

核酸杂交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)

核酸分子杂交技术是 70 年代发展起来的一种崭新的分子生物学技术, 即根据 DNA 分子碱基互补配对的原理, 以一特异性的 cDNA 探针与待测样品的 DNA 或 RNA 形成杂交分子的过程。由于它的高度特异性和灵敏度, 近年来已被广泛应用于环境微生物检测中; 不仅用来检测环境中的致病微生物、指示微生物及某些特定基因型的存在与否, 而且还被应用于环境微生物的生态研究中, 例如用于监测某一特定环境中的微生物种群、数量、分布及其变化, 从而预测该环境中的微生物种群变化趋势并最终得到有益的控制。另一重要的应用是监测某些微生物的特定基因型在环境中的动态, 如遗传工程微生物, 它们一般与环境固有的微生物在表型上无明显区别, 按常规方法难于区分, 而应用特异性的探针进行分子杂交检测则简便得多。核酸杂交技术目前已成为环境微生物检测的有力手段之一。本文试从以下几方面简要介绍其基本方法及其应用现状。

1 探针的制备方法

用于环境微生物检测的 cDNA 探针的制备方法与普通制备方法基本一致。常用的放射性标记是 ^{32}P , 通过缺口平移(nick translation)或末端标记法进行放射性标记。使用缺口平移法制备的 cDNA 探针具较高的比活放射性, 一般可达 $5 \times 10^8 \text{dpm}/\mu\text{g}$ DNA, 探针的长度为 400bp 左右。

在环境微生物检测中使用的 cDNA 探针主要有双链 DNA、单链 DNA 和 RNA 以及寡聚核苷酸探针等三类。制备的探针一般是种或株系特异性的, 可用于检测环境样品中特异性微生物种或株系; 有时是基因型特异性的, 它特异性更强, 可用于检测某一特定基因型的存

在与否。

双链 cDNA 探针在环境微生物检测中应用最广, 许多常见细菌如 *E. coli*、*Salmonella* spp 及 *Rhizobium* 等均已制备出种特异性的 ds DNA 探针。ds DNA 探针可从整个基因组 DNA 或质粒 DNA 通过缺口平移法进行制备, 也可以从亚克隆的特定 DNA 片段制备。1987 年 Roberts 等研究表明, 从基因组 DNA 制备的 cDNA 探针更适宜于种群鉴定, 因为它不需要复杂的克隆程序, 可与种内所有株系进行杂交, 而且比单拷贝基因探针具有更高的灵敏度^[1]。对于鉴别环境样品中相类似的种, 可以通过除去同源序列的方法制备出种特异性的探针来进行检测。

表型特异性的 cDNA 探针对于检测环境样本中某一特定表型的存在与否十分有用。例如, 细菌中存在编码致病性、抗生素抗性和重金属抗性等同源基因, 可以采用这些同源基因的 cDNA 探针来检测特定表型。

近年来, 单链 cDNA 和 RNA 探针亦已应用于 *E. coli* 和 *Salmonella* spp 等环境微生物的检测。与双链 cDNA 探针比较, 它们具有更高的灵敏度, 背景更清晰, 放射比活可达 $5 \times 10^8 \text{dpm}/\mu\text{g}$, 而且杂交时不需要变性^[2]。

另一类目前广泛应用的是寡聚核苷酸探针, 它们多由人工合成, 一般为 30bp 左右, 具有极高的灵敏度, 可用于检测环境微生物的单基因及点突变^[3]。目前应用较多的寡聚核苷酸探针是根据细菌 rRNA 基因的多拷贝且高度保守性的 DNA 片段设计的。许多常见细菌的 rRNA 基因的多拷贝保守序列是已知的, 它们

1994-06-10 收稿

一般具有界、属及种的特异性。因此,采用一组寡聚核苷酸探针既能粗略地检测某一环境样本中细菌的大致种类,又能鉴定出特定种的存在。目前许多常见细菌的寡聚核苷酸探针已有商品出售,被应用于检测环境样品中的 *E. coli*、*Listeria* spp、*Yersinia* spp 及 *Mycobacterium avium* 等致病性细菌^[6]。

