

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2018090702

何荣, 原珂, 林里, 等. 功能宏基因组学在新型抗生素耐药基因研究中的应用进展[J]. 环境化学, 2019, 38(7): 1548-1556.

HE Rong, YUAN Ke, LIN Li, et al. Functional metagenomics: One of the most robust tools for discovering new antibiotics resistance genes[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(7): 1548-1556.

功能宏基因组学在新型抗生素耐药 基因研究中的应用进展*

何荣¹ 原珂¹ 林里² 杨颖¹ 邹世春¹ 栾天罡^{2,3} 陈保卫^{1**}

(1. 中山大学海洋科学学院, 广州, 510275; 2. 中山大学生命科学院, 广州, 510275;
3. 中山大学环境科学与工程学院, 广州, 510275)

摘要 抗生素耐药性是二十一世纪人类面对的最严峻的环境健康问题之一. 抗生素耐药基因 (Antibiotics resistance genes, ARGs) 被认为是一类新型环境污染物. 当前针对 ARGs 的主要研究方法有细菌分离和培养法、聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 法和宏基因组法. 然而, 仅有功能宏基因组方法能发现新型的 ARGs. 功能宏基因组方法利用新一代测序技术的高通量的特性, 结合分子生物学技术和功能筛选构建有关抗生素耐药性的基因库, 通过生物信息学分析高效地发现新型 ARGs. 本文综述了近来利用功能宏基因组技术筛选新型 ARGs 的相关研究进展, 总结了功能宏基因组学相关的技术和方法的优势和限制, 并展望了功能宏基因组学方法进一步发展的方向.

关键词 抗生素耐药基因, 功能宏基因组学, 文库构建.

Functional metagenomics: One of the most robust tools for discovering new antibiotics resistance genes

HE Rong¹ YUAN Ke¹ LIN Li² YANG Ying¹ ZOU Shichun¹
LUAN Tiangang^{2,3} CHEN Baowei^{1**}

(1. School of Marine Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510275, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510275, China;

3. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510275, China)

Abstract: Antibiotic resistance is one of the greatest challenges on the public health in the world. Currently, antibiotic resistance genes (ARGs) have been regarded as a group of emerging environmental contaminants. The main analytical approaches of ARGs include isolation and incubation of bacterial strains, PCR, and new generation high-throughput sequencing-based metagenomic methods. However, functional metagenomic approach is a robust tool to find the new ARGs that have never been identified. This approach combines the high throughput of new generation sequencing platforms with function identification of constructing gene libraries, which is able to efficiently seek the novel ARGs without any of prior knowledge about the function of them. In this paper, we reviewed research progress on the application of functional metagenomics in the discovery of novel ARGs and summarized the advantages and flaws of current technologies and methods related to functional metagenomics. In final, we provided the perspectives of the future improvement on functional metagenomics.

2018年9月7日收稿 (Received: September 7, 2018).

* 国家自然科学基金 (21777198) 资助.

Supported by National Natural Science Foundation of China (21777198).

** 通讯联系人, Tel: 020-84111627, E-mail: Chenbw5@mail.sysu.edu.cn

Corresponding author, Tel: 020-84111627, E-mail: Chenbw@mail.sysu.edu.cn

Keywords: antibiotic resistance genes, functional metagenomics, metagenomic library.

抗生素是人类医药史上最重大的发现之一,自 1928 年弗莱明发现青霉素以来,有 3 次诺贝尔医学或生理学奖颁给对新抗生素药物有突出贡献的科学家^[1].除临床使用外,1950 年美国食品与药物管理局(FDA)首次批准抗生素可用作动物饲料添加剂^[2].自此,抗生素被广泛地用于人类与动物细菌性疾病的预防和治疗.大部分抗生素易溶于水,抗生素在使用后约有 30%—90%通过人和动物的粪、尿排出,随后抗生素经不同途径进入环境,主要包括:污水处理厂、养殖场、垃圾填埋场、医院和药厂废水等.抗生素的大量生产和广泛使用导致环境介质中(如土壤、环境水体)抗生素含量显著提高,抗生素的胁迫诱导了环境微生物抗生素耐药性的进化和传播^[3].研究表明,低浓度抗生素暴露 10 d 后,大肠杆菌(*Escherichia coli*)的耐药性能迅速提高约 1000 倍^[4].抗生素的长期滥用导致大量耐药菌的产生,包括对多种抗生素均具有极强耐药性的“超级细菌”^[5].据统计,每年欧洲有超过 25000 人死于耐药病原菌引起的感染,估计 2050 年全球死于耐药病原菌感染的人数将超过一千万.2006 年 Pruden 等明确提出,抗生素耐药基因(Antibiotics resistance genes, ARGs)是一类新型环境污染物^[6].

抗生素耐药基因的分析方法主要有细菌分离和培养法、聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)方法和基于高通量测序的宏基因组分析方法^[7].上述分析方法各有优势:细菌分离和培养法能直观反映被分离菌株的耐药性^[8];普通 PCR 方法和定量聚合酶链式反应(Quantitative Polymerase Chain Reaction, q-PCR)方法具有很高的灵敏度,可对环境样品中的 ARGs 进行准确的定性和定量分析^[8-9],但这些方法都基于已知 ARGs 的序列信息,并不能发现新的 ARGs^[10].功能宏基因组学能发掘新型的 ARGs,该方法利用新一代测序技术高通量的特性,结合分子生物学技术和功能筛选构建有关抗生素的耐药性基因库,最后通过生物信息学分析发现新型的 ARGs^[11-13].新型 ARGs 的发现不仅有利于提高对抗生素耐药性的认识,也能有助于新型抗生素的研发^[12].

