

Molecular Microbiology

Diagnostic Principles and Practice

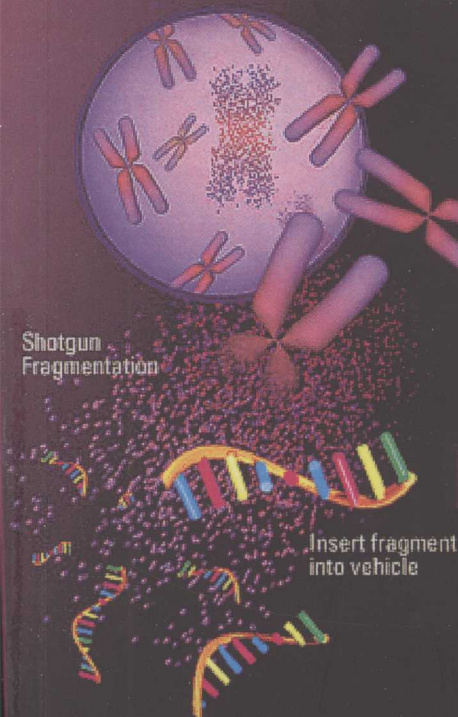
分子微生物学

诊断原理与实践

(美)珀西恩 (D. H. Persing) 等著
柯昌文 邓小玲 王洪敏 主译

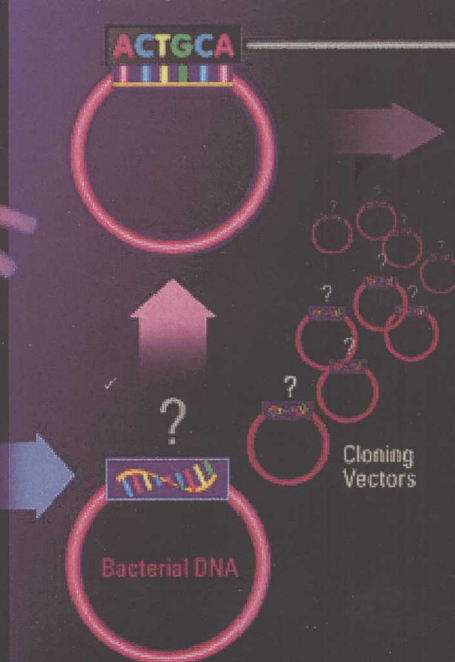
Library Construction

Nucleus & Chromosomes



Random Sequencing Phase

Identify through Sequencer



Assembly & Annotation

Realign DNA

Map Sequence to Chromosomes

Annotation





Molecular Microbiology

Diagnostic Principles and Practice

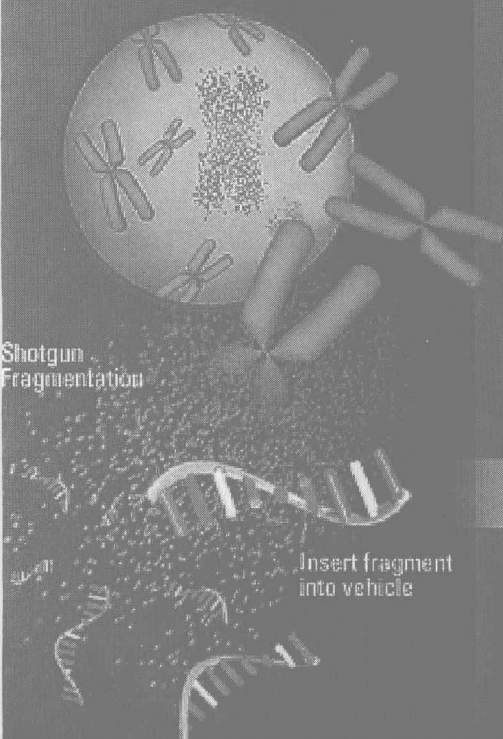
分子微生物学

诊断原理与实践

(美)珀西恩 (D. H. Persing) 等著
柯昌文 邓小玲 王洪敏 主译

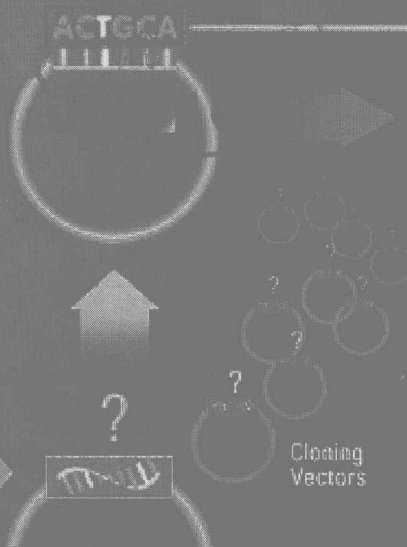
Library Construction

Nucleus & Chromosomes



Random Sequencing Phase

Identify through Sequencer

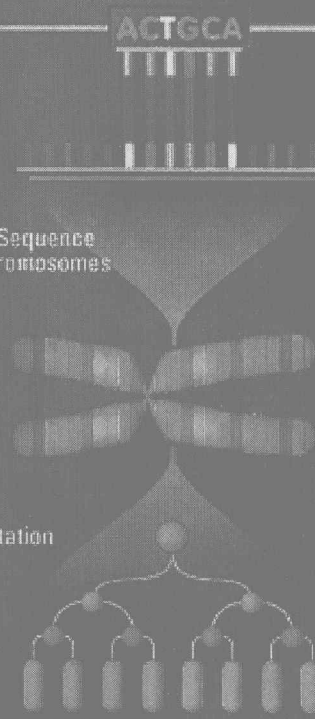


Assembly & Annotation

Realign DNA

Map Sequence to Chromosomes

Annotation



中山大学出版社

· 广州 ·

Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice

By David H. Persing, Fred C. Tenover, James Versalovic, Yi-Wei Tang, Elizabeth R. Unger, David A. Relman, and Thomas J. White

Copyright © 2003 by ASM Press. All rights reserved. Translated and published by arrangement with ASM Press, Washington, DC; USA.

本书中文简体字版由 ASM Press 授权中山大学出版社出版并在全球独家发行, 版权为中山大学出版社所有。未经出版者预先书面允许, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何内容。

广东省版权局著作权合同登记号 图字: 19-2006-001 号

版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

分子微生物学: 诊断原理与实践/ (美) 珀西恩 (D. H. Persing) 等著; 柯昌文, 邓小玲, 王洪敏主译. —广州: 中山大学出版社, 2008. 8

书名原文: Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice
ISBN 978-7-306-03141-9

I. 分… II. ①珀… ②柯… ③邓… ④王… III. 分子生物学: 微生物学 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 113810 号

出版人: 叶侨健

策划编辑: 周建华

责任编辑: 周建华

封面设计: 曹巩华

责任校对: 海 生

责任技编: 黄少伟

出版发行: 中山大学出版社

电 话: 编辑部 020-84111996, 84113349

发行部 020-84111998, 84111981, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275 传 真: 020-84036565

网 址: <http://www.zsup.com.cn> E-mail: zdcbs@mail.sysu.edu.cn

印 刷 者: 佛山市浩文彩色印刷有限公司

规 格: 787 mm × 1092 mm 1/16 56.25 印张 4 彩插 1381 千字

版次印次: 2008 年 8 月第 1 版 2008 年 8 月第 1 次印刷

定 价: 120.00 元

本书如有印装质量问题影响阅读, 请与出版社发行部联系调换

本书编委会

主 译：柯昌文 邓小玲 王洪敏

副 主 译：陈秋霞 黄 平 扈庆华

编译人员：（按姓氏拼音排序）

陈 谷 陈秋霞 邓小玲 方 苓 扈庆华

黄 平 柯碧霞 柯昌文 李 晖 马 聪

裴福全 孙 巍 王洪敏 吴新伟 颜 瑾

张贤昌 张 欣 郑 夔 朱海明 邹丽容

主 审：杨杏芬 汤一茅

序



新发和突发传染病仍是人类健康的主要威胁，在传染病经过航空旅行和城市化快速传播时，或者怀疑有新的感染性疾病出现时，能尽快鉴别病原体是关键的一环。因此，提高实验室快速检测能力，开展基于实验室的传染病早期预警监测，是控制新发和突发传染病的基本策略。

现代分子生物学技术为传染病的诊断、监测和预警提供了强大的技术支撑，并使检测所有的人类传染病病原体成为可能。由于历史的原因，分子诊断技术在我国的应用还未普及，理论水平低，缺乏实践经验，特别是因实验室污染问题、PCR 技术的应用受到限制等原因。由 David H. Persing 等著、美国微生物学会出版社出版的 *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice* (《分子微生物学：诊断理论与实践》) 一书系统地介绍了现代分子生物学技术理论和诊断实践，几乎涵盖了传染病快速诊断和分子流行病学研究的所有技术。广东省疾病预防控制中心及其承建的广东省应急病原学检测重点实验室出于提升广东省的应急检测和研究能力的责任感，为了更好地应对新发和突发传染病，组织翻译了本书。本书的出版非常及时，可将书中的先进技术和方法应用于自己的实际工作中，势必将大大促进我国的病原微生物的检测水平和传染病控制能力，造福于中国人民。

