

发光细菌 *lux* 报告基因系统的评价及应用

茆灿泉 杨树德

(卫生部北京医院临床检验中心 北京 100730)

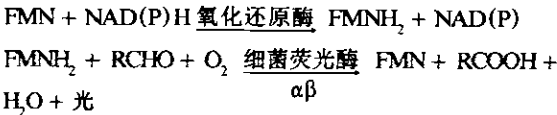
关键词: *lux*, 细菌荧光酶, 报告基因

中图分类号: Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0297-03

细菌生物发光基因 (*lux*) 的成功分离和表达极大地促进了其在应用和基础研究上的进展, 几乎所有的发光细菌可归于 3 个属 (发光杆菌属 (*Photobacterium*); 弧菌属 (*Vibrio*); 异短杆菌属 (*Xenorhabdus*)), *lux* 基因是编码和调控发光细菌生物发光的操纵子, 与其他报告基因相比, 具有快速、简便、灵敏和对细胞无伤害的优点, 在分子生物学、临床微生物、以及生化检测中呈现潜在应用价值。本文就 *lux* 报告基因系统的优缺点及其与常用的几个报告基因系统进行比较和评价, 并就 *lux* 报告基因系统在基因表达、细菌密度信号传导、细菌检测上的应用和研究进行综述。

1 细菌生物发光反应的启动及 *lux* 操纵子的组成

细菌生物发光反应由分子氧作用、胞内细菌荧光酶催化, 将还原态的黄素单核苷酸 (FMNH₂) 及长链脂肪酸 (如: 十烷醛) 氧化为 FMN 及长链脂肪酸, 同时释放出其最大发光强度在波长 λ 为 450~490nm 处的蓝绿光^[1]:



典型 *lux* 操纵子的必需结构基因排列如图:

转录方向→

基因: *luxC luxD luxA luxB luxE*

其中, *luxA*、*luxB* 分别编码细菌荧光酶的 α 和 β 亚单位, 共同组成具有强活性的异质二聚体细菌荧光酶; *luxC*、*luxD*、*luxE* 共同编码脂肪酸还原酶复合体, 产生长链脂肪酸。由于长链脂肪酸可体外提供, 故 *lux* 应用可采用两种方法: 在外加脂肪酸下插入和表达 *luxAB* 基因; 或利用整个 *lux* 操纵子, 在不加任何底物的条件

下发光^[2]。

2 *lux* 基因系统的优缺点与常用报告基因系统的比较和评价

2.1 *lux* 基因系统的优点 (1) 灵敏和线性范围宽: 在非常低的含量水平和非常宽的范围内 ($< 10^0 \sim 10^7$ pg 的荧光酶) 荧光酶含量与荧光强度 ($10^3 \sim 10^{12}$ 量子数 / s $\times 0.5$ 的荧光酶活性) 呈线性关系。(2) 快速、简便: 测定时间不到 1s 或仅需 1~3min。(3) 在非发光生物体中无本底荧光酶活性, 故非发光生物体发光本底等于零, 其检测限主要受仪器本底噪音 (暗电流) 和胶膜 (如果使用胶片照相) 灵敏度的限制, 故可有效筛选出发光菌落。(4) 价廉: 对于生物发光反应来说, 底物的费用 (FMNH₂, 脂肪酸) 是很低的。(5) 由于重复地使用脂肪酸对细胞一般是无害的, 故在体外、液体或自然生境中可长时间非伤害地监测细胞中基因的转录和表达。(6) 光不扩散也不在原位聚集, 基因表达可在菌落内进行高分辨率的空间定位^[3]。

2.2 *lux* 基因系统的缺点 (1) 在真核细胞中, 作为基因表达的载体需是在单个启动子控制下使用单顺反子的融合, 目前已构建了系列 *luxAB* 融合基因载体, 并已有在哺乳动物细胞中表达的报道^[4], 在真核细胞尤其哺乳动物细胞中表达的一个限制是其能否在高温下作为基因表达的有效报告基因, 尽管低温下其在真核细胞中也是非常有效的。(2) 在细胞中由于影响因素多, 故发光强度值的解释比细胞提取物中酶测定结果的分析要复杂得多。(3) 体内发光强度的变化不仅受功能性荧光酶数量的影响, 也受发光反应底物 (FMNH₂, O₂, 醛) 的有效性影响, 后者最终受到其他基因表达的影

响,因此与体外活性计量相比,表达产物相对不稳定,体内定量结果的获得比较困难,并且体内光强度变化的错误解释可能性也将会增高。

总之,不伤害细胞膜和不丢失细胞活性用于体内功能的直接定量和直观检测是 *lux* 基因被广泛感兴趣的一个主要原因,就目前而言,细菌 *lux* 系统仍主要用于原核细胞中表达。

2.3 *lux* 基因系统与其他报告基因系统的比较 目前常用的报告基因系统有 *luc* (萤火虫荧光酶)、*lacZ* (β -半乳糖苷酶) α -互补蓝/白菌落筛选系统、CAT (氯霉素乙酰转移酶)、NEO (新霉素磷酸转移酶)、GFP (绿色荧光蛋白),本处仅就前两个报告基因系统为例与 *lux* 基因系统作一比较。