本文综述了近来功能宏基因组技术在筛选新型 ARGs 的研究进展,总结了运用功能宏基因组学发现新型 ARGs 的方法学,其基本流程如图 1 所示,主要包括 3 个方面:宏基因组文库的构建、宏基因组文库的功能筛选及后续的生物信息学分析.

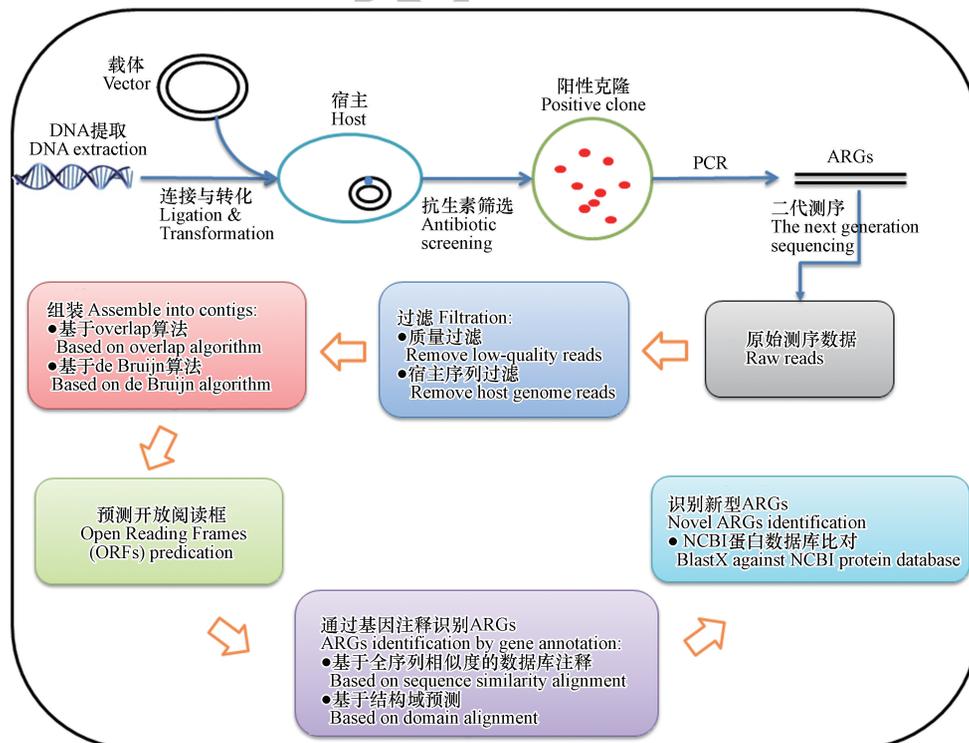


图 1 功能宏基因组方法发掘新型 ARGs 流程图

Fig.1 General procedure regarding identification of novel ARGs using functional metagenomics

1 宏基因组文库的构建 (Construction of metagenomic library)

1.1 环境样品类型

由于抗生素耐药性在环境中普遍存在,能用于功能宏基因组法新型抗生素耐药基因研究的样品很多,包括:人和动物肠道粪便^[14-16],污水处理厂样品^[2,17-18],医疗废水、养殖水体^[19],环境水样^[20-22],农田土壤^[23],如表 1 所示.近年来,科学工作者以上述样品构建宏基因组文库,功能筛选出多种新型 ARG.如 Wichmann 等在奶牛的排泄物中发现了 80 多种 ARGs,其蛋白序列与 GenBank 中序列的平均相似度仅为 50%—60%,且发现一种新型的氯霉素转移酶^[24].Leclercq 等研究了北京养猪场中的粪便样品,使用功能宏基因组法筛选出 17 种耐四环素基因,其中有 2 种完全新型的 ARGs,分别是 *tet*(59)、*tet*(W/N/W)^[25].Amos 等提取了污水处理厂上下游河水中的 DNA,使用功能宏基因组学方法发现了一些新型的转运基因,为提出抗生素的新型耐药机制提供了证据^[18].土壤含有极其多样化的微生物群落^[26],其基因组是大肠杆菌基因组的 5×10^3 — 5×10^5 倍^[27],是发现新型抗生素耐药基因的一类重要样品^[12].通过使用土壤为样本构建宏基因组文库,功能筛选出多种类型 ARGs^[28-29].一些研究直接从耐药菌株中提取 DNA,构建 35—45 kb 大片段黏粒文库再亚克隆构建 3 kb 质粒文库,通过功能筛选最终确定新型 ARGs 序列^[30].