中国疾病预防控制中心病毒病所
病毒生物技术国家工程研究中心

侯云德 院士



2008. 8. 24

原著前言

《诊断分子微生物学》(原理与应用)于1993年开始了首批图书的发行,我们当中有几个人都参加了该次发行。这本书囊括了当时所有分子诊断试验的核心技术,广泛收集了当时认为是高知识水平的实验方案。正如大家所知道的,这本书将分子生物学原理与实际实验操作相结合,目的是为了能够更好地指导那些热衷于以核酸扩增为基础、进行实验研究的实验室主管、实验技术人员和学生。这本书中的许多实验方案具有较高的知识水准,直到现在仍在使用,因此我们认为它走在了时代的前列,堪称书之经典。这本书中有许多章节,比如污染控制,今天的内容与当时的内容仍一脉相承。

在目前汇编的这本书中,我们想走捷径,试着模仿第一版的风格和组织形式,但很快意识到这个领域发展迅速,过去的一个知识点很容易剖析成许多单个的实验方案。繁杂、易污染的技术逐渐被有自我控制的半自动系统所取代;DNA测序技术在人类基因组计划的资助下得到发展,并逐步渗透到临床实验室;有用的实验方案也很容易从互联网和出版物中得到;核酸扩增实验的商业化,在1993年还只是个幻想,现正被广泛使用。事实上,再过10年以后,作为一个整体而言,这个领域需要重新被认识,它已经步入了分子诊断学的后现代化时代。现在检验师被要求、有时是被恳求去扩展他们的试验内容。这些检验在20世纪90年代中期使用过的《诊断分子微生物学》。庆幸的是,临床微生物学家在新技术水平以及对新技术的熟悉程度从整体上讲都有了巨大的飞跃。系统发生分析正迅速地成为主流的新技术手段,并要求我们的词典增加诸如“bootstrapping”和“parsimonious”等新词汇;DNA测序和微阵列技术将拓展我们的科技见解。此外,宿主遗传信息与微生物报告整合在一起进行综合分析也将日常化,在某种程度上,这样的分析结果对病人的管理会产生积极的影响。现在经授权能够使用的新技术不断出现,包括毛细管电泳、定量核酸扩增技术、实时快速PCR、长片段PCR扩增、系统发生分析、单核苷酸多态性(SNP)检测、分子分型和微阵列,以及一些待命名的技术。一些被认为已经灭绝的人类病原微生物,如天花和炭疽,在2001年“911”恐怖事件袭击后突然变得备受关注。

尽管有许多优秀的图书涵盖了一些在研究和分析上达到一定深度的单个技术领域,但是,我们还没有发现一本有权威的图书能够将所有分子微生物学知识和相关内容串在一起,这样微生物学家、病理学家和传染病学专家,以及实验技术人员和进修人员更易理解和掌握这种知识的关联和相互联系。因此,在反复推敲和讨论之后,我们决定不能局限在《诊断分子微生物学》的框架内来编写这本书,而是需要一种新的方法。于是,我们组织了一个来自多学科领域的新的编辑队伍。经过大家的不懈努力,一部具有创新性和高瞻远瞩的著作诞生了,这本书就是《分子微生物学:诊断原理与实践》。有些人可能对我们在这

这本书中因没有包含实验方案而不太满意,但是经过我们长时间的讨论之后,认为:实验方案在一定程度上已经成为某种实验诊断所依赖的平台,一种诊断可能需要几种不同的技术,如实时 PCR、PCR 酶联免疫测定、传统 PCR、TMA、SDA 等。所以,我们试图为临床实验主管和技术人员收集编写一些基础知识,即使再过 5 年,仍然能够帮助他们与快速发展的分子微生物学相关实验技术保持一致。

《分子微生物学:诊断原理与实践》分成两部分。第一部分:诊断原理,这一部分综述了 DNA 探针技术、核酸扩增方法、核酸测序策略、分子分型方法和核酸扩增产物检测新方法。第二部分:诊断应用,这一部分注重这些技术在细菌、病毒、真菌和寄生虫等病原体的检测和鉴定中的应用。我们也没有忽视疾病的主体,书中还包括了遗传药理学和宿主遗传对传染性疾病预防的影响等重要部分。最后,还讨论了实验室标准化、职能考核和质量控制等关键领域。我们还在书中插入了许多来自编者们的从事分子微生物学的私人图片,希望读者欣赏这些插图。

