

# 细菌的实验室进化

刘垒

2011-10-17

- 什么是ALE?

ALE, 实验室适应进化adaptive laboratory evolution,

在给定的实验室预期条件下观察生物的进化现象

微生物非常适合进行ALE研究

- 1.生长速度快，传代时间短
- 2.可重复性高
- 3.容易维持大群体
- 4.实验检测所需群体能够方便保存

## 为什么需要ALE?

- 1.达尔文的进化论不涉及任何分子遗传机理，达尔文之后的进化论的发展基本上也忽视了分子机理
- 2.缺乏有效的实验方法来模拟进化过程
3. 遗传操作技术的完善，特别是高通量DNA测序技术的飞速进步为ALE提供了强有力的工具

# 四大领域的进展

- 测序技术检测基因组突变
- ALE系统中调控网络的变化
- ALE中的系统优化
- 进化群体中突变的动态变化及其多样性

# 一、测序技术检测基因组突变

运用全基因组重测序(whole genome resequencing,WGS)技术，将经历ALE实验的大肠杆菌菌株与起始菌株的基因组序列进行对比，可以找出在进化中发生的突变。

单核苷酸突变是最普遍的突变形式，约占突变总数的61%

- WGS显示，ALE菌株经历适应进化后，出现了各种突变形式，包括单核苷酸替换、小片段插入和丢失、大片段重复、专做片段插入等等
- 进化遗传路径是严格限定的。只有能够提供有利性状的突变才能在进化后代中被反复选择而得以保留

- 在纵向研究中发现，大肠杆菌在适应后期会发展出增变基因表型，使突变率大幅提高，而在出现增变基因表型之前，其获得的有利突变几乎呈线性增长



- 等位基因替代实验（allelic replacement）结合生长速率测定或竞争实验可以有效地评估突变对细菌是否有利。
- 等位替代实验不仅表明大部突变都是有利的，而且还能够揭示某些适应突变基因型和表型之间的联系

- 等位替代发现，有时候一些突变单独存在时对细菌似乎是中性甚至是有害的，单当有其他适应突变加入时就显出有利性状
- 这种突变之间的作用称为“上位”（多突变之间不具有累加效应）
- 上位作用在实验中似乎是一个被普遍发现的特征。

- 对于多个突变同时存在的菌株，构建等位替代是很困难的
- 可以采用多元自动基因工程技术，将突变基因合成寡核苷酸，随机整合到基因组上构建等位替代文库
- 亦可运用基于微阵列技术的适应突变找寻技术，将冗余、无用的突变“过滤”掉

## 二、ALE系统中调控网络的变化

- 在细菌子代进化群体中，有时可以观察到相当程度的平行进化现象（parallelism），进一步测序表明这些群体中，相似的调控基因发生了突变
- **ALE**实验表明，调控节点发生的突变能够产生大量有利性状，普遍存在于子代进化群体中。

- RNA聚合酶（RNAP）是一个重要的中央调控节点
- 将大肠杆菌置于贫瘠营养环境中连续培养，发现RNAP核心酶基因经常发生突变，其中，*rpoC*（编码RNA聚合酶的一个亚基）的突变占80%
- *rpoC*突变后，大肠杆菌生长速率增加60%，并改变了基因组中20-27%基因的表达模式

