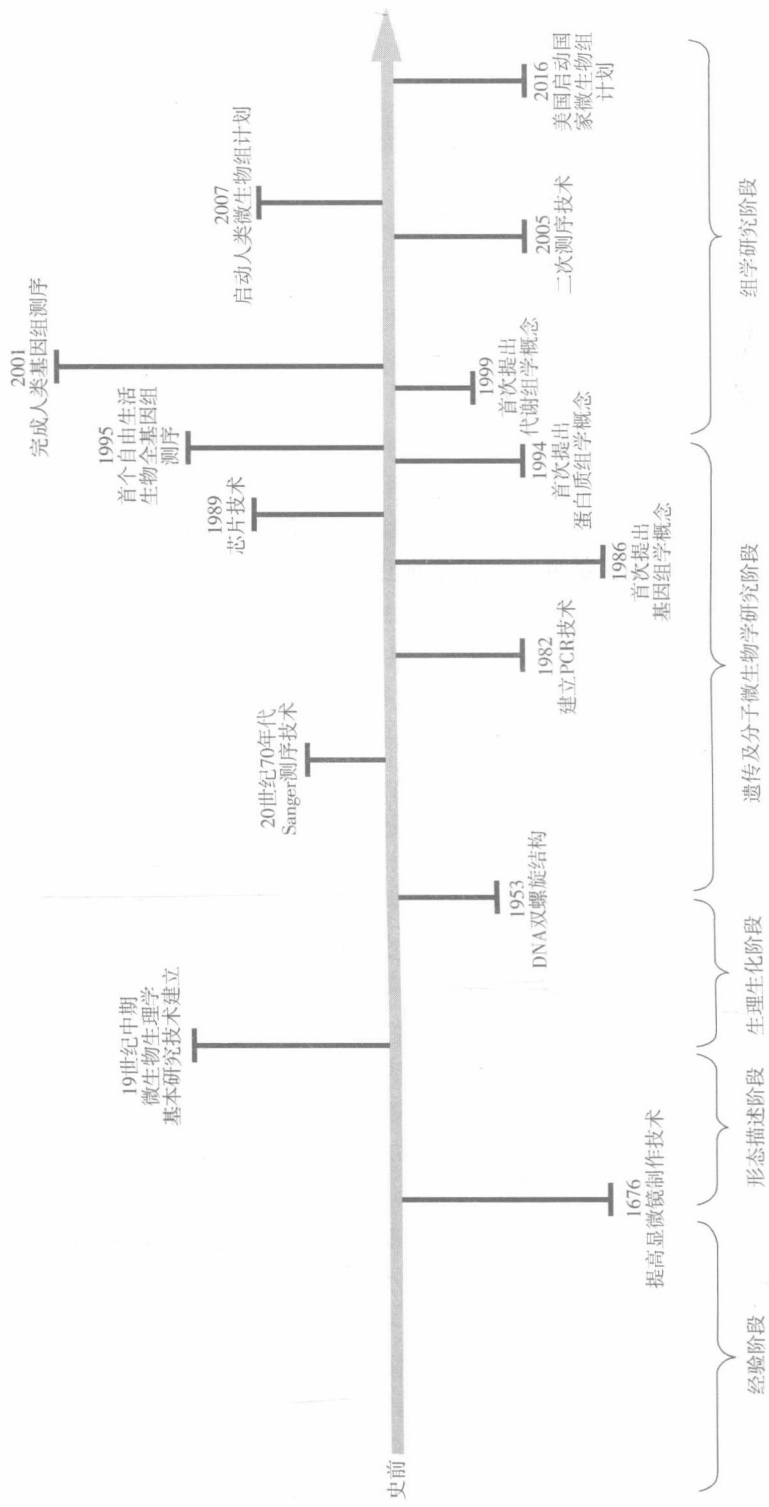


图1-1 技术创新推动了微生物学的发展

第二节 微生物学研究技术

一、显微技术

微生物形体微小,对微生物个体和细胞的研究,离不开显微技术。显微技术包括精确使用显微镜、精心制作标本片和科学采集与处理图像技术。

1. 光学显微术

光学显微镜以可见光为成像介质,有效放大倍数为 1000 ~ 1500 倍,能分辨的两点之间最小距离为 $0.2\mu\text{m}$ 左右。此外,相差显微镜可以观察活细胞或未染色标本,能更清晰地观察到活细胞的细微结构;暗视野显微镜可用来鉴别各种死活酵母细胞,对于梅毒螺旋体等娇弱微生物的观察也特别有用;多种荧光显微镜,如发光二极管荧光显微镜、结构光照明荧光显微镜、全内反射荧光显微镜等,在特异性荧光染色后,可用于观察细菌拟核、真核生物细胞核等细胞器,区分原生质体,还可普遍应用于免疫学、环境微生物学和分子生物学的相关研究。

2. 电子显微术

扫描电子显微镜以聚焦电子束在试样表面逐点扫描成像。试样为块状或粉末颗粒,成像信号可以是二次电子、散射电子或吸收电子。扫描电镜制样方法简单,可以观察直径大到 30mm 的大块试样;场深大,适用于粗糙表面和断口的分析观察;图像富有立体感、真实感,易于识别和解析;放大倍数一般为 15 万 ~ 20 万倍,最大可达 10 万 ~ 100 万倍;分辨率一般为 2 ~ 6nm,最高可达 0.5nm;可以通过电子学方法有效地控制和改善图像的质量,可在荧光屏上同时观察不同放大倍数的图像或不同形式的图像;可进行多种功能的分析,如与 X 射线谱仪配接可进行微区成分分析,配有光学显微镜和单色仪等附件时可观察阴极荧光图像和进行阴极荧光光谱分析等;结合冰冻蚀刻技术,可观察亚细胞结构。

透射电子显微镜利用透过样品的电子束成像,分辨率可达 0.1nm。透射电镜镜筒中要求高真空,用电磁圈使电子束汇聚、聚焦,用显示屏来显示或用感光胶片做记录,样品需要超薄切片。电子显微镜的发明,有力地促进了微生物个体、细胞、亚细胞等水平的研究。

冷冻电子显微术是结构生物学研究的重要技术手段,其解析生物大分子及细胞结构的核心是透射电子显微镜成像,基本过程包括样品制备、透射电子显微镜成像、图像处理及结构解析等几个基本步骤。可以采取不同的显微镜成像及三维重构方法。目前使用的主要几种冷冻电子显微学结构解析方法包括电子晶体学、单颗粒重构技术、电子断层扫描重构技术等,分别针对不同的生物大分子复合体及亚细胞结构进行解析。

3. 扫描隧道显微术

扫描隧道显微镜利用量子力学的隧道效应和三维扫描,用一个极细的尖针(针尖头部为单个原子)去接近样品表面,当针尖在不到一个纳米的高度上扫描样品时,此处电子云重叠,外加一电压(2mV ~ 2V),针尖与样品之间产生隧道效应而有电子逸出,形成隧道电流。电流强度和针尖与样品间的距离呈函数关系。当探针沿物体表面按给定高度扫描时,因样品表面原子凹凸不平,使探针与物质表面间的距离不断发生改变,从而引起电流

不断发生改变。将电流的这种改变图像化即可显示出原子水平的凹凸形态。扫描隧道显微镜的分辨率很高，横向为 $0.1 \sim 0.2\text{nm}$ ，纵向可达 0.001nm 。固态、液态和气态物质均可进行观察。原子力显微镜、激光力显微镜、弹道电子发射显微镜、光子扫描隧道显微镜以及扫描近场光学显微镜等都属于扫描隧道显微镜。原子力显微镜利用原子之间的范德华力作用来呈现样品的表面特性。利用扫描隧道显微镜可直接观察生物大分子，如 DNA、RNA 和蛋白质等分子的原子布阵，和某些生物结构如生物膜、细胞壁等的原子排列。

4. 扫描电化学显微术

扫描电化学显微术是一种分辨率介于普通光学显微镜与扫描隧道显微镜之间的电化学现场检测新技术。它通过超微电极（探针）靠近基底或在靠近基底的区域内移动时产生的电流信号来研究体系电化学性质及基底形貌。用电流法和电位法（离子选择电极）可观察人工或天然生物体系，如 DNA 与小分子相互作用、生物酶活力的分布、原生质光合作用、抗原抗体作用、活细胞研究及媒介反应动力学等。