2 环境样品的核酸杂交方法

2.1 菌落原位杂交

菌落原位杂交是环境微生物检测的常用方法,具有快速、简便等优点,且易与分离培养方法相结合。其检测程序是:首先将环境样品进行分离培养,将生长好后的菌落影印至 NC 膜上,碱变性处理,烘干滤膜,然后用特异性的探针与该滤膜进行杂交,根据放射自显影的结果确定特定种群的存在与否。Saylor 等研究表明,在 *E. coli* 和 *Pseudomonas putida* 的混合培养物中,使用 TOL 质粒探针进行菌落原位杂交,可以从 1×10^6 个 *E. coli* 菌落中筛选出 1 个含有 TOL 基因(甲苯代谢基因)的 *Pseudomonas putida* 菌落^[5]。

菌落原位杂交技术目前主要检测环境样品中 *E. coli*、*Yersinia* spp、*Vibrio* spp、*Shigella* spp 及 *Salmonella* spp 等重要病原细菌,可以检测出它们中某一特定基因型或表现型的存在与否及其数量变化趋势^[6]。

Jain 等报道,他们采用一系列特异性的探针与样本进行菌落原位杂交,监测了地下水中某些与代谢或抗性有关的质粒基因的存在。结果表明,人工引入的这些质粒基因在无选择压力时可在地下水中长期存在^[7]。Barkay 等则应用菌落原位杂交方法探讨了被汞污染的土壤中抗汞细菌的种类、数量及变化趋势^[8]。

菌落原位杂交方法既可检测环境样品的原始分离物,又可将原始分离物分离、纯化后再进行杂交检测,前者简便、易行、省时,应用较普遍;后者灵敏度虽高,但很费时。

2.2 从环境样品提取核酸的杂交方法

菌落原位杂交用于检测环境样品具有一定局限性,只能检测可培养的微生物如 *E. coli*

等多数细菌,而对于一些无法人工培养的微生物如螺原体(*Spiroplasma*)等的检测则无能为力。因此,近年来发展了从环境样品中提取 DNA 的各种分子杂交方法,其中主要的是将提取的 DNA 转移至 NC 膜上的 Southern blot 杂交方法,它可克服上述不足^[9]。

从土壤及水样中提取 DNA 的方法很多^[10],主要包括氯化铯密度平衡离心、亲和层析及酚/氯仿抽提等,也有时同时使用上述几种方法。从水样微生物中提取 DNA 一般比从土、空气样本中提取更简单一些。首先将水样过滤,收集微生物细胞,然后用溶菌酶处理使 DNA 从细胞中释放出来,有时也可通过反复冻融的方法使 DNA 释放,而后用酚/氯仿抽提或超速离心从上述细胞水解液中得到纯的 DNA 样品^[11]。

从土样微生物中提取高度纯化的 DNA 样品具有一定的困难,原因是土壤中的有机腐殖质常与 DNA 紧密结合,在抽提过程中难于与 DNA 分开^[12]。目前主要有两种提取方法:直接抽提和细胞抽提法。前者首先用溶菌酶等处理土样,使 DNA 从细胞中释放出来,然后再从土壤混合液中进一步纯化 DNA^[13],常用的纯化方法是氯化铯密度梯度超速离心。但此法仍难于除去 DNA 样品中的腐殖酸。Steffan 等研究表明,在土壤混合液中加入聚乙烯聚吡咯烷酮(PVPP),可以较好地除去腐殖酸^[14]。目前广泛应用的是细胞抽提法,先从土壤样本分离微生物细胞,进行溶菌酶处理后进一步纯化^[15]。Steffan 等研究表明上述二种方法均是可行的,前者可得到较多的 DNA 样品,后者得率较少,其原因是细胞抽提法仅能抽提到活菌的 DNA^[16]。

