

# 元基因组学技术

—大片段文库的构建

朱雅新

zhuyx@Im.ac.cn

微生物前期开发国家重点实验室

2012-3-29

微生物所十二讲  
测试技术论坛

# 提纲

- \* 直接针对特定生境中宏量生物信息（DNA. mRNA. miRNA. 蛋白等）的研究技术在近年来发展迅速，元基因组技术是重要的基础之一，该技术通过分析微生物种群生态分布、群体遗传特征、特殊环境微生物资源及微生物与人类关系等，已经在地球环境气候科学、生物酶资源、人类健康等方面取得了重要的进展。
- \* 本讲座结合微生物所现有相关的仪器设备及基因资源库，主要介绍元基因组技术的研究方法及进展，讲述大片段文库构建的方法及常见问题的解决方案，探讨基因资源库的选择与构建，开发与利用等。

# 内容提要

---

- \* 元基因组学
- \* 元基因组学的基本策略
- \* 大片段基因组文库
- \* 元基因组文库的筛选
- \* 元基因组测序
- \* 相关的仪器介绍
- \* 微生物所现存元基因组库

# 背景资料

- \* 微生物是地球上生物量（约占总生物量的60%）最大的生物类群，  
The total number of microbial cells on Earth is estimated to be  $10^{30}$  (Turnbaugh, P. J., 2008)
- \* 1985年Staley, J. T., 等发现在实验室能够培养的微生物不能够代表全部的微生物世界。
- \* 1991年Pace 等人首次提出环境基因组学 (Environmental genomics) 的概念，直接提取太平洋浮游生物样品总DNA，构建了第一个噬菌体文库，发现了15种全新的细菌序列。首次报道利用元基因组文库发现新物种。
- \* 1998年Handelsman 等首次将“特定小生境中全部微小生物遗传物质的总和”定义为宏基因组 (Metagenome), the genomes of the total microbiota found in nature”

# 背景资料

- \* 基因组（genome）是生物体内遗传信息的集合，是某个特定物种细胞内全部DNA分子的总和。
- \* 基因组学（genomics）是指研究并解析生物体整个基因组的所有遗传信息的学科。
- \* 基因组计划（Genome Project）是指对人类以及其它生物体全基因组的测序工作（sequencing）。
- \* 人类基因组计划（Human Genome Project, HGP）：90年代提出并已基本完成，同40年代原子弹爆炸，60年代人类登月一起被认为是二十世纪科技发展史上的三大创举
- \* 人类元基因组：与人类共生的全部微生物的基因组总和。

# 元基因组学

## ◎ 元基因组学

又叫宏基因组学（**Metagenomics**）, **Microbial Environmental Genomics**, **Ecogenomics**, **Community Genomics**）它包含了可培养的和未可培养的微生物的基因, 目前主要指环境样品中的细菌和真菌的基因组总和。

◎ 它是采用未培养技术, 通过分子生物学手段, 绕过对微生物进行菌种分离纯培养这一步骤, 直接对环境中的微生物基因资源进行研究和开发的一种方法。

◎ 以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象, 以功能基因筛选和/或测序分析为研究手段, 以微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系为研究目的的新的微生物研究方法

# 元基因组学方法

- 环境样品中的微生物组成的群落构成了一个巨大而复杂的基因库。通过直接从环境样品中提取全部微生物的基因组DNA, mRNA, 克隆到已经培养驯化的宿主生物体中, 构建元基因组DNA、cDNA文库。来研究微生物的生理、生化特性以及环境样品所包含的全部微生物的遗传组成及其群落功能。

Methods and primers used in microbial diversities of soil samples

Samples	Methods	Primers	References
Agricultural soils, forest soil, grassland soil and wetland	Pyrosequencing	492R/787F (V9 region)	Roesch et al. 2007
	Cloning and sequencing	27F/1492R	Bruce et al. 2010
	Microarray, cloning, and sequencing	27F/1492R for bacteria, 1492R/23F for archaea	Cruz-Martínez et al. 2009
	RFLP	27F/1492R	Baik et al. 2008
	DGGE	341F/534R for bacterial 16S rDNA, U1/U2 for fungal 28S rDNA	Kim et al. 2011
Soil from cave	FISH, RFLP	616F/630R and 27F/1492R for bacteria, A112f/A934b as archaeal primers	Engel et al. 2010
	RFLP	27F/1492R for bacteria, Arch21F/1492R and Arch21F/Arch958R for archaea	Chen et al. 2009
Soil from Antarctic	DGGE, RFLP	341fgc/534r, E9F/U1510R for eubacteria	Smith et al. 2006;
	Cloning and sequencing	amoA-1F/amoA-2R for ammonia oxidizing bacteria, 16F27N/16R1525XP for eubacteria	Shravage et al. 2007
Soil from marine	DGGE, RFLP	B341F/907R for bacteria, CYA359F/CYA781R for cyanobacterium, CNF/CNR for the nifH gene, 27F/1392R for bacteria	Diez et al. 2007
	Real-time PCR, Cloning and sequencing	B27F/U1492R for bacteria, A8F/U1492R for archaea, pmoA189-f/mb661-r for pmoA genes	Wasmund et al. 2009
Soil from mine sites and hydrocarbon-polluted place	Cloning and sequencing, microarray	530F/1490R for clone library construction, 8F/1492R and Arch SD21F/1492R for PhylloChip hybridization	Rastogi et al. 2010b
	Cloning and sequencing	530F/1490R	Löhr et al. 2006
	Microarrays	63f/1392r for bacteria, Arch 21F/Arch 958R for archaea,	Rastogi et al. 2010a
	DGGE	341F/907R	Zhang et al. 2010
	DGGE	S-C-Act-235-a-S-20/S-C-Act-878-a-A-19 for Actinobacteria, nu-SSU-0817/nu-SSU-1536 and nu-SSU-0817/nu-SSU-1196 for fungi	Bjorklof et al. 2009

Samples	Objects	Methods	Primers	References
Human	Bacterial diversity of stomach, throat and fecal samples	Pyrosequencing	784F/1061R (region V6)	Andersson et al. 2008
	Bacterial diversity of human nostril and oropharynx	Microarray, cloning, and sequencing	27F/1492R	Lemon et al. 2010
	Bacterial diversity of the healthy individuals' oral cavity	Cloning and sequencing	8FM/1391R	Bik et al. 2010
	Bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis	DGGE	U968/L1401-r (V6 to V8 region)	Delgado et al. 2008
	Bacterial diversity of synovial fluid samples of reactive and other forms of arthritis	Cloning and sequencing	Bac08/Uni1390	Siala et al. 2009
	Bacterial diversity of the periodontitis patients' oral cavity	Cloning and sequencing	27F/519R and 515F/1525R	Hutter et al. 2003
	The distribution of methanogens in the periodontal and endodontic samples from necrotic teeth	qPCR, T-RFLP	ME1/LuR for the mcrA gene	Vianna et al. 2009
	The impact of antibiotics on intestinal bacterial	Pyrosequencing	8-27F/533-515R	Dethlefsen and Relman 2011
		Pyrosequencing, cloning and sequencing	8F/1391R, (967-985F)/(1064-1046R) for V6 region, (338-357F)/(533-515R) for V3 region	Dethlefsen et al. 2008
	The relation between gut microbial ecology and body fat	Cloning and sequencing	8F/1391R	Ley et al. 2005; Ley et al. 2006
	The relation between gut microbial ecology neonatal necrotizing enterocolitis	Cloning and sequencing, T-RFLP	8F/1492R	Wang et al. 2009
	The relation between oral or gut microbiota and atherosclerosis in humans	qPCR, pyrosequencing	27F/338R	Koren et al. 2011
	Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota	Culture-dependent method, DGGE	Euk1a/516r, ITS1F/ITS4R	Scanlan and Marchesi 2008
	The relation between cervicovaginal microbiota and female lower genital tract infections	qPCR, DGGE	341F/534R (V3 region)	Ling et al. 2011
Animal	Bacterial diversity of the oral microbiota of dogs	FISH		Rober et al. 2008
	The development and stability of the genus <i>Bacteriodes</i> in the human flora-associated mice	DGGE	Bfr-F386-405/Bfr-R 593-617 for the genus <i>Bacteriodes</i>	Yuan et al. 2011
	The bacterial diversity of fecal samples from the wild pygmy loris	RFLP	27F/1492R	Xu et al. 2010
	Bacterial diversity of fecal from human-habituated wild chimpanzees	T-RFLP	Bact-27F/Bact-1387R	Szekely et al. 2010
	Bronchopneumonia in free-ranging bighorn sheep	RFLP	27F/805R	Besser et al. 2008
	Biodiversity of larvae and adult midgut microflora	Culture-dependent method, cloning and sequencing	27F/1492R	Rani et al. 2009

# 元基因组学研究的意义

## ① 认识未培养的微生物

- ① 目前研究表明：自然环境中90-99.9%的微生物采用现有培养技术是不能够被培养的，（海水中微生物的可培养性约为0.001%~0.100%、淡水约0.25%、土壤约0.3%、活性污泥为1%~1.5%左右，瘤胃约小于10%）

## ② 研究不同微生物构成的群落及其相互关系,使得认识单元实现从单一基因到基因集合的转变

- ② 微生物通过群落而非单一个体来发挥这些重要功能。水体、土壤、肠道和很多的人工生物环境（如废水处理、食品发酵、堆肥、沼气池，等等）都具有很复杂的微生物群落，这些微生物相互作用、共同协作，一起完成复杂的代谢功能及生命活动。

## ③ 筛选获得新型活性物质

- ③ 元基因组学方法已经应用在ocean surfaces, deep sea vents, hot springs, soil, animal rumen and gut, human oral cavity and intestine等领域。元基因组学在开发微生物资源多样性、筛选获得新型活性物质、发掘与抗生素抗性、维生素合成及污染物降解相关的蛋白质等方面展示了很大的潜力。为解决环境、能源以及健康等几个重大课题提供了一系列的新研究技术和新思路。

## 理论价值

- ◎ 在海洋微生物对于基于视紫质的光合细菌的发现，确认了微生物在海洋碳代谢中的重要地位，从而改写了海洋能量循环的通路。（2000，Science)
- ◎ 海洋微生物中厌氧甲烷氧化细菌和硫酸盐还原菌间就存在共生的关系，并且它们的相互作用还大大减少了全球甲烷的排放量。（2009，PNAS)
- ◎ 其次是对于海洋生态与微生物基因组特征的关系，从多个方面已经证实了微生物在进化中对于环境的适应性可以在基因组中找到印记，如同属一个种的菌在不同的深度它的基因组有适应性变化（如光能自养菌 MIT9313，MED5，SS120之间对于氮利用基因的差别）；海岸线上的微生物对于营养物质利用的多种适应性基因组。深海微生物基因组与透光层对应数据的比较，有较多的趋化因子及主动运输的基因。而少有光合成有关的基因。

# 元基因组学研究的意义

## 活性物质——酶

Marine enzymes discovered from Microbial and Metagenomic sources.

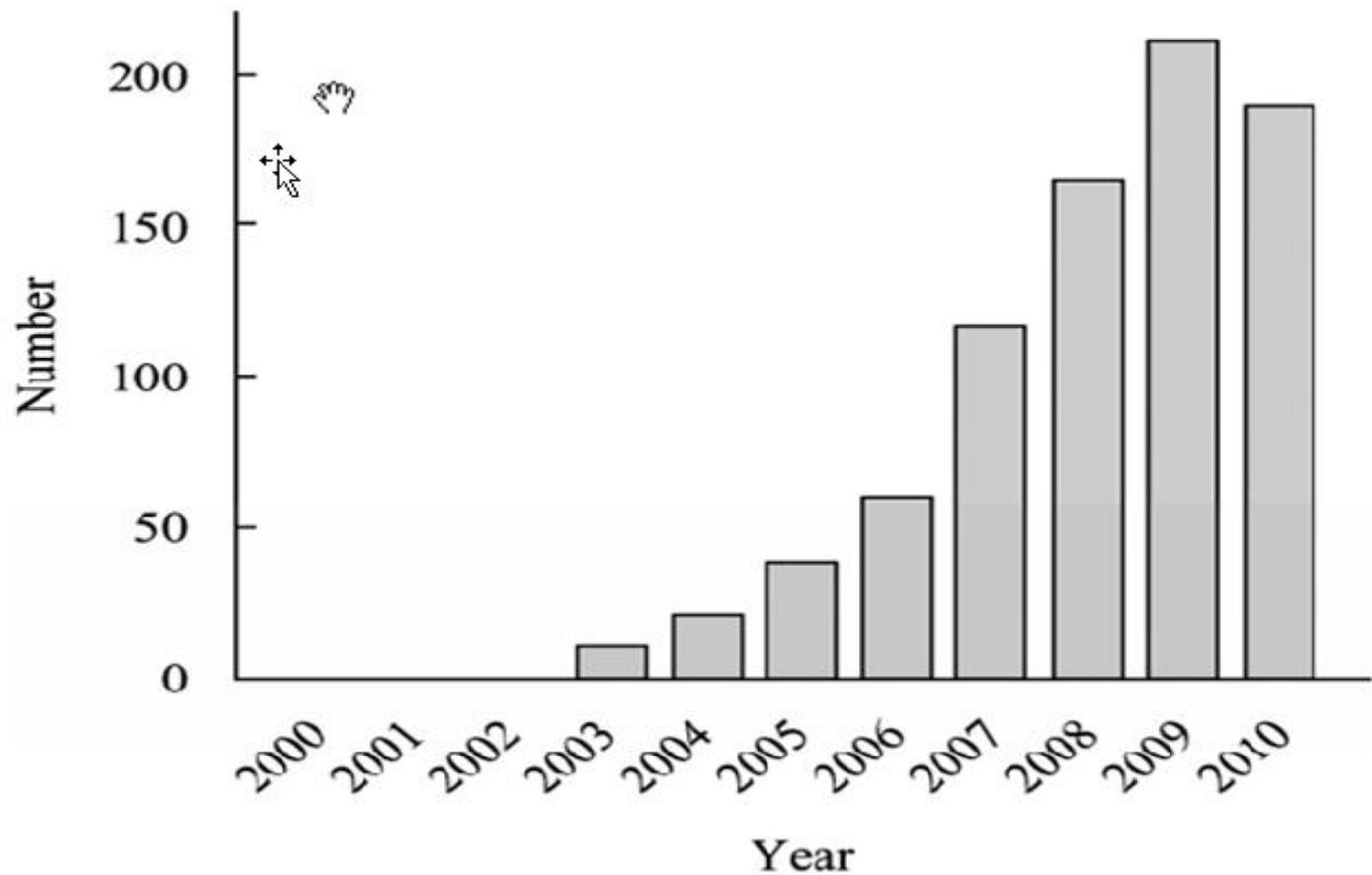
Activity	Source	Habitat	Reference
Esterase	Metagenome	Deep-sea sediment	[97]
	Metagenome	Deep-sea basin	[72]
	Metagenome	Surface seawater	[69]
	Metagenome	Arctic sediment	[98]
	<i>Vibrio</i> sp.	Sea Hare Eggs	[99]
	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Antarctic Seawater	[71]
Lipase	Metagenome	Tidal Flat	[74]
	Metagenome	Deep Sea sediment	[75]
	Metagenome	Baltic Sea sediment	[67]
	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125	Antarctic Seawater	[73]
	<i>Aureobasidium pullulans</i> HN2.3	Sea saltern	[100]
Cellulase	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. DY3	Deep-sea sediment	[77]
	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Antarctic Seawater	[78]
	<i>Teredinibacter turnerae</i> T7902T	Shipworm	[79]
	<i>Marinobacter</i> sp. MSI032	Marine sponge	[76]
Chitinase	Metagenome	Estuary	[80]
	<i>Arthrobacter</i> sp. TAD20	Antarctic ice	[101]
	<i>Rhodothermus marinus</i>	Marine hot spring	[81]
Amidase	Metagenome	Marine sediments / sludges	[102]
Amylase	<i>Aureobasidium pullulans</i> N13d	Deep-sea sediment	[103]
	Metagenome	Deep sea hydrothermal vent	[66]
Phytase	<i>Kodomaea ohmeri</i> BG3	Fish gut	[104]
Protease	<i>Pseudomonas</i> strain DYA	Deep-sea sediment	[105]
	Marine bacterium	Antarctic Seawater	[106]
	<i>Aeropyrum pernix</i> K1	Coastal solfataric vent	[107]
Alkane hydroxylase	Metagenome	Hydrocarbon seep	[82]
	Metagenome	Deep sea sediment	[68]
Xylanase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Antarctic Seawater	[108]