5. 激光共聚焦显微术

激光共聚焦显微镜由荧光显微镜、扫描、计算机控制 3 部分组成。利用激光束经照明针孔形成点光源，对标本内焦平面的每一点进行扫描，标本上的被照射点在探测针孔处成像，由探测针孔后的光电倍增管或冷电耦器件逐点或逐线接收，迅速在计算机监视器屏幕上形成荧光图像。激光共聚焦显微镜以极高的分辨率对较厚标本的细节进行观察，可对溶酶体、线粒体等亚细胞以及细胞骨架、DNA、RNA、酶和受体分子等细胞特异结构的含量、组分及分布进行定性、定量、定时及定位测定，并能重建三维图像，在医学、动物学、生物化学、微生物学、细胞生物学、组织胚胎、食品科学、遗传、药理、生理、光学、病理、植物学、神经科学和海洋生物学等学科领域具有广泛的应用。

二、高级质谱技术和代谢组学技术

在诊断微生物学中，采用基质辅助激光解吸/离子化质谱（matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI-MS）可从血清和组织样品直接测定分子谱，用于病原菌-宿主互作研究和发现潜在的感染标记。它能原位测定组织切片的特异性分子，并进行二维和三维立体分析，达到快速鉴定病原细菌的目的。利用质谱成像（imaging mass spectrometry）技术和实时质谱技术（real-time mass spectrometry），不需繁杂的样品预处理，即可二维和三维分析微生物菌落和群落产生的特异性代谢产物的分布。采用这些方法捕获分子的速度依赖于新的分子可视工具如分子网络（molecular networking）的发展与应用。

代谢组（metabolome）是指一个生物或细胞在特定生理时期内所有低分子质量代谢物的集合（包括代谢中间产物、激素、信号分子和次生代谢产物）。它是细胞变化和表型之间相互联系的核心，直接反映了细胞的生理状态。代谢组学（metabolomics）是对某一生物或生物系统内所有代谢物（通常小于 1ku ）进行定性和定量分析的一门科学，能够为进一步了解相关代谢途径及其变化提供关键的信息。代谢组学的概念普遍认为是英国帝国理工大学的 Nicholson 教授于 1999 年提出来的。目前，微生物代谢组学已被广泛应用于不同的研究领域，如生物医药开发、环境污染物降解途径、特定环境中微生物的鉴定、诱变育种、功能基因研究、代谢工程和发酵工程等。代谢组学研究通常包括三个步骤：样品制备

(灭活酶, 胞外和胞内代谢物分离与提取), 联合应用多种分离与鉴定技术如质谱 (MS)、核磁共振 (NMR)、液质联用 (LC-MS) 和气质联用 (GC-MS) 等分离和鉴定代谢物分子, 以及数据处理和分析。基于 NMR 的方法在表征代谢物结构和量化测定方面无与伦比, 而且样品预处理少 (有时候需要完整细胞/个体); 但是其灵敏度要小, 约为质谱方法的 $1/1000 \sim 1/100$, 而且在解析复杂混合物时有局限。LC-MS 在其灵敏度和动态测定方面相对于 NMR 和其他波谱方法如紫外 (UV) 和红外 (IR) 光谱优势明显, 能从包含数千分析物的复杂混合物分辨和鉴定代谢物原态, 复杂分析物丰度变化可达 10000 倍; 但其缺陷是难以有效地测定挥发性代谢物, 而且在代谢物的结构鉴定和绝对量化能力方面有局限。GC-MS 可以量化测定挥发性和不带电荷的代谢物、同质异构化合物 (如糖和脂); 但 GC-MS 需要多种化学衍生化, 因此需要预知目的分子的化学性质。多种高级质谱设备, 如三级四级质谱仪在测定预先指定的分析物中灵敏度较高, 配备高分辨全扫描检测器 (如飞行时间或 Orbitrap 质谱仪) 能无偏差量化已知和未预期代谢物, 通常用于测定其原子组成和经验分子式。

