

生物信息技术 在宏基因组学的应用

报告人：耿爽（组长）

成员：罗一菁 崔韶 潘鑫池

时间：2011年12月23日

课程：实用生物信息技术

一，传统的宏基因组学研究流程。

二，基于文库构建的技术改进。

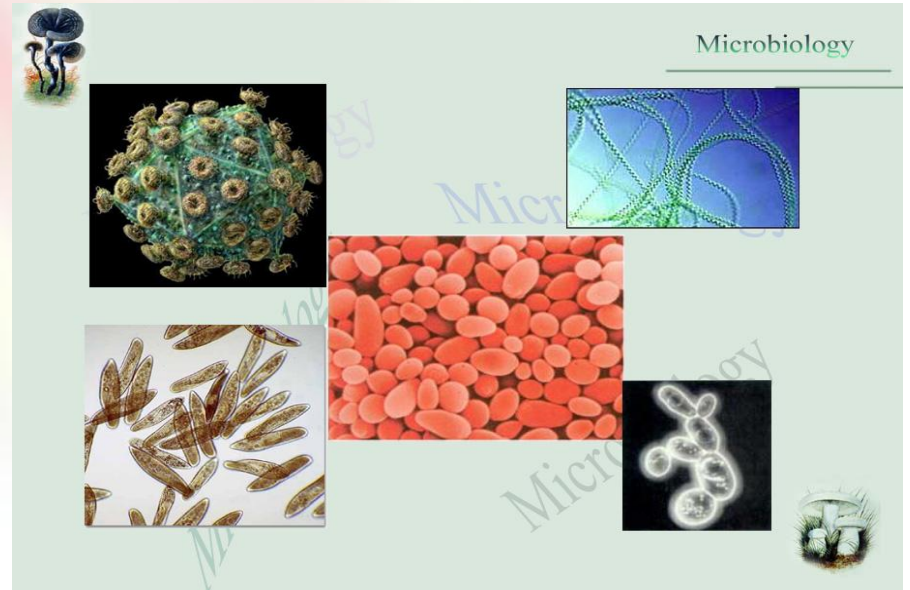
三，基于高通量测序的技术改进。

四，宏基因组、宏转录组、宏蛋白质组的结合。

一，传统的宏基因组学研究流程。



纯培养



超过99%不可纯培养

宏基因组（Metagenome）

其定义为生境中全部微小生物遗传物质的总和，包含了可培养和未可培养微生物的基因。