我们要对本书的所有作者表达我们最真诚的谢意;我们也非常感谢 ASM 出版社,感谢他们按照我们的意愿,在出版后期更换了多个章节的内容;特别要感谢的是我们的配偶和/或子女,他们为这本书做出了很多牺牲,至少失去了很多相聚的时间。

David H. Persing

Fred C. Tenover

James Versalovic

Yi-Wei Tang

Elizabeth R. Unger

David A. Relman

Thomas J. White

译者的话

广东省应急病原学重点实验室自 2003 年立项建设以来,重点以病原微生物分子流行病学研究和分子诊断技术开发来提升广东省的应急检测和研究能力。为了加强病原微生物应急检测实验室与欧美科学家的交流和联系,2005 年由广东省疾病预防控制中心与中心的科学顾问汤一苇教授在广州组织举办了一期公共卫生微生物研讨会,并就病原微生物的分子诊断和实验室生物安全管理进行了学术交流。研讨会期间确定翻译由珀西恩 (David H. Persing) 等著、美国微生物学会出版的 *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice* (《分子微生物学:诊断理论与实践》) 一书的意向。

随着科技的发展,分子生物学技术在突发公共卫生事件和不明原因疾病的病因学诊断方面显示了重要作用,但目前国内尚未见理论与实践相结合的同类书籍,所以,本书的翻译出版将为各级疾病控制机构、检验检疫和临床诊断实验室提供一本全面实用的参考书。

病原微生物检测技术日新月异,为了在全省各级疾控机构和临床医院专业人员中推广突发事件应急检验技术,并使这些技术在未来突发事件应急检验技术中得到应用,迫切需对我省各级疾控机构和临床医院实验室专业技术人员进行常用应急分子检测技术培训。为此,广东省疾病预防控制中心承担了“世行贷款/国外赠款中国传染性非典型肺炎及其他传染病应对项目”后期活动计划中的“传染病病原学监测与应急反应体系建设培训项目”,并于 2006 年 3 月成立了广东省传染病应急与监测实验室网络。所以,本书的出版将为实验室网络技术人员培训提供高质量的教材,也为一线的技术人员提供一本实用的参考书。

在本书的翻译和出版过程中,卫生部世行贷款办、广东省卫生厅、省疾病预防控制中心和中山大学出版社,以及广州、深圳和东莞市疾病预防控制中心等给予了大力支持和帮助,在此深表感谢。本书的所有编译者利用业余时间完成了本书的翻译和校对工作,付出了辛勤的劳动,美国疾病预防控制中心的谢文儒医生对翻译文稿进行了仔细的审阅,提出了宝贵的修改意见,胡守旺、杨承勇、陈谷、武婕、李建娜、马强、杨学习、陈瑶、牟霞、曾文慧、尹依、肖红、吴德博士也为本书的出版付出了辛勤劳动,在此一并致谢;特别要感谢的是我们的家人,他们为这本书的出版做出了很多牺牲。

柯昌文 邓小玲 王洪敏

2008 年 6 月

目 录

诊断原理

第一部分 培养物的确认和直接检测探针	(1)
第1章 荧光原位杂交在微生物学诊断中的应用	(2)
第2章 用于培养菌确认和细菌感染直接检测的 DNA 探针：技术综述	(25)
第3章 商品化试剂盒在临床微生物实验室的应用：方法选择和质量保证	(35)
第二部分 核酸扩增技术	(48)
第4章 体外扩增技术的发展	(49)
第5章 核酸体外扩增技术	(52)
第6章 实时 PCR	(88)
第7章 核酸扩增方法：实验室设计和操作	(109)
第8章 分子定量的方法：结果的标准化、分析和实验室质量控制	(121)
第三部分 突变检测和诊断测序	(169)
第9章 突变筛查策略：综述	(170)
第10章 突变扫描	(175)
第11章 突变检测：基于 PCR 的方法	(184)
第12章 自动化 DNA 测序	(193)
第13章 分子种系发生分析	(203)
第四部分 分子分型方法	(229)
第14章 近 10 多年来细菌分型的进展：个人回顾	(230)
第15章 脉冲场凝胶电泳	(233)
第16章 基于 PCR 扩增的微生物分型	(250)
第17章 用可变数目串联重复序列进行细菌基因分型	(285)
第18章 多位点测序分型 (MLST)：菌株鉴定、菌群生物学和进化遗传 模式的研究工具	(299)
第19章 自动化核糖体分型	(311)
第20章 流行病学中的分子亚型：图谱模式可比性问题和数据解释	(329)

