

# 基因工程微生物的环境监测及生物防御体系研究进展

李琴<sup>1,2</sup>, 伍一军<sup>1</sup>

1 中国科学院动物研究所分子毒理学实验室, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

**摘要:** 随着生物技术的发展, 研究人员构建出了大量具有特定功能的基因工程微生物, 这些基因工程微生物在实际应用时常受到限制, 因为它们释放到环境中有可能带来新的污染。为了减少或消除其对环境的潜在危害, 有必要采取措施对这些基因工程微生物进行监测和安全控制。通常要求这类基因工程微生物带有便于监测的检测标记以及能进行自消亡的主动生物防御体系。对基因工程微生物的检测标记以及主动生物防御体系的研究现状进行了综述。

**关键词:** 基因工程微生物, 环境监测, 主动生物防御体系, 自杀基因

## Progress of Environmental Monitoring and Biological Containment System on Genetically Engineered Microorganisms

Qin Li<sup>1,2</sup>, and Yijun Wu<sup>1</sup>

1 Laboratory of Molecular Toxicology, State Key Laboratory for Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

**Abstract:** With the development of biological technology, many genetically engineered microorganisms (GEMs) for special purposes have been constructed and developed, but their practical applications in the field are still limited because GEMs may cause new environmental contaminations. To minimize the potential risks, the organisms released to environment need to be monitored and restricted for their distribution. In the laboratory conditions, the GEMs can be wiped off when required using some new biological technologies. The recent progress of research on the monitoring methods and active biological containment system for GEMs were reviewed in this paper.

**Keywords:** genetically engineered microorganisms, environmental monitoring, active biological containment system, suicide gene

在过去的几十年间, 随着生物技术特别是重组 DNA 技术的发展, 结合实际需要, 研究人员创造出了多种基因工程微生物, 又被称为遗传工程微生物 (genetically engineered microorganisms, GEMs), 它们的目的和用途多种多样, 例如: 用于增强豆类植

物的固氮能力<sup>[1]</sup>, 控制农业害虫<sup>[2]</sup>, 工业生产甘油<sup>[3]</sup>, 富集金属离子<sup>[4]</sup>, 降解环境中的污染物<sup>[5]</sup>等。尽管 GEMs 具有广阔的应用前景, 许多具有特定功能的 GEMs 在实验条件下也表现出了很好的功能特性, 但是 GEMs 是一把双刃剑, 将其释放到环境中, 可

Received: July 18, 2007; Accepted: September 3, 2007

Supported by: the CAS Innovation Program (No. KSCX-IOZ-0701) and the National High Technology R & D Program of China (863 Program) (No. 2002AA601160).

Corresponding author: Yijun Wu. Tel: +86-10-64807251; Fax: +86-10-64807099; E-mail: wuyj@ioz.ac.cn

中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (No. KSCX-IOZ-0701) 及国家 863 项目 (No. 2002AA601160) 资助。

以发挥有益的作用,同时又有可能会影响环境中原有的生态系统而导致新的生物污染,给自然生态系统和人类健康带来潜在威胁。研究发现,GEMs所携带的重组质粒在土壤介质中可以水平转移入土著菌中,而且外源基因可以重组到土著菌的染色体中并改变土著菌的遗传信息<sup>[6]</sup>。通过盆栽大白菜的土壤环境评估GEMs的安全性发现,GEMs可对土壤中的土著细菌群落产生影响,在较短的时间(15 d)内就会导致土著细菌总数下降<sup>[7]</sup>。GEMs不像化学物质,它是一个自我复制的实体,一旦释放入环境,就可以自我繁殖,持续存在。如果发现它们在环境中存在不利的效应,很难将其彻底消除。为减少GEMs的潜在危险性,研究人员设计了主动生物防御(active biological containment, ABC)体系以便在需要的时候减少或消除GEMs的存在。无论是将GEMs释放到环境中还是要将它们从环境中消除,都需要对GEMs的存在、分布以及远期效应进行监测。而环境安全监测和生物防御则是GEMs安全应用的两个重要方面,本文对其研究现状进行如下综述。

## 1 基因工程微生物的环境监测研究

基因工程微生物的环境监测内容主要包括基因工程微生物在环境中的分布,对原有生态环境的影响,以及重组DNA在土著微生物中的转移。利用基因工程微生物本身所具有的许多特性,例如:抗性、生物发光、标记基因等,均可对其进行监测。

### 1.1 分子标志物

许多GEMs带有特殊的DNA序列,可以通过探针杂交或PCR扩增特异片段的方法进行检测。Khan等<sup>[8]</sup>利用特异引物扩增特定基因对土壤样品中的GEMs进行检测,检测限可以达到 $10^2$ 个细胞/克土壤。即使GEMs没有带有特殊序列,也可以在构建GEMs时专门插入一些特殊序列进行检测。Amici等<sup>[9]</sup>就曾经合成特定的寡核苷酸片段插入GEMs的染色体上以便于用PCR检测。Chaudhry等<sup>[10]</sup>则将一段来自紫狼尾草的与各种微生物没有杂交特异性的约0.3 kb的基因序列作为GEMs的检测序列。除了DNA探针技术外,RNA探针技术也被用于检测GEMs,Pitulle等<sup>[11]</sup>和Yang等<sup>[12]</sup>都曾经在GEMs中插入特殊的rRNA类序列,然后将该特异转录的rRNA作为检测物。利用PCR技术或核酸杂交技术

