

李梦南, 郑广宏, 王磊, 等. 2009 热处理重组质粒 DNA 的复性及其在水环境中的降解特性 [J]. 环境科学学报, 29(9): 1800-1805

Li M N, Zheng G H, Wang L, et al. 2009 Renaturation and degradation of thermo-treated waste plasmid DNA in an aquatic environment [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(9): 1800-1805

热处理重组质粒 DNA 的复性及其在水环境中的降解特性

李梦南¹, 郑广宏¹, 王磊^{1*}, 付小花¹, 肖伟², 乐毅全¹, 任大明²

1 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092

2 复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

收稿日期: 2008-12-08 修回日期: 2009-04-27 录用日期: 2009-07-03

摘要: 为了考察热处理后的重组 DNA 进入水环境后可能存在的环境风险, 以 pET-28b 质粒为材料, 以质粒相对转化效率为指标, 考察了热变性重组质粒 DNA 的复性可能性, 并在此基础上构建了人工模拟水环境系统, 研究了热变性质粒 DNA 在水环境中的降解速率和影响因素。结果表明, 热变性 pET-28b 质粒经过 30 min 后, 其转移活性可以得到恢复, 在 4 ~ 37℃ 之间, 温度越高越有利于热变性质粒的复性。热处理过程中未被降解的质粒 DNA 进入水环境后, 在 pH 值为 7.8 时降解速率相对较慢, 在 pH 值为 5.6.9 的条件下, 降解较快, 但在任何 pH 下, 1.0 h 后仍存在未降解的质粒 DNA。水环境中的 NaCl 对热处理质粒 DNA 有一定的保护作用, 而且这种作用是随着 NaCl 质量分数的提高而增强。进入水环境中的热变性 DNA 有足够的时间复性, 从而可能发生基因转移。因此, 这些热处理的质粒 DNA 进入环境后理论上存在一定的生态风险。

关键词: 热处理; 质粒 DNA; 水环境; 复性; 转化; 降解

文章编号: 0253-2468(2009)09-1800-06 中图分类号: X171 文献标识码: A

Renaturation and degradation of thermo-treated waste plasmid DNA in an aquatic environment

LIM engnan¹, ZHENG Guanghong¹, WANG Lei^{1*}, FU Xiaohua¹, XIAO Wei², LE Yiqian¹, REN Daming²

1 State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092

2 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433

Received 8 December 2008 received in revised form 27 April 2009 accepted 3 July 2009

Abstract Plasmid pET-28b was used as a test plasmid to investigate the potential environmental risk caused by thermo-treated recombinant DNA. Firstly, plasmid DNA transformation was performed to evaluate the re-naturation efficiency of the thermo-treated plasmid DNA, and then simulated aquatic environments were constructed to determine the persistence of un-decayed plasmid DNAs in the aquatic environment after thermo-treatment. The results showed that the transforming activity of the thermo-treated plasmid DNA could be recovered to a certain extent after re-naturing for 30 min. From 4 ~ 37°C, the higher the temperature, the more transforming activity of denatured plasmid DNA will be recovered. When thermo-treated plasmid DNAs were discharged into simulated aquatic environments with pH from 5 ~ 9, the persistence of un-decayed plasmid DNAs at pH 7 and 8 exceeded those at 5, 6 or 9, but at any pH some could persist for 1.0 h or more. Higher ionic strengths further inhibited decay of the recombinant plasmid in the simulated aquatic environment. These results indicate that recombinant DNAs which are not destroyed during the thermo-treatment process cannot be degraded completely in a short time in the aquatic environment, which means when they are discharged into aquatic environment, they may have enough time to re-nature and transform, thus resulting in gene diffusion.

