

针对局部问题改善技术和方法的同时,蛋白质芯片的构建也应重视各个环节的配合,以实现芯片整体性能的优化。

参考文献

[1] Stoevesandt O, He M, Taussig MJ. Protein microarrays printed from DNA microarrays[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 671(1): 95-106.

[2] Stoevesandt O, Vetter M, Kastelic D, et al. Cell free expression put on the spot: advances in repeatable protein arraying from DNA (DAPA)[J]. *N Biotechnol*, 2011, 28(3): 282-290.

[3] MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination [J]. *Science*, 2000, 289(5485): 1760-1763.

[4] Angenendt P, Glokler J, Murphy D, et al. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials[J]. *Anal Biochem*, 2002, 309(2): 253-260.

[5] Kusnezow W, Jacob A, Walijew A, et al. Antibody microarrays: an evaluation of production parameters[J]. *Proteomics*, 2003, 3(3): 254-264.

[6] Gerber D, Maerkl SJ, Quake SR. An in vitro microfluidic approach to generating protein-interaction networks [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 71-74.

[7] Mirzabekov A, Arenkov P, Kukhtin A, et al. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions[J]. *Anal Biochem*, 2000, 278(2): 123-131.

[8] 王毓德, 孙晓丹, 彭平华, 等. 分子自组装及其在传感器中的应用[J]. *高技术通讯*, 2002, 12(10): 102-107.

[9] 邓橙, 徐书宽, 朱疆, 等. 表面等离子共振成像非标记微阵列芯片检测[J]. *光电子激光*, 2009, 20(3): 366-368.

[10] 虞伟, 廖建辉, 葛存旺, 等. 琼脂糖凝胶基片用于蛋白质与抗原分子的固定研究与表征[J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(4): 503-508.

[11] Seo JH, Chen LJ, Verkhoturov SV, et al. The use of glass substrates with bi-functional silanes for designing micropatterned cell-secreted cytokine immunoassays [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(23): 5478-5488.

[12] Hulse RE, Kunkler PE, Fedynyshyn JP, et al. Optimization of multiplexed bead-based cytokine immunoassays for rat serum and brain tissue[J]. *J Neurosci Methods*, 2004, 136(1): 87-98.

[13] Avaniss-Aghajani E, Berzon S, Sarkissