

[Akceptuję](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

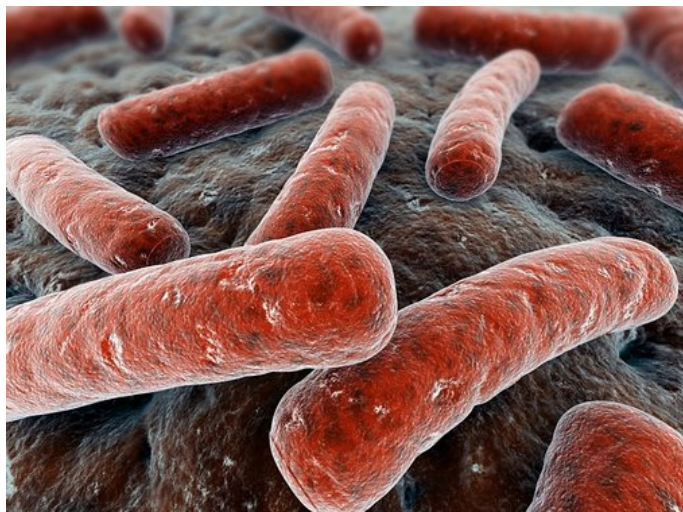
zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Metagenomika - nowa strategia identyfikacji mikroorganizmów



Mikroorganizmy, zamieszkujące niemalże wszystkie miejsca na świecie, stanowią istotny element ziemskiego ekosystemu. Dotychczasowa wiedza o świecie bakterii ogranicza się do takich gatunków, które umiemy hodować w laboratoriach. Duży postęp w badaniach mikroorganizmów, w tym odkrycia w dziedzinie biologii molekularnej i genetyki, dokonano opierając się o czyste kultury drobnoustrojów izolowanych z różnych środowisk naturalnych. Ostatnie dziesięć lat świadczy o dynamicznym postępie w dziedzinie genomiki i proteomiki bakterii. Dotychczas poznano pełną sekwencje genomów kilkuset szczepów i gatunków mikroorganizmów. Ocenia się, że 90% tych baz danych to bakterie należące do domeny Bacteria, z czego 75% wiadomości dotyczy bakterii chorobotwórczych. Z pewnością należy także stwierdzić, że bakterie zdolne do wzrostu w warunkach laboratoryjnych (hodowlane) stanowią ponad 1% bardzo zróżnicowanej populacji wszystkich gatunków żyjących w różnych środowiskach naturalnych, takich jak na przykład woda, gleba, ścieki, przewody pokarmowe ludzi i zwierząt. Daje to przeświadczenie jak mała jest nasza wiedza o bakteriach. Prace Pace'a oraz jego współpracowników z lat 1985-1986 ukazały możliwość bezpośredniego izolowania z bakterii środowiskowych podjednostki 5S oraz 16S rRNA. Po raz pierwszy na identyfikację nieznanych dotychczas gatunków bakterii, pozwoliło katalogowanie i sekwencjonowanie tak sklonowanych podjednostek bezpośrednio z bakterii środowiskowych, bez wcześniejszej hodowli. Przełom ten świadczył o możliwości badania i identyfikacji niehodowanych mikroorganizmów środowiskowych. Sprzyjający tej strategii rozwój technik pozwalających na amplifikację DNA (PCR), konstrukcję bogatych bibliotek genomowych i szybkie sekwencjonowanie DNA, przyczynił się do zdolności identyfikowania nieznanych dotąd gatunków i rodzajów bakterii środowiskowych na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA. Od czasów Carla Woese'go tworzone drzewo filogenetyczne bakterii, w oparciu o 16S rRNA, w ostatnich latach szybko się rozwija i wzbogaca o coraz większą liczbę niepoznanych dotąd rodzajów, typów, a także gatunków bakterii środowiskowych [1].

