

生物科学研究方法丛书

# 微生物学方法

中国生物技术发展中心  
中国科学院微生物研究所

编著



科学出版社

生物科学方法丛书

# 微生物学方法

中国科学院微生物研究所  
微生物学方法研究室编

第三版

科学出版社

生物科学研究方法丛书

# 微生物学方法

中国生物技术的发展中心 编著  
中国科学院微生物研究所

主 编 马延和

主要参编人员 (按姓氏汉语拼音排序)

|     |     |                |     |
|-----|-----|----------------|-----|
| 蔡 真 | 董红军 | 付卫平            | 高成华 |
| 高 鹏 | 耿红冉 | 巩伏雨            | 黄英明 |
| 贾开志 | 姜 凯 | 旷 苗            | 李春立 |
| 李 寅 | 柳国霞 | 马贵宏            | 马延和 |
| 孟 姗 | 邱宏伟 | 宋亚团            | 孙际宾 |
| 王 晶 | 王少华 | 王 莹            | 邢建民 |
| 薛燕芬 | 于 波 | 翟 磊            | 张海峰 |
| 张天瑞 | 张延平 | 赵秋伟            | 赵饮虹 |
| 周 成 | 周 杰 | <del>朱林江</del> | 朱泰承 |
| 朱 岩 |     |                |     |

整体校稿

李 寅 张延平 于 波

科 学 出 版 社

北 京  
0991738

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

## 内 容 简 介

微生物学领域正经历跨越式的发展,创新方法层出不穷。本书在总结微生物学发展历程的基础上,重点调研和总结了该学科主要研究领域的新方法、新技术,内容涉及微生物资源发掘、认识、改造、应用等多个方面,尤其关注了工业微生物研究和工业生物技术的最新发展和应用,希望与广大科研人员和科研管理人员一起,共同探讨我国微生物学领域方法创新的目标和重点,以便在科学研究过程更科学地应用这些方法,更理性地设计研究思路。

### 图书在版编目(CIP)数据

微生物学方法 / 中国生物技术发展中心,中国科学院微生物研究所编著;马延和主编. —北京:科学出版社,2012.9

(生物科学研究方法丛书)

ISBN 978-7-03-035586-7

I. 微… II. ①中…②中…③马… III. 微生物学-研究方法 IV. Q93-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 221818 号

责任编辑:邹梦娜 / 责任校对:包志虹

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

装 订 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2012 年 9 月 第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012 年 9 月第一次印刷 印张:13 1/2

字数:319 000

定价:59.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



# 前言

微生物学(microbiology)是生物学的分支学科之一。它是在分子、细胞或群体水平上研究各类微小生物(细菌、放线菌、真菌等)的形态结构、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。

自古以来,人类在日常生活和生产实践中,已经觉察到微生物的生命活动及其所发生的作用。17世纪,荷兰人列文虎克用自制的简单显微镜(可放大160~260倍)观察牙垢、雨水、井水和植物浸液后,发现其中有许多运动着的“微小动物”,并用文字和图画科学地记载了人类最早看见的“微小动物”——细菌的不同形态(球状、杆状和螺旋状等)。1838年,德国动物学家埃伦贝格在《纤毛虫是真正的有机体》一书中,首次创用bacteria(细菌)这一词。随着人类对生命过程认识的加深,系统认识并利用微生物已成为实现社会可持续发展的最有潜力的领域,在环境治理、能源生产和健康保障等方面发挥着不可替代的作用。

微生物已经有35亿年的进化历史,可存在于任何环境。微生物适应环境的广泛性和生命策略的多样性,为人类社会发展和文明进步提供了无穷的物质源泉,也为人类社会的可持续发展和科学进步提供了崭新模式。微生物代谢类型多样,可塑性强,能利用任何形式的物质和能量,几乎参与了地球有机化学反应的全部过程。微生物具有卓越的化学合成能力,几乎能合成地球上所有的化学品,其次级代谢产物的化学结构和生物活性多样。利用生命科学和生物技术的最新发展,充分发掘自然微生物资源的潜力,对推动生物产业的发展、提升科技创新和竞争能力将做出重要贡献。

尽管人类对微生物的利用已有几千年的历史,现代微生物学也经历了一个多世纪的发展,但至今,为人们所认识的微生物种类仅占自然界中微生物总数的1%~5%,获得开发利用的则更少。因此,微生物可能是地球上最大的、尚未有效开发利用的自然资源。自20世纪90年代以来,微生物学领域正经历跨越式的发展,对微生物的认识步步深入,在微生物资源发掘、认识、改造、应用等各个方面的创新方法层出不穷。这些新技术、新方法的利用,对发掘和利用微生物资源、推动微生物学科发展已经产生巨大影响。因此,非常有必要适时总结最新技术发展,认真总结不同方法的优点和缺陷,找准技术进步的方向,不断完善方法,坚持创新和发展之路,推动微生物学研究的更大进步。

应中国生物技术发展中心之邀,我们邀请从事微生物学研究的一线科研人员,整理出微生物学领域的主要技术发展历程,对微生物学研究主要领域的新方法、新技术进行了调研和总结。微生物学涉及领域非常广,方法创新蓬勃发展,以一书之力难概全局。本书力求在微生物资源发掘、认识、改造和应用等领域给读者一些“面”上的认识。不同于《分子生物学手册》、《基因工程手册》等书籍在“点”上对方法的具体介绍,本书力求在所涉及的各个领域都形成由浅入深、由简单到复杂的逻辑主“线”,汇总成微生物学研究方法的“面”,帮助科研人员和科研管理人员更系统的了解微生物学技术的发展,在科学研究过程中更科学地应用这些新方法,更客观地评价研究思路和技术。