# 元基因组学研究的意义

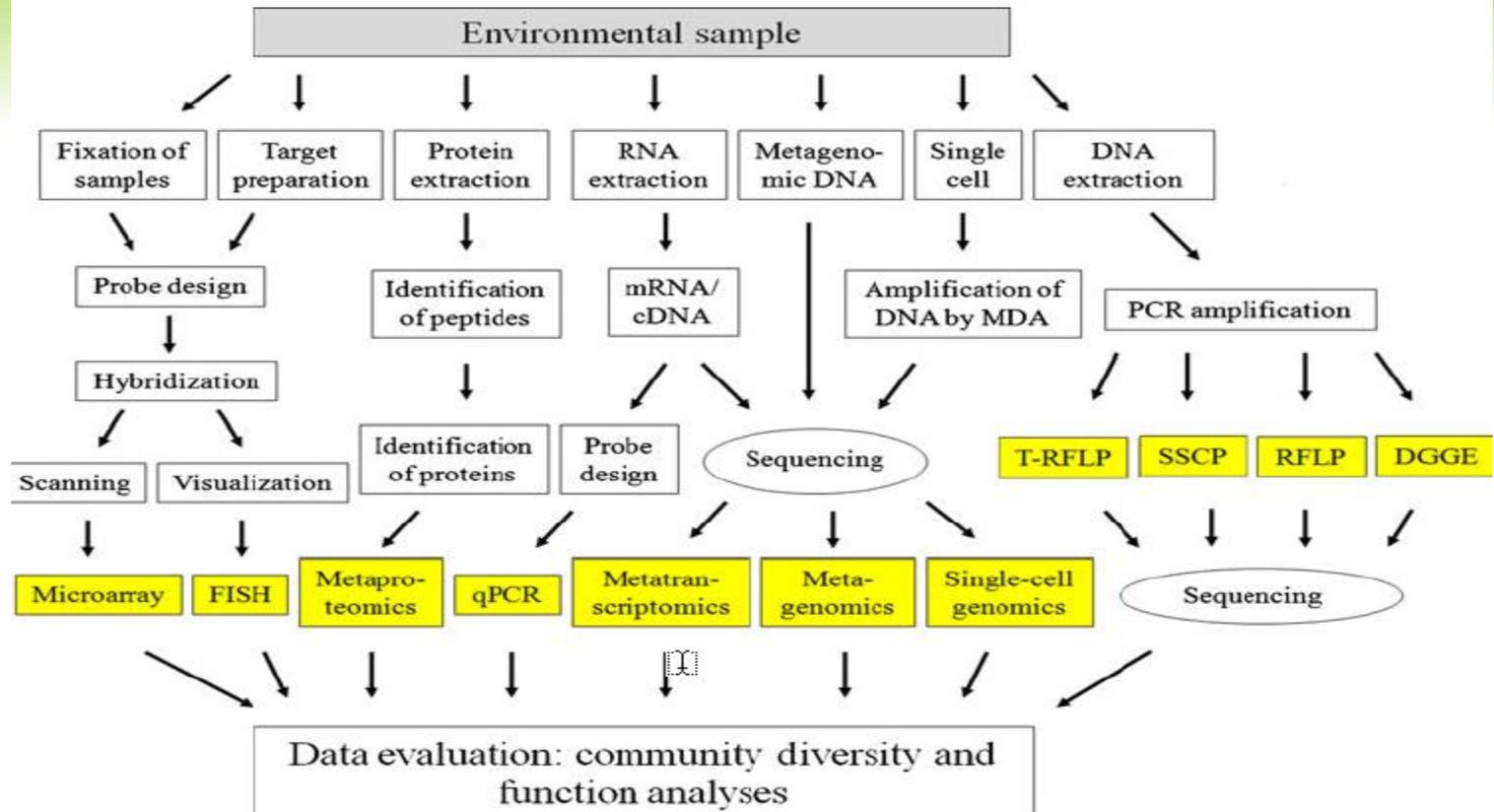
## 一些应用

- ① Handelsman及其他研究人员无法在实验室中培育占绝大多数的微生物进行研究，带回实验室能分离出的往往不是优势微生物，例如：在苹果园里，探明苹果树中的抗生素失效的原因。
- ② 2005年，威斯康辛州苹果园中，蜂群衰竭失调， Science杂志上报道，这些蜜蜂感染了以色列急性瘫痪病毒（Israeli acute paralysis virus），借助元基因组技术进行基因分析鉴定其中的基因。
- ③ 2007年，Trina McMahon等人用元基因组方法研究污水处理工程时发现。一种被称为Accumulibacter phosphatis的细菌可以在废水处理厂里生存，并从废弃物中除去磷。这种细菌在低氧环境中会积聚磷，为了促进这一作用，污水处理时减少设备中的氧气，以诱导这种细菌积聚大量磷。

# 科学数据库ISI检索到的 METAGENOMICS 文献数



# 环境微生物样品研究的路径



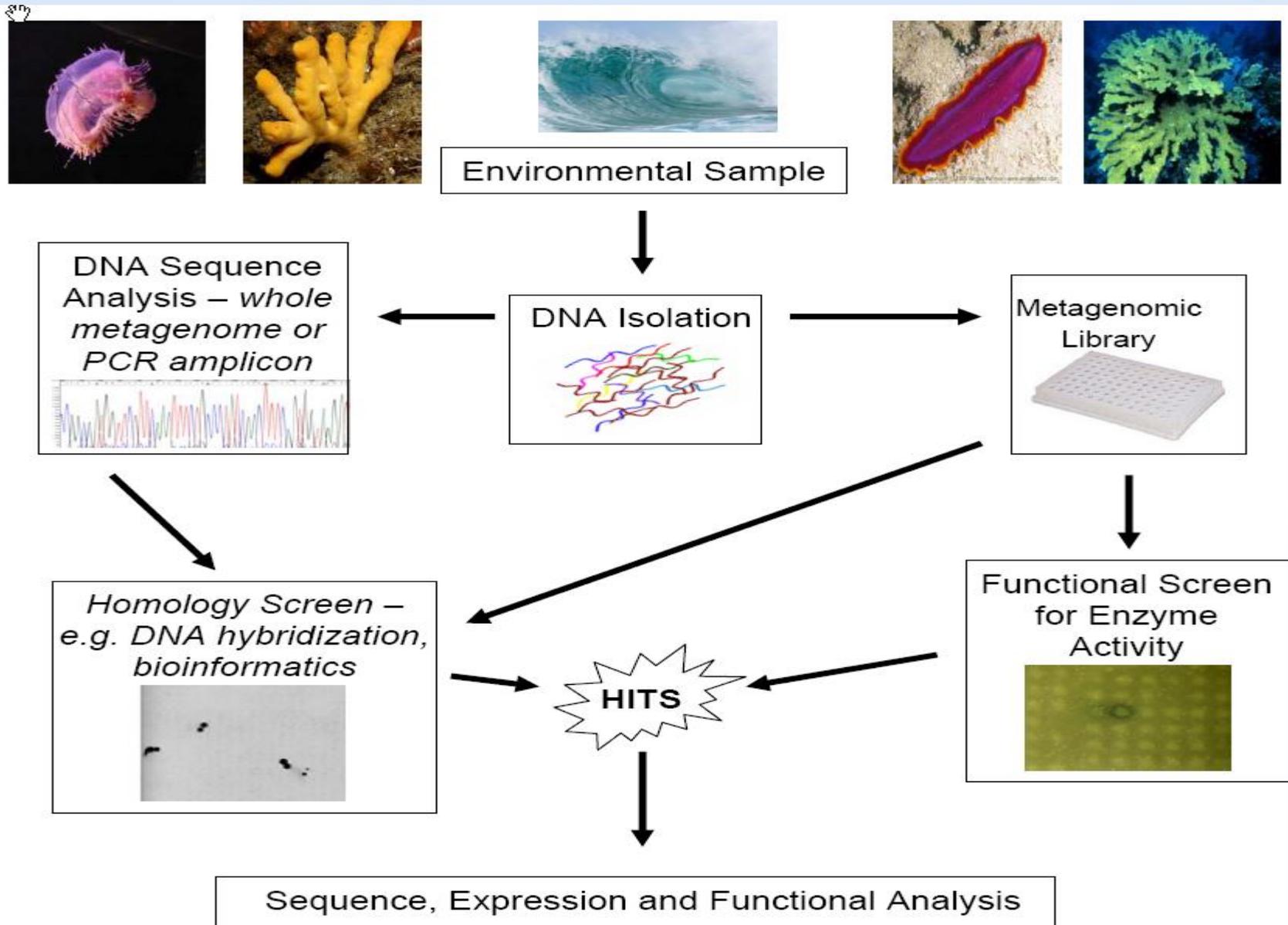
used two or more culture-independent methods (CIMs) and/or complemented with culture-dependent method to reduce biases

- 
- ① metagenomics (Xu 2006),
  - ② metatranscriptomics(Poretsky et al. 2009),
  - ③ metaproteomics (Wilmes and Bond 2004),
  - ④ and single-cell genomics (Lasken 2007; Ishoey et al. 2008).
  - ⑤ denaturing/temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE) (Muyzer 1999),
  - ⑥ single-strand-conformation polymorphism (SSCP) (Lee et al.1996),
  - ⑦ restriction fragment length polymorphisms (RFLP)(Laguerre et al. 1994),
  - ⑧ terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP), (Dunbar et al. 2000),
  - ⑨ and quantitative PCR (qPCR) (Takai and Horikoshi 2000
  - ⑩ non-PCR-based molecular techniques
  - ⑪ fluorescence in situ hybridization (FISH) (Bottari et al. 2006)
  - ⑫ microarray(Bodrossy and Sessitsch 2004)
  - ⑬ Appl Microbiol Biotechnol (2012) Can Su
  - ⑭ 《Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective》

# 元基因组学的基本策略

- ▣ 采用原位裂解法或间接提取法尽可能完全地抽提环境样品中的总DNA；利用合适的载体，如粘粒载体、Fosmid 载体、细菌人工载体 (BAC) 等，将元基因组DNA 克隆到模式微生物中，如大肠杆菌、链霉菌，构建元基因组文库；通过外源基因赋予宿主细胞的新性状或基于某些已知DNA序列筛选，寻找新的生物活性物质或基因(簇)。

# 元基因组学研究的技术路线



# 环境样品DNA 的提取

要求：

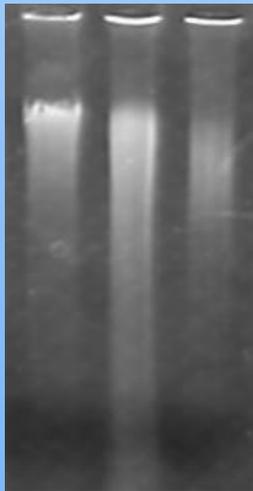
元基因组DNA的提取要代表环境样品的微生物种类，尽量避免对样品的干扰，缩短保存和运输时间，尽可能的保持样品的微生物原貌。若要对功能基因簇进行研究，提取DNA时，既要尽量完全地提出样品中DNA，又要使获得的DNA 保持大的片段，保持最大提取量和最小剪切力。

方法：

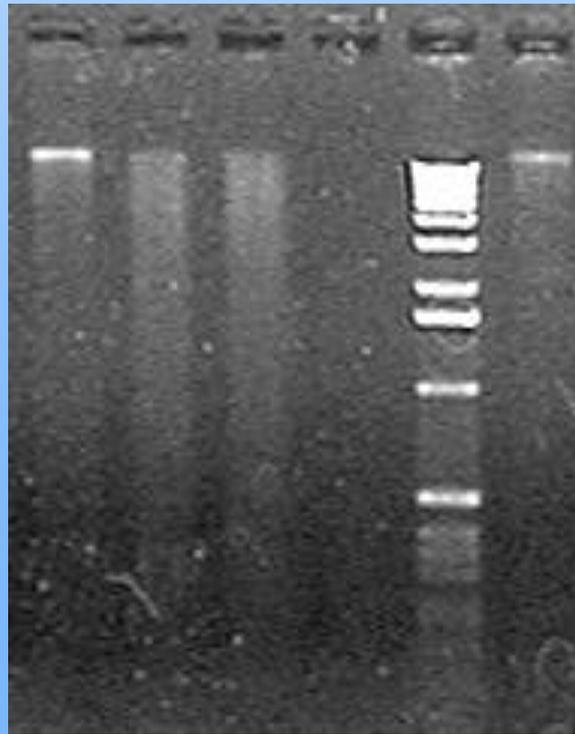
- 环境样品中存在诸多不同的因素影响效果，克隆操作过程中基因或基因簇的断裂破坏可能导致基因不能表达，环境中存在的具有核酸酶活性的物质也会使完整DNA 的获取具有很大的难度。现有的DNA 提取技术尚不能适用所有的环境样品，不能覆盖环境样品中所有的微生物类群(基因组类群)。不同的提取方法导致微生物群落分布不同 (2011, Kurt. E. Williamson)

# 元基因组DNA 的提取

- 环境样品基因组DNA 总是降解？
- 样品存放，样品的处理，提取DNA的时间缩短，保持低温

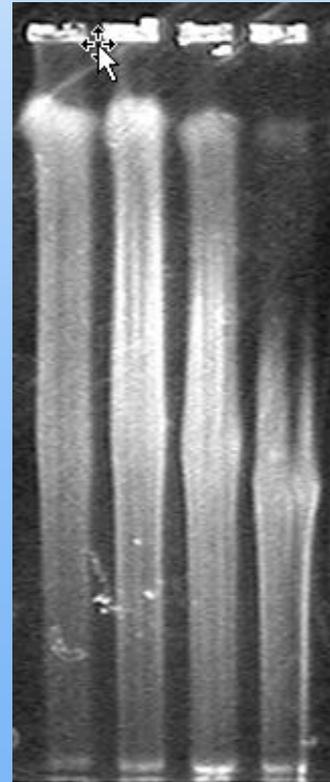
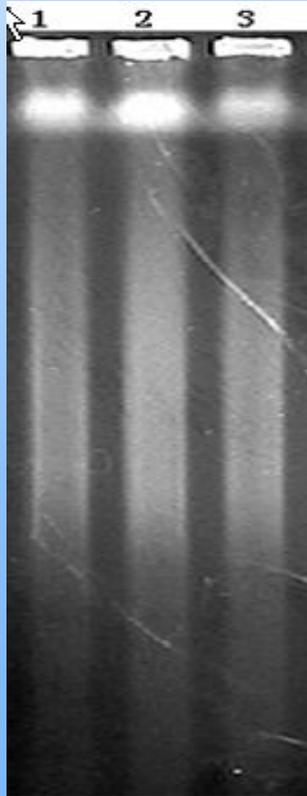


液氮研磨，beating，



冻融法，+溶菌酶+ CTAB/NaCl法的  
DNA质量较好

# 脉冲场分离胃癌 HWDNA



# 元基因组DNA 的提取

- ▣ 1， 样品获得的不易， 比较珍贵。
- ▣ 2， 取样量少， 生物含量少。
  
- ▣ 提出以下两种提取方案

# 生物量少的样品元基因组DNA 提取

- 基于周集中 1996 《 DNA recovery from soils of diverse composition 》
- 方法一:
- 3g沉积物 (2mL) ,
- 加入4mL的DNA提取Buffer, 冻/融3次 (液氮/65° ,
- 加入溶菌酶2mg/mL, 2小时, 37° C
- 加入SDS 1.5mg/mL, 蛋白酶1mg/mL 2小时, 50° C
- 第二个冻/融3次 (液氮/65° )
- 
- 1000g离心10分钟, 上清转移,
- 用酚/氯仿/异戊醇, 加入0.1倍5 MNaCl, 2.5 v无水乙醇, 70%无水乙醇,
- 
- DNA extraction buffer (200 mM)NaCl, 200 mM TRIS, 2 mM sodiumcitrate, 10 mM CaCl , 50 mM EDTA, 0.5mg mL1 ), 5 mM sodium pyrophosphate (NaPh), pH 8).
-

## ▣ 方法二：

- ▣ 3 g sediment 5 mL of denaturing solution  
(4M guanidine isothiocyanate, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.0) by vortexing for 1 minute.
- ▣ 1.8 mL aliquots of the slurry, 2 mL bead-beating tubes containing 0.1 mm glass beads homogenized for 40 s at level 5000rpm ,
- ▣ The tubes were then frozen and thawed four times in liquid nitrogen and a water bath at 65 ° C, 20 mL of extraction buffer for 30 min at 65 ° C.
- ▣ (100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM TRIS, 100 mM DTA, 1.5M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide, 2% sodium dodecyl sulphate)
- ▣
- ▣ 10 minute centrifugation at 6000 g,
- ▣ phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1).

