

# 生物技术在动物微生物生态制剂 研究中的应用

蔡辉益 博士

中国农业科学院饲料研究所  
国家饲料工程技术研究中心

# 前言



- 抗生素在人畜保健、疾病防治、促进人类社会进步和发展诸方面都发挥了极其重要的作用。
- 然而饲料中加倍添加抗菌类促生长药物不仅杀灭了消化道固有的有益菌使病原菌产生了抗药性，破坏了内在的微生物生态平衡，而且药物残留对人类的健康带来了越来越严重的威胁。
- 因此寻找抗生素的替代物成为科学家的重要工作，而微生态制剂则成为目前认为比较理想的抗生素的替代物。

# 前言



- 近几年来，农业生物技术对农业产业结构的改善和产量增加的发挥了重大作用。农业生物技术领域中研究最活跃的是应用转基因技术，将目的基因导入动植物体内，对家畜、家禽及农作物进行品种改良，从而获得高产、优质、抗病虫害的转基因动植物新品种，达到充分提高资源利用效率，降低生产成本的目的。
- 而动物微生态制剂已应用这些生物技术生产了一大批新型的营养品、保健品和添加剂，如益生菌、基因工程生长激素、生长抑素抑制剂等。
- 在动物防病方面，科学家们也正在创造转基因饲料作物、转基因工程菌以及对病原微生物进行基因分析、鉴定和分型等。



# 一、生物技术的基本特征

- ▼ 生物技术也称生物工程，它是在分子生物学基础上建立的创建新的生物类型或新生物机能的实用技术，是现代生物科学和工程技术相结合的产物。



# 一、生物技术的基本特征

- 目前世界上许多国家已经将生物技术、信息技术和新材料技术作为三大重中之重的高技术。生物技术可以分为传统生物技术、工业生物发酵技术和现代生物技术。通常人们所指的生物技术就是指现代生物技术。
- 生物技术包括基因工程、蛋白质工程、细胞工程、酶工程和发酵工程五大工程技术，其中基因工程技术是生物技术的核心技术。



## 二、生物技术在微生态制剂研究中的应用

- 目前微生态制剂的研究呈现几个特点：
- 首先是力求在研究方法上实现突破，它是深入研究的一个基本条件，包括菌株的分离与鉴定的方法、生物芯片技术、微生物代谢活动的动态“监测”系统、模式生物的使用等方面；



## 二、生物技术在微生态制剂研究中的应用

- 其次开始深入全面地研究益生菌的作用机理，主要包括消化道内微生物菌群的动态变化、菌体细胞的代谢、菌群与宿主免疫系统的关系、菌群对宿主代谢的影响等方面；



## 二、生物技术在微生态制剂研究中的应用

最后一个特点是集中在乳酸菌等少数几类益生菌，在研究益生菌的有益作用的同时还考虑有害的一面，结合益生菌的基因组学的研究，开始对细胞内基因的表达和调控进行全面彻底的研究。





## (一)、生物技术在菌株的分离与鉴定中的应用

- ▼ 动态的、完整的描绘整个消化道内微生物的分布和组成，对于正确评价益生菌在细胞水平上的营养调控机制，对于了解益生菌产品的菌株的组成，定量分析及质量控制都具有重要意义。



## (一)、生物技术在菌株的分离与鉴定中的应用

- 1、根据微生物的核苷酸顺序的特异性进行鉴别，可以进行群间、属间、种间、亚种间、乃至菌株之间的鉴定，帮助从复杂的培养物中间分离菌株，有望克服传统方法的不足。
- 2、除了依靠表型鉴定益生菌以外，还可以使用包括以基因组探针技术、基因组指纹技术、**PCR**技术为基础的方法。



## (一) 生物技术在菌株的分离与鉴定中的应用

3、PCR技术应用为益生菌的研究提供了有力的技术手段，该技术相对简单快速，不需要纯化培养，目前多用于鉴定复杂菌群的菌种分布情况，检测染色体上是否存在致病因子的基因。

4、目前已经得到大量专一性的引物，可以对微生物进行定性、半定量的分析或进行种的鉴定工作，通过直接扩增16s rRNA，然后使用变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳（DGGE/TGGE）、探针杂交或者对单独的rRNA基因测序。



## (二)、生物技术在对益生菌进行遗传修饰中的应用

- ❖ 由于当前动物微生态制剂的实际应用中存在许多问题：例如效果不稳定、专项功能较弱（如酶活），因此人们开始利用基因工程技术对已经过筛选或被证明有临床效果的菌株进行改良，拓宽应用范围，增强应用效果。
- ❖ 如果对益生菌进行遗传修饰，就要求筛选益生菌菌株，同时对菌株细胞的代谢和内部基因调控有着清楚的了解，目前主要有两条技术路线：



# 1、利用益生菌作为体内生物反应器表达外源基因

目前芽孢杆菌、酿酒酵母和乳酸菌都可以作为表达外源基因的宿主菌，其中乳酸菌作为“体内生物反应器”是最有价值、最有代表性。这些外源基因主要包括酶基因和治病/抗病基因，目前许多报道都集中在对促进消化的外源酶基因的克隆和表达方面。



