

医学实验技术系列

医学微生物 实验技术

主编 郭晓奎



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

图书在版编目(CIP)数据

医学实验技术系列

医学实验技术系列

ISBN 7-117-15302-3

①医学实验技术系列 ②医学实验技术系列 ③医学实验技术系列

医学微生物 实验技术

主 编 郭晓奎

副主编 李擎天 王 玲

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学微生物实验技术 / 郭晓奎主编. — 北京:
人民卫生出版社, 2010.6

ISBN 978-7-117-12905-3

I. ①医… II. ①郭… III. ①医药学: 微生物学—实验 IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 072823 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

医学微生物实验技术

主 编: 郭晓奎

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京蓝迪彩色印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 18

字 数: 432 千字

版 次: 2010 年 6 月第 1 版 2010 年 6 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-12905-3/R·12906

定 价: 56.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前言

自从 17 世纪,荷兰科学家列文虎克制成显微镜,第一次观察到细菌这种微生物开始,微生物学大致经历了微生物形态学时代、微生物生理学时代、微生物免疫学时代,以及微生物分子生物学时代几个重要的历史时期,而推动微生物学向前不断发展的动力来源于微生物学技术的不断进步。从 19 世纪固体培养基、染色法的首次应用,到分子生物学方法的大量实践,如今的微生物学技术已经不再是一门孤立的学科,而是一门结合分子生物学、免疫学、病理学、物理学、工程学等众多技术的交叉学科,这些技术从微生物的形态、结构、生化代谢、遗传信息、微生态等各个层面向人们揭示出微生物世界的奥秘,是人们在研究、学习微生物时不可或缺的工具。

针对微生物研究的不同层面,微生物学技术可以主要分为两大类,第一类是以微生物表现型为主要研究对象。包括微生物的一些结构,如荚膜、鞭毛、细胞壁,分泌的各种蛋白、毒素,以及细菌的生理活动或生化反应。这类技术有很大一部分来自于传统微生物学的经典方法,如革兰染色、荚膜染色、琼脂培养、鸡胚接种、IMViC 试验、药物敏感试验等,也包括现代免疫学的一些方法,如血清学反应、ELISA 技术等,以及由此衍生出的疫苗学相关技术。当前分子生物学以及微生物基因组研究已经有了长足的进步,它们在微生物的快速检测、鉴别、诊断、疫苗的开发和公共卫生事件的监测有着不可替代的作用。随着科学技术的不断发展,如今,标准化、自动化、集成化、高效率正在成为这些技术的发展趋势,在基本原理不变的前提下,通过技术革新以达到准确、高效的目的。随着分子生物学、基因学的进步,微生物学第二类技术,即针对微生物个别基因及基因组研究技术逐渐成为了微生物研究领域中的主流技术。这一类技术的优势在于它从微生物的遗传物质这一根本入手,从基因层面解释了微生物各种表现型的存在机制,对于微生物各种性质的研究具有决定性意义。它们的优势主要体现在几个方面:①改“检测”为“预测”;②使“改变”微生物性质成为可能;③掌握大量遗传数据,方便归类和检测。同时,随着这类技术的发展,也使微生物原本的一些传统技术发生了质变,例如传统的药物敏感试验、毒力试验转变为耐药基因、毒力基因的研究,传统的疫苗学方法转变为通过研究抗原基因的逆向疫苗学。无疑,微生物的基因研究正在给予人们微生物表现型重新认识。同时,在此基础上,各种组学技术(如:基因

组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学)的研究也在蓬勃发展,它们将站在一个整体的高度对于微生物予以崭新诠释,将成为未来的趋势。

本书由北京大学医学部、卫生部北京医院、中国疾病预防控制中心、大连医科大学、中国科学院上海生命科学研究院、上海生物芯片国家工程研究中心、上海交通大学医学院附属瑞金医院和上海交通大学医学院从事医学微生物学相关专业的专家和研究人员编写完成,重点介绍基因组技术、转录组技术、蛋白质组技术、代谢组技术、基于基因组的病原体检测技术、微生物耐药基因研究等的发展和趋势,以及微生物学检测的自动化和未知病原的检测等。