W ostatnich latach pokaźnie poszerzono strategię badań niehodowlanych bakterii poprzez klonowanie DNA, które bezpośrednio pozyskiwano ze środowisk naturalnych, jak i sekwencjonowanie nadzwyczaj dużych środowiskowych bibliotek genomowych bakterii pochodzących z gleb, wód, ścieków, osadów sedymentacyjnych oraz przewodów pokarmowych zwierząt i ludzi. Ten kierunek współczesnej genomiki definiuje się pojęciami: metagenomika, genomika populacji drobnoustrojów bądź genomika mikroorganizmów środowiskowych. Wyłaniający się nowatorski kierunek mikrobiologii - metagenomika, zrewolucjonizuje postrzeganie i rozumienie świata mikrobiologii i daje niezwykle obiecujące rezultaty. Celem naukowców jest dążenie do rozszyfrowania bogactwa informacji genetycznej znajdującej się w ogromnych metagenomach, dla określonych środowisk. Istotne znaczenie ma także identyfikacja dotychczas niepoznanych genów, co pozwoliłoby na zwiększenie wiedzy o niehodowlanych dotąd bakteriach i ich roli w środowiskach naturalnych. Oczekuje się, że da to pożądane rezultaty w rozwiązaniach biotechnologicznych, które dotyczyć będą produkcji nowatorskich leków, enzymów oraz innych bioproduktów [1].

Geneza metagenomiki

Po raz pierwszy w 1985 roku Pace i współpracownicy przedstawili nową strategię identyfikacji mikroorganizmów, niezależną od wcześniejszej hodowli, która polegała na sekwencjonowaniu podjednostek 5S i 16S rRNA, izolowanych bezpośrednio z próbek środowiska. Ten nowatorski projekt zdecydowanie zaburzył wcześniejsze dokonania Woese i współpracowników, którzy przeprowadzając badania na czystych kulturach różnych bakterii hodowlanych udowodnili, że sekwencje genów 5S i 16S rRNA są molekularnymi wyznacznikami ich filogenezy. Nie ma wątpliwości, że na podstawie wyników wielu prac, w oparciu o szczegółową analizę tych podjednostek na poziomie sekwencji nukleotydowych, można identyfikować poszczególne gatunki i rodzaje, jak również konstruować naturalne drzewo filogenetyczne bakterii. Istotnego odkrycia dokonano w latach 1991-1998, kiedy opracowano metody umożliwiające klonowanie DNA bakterii izolowanych bezpośrednio z różnych próbek środowiskowych. Stało się też możliwe konstruowanie w różnych wektorach dużych bibliotek fragmentów DNA, oraz wraz z momentem wprowadzenia techniki PCR, amplifikacja całych genów rRNA bądź ich poszczególnych regionów [2].

Strategia badań, nie zależna od hodowli, w dość krótkim czasie pozwoliła na identyfikację w różnych naturalnych środowiskach ogromnej liczby niepoznanych dotąd gatunków, rodzajów oraz typów bakterii. Natomiast zidentyfikowanie pełnej sekwencji genów 5S oraz 16S rRNA różnych gatunków bakterii środowiskowych dało możliwość konstruowania gatunkowo-specyficznych sond DNA oraz ich znakowanie różnymi wyznacznikami fluorescencyjnymi. Takie sondy zastosowano w mikroskopowej analizie próbek środowiskowych, której celem była szczegółowa ocena rozłokowania różnych gatunków w określonych środowiskach [3].

W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby badań sekwencji nukleotydowej podjednostki 16S rRNA w populacjach bakterii środowiskowych. Światowa baza danych Gen- Bank do końca 2004 roku mieściła 21466 sekwencji genów 16S rRNA bakterii hodowlanych oraz 54665 sekwencji tych genów z bakterii niehodowlanych. W tym samym roku system ten obejmował aż 14 dodatkowych typów rozpoznanych spośród bakterii hodowlanych i 26 nowych typów bakterii niehodowlanych. Dane te wykazują, że badania obecności i rozprzestrzeniania bakterii w różnych środowiskach naturalnych stały się dostępne, chociaż nie umiemy stworzyć odpowiednich warunków hodowli dla około połowy świata organizmów prokariotycznych Bacteria i Archea [4].