第五部分 检测方法学	(339)
第 21 章 扩增产物的检测	(340)
第 22 章 凝胶电泳、Southern 杂交和限制性酶切片长度多态性分析	(345)
第 23 章 扩增子检测与鉴定的微孔板检测系统	(354)
第 24 章 应用多色分子信标方法检测病原体	(359)
第 25 章 荧光共振能量转移系统	(369)
第 26 章 利用质谱技术和蛋白质组学方法进行诊断和疫苗筛选	(386)

诊 断 应 用

第六部分 细菌病原体检测和鉴定	(400)
第 27 章 理想方法——应用核酸扩增技术检测和鉴定细菌性病原体	(401)
第 28 章 杜克嗜血杆菌、苍白密螺旋体和生殖道支原体的 PCR 检测	(436)
第 29 章 16S rDNA 序列测定在临床微生物实验室细菌鉴定中的应用	(453)
第 30 章 广谱 PCR 在细菌检测及鉴定方面的应用	(474)
第 31 章 微生物耐药基因及耐药相关突变的检测	(490)
第 32 章 基因组信息在细菌感染诊断、管理和控制中的应用：以金黄色葡萄球菌基因组研究为例	(514)
第 33 章 与生物恐怖有关的病原体检测	(528)

第七部分 病毒检测和鉴定	(537)
第 34 章 DNA 病毒检测	(538)
第 35 章 RNA 病毒检测	(554)
第 36 章 病毒载量测定	(601)
第 37 章 病毒基因分型	(619)
第 38 章 人类 1 型免疫缺陷性病毒 (HIV-1) 药物敏感性的表型测定	(633)
第 39 章 新出现病毒病原体	(667)
第 40 章 分子病毒学的现在和未来	(684)

第八部分 病原真菌检测和鉴定	(692)
第 41 章 病原真菌的分子检测与鉴定	(693)
第 42 章 基于序列分析的真菌鉴定和分类	(705)
第 43 章 真菌抗药性的分子检测	(717)

第九部分 寄生虫检测和鉴定	(728)
第 44 章 寄生虫病分子诊断学的发展、应用与未来	(729)
第 45 章 分子技术在隐孢子虫检测、种属鉴定与基因分型方面的应用	(733)
第 46 章 疟疾检测和抗药性遗传标记鉴定的分子方法	(759)

第十部分 阵列技术的应用	(780)
第 47 章 杂交阵列技术	(781)
第十一部分 宿主遗传学和药物基因组学	(809)
第 48 章 人类基因组、遗传多态性和疾病管理	(810)
第 49 章 细胞色素 P-450 的遗传多态性、药物转运载体和感染性疾病 的管理	(826)
第 50 章 宿主对微生物感染的易感性与癌症	(847)
第 51 章 基因组学和 DNA 变异：微生物感染性疾病易感性和感染结果 的决定因素	(857)
第十二部分 实验室标准化、能力验证、质控标准和监控	(870)
第 52 章 诊断分子微生物学的外部质量评价和能力验证	(871)
第 53 章 实验室质控品和标准品	(878)

诊断原理

第一部分 培养物的确认和直接检测探针

第1章 荧光原位杂交在微生物学诊断中的应用

Stefan Juertschko, Anne Marie Buccat, Thomas R. Fritzsche

在微生物学中,“种系染色”的概念是指以存在于完整细胞中高拷贝的保守分子(如rRNA)为靶标,应用荧光标记的核酸探针与之结合。在检测荧光探针和靶分子的杂交结合物时,具有足够的靶分子是关键,而且可以在完整细胞中采用荧光显微镜直接进行观察。采用荧光原位杂交(FISH)技术直接观察生物体的方法可以同时提供生物体在种系发生上的关系、在样本基质中的空间分布、相对丰度和相对生理活性等信息。

FISH 技术使用荧光染料标记核酸探针,这一点在杂交技术中是独一无二的。这些探针发出的荧光信号可以通过荧光显微镜进行检测,荧光显微镜通过特殊激发和阻挡滤光片得到不同的波长。杂交反应发生在原位,即将靶细胞点在聚四氟乙烯板上的多孔显微镜载玻片上。杂交时,靶细胞的形状和结构不会发生改变,效果可以和传统的革兰氏染色、总核苷酸染色相媲美,而且这样可以保持生物体形态和空间位置的完整性。原位使用分子探针有一个缺点,就是要特别小心以保证样本中的细胞保持完整。而在固定过程中要保证组织和细胞的完整而不破坏细胞的形态,仍然是一个挑战。