由于编写时间紧迫和编者水平所限,书中难免有疏漏或不当之处,敬请广大读者不吝指正并提出宝贵意见。

编写组全体人员

2012年3月12日

# 目 录

## 前言

## 第一篇 历史篇 微生物学领域技术的发展历程和规律

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| 第一章 微生物学发展历程(总论)               | (1)  |
| 第二章 研究思路的发展历程(方法论的角度)          | (6)  |
| 第一节 微生物培养                      | (6)  |
| 第二节 分子水平研究                     | (7)  |
| 第三节 组学水平研究                     | (10) |
| 第三章 研究手段的发展历程(技术原理的角度)         | (13) |
| 第一节 微生物培养技术                    | (13) |
| 第二节 微生物分子操作技术                  | (17) |
| 第三节 微生物组学分析技术                  | (25) |
| 第四章 仪器设备的发展历程(工具的角度)           | (30) |
| 第一节 微生物研究显微镜的发展历程              | (30) |
| 第二节 微生物生物反应器的发展                | (33) |
| 第三节 微生物代谢物检测仪器的的发展             | (34) |
| 第四节 微生物分子操作仪器的发展               | (41) |
| 第五节 微生物高通量分析/检测仪器的的发展          | (43) |
| 第五章 微生物学技术方法演进案例的剖析与启示         | (47) |
| 第一节 微生物改造:从传统物化因子诱变育种到代谢工程定向改造 | (47) |
| 第二节 微生物资源发掘:从培养技术到非培养技术和宏基因组   | (53) |
| 第六章 学科交叉对微生物学技术方法发展的作用         | (61) |
| 第一节 物理学在微生物学发展中的作用             | (61) |
| 第二节 化学在微生物学发展中的作用              | (62) |
| 第三节 机械学在微生物发展中的作用              | (66) |
| 第四节 信息学在微生物发展中的应用              | (67) |
| 第五节 数学在微生物发展中的应用               | (69) |

## 第二篇 方法篇 微生物学领域主要创新方法汇编

|                            |      |
|----------------------------|------|
| 第一章 微生物的分离与纯化              | (71) |
| 第一节 微生物的快速筛选技术             | (71) |
| 第二节 微生物的新型鉴定技术             | (73) |
| 第三节 微生物分类的技术方法             | (75) |
| 第二章 微生物显微成像技术              | (82) |
| 第一节 不同显微成像技术的工作原理、优缺点及使用对象 | (82) |
| 第二节 光学显微成像技术的最新发展          | (85) |

|     |                              |       |
|-----|------------------------------|-------|
| 第三节 | 电子显微成像技术的最新发展 .....          | (92)  |
| 第四节 | 重要应用举例 .....                 | (95)  |
| 第三章 | 微生物发酵培养技术 .....              | (99)  |
| 第一节 | 发酵过程在线监测与控制技术 .....          | (99)  |
| 第二节 | 微培养技术 .....                  | (101) |
| 第三节 | 计算流体力学技术 .....               | (103) |
| 第四章 | 微生物菌种选育 .....                | (105) |
| 第一节 | 传统诱变的优点与局限 .....             | (105) |
| 第二节 | 微生物代谢网络改造主要创新技术 .....        | (106) |
| 第三节 | 微生物改造全局扰动技术 .....            | (114) |
| 第五章 | 微生物酶分子改造技术 .....             | (124) |
| 第一节 | 理性设计的原理与发展 .....             | (124) |
| 第二节 | 定向进化的原理与发展 .....             | (127) |
| 第三节 | “理性进化”的原理和发展 .....           | (136) |
| 第六章 | 微生物大分子及代谢物的检测、分离与纯化技术 .....  | (141) |
| 第一节 | 微生物大分子及代谢物检测技术的发展及其原理 .....  | (141) |
| 第二节 | 微生物大分子及代谢物分离纯化技术的发展与原理 ..... | (145) |
| 第三节 | 高灵敏性、高通量特点的代谢物检测技术 .....     | (154) |
| 第七章 | 微生物计算生物学技术 .....             | (158) |
| 第一节 | 计算生物学在微生物学研究中的应用与发展 .....    | (158) |
| 第二节 | 生物信息学在微生物学研究中的应用与发展 .....    | (159) |
| 第三节 | 微生物系统模拟与仿真 .....             | (163) |
| 第四节 | 计算结构生物学在微生物学研究中的应用与发展 .....  | (166) |
| 第八章 | 微生物组学技术 .....                | (168) |
| 第一节 | 微生物基因组测序技术的发展 .....          | (168) |
| 第二节 | 微生物基因芯片技术的最新发展 .....         | (177) |
| 第三节 | 微生物蛋白质组技术的最新发展 .....         | (180) |
| 第四节 | 微生物代谢物组技术的最新发展 .....         | (184) |
| 第五节 | 各种微生物组学数据的整合及模型构建及预测 .....   | (187) |
| 第六节 | 成功应用案例 .....                 | (188) |

