



环境生物技术丛书



环境中的分子生物学 诊断技术

王爱杰 任南琪 等编著



化学工业出版社
环境科学与工程出版中心





环境生物技术丛书



环境中的分子生物学 诊断技术

王爱杰 任南琪 等编著



化学工业出版社

环境科学与工程出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

环境中的分子生物学诊断技术/王爱杰, 任南琪等编著. —北京: 化学工业出版社, 2004. 3

(环境生物技术丛书)

ISBN 7-5025-5263-4

I. 环… II. ①王…②任… III. 环境生物学: 分子生物学 IV. X17

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 019017 号

环境生物技术丛书

环境中的分子生物学诊断技术

王爱杰 任南琪 等编著

责任编辑: 管德存 陈 丽 邹 宁

文字编辑: 孔 明

责任校对: 凌亚男

封面设计: 蒋艳君

*

化学工业出版社 出版发行
环境科学与工程出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市海波装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 25¼ 字数 606 千字

2004 年 3 月第 1 版 2004 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5263-4/X · 394

定 价: 56.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序

近 20 年来, 由于生物技术与环境科学、环境工程等学科不断交叉并紧密地结合, 产生了一门新兴的边缘学科——环境生物技术。目前, 环境生物技术已经在水污染控制、大气污染治理、有毒有害物质降解、清洁可再生能源开发、废物处置与资源化、环境监测、环境友好材料合成、生态环境修复和清洁生产等领域发挥着极为重要的作用, 已经成为解决复杂环境问题的最有效、最经济的手段之一, 而且很多新技术和新方法如雨后春笋般不断涌现。但是, 就环境生物技术的指导性和实践性而言, 目前还没有一套较为系统的丛书从理论到方法、从技术到应用阐述环境生物技术不同层次的研究成果。

哈尔滨工业大学环境科学与工程系环境生物技术学科部, 长期从事环境生物技术研究, 在高浓度有机废水生物处理新技术新工艺、发酵法生物制氢技术、复合型微生物制剂开发、秸秆等生物质资源化与能源化技术等研究领域取得了一系列令人瞩目的创新性成果, 仅近 5 年, 他们就获国家科技进步奖 2 项, 省部级科技进步奖 3 项, 尤其是有机废水发酵法生物制氢技术, 被 485 位两院院士评为“2000 年中国十大科技进展新闻”之一。此套丛书是他们总结提炼多年的研究成果, 并结合国内外该领域的最新研究进展编写而成。作为此创新集体的荣誉教授, 我十分关注他们的研究发展动态, 更为他们取得的喜人成果而骄傲, 于是欣然接受为该套丛书写序的邀请。

本套丛书从基础理论、工程设计、应用与发展前景等角度, 对目前的环境生物技术进行了总体描述, 并着眼于介绍环境生物制剂、环境中的分子生物学技术、环境污染与修复、废物资源化与能源化等生物技术领域的理论和应用成果。《厌氧生物技术原理与应用》总结凝炼了十几年来在废水(物)发酵法生物制氢技术、厌氧生物处理技术等领域具有自主知识产权的创新性研究成果, 深入浅出地介绍了相关理论, 并突出描述了研究成果的应用情况。《环境中的分子生物学诊断技术》围绕着分子生物学诊断技术的原理和它在环境污染治理及环境监测中的应用实例, 着重阐述了环境污染物和致病微生物的快速鉴别和检测; 特定环境中微生物的多样性、微生物群落结构和群落动态的监测; 环境微生物功能基因定位和原位表达等内容。《环境生物制剂的开发与应用》在多年的研究成果基础上, 综合近 10 年的国内外资料, 系统地阐述了生物制剂研究开发的方法、应用领域、安全性评价以及如何才能实现商品化, 内容包括微生物絮凝剂、生物添加剂、工程菌的构建、微生物肥料、微生物饲料、生物表面活性剂、固定化生物活性炭的研究与设备开发、生物修复中的生物制剂、有效微生物菌群(EM)、生物制剂的安全评价等。《环境污染防治中的生物技术》介绍了生物工程技术及其在环境污染防治中的应用、污水生物处理工程技术、有机固体废弃物的生物处理技术、工业废气的生物治理技术、有毒有害有机污染物的微生物降解、污染环境的生物修复以及环境污染预防生物技术和环境生物监测技术等内容, 既有传统的环境工程生物技术, 也有现代生物技术与环境工程结合的新型技术, 全面反应了国内外在这一领域的研究、开发和应用现状。《废物资源化与生物能源》以废弃物的资源化