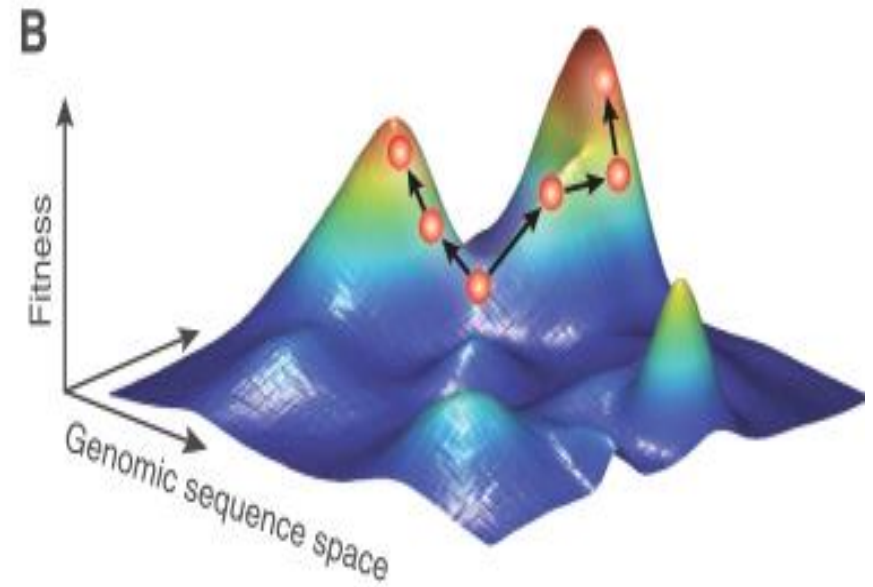
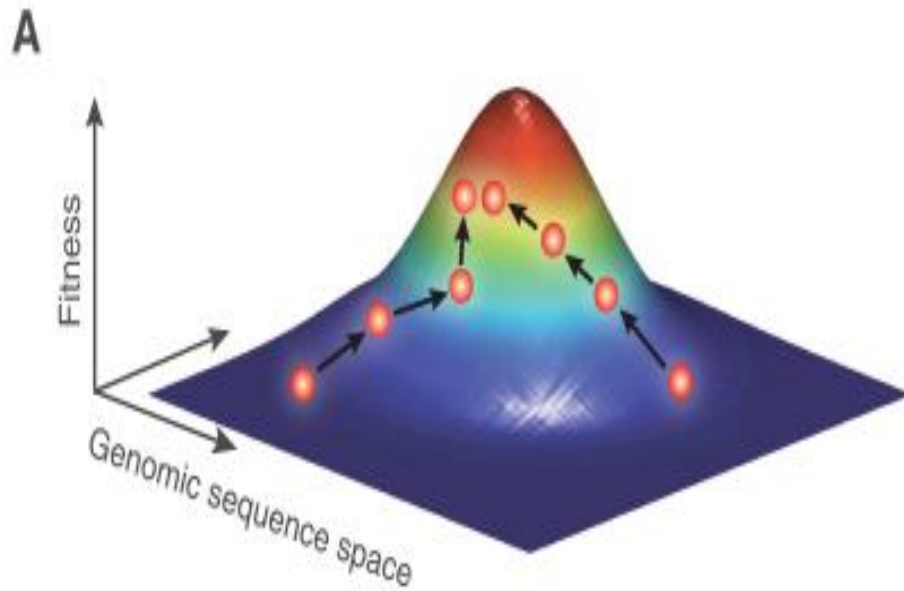
- $\sigma$ 因子在细菌中结合RNAP，参与识别特定启动子，辅助形成转录复合物。
- *rpoS*编码一个 $\sigma$ 因子参与全局压力应答。而 $\sigma^{70}$ 是代谢生长相关基因转录必需的 $\sigma$ 因子。二者形成一种平衡协调关系，调节细菌的压力胁迫状态和持续增长状态
- 生存压力胁迫条件下，*rpoS*及其调节子更容易被突变

# 三、ALE中的系统优化

进化群体中目标表型的可能遵循最优原理  
(principle of optimality)

