

报告基因技术及其在土壤质量监测中的应用

茆 婷^{1,2}, 何 伟³, 钟文辉^{2,*}, 林先贵¹, 董元华¹

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008;

2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097; 3. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要:报告基因包括 *lux*、*gfp*、*lacZ*、*inaZ*、*luc*、*cat*、*xylE* 及 *uidA* 等, 其中土壤质量监测中最常用的报告基因有 *lux*、*gfp*、*lacZ* 和 *inaZ* 4 种。从不同角度比较了土壤质量监测中最常用的上述 4 种报告基因, 简要阐述了应用于土壤质量监测中的微生物监测报告基因的定义、类别、性质及特点, 展示了报告基因表达系统的构建方法与检测方法, 总结了报告基因技术在监测土壤重金属、污染物质、营养物质等化学物质以及在土壤微生物及其活动、土壤根际微生物与土壤中原生动物、植物间的相互作用等方面的应用。讨论了目前报告基因技术应用的局限性及未来研究方向和重点。

关键词:报告基因技术; *lux*、*gfp*、*lacZ*、*inaZ*; 土壤质量监测; 土壤化学物质

文章编号: 1000-0933(2009)12-6733-08 中图分类号: Q143 文献标识码: A

Reporter gene technology and its application in the monitoring of soil quality

MAO Ting^{1,2}, HE Wei³, ZHONG Wen-Hui^{2,*}, LIN Xian-Gui¹, DONG Yuan-Hua¹

1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

2 College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

3 College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(12): 6733 ~ 6740.

Abstract: Reporter genes include *lux*, *gfp*, *lacZ*, *inaZ*, *luc*, *cat*, *xylE*, *uidA* and so on, in which *lux*, *gfp*, *lacZ* and *inaZ* genes are the commonly used ones in the monitoring of soil quality. This review firstly compares the above-mentioned four kinds of reporter genes generally used in the monitoring of soil quality from different perspectives, and describes the definition, classifications, characteristics and feature of these reporter genes. This review also reveals the construction of the reporter gene expression system and its detection method, and then summarizes the application of the reporter gene technology in the monitoring of heavy metals, pollutants, nutrients and other chemical compounds in soil, and microbes or their activities, the interactions between soil microbes and protozoan as well as plants in soil, and finally discusses the limitations of the reporter gene technology, and the direction of research and development in the future.

Key Words: Reporter gene technology; *lux*, *gfp*, *lacZ* and *inaZ*; Monitoring of the soil quality; Soil chemical compounds

报告基因是一种编码某种易于检测的蛋白质或酶的基因。把它的编码序列和基因表达调控序列相融合形成嵌合基因, 或与其它目的基因相融合, 在调控序列控制下进行表达, 通过它的表达产物可标定目的基因的表达调控。该技术的主要优点是高灵敏度, 可信性及检测方便且适合大规模检测, 已广泛应用于转基因及启动子分析、药物筛选、基因治疗等领域。随着技术和检测手段的进步, 该技术越来越多地应用在土壤研究中, 可用于描述土壤微生物原位活性、指示土壤污染和营养状况、监测土壤生态过程等^[1], 有的可以实现原位、在线监测。

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(kzcx2-yw-408); 土壤与农业可持续发展国家重点实验室基金资助项目(0751010017)

收稿日期: 2008-09-03; 修订日期: 2009-04-10

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

1 土壤微生物监测报告基因系统

1.1 报告基因的种类

在土壤微生物监测中最常用的报告基因有细菌荧光素酶基因 *luxCDABE*、*gfp*、*lacZ* 和 *inaZ* 等。

1.1.1 *luxCDABE*

lux 基因已从许多发光菌中克隆出来,其包括 5 个结构基因:*luxA*、*B*、*C*、*D*、*E*。在 *lux* 操纵子中其排列顺序为 *luxC*、*D*、*A*、*B*、*E*,其中 *luxA*、*B* 分别编码组成荧光脂酶的分子量为 40 KDa 和 37 KDa 的 2 条多肽链,*luxC*、*D*、*E* 分别编码还原酶、转移酶及合成酶,3 种酶聚合在一起组成脂肪酸还原酶复合物。此外,在 *luxC* 的上游还有 *luxI* 和 *luxR2* 个调控基因。整个 *lux* 基因含有 2 个从中间调节区开始向 2 个不同方向转录的左操纵子 (*luxR*) 和右操纵子 (*luxICDABE*)^[2]。*lux* 基因的组成具有种、属特异性。

luxAB 编码的荧光脂酶在长链脂肪醛、还原型黄素单核苷酸 (FMNH₂) 及 O₂ 存在时催化脂肪醛氧化,生成脂肪酸等产物的同时产生波长约 490nm 的蓝绿色生物光。*luxCDE* 编码的脂肪酸还原酶复合物将脂肪酸又还原成脂肪醛,构成一循环的反应体系^[2]。

