

文章编号: 1001-5914(2001)04-0253-04

Lux 基因及其在环境检测中的应用

刘和, 王晓云

摘要 基于 lux 基因的生物发光检测技术是一项蓬勃发展的环境检测新技术。本文概述了 lux 基因的组成与功能、表达与调控, 并对其在环境检测应用研究中的最新进展作了介绍。

关键词 lux 基因; 生物发光; 环境检测

中图分类号: R318

文献标识码: A

The Lux Gene and Its Application in the Environmental Detection. LIU He, WANG Xiao-yun. *Environmental Health*
Department of Lanzhou Medical College. Lanzhou 730000

Abstract On the basis of the bioluminescent detection technology of the lux gene being a kind of new and progressing environmental detection technology, in this paper, the constitution, function, expression and regulation of the lux gene were introduced, moreover, the recent advance of its application in the study of environmental detection was reviewed.

Key words Lux gene; Bioluminescence; Environmental detection

自然界中许多生物具有发光现象, 如细菌、真菌、昆虫等, 而细菌是其中种类最多分布最广泛的一类。目前在海洋、淡水及陆地环境中都已检测出发光菌。发光菌是一类能运动的革兰氏阴性兼性厌氧杆菌, 一般将其分为三类: 弧菌属、发光杆菌属和异短杆菌属。目前研究得较为详尽、透彻的发光细菌有以下五种: 哈氏弧菌、费氏弧菌、明亮发光杆菌、鳗鱼发光杆菌、发光异短杆菌(以下分别简称为 *V. f* *V. h* *P. p* *P. l* *X. l*)。在这些发光菌中催化生物发光反应的酶称为荧光脂酶, 而编码荧光脂酶的生物发光基因 – lux 基因已全部得到克隆和表达。

1 lux 基因的组成与功能

lux 基因已从包括 *V. f*, *V. h*, *P. l*, *P. p* 及 *X. l* 在内的许多发光菌中克隆出来。在对其组成进行分析后发现, 所有种属发光菌的 lux 基因中都存在以下五个结构基因, 分别是 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 分别编码分子量为 40 和 37 KD 的两条多肽链, 组成荧光脂酶。luxC D E 分别编码还原酶、转移酶及合成酶, 三种酶聚合在一起组成脂肪酸还原酶复合物。除上述五个结构基因外, 在 luxC 的上游还有 luxI 和 luxR 两个调控基因。整个 lux 基因含有两个转录方向相反的操纵子, 分别是左操纵子(luxR)和右操纵子(luxICDABE), 它们从中间调节区开始向两个不同的方向转录。luxI 和 luxR 的基因编码产物分别参与对发光反应的诱导和调控。lux 基因的组成具有种属特异性, 而即使是同一菌属也会因其不同的菌株来源而导致基因组成会有所不同。在 *P. p* 及部分 *P. l* 中, luxB 和 E 之间存在 luxF 基因。luxF

的功能尚不十分明了, 但从这两种细菌生活环境的特殊性推断可能与细菌的环境适应性有关。在所有海洋环境中分离得到的菌属(即弧菌属和发光杆菌属)中, lux 操纵子的下游还含有 luxG, *V. f* 中 luxG 的下游还含有 luxH。对这些基因进行转座子插入致突变试验, 发现并不影响细菌发光, 证明这些基因并非细菌发光所必需, 推测可能与 luxF 一样与细菌的环境适应性有关^[1]。lux 基因编码的荧光脂酶在其反应底物即长链脂肪醛、还原型黄素单核苷酸(FMNH₂)及 O₂ 存在时催化脂肪醛氧化, 在生成脂肪酸等产物的同时, 还产生波长约 490 nm 的兰绿色光, luxCDE 编码的脂肪酸还原酶复合物将脂肪酸又还原成脂肪醛, 这就构成了一循环的反应体系。荧光脂酶对 FMNH₂ 有严格的特异性, 底物结构微小变化均引起酶活性急剧降低。

