

PCR 技术在环境微生物检测中的应用

胡稳奇 张志光

(湖南师范大学生物系, 长沙 410006)

摘要 多聚酶链式反应技术(PCR)近年来已广泛应用于环境微生物检测中,与常规方法比较,它具有灵敏度高、特异性强及快速简便等优点。本文简要介绍了 PCR 技术的基本原理,PCR 应用于环境微生物检测的方法学及其应用现状与前景。

关键词 多聚酶链式反应,环境微生物学,检测。

多聚酶链式反应技术(Polymerase Chain Reaction,简称 PCR),是美国学者 K. B. Mullis 和 R. K. Saiki 等于 1985 年首创的^[1]。作为一种特异性 DNA 体外扩增技术,PCR 具有特异性、灵敏度高、快速简便和重复性好等优点,应用该方法可使极微量的特异 DNA 片段在几小时内(2—4h)迅速扩增百万倍以上,从而有利于对 DNA 分子检测,增加其特异性与灵敏度^[2]。从 PCR 技术发明至今虽然仅有不到 10 年时间,它的应用已涉及几乎整个生命科学的领域。

近几年来,随着 PCR 技术的不断发展与完善,它在环境微生物学中也得到了广泛的应用,有关这方面的文献报道日益增多,至今已达 100 余篇^[3]。PCR 技术创立之初期,各国环境微生物学工作者即开始应用该技术,检测环境中的特定微生物类群或基因型。近年来随着 PCR 技术本身的发展,其特异性和灵敏度不断提高,各国环境微生物学工作者研究的重点主要集中于以下 2 个方面:①应用 PCR 技术研究某一特定环境中微生物区系的组成、结构,并进而了解其种群动态;②应用 PCR 技术监测环境中特定种群(如致病菌、工程菌株)的动态。

1 PCR 技术的基本原理与方法^[4]

PCR 技术是特异性 DNA 体外扩增的一种非常快速而简便的新方法,其反应主要包括以下 3 个过程:①双链 DNA(模板)加热变性为单链;②引物与模板 DNA 单链结合;③引物延伸(扩增)。其基本原理与反应过程是:在 PCR 反应缓冲液中,分别加入一定量的 DNA 聚合酶、待扩增

DNA 样品、一对引物及 4 种脱氧核苷酸(dNTP),首先加热(95℃)使模板 DNA 变性,解链为单链 DNA,随即一对引物分别与模板 DNA 的 2 条单链的两端互补杂交。这时反应温度降至适宜的温度,在适宜离子强度、pH 和 4 种脱氧核苷酸等条件下,由 DNA 聚合酶催化引物引导的 DNA 链的延伸。至此完成了 PCR 第一轮反应。继之又开始加热变性和退火进入第二轮反应。由于在第一轮反应中新扩增的 DNA 链又可作为第二轮反应的模板,DNA 链拷贝数以 2ⁿ 增加。上述反应周而复始,循环往复,经 20—30 轮反应后,目的 DNA 成百万倍扩增。

PCR 技术创立之初,在 PCR 反应中使用的 DNA 聚合酶是来源于大肠杆菌(*E. coli*)的 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 大片段,由于该酶不耐高温,因而必须在每轮反应中加入新酶,给其操作带来了困难。1988 年美国 Cetus 公司的 R. K. Saiki 等从一种嗜热细菌中分离到可耐 95℃ 高温的 DNA 聚合酶-TaqDNA 聚合酶,从而解决了上述困难^[4]。继之又发明了 PCR 扩增仪,使 PCR 反应的实验操作完全自动化,从而促进了 PCR 技术在各个研究领域的更广泛应用。

研究表明,虽然 PCR 反应的基本原理已十分简单明了,但其反应本身及整个循环中不断变化着的温度、产物、引物、dNTP 及 DNA 多聚酶的浓度等存在着极为复杂的动力学关系^[4]。影响 PCR 反应的主要因子是反应液中 DNA 多聚酶、引物、dNTP、模板 DNA 及 Mg²⁺ 的浓度。因此,在

PCR 每一新的应用中,常需反复试验从而找到其最佳反应条件,这一点对于 PCR 在环境微生物检测中的应用尤其重要。因为从环境样品(如水样、土样或空气样本)提取的 DNA 或 RNA 的量往往是极其微量的,即模板 DNA 的量极微量,如果反应条件控制不好,常会出现扩增后见不到产物或产物浓度太低而无法检测出来^[5]。环境样品 PCR 检测的另一个困难就是待扩增样品往往含有较多的非特异性 DNA 或 RNA,从而抑制特异性 DNA 的扩增或造成扩增产物出现非特异性背景区带,影响产物的检测^[6]。