一，传统的宏基因组学研究流程。

构建宏基因组文库流程



提取环境样品
总DNA

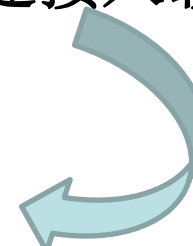
小于10KB,
40KB左右,
350KB

酶切为片段

质粒plasmid,
质粒fosmid
粘粒cosmid,
人工染色体
BAC

连接入载体

转入宿主大肠杆菌

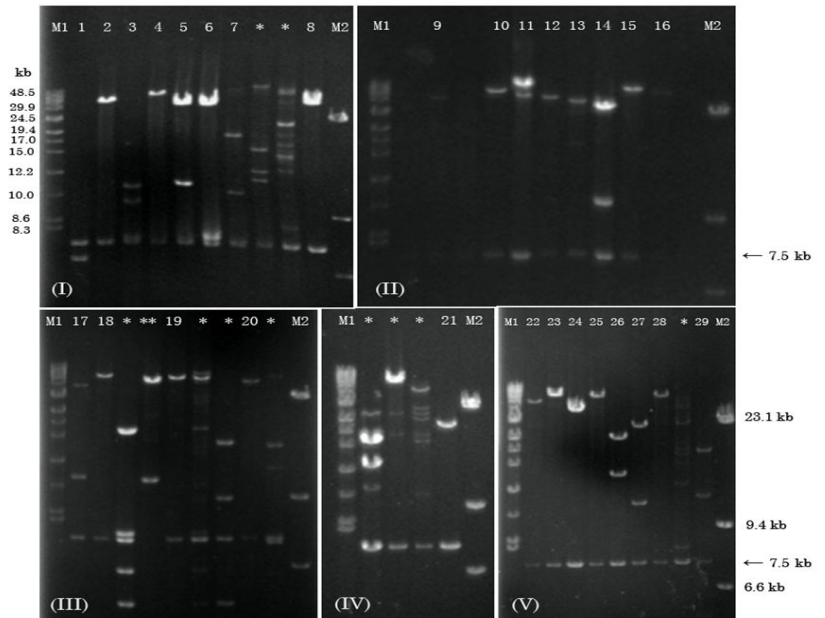
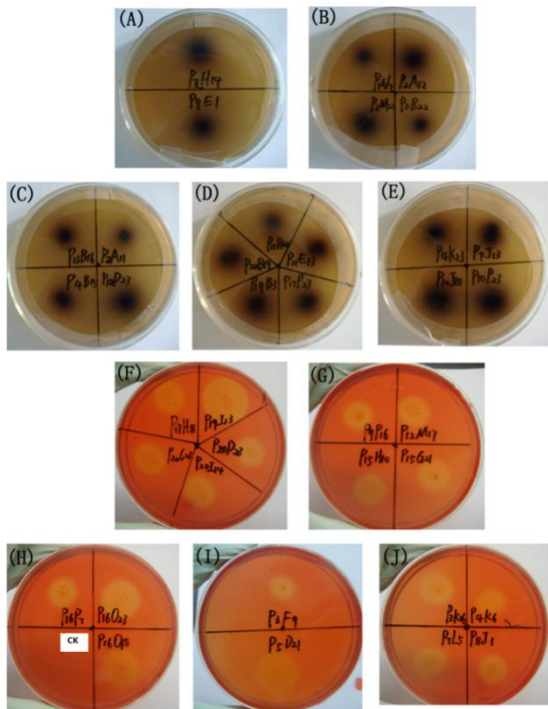