1.1.2 *gfp* 基因

1992 年,Prashar 等首次从水母中克隆到编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的 *gfp* 基因^[3]。*gfp* 基因由 3 个外显子组成,分别编码 69、98 和 71 个氨基酸。由于水母 *gfp* 基因的无种属限制,已在多种生物体内转化成功并表达。

GFP 是一类存在于水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白,由 238 个氨基酸残基组成,分子量为 27 kDa。它是由 2 个相当规则的内含 1 个 α 螺旋和外面包围 11 个 β 折叠的 β 桶状结构组成的二聚体,桶状结构和位于其末端的短 α 螺旋以及环状结构一起组成 1 个单独的致密结构域。GFP 的生色团是由蛋白质内部第 65~67 位的丝氨酸、脱氢酪氨酸、甘氨酸自身环化和氧化形成的,用蓝紫光激发即能发出肉眼清晰可见的绿色荧光,无需任何底物或辅助因子^[3]。

1.1.3 *lacZ* 基因

lacZ 基因编码 β -半乳糖苷酶。在分子生物技术中 β -半乳糖苷酶被广泛用来监测和校正转染效率,其分析简单而且无需使用放射性同位素。在大多数环境下,即使细胞代谢活性较低,无需依赖氧和其他任何特殊生长因子, β -半乳糖苷酶即能产生。 β -半乳糖苷酶能催化一系列底物转化成极易检测的不同颜色的产物^[4]。一些经其催化转化的产物在氧化电极被氧化后,能产生可测量的电化学信号^[4]。*lacZ* 基因在土壤微生物监测中没有 *lux* 和 *gfp* 使用广泛,主要是由于 β -半乳糖苷酶的检测需要细胞的裂解且不能用于简单的单细胞检测。

1.1.4 *inaZ* 基因

inaZ 基因来自于丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*),编码激发冰核活性的冰核蛋白 InaZ,这种活性可通过检测 *inaZ* 的表达来测量。*inaZ* 作为报告基因已经被用来研究如以酰基高丝氨酸内酯介入的群体感应,植物根围的铁、蔗糖和色氨酸的可利用性^[5]。在菜豆晕斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) 中,*inaZ* 报告基因显示出至少比 *lacZ* 高 10 倍的灵敏性。因此,*inaZ* 融合系统给细菌基因表达的研究提供了一个灵敏、方便的工具。但由于不能实现单细胞和原位监测,*inaZ* 基因在土壤微生物监测中受到限制。

现将土壤质量监测中最常用的 4 种报告基因总结于表 1。除上述 4 类报告基因外,还有 *cat* (编码氯霉素乙酰转移酶)、*xylE* (编码邻苯二酚氧化酶) 和 *uidA* (编码 β -葡糖苷酸酶,又称 β -*gus* 报告系统) 等。*cat* 产物的检测需要依赖放射性化学物质,线性范围窄,灵敏性低。*xylE* 难以实现单细胞和实时原位监测。而 β -*gus* 需要加入底物 X-Gluc 才能进行转录表达,组织化学分析需要分裂细胞,而且一些根际原核生物和真菌中显示出一定水平的内源性 *gus* 活性。由于上述缺点和目前技术的限制,使得它们在土壤微生物监测中的应用还不成熟。随着检测技术的进步,荧光分析以其能够将细胞内报告基因的活性可视化和对细胞的非破坏性而越来越成为主流,因此 *lux* 和 *gfp* 这两类可发出荧光的报告基因成为众多报告基因中佼佼者。

表 1 土壤质量监测中最常用的报告基因

Table 1 The mostly used reporter genes in the monitoring of soil quality

报告基因 Reporter genes	<i>luxCDABE</i>	<i>gfp</i>	<i>lacZ</i>	<i>inaZ</i>
编码蛋白 Encoding protein	荧光素酶	绿色荧光蛋白	β-半乳糖苷酶	冰核蛋白
监测原理 Monitor principle	蓝绿光	荧光	显色反应或电化学反应	冷冻液滴数量
灵敏性 Sensitivity	极高	中等	极高	极高
氧的需求 Oxygen requirement	需要	需要	不需	不需
辅因子独立性 Co-factor independency	低	极高	极高	极高
在低代谢活性下的表达 Expression at low metabolic activity	低	中等	中等	中等
原位监测 In situ detection	中等	极高	不能实现	不能实现
单细胞监测 Single-cell detection	低	极高	低	不能实现
细胞破壁必要性 Cell disruption necessary	不需要	不需要	需要	不需要
成本 Cost	中等	低	极高	极高
外源物质 Extra matter	需要	不需要	半乳糖苷	不需要
同系列的报告基因 Reporter gene of the same series	<i>luxAB, lucFF, ruc</i>	<i>CFP, YFP, BFP, RFP, cobA</i>	—	<i>inaW, inaA</i>