2.3.1 *lux* 与 *luc* 系统: 除 *lux* 系统源于原核生物,而 *luc* 来源于真核萤火虫外,*lux* 使用的底物是可扩散性的脂肪醛,它对于细胞体内存在足够量 FMNH₂ 的体内基因表达分析特别有用,并且对于含整个 *lux* 操纵子的载体,其不需要任何底物;*luc* 使用的底物是荧光素,它不易进入细胞体内,并且 *in vivo* (体内) 试验表明,达到酶饱和和浓度的荧光素在一定程度上有毒性,但 *luc* 比 *lux* 具有相对高的效率(量子产率 *luc* > 0.8, 而 *lux* < 0.1), 并已在多种真核细胞和生物中表达和应用。

2.3.2 *lux* 与 *lacZ* 系统: *lacZ* 系统要求宿主细胞是 *lac*⁻ 菌,并且需含 IPTG 及 X-Gal 的指示培养板;*lux* 则不需要突变细胞株并可在多种菌中表达, *lux* 系统除抗生素抗性筛选外,不需要特殊的培养,并且 *lacZ* 系统不适用于大多数链霉菌,另外,新霉素抗性系统也有局限。

3 *lux* 报告基因系统的应用

3.1 基因表达的报告基因 作为报告基因, *lux* 报告基因系统已被广泛用于不同启动子下外源基因表达强度和转录调控的研究^[5],其最常用的方法是将启动子与 *lux* 基因相融合用于生化检测。此处仅就 *lux* 在对细胞无伤害及高灵敏、快速分析上举例, Burlage 等构建了以 NAH7 的上游启动子 P_{nah} 与费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*, V. f) 的 *lux* CDABE 基因相结合的融合子,可用于快速测定假单胞菌菌株 RB1351 生长培养物中 *lux* 基因在受禁影响后的基因表达情况,通过观察细菌发光从而监测 P_{nah} 的激活,作者认为该构建所产生的光强度对于通过光纤或液光管技术进行遥感是足够的,其为潜

在工业应用提供了基础^[6]。微生物发光作为基因表达标记的一个里程碑是 O' Kane 等利用光计数显微图像技术在单个活植物细胞中监测组成性的和 *nif* D 启动子调控的荧光酶的基因表达和发光定位,其在临床上的意义是可用于研究巨噬细胞对细菌的吞噬作用。*lux* 基因用于 G⁺ 细菌的报道较少,一个主要的原因是其在 G⁺ 菌中的发光比在 G⁻ 菌中弱 100 倍,但 Jacobs 等通过强的 G⁺ 启动子和将 *luxA* 与另一个经修剪的基因相连,获得了高效的荧光酶基因表达^[7],利用该融合 *luxAB* 技术可用于多种枯草杆菌的启动子研究。Gordon S. 等首次利用细菌荧光酶作为报告基因构建了 pSG10 分枝杆菌启动子探针穿梭载体,可用于监测分枝杆菌 (*smegmatis*) 乙酰胺酶基因启动子的诱导^[8]。Alan Schauer 等利用夏威夷弧菌 (*Vibrio harveyi*, V. h) 的 *luxAB* 基因测定一个由链霉菌 (*coelicolor*) 的 *sapA* 基因编码的 13 KD 的孢子相关多肽转录的时间分布和空间定位,通过核酸酶保护-杂交技术及发光检测,表明荧光酶合成与气生菌丝发生及 *sapA* 转录起始一致^[3]。*lux* 基因还可用于研究金黄色葡萄球菌的 *eta* 基因的表达,外皮溶血毒素 ETA 是葡萄球菌-烫伤皮肤综合症的主要影响因素, Scheehan 等将 *eta* 启动子与 V. f 的 *luxAB* 基因相融合,然后转化到伴随基因调控子 (accessory gene regulator, agr) 阳性 agr⁺ 及 agr⁻ 阴性的菌株中,结果表明,荧光酶活性在 agr⁺ 比 agr⁻ 要强得多。*lux* 反应也可通过耦联的方法用于检测其他报告基因和酶,如将 *lux* 与 G-6-P 脱氢酶相耦联可用作 DNA 探针, *lux* 的另一个应用领域是将 *luxAB* 用作 DNA 聚合酶扩增特异性的指示物,可为 DNA 聚合酶大量用于 PCR 反应提供一个快速比较其相对特异性的方法。

3.2 密度依赖的信号传导的报告基因 大多发光细菌是密度依赖性的(即达到一定的细菌浓度才能发光),呈现细菌生长与发光不同步的现象,这是由于需要自我诱导物达到一定水平之故。利用这一特性, Bainton 等 (1992) 构建了一个 *lux* 系统,将其 V. f 的 *lux* 启动子及 *lux* R 和 V. h 的 *luxAB* 基因相连,该系统只有在外加 KHL (N-(β -ketocaproyl) homo-serine lactone, KHL, N- β -酮己酰高丝氨酸内酯,一种自我诱导物) 及十烷醛的条件下才能发光。由于 *E. coli* K12 株不产生任何 V. f 的自我诱导物,当它导入自我诱导物传感质粒后,即可用于传感和监测外源性的自我诱导物,并且可用于快