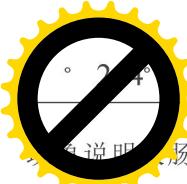
2 lux 基因的表达与调控

2.1 lux 基因的表达

2.1.1 lux 基因在原核生物细胞中的表达 lux 基因可以用许多载体以不同的方式导入到原核生物细胞内。如可将 lux 基因与质粒构成重组体后导入, 还可通过噬菌体以转导方式转移到宿主细胞中。转移 lux 基因的载体除常用的质粒外, 还有很多转座子载体, 如 Mini-Mu, Tn 系列等^[2]。通过转座子载体方式导入后, lux 基因的表达与通过质粒载体方式导入的表达相比有一优点, 就是它避免了在质粒载体上表达所引起的表达产物的量不易控制的缺点^[3]。导入 lux 基因时有两种模式, 其一是只导入编码荧光脂酶的 luxA B 基因, 另外一种是将整个 lux 操纵子都导入^[4]。两种模式的选择各有利弊: 前者需要向反应体系中额外添加足量的脂肪醛底物, 后者则因导入基因的分子量较大, 导致重组体的稳定性、酶切位点的数量等都受到影响。只有 *V. f* 菌的 lux 基因在大肠杆菌中表达时, 大肠杆菌的 RNA 聚合酶能识别 lux 基因启动子并与之直接接合启动转录。这一

作者单位: 兰州医学院环境卫生教研室(甘肃兰州 730000)

作者简介: 刘和(1974-), 男, 江西省万安县人, 兰州医学院环境卫生学硕士研究生, 主要从事水体卫生防护研究。

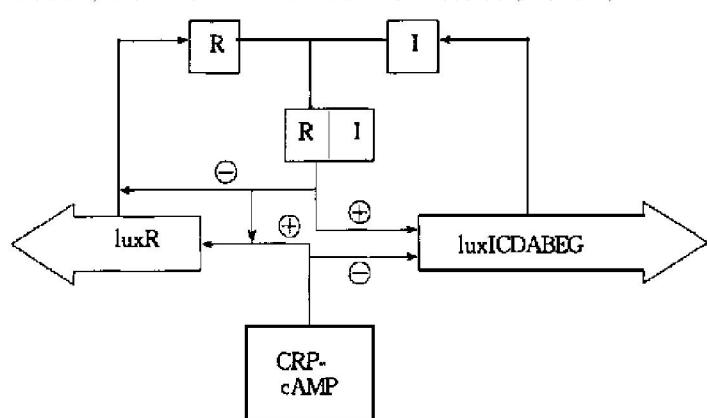


说明 *V. f* 菌中可能还缺乏其它种属发光菌的 lux 基因表达所需的一些调节基因或调节分子。在以往的研究中, *V. h* 和 *V. f* 的 luxAB 基因编码的荧光脂酶在稳定性、活性、底物选择的特异性等方面均优于其它菌属, 因而得到较多应用。但也有研究发现, *X. I* 的荧光脂酶具有更高的热稳定性, 能适应在不同环境下生存的宿主菌中稳定的表达, 因而具有更广阔的应用空间^[5]。

2.1.2 lux 基因在真核生物细胞中的表达 和在原核细胞中的表达不同, lux 基因在大部分真核生物细胞中的高效表达需要在 luxA 和 luxB 前各接上一启动子, 这在 DNA 重组技术上是较为困难的, 而基因融合技术很好地解决了这一问题。将 luxA 和 luxB 融合后得到的单顺反子在转录与表达时只需要一个启动子, 而且表达产物同样具有较高的催化发光活性。如将 *V. h* 的 luxA B 导入真核细胞表达之前, 在 luxA 与 B 之间的第 29 个核苷酸序列处加入一鸟嘌呤并将之后的一个胸腺嘧啶置换为鸟嘌呤, 这样就去除了 luxA 的终止密码子, luxA 和 B 的编码产物 α β 亚单位可通过一个 10 肽片段连在一起。luxAB 融合子编码的荧光脂酶的活性受到诸多因素的影响, 首先是与 α β 亚单位间多肽链连接片段的一级结构有关, 其次与宿主菌的培养温度也有关。

2.2 lux 基因的调控

2.2.1 自诱导现象 自诱导是 lux 基因表达的一个重要调控因素。*V. f* 菌中, luxI 编码的 β -己酮高丝氨酸内酯是其自诱导物, 和 luxR 基因编码的受体蛋白结合后形成的自诱导物-受体复合物可引发右操纵子的表达。因右操纵子内包含 luxI 基因, 因而操纵子表达的同时也促进了 luxI 基因产物的合成, 所以构成了一正反馈调节途径。但与此同时, 还存在一负反馈调节途径。自诱导物-受体复合物达到一定浓度后可限制或关闭 luxR 的转录, 导致整个 lux 基因的表达受到抑制(见附图)。