流平衡分析和成本-产出分析可以帮助我们预测可能产生的表型

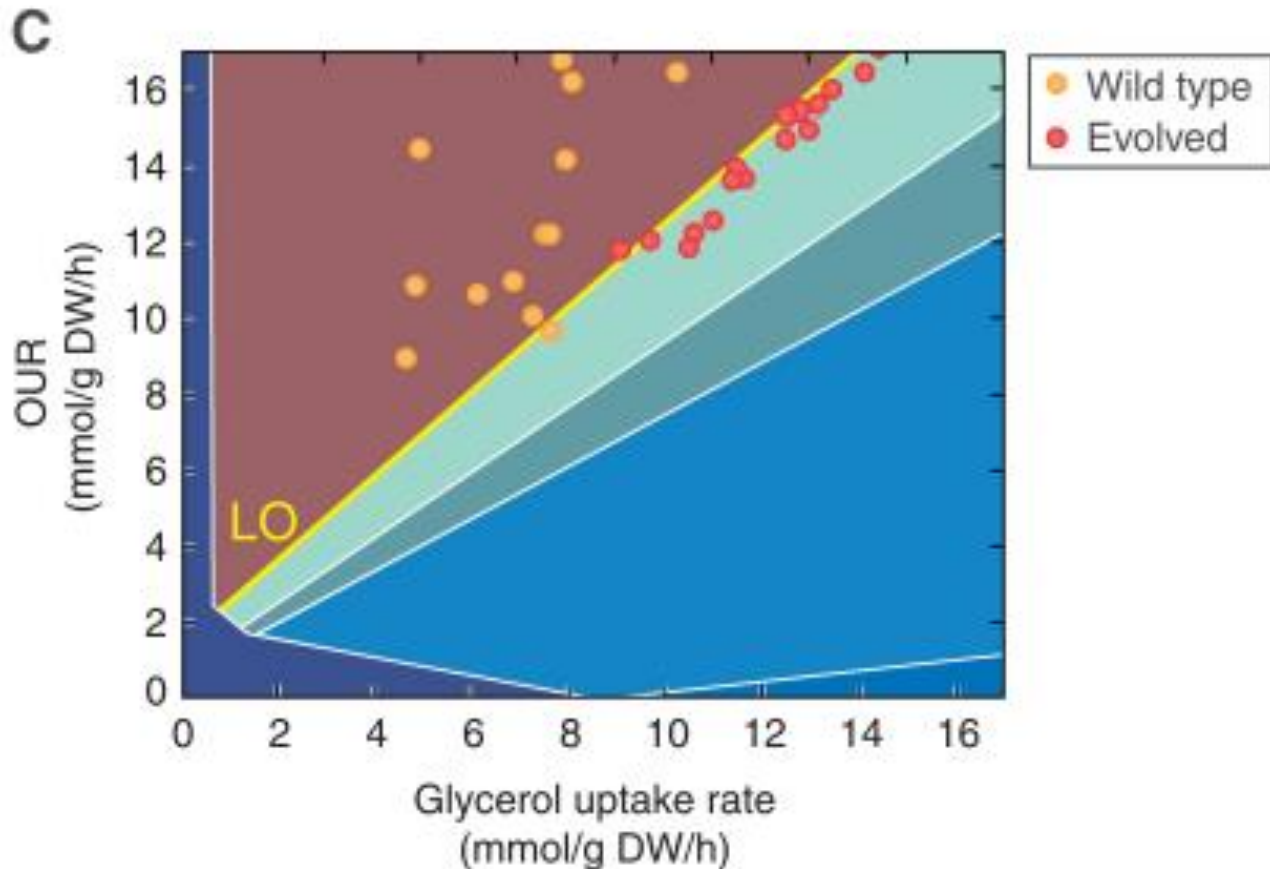
- 进化模型的建立需要求助于进化图景。





- 通过数学模型可以研究细胞优化配置过程。当生物组织的代谢网络确定，各生物量成分已知，可以用流平衡分析(flux-balance analysis, FBA) 来计算给定营养条件下的最大生物产出量

