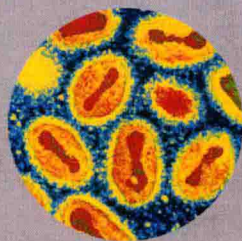
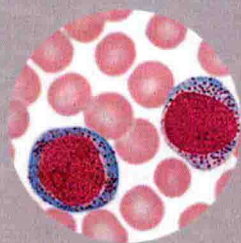
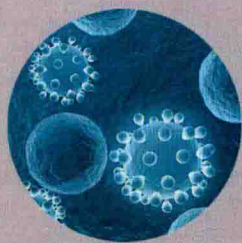




# 现代医学


# 检验技术

XIANDAI YI XUE JIANYAN JI SHU



主编 肖 静 余道军 王新华  
张淑芳 陈世知 胡军华

天津出版传媒集团

 天津科学技术出版社

# 现代医学检验技术

主 编	肖 静	余道军	王新华
	张淑芳	陈世知	胡军华
副主编	邓如琦	向华国	杨阿宁
	李 哲	李 臣	宋江勤
	刘镜光	万举姜	

天津出版传媒集团

 天津科学技术出版社

### 图书在版编目(CIP)数据

现代医学检验技术 / 肖静, 余道军, 王新华主编

—天津: 天津科学技术出版社, 2018.1


ISBN 978-7-5576-4109-2

I. ①现… II. ①肖… ②余… ③王… III. ①医学检验 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 022109 号

责任编辑: 张建锋

责任印制: 兰毅

天津出版传媒集团 出版  
 天津科学技术出版社

出版人: 蔡颢

天津市西康路 35 号 邮编 300051

电话(022)23332377(编辑室)

网址: [www.tjkjcs.com.cn](http://www.tjkjcs.com.cn)

新华书店经销

天津印艺通制版印刷有限责任公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张 33.75 字数 900 000

2018 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

定价: 88.00 元



**肖 静** 男,1968年生,现任深圳市宝安区松岗人民医院中心实验室主任,主任技师,医学硕士,1999年毕业于中山医科大学病原生物学专业、从事临床医学检验专业27年,主要从事病原生物学、分子生物学研究,完成的课题5项、发表文章12篇。



**余道军** 医学博士,硕导,主任技师,执业医师。先后在蚌埠医学院附属医院和杭州市第一人民医院检验科从事临床检验诊断、科研、教学工作。现为浙江中医药大学、温州医学院和南京医科大学硕导,浙江省和杭州市科技专家库专家。主持包括省自然科学基金、省科技厅公益技术应用在内的各类科研项目近20项,参与863项目和国家自然科学基金项目各2项,发表论文60余篇(SCI收录论文15篇),申请发明专利6项(已获授权2项),研发诊断试剂1项,各类科研获奖10项,参加国际学术交流5次,参编专著1部。



**王新华** 男,主任检验技师。湖南省健康服务业协会医卫检验分会常务理事、湖南省医学会检验专业委员会委员、湖南省临床检验质量控制委员会委员、湖南省益阳市医学会检验专科学会主任委员、湖南省益阳市临床检验质量控制中心主任。从事临床检验工作27年,主要从事病毒免疫学检测与诊断、细胞免疫与体液免疫检测及研究。现任湖南益阳市中心医院临床检验中心主任。主持国家863子课题及湖南省科技厅科研项目4项,发表专业论文30余篇。获湖南省科学技术进步三等奖1项、益阳市科学技术进步一等奖1项、湖南省自然科学论文三等奖2项。

# 编 委 会

- |     |     |                     |
|-----|-----|---------------------|
| 主 编 | 肖 静 | 广东省深圳市宝安区松岗人民医院     |
|     | 余道军 | 杭州市第一人民医院           |
|     | 王新华 | 湖南省益阳市中心医院          |
|     | 张淑芳 | 海口市人民医院             |
|     | 陈世知 | 重庆医科大学附属第二医院        |
|     | 胡军华 | 湖北省汉川市第二人民医院        |
| 副主编 | 邓如琦 | 广州艾迪康医学检验所有限公司      |
|     | 向华国 | 深圳市宝安人民医院(集团)第三人民医院 |
|     | 杨阿宁 | 贵州省黔西县人民医院          |
|     | 李 哲 | 广东省东莞市万江医院          |
|     | 李 臣 | 甘肃省金昌市中西医结合医院       |
|     | 宋江勤 | 湖北省天门市第一人民医院        |
|     | 刘镜光 | 深圳市宝安人民医院(集团)第三人民医院 |
|     | 万举姜 | 云南大理祥云县人民医院         |
| 编 委 | 邵圣文 | 湖州师范学院              |
|     | 许 睿 | 新乡医学院第二附属医院         |