3 核酸杂交技术的应用

3.1 对致病性微生物的检测

土壤、水源及空气等环境中都存在一定种类和数量的致病性微生物,它们与某些传染性疾病的存在有着密切关系,例,我国上海市 1988 年甲肝大流行被证明与水源污染有关。因此,定期性地监测环境中致病微生物的种群动

态在卫生防疫上具有重要意义。常规的分离培养检测费时,而且不适宜于检测无法人工培养的病原菌。核酸杂交技术则可克服上述不足。

如前所述,许多细菌的 rRNA 基因含有多拷贝的高度保守性 DNA 序列,可以根据这些 DNA 序列合成特异性的寡聚核苷酸探针来检测病原细菌。目前应用此法监测的细菌包括 *E. coli*、*Vibrio*、*Shigella*、*Salmonella*、*Mycobacterium* 和 *Yersinia* 等一些重要的致病菌^[4]。例如研究发现军团杆菌在水源中广泛存在,可引起人类感染,当饮用水源中该菌超过一定数量时应对水源进行消毒处理。一些研究者根据其 5srRNA 基因的保守序列设计了寡聚核苷酸探针,可以特异性地检测出水样中该菌存在与否,并可区分其不同的血清型,从而为水质监测提供理论依据。

近年研究证明,河流、湖泊等水体中都存在一定种类和数量的病毒,是引起人类感染的病原之一。对水体中病毒种群动态的监测日益受到重视,核酸杂交技术为其提供了有力的手段。1986 年 Jiang 等研究表明,应用核酸杂交技术检测水中的甲肝病毒,不仅快速、简便,且具有很高的灵敏度^[17]。

3.2 指示菌的监测

指示细菌的种群消长动态是土壤、水体等环境监测的重要依据之一,例如饮用水源监测以检查大肠菌群及人类粪便污染的大肠杆菌为依据。传统的方法一般要花费几天时间,目前采用核酸杂交技术检测指示菌则可以在几小时内完成。例如,采用大肠杆菌编码肠毒素的基因作探针对环境样品进行菌落原位杂交,可以特异性地检测出样品中大肠杆菌的存在情况。

Rhizobium spp 等是重要的土壤指示菌之一, Schofield 等采用 nif、nod 和 met 等 3 个基因作为分子探针,特异性地检测出了土壤中该菌的种群分布情况,为土壤监测提供了依据^[18]。1990 年 Mahbubani 等采用 *Legionella* 的 104bp DNA 片段作为探针,检测经 PCR 扩增的环境样品 DNA,结果表明可以检出水样中 *Legionella* 属的全部细胞,并且能够区分

Legionella pneumophila 的全部 15 个血清型^[19]。

被汞等重金属污染的土壤或水中常有大量的抗汞细菌存在,它们的种群变化在一定程度上反映了受污染的程度。由于细菌的汞抗性多是由质粒编码的,因此某些已被克隆的汞抗性质粒基因可以作为分子探针,用于监测环境中抗汞细菌的种群变化。Lo 等研究表明,这一方法具有很高的特异性和灵敏度^[20]。此外,某些与 2, 4-D 及甲苯等物质降解有关的细菌亦是重要的土壤指示菌,由于与上述物质分解代谢有关的基因已被克隆,携带有克隆基因的质粒 DNA 可以作为分子探针,用于监测土壤中上述指示菌的种群变化^[7]。

3.3 对遗传工程菌的监测

近年来,随着遗传工程研究的广泛开展,出现了许多遗传工程菌株,它们将不可避免地进入到自然环境中。研究这些遗传工程菌在自然环境中的种群动态及其对环境的影响在理论上和实践上均具有重要意义。由于工程菌株的基因组 DNA 至少是部份已知的,可以有的放矢地设计高度特异性的 cDNA 探针进行杂交检测,核酸杂交技术在这方面具有广阔的应用前景。