1.2 报告基因表达系统的构建与检测

1.2.1 报告基因表达系统及其构建

用于土壤研究中的报告基因表达系统主要分为非特异性表达系统和特异性表达系统。

非特异性表达系统一般是把报告基因与适当的启动子构成嵌合基因,并克隆到质粒载体上,导入受体微生物细胞,只要微生物是活的和有代谢活性的,报告基因就能表达。细胞受到毒害作用时,表达产物信号减弱(图 1a)。这种表达系统通常用来评价污染物总的毒性^[6]。

特异性表达系统是将报告基因的编码区与位于其上游或下游的目的基因融合,并置于目的基因启动子的控制下,克隆到质粒载体上,转染入宿主微生物细胞内,环境中存在的特异性化学物质与调控蛋白相结合后产生诱导作用,导致报告基因表达(图 1 b)。可用来检测特异性化学物质^[7]。

1.2.2 报告基因的检测

不同的报告基因表达产物类型不同,检测方法也有所差异(表 2),包括生物光法、荧光法、比色法和电流检测法等。

表 2 土壤质量监测中最常用报告基因检测方法

Table 2 Detection methods for reporter genes mostly used in the monitoring of soil quality

报告基因 Reporter gene	检测方法 Detection method				其它 Others
	光学检测法 Optic detection method			电 流 检 测 法 Current detection method	
	生物光法 Bioluminescence method	荧光法 Fluorescence method	比色法 Colorimetry		
<i>lux</i>	√	√			
<i>gfp</i>		√			
<i>lacZ</i>		√	√	√	
<i>inaZ</i>					√

生物光法是指使用生物发光测定仪、液闪仪、冷光仪、分光光度计及高级照相机等设备检测荧光素酶报告基因系列编码的荧光酶氧化底物过程中形成的光,可用于 *lux* 基因表达的检测^[8,9];荧光法是指使用紫外灯、荧光显微镜、荧光激光共聚焦扫描仪、细胞流量计及荧光激活的细胞分选仪等荧光检测设备检测经紫外线照射后发出的荧光,可用于 *gfp* 等基因表达的检测^[6,10];比色法可用于 *lacZ* 表达的检测,该法基于显色反应,以可见光作光源,使用光电比色计通过比较或测量有色物质溶液颜色深度来确定待测组分的含量^[10]。电流检

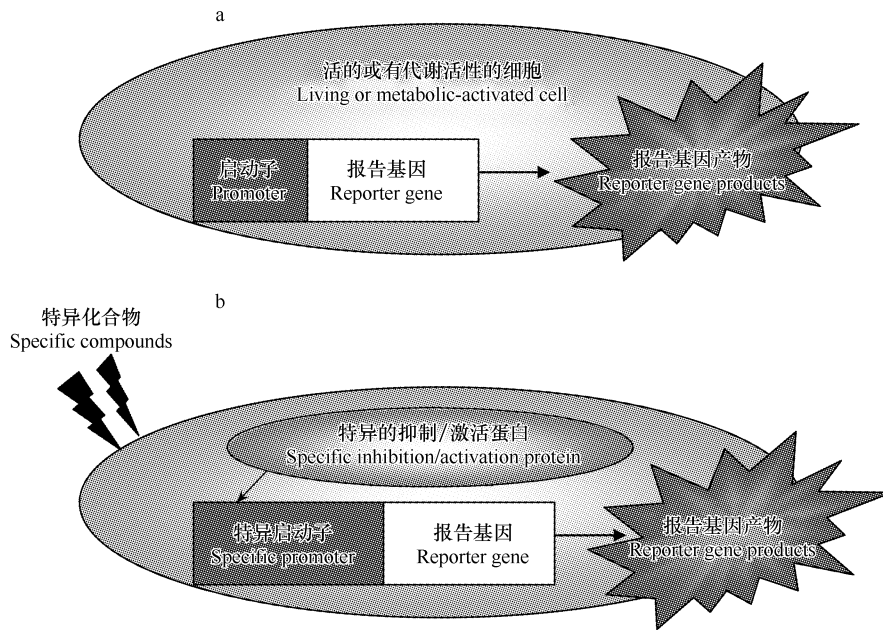


图1 在土壤研究中应用的两种报告基因表达系统

Fig. 1 The two expression systems of reporter gene used in soil study

(a)非特异性表达系统 the non-specific expression system, (b)特异性表达系统 the specific expression system

测法以电化学反应为基础,利用电流计检测底物经催化转化的产物在电极处发生氧化反应产生的电流,也可用于 *lacZ* 表达的检测^[4, 10]。此外,还可使用 β -半乳糖苷酶特殊荧光抗体,通过细胞流量计分析土壤细胞中 *lacZ* 基因的表达^[11]。对于 *inaZ* 表达的检测,由于该基因表达时能产生具有高冰核活性的蛋白,进入细菌外膜,使细胞能够在相对暖和的温度结冰,因此通常用冷冻液滴的数量来检测 *inaZ* 的表达水平^[5]。