三、高通量测序技术

高通量测序 (high throughput sequencing) 技术区别于传统的桑格 (Sanger) 链末端测序技术, 不需要将模板 DNA 克隆到载体上, 而是首先将 DNA 片段化, PCR 扩增后测序, 因而又称二代测序 (next generation sequencing) 技术。高通量测序采用相对简单的台式技术和有效的文库制备方法, 显著降低了成本、提高了速度、增加了读长。目前, 二代测序主要有如下几种技术。①焦磷酸测序 (Roche 454): 为较早的二代测序技术, 主要原理是往测定体系内加入互补核苷酸, 检测模板序列释放的焦磷酸。该技术的缺点是手工操作时间长, 需要微乳滴 PCR (emPCR) 人工扩增测序文库; 每个碱基的成本较高。罗氏 454 测序系统经过多次升级, 最新一代 454 GS FLX 基因组测序仪将焦磷酸测序原理与微流体技术整合, 配合 Titanium 系列测序试剂, 具有更高的测序通量和更加广泛的灵活性和准确性, 并且保持了新一代测序技术中运行速度快和单序列读长高的优势, 且单一读长的准确性和完整测序结果一致的准确性均有提高。②离子半导体测序 (life technologies ion torrent): 有搭载半导体芯片的 Ion Torrent™ 个人化操作基因组测序仪 (Personal Genome Machine, PGM) 和搭载更先进芯片的高通量 Ion Proton™ 系统平台, 采用边合成边测序技术, 检测随着互补 DNA 的合成而释放氢离子而引起的 pH 的改变。该测序技术成本较低, 但测序特别是同源多聚体错误率较高, 对极端 AT 丰富或 GC 丰富区域的覆盖率较差。③Illumina 测序: 采用边合成边测序的方法, 检测掺入测序序列的核苷酸释放的荧光标记。目前该技术是高通量测序的市场领导者, 错误率和成本均较低; 其缺陷是读本序列稍短, 因而对长测序需要更长时间。最近引入 TruSeq 长读本技术, 可产生长达 10kb 的合成读本 (目前仅有 HiSeq2000/2500 平台)。单分子实时测序 (pacific biosciences) 和纳米孔测序 (oxford nanopore) 等新开发的测序技术也称为三代测序技术, 技术成熟以后将更大地促进生物组学研究。

高通量测序技术的推广应用, 极大地降低了基因组测序的成本。例如, 采用鸟枪法, 基于桑格测序技术, 人类基因组测序耗时 20 年, 花费 30 亿美元才得以完成; 而采用高通量技术进行人类基因组测序, 成本将从 2001 年的 9500 万美元降低到 2013 年的不到 6000

美元。采用高通量测序技术，已经完成了上千种各种生物包括微生物的基因组测序。测序技术和生物信息学、计算工具、设备和数据的分析与注释技术的发展与进步，为微生物学研究带来了革命性的变化。微生物学研究进入“组学”时代。

四、基因组编辑技术

基因组编辑 (genome editing) 是在基因组尺度对细胞进行有效设计与高效改造，如基因组上多个位点同步插入或删除，通过多个代谢分支途径的组合优化和外源代谢路径的大片段基因组整合等，实现全新代谢能力的改造。这种基因组尺度的高效编辑技术主要包括对基因组上多重位点进行同步改写、高效插入、替换或删除、大片段的剪切-粘贴以及自主编辑（即基因组程序性进化）等。

1. 基因组多重位点的同步编辑技术

基因组上多重位点的同步编辑可用于工业微生物组合调控多个酶的表达水平，实现分支路径弱化与主代谢路径强化的同步等，克服多重代谢通量的细胞代谢网络改造的困难。该类编辑技术主要有寡核苷酸介导的基因组多重位点编辑技术，如基于 λ 噬菌体基因 Red 区段的 β -重组蛋白的基因组多重位点自动改造技术 (multiplex automated genome engineering, MAGE) 及在此基础上改进的单链 DNA (ssDNA) 介导的基因组编辑技术，以及选择标记辅助的多重位点编辑技术如 CoS-MAGE 技术等。

