

克隆识别

——应用于流行病学和院内
感染学的方法和技术

主编 李蓉 郭晓奎

北京医科大学
中国协和医科大学联合大学

克 隆 识 别

——应用于流行病学和院内感染学的方法和技术

主 编

李 蓉 郭晓奎

编 者

(按姓氏笔画为序)

牛美娟 吕亚彬 ~~李蓉~~ 李呼伦
张凤民 钟照 ~~李蓉~~ ~~郭晓奎~~ 赵月辉
施福东 徐 ~~红薇~~

北 京 医 科 大 学
中国协和医科大学 联合出版社

[京] 新登字 147 号

图书在版编目 (CIP) 数据

克隆识别: 应用于流行病学和院内感染学的方法和技术
/李蓉, 郭晓奎主编. —北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994

ISBN 7-81034-382-3

I. 克… II. ①李…②郭… III. 无性系-识别 IV. ①
R372②R181.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (94) 第 07800 号

克 隆 识 别

——应用于流行病学和院内感染学的方法和技术

李 蓉 郭晓奎

责任编辑: 陈永生 王庆然

*

北 京 医 科 大 学 联合出版社出版
中国协和医科大学

北京市昌平精工印刷厂印刷

四方计算机照排中心排版

新华书店北京发行所发行

*

787×1092 毫米 1/32 印张 8.25 千字 183

1994 年 10 月第 1 版 1994 年 10 月北京第一次印刷

印数: 1—2000

ISBN 7-81034-382-3/R · 381

定价: 10.80 元

2-196/04

内 容 简 介

本书专门介绍流行病学、院内感染学领域中的微生物定性、定量、定位分析技术。内容包括经典方法、核酸分析方法、蛋白质和酶分析方法等，重点介绍分子生物学技术，既面向基层又具有先进性。方法可重复性强，实用性强。本书文字浅显易懂，简明扼要。适合大专院校、卫生防疫、医疗检验、食品监测、院内感染监测、畜牧兽医、轻工、外贸商检、粮食、副食等有关部门的微生物学、流行病学工作者和从事上述专业教学和学习的师生使用和参考。

序

在由微生物引起的医学、保健、食品、商检等问题中，原因微生物的确定和研究是核心问题，以往国内出版的有关书籍介绍的传统方法已远不适应当前社会、经济和科学技术发展形势的要求。李蓉、郭晓奎主编的《克隆识别》一书，采用现代分子生物学技术，对微生物进行定性、定量、定位分析，系统地论述了各种克隆识别技术的原理、操作步骤及应用实例。所介绍的方法既有科学性、先进性，又能面向基层，具有很强的实用性，普及与提高并重。相信本书的出版，将为流行病学和院内感染学的克隆识别，为跟踪国际同类研究水平，起到积极的促进作用。有鉴于此，愿为作序，以资推荐。

张凤山

1993年10月26日

前 言

克隆是菌落、集落、群体之意。在微生物学中是指由单一微生物个体繁衍而来的群体。在流行病学中，克隆又具有同源的含义。同一克隆具有相同的表型和遗传型。克隆有广义和狭义之分，广义上指同一类群的微生物，科、属、种和型分别为4个层次上的克隆；狭义上是指亚型，或基因在各种水平上的差异所构成的类别，如基因的限制性多态性构成的各种克隆。克隆识别，即对来自不同时间、不同地点、不同标本的微生物株进行鉴定、区别，判断其是否为同一克隆。

克隆识别技术主要包括经典的分型方法和分子生物学分析技术。经典分型方法包括血清学分型、细菌素分型、噬菌体分型和耐药谱分型等，这些方法在克隆识别上仍具有现实意义。分子生物学技术主要包括核酸（基因）、蛋白质和酶等的分析技术，是目前仍在发展并具良好应用前景的克隆识别手段。