与能源化为主线，重点介绍了利用现代生物手段实现废弃物的资源化与能源化技术，既包括以有机废水发酵法生物制氢、利用有机废弃物生产乙醇、利用含油丰富的废物制取生物柴油、生物质甲烷发酵、沼气发酵以及固体废物能源化等多种废弃物的能源化技术，也包括从有机废物制取生物可降解性塑料、从有机废物生产单细胞蛋白、有机废物的高速堆肥和污水深度处理回用等多种废物的资源化技术。《现代生物技术在环境工程中的应用》主要介绍了现代生物技术概论、现代生物技术在环境检测与评价中的应用、生物强化处理技术、现代生物技术与生物能源、应用现代生物技术进行生态制品的设计与制备、新绿色革命与现代农业、几种典型的分子生物学技术与应用、现代生物技术风险分析等内容。

总之，本套丛书汇总了生物技术、环境工程、化学工程、材料工程等学科的大量信息，并注重系统性、科学性、前沿性、创新性、针对性、实践性和指导性，以期为环境保护和污染防治提供有借鉴价值的技术措施和方法。愿此套丛书的出版能为推动我国环境生物技术领域的发展做出积极贡献。

孫铁珩

2004年3月

前言

分子生物学诊断技术最早源自医学领域，是生物技术、微量化学、探测系统、微电子技术、信息技术等众多学科交叉的产物，近年来它才渗透到环境科学和环境工程领域，并作为一种新兴的分子生物学技术和强大的分析检测工具向人类展示着勃勃的生机。本书是作者在长期从事环境生物技术工作的基础上，总结国内外分子生物学诊断技术的最新进展编写而成。全书围绕着分子生物学诊断技术的原理及其在环境污染治理、环境监测中的应用实例，着重阐述环境污染物和致病微生物的快速鉴别与检测，特定环境中微生物的多样性、微生物群落结构和群落动态的监测，以及环境微生物功能基因定位和原位表达等内容。

全书共分为 12 章，其中第 1 章概述分子生物学诊断技术及其在环境中的应用；第 2 章和第 3 章介绍环境污染物检测的分子生物学诊断技术；第 4 章和第 5 章介绍环境致病微生物的分子生物学诊断技术；第 6 章介绍环境微生物的分子分类；第 7 章介绍基于分子标记技术的环境微生物多样性分析；第 8 章介绍环境微生物的基因组和蛋白质组分析；第 9 章介绍环境样品中微生物群落结构和群落动态监测的分子生物学诊断技术；第 10 章介绍环境微生物功能基因表达分析；第 11 章介绍分子生物学诊断技术与生物信息；第 12 章介绍分子生物学诊断技术与生物安全性。全书内容丰富，并注重系统性、科学性、前沿性、实践性和指导性。

本书中第 2 章～第 5 章由哈尔滨工业大学赵阳国博士、任南琪教授和王爱杰副教授执笔完成；第 6 章～第 8 章由哈尔滨工业大学李永峰博士和包红旭博士执笔完成；第 9 章、第 10 章由哈尔滨工业大学邢德峰博士和王爱杰副教授执笔完成；第 11 章由哈尔滨工业大学邢德峰博士和赵阳国博士执笔完成；第 12 章由哈尔滨工业大学王爱杰副教授和赵秋实执笔完成。其他章节由任南琪教授和王爱杰副教授执笔完成；全书最后由王爱杰副教授统稿。本书在撰写过程中，研究生郑国香、程瑶、李秋波等也参加了部分编写工作。

本书可以作为高等院校环境科学、环境生物技术和微生物等专业研究生和本科生的教材或科研参考书，也可以供遗传工程等领域的相关研究人员参考。

由于编者水平有限，书中错误和疏漏之处在所难免，请有关专家和广大读者批评指正。

编 者

2003 年 11 月

目 录

1 概论	1
1.1 分子生物学诊断技术的崛起	1
1.2 常用的分子生物学诊断技术	2
1.2.1 用于分子生物学诊断的主要靶基因序列	2
1.2.2 常用的分子生物学诊断技术	2
1.3 分子生物学诊断技术与微生物分子生态学	9
1.4 分子生物学诊断技术在环境中的应用	11
1.4.1 诊断污染环境中微生物的群落结构和种群丰度	11
1.4.2 诊断污染环境中微生物的群落动态	12
1.4.3 诊断污染环境中微生物质粒的分子生态效应	12
1.4.4 监测和预警环境污染状况	13
1.4.5 与降解有关基因的分子多态性	14
1.5 分子生物学诊断技术展望	14
2 免疫技术对环境中污染物的检测	16
2.1 免疫分析的原理及类型	16
2.1.1 免疫分析的原理	16
2.1.2 免疫分析的分类	17
2.2 应用免疫分析技术检测环境中的残留农药	19
2.2.1 采用 ELISA 检测残留农药的改进方法	19
2.2.2 ELISA 检测残留农药的一般程序	20
2.3 采用分子诊断技术对环境中毒素的检测分析	26
2.3.1 采用免疫分析对真菌毒素的分子诊断	26
2.3.2 采用免疫分析技术对细菌毒素的分子诊断	31
2.3.3 采用免疫分析技术对其他生物毒素的检测	32
2.4 免疫技术对环境其他重要污染物的检测	33
3 生物传感器对环境污染物的检测	36
3.1 生物传感器的基本原理	37
3.1.1 基础电极设计的一般原则	37
3.1.2 生物传感器应具备的特性	38
3.2 生物传感器的研究现状	39
3.2.1 酶传感器	39
3.2.2 微生物传感器	41
3.2.3 免疫传感器	43