报告基因可方便地实现原位 (*in situ*) 监测和在线 (*on line*) 监测。土壤微生物学研究的目的是描述土壤微生物原位活性,用传统分析法较难达到此目的。原位监测是对被测物在真实环境中的综合观察和分析,不需要将生物传感器细菌从土壤或根部分离出来。实行原位监测时,通常先将生物传感器细菌接种于土壤中,经过几小时至几星期后,采取土壤样品,使用高级照相机或显微镜观察报告基因表达的细胞。如为了报告大麦根围的磷酸盐限制,Kragelund 等^[12]将 *luxAB* 标记的荧光假单胞菌接入贫瘠土壤中大麦根部,然后将根部暴露于乙醛蒸气中,使用光子照相机可观察到根部发出亮光,但随后加入磷酸盐缓冲液后,发光受到抑制。整个过程无需将细菌从根部分离,使用高级照相机检测器甚至可以检测来自单细胞的光。

在线监测是对生物传感器细菌正在发生变化的连续的动态观察和分析,强调实时性和连续性。实行在线监测时,通常将藻酸盐固定化的生物传感器细胞制成探针,并将其固定在流动光导纤维上,探针尖端通过高压液相色谱泵分别与土壤样品自动进样系统、废物排出系统、介质维持系统连接,另一端与光电倍增管、数显记录仪和电脑连接,实时传输监测结果。Heitzer 等^[13]将包含 *NahG2-luxCDABE* 的质粒 pUTK21 导入荧光假单胞菌 HK44,并将该工程菌固定在光纤上制成传感器对萘及其分解产物进行在线监测,发现生物报告质粒 pUTK21 的发光量与萘的含量有很好的对应关系。

2 微生物监测报告基因系统在土壤质量监测中的应用

2.1 监测土壤中的化学物质

利用报告基因构建的非特异性和特异性的生物传感器,可以有效地监测土壤中某些化学物质(表3)。

2.1.1 监测土壤中重金属

基于报告基因 *lux* 和 *gfp* 的光学微生物传感器已被广泛应用于监测土壤中重金属,如 $\text{Hg}^{[15]}$ 、 $\text{Ni}^{[16]}$ 、 $\text{Cu}^{[17]}$ 、 $\text{Fe}^{[18]}$ 、 $\text{Sb}^{[19]}$ 、 $\text{Zn}^{[20]}$ 、 $\text{Pb}^{[21]}$ 等。其中对 Hg 检测研究最多也最为透彻。

表 3 报告基因监测的土壤中化学物质^[14]

Table 3 The chemical compounds monitored by the reporter genes in soil^[14]

	感应的化合物或状态 Compound or condition sensed	报告基因(非特异性) 或基因融合体(特异性) Reporter gene(non-specific) or gene fusion(specific)	环境 Environment	宿主菌 Host strain
非特异性 Non-specific	Zn	<i>luxCDABE</i>	土壤孔隙水	大肠杆菌, 荧光假单胞菌
	Cu	<i>luxCDABE</i>	土壤孔隙水	大肠杆菌, 荧光假单胞菌
	2,4-二氯酚	<i>luxCDABE</i>	土壤提取物	大肠杆菌
	烷基苯磺酸盐	<i>luxAB</i>	土壤泥浆及提取物	亚硝化单胞菌
	苯的相关化合物	<i>luxCDABE</i>	沉淀提取物	荧光假单胞菌
	多环芳烃毒性	<i>luxCDABE</i>	土壤提取物	大肠杆菌
	污染物胁迫	<i>luxCDABE</i>	根茎提取物	荧光假单胞菌
	CPC, TPC, PCP	<i>luxCDABE</i>	土壤提取物	大肠杆菌, 荧光假单胞菌
	C	<i>luxCDABE</i>	土壤提取物	荧光假单胞菌
	新陈代谢活性	<i>luxAB</i>	土壤(原位)	荧光假单胞菌
特异性 Specific	镉	<i>Pars-luxAB</i>	土壤提取物	大肠杆菌
	Ni	<i>cnrYXH::luxCDABE</i>	土壤提取物	富营养产碱菌
	Cd	<i>Pantz-lacZ</i>	土壤(原位)	大肠杆菌
	Cu	<i>cop::luxAB</i>	土壤提取物	荧光假单胞菌
	Fe	<i>Ppvd-gfp</i>	根际(原位)	丁香假单胞菌
	Hg	<i>PmerTPCAD-luxCDABE</i>	土壤提取物	大肠杆菌
	甲苯	<i>PtbuA1-gfp</i>	土壤及根际(原位)	荧光假单胞菌
	多氯联苯	<i>Pm::gfp</i>	根际(原位)	荧光假单胞菌
	4-氯酚	<i>bphA::lacZ</i>	根际(原位)	荧光假单胞菌
	萘和水杨酸	<i>nahG::luxCDABE</i>	土壤提取物	荧光假单胞菌
	C	<i>Pfic-lacZ</i>	土壤(原位)	荧光假单胞菌
	N 和 P	<i>Tn5-luxAB PP2-luxAB</i>	土壤提取物	荧光假单胞菌
	阿拉伯糖	<i>P_{BAD}-gfp</i>	土壤和根际(原位)	阴沟肠杆菌
	半乳糖苷	<i>PmelA-gfp</i>	根际(原位)	苜蓿根瘤菌
	N-酰基高丝氨酸内酯	<i>PhuI-gfp</i>	土壤(原位)	大肠杆菌
	蔗糖和色氨酸	<i>PscrY-inaZ, aat::inaZ</i>	根际(原位)	草生欧文菌
	赖氨酸	<i>davT::luxCDABE</i>	根际(原位)	恶臭假单胞菌
	土霉素	<i>Ptet-gfp</i>	土壤(原位)	大肠杆菌