# 前 言

医学检验学科是一门多学科相互交融的边缘科学,发展迅速。随着基础理论研究的不断深入和分析技术的迅速发展,临床检验的新项目、新方法不断涌现,同时也有些检验项目或方法需要淘汰更新,检验工作者对原有项目的认识和应用也在不断深化。

检验是对感染性疾病的病原(包括细菌、病毒、真菌、寄生虫)进行检测、鉴定和抗微生物药敏试验的一门学科。随着医疗的不断进步,介入操作的迅速发展,抗菌药物广泛使用而造成的各类多重耐药菌、泛耐药菌的暴发和播散,医学检验在现代医学中的地位不断提高。特别是新发和再发感染性疾病的出现,医学检验实验室作为发现病原的前哨,其作用越发凸显出来。

医学检验主要作用在于:①对感染性疾病做出快速、准确的病原学诊断确诊依据,提供治疗、预防建议和咨询服务,参与疑难性感染性疾病的会诊;②监测和预警院内感染的暴发,确定暴发的来源并及时控制其播散;③参与医疗机构抗菌药物的管理工作;④提供药敏监测数据,为临床经验用药提供指导;⑤开展微生物学研究和教学工作。

我们有必要将这些进展、变化现于笔端,呈现给对医学检验孜孜以求的同道们。

由于作者水平所限,疏漏错误在所难免,望同道批评赐正。

本书由一线专家、教授共同创作完成,他们具有深厚的理论基础和多年临床经验,具体分工如下。

- ◆肖 静 (第一章至第五章)
- ◆余道军 (第十五章)
- ◆王新华 (第十九章、第二十章)
- ◆张淑芳 (第二十三章、第二十六章)
- ◆陈世知 (第七章、第八章)
- ◆胡军华 (第十三章中第八节至第十一节、第二十二章)
- ◆邓如琦 (第十六章中第一节至第十四节)
- ◆向华国 (第六章、第二十五章)
- ◆杨阿宁 (第二十七章)
- ◆李 哲 (第二十一章中第二节)
- ◆李 臣 (第十四章、第十六章中第十五节至第十七节)
- ◆宋江勤 (第十七章、第十八章)
- ◆刘镜光 (第九章至第十二章)
- ◆万举姜 (第十三章中第一节至第七节)
- ◆邵圣文 (第二十四章)
- ◆许 睿 (第二十一章中第一节)

作者  
2018年1月

# 目 录

<b>第一章 基因组及蛋白质组</b> .....	1
第一节 基因组 .....	2
第二节 蛋白质组 .....	16
<b>第二章 生物信息学</b> .....	26
第一节 生物信息学 .....	26
第二节 常用生物信息学软件 .....	34
<b>第三章 核酸与蛋白质的分离与纯化</b> .....	41
第一节 核酸分离与纯化的基本原则及技术路线 .....	41
第二节 DNA 的分离与纯化 .....	45
第三节 RNA 的分离与纯化 .....	52
第四节 蛋白质的分离与纯化 .....	55
<b>第四章 核酸扩增技术</b> .....	62
第一节 聚合酶链式反应 .....	62
第二节 PCR 产物的不同检测技术 .....	68
第三节 衍生的 PCR 技术 .....	71
第四节 临床基因扩增实验室的质量控制 .....	83
<b>第五章 核酸分子杂交技术</b> .....	92
第一节 核酸分子杂交 .....	92
第二节 核酸探针 .....	101
第三节 杂交信号的检测 .....	109
第四节 荧光原位杂交 .....	112
<b>第六章 核酸测序技术</b> .....	118
第一节 第一代测序技术 .....	118
第二节 第二代测序技术 .....	122
第三节 第三代测序技术 .....	126
<b>第七章 分子克隆技术</b> .....	129
第一节 分子克隆的工具 .....	129
第二节 重组基因的导入策略 .....	139
第三节 重组子的鉴定 .....	140
<b>第八章 感染性疾病的临床分子诊断</b> .....	143