附图 *V. f* 菌内 lux 基因的调控机制

不同种属的发光菌其诱导机制有所不同, *V. h* 的自诱导物是 β -羟基丁酰高丝氨酸内酯, 目前对其详细的诱导机制并不十分明了, 只是证实在 *V. h* 的早期培养阶段, 加入自诱导物可引起细菌发光明显增强, 而且是在 lux 基因的转录水平上加以调控。但是尚不明确自诱导物是通过与可和 lux 启动子相结合的受体蛋白相互作用来促进 lux 基因的表达还是通过影响其它调控因素来调节。*V. f* 和 *V. h* 的自诱导物即 β -己酮高丝氨酸内

酯和 β -羟基丁酰高丝氨酸内酯, 其化学结构有些相似。这可能提示尽管 *V. f* 的基因组成和 *V. h* 不完全一样, 但两者的调节机制有相同之处。但从进一步的分子构型模式来看, 两种诱导物还是不一样的。此外还有研究发现, 尽管 β -羟基丁酰高丝氨酸内酯对 *V. h* 的诱导作用是特异性的, 然而有证据表明, 一些其它种属的发光菌及非发光菌的分泌物对 *V. h* 的发光反应同样有诱导作用。因此对于自诱导现象, 有学者认为, 自诱导物和细菌的其它信号传递分子一样, 是细菌对其所处环境及营养状态进行感应的方式之一。

2.2.2 代谢产物抑制作用 在培养基中有葡萄糖存在时, *V. f* 和 *V. h* 的发光都受到其代谢产物的抑制, 而 cAMP 可解除此抑制现象, 因为缺少 cAMP 或 cAMP 受体蛋白(CRP)时, 细菌发光强度很低。如附图所示, 在 *V. f* 中 luxR 与 luxI 两基因间存在一段 CRP 结合序列, CRP-cAMP 复合物可和此区域结合。CRP-cAMP 复合物和自诱导物-受体复合物的作用相反, 可促进左操纵子的表达而抑制右操纵子。但是 CRP-cAMP 的调控作用只是在 luxR 基因产物浓度较高并开始抑制整个 lux 基因的表达时才开始发挥出来。因此 cAMP 是 lux 基因表达的一种正调控因素。在 *V. h* 中 CRP-cAMP 的调控机制比较复杂, 它对 lux 基因表达的调控并不是直接进行, 而很可能是通过其它一些基因的作用而间接地对 lux 基因的表达进行调控。

2.2.3 其它调控因素的作用 许多研究证实, lexA, recA 两种作用相反的蛋白质也参与对 lux 基因的调控, lexA 与 *V. f* 菌中 lux 基因上游的一段重复序列结合后可促进其表达。另外, *V. f* 菌中的 δ^{32} 蛋白和 lux 基因转录起始有关, 是一正调控因子。缺少 δ^{32} 蛋白时自诱导物不能发挥作用。但是, 当诱导物浓度很高时 lux 基因仍可得到表达。

3 lux 基因环境检测中的应用

lux 基因编码的荧光脂酶能催化生物发光反应发出兰绿色光, 因此作为一报告基因, lux 基因在环境检测中的应用研究受到广泛关注^[6, 7]。

3.1 检测环境中的化学污染物

一些细菌长期生活在含某种化学物质的自然环境中, 产生了适应现象, 细菌基因组中含对该化学物具有特异性的诱导基因及降解基因。将这些基因与 lux 基因融合构成重组体, 在特异的化学物存在时产生诱导作用, 启动诱导基因并导致 lux 基因表达。由重组体的发光与否就可得知某化学物是否存在。因此, 借助于适宜的载体将重组体导入宿主细菌后构成的基因工程菌可用来检测环境中存在的特异的化学污染物。King 等^[8]构建了一含 NahG-luxCDABE 的质粒 PUTK21, 并将其导入 *Pseudomonas fluorescens* HK44 菌中, 用以检测土壤中的萘。Heitzer 等^[9]对此作了进一步的研究, 他们采用细胞固定化技术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, 结果发现生物报告质粒 PUTK21 的发光量与萘的含量有很好的对应关系。因此不仅可对萘进行定性检测, 还可进行定量分析, 进一步还可对萘的生物可利用度及生物可降解