## 第三篇 战略篇 我国微生物领域技术创新的发展战略

|     |                                      |       |
|-----|--------------------------------------|-------|
| 第一章 | 我国微生物学科和产业发展对技术创新的迫切需求、目标和工作重点 ..... | (192) |
| 第一节 | 微生物学科发展对技术创新的需求 .....                | (192) |
| 第二节 | 我国生物产业发展迫切需要微生物技术创新 .....            | (197) |
| 第三节 | 我国微生物领域技术创新的目标和工作重点 .....            | (200) |
| 第二章 | 我国微生物领域设备创新的需求、目标及工作重点 .....         | (203) |
| 第一节 | 高通量设备 .....                          | (203) |
| 第二节 | 发酵在线监测和控制设备 .....                    | (204) |
| 第三节 | 自动化取样分析一体化设备 .....                   | (205) |
| 第四节 | 高通量微型生物反应器系统 .....                   | (206) |

# 第一篇 历史篇

## 微生物学领域技术方法的发展 历程和规律

### 第一章

#### 微生物学发展历程(总论)

人类最早认识微生物仅仅是一个朦胧阶段,大多是凭借实践经验利用微生物的有益活动(进行酿酒、发面、制酱、酿醋、沤肥等)。随着人类社会科学技术的不断进步,微生物学领域的发展经历了形态描述、生理水平研究、生化水平研究和分子生物学水平研究的阶段,不断交叉发展并持续至今。随着基因组学、系统生物学和合成生物学的飞速发展,现代微生物学也逐渐进入了一个组学与系统研究的新发展阶段,在不远的将来,还将实现人工半合成与全合成的微生物。

在现代科学中,对人类健康关系最大、贡献最为突出的莫过于微生物学。微生物学从建立之初就与人类和动物传染病的防治产生了解之缘,可以说,微生物学的发展促进了人类的进步。在基础理论问题研究中,微生物也是最佳的模式生物。历史上自然发生说的否定、糖酵解机制的认识、基因与酶关系的发现、突变本质的阐明、核酸是一切生物遗传变异的物质基础的证实、操纵子学说的提出、遗传密码的揭示、基因工程的开创、PCR(DNA 聚合酶链式反应)技术的建立、真核细胞内共生学说的提出等,都是选用微生物作为研究对象而取得的重大成果。随着认识微生物能力的不断提高,人类利用微生物的技术能力也不断提升。新技术也不断促进核心“生物工具”的进步,生物炼制与生物质转化、生物催化与生物加工、现代发酵等现代生物制造技术不断取得重大创新和产业应用,对工业基础原材料的化石原料路线替代、传统工业的工艺路线替代以及生物产业升级显示了巨大的推动作用。

#### 一、微生物的形态描述阶段

微生物是生物中一群重要的分解代谢类群,它们是地球上最早出现的生命形式,迄今已有 35 亿年的进化历史,其生物多样性在维持生物圈和为人类提供广泛而大量的未开发资

源方面起着主要的作用。微生物可存在于任何环境,代谢类型多样,可利用任何形式的物质和能量,从无机小分子到有机高分子化合物,几乎无所不被其所利用;从太阳辐射,到光合作用产生有机化学物,到地表深处的矿物质,微生物参与了地球有机化学反应的全部过程。

由于微生物个体过于微小、群体外貌不显、种间杂居混生以及形态与其作用的后果之间很难被人认识等,初期成为一个难以认识的微生物世界。直至 1676 年,列文虎克发明了显微镜,观察到了微生物的个体,也对一些微生物进行了初步的形态描述,而成为微生物学研究的先驱者。显微镜发明之后,组织学和细胞学也就相应地建立起来。电子显微镜的使用,进一步使表现形态描述深入到超微结构的领域。微生物资源是人类赖以生存和发展的重要物质基础和生物技术创新的重要源泉。没有微生物的活动,地球上的生命是不可能存在的。现在的形态学早已跳出单纯描述的圈子,形态学的研究也越来越与微生物机能研究结合起来,通过研究微生物形态分类,进行微生物多样性和微生物资源发掘,帮助揭示极端环境中的生命特征,生命起源和演化,系统发育与进化生物学等重大科学问题。

## 二、微生物生理水平研究阶段

微生物种类繁多,生理类型复杂,就营养和能量转换而论,既有像动物那样异养生活的类群,也有像植物那样进行光合作用的自养类群。另外还有利用化能的自养类群以及与其他生物具有共生或寄生关系的类群。在碳的同化方面,除一般的代谢类型外,微生物还有许多特殊的代谢途径,可以产生有机酸、溶剂、脂肪酸、维生素、多糖等对人类有用的产物,也可代谢氧化烃、芳香族化合物等,从而清除污染环境的物质。另外,微生物还可产生抗生素、色素、毒素、甾体化合物等次级代谢产物。氮的利用方面,微生物有能利用有机氮化物的类群,也有能利用无机氮的类群。固氮菌、根瘤菌、蓝细菌和某些异养菌能够直接同化大气中的氮。微生物的能量产生方式因好氧生活、厌氧生活或兼性生活而有所不同。光合细菌可通过光合磷酸化方式获得能量,好氧菌可由氧化磷酸化获得能量,厌氧菌可由底物水平的磷酸化获得能量。