来检测环境中的微生物,虽然具有很高的敏感性,但由于涉及到环境样品中核酸的抽提和纯化,操作较为烦琐。

### 1.2 免疫学方法

GEMs可以产生特殊的抗原,制备相应抗体就可以利用抗原-抗体反应如杂交、酶联免疫法等进行监测。Ramos-Gonzalez等<sup>[13]</sup>制备单克隆抗体利用斑点杂交对假单胞菌进行监测,每个点少至100个菌就可以被检测。虽然利用抗体检测GEMs也是一个有效的方法,但在实际操作中由于抗体的效果会受到很多因素的影响而导致特异性和敏感性下降。

### 1.3 报告基因

报告基因(reporter gene)是指其表达产物易被检测,且易与内源性背景蛋白相区别的基因,已被广泛用于基因调控的研究<sup>[14]</sup>。由于产生的报告分子可以通过比色法或发光法等检测,相对简单,因此一些报告基因,如: $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶、荧光蛋白等也被广泛用于GEMs的检测研究。

#### 1.3.1 $\beta$ -半乳糖苷酶

$\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -D-galactopyranoside)是来源于大肠杆菌lacZ基因编码的由相同多肽亚单位组成的四聚体蛋白,可以切割 $\beta$ -半乳糖苷键,能够水解合成的生色底物O-硝基苯- $\beta$ -半乳糖苷酶(O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, ONPG),产生O-硝基酚(O-nitrophenol),后者在水溶液中显黄色,可以通过分光光度法分析。该酶还可以分解X-gal产生蓝色物质,这样表达该酶的微生物在含有X-gal的平板上显现蓝色而被观察到,分子生物学技术中的兰白斑筛选技术就是基于此原理。 $\beta$ -半乳糖苷酶曾用于假单胞菌及固氮螺菌的追踪标记<sup>[15,16]</sup>,Drahoš等<sup>[17]</sup>用 $\beta$ -半乳糖苷酶标记假单胞菌,可以在1g土壤样品中检测到低于10个菌落形成单位(colony forming unit, CFU)的Lac<sup>+</sup>转化子。

#### 1.3.2 荧光素酶

荧光素酶(luciferase, Luc)是能够催化不同底物,如:荧光素(luciferin)、腔肠素(coelenterazine)等发生氧化,发出荧光的一类酶,可从多种昆虫、海洋生物和原核生物中分离得到。作为报告基因分析,最常用的Luc是细菌Luc、萤火虫Luc和花虫Luc,它们没有宿主核苷酸上的同源性,反应底物的化学结构也不相关,但本质上都是释能反应<sup>[18]</sup>。Luc检测方

便、快速,对宿主代谢影响小,不仅在哺乳动物细胞研究中有广泛的应用,也被大量用于细菌标记研究。Ratray 等<sup>[19]</sup>用 Luc 标记大肠杆菌,可在 5 min 内完成检测,在液体中的检测限能够达到  $10^2$  个/mL,在土壤中的检测要稍低,大约是  $2 \times 10^2 \sim 6 \times 10^3$  个/g。Ripp 等<sup>[20]</sup>的研究也显示利用 Luc 特性检测微生物要比标准的选择性平板培养技术的准确性高。

### 1.3.3 荧光蛋白

荧光蛋白(fluorescent protein, FP)家族是从水螅虫纲和珊瑚类动物中发现的分子量为 20~30 kD 的同源性蛋白。1962 年,Shimomura 等<sup>[21]</sup>首先从维多利亚水母中分离出绿色荧光蛋白(green FP, GFP),1992 年,Prasher 等<sup>[22]</sup>首次克隆得到了 GFP 的 cDNA,2 年后,Chalfie 等<sup>[23]</sup>在大肠杆菌中成功表达了能发出荧光的 GFP。之后陆续证明 GFP 在多种异源细胞及多种细菌中都可以表达,被广泛用作原核细胞和真核细胞的报告基因。正常野生型 GFP 由 238 个氨基酸组成,分子量为 27~30 kD。GFP 的生色基团是由丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸(Ser65-Tyr66-Gly67)形成的环化三肽所构成,只有生色基团包被在完整的 GFP 蛋白中才能发出荧光<sup>[24]</sup>。GFP 生色基团的形成无种属特异性,在原核和真核细胞中都能表达,其表达产物对细胞没有毒害作用,并且不影响细胞的正常生长和功能。GFP 在紫外光激发下发绿色荧光的最大吸收峰为 395 nm,另一小吸收峰为 470 nm,最大激发波长为 509 nm,在 540 nm 处有一肩峰<sup>[25]</sup>。