近年来,很多研究者对环境样本的 PCR 的适宜条件进行了深入研究^[5,6],Steffan 等(1991)对此作了综述^[3]。Mullis 等(1987)研究表明^[6],对环境样本的 DNA 进行 2 轮扩增可显著提高其灵敏度并减少非特异性 DNA 的干扰,其方法是:将前一轮 PCR 扩增产物进行适当稀释(1:10—200),然后再进行 PCR 扩增,据认为通过对前一轮反应的产物进行适当稀释,可提高特异性 DNA 在反应液中的比例,从而提高 PCR 扩增的灵敏度与特异性。在上述前后 2 轮 PCR 扩增中既可以使用同一对引物(Primers),也可以在后一轮扩增使用套式引物(nested Primers)。Haqqi 等(1988)研究发现^[7],在后一轮反应中使用套式引物对于环境样本的 PCR 扩增是十分适用的。Ruano 等(1989)提出了另一种适应于环境样本 PCR 扩增的策略,即在 PCR 扩增的前 20 轮反应中将引物浓度控制在 2.5—8.3 pmol/L,后 10 轮反应中将引物浓度提高至 0.1—50 μ mol/L^[8]。使用这一方法,即使样本仅含有 5—10 个 DNA 分子也能通过 PCR 扩增后检测出来。

2 PCR 在环境微生物检测中应用的方法

应用 PCR 技术检测环境样品中的特定微生物类群,其基本步骤主要包括:①从环境样本中提取核酸(DNA 或 RNA);②以提取的 DNA 或 RNA 样品为模板进行 PCR 扩增;③对 PCR 扩增产物的检测与分析。

2.1 环境样本中核酸的提取

应用 PCR 技术检测环境样本的第一步,就

是必须从水样、土样或空气样本等环境样品中提取到纯化的 DNA 或 RNA,然后以此为模板进行 PCR 扩增。近年来各国研究者对从环境样本中提取核酸进行了深入的研究(Steffan 等,1991)^[3]。从环境样本中提取核酸的方法主要包括:氯化铯-溴化乙锭超速离心、亲和层析、酚/氯仿抽提、乙醇沉淀及聚乙烯聚吡咯烷酮(PVPP)处理等,有时是上述几种方法的结合。

最近几年一些研究者提出了多种从水体样本中提取核酸的方法^[3],一般说来,从水样中提取核酸比从土样或空气样品提取更简单一些。多数情况下是首先对水样进行过滤收集微生物细胞,然后用溶菌酶处理微生物使核酸从细胞中释放出来,也可以采用反复冻融的方法进行处理^[9,10]。Bej 等发现通过上述处理得到的核酸粗液即可进行 PCR 扩增,而不需进一步纯化以除去杂质^[11]。但多数情况下需通过酚/氯仿抽提、高速离心及乙醇沉淀等进一步纯化,然后再以纯化的 DNA 或 RNA 样品进行扩增。Steffan 等(1989)提出了一种较为理想的纯化方法,即在上述微生物细胞水解液中添加一定量的醋酸氨,使其终浓度为 2.5 mol/L,接着进行高速离心,然后取上清液进行乙醇沉淀^[12]。通过上述处理可除去样品中的大多数有机物杂质,得到较纯的 DNA 样品。

从土壤样本提取 DNA,目前主要采用以下 2 种方法:一是先从土样中分离微生物细胞,然后对分离的微生物细胞进行酶解及进一步的纯化 DNA,称之为细胞抽提法^[13]。二是对土壤样本中的微生物连同土壤基质一起酶解,然后再纯化其中的 DNA,称之为直接抽提法^[14]。Steffan 等(1988)研究发现,采用直接抽提法的 DNA 得率较高,但样品含杂质也多,需经过进一步纯化;而采用细胞抽提法的 DNA 得率低,但样品一般较纯^[15]。

2.2 PCR 产物的检测与分析

如前面所述,PCR 技术具有极高的灵敏度和特异性,即使是极其微量甚至无法检出的 DNA 分子通过 PCR 扩增后,由于其含量成百万倍增加,从而可以通过适当的方法予以检测^[4]。如果