第一节	病毒性疾病的临床分子诊断	144
第二节	细菌性疾病的临床分子诊断	150
第三节	特殊病原体的临床分子诊断	156
第四节	医院感染的临床分子诊断	160
<b>第九章</b>	<b>粪便检查</b>	164
第一节	粪便标本的采集与处理	164
第二节	粪便理学检验	165
第三节	粪便隐血试验	165
第四节	粪便有形成分检验	167
<b>第十章</b>	<b>脑脊液检验</b>	169
第一节	脑脊液标本的采集与处理	169
第二节	脑脊液理学检验	169
第三节	脑脊液化学检验	171
第四节	脑脊液有形成分分析	173
第五节	脑脊液病原微生物检查	174
<b>第十一章</b>	<b>痰液检验</b>	175
第一节	痰液标本的采集与处理	175
第二节	痰液理学检验	176
第三节	痰液有形成分分析	176
<b>第十二章</b>	<b>支气管肺泡灌洗液检验</b>	178
第一节	支气管肺泡灌洗液标本的采集与处理	178
第二节	支气管肺泡灌洗液有形成分分析	178
<b>第十三章</b>	<b>糖代谢测定</b>	180
第一节	血液葡萄糖测定	180
第二节	口服葡萄糖耐量试验	185
第三节	糖化血红蛋白测定	186
第四节	糖化血清蛋白测定	191
第五节	血清 C 肽测定	193
第六节	血清胰岛素测定	193
第七节	脑脊液葡萄糖测定	194
第八节	尿液葡萄糖测定	194
第九节	血浆乳酸测定	194
第十节	血浆丙酮酸测定	197
第十一节	血清 $\beta$ -羟丁酸测定	198
<b>第十四章</b>	<b>天然免疫功能检测</b>	201
第一节	中性粒细胞免疫功能检测	201
第二节	自然杀伤细胞功能检测	205
第三节	急性时相反应蛋白检测	207
<b>第十五章</b>	<b>感染性疾病免疫检测</b>	210

第一节	甲型肝炎病毒免疫检测	210
第二节	乙型肝炎病毒免疫检测	214
第三节	丙型肝炎病毒免疫检测	220
第四节	丁型肝炎病毒免疫检测	224
第五节	戊型肝炎病毒免疫检测	225
第六节	人类免疫缺陷病毒免疫检测	226
第七节	梅毒螺旋体免疫检测	229
第八节	弓形虫免疫检测	232
第九节	巨细胞病毒免疫检测	235
第十节	单纯疱疹病毒免疫检测	237
第十一节	风疹病毒免疫检测	238
第十二节	呼吸道病毒免疫检测	239
第十三节	肠道病毒免疫检测	251
第十四节	轮状病毒免疫检测	257
第十五节	登革病毒免疫检测	258
第十六节	人乳头瘤病毒免疫检测	260
第十七节	EB病毒免疫检测	261
第十八节	结核分枝杆菌免疫检测	264
第十九节	幽门螺杆菌免疫检测	265
第二十节	其他细菌免疫检测	267
第二十一节	抗链球菌溶血素“O”检测	279
第二十二节	降钙素原检测	280
<b>第十六章</b>	<b>肿瘤标志物检测</b>	<b>283</b>
第一节	甲胎蛋白检测	283
第二节	甲胎蛋白异质体检测	286
第三节	癌胚抗原检测	290
第四节	CA19-9 检测	292
第五节	CA125 检测	294
第六节	CA15-3 检测	296
第七节	CA242 检测	299
第八节	CA72-4 检测	299
第九节	神经元特异烯醇化酶检测	301
第十节	细胞角蛋白 19 片段检测	302
第十一节	胃泌素释放肽前体检测	304
第十二节	前列腺特异性抗原检测	306
第十三节	人绒毛膜促性腺激素检测	310
第十四节	$\beta_2$ -微球蛋白检测	312
第十五节	鳞状上皮细胞癌抗原检测	314
第十六节	人表皮生长因子受体-2 蛋白胞外区检测	316
第十七节	人附睾蛋白 4 检测	318

<b>第十七章</b>	<b>临床病原生物学检验质量保证</b>	321
第一节	基本条件	321
第二节	检验前质量控制	326
第三节	检验中质量控制	327
第四节	检验后质量控制	329
<b>第十八章</b>	<b>病原生物学检验技术</b>	332
第一节	显微镜检验技术	332
第二节	分离培养技术	333
第三节	快速诊断技术	336
第四节	消毒与灭菌技术	337
<b>第十九章</b>	<b>病毒检验与鉴定</b>	340
第一节	概述	340
第二节	病毒检验	344
第三节	病毒鉴定	354
<b>第二十章</b>	<b>寄生虫检验与常规鉴定</b>	367
第一节	概述	367
第二节	寄生虫检验	370
第三节	寄生虫形态特征与鉴定	381
<b>第二十一章</b>	<b>染色体病和遗传性疾病基因检测</b>	391
第一节	染色体病基因检测	391
第二节	遗传性疾病基因检测	396
<b>第二十二章</b>	<b>肿瘤基因检测</b>	412
第一节	白血病融合基因检测	413
第二节	神经母细胞瘤 N-myc 基因检测	418
第三节	尤文肉瘤 EWS 基因检测	421
第四节	淋巴瘤融合基因检测	423
第五节	骨髓增殖性肿瘤基因突变检测	429
<b>第二十三章</b>	<b>血培养标本的检测流程</b>	435
第一节	标本采集和运送	436
第二节	培养方法	440
第三节	标本处理流程	441
第四节	质量控制	445
第五节	特殊菌的处理流程	448
第六节	结果报告和解释	453
第七节	局限性	455
<b>第二十四章</b>	<b>眼部标本检测流程</b>	456
第一节	标本采集和运送	456
第二节	标本处理	458
第三节	其他诊断技术	461