一，传统的宏基因组学研究流程。

宏基因组文库筛选

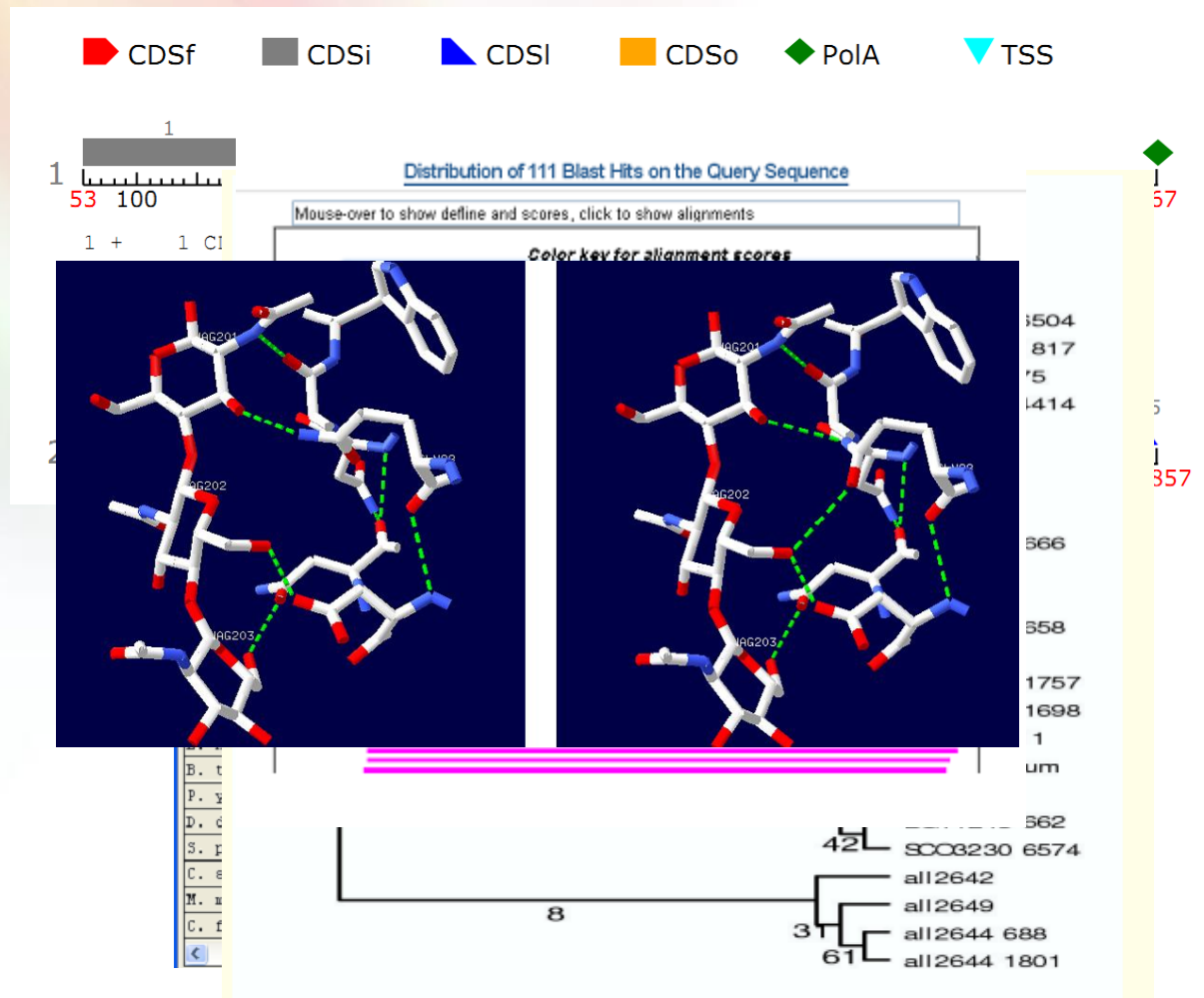
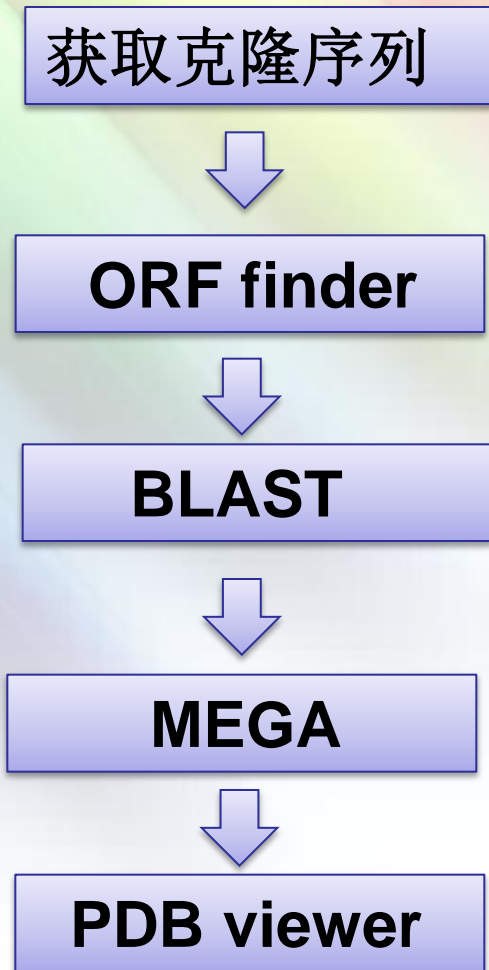
功能筛选