2. 双链断裂介导的高效插入、替换和删除

通过自定义人工核酸酶，精确识别并切割基因组特定位点，形成双链断裂，进而通过胞内的 DNA 修复系统实现基因组的编辑，包括锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs) 介导的基因组编辑技术、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 介导的基因组编辑技术、CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein 9) 介导的基因组编辑技术等。

3. 基因组大片段的插入、删除和剪切-粘贴

大片段 DNA 插入或删除技术主要是由位点专一性重组酶和它的特异性识别位点组成，包括最早被识别的 λ 噬菌体溶源性基因组整合系统（整合酶和专一性位点——自身基因组上的 *attP* 位点和宿主基因组上的 *attB* 位点）、P1 噬菌体的 Cre/lox 重组系统、酵母的 FLP/FRT 重组系统等。该类技术包括位点专一性重组酶的基因组编辑技术、二型内含子归巢介导的基因组编辑技术和基因组大片段 DNA 高效编辑技术。

4. 基因组自主编辑

应用基因组进化，近几年开发了一些新的基因组进化技术，以实现基因组自主编辑，如结合原生质体融合的基因组重排技术、改造基因组范围转录调控程序的全局转录因子工程、基因组复制机器工程辅助的连续进化以及环境条件诱导的适应性进化策略等。

第三节 “组学”时代的微生物学

一、微生物“组学”研究概述

微生物“组学”包括基因组学、宏基因组学、转录组学、元转录组学、蛋白质组学、

元蛋白质组学、代谢组学、糖组学、脂质组学和人体微生物组学等。

1. 微生物基因组学与宏基因组学

近年来,已经完成了数百种模式菌、特殊分布微生物、主要病原微生物、特殊功能微生物等的全基因组测序。微生物基因组学 (genomics) 研究的重点已由结构基因组学 (structural genomics) 向功能基因组学 (functional genomics) 转移。微生物功能基因组学研究不仅要阐明微生物基因组内每个基因的作用或功能,还要研究基因的调节及表达谱,进而从整个基因组及其全套蛋白质产物的结构、功能、机理的高度去了解微生物生命活动的全貌,揭示微生物世界各种前所未有的规律,并使之为人類和社会服务。全面深入的基因组学研究促进了对微生物的起源和进化、适应性等生物学机制的理解。例如,微生物移动基因组 (mobilome, 包括质粒、噬菌体和转座子等的 DNA 序列) 研究揭示了生物之间横向基因转移的普遍性,发现移动遗传因子 (特别是病毒) 不仅显著影响了微生物群落的多样性和进化,而且有力驱动了细胞型宿主适应极端环境的潜力。移动遗传因子在疾病感染、抗生素抗性、细菌共生和外源化学物的生物转化等方面都具有重要作用。

宏基因组学 (metagenomics) 又称元基因组学、环境基因组学、群落基因组学。宏基因组是指环境中全部微生物基因的总和,包含了可培养的和不可培养的微生物的总基因。宏基因组学基于非传统培养方法,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。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,显示了重要的应用价值。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,为功能微生物资源开发利用提供了丰富的研究资源,不仅可用于新药的研发,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具有广阔的应用前景。

2. 转录组学与元转录组学

转录组 (transcriptome) 是特定时间和条件下细胞内所有基因转录的 RNA 总称,包括 mRNA 和非编码 RNA。转录水平的调控是微生物基因表达调控的重要方式。转录组学 (transcriptomics) 采用基于杂交的技术 (DNA 微阵列、DNA 宏阵列)、基于标签的技术 (基因表达系列分析、大规模平行信号测序系统) 和高通量测序技术,从 RNA 水平研究基因表达及其调控规律。其研究内容包括非编码区域功能研究 (noncoding RNA 研究、microRNA 前体研究等)、转录本结构研究 (UTR 鉴定、Intron 边界鉴定、可变剪切研究、起始密码子鉴定等)、基因转录水平研究和全新转录区域研究等。通过转录组分析,能够高通量地获得基因表达的 RNA 信息,并揭示基因表达与某些生命现象之间的内在联系。