不像 Luc 发光需要底物,光激发 FP 发射荧光是一个特异性的独立过程,除了氧分子外,不需要任何协同因子或底物的参与。随着对 GFP 的研究的不断深入,根据其结构和生物化学特性进行改造而获得的突变体不断涌现。将 GFP 发光结构中的 Ser65 用 Thr 替代, Phe64 用 Leu 替代得到的增强型绿色荧光蛋白(enhanced GFP, EGFP)在 488 nm 激发波长下产生的荧光强度比野生型 GFP 提高了 35 倍,而且在激发后的 16~24 h 仍可稳定地检测到荧光<sup>[26]</sup>。此外,还经过突变产生了一些黄色 FP(yellow-green emission GFP, YFP)<sup>[27]</sup>、蓝色 FP(blue emission GFP, BFP)<sup>[28]</sup>、紫外激发优化的突变系(UV-Optimized GFP, GFPuv)<sup>[29]</sup>、红移突变蛋白(Red-Shifted GFPs, RSFP)<sup>[30]</sup>等。GFP 作为遗传标记和报告基因具有检测方便、荧光稳定、无毒害、可以进行实时监测等

特点,已经被广泛用于分子生物学、细胞生物学、动植物学研究等各个领域。早在 1996 年,Leff 和 Leff<sup>[31]</sup>就用 GFP 标记大肠杆菌,通过平板培养和显微镜观察监测 GEMs 在水环境中的存活。Gory 等<sup>[32]</sup>用 GFP 监测在肉类食品上常存在的一种乳酸菌,结果显示无论是利用质粒表达 GFP 还是将 GFP 整合到该菌的染色体上,都对该菌的生长没有影响,在实验条件下或干的香肠样品上都可以通过荧光显微镜监测 GFP 阳性菌的生长。GFP 作为一种新型的非酶性报告基因,不但可以单独表达用于监测,还能与多种不同蛋白质的 N 端或 C 端融合表达而不影响各自的特征,在一些 GEMs 的构建中就采用了 GFP 融合表达的方式达到利用荧光监测的目的,在这种情况下,荧光特性不仅可以用来监测菌体的存在还可以指示与 GFP 融合表达的目的蛋白的活性<sup>[33-35]</sup>。

1999 年,Matz 等<sup>[36]</sup>从印度洋-太平洋地区的珊瑚虫中分离出 6 种与 GFP 同源的 FP,并鉴定了它们的光谱性质,其中,来源于 *Discosoma striata* 的红色 FP(原名为 drFP583,后来被重新命名为 DsRed)受到研究者的重视。DsRed 是由 225 个氨基酸残基组成的 28 kD 大小的蛋白,激发波长和发射波长较长,发射峰位于培养基、组织培养器材及细胞成分等产生的荧光背景范围之外,具有较高的信噪比,最大吸收波长为 558 nm,最大发射波长为 583 nm<sup>[37]</sup>。DsRed 内部的三肽 Gln66-Tyr67-Gly68 能够自我催化形成与 GFP 类似的生色团<sup>[38,39]</sup>。与 GFP 相比,DsRed 具有对 pH 不敏感和抗光漂白能力强的优点,但它也存在成熟缓慢、易形成四聚体的缺点<sup>[40]</sup>。四聚体结构为 DsRed 的成熟和荧光激发所必须,但有些时候确实妨碍了 DsRed 在融合表达中的应用。对 DsRed 的成熟动力学监测表明,在室温条件下,至少需要 48 h 才能达到最大荧光值的 90%,成熟缓慢的特性妨碍了 DsRed 在基因短期表达检测中的应用<sup>[37]</sup>。为了克服 DsRed 的缺点,人们采用随机突变或定点突变对 DsRed 进行优化,其突变株的特点主要是减少寡聚化,加快成熟速率和改变波长等。像突变体 DsRed2 有 6 个氨基酸的替代,其成熟时间比野生型 DsRed 大大缩短,而且聚集化也大大减少<sup>[41]</sup>;突变体 mRFP1 具有 33 个氨基酸突变,虽然荧光强度减弱,但却是一个单体蛋白,成熟速度大大加快<sup>[42]</sup>。DsRed 自被发现后,很快就被应用于多个研究领域,

由于与 GFP、Luc 等具有不同激发波长和发射波长,与后两者联用可以进行荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer) 研究,该技术可以用于检测蛋白质的相互作用<sup>[43,44]</sup>。DsRed 与 GFP 也可以用于双色标记,研究微生物与植物的相互作用<sup>[45]</sup>以及微生物共生现象<sup>[46]</sup>等,还可以用于基因改造的病毒 (genetic modified baculovirus) 的监测<sup>[47]</sup>。

## 2 生物防御系统的研究进展

为了将 GEMs 的潜在危险性降到最小,研究人员设计了可以调控的自毁灭机制即 ABC 体系来控制 GEMs 的存活,主要通过自杀基因的调控性表达来实现。虽然 ABC 不能保证 100% 的生物防范率,但它却有助于减少 GEMs 的潜在危险性。1987 年, Molin 等<sup>[48]</sup>利用色氨酸启动子控制自杀基因 *hok* 的表达,成功进行了细菌条件性自杀实验,1991 年, Contreras 等<sup>[49]</sup>正式提出 ABC 设想,此后 ABC 系统的研究有了较快发展,用于 ABC 体系的自杀基因的种类越来越多,ABC 模式也越来越完善。