- PhPP图分析

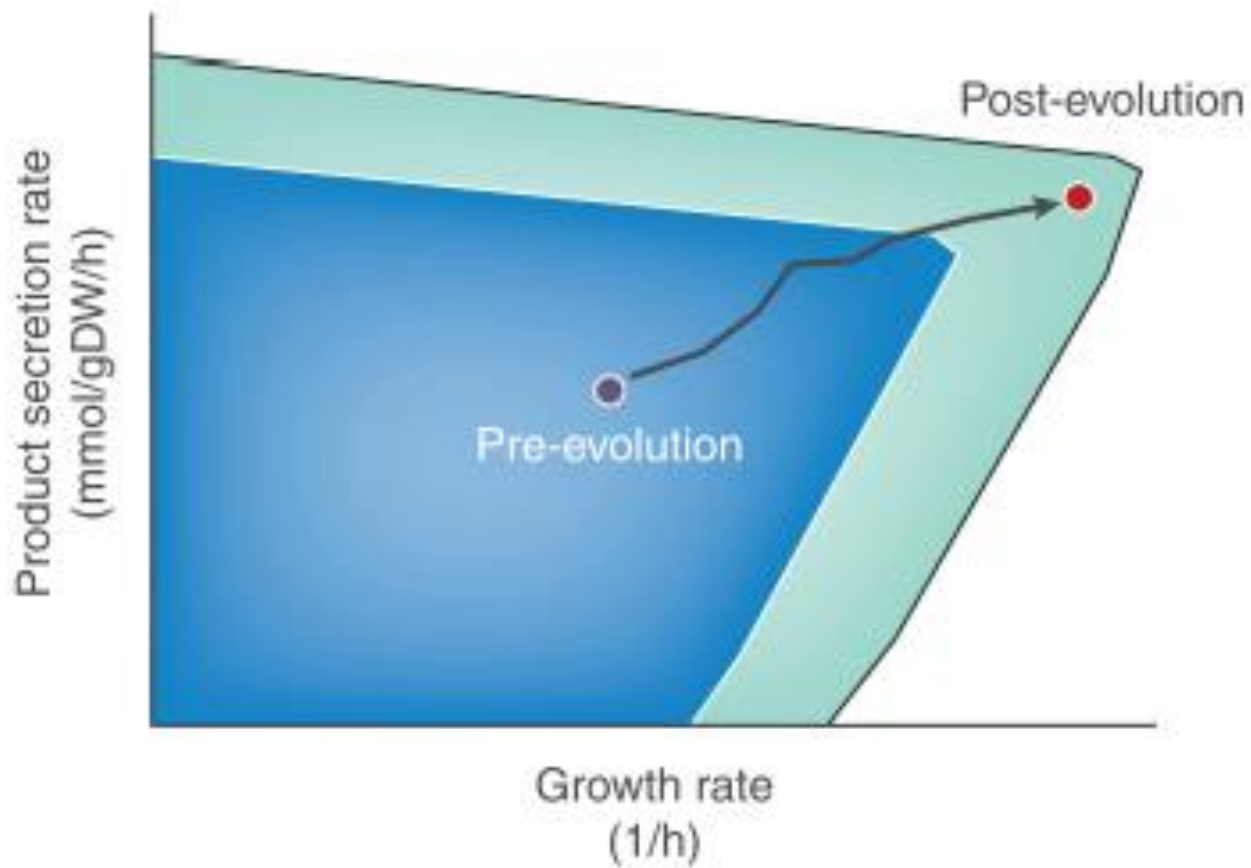


在大肠杆菌和乳酸杆菌中都观察到子代进化群体中代谢平衡向最优线移动的现象

- 要得到好的最优代谢流状态，需要相关酶足额表达，但是蛋白的表达对细胞来说是耗时耗力的过程。因此需要根据成本-产出分析来建立蛋白质的最优表达模式。
- 一个关于LacZ表达优化的实验表明，大肠杆菌Lac操纵子的最优表达水平取决于环境中的乳糖含量。
- 在给定的乳糖含量下，表达次优LacZ量的大肠杆菌会快速转变为表达最优LacZ量的状态

- 细菌向最优表型进化可以应用于代谢工程研究。
- 生长和分泌通常是此消彼长的关系，通过开发算法，预测某些基因，将其敲除后可以同时获得高分泌蛋白和高生长速度的菌株。
- 在这样的菌株中，所需的分泌蛋白正是生长所必需的蛋白

**D**



- 优化模型目前主要关注的是代谢网络，，而代谢基因只占基因组的小部分。其他细胞生理生化活动诸如转录、细胞维持、防御等也需要考虑和关注
- 此外，突变有可能造成转录蛋白结合模体和结合动力学参数的改变，这些在建立最优模型时都要纳入考虑。

