

# 分子生物学技术在环境微生物监测中的应用

岳春梅 明镇寰

(浙江大学生命科学院 杭州 310012)

**关键词:** 分子生物学技术, 环境微生物, 监测

**中图分类号:** Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0215-04

随着环境生物学的发展, 对环境中复杂的混合微生物群落进行及时监测和准确鉴定变得越来越重要, 但是传统的研究方法因为检测速度慢、准确性差等缺点, 在某种程度上已经不适应于这方面的研究; 而以 PCR(polymerase chain reaction) 技术为主的一些分子生物学技术因具有快速、灵敏的特点, 正被越来越多的人所采用。目前, 这些分子生物学技术已能在 rDNA 测序和有关结构基因分析的基础上监测和定量复杂的混合微生物群落中的一些特殊的微生物, 而且其中许多技术都是在 PCR 扩增的基础上来检测混合微生物群落中原本含量很低的 DNA 序列。比如逆转录与 PCR 结合使用在 mRNA 丰度(mRNA abundance)基础上测定结构基因的表达; 用各种分离技术和限制酶切技术进一步检测 PCR 产物可确定微生物的多样性及群落的结

构等。从目前的发展趋势可以看出, 分子生物学技术正逐步取代某些传统的研究方法而被广泛地应用于环境生物技术。

## I 核酸杂交技术

在环境微生物监测中, 核酸杂交技术操作简单, 能灵敏地检测出环境微生物中特殊的核酸序列, 并且用光密度测定法直接比较核酸杂交所得到的阳性条带或斑点就能得出定量的结果, 是一种非常有用的技术。

Saylor 等人<sup>[1]</sup>用降解萘和甲苯的质粒 DNA 印迹杂交(blot hybridization)来监测环境中含有这两种质粒的微生物种群。试验以整个质粒作为探针, 进行菌落杂交, 可以从  $10^6$  个混杂的异源种群中检测出含有降解甲

---

收稿日期: 1999-01-04, 修回日期: 1999-04-29

苯的质粒的种群。结果表明质粒浓度和矿化率即萘降解率之间存在正相关,含有芳香族物质的培养基可以提高菌落中质粒的数量。Ogunseitan 等人<sup>[2]</sup>用 DNA 印迹法来检测接种在含有水杨酸盐的土壤中的降解萘的假单胞杆菌。水杨酸盐是萘降解途径中的一个中间物,也是萘操纵子的诱导物,所以用 DNA 印迹法测定土壤中细菌种群的基因型就能确定水杨酸盐对细菌种群降解萘的影响水平,从而间接测出假单胞杆菌在土壤中的分布情况及其降解萘的潜能。Fleming 等人<sup>[3]</sup>用 RNase 保护验证法 (ribonuclease protection assays) 对萘操纵子转录物进行定量测定。先使带有放射性标记的反义 RNA 在溶液中与提取出的样品 RNA 进行杂交,再向溶液中加入 RNase,降解未被杂交的转录物即除了萘操纵子以外的其他任何转录物,最后再对其 mRNA 进行定量测定。结果表明在被多环芳香烃污染的土壤中,萘操纵子的转录和萘矿化之间存在正相关。

此外,来自于被汞污染的新鲜水体中的微生物群落的汞还原酶基因可用狭线印迹杂交法 (slot-blot hybridization) 探测和定量。多氯联苯 (polychlorinated biphenyl PCB) 分解基因的斑点杂交可以测定出土壤微生物群落中降解 PCB 的微生物的存在情况。核酸杂交与传统的 MPN (most probable number) 法结合,用于研究对芳香族化合物有脱氯作用的微生物。有人用 MPN 法和菌落杂交连续监测接种了降解氯苯的产碱菌属菌株的流通潮实验生态系统中的微生物群落,发现用不同浓度的 3-氯苯处理时,分解 3-氯苯的种群的活性与体积之间存在相关性。

因为操作简单,在显微镜可探测到的细胞水平上,核酸杂交技术能有效地对环境中的微生物进行定量检测,在环境生物学中得到广泛应用。

## 2 PCR 及其相关技术

PCR 是一种体外扩增核酸序列从而得到多个核酸拷贝的技术。在环境检测中,被扩增的核酸序列往往存在于一个复杂的混合物如全细胞提取液中,且含量很低,难以用直接杂交技术检测。PCR 扩增产物可用琼脂糖凝胶电泳进行纯化和检验,对被扩增的序列作定性或定量研究;也可以对 PCR 产物进行克隆,用于转化或测序。