### 2.1 自杀基因的种类

ABC 系统主要是通过对自杀基因的调控性表达来控制细胞存活,目前已经有多种自杀基因用于 ABC 系统(见表 1),它们通过不同的机制导致细胞死亡,如:破坏细胞膜、引起细胞裂解、分解细胞遗传物质等。常用的自杀基因 *hok*、*gef*、*relF* 等是一类来源于大肠杆菌的同源基因家族,编码 50-52 个氨基酸的毒性多肽,可以在细胞膜上产生小孔破坏细胞膜而导致细胞死亡<sup>[50]</sup>。在细菌中表达 $\lambda$ 噬菌体的裂解基因 S、R 和 R<sub>Z</sub>, $\phi$ X174 噬菌体的裂解基因 E 或 T7 噬菌体的溶菌酶基因都可以使细胞发生可诱导性的裂解死亡<sup>[51-53]</sup>。来源于枯草芽孢杆菌的 *sacB* 基因的编码产物是果聚糖蔗糖酶,可以改变革兰氏阴性细菌的蔗糖敏感性,在蔗糖存在时,引起外周胞质中果聚糖的大量聚积而导致细胞裂解<sup>[54]</sup>,同是来源于该菌的 *sspC* 基因编码一种小分子的酸溶性蛋白,可以通过改变大肠杆菌的 DNA 构象而导致细胞死亡<sup>[55]</sup>。来源于大肠杆菌 F 质粒的毒性蛋白 CcdB 可以干扰 DNA 促旋酶的功能而导致菌体死亡<sup>[56]</sup>。其他的像链霉抗生物素蛋白 (streptavidin) 也被用于自杀体系研究,该蛋白对生物素有强结合力,而生

物素是许多重要代谢途径中的辅酶,它的缺失可以导致细胞死亡<sup>[57]</sup>。大肠杆菌素 E3 基因编码一种 58 kD 的 RNA 酶,可以特异性地切割 16S rRNA,导致细胞死亡<sup>[58]</sup>。*ecoRIR* 基因编码 *EcoR* I 限制性内切酶,对没有经过 *EcoR* I 甲基转移酶修饰作用的宿主细胞 DNA 有降解作用。将 *ecoRIR/ecoRIM* 基因联合应用于 ABC 系统对革兰氏阴性菌可表现出良好的自杀效率<sup>[59-61]</sup>。来自沙雷氏菌属的胞外核酸酶基因在去除前导肽序列后在细菌或酵母菌中诱导表达产生的核酸酶可以降解细胞内 DNA 导致细胞死亡,利用该基因进行自杀调控可以减少细胞死亡时 DNA 的扩散<sup>[62,63]</sup>。

表 1 自杀基因种类

Table 1 Suicide genes

Suicide genes	Origin of genes	Lethal reason
<i>hok</i>	<i>E. coli</i> <sup>[50]</sup>	Membrane-destabilizing polyp
<i>gef</i>	<i>E. coli</i> <sup>[50]</sup>	Eptides, destroying the cell
<i>relF</i>	<i>E. coli</i> <sup>[50]</sup>	membrane or cell wall
<i>S-R-R<sub>Z</sub></i>	Bacteriophage $\lambda$ <sup>[51]</sup>	Lysing cells
<i>E</i>	Bacteriophage $\phi$ X174 <sup>[52]</sup>	Lysing cells
<i>T7Lys</i>	Phage T7 <sup>[53]</sup>	Lysing cells
<i>sacB</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>[54]</sup>	Lysing cells by accumulation of levan in periplasm
<i>sspC</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>[55]</sup>	Altering DNA conformation
<i>ccdB</i>	<i>E. coli</i> <sup>[56]</sup>	Influencing the DNA gyrase
<i>streptavidin</i>	<i>Streptomyces avidinii</i> <sup>[57]</sup>	Binding biotin
<i>colE3</i>	<i>E. coli</i> <sup>[58]</sup>	Cleaving the 16S rRNA
<i>ecoRIR</i>	<i>E. coli</i> <sup>[59]</sup>	Degrading the host DNA that does not modified by <i>EcoRI</i> methyltransferase
<i>nuc</i>	<i>Serratia marcescens</i> <sup>[62]</sup>	Degradation of cellular DNA

### 2.2 现有的生物防御系统模式

ABC 体系主要是通过化学底物或物理条件的改变来控制自杀基因的表达从而控制 GEMs 的存活。采用何种方式控制细胞死亡关键在于自杀基因上游的可诱导启动子的选择。如 $\lambda$ 噬菌体的热诱导启动子 P<sub>R</sub> 和 P<sub>L</sub> 可以通过温度改变启动表达,基于乳糖操纵子的启动子 P<sub>tac</sub>、P<sub>lac</sub> 可以通过 IPTG 或半乳糖的添加启动表达,色氨酸启动子 P<sub>trp</sub>、碱性磷酸酶启动子 *phoA* 则分别通过培养环境中色氨酸或磷酸盐浓度的改变来启动表达。许多自杀基因都被构建到了不同的启动子下游,通过环境条件的改变来启动自杀基因表达,像 *relF* 和 *hok* 基因都曾被克隆到 *lac* 启动子