序列筛选



一，传统的宏基因组学研究流程。

阳性克隆的后续分析



二，基于文库构建的技术改进。

传统流程费时费力费钱，

因为阳性克隆比例太低。

以潮间带沉积物为样品构建文库，阳性4/386400。



提高阳性克隆比例

- 1， 稳定同位素示踪技术
- 2， **BrdU**标记的**DNA**免疫捕捉法
- 3， 抑制性消减杂交技术
- 4， 荧光活化细胞分选

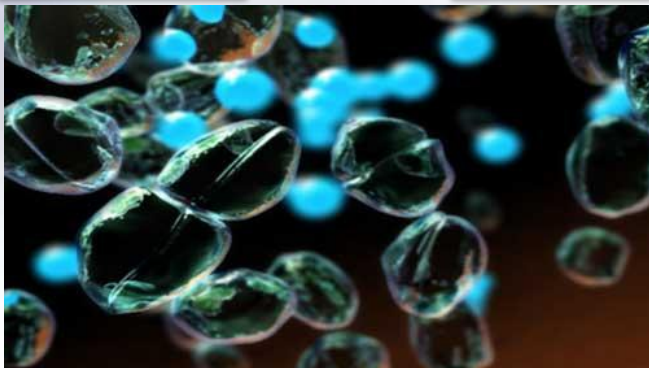
二，基于文库构建的技术改进。

稳定同位素探针技术

- 1，同位孵育把稳定同位素标记的化合物结合到样品中微生物的**DNA**上。
- 2，等密度超速离心技术分离标记的**重DNA**。
- 3，构建宏基因组文库。

$^{13}\text{CH}_4$

森林土壤嗜甲烷细菌

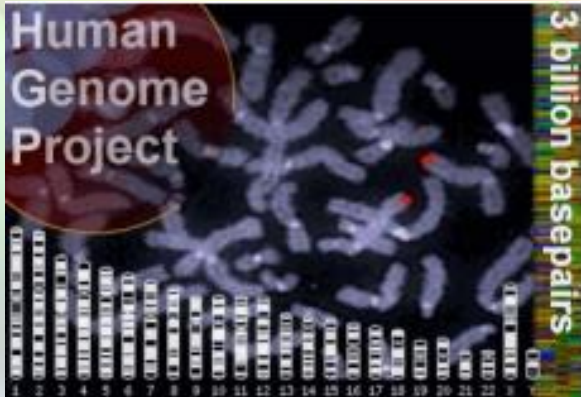


重DNA



构建含**2300**个克隆的文库，
即获得一个阳性克隆

三，基于高通量测序的技术改进。



传统测序：
1美元1对碱基。

构建宏基因组文库



高通量测序并分析



454

- pyrophosphate-based sequencing
- emulsion system
- Pyrophosphate



Illumina/Solexa

- DNA cluster
- Sequencing-by-synthesis (SBS)



AB SOLiD

- Ligation-based chemistry
- Color-space encoded

高通量测序：
1000美元一个基因组。

三，基于高通量测序的技术改进。

本地**BLAST**对宏基因组文库信息的分析

构建宏基因组文库

高通量测序获取序列

用检索序列进行本地**BLAST**



获取克隆序列

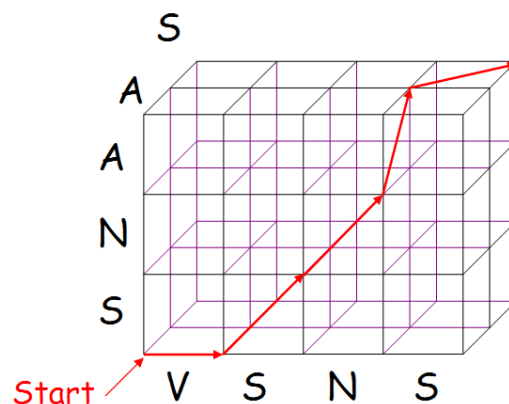
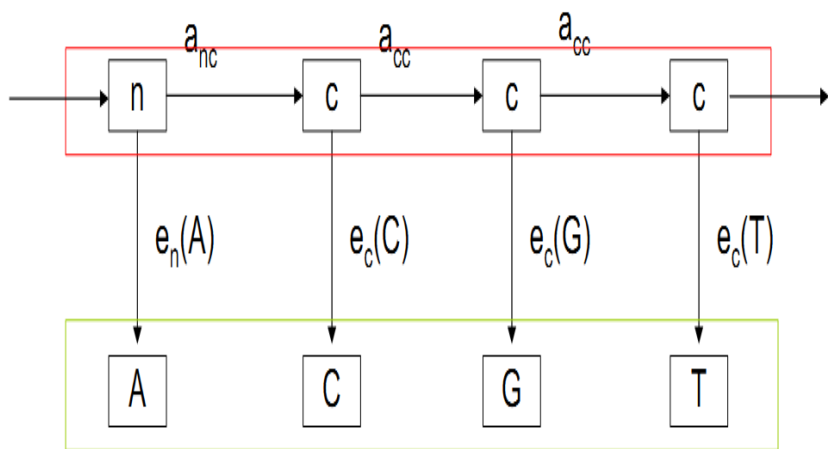
ORF finder