本书重点介绍了质粒图谱、基因组及其酶切图谱、分子杂交、染色体探针杂交图谱、多聚酶链反应（PCR）、寡核苷酸图谱以及蛋白质和多位点酶等分子生物学技术在克隆识别方面的应用。其中质粒图谱和可溶性蛋白分析技术相对简便，实用性强，适合基层应用。限制性多态性分析（基因组核酸和质粒的酶切图谱、染色体探针杂交图谱、寡核苷酸酶切图谱分析等）、核酸杂交和PCR分析，相对来说技术难度较大，适合基础较好的实验室或研究室使用。

编写本书旨在推动分子生物学技术在传染病学、微生物

流行病学和院内感染学领域的应用,也是一种大胆的尝试。本书编写者虽从事此领域研究多年,有一定的实践经验,但由于该技术仍在不断发展、进步,因此,书中难免出现不当或疏漏之处,诚恳希望同行多多给予指教。

李 蓉 郭晓奎

1993 年 10 月于哈尔滨

目 录

第一篇 经典分析技术简介.....	(1)
抗生素敏感性分型.....	(3)
生物分型.....	(6)
噬菌体分型.....	(6)
血清型分型.....	(6)
细菌素分型.....	(6)
第二篇 核酸分析技术.....	(9)
第一章 质粒图谱分析技术.....	(11)
第一节 概述.....	(11)
第二节 方法.....	(17)
1. 小量制备质粒 DNA 用菌株的 培养和收获	(17)
2. 质粒 DNA 的提取	(19)
3. 凝胶电泳	(26)
4. 琼脂糖凝胶中 DNA 的回收	(39)
5. 限制性内切酶的使用	(44)
6. 质粒和质粒酶切图谱结果分析	(51)
第二章 基因组核酸电泳图谱分析技术.....	(61)
第一节 概述.....	(61)
第二节 基因组核酸电泳核型分析方法.....	(67)
1. 低等真核生物基因组核酸电泳分析	(67)
2. 病毒基因组核酸电泳分析	(69)
第三节 基因组核酸酶切电泳图谱分析方法.....	(71)
1. 基因组核酸的提取	(72)

2. 限制性内切酶酶切	(79)
3. 电泳	(80)
4. 结果分析	(80)
第三章 核酸分子杂交技术.....	(82)
第一节 概述.....	(82)
第二节 方法.....	(94)
1. 重组质粒目的基因的获取	(94)
2. 核酸探针的标记.....	(98)
3. 固相杂交	(109)
第四章 染色体探针杂交图谱分析技术.....	(120)
第一节 概述.....	(120)
第二节 方法.....	(127)
1. Southern 转移	(128)
2. Southern 膜的预杂交	(131)
3. Southern 膜杂交	(132)
4. 杂交后 Southern 膜的洗涤	(132)
5. 放射自显影	(133)
6. 注意事项	(133)
第五章 PCR 分析技术	(136)
第一节 概述.....	(136)
第二节 方法.....	(140)
1. 参与 PCR 的组成部分及相关因素.....	(140)
2. PCR 的基本方法	(151)
3. PCR 实验室操作注意事项	(152)
第六章 寡核苷酸分析技术.....	(157)
第一节 概述.....	(157)
第二节 方法.....	(159)

1. 微生物分离培养	(161)
2. RNA 的提取	(161)
3. T ₁ 酶消化	(162)
4. γ - ³² PATP 标记	(162)
5. 寡核苷酸提取	(163)
6. 标本处理	(163)
7. 电泳	(164)
8. 结果判定	(167)
第三篇 蛋白质和酶分析技术	(171)
第七章 全细胞可溶性蛋白图谱分析技术	(173)
第一节 概述	(173)
第二节 方法	(176)
1. 全细胞可溶性蛋白样品的制备	(176)
2. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(177)
3. 蛋白免疫印迹法	(182)
第八章 外膜蛋白图谱分析技术	(190)
第一节 概述	(190)
第二节 方法	(193)
1. 外膜蛋白提取	(193)
2. OMP 的 SDS-PAGE 方法	(195)
3. 结果分析方法和资料处理	(195)
第九章 多位点酶电泳分析技术	(199)
第一节 概述	(199)
第二节 方法	(203)
1. 制备酶提取物	(203)
2. 电泳	(204)
3. 酶的染色	(205)