郭晓奎

2010年5月

目 录

第一章 病原微生物镜检技术	1
第一节 普通光学显微镜.....	1
第二节 几种特殊的光学显微镜.....	2
第三节 电子显微镜.....	3
第四节 运用显微镜进行活体动物体内成像技术.....	5
第二章 核酸体外扩增技术	10
第一节 常规 PCR	10
第二节 反转录 PCR	18
第三节 定量 PCR	20
第四节 致突变 PCR	23
第五节 其他种类 PCR	25
第三章 突变技术	30
第一节 突变分析.....	31
第二节 笔记标识突变.....	33
第四章 体内表达技术	41
第一节 体内表达技术.....	41
第二节 体内诱导的抗原技术.....	42
第三节 差异荧光诱导 (DFI) 的启动子捕获技术	45
第五章 微生物基因组学技术	49
第一节 微生物基因组测序.....	49
第二节 基因组数据分析.....	69
第三节 细菌比较基因组学.....	72
第六章 微生物蛋白质组技术	78
第一节 蛋白质组技术简介.....	78
第二节 蛋白质样品的制备和分离.....	78
第三节 蛋白质鉴定技术.....	79

第四节	定量蛋白质组技术·····	80
第五节	免疫蛋白质组与生物信息学·····	81
第六节	参考实验方案·····	81
第七章	微生物代谢组学·····	93
第一节	微生物代谢组学概述·····	93
第二节	代谢组学的应用·····	94
第三节	代谢组学研究技术·····	95
第四节	代谢组学研究展望·····	97
第五节	参考实验方案·····	97
第八章	基因芯片在微生物基因组研究中的应用·····	99
第一节	基因芯片概述·····	99
第二节	基因芯片的原理·····	99
第三节	基因芯片的制备方法·····	101
第四节	基因芯片的检测技术·····	105
第五节	基因芯片在微生物基因组研究中的应用·····	107
第六节	微生物基因芯片应用展望·····	114
第七节	参考实验方案·····	115
第九章	正常菌群分析技术·····	124
第一节	DNA 指纹图谱分析·····	125
第二节	基因克隆文库分析·····	130
第三节	分子杂交·····	132
第四节	参考实验方案·····	134
第十章	微生物学检验的自动化·····	141
第一节	法国生物梅里埃公司产品·····	142
第二节	美国 BD 公司产品·····	148
第三节	BioFosun 微生物鉴定药敏分析系统·····	149
第十一章	微生物 - 宿主相互作用研究技术·····	151
第一节	前言·····	151
第二节	实验材料·····	152
第三节	实验方法·····	155
第四节	注意事项·····	159
第十二章	细菌对宿主细胞黏附和侵袭研究技术·····	162
第一节	细菌的黏附·····	162

第二节	细菌的侵入·····	165
第三节	细菌在胞内的生存和繁殖·····	166
第四节	宿主细胞反应·····	167
第五节	参考实验方案·····	169
第十三章	抗原抗体检测技术·····	178
第一节	基本原理·····	178
第二节	技术应用·····	183
第三节	统计学分析·····	185
第四节	参考实验方案·····	187
第十四章	基于基因组的病原体检测分型技术·····	198
第一节	基于基因组的病原体检测技术·····	198
第二节	基于条带的病原体分型技术·····	201
第三节	基于序列的病原体分型技术·····	206
第四节	参考实验方案·····	210
第十五章	细菌对抗菌药物的敏感性试验·····	220
第一节	微生物耐药性的概念与机制·····	221
第二节	抗菌药物敏感性试验·····	222
第三节	耐药性监测的分子生物学方法·····	227
第四节	参考实验方案·····	230
第十六章	常用病毒培养技术·····	243
第一节	实验动物·····	244
第二节	鸡胚·····	244
第三节	组织培养·····	246
第四节	细胞克隆技术·····	255
第五节	病毒蚀斑技术·····	257
第十七章	未知病原的检测·····	262
第一节	疫情的发生与发展·····	262
第二节	临床与实验室检查特征·····	265
第三节	流行病学特征·····	271
第四节	无形体感染的最终确定过程·····	274

1

第一章

病原微生物镜检技术

自然界中的微生物,一般形体小、结构简单,大部分不能直接用肉眼看见,必须借助光学显微镜或电子显微镜放大数百倍、数千倍,甚至数万倍才能观察到。绝大多数微生物个体极其微小,常以微米(μm ,即 10^{-6}m)或纳米(nm ,即 10^{-9}m)作为计量单位。微生物与人类的关系非常密切,正常情况下,寄生在人类和动物口、鼻、咽部和消化道的微生物是无害的,有的尚能拮抗病原微生物,只有少数微生物能引起人类和动物、植物的发病,这些具有致病性或条件致病性的微生物称为病原微生物(pathogenic microorganism),如伤寒杆菌、痢疾杆菌等。