微生物学的研究从 19 世纪 60 年代开始进入生理水平阶段,法国科学家巴斯德对微生物生理学的研究为现代微生物学奠定了基础。从此,微生物学作为一个学科真正开始建立。随着科技的进步,微生物生理学的研究也不断面临着一些重大科学问题的挑战:包括①细胞中的生物化学转化、能量的产生和转换的机制;②生物大分子的结构与功能(核酸与蛋白质的合成、遗传信息的传递以及膜的结构和功能等)的关系;③分子水平上的形态建成、分化及其行为等。近年来,微生物生理学的研究扩展到了新的或过去不引人注意的微生物类群和可再生能源方面。极端环境中的微生物为了适应生存,逐步形成了独特的结构、生理机能和遗传因子,以适应环境。它不仅在生命起源、系统进化等方面给了人们许多重要的启示,而且极端微生物特殊的基因类型、生理机制及代谢产物,具有极大的应用价值。这将使某些新的生物技术手段成为可能,极大地推动生物技术的发展。目前,极端微生物已成为国际研究的热门领域,日本、美国、欧洲等国都启动了极端微生物的研究计划,进行新物种的发现、新产物的研究与生产、酶的结构与功能及其基因的克隆表达和基因组分析等研究,瞄准解决酶适应机制的分子基础及遗传原理等方面科学问题。特别值得一提的是,极端微生物产生的极端酶在极端的条件下具有高的活性和稳定性,而传统酶工业中的酶在应用的过程中经常会表现出不稳定性,尤其是在高温、强碱、强酸等极端环境下易出

现失活状态,这使酶工程的应用范围有一定的局限性,极端酶正好弥补了这方面的缺陷。这使得这类特殊的酶成为现代酶学微生物学研究的焦点,极端微生物酶的研究将会成为酶学研究和微生物资源开发利用的新方向。通过微生物生理机制的研究,尤其是极端微生物,包括部分极端古菌的研究,将逐步加深我们对生命科学基础理论的认识水平。

### 三、微生物生化水平研究阶段

20 世纪以来,生物化学和生物物理学向微生物学渗透,再加上电子显微镜的发明和同位素示踪原子的应用,推动了微生物学向生物化学阶段的发展。1897 年德国学者认识了酵母菌酒精发酵的酶促过程,将微生物生命活动与酶化学结合起来。随后的微生物学者对微生物代谢的研究以及比较生物化学的研究,发现了微生物代谢的统一性,阐明了生物体的代谢规律和控制其代谢的基本原理,普通微生物学开始形成。在控制微生物代谢的基础上扩大利用微生物,发展酶学,推动了微生物生物化学的发展。微生物的生长繁殖主要依赖于两种代谢途径,即分解代谢与合成代谢。微生物通过分解代谢将从环境中吸收的各种碳源、氮源等物质降解,为细胞的生命活动提供能源和小分子中间体。分解代谢包括各种中心途径如 TCA,EMP 和 HMP,以及外周途径(指其他碳源、氮源物质通过分解后进入中心途径)。微生物的合成代谢是利用分解代谢的能量和中间体合成氨基酸、核酸等单体物质,及蛋白质、核酸、多糖等多聚物。因此,微生物的分解代谢与和合成代谢是相互关联、相互制约的,成为其生命活动的基础。阐明代谢调控机制成为微生物学领域的一个重大科学基础问题。多年的研究发现,微生物在生产过程中机体内的复杂代谢过程是互相协调和高度有序的,并对外部环境的改变能够做出反应。其原则是经济合理的利用和合成所需的各种物质和能量,使细胞处于平衡生产状态。

研究微生物的代谢调节具有极为重要的意义。在工业上,可对微生物的代谢途径加以控制,打破微生物原有的代谢调控系统,满足生产的需要。微生物及其代谢产物的多样性,为新抗菌药物的筛选提供了丰富来源。但过去半个多世纪以来的药物筛选还只触及到其中很小的一部分,而对海洋微生物和极端微生物的研究更少,因此,新型抗菌药物开发尚有十分广阔的前景。通过对微生物进行生化水平上的研究,解决了微生物代谢调控、合成途径等各方面的技术挑战,运用抗生素作用机制、耐药原理和分子药理学与病理学等方面的新成就,创建新的筛选模型,利用高新技术建立自动、快速、高通量的筛选程序;广开菌源,并采用基因工程、细胞工程等技术构建生物工程菌株,运用电子计算机辅助设计和组合化学等手段大量获取新化合物和产品制造新路线。另一方面,能源、资源安全以及日益严重的环境问题迫使我们寻找更加可持续发展的经济发展模式,以降低不可再生的化石资源(石油、天然气、煤、矿物)的快速消耗速度。一个有前景的方法就是逐步将全球经济的大部分转变为可持续的,以生物能源、生物燃料及生物基产品为主要支柱的生物基经济。将经济形态部分或全部调整为以可再生原材料为基础的经济,需要在研究、开发及生产过程中使用全新的理念和方法。微生物代谢调控机制等微生物生物化学领域的重大基础科学问题的突破为实现生物经济提供了理论与技术基础。

### 四、微生物分子生物学水平研究阶段

生物的遗传变异有无物质基础以及何种物质可执行遗传变异功能的问题,是生物科学



中的一个重大的基础理论问题。围绕这一问题,曾有过种种推测和争论。通过生物学家不懈的努力,以确凿的事实证明了核酸尤其是 DNA 才是一切生物遗传编制的真正物质基础。1953 年,沃森和克里克提出了 DNA 分子的双螺旋结构模型和核酸半保留复制学说。富兰克尔·康拉特等通过烟草花叶病毒重组试验,证明核糖核酸(RNA)是遗传信息的载体,为奠定分子生物学基础起了重要作用。其后,又相继发现转运核糖核酸(tRNA)的作用机制、基因三联密码的论说、病毒的细微结构和感染增殖过程、生物固氮机制等微生物学中的重要理论,展示了微生物学广阔的应用前景。