## 1、利用益生菌作为体内生物反应器表达外源基因

把益生菌作为表达外源基因的宿主菌，除了得到适合基因操作的菌株外，还必须建立合适的载体以及解决外源基因表达的相关问题，包括能够用于表达外源基因的启动子、高效率的信号肽、筛选标记、高效率的转化方法，及解决外源基因稳定性等问题，目前受体菌主要使用乳酸菌，特别是乳酸乳杆菌



## 2. 对益生菌内源基因的遗传修饰

对益生菌染色体上的内源基因的遗传修饰主要指敲除有害基因，构建缺陷型菌株，以及对功能基因的改造，进一步增强益生菌的功能。

通常选择乳酸杆菌，利用已经筛选过的菌株，通过遗传修饰筛选更为优良的益生菌菌株。

但在动物方面的应用还需要大量工作。





### （三）、生物技术在动态监测动物体内益生菌的生长繁殖与代谢状况中的应用

使用报告系统的目的是有效的监测益生菌在体内生长与代谢繁殖情况，如与宿主和有害微生物之间的相互作用、基因表达情况、微生物代谢产物在体内的代谢情况。建立报告系统首先要得到一系列报告基因（见表1），然后筛选表达报告基因的重组菌株和便于检测而且能与报告基因共表达的外源底物。





表1 用于益生菌体内监测的作为报告基因的生化标记

生化标记	基因产物	参考文献
cat-194( <i>Staphylococcus aureus</i> )	氯霉素乙酰转移酶	Achen et al., 1986
gusA( <i>E.coli</i> )	$\beta$ -葡糖醛酸酶	Christ et al., 2000
LacL/lacM( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> )	$\beta$ -半乳糖苷酶	Hans et al., 1995
amyL( <i>Bacillus licheniformis</i> )	$\alpha$ -淀粉酶	Pascal et al., 1992
luxAB ( <i>Vibrio fischeri</i> )	荧光素酶	Eaton et al., 1993
Nuc( <i>S.aureus</i> )	核酸酶	Poquet et al., 1998
gfp ( <i>Aequorea victoria</i> )	绿色荧光蛋白	Martin et al., 1994



### （三）、生物技术在动态监测动物体内益生菌的生长繁殖与代谢状况中的应用

用作报告基因的**gfp**基因是近年来发展起来的，来源于水母，表达绿色荧光蛋白**GFP**，检测时不需要外源底物或辅因子，可以监测基因表达和在活细胞里定位蛋白质，实现在消化道内实时监测**GFP**+菌株的代谢情况。



## （四）、生物技术在益生菌的功能基因组学研究中的应用

- 1、目前先进的全基因组测序技术的发展为微生物的基因组学研究提供了可能，尽管微生物基因组学的初衷不是单纯为了益生菌的研究，但是这些工作很可能为益生菌的研究开辟了一条全新的道路。据报道，目前已经完成枯草杆菌、乳酸乳杆菌、酿酒酵母等的全基因组的测序。
- 2、由于微生物基因组比较小，可以同时对人体细胞中每一个基因进行分析，目前已经陆续对这些完成测序工作的生物进行功能基因组学研究，其中对酿酒酵母首先展开工作，并分别破坏全部**6300**多个基因，确定了单个基因的功能。



## （四）、生物技术在益生菌的功能基因组学研究中的应用

与大规模测序得到的海量数据相适应，科学工作者们还发展了一些高通量的分析方法，包括生物芯片、双向电泳与MALDI-TOF联用技术，这里使用的生物芯片主要包括DNA微阵列、寡核苷酸芯片两种。人们可以利用DNA微阵列分析生物整个基因组的转录情况。



## 四、益生菌研究存在的问题

- ✓ 益生菌研究的核心问题可以认为是认识微生物在生物体内所扮演的角色，包括：
  - ✓ 1、为什么益生菌有益生作用？益生菌是否对宿主存在副作用，这种副作用有多大？
  - ✓ 2、益生菌的安全性怎样，在什么情况下会成为不安全的菌株，不安全的菌株是否会扩散？
  - ✓ 3、益生菌与宿主各器官，特别是与消化系统和免疫系统的关系？在消化道内不同微生物菌群之间的关系？



## 四、益生菌研究存在的问题

- 4、益生菌在宿主体内的生命历程？等等。
- 虽然国内外已有大量商品化的益生菌问世，但是除了对酵母、芽孢杆菌和乳酸菌的研究相对深入一些以外，大部分益生菌的研究只停留在对作用效果研究上，而且这些研究成果还不系统，还需要更多的实验去支持，对机理的研究的不深入会在使用上遗留许多的麻烦。其中最重要的问题之一是益生菌的安全性问题。



## 2、需要研究的问题

- 1) 各种菌群，特别是常见的肠道优势有益菌群在肠道的定植时期，最佳微生态环境，以及菌群与内环境的具体联系机制，菌群与不同饲料养分之间的研究。
- 2) 筛选抗逆性强、易保存和有较强适应特定种类、特定时期动物肠道微环境的菌种，或者诸多菌种最优配比的研究。



- 3) 利用基因工程，将能产生特定酶、氨基酸、维生素、短链脂肪酸和其它有利于宿主营养，保健的生物活性物质的微生物基因转入能够快速繁殖，高效表达或良好抗逆性的其它种类生物的基因中，以便综合各种有益菌属的优良性状等方面的研究。
- 4) 将具有耐热性能的基因与微生物嫁接，在动物体与微生物间建立起有益的物流桥梁。





请多指教！  
谢谢！