植物共生菌宏基因组文库探秘

曾 英 王浩鑫

微生物泛指一切肉眼看不到或看不清楚、需要借助显微镜观察的微小生物。虽然微生物个体微小，但是在生物圈中却占有重要地位，它们作为分解者在地球物质循环（如碳循环、氮循环）中发挥着举足轻重的作用。微生物在自然界中无处不在，从寒冷的极地到炎热的沙漠，从几万米的高空到几千米深的海底，从动植物体内到真菌细胞内，凡是我们能够想象到的地方都有它们的踪迹。就拿我们的身体来讲，人体实际上是一个可以移动的微生物的生态系统，手掌心平均有150种不同的细菌，唾液中有600多种细菌，并且这些细菌因人而异。植物也是一种相对复杂的生态系统，一粒种子或者一棵参天大树都有大量不同种类的微生物栖息其中。无论是生活在植物体表还是组织内部，也无论它们与宿主植物的关系如何，这些微生物可以统称为植物共生菌。同其他环境的微生物一样，绝大部分植物共生菌也很难人工培养存活，即未可培养。实际上，自然界中的许许多多的微生物既没有被描述过，更没有被研究过，甚至连名字也没有。然而它们的确存在，生生不息。这些鲜为人知的基因资源像磁石一样吸引了科学家，正是强烈的好奇心和锲而不舍的努力，催生了现代生物技术一枝新的奇葩——宏基因组学。

宏基因组概念的提出是现代基因组学的重要进展，在了解宏基因组之前我们先来介绍一下什么是基因组。基因组是指一个物种的全部DNA信息。基因组是一个抽象概念，由于同一物种内不同个体的遗传信息存在少量差异，所以对个体来说就有了个体基因组的概念。在微生物中将基因组的概念扩展到比物种更高的群落水平，就形成了宏基因组的概念。宏基因组这一名词由Handelsman等人在1998年提出，指的是生境中可培养和未可培养的全部微生物的基因组总和，与这一概念具有相似含义的还有环境基因组、生态基因组和群落基因组。宏基因组包含了群落中不同物种的相互作用信息，摆脱了物种界限，有助于在更高层次上揭示生命规律。在分子生物学的发展过程中，基因文库（包含某种特定的物种或细胞的遗传信息的克隆集合） 作为一个基本技术起到了重要的作用。基因组文库是进行分子克隆和基因组结构与功能研究的基础，通过合适的载体克隆基因组DNA就得到了基因组文库。具体的做法是通过酶切或其他手段将庞大的基因组DNA分解成一个个DNA片段 （几千至几十万个碱基对），再将这些DNA片段分别装入合适的载体

呈球状与杆状的植物共生菌扫描电子显微镜照片

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（可类比为纸张），一起导入合适的宿主菌（通常是大肠杆菌，可类比为书架）中。这样，整个基因组信息就分散在一个个可独立操作的“书架”上，方便了后续研究。理论上，从完整的基因组文库中可获得任意DNA片段。用生境中全部微生物的基因组DNA构建的基因组文库就是宏基因组文库。宏基因组文库是宏基因组学研究的主要手段，它将常规的基因组文库技术用于宏基因组研究中，通过直接提取和克隆环境样品中所有微生物的DNA，对环境微生物进行分析。宏基因组文库技术避开了微生物纯培养的瓶颈，是研究和利用微生物、尤其是未可培养微生物资源的有效途径。

前面提到，在植物的整个生活史以及植物的各个组织器官中都存在种类和丰富度不同的微生物，最典型的当数豆科植物的根瘤，不计其数的根瘤细菌在植物根部安营扎寨，形成一个个瘤状小鼓包，“根瘤”之名由此而来。根瘤细菌在根瘤中央聚集，因此可以直接从根瘤获得较为纯净的根瘤共生菌基因组DNA。然而，绝大多数共生菌在植物体内没有明显的聚集点，与宿主植物相比，植物共生菌的基因组DNA和生物量都非常微小。如果直接提取一克植物材料的基因组DNA构建文库，被视为“污染物”的植物基因组DNA必定以绝对优势掩盖微乎其微的共生菌基因组DNA，这样的文库无疑是一堆“垃圾”。因此，构建植物共生菌宏基因组文库必须首先突破共生菌富集的技术瓶颈，即想方设法从大量的植物材料中富集看不见摸不着的共生菌。经过几百次的实验，我们终于成功创建了独特的植物共生菌富集方法，并在此基础上成功构建了国际上首例植物共生菌宏基因组文库。

植物共生菌的富集过程概括起来有三个步骤：首先是植物共生菌的释放，通过破碎植物组织和细胞，让存在于细胞间隙和细胞内的所有共生菌挣脱束缚，自由而完好无损地来到溶液介质中；接着采用过滤和离心的方法来去除植物残渣、细胞团块以及植物细胞核，此时的共生菌细胞因体小轻微而仍然保留在溶液介质中；最后，也是创新的关键一步，即选择性地去除DNA“污染源”——植物细胞器，包括叶绿体、线粒体和残留的植物细胞核，因为这些细胞器含有大量的植物DNA，可以轻而易举地湮没共生菌DNA的存在。我们的方法是添加一定浓度的电解质（如氯化钠、氯化钙）和表面活性剂（如十二烷基磺酸钠），选择性地裂解和沉淀细胞器，从而达到去除植物细胞器的目的，获得富含共生菌的“富集沉淀”。因为表面活性剂可以在裸露的细胞器表面“打孔”，导致细胞器破裂，而氯化钠等电解质可以加速细胞（器）碎片的共沉淀，通过自然沉降即可去除破碎的植物细胞器。此时，共生菌完好的外壁可以抵御低浓度的表面活性剂，从而继续保留在溶液介质中。对于不同的植物材料，应适当调整电解质和表面活性剂的浓度。采用这种方法，我们从1.6公斤滑桃树茎皮中得到约0.4克共生菌富集沉淀。通过扫描电子显微镜观察，发现富集沉淀中明显存在形似细菌的球状物和杆状物。从这0.4克共生菌富集沉淀中又提取到了20微克DNA，并构建了粘粒文库，文库中88%以上的克隆插入片段来源于原核微生物，有力地证明了这一共生菌富集方法显著有效。

独特而有效的植物共生菌富集方法为植物共生菌的宏基因组研究扫清了第一道障碍，可以想象，地球上几万种高等植物体内难以估计的共生菌资源就此敞开了神秘的大门。植物共生菌宏基因组研究的广泛开展不仅有助于加深理解共生菌与宿主植物的相互作用，还能促进微生物培养技术的进步，最终实现未可培养微生物的纯培养。但是，我们也应该看到，目前宏基因组研究还存在许多技术难题有待克服：首先，筛选方法一直是基因资源开发利用的软肋，现有的筛选方法都存在明显的局限性，或者适用范围太窄，或者难以实现高能量筛选，或因成本太高而难以推广；其次，由于宏基因组研究中的绝大多数微生物目前仍无法获得纯培养，在纯培养技术短期内难以取得突破性进展的前提下，对这些微生物的基因资源及化合物资源进行深入的研究在很多时候仍然是在“碰运气”。虽然宏基因组的深入研究还存在许多障碍，却阻挡不了研究者们进入这一领域的热情，不依赖培养的微生物宏基因组文库作为新颖的基因资源，既是生物技术发展的源泉，也是发现新酶和开发生物催化剂的新途径。生物催化剂被视为21世纪化学工业可持续发展的必要工具，植物共生菌宏基因组文库这一崭新的基因资源，极有可能为生物催化剂的研制提供源头上的创新。

（作者单位：中国科学院昆明植物研究所）

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net