BLAST

MEGA

三，基于高通量测序的技术改进。

宏基因组文库功能基因预测软件



基因组功能基因预测软件
核心思想是隐马尔科夫模型。



需要对有机体有一定了解

宏基因组功能基因预测软件
加入动态规划算法、最大似然参数估计。

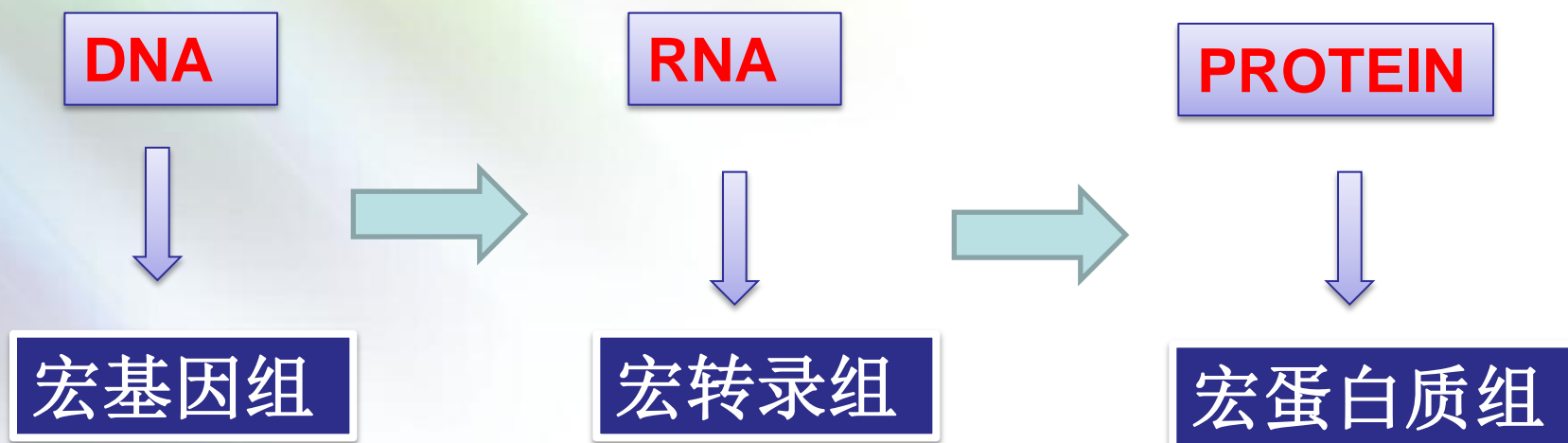


对有机体未知

四，宏基因组、宏转录组、宏蛋白质组的结合。

宏基因组的局限性：

基因表达的时空特异性 蛋白质修饰作用



四，宏基因组、宏转录组、宏蛋白质组的结合。

宏转录组

研究特定环境特定时期群体细胞在某功能状态下转录的所有RNA(包括mRNA 和非编码RNA) 的类型及拷贝数。

Poretsky对贫瘠的北太平洋水域表面的浮游细菌种群进行了研究，**mRNA** 数据表明，该群体的微生物白天进行光合作用、氧化磷酸化和C1化合物的合成代谢活动，而夜间则进行细胞膜、氨基酸和维生素等生物合成活动。