4. 结果判定	(220)
5. 资料分析	(223)
附录.....	(227)
1. 器材和仪器	(227)
2. 试剂和溶液	(230)
3. 培养基和抗生素溶液的配制	(238)
4. 常用数据	(242)
5. 核酸的定量	(248)
6. EB 溶液的净化处理	(249)

第一篇

经典分析技术简介

流行病学和院内感染学调查中常发现有相同的感染菌株，通常用其生化特征和抗生素敏感性进行分型，有时仅凭这两种方法无法区分类似菌株，则需采用其它方法进行分型。

经典分析方法包括：抗生素敏感性分型、生物分型、噬菌体敏感性分型、血清分型和细菌素分型。表1列出可被经典方法分析的病原体，尽管有些基层实验室不具备特异分型的设施，但必须熟知哪些病原菌可以被经典法分型，哪些不能；而且必须知道哪些实验室具备此能力。当流行病学调查发现重要病原菌时，标本应迅速转交给他们。

本书对经典分型方法仅做一简述，具体操作方法请参见有关书籍。

抗生素敏感性分型⁽²⁾

1. K—B 纸片扩散法：将含一定量的抗菌药物纸片，平贴在已经接种了待测菌的琼脂培养基上，纸片中的抗菌药物溶解于培养基中，并环绕纸片向四周扩散，扩散在琼脂中的药物浓度与扩散距离成反比。如果待测菌对该药物敏感，则在琼脂上药物最低抑菌浓度范围内生长受到抑制，从而在含药纸片周围形成透明的抑菌环。将平皿衬一黑色背景，从背面量取抑菌环直径（以 mm 为单位）。如用血平板，则需打开平皿盖从正面量取抑菌环直径。根据抑菌环的大小，以确定待测菌对该药物的敏感度，然后根据待测菌的耐药谱进行分型。

2. MIC 和 MBC 测定：用培养基把抗生素倍比稀释，然后接入定量的待测菌，12~18 小时内定量测定抗生素对待测菌的最低抑菌浓度（MIC）和最低杀菌浓度（MBC）。凡培养管外观清晰不混浊者为无菌生长，无菌生长管中稀释度最大的一管的浓度为待测菌的最低抑菌浓度（MIC）；将其 0.01ml

表 1 流行病学调查中相关菌株几种经典分型系统^[1]

分型系统	可分型的细菌	参考文献	分型系统	可分型的细菌	参考文献
抗生素敏	艰难梭菌	5		变形杆菌属	25
感性分型	类白喉棒状杆菌	6		铜绿假单胞菌	26
	肠杆菌属	7		沙门氏菌属	27
	大肠埃希氏菌	8		粘质沙雷氏菌	15
	流感嗜血杆菌	9		志贺氏菌属	28
	克雷伯氏菌属	10		金黄色葡萄球菌	29
	偶发分枝杆菌	11		血浆凝固酶阴性的	
	变形杆菌属	12		葡萄球菌	18
	铜绿假单胞菌	13		耶尔森氏菌属	19
	沙门氏菌属	14	血清分型	空肠弯曲菌	30
	粘质沙雷氏菌	15		大肠埃希氏菌	8
	志贺氏菌属	16		流感嗜血杆菌	9
	金黄色葡萄球菌	17		克雷伯氏菌属	20
	血浆凝固酶阴			军团菌属	31
	性的葡萄球菌	18		李斯特氏菌属	32
	耶尔森氏菌属	19		变形杆菌属	12
生物分型	类白喉棒状杆菌	6		铜绿假单胞菌	13
	肠杆菌属	7		洋葱假单胞菌	33
	大肠埃希氏菌属	8		沙门氏菌属	34
	流感嗜血杆菌	9		沙雷氏菌属	15
	克雷伯氏菌属	20		志贺氏菌属	34
	偶发分枝杆菌	11		金黄色葡萄球菌	35, 36
	变形杆菌属	12		血浆凝固酶阴性的	
	粘质沙雷氏菌	15		葡萄球菌	36
	金黄色葡萄球菌	21		链球菌属	37
	血浆凝固酶阴			耶尔森氏菌属	19
	性的葡萄球菌	18	细菌素分	艰难梭菌	22
	耶尔森氏菌属	19	型	肠杆菌属	38
噬菌体敏	艰难梭菌	22		大肠埃希氏菌	39
感性分型	大肠埃希氏菌	23		克雷伯氏菌属	40