Keywords thermo-treatment; plasmid DNA; simulated aquatic environment; renaturation; transformation; degradation

1 引言 (Introduction)

DNA 在自然环境中的降解往往受到多种生态

因子的影响, 裸露的 DNA 片段受到环境中内切酶的作用, 其降解速率可能会比较高。有关裸露 DNA 片段释放到自然环境后的降解或转移情况曾有学者

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 40571145, 40871217)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40571145, 40871217)

作者简介: 李梦南 (1984-), 男; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: celwang@yahoo.com

Biography: LIMengnan (1984-), male; * Corresponding author E-mail: celwang@yahoo.com

在土壤中作过实验, 即把提纯后的转基因烟草 DNA 片段直接释放到模拟土壤系统中, 观察 DNA 的稳定性及其降解半衰期, 实验结果表明, 经过 40d 仍有 0.1% 的目标基因片段未被降解 (Wilmer *et al.*, 1996). 另一项研究是将转基因烟草的 DNA 片段加入模拟土壤系统中, 5d 后就无法从土壤中检测到所加的 DNA (Paget *et al.*, 1998). 还有田间实验研究表明, 经过与土壤中酶和微生物几个月的相互作用, 仍然能够检测到转基因烟草 DNA 的存在 (DEFRA, 2002). 虽然不同的研究者因为实验方法的差别, 对于 DNA 在土壤中降解的半衰期有不同的结论. 但是诸多研究结果都表明, 尽管自然界中存在各种各样的微生物和酶, 仍然有一部分裸露 DNA 在排放到自然环境中后, 能在相当一段时期内保持其结构的完整性. 这就意味着如果基因重组 DNA 进入环境后难以在短时间内被彻底破坏, 将存在基因转移的风险. 为防止重组 DNA 向环境中释放并导致基因污染, 实验与生产过程中产生的重组 DNA 一般均需经预处理后才能排放 (卢英方等, 2003).

根据以往的研究可知, 热处理过程对于废弃重组 DNA 片段的处置并非十分有效, 它主要是使 DNA 变性 (李梦南等, 2008a). 同时, 生物实验室废水中所含的多种有机物和无机离子往往会在热处理的过程中对 DNA 起到保护作用, 使其不能被充分、有效地降解 (李梦南等, 2008b). 由于 DNA 结构的特殊性, 变性 DNA 在适合条件下可以恢复其原有的空间构象和生物活性 (Klamp, 1998). 这就意味着这些在热处理中未被彻底破坏的重组 DNA 被排放到水环境中, 如不能在短时间内被彻底降解, 理论上存在着复性并发生基因水平转移的可能性. 热变性 DNA 的结构和性质与天然 DNA 有显著差异, 而且水环境的流动性与土壤系统也不同. 目前, 国内外尚无有关热变性重组 DNA 在水环境中的降解速率与其影响因素的详细研究与报道.

鉴于此, 为考察热处理废弃重组 DNA 进入水环境后可能存在的环境风险, 本文对热变性重组质粒 DNA 的复性可能性进行研究, 并在此基础上探讨热变性质粒 DNA 在水环境中的降解速率和其影响因素, 以期判断热变性重组 DNA 在自然水环境中发生复性与转移的可能性提供参考.

2 实验材料与方法 (Materials and methods)

2.1 质粒 DNA 的制备

质粒: pET-28h 质粒的制备与浓度检测参考李梦南等 (2008a) 的方法. 本次实验制备的质粒 DNA 浓度为 $44.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, 转化成拷贝数的具体算法参照公式 (1).

$$n = N_A \times m \cdot M_{rDNA}^{-1} \quad (1)$$

式中, n 表示 DNA 拷贝数 ($\text{copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); m 为 DNA 质量 (g); M_{rDNA} 为双链 DNA 分子的分子量; N_A 为阿伏加德罗常数, 取值为 6.02×10^{23} . 经计算质粒浓度为 $7.6 \times 10^{10} \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, DNA 纯度主要根据光密度 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 的比值确定, 此次抽提的质粒 DNA $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 比值为 1.79 符合 PCR 检测要求.

2.2 其它材料的准备

麦穗鱼 (*Pseudorasbora parvus*) 购于上海曲阳花鸟市场, 阿根廷皇冠水草 (*Echinodorus argentinensis*) 和石英砂用以构建人工模拟水环境.

2.3 质粒 DNA 的时间梯度复性

将拷贝数为 $1 \times 10^{10} \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA 溶液稀释到 $1 \times 10^9 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 然后分装到 3 个 EP 管内, 分别在沸水浴中加热 30min, 然后置于 37°C 分别放置 0、30、60min 使其复性, 最后置于 0°C 冰浴备用, 本实验重复 3 次.