# 大片段基因组文库

## 基因组文库

用重组DNA技术将某种生物细胞的核DNA的全部片段随机地连接到基因载体上,再转移至适当的宿主细胞中,通过细胞增殖而形成的各个片段的无性繁殖系的总集。

## 文库的种类:

λ噬菌体文库 (λ-bacteriophage)、粘粒(cosmid)、  
酵母人工染色体(yeast artificial chromosom, YAC),  
衍生于P1的细菌人工染色体(P1-derived artificial chromosome, PAC)  
细菌人工染色体(bacteria artificial chromosom,BAC)。  
可转化人工染色体(transformation-competent artificial chromosome, TAC)

表 4 八种克隆载体系统的比较

Table 4 Comparison of eight cloning vectors systems

文库系统	宿主	结构	插入片段长度
Library system	Host	Structure	Insert size
$\lambda$ -bacteriophage	<i>E.coli.</i>	Circular plasmid	20kb
Cosmids	<i>E.coli.</i>	Circular plasmid	5-45kb
P1-clones	<i>E.coli.</i>	Circular plasmid	70-100kb
BACs	<i>E.coli.</i>	Circular plasmid	<500kb
PACs	<i>E.coli.</i>	Circular plasmid	100-300kb
YACs	<i>S.cerevisiae</i>	Linear chromosome	100-2000kb
MACs	Mammalian cells	Linear chromosome	?>1000kb
TACS	<i>E.coli.</i>	Circular plasmid	100-300kb

## ❖ λ 噬菌体文库

1974年Murray最早使用的克隆载体。其插入片段仅为20 kb左右。

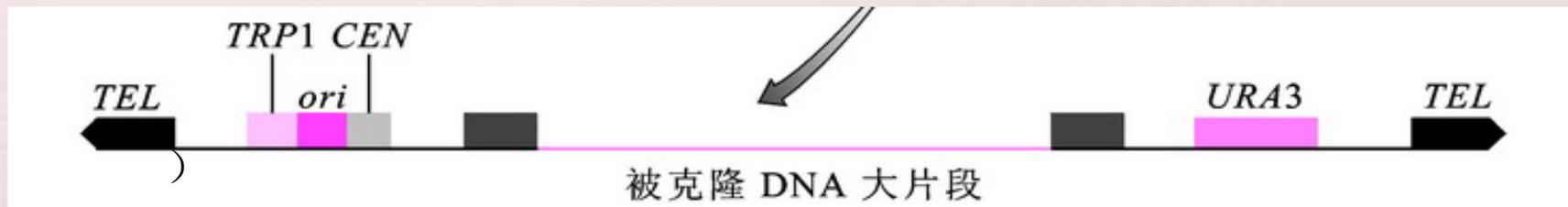
## ❖ Cosmid文库

1979 Royal等首先确定了在Cosmid载体中克隆大片段的可能性，此后用于构建了果蝇、小鼠和人等基因组文库并从数种生物中分离到基因。Cosmid文库的插入一般为5-45 Kb。

- ※ **Y A C 文库** ( yeast artificial chromosome, 酵母人工染色体)  
1983年Murray第一个成功构建。由酵母染色体的着丝点、自主复制序列和端粒三类维持染色体正常功能必不可少的顺式作用元件组成，是迄今容量最大的克隆载体，插入片段平均长度为200-1000 Kbp，最大的可以达到2 Mbp

优点：插入片段长。

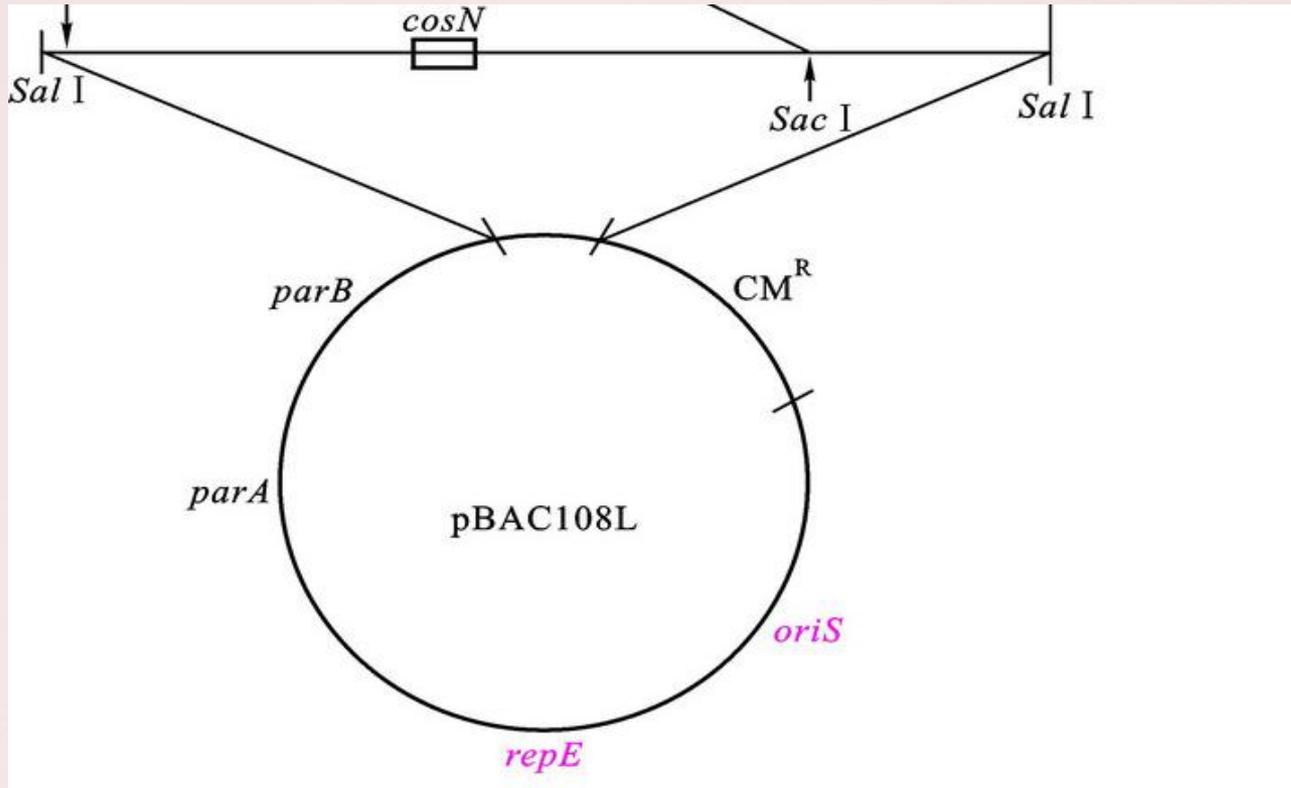
- ※ 缺陷：1) 嵌合现象的存在 (40%-60%) (Cai et al,1998) ;  
2) 稳定性差 (Anderson, 1993),  
3) 插入DNA分离与纯化困难 (O'Conner et al,1989;  
4) 转化效率低 (Venter et al, 1998; Rolf et al, 1999)



## ⌘ B A C文库 (Bacterial artificial chromosome) ,

- ⌘ 1992年 Shizuya等第一个成功构建了BAC载体-pBAC108L, 是衍生于E. coli的性因子—F因子的一种新型载体, 该载体主要包括维持BAC DNA在E. coli中单拷贝数和稳定存在的基因rep E, oriS, par A, par B和par C。
- ⌘ 缺点: 插入片段比YAC小
- ⌘ 优点: 1) 拷贝数低、稳定遗传、极少发生重排(<5%) (Song,2001)  
    缺失及嵌合现象。
  - 2) 电激转化率比YAC转化率高10-100倍。
  - 3) BAC以环状超螺旋形式存在易于分离提取。
  - 4) BAC插入片段可直接进行末端测序。

## 100-150 Kbp insertion



pBAC108L来自细菌的一个小型F质粒，其中*oriS*和*repE*控制了质粒的复制起始，*parB*和*parA*控制了拷贝数。

# 大片段文库构建的意义

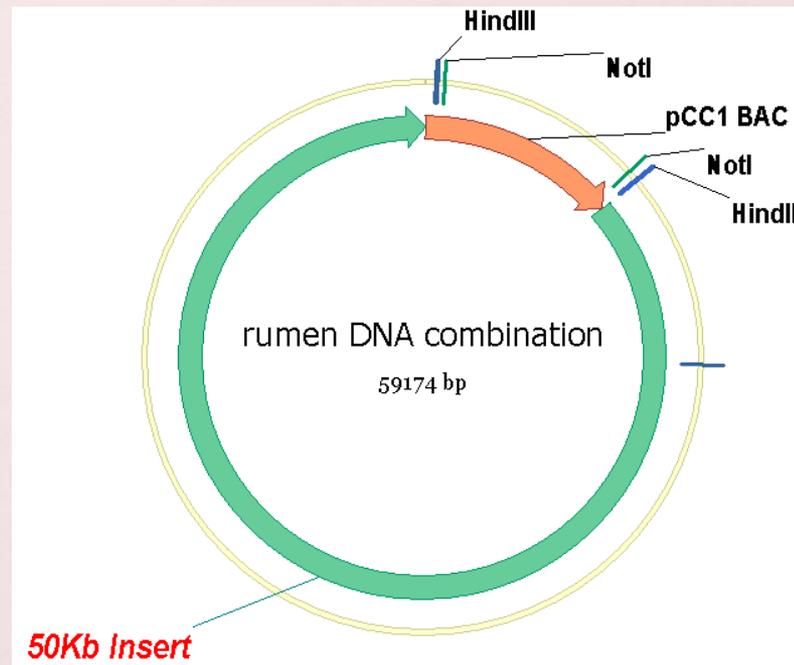
由于BAC可以容纳大片段DNA，不仅包括编码区，而且还包含有内含子和调控区；理论上和正常染色体上的基因相似。

- ◎有利于研究复杂的基因组（如真核生物）
- ◎有利于研究复杂的微生态区系微生物与宿主，微生物与微生物之间的相互作用
- ◎目前研究基因的功能、基因调控和时空表达的有力工具
- ◎可以获得相互关联的基因簇的信息（如抗生素合成途径的编码基因或基因簇）
- ◎用于基因作图，构建物理图谱（人类基因组计划的完成，最后通过构建BAC文库）

- 比较插入片段100kb和5kb的文库

例1：200种微生物组成的微生物区系，每种基因组4Mb。质粒文库需160000个克隆。BAC文库只需8000个克隆。可以覆盖一倍总微生物基因组DNA。

- 如图：



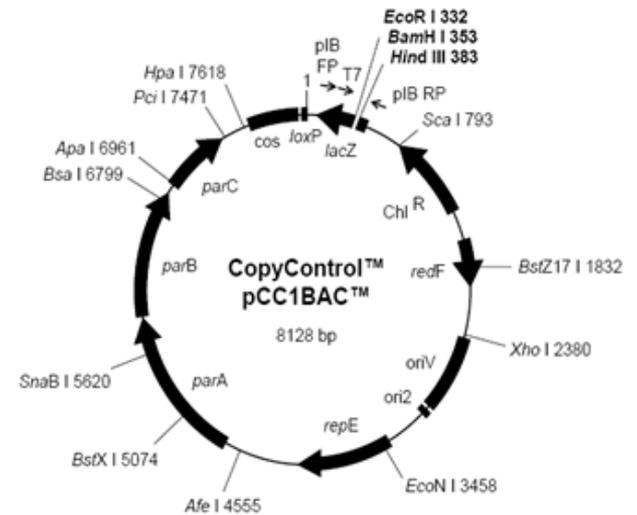
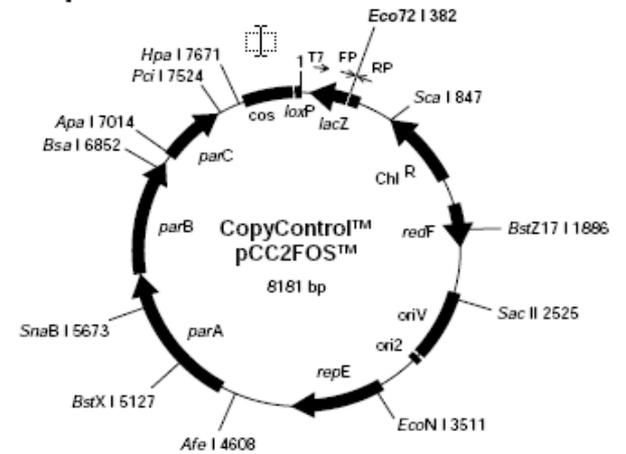
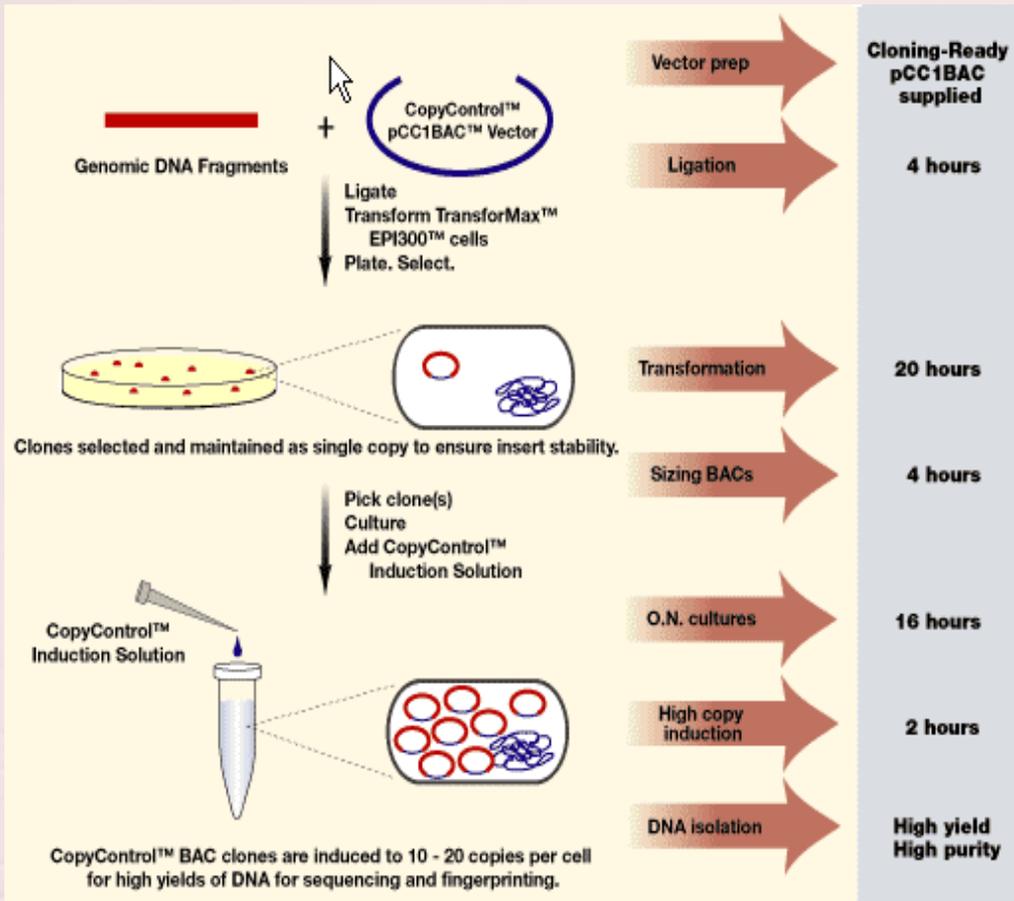
# <<Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes>>

Mol Microbiol Biotechnol 2009

**Table 2.** Lipolytic clones from metagenomic DNA

Library details					Lipolytic clones			Reference
source	vector	clone number	average insert size <sup>a</sup> kb	total size	total number	1/Mb DNA screened	1/number of clones	
Soil	plasmid	73,000	6.5	474.5 Mb	1	1/474.5 Mb	1/730,000	Henne et al., 2000
	plasmid	180,000	6.5	1,170 Mb	1	1/1170 Mb	1/180,000	
	plasmid	98,000	6.5	637 Mb	2	1/318.5 Mb	1/49,000	
Soil	BAC	3,648	27	100 Mb	2	1/50 Mb	1/1824	Rondon et al., 2000
Soil	cosmid	1,532	32.5	49.8 Mb	1	1/49.8 Mb	1/1,532	Voget et al., 2003
Kenyan soda lakes	phagemid	60,000	6	360 Mb	2 <sup>b</sup>	1/180 Mb	1/30,000	Rees et al., 2003
	phagemid	100,000	6	600 Mb	1	1/600 Mb	1/100,000	
Topsoil	fosmid	33,700	35	1,179.5 Mb	8	1/147 Mb	1/4213	Lee et al., 2004
Pond water	plasmid	30,000 screened	3.8	114 Mb screened	11	1/10.4 Mb	1/2,727	Ranjan et al., 2005
Hot spring	fosmid	2,000	20	40 Mb	4	1/10 Mb	1/200	Rhee et al., 2005
Hot spring	fosmid	10,214	40	408.6 Mb	10	1/40.9 Mb	1/1,021	Kim et al., 2005
Deep-sea hypersaline basin	phagemid	4 × 10 <sup>8</sup> total % screened unspecified	5	2,000 Gb % screened unspecified	5 <sup>b</sup>	–	–	Ferrer et al., 2005a
Cow gut	phagemid	14,000 screened	5.5	77 Mb screened	11	1/7 Mb	1/1,273	Ferrer et al., 2005b
Mud flats, beach & forest	fosmid	6,000	35	210 Mb	5	1/42 Mb	1/1,200	Kim et al., 2006
Drinking water	cosmid	1,600	35	56 Mb	6	1/9.3 Mb	1/267	Elend et al., 2006, 2007
Soil	cosmid	2,500	35	87.5 Mb	2 <sup>b</sup>	1/87.5 Mb	1/2,500	
Korean tidal flat	fosmid	386,000	35	13.5 Gb	6	1/2.25 Gb	1/64,333	Lee et al., 2006b
Soil, compost	plasmid	32,000 <sup>c</sup>	3–8	26 Mb	14	1/12 Mb	1/1,500	Lämmle et al., 2007