汞的抗性操作子 *mer* 由两部分组成,两部分各有一个交叉且表达方向相反的启动子,启动子上所连接的分别是调控基因 *merR* 和结构基因 *merTPCAD*,当二价汞存在时 *merTPCAD* 的活性将会被抑制,而 *merR* 上的启动子将会被激活而进行表达^[9]。基于上述原理, Selifonova 等^[9] 从 Tn21 中切下 *merRo/pT* 片段 pWR2, 插入质粒 pUCD615 中 *luxCDABE* 的右方构成重组质粒 pRB28,当 Hg²⁺ 结合到调控蛋白 MerR 上时,激活 *merR* 前端启动子,引起 *lux* 报告基因的转录,在底物作用下发出亮光(图 2),成功地用于定性定量监测 Hg²⁺。 Rasmussen 等^[15] 在此基础上,对 pRB28 略加改造,构建出同基因型的 pRB27,转染大肠杆菌 HMS174 中,以丙酮酸和磷酸盐为介质,在闪烁计数瓶中加入待测样品及生物传感器细胞,使用 Tri-Carb 2500 TR 闪烁计数器中的单光子计数模型记录发光情况,最后计算出土壤中可利用的汞离子浓度。

此外,也有人构建了包含重金属诱导启动子-*lacZ* 融合体的电流细菌传感器来监测土壤中的重金属,已成

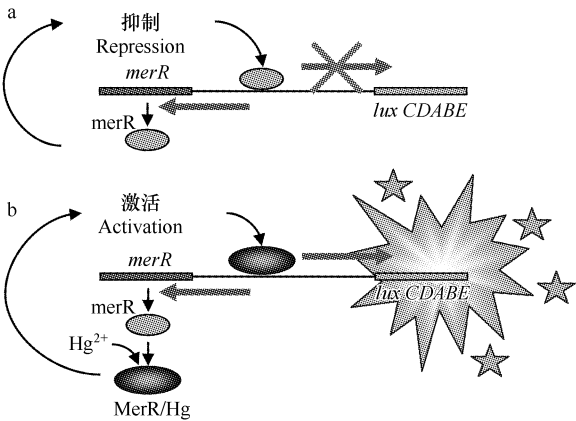


图 2 Hg 诱导下 *lux* 基因的特异性表达
Fig. 2 The specific expression of *lux* by mercury induction
merR, *luxCDABE* 为基因, MerR 为蛋白, MerR/Hg 为 Hg²⁺ 与 MerR 蛋白结合成的螯合物

功实现了 Cd 的原位和在线监测^[4]。

2.1.2 监测土壤中的有机污染物质

目前,利用报告基因构建的生物传感器可用来定性监测土壤中的氯酚类^[10]、PCB^[22]、PAH^[23]、甲苯及相关化合物^[24]等污染物。

为了研究不同报告基因在全细胞细菌传感器中的差异以选择最合适的报告基因,Li 等^[24]在相同的基因构建方式和培养条件下,分别构建了由 *gfp* 和 *lux* 组成的甲苯细菌生物传感器,比较了 2 种生物传感器对目标化合物的灵敏性及特异性。他们首先将恶臭假单胞菌(*P. putida*) TOL 质粒上的启动子 Pu、转录激活子 *xylR* 及 *xylR* 的启动子 Pr 分别克隆到包含 GFP 的质粒 pPROBE-NT 和包含 *luxCDABE* 的质粒 pUCD615 上,构造出监测甲苯的生物传感器质粒 pTOLGFP 和 pTOLLUX,随后分别转入大肠杆菌 DH5 α 细胞中。在 96 微孔板中的 LB 培养基中加入重组 DH5 α 细胞及甲苯等诱导物,重组细胞的 XYIR 蛋白与甲苯及相关化合物结合后,激活启动子 Pu,导致 *gfp* 或 *lux* 表达,将微孔板置于微孔冷光仪或微孔荧光仪上,一定时间间隔内测定发出的生物光和荧光。通过比较 2 种报告基因对多种芳香族化合物的感应强度、诱导时间的差异,特别是对不同浓度甲苯的响应,得出结论:*lux* 生物传感器更适合于快速灵敏地检测甲苯及相关化合物,而 *gfp* 生物传感器更可利用于长时间暴露和累积信号的检测。