待检样本中含有较多的目的 DNA,一般通过 PCR 扩增后,可用肉眼从溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶上见到清晰的电泳区带^[1]。然而,由于环境样品中一般仅含有极其微量的待检 DNA 分子,常常通过 PCR 扩增后仍无法用肉眼观察到清晰的电泳区带(Paul 等 1990)^[2],因而近年来发展了多种检测环境样本 PCR 产物的方法(Steffan 等 1991)^[3]。这些方法主要包括:①Southern 印迹杂交^[5];②生物素标记探针分子杂交^[16];③在 PCR 扩增中以生物素标记的 Bio-dUTP 等取代 dTTP 直接掺入到 PCR 产物中^[17];④在 PCR 产物中直接接上生物素标记的寡核苷酸探针(用 DNA 连接酶连接)^[18]。

3 PCR 技术在环境微生物学中的应用

3.1 应用 PCR 技术检测环境中的致病菌与指示菌

研究表明,水、土壤及空气等环境中都存在一定种类和数量的致病性细菌和病毒等,它们与某些重要的传染性疾病的传播和流行密切相关。例如 1955 年印度新德里市和 1988 年我国上海市的甲肝大流行,证明与水源污染有关^[19]。因此定期性的检测环境中致病菌的动态(种类、数量、变化趋势等)具有重要的意义。以前大多采用分离培养的方法进行检测,不仅费时(一般需几天到数周),而且无法检测一些难于人工培养的病原菌。近年采用 PCR 技术进行检测则克服了上述缺陷,一般仅需 2—4h 就能完成。

Bej 等 1990 年报道了利用 PCR 技术检测水中大肠杆菌类细菌的结果^[11]。他们对水样中提取的 DNA 利用 PCR 扩增技术,特异性地扩增其 LacZ 和 LamB 基因(来源于大肠杆菌)片段,然后分别用 LacZ 和 LamB 基因探针进行检测。结果发现:①利用 PCR 技术特异性扩增样品 DNA 的 LacZ 基因片段后,可以检测出水样中的大肠杆菌(*E. coli*)、志贺氏杆菌(*Shigella* spp.),但不能检测沙门氏菌(*Salmonella* spp.)及其它非大肠杆菌类细菌;②利用 PCR 特异性地扩增样品中 DNA 的 LamB 基因片段后,可以选择性地检测出水样中的大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌;③利用上

述 PCR 技术的灵敏度可达到 1—5 个细胞/100ml 水。另据报道,Bej 等(1990)还建立了另外一种检测水样中大肠杆菌类细菌的方法,即利用一对 PCR 引物特异性地扩增样品 DNA 中的 uid 基因片段(编码 β -葡糖苷酸酶),然后用 uid 基因探针进行检测,结果发现该方法可特异性地检测出水样中的大肠杆菌(*E. coli*)和志贺氏菌(*Shigella* spp.),即使是大肠杆菌的 uid⁻菌株也能检出,而其它大肠杆菌类细菌及非肠道菌的 DNA 不能扩增^[20]。

1989 年 Starnbach 等报道^[21],采用 PCR 技术特异性扩增 *Legionella* spp. DNA 的一未知功能的 DNA 片段,可特异性地检出样品中的 *Legionella pneumophila*,其灵敏度相当于稀释培养法的 35CFU。Mahbubani 等 1990 年报道了一种用 PCR 技术检测水样中 *Legionella* 属细菌的方法^[22],即采用 PCR 技术特异性地扩增待测样品 DNA 的 104bp DNA 片段(该片段编码 5S rRNA),然后用 104bp DNA 探针进行检测,结果表明该方法可检测出水样中的 *Legionella* 属的全部细菌,并可检测出 *Legionella pneumophila* 的全部 15 个血清型。

3.2 利用 PCR 技术检测环境中的工程菌株

随着遗传工程研究的广泛开展和大量的工程菌株的出现,一些工程菌株将不可避免地进入周围环境中,由于安全方面的考虑及研究工作本身的需要,检测工程菌株在水、土壤等环境中的动态在目前具有十分重要的意义。而 PCR 技术在这一领域具有广阔的应用前景,因为工程菌株的 DNA 基因组的结构和功能往往是已知的或较清楚,因而可有的放矢地设计 PCR 扩增的引物和检测扩增产物的探针。