将外源 DNA 通过体外重组后,导入受体细胞,使其在受体细胞中复制、转录、翻译表达的技术称为基因工程或 DNA 体外重组技术。这项在微生物遗传学和分子生物学基础理论上发展起来的技术,不仅是生命科学研究发展的里程碑,也使现代生物技术产业发生了革命性的变化。近年来,微生物基因重组的研究不断获得进展。自 1973 年第一个目的基因重组成功以来,已用微生物细胞表达和生产了许多重组基因产物,包括受体细胞自身原有的和原来不能产生的各种物质。1982 年第一个基因工程产品——人工胰岛素在美国问世,更是吸引和激励了大批科学家投身这一领域的研究和开发,获得了大批的成果,也产生了巨大的经济效益和社会效益。随着基因工程的长足发展,利用基因工程技术改变代谢流,扩展和构建新的代谢途径,或通过关联酶将两个代谢途径连接形成新的代谢途径的研究,早已取得了令人瞩目的进展。这种涉及多个基因的基因工程称为代谢工程或途径工程。通过广泛运用分子生物学理论和现代研究方法,深刻揭示微生物的各种生命活动规律。以基因工程为主导,把传统的工业发酵提高到发酵工程新水平。微生物分子生物学的基础理论和独特实验技术推动了生命科学各领域飞速发展。尤其值得一提的是,微生物基因组的研究促进了生物信息学及组学研究时代的到来。

## 五、现代微生物组学研究 with 系统改造

随着对生物体内部代谢及调控知识的积累和分子生物学技术的进步,人类认识和改造微生物的技术能力也在不断增强。在 20 世纪 90 年代出现了代谢工程(或途径工程)技术。代谢工程一度成为定向改造微生物菌种的热点方法,如上文所述,有很多成功的例子。但是,多年的代谢工程实践也告诉我们,针对途径的操作并不是万能的,生物体是一个比想象更为复杂的系统,特定途径的限速步骤常常位于途径之外。21 世纪初,大规模廉价的基因组测序技术的出现终于为微生物学研究揭开了新的一页。以生物信息学为支撑,基于基因组数据可以迅速重建细胞代谢网络,这为揭示微生物的生理代谢本质提供了一种全新的方法。通过比较基因组分析,可以将研究目标锁定在存在差异的基因及其调控序列上,迅速阐明生理代谢特性的分子机制。功能基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢物组学等,从各个水平为解析生物的生理代谢提供了系统层面的实验数据;序列比对、基因组注释、细胞网络的重建、模拟和预测,从一级序列预测三维结构,从三维结构预测小分子与大分子的相互作用,生物信息学和计算生物学为全面理解生物学数据和设计生物学进程提供了强有力的计算工具;定向进化、蛋白质工程、基因组规模的 knockout 和 knockdown 为重新设计生物催化剂提供了有效的实验手段。为了解决生物制造的原料利用、产品成本与过程效率等相关科技问题,提高我国基础化学品、手性化学品与特殊化学品等有机化学品生物合成的核心竞争力与发展的可持续性,真正实现生物基经济。需要解决生物催化、生物质原料转化、生物分子机器等重要科学问题,为建立高效生物催化技术奠定科学基础。开展微生物

系统生物学与物质代谢的分子基础研究,探索人工生命的构建原理,解决合成生命、人工生物器件、细胞工厂、人工生物叶片等方面的重大科学问题,为解决我国能源、化工、医药和环境等重大需求问题提供原始创新方案。研究复杂生物过程的原理与规律,解决生物过程及其工程化的科学问题,以突破生物工艺过程、食品加工过程、多物种生态工艺过程、污染物生物降解过程等方面的重大科学问题,为建立生物制造过程模式奠定科学基础。

基于基因组信息的代谢和调控网络重构的基因组育种改造技术已取得了一系列突破性的进展。基因组改组技术、系统代谢工程技术、基因组快速进化技术、基因组删减技术、细胞全局扰动技术等微生物基因组育种技术已经引发传统工业微生物育种及发酵产业的革命,大幅度提高生物产品的生产水平。蛋白质工程技术在工业酶蛋白进化、改造等方面发展迅速,正在使更多的生物蛋白质成为可商业化的工业催化剂。合成生物学建立在系统生物学和代谢工程的基础之上,是生命科学发展的必然趋势,它将创造解决生物医药、环境能源、生物材料等重大问题的新“生命”,为产业升级带来新的动力,从根本上改变经济发展模式。合成生物学技术快速发展,使人们有可能按照对生命系统运行法则的认识,以最优化的方式重新编程,甚至合理引入自然界不存在的人造法则,从而构建出全新的“人造微生物体”,突破自然生物体的局限,改变功能材料、工业化学品与药品合成的现有生产模式,开创一个微生物学研究及其应用的新纪元。

执笔:于波

讨论与审核:周成、朱泰承

资料提供:朱林江



## 第二章

### 研究思路的发展历程(方法论的角度)

#### 第一节 微生物培养

从人类有意识地利用微生物以来,微生物培养历经杂菌发酵、纯培养、混合培养以及菌群培养几个阶段,这些技术发展是与对微生物及其群落的认识程度密切相关的,其中,微生物纯培养技术是现代微生物学发展的基础。纯培养(pure culture)是指在同一培养物或一管菌种中,所有的细胞或孢子都是生物分类中的同一个种。严格说,是在培养基上由一个细胞分裂、繁殖所产生的后代。