由于病原微生物体积微小,不能被肉眼所见,显微镜应运而生。最早观察到微生物的是荷兰人列文虎克,他自磨镜片创制了第一架能放大 266 倍的原始显微镜并用该显微镜检查了污水、牙垢等,发现许多肉眼看不到的微小生物,并正确描述了微生物的形态有球形、杆状和螺旋状等,为微生物学的发展做出了巨大的贡献。随着科学技术的迅速发展,显微镜越来越精密,越来越复杂,种类也繁多起来,其中应用于微生物学的显微镜主要包括普通光学显微镜、特殊光学显微镜和电子显微镜三种,这三种显微镜主要在体外观察病原微生物。目前一种新的活体动物体内成像技术(Whole body biophotonic imaging, BPI)的广泛应用为体内观察病原菌提供了便利的工具。

本文按照显微镜的分类讲述了显微镜在病原微生物领域的应用,重点描述了 BPI 技术的理论和方法。

第一节 普通光学显微镜

光学显微镜是一种精密的光学仪器。当前使用的显微镜由一套透镜配合,因而可选择不同的放大倍数对物体的细微结构进行放大观察。普通光学显微镜通常能将物体放大 1500~2000 倍(最大的分辨率为 $0.2\mu\text{m}$)。

一、基本成像原理

光线经过反光镜、遮光器、通光孔,通过透明的镜检样品,经物镜的透镜第一次放大成倒立实像,经过镜筒,在目镜的透镜作用下再次放大成虚像,最后经过人眼成像。

二、在病原微生物学中的应用

普通光学显微镜主要用来观察临床样本(痰液、尿液、粪便、脑脊液、血液、组织液)中经革兰染色或特殊染色的微生物;组织中的微生物通常采用免疫组化的方法对细菌染色,用普通光学显微镜可以清晰地看到被染色的细菌。

第二节 几种特殊的光学显微镜

一、暗视野显微镜

暗视野显微镜不具备观察物体内部的细微结构的功能,但可以分辨 $0.02\sim 0.004\mu\text{m}$ 以上微粒的存在和运动,因而常用于观察活细胞的结构和细胞内微粒的运动等。

1. 基本原理 在日常生活中,室内飞扬的微粒灰尘是不易被看见的,但在暗的房间中若有一束光线从门缝斜射进来,灰尘便粒粒可见了,这是光学上的丁达尔现象。暗视野显微镜的基本原理就是丁达尔效应。暗视野显微镜在普通的光学显微镜上换装中央遮光板或暗视野聚光器,常用的是抛物面聚光器,使光源的中央光束被阻挡,改变光线途径,倾斜地照射在标本上,光线发生衍射或散射,照射在待检物体表面的光线不能直接进入物镜和目镜,仅散射光能通过,因而视野是黑暗的。操作者通过目镜观察到的是待检物体的衍射光图像,所以只能看到物体的存在和运动,不能辨清物体的微细结构。

2. 在病原微生物学中的应用 主要用于观察活细菌的运动性和细菌计数,例如梅毒螺旋体、钩端螺旋体等细菌的计数。

二、荧光显微镜

荧光显微镜是利用细胞内物质发射的荧光强度对其进行定性和定量研究的一种光学工具。细胞内的荧光物质有两类,一类直接经紫外线照射后即可发荧光,如叶绿素等;另有一些物质本身不具这一性质,但如果以特定的荧光染料或荧光抗体染色,经紫外线照射后亦可发荧光。

1. 基本原理 荧光显微镜的原理为利用一个高发光效率的点光源(如超高压汞灯),经过滤色系统发出一定波长的光(如紫外光 $3650\text{\AA}$ 或紫蓝光 $4200\text{\AA}$)作为激发光,激发标本内的荧光物质发射出各色的荧光后,再通过物镜后面的阻断(或压制)滤光片的过滤,最后经由目镜的放大作用加以观察。阻断滤光片的作用有二,一是吸收和阻挡激发光进入目镜以免干扰荧光和损伤眼睛;二是选择并让特定的荧光透过,表现出特定的荧光色彩。

荧光显微镜按照光路原理可分为两种:

(1) 透射式荧光显微镜:属于较为旧式的荧光显微镜,其激发光源通过聚光镜穿过标本材料来激发荧光。其优点是低倍镜时荧光强,而缺点是随放大倍数增加其荧光减弱,故仅适用于观察较大的标本材料。