第四节	结果报告和解释 .....	462
<b>第二十五章</b>	<b>尿标本的检测流程</b> .....	464
第一节	标本的采集和运送 .....	464
第二节	标本的处理流程 .....	467
第三节	结果报告和解释 .....	473
第四节	质量控制和局限性 .....	476
<b>第二十六章</b>	<b>皮肤和软组织标本的检测流程</b> .....	478
第一节	烧伤标本 .....	478
第二节	伤口组织和脓液标本 .....	484
第三节	糖尿病足标本 .....	488
第四节	浅部真菌标本 .....	492
<b>第二十七章</b>	<b>真菌</b> .....	499
第一节	真菌鉴定思路 .....	499
第二节	酵母样真菌 .....	501
第三节	皮肤癣菌 .....	510
第四节	接合菌 .....	514
第五节	曲霉菌 .....	519
<b>参考文献</b>	.....	523

# 第一章 基因组及蛋白质组

基因是遗传信息的携带者,而全部生物功能的执行者却是蛋白质,仅从基因的角度来研究生命活动是远远不够的,必须对基因、转录和翻译等进行研究,才能真正揭示生命活动规律,揭开生命之谜,使之成为人类社会服务。随着基因组学研究的不断深入,转录组学、蛋白质组学、代谢组学等组学的不断涌现,生物学研究已经跨入后基因组时代。

基因组是德国汉堡大学植物学教授汉斯·温克勒(Hans Winkler)1920年提出的,指一个细胞或一种生物体的整套遗传物质。基因组学是研究生物基因组的组成,组内各基因的精确结构、相互关系及表达调控的科学,是涉及基因作图、测序和整个基因组功能分析的遗传学分支。基因组学研究包括两方面的内容:以全基因组测序为目标的结构基因组学和以基因功能鉴定为目标的功能基因组学。随着人类基因组被破译,“生命之图”被绘就,很多疾病的病因将被揭开,利用基因治疗更多的疾病不再是一个奢望,人类的整体健康状况将会大大得到改善。

蛋白质组是由澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 于 1994 首先提出,指全部基因表达的所有蛋白质及其存在方式,是每一个基因、一个细胞或组织所表达的全部蛋白质成分。蛋白质组学是对不同时间和空间发挥功能的特定蛋白质群体的研究,旨在阐明生物体全部蛋白质的表达模式及功能模式,内容包括鉴定蛋白质表达、存在方式、结构、功能和相互作用方式等,为临床诊断、病理研究、药物筛选、药物开发、新陈代谢途径等提供理论依据和基础。

转录组是指从一种细胞或者组织的基因组所转录出来的 RNA 的总和,包括编码蛋白质的 mRNA 和各种非编码 RNA。狭义转录组是指所有参与翻译蛋白质的 mRNA 总和。与基因组不同的是转录组包括了所有在细胞里的 mRNA 的转录,反映了在任何给定时间内活跃表达的基因。自 20 世纪 90 年代中期以来,随着微阵列技术被用于大规模的基因表达水平研究,转录组学作为一门新技术开始在生物学前沿研究中崭露头角并逐渐成为生命科学研究的热点。

代谢组是 1998 年由 Tweeddale 等在研究大肠杆菌的代谢时首次提出的,是生物体内源性代谢物质的动态整体。而传统的代谢概念既包括生物合成,也包括生物分解,因此理论上代谢物应包括核酸、蛋白质、脂类生物大分子以及其他小分子代谢物质。但为了有别于基因组、转录组和蛋白质组,代谢组目前只涉及相对分子质量小于 1000 的小分子代谢物质。相对于基因组学、转录组学和蛋白质组学来说,基因、转录子、蛋白质的存在是为某生物学事件或过程的发生奠定物质基础,但这个事件或过程有可能不发生;而代谢物的存在则反映生命过程中已经发生的生物化学反应,其变化正是对该生物事件或过程的反映。代谢组学是对其他三种组学的重要补充。代谢组学是通过考察生物体系在受到外界刺激后对其体液(血液、尿液、淋巴液等)及组织代谢产物的组成变化或其随时间的变化,来研究生物体系代谢途径的一种技术。

外显子组是指全部外显子区域的集合,该区域包含合成蛋白质所需要的重要信息,涵盖了与个体表型相关的大部分功能性变异。外显子组是真核生物基因组的一部分,人类基因组大约含 180000 个外显子(约 30Mb),约占人类基因组的百分之一。近年应用全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)技术开展单基因遗传病致病基因和复杂疾病易感基因的鉴定研究成为了热点,外显子组测序是