W 1991 roku zrealizowano koncepcję klonowania bakteryjnego DNA izolowanego bezpośrednio z próbek środowiskowych. Jako pierwsi Schmidt i współpracownicy sklonowali w wektorze fagowym mieszaninę bakteryjnych DNA izolowanych bezpośrednio z próbek wody morskiej. Był to sposób na skonstruowanie pierwszej środowiskowej biblioteki DNA [3]. Kolejnym sukcesem, okazało się w 1995 roku sklonowanie DNA izolowanego z mieszaniny mikroorganizmów termofilnych, które były hodowane w laboratorium na wysuszonej trawie (Iignocelulozie). W wyniku tego badania skonstruowano dużą bibliotekę DNA, jak również wyselekcjonowano z niej klony ekspresujące wysoką aktywność celulolityczną. Natomiast, w laboratorium DeLonga w 1996 roku scharakteryzowano konstrukcję ogromnej biblioteki środowiskowej DNA organizmów prokariotycznych zbiornika słodkowodnego. Wyselekcjonowano tam klon o wielkości 40 kb, a następnie zidentyfikowano jego fragment genomu. Końcem lat 90. w wielu laboratoriach osiągnięto sukces związany z konstruowaniem w różnych wektorach biblioteki DNA mikroorganizmów z różnych próbek gleby [5].

Szybki rozwój metagenomiki nastąpił w ostatnich 4-6 latach, ponieważ w tym czasie stworzono i opisano wiele bibliotek DNA mikroorganizmów gleb, wód słodkowodnych i oceanicznych, osadów sedimentacyjnych, ścieków, środowisk ekstremalnych (w tym termofilnych i acidofilnych), flory jamy ustnej i przewodu pokarmowego człowieka, flory szpitali, populacji bakterii tworzących biofilmy oraz bakterii symbiotycznych [6]. W 2004 roku przyjęto pracę Ventera i współpracowników, w której opisano konstrukcję metagenomu o wielkości miliarda par zasad mikroorganizmów z Morza Sargassowego na Bermudach jak i rozszyfrowanie ich sekwencji nukleotydowych. Obecnie jest to największy zrealizowany projekt w dziedzinie metagenomiki. Stworzenie olbrzymiej, metagenomowej biblioteki DNA mikroorganizmów morskich, w której zsekwencjonowano ponad miliard par zasad oraz rozpoznano około 1,2 miliona dotychczas nieznanych genów, dało nowe możliwości wielokierunkowych badań poznawczych i aplikacyjnych bakterii morskich [7].

W ostatnich latach przeprowadzono badania w dziedzinie metagenomiki również w niewiele poznanym świecie bakteriofagów. Wiedza o nich ogranicza się do tych, których gospodarzami są bakterie hodowlane. Jednak nie za duża jest nasza wiedza o bakteriofagach poruszających się w świecie bakterii niehodowlanych. Aktualnie nie wykryto molekularnego wyznacznika, przydatnego

do identyfikacji, taksonomii oraz filogenezy bakteriofagów. Metagenomika dała możliwości konstrukcji banków DNA bakteriofagów niehodowlanych bakterii, umożliwiając ich analizę na poziomie sekwencji nukleotydowej. Istotnym nowatorskim osiągnięciem w tej dziedzinie jest sklonowanie banku DNA fagów przebywających w przewodzie pokarmowym człowieka. Naukowcy stworzyli metagenomową bibliotekę DNA fagów, w której poznano ponad 400 różnych fagów, jednak około 60% to nieznane dotąd bakteriofagi. Zakłada się, że w organizmie człowieka przebywa około 1200 różnych fagów, które modyfikując genotypy flory bakteryjnej człowieka, niewątpliwie zwiększają jej różnorodność jak i zmienność [6].

Metagenomika

Metagenomika, zwana także genomiką populacji mikroorganizmów środowiskowych i ekogenomiką, jest nową techniką badań. Polega ona na klonowaniu DNA pozyskiwanego bezpośrednio z naturalnych środowisk a następnie sekwencjonowaniu ogromnych bibliotek genomowych, jak i funkcjonalnej analizie materiału ekologicznego izolowanego z różnych nisz ekologicznych [8].