微生物是一大群种类各异、独立生活、以单细胞或以多细胞群体存在的生物体。因为单独的微生物细胞很小,肉眼是看不到的,所以在自然界中,我们对微生物的认识起始于显微镜的使用。19世纪,显微镜的性能得到改良,随后广泛使用,从而极大的推动了微生物学科的发展,促进了科学工作者深入的研究细胞的秘密。在显微镜下,通过对自然物质如土壤、淤泥、腐烂的食物、患病动物的血液和排泄物等材料的观察,科学工作者发现这些材料中充满了众多的微生物细胞,而其中的一种或几种微生物是导致腐败、疾病、降解等现象的重要原因。为了成功的研究一种微生物引起的这种现象,人们必须确保这一微生物是单独存在于培养基中及纯培养。Koch观察到,固体培养基表面,如马铃薯片,暴露在空气中,然后加以培养时,细菌菌落就会产生并生长,每一个菌落都有一个特定的形状和颜色。他认为不同形状和颜色的菌落来自于不同种类的微生物。当挑取菌落中的细胞涂布到新鲜的培养基表面时,就会出现许多菌落,每个都具有同原有菌落一样的形状和颜色。Koch的这一发现为我们提供了一个简单、快速获得纯培养的方法及纯培养技术。此外,Koch发现在污染的固体培养基上产生的不同菌落(颜色、菌落形态、大小和嗜好)的特征是彼此有别的,来自不同菌落的细胞在显微结构、温度以及营养需求方面也是不同的。Koch敏锐地认识到有机体的这些不同能够有助于微生物分类的研究。Koch这两项极为重要的发现最终导致了微生物鉴定和筛选技术的产生和发展。

但是对微生物进行常规培养时,由于生活条件的改变,有些微生物不能适应而死亡,另一些则通过产生孢子进入休眠状态或改变细胞形态、进入维持一定代谢活性但不生长繁殖的“活的非可培养状态”,结果均表现为微生物的“不可培养性”。实际上,微生物的不可培养性是由于对微生物生长条件及其规律性的认识严重不足,而采取了偏离微生物生长实际情况的培养条件所造成的。由于目前监测技术和手段的限制,人们对微生物生存环境和自然条件的了解尚不充分。因此,人们没有或无法完全模拟微生物的自然生存条件,而通常将培养条件进行简化:将微生物置于恒温、恒湿、黑暗等环境中;将微生物限制在“板结”的琼脂或不扰动的液体介质中;简化微生物的营养组成没有提供微生物生长繁殖所必需的某些化学物质等等。所以在自然界中可以生长繁殖的微生物,在“纯培养”中生长条件得不到满足,从而导致了微生物的不可培养性。

模拟自然环境条件,维持微生物种群间的相互关系是提高环境中微生物可培养性的关键。如可考虑将环境微生物用环境介质混合培养至生长稳定阶段,然后将菌液离心过滤,用上清液作为培养基培养微生物,这些方法由于在培养过程中引入了多种微生物自然分泌的信号分子和促进复活因子,均可较好地强化微生物之间的相互关系,而克服引入单一信号分子的效果有限且操作费时费力的缺点。此外,在培养过程中结合多种培养因素、组合采取多种培养方案来取代模拟一种培养条件的方案,可以获得更多可培养的微生物、取得更高效的培养结果。

## 第二节 分子水平研究

随着对微生物胞内功能单元(核酸、蛋白质)以及信息传递通路的深入理解,目前对微生物的研究已经深入到分子水平,发展了分子生物学、分子细胞学、分子生态学、分子遗传学、分子病毒学等分支领域。

### 一、分子生物学

分子生物学(molecular biology)从分子水平研究生物大分子的结构与功能从而阐明生命现象本质的科学。自20世纪50年代以来,分子生物学是生物学的前沿与生长点,其主要研究领域包括蛋白质体系、蛋白质-核酸体系(中心是分子遗传学)和蛋白质-脂质体系(即生物膜)。生物大分子,特别是蛋白质和核酸结构功能的研究,是分子生物学的基础。现代化学和物理学理论、技术和方法的应用推动了生物大分子结构功能的研究,从而出现了近年来分子生物学的蓬勃发展。

分子生物学和生物化学及生物物理学关系十分密切,它们之间的主要区别在于:①生物化学和生物物理学是用化学的和物理学的方法研究在分子水平,细胞水平,整体水平乃至群体水平等不同层次上的生物学问题。而分子生物学则着重在分子(包括多分子体系)水平上研究生命活动的普遍规律;②在分子水平上,分子生物学着重研究的是大分子,主要是蛋白质,核酸,脂质体系以及部分多糖及其复合体系。而一些小分子物质在生物体内的转化则属生物化学的范围;③分子生物学研究的主要目的是在分子水平上阐明整个生物界所共同具有的基本特征,即生命现象的本质;而研究某一特定生物体或某一种生物体内的某一特定器官的物理、化学现象或变化,则属于生物物理学或生物化学的范畴。

结构分析和遗传物质的研究在分子生物学的发展中做出了重要的贡献。结构分析的中心内容是通过阐明生物分子的三维结构来解释细胞的生理功能。1912年英国W. H. 布拉格和W. L. 布拉格建立了X射线晶体学,成功地测定了一些相当复杂的分子以及蛋白质的结构。以后布拉格的学生W. T. 阿斯特伯里和J. D. 贝尔纳又分别对毛发、肌肉等纤维蛋白以及胃蛋白酶、烟草花叶病毒等进行了初步的结构分析。他们的工作为后来生物大分子结晶学的形成和发展奠定了基础。50年代是分子生物学作为一门独立的分支学科脱颖而出并迅速发展的年代。首先是在蛋白质结构分析方面,1951年L. C. 波林等提出了 $\alpha$ -螺旋结构,描述了蛋白质分子中肽链的一种构象。1955年F. 桑格完成了胰岛素的氨基酸序列的测定。接着J. C. 肯德鲁和M. F. 佩鲁茨在X射线分析中应用重原子同晶置换技术和计算机技术分别于1957和1959年阐明了鲸肌红蛋白和马血红蛋白的立体结构。1965年中国科学家合成了有生物活性的胰岛素,首先实现了蛋白质的人工合成。