元转录组学 (metatranscriptomics) 又称宏转录组学,是一门在整体水平上研究某一特定环境、特定时期群体生物全基因组转录情况以及转录调控规律的学科。它以特定环境中所有微生物的转录产物作为研究对象,通过分析 mRNA 信息得到微生物群落中基因表达与环境之间的关系,已广泛应用于海洋生态系统中的物质循环、微生物物质代谢,以及土壤等复杂系统中微生物群落的结构和功能研究,并在发现新基因、微生物群落分析、微生物

和环境的相互作用、氮素等物质循环的研究中逐渐成为热点。

3. 蛋白质组学与元蛋白质组学

蛋白质组 (proteome) 是指一个组织或细胞中由基因组表达的全部蛋白质。蛋白质组学 (proteomics) 从整体动力学角度分析细胞内蛋白质的修饰状态、表达水平来了解蛋白质之间的相互作用, 从而揭示细胞的活动规律及蛋白质功能。蛋白质组学基于蛋白质分离和质谱鉴定, 从细胞、组织或生物体整体的角度来研究蛋白质组成及变化。蛋白质组学研究不仅弥补了传统方法对单个蛋白质研究的局限性, 而且其研究结果是对基因组学、转录组学的补充和验证。它比基因组学和转录组学更能够代表生物体真实的生命活动规律。根据研究目的和手段的不同, 蛋白质组学可分为组成性蛋白质组学、比较蛋白质组学和相互作用蛋白质组学。组成性蛋白质组学是针对有关基因组或转录组数据库的生物体或组织细胞, 建立其蛋白质组或亚蛋白质组及其蛋白质组连锁群。比较蛋白质组学是以重要生命过程或人类重大疾病为对象, 进行重要生理病理体系或过程的局部蛋白质组分析。相互作用蛋白质组学又称为“细胞图谱”蛋白质组学, 是通过多种先进技术研究蛋白质之间的相互作用, 绘制某个体系的蛋白质。蛋白质组学在微生物基因组注释、新药物开发、工业微生物代谢途径与调控机制阐明、食品微生物安全评估与检测、污染物微生物降解等方面, 具有广阔的应用前景。

元蛋白质组 (metaproteome) 是指特定时间点内环境微生物所有蛋白质的总和。元蛋白质组学 (metaproteomics) 是近年来出现的一种基于蛋白质组学对微生物群落进行研究的新技术, 它对特定环境的所有微生物蛋白质进行即时的、大规模的分析。应用元蛋白质组学技术可大规模研究原位微生物群落的蛋白质表达, 分析生态系统中微生物的功能, 寻找新的功能基因和代谢通路, 为微生物群体的基因和功能多样性研究提供数据。

4. 糖组学与脂质组学

生物体或细胞内的所有糖链称为糖组 (glycome)。糖组学 (glycomics) 是研究糖链组成及其功能的学科, 是基因组学的后续和延伸, 具体内容包括研究糖与糖之间、糖与蛋白质之间、糖与核酸之间的联系和相互作用, 主要研究对象为聚糖。丰富多样的聚糖覆盖了生物有机体的所有细胞, 不仅体现了细胞的类型和状态, 也参与了许多生物学行为, 如细胞发育、分化、肿瘤转移、微生物感染、免疫反应等。聚糖还体现生物和分子的进化作用, 如糖酵解、生物合成的保守性以及核糖的起源等。因此, 糖组学的研究既是覆盖细胞功能、发育、进化等多个方面的基础研究, 同时也在医药、食品等领域具有重要的潜在应用价值。糖组学研究通常包括聚糖组的分离与纯化、糖链组的分离和富集、糖链的结构解析和定量以及糖链的性质和功能研究。根据糖蛋白组、蛋白聚糖组和糖脂组生物化学性质的不同, 可相应采用分步沉淀法、硼酸亲和法、二氧化钛法、亲和层析法、体积排阻法、凝胶过滤层析和柱层析法等进行分离与纯化; 进而通过植物凝集素、亲水色谱和固相萃取等技术富集高纯度且特异性的糖链; 通过凝集素芯片技术、各种生物质谱及其联用并辅以糖链的衍生化标记对糖链进行结构解析, 并应用同位素标记法和代谢标记法对糖链进行相对定量; 最后, 借助糖链结构解析软件工具及糖链相关数据库进行生物信息学分析, 可对糖链的生物学功能进行更全面的解析。