Metagenomika obejmuje następujące etapy prac eksperymentalnych:

- Izolację DNA mikroorganizmów bezpośrednio z próbek środowiskowych. Próbką jest pobierana z naturalnego środowiska flory bakteryjnej i zawiera różne typy mikroorganizmów.
- Otwieranie komórek bakteryjnych przy pomocy metod chemicznych, na przykład silnie zasadowe środowisko, bądź za pomocą metod fizycznych, na przykład sonifikacja.
- Klonowanie *in vitro* fragmentów restrykcyjnych w odpowiednich wektorach plazmidowych.
- Transformację rekombinowanych klonów do komórek, najczęściej *Escherichia coli*.
- Konstrukcję biblioteki klonów, analizę genetyczną i funkcjonalną biblioteki oraz selekcję klonów o określonych genotypach bądź właściwościach biologicznych [8].

W metagenomice najczęściej praktykowanymi wektorami do klonowania DNA i konstrukcji bibliotek jest niskokopijny plazmid BAC (bacterial artificial chromosome) oraz fasmidy, ponieważ w wektory te jest możliwość klonowania dużych fragmentów DNA (40-100 kb). W związku z tym uzyskuje się ich stabilną replikację w komórkach gospodarza - biorcy, najczęściej są to komórki odpowiednich szczepów *E. coli*. Poza tym fasmidy, a przede wszystkim pochodne plazmidu BAC, jako wektory wahadłowe (shuttle BACs) stwarzają możliwość koniugacyjnego przenoszenia DNA z *E. coli* do innego gospodarza na przykład *Streptomyces lividans*, bądź *Pseudomonas putida*. W sytuacji kiedy celem prowadzonych badań jest selekcja klonów zdolnych do ekspresji danych białek, enzymów lub innych bioproduktów, wówczas jest zalecane przenoszenie biblioteki klonów z *E. coli* do w/w wymienionych gospodarzy. Dotychczas w analizie metagenomowych bibliotek DNA, poważne trudności metodyczne stwarza niewielka częstość pojawiania się określonych klonów, głównie klonów o poszukiwanych aktywnościach biologicznych. W tym celu oferuje się różne działania oraz zabiegi. Jedną z metod jest wzbogacenie próbek środowiskowych, z których izoluje się DNA do klonowania, w mikroorganizmy o poszukiwanych właściwościach biologicznych. Kolejnym sposobem jest wzbogacanie klonowanej mieszaniny DNA izolowanej z próbek środowiskowych we frakcje, mogące zawierać oczekiwane sekwencje bądź poszukiwane geny [8].

Przykładem wykorzystania naturalnego wzbogacenia danego środowiska w populację określonych mikroorganizmów było skonstruowanie w fasmidzie biblioteki DNA izolowanego z populacji

