

环境中基因工程微生物的监测方法

童咏仪

(中国军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 介绍国外有关环境基因工程微生物的监测原理与方法。即环境 GEM 监测标记系统的基本要求; 几种环境 GEM 监测常用的标记系统: 抗性标记系统、发色标记系统和发光基因标记系统等; 环境 GEM 的检测方法: 平皿培养计数法、免疫学法、遗传学法、生物发光法和流动细胞计数器对环境 GEM 监测。

关键词 基因工程微生物, 环境, 监测。

偶然逃逸(实验室、工厂)和人为施放入环境中的基因工程微生物(Genetically Engineered Microorganism, GEM)是否会对生态平衡和人类健康造成危害一直为科学界和各国政府所关注。特别是近年来一些国家提出向环境中人为引入 GEM 以提高作物产量和治理环境污染等以来, 这一问题更引起科学界和公众的不安, 各国政府相继建立管理机构和法规来评价和管理 GEM 的人为施放活动^[23]。

研究 GEM 在环境中的命运(存活, 扩散, 基因传播等)及其可能对生态环境和人类健康造成的危害首先必需解决环境中 GEM 的监测问题。1990 年经济合作与发展组织(OECD)在丹麦首都哥本哈根召开了一次有关环境中遗传修饰有机体(Genetically Modified Organisms, GMO)监测的国际会议, 其中讨论了对环境 GEM 监测的制度、方法、设计及国际间合作的必要性等问题^[1]。为了促使我国学者参与国际上对生物工程这一重大技术安全性问题的研究和讨论, 特别是具体地监察和评价我国各种 GEM 的人工施放活动, 现对国外有关环境中 GEM 的监测方法加以介绍。

1 监测环境中 GEM 的基本策略

在构建用于环境施放的 GEM 时, 考虑到日后的监测问题, 常向 GEM 中引入某种标记(Marker, Reporter)以研究 GEM 及其工程特性在环境中的命运和转归。这种标记基因的引入既可以通过体外重组, 也可通过体内重组和人工诱变等现代分子生物学和微生物学技术获得。标记系统可以是专门设计的, 也可能是工程特性本身在引入环境中的稀有性而具有标记功能。

1.1 环境 GEM 监测标记系统的基本要求

(1) 在引入环境中是特异的 环境中很少或没有这种标记系统的存在或活动。如 *xyIE* 基因是恶臭假单胞菌质粒上编码邻苯二酚-2,3-双加氧酶(C_{230})基因, 一般环境中微生物很少有这种基因, 因此具备作为标记系统的条件^[15,24,25]。发光微生物存在于许多水体中, 特别是海洋中, 但陆上土壤中的微生物很少有发光基因的活动, 因此它可在这些环境中被用作标记基因^[9]。

(2) 具备多种方便、灵敏的检测方法 如既可以用核酸探针等遗传学方法检测标记基因存在, 又可通过免疫学方法、酶活力测定、发色、发光反应等表型检测方法检测该基因的表达产物。既可通过标记系统追踪 GEM 在环境中存在和移动, 又可研究新遗传性状在环境中的稳定性。

(3) 不要因标记系统的活动给宿主 GEM 带来太大负担 向宿主菌引入额外标记系统, 其保持和表达会给宿主带来一定的负担, 特别在高效表达时。因此, 在考虑引入标记系统时, 应避免因标记系统的活动影响 GEM 的期望功能。如 Winstanley(1989)用 *xyIE* 基因作标记基因时, 向工程质粒中引入可调控原件 P_L 或 P_R 启动子及其温度敏感抑制子 CI_{857} 。在一般外环境温度时 CI_{857} 处于活性状态, 抑制了 *xyIE* 基因的表达, 减少了对宿主的负担。但在检测时, 将培养温度提高到 37℃ 以上使抑制子失活, 开动了 *xyIE* 基因的表达, 起到标记功能^[24]。此外, 将标记基因置于染色体而不是质粒上不仅可以减少因质粒不稳定造成标记的丢失, 还可减少因其过度复制和表达给宿主带来的负担, 其传播的危险性也降低了。但标记置于染色体上时, 其拷贝数必然较少,

赋予检测的信号也就弱了。

(4)不致带来新的公共卫生和环境问题 如抗菌素抗性基因虽可方便地用作标记基因,但由于其在环境中潜在传播的可能性,因此即便使用也最好不用人、畜常用的抗菌素的抗性基因作标记,而应用萘啶酮酸、利福平等抗性基因^[17]。