## 四、进化群体中突变的动态变化及其多样性

- 进化群体中的多样性与多种因素有关，例如：突变率、有利突变的适应效果、“瓶颈”群体的大小等等

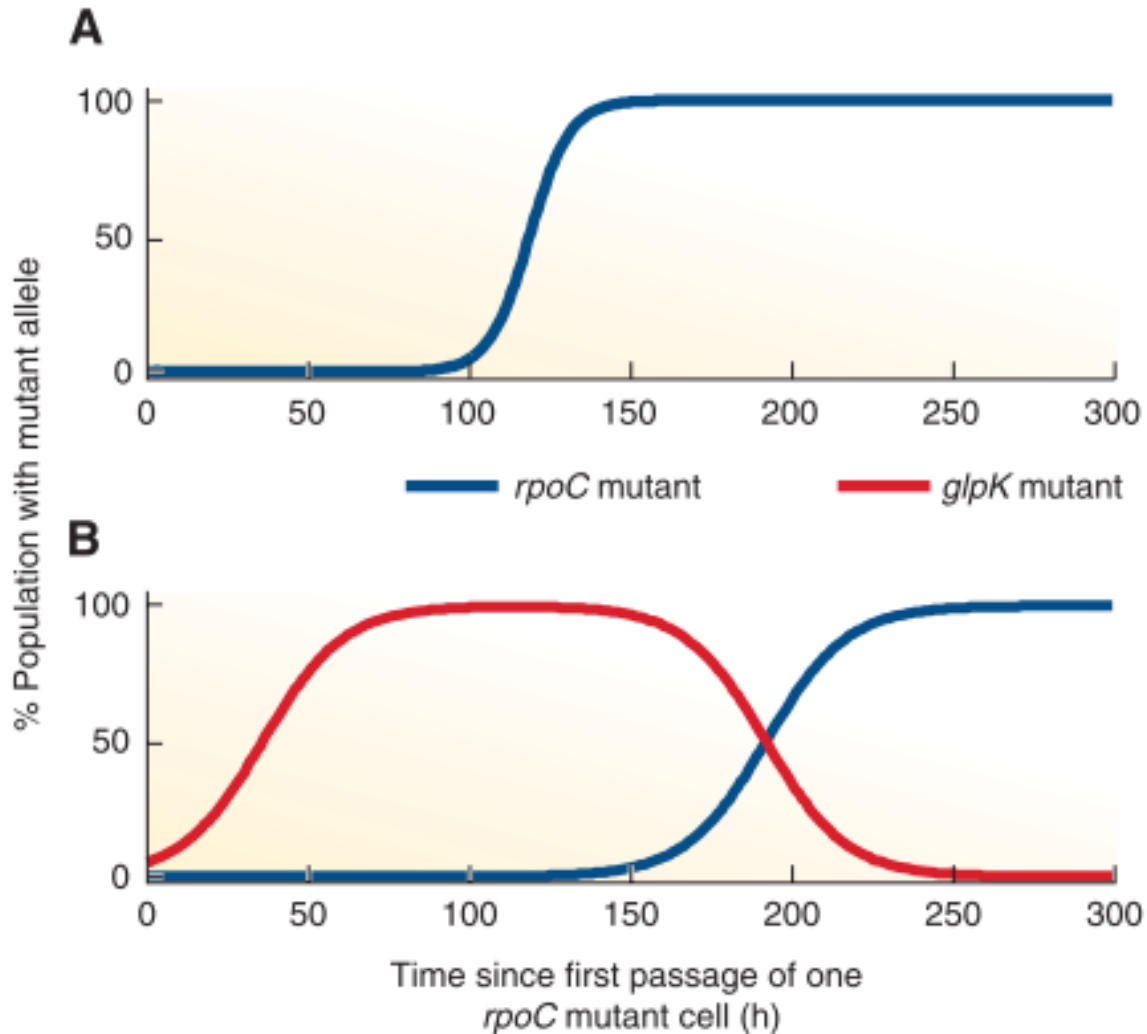
- ALE实验中的克隆干扰和“瓶颈”
- 克隆干扰：在一个大的群体中，携带有一个有利性状的小群体比其他亚群体具有明显的进化优势，它在群体中所占的比例会不断增大，甚至完全充满整个群体，使新的突变不再产生，达到进化速度的极限
- 当然，克隆干扰并非一定发生



“瓶颈”（bottlenecks）：在进化群体中取出一个随机的小群体转移到新鲜培养基环境中进行指数增长，连续世代实验发现这个小群体“丢失”的可能性非常高。

瓶颈现象说明，即使是有利突变也会无故丢失

# 克隆干扰和漂变的关系



实验表明，连续世代培养实验由于生存压力的选择和“瓶颈”存在，通常会产生均一群体，而丧失突变的多样性；

而某个基因位上突变的多样性往往存在于恒定环境(各种成分保持不变)中

这表明进化群体中突变多样性比简单等位替代要复杂得多。

# 总结

以系统生物学的眼光来看ALE实验:

生物功能的研究可以通过环境扰动（生化因子）和遗传扰动（基因敲除）的不同组合来实现。

ALE实验中所有选择的突变都可以看做系统的一个扰动变量，为系统生物学提供了有效变量参数，对学术研究和工业应用都具有重要意义