3.2.4	组织传感器	45
3.2.5	其他新型免疫传感器	47
3.3	采用生物传感器对环境中的污染物进行监测	50
3.3.1	采用生物传感器对环境参数的监测	50
3.3.2	生物传感器对毒素物质的检测	53
3.3.3	利用生物传感器对残留农药的检测	53
3.3.4	采用传感器对重要污染物的检测	57
3.3.5	生物传感器对有机大分子的检测	62
3.3.6	生物传感器对环境金属离子的检测	64
4	基于分子诊断技术的环境致病微生物检测	66
4.1	利用 PCR 技术检测环境中的致病微生物	66
4.1.1	聚合酶链式反应	66
4.1.2	采用 PCR 技术检测病原菌	73
4.1.3	采用 PCR 检测环境中的病毒	78
4.1.4	PCR 检测环境中的寄生虫	81
4.2	利用寡核苷酸杂交技术检测致病微生物	84
4.2.1	核酸探针杂交技术	84
4.2.2	采用 DNA 探针检测病原微生物	99
4.3	利用免疫分析技术检测致病微生物	107
4.3.1	免疫分析法检测病原细菌	107
4.3.2	ELISA 法检测病原真菌	108
4.3.3	ELISA 法检测病毒	109
4.3.4	ELISA 法检测病原虫	111
4.4	检测环境中病原微生物的其他快速方法	111
4.4.1	检查某些细菌的专有酶进行快速鉴定	111
4.4.2	快速检测细菌生化反应的色原或荧光底物及成套鉴定系统	112
4.4.3	应用不同载体的快速凝集试剂检查与鉴定微生物	112
4.4.4	快速检出细菌的毒素	112
4.4.5	快速的细菌对抗菌药物的敏感性试验	113
4.4.6	化学传感器对病毒的快速监测	113
5	采用生物芯片检测环境微生物	115
5.1	生物芯片的工作原理	115
5.1.1	基因芯片	115
5.1.2	蛋白质芯片	120
5.1.3	芯片实验室	120
5.2	基因芯片检测分析环境样品的步骤	121
5.2.1	制备靶分子	121
5.2.2	靶分子和分子探针进行杂交	121
5.2.3	结果检测 and 数据分析	122
5.3	DNA 芯片在环境病原微生物检测中的应用	123

5.3.1	检测病原体的耐药性	124
5.3.2	快速诊断环境致病微生物	126
5.4	基因芯片技术的研究方向及当前面临的困难	130
6	环境微生物的分子分类	132
6.1	微生物的分类系统	132
6.1.1	微生物的分类命名与鉴定	132
6.1.2	分类方法	136
6.2	DNA 组成 (G+C) 分析	137
6.2.1	DNA 中 G+C 含量的摩尔分数	137
6.2.2	G+C 含量在细菌分类鉴定中的作用	139
6.2.3	测定基因组 DNA 的 G+C 含量	140
6.3	DNA-DNA 分子杂交技术	145
6.3.1	DNA 的变性和复性	145
6.3.2	DNA-DNA 分子杂交技术	149
6.4	16S rRNA 序列分析技术	152
6.4.1	16S rRNA 的分子结构	152
6.4.2	16S rRNA 序列分析技术	156
6.4.3	16S rDNA 测序与细菌分类地位的确定	158
6.4.4	基于 16S rDNA 的系统发生分类法	160
6.5	rDNA 转录间隔区序列分析技术	161
6.5.1	23S rRNA 的分子结构	161
6.5.2	16S-23S rDNA 间隔区	163
6.5.3	16S-23S rDNA ISR 在细菌分类和鉴定中的应用	165
6.5.4	真菌 rDNA 基因间隔区段序列分析及其应用	166
6.6	分子系统发育进化树的构建	168
6.6.1	分子进化的基本概念	168
6.6.2	分子进化模型与序列分歧度计算	169
6.6.3	分子系统树的构建	172
7	分子标记技术与环境微生物多样性分析	177
7.1	限制性片段长度多态性分析及其在环境微生物检测中的应用	177
7.1.1	RFLP 分析的基本原理	177
7.1.2	DNA 片段的变异	178
7.1.3	RFLP 的操作步骤与应用范围	180
7.2	随机扩增多态性 DNA 技术及应用	181
7.2.1	RAPD 技术的基本原理	181
7.2.2	RAPD 技术的操作程序	182
7.2.3	RAPD 在微生物分类鉴定中的应用	183
7.3	DNA 单链构象多态 (SSCP) 技术	184
7.3.1	PCR-SSCP 技术的基本原理	184
7.3.2	操作程序	185