1.2 几种环境 GEM 监测常用的标记系统

国外近几年发展起来用于环境 GEM 监测的几种标记系统都还不太成熟,离满意使用还有一段距离,但随着大家的努力,从这些系统中会发展出一些能更好地满足上述条件的标记系统。

1.2.1 抗性标记系统

对抗菌素或重金属的抗性基因可通过体外重组或人工突变的方法使 GEM 带上该标记,这种标记系统可使 GEM 方便地在含有抗菌素(如萘啶酮酸、新生霉素、利福平等)或重金属盐(Ca、Hg)的选择性培养基上生长出来并可进行定量研究。在使用抗性标记系统时应注意以下几点:

①不要用人畜常用抗菌素抗性基因作标记,因为这可导致抗菌素抗性传播的可能性;②环境中可能存在一些天然抗性本底,如杀虫剂可能诱导本土细菌产生对重金属的抗性而干扰了其标记功能;③为避免抗性基因传播,应将抗性基因置于染色体上,而不是质粒上,而且不要位于染色体重复序列附近以免因转位子活动导致基因传播;④一些在实验室构建的抗性菌株在缺乏选择压力的自然环境中可能生长不好^[17]。

1.2.2 发色标记系统

(1)LacZY 标记系统 LacZY 基因已成功地用于许多基因操作中选择阳性重组子。其产物能分解乳糖或其类似物 X-gal 等使菌落呈特殊颜色。由于许多环境中不存在该基因的活动(如土壤、植物叶面等),因此可在这些环境中作为一种方便的标记系统。Drallos(1986)将该基因置于广谱质粒上,通过不同的高效启动子启动,非常有效监测土壤中的荧光假单胞菌^[4]。Kluepfel(1991)将该基因引入致金假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens*)染色体中用于检测目的^[11]。

(2)xylE 标记系统 xylE 基因是恶臭假单胞菌大质粒 pWWO 上编码邻苯二酚-2,3-双加

氧酶(C₂₃₀)的基因,该酶能使邻苯二酚转化为一种黄色产物(2-hydroxymuconic semialdehyde)。由于该基因序列已全部弄清,C₂₃₀酶定量方便,C₂₃₀酶还可以转化邻苯二酚为黄色产物使菌落呈黄色,因此可用基因探针、酶学定量、邻苯二酚喷雾、ELISA 等多种检测方法对这种标记系统进行检测^[15,24,25]。

xylE 基因作为标记基因不仅可用于研究携带该标记系统的 GEM 在环境中的存活、扩散情况,而且它作为一种非选择性标记系统用于研究 GEM 的基因传播时,可以克服抗性选择标记系统难以区分基因转移究竟是发生在皿上(实验过程中)或是在自然界中的问题。

(3)葡萄糖苷酸酶(glucuronidase, GUS)基因 大肠杆菌产生的 GUS 性质稳定、测定方便,底物丰富,绝大多数植物及其叶面、根际微生物、真菌、昆虫都没有大肠杆菌 GUS 基因的活动,因此可将其引入这些生物中,作为标记研究基因的表达调控和追踪 GEM 在环境中的动向^[6]。

1.2.3 发光基因标记系统

许多微生物,特别是海洋微生物具有发光的特性,对其中有些微生物的生物发光机理已经弄清并将有关基因作为标记来研究基因的调控表达规律和追踪环境微生物的动向^[14]。Ratray(1989)将一种海洋发光弧菌(*Vibrio fischeri*)的荧光酶基因(Luciferase genes)LuxA、B、C、D、E、I、R 构建成不同的结构性和可诱导性质粒引入大肠杆菌中,用测光法测定具有这些工程质粒的大肠杆菌,在水中的敏感性为 10²/ml,在土壤中的敏感性为 10³/g^[18]。Kaniga(1992)将 LuxA、B 基因引入小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)的染色体中,用生物发光法测定了经牛和小鼠口服该菌后的排菌情况^[9]。由于水环境中有不少能自发荧光的细菌,有人认为该标记系统用于水环境时特异性不好。

1.2.4 其它标记系统

(1)特异性寡核苷酸片段 这些标记系统主要通过核酸探针或 F-R 技术进行检测而不是对表达产物的表型检测。如 Chaudhry(1989)用来自紫狼尾草(napier grass)的一段 DNA 作为标记基