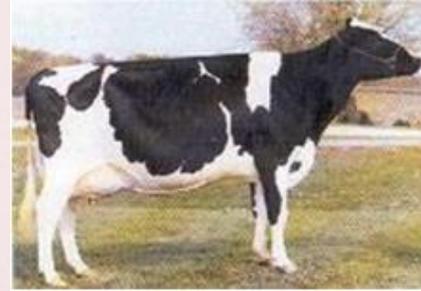
# 大片段文库的构建



# 构建瘤胃元基因组BAC文库

# 瘤胃环境的特殊性

- ❖ 严格厌氧
- ❖ 瘤胃温度一般 $38-41^{\circ}\text{C}$ ，平均 $39^{\circ}\text{C}$ ，
- ❖ pH值6-7，
- ❖ 瘤胃内摩尔渗透压浓度 $400\text{mOsmol/kg}$
- ❖ 瘤胃内氧化还原电位- $250-450\text{mv}$ 之间，平均- $350\text{mV}$ 。
- ❖ 瘤胃内产生大量的挥发性脂肪酸，同时会产生大量的 $\text{CO}_2$ 和 $\text{CH}_4$ 。还有少量的 $\text{N}_2$ 和 $\text{O}_2$ 。
- ❖ 微生物能长期适应和生长相对稳定瘤胃内环境，变动在有利于微生物繁殖生长的范围内。



中国荷斯坦奶牛：  
分布范围广、产奶量高、耐粗饲，经济价值高。

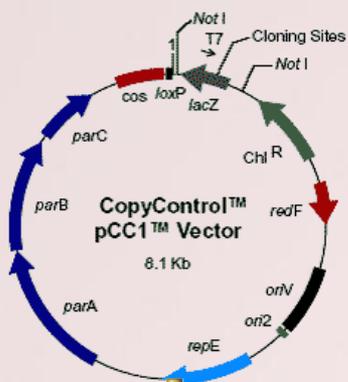


藏牦牛：中国青藏高原海拔3000米以上地，适应高寒生态条件，耐粗、耐劳；



大额牛：分布于云南、西藏，产印度和缅甸主栖林缘灌丛和草坡地带

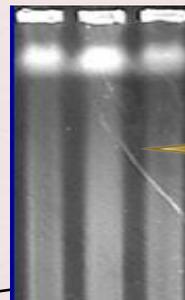
# 瘤胃BAC



载体制备



酶切



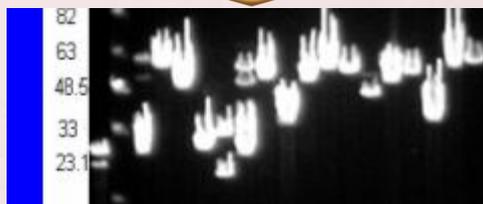
HMW  
DNA  
制备



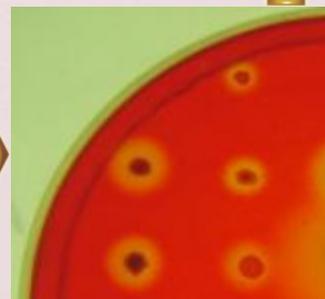
连接转化



库的  
鉴定



功能性筛  
选



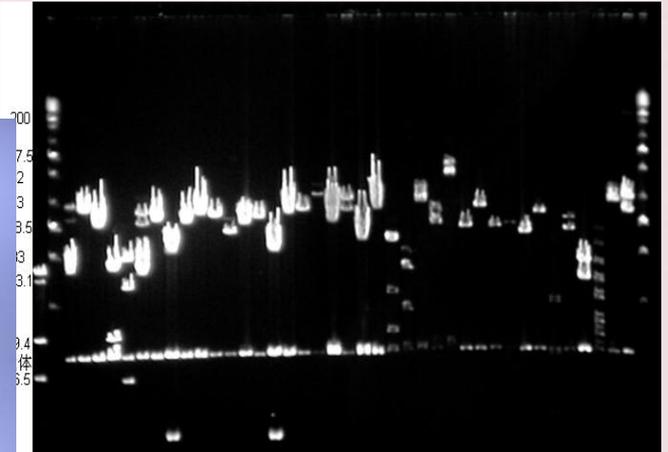
亚克隆



# 构建瘤胃元基因组BAC文库-获得基因簇



Colony picker



BAC克隆的NotI酶切检测

牦牛瘤胃内容物：插入片段：平均55kb，文库容量60,000个克隆

BAC文库从物质和技术上奠定了用非培养手段研究复杂环境微生物结构和功能关系的基础

# 洱源热泉水体微生物元基因组BAC文库构建

# 热泉样品

## 云南腾冲蛤蟆嘴热泉土壤

采样 pH: 8.0

采样温度: 84°C

采样时间: 2004年3月

采样地点: N 24°57'00.5"

E 98°26'17.2"

海拔 1450m



## 西藏塔格架7号热泉土壤

采样pH: 3.0

采样温度: 72°C

采样时间: 2004年5月

采样地点: N 29°36'11.9"

E 85°44'52.0"

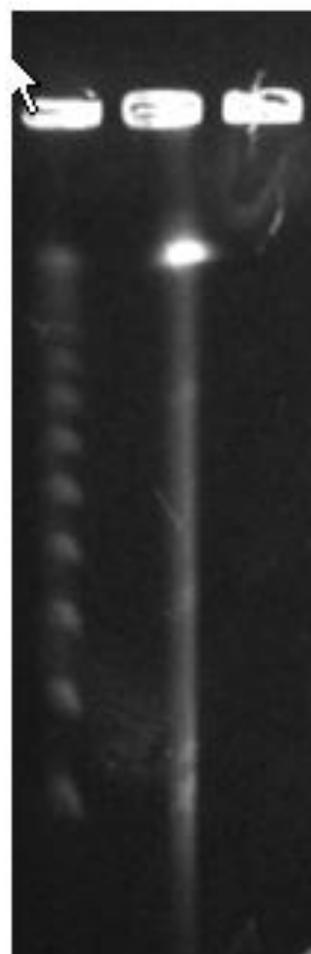
海拔 5015m



## 云南洱源热泉:

2008年7月, 样品采自牛街热泉 (北纬26.6040', 东经99.5649')。温度温58°C, pH为7.0, 富含钙、氟

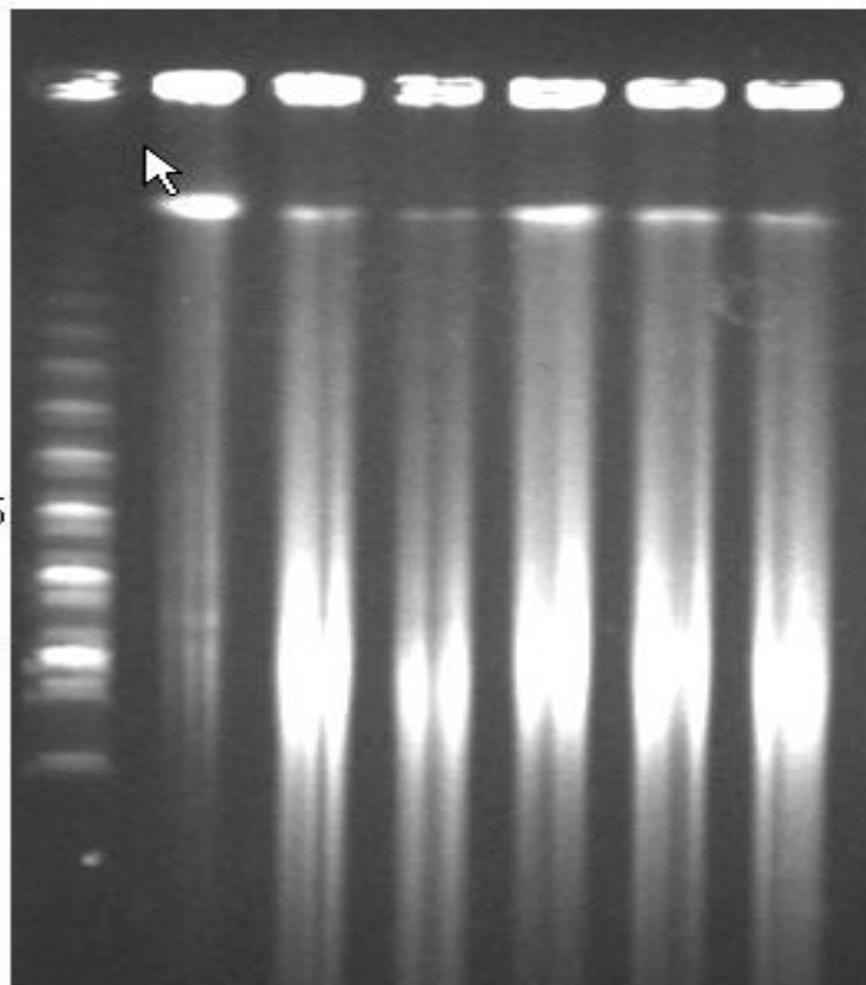
## 洱源热水沟微生物高分子量DNA



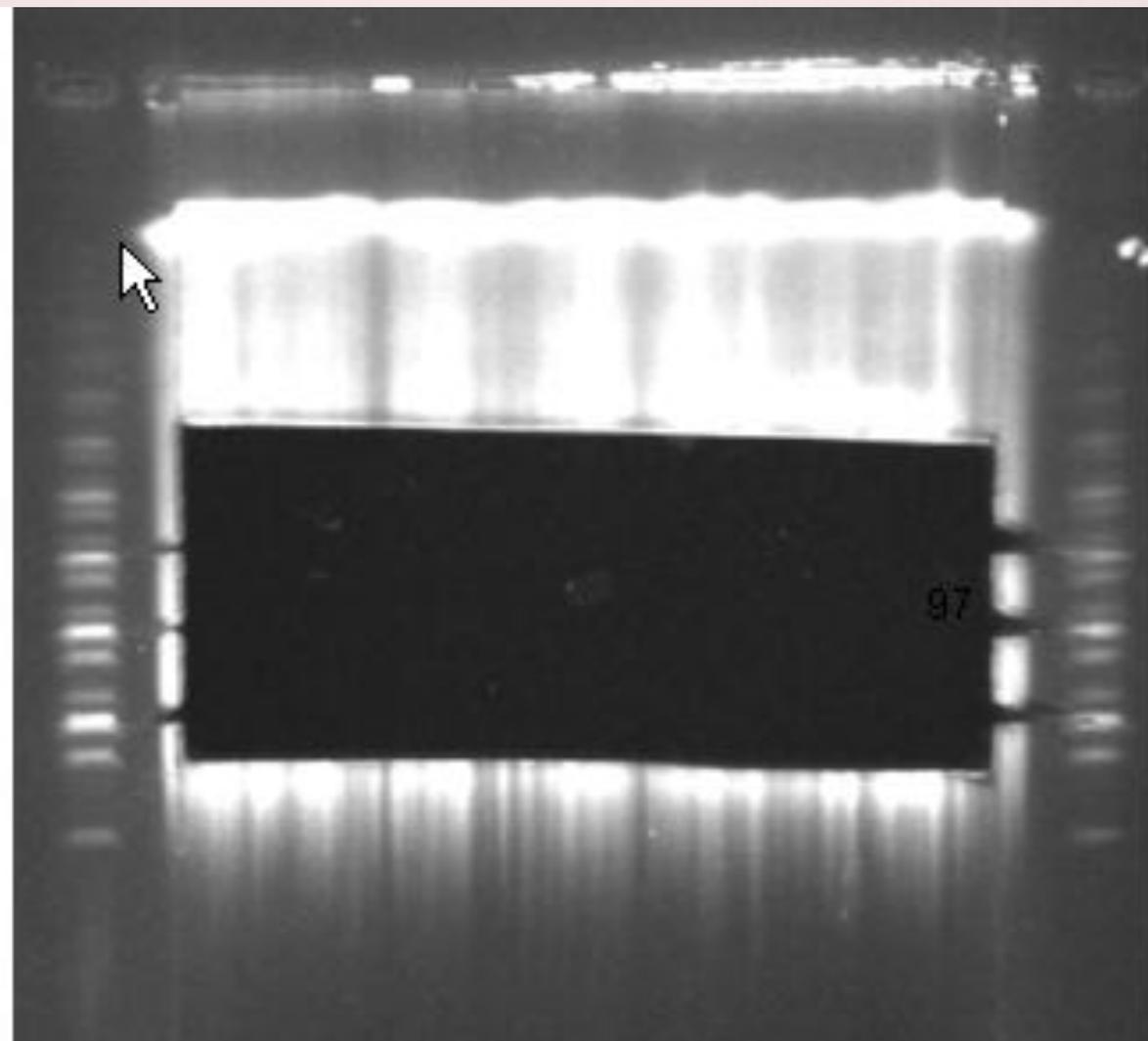
Ry HWD

### HindIII 部分酶切RyHWD

Kb



194  
145.5  
97  
48.5



242.5

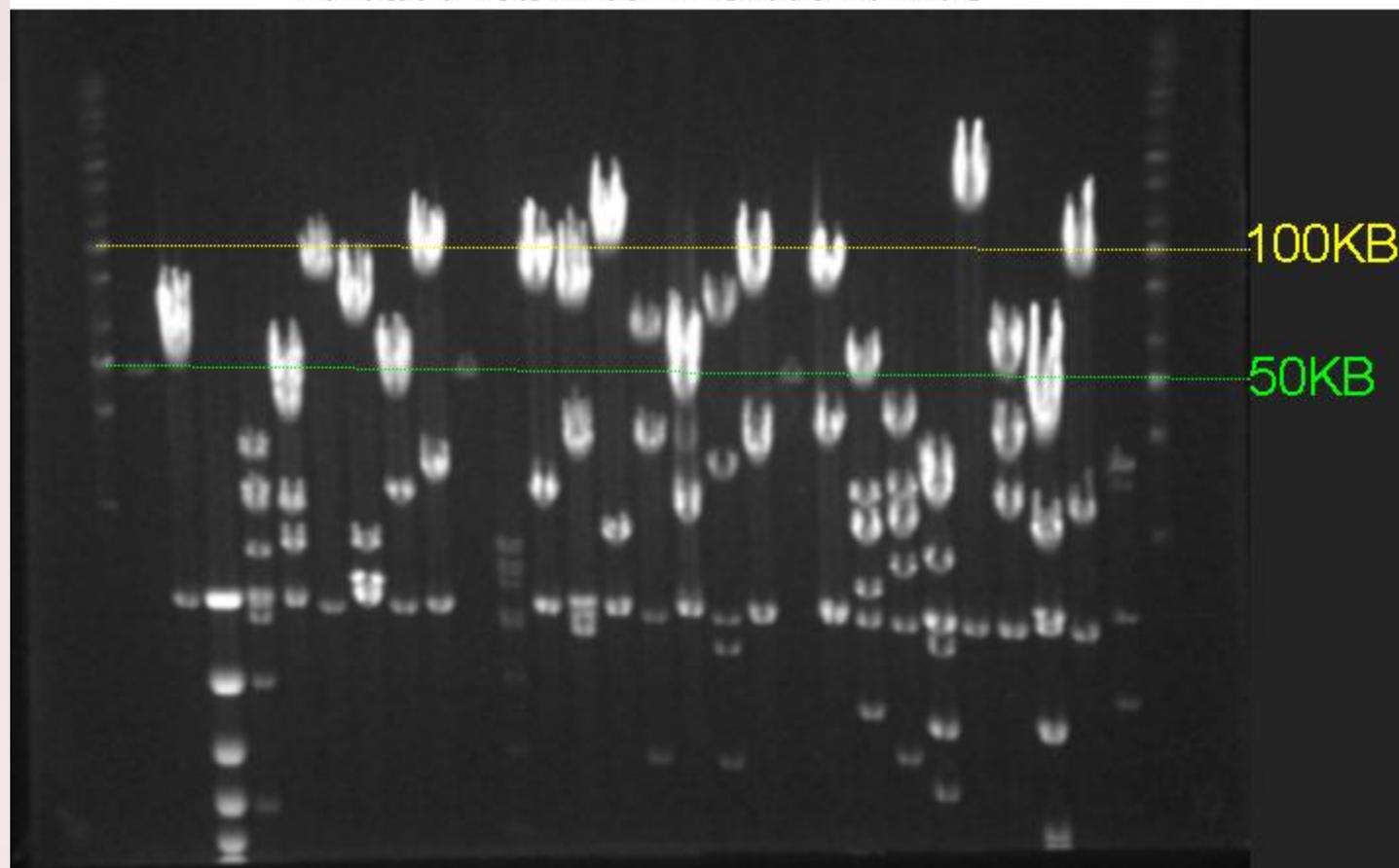
194

145.5

97

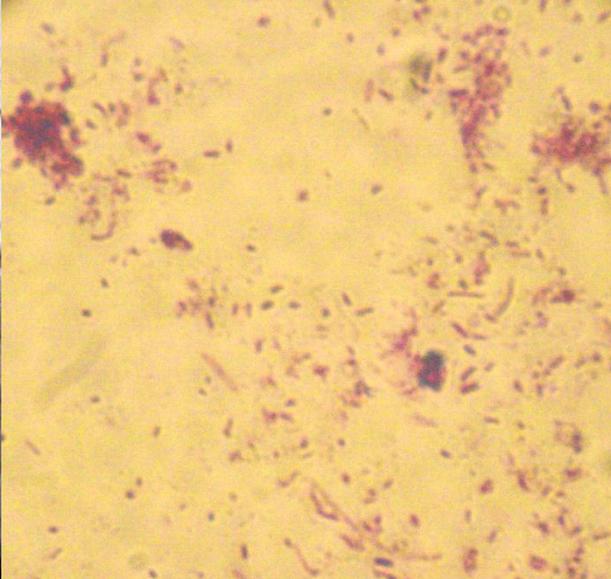
48.5

## 洱源热水沟微生物BAC文库大小鉴定



# 洱源热水沟水体微生物BAC文库构建

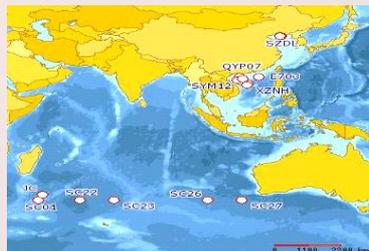
- ✿ 保存克隆：230\*384=8.8万
- ✿ 克隆平均大小 83 KB 总库容：7.3 GB