7.3.3	PCR-SSCP 的优缺点分析	186
7.3.4	SSCP 技术在检测突变方面的应用	187
7.4	扩增的限制性片段长度多态性 (AFLP) 技术	187
7.4.1	AFLP 的基本原理	187
7.4.2	操作程序	188
7.4.3	AFLP 技术的应用	190
7.5	扩增性限制性酶切片段分析及其应用	191
7.5.1	ARDRA 的基本原理	191
7.5.2	ARDRA 的操作程序	191
7.5.3	ARDRA 技术的应用	192
7.6	AP-PCR 的指纹图谱	195
7.6.1	AP-PCR 的基本原理	195
7.6.2	AP-PCR 指纹图谱在微生物菌体鉴别中的应用	195
7.6.3	RNA 的 AP-PCR 的指纹图谱	196
7.6.4	tRNA 基因重复序列之间的 PCR	196
7.7	其他环境微生物多样性分析的分子标记技术	197
7.7.1	特异引物的 PCR 标记	197
7.7.2	ISSR 标记	199
7.7.3	T-RFLP	199
7.7.4	PCR-DGGE 方法	200
7.7.5	温度梯度胶电技术	202
8	环境微生物基因组和蛋白质组分析	203
8.1	环境微生物基因组分析	203
8.1.1	微生物基因组计划进展	203
8.1.2	微生物基因组测序的策略	203
8.1.3	微生物基因组的注释	205
8.2	嗜盐古细菌 sp. NRC-1 基因组概述	206
8.3	嗜热自养甲烷杆菌 δ H 菌株基因组概述	207
8.4	詹氏甲烷球菌	208
8.5	闪烁古生球菌	210
8.6	环境群体微生物基因组的比较分析	212
8.6.1	天然微生物聚集体中的基因组	212
8.6.2	自然菌群基因组大片段文库	213
8.6.3	多变性——微生物群体基因组	214
8.7	环境微生物蛋白质的大规模分离技术	214
8.7.1	蛋白质双向电泳技术	215
8.7.2	色谱-质谱技术	230
8.7.3	一维电泳 (色谱)-质谱技术	232
8.8	环境微生物的高通量蛋白质鉴定技术	232
8.8.1	生物质谱技术	233

8.8.2	2-DE 胶上蛋白质识别与鉴定技术	233
8.8.3	生物质谱新技术	234
8.9	环境微生物蛋白质组学	235
8.9.1	环境胁迫条件下的微生物蛋白质组学	235
8.9.2	病原微生物蛋白质组学	236
8.9.3	与微生物生理生化相关的定量蛋白质组学	236
8.9.4	亚蛋白质组学在环境微生物研究的应用	237
8.9.5	基因工程微生物蛋白质组学	237
8.10	微生物群落蛋白质组学	238
8.10.1	微生物群落蛋白质组学	238
8.10.2	自然微生物群落的蛋白质提取	239
9	利用分子诊断技术监测微生物群落结构和群落动态	241
9.1	FISH 技术在微生物群落结构和群落动态研究中的应用	241
9.1.1	FISH 技术发展和关键操作环节	241
9.1.2	采用 FISH 技术鉴定和定量分析特异微生物	243
9.1.3	应用 FISH 技术监测微生物群落结构、功能和动态	246
9.1.4	FISH 技术应用时的主要问题	252
9.2	应用 DGGE 技术监测微生物群落结构和群落动态	253
9.2.1	DGGE 技术	253
9.2.2	DGGE 的操作方法	256
9.2.3	应用 DGGE 技术监测微生物的群落动态	256
9.3	应用 SSCP 分析技术监测微生物的群落动态	258
9.3.1	SSCP 在分析监测微生物群落动态中的可行性	258
9.3.2	应用 SSCP 分析技术监测微生物的群落动态	258
10	环境微生物群落功能基因与表达分析	262
10.1	环境微生物群落功能基因与定位	262
10.1.1	多环芳烃降解基因	262
10.1.2	氨单加氧酶基因	264
10.1.3	有机磷水解酶基因	266
10.1.4	酚类化合物降解基因	267
10.1.5	脱色相关基因	269
10.1.6	其他降解基因	271
10.2	环境微生物群落功能基因表达分析	272
10.2.1	Northern blotting 杂交技术	272
10.2.2	蛋白质二维 (双向) 电泳在降解微生物表达分析中的应用	277
10.2.3	Western blot 杂交技术	278
10.2.4	原位 PCR 的功能基因原位表达分析	283
10.2.5	生物芯片的功能基因原位表达分析	287
11	分子诊断技术与生物信息学	292
11.1	生物信息学研究的主要内容	293