symbiotycznych bakterii gąbek morskich, jej zsekwencjonowanie, a w rezultacie ustalenie pełnej sekwencji nukleotydowej genomu kolejnego gatunku niehodowlanych archebakterii *Cenarchaeum symoiosum*. Jednak uwagę należy zwrócić, że w organizmie gąbek mamy do czynienia z populacją tylko kilku gatunków, wśród których gatunek *C. symbiosum* stanowi około 65%. W ostatnich latach sklonowano i zsekwencjonowano metagenom bakterii, które tworzyły biofilm w kwaśnych wodach kopalni pirytu w Richmond w USA, o temperaturze 42°C i pH 0,1-0,4 oraz 2 mM stężeniu jonów żelaza, miedzi, cynku i arsenu. W warunkach laboratoryjnych biofilm ten jest zdominowany przez populacje kilku rodzajów niehodowlanych bakterii: *Sulfobacillus*, *Leptospirillum*, *Acidimicrobium* oraz przez archaebakterie *Ferroplasma acidarmanus*. Dzięki poznaniu sekwencji nukleotydowej całego metagenomu biofilmu o wielkości 72 milionów par zasad, jak również analizie bioinformatycznej stało się możliwe ustalenie pełnej sekwencji nukleotydowej genomów *Leptospirillum* oraz *Ferroplasma*, jak i zlokalizowanie w nich istotnych genów odpowiadających za metabolizm i wzrost bakterii biofilmu w tak ekstremalnym środowisku, gdzie jedynym dostępnym źródłem węgla jest CO₂, a źródłem azotu jest azotatmosferyczny. Powyższe przykłady badań miały związek z metagenomami mieszanych populacji bakterii o dominacji jednego bądź kilku gatunków, co ułatwiało sklonowanie takich metagenomów i ich analizę sekwencyjną. Zdecydowanie bardziej skomplikowane jest klonowanie i analizowanie metagenomów złożonych populacji mikroorganizmów wód, a przede wszystkim gleby. Ze względu na liczbę komórek prokariotów w przeliczeniu na 1 gram ma możliwość osiągnięcia wartości 1 miliarda, a nawet więcej, co oznacza, że może w nich przebywać nawet 1000 różnych szczepów i gatunków bakterii. W związku z tym wykonuje się różne zabiegi, których celem jest wzbogacenie analizowanych próbek gleby w populacje bakterii, wyróżniające się pożądaną lub oczekiwaną aktywnością biologiczną. Podejmowanymi kierunkami działania są próby frakcjonowania izolowanych DNA z tak złożonych populacji mikroorganizmów, aby w zależności od celu badań, do klonowania bibliotek metagenomowych używać określonych, wyselekcjonowanych frakcji DNA. Jeden z takich sposobów polega na ultrawiirowaniu DNA izolowanego z gleby, zamierzeniem czego jest separacja do klonowania frakcji bogatych w pary GC. Mikroorganizmy z genomem zasobnym w pary GC, są organizmami środowiskowymi mającymi istotne znaczenie dla biotechnologii leków i ekologii (*Actinomyces*, *Streptomyces*, *Acidobacteria*). Stanowią więc zainteresowanie w badaniach w dziedzinie metagenomiki, których celem jest selekcja z bibliotek metagenomowych klonów o nowych aktywnościach. Ciekawą strategią stanowi wzbogacenie analizowanych próbek gleby, przed izolacją z nich DNA, w populacje mikroorganizmów o poszukiwanych aktywnościach metabolicznych. Do takich próbek dodawany jest bromodeoksyuracyl (BRdU), który włącza się tylko do DNA aktywnie dzielących się komórek. Za pomocą metody immunoprecypitacji frakcje tak wyznakowanego DNA mogą być bez trudu oddzielane i używane do konstrukcji bibliotek metagenomowych. W przypadku dodania do próbek gleby określonego substratu będącym źródłem węgla i energii na przykład skrobi, celulozy czy ksenobiotyku, można się spodziewać, że analizowana próbka gleby będzie wzbogacona w populacje mikroorganizmów metabolicznie aktywnych, mających zdolność wykorzystania określonego substratu bądź substratów. Inną metodą jest dodawanie do próbek gleby substratów znakowanych radioaktywnym węglem bądź azotem. Zdolne do rozkładu określonego, znakowanego radioaktywnie substratu populacje bakterii powiększą swoją gęstość w analizowanej próbce, również genomowy DNA z nich izolowany będzie radioaktywny, a więc łatwy do separacji metodą ultrawiirowania w gradiencie. Frakcja tak otrzymanego DNA może być badana za pomocą metody PCR na obecność określonych genów bądź klonowana, w celu konstrukcji biblioteki klonów oraz ich analizy funkcjonalnej. W środowisku różnych ksenobiotyków, na przykład chlorofenoli i fenoli, biodegradacja następuje zazwyczaj przy udziale dwóch, a nawet kilku różnych gatunków bakterii. Identyfikacja w środowisku takiej populacji, sklonowanie ich metagenomu, a także identyfikacja genów i ich produktów stanowi szczególne zainteresowanie naukowców. Osiągnięcie sukcesu, jest możliwe dzięki zwiększaniu gęstości komórek populacji poprzez dodawanie wymienionych substratów do analizowanej gleby oraz inkubację próbek przed izolacją DNA [7].