(2) 落射式荧光显微镜:激发光从物镜向下落射到标本表面,即用同一物镜作为照明聚光器和收集荧光的物镜。光路中需加上一个双色束分离器(分色镜),它与光轴呈 45° 角,激发光被反射到物镜中,并聚集在样品上,样品所产生的荧光以及由物镜透镜表面、盖玻片

表面反射的激发光同时进入物镜,返回到双色束分离器,使激发光和荧光分开,残余激发光再被阻断滤光片吸收。如换用不同的激发滤光片/双色束分离器/阻断滤光片的组合插块,可满足不同荧光反应产物的需要。此种荧光显微镜的优点是视野照明均匀,成像清晰,放大倍数愈大荧光愈强。

2. 在病原生物学中的应用 荧光显微镜观察的物体需要提前标记或自身带有荧光,所以对病原微生物的荧光显微镜检测,可以有两种方法:一是将病原微生物转化成为可以表达特定荧光的细菌,此时检测的病原微生物是有活力或致病性的,而且检测时操作方便,节省时间,但是检测的时间点要求较高;二是采用免疫荧光的方法将标本固定进行检测,该方法虽然操作较繁琐,耗材多,但是荧光特异性高,无需构建新的菌株。

三、激光共聚焦显微镜

激光扫描共聚焦显微镜是采用激光作为光源,在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦原理和装置,并利用计算机对所观察的对象进行数字图像处理的一套观察、分析和输出系统。主要系统包括激光光源、自动显微镜、扫描模块(包括共聚焦光路通道和针孔、扫描镜、检测器)、数字信号处理器、计算机以及图像输出设备(显示器、彩色打印机)等。

通过激光扫描共聚焦显微镜,可以对观察样品进行断层扫描和成像。因此,可以无损伤地观察和分析细胞的三维空间结构。同时,激光扫描共聚焦显微镜也是进行活细胞动态观察、多重免疫荧光标记和离子荧光标记观察的有力工具。激光扫描共聚焦显微镜可对单、双或三标的细胞及组织标本的荧光进行定位定量分析,也适合高灵敏度的快速免疫荧光测定,可以准确监测抗原表达、荧光原位杂交斑点等。除此之外,还可以利用激光共聚焦显微镜进行细胞微操作等。

四、相差显微镜

相差显微镜将光通过物体时产生的相位差(或光程差)转变为振幅(光强度)变化。主要用于观察活细胞、不染色的组织切片或缺少反差的染色标本。

1. 基本原理 人眼只能鉴别可见光的波长(颜色)和振幅的变化,不能鉴别相位的变化。而大多数生物标本高度透明,光波通过后振幅基本不变,仅存在相位的变化。相差显微镜把透过标本的可见光的光程差变成振幅差,从而提高了各种结构间的对比度,使各种结构变得清晰可见。光线透过标本后发生折射,偏离了原来的光路,同时被延迟了 $1/4\lambda$ (波长),如果再增加或减少 $1/4\lambda$,则光程差变为 $1/2\lambda$,两束光合轴后干涉加强,振幅增大或减小,提高反差。

2. 在病原生物学中的应用 相差显微镜主要用于观察活细胞,可以观察到胞内的颗粒和空泡;也可以在细菌未染色的情况下观察细菌的运动和活力;当细菌与细胞相互作用时,可以观察到细菌的运动以及与细胞相互作用的情况,所以可以用来镜下观察细胞或细菌是否被异常病原菌污染,这些操作在普通光镜下是难以观察到的。

第三节 电子显微镜

电子显微镜是利用高速运动的电子束来代替光波的一种显微镜。光学显微镜下只能清楚地观察大于 $0.2\mu\text{m}$ 的结构,而小于 $0.2\mu\text{m}$ 的结构称为亚显微结构(submicroscopic

structures)或超微结构(ultramicroscopic structures; ultrastructures),要想看清这些更为细微的结构,就必须选择波长更短的光源,以提高显微镜的分辨率。电子束的波长要比可见光和紫外光短得多,并且电子束的波长与发射电子束的电压平方根成反比,也就是说电压越高波长越短。因此电子显微镜的分辨率远高于光学显微镜,目前可达 0.2nm,放大倍数可达 80 万倍。

电子显微镜按结构和用途可分为透射式电子显微镜、扫描式电子显微镜、反射式电子显微镜和发射式电子显微镜等。其中生物学研究中使用最为广泛的是透射式和扫描式电子显微镜,前者常用于观察那些用普通显微镜所不能分辨的超微结构,后者可快速有效地进行微米和纳米物质的二维或三维形态观测。