2.4 质粒 DNA 的温度梯度复性

将拷贝数为 $1 \times 10^{10} \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA 溶液稀释到 $1 \times 10^9 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 然后分装到 3 个 EP 管内, 分别在沸水浴中加热 30min, 然后置于 4、20、37°C 各 30min 使其复性, 最后置于 0°C 冰浴备用, 本实验重复 3 次.

2.5 模拟水环境的构建

由于天然水环境的开放性和流动性, 因此, 很难在天然系统中研究 DNA 在水环境中的降解. 为研究经过热处理的 DNA 在排放到水体中后能否被有效、快速地降解, 实验设计了一个模拟的水环境. 该水环境由鱼、水、水草和沉积物组成. 在 9 个 2L 的烧杯中各放置 70g 沉积物和一定量的鱼、水草, 添加蒸馏水至 1.5L, 每天曝气 3 次, 每次 20min. 7d 后分别测定每个系统的 TOC 值和微生物总量. 在投入质粒 DNA 前, 分别用 HCl、NaOH 及 NaCl 溶液将其 pH 及 NaCl 质量分数调至如表 1 所示水平.

表 1 7d后模拟水环境的组成及环境条件

Table 1 The contents of the simulated aquatic environments after 7 days

实验条件	TOC值 / (mg L^{-1})	微生物总量 / ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	麦穗鱼质量* (2条) / g	阿根廷皇冠水草质量 / g
pH = 7.0	1.442	2.3×10^3	0.45 0.47	12
pH = 5.0	1.024	1.9×10^3	0.53 0.66	14
pH = 6.0	1.286	1.7×10^3	0.41 0.42	10
pH = 8.0	1.124	2.1×10^3	0.46 0.47	12
pH = 9.0	1.302	2.0×10^3	0.46 0.52	13
$\omega(\text{NaCl}) = 0.05\%$	1.216	2.7×10^3	0.42 0.48	16
$\omega(\text{NaCl}) = 0.10\%$	1.541	2.3×10^3	0.45 0.49	16
$\omega(\text{NaCl}) = 0.25\%$	1.097	2.9×10^3	0.40 0.57	17
$\omega(\text{NaCl}) = 0.50\%$	1.386	2.4×10^3	0.49 0.51	15

注: * 表示每条麦穗鱼的质量.

2.6 水环境中热变性质粒 DNA 降解效率分析

将拷贝数为 $1 \times 10^9 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA 溶液放入 EP 管, 沸水加热 10min 后, 迅速向每个烧杯中加入 15 μL 热变性质粒 DNA 溶液. 先隔 1h 取 1 次水样, 2h 后, 每隔 12h 取 1 次水样. 取得的样品以定量 PCR 法检测其中残留的可扩增模板数 (质粒上特异性的 245bp 卡那霉素片段), 从而得出热变性质粒 DNA 的降解效率. 由于被扩增的这一片段的长度为 245bp, pET-28b 质粒的长度为 5368bp. 假设质粒 DNA 的降解/破坏是一个随机过程, 即整个 DNA 在任一点处断裂的概率相等, 则可根据公式 (2) 估算出全长质粒 DNA 在任一位点断裂的半衰期.

$$t_{1/2} = t_{1/2, 245\text{bp}} \times (245/5368) \quad (2)$$

式中, $t_{1/2}$ 为全长质粒降解半衰期 (h); $t_{1/2, 245\text{bp}}$ 为 245bp 片段降解半衰期 (h).

2.7 质粒 DNA 的定量 PCR 检测

质粒 pET-28b 中特异性片段的定量扩增方法参考李梦南等 (2008) 的方法. 荧光定量 PCR 反应之前, 先将所有样品进行经乙醇沉淀, 以纯化 DNA, 并去除部分干扰. 考虑到模拟水环境中存在一些微生物, 可能会对实验结果造成影响. 因此, 在加入热处理质粒 DNA 之前, 先取各个烧杯中的水样, 8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15s 后进行定量 PCR 反应, 并把这些结果作为实验本底值. 该实验本底值为 $1.63 \times 10^2 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 后续所有样品的测定值与本底值的差值即为实际质粒可扩增片段的模板数.