W badaniach w dziedzinie metagenomiki należy wyróżnić trzy zasadnicze cele. Mianowicie wnikliwe poznanie filogenetycznej i taksonomicznej różnorodności mikroorganizmów w biosferze, gdzie większość stanowią dotychczas nieznane, niehodowlane gatunki i rodzaje bakterii. Kolejnym celem jest identyfikacja w konstruowanych metagenomach nieznanych dotąd sekwencji, operonów i genów kodujących nowatorskie leki, białka, enzymy oraz inne bioprodukty mające biotechnologiczne znaczenie. Tak więc techniki oraz sposoby stosowane w analizie genetycznej i funkcjonalnej mniejszych i większych bibliotek DNA organizmów środowiskowych, jak również ogromnych metagenomów o wielkości milionów par zasad, zależne są od celu, dla którego zostały skonstruowane. Niezwykle przydatna okazała się metoda PCR, poprzez zastosowanie odpowiednich starterów oraz sekwencjonowanie wyselekcjonowanych klonów i całych bibliotek metagenomowych. Metoda ta ma również duże znaczenie w analizie bibliotek metagenomowych, a w szczególności w poszukiwaniu sekwencji i genów bakterii niehodowlanych, których homologi, o ustalonej sekwencji nukleotydowej, są znane w genomach bakterii hodowlanych [9]. Dzięki metodom amplifikacji i sekwencjonowania DNA, powiodło się zidentyfikowanie w metagenomowych bibliotekach także genów odpowiedzialnych za ekspresję nowych syntaz poliketydowych (PKSs), będących zasadniczymi enzymami szlaków biosyntezy wielu antybiotyków. Udało się również rozpoznać gen kodujący syntezę rodopsyny, fotoreceptora poznanego najpierw u archebakterii, a następnie zidentyfikowanego w metagenomie bakterii morskich na fragmencie DNA kłona noszącego podjednostkę 16S rRNA *Proteobacteria*. Dowiedziono, że fototrofia jest pokaźnie rozpowszechniona wśród *Proteobacteria* mórz i oceanów, a nie jak sądzono, że jest właściwością tylko gatunków należących do królestwa *Archea* [10].

Znaczenie metagenomiki w identyfikacji nowych genów

Istotną rolę w osiągnięciach metagenomiki pełni analiza funkcjonalna metagenomowych bibliotek DNA, której celem jest selekcja i identyfikacja klonów noszących geny bądź zespoły genów, podlegających transkrypcji oraz translacji w komórkach *E. coli*. Odnotowano wiele znaczących sukcesów w tym zakresie, największym z nich było wyselekcjonowanie klonów zdolnych do syntezy wcześniej znanych, jak również nowych antybiotyków. Zidentyfikowano także wiele nowych genów, między innymi geny kodujące lekooporność, geny białek membranowych, geny szlaku syntezy biotyny oraz geny kodujące syntezę wielu białek enzymatycznych, takich jak lipazy, chitynazy, amylazy [11].

Zastosowanie testu komplementacji przyczyniło się do zidentyfikowania w jednej z bibliotek metagenomowych klonu mającego zdolność do syntezy białek antyportu $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$. W powyższych badaniach, DNA z tej biblioteki transformowano do komórek mutantu *E. coli*, pozbawionego 3 genów kodujących syntezę białek antyportu Na^+/H^+ i nie mającego zdolności do wzrostu na podłożach z wysokim stężeniem jonów litu. Dało to możliwość wyselekcjonowania transformanta, który wskutek komplementacji osiągnął zdolność wzrostu na podłożu zawierającym 7,5 mM LiCl [12]. Podobny test komplementacji przeprowadzono w komórkach mutantu *E. coli* nie zdolnego do syntezy biotyny, a w związku z tym niezdolnego do wzrostu na podłożu bez tej witaminy. Wyniki tych badań wpłynęły na zidentyfikowanie szlaku biosyntezy biotyny w innej metagenomowej bibliotece 7 nowych operonów. Natomiast geny lekooporności identyfikowano przez zastosowanie podłoży selekcyjnych z odpowiednimi antybiotykami. W ten sposób zidentyfikowano w metagenomie bakterii jamy ustnej człowieka nowy gen kodujący oporność na tetracyklinę. Natomiast w metagenomie bakterii