介于全基因组关联分析与全基因组测序之间的基因分析策略。该技术能较系统地发现基因组中蛋白质编码区的主要遗传变异,与全基因组测序相比,工作量与分析成本相对较低。

## 第一节 基因组

不同生物体,其基因组组成差别很大。病毒基因组有的是 DNA,有的是 RNA,结构较简单,所含基因数量较少;原核生物多数只有一条染色体,其整条染色体就是基因组,基因数量远多于病毒基因组,且有较为完善的表达调控体系;真核生物体的基因组是指一套完整单倍体 DNA(染色体 DNA)与线粒体 DNA 的全部序列,包括了编码序列及非编码序列,所含的基因数量巨大,表达调节系统也更为精细。基因组大小和复杂程度不同,所储存的遗传信息量差别很大。不同生物体基因组大小见表 1-1。

表 1-1 不同生物体基因组大小

生物	基因组大小(碱基对)
病毒,噬菌体 $\phi$ -X174;	5387(最早完成测序的基因组)
病毒,噬菌体 $\lambda$	$5 \times 10^4$
细菌,大肠杆菌	$4 \times 10^6$
变形虫,无恒变形虫( <i>Amoeba dubia</i> )	$67 \times 10^{10}$ (2005 年 12 月已知的最大基因组)
植物,一种贝母( <i>Fritillary assyriaca</i> )	$13 \times 10^{10}$
真菌,酿酒酵母	$2 \times 10^7$
线虫,秀丽隐杆线虫	$8 \times 10^7$
昆虫,黑腹果蝇	$2 \times 10^8$
哺乳动物,人	$3 \times 10^9$

### 一、原核生物基因组

原核生物是细菌、支原体、衣原体、立克次氏体、螺旋体、放线菌及蓝绿藻等原始生物的总称,是最简单的细胞生物体。其繁殖迅速、容易获得突变株,其生命活动主要是利用外界环境中的营养成分获取能量,合成自身生长所需的材料(核苷酸、氨基酸等)。原核生物基因组的研究发展十分迅速,自 1995 年完成了第一个原核生物——流感嗜血杆菌基因组全序列测定至今已测出了 190 多种原核生物(包括真菌及古细菌)基因组 DNA 序列。

#### (一)原核生物基因组特征

##### 1.基因组分子质量较小

一般原核生物基因组碱基对在  $10^6 \sim 10^7$  bp 之间,如大肠杆菌基因组 DNA 分子大约有  $4.6 \times 10^6$  bp,是人类基因组( $3 \times 10^9$  bp)的 0.1%。基因数目也少,大约为 3500 个基因。

##### 2.环状双链 DNA 分子

原核生物基因组通常是一条环状双链 DNA 分子,只有一个复制起始点。基因组 DNA 虽然与蛋白结合,但并不形成染色体结构,只是习惯上仍将之称为染色体。

##### 3.具有类核结构

原核生物没有典型的细胞核结构,基因组 DNA 位于细胞中央的核区,没有核膜将其与细胞质

隔开,在蛋白质的协助下,以高度折叠、盘绕聚集在一起,形成致密的类核。类核中央部分由 RNA 和支架蛋白组成,外周是双链闭合的超螺旋 DNA。类核中 80% 为 DNA,其余为 RNA 和蛋白质。见图 1-1。



图 1-1 原核生物基因组的类核结构

#### 4. 广泛存在操纵子结构

原核生物的结构基因大多数按功能相关性串联排列在一起,结构基因连同其上游的调控区(包括调节基因、启动基因和操纵基因)以及下游的转录终止信号,共同组成了一个基因表达单位,即操纵子结构。如乳糖操纵子、阿拉伯糖操纵子及色氨酸操纵子等。原核生物的 mRNA 是多顺反子 mRNA,即一个 mRNA 分子带有几种蛋白质的遗传信息,转录出的 mRNA 分子可以编码几种不同的但多为功能相关的蛋白。

#### 5. 多为单拷贝

编码蛋白质的结构基因多为单拷贝,重复基因很少;但编码 rRNA 和 tRNA 的基因有多个拷贝,这有利于核糖体的快速组装和蛋白质的急需合成。结构基因中没有内含子成分, RNA 合成后不需要剪切加工。

#### 6. 结构基因无重叠现象

基因重叠是指基因组 DNA 中的某些序列被两个或两个以上的基因所共有。基因重叠现象在病毒基因组中普遍存在,但未在原核生物的结构基因中发现。

#### 7. 具有编码同工酶的不同基因

这是一类结构不完全相同的基因,但其表达的产物功能相同。如在大肠杆菌基因组中有两个编码分支酸变位酶同工酶的基因,两个编码乙酰乳酸合成酶同工酶的基因。

#### 8. 具有可移动的 DNA 序列

包括插入序列、转座子及质粒等。这些可移动的 DNA 序列通过不同的转移方式发生基因重组,改变生物体的遗传性状,使生物体更适应环境的变化。自然界中不同物种或个体之间的 DNA 重组和基因转移经常发生,它是基因变异、物种演变及生物进化的基础。