一、透射式电子显微镜

透射式电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)简称透射电镜,是把经加速和聚集的电子束投射到非常薄的样品上,电子与样品中的原子碰撞而改变方向,从而产生立体角散射。散射角的大小与样品的密度、厚度相关,因此可以形成明暗不同的影像。通常,透射电子显微镜的分辨率为 0.1~0.2nm,放大倍数为几万至上百万倍,用于观察超微结构,即小于 0.2 μ m、光学显微镜下无法看清的结构,又称亚显微结构。

成像原理分三种情况:

吸收像:当电子射到质量、密度大的样品时,主要的成像作用是散射作用。样品上质量厚度大的地方对电子的散射角大,通过的电子较少,像的亮度较暗。早期的透射电子显微镜都是基于这种原理。

衍射像:电子束被样品衍射后,样品不同位置的衍射波振幅分布对应于样品中晶体各部分不同的衍射能力,当出现晶体缺陷时,缺陷部分的衍射能力与完整区域不同,从而使衍射波的振幅分布不均匀,反映出晶体缺陷的分布。

相位像:当样品薄至 100Å 以下时,电子可以通过样品,波的振幅变化可以忽略,成像来自于相位的变化。

二、扫描式电子显微镜

扫描式电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)于 20 世纪 60 年代问世,目前分辨率可达 6~10nm。其工作原理是由电子枪发射的精细聚焦电子束经两级聚光镜、偏转线圈和物镜射到样品上,扫描样品表面并激发出次级电子,次级电子的产生量与电子束入射角有关,即与样品的表面结构有关。次级电子经探测体收集后,由闪烁器转换为光信号,再经光电倍增管和放大器转变为电信号来控制荧光屏上电子束的强度,显示出与电子束同步的扫描图像。图像为立体形象,反映了标本的表面结构。

扫描电镜的标本在检验前,需进行固定、脱水处理,再喷涂上一层重金属微粒,重金属在电子束的轰击下发出次级电子信号。

三、电镜技术在病原生物学中的应用

电镜技术对病毒学的发展起着十分重要的作用。病毒体积很小,电镜是直接观察病毒结构的唯一工具,病毒性疾病的诊断也离不开电镜。通过电镜还可以观察活检组织、细胞

培养等材料的超薄切片,观察感染细胞内病毒形态结构和细胞内形态发育过程,如病毒大小、形态、排列及其复制组装、成熟过程以及某些有包膜病毒的芽生、成熟部位和病毒包涵体的形态特征。对一些很难进行组织培养的病毒(如肝炎病毒、轮状病毒)和不引起细胞明显病变的病毒(风疹病毒、鼻病毒)电镜是鉴定和诊断的可靠手段。此外,通过电镜可进一步深入研究原虫、细菌、真菌、螺旋体和支原体等的超微结构。

第四节 运用显微镜进行活体动物体内成像技术

BPI 技术最早开始于 1995 年,Contag 等人利用能发出荧光的细菌感染小动物,然后检测细菌在动物体内的感染情况,随后这种技术很快的发展,并成为科研和医疗工作的实验平台。最初人们把这种方法应用在急性感染性疾病,后来发现这种方法应用于慢性疾病(尤其当体内形成生物被膜时)中的优势更加明显。

活体动物体内成像技术(BPI 技术)为医疗工作者研究病原微生物和临床上预处理感染提供了良好的工具。利用这种技术,我们可以在整个病程中毫无创伤地观察疾病发展和药物疗效,而且可以提前发现一些在常规情况下难以诊断的疾病。这种技术的原理是利用活体动物体内的细菌表达的荧光能够被外部的荧光检测仪检测到,因此可简单方便地检测菌的运动和扩散;能够对同组动物在不同时间点进行观察,减少了动物的数量,节省了时间和经费;由于每一个动物都是自身的对照,减少了动物之间的差异,得到的数据结果易于做统计学处理。

随着医疗事业的发展,假肢和移植技术在外科变得常见起来,虽然所有的医疗器械和材料都经过灭菌消毒,但仍难以避免感染的出现。由于感染的病原菌往往能够抵抗宿主免疫系统的清除作用并产生耐药性,所以经常导致移植失败。BPI 技术的应运而生,使得体内微生物感染的观测技术成为可能,它不仅能够快速实时地检测到生物被膜的形成,而且无创伤性,不会影响到宿主的免疫系统。本文详细描述了自发荧光革兰阳性和革兰阴性菌的构建以及它们感染多种动物多个解剖部位时 BPI 技术的应用,集中介绍了 BPI 技术在生物被膜的形成和观察中的应用。