Chaudry 等 1989 年报道了应用 PCR 技术检测环境中工程菌株的结果^[23]。他们将一工程菌株接种于经过过滤灭菌的湖水及污水中,定期取样并对提取的样品 DNA 进行 PCR 扩增,特异地扩增其 0.3kb DNA 片段(为该工程菌株的标记),然后用 0.3kb DNA 探针进行检测。结果表明接种 10—14d 后仍能用 PCR 方法检测出该工程菌株。

Steffan 等(1988)报道^[1],他们对环境(土壤)中的 *Pseudomonas cepacia* 重组菌株的检测研究表明,PCR 技术应用于检测土壤中的工程菌株具有极高的灵敏度,即使每 g 土壤样本中仅含有 1 个细菌仍可检出。

3.3 PCR 技术在环境微生物基因克隆中的应用

众所周知,土壤、淡水及海洋等环境中含有极其丰富的微生物资源,其中某些微生物种类具有重大的应用价值,从这些微生物中克隆出某些可利用的基因(如固氮基因、抗重金属基因等)具有重要的意义。但用常规的基因克隆方法难于分离到一些不能人工培养的细菌的基因。PCR 技术则在这一方面提供了一有力的工具。例如, Zehr 等(1989)报道^[2],他们采用 PCR 技术直接从海水 DNA 样本特异性地扩增其固氮基因(*nif*)片段,最终克隆到 *Trichodesmium thiebautii* 的 *nif* 基因,而 *Trichodesmium thiebautii* 至今无法人工培养,用常规方法无法克隆到其 *nif* 基因。

4 小结与展望

自 1985 年 K. B. Mullis 等首先建立 PCR 技术至今仅有不到 10 年的时间,但已在包括环境微生物学在内的众多生物学分支领域中得到了广泛的应用。本文展示了 PCR 技术在环境微生物学领域的广阔的应用前景。近几年来利用 PCR 技术进行环境微生物检测的研究报道与日俱增。研究结果表明,PCR 技术与其它常规检测方法比较具有下列优点:①高度灵敏性,PCR 技术的检测灵敏度可达到 1—2pg DNA 水平,或可从 1g 环境样品检出 1—2 个细菌细胞^[3];②高度特异性,利用 PCR 技术可特异性地检出环境微生物中的特定基因型、血清型及株系,还可特异性检测样本中的特定基因如毒性基因;③快速简便,以前利用常规分离培养方法检测环境样本的细菌和病毒,一般需几天甚至几周,利用 PCR 技术

仅需 2—4h 就能完成;④适用面广,利用 PCR 技术既可检测环境中的细菌,也能检测病毒,如 Xu 等(1990)^[25]利用 PCR 技术直接从人类粪便中检测出轮状病毒,其灵敏度比核酸杂交高 5×10^3 倍。

近年来 PCR 技术正在不断发展之中,如近年又相继建立了套式 PCR、逆向 PCR 及复式 PCR 等。可以预料,今后几年内 PCR 技术在环境微生物领域中的应用将进一步扩大,特别是在检测水体、土壤中的致病细菌、病毒及指示菌等方面发挥愈来愈大的作用。

参考文献

- 1 Saiki R K et al. . Science. 1985, **230**:1350
- 2 胡稳奇. 生物学通报. 1992, **3**:11
- 3 Steffan R J et al. . Annu. Rev. Microbiol. . 1991, **45**:137
- 4 Erlich H A et al. . PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton. . 1989
- 5 Paul J H et al. . Appl. Environ. Microbiol. 1990, **56**:1963
- 6 Mullis K B et al. . Methods Enzymol. 1987, **155**:335
- 7 Haqqi T M et al. . Nucleic Acids Res. . 1988, **16**:11844
- 8 Ruano G et al. . Nucleic Acids Res. . 1989, **17**:5407
- 9 Holben W E et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1988, **54**:703
- 10 Steffan R J et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1988, **54**:2908
- 11 Bej A K et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1990, **56**:307
- 12 Steffan R J et al. . Can. J. Microbiol. . 1989, **35**:681
- 13 Balkwill D L et al. . Can. J. Microbiol. . 1975, **21**:252
- 14 Ogram A et al. . J. Microbiol. Methods. . 1987, **7**:57
- 15 Steffan R J et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1988, **54**:2185
- 16 Olive D M et al. . Mol. Cell Probes. . 1988, **2**:47
- 17 Day P J R et al. . Biochem. J. . 1990, **267**:119
- 18 Kusakawa N et al. . Biotechniques. . 1990, **9**:66
- 19 张楚瑜等. 病毒学杂志. 1991, **1**:65
- 20 Bej A K et al. . Mol. Cell Probes. . 1990, **4**:353
- 21 Starnbach M N et al. . J. Clin. Microbiol. . 1989, **27**:1257
- 22 Mahbubani M H et al. . Mol. Cell Probes. . 1990, **4**:175
- 23 Chaudry G R et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1989, **55**:1301
- 24 Zehr J P et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1989, **55**:2522
- 25 Xu L et al. . J. Virol. Methods. . 1990, **27**:29

Key words: miniaturized watercolumn barometer, mercury pollution, saturated water vapor pressure, ambient temperature.