其它有机污染物的监测原理与此类似,通过检测重组质粒中发光报告基因产生的各种类型的光来监测有机污染物。

2.1.3 监测土壤中的营养物质

目前,报告基因已成功监测土壤中的 C^[11]、N^[12]、P^[12]、蔗糖和氨基酸^[5]等营养物质。

为了研究蔗糖和色氨酸在土壤根际周围的时空分布,Jaeger 等^[5]利用报告基因 *inaZ* 构建了分别能够对蔗糖和色氨酸作出响应的生物传感器 299R-suc(含融合体 *scrY::inaZ*) 和 299R-tryp(含融合体 *aatI::inaZ*)。实验中将试验植株置于模拟微观世界的生长槽中,给予适当的温度和光照,当生长到顶峰期时,将生物传感器细菌悬液喷洒在土壤表面,置于槽中继续生长。24h 后,将整个根部从土壤正面切离,制备土壤悬液,连续稀释后,取适量样品稀释液置于涂有石蜡的铝箔片上,此铝箔片漂浮在 -7℃ 酒精浴中,根据 5min 内冷冻液滴数计算原样品中的冰核。结果显示,在根际周围检测到的色氨酸和蔗糖空间分布存在很大差异。色氨酸明显地聚集在距根尖 12~16cm 的根部土壤,而蔗糖则大部分富集在根尖土壤中。

将发光报告基因与各种营养物质的启动子及调控基因融合,加入合适的底物,经过不同诱导时间,记录报告基因的发光情况,是监测土壤中营养物质的另一常用方法。近年来,Standing 等^[25]进一步研究,利用 *lux* 标记的荧光假单胞菌首次构建出同时报告土壤中 C、N、P 的三重报告基因系统,该系统结合化学分析法定量描述了 C、N、P 的流动状况,为根部营养动力学研究提供了多维空间的调查,并为营养物质的原位实时监测奠定了基础。

2.2 监测土壤环境中的生态过程

2.2.1 监测土壤环境中的微生物及其活动

将发光报告基因导入基因工程微生物中,可对微生物在环境中的生长、活性、分布等进行实时在线监测。

luxAB 标记的生物光需要细胞代谢提供能量,因此,其生物光量与细胞的代谢活性直接相关,而 *gfp* 荧光没有能量需求。基于这一差异,Unge 等^[26]结合这 2 种生物标记的双重标记系统来同时监测被标记细胞群体的总的细胞数量和代谢活性。他们将质粒 pIC19Hgfp 上的 *gfp* 连同启动子 *PpsbA* 切下,插入 pUC18Not 中构建重组质粒 pAU102,还将质粒 pSB230 上 *luxAB* 酶切插入 pBluescriptSK(-) 中构建重组质粒 pAU103,然后将 pAU103 中的 *luxAB* 切下并插入到 pAU102 构建重组质粒 pAU104,之后将 pAU104 上包含 *PpsbA-gfp-luxAB* 片段切下并插入 pUT 中,最终构建了包含 *PpsbA-gfp-luxAB* 联合体的微转座子 pUTgflux。经电穿孔,将其转入大肠杆菌 DH5a 和荧光假单胞菌 SBW25 中。在特定的时间间隔内,密度梯度离心,提取出土壤细菌样品,加入含 0.5% 葵醛的酒精为底物,室温培养 4min 后,用分光光度计检测荧光素酶活性。而 *gfp* 荧光菌落在蓝灯下

可直接观察,最后经过配有氩离子激发器激发光源的流式细胞器计算荧光细胞数目。结果显示,对数生长期期间,荧光素酶活性与 *gfp* 荧光细胞及培养的细胞数目成正比。一旦进入稳定期,由于菌群的细胞代谢活性降低,导致荧光素酶活性的下降,但 *gfp* 荧光细胞的数目保持相对稳定。

2.2.2 研究土壤根际微生物-植物相互作用

报告基因监测系统为研究土壤微生物与植物的相互作用提供了一种便利的监测手段。Pistorio 等^[27]用 BamHI 将携带草木樨中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)染色体部分序列的基本载体 pMP10 酶切,然后与从载体 pHP456-Tc 上用 SmaI 酶切下的携带 Tc^r基因的 DNA 片段连接,产生新的质粒 pMP5。接着将 pGreenTIR 上的 *gfp*-P64L/S65T 片段连接到经 EcoRI 酶切的 pMP5 载体上,构建成新的整合载体 pMP6。经过结合转化,中华根瘤菌染色体上的质粒 pMP6 由大肠杆菌 S17-1 转移到中华根瘤菌 2011 中。最后将细菌悬液接种到经处理的紫花苜蓿秧苗初生根上,一定温度下光照培养 16h 后,在荧光和相位差显微镜下,通过 *gfp* 在强启动子 *npt II* 控制下的连续显型表达,即可观察到根瘤菌在根部的动态变化的各个阶段(包括根部菌落的繁殖,侵染线的形成,根瘤的发展等)。