glebowych, o wielkości 4 milionów par zasad, rozpoznano klaster 6 nowych genów kodujących oporności na antybiotyki aminoglikozydowe [13]. Na podłożach selekcyjnych z dodatkiem skrobi i celulozy jako jedynych źródeł węgla i energii oraz z wykorzystaniem do transformacji szczepów *E. coli* pozbawionych takich zdolności, selekcjonowano klonoszące geny kodujące amylazy i celulazy. Udało się także zidentyfikować klon syntetyzujący nowy istotny antybiotyk, terraginę, hamujący rozwój prątków gruźlicy, natomiast w bibliotece sklonowanej w *E. coli* uzyskano antybiotyki acylotyrozynowe. Osiągnięcie to zostało dokonane przy pomocy standardowego testu inhibicji wzrostu bakterii na podłożach wzrostowych w bibliotece DNA mikroorganizmów glebowych, sklonowanej w *S. lividans*. W metagenomowych bibliotekach, wśród klonów syntetyzujących na podłożach wzrostowych, barwniki odpowiednio pomarańczowy, czerwony i purpurowy pomyślnie zidentyfikowano nowe antybiotyki takie jak turbomycyna A, turbomycyna B i violaceina. Badaczom udało się również zidentyfikować, w metagenomowej bibliotece bakterii glebowych, strukturalnie podobny związek - indurbinę [14].

Kilka lat temu w laboratorium Handelsmana opracowano bardzo obiecującą strategię selekcji metagenomowych klonów zdolnych do syntezy różnych cząsteczek. Technika selekcji takich klonów polega na wykorzystaniu do tego celu bakteryjnego systemu komunikowania się bakterii QS (quorum sensing). Transformuje się metagenomowy DNA do komórek *E. coli* noszących plazmid z operonem luxR oraz gen reporterowy, który koduje syntezę białka GFP. Szczepy *E. coli* nie syntetyzują cząsteczek sygnałowych, w genomie nie mają też genów operonu luxR, w związku z czym szczep *E. coli* z reporterowym plazmidem nie syntetyzuje białka GFP. Posiada jednak taką zdolność po kotransformacji innym plazmidem, noszącym geny mające zdolność do syntezy specyficznych cząsteczek sygnałowych. W związku z tym kotransformacja reporterowego szczepu DNA genomu umożliwia selekcjonować kolonie fluoryzujące, a więc klonoszące zdolność syntezy cząsteczek sygnałowych indukujących bakteryjny system QS. Tak transformowany wskaźnikowy szczep *E. coli* można hodować na podłożu z dodatkiem naturalnych induktorów QS, laktonów homoseryny, oraz selekcjonować metagenomowe klonoszące, które syntetyzują inhibitory tego systemu, a w związku z tym kolonie bądź komórki transformantów niezdolne do fluorescencji [15].

Podsumowanie

Metagenomika to szybko rozwijająca się dziedzina mikrobiologii, dająca możliwość badania znacznie szerszego zakresu bioróżnorodności wielu środowisk, a także wykorzystania ich dla korzyści człowieka. Wyznacza nowe kierunki badań dotychczas nieznanego świata bakterii środowiskowych, kształtując metodyczne możliwości ich identyfikacji i charakterystyki na poziomie genotypów oraz fenotypów. Metagenomika stworzyła możliwości dokładnych badań poznawczych w dziedzinie taksonomii i filogenezy bakterii żyjących w różnorodnych środowiskach naturalnych. Pozwoliła na analizy ich właściwości biologicznych opierając się na odczytywaniu informacji genetycznej klonowanych genomów jak i genów. Dobrze zapowiadające się osiągnięcia metagenomiki funkcjonalnej w identyfikacji nowych bioproduktów syntetyzowanych przez nieznane dotąd, niehodowlane bakterie kierują w nowatorskie poszukiwania naukowe we współczesnej biotechnologii. Dalszy postęp w dziedzinie konstrukcji metagenomowych bibliotek DNA populacji mikroorganizmów środowiskowych będzie dotyczył opracowania nowych, szybszych metod konstruowania ogromnych bibliotek genomowych DNA populacji mikroorganizmów gleby, środowisk ekstremalnych, jak i mórz, oceanów.