#### 9. 非编码区内主要是一些调控序列

原核生物基因组中编码区所占的比例约为 50%,远大于真核生物基因组(人类基因组编码序列仅占全基因组的 2%~3%),远小于病毒基因组(>90%)。非编码区域中常有反向重复序列存在,并形成特殊结构,具有一定的调控作用。如大肠杆菌色氨酸操纵子的终止子富含 GC 的反向重复序列,可以形成茎环结构,使转录终止。

### (二) 质粒

质粒是存在于细菌、真菌等微生物细胞中、独立于染色体外、能进行自我复制的遗传因子。质粒通常是共价、闭合、环状双链 DNA(简称 cccDNA)分子,但自 20 世纪 80 年代中期以来,在链霉

菌、酵母、丝状真菌等微生物中都发现了线状 DNA 质粒,甚至还有 RNA 质粒。质粒分子大小为 1~1000kb,其可以整合到染色体上,也可以游离于染色体外。质粒的存在与否对宿主细胞生存没有决定性的作用,但在某些条件下,质粒能赋予宿主细胞以特殊的功能。如抗药性质粒能使宿主细胞在有相应药物的环境中生存。在基因工程和分子生物学的发展过程中,质粒起着非常重要的作用。如以质粒为载体进行的基因克隆技术已在工、农、医等各个领域中得到广泛应用。

### 1. 质粒的命名

质粒命名原则是用小写字母 p 代表质粒,在 p 字母后用两个大写字母代表发现这一质粒的作者或实验室名称,如 pUC119,其中 p 代表质粒,U 和 C 是构建该质粒的研究人员的姓名,119 代表构建一系列质粒的编号。

### 2. 质粒的分类

质粒的类型较多,可根据质粒的功能、复制机制、转移方式等进行分类。

(1)按质粒的功能分为:F 质粒、R 质粒及 Col 质粒。①F 质粒(fertility factor,又称致育因子或性因子),是大肠杆菌等细菌中发现的一种最有代表性的单拷贝的接合型质粒,其决定性别并有转移功能。F 质粒的分子质量为  $62 \times 10^6$  D(62MD,1D=1u),有长 94.5kb 的环状 DNA 分子,其中 1/3 基因(tra 区)与接合作用有关。②R 质粒(resistance factor,又称抗药性质粒或耐药性质粒)具有使宿主菌对链霉素、四环素等抗生素产生抗药性的基因群,通过接合进行转移,获得该因子的细菌同时获得对多种药物的抗性。R 质粒由相连的两个 DNA 片段即抗性转移因子(resistance transfor factor,RTF)和抗性决定 R 因子组成。RTF 分子质量约为 11MD,控制质粒拷贝数及复制,可使耐药性自一菌转移至另一菌;抗性决定质粒大小,不固定,从几 MD 到 100MD 以上,含有抗生素的抗性基因,如抗青霉素(Penr)、抗氨苄青霉素(Ampr)、抗氯霉素(Chlr)等抗性基因。R 因子在细胞内的拷贝数可从 1~2 个到几十个,分为严紧型和松弛型两种,经氯霉素处理后,松弛型质粒可达 2000~3000 个/细胞。③Col 质粒(Col plasmid)又称大肠杆菌素生长因子,因在大肠杆菌中发现而得名,该质粒含有编码大肠杆菌素的基因。大肠杆菌素是一类由大肠杆菌某些菌株所产生的细菌素,具有通过抑制复制、转录、翻译或能量代谢等方式专一杀死其他肠道菌或同种其他菌株的能力。Col 质粒可分为两类:Col E1 及 Col Ib。Col E1 的特点是分子质量小,约为 5MD,无接合作用,是松弛型控制、多拷贝质粒,被广泛地用于重组 DNA 的研究;Col Ib 的特点是分子质量大,约为 80MD,与 F 质粒相似,具有通过接合而转移的功能,属严紧型控制质粒,只有 1~2 个拷贝。凡带有 Col 质粒的菌株,因质粒本身可编码免疫蛋白,故对大肠杆菌素有免疫作用,不受其伤害。

(2)按质粒的复制机制分为:严紧型质粒和松弛型质粒。严紧型质粒复制时受到宿主细胞的严格控制,只在细胞周期的一定阶段进行复制,当染色体不复制时,它也不能复制,通常每个细胞内只含有 1 个或几个质粒分子,如 F 质粒。松弛型质粒复制时不受宿主细胞的严格控制,在整个细胞周期中随时可以复制,在每个细胞中有许多拷贝,一般在 20 个以上,如 Col E1 质粒。如使用蛋白质合成抑制剂一氯霉素时,细胞内蛋白质合成、染色体 DNA 复制和细胞分裂均受到抑制,严紧型质粒复制停止,而松弛型质粒继续复制,质粒拷贝数可由原来 20 多个扩增至 1000~3000 个。