Advances in Physical and Chemical Technologies for Decolorization of Dye Wastewater. Yu Gang, Yang Zhihua et al. (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua University, Beijing 100084); *Chin. J. Environ. Sci.*, **15**(4), 1994, pp. 75—79

A review was made on the current status and development of physical and chemical technologies for decolorization of dye wastewater, including adsorption, coagulation and flocculation, chemical oxidation, ion exchange, ultrafiltration, and others.

Key words: dye wastewater, technology for decolorization, physical and chemical processes.

Applications of Polymerase Chain Reaction to Environmental Microbiology. Hu Wenqi and Zhang Zhiguang (Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha 410006); *Chin. J. Environ. Sci.*, **15**(4), 1994, pp. 80—83

Because of its high sensitivity, high specificity and simplicity, Polymerase Chain Reaction (PCR) has been widely used to detect pathogenic bacteria,

indicator bacteria and viruses in environmental samples since its creation in 1985. A review was made on the fundamental principles, methodology and current status of the applications of PCR to environmental microbiology.

Key words: polymerase chain reaction, environmental microbiology, detection application.

Role of Microbial Co-metabolism in the Biodegradation of Chlorinated Organic Compounds.

Shen Dongsheng et al. (Dept. of Environ. Sci., Zhejiang University of Agriculture, Hangzhou 310029); *Chin. J. Environ. Sci.*, **15**(4), 1994, pp. 84—87

Biochemical mechanism of microbial co-metabolism, progress in its research, and its role in the biodegradation of chlorinated organic compounds were dealt with in this article. The prospect of microbial co-metabolism, a biological process which has not yet been fully understood, to be applied in the treatment of refractory compounds such as chlorinated organic compounds was also suggested.

Key words: co-metabolism, chlorinated organic compounds, biodegradation.

SPACEMAN 特别推荐

全中文高档微机地理信息系统 SPACEMAN4.0

SPACEMAN 是一套专为地学及环境专家设计的 GIS 软件工具,国内用户已近 200 家,遍及著名的高等院校及科研院所,该系统以其功能齐全、操作方便、价格适宜及全中文面向用户的开放式设计,赢得了广泛好评。部分成果已打入国际市场,并在国际上获奖。

SPACEMAN4.0 主要特点:

中文管理、操作便捷、一看就懂、一用就会
面向用户设计,无需编程,可实现二次开发
空间模型自动生成,地学专家好帮手
立体地形任意角度生成,替代地图及沙盘
千种图案,矢量汉字,任意缩放,旋转注记
栅格矢量共存、相互转换、应用面广
精美彩色制图,进入二维/三维制图新天地
图表文及排版一体化管理、实现信息现代化
工作站的效率,微机的价格

可选软件配置: SPACEMAN-scanner; GIS 扫描输入系统,

SPACEMAN-mapper; 遥感地图制做系统, SPACEMAN-ptofessor; GIS 教学演示系统。

SPACEMAN 提供下列服务:提供各类 GIS 硬件及负责软硬件接口,常年举办 GIS 专业培训班,承接专题图件录入、专题及遥感制图及 GIS 项目设计、软件开发等业务,欢迎垂询!

国内首家 GIS 专业企业

北京天维资源环境新技术研究所

地址:北京市北京大学畅春园一号二楼 邮编:100080 寻呼热线:2048888—22342

电话:2559461—2168(或 2163) 2571135 2594114—6318(晚) 6895629—419(晚)

基本软件配置:

图形图像采集编辑模块、图形图像分析管理模块
属性数据库管理模块、图形图像彩色打印制图模块
图形彩色绘图制图模块
数字地形(DTM)制作模块、统计制图制表模块
空间模型自动生成运行模块
应用界面辅助生成模块
图表文及排版综合管理模块

硬件配置:数字化仪、绘图仪、彩色打印机、喷墨绘图仪、喷墨打印机及各类微型机。