3 结果 (Results)

3.1 热处理质粒 DNA 的复性

质粒转化是分子生物学常规研究方法之一, 以未经热处理的质粒 DNA 在大肠杆菌中的转化子数作为标准, 来比较各样品的相对转化率, 由此可以

对各样品中所含未被降解并具有转化活性的质粒 DNA 进行定量. 为了解变性后的质粒 DNA 是否会发生复性, 以及不同复性时间对其复性的影响, 以沸水加热 0min 质粒 DNA 样品的转化子数作为标准, 计算各不同复性时间下复性样品的相对转化率 (图 1). 从图 1 可以看出, 经过不同时间的复性后, 质粒的转化活性会有显著提高, 30min 复性后的质粒转化活性最高. 以 30min 作为复性时间, 对不同复性温度下复性样品的相对转化率进行研究, 结果见图 2. 从图 2 可以看出, 经过 30min 的复性后, 不同温度下质粒的转化活性同样有不同程度的提高, 37 $^{\circ}\text{C}$ 为变性质粒 DNA 的最佳复性温度. 上述结果表明, 热处理的质粒 DNA 经过一段时间复性后其转移活性有较显著的提高. 如果热处理的质粒 DNA 进入水环境后在短时间内不能被彻底降解, 其转化复性会提高, 从而存在基因转移的风险. 鉴于此, 有必要对热处理质粒 DNA 在进入水环境后的持久性、降解特性及其影响因素进行研究.

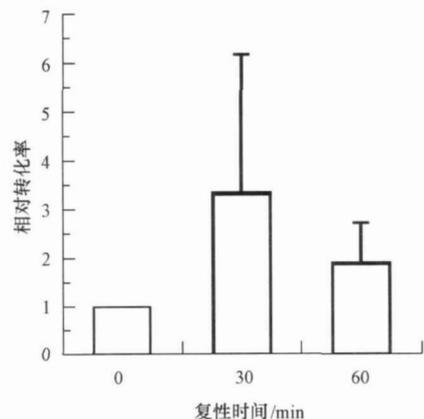


图 1 不同复性时间下热处理质粒 DNA 的相对转化率

Fig. 1 The transformation efficiency of plasmid DNA pET-28b after different renaturation periods

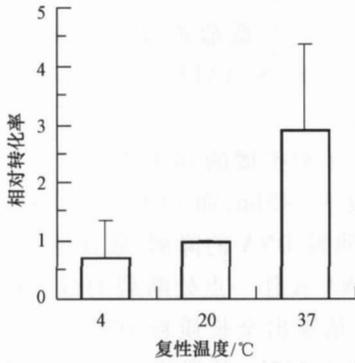


图 2 不同复性温度下热处理质粒 DNA 的相对转化率

Fig. 2 The transformation efficiency of plasmid DNA pET-28b at different renaturation temperatures

3.2 热变性质粒 DNA 在不同 pH 水环境中的降解速率

研究表明, pH 会对热处理过程中质粒 DNA 的降解产生一定的影响 (Weaver, 2000), 为此考察了热变性质粒 DNA 在不同 pH 的水环境中的降解规律. 由于自然界水环境中的 pH 值一般在 5~9 之间, 因此, 选取此 pH 范围来观察热变性质粒 DNA 的降解规律. 由于不同的 pH 值会对水生生态系统产生不同的影响, pH 值过高或过低, 都会抑制水生植物的光合作用和微生物的分解作用, 其中, 前者会影响到水体的溶解氧状况和鱼类的呼吸条件, 后者又会影响到水中有机质的浓度. 为了观察 pH 对热变性质粒降解速率的影响, 同时尽量避免其它环境因子变化而造成的干扰, 模拟水环境先经过每天 3 次、每次 20min 的曝气, 在加入热处理质粒 DNA 之前, 再将水环境 pH 调至所需值.