表 1 功能宏基因组学方法在发掘新型 ARGs 的应用

Table 1 Application of functional metagenomics approaches in exploring of novel ARGs

样品 Samples	载体 Vectors	宿主 Hosts	插入 DNA 长度 The length of inserted DNA	新型 ARGs Novel ARGs
土壤	pCF430	<i>E. coli</i> EC100	未知	<i>bla</i> Rm3 ^[31]
	pCC1FOS	<i>E. coli</i> EPI300	25—70 kb	耐氨基糖苷类、磺胺类以及广谱 β -内酰胺类的新型 ARGs ^[32]
	pZE21	<i>E. coli</i> DH10B	1—5 kb	耐四环素类 β -内酰胺类等抗生素的新型 ARGs ^[33]
	pWED-TNC/ pJTU2554	<i>E. coli</i> EFI 100-T1/ <i>E. coli</i> JTU007	38/30 kb	21 种 MFS transporter 基因 ^[34]
排泄物	pCCFOS2	<i>E. coli</i> EPI300	~40 kb	<i>tet</i> (59), <i>tet</i> (W/N/W) ^[25]
	pZE21	<i>E. coli</i> DH10B	1—5 kb	新型抗 <i>D</i> -环丝氨酸基因 ^[35]
	pZE21	<i>E. coli</i> DH10B	2—5 kb	16 S rRNA 甲基化酶 ^[36]
	pCF430	<i>E. coli</i> DH10B	2.3—3.2 kb	氯霉素转移酶 ^[24]
水	pZE-21	<i>E. coli</i>	2—4 kb	耐氨基苄、四环素、呋喃妥因、磺胺二甲嘧啶的新型 ARGs ^[37]
	pCC1FOS	<i>E. coli</i> EPI300	未知	新型的 β -内酰胺酶 ^[38]
环境样品分离的可 培养细菌	pUC18	<i>E. coli</i> TOP 10	未知	<i>tet</i> 45 ^[39]
	pZE21	<i>E. coli</i> TOP 10	0.7—5 kbp	One marine-specific ampicillin-resistance-conferring β -lactamase ^[40]

1.2 DNA 提取

目前,环境样品 DNA 的提取方法主要有:细胞提取法和直接裂解法.细胞提取法是利用离心介质或梯度离心等方法先把微生物从环境样品中分离出来,再按处理纯培养细胞的方法裂解微生物提取 DNA,其优点是 DNA 片段长(20—500 kb)且纯度高,提取的 DNA 可用于构建染色体文库^[41].然而,细胞提取过程会导致部分微生物不能从样品中被有效分离,且该方法对于一些细胞壁较厚的微生物 DNA 提取效率较低,DNA 的提取产率一般比直接裂解法低约 100 倍^[42].直接裂解法是将环境样品直接悬浮在裂解缓冲液中进行提取及纯化.该方法优点是,操作容易、成本低、DNA 产率高、重复性好.但是机械剪切作用导致提取的 DNA 片段较短(1—50 kb),此外,该方法对酚类物质(尤其是腐殖酸)去除效率低,提取的 DNA 需进一步纯化才能进行下游实验^[43].直接裂解法无需进行微生物培养,且黏附颗粒上的微生物亦能被裂解,所得 DNA 能更好地反映样品中微生物群落的多样性,目前该方法被普遍用于环境样品 DNA 的提取^[44].

土壤是由水、矿物质及有机质组成,其中有机质尤其是腐殖质在 DNA 提取过程中难以去除,大大降

低了提取的 DNA 质量,严重干扰了如 DNA 连接,PCR 等下游实验^[26].在 DNA 提取前对土壤样品进行清洗,能去除土壤中可溶性的有机质,同时也会导致胞外 DNA 损失.有研究发现直接裂解法联合 CsCl-EtBr 密度梯度超速离心法能去除大部分腐殖酸,提取的 DNA 具有较高的纯度^[26].当土壤样品中含有较高比例的革兰氏阳性菌,研磨、冻融及 SDS 联合使用可获得高产量且片段完整的 DNA^[45].

目前,有许多方法被用于提取排泄物中的 DNA,如硫氰酸胍法、双水相系统法、酚-氯仿法^[46].然而这些方法都会受排泄物中杂质、样品保存时间及样品中微生物种类影响.Li 等发现使用商业试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit)能有效的去除排泄物中的杂质,并用硅胶进一步纯化提取液中的 DNA,保证 DNA 提取的质量,但这种方法的成本相对较高^[47].

样品类型及其所携带的微生物群落结构的不同,采用的 DNA 提取方法也略有不同,其目的都为确保 DNA 完整性和质量,并能最大程度的保持样品中微生物多样性.为了获得较为完整的 DNA,应在提取过程中及时使一些 DNA 酶(如 DNA 剪切酶等)失活,防止 DNA 被降解;微生物裂解后,应避免剧烈振荡,防止 DNA 被机械剪切.一些环境样品的 DNA 产率很低,主要原因是一些细胞壁较厚的菌株未完全裂解.为了提高产率并获得多样性高的 DNA,可联合使用酶裂解和物理裂解,以实现环境样品中微生物的充分破碎.

1.3 DNA 片段化

由于选择的载体不同,插入的 DNA 长度也不同,如表 1 所示.使用质粒(plasmid)作为载体,插入的 DNA 片段约为 3 kb,主要原因是 ARGs 是由单个基因编码的,一个耐药基因的长度约为几百至上千个碱基^[33].如使用 fosmid 为载体,插入的 DNA 片段约为 30—70 kb,较长的 DNA 片段有利于识别 ARGs 的来源,即是位于细菌染色体上或质粒上.直接裂解法提取环境样品中的 DNA,其长度一般是 1—50 kb,若是直接用于构建质粒载体文库,DNA 片段过长,将大大降低载体连接效率和转化效率,所以必须进一步将 DNA 片段化(约 3 kb).