一、试验器材

1. 菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC12600 型菌株 3,铜绿假单胞菌 ATCC19660,奇异变形杆菌 ATCC51286, *E.coli* S17-1
2. 质粒 pXen-5
3. 抗生素 氨苄西林,四环素,红霉素,卡那霉素
4. 培养基 LB, TSB, BHI 培养基
5. 氯胺酮,甲苯噻嗪,硫酸镁,甘油,葡萄糖
6. GenePulser II 电穿孔系统,试管
7. 聚四氟乙烯树脂静脉内导管(14-Gauge)
8. 聚乙烯 50
9. IVIS 显像系统, LivingstonImage 软件
10. 超声仪器

11. 外科手术剪,手术刀片,手术固定针头
12. 动物 Balb/c、CF-1、CD-1 雌性小鼠,18~30g

二、自发荧光细菌的制备方法

为了保证细菌发出荧光的稳定性,在 BPI 技术中,需要把 *Photobacterium luminescence lux* (细菌荧光酶 lux) 操纵子整合到细菌基因组上,该操纵子是编码荧光素酶和底物的必需基因,无需加入外源性作用底物。以下介绍两种将革兰阳性和革兰阴性细菌转化为稳定的生物发光菌的成熟方法,均已应用在生物被膜(biofilm)研究中。

1. 革兰阴性菌的转化步骤

(1) 利用含有卡那抗性基因的空质粒电转的方法,使革兰阴性受体菌转入一个抗性基因(Kan)。

(2) 供体菌是 *E.coli* S17-1 λ pir pUT Amp^r mini-Tn5/luxCDABE。pUT 是自杀性连接载体,可以存在于表达 π 蛋白的 *E.coli* 中,如 S17-1 pir 和 CC118 pir。mini-Tn5/luxCDABTTC^r 转座子具有四环素抗性。Lux 操纵子无启动子,荧光的表达依赖转座子位点上游的启动子。

(3) 选择一个革兰阴性受体菌的菌落接种在 10ml 的 LB 培养基(含有选择性抗生素 Kan)。同样挑选一个 S17-1 λ pir pUT Amp^r mini-Tn5/luxCDABE 菌落,接种在 10ml 含有氨苄西林(100 μ g/ml)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

(4) 分别离心沉淀两种菌液,用 10ml 的 LB 培养液分别重悬两种细菌沉淀。

(5) 准备新鲜配制的 10ml 含有 10mM MgSO₄ 的 LB 培养液,加入上述两种细菌重悬液各 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,使之发生接合作用。

(6) 吸取 100 μ l 上述混合菌液涂布在含有两种菌带有的抗生素抗性(Kan 和 Amp)和 20 μ g/ml 四环素的 LB 培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

(7) 长出单个菌落后,通过高度灵敏的选择性成像系统如 IVIS Imaging System,挑选出能够发出荧光的菌落作为转化成功的革兰阴性菌,同时确保该菌与母体菌都能在体内和体外发出同样强度的荧光。

2. 革兰阳性菌的转化步骤(主要是金黄色葡萄球菌) 革兰阳性菌通过在其基因组上稳定地整合一段 *P.luminescence luxABCDE* 基因簇的方法,使其成为荧光细菌。大多数革兰阳性菌通过转化该质粒都可以具备自发生物荧光的表型,以下的方法最适合用于金黄色葡萄球菌。

(1) 金黄色葡萄球菌接种在 10ml BHI 培养基中,培养过夜。

(2) 用量程为 500ml 的烧瓶准备 50ml 新鲜配制的 BHI 肉汤培养基,以 100:1 的比例稀释接种以上菌液,37 $^{\circ}$ C 200rpm 摇动培养使 OD₆₀₀ 达到 0.8(指数生长期)。

(3) 离心菌液,依次用 50ml、25ml 和 5ml 冰上预冷的 10% 甘油溶液漂洗沉淀(每次漂洗前都要离心)。

(4) 加 500 μ l 冰上预冷的甘油重悬细菌沉淀。

(5) 向 200 μ l *S.aureus* 甘油重悬液中加入 1 μ l 浓度为 1 μ g/ μ l 的质粒 pXen-5(pAUL-A Tn400/luxABCDE Km^R)。