11.1.1	获取人类和各种生物的完整基因组	293
11.1.2	发现新基因和新的单核苷酸多态性	294
11.1.3	研究基因组中非编码蛋白质区域的结构与功能	295
11.1.4	在基因组水平上研究生物进化	296
11.1.5	比较完整的基因组	296
11.1.6	从功能基因组到系统生物学	296
11.1.7	蛋白质结构模拟与药物设计	297
11.2	生物信息数据库与查询	298
11.2.1	分子生物学数据库	298
11.2.2	基因库的 Entrez 浏览检索	307
11.2.3	BLAST 程序	309
11.3	系统进化与序列分析	316
11.3.1	分子进化钟与中性理论	316
11.3.2	分子进化树	318
11.3.3	基因组序列信息分析	325
11.4	杂交探针与 PCR 引物的设计	328
11.4.1	探针和引物设计优化	328
11.4.2	探针和引物设计	331
11.4.3	进行分子诊断时常用的分子生物学软件介绍	331
12	分子生物学诊断技术与生物安全性	337
12.1	引起生物安全问题的主要因素	337
12.1.1	生物入侵	337
12.1.2	生物多样性的破坏	339
12.1.3	有害生物	340
12.1.4	基因流动	340
12.2	转基因生物的安全性	341
12.2.1	转基因植物及其安全性	341
12.2.2	转基因动物及其安全性	345
12.2.3	转基因微生物及其安全性	350
12.2.4	医药生物技术及其产品的生物安全	355
12.3	基于分子生物学诊断技术的生物安全性监测与评价	361
12.3.1	转基因植物安全性监测与评价	361
12.3.2	分子诊断技术用于转基因动物安全性监测与评价	365
12.3.3	分子诊断技术用于转基因微生物安全性监测与评价	368
12.3.4	分子诊断技术用于医药生物技术及其产品的安全性评价	372
	参考文献	382

► 1.1 分子生物学诊断技术的崛起

20 世纪 90 年代世界上最重大的两项技术进步当属网络 (internet) 和基因工程 (gene engineering)。其中, 基因工程技术可以说是一场改变人类自身命运的革命, 它开启了一个关于人类自身生命秘密研究的崭新领域。据专家预测, 基因工程技术的崛起很可能形成一个以往任何时代的增长速率都无法比拟的新发展阶段。纵观十几年来基因工程技术领域日新月异的变化, 不难看出, 分子生物学诊断技术作为一个新兴的科研方向正向人类展示出勃勃的生机。

分子生物学诊断技术最早源自医学领域。在医学上, 分子诊断是指建立在聚合酶链反应 (PCR)、单克隆抗体和重组抗原等技术的基础上, 运用现代分子生物学和分子遗传学方法检查基因的结构及其表达产物, 能够及早地预报疾病的发生和发展趋势, 进而指导医学专家“对因施治”的分子生物学技术手段。因此, 该技术在攻克癌症、遗传性疾病、病毒感染和生物制药等领域展示出巨大的应用潜力。例如:

① 对病原体基因组测序。通过对人类病原体的基因组测序, 可以更好地了解致病机理和寻求有效治疗方法, 甚至可能找到药物的靶位点及引起病症的关键蛋白质。

② 建立性传播疾病防治手段。这是一种建立在重组疫苗、单克隆抗体等生物技术基础上的诊断方法。性传播疾病的危害正在急剧增加, 艾滋病还只是其中一种, 据统计全球每年有 3.33 亿人染上艾滋病以外的性传播疾病。性传播疾病防治手段如果得到推广, 有望大大改善全球妇女的健康状况。

③ 利用生物信息学防治疾病。生物信息学是生命科学和计算机技术的“联姻”, 它以计算机分析大量的生物信息数据, 如 DNA、RNA 和蛋白质的排序等, 从中得到有价值的信息用于疾病防治。

④ 发现和研制新药物。基因组学和分子生物学的突破, 使人们能更精确地在基因上定位药物的“标靶”, 而依靠高度自动化的组合化学手段, 可以试验不同的药物分子及其变体是否对这些“标靶”有效, 这种交互性的过程将使新药物研发效率提高、周期缩短。

⑤ 开发重组药物。这是指在生物的基因组中整合进外源的基因, 使生物产生具有治疗作用的药用蛋白质, 这种“生物制药厂”将增强人类对付非传染性疾病 (如心脏病) 的能力。

2003 年 5 月 16 日, 陈超等人开发出的利用现代分子生物学方法诊断严重急性呼吸系统综合征 (SARS) 病原体样品的技术, 在西安的国家微检测系统工程技术研究中心正式问世。对大多数实验室来说, 研究 SARS 诊断、治疗技术的难题之一是得到 SARS 病原