DNA 片段化的方法包括物理法(声学剪切、超声波剪切、水力剪切)、酶剪切法(限制性核酸内切酶、非特异性酶、转座酶)及化学法(热力学、二价阳离子)^[48].其中适用于构建功能宏基因组文库的方法为酶切法和超声波法.超声波破碎 DNA 时,将电能转化为超声波,超声波能在水溶液中产生密集的小气泡,随着气泡的震动和聚爆而产生机械切割力 DNA 片段化.与酶切法相比,超声波操作更为简单,片段化精准,成功率高且可重复,所以目前普遍使用超声波法剪切用于构建功能宏基因组文库的 DNA^[18, 33, 40].

1.4 载体和宿主菌的选择

功能宏基因组载体的选择原则是便于宿主中目标基因的稳定存在和功能的正常表达.目前用于研究新型 ARGs 的载体包括,小片段 DNA 插入文库载体(质粒载体^[49])和大片段 DNA 插入文库载体(细菌人工染色体(BAC)^[50]、Fosmid 载体^[25, 31, 34]).研究 ARGs 的质粒载体有 pZE21、pUC 系列载体、pHT01 载体.使用较为广泛的载体是 pZE21 载体^[33, 36, 40],pZE21 载体通过 3 个位点(*XhoI/AatII*, *XbaI* 及 *SacI*)分为 3 个功能模块:模块 1 有多克隆位点,可插入 ARGs,多克隆位点上游含有 PLtetO-1 转录识别位点和核糖体结合位点,这些位点保证插入的基因能在宿主中被正常表达;模块 2 含有适于大肠杆菌内的复制起始位点,确保插入基因能在大肠杆菌宿主中稳定存在并复制;模块 3 含有卡那霉素耐药基因及相应的转录和核糖体结合位点,便于阳性克隆的筛选.pUC 系列载体对宿主代谢机制干扰小,且在宿主中高拷贝存在^[51],通常与大片段 DNA 插入文库载体联合使用.pHT01 是一种穿梭载体,含有两个亲缘关系不同的复制起始点,能在大肠杆菌和枯草杆菌中都稳定存在^[52].质粒载体常用于研究 ARGs 的序列信息,无法提供 ARGs 的结构以及位置信息,大片段 DNA 插入文库载体可与此互补.BAC 载体能够稳定地克隆和保持大于 70 kb 的 DNA 片段^[49],Fosmid 载体适用于 35—45 kb 的 DNA 片段^[53],与 BAC 载体相比,Fosmid 载体具有以下优点^[54]:(1) Fosmid 载体携带 *E. coli* 的 F 因子,可保证单拷贝克隆的高稳定性;(2) Fosmid 载体含有高拷贝复制起始位点,有利于细菌宿主内目标基因及其载体的复制;(3)可有效并准确的控制插入 DNA 片段的长度(35—45 kb),降低 Fosmid 构建的宏基因组文库的假阳性.这些优势使得 Fosmid 载体成为较受欢迎的大文库构建载体之一.大片段 DNA 能保证基因簇的完整性,有利于 ARGs 的结构与功能分析.然而,大片段 DNA 插入文库载体克隆效率低,插入基因很难在宿主菌中正常转录与

翻译,且由于 DNA 片段过长,需要亚克隆从而确定 ARGs 的位点与序列^[51]。

目前,最常用的表达 ARGs 的细菌宿主是大肠杆菌^[18, 33, 40, 55]。由于 pZE21 上含有大肠杆菌复制起始位点,使得重组质粒能在大肠杆菌中稳定存在和复制。pZE21 的结构特点使其能利用宿主细菌的转录翻译体系,使插入的目标基因的功能被有效表达,且由于大肠杆菌具有良好的生长特性,完善的基因编辑工具,使大肠杆菌宿主-pZE21 载体体系被广泛地用于 ARGs 的功能宏基因组方法^[37, 56]。然而,研究表明大肠杆菌只能表达外源基因的 30% 左右,对于富含高 GC 的放线菌 DNA,大肠杆菌仅能表达 7%^[15]。尽管 pZE21 载体上含有能被宿主识别的转录和核糖体结合位点,保证外源基因的转录与翻译,但大肠杆菌缺乏一些确保外源性多肽组装的物质,如蛋白修饰酶、分子伴侣、辅因子等,结果导致一些外源性的 DNA 在大肠杆菌内不能表达,且外源性基因能干扰大肠杆菌内部的代谢过程^[57]。研究发现,使用革兰氏阴性菌变形杆菌和富含 GC 的变铅青霉链菌作为表达宿主,可使大肠杆菌中不能表达的基因正常表达其功能^[58]。Biver 等就用枯草杆菌为宿主,筛选出具有抗蜡状芽孢杆菌活性的新型物质,这种物质对蛋白酶 K 敏感,但在大肠杆菌中却无法表达出来这种物质^[52]。

1.5 转化方法

将重组的质粒载体导入宿主菌的方法有化学转化法和电转化法。化学转化法是利用氯化钙改变感受态细菌膜的通透性^[59],其转化效率较低,一般低于 10^8 CFU/ μ gDNA。电转化的基本原理是将细菌置于电场中,菌膜起着电容器的作用,随着电压升高,菌膜组分被极化,并在细菌膜两侧产生电位差,当电位差超过阈值,菌膜局部被击穿,形成一些瞬时的孔洞,孔径大小足以让外源性基因进入细菌^[59]。与化学转化法相比,电转化法的转化效率高近 100 倍^[60]。因此,功能宏基因组的方法普遍使用电转化法将重组的质粒导入宿主菌。