FISH 技术作为一种重要工具,已经被广泛应用于许多不同环境的复杂微生物共存体中单个微生物的检测和鉴定。这种方法可以在培养前即鉴定出微生物,事实上根本不需要培养。FISH 技术不仅可以用来检测富营养环境中的细菌群落,如生物膜^[10,44,121]、生物滤器^[35]、生物反应器^[13,15,22,120]和废水处理厂的活性污泥池^[3,24,62,64,122,123,126,127,142],而且也可以检测营养不足的水环境中的细菌群落,如饮用水^[89]、高山湖水^[14]、海水沉积物^[81,109]、含盐水^[98]、河水^[12]和海水^[28,45]。此外,FISH 技术还可用于活性污泥^[62]和肠内容物^[16,78,107]中细菌菌群的分析,海水浮游生物^[21]、原生动物共生体^[4,29,30,40,93]和海绵^[147]中菌落构成的分析,与苯酚生物处理^[150]、食品加工表面黏附和生物膜形成(*Shewanella putrefaciens*^[10])、马铃薯的褐腐(*Ralstonia solanaceum*^[155])有关的细菌的分析,以及苏格兰松芽^[105]中细胞内细菌的分析。

FISH 技术作为全套方法^[7]的一部分,可以原位检测未能培养的或迄今未知的细菌。这主要通过以下方式实现:①用 PCR 技术获得环境中 16S 核糖体的 DNA 序列(rDNA)^[62];②根据已有的序列数据设计特异的寡核苷酸探针^[127];③直接在原始样本中检测与 rRNA 序列同源的微生物^[56,62,64,115,116,126]。

FISH 技术作为一种快速、经济和可靠的检测方法,已不断得到公认,在临床微生物学领域中具有广阔的应用前景(见表 1-1)^[94]。研究表明,FISH 技术的最大优点在于在细菌培养前就可以鉴定出致病菌^[7,115];其他还包括对培养物的确认,尤其是对那些营养苛刻的细菌或用快速表型分析和生化分析方法无法鉴定的细菌的确认。

表 1-1 FISH 技术在临床微生物学中的应用实例

感染部位的种类	临床样本	参考文献
口腔		
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	牙龈拭子	67
<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Bacteroides forsythus</i>	牙龈斑	42, 43
<i>Treponema pallidum</i>	牙缝斑和拭子	18, 95, 96, 148
呼吸道		
<i>Legionella pneumophila</i> , <i>Legionella</i> spp.	痰, 咽拭子, 支气管肺 泡灌洗液	47, 48, 52, 59, 87
<i>Haemophilus influenzae</i>	腺组织	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	痰, 咽拭子	54
<i>Sarcobium lyticum</i>	痰富集物, 肺炎	129
Bacterial agents in community-acquired pneumonia	痰液, 咽拭子, 支气管 肺泡灌洗液	Buccat et al., Abstr. 102nd Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 2002
<i>Pasteurella multocida</i>	猪、鸡的肺组织	90
血液		
<i>Candida</i> spp.	血液, 组织, 受感染鼠	79, 80
<i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp.	血液	60, 70, 71
胃肠道		
<i>Brachyspira</i> spp.	肠活检样本	61
<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp.	粪便	32, 74, 135
<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	粪便	8
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium, <i>Escherichia coli</i>	鼠肠切片	78, 107
<i>Salmonella</i> spp.	组织样本, 涂片	100
<i>Helicobacter pylori</i>	胃肠黏液, 抗菌物质	112, 113, 141
<i>Helicobacter heilmannii</i>	胃肠黏液切片	93, 137
<i>Coriobacterium</i> spp., <i>Atopobium</i> spp.	粪便	50, 51
<i>Tropheryma whipplei</i>	肠黏液组织	34