脂质 (lipid) 不仅是构成细胞膜的组成部分和能量储存物质, 而且还在生命活动中发挥着多种重要的生物学功能。作为代谢组学的分支, 脂质组学 (lipidomics) 是系统性研究

生物体、组织或细胞中脂质及与其相互作用分子的一门学科。近年来,脂质组学广泛应用于微生物的表型研究、微生物传染性研究、微生物耐药机制研究、耐药菌生物标志物发现、药物靶点及新药研发、发酵条件优化的机制研究等方面。

5. 人体微生物组学

在人体表面(皮肤)以及与外界相通的腔道如胃肠道、鼻腔、口腔、泌尿生殖道等部位,定植着大量以细菌为主的微生物群落。这些微生物的数量可达人体自身细胞数的10倍以上,其基因数量更多达人体基因数的100多倍。微生物群落在人体内维持一定的动态平衡,参与调节人体的一系列生理生化反应,如免疫调节、食物消化、维生素合成等。人体微生物与诸多人类重大疾病息息相关,如肥胖症、糖尿病、自闭症、过敏症、炎症性肠道疾病、心血管疾病、多种癌症以及抑郁症等大量代谢、精神、免疫系统疾病。因此,人体微生物可能成为干预治疗的最新靶标,从而在这些重大疾病的诊断、分析和治疗上发挥重要作用。人体微生物组(Human microbiome)的概念最早在2001年就提出了,是人体共栖、共生和致病的所有微生物的总称,是人体基因组中不可缺少的组成部分。近年来,随着DNA测序技术的进步,美国、欧盟等开展了一系列微生物组相关的国际性重大项目研究,如美国的人类微生物组项目(Human Microbiome Project, HMP, 2008年至今)和国家微生物组计划(National Microbiome Initiative, NMI, 2016年5月批准)、欧盟的肠道微生物组计划(Metagenomics of Human Intestinal Tract, MetaHIT, 2008~2012年)和地球微生物组项目(Earth Microbiome Project, EMP, 2013年至今)等。微生物组的研究,在揭示生命奥秘和生态圈运动规律等方面具有巨大的理论价值,同时也具有重大的产业价值和生态价值。

二、“组学”时代的交叉和融合学科

各种“组学”技术和学科的涌现和发展,促进生命科学进入“生命组学”时代、大发现时代和大数据时代。在该时代,不仅微生物学内部的诸多分支学科(如微生物生理学、微生物遗传学和微生物生态学等)的界限比较模糊,而且生物学学科下的一些二级学科(动物学、植物学、微生物学和生态学等)的研究技术和内容也逐渐趋于一致。此外也促进了生命科学与其他学科的融合,产生了一些新的交叉和融合学科,如系统生物学、定量生物学和合成生物学等。

1. 系统生物学

系统生物学(systems biology)综合各种组学的方法,通过高通量的实验手段,从转录组、蛋白质组、代谢组等方面多层次、全方位地检测生物体内的生命活动,同时利用生物信息学的方法和手段对相关的数据进行分析及整合,并在此基础上对相关的生命活动进行模拟,以系统地研究和阐明生命活动的规律。系统生物学主要包括如下内容:细胞信号传导系统、基因调控网络、代谢途径、蛋白质相互作用、生物分子标记的发现和药物的筛选、药物效果的建模等。其研究目标是从如下不同层次来理解生命现象。(a)理解系统的结构:如基因调控及生化网络,以及实体构造;(b)理解系统的行为:定性定量地分析系统动力学,并具备创建理论或模型的能力,可用来进行预测;(c)理解如何控制系统:研究系统控制细胞状态的机制;(d)理解如何设计系统:根据明确了理论,设计、改进和重建生物系统。系统微生物学主要集中于微生物代谢途径的研究,通过对代谢途径的分