影响电转化效率的因素有很多,主要包括电转化溶液的离子强度、宿主菌培养条件、宿主菌生长状态等^[60]。降低电转化溶液的离子强度有助于提高电转化效率^[61]。使用去离子水或 10% 甘油洗涤菌体,降低菌液中的离子浓度,则电阻越小,避免电转化过程中产生电火花,但洗涤次数过多,会造成宿主菌损失和污染^[61]。目标基因与质粒的连接反应溶液中含有 Cl^- , Na^+ 等盐离子,需对其进行脱盐处理,方法包括硅胶柱和微量透析,后者的脱盐效率是前者的 3—5 倍^[62]。制备大肠杆菌感受态细胞的最佳培养温度为 25 °C,这时细胞膜不饱和脂肪酸的含量增加,能提高膜的流动性,从而提高菌体对外源性 DNA 的摄取能力^[63]。培养基中可添加调节渗透性的物质(如甘氨酸),影响细胞壁的合成,提高菌膜的渗透性,导致电转化效率的提高^[63]。此外,选择合适的制备感受态细菌的生长期也是影响转化效率的关键因素,对数生长期前期的菌体制备的感受态菌的转化效率是后期的 5 倍^[61]。

2 宏基因组文库的功能筛选 (Functional screening of metagenomic library)

目前,构建宏基因组文库的受体菌大多使用革兰氏阴性大肠杆菌。进行抗生素耐药功能筛选时,应尽可能避免革兰氏阴性菌不敏感的糖肽类、大环内酯类、噁唑烷酮类以及万古霉素抗生素等^[13],可选择在环境中检出率较高的抗生素,如四环素类、磺胺类、大环内酯类和喹诺酮类^[64],也可选择一些新型的抗生素,如替加环素。 β -内酰胺类抗生素虽然使用量较大,但在环境中易水解,因此检出率较低^[65]。功能宏基因组在进行抗生素耐药性筛选时,一般使用抗生素的最小抑菌浓度^[66],即在最佳培养条件下能抑制 90% 的菌(37 °C)生长的浓度^[24]。每个阳性克隆(抗生素胁迫下能存活的宿主菌)都携带 ARGs,收集阳性克隆,并以此为模板,设计 PCR 引物扩增能表达抗生素耐药性的插入基因,以用于后续的高通量测序和生物信息学分析。

3 生物信息学分析 (Bioinformatic analysis)

3.1 高通量测序

目前常用的高通量 DNA 测序技术主要包括焦磷酸测序技术(454 life sciences 公司)、Solid 测序技术(ABI 公司)和 Solexa 测序技术(Illumina 公司)。这 3 种测序技术基本原理类似,核心策略都是边合成边测序,即生成新 DNA 互补链时,加入的 dNTP 通过酶促级联反应催化底物激发出荧光,或直接加入荧光标记的 dNTP 或半简并引物,在合成或连接生成互补链时释放出荧光信号,捕获荧光信号并转化为一个

测序峰值,获得互补链序列信息.这3种技术平台各有优点,焦磷酸测序法的测序片段较长,能达到400 bp, Solexa 测序技术性价比最高,不仅测序仪器的价格低且运行成本也低,测序成本只有焦磷酸测序法的十分之一. Solid 测序的准确度最高,原始碱基数据的准确度大于99.94%,而在15x覆盖率的准确度可以达到99.999%,是目前准确度最高二代测序平台^[67].二代测序技术虽然测序通量高.可缺点是读长短(30—450 bp),扩增过程也易引入外源基因而错配.随着大数据时代的到来,出现了 Helicos Biosciences 公司的单分子 DNA 测序(True single molecular sequencing, tSMS)、Pacific Bioscience 公司的单分子实时测序(Single molecular real time sequencing SMRT)以及 oxford Nanopore 的纳米孔单分子技术为代表的第三代测序平台^[68].第三代测序技术是集高通量、快速、长读长及低成本等多种优点的新一代测序技术,其最大特点是无需 PCR 扩增,可直接读取目标序列,假阳性大大减少,避免了 PCR 扩增中常见的碱基替换及偏置等错误^[69].但是,其准确度远低于二代测序技术,其测序错误率达到15%^[70].目前,三代测序仍处于初步发展的阶段,二代测序仍占据 DNA 测序的主流市场.