续上表

感染部位的种类	临床样本	参考文献
生殖道		
<i>Trichomonas vaginalis</i>	阴道拭子	97
皮肤和软组织		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (Group C)	深层软组织, 活检样本	125
<i>Yersinia</i> spp.	受感染的鼠组织, 咽部 棘状组织样本	139
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	内皮细胞, 组织切片	73
<i>Yersinia enterocolitica</i>	关节炎滑膜纤维	91
Endosymbionts of amoebae (<i>Rickettsiales</i> , <i>Caedibacter</i> , <i>Chlamydia</i>)	角膜屑, 眼拭子	5, 37, 38, 56, 58
<i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Borrelia</i> spp.	皮肤活检样本, 蝉 (蓖 麻子蝉)	49
<i>Streptococcus pyogenes</i>	坏死筋膜炎组织	140
<i>Rhinosporidium seeberi</i>	黏膜表层	33

16S rRNA 基因序列分析是一个很有用的技术, 可以用于致病菌的鉴定, 在一些临床实验室用来常规鉴定细菌分离株^[110, 114, 149, 154]。然而, 以序列为基础的检测方法用来鉴定微生物, 仍然需要纯培养物才能得到正确结果, 因此只适用于那些培养后的确证试验。而 FISH 技术可以直接用于任何样品, 即使是混合培养物^[4]。该方法要求使用针对每一种致病菌特异的探针。16S rRNA 序列分析对于那些生长缓慢的、不常见的和不易培养的细菌的鉴定, 以及对于采用生化试验难以鉴别的细菌的鉴定也十分有用^[55, 114]。研究表明, FISH 技术同样适用于上述细菌的鉴定, 而且与序列分析相比, 检测快速、费用低廉^[34, 97, 110, 113, 133, 134, 141]。

1.1 选择靶基因: rRNA

20 世纪 70 年代中期, Carl Woese 和他的同事利用 rRNA 的序列信息研究微生物的种系发生关系, 并推论它们的自然分类^[151~153]。核糖体高度保守, 是负责蛋白质合成的细胞器, 可以作为很好的种系发生标志物。核糖体核苷酸是核糖体的重要组成物质, 存在于每一个活细胞中, 生长期的细菌中含有多达 $10^4 \sim 10^5$ 个拷贝的 5S、16S 和 23S rRNA^[27, 69, 106]。也就是说, 直接用 rRNA 作为靶基因, 其拷贝数就足够用于直接检测, 而不必像 DNA 那样还需要核酸扩增。检测通过一个荧光素分子标记的寡核苷酸作为探针来完成。在信号强度不足的情况下, 同时采用针对不同位点的多重标记探针进行检测更具优势。

16S rRNA 和 23S rRNA 分子由不同的序列基序组成, 不同的序列基序反映了不同的系

统发育起源,因此,根据这些基序的多样性可以在不同分类学水平上设计探针。通过采用针对保守程度不同的 RNA 区域的探针,就可以进行细菌的种系发生分类(界、门、科、属、种),有时可以分到亚种,但通常不能进行菌株的确认,这也是 FISH 技术的一个局限。如果需要进行更深入的分类,可以针对 23S rRNA 来设计探针,因为它比分子较短的 16S rRNA 包含了更多有意义的与种系发生特征有关的位点^[82]。如果要以核糖体为靶标设计探针,用于细菌的检测和确认,不仅需要熟悉系统发生学的方法和技术,而且需要知道针对某种表型特征(革兰阳性球菌、乳糖发酵、吲哚阳性),这是不可能的。用 rRNA 做靶基因还有一个优点,就是它是单链的,在杂交前不需要变性这个过程,这一点与 DNA 不同。

除了前述的 16S 和 23S rRNA 外,其他 RNA 也可以作为靶基因,用来帮助区分细菌亲缘关系很近的种、亚种和株。所谓 tmRNA,就是一种小而稳定的 RNA,有 363 个核苷酸,兼有 tRNA 和 mRNA 的特性,它与截短蛋白质降解有关^[68]。据报道,这种 tmRNA 分子能够提供有意义的细菌种系发生的信息,针对 tmRNA,研究者建立了一种利用辣根过氧化物酶标记探针进行原位杂交的方法,用于细菌的鉴定^[117]。另外,Wangner 等人成功地建立了以 mRNA 为靶基因的原位杂交技术^[143]。与 rRNA 相比,mRNA 是一种脆弱的、不稳定的分子,拷贝数低,半衰期短。研究者采用体外转录的方式合成多聚核苷酸探针^[138],并利用 TSA (Tyramide Signal Amplification) 试剂盒^[118]来检测 iap (侵袭性蛋白)的 mRNA, iap 是单增李斯特菌的毒力因子。传统的 FISH 技术与 mRNA 检测结合起来,可以揭示出生理活性和基因表达的原理。Juretschko 等人^[63]用 FISH 技术检测到 ColE1 相关质粒(比如 pBR 或 pUC)。这类质粒都遵循同一种复制机制,均由两种 RNA,即 RNA I 和 RNA II 调控^[136]。如果以质粒中这种稳定的调控性的 RNA II 为靶分子,那么只有含有这种质粒的细胞才显示出阳性信号^[63]。