(6) 将细菌/质粒混合液加入一个 1ml 冰上预冷的电转杯,电转条件: 25 μ F, 100 Ω , 2.5kV。

- (7) 立即轻柔地将电转液加入到 0.8ml 的 BHI 培养基中, 37℃ 静置培养 1h。
- (8) 取 200 μ l 电转液涂布在含有 0.3 μ g/ml 红霉素的 BHI 琼脂平板上, 37℃ 培养 24h。
- (9) 从平板上取下约 1cm² 长有菌落的琼脂片涂布接种在含有 0.3 μ g/ml 红霉素的 BHI 琼脂平板上, 37℃ 培养过夜。
- (10) 定量取菌环挑取一环范围的菌落 (约 10 μ l, 含有约 10⁸~10⁹ 菌量) 在含有 200 μ g/ml 卡那霉素 BHI 琼脂平板上均匀划线, 37℃ 培养 24h。
- (11) 将平板放置在高灵敏度选择性荧光成像仪下观察。
- (12) 挑选一个荧光强度最强的菌落, 并确保它同母体菌同样具有体内体外发出稳定荧光的能力。

三、导管有关生物被膜体外制备方法

1. 所需细菌具备两个条件: 能够发出生物荧光; 能够形成菌膜 (biofilm)。将细菌接种在含有 0.25% 葡萄糖的 TSBG 培养基 (简称 TSBG) 中, 摇床 37℃ 培养过夜。
2. 以上菌液按 1:10 稀释接种在新鲜配制的 TSBG 培养基中, 37℃ 培养 1.5h。
3. 测 OD₆₀₀, 在 TSBG 中浓度达到 10⁵CFUs/ml 为宜。
4. 割取 1cm 长的聚四氟乙烯树脂静脉内导管 (14-Gauge)、6mm 长的聚乙烯导管 (PE50), 用 70% 酒精消毒, 空气中静置干燥过夜。
5. 取 1ml 上述菌液 (浓度 10⁵CFUs/ml) 于无菌 Ep 管中, 将上述切割好消毒过的导管放入该 Ep 管内。
6. 上下颠倒混匀 Ep 管, 排除导管内气泡, 确保导管浸泡在菌液内。
7. 37℃ 培养适当时间后, 在无菌 TSBG 培养液中浸洗一次, 去除未结合的细菌, 同时用无菌 TSBG 培养液轻轻盥洗导管腔, 在植入动物体之前, 荧光显微镜下观察确保导管上保留适当的细菌菌落。

四、动物软组织生物被膜感染模型建立

将提前准备好或体内感染长有革兰阳性或革兰阴性生物荧光菌的导管, 经皮下植入到健康小鼠的侧腹部, 使体内的导管逐渐长成生物被膜并发出荧光, 这个模型就是软组织生物被膜感染模型。

该模型在无需取材培养的情况下, 用于观察医疗器械生物被膜的形成以及药物疗效的检测, 在临床上该方法确诊感染的最低病原菌量为 10³CFUs。该模型最适合用于抗生素对早期和成熟期的生物被膜的疗效观察、细菌耐药性检测以及最适抑菌浓度的评估。由于可以在同一动物体内持续反复观察较长一段时间, 而且无需杀死动物或取出内置导管对生物膜取材, 所以在临床应用和治疗方面该方法比常规的方法具有更大的优势。

方法如下:

1. 氯胺酮 (100mg/kg) 和甲苯噻唑 (5mg/kg) 麻醉 Balb/c 雌性小鼠, 体重控制在 18~22g 之间。
2. 小鼠侧腹部剃毛, 用 Betadyne 和酒精对皮肤进行消毒。
3. 切开一个长约 4~5mm 的皮下切口 (越小越好), 分离皮肤和组织形成一个皮下管状创口, 长约 1.5cm。

4. 将 1cm 长的长有荧光性生物被膜的静脉内导管通过切口植入皮下管状创口, 每个小鼠每侧腹部植入一段导管。

5. 将周围完整皮肤用外科肘钉固定盖住伤口, 并给皮肤消毒。

6. 将小鼠放在热垫上直到苏醒过来。

7. 采用高灵敏度低光线视像观测系统观察小鼠。

8. 以上介绍的是植入前导管感染, 植入后感染(post-infection)操作类似, 先植入一段无菌的导管, 大约 1h 后, 用 31 号针头向导管内注射 50 μ l 以 PBS 稀释的菌液, 约为 $10^3 \sim 10^5$ CFUs。