2.2.3 研究土壤中细菌与原生动物的作用

原生动物的摄食是影响土壤中细菌生存的重要因素,但直接观察原生动物对特定细菌的捕食作用是很困难的。利用 *gfp* 标记细菌可以实时跟踪细菌的去向,估计原生动物对细菌的瞬时捕食速率。Leung 等^[28]利用微转座子 Tn-5*gfp* 将 *gfp* 插入可降解 PNP 的莫氏杆菌(*Moraxella* sp.)的染色体中,获得能够发光的菌株 G21,其激发和发射波长分别为 488 和 507nm。将原生动物嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)接种到 G21 细胞悬液中,22℃ 培养一定时间后,在落散荧光显微镜下可直接观察到捕食过程及嗜热四膜虫液泡内单个 G21 荧光细胞。结果显示,大多数 G21 细菌在嗜热四膜虫中发生胞溶作用,*gfp* 释放出来在原生物动物体内形成明亮的荧光空泡。

2.2.4 追踪微生物对土壤的修复

微生物在污染土壤修复中起重要作用,但对微生物如何转移集中到污染的位置对污染物进行降解以及微生物移动的控制因素如土壤空隙率、土壤中的矿物质、土壤颗粒的大小等了解甚少。*gfp* 分子标记技术可以很好地解决这些问题。Burlage 等^[29]用 *gfp* 标记恶臭假单胞菌细胞,通过荧光分光光度计追踪细胞在土壤微生物生态系统中的行为,结果表明该方法能精确地对细菌进行定位追踪,从而方便揭示微生物在土壤修复中如何转移和发挥降解作用。

3 结语

报告基因技术为土壤质量的监测提供了有力的工具,但是也应该看到该技术有其特定的缺点和不足。报告基因是通过构建质粒后转入受体菌株的,质粒在细菌的遗传过程,特别在复杂的土壤环境中容易丢失,因而系统的稳定性难以保证。另外,污染物的定量检测尚处于实验室的模拟研究阶段,还没有相关野外原位、在线研究的报道。如何建立一种遗传稳定、检测灵敏、功能多样、适合高通量筛选并能在各种生物系统中表达的报告基因技术将是我们面临的一大挑战。

目前,国内有用 *gfp* 标记甲基对硫磷降解菌 DLLBR 来研究其在青菜及根际土壤定殖的报道^[30],有用 *luxAB* 标记的重组大豆根瘤菌在土壤缩影中的存活研究^[31]及用 *gfp* 检测土壤中 Cu²⁺ 对饭豆根瘤菌生物毒性的研究^[32]等,但绝大部分仅局限于将报告基因作为标记物,非特异性地监测基因工程菌在土壤中的行为,如何利用报告基因特异性地监测土壤中特定的污染物,同时改进影像技术,使报告基因信号最大化,将成为国内今后研究的重点。总之,报告基因技术在实际应用中的不断完善和优化,必将为土壤质量的监测提供更为广阔的应用前景。

References:

- [1] Naylor L H. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(5): 749—757.
- [2] Elasmir M O, Miller R V A. *Pseudomonas aeruginosa* biosensor responds to exposure to ultraviolet radiation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50: 455—458.