另一方面, M. 德尔布吕克小组从 1938 年起选择噬菌体为对象开始探索基因之谜。噬菌体感染寄主后半小时内就复制出几百个同样的子代噬菌体颗粒, 因此是研究生物体自我复制的理想材料。1961 年 F. 雅各布和 J. 莫诺提出了操纵子的概念, 解释了原核基因表达的调控。到 20 世纪 60 年代中期, 关于 DNA 自我复制和转录生成 RNA 的一般性质已基本清楚, 基因的奥秘也随之而开始解开了。

## 二、分子生态学

分子生态学是 90 年代初新兴的一门生态学学科分支, 它一经产生就引起了人们的广泛重视。不同的学者从各自的研究背景出发, 对分子生态学的概念有着不同的理解。Burke 等(1992)和 Smith 等(1993)分别在《分子生态学》(*Molecular Ecology*)的创刊号和第二期首卷的社论中解释了分子生态学的概念。这个概念注重动植物和微生物(包括重组生物体)的个体或群体与环境的关系, 认为分子生态学是分子生物学与生态学有机结合的一个很好的界面。目前较为一致的看法是, 分子生态学是应用分子生物学的原理和方法来研究生命系统与环境系统相互作用的机制及其分子机制的科学, 它是生态学与分子生物学相互渗透而形成的一门新兴交叉学科。其特点是强调生态学研究宏观与微观的紧密结合, 用分子生物学的方法来研究生态学或种群生物学的方方面面, 阐明自然种群和引进种群与环境之间的联系, 评价重组生物体释放对环境的影响。向近敏等(1996)则将分子生态学与宏观生态学和微观生态学对应起来, 认为分子生态学是研究细胞内的生物活性分子, 特别是核酸分子与其分子环境关系的。这个概念强调有生命形式的细胞内寄生物(如分子形式的病毒等)及其有生物学活性的细胞和分子与其相关细胞之间的各种活性分子, 直至分子网络相互作用的生理平衡态和病理失调态的分子机制, 从而提出促进生理平衡和防止病理失调的措施和方法。

从分子生态学的历史来看, 它与群体遗传学-生态遗传学和进化遗传学的关系是密不可分的。这三个学科的研究工作所用的手段既包括 DNA 水平的, 也包括同工酶等水平的。由此可见, 分子生态学并非是生物学术在生态学研究领域中的简单运用, 而是宏观与微观的有机结合。它是围绕着生态现象的分子活动规律这个中心进行的。包含了在生物形态-遗传-生理生殖-进化等各个水平上协调适应的分子机制。

## 三、分子遗传学

分子遗传学(molecular genetics)是在分子水平上研究生物遗传和变异机制的遗传学分支学科。

经典遗传学的研究课题主要是基因在亲代和子代之间的传递问题; 分子遗传学则主要研究基因的本质、基因的功能以及基因的变化等问题。分子遗传学的早期研究都用微生物为材料, 它的形成和发展与微生物遗传学和生物化学有密切关系。

1944 年, 美国学者埃弗里等首先在肺炎链球菌中证实了转化因子是脱氧核糖核酸(DNA), 从而阐明了遗传的物质基础。1955 年, 美国分子生物学家本泽用基因重组分析方法, 研究大肠埃希菌的 T4 噬菌体中的基因精细结构, 其剖析重组的精细程度达到 DNA 多核苷酸链上相隔仅三个核苷酸的水平。

关于基因突变方面, 早在 1927 年马勒和 1928 年斯塔德勒就用 X 射线等诱发了果蝇和

玉米的基因突变,但是在此后一段时间中对基因突变机制的研究进展很慢,直到以微生物为材料广泛开展突变机制研究和提出 DNA 分子双螺旋模型以后才取得显著成果。例如碱基置换理论便是在 T4 噬菌体的诱变研究中提出的,它的根据便是 DNA 复制中的碱基配对原理。美国遗传学家比德尔和美国生物化学家塔特姆根据对粗糙脉孢菌的营养缺陷型的研究,在 40 年代初提出了一个基因一种酶假设,它沟通了遗传学中对基因的功能的研究和生物化学中对蛋白质生物合成的研究。按照一个基因一种酶假设,蛋白质生物合成的中心问题是蛋白质分子中氨基酸排列顺序的信息究竟以什么形式储存在 DNA 分子结构中,这些信息又通过什么过程从 DNA 向蛋白质分子转移。前一问题是遗传密码问题,后一问题是蛋白质生物合成问题,这又涉及转录和翻译、信使核糖核酸(mRNA)、转移核糖核酸(tRNA)和核糖体的结构与功能的研究。这些分子遗传学的基本概念都是在 20 世纪 50 年代后期和 60 年代前期形成的。