1989 年 Amy 等以携带有 2, 4-D 降解基因的质粒 DNA 作为探针,通过菌落原位杂交研究了重组大肠杆菌在水中的种群变化^[21]。1988 年 Lo 等以 tR 基因(胸腺苷激酶基因)为分子探针,检测了释放于自然环境中的重组大肠杆菌。1993 年, Iwasaki 应用核酸杂交技术,监测了携带有汞抗性基因的 *Pseudomonas putida* 工程菌株在水中的存活情况,结果表明工程菌株与野生型菌株在 5 d 内群体数量迅速下降,随后至第 28 天变化缓慢,二者的种群变化无明显差异^[22]。1993 年 Kane 等应用核酸杂交技术研究了大肠杆菌工程菌株——W3100 G 在自然环境中的动态及其对环境的影响,结果未发现不良影响^[23]。

3.4 在特异性微生物分离及基因克隆中的应用

土壤及水体等自然环境中含有丰富的微生物资源,其中某些特异性的微生物具有重大应用价值,如抗重金属细菌、固氮菌及某些有害物(如2,4-D、DDT)的降解菌等,核酸杂交技术为这些特异性微生物的分离及其基因克隆提供了有力的手段。1986年,Pettigrew等以与4-chlorobiphenyl降解有关的质粒DNA作为探针,通过菌落原位杂交从被4-chlorobiphenyl污染的湖水中分离到了降解该物质的细菌^[4]。1986年Barkay等以汞抗性细菌质粒DNA为探针,通过菌落原位杂交从土壤中分离得到了抗汞细菌^[25]。

综上所述,核酸杂交技术近年来已广泛应用于环境微生物检测中,并展示了广阔的应用前景。由于它具有特异性强、灵敏度高及快速简便等优点,随着核酸杂交技术的不断发展与完善,预期在今后几年内其应用将日益广泛和深入,在环境微生物检测中将发挥愈来愈大的作用。

参 考 文 献

- [1] Roberts M C, Moncla B, Kenny G E. *J Gen Microbiol*, 1987, **133**: 1423—1430.
- [2] Holben E, Jansson J K, Chelm B K, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 703—711.
- [3] Wallace R B, Shaffer J, Murphy R, et al. *Nucleic Acids Res*, 1979, **6**: 3543—3557.
- [4] Datta A R, Wentz B A, Hill W E. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2933—2937.
- [5] Saylor G S, Harris C, Pettigrew C, et al. *Dev Ind Microbiol*, 1987, **27**: 135—149.
- [6] Saylor G S, Layton A C. *Ann Rev Microbiol*, 1990, **44**: 625—648.
- [7] Jain R K, Saylor G S, Wilson J T, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 996—1002.
- [8] Barkay T, Liebert C, Gillam M. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 1574—1577.
- [9] Jansson J K, Holben W E, Tiedje J M. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 3022—3025.
- [10] Steffan R J. *Ann Rev Microbiol*, 1991, **45**: 137.
- [11] Steffan R J, Breen A, Atlas R M, et al. *Can J Microbiol*, 1989, **35**: 681—685.
- [12] Olsen G J, Lane D J, Giovannoni S J, et al. *Ann Rev Microbiol*, 1986, **40**: 337—365.
- [13] Ogram AV, Saylor G S, Barkay T. *J Microbiol Methods*, 1988, **7**: 57—66.
- [14] Steffan R J, Atlas R M. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2185—2191.
- [15] Ogram A V, Saylor G S, Barkay T. *J Ind Microbiol*, 1988, **3**: 281—292.
- [16] Steffan R J, Goksyr J, Bej A K, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2908—2915.
- [17] Jiang X, Estes M K, Metcalf T G, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **52**: 711—717.
- [18] Schofield P R, Gibson A H, Dudman W F, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 2942—2947.
- [19] Mahbubani M H. *Mol Cell Probes*, 1990, **4**: 175—182.
- [20] Lo Y, Mehal W Z, Fleming K A. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 8719.
- [21] Amy P S, Hiatt H D. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 788—793.
- [22] Iwasaki K. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**: 1264—1269.
- [23] Kane J F. *J Ind Microbiol*, 1993, **11**(4): 205—210.
- [24] Pettigrew C A, Saylor G S. *J Microbiol Methods*, 1986, **5**: 205—213.
- [25] Barkay T, Liebert C, Gillma M. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 1574—1577.