PCR 技术的形式多种多样。Fantroussi 等人<sup>[4]</sup>用嵌套式 PCR (nested PCR) 来监测未被污染的土壤淤泥实

验生态系中 3-氯苯脱氯细菌的外源基因的种类。在 PCR 的第一个循环中,用标准的 Tag 酶浓度 (0.4U / 50 $\mu$ L) 和非特异性引物扩增了 16S rDNA 的一个长度为 1199bp 的片段。在 PCR 的第二个循环中,用 0.04U / 50 $\mu$ L 的酶浓度和特异性引物,以第一个循环的产物为模板,扩增出 614bp 的中间片段,对微生物的外源基因作定性研究。这一技术可使 PCR 的灵敏度提高 1,000 倍。逆转录 PCR (reverse transcriptase-mediated PCR RT-PCR) 是由逆转录酶介导的、探测和定量个体结构基因表达的一种 PCR 技术。最近 Selvaratnam 等人<sup>[5]</sup>用编码苯酚单加氧酶的 *dmpN* 基因的 PCR 扩增来检测处理废水的分批式反应器中的降解酚的假单胞杆菌。在该研究中,RT-PCR 不仅能检测出微生物降解酚的能力,还能测量出 *dmpN* 基因的转录水平,从而确定该假单胞杆菌特殊的分解活性。研究结果表明在转录水平、酚浓度、通气阶段之间存在正相关。竞争性 PCR (competitive PCR) 是一种定量 PCR,通过向 PCR 反应体系中加入人工构建的带有突变的竞争模板,控制竞争模板的浓度来确定目的模板的浓度,对目的模板作定量研究。竞争性 PCR 曾被用来测定受多环芳香烃污染的沉降物中的编码儿茶酚 2,3-过氧化物酶的 *dmpB* 基因的浓度。对 PCR 扩增的 *dmpB* 基因片段进行人工改造,使其带有一个 40bp 大小的缺失,作为 PCR 扩增的竞争模板。因此,竞争模板的 PCR 产物就比目的模板的 PCR 产物短。用竞争性 PCR 对二者进行共扩增,通过与竞争模板的浓度进行比较,来定量沉降物中 *dmpB* 基因的浓度。

此外,PCR 技术还与其他方法结合应用于环境监测中。Chandler 等人<sup>[6]</sup>用 MPN / PCR 技术来估测被燃料污染的土壤中的萘过氧化物酶基因 *nahAc*、链烷单加氧酶基因 *alkB* 及 *dmpB* 的数量。在 PCR 扩增之前,先将 DNA 提取液连续稀释,通过与浓度已知的对照稀释梯度作比较,控制样品中基因的数目。PCR 技术与核酸杂交技术结合,用来进一步检测 PCR 扩增产物,核实被扩增的序列即目的序列。当用某种 DNA 聚合酶时,PCR 扩增产物的每一端都有一个多余的 A,在许多情况下,这能使 PCR 产物被容易地克隆到一个含 T 突出端的序列已有的载体上,而不需要对产物做进一步纯化或修饰。

在检测混合微生物群体方面,PCR 是一种很有用的技术。需要注意的是,在用 PCR 结果说明问题时必须

十分小心。因为在 PCR 扩增过程中,轻微的污染也能导致假阳性现象。在实际操作中,除了严格控制操作条件减少人为因素外,还应注重 PCR 反应条件的优化,尽量减少假阳性现象的出现。必要时还要重复 PCR 反应,核实已经得到的结果。

### 3 基于多态性的技术

现有几种不同的应用于微生物生态系研究的以多态性为基础的技术。一般情况下,这些技术与 PCR 结合使用,来分离和检测具有微小差别的含量很低的特殊 DNA 序列,为群落结构和含有某种关键基因的微生物的多样性提供重要信息。这些技术在分离和鉴定那些大小相同但核酸序列稍有差别的 PCR 扩增产物方面是很有用的。

有人将 PCR 技术和限制酶切技术结合使用,检测 *nahAc* 基因在自然沉降物中的存在情况。他们用限制酶酶切 *nahAc* 基因的 PCR 扩增产物,通过对酶切产物的分析,检测该基因的限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism)。Erb 等人<sup>[7]</sup>曾用 PCR 扩增从被 PCB 污染的沉降物中提取出的总 DNA 中的 2,3-二羟基联苯过氧化物酶基因 *bphC*,对 PCB 的 *bph* 降解途径中的 *bphC* 基因作进一步研究。试验用 *Rsa* I 对 PCR 扩增产物进行酶切,观察到了 *bphC* 基因的限制性片段长度多态性,这表明该沉降物中降解 PCB 的微生物群落具有生物多样性,而未受 PCB 污染的湖水的沉降物中 *bphC* 基因的数量则相当少。