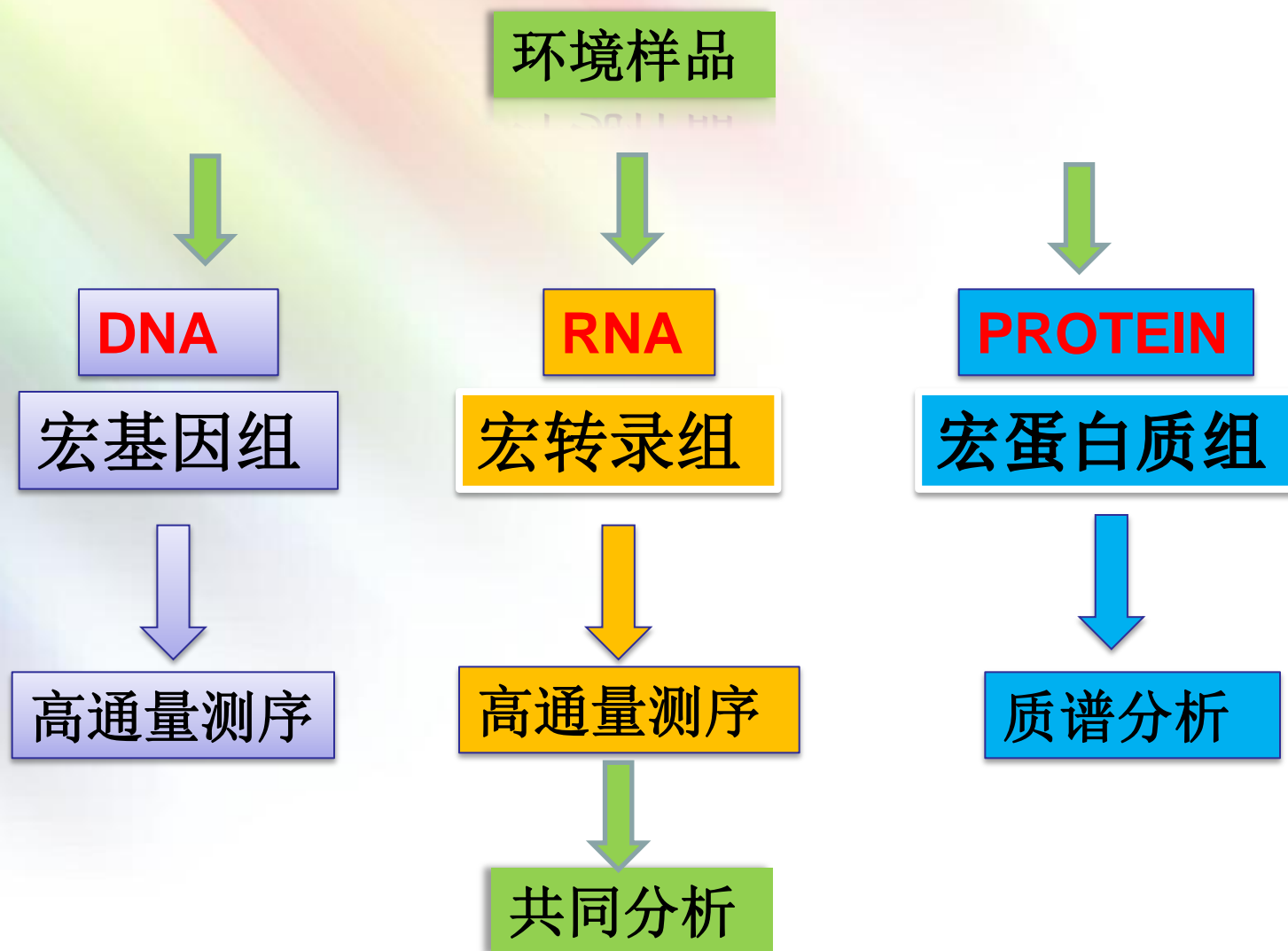
四，宏基因组、宏转录组、宏蛋白质组的结合。

宏蛋白质组

由 **Paul**和 **Philip**二人在**2004**年首先提出，指在特定时间对微生物群落的所有蛋白质组成进行大规模鉴定。

目前还没有通用的应用于环境样品蛋白质提取的方法，特别是从土壤、海水等复杂环境样品中提取总蛋白还有很大困难。目前的蛋白质分离技术仅能对复杂环境样品中不到**1%**的蛋白质进行分析。

四，宏基因组、宏转录组、宏蛋白质组的结合。



总 结

- 一，传统的宏基因组学研究费时费力。
- 二，基于文库构建进行技术改进。
- 三，基于高通量测序进行技术改进。
- 四，宏基因组、宏转录组、宏蛋白质组的结合。



Q & A

谢谢大家!

分工:

材料搜集: 耿爽 潘鑫池 罗一菁

PPT制作: 崔韶