下游, 通过 IPTG 诱导启动自杀基因的表达<sup>[64,65]</sup>。沙雷氏菌的核酸酶基因被构建到热启动子  $P_L$  下游, 升高培养温度时可以诱导表达核酸酶, 分解细胞内的遗传物质导致细胞死亡, 这种方式不仅限制 GEMs 的存活而且减少重组 DNA 向其他微生物的转移<sup>[62,63]</sup>。Contreras 等<sup>[49]</sup>将恶臭假单胞菌的 TOL 质粒 pWW0 的代谢切割途径应用于细菌的生物防御系统研究, 这是一个与底物(也就是需要去除的污染物)相联系的防御系统, 它利用  $P_{tac}$  启动子控制自杀基因 *gef* 的表达, 又利用  $P_m$  启动子控制  $P_{tac}$  启动子的阻遏蛋白 LacI 的表达, 而  $P_m$  的启动与否又与 XylS 蛋白的效应子(安息香酸盐)是否存在有关。当 XylS 效应子存在时,  $P_m$  启动子启动合成 LacI, 后者可以阻止  $P_{tac}$  启动子启动自杀基因 *gef* 的表达, 细胞存活。当缺乏 XylS 效应子时,  $P_m$  启动子不启动合成 LacI, 则  $P_{tac}$  启动子缺乏阻遏蛋白可以启动自杀基因 *gef* 的表达, 导致细胞死亡。这一调控模式的优点是它以要分解的底物为效应子, 但也存在明显的不足, 那就是它需要的发挥作用的效应子(安息香酸盐)浓度要高于在环境中该底物的实际存在浓度, 另外就是它仍然存在一个较高的自杀逃逸率。Ronchel 等<sup>[66]</sup>则将该调控模式转移到假单胞菌的染色体上, 将 *gef* 和  $\phi$ X174 裂解基因 *E* 分别作为自杀基因并进行了比较, 发现两者都有较好的自杀效果, 都可以改变膜通透性, 导致细胞内容物外放, 引起细胞死亡, 但由  $\phi$ X174 裂解蛋白 E 介导的细胞自杀要快于 Gef 蛋白。Szafranski 等<sup>[57]</sup>率先将与生物素有不可逆结合能力的链霉菌抗生物素蛋白用于 ABC 系统研究, 在该研究中, T7 噬菌体 RNA 聚合酶-溶菌酶系统、反义 RNA 技术以及大肠杆菌的 LacI 阻遏蛋白被联合使用控制自杀基因的表达。该体系可以将自杀逃逸率控制在  $10^{-7}$ ~ $10^{-8}$ /细胞/代。ABC 体系中存在的最大问题就是部分细胞存在自杀逃逸现象, 最常见的原因是自杀元件的突变<sup>[67]</sup>。当然, 表达系统的突变或其他导致 GEMs 产生自杀功能抗性的突变也可以造成细胞逃逸。研究人员不断改进 ABC 模式以增强自杀效率。Ronchel 和 Ramos 等<sup>[68]</sup>将基于 pWW0 的代谢切割途径的 ABC 体系模式应用于天冬氨酸- $\beta$ -半醛脱氢酶缺失突变菌株构建了双重自杀防御系统来增强自杀效率(见图 1)。利用  $P_m$  启动子控制宿主菌天冬氨酸- $\beta$ -半醛脱氢酶基因 *asd* 以及 LacI 的表达。

这样当有 Xyls 效应子存在时, 宿主菌表达天冬氨酸- $\beta$ -半醛脱氢酶以及 LacI, 宿主菌存活, 当 Xyls 效应子不存在时, 宿主菌表达自杀基因 *gef*, 同时天冬氨酸- $\beta$ -半醛脱氢酶缺陷, 宿主菌死亡, 通过该防御机制可将致死逃逸率降低到  $10^{-9}$ /细胞/代以下。Torres 等<sup>[69]</sup>联合大肠杆菌素 E3 及其对抗物 E3 免疫蛋白, *EcoR* I 的限制-修饰系统两个毒性-抗毒性体系构建了作用于不同靶标的双重自杀机制体系。在该研究中, 具有抗毒性的 E3 免疫蛋白和 *EcoR* I 的甲基转移酶基因被插入宿主细胞的染色体上, 而具有毒性作用的大肠杆菌素 E3 和 *EcoR* I 限制性内切酶基因则被构建到质粒上。通过这种组合方式不仅提高了防御效率而且可以降低基因转移频率, 因为质粒离开宿主细胞转移到别的受体细胞后, 由于其携带毒性基因会导致后者死亡。为减少由于自杀基因突变而引起的自杀效率降低还可以将自杀元件以双拷贝的形式作用于宿主菌。自杀基因 *relF* 和 *gef* 组成元件的双拷贝形式都使得自杀效率大大提高<sup>[64,70]</sup>。我们实验室在以来源于沙雷氏菌的核酸酶为自杀基因的 ABC 体系研究中也发现该酶的双拷贝形式的自杀效率要高于单拷贝形式(Li and Wu, 待发表资料)。