3.2 生物信息学分析

测序所得的 raw reads 经质量过滤并去除宿主序列后进行组装.宏基因组组装有两种常见的策略,一种是基于序列 overlap 关系进行拼接,代表软件有 phrap;另一种就是基于 de Bruijn 图进行组装,软件有 Velvet、megahit、SOAPdenovo.基于序列 overlap 策略组装方法需要较长的基因测序长度,因此这种策略更有利于跨越短重复序列,避免宏基因组数据中复杂的重复序列带来的干扰.基于 de Bruijn 图的算法是先把 reads 分割成一定长度的 k-mer,然后根据 k-mer 之间的碱基配对关系去构建 de Bruijn 图,最后分析 de Bruijn 图找出合理的序列组装结果,该方法是现阶段主流的组装方法,其中 velvet 可用于短 reads 的组装(25—50 bp)^[71].功能宏基因组筛选子平行组装与注释(Parallel Annotation and Reassembly of Functional Metagenomic Selection, PARFuMS)结合 overlap 和 de Bruijn 两种算法,已被成功用于土壤和排泄物中新型 ARGs 的研究^[33, 35],主要步骤如下:1)屏蔽测序数据中的载体序列;2)使用 velvet 进行三次迭代组装;3)最后使用 phrap 迭代组装两次.将组装的 contigs 进行基因预测获得开放阅读框(Open reading frames, ORFs),将 ORFs 通过功能注释筛选具有抗生素耐药性功能的 ORFs.目前 ARGs 预测方法有基于全序列相似度和基于结构域分析的方法.基于序列相似度的方法是通过与抗生素抗性基因数据库(Antibiotic Resistance Genes Database, ARDB)或综合抗生素数据库(the Comprehensive Antibiotic Research Database, CARD)等进行比对,但是仅仅25 aa的比对长度的设置将大大影响分析结果的准确性^[72].蛋白质的功能主要与其核心结构域相关.基于结构域的 ARGs 预测方法是使用 HMMER 软件与 Resfams 隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model HMM)进行比对^[73].与全序列相似度分析方法相比, HMM 模型的结构域预测能更准确的注释 ARGs,特别是宏基因组测序数据,即使 ARGs 基因序列不完整,只要含有关键结构域,也能预测 ARGs 的功能. Resfams 数据库以 CARD 的抗性基因数据为基础,结合其他的抗性基因数据库(Pfam, TIGRFam)构建了 HMM 模型,提高了新型 ARGs 预测的准确度.土壤和排泄物宏基因组中的 ARGs 研究表明, Resfams 数据库预测的 ARGs 种类高于使用 ARDB/CRDB 数据的结果^[74].最后将所有具有抗生素耐药性功能的 ORFs 与 GeneBank 非冗余蛋白数据库进行对比分析,若与已知的抗生素耐药基因相似度低于60%或该序列没有抗生素耐药功能注释,可判定被分析的基因为新型 ARGs^[13].

4 展望(Perspective)

功能宏基因组学技术是目前发现新型 ARGs 的最强大的工具,该技术在新型 ARGs 的研究中的应用,极大的提高了对现代环境中抗生素耐药性的起源、进化及传播的认识.今后可从以下三个方面对功能宏基因组学技术进一步完善:

(1)构建宏基因组文库过程中,从 DNA 提取到后续的转化,一些基因片段不可避免的遗失导致 DNA 的利用率极低,如何提高 DNA 的提取和转化效率,避免 DNA 的遗失,将显著提高新型 ARGs 的发现效率.

(2)革兰阴性大肠杆菌对大环内酯类,噁唑啉酮类及糖肽类等抗生素具有耐药性,这将限制大肠杆菌在发现这些抗生素耐药基因的应用,发现并有效评价适合对上述抗生素药敏的宿主菌,将极大的推动

对这些抗生素耐药性的研究。

(3) 尽管大肠杆菌结合 PZE21 质粒载体目前是一个较好的目标基因的功能表达体系,但大肠杆菌仅能表达约 30% 外源性基因,对于高 GC 的 DNA 表达效率则更低(约 7%),因此有必要开发更多样的基因功能表达体系,使得 ARGs 在进入宿主菌后能正常表达。

参考文献 (References)

- [1] 朱永官, 欧阳纬莹, 吴楠, 等. 抗生素耐药性的来源与控制对策[J]. 中国科学院院刊, 2015, 30(4) :509-516.
ZHU Y G, OUYANG W Y, WU N, et al. Antibiotic resistance: sources and mitigation[J]. Bulletin of the Chinese Academy of Sciences, 2015, 30(4) : 509-516 (in Chinese).
- [2] BOUKI C, VENIERI D, DIAMADOPOULOS E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 91:1-9.
- [3] XIONG W, SUN Y, ZHANG T, et al. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China[J]. Microbial Ecology, 2015, 70(2) :425-432.
- [4] BAYM M, LIEBERMAN T D, KELSIC E D, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes[J]. Science, 2016, 353(6304) :1147-1151.
- [5] 郑璇, 郑育洪. 国内外超级细菌的研究进展及防控措施[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2012, 28(1) :69-75.
ZHENG X, ZHENG Y H. Research progresses and controlling measures of superbugs[J]. Chinese Abstracts of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 28(1) :69-75 (in Chinese).
- [6] PRUDEN A, PEI R, STORTEBOOM H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern colorado[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23) :7445-7450.
- [7] COUGHLAN L M, COTTER P D, et al. Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6:672.
- [8] VIKESLAND P J, PRUDEN A, ALVAREZ P J J, et al. Toward a comprehensive strategy to mitigate dissemination of environmental sources of antibiotic resistance[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(22) :13061-13069.
- [9] PRUDEN A, ARABI M, STORTEBOOM H N. Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(21) :11541-11549.
- [10] CHENG G, HU Y, YIN Y, et al. Functional screening of antibiotic resistance genes from human gut microbiota reveals a novel gene fusion [J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 336(1) :11-16.
- [11] UFARTA L, POTOCKI-VERONESE G, LAVILLE A L. Discovery of new protein families and functions: New challenges in functional metagenomics for biotechnologies and microbial ecology[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6:563.
- [12] Dos Santos, KNUPP D F, ISTVAN P, et al. Functional metagenomics as a tool for identification of new antibiotic resistance genes from natural environments[J]. Microbial Ecology, 2017, 73(2) :479-491.
- [13] PEHRSSON E C, FORSBERG K J, GIBSON M K, et al. Novel resistance functions uncovered using functional metagenomic investigations of resistance reservoirs[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4(145) :145.
- [14] WANG W, XU S, REN Z, et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(3) :803-814.
- [15] PENDERS J, STOBBERINGH E E, SAVELKOUL P H M, et al. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4(1) :87.
- [16] FOUHY F, OGILVIE L A, JONES B V, et al. Identification of aminoglycoside and β -lactam resistance genes from within an infant gut functional metagenomic Library[J]. Plos One, 2014, 9(9) : e108016
- [17] PHUONG H, THI P, NONAKA, et al. Detection of the sul1, sul2, and sul3 genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam[J]. Science of the Total Environment, 2008, 405(1-3) :377-384.
- [18] SHARMA V K, JOHNSON N, CIZMAS L, et al. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes[J]. Chemosphere, 2016, 150:702-714.
- [19] GIGER W. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 393(1) :37-44.
- [20] LAPARA T M, BURCH T R, MCNAMARA P J, et al. Tertiary-Treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into duluth-superior harbor[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(22) :9543-9549.
- [21] LUO Y, MAO D, RYSZ M, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. Environ Sci Technol, 2010, 44(19) :7220-7225.
- [22] AMOS G C A, ZHANG L, HAWKEY P M, et al. Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 171(3-4) :441-447.
- [23] HEUER H, SCHMITT H, SMALLA K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields [J]. Current