此外,变性梯度凝胶电泳 (denaturing-gradient gel electrophoresis DGGE) 也可以分离 PCR 扩增产物。DGGE 的精密度很高,可以测定出扩增产物中单个碱基的替代,是检测环境微生物多样性的一种可靠方法。Ferris 等人<sup>[8]</sup>用 DGGE 分析 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物,来绘制一组微生物种群 16S rRNA 的基因图谱。16S rRNA 基因扩增产物的大小是基本上相同的,只是个别碱基存在差异,正是这些微小的差异使各种 16S rRNA 基因扩增产物的溶解特性不同。又因为变性梯度凝胶中变性物的浓度是呈线性梯度上升的,具有不同溶解特性的 16S rRNA 基因扩增产物在凝胶上迁移时,就会停止在特定的位置,形成分离的条带。这些条带可用 DNA 印迹杂交检测或被切除,确定它们的 DNA 顺序。因为每一条带都代表一个不同的微生物种群,仅分析条带就能得到有用的信息。

RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 技术也是应用比较广泛的一种以多态性为基础的技术。RAPD 是用某一特定基因的非特异性引物来扩增某些片段。RAPD 分析用于检测含有混合微生物种群的各种生物反应器中的微生物多样性。用 RAPD 分析所得到的基因组指纹图谱在比较一段时间内微生物种群的变化以及比较小试规模和中试规模的反应器方面是有用的,但还不足以用来估测群落的生物多样性。用 RAPD 分析检测实验室规模的油性淤泥培养料中的细菌菌群发现,用油脂淤泥改良过的培养料比未经改良的更适合于不同的微生物种群生长。

### 4 16S rDNA 测序

对 rDNA 进行直接测序是检测微生物群落的常用方法之一,rDNA 测序大大增强了人们检测和鉴定环境微生物的能力。一般是测 16S rDNA,也有人测过 23S rDNA,利用 PCR 技术使 16S rDNA 测序容易许多。来自于混合微生物种群的各种 16S rDNA 用 PCR 扩增之后,能很容易地被克隆到一个适合测序的载体上进行测序;当然也可以将微生物有机体从混合种群中分离出来,对 16S rDNA 直接测序。用这种方法可以鉴定出一个混合种群内的微生物,而无需经过培养。Vainio 等人<sup>[9]</sup>将从 516 种孤立的菌落中抽提出的 16S rDNA 进行测序。来检测活性淤泥中微生物种群的结构。16S rDNA 测序能准确判定菌落中的微生物有机体。

随着分子生物学的发展,越来越多分子生物学技术应用于环境生物学领域。除了已经提及的几种之外,还有荧光原位杂交 (fluorescent in situ hybridization FISH)、基因工程菌等。FISH 和荧光显微术、聚光激光扫描显微术结合使用,用于生物膜 (biofilm) 上的微生物的定位和活性检测。FISH 常以用荧光染色剂标记的 rDNA 作为探针,提供与菌落微生物相对应的功能方面的信息,这对检测一个生态系统是很重要的。一些作为分子标记的基因工程菌也应用到环境生物技术当中,主要用来监测投放到环境中的微生物的情况。此外,这些分子生物学技术可以结合使用,在系统发生基础上对混合培养物中的微生物进行快速的测定,从而为监测自然界和基因工程体系中的菌落结构和生物多样性提供重要的依据。所有这些分子生物学技术的共同特点是特异性,它们能快速灵敏地检测环境中微生物的结构基因并对其进行定量研究,从而能准确测定微生物

的活性。分子生物学技术在环境生物技术上的应用,使环境生物技术的理论和实践得到了提高,对环境生物技术的发展起到很大的推动作用。

### 参 考 文 献

- [1] Sayler G S, Sheilds M S, Tedford E T. Appl Environ Microbiol, 1985, 49:1295~1303.
- [2] Ogunseitian O A, Delgado I L, Tsai Y L, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1991, 57:2873~2879.
- [3] Fleming J T, Sanseverino J, Sayler G S. Environ Sci Technol, 1993, 7:1068~1074.

- [4] El Fantroussi S, Mahillon J, Naveau H *et al.* Appl Environ Microbiol, 1997, 63:806~811.
- [5] Selvaratnam S, Schoedel B A, Mcfarland B L *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 47:236~240.
- [6] Chandler D P, Brockman F J. Appl Biochem Biotechnol, 1996, 57 / 58:971~982.
- [7] Erb R W, Wagner Dobler I. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:4065~4073.
- [8] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:3922~3928.
- [9] Vainio E J, Moilanen A, Koivula T T. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48:73~79.