行评价。此外,还有许多学者利用类似的方法构建相应的基因工程菌来检测环境中的 PCB、汞、苯系物、氯等^[10-13]。

3.2 检测环境中的微生物

lux 基因作为一报告基因,可将其导入应用基因工程微生物中,从而只需通过对光线的检测就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,这是所有其它生物报告基因所不可比拟的一项优点^[14]。De weger 等^[15]将 lux 基因导入植物根瘤菌中,通过发光检测设备对工程菌产生光线的监测从而对细菌侵入植物的整个过程进行了实时在线监测,这是细菌检测史中一项里程碑式的进展。Ulitzur 等早在 1987 年就提出了一全新概念的细菌检测技术。他们首先将 lux 基因导入某种嗜菌体的 DNA 中,该嗜菌体因缺少进行生物发光反应所必需的生化底物,因此不会发光。然而当嗜菌体感染到特异的宿主菌内后,lux 基因也被导入并得以表达,催化生物发光反应使宿主菌发光,因此可利用嗜菌体与其宿主菌之间严格的特异性来检测某种细菌的存在。另外,lux 基因的发光量还与宿主菌的生理生化状态有关,因此通过对细菌发光量的检测可反映细菌的活性,进一步可推测细菌的环境适应性及生存力等^[16,17]。日本学者利用生物发光反应的原理提出了一种微生物快速检测法(RMDS)^[18]。该检测技术是基于生物发光反应需要 ATP 的参与而活微生物内含有 ATP。当向检测样品中加入荧光脂酶及生物发光反应所需底物时,如样品含有活微生物便可进行生物发光反应,发出光线,从而可确定活微生物的存在。由于生物发光反应只需少量 ATP,微生物不需培养或经短暂培养后所产生的 ATP 即足够发光反应所需,借助于高灵敏度的发光检测及分析设备,即可对微生物进行计数,这使得检测样品中的微生物所需的时间从以前的 2~3 天缩短到只需几小时,因此这是一种高灵敏度、快速的检测活微生物的方法。

3.3 检测环境污染物的毒性

lux 基因的发光强度在外界环境污染作用下会发生改变,而且变化的大小与污染物毒性的强弱有关,因此利用这一特性可将 lux 基因用于环境污染物的毒性测试。有学者将砷酸盐阴离子可诱导的染色体操纵子 arsRBC 与 lux 基因融合后构建的基因工程菌(arsRBC: luxAB)来检测含砷化合物的毒性,获得了满意的结果^[19]。还有人用生物发光毒性试验和水蚤生物毒性试验两种方法检测了被杂酚油污染的湖水和底泥的毒性,并对两种方法进行了比较^[20]。以上研究表明,与传统的生物毒性检测试验相比,生物发光毒性试验的最大优点是能够在现场进行在线检测。除一般生物毒性以外,lux 基因还可以对环境污染物的遗传毒性进行检测。如明亮发光杆菌暗变种回复突变试验,其原理和 Ames 试验类似,从菌株的重新发光与否来推断测试物的致突变效应。目前应用较多的是将 lux 基因作为一报告基因与对某种污染物特异的诱导基因融合,借助于重组体的生物发光来指示测试物的遗传损害效应。如比利时学者提出的生物毒性试验(VITOTOX test)即是将细菌的 SOS 修复系统基因与 lux 基因融合构成基因工程微生物来检测测试物的遗传毒性,当测试物损害到基因工程菌的 DNA 时,细菌的 SOS 修

复系统启动,从而导致 lux 基因得以表达,因此能进行测试物的遗传毒性^[21]。另外,有学者进一步将 SOS 修复系统基因与 lux 基因构建成的质粒 pPLS-1 来对包括丝裂霉素 C 在内的 6 种已知遗传毒物进行测试,并和 Ames 试验等传统的遗传毒性检测试验进行了比较,证实几种方法的检测结果之间有着很好的相关性^[22]。还有学者也在这方面进行了更深入的研究^[23]。