(3)按质粒的转移方式分为:接合型质粒、可移动型质粒及自传递型质粒。接合型质粒只能使细菌接合,本身不能被传递。其含有自我复制基因,还带有一套控制细菌配对和质粒接合转移的基因,如 F 质粒、部分 R 质粒等。可移动型质粒可以被动传递,但不能使细菌接合;自传递型质粒兼具上述两种质粒功能,如 F 质粒兼有接合和可移动的双重性质。

### 3. 质粒的生物学特征

#### (1) 质粒的大小和拷贝数

质粒的大小以分子质量 MD 或碱基对数 kb 表示, 1MD 的双链 DNA = 1.65kb。质粒的大小一般在 1~200kb, 最大的可达 1400kb(如苜蓿根瘤菌质粒 pRm141a)。质粒的拷贝数是指同一质粒在每个细胞中的数量, 不同的质粒在同一细胞中的拷贝数有差异。一般而言, 质粒的拷贝数与其分子大小成反比关系, 分子大的拷贝数低, 分子小的拷贝数高。如 F 质粒, DNA 长 94.5kb, 每个细胞中只有 1~2 个拷贝; 分子质量小的, DNA 长为 6.6kb 的 ColE1 质粒, 每个细胞中有 10~30 个拷贝。

#### (2) 质粒的转移

分子质量在 25MD 以上的质粒可以从供体细胞把它的一个复本转移给受体细胞, 如 F 质粒和 R 质粒。而分子质量在 10MD 以下的小质粒一般无自我转移能力。质粒的这种转移可以在同一种属的菌体内转移或菌体间转移; 也可以在不同种属的菌体间转移, 携带的遗传性状也可随之转移。如质粒可以从抗生素耐受细菌转移到抗生素敏感的同种或异种细菌中, 使后者变为耐药菌。

#### (3) 质粒的复制

质粒的复制主要有  $\theta$  型复制和滚环复制两种方式, 以  $\theta$  型复制为主。 $\theta$  型复制有单向复制和双向复制两种类型。革兰氏阴性菌中多数质粒是以  $\theta$  型方式复制, R1、R100 等是单向复制, F、R6k 等是双向复制类型。在革兰氏阳性菌中大多数质粒是以滚环方式复制。

复制起点即 ori 位点, 是一段特定的 DNA 序列, 长约几百个碱基对, 含有参与 DNA 合成起始调控因子的结合位点。在大多数质粒中, ori 位点周围的小范围 DNA 是质粒复制所必需的, 因为与复制有关的蛋白质基因位于它们的作用位点 ori 序列附近。如果质粒 DNA 的大部分区域被去掉, 而只保留质粒的 ori 序列, 而且质粒是环状的, 则质粒仍然能进行复制。将 ori 区克隆到一个不能自主复制的环状双链 DNA 分子上并引入到原核细胞后, 该重组 DNA 具有自主复制能力。分子克隆中常用的质粒载体就是以这种方法构建的。

如 ColE1 质粒 DNA 的复制, 是从特定的复制起点 ori 开始, 单向进行。在复制时, 首先合成前 RNA II, 即前引物, 并与 DNA 形成杂交体; 而后 RNase H 切割前 RNA II, 使之成为成熟的 RNA II, 并形成三叶草二级结构, 该引物引导质粒的复制。形成的 RNAI 可控制 RNA II 形成二级结构, 同时 Rop 增强 RNAI 的作用, 从而控制质粒的拷贝数。控制此种质粒 DNA 复制启动的两种关键因素 RNA I 和 RNA II, 以及另一种负调控因子 Rop 蛋白, 都是由 Col E1 DNA 转录产生的。Col E1 质粒复制起点结构见图 1-2。

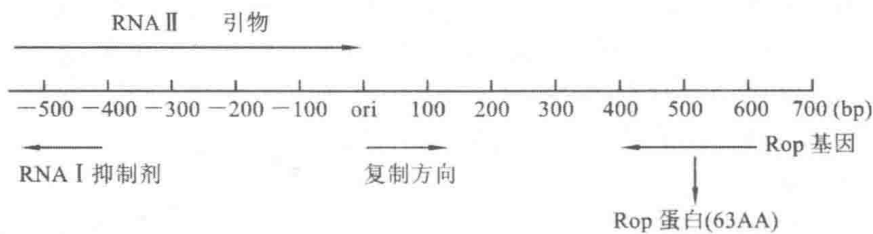


图 1-2 Col E1 质粒复制起点结构

#### (4) 质粒的标记

按其用途可将质粒标记基因分为选择标记基因和筛选标记基因。选择标记用于鉴别目标 DNA(载体)的存在, 将成功转化了载体的宿主挑选出来; 筛选标记可用于将特殊表型的重组子挑选出来。