因,由于它与水、土等环境中各类微生物核酸无同源性,因此可将其用作标记基因检测 GEM 在环境中的转归^[9]。

(2)King(1991)用去调节的二氯芬氧乙酸单加酸(dichlorophenox yacetate monooxygenase)基因作为标记系统,该基因的产物可使苯氧基乙酸(phenoxyacetate PAA)转化为酚,用分光光度法、气相色谱或高性能液相色谱测定酚的含量或同时监测 PAA 的消失情况即可对 GEM 进行定量研究。也可以将 PAA 等喷雾到平皿上,含有该标记基因的菌落能转化 PAA 使菌落呈红色。由于环境中一般微生物不能降解 PAA,故该基因作为标记基因具有很好的特异性。但该方法的敏感性尚有待提高^[10]。

(3)Ben Lugtenberg(1990)利用一种融合蛋白作为标记来检测环境中 GEM。NodO 蛋白是一种根瘤菌的分泌蛋白(细胞膜上没有),PhoE 是肠杆菌科具有的一种外膜蛋白,将两种蛋白的基因克隆到一个去掉转座酶基因的转座子上(防止传播),并置于一个广谱革兰氏阴性菌启动子之下,借一个不稳定质粒的转座酶基因的转座作用,可将其导入多种革兰氏阴性菌中,成为一种广谱的标记系统。PhoE 蛋白作为锚将 NodO 蛋白固定于细胞外膜,用免疫学方法检测时可克服较长的外膜脂多糖的干扰作用^[7]。

2 环境 GEM 的检测方法

GEM 的检测方法按检测的对象可分为表型检测和遗传型检测,前者是对基因产物的检测,后者是对核酸片段的检测。按定量与否可分为定性检测与定量检测。按检测的手段可分为培养法、免疫学方法、核酸探针检测方法、生物发光法、酶活力测定法等。

一种标记系统可能同时用多种方法进行检测。如对 xylE 标记系统可采用培养平皿喷雾法(定量、表型检测),也可用核酸探针法检测 xylE 基因,还可通过测定邻苯二酚-2,3-双加氧酶的活力对 GEM 进行定量。具体使用哪种方法要考虑到所用方法的特异性、敏感性、实用性和可靠性等因素。

2.1 平皿培养计数法

许多抗性标记系统和发色、发光标记系统(xylE, lacZY, GUS, LuxAB 等)都可使用平皿培养计数法直接对 GEM 进行计数。前者是向平皿介质中加入一定浓度抗菌素或重金属盐抑制杂菌的生长而使带标记的 GEM 能选择性地生长出来进行计数;后者是向平皿介质中加入某种基质(如乳糖)或待菌落长成后再向平皿中喷入某种物质(如邻苯二酚),带有标记的菌落具有特殊代谢能力能产生特殊颜色而计数。

平皿培养计数法是一种表型检测方法,它的特点是直观,可定量。但其缺点是对环境中普遍存在的休眠态微生物无法检测;有些含有标记基因,但在环境中并不表达该基因特性的 GEM 也不能检测;一些环境中微生物具有的本底抗性也可能影响该方法的可信性。

2.2 免疫学方法

象其它微生物一样,免疫学方法对环境中特异 GEM 也是一种很好的检测方法。

(1)免疫荧光直接计数法 将环境样品经过适当处理后,用荧光标记的单克隆抗体染色,然后用荧光显微镜直接计数染荧光的细胞。Mason(1990)用这种方法检测土壤样品中 *Flavobacterium* P25 菌,敏感性达 20/g^[12]。目前认为这是一种最具特异性和敏感性的环境 GEM 检测方法。它不需要培养微生物就可直接定量,使用萘啶酮酸和酵母浸膏先处理样品后再荧光染色计数能使具有代谢活力的 GEM 与总 GEM 区别开来。但制备针对每一种 GEM 的单克隆抗体较复杂,环境中的自发荧光对检测也有一定影响。

(2)免疫磁捕获法 将包被有特异性抗体的磁性微粒加入到样品中特异性地吸附相应 GEM,在外加磁场时,所吸附的 GEM 被磁粒带到试管壁上,其它杂质被倒掉,用这种方法可将样品中的 GEM 选择性浓缩供进一步分析。Morgan(1989)用对模式假单胞菌鞭毛特异性抗原的单克隆抗体包被磁珠,从中回收了 20% 的靶细胞^[16]。

(3)ELISA Morgan(1989)用 ELISA 法测定了带 xylE 基因标记的恶臭假单胞菌。由于 xylE 基因产物 C₂₃₀ 仅在细胞上才有活性,因此可用