体样品。世界卫生组织于 2003 年 5 月宣布为一些国家提供病原样品与标准品。但由于样品量需求大,来源少,很多实验室很难及时获得标准样品,同时病原体具有变异多样性,难以根据不同的实验要求及时提供多种标准的样品。陈超等人在无需接触病原体的情况下,体外获取所需的可用于诊断和治疗的核酸和蛋白片段。通过这一技术,可以安全、简单、快速地获得靶基因的片段和靶蛋白样品,并可根据病毒体变异株的不同,提供不同基因型的特异性片断。这为科学家和实验室获取 SARS 病原体核酸和蛋白样品提供了新的途径,从而大大加速了 SARS 诊断和治疗的研究进程。

分子生物学诊断技术的发展不仅为人类征服疾病提供了有力的帮助,而且为许多生产部门开辟了一个新的广阔的市场。如法医学鉴定、民事鉴定、环境监测、毒理学、药物设计、生物量的保存和分配、生物除污、病原物的检测、食品工业的质量控制、各种工业生产过程中涉及的生物过程的监控以及农业和畜牧业管理,还包括生物多样性的保持、提高产量、提高抗病性、提高产品的营养价值等诸多方面。因此,该技术一经产生,便展示出诱人的发展前景。

分子生物学诊断技术是多学科交叉的产物,它涉及生物技术、微量化学、微量机械、多种分离技术、探测系统、微电子技术、信息技术等众多学科。分子生物学诊断技术的发展和提高需要分子生物学家、工程专家、物理学家、化学家、数学家和计算机专家共同努力。据分析,在分子生物学诊断技术领域中最具潜力的是 DNA 诊断系统,包括扩增反应、序列分析、杂交分析等多种装置。一般来说,要求这些装置能够实现小型化、平行化、自动化。

► 1.2 常用的分子生物学诊断技术

1.2.1 用于分子生物学诊断的主要靶基因序列

目前,用于分子生物学诊断的靶基因序列主要有以下 3 种。

① 编码蛋白的基因序列。这些编码蛋白的基因主要包括降解污染物的基因(如与苯环类化合物降解、烷烃类化合物降解、杂环类化合物降解有关的基因)和微生物分类有关的基因(既含有属特异性基因序列,又含有种特异性基因序列,可在属及种水平鉴定微生物、细胞色素 c 和热激蛋白基因等)。

② rRNA 基因序列。rRNA 是与核糖体蛋白结合的 RNA 分子,是细菌和真核细胞核糖体的基本成分。编码细菌 rRNA 的基因是由 23S rDNA、16S rDNA 和 5S rDNA 三部分组成 rRNA 操纵子(*rrn* 操纵子),其大小分别约为 3000bp、1500bp 和 120bp。由于 5S rRNA 对分类学研究来讲所含信息量较少,而 23S rRNA 序列较长,不利于全序测定,因此在原核微生物的分类中对 16S rRNA 研究的最多。

③ 16S-23S rRNA 基因(16S-23S rDNA)转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列。在原核生物的 *rrn* 操纵子中,各基因的排列顺序为 5' 16S-23S-5S 3',其中 5S rDNA 与 16S rDNA、16S rDNA 与 23S rDNA 之间由两个非编码 ITS 分开。由于 ITS 在自然进化过程中,不受选择的压力,所以变异更快,足以满足种及种以下水平的分类,因此对 16S-23S rDNA 转录间隔区的研究也比较多。

1.2.2 常用的分子生物学诊断技术

目前,常用的分子生物学诊断技术可以归纳为以下 7 类。

1.2.2.1 聚合酶链式反应技术

聚合酶链式反应 (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混合液中, 且含量很少, 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 技术的改进形式多种多样, 根据扩增的模板、引物序列来源及反应条件的不同, 目前应用在环境分子生物学诊断中的 PCR 技术分为以下几种。

(1) 反转录 PCR 是由反转录酶介导的, 检测和定量结构基因表达的一种 PCR 技术。它不仅能检测出微生物降解污染物的能力, 还能测量出微生物功能基因的转录水平, 从而确定微生物分解污染物的活性。

(2) 竞争性 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。具体方法是对 PCR 扩增的降解污染物的目的基因片段进行人工改造, 使其带有一个小片段的缺失, 作为 PCR 扩增的竞争模板。这样, 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, 来定量降解污染物的目的基因的浓度。

(3) 半嵌套式 PCR 半嵌套式 PCR 和多重 PCR 的前提是所克隆的目的基因必须有 2 个以上的引物, 半嵌套式 PCR 就使用了 3 个引物。先用两个引物检出一个特定基因, 然后在第 2 轮 PCR 中使用补加试剂、一个原来的下游引物和一个新的与原来 PCR 产物的内部序列互补的内部引物。第二轮 PCR 不仅提高了反应的灵敏度, 而且能通过产生比原来产物小和依据内部序列的第二产物来确证第一轮扩增产物。这一技术可使 PCR 的灵敏度提高 1000 倍, 特别适合 DNA 提取量少, 电泳结果不太明显的情况。