导管植入后感染试验对于手术植入后感染的研究或植入早期宿主蛋白促进细菌黏附生物材料的研究是很有帮助的。当每个导管感染 $10^3 \sim 10^5$ CFUs 金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌时, 直到试验的第 25~50 天, 导管上才会形成典型的生物被膜; 但是当每个导管的菌量在铜绿假单胞菌 $>10^6$ CFUs 或金黄色葡萄球菌 $>10^8$ CFUs 时, 动物死亡率达 100%; 当菌量 $\leq 10^5$ CFUs 时, 动物将成为慢性感染模型。

五、动物尿路插管相关感染模型建立

UTIS (Urinary tract infection) 是一种常见的感染性疾病, 大多数尿路感染发生在尿路插管以后, BPI 技术能够检测尿路感染的发病过程以及治疗效果和疾病复发等。

方法如下:

1. 截取 6mm 长的聚乙烯导管 (PE50), 中心套入一根柔软的金属丝。
2. 外围绕一根金属丝使其成为螺旋状, 开水中放置 1min。
3. 取下导管用 70% 的酒精消毒, 空气中干燥过夜。
4. 使导管形成生物被膜。
5. 截取 5cm 长中间有金属空心针的聚四氟乙烯导管 (24-Gauge), 将无菌或长有生物被膜的 PE 导管套入金属空心针内。
6. 用 2.5% 异氟烷气体麻醉一只体重约 26~30g 的雄性 CF-1 小鼠, 仰卧位固定。
7. 外尿道周围用 70% 酒精消毒处理。
8. 用手术钳轻轻捏住并从腹部拎起外尿道口。
9. 利用金属空心针带动 6mm 长的 PE 导管进入尿道, 使整个导管滞留在膀胱中, 拉出 5cm 长的聚四氟乙烯导管和金属空心丝, 滞留在膀胱内的 PE 导管自动成为螺旋状。
10. 用高灵敏度低光线视像系统观察动物。

与插管后感染模型的建立类似, 先向膀胱内插入一段无菌的 PE 管, 然后再次向膀胱内插入聚四氟乙烯导管, 通过这个导管注射 50 μ l 定量的菌液 (PBS 稀释)。

六、中央静脉导管小鼠感染模型建立

随着现代医疗事业的发展, 血管内长期置管技术已成为外科的先进技术之一, 但常有化脓性感染并发症的发生, 最常见的是葡萄球菌感染, 往往由于手术过程中污染或手术后血液中的细菌黏附定植在植入的导管上形成生物被膜, BPI 技术观测中央静脉导管感染虽然未应用于临床, 但是在科研过程中已经取得了初步的效果。

方法如下:

为降低试验操作过程中动物的死亡率,建议购买专门用于外科研究的小鼠或商品化的小鼠。

1. 小鼠导管插入 5~7 天后,静脉内注射 PBS 稀释的对数期生长的金黄色葡萄球菌 10^4 CFUs。
2. 设立对照组:导管插入的正常小鼠静脉内注射同样菌量。
3. 在高灵敏度低光线视像系统下观察。
4. 为获得最佳观测效果,剃掉靠近心脏(腹部)、脾脏和肾脏(背部)的毛。

七、导管细菌的分离技术

1. 最末观察时间点之后,人性化处死小鼠(根据 Institutional Animal Care Use Committee 有关条例规定)。
2. 在视像系统下找到细菌荧光最强的导管。
3. 将此导管放入含有 1ml TSB 缓冲液的试管内,超声处理 5~10min (38.5~40.5kHz)。
4. 颠倒混匀试管 1min,确保生物被膜完全从导管上剥离下来(可在视像观测系统下观察)。
5. 如有必要可以重复超声操作,但是注意:超声 >10min 会影响某些病原菌的活力。
6. 混匀从导管上剥离下来的菌液,在含有胰蛋白酶的蛋白琼脂平板上 37℃ 培养过夜,以每个导管每秒的光子数 (Photons/Sec/Cather) 与每个导管 CFUs (CFUs/Cather) 的比值表示导管上菌落数与生物荧光信号的关系。

八、视像观测系统

1. 成像之前或成像过程中,用 2%~2.5% 异氟烷气体麻醉小鼠。
2. 利用高敏感度检测系统 IVIS Imaging System 多个时间点观测小鼠的背部和腹部。
3. Xenogen's Living Image 软件定量分析从试验动物特定部位(膀胱、肾脏、侧腹部、腹部和心脏等)发射出的光子数。
4. 观测结束后,将小鼠放回饲养笼,待下一个时间点观测时再进行如上操作。

(娄晓丽 何 平)