与一些常规检测方法比较,生物发光检测技术有一些明显的特点,如具有高灵敏度、高特异度以及检测快速方便等。如今,lux 基因正与其它各种高新技术如生物传感器技术,细胞固定化技术以及计算机技术紧密结合起来,使得生物发光检测新技术逐步完善,自动化水平也日趋提高,这使 lux 基因在环境检测中的应用进入全新的阶段^[24]。

4 参考文献

- [1] Meighen EA. Molecular biology of bacterial bioluminescence [J]. Microbiol Rev, 1991, 55(1): 123-142.
- [2] Stewart GSAB, Williams P. Lux genes and the applications of bacterial bioluminescence [J]. J Gen Microbiol 1992, 138 Part 7: 1289-1300.
- [3] Amin-Hanjani S, Meikle A, Glover LA, et al. Plasmid and chromosomally encoded luminescence marker systems for detection of *Pseudomonas fluorescens* in soil [J]. Mol Ecol, 1993, 2: 47-54.
- [4] Hill PJ, Stewart GSAB. Use of lux genes in applied biochemistry [J]. J Biolumin Chemilumin, 1994, 9: 211-215.
- [5] Szittner R, Meighen EA. Nucleotide sequence, expression and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium [J]. J Biol Chem, 1990, 265: 16581-16587.
- [6] Heitzer A, Burlage RS. A review of environmental application of bioluminescence measurement [J]. Chemosphere, 1995, 30: 2155-2197.
- [7] Burlage RS, Robert S. Emerging technologies bioreporters, biosensors and microprobe [J]. Mar Environ Microbiol. 1997, 115-123.
- [8] King JM H, Digrizia PM, Applegate B, et al. Rapid sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation [J]. Science, 1990, 249: 778-781.
- [9] Heitzer A, Malachowsky K, Thonnard J, et al. Optical biosensor for environment on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(5): 1487-1494.
- [10] Layton AC, Muccini M, Ghosh MM, et al. Construction of a bioluminescent reporter to detect PCB [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(12): 5023-5026.
- [11] Selifonova O, Burlage R, Barkay T. Bioluminescence sensors for detection of the bioavailable Hg(II) in the environment [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 3083-3090.
- [12] Applegate BM, Kehrmeyer SR, Sayler GS. A chromosomally based tod-luxCDABE whole-cell reporter for Benzene, Toluene, Ethylbenzene and xylene (BTEX) sensing [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(7): 2730-2735.
- [13] Taro I, Masahiro M, Kanji N. A bioluminescence assay using *nitrilotroponas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3656-3662.
- [14] Prosser JI. Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment [J]. Microbiology,



1991 0 5-17.

- [15] Baweger L, Dunbar P, Mahafee W, et al. Use of bioluminescence markers to detect *Pseudomonas spp.* in the rhizosphere [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 3641-3644.
- [16] Prosser JI, Killham K, Glover LA, et al. Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment [J]. Crit Rev Biotechnol, 1996, 16(2): 157-183.
- [17] Burlage RS, Heitzer A, Sayler GS. Bioluminescence a versatile bioreporter for monitoring bacteria activity [J]. Biotech Forum Europe, 1992, 9: 704-709.
- [18] Tanaka H, Shinji T, Sawada K, et al. Development and application of a bioluminescent ATP assay method for rapid detection of coliform bacterium [J]. Water Research, 1997, 31(8): 1728-1732.
- [19] Cai J, DuBow MS. Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA) [J]. Biodegradation, 1997, 8(2): 105-111.
- [20] Hyotylainen T, Oikari A. The toxicity and concentration of PAHs

in creosote contaminated lake sediment [J]. Chemosphere, 1997, 38(5): 1135-1144.

- [21] Van der Lelie D, Regniers L, Borremans B, et al. The VITO TOX test, an SOS bioluminescence salmonella typhimurium test to measure genotoxicity kinetics [J]. Mutat Res, 1997, 389(2-3): 279-290.
- [22] Ptitsyn LR, Horneck G, Komova O, et al. A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant escherichia coli cells [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(11): 4277-4284.
- [23] Davidov Y, Rozen R, Smulski DR, et al. Improved bacterial SOS promoter & Colon: lux fusion for genotoxicity detection [J]. Mutat Res, 2000, 466(1): 97-107.
- [24] Steiberg SM, Poziomek EJ, Englemann WH, et al. Bioluminescent bioreporter integrated circuits novel whole-cell biosensors [J]. Trends Biotechnol, 1998, 16: 332-338.