(4) 多重 PCR 多重 PCR 是在一个反应中使用几套引物以产生几条鉴别性的电泳带。使用多套引物的一个目的就是能检出基因组的多重区段。例如, 为了确证用 lamB 引物检出的大肠杆菌也携带毒素基因, 可以用 lamB 基因和这个毒素基因二者的引物来建立一个 PCR 反应。多重 PCR 还可用于检出一个样品中多种机体的多重基因组, 如可以检出自来水含有多种病原体。但是, 特别要注意建立起来的多重反应必须有平衡的引物套数比率, 这样才能得到正确有效而明确具体的结果。实质上, 这些 PCR 方法使研究者能以单个实验回答多个问题。半嵌套式 PCR 能以一次试验鉴别和确证 PCR 产物, 而多重 PCR 能以单个反应鉴别多个靶序列。

(5) 综合细胞培养 PCR (ICC-PCR) 这种方法采用病毒的纯培养物或环境样种接种于细胞培养瓶中, 保温培养 2~3d。保温培养后冷冻培养瓶, 使细胞溶解, 释放出病毒粒子。然后对细胞培养物裂解液进行反转录 PCR (RT-PCR) 扩增, 实质上, 这是在生物扩增后紧跟着酶促扩增。这种方法只要 3d 就可鉴别病毒, 而单独的细胞培养需要 10~15d。因此, 这项新技术大大地提高了检出病毒的速度。ICC-PCR 还具备以下一些优越性: 因为病毒的生长先于 PCR 扩增, 所以只有感染的病毒才能被检出; ICC-PCR 的灵敏性比直接的 RT-PCR 扩增要好, 这是因为加到细胞培养物中的样品量可以大一些; 细胞培养物中样品的稀释同样也稀释了任何可能存在于环境样品中的 PCR 抑制物质; 再者, ICC-PCR 阳性样品是通过 PCR 确证的, 所以没有必要像细胞培养阳性那样去进行单独的细胞

培养试验来确证阳性反应。这样，总的花费减少约 50%。

(6) 免疫 PCR 该技术将血清中的抗体反应与聚合酶链式反应特异扩增一段 DNA 分子技术结合起来，用一段具体的 DNA 分子标记抗体，应用此抗体去检测环境中的抗原。PCR 扩增此段 DNA 分子，电泳定性根据此段 DNA 分子是否存在，来显示环境中的抗原是否存在。其一般程序：在酶联板内包被捕获抗原的抗体→加入待检抗原→温育后洗涤→加入 DNA marker 标记的检测抗体→温育后充分洗涤→PCR 扩增黏附在抗体-抗原复合物上的 DNA 分子→电泳显示结果。

(7) 原位 PCR 原位 PCR 综合了 PCR 和原位杂交 (*in situ* hybridization, ISH) 的优点，是一种在组织切片或细胞涂片上对特定的 DNA 或 RNA 进行原位扩增，再用特异性的探针原位杂交检测的技术。原位杂交技术避免了必须从样品中提取出 DNA 而造成的测定结果可能与特征脱节的现象，也克服了不能进行细胞定性及细胞内定位的缺点。但是，该法灵敏度有限，常需至少 20 个拷贝量的核酸序列。原位 PCR 标本一般需先经化学固定，以保持组织细胞的良好形态结构。细胞膜和核膜有一定的通透性，PCR 扩增所需的各种成分可进入细胞内或核内，在原位对特定的 DNA 或 RNA 进行扩增。扩增产物由于分子量较大或互相交织，不易透过细胞膜向外弥散，故保留在原位。这样就很容易应用 ISH 将其检出，同时还可对目的 DNA 序列的组织细胞进行形态学分析。

(8) 基于 PCR 的多态性分析技术

① PCR-RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)。是针对某一特定基因的非特异性引物来扩增某些片断，操作简便，引物实用性广，对于结果准确性要求不高以及亲缘关系近的种属有较高的可信度。PCR-RADP 广泛应用于分子多态的检测中，适用于分析各种生物反应器中混合微生物多样性，通过比较得到的基因组指纹图谱，可以比较不同时间段或不同工艺条件下微生物种群的变化，但此方法还不能分析群落的生物多样性。

② PCR-RFLP (restrict fragment length polymorphism)。是较早的基于 DNA 的分子标记技术，能检测酶切位点因 DNA 插入、重排或缺失造成的长度差异，具有很高的分辨率，结果的重复性和准确率高，在群体遗传和系统演化领域具有重要的应用价值。不足之处是操作步骤烦琐，有较高的技术要求。例如，可以将 PCR 技术和限制性酶切技术结合起来检测 PCB 降解基因在环境中的存在情况，通过对酶切产物的分析，探测该基因的多态性，从而得到不同污染地区降解某物质的微生物群落的生物多样性。