- Opinion in Microbiology, 2011,14(3):236-243
- [24] WICHMANN F, UDIKOVIC-KOLIC N, ANDREW S, et al. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure[J]. MBio, 2014,5(2):379-382.
- [25] LECLERCQ S O, WANG C, ZHU Y, et al. Diversity of the tetracycline mobilome within a chinese pig manure sample[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016,82(21):6454-6462.
- [26] LAKAY F M, BOTHA A, PRIOR B A. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007,102(1):265-273.
- [27] BERTRAND H, POLY F, VAN V T, et al. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005,62(1):1-11.
- [28] UDIKOVIC-KOLIC N, WICHMANN F, BRODERICK N A, et al. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014,111(42):15202-15207.
- [29] SU J Q, WEI B, XU C Y, et al. Functional metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China[J]. Environment International, 2014,65:9-15.
- [30] NASRIN S, GANJI S, KAKIRDE K S, et al. Chloramphenicol derivatives with antibacterial activity identified by functional metagenomics [J]. Journal of Natural Products, 2018,81(6):1321-1332.
- [31] SALIMRAJ R, ZHANG L, HINCHLIFFE P, et al. Structural and biochemical characterization of rm3, a subclass b3 metallo- β -lactamase identified from a functional metagenomic Study[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2016,60(10):5828-5840.
- [32] LAU C H, van ENGELEN K, GORDON S, et al. Novel antibiotic resistance determinants from agricultural soil exposed to antibiotics widely used in human medicine and animal farming[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017,83(16):e0989-17.
- [33] FORSBERG K J, PATEL S, GIBSON M K, et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats[J]. Nature, 2014,509(7502):612-616.
- [34] WANG S, GAO X, GAO Y, et al. Tetracycline resistance genes identified from distinct soil environments in China by functional metagenomics[J]. Front Microbiol, 2017,8:1-9.
- [35] FORSBERG K J, REYES A, WANG B, et al. The Shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens[J]. Science, 2012,337(6098):1107-1111.
- [36] MOORE A M, PATEL S, FORSBERG K J, et al. Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes[J]. PLoS ONE, 2013,8(11):e78822.
- [37] HATOSY S M, MARTINY A C. The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015,81(21):7593-7599.
- [38] VERCAMMEN K, GARCIA-ARMISEN T, GOEDERS N, et al. Identification of a metagenomic gene cluster containing a new class A beta-lactamase and toxin-antitoxin systems[J]. Microbiologyopen, 2013,2(4):674-683.
- [39] YOU Y, HILPERT M, WARD M J. Identification of tet45, a tetracycline efflux pump, from a poultry-litter-exposed soil isolate and persistence of tet(45) in the soil[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013,68(9):1962-1969.
- [40] VERSLUIS D, RODRIGUEZ DE EVGRAFOV M, SOMMER M O A, et al. Sponge microbiota are a reservoir of functional antibiotic resistance genes[J]. Frontiers in Microbiology, 2016,7:1848.
- [41] COURTOIS S, CAPPELLANO C M, BALL M, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003,69(1):49-55.
- [42] COURTOIS S, FROSTEGARD A, GORANSSON P, et al. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation[J]. Environ Microbiol, 2001,3(7):431-439.
- [43] LEVER M A, TORTI A, EICKENBUSCH P, et al. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types[J]. Frontiers in Microbiology, 2015,6(476):476.
- [44] LI H, ZHANG Y, ZHANG C G, et al. Effect of petroleum-containing wastewater irrigation on bacterial diversities and enzymatic activities in a paddy soil irrigation area[J]. Journal of Environment Quality, 2005,34(3):1073-1080.
- [45] ROBE P, NALIN R, CAPELLANO C, et al. Extraction of DNA from soil[J]. European Journal of Soil Biology, 2003,39(4):183-190.
- [46] ZHANG B, LI M, MA L, et al. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples[J]. Biochemical Genetics, 2006,44(11-12):494-503.
- [47] LI M, GONG J, COTTRILL M, et al. Evaluation of QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003,54(1):13-20.
- [48] LEE LE JIE, ABDULLAH M. Optimization of genomic DNA shearing by sonication for next-generation sequencing library preparation[J]. AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol, 2014,22(3):200-208.
- [49] MCGARVEY K M, QUEITSCH K, FIELDS S. Wide variation in antibiotic resistance proteins identified by functional metagenomic screening of a soil DNA library[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012,78(6):1708-1714.
- [50] RIESENFELD C S, GOODMAN R M, HANDELSMAN J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes[J]. Environmental Microbiology, 2004,6(9):981-989.