# 深海沉积物和水体微生物 phi29元基因组FOSmid 文库构建

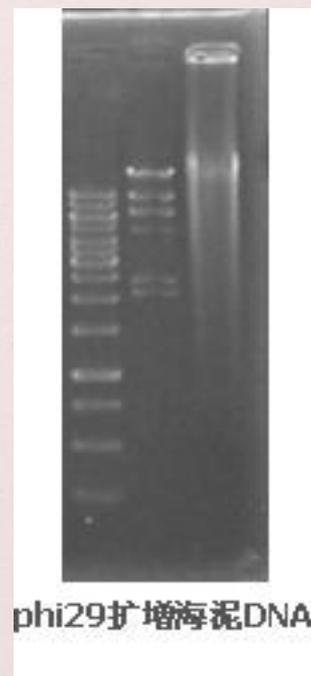
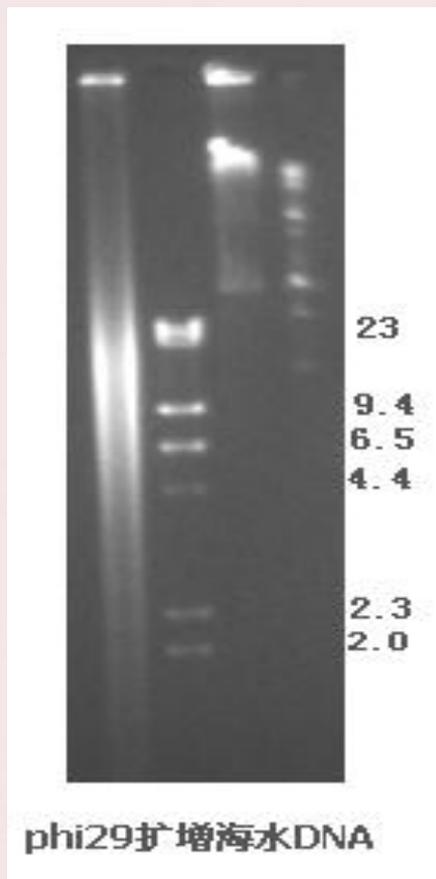
# 海洋样品的特点

- 海洋微生物处于**极端温度与压力环境**：11,000 m 深处压力可达100 MPa. 盐分3.5%，温度在极地处于冰水中，深海海洋热液高达100 °C. (有发现在121 °C分离的古菌)
- 海洋**原始代谢产物** 98% 源于微生物；
- 海洋有**特殊营养环境**：如寡营养条件下非常精简的微生物基因组，大小 1.66 Mbp ；**不同地区**营养变化悬殊。
- 海洋微生物**物种间关系密切**，研究发现珊瑚元基因组中38%与真菌相关，7%与细菌相关，1%与古菌相关，2%与真核病毒有关，3%与噬菌体有关。

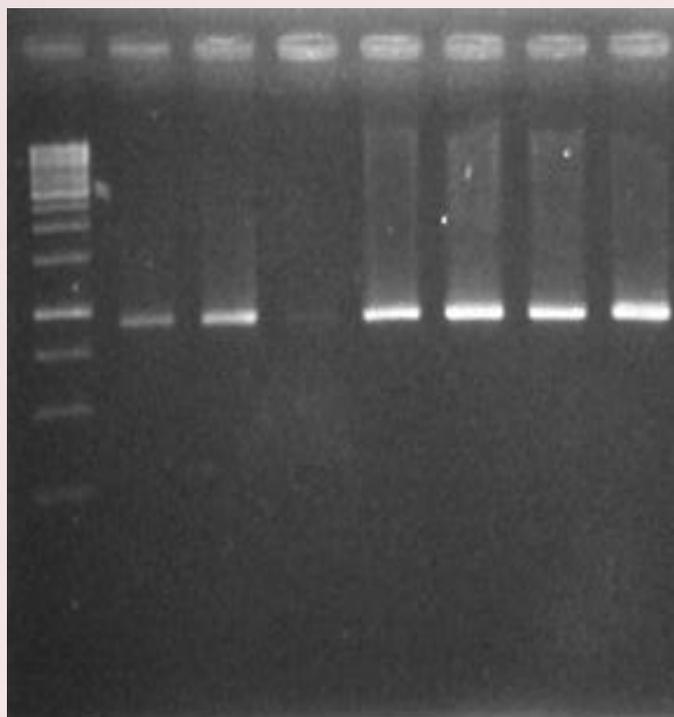


		印度洋21航次样品		
检验项目		SE2800	WT2800	SE4000
pH 值		6.94	7.47	8.34
电导率	ms/cm	11.52	26.2	4.17
有机碳	g/kg	162(甘油)	18.1 mg/L	4.92
总氮	g/kg	0.239	0.047	0.389
总磷		0.26%	0.07%	0.16%
硝态氮	mg/kg	5.115	8.843	13.91
硫	mg/kg	44.458	1254.5	300.4
铁	mg/kg	1553.712	<0.015	364.7
锰	mg/kg	105.017	<0.012	19.19
钙	mg/kg	154.788	3194	20008
镁	mg/kg	62.579	9312	158.1

# Phi29扩增浓缩海水和海泥样品DNA

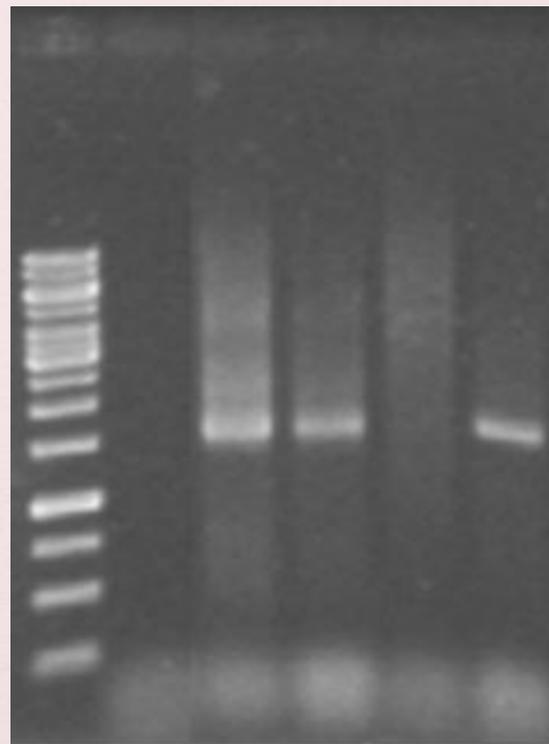


## 扩增的浓缩海水海泥样品16srDNA文库构建



海水海泥样品古菌16s扩增

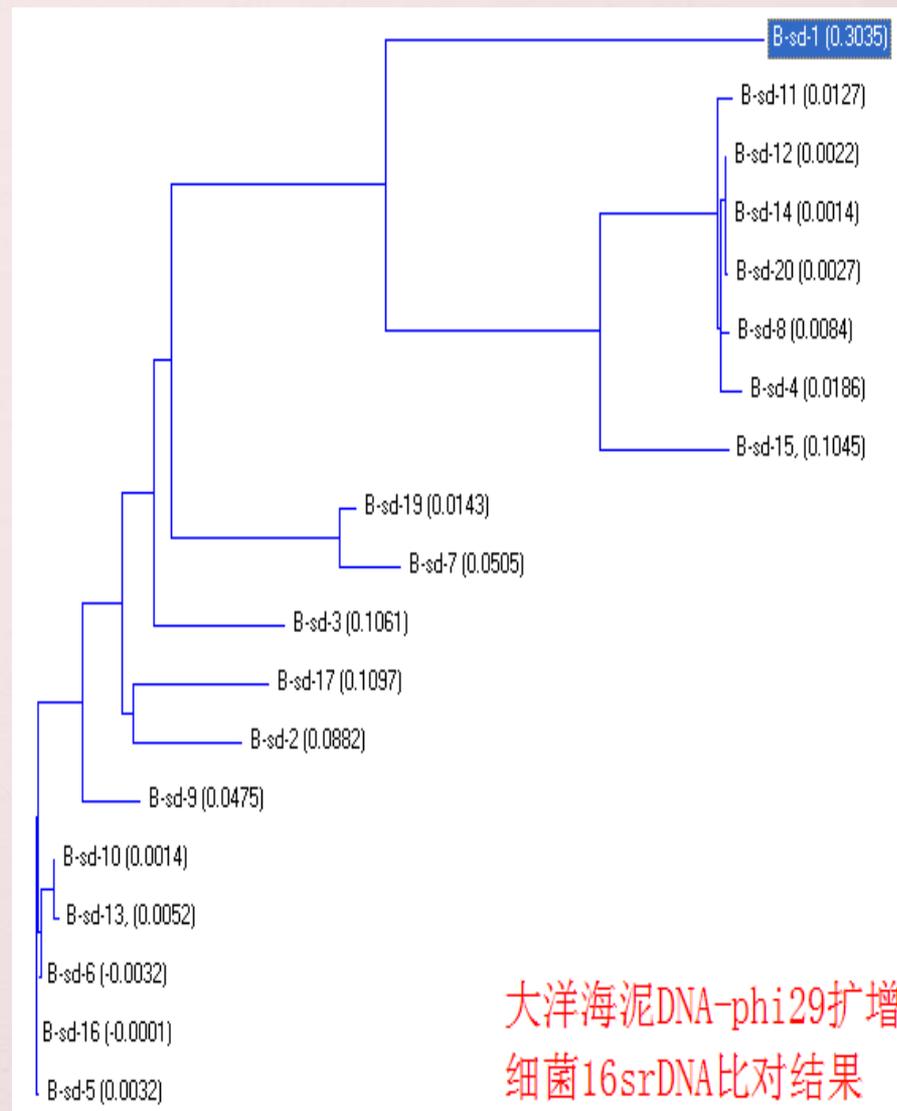
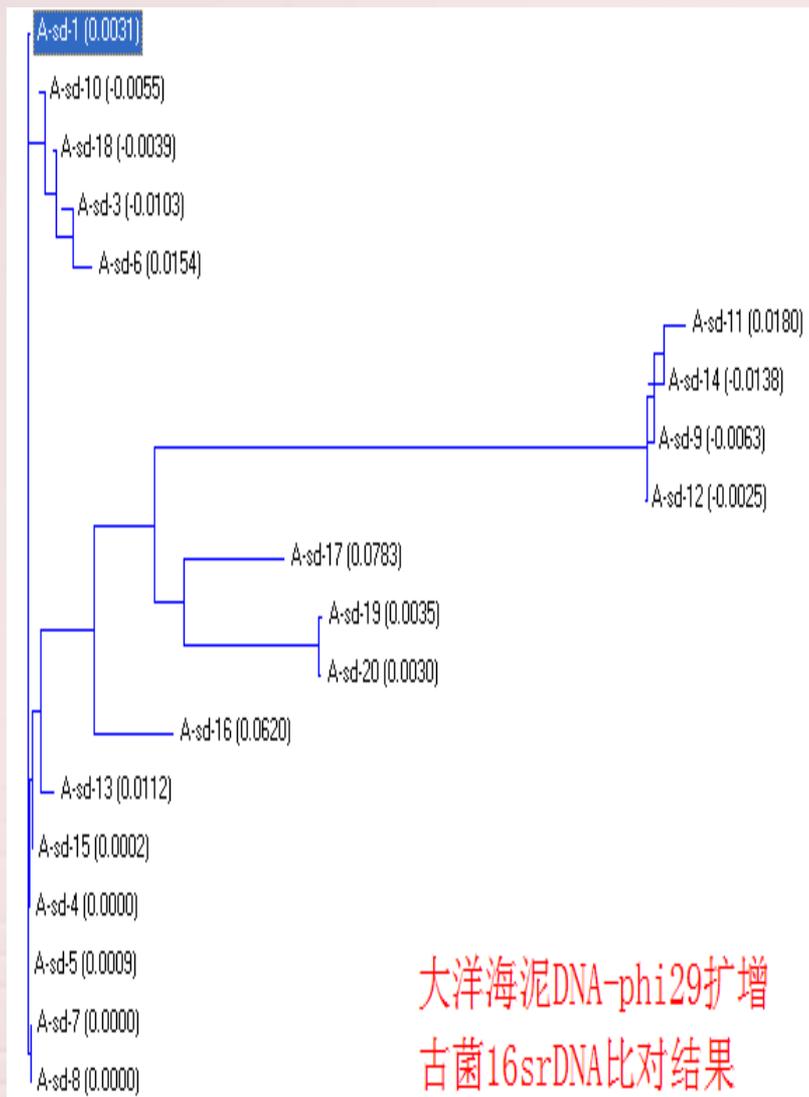
古菌通用引物21f 958r