③ PCR-AFLP (amplified fragments length polymorphism)。是通过 DNA 多聚酶链式反应扩增基因组 DNA 模板产生多态性的 DNA 片断。不同的物种基因组 DNA 差异很大，复制特定 DNA 序列所需的引物的核苷酸序列也不同。同一引物可能使某一品种的 DNA 片断得到扩增，而对另一品种无法扩增。将此引物所诱导的特定 DNA 片断采用 PCR 技术进行扩增，然后电泳分离，就可使某物种特定的 DNA 出现，而其他物种无此谱带产生。AFLP 集 RFLP 和 RAPD 的优势为一体，既具有高的分辨力，准确性和重复性，又克服了 RFLP 的烦琐操作，成为遗传多样性检测和系统分类、基因定位的主要分子标记技术。不足之处是得到的主要是显性，而非共显性标记。

④ PCR-SSCP (single stranded conformation polymorphism)。单链构象多态性对于检测碱基置换突变 (点突变) 具有极高的灵敏度。此法是凭借单一碱基置换引发的突变型单链 DNA 三维构象的改变，通过观察单链 DNA 电泳迁移率的漂移来判断突变。其策略是，将 PCR 扩增的待测片段变性解链后，通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，比较待

测单链 DNA 与无突变参照片段的电泳迁移率,完成对突变的检测。但是,PCR-SSCP 技术的突变检测率只有 50%~80%,而且为了确保突变检测效率,SSCP 的最适检测长度约为 100~300bp。与 PCR-RFLP 相比,PCR-SSCP 可以检测所有的点突变,该方法由 Orita 等建立,在检测已知突变或未知变异的分析中十分常用和实用,由于设备配置简单,具有一定的推广价值。

PCR 比传统的培养技术有许多优点。例如,灵敏度高,并能检出所有的机体而不管其生理状态如何;PCR 试验一经在实验室优化,就能在 24h 内相当快速简易地得到结果。相比之下,传统培养方法可能需要几天或几个星期。但是,PCR 也有一些不足之处。例如,PCR 检测的对象是 DNA,而不是有机体本身,所以在某些情况下,检测到的有可能是死的机体,也有可能是动物体内正常的菌群,这样势必给出一种错误的信息。另外,由于 PCR 灵敏度极高、技术性较强,所以实验污染也是 PCR 过程中不容忽视的问题,因为这样极易造成假阳性的结果。

1.2.2.2 核酸分子杂交技术

核酸分子杂交技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种崭新的分子生物学技术,它是基于 DNA 分子碱基互补配对的原理,用特异性的探针与待测样品进行杂交来钓取或检测目的基因的技术。根据所用的探针和靶核酸的不同,杂交可分为 DNA-DNA 杂交, DNA-RNA 杂交和 RNA-RNA 杂交 3 类。由于它的高度特异性和灵敏性,近年来被广泛应用于微生物生态学的研究中。

核酸杂交技术可以快速检测出环境微生物中独特的核酸序列,可以对有关微生物在特定环境中的存在与否、分布模式和丰度等情况进行研究。如果用光密度测定法可直接得到杂交的阳性结果并定量。例如,对活性污泥中的特定微生物的生长速率进行测定,将放射性标记的胸腺嘧啶投加到活性污泥的系统中,细菌在 DNA 复制过程掺入新产生的细菌中;之后将人工合成的特异细菌的核苷酸探针固定在杂交膜上,用活性污泥总 DNA 与之杂交,根据放射性强度可以定量分析该特定细菌的 DNA 的量。在对被石油污染的土壤分析中,用核酸杂交法得到某种烃降解基因的检出率显著高于不污染样品。定量分析结果表明,污染越严重,这种降解基因的含量也越高。可用该方法作为土壤中石油污染程度的评价。

(1) 斑点印迹 (dot blotting) 这是一项评价特异核酸序列存在与否的技术,这项技术不必进行凝胶电泳。更确切地说,是将等量的核酸点在硝酸纤维素滤膜上,然后用探针与之杂交,可用来指示一个序列的存在与否,或用来对序列做定量分析。就定量而言,杂交的相应量或强度与同时点上去的已知标准品相比较会估计出样品中序列的量,信号的强度可由光密度仪测定。

(2) Southern 杂交和 Northern 杂交 核酸探针技术的另一应用是通过 Southern 杂交或 Northern 杂交来鉴别靶序列。Southern 杂交 (DNA 印迹法) 是用于鉴别 DNA 序列的技术。例如,若要知道一个基因是在质粒上,还是在染色体上,可以将这个菌株内所有的质粒抽提出来,并用凝胶电泳分离开。质粒 DNA 用印迹法转移到硝酸纤维素膜上,然后采用标记的探针杂交,因为只有含靶 DNA 序列的质粒或基因组才与探针杂交,所以可鉴别出基因所在的位置。

Northern 印迹法 (RNA 印迹法) 的原理与 DNA 印迹法类似,只是它的靶序列不是 DNA,而是 RNA。从环境样品中抽提出的总 RNA,然后在凝胶上电泳并转移到膜上,而特