除 rRNA 之外的所有 RNA,在应用 FISH 技术时,使用单标记探针的灵敏度均不够,需要额外采用信号放大的方法。针对 rRNA 靶标的探针,其检出限取决于每一个细胞中 rRNA 的拷贝数,如果要杂交成功,至少需要 1000 个核糖体分子。尝试用其他 RNA 做靶基因时,需要特别关注它们的检出限^[118,138]。

1.2 设备

大多数临床实验室都有 FISH 操作所需的实验设备,培养箱、水浴箱和落射荧光显微镜是必需的,其中显微镜是成功操作 FISH 的最为关键的仪器。当使用多重探针时,配备一套合适的用于跟踪所使用的每一种染料的带通滤波器是必需的。无论如何,要想得到最佳的结果,使用高质量的并能提供强大技术支持的光学仪器是必要的。

表 1-2 列出了最常用的荧光染料及其特性。它们的不同之处在于发射波长不同,因此在同时使用时要避免发射光谱重叠。两种吲哚菁类染料 Cy3 (红)和 Cy5 (蓝)与荧光素(绿)是最有用的也是最常用的荧光染料组合,与合适的滤光装置(激发、带通和发射滤光器)结合,就可以得到最好的荧光信号辨别率。Cy3 和 Cy5 通常会产生最好的信号,并且能抵抗光漂白作用^[128]。这类染料适用于低含量微生物的检测,而荧光素更适合

于以 16S rRNA 上高度保守区域为靶标的探针标记, 包括区域、群或属特异性的探针。当同时使用不同染料标记的探针时, 以较高分类水平为靶标的荧光标记探针最好作为阳性对照。Cy5 有一个缺点, 因为它是红外发射光谱, 所以人的肉眼看不到它的荧光信号, 因此需要配置一台 CCD 照相机及数码图像分析软件。经过图像分析软件处理后, Cy5 的阳性信号通常设定为蓝色。

表 1-2 常用荧光染料及其特征

荧光染料	颜色	波长 ^①	
		激发	发射
DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)	蓝	365	397
FLUOS (5, 6) -carboxyfluorescein- <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester)	绿	494	518
TRITC (tetramethylrhodamine-5, 6-isothiocyanate)	红	537	566
Texas Red	红	578	600
Cy3 (indolocarboyanine- <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester)	红/橙	552	565
Cy5 (indolocarboyanine- <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester)	淡红 ^②	650	667

① 波长参数不是精确值, 具体可参照制造商说明书。

② Cy5 只能通过 CCD 相机观察。一般情况下, 蓝色作为 Cy5 信号显色。

通过三原色 (红、绿、蓝) 的结合, 可获得四种补充的颜色: 粉色 (红蓝结合)、青绿色 (绿蓝结合)、黄色 (红绿结合)、白色 (三种色结合), 因而增加了 FISH 技术的应用范围 (见彩色图版 1)。其中一个例子是 Amann 等人提出了应用多重探针杂交和在一个显微视野下观察七种颜色来检测七种不同细菌^[3]。

用于探针设计的设备包括具有适当处理速度和内存的计算机, 用于数据库比对、序列编辑以及探针设计的软件, 以及 16S 和 23S 序列数据库。数以万计的完整的或部分 16S 和 23S rRNA 序列目前可从多种渠道获得, 更重要的是, 人们可以免费也可以通过商业付费来获得这些数据库资料^[83, 84, 156, 157]。选择的软件应该能够输入一个新的序列并能正确地互相排列。ARB 是一个有用的软件包, 它将必要的程序和满足应用 FISH 技术和探针设计所需的软件结合起来。这个软件包连同合适的 16S 的数据库可从 www.arb-home.de^[83] 免费下载, 但是需要 Unix 操作系统或配置了 Linux 操作系统的电脑。

1.3 探针

用于 FISH 技术的寡核苷酸探针通常是短的 DNA 序列, 在 15~25 个核苷酸之间。保持探针短小对于保持杂交过程的严密性和特异性具有重要作用。一般而言, 这么短的探针是不容许发生错配的, 因为短探针和靶标之间的结合力降低。这在探针设计中有重要作用, 因为一个碱基的错配能够用来区别密切相关的生物体。