- [51] MULLANY P. Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance[J]. *Virulence*, 2014,5(3):443-447.
- [52] BIVER S. *Bacillus subtilis* as a tool for screening soil metagenomic libraries for antimicrobial activities[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013,23(6):850-855.
- [53] STREIT W R, SCHMITZ R A. Metagenomics-the key to the uncultured microbes Wolfgang R Streit 1,2 and Ruth A Schmitz1[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7:492-498.
- [54] CHUNG E J, LIM H K, KIM J C, et al. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008,74(3):723-730.
- [55] DEVIRGILIIS C, ZINNO P, STIRPE M, et al. Functional screening of antibiotic resistance genes from a representative metagenomic library of food fermenting microbiota[J]. *BioMed Research International*, 2014,2014:1-9.
- [56] van ELSAS J D, COSTA R, JANSSON J, et al. The metagenomics of disease-suppressive soils-experiences from the METACONTROL project[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008,26(11):591-601.
- [57] MIRETE S, MORGANTE V, EDUARDO GONZALEZ-PASTOR J. Functional metagenomics of extreme environments[J]. *Current Opinion In Biotechnology*, 2016,38:143-149.
- [58] MCMAHON M D, GUAN C, HANDELSMAN J, et al. Metagenomic analysis of *Streptomyces lividans* reveals host-dependent functional expression[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012,78(10):3622-3629.
- [59] WILHARM G, LEPKA D, FABER F, et al. A simple and rapid method of bacterial transformation[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010,80(2):215-216.
- [60] AUNE T E V, AACHMANN F L. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010,85(5):1301-1313.
- [61] WU N, MATAND K, KEBEDE B, et al. Enhancing DNA electrotransformation efficiency in *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2010,13(5):11.
- [62] SARASWAT M, GRAND R S, PATRICK W M. Desalting DNA by drop dialysis increases library size upon transformation[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013,77(2):402-404.
- [63] AHMAD I, RUBBAB T, DEEBA F, et al. Optimization of *E. coli* culture conditions for efficient DNA uptake by electroporation[J]. *Turkish Journal of Biology*, 2014,38:568-573.
- [64] 高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 抗生素环境行为及其环境效应研究进展[J]. *环境化学*, 2013,39(9):1619-1633.
GAO L H, SHI Y L, LI W H, et al. Research progresses on environmental behavior and effects of antibiotics [J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 39(9):1619-1633 (in Chinese).
- [65] LANGIN A, ALEXY R, KONIG A, et al. Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin[J]. *Chemosphere*, 2009,75(3):347-354.
- [66] ANDREWS J M. Determination of minimum inhibitory concentrations[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001,481:5-16.
- [67] 王兴春, 杨致荣, 王敏, 等. 高通量测序技术及其应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2012,32(1):109-114.
WANG X C, YANG Z R, WANG M, et al. High-throughput sequencing technologies and their application[J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(1):109-114 (in Chinese).
- [68] 曹晨霞, 韩璇, 张和平. 第三代测序技术在微生物研究中的应用[J]. *微生物学通报*, 2016,43(10):2269-2276.
CAO C X, HAN W, ZHANG H P. Application of third generation sequencing technology to microbial research[J]. *Microbiology*, 2016, 43(10):2269-2276 (in Chinese).
- [69] 张得芳, 马秋月, 尹俊明, 等. 第三代测序技术及其应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2013,33(5):125-131.
ZHANG D F, MA Q Y, YI D M, et al. Third-generation sequencing technologies and their application[J]. *China Biotechnology*, 2013, 33(5):125-131 (in Chinese).
- [70] LIAO Y, LIN S, LIN H. Completing bacterial genome assemblies: Strategy and performance comparisons[J]. *Scientific Reports*, 2015,5(1):8747.
- [71] ZERBINO D R, BIRNEY E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs[J]. *Genome Research*, 2008,18(5):821-829.
- [72] VAN GOETHEM M W, PIERNEEF R, BEZUIDT O K I, et al. A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils[J]. *Microbiome*, 2018,6(1):40.
- [73] FINN R D, CLEMENTS J, EDDY S R. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(suppl):W29-W37.
- [74] GIBSON M K, FORSBERG K J, DANTAS G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology[J]. 2015,9(1):207-216.