ELISA 测定该产物对完整细胞进行定量。该方法的敏感性为 $10^3/\text{ml}^{[15]}$ 。

2.3 遗传学方法

(1) 菌落原位杂交法 将样品中的微生物先在平皿上长成菌落,然后按菌落原位杂交法用针对 GEM 的特异性探针进行杂交,对杂交阳性的菌落计数即可知样品中 GEM 的浓度。由于要求细菌先长成菌落,因此它还是克服不了平皿培养计数法对休眠态微生物不能计数的缺点。但用于分离环境中低浓度含目的基因的微生物时十分有用^[20]。

(2) MPN-核酸探针杂交法 Fredrickson (1988)根据 MPN 的终极稀释原理,用微量板将微生物样品用抗性选择培养基多孔系列稀释后培养 3—4d,然后将各孔菌液过滤到膜上进行点杂交,根据阳性杂交点数和 MPN 计数法原理求算样品中微生物浓度。该方法用于检测土壤含 Tn5 的恶臭假单胞菌和 *Rhizobium leguminosarum* 的敏感性为 10/g 和 100/g^[5]。Fulthorpe(1989)也进行了类似的探索^[6]。

(3) 直接抽提环境样品中微生物的总核酸纯化后用核酸探针杂交能对环境 GEM 作定性检测^[19,21]。它的优点在于不需要先培养微生物,解决了休眠态微生物的检出问题。将核酸纯化、酶切后 South 斑点杂交分析可研究工程基因在环境中的重排、缺失和基因转移现象。特别是先通过 PCR 技术特异性地扩增靶片段,然后再进行杂交,能大大提高该方法的敏感性^[3,22]。但如何利用该方法对环境样品中的 GEM 进行定量的问题还没有解决。

2.4 生物发光法

标记具有发光功能的 GEM 能通过发光菌落计数、光输出测量、萤光酶基因探针、电荷耦合显微镜(Charge-coupled microscope)和 X 光成像等多种方法检测。光输出测量具有简单、快速的特点。Mahro (1989)用高灵敏度的摄像机对 *Streptomyces coelicolor* J1501(含有 LuxA B)进行空间照像定位,能确定以微菌落和微液滴形式存在的 GEM 在环境中各层次密度^[13]。

2.5 流动细胞计数器(Flow cytometer)对环境

GEM 监测

流动细胞计数器是一种能对环境中的特异微生物进行快速鉴定、分选、计数的方法。用荧光染料标记的特异性抗体或寡核苷酸探针处理环境样品,由于抗原抗体反应或核酸探针杂交使样品中的 GEM 带上特异性荧光,洗去游离的荧光抗体或寡核苷酸片段,剩下标记有特异性荧光的 GEM 在流动细胞计数器上极细的激光束中一个一个地通过,仪器将记录下细胞的各种参数(密度、大小),如果用不同的荧光染料标记几种抗体或核酸探针则可同时对几种不同的微生物进行检测,并分选、计数,结果可用计算机储存、分析。Amman(1990)用该法检出了复杂微生物群体中 <3% 的目标微生物 *De sulfobrio gigas*^[2]。

参考文献

- 1 禾子. 生物工程信息快报. 1991, (3): 20
- 2 Amman R I et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1990, 56: 1919
- 3 Chaudhry C R et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1989, 55: 1301
- 4 Drallos D I et al. . Bio/Technology. 1986, 4: 439
- 5 Fredrickson J K et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1988, 54: 446
- 6 Fulthorpe R A et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1989, 55: 1584
- 7 Lugtenberg B et al. . edited by Omenn G S & Bourquin A W. Biotechnology & Biodegradation. 1990, 467
- 8 Jefferson R A. . Nature. 1989, 342: 837
- 9 Kaniga K et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1992, 58: 1024
- 10 King R J et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1991, 57: 1790
- 11 Kluepfel D A et al. . Phytopathology. . 1991, 81: 348
- 12 Mason J et al. . FEMS Microbiology Letters. 1990, 73: 299
- 13 Mahro B et al. . DECHEMA Biotechnol. Conf. . 3 pt A, 1989: 447—450
- 14 Meighen A E. . Microbiol. Review. . 1991, 55: 123
- 15 Morgan J A W et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1989, 55: 2537
- 16 Morgan J A W et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1991, 57: 503
- 17 Omenn G S et al, edited by Omenn G S & Bourquin A W. Biotechnology & Biodegradation. 1990: 426—489
- 18 Rattray E A S et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1990, 56: 3368
- 19 Sayler G S et al. . Annu. Rev. Microbiol. . 1990, 44: 625
- 20 Sayler G S et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1985, 49: 1295
- 21 Steffan R J et al. . Can. J. Microbiol. . 1989, 35: 681
- 22 Steffan R J et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1988, 54: 2185
- 23 Tiedje J M et al. . Ecology. 1989, 70: 298
- 24 Winstanley C et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1989, 55: 771
- 25 Winstanley C et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1991, 57: 1905