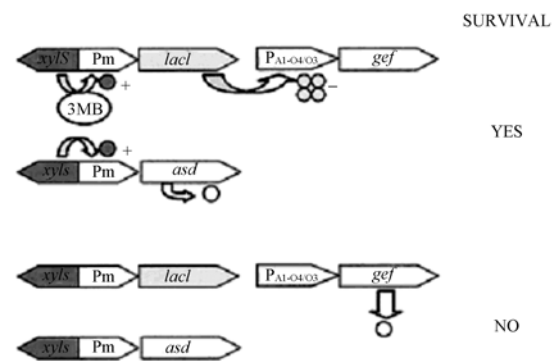


图 1 双重防御模式系统<sup>[63]</sup>

Fig. 1 Scheme of a dual containment system<sup>[63]</sup>

$P_m$ : promoter for the *meta* pathway; *lacI*: repressor for the *lac* operon; *xylS*: positive regulator of  $P_m$ ; *asd*: aspartate- $\beta$ -semialdehyde dehydrogenase gene;  $P_{A1-04/O3}$ : modified promoter for the *lac* operon; *gef*: killing gene from *E. coli*. 3MB: 3-methylbenzoate, XylS effector

在 ABC 系统的构建中, 选择合适的诱导剂进行调控以及提高自杀效率都是关键所在。通过自杀元件的多拷贝形式可以大大提高自杀效率, 但诱导剂的选择却始终没有得到很好的解决。2004 年, 加州理工学院的生物工程学家 You 等<sup>[71]</sup>重建了 *Vibrio fischeri* 的自然细胞讯号途径为 GEMs ABC 体系的调

控研究带来了新的思路。*Vibrio fischeri* 是生活在深海乌贼光细胞上的细菌, 具有数量感应基因, 会让每个细菌产生被称为自诱导(autoinducer)的化学作用并且随着族群的成长逐渐累积。当个体细菌侦测到其生活环境有足够的自诱导就会开启它们的生物体发光基因。他们将数量感应基因移植到大肠杆菌中并用其控制自杀基因的表达, 当细菌达到一定数量时, 就会开启自杀基因的表达导致细菌死亡。这一回路的建立可以使 GEMs 在产生一定数量的后代后自杀, 可以用于 ABC 系统的调控, 避免 GEMs 逃脱进入环境之中。

### 3 展望

近年来, 基因工程技术及其产业化的迅速发展使得人们越来越关注其产品的生物安全性。现代分子生物学方法和技术的兴起, 为 GEMs 的环境监控提供了有力工具。利用 FP 标记的方法是一简便可行的监测方法, 无需任何底物或辅助因子的添加, 检测简单, 且生物体发光能够被持续实时监测。GEMs 的安全使用不仅需要具有方便的监测系统还需要具有安全控制系统。经过近 20 年的研究, GEMs 的 ABC 系统的防御能力已有很大提高, 但其实际应用还有待改进, 因为在体外具有高效的自杀机制不代表他们在自然环境中也具有同样的作用, 细胞的生理状态在体外实验和现实环境中可能很不相同, 对诱导剂以及自杀机制的敏感性也有可能不同。理想的 GEMs 在应用于环境时应该不带有任何抗生素抗性, 以防止耐药菌的产生, 这需要在构建 GEMs 时采用新的筛选机制; GEMs 的自杀调控机制最好与其要作用的底物相关联, 即在作用底物存在时, 自杀基因不表达, GEMs 存活, 当 GEMs 的功能执行完后, 表达自杀基因, GEMs 死亡。因此, 如何将 ABC 系统应用于生产实际, 真正有效地控制 GEMs 在环境中的分布, 与 GEMs 的检测标记联合应用, 构建出安全有效、检测方便的 GEMs 仍然有待进一步研究。

我国的基因工程研究发展比较迅速, 但到目前为止, 对 GEMs 的生态学和释放到环境后的安全性问题尚未见较深入的研究报道。中科院动物所分子毒理学实验室在国内率先开展基因工程菌安全控制的实验研究, 不仅成功地构建出带有 GFP 标记和具

有农药降解功能的基因工程菌<sup>[35]</sup>, 而且也开展了 ABC 体系的研究, 在构建 ABC 体系时, 我们通过 DNA 重组技术改建质粒, 特意避免使用以往惯用的 IPTG 这一既昂贵又有毒的诱导剂, 而成功地采用廉价无毒的阿拉伯糖来调控自杀基因的表达(Li and Wu, 待发表资料), 同时还进一步尝试将该 ABC 体系应用于具有荧光标记的基因工程菌中。相信通过对 GEMs 安全性控制的深入研究, 不仅有助于将 GEMs 安全有效地应用于生产实际, 而且还将促进我国基因工程产品的健康发展。