(收稿日期: 2000-08-03)

(本文编辑: 于文霞)

【监督监测】

文章编号: 1001-5914(2001)04-0256-01

1997~1999年广州市自来水挥发性卤代烃水平分析

刘伟佳, 黄蓓, 麦永辉, 梁慧萍, 黄方琦

中图分类号: 123.1

文献标识码: C

为了解广州市自来水挥发性卤化烃水平及变化情况,为改善和提高饮水质量提供理论依据,于1997~1999年对广州市自来水厂及管网水设监测点进行监测。监测时间:每两月一次,连续3年(1997~1999年)分别对自来水厂的水源水及出厂水、管网水监测点进行监测。检测方法:按GB5750-1985《生活饮用水卫生标准检验方法》气相色谱法。

不同年份自来水氯仿(CHCl₃)、四氯化碳(CCl₄)含量见表1。经方差分析,自来水CHCl₃及CCl₄含量1997与1999年、1997年与1998年比较P均<0.05,1998年与1999年比较P均>0.05,说明自来水CHCl₃含量1997年大于1998和1999年,有下降的趋势,但逐年下降的趋势不明显。自来水CCl₄含量则1997年小于1998年和1999年,有上升的趋势,但每年上升的趋势不显著。两者的变化存在相反的情况,其具体原因有待进一步观察。

表1 不同年份自来水氯仿、四氯化碳含量(μg/L)

年份	氯仿			四氯化碳		
	n	范围	$\bar{x} \pm s$	n	范围	$\bar{x} \pm s$
1997	137	2.50~26.00	3.9±3.48	137	0.25~6.30	0.29±0.52
1998	191	2.50~25.70	3.04±2.40	191	0.25~9.40	0.88±1.09
1999	162	2.50~20.00	2.64±1.43	163	0.50~3.40	0.68±0.44

1997~1999年自来水水源水、出厂水、管网水CHCl₃、CCl₄含量见表2。经方差分析,水源水、出厂水、管网水CHCl₃含量出厂水与水源水比较P<0.05,出厂水与管网水、水源水与管

网水比较P均>0.05。CCl₄含量出厂水与管网水、水源水与管网水比较P均<0.05,出厂水与水源水比较P>0.05,说明CHCl₃含量出厂水大于水源水,可能与水源水经氯化消毒作用有关,但管网水与水源水CHCl₃的差别不明显,没有显示增加的情况。CCl₄含量出厂水及水源水均大于管网水,这可能与管网输送过程中CCl₄的挥发性作用有关。该结果与李大斌等^[1]报道的南充市饮用水挥发性卤代烃变化情况存在差别(管网水>水源水)。从表2可知,出厂水、管网水的氯仿水平为2.5~26μg/L,基本在国家生活饮用水标准范围之内,出厂水四氯化碳水平为0.25~6.3μg/L,出现了超标现象。

表2 不同水源自来水氯仿、四氯化碳含量(μg/L)

水源	氯仿			四氯化碳		
	n	范围	$\bar{x} \pm s$	n	范围	$\bar{x} \pm s$
水源水	143	2.5~14	2.88±1.79	143	0.25~9.4	0.79±1.10
出厂水	143	2.5~26	3.6±3.85	143	0.25~6.3	0.75±0.89
管网水	204	2.5~13	3.02±1.72	205	0.50~2.14	0.48±0.37

综上所述,自来水氯仿、四氯化碳含量在3年间存在着明显的差异,水源水、出厂水、管网水都受到了不同程度的挥发性卤代烃污染。为减少挥发性卤代烃污染,改善水质,必须采取标本兼治的防治措施,特别要加强水源的卫生防护工作。

参考文献

- [1] 李大斌,白体君,韩宇,等.南充市饮用水挥发性卤代烃污染水平研究[J].环境与健康杂志,1999,16(3): 164-166.

(收稿日期: 2000-12-22)

(本文编辑: 于文霞)