Abstracts

Chinese Journal of Environmental Science

chem., Qingdao Univ., Qingdao 266071); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(1), 1994, pp. 42—45

The adsorptions of cationic, disperse, reducible, neutral, active and direct dyes on bentonite are studied respectively and the decolorization effects of treating dye-containing aqueous solution by using bentonite adsorption-flocculation method and only flocculation method are compared. The decolorization rate of the former will be 40%—200% higher than that of the latter. Using 0.01% of bentonite with 0.005% of PAC can decolorize the dye-containing wastewater by 94%—100%, where in the dye consists mainly of cationic dye.

Key words: bentonite, adsorption, flocculation, treatment of wastewater, organic dye.

Treatment of Effluent Containing Cu Ions by Means of a Packed Bed Electrochemical Reactor. Xu Wenlin, Wang Yaqiong (Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(1), 1994, pp. 46—49

A treatment process for effluent containing Cu ions is studied by means of a packed bed electrochemical reactor which is designed using one dimensional reactor model. Experimental results show that such a process particularly suitable for the treatment of the diluent effluent and the treated water can meet the requirement of the outlet concentration $< 1 \times 10^{-6}$; the factors affecting the effluent treatment process, such as Cu ions input concentration, operation temperature, operation voltage, solution flow rate, effluent conductivity and the kind of the packed material, are also discussed. This process is economically viable and provides an effective way of removing trace metal based on the assessment of the experimental process.

Key words: effluent containing Cu ions, packed bed electrode, electrochemical reactor, wastewater treatment.

Studies on the Treatment of Pharmaceutical Wastewater with Upflow Anaerobic Sludge Blanket. Cheng Yu et al. (The Research Institute of Environmental Protection for Pharmaceutical Industry of Shenyang 110026); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(1), 1994, pp. 50—52

In this paper, described were some research results about the treatment of wastewater from Vitamin-C, SD and glucose production processes at a normal temperature with upflow anaerobic sludge blanket. The reactor has a volume of 100 litres, at a fermentation temperature of 17—24°C and the influent COD_{Cr} of 3000—5000 mg/L. The organic load was 3—6 kg COD/(m³ · d), the hydraulic retention time (HRT) was 18—24h and the rate of gas generation reached to 0.3 m³/kg COD with 70%

methane in the gas. The COD_{Cr} removal was up to 90%. All the experimental results were satisfactory. This process is found appropriate for treating the lower concentration pharmaceutical wastewater under the anaerobic condition.

Key words: upflow anaerobic sludge, blanket granular sludge, *methanosarina*, total volatile acid.

Survey on Municipal Domestic Wastes Composting Technology in Mainland China. Chen Shihe (School of Environmental Engineering, Tongji University, Shanghai 200092); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(1), 1994, pp. 53—56

This article deals with a general survey on the composting technology for municipal domestic wastes in mainland China, including: (1) the history of composting technology for municipal domestic wastes; initial stage, development and research stage, and application stage; (2) studies on composting technology; microorganism characteristic in composting process, oxygen delivery mechanism, composting process, factors affecting composting process, special-purpose machinery, trial engineering of composting technology, and existing problem; (3) the trend of composting technology for municipal domestic wastes in mainland China. This article gives a detailed and complete description on the evolution, current status and prospects of composting technology for municipal domestic wastes in mainland China.

Key words: municipal domestic wastes, composting technology.

Monitoring Methods for Genetically Engineered Microorganisms in the Environment. Tong Yongyi (Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(1), 1994, pp. 57—60

This paper deals with the monitoring principle and methods for genetically engineered microorganisms (GEM) in the environment, including the requirements of marker system on GEM for monitoring purpose, some recently developed marker systems and the monitoring methods for environmental GEM culture method, immunological method, genetic method, bioluminescent method and application of flow cytometry.

Key words: genetically engineered microorganism (GEM), environment, monitor.

Analysis of the Reversible Mechanism of Inhibition by Synthetic Organics in Anaerobic Digestion. Bian Rulin (Department of Environmental Engineering, Xi'an Institute of Metallurgy and Construction Engineering, Xi'an 710055); *Chin. J. Environ.*