分子遗传学的另一重要概念——基因调控在 1960~1961 年由法国遗传学家莫诺和雅各布提出。他们根据在大肠埃希菌和噬菌体中的研究结果提出乳糖操纵子模型。接着在 1964 年,又由美国微生物和分子遗传学家亚诺夫斯基和英国分子遗传学家布伦纳等,分别证实了基因的核苷酸顺序和它所编码的蛋白质分子的氨基酸顺序之间存在着排列上的线性对应关系,从而充分证实了一个基因一种酶假设。此后真核生物的分子遗传学研究逐渐开展起来。用遗传学方法可以得到一系列使某一种生命活动不能完成的突变型,例如不能合成某一种氨基酸的突变型、不能进行 DNA 复制的突变型、不能进行细胞分裂的突变型、不能完成某些发育过程的突变型、不能表现某种趋化行为的突变型等。不过许多这类突变型常是致死的,所以各种条件致死突变型,特别是温度敏感突变型常是分子遗传学研究的重要材料。在得到一系列突变型以后,就可以对它们进行遗传学分析,了解这些突变型代表几个基因,各个基因在染色体上的位置,这就需要应用互补测验,包括基因精细结构分析等手段。抽提、分离、纯化和测定等都是分子遗传学中的常用方法。在对生物大分子和细胞的超微结构的研究中还经常应用电子显微镜技术。对于分子遗传学研究特别有用的技术是顺序分析、分子杂交和重组 DNA 技术。

分子遗传学方法还可以用来研究蛋白质的结构和功能。例如可以筛选得到一系列使某一蛋白质失去某一活性的突变型。应用基因精细结构分析可以测定这些突变位点在基因中的位置;另外通过顺序分析可以测定各个突变型中氨基酸的替代,从而判断蛋白质的哪一部分和特定的功能有关,以及什么氨基酸的替代影响这一功能等等。生物进化的研究过去着眼于形态方面的演化,以后又逐渐注意到代谢功能方面的演变。自从分子遗传学发展以来又注意到 DNA 的演变、蛋白质的演变、遗传密码的演变以及遗传机构包括核糖体和 tRNA 等的演变。通过这些方面的研究,对于生物进化过程将会有更加本质性的了解。

分子遗传学也已经渗入到以个体为对象的生理学研究领域中去,特别是对免疫机制和激素的作用机制的研究。随着克隆选择学说的提出,目前已经确认动物体的每一个产生抗体的细胞只能产生一种或者少数几种抗体,而且已经证明这些细胞具有不同的基因型。这些基因型的鉴定和来源的探讨,以及免疫反应过程中特定克隆的选择和扩增机制等既是免疫遗传学也是分子遗传学研究的课题。分子遗传学研究的方法,特别是重组 DNA 技术已经成为许多遗传学分支学科的重要研究方法。分子遗传学也已经渗入到许多生物学分支学科中,以分子遗传学为基础的遗传工程则正在发展成为一个新兴的工业生产领域。

### 第三节 组学水平研究

20 世纪 80 年代,随着测序技术的发展,基因组学应运而生。1990 年人类基因组计划启动,揭开了基因组学研究的新篇章。随着生物学数据的高速积累,以及数据信息的方便获取,人类从此进入了一个生物学研究的新时代——后基因组时代。分子生物学的研究方式发生了重大的变革,从对单个基因和蛋白的功能研究逐步转向了对生命体全局化系统化的研究。基因组学与转录组学、蛋白质组学、代谢物组学等新兴组学技术一起构成了后基因组时代生物学研究的技术平台。

#### 一、基因组学

基因组学最初被用来描述对基因组进行图谱绘制测序和分析的科学学科。后来这一定义扩展为利用全基因组序列信息和高通量基因组技术,在基因组水平上认识生物系统的结构、功能和进化的分子基础的生物学领域。广义的基因组研究既包括以全基因组测序为目标的\*\*结构基因组学(structural genomics)\*\* ,又包括以基因功能鉴定为目标的功能基因组学(functional genomics),即后基因组(postgenome)研究。其中功能基因组学主要指转录组学、蛋白质组学和代谢物组学,将在以下部分分别予以介绍。

人类基因组计划之初,模式生物的基因组测序也同时启动,以期探讨 DNA 测序的新技术、新方法,以及确定基因功能的表达模式。其中包括我们所熟知的大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等微生物。1995 年,Fleischmann 等采用全基因组随机测序法(whole-genome shotgun sequencing)成功地完成了流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)全基因组序列的测定和组装,为微生物基因组研究翻开了历史性的一页。1996 年酿酒酵母全基因组测序完成,1997 年大肠埃希菌全基因组测序完成,之后许多微生物的序列相继被测定。随着新型测序技术的不断涌现和测序成本不断降低,完成基因组测序的微生物数量呈指数增长。

微生物基因组学不仅推动了人类基因组计划的顺利实施,同时对微生物学,甚至整个生命科学都产生了巨大影响。它为本学科开辟了新的研究领域,提供了新思路和新方法,极大促进了微生物生态,生理和遗传等方面的发展。

#### 二、转录组学

转录组是指一个活细胞所能转录出来的所有 RNA 的总和。转录组学(transcriptomics)就是一门在整体水平上研究细胞中基因转录情况,发现基因转录调控规律的学科。简而言之,转录组学从 RNA 水平研究基因表达情况,是研究细胞表型和功能的一个重要手段。基因在不同条件下的表达状态与其编码产物的功能有很强的相关性,转录调节是控制蛋白质和代谢物细胞水平的重要机制,因此 RNA 水平反映着细胞的生理状态和功能活性的动态变化信息。转录组学的综合分析对研究基因功能,基因表达的调节机制和细胞的生理状态具有重要意义。

与蛋白质和代谢产物相比,RNA 分子可以借助基因芯片杂交,RNA 测序等技术实现大规模的全面综合分析。基因芯片又称为 DNA 微阵列(DNA microarray),它的诞生使得