模拟水环境中加入热处理质粒 DNA 后于不同时间取水样, 经 8000 r min⁻¹ 离心 15s 上清液经乙醇沉淀纯化后, 再稀释到原来的体积 (200μL) 进行定量 PCR 反应, 结果见图 3. 从图 3 可以看出, 过高或过低的 pH 条件均会加速质粒 DNA 的降解, 在 pH 值为 5 或 9 的情况下, 根据公式 (2), 经过 1.1h 的降解便无法从水中检测到完整质粒 DNA, 24h 后便无法从水中检测到可扩增质粒 DNA 片段的存在, 其中, pH 值为 9 时降解的最快. pH 值为 7、8 时 DNA 降解速率相对较慢, 根据公式 (2), 2.2h 后才无法检测到完整质粒 DNA 的存在, 直至 48h 后才无法检测到该特性质粒 DNA 片段的存在, 可视为完全降解.

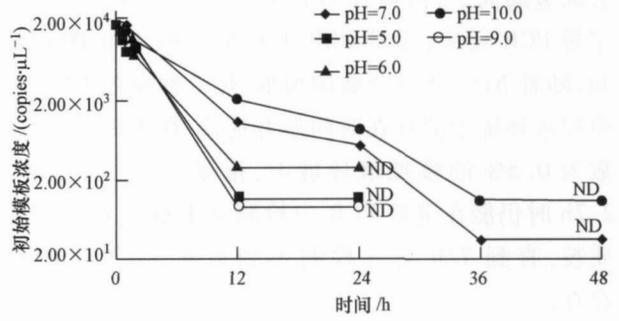


图 3 热变性质粒 DNA 在不同 pH 水环境的降解规律 (ND: 未能检测到可扩增片段)

Fig. 3 Degradation curve of the 245bp fragment of thermo-treated pET-28b in a simulated aquatic environment under different pH conditions (ND indicates that the 245bp fragment of thermo-treated pET-28b was not detectable)

3.3 水环境中的 NaCl 质量分数对热变性质粒 DNA 降解的影响

热处理过程中, NaCl 的存在可显著保护质粒 DNA 免于被破坏 (Stryer, 1999), 而水体中往往也含有一定浓度的无机离子, 因此, 考察了 NaCl 质量分数对进入水环境的热变性质粒 DNA 降解的影响 (图 4). 淡水水体的 NaCl 质量分数一般在 0.02%~0.50% 之间 (Stumm et al., 1981), 本实验选取的 NaCl 质量分数梯度涵盖了这个范围. 为了尽量避免其它环境因子的变化而造成的差异, 同样经过一段时间的曝气后, 在需要加入热处理质粒 DNA 之前再将水环境 NaCl 质量分数调至所需值. 模拟水环境中加入热处理质粒 DNA 后于不同时间取水样, 经 8000 r min⁻¹ 离心 15s 上清液经乙醇沉淀纯化, 以

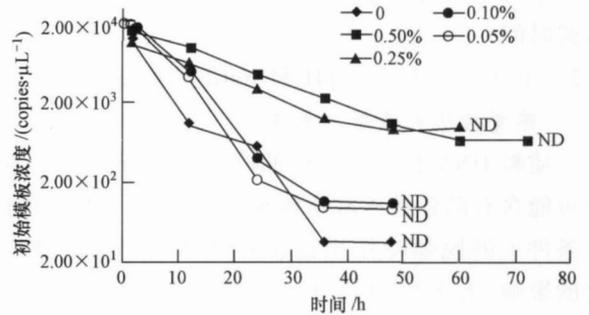


图 4 热变性质粒 DNA 在不同 NaCl 质量分数水环境的降解规律 (ND: 未能检测到可扩增片段)

Fig. 4 Degradation curve of the 245bp fragment of thermo-treated pET-28b in a simulated aquatic environment under different NaCl mass fraction conditions (ND indicates that the 245bp fragment of thermo-treated pET-28b was not detectable)

去除金属离子,再稀释到原来的体积(200 μ L)进行定量PCR反应,定量PCR的结果见图4。由图4可知,随着NaCl质量分数的增加,热变性质粒DNA在模拟水环境中的存在时间显著延长。在NaCl质量分数为0.5%的模拟水环境中,根据公式(2)推算,2.7h时仍能在定量PCR中检测到未被降解的完整质粒,直到72h后才检测不到质粒DNA片段的存在。