### REFERENCES

- [1] Birkenhead K, Manian SS, O'Gara F. Dicarboxylic acid transport in *Bradyrhizobium japonicum*: use of *Rhizobium meliloti* *dct* gene(s) to enhance nitrogen fixation. *J Bacteriol*, 1988, **170**(1): 184-189.
- [2] Bonning BC, Hammock BD. Development and potential of genetically engineered viral insecticides. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1992, **10**: 455-489.
- [3] Du LQ, Wei YT, Chen FZ, et al. Co-expression of *gpd1* and *hor2* from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol*, 2005, **21**(3): 385-389.  
杜丽琴, 韦宇拓, 陈发忠, 等. 酿酒酵母 *gpd1* 和 *hor2* 基因在大肠杆菌中的共表达. *生物工程学报*, 2005, **21**(3): 385-389.
- [4] Deng X, Li QB, Lu YH, et al. Uptake of nickel from industrial wastewater by genetically engineered *Escherichia coli* JM109. *Chin J Biotechnol*, 2003, **19**(3): 343-348.  
邓旭, 李清彪, 卢英华, 等. 基因工程菌大肠杆菌 JM109 富集废水中镍离子的研究. *生物工程学报*, 2003, **19**(3): 343-348.
- [5] Jiang JD, Gu LF, Sun JQ, et al. Construction of multi-functional genetically engineered pesticides-degrading bacteria by homologous recombination. *Chin J Biotechnol*, 2005, **21**(6): 884-891.  
蒋建东, 顾立锋, 孙纪全, 等. 同源重组法构建多功能农药降解基因工程菌研究. *生物工程学报*, 2005, **21**(6): 884-891.
- [6] Devers M, Henry S, Hartmann A, et al. Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (*atz*) from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maize-cultivated soil. *Pest Manag Sci*, 2005, **61**(9): 870-880.
- [7] Zhang ZY, Li L, Ren HY, et al. Biosafety evaluation of genetically engineered bacillus thuringiensis WG-001 and 1125BG in potting soil. *J Saf Environ*, 2005, **5**(2): 118-122.  
张振宇, 李林, 任红燕, 等. 苏云金芽胞杆菌基因工程菌 WG-001 和 1125BG 在盆栽土壤中的安全性评估. *安全与环境学报*, 2005, **5**(2): 118-122.
- [8] Khan AA, Jones RA, Cerniglia CE. Rapid method for the

- detection of genetically engineered microorganisms by polymerase chain reaction from soil and sediments. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1998, **20**(2): 90–94.
- [9] Amici A, Bazzicalupo M, Gallori E, *et al.* Monitoring a genetically engineered bacterium in a freshwater environment by rapid enzymatic amplification of a synthetic DNA “ number-plate ”. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, **36**(2): 222–227.
- [10] Chaudhry GR, Toranzos GA, Bhatti AR. Novel method for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(5): 1301–1304.
- [11] Pitulle C, Hedenstierna KO, Fox GE. A novel approach for monitoring genetically engineered microorganisms by using artificial, stable RNAs. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(10): 3661–3666.
- [12] Yang Y, Fox GE. An Archaea 5S rRNA analog is stably expressed in *Escherichia coli*. *Gene*, 1996, **168**(1): 81–85.
- [13] Ramos-Gonzalez MI, Ruiz-Cabello F, Brettar I, *et al.* Tracking genetically engineered bacteria: monoclonal antibodies against surface determinants of the soil bacterium *Pseudomonas putida* 2440. *J Bacteriol*, 1992, **174**(9): 2978–2985.
- [14] Naylor LH. Reporter gene technology : the future looks bright. *Biochem Pharmacol*, 1999, **58**(5): 749–757.
- [15] Hattemer-Frey HA, Brandt EJ, Travis CC. Small-scale field test of the genetically engineered lacZY marker. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1990, **11**(3): 253–261.
- [16] Barry GF. Permanent insertion of foreign genes into the chromosomes of soil bacteria. *Bio/Technology*, 1986, **4**: 446–449.
- [17] Drahos DJ, Hemming BC, McPherson S. Tracking recombinant organisms in the environment;  $\beta$ -galactosidase as a selectable nonantibiotic marker for fluorescent pseudomonads. *Bio/Technology*, 1986, **4**: 439–444.
- [18] Hastings JW. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, 1996, **173**(1 Spec No): 5–11.
- [19] Rattray EA, Prosser JI, Killham K, *et al.* Luminescence-based nonextractive technique for in situ detection of *Escherichia coli* in soil. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(11): 3368–3374.
- [20] Ripp S, Nivens DE, Werner C, *et al.* Bioluminescent most-probable-number monitoring of a genetically engineered bacterium during a long-term contained field release. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **53**(6): 736–741.
- [21] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962, **59**: 223–239.
- [22] Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, *et al.* Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992, **111**: 229–233.
- [23] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**(5148): 802–805.
- [24] Cody CW, Prasher DC, Westler WM, *et al.* Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 1993, **32**(5): 1212–1218.
- [25] Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(26): 12501–12504.
- [26] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, **173**(1 Spec No): 33–38.
- [27] Miyawaki A, Llopis J, Heim R, *et al.* Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, **388**(6645): 882–887.
- [28] Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol*, 1996, **6**(2): 178–82.
- [29] Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, *et al.* Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 315–319.
- [30] Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, **373**(23): 663–664.
- [31] Leff, LG, Leff AA. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 3486–3488.
- [32] Gory L, Montel MC, Zagorec M. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **194**: 127–133.
- [33] Wu CF, Cha HJ, Rao G, *et al.* A green fluorescent protein fusion strategy for monitoring the expression, cellular location, and separation of biologically active organophosphorus hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**(1): 78–83.
- [34] Du W, Huang Z, Flaherty JE, *et al.* Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(2): 834–836.
- [35] Li Q, Chen R, Li W, *et al.* A genetically engineered *Escherichia coli*, expressing the fusion protein of green fluorescent protein and carboxylesterase B1, can be easily detected in the environment following degradation of pesticide residues. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**(9): 1357–1362.
- [36] Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, *et al.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 969–973.
- [37] Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 11984–11989.
- [38] Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, *et al.* The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 11990–11995.
- [39] Wiehler J, von Hummel J, Steipe B. Mutants of *Discosoma* red fluorescent protein with a GFP-like chromophore. *FEBS Lett*, 2001, **487**: 384–389.
- [40] Miyawaki A. Green fluorescent protein-like proteins in reef Anthozoa animals. *Cell Struct Funct*, 2002, **27**: 343–347.
- [41] Bevis BJ, Glick BS. Rapidly maturing variants of the

- Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 83–87.
- [42] Campbell RE, Tour O, Palmer AE, *et al.* A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(12): 7877–7882.
- [43] Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, *et al.* pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J*, 2002, **31**(3): 375–383.
- [44] Arai R, Nakagawa H, Kitayama A, *et al.* Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein. *J Biosci Bioeng*, 2002, **94**(4): 362–364.
- [45] Bloemberg GV, Wijffjes AH, Lamers GE, *et al.* Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, **13**: 1170–1176.
- [46] Dunn AK, Millikan DS, Adin DM, *et al.* New *rfp*- and pES213-derived tools for analyzing symbiotic *Vibrio fischeri* reveal patterns of infection and *lux* expression in situ. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(1): 802–810.
- [47] Jinn TR, Kao SS, Tzen JT, *et al.* Coral red fluorescence protein as genetic modified baculovirus tracer. *J Biotechnol*, 2005, **119**(3): 255–259.
- [48] Molin S, Klemm P, Poulsen LK, *et al.* Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids. *Bio/Technology*, 1987, **5**: 1315–1318.
- [49] Contreras A, Molin S, Ramos JL. Conditional-suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 1504–1508.
- [50] Gerdes K, Poulsen LK, Thisted T, *et al.* The *hok* killer gene family in gram-negative bacteria. *New Biol*, 1990, **2**: 946–956.
- [51] Kloos DU, Stratz M, Guttler A, Steffan RJ, Timmis KN. Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 7352–7361.
- [52] Tedin K, Witte A, Reisinger G, *et al.* Evaluation of the *E.coli* ribosomal *rrnB* P1 promoter and phage-derived lysis genes for the use in a biological containment system: A concept study. *J Biotechnol*, 1995, **39**: 137–148.
- [53] Schweder T, Hofmann K, Hecker M. *Escherichia coli* K12 *relA* strains as safe hosts for expression of recombinant DNA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **42**: 718–723.
- [54] Steinmetz M, Le Coq D, Aymerich S, *et al.* The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol Gen Genet*, 1985, **200**: 220–228.
- [55] Setlow JK, Randesi M, Adams JG, *et al.* Mutation and killing of *Escherichia coli* expressing a cloned *Bacillus subtilis* gene whose product alters DNA conformation. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 2943–2950.
- [56] Engelberg-Kulka H, Glaser G. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol*, 1999, **53**: 43–70.
- [57] Szafranski P, Mello CM, Sano T, *et al.* A new approach for containment of microorganisms: dual control of streptavidin expression by antisense RNA and the T7 transcription system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 1059–1063.
- [58] Munthali MT, Timmis KN, Diaz E. Use of Colicin E3 for Biological Containment of Microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1805–1807.
- [59] O'Connor CD, Humphreys GO. Expression of the *EcoR* I restriction-modification system and the construction of positive-selection cloning vectors. *Gene*, 1982, **20**: 219–229.
- [60] Pingoud A, Jeltsch A. Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur J Biochem*, 1997, **246**: 1–22.
- [61] Torres B, Jaenecke S, Timmis KN, *et al.* A gene containment strategy based on a restriction-modification system. *Environ Microbiol*, 2000, **2**(5): 555–563.
- [62] Ahrenholtz I, Lorenz MG, Wackernagel W. A conditional suicide system in *Escherichia coli* based on the intracellular degradation of DNA. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 3746–3751.
- [63] Balan A, Schenberg AC. A conditional suicide system for *Saccharomyces cerevisiae* relying on the intracellular production of the Serratia marcescens nuclease. *Yeast*, 2005, **22**: 203–212.
- [64] Knudsen SM, Karlstrom OH. Development of efficient suicide mechanisms for biological containment of bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 85–92.
- [65] Bej AK, Perlin MH, Atlas RM. Model suicide vector for containment of genetically engineered microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2472–2477.
- [66] Ronchel MC, Molina L, Witte A, *et al.* Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expression of heterologous killing genes. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 4904–4911.
- [67] Ramos JL, Andersson P, Jensen LB, *et al.* Suicide microbes on the loose. *Biotechnology (NY)*, 1995, **13**: 35–37.
- [68] Ronchel MC, Ramos JL. Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2649–2656.
- [69] Torres B, Jaenecke S, Timmis KN, *et al.* A dual lethal system to enhance containment of recombinant microorganisms. *Microbiology*, 2003, **149**(Pt12): 3595–3601.
- [70] Jensen LB, Ramos JL, Kaneva Z, *et al.* A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 3713–3717.
- [71] You L, Cox RS, Weiss R, *et al.* Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. *Nature*, 2004, **428**: 868–871.