速鉴定那些负责自我诱导物生成的 DNA 编码基因。

3.3 细菌检测的报告基因 Ulitzur 及 Kuhn 于 1986 年报道了一种全新的细菌检测方法, 将 *V. f* 编码 *lux* 的 9.6kb 大片段整合到 λ 噬菌体 Charon 30 载体中, 通过感染宿主细菌, 可在短至 30~50min 检测到尿液中至少 10 个 *E. coli* 数目, 若在牛奶中加入该重组噬菌体, 仅需短暂的培养, 即可检测牛奶中的细菌数^[9]。依此重组噬菌体技术, Stewart 等检测到低至 100 个肺炎沙门氏菌^[10]。尽管对于检测专一性的病原菌需要建立宿主专一性的重组噬菌体, 但这种技术为快速、方便的微生物检测提供了崭新的思想。最近 Matin J. Loessner 等利用该思想采用同源重组的方法将 *V. h* 的 *luxAB* 基因整合到单核细胞增多性李斯特菌的专一性噬菌体 A551 中, 构建了 A551::*luxAB* 重组噬菌体, 为食品污染和环境微生物提供了一种简单、快速和廉价的检测方法^[11]。该方法的好坏主要依赖于病毒或质粒载体对不同细菌菌株的特异性程度, 若一个载体特异性不高, *lux* 将很容易导入非目的菌株, 导致假阳性反应; 相反, 特异性太窄, 可能不易将 *lux* 基因导入目的株中, 从而出现阴性反应。

3.4 细胞活力的报告基因 任何物质和外部环境损伤细胞代谢都将可能影响细胞活力, 降低生物发光, 故 *lux* 基因可用于检测生物毒素、抗生素以及其他有毒物质, Moelders 等 (1990) 利用细菌对 Hg 的抗性是依赖于 Hg^{2+} 与 *merR*(Hg(汞)抑制基因) 基因产物的结合和表达激活的原理, 构建了由 *merR* 基因和 *luxAB* 基因融合的质粒载体, 建立了发光强度与 Hg 含量的关系, 该系统对 Hg 具绝对专一性, (其检测限可至 0.2ng/L), Ramanathan 等利用 *ArsR*(As(砷)调控基因) 对细菌荧光酶发光表达的影响是依赖于样品中亚砷酸盐和亚砷酸盐浓度的原理, 构建了 *ArsR* 与 *lux* 的重组质粒, 可检测到 10^{-5} mol/L 的盐浓度^[12]; 同样, Jacobs 等构建的生物发光嗜热链球菌可用于检测牛奶中的抗生素含量^[13]。利用 *luxAB* 作为报告基因和启动子探针的另一用途是可用于研究防腐剂对食物的效果, 目前采用的微生物分析方法在细菌计数前破坏了食物的原形, 不能得到

其空间分布的信息, 将 *lux* 基因重组指示菌整合到食物模型上从而测定各部分菌数或将指示菌涂布到食物各部分的表面, 通过光子图像仪则可检测防腐剂在食物模型上的浓度分布。

发光细菌 *lux* 基因系统作为一种新的报告基因系统具有广泛的应用前景(细菌生物钟现象的灵敏检测等), 将低光影像技术或 CCD 相机与 *lux* 系统相耦联以及构建更加稳定和在高温下 (37℃) 能高效表达融合 *luxAB* 基因系统, 必将使 *lux* 在原核和真核细胞及生物中的应用进入一个新的阶段。

参 考 文 献

- [1] Edward A M. *Microbiological Reviews*, 1991, 55: 123~142.
- [2] Phillip J H, Catherine E D R, Michael K W *et al.* *Biotechnol. Appl. Biochem*, 1993, 17:3~14.
- [3] Alan T S. *Trends in Biotechnology*, 1988, 23~27.
- [4] Mario P, Jerry H D, David O P *et al.* *Analytical Biochemistry*, 1992, 204:315~323.
- [5] Stewart G S A B, Williams P. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138:1289~1300.
- [6] Burlage R S, Larimer G S. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172:4749~4757.
- [7] Jacobs M, Hill P J, Stewart G S A B. *Molecular and General Genetics*, 1991, 230:251~256.
- [8] Gordon S, Parish T, Roberts I S *et al.* *Lett Appl Microbiol*, 1994, 19:336~340.
- [9] Ulitzur S, Kuhn J. in *Bioluminescence new perspectives*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1986, 463~472.
- [10] Stewart G S A B, Smith A J, Denyer S P. *Food Sci Technol Today*, 1989, 3:19~22.
- [11] Matin J L, Catherine E D R, Stewart G S A B. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 1133~1140.
- [12] Ramanathan S, shi W, Rosen B P *et al.* *Anal Chem*, 1997, 69:3380~3384.
- [13] Jacobs M F, Tynkynen S, Sibakov M. *Gene*, 1997, 186:197~200.