4 讨论(Discussion)

4.1 不同复性条件对热处理质粒DNA复性效率的影响

不同复性时间和复性温度实验表明,热变性质粒DNA在适当条件下可以恢复原有的二级空间结构和转化活性,但温度对质粒DNA的复性有较大的影响。当在37 $^{\circ}$ C进行复性时,复性是相当理想的;在4 $^{\circ}$ C时,DNA的复性效果较差。一般认为,比解链温度(T_m)低25 $^{\circ}$ C左右的温度是复性的最佳条件,远离此温度,复性速度就越慢。从热运动的角度考虑,在4~37 $^{\circ}$ C之间温度越低,DNA分子的热运动减弱越显著,互补链结合的机会越小。因此,维持在 T_m 值以下,较高的温度更有利于复性。

热处理后的质粒DNA在4~37 $^{\circ}$ C之间,30min后可以恢复其二级结构和转化活性。因此,热处理(热变性)的重组质粒DNA在排放进入水环境后如不能被快速降解和破坏,可能会发生复性和基因转移。鉴于此,为判断热处理(变性)重组DNA进入水环境后的潜在风险,必须研究热处理(热变性)质粒DNA在水环境中的降解速率以及在各种条件下的残留时间。

4.2 水环境中不同的pH和NaCl质量分数条件对热变性质粒降解的影响

质粒DNA在水环境中的降解一方面是因为水中可能含有的各种核酸水解酶,另一方面DNA在酸性条件下的脱嘌呤作用也会对其降解速率造成一定的影响。大多数内切酶或外切酶为酸性酶,酶活性最高的pH范围一般在4.5~6.0之间。pH值为5.6的情况下,质粒DNA的降解速率较快可能是受到这些作用的影响(Nelson *et al.*, 2000); pH值为9时质粒DNA的降解速率最快,可能是因为碱性条件会使磷酸二酯键水解断裂,还可能与低盐浓度、高pH值条件下内切酶识别和切割序列发生低特异性有关。例如,EcoR I在正常条件下识别并切割

5'-GAATTC-3'序列,但Polisky等(1993)对EcoR I的早期研究表明,在低盐浓度、高pH值条件下,EcoR I还可能切割N/AATTN序列,从而强化内切酶的切割效率。

由于实验中被扩增的pET-28b质粒DNA的特异性片段长度为245bp,而pET-28b质粒的长度为5368bp。假设质粒DNA的降解破坏是一个随机过程,即整个DNA在任一点处断裂的概率相等,则可根据公式(2)估算出全长质粒DNA在任一位点断裂的半衰期约为245bp片段半衰期的1/22(245bp/5368bp \approx 1/22)。

由此可见,虽然pH对热变性质粒DNA的降解影响较大,但在任何pH情况下,1h之内仍有较多的质粒DNA未被降解。理论上,这部分热变性质粒DNA在这段时间内可能复性并发生基因转移。有关质粒复性与转移的可能性与诱发因素之间的关系还有待深入研究。

NaCl质量分数越高,其对DNA的保护作用就越强,这可能是因为较高的NaCl质量分数会在一定程度上限制核酸内切酶的活性。NaCl对DNA降解的影响规律应该也适合于天然水体,天然水体中往往含有一定量的无机离子。因此,热变性质粒DNA在天然水体中可能会存在较长时间,这将为热变性DNA的复性与转移提供足够的时间,这一点应当引起重视。自然水体的环境条件与模拟水体还有一定的差异,影响DNA降解的环境因素还不仅仅是pH和NaCl质量分数,其他影响因素的研究也有待进一步深入。

尽管自然水环境的条件和影响因素更为复杂,但本研究结果初步表明,进入水环境的热变性重组质粒DNA在较短时间内难以被彻底降解,仍然会在环境中存留一段时间,这意味着进入水环境中的热变性DNA有足够的时间复性。当然,为了提供热变性质粒DNA是否在水环境中发生基因转移的确凿证据,还需要采用现代分子生物学技术分析并验证复性的重组质粒DNA在各种气象、环境条件下是否发生向水环境中其他生物体的水平转移,并研究可能诱发质粒DNA水平转移的特殊气象、环境条件,从而最终确定热变性重组质粒DNA在复杂水环境中是否存在基因水平转移并导致基因污染的可能性。

5 结论(Conclusions)

1) 在一定条件下热变性的pET-28b质粒经过

30min 复性后其转化活性可以一定的恢复, 在 4℃ ~ 37℃ 范围内, 温度越高越利于热变性质粒的复性. 因此, 热变性的质粒 DNA 进入自然环境后理论上存在着复性并恢复转移活性的可能.