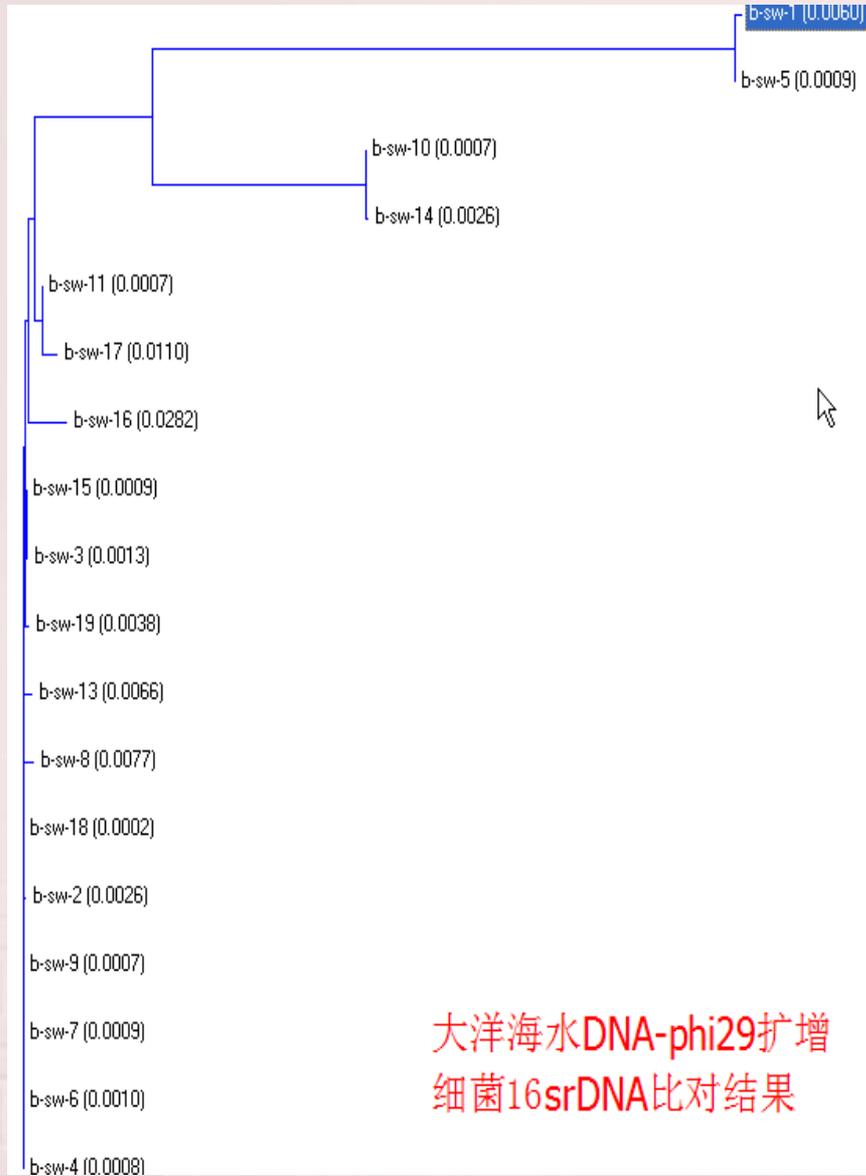
海水海泥细菌16s扩增

细菌通用引物27f,1492r

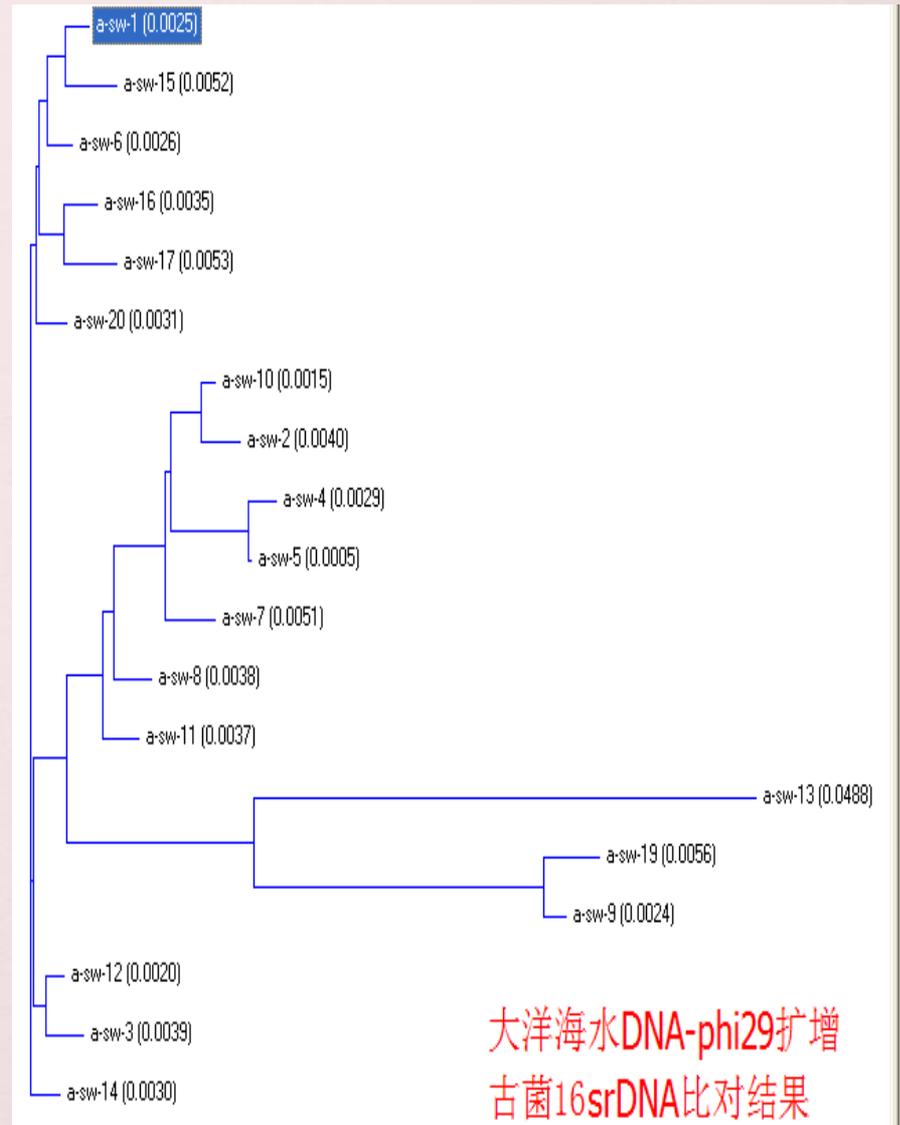
# phi29扩增海泥元基因组DNA多样性



# 用phi29扩增海水元基因组DNA多样性



大洋海水DNA-phi29扩增  
细菌16srDNA比对结果

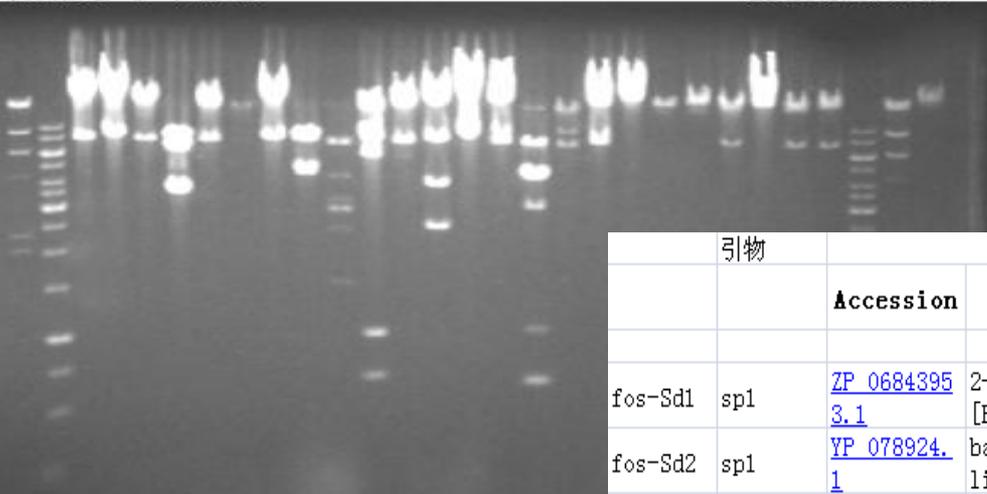


大洋海水DNA-phi29扩增  
古菌16srDNA比对结果

- 建立深海沉积物和水体微生物富集及微量元基因组扩增体系；
- 扩增产物的初步序列分析表明，水体主要古菌类群为MG I泉古菌，相似性98-100%；沉积物主要古菌为未培养广古菌，与已培养广古菌的相似性<85%。

# phi29扩增海泥样品的元基因组文库构建

MM 1 2 3 4 5 6 22 23 24 MM λ



NotI 酶切 Fosmid clones

## Fosmid clones 末端测序

引物		部分序列蛋白比对结果					
		Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E
fos-Sd1	sp1	<a href="#">ZP_0684395</a> <a href="#">3.1</a>	2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase [Burkholderia sp.	<a href="#">35.4</a>	35.4	63%	2
fos-Sd2	sp1	<a href="#">YP_078924</a> <a href="#">1</a>	bacillopeptidase F [Bacillus licheniformis	<a href="#">50.4</a>	50.4	24%	4.00E-04
fos-Sd3	sp1	<a href="#">ZP_0811287</a> <a href="#">2.1</a>	heavy metal translocating P-type ATPase [Desulfotomaculum nigrificans DSM 574]	<a href="#">301</a>	301	100%	9.00E-94
fos-Sd4	sp1	<a href="#">YP_0031098</a> <a href="#">70.1</a>	undecaprenyl diphosphate synthase [Acidimicrobium ferrooxidans	<a href="#">276</a>	276	60%	6.00E-90
fos-Sd5	sp1	<a href="#">YP_0018195</a> <a href="#">55.1</a>	hypothetical protein Oter_2674 [Opitutus terrae	<a href="#">36.2</a>	36.2	25%	6.9
fos-Sd6	sp1	<a href="#">YP_0025744</a> <a href="#">50.1</a>	hypothetical protein Athe_2612 [Caldicellulosiruptor bescii	<a href="#">50.8</a>	50.8	92%	5.00E-05
fos-Sd7	sp1	<a href="#">ZP_0909834</a> <a href="#">0.1</a>	CRISPR-associated protein Cas5 family [Desulfobacter postgatei family	<a href="#">152</a>	152	95%	1.00E-44
fos-Sd8	sp1	<a href="#">ZP_0666137</a> <a href="#">6.1</a>	replication initiation protein [Escherichia coli B088]	<a href="#">419</a>	419	99%	#####
fos-Sd9	sp2	<a href="#">ZP_0891875</a> <a href="#">4.1</a>	Asparaginase/glutaminase [Thermobacillus composti	<a href="#">35.8</a>	35.8	38%	1.6
fos-Sd10	sp1	<a href="#">ZP_0887055</a> <a href="#">0.1</a>	rod shape-determining protein RodA [Azospirillum amazonense	<a href="#">312</a>	312	83%	#####

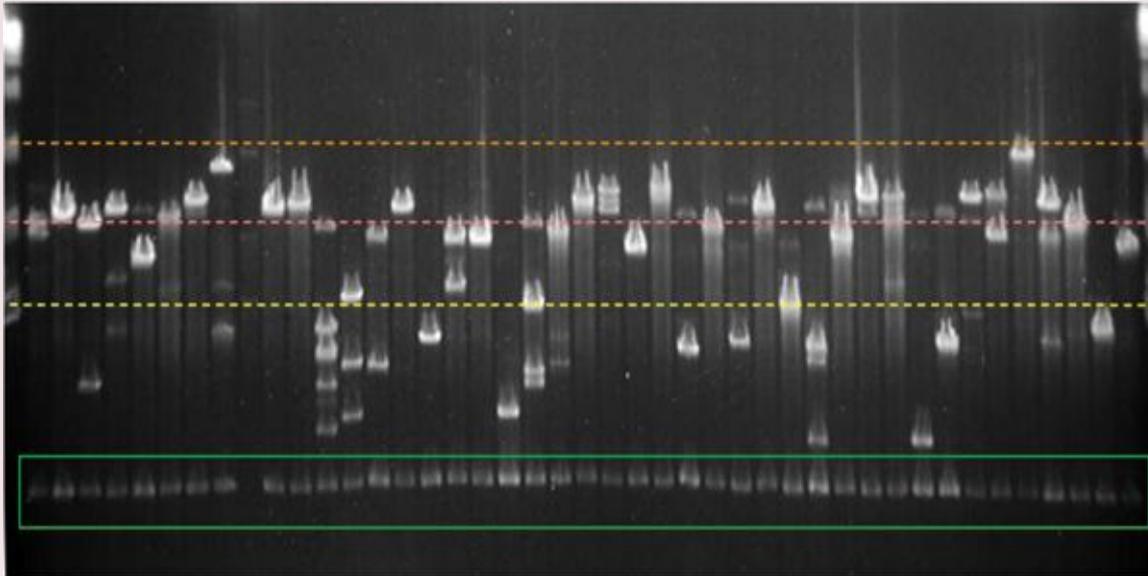
Phi29-sea-water FOSmid 文库  
共保存28000克隆

Phi29-sea-sediment FOSmid  
文库共保存20000克隆

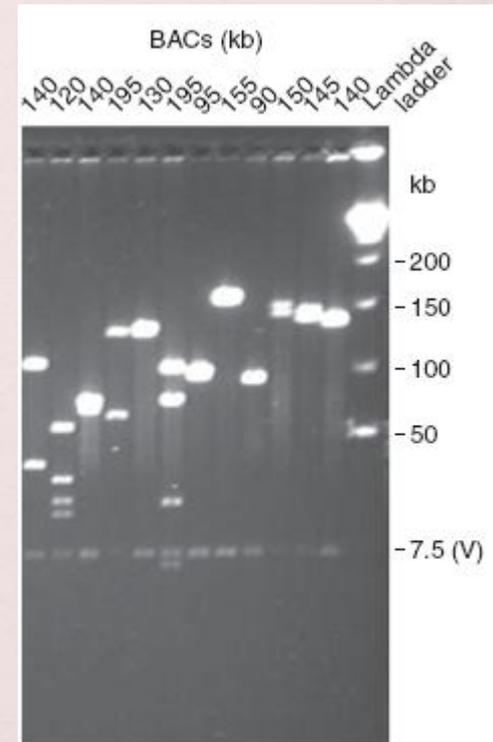
# 总结

- ❖ 构建BAC基因组DNA文库，将基因组DNA用限制性内切酶（常用EcoR I、BamH I或者Hind III）来消化基因组DNA，然后通过脉冲场电泳找到合适长度的DNA片段（比如100kb-150kb），随后透析回收DNA。  
需要注意：
  - （1）电泳时，要选用合适的DNA Ladder，以保证电泳后可以准确定位所需分子量的DNA。用Epicentre公司的Control Insert DNA来做marker，既方便又准确。
  - ❖ （2）电泳以后，应该避免用紫外光照射目标DNA，紫外光照射DNA会显著降低克隆效率。解决方法：把marker所在的部分凝胶切下，在紫外灯下做好记号，然后以此为参考定位所需的片段。
  - （3）回收DNA的时候，应该要避免过度离心，以防止DNA被剪切，降低文库质量

## *NotI* digest of random *C. porosus* BAC clones



an average clone insert size of 102 kb



平均插入片段140Kb

# 元基因组文库克隆数的确定

基因组DNA文库需要包含足够多的克隆，来保证文库的代表性。一般使用如下的经验公式来确定：

$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$  P是希望得到的覆盖率，f是插入片段大小与基因组DNA大小的比值，N是所需的克隆数。举例来说，用BAC载体构建人类基因组文库，人类基因组大小为 $3 \times 10^9$  bp，插入片段大小为100kb，希望覆盖率99%，那么所需要的BAC克隆数为

$$N = \ln(1 - 0.99) / \ln(1 - [10^6 \text{bp} / 3 \times 10^9 \text{bp}]) \\ = -4.61 / -3.33 \times 10^{-6} = 138,298$$

## 元基因组文库筛选

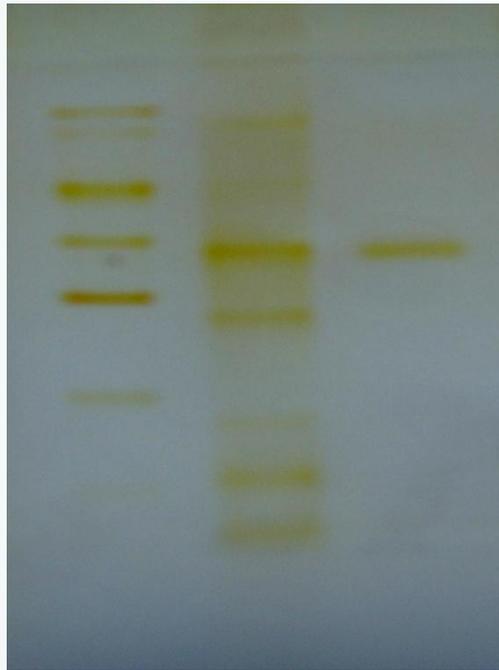
- 序列筛选(Sequence-based screening)依赖目的基因保守的DNA序列, 根据已知相关功能基因的序列设计探针或PCR引物, 通过杂交或PCR扩增筛选阳性克隆子, 从文库中获得目的基因, 继而对其异源表达, 得到具有生物活性的产物
- 功能筛选(Function-based screening)以生物活性为线索, 主要是根据一些酶蛋白的功能, 在功能平板上检测宿主菌出现的一些变化, 如阳性克隆周围出现透明圈或酶降解产物显现某种颜色, 先获得具有生物活性的阳性克隆子, 再进行相关测序分析得到相应的基因结构。通过功能筛选能够得到完整的功能基因或带有目的基因的基因簇, 而且这些功能基因很可能是全新的, 以及底物诱导的表达筛选 (SIGEX),

# 牦牛瘤胃BAC活性克隆活性筛选

	筛选用底物	筛选克隆数	活性克隆 (%)
纤维素酶	羧甲基纤维素钠	21060	421 (2%)
木聚糖酶	白桦木聚糖	14976	149 (1%)
甘露聚糖酶	长角豆半乳甘露聚糖	15360	30 (0.2%)
淀粉酶	可溶性淀粉	22656	237 (1.05%)
酯酶	$\alpha$ -乙酸萘酯	28356	425 (1.5%)
脂肪酶	三丁酸甘油酯	15360	215 (1.4%)