选择标记有多种,如抗药性基因、营养缺陷型基因、抗重金属基因等。最常见的是抗药性基因,即带有一种或多种抗生素的抗性基因,可赋予宿主菌抵抗某种抗生素的能力。如氨苄青霉素抗性(Amp<sup>r</sup>)基因,能编码β-内酰胺酶,该酶能水解氨苄青霉素内的β-内酰胺环使之失效,从而使细菌具有抗氨苄青霉素的能力。另外,还有四环素抗性(Tetr)基因、氯霉素抗性(Chlr)基因、卡那霉素抗性(Kanr)基因等。

筛选标记主要用来区别重组质粒与非重组质粒,当一个外源 DNA 片段插入到一个质粒载体上时,可通过该标记来筛选插入了外源片段的质粒,即重组质粒。

#### (5)质粒具有不相容性

两个质粒在同一宿主中不能共存的现象称为质粒的不相容性。同一类群的不同质粒通常不能在同一菌株中稳定共存,如在大肠杆菌中现已发现 30 多个不相容群,如 Col E1 和 pMB1, pSC101 和 p15A。而有些不同群质粒(如 F 和 Col E1)可以在同一菌株内稳定共存,这些质粒具有相容性。质粒产生不相容性的原因在于同群质粒 DNA 具有同源性,可以产生相同的阻遏蛋白,抑制质粒 DNA 的复制,因此彼此间有相互抑制作用,不能共存于同一细胞中。

## 二、病毒基因组

病毒(virus)是一类个体微小,结构简单,只含单一核酸(DNA/RNA),必须在活细胞内寄生并以复制方式增殖的非细胞型微生物。它不能独立地复制,必需进入宿主细胞中借助细胞内的一些酶类和细胞器才能使其得以复制。病毒主要由内部的遗传物质核酸和蛋白质外壳组成。核酸为病毒的核心,构成病毒基因组,为病毒的复制提供遗传信息;蛋白质包围在核心周围,形成了衣壳,衣壳是病毒颗粒的主要支架结构和抗原成分,有保护核酸及介导病毒与宿主细胞结合等作用。人类许多疾病是由病毒引起的,如艾滋病、流感、病毒性肝炎等。

### (一)病毒基因组特征

#### 1.病毒基因组大小相差大

与原核生物或真核生物基因组相比,病毒的基因组很小,而不同的病毒之间其基因组大小相差很大,变化范围一般在 $(1.5\sim 3.6)\times 10^3$ kb 之间。如乙肝病毒 DNA 只有 3.2kb 大小,所含信息量较小,只能编码 6 种蛋白质;而痘病毒的基因组有 300kb 之大,可以编码几百种蛋白质,不仅为病毒复制所涉及的酶类编码,还可以为核苷酸代谢的酶类编码,因此,痘病毒对宿主的依赖性较乙肝病毒小很多。

#### 2.基因组的核酸类型

病毒基因组可以由 DNA 组成,也可以由 RNA 组成,有双链或单链,有环状分子,也有线性分子等多种类型。如腺病毒是线性的双链 DNA,而乳头瘤病毒是闭环的双链 DNA;脊髓灰质炎病毒基因组是单链的 RNA 分子,而呼肠孤病毒由双链的 RNA 组成。一般说来,大多数 DNA 病毒的基因组是双链 DNA 分子,而大多数 RNA 病毒的基因组是单链 RNA 分子。每种病毒颗粒中只含有一种核酸,为 DNA 或 RNA,两者一般不共存于同一病毒颗粒中。

#### 3.有基因重叠现象

基因重叠指同一段 DNA 片段参与编码 2~3 种蛋白质分子。有些病毒基因间出现互相重叠,这种结构使较小的基因组能够携带较多的遗传信息。这种现象在其他的生物细胞中仅见于线粒体和质粒 DNA。重叠基因有以下几种情况:①一个基因完全在另一个基因里面。如基因 A 和 B 是两个不同的基因,而基因 B 包含在基因 A 内。同样,基因 E 在基因 D 内。②部分重叠。如基因 K 和基因 A 及 C 的一部分基因重叠。③两个基因只有一个碱基重叠。如基因 D 的终止密码子的最后一个碱基是基因 J 起始密码子的第一个碱基。见图 1-3。这些重叠基因尽管它们的 DNA 大部分相同,但是由于将 mRNA 翻译成蛋白质时的读框不一样,产生的蛋白质分子往往并不相同。