2) 水环境中 pH 的变化会对热处理质粒 DNA 的降解造成不同程度的影响. 在 pH 值为 5.6~9 的情况下, 24h 后已无法从水中检测到质粒 DNA 片段的存在, 根据公式 (2) 推算, 经过 1.1h 的降解, 便无法从水中检测到完整质粒 DNA, 其中, pH 值为 9 时降解最快. pH 值为 7.8 时 DNA 降解速率相对较慢, 根据公式 (2) 推算, 2.2h 后才无法检测到完整质粒 DNA 的存在.

3) 水环境中的 NaCl 对热处理质粒 DNA 有一定的保护作用, 而且这种作用是随着 NaCl 质量分数的提高而增强. 在水环境中 NaCl 质量分数达到 0.5% 时, 根据公式 (2) 推算, 2.7h 时仍能在定量 PCR 中检测到未被降解的完整 DNA 质粒.

责任作者简介: 王磊 (1963—), 教授, 主要研究方向为环境生物技术、环境微生物和工业微生物发酵. Tel: 021-65981831; E-mail: celwang@yahoo.com.

参考文献 (References):

Klum P H. 1988. Conformational transitions in nucleic acids [C]. Studies in Modern Thermodynamics. Biochemical Thermodynamics. New York: Elsevier, 131.

李梦南, 郑广宏, 王磊, 等. 2008. 重组质粒 DNA 在热处理过程中的降解/变性规律研究 [J]. 环境科学学报, 28 (5): 945-951.

Li M N, Zheng G H, Wang L, *et al*. 2008. The decay/denaturation of

plasmid DNA by thermo-treatment process [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 28(5): 945-951 (in Chinese).

李梦南, 郑广宏, 王磊, 等. 2009. 废弃重组质粒 DNA 热处理效率的环境影响因素 [J]. 环境科学学报, 29(6): 1190-1194.

Li M N, Zheng G H, Wang L, *et al*. 2009. The environmental factors affecting the efficiency of thermo-treatment for disposal of waste plasmid DNA [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(6): 1190-1194 (in Chinese).

卢英方, 任民, 许利峰. 2003. SARS 过后的思考——建设部关于建立医疗垃圾处理系统的调查报告 [J]. 建设科技, 9: 48-51.

Lu Y F, Ren M, Xu L F. 2003. Consideration after SARS—An MOHURD investigation report considering setting up the medical wastes treatment system [J]. Construction Science & Technology 9: 48-51 (in Chinese).

Nelson D L, Cox M M. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry (3rd edition) [M]. New York: Worth Publishers, 347-591.

Paget E, Lebrun M, Freyssié G, *et al*. 1998. The fate of recombinant plant DNA in soil [J]. Euro J Soil Biol 34(2): 81-88.

Pearce B D, Wolfe M S, Welsh J P. 2002. Review of knowledge of the potential impacts of GMOs on organic agriculture [A]. Proceedings of the 14th IFOAM World Congress [C]. Canada: Victoria, 298.

Robinson C R, Sligar S G. 1993. Molecular recognition mediated by bound water: A mechanism for star activity of the restriction endonuclease EcoRI [J]. J Mol Biol 234(2): 302-304.

Styer L. 1999. Biochemistry (5th edition) [M]. New York: W. H. Freeman and Company, 476-477.

Stumm W, Morgan J J. 1981. Aquatic Chemistry [M]. New York: John Wiley & Son Inc, 249-502.

Weaver R F. 2000. Molecular Biology [M]. New York: McGraw-Hill Companies Inc, 1123-1124.

Wilmner F, Seidler R J, Watrud L S. 1996. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms [J]. Mol Ecol 5: 603-613.