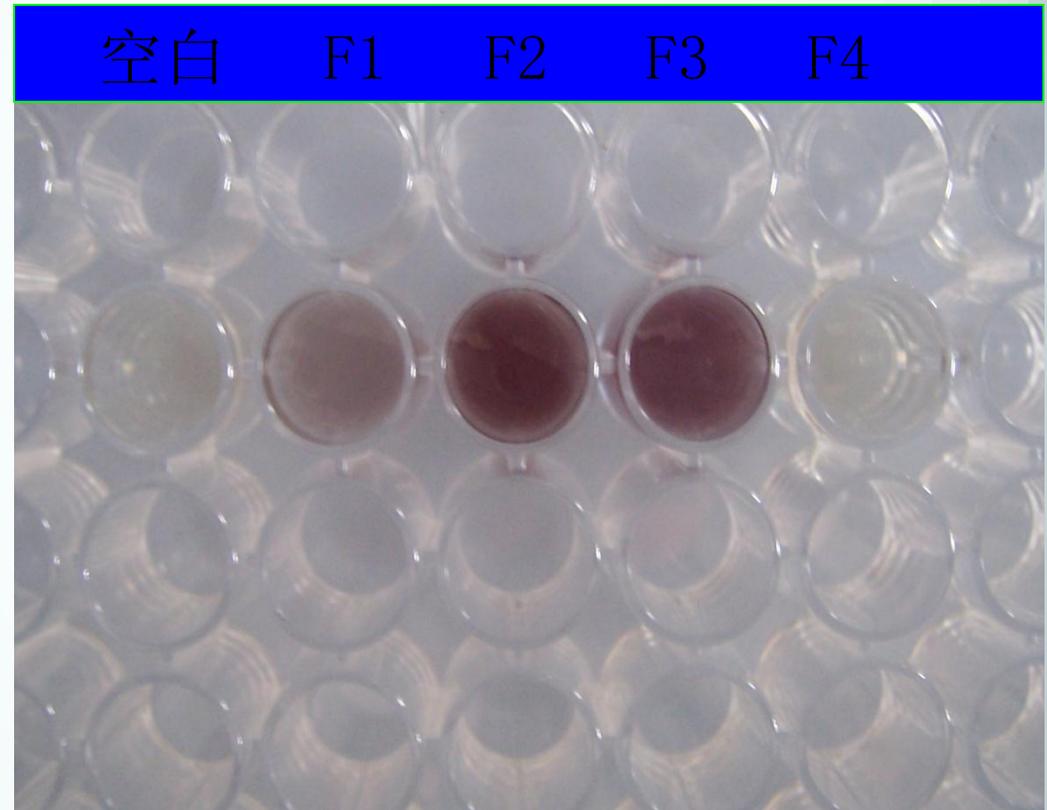
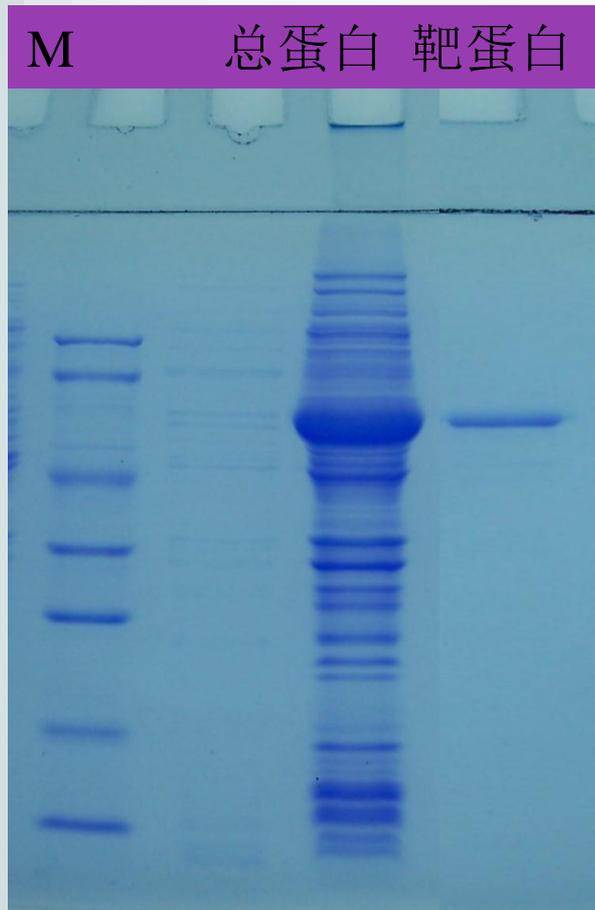
# 瘤胃BAC克隆功能基因的异源表达

M 总蛋白 靶蛋白



表达的纤维素酶及其酶活检测

# 瘤胃BAC克隆功能基因的异源表达



异源表达的酯酶蛋白及其酶活检测

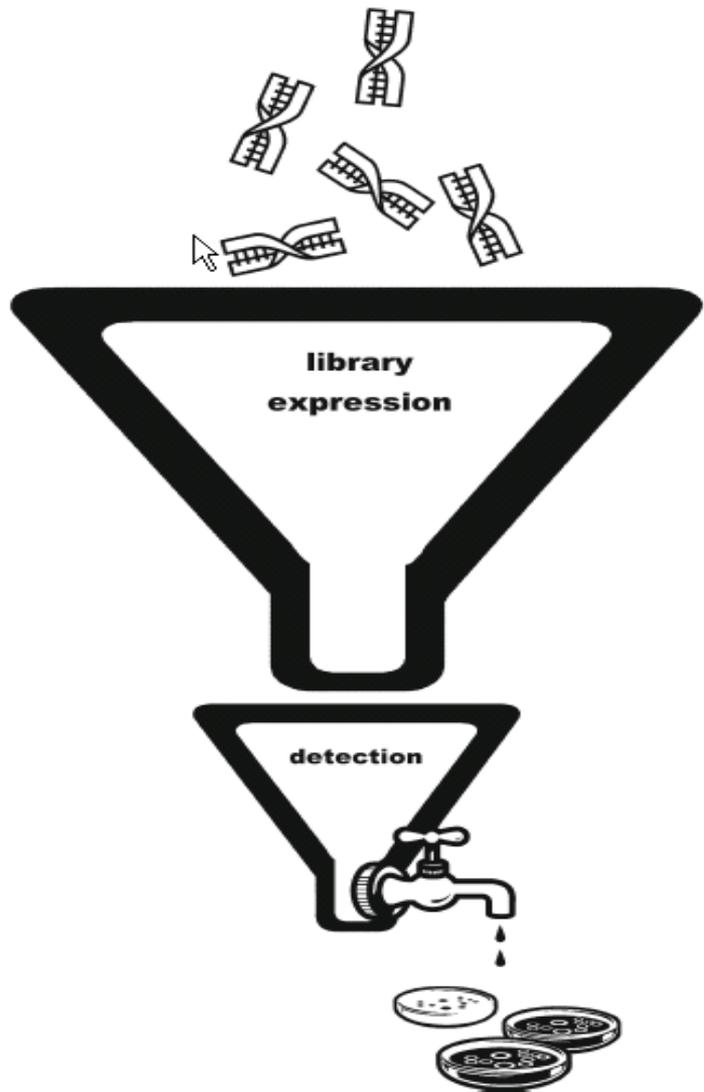


Fig. 3 The metagenomic expression bottleneck

1, a shuttle vector

2, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, and *Bacillus subtilis*

3, limited by insufficient promoter recognition.

enhance the expression capacity of *E. coli* by using the transposon MuExpress

# 元基因组测序

## • 宏基因组测序

-  宏基因组测序是对某一特定环境，如肠道、土壤、海水等中的所有微生物进行基因组测序。通过此方法可对该环境中的微生物种类和优势物种进行检测，揭示微生物群落多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系。自然环境中很多微生物无法分离培养，而此方法无需对微生物进行分离培养。
- 宏基因组测序方法现在有全基因组的宏基因组测序和16S/18S rRNA宏基因组测序。

# 元基因组学测序样品质量要求

## \* 1、 样品要求：

- \* 1) 微生物的基因组DNA（双链DNA序列）。
- \* 2) 构建小片段文库，DNA样品总量不低于5 $\mu$ g.
- \* 3) OD260/280值应在1.8~2.0 之间；
- \* 4) 样品的主带应在23kb以上，保证基因组无降解。
- \* 5) 样品浓度：样品的浓度越高越好，最低不应低于50ng/ $\mu$ l.

## \* 2、 测序要求：

- \* 1) 需要提供电泳胶图，nanodrop，Gel-Electrophotometric，或者Aglient中一种或多种形式的样品分析结果。
- \* 2) 样品必须注明溶剂成分；
- \* 3) 样品中存留RNA和少量蛋白，一般来说并不影响实验，但是样品中有多糖、糖蛋白的残留，往往对打断DNA样品带来非常大的麻烦，且很难去除，



Applied Biosystems  
ABI 3730XL  
1 Mb / day



Roche / 454  
Genome Sequencer FLX  
100 Mb / run



Illumina / Solexa  
Genetic Analyzer  
2000 Mb / run



Applied Biosystems  
SOLiD  
3000 Mb / run

## • 454 的特点与主要应用

- 读长较长, 400–600bp
- 通量较低, 1Run 1M 序列, 400–600Mb
- 相对成本较高
- 主要应用: de novo 测序

## • Solexa 的特点与主要应用

- 读长较短, 100–150bp
- 通量高, 25G 每天, 120-150G 每Run
- 主要应用: RNA 测序、表观遗传学研究

## • SOLiD 的特点与主要应用

- 读长较短, 50-75bp
- 精度高, 可达Q40
- 通量高, 20-30G 每天, 1Run 可达120G
- 主要应用: 基因组重测序、SNP 检测等

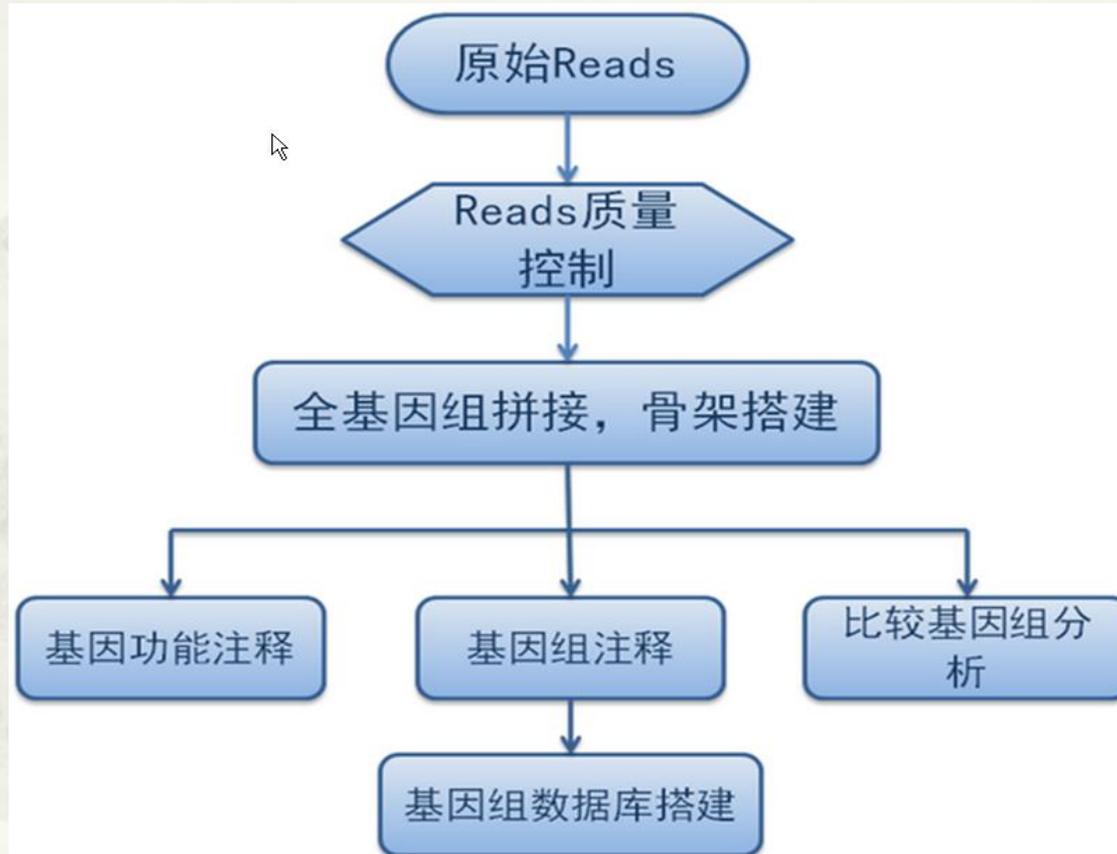
	Feature generation	Sequencing by synthesis	Cost per megabase	Cost per instrument	Paired ends?	1° error modality	Read-length
454	Emulsion PCR	Polymerase (pyrosequencing)	~\$60	\$500,000	Yes	Indel	250 bp
Solexa	Bridge PCR	Polymerase (reversible terminators)	~\$2	\$430,000	Yes	Subst.	36 bp
SOLiD	Emulsion PCR	Ligase (octamers with two-base encoding)	~\$2	\$591,000	Yes	Subst.	35 bp

## • 三种平台的技术差异



平台	454	Solexa	SOLiD
PCR	磁珠乳化PCR	桥式PCR	磁珠乳化PCR
测序载体	磁珠	玻片	玻片
测序方式	焦磷酸、荧光	可逆终止物、荧光	连接酶、荧光
结果序列	FastQ	FastQ	CSFastQ

# 元基因组学测序数据分析



# • 宏基因组测序信息分析主要内容



- 拼接组装
- 物种分类组成分析
- 基因预测和功能注释
- 生成Profiling table
- 主成分分析 (PCA)
- 筛选与样品分组显著相关的因子
- 多样品间比较分析

## • **16S/18S rRNA**测序信息分析内容

- 物种分类、物种丰度分析 
- OTU (Operational Taxonomic Units) 分析
- 多样性分析
- 系统进化分析
- 多样品间的比较分析

## • 常用生物信息学分析平台与资源

- 常用编程分析平台：

Perl / BioPerl

Python / BioPython

R / Bioconductor

JAVA / BioJava

- 常用网上资源：

NCBI SRA - Sequence Read Archive

UCSC Genome Browser

SEQanswers - WiKi & Forum for NGS

## • 常用基因组拼接软件

- Velvet
- Ray
- ABySS
- SOAPdenovo
- SSAKE
- SHARCGS
- MIRA
- Edena

## • 基因组比对软件

- BLAST
- BLAT
- MAQ
- SOAP
- Bowtie
- BWA
- SSAHA
- ELAND

## • **SNP** 分析软件



- SAMTools
- SOAPsnp
- NGS-Backbone
- MAQ
- SeqMan NGen
- CLCBio Genomics

# 新一代测序技术为微生物学的研究带来了新的曙光

- \* 深圳华大Qin等通过对124位欧洲人的肠道微生物组的solexa高通量测序分析（576.7 Gb测序量），为我们揭示了人类肠道菌群的组成与代谢潜能。
- \* Hess等（2011）对牛胃的微生物群落以solexa进行了深度元基因组测序，通过拼接和比对获得了27755个与碳水化合物代谢相关的基因，对部分预测的基因进行了功能验证，**表明很高比例的基因是与纤维素降解相关的。**
- \* Lucker等（2010）对一个富集后*Nitrospira*占到群落内细菌总数86%的微生物群落的元基因组进行了测序分析，拼接出废水处理相关微生物群落中无法分离的*Nitrospira*细菌的全基因组序列，并以此为基础，对*Nitrospira*细菌的代谢功能进行了详细分析，揭示了该菌在反应器群落**氮循环**中的作用机制。
- \* Snapareddy等（2009）对一个城市污水处理厂的样品的元基因组进行了分析，以获得的91Mbp序列预测的群落主要功能类型与反应器的功能间较好吻合

2011-06

## 中外科学家全方位分析全球微生物群落

第一届地球环境微生物计划（EMP）会议在深圳召开。世界各国科学家将携手全方位分析全球范围内微生物群落的多样性及功能。项目将对全球典型的环境样本进行宏基因组测序，其中包括土壤、海洋、空气、淡水生态系统等整个地球表面的绝大多数的微生物群落。



- \* 《第一届地球环境微生物计划：10000个样本的初步研究》
- \* 《水生生物的环境微生物计划的研究——具有最多微生物的生态系统》

# 国内元基因组测序平台

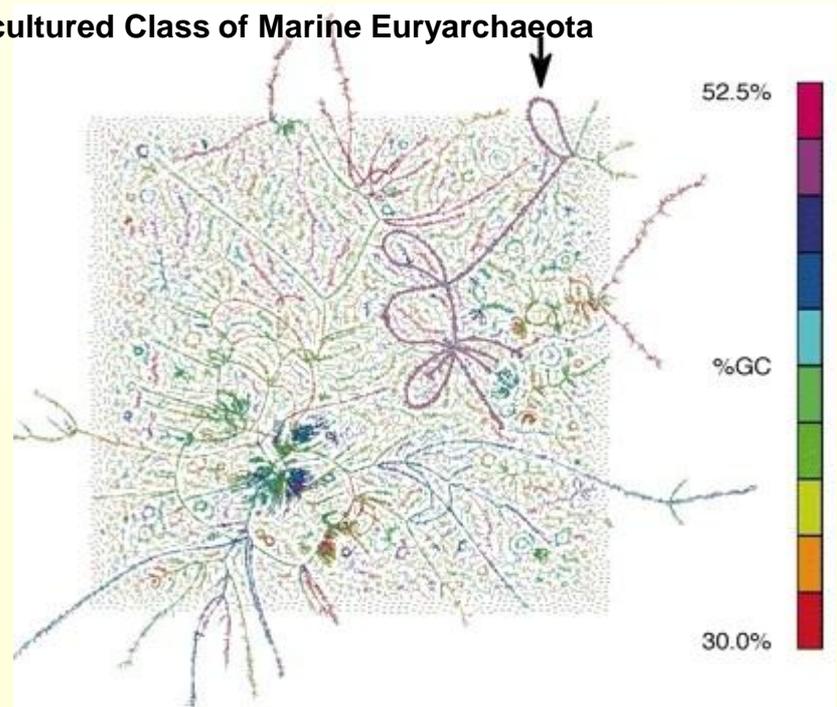
- \* 青岛生物能源与过程所新一代元基因组平台建设
- \* 徐健团队分别与中科院南京土壤所贾仲君研究员、中山大学凌均棨教授等课题组合作，在微生物生态学权威学术期刊The ISME Journal上连续发表了两篇研究论文
- \* Xia, W., et.al., Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. The ISME Journal. The ISME Journal (2011) 5, 1226 - 1236
- \* Yang F., et.al., Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human-populations. The ISME Journal , (30 June 2011) | doi:10.1038/ismej.2011.71