续表

分型系统	可分型的细菌	参考文献	分型系统	可分型的细菌	参考文献
	克雷伯氏菌属	20		变形杆菌属	12
	李斯特氏菌属	24		铜绿假单胞菌	41
				沙雷氏菌属	15
				志贺氏菌属	42
				A 群链球菌	43

接种血平板作次代培养，经 35℃ 过夜后，99.9% 的待测菌被杀死的最低药物浓度为该菌的最低杀菌浓度 (MBC)。MIC 和 MBC 测定也可用琼脂稀释法。用此法，一块含药平板可测定多株耐药菌。根据各待测菌对实验室常用抗生素的敏感程度和抗药性对细菌进行分型。

3. 联合抗生素敏感性测定：为测定待测菌是否有联合抗药作用时使用。其方法有多种，常用的有纸片法、平板纸条交错法、梯度纸条法及联合试管稀释法等。

4. 厌氧菌药物敏感性测定：厌氧菌不需做常规抗生素敏感性试验，但对于监测常见厌氧菌耐药谱型变化来说，药敏试验也是必要的。厌氧菌药敏试验以肉汤纸片法为好，而琼脂扩散法由于厌氧环境所限不宜采用。

5. 真菌对抗菌药物的敏感性测定：由于各种致病真菌的形态、生长速度、培养条件不同，常用抗真菌药物的理、化性质也不同，因此，药敏试验必须根据所分离的真菌种类选择不同试验方法。

无论采取何种方法、对何种病原菌进行药物敏感性分型，实验中都要做标准菌株对照。

生物分型

生物分型是实验室中最常用的一种方法，即根据不同细菌常表现出来的生化特征进行分型，因此，根据不同细菌有不同的方法。无论是自制的还是市售的生化鉴定用品，使用时都要用标准菌株做对照以检测其准确性。流行病学调查中常把生化分型（即生物分型）与药物敏感性分型结合起来鉴别分离菌株^{〔3〕}。与调查中分离的菌株生化特性相同但抗药性不同的菌株常作为对照菌株。

噬菌体分型

噬菌体为专性寄生于细菌的病毒（也叫细菌的病毒），不同的噬菌体对某种细菌有特异的侵袭性。因此，根据噬菌体对细菌的侵袭性不同，可对细菌进行分型。噬菌体分型是公认的对金黄色葡萄球菌分型的最佳方法（参见表1）。不过，目前基层实验室多不具备作此分型的条件，而且质粒的转移也会干扰鉴定的结果，这将有碍于噬菌体分型的推广应用。其实，基层实验室，只要能得到开展过噬菌体分型实验技术人员的指导，完全可以开展这项工作。

血清型分型

血清型分型是依据细菌所具的特异抗原与其特异对应的抗体间的免疫反应机理建立起来的分型方法，它被经常地、有效地应用于对许多革兰氏阴性杆菌（尤其是肠杆菌科的细菌和铜绿假单胞菌）进行分型。最近出现了多种对金黄色葡萄球菌荚膜（有些金黄色葡萄球菌有荚膜或粘膜）抗原的检测方法（参见表1）。血清型方法无论在疾病爆发调查中还是在科研中都是一种很有效的分析手段^{〔4〕}。

细菌素分型

许多细菌可产生细菌素以抑制其它细菌的生长。无论是