- [3] Yang F, Moss L G, Phillips G N. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotech*, 1996, 14: 1246 — 1251.
- [4] Biran I, Babai R, Levkov K, *et al.* On line and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium. *Environ Microbiol*, 2000, 2: 285 — 290.
- [5] Jaeger C H, Lindow S E, Miller W, *et al.* Mapping of sugar and aminoacid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 2685 — 2690.
- [6] Dalzell D J B, Alte S, Aspichueta E, *et al.* A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere*, 2002, 47: 535 — 545.
- [7] Daunert S, Barrett G, Feliciano J S, *et al.* Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chem Rev*, 2000, 100: 2705 — 2738.
- [8] Tauriainen S, Virta M, Chang W, Karp M. Measurement of firefly luciferase reporter gene activity from cells and lysates using *Escherichia coli* arsenite and mercury sensors. *Anal Biochem*, 1999, 272: 191 — 198.
- [9] Selifonova O, Burlage R, Barkay T. Bioluminescent Sensors for Detection of Bioavailable Hg(II) in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 3083 — 3090.
- [10] Lei Y, Chen W, Mulchandani A. Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 568: 205 — 208.
- [11] Koch B, Worm J, Jensen L E, *et al.* Carbon limitation induces sigma(S)-dependent gene expression in *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3363 — 3370.
- [12] Kragelund L, Christofferson B, Nybroe O, *et al.* Isolation of *lux* reporter fusions in *Pseudomonas fluorescens* DF57 inducible by nitrogen or phosphorus starvation. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 17: 95 — 106.
- [13] Heitzer A, Malachowsky K, Thonnard J, *et al.* Optical biosensor for environment on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(5): 1487 — 1494.
- [14] Burmølle M, Hansen L H, *et al.* Reporter Gene Technology in Soil Ecology; Detection of Bioavailability and Microbial Interactions. In: Nannipieri P, Smalla K eds. *Soil Biology*. Berlin: Springer-Verlag Press, 2006. 405 — 407.
- [15] Rasmussen L D, Sørensen S J, Turner R R, *et al.* Application of a *mer-lux* biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biol Biochem*, 2000, 32: 639 — 646.
- [16] Tibazarwa C, Corbisier P, Mench M, *et al.* A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environ Pollut*, 2001, 113: 19 — 26.
- [17] Perkiomäki J, Tom-Petersen A, Nybroe O, *et al.* Boreal forest microbial community after long-term field exposure to acid and metal pollution and its potential remediation by using wood ash. *Soil Biol Biochem*, 2003, 35: 1517 — 1526.
- [18] Joyner D C, Lindow S E. Heterogeneity of iron bioavailability on plants assessed with a whole-cell GFP-based bacterial biosensor. *Microbiology*, 2000, 146: 2435 — 2445.
- [19] Flynn H C, Meharg A A, Bowyer P K, *et al.* Antimony bioavailability in mine soils. *Environ Pollut*, 2003, 124: 93 — 100.
- [20] Chaudri A M, Knight B P, Barbosa-Jefferson V L, *et al.* Detection of acute Zn toxicity in pore water from soils previously treated with sewage sludge using bioluminescence assays. *Environ Sci Technol*, 1999, 33: 1880 — 1885.
- [21] Rensing C, Sun Y, Mitra B, *et al.* Pb(II)-translocating P-type ATPases. *Biol Chem*, 1998, 273: 32614 — 32617.
- [22] Boldt T S, Sørensen J, Karlson U, *et al.* Combined use of different *gfp* reporters for monitoring single-cell activities of a genetically modified PCB degrader in the rhizosphere of alfalfa. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 48: 139 — 148.
- [23] Gu M B, Chang S T. Soil biosensor for the detection of PAH toxicity using an immobilized recombinant bacterium and a biosurfactant. *Biosensors & Bioelectronics*, 2001, 16: 667 — 674.
- [24] Li Y F, Li F Y, Ho C L, *et al.* Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. *Environmental Pollution*, 2007, 1 — 7.
- [25] Standing D, Meharg A A, Killham K. A tripartite microbial reporter gene system for real-time assays of soil nutrient status. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 220: 35 — 39.
- [26] Unge A, Tombolini R, Mølbak L, *et al.* Simultaneous Monitoring of Cell Number and Metabolic Activity of Specific Bacterial Populations with a Dual *gfp-luxAB* Marker System. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 813 — 821.
- [27] Pistorio M, Balague L J, DelPapa M F, *et al.* Construction of a *Siborhizo biummeliloti* strain carrying a stable and non-transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP2P64L/S65T. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 214: 165 — 170.
- [28] Leung K T, So J S, Kostrzynska M, *et al.* Using a green fluorescent protein gene-labeled p-nitrophenol degrading *Moraxella* strain to examine the protective effect of alginate encapsulation against protozoan grazing. *Microbiol Methods*, 2000, 39: 205 — 211.
- [29] Burlage R S, Yang Z K, Mehlhorn T. A transposon for green fluorescence protein transcriptional fusions: Application for bacterial transport experiments. *Gene*, 1996, 173: 53 — 58.
- [30] Qiu S L, Cui Z L, Wang Y, *et al.* Colonization of methylparathion-degrading bacterium *Pseudomonas putida* DLLBR in soil and inside vegetable. *Soil*, 2005, 37(1): 100 — 104.
- [31] Li Y G, Zhou J C. Study on population survival of two recombinant soybean rhizobia marked with *luxAB* gene in soil microcosm. *Soil Transaction*, 2003, 40(4): 613 — 617.
- [32] Shao J H, He S J, Wang P, *et al.* Biototoxicity analysis of Cu²⁺ stress on rhizobia rice bean in soil by using *gfp* as report gene. *Huazhong Agricultural University Transaction*, 2004, 23(3): 307 — 310.

参考文献:

- [30] 邱珊莲, 崔中利, 王英, 等. 甲基对硫磷降解菌 DLLBR 在青菜及根际土壤中的定殖研究. *土壤*, 2005, 37(1): 100 ~ 104.
- [31] 李友国, 周俊初. 两株发光酶基因标记的重组大豆根瘤菌在土壤缩影中的存活研究. *土壤学报*, 2003, 40(4): 613 ~ 617.
- [32] 邵继海, 何邵江, 王平, 等. 用 *gfp* 报告基因检测土壤中 Cu²⁺ 对饭豆根瘤菌生物毒性的研究. *华中农业大学学报*, 2004, 23(3): 307 ~ 310.