Sądzi się, że usprawnienie i obniżenie kosztów sekwencjonowania metagenomowych bibliotek DNA oraz zastosowanie nowych osiągnięć bioinformatyki do analizy tworzonych, ogromnych baz danych

powinno przyspieszyć oraz ukierunkować poznawcze jak i aplikacyjne badania w tej nowej dziedzinie mikrobiologii. Nadzieja na identyfikację nowych leków, enzymów oraz innych bioproduktów w metagenomowych bibliotekach DNA mikroorganizmów środowiskowych uzależniona jest od dalszego, szybkiego postępu w opracowaniu nowych wektorów i systemów ekspresji heterologicznych białek, a także od nowych, szybkich testów screeningowych do analizy funkcjonalnej metagenomowych bibliotek DNA.

Autor: Katarzyna Czuba

Literatura:

1. Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. 49, 1379-1384.
2. Woese C.R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 1987. 51, 221-271.
3. Schmidt T.M., DeLong E.F., Pace N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing, *J. Bacteriol.* 1991. 173, 4371-4378.
4. Rappe M.S., Giovannoni S.J. The uncultured microbial majority, *Annu. Rev. Microbiol.* 2003. 57, 369-394.
5. Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C., Tjong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clady J., Handelsman J., Goodman R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. 66, 2541-2547.
6. Riesenfeld C.S., Goodman R.M., Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes, *Environ. Microbiol.* 2004. 6, 981-989.
7. Venter J.C., Remington K, Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffnagel J., Parson R., Baden-Tilson H., Pfannkoch C., Rogers Y.H., Smith H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*. 2004. 304, 66-74.
8. Schloss P.D., Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. 14, 303-310.
9. Handelsman J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. 68, 669-685.
10. Beja O., Spudich E.N., Spudich J.L., Leclerc M., DeLong E.F. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean, *Nature*. 2001. 411, 786-789.
11. August P.R., Grossman T.H., Minor C., Draper M.P., MacNeil I.A., Pemberton J.M., Call K.M., Holt D., Osburne M.S. Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000. 2,

513-519.

12. Majernik A., Gottschalk G., Daniel R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁺(Li⁺)/H⁺ antiporter activity on Escherichia coli- characterization of the recovered genes and the corresponding gene products, J- Bacteriol. 2001. 183, 6645-6653.

13. Diaz-Torres M.L., McNab R., Spratt D.A., Villedieu A., Hunt N., Wilson M., Mullany P. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome, Antimicrob. Agents Chemother. 2003. 47,1430-1432.

14. MacNeil I.A., Tiong C.L., Minor C., August P.R., Grossman T.H., Loiacono K.A., Lynch B.A., Phillips T., Narula S., Sundaramoorthi R., Tyler A., Aldredge T., Long H., Gilman M., Holt D., Osburne M.S. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2001. 3, 301-308.

15. Goh E.B., Yim G., Tsui W., McClure J., Surette M.G., Davies J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentration of antibiotics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. 99, 17025-17030.

16.

<http://www.pressebox.com/pressrelease/imgm-laboratories-gmbh/IMGM-Laboratories-First-Service-Provider-to-adopt-Roche-454-GS-FLX-technology-to-offer-advanced-amplicon-based-Metagenomics-Services/boxid/567689>

<http://laboratoria.net/artykul/21071.html>

Informacje dnia: [Potrzebne regulacje dot. norm i zasad hałasu turbin wiatrowych](#) [Naukowcy zbadali, jakie obrazy zapadają częściej w pamięć](#) [Człowiek poprzez emisję gazów spowodował ocieplenie](#) [Sztuczna inteligencja diagnozuje spektrum autyzmu](#) [Autonomiczne hulajnogi elektryczne](#) [Wydano pierwszy atlas geologiczny Księżyca](#) [Potrzebne regulacje dot. norm i zasad hałasu turbin wiatrowych](#) [Naukowcy zbadali, jakie obrazy zapadają częściej w pamięć](#) [Człowiek poprzez emisję gazów spowodował ocieplenie](#) [Sztuczna inteligencja diagnozuje spektrum autyzmu](#) [Autonomiczne hulajnogi elektryczne](#) [Wydano pierwszy atlas geologiczny Księżyca](#)

Partnerzy