# Untangling Genomes from Metagenomes: Revealing an Uncultured Class of Marine Euryarchaeota

Vaughn Iverson

Science 3 February 2012

## 从宏基因组数据中分离出单个物种基因组序列



从由细菌、古细菌和病毒组装的错综复杂宏基因组DNA序列中，研究人员获得一种神秘的广古菌的整个基因组序列。

2012年2月2日发表在《科学》期刊上的一种新计算方法可能提供答案和允许研究人员从宏基因组数据中对单个物种基因组测序。研究人员将他们的方法应用到从普吉湾(Puget Sound)水面获得的水样品上，能够从14种不同生物组成的DNA混合物中解析出两个完整的基因组序列。

美国华盛顿大学Virginia Armbrust也是该研究论文的共同作者。Armbrust和她的同事们组装的一个基因组序列就是来自一种广古菌(Euryarchaeota)物种的，这种海洋微生物人们从未能够在实验室中培养。

# 人类元基因组

- \* 人类元基因组 又被称为“人类微生物组”或“人类第二基因组”
- \* 是指与人类共生的全部微生物的基因总和，包括肠道、口腔、呼吸道、生殖道等。
- \* 人类体内的微生物多达1000多种，人体内微生物的编码基因的总量大约是人类编码基因数目的50-100倍，这相当于在人类体内存在着另一个基因组通过表达调控人体的生命健康，即第二基因组。
- \* 科学家后来发现，人类体内大多数微生物的生命活动由复杂的微生物群落来完成而非单一物种
- \* 人类是与微生物共生的，比如在2005年诺贝尔生理学或医学奖表彰的就是科学家关于幽门螺旋杆菌与胃炎及胃溃疡之间联系的发现；这一发现其实就是人类元基因组的部分基因表达后的结果。
- \* 2010基本绘制出了人类肠道元基因组的图谱年3月，关于人类肠道元基因组的研究有了新的突破，在各国科学家努力下，已经，这将对科学家研究肠道微生物与人类健康的关系提供有力的帮助。
- \* 越来越多研究表明，体内菌群的组成和活动与人的生长发育、生老病死息息相关。
- \* 研究论文表明：肠道菌群可调节人体脂肪储存活动，因而与肥胖症密切相关；还有科学家发现，能够产生神经毒素的梭状芽孢杆菌在肠道内过度生长，与儿童自闭症发生有很大联系

- \* 一项宏大的科学计划——“人类元基因组计划”启动（2007年）
- \* 上海交大、国家基因组南方中心和浙江大学等单位已组成“中国人类元基因组联盟；
- \* “人类基因组计划”用了13年，花费30亿美元，测定出人类自身基因有2.5万个左右。人类元基因组相当于10个人类基因组计划工作量，有可能发现超过100万个新的基因。
- \* 科学家认为：人类基因组和人类元基因组这两本“天书”绘制完成后，将有助于更好地破解人类疾病。
- \* 。

# 共享元基因资源

---

- \* [Stand Genomic Sci.](#) 2011 Nov  
30;5(2):203-10. Epub 2011 Nov 23.
- \* Open resource metagenomics: a model  
for sharing metagenomic libraries

# 相关的仪器介绍

- ☼ *BIO\_RAD* CHEF MAPPER XA
- ☼ Bertin Precellys 24 多功能样品均质器
- ☼ **Model 422 Electro-Eluter**
- ☼ *BIO\_RAD* **Gene Pulser Xcell**
- ☼ **Genetix Qfill 3**微孔板液体分注仪
- ☼ Thermo **IemSIncubator/Shaker/HT**
- ☼ GeneTix QPix2
- ☼ Synergy H4 Hybrid Microplate Reader
- ☼ Bio-Tek precision XS美国伯腾全自动加样工作站

# 脉冲场凝胶电泳 PFGE

- 1984 年美国哥伦比亚大学 Schwartz 和 Cantor 首创脉冲电泳, 并成功地应用于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 染色体 DNA 的分离, 大大提高了 DNA 的分辨率。
- PFGE 是一种可用于分离 20 Kb~10Mb 大分子量 DNA 的新型凝胶电泳技术。

**表 1 脉冲时间与分离 DNA 片段范围关系**

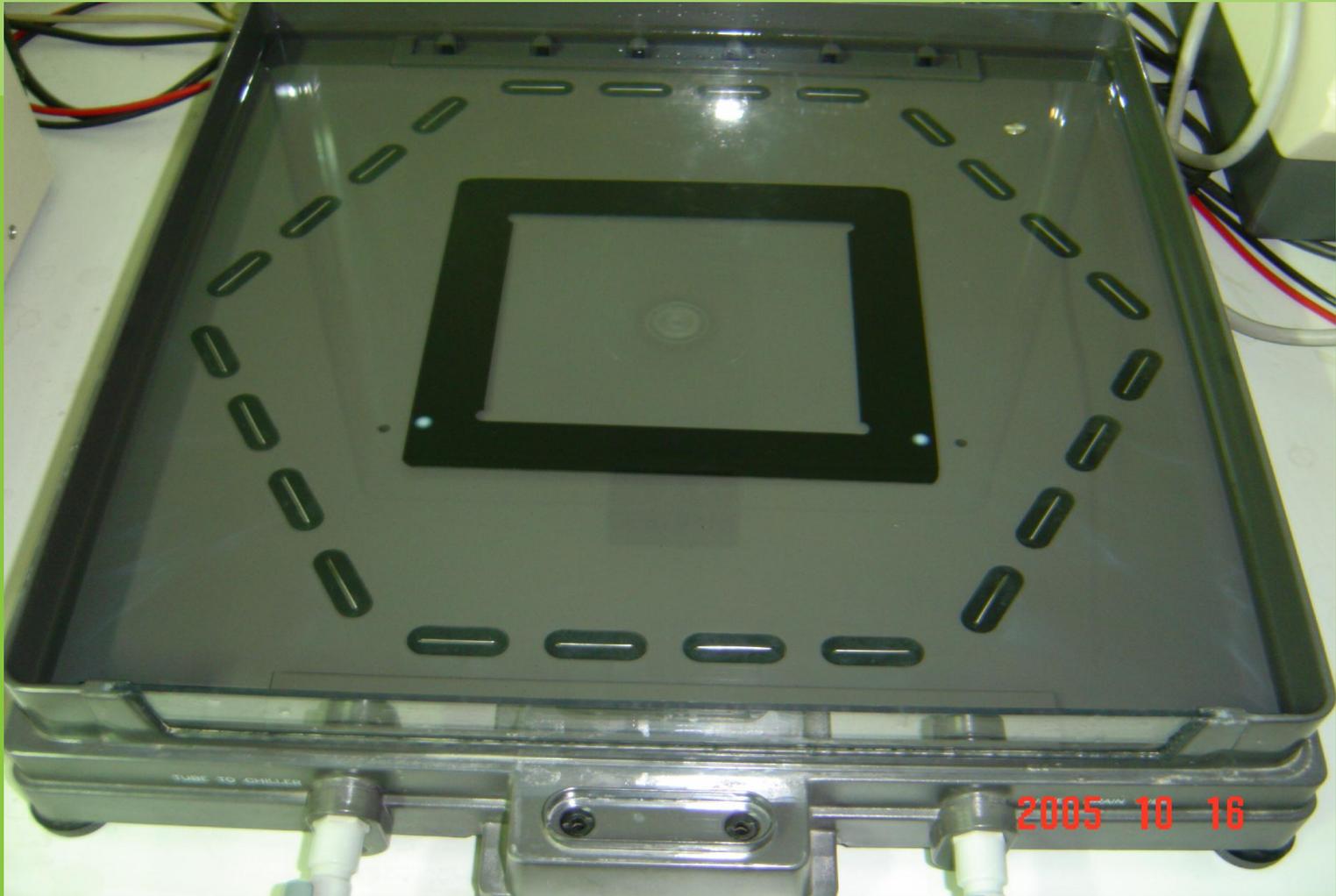
脉冲时间 (S)	有效分离 DNA 范围 (kb)
5	20~100
25	40~400
45	40~600
100	40~1000
125	100~1600

## PFGE原理

在琼脂糖凝胶上外加正交的交变脉冲电场,其方向、脉冲时间与电流大小交替改变,当DNA分子变换方向的时间小于脉冲周期时,DNA就可以按其分子量大小分开。

## CHEF

Chu等根据静电学原理,将24个电极均匀排列在等六边形周围,从而在六边形中央形成脉冲式均质电场,称之为等高锁状均质电场(Contour-Clamped Homogeneous Electric Field),简称CHEF。



# BIO\_RAD CHEF MAPPER XA



六角形电极的电泳槽，保证矢量电场的自由旋转，比常规的脉冲场电泳提供更高的分辨率，电泳速度和更精确的分离，主要用于基因组DNA的分离分析，大分子DNA的指纹图谱分析及多态性分析等

# Bertin Precellys 24 多功能样品均质器

Precellys 24是一台集研磨、裂解、均质为一体的多功能、高通量样品均质器、细胞破碎仪、组织匀浆机。它通过三维高速振动（最高6800rpm），辅助研磨珠（玻璃珠、陶瓷珠、钢珠等）的敲打，达到对样品进行研磨、裂解、均质的目的



技术参数：

1. 均质速度5000~6800rpm/min，100rpm可调
2. 内置2个程序，可任意更改并储存，每个程序最高可设3个循环
3. 每个循环运行时间为1-90s，1s可调；循环之间间隔数分钟，1s起可调
4. 真空压盖技术（国际专利）固定样品管，使得样品放置更方便、快捷、安全
5. 样品管无需平衡，即插即用，运行稳定
6. 3种安全防护：过温报警、压力报警、开盖报警
7. LCD双排数字显示程序进程
8. 对样品温度要求极为苛刻的用户，有Cryolys冷却系统供选配

# Model 422 Electro-Eluter

Model 422 Electro-Eluter #165-2976



# BIO\_RAD Gene Pulser Xcell电转仪



- 能够提供指数波（exponential waveform）和方波（square waveform）
- 适用于所有细胞类型，原核的和真核的
- 模块化设计，包含 main unit，CE module，PC module 和ShockPod
- 友好的数字用户界面，可方便、直观地编程控制所有参数，包括那些附属设备的参数
- 应用了 Bio-Rad的专利技术 PulseTrac 电路和 Arc 保护技术 (US 专利号 4,750,100; 4,910,140)
- 预存有经优化的针对常见的细菌、真菌和动物细胞类型的实验程序
- 手工编程时可进入或修改所有参数或直接编辑所需要的时间常数
- 可储存144个用户自己的程序
- 有优化程序的功能
- 能提供实际发送脉冲的数据，包括时间常数、实际的电压，脉冲间隔和脉冲时间等
- 在高压电路中提供最高3000 V的电压，在低压电路中提供最高500 V的电压
- 能够储存和唤回前100次实验的实验参数
- 用户参数选择可调节按键音量和显示屏亮度
- 紧凑的外型
- 单键激发电脉冲
- 革新的 ShockPod电击腔（shocking chamber）可单手操作，能适当地定位电击杯来进行安全操作。
- 符合的电器安全指标包括：EN 61010，EMC EN61326 Class A
- 作为PulseTrac系统的一部分，用户可选择进行校准和电容器测量

另外：

GiBiCo cell-porter 能保证在冰上操作，实现高通量转化，得到较大片段。

# Genetix Qfill 3 微孔板液体分注仪



The Genetix QFill3 is a simple, rapid and versatile microplate filler. Critically, for sterile applications such as dispensing bacterial growth media and mammalian cell culture media, the QFill3 has a small enough footprint to be sited in a laminar flow hood.

The entire flow path can be removed and autoclaved to ensure sterility between runs. 96 and 384-well plate formats can be used with this system and a range of manifolds offer the ability to use microplates of differing depths including deep-well blocks.

The instrument can fill a 384-well microplate in under 10 seconds with a CV of <math><5\%</math> (for a 40 $\mu$ l volume).

# Thermo iEMSIncubator/Shaker/HT

## 微孔板孵育和振荡器



一种高性能的96孔板孵育器和圆周振荡器

- 1,扩展的温度范围可达到接近70度
- 2,极佳的板内温度一致性
- 3,有效的圆周振荡
- 4,同时孵育3块板（高温）或9块板（普通）

### 独特的优点

iEMS系统使用独立的微孔板加热适配器对每块板进行均匀加热，板内温度差异小于 $0.3^{\circ}\text{C}$ 。

# GeneTix QPix2



QPix2全自动多功能生物芯片挑克隆系统  
QPix2是一款多功能的生物芯片挑克隆系统。

挑克隆 (Colony Picking) :

- u 在线CCD实时监控
- u 96针高速运行, 挑4600个克隆/小时
- u 1×222mm×222mm QTray、2×80mm×120mm、5只培养皿或15×96/384微孔板

膜芯片 (Macroarraying) :

- u 222mm×222mm膜上点55,296个样
- u 100,000点/小时
- u XY轴上达到1μm高精度解析度, Z轴由伺服马达控制
- u 同样适合点DNA膜芯片阵列

复制 (Replicating) :

- u 可以进行96孔板和384孔板的相互复制转移

重排转移 (Rearranging) :

- u 通过屏幕选取特定的点或DNA序列进行再排列, 自动转移到指定位置

环境控制:

- u 严格的针头灭菌一体化操作, 装有针头刷洗槽, 用乙醇刷洗针头, 卤素灯干燥防止样品交叉污染,  
稠厚样品推荐加装刷洗槽, 使用前后紫外光杀菌

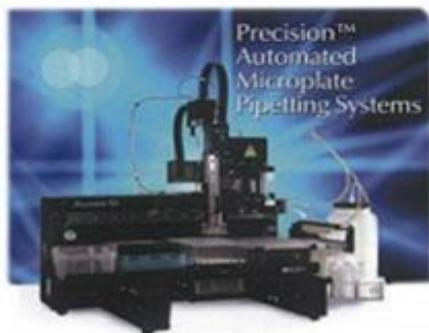
# Synergy H4 全功能酶标仪 (Synergy H4 Hybrid Microplate Reader)



BioTek仪器公司的酶标仪家族新成员--Synergy H4 全功能酶标仪，同时整合了基于滤光片和基于光栅的光学系统

## 美国伯腾Bio-Tek Precision XS 全自动加样工作站

美国原装进口



### Precision™ 系列全自动加样工作站

Precision™系列全自动加样工作站拥有小巧的体积和强大的功能，能够胜任试管、离心管、96孔板以及384孔板之间的移液及分液工作。Precision可使用单通道、8通道以及12通道自动移液装置，完全替代日常繁琐的加样工作。智能化的软件设计，使得Precision可以胜任液体分装、梯度稀释、板对板复制以及样本稀释等多种用途。同时Precision还可选配大体积分液系统，实现试剂分配到孔板的高速分液。Precision可适用于标准板、浅孔板及深孔板。

# 微生物所现存元基因组库

- 杨瑞红，构建的奶牛瘤胃质粒文库
- 蔡莹，构建的西藏土壤质粒文库(塔腾冲蛤蟆嘴,塔格架7号)
- 朱雅新，构建奶牛瘤胃BAC文库
- 朱雅新，构建的牦牛瘤胃BAC文库
- 朱雅新，构建的洱源热泉BAC文库
- 朱雅新，一株强毒鼠疫菌BAC文库
- 朱雅新，构建黄河冷水团浓缩海水 Fosmid文库
- 朱雅新，构建深海海水phi29扩增的 Fosmid 文库
- 朱雅新，构建深海海泥phi29扩增的 Fosmid 文库

# 目前基因库利用情况

- 赵圣国等筛选奶牛瘤胃BAC库
- 朱雅新筛选牦牛瘤胃BAC库纤维素酶，木聚糖酶，果胶酶，甘露聚糖酶，淀粉酶，酯酶，脂肪酶，蛋白酶
- 钟瑾实验室的滕坤玲筛选牦牛瘤胃BAC库、洱源热泉BAC库细菌素
- 董志杨实验室陈秀珍等筛选洱源热泉BAC库中纤维素酶，木聚糖酶，果胶酶，甘露聚糖酶，淀粉酶，酯酶，脂肪酶，蛋白酶
- 冯婕实验室张超筛选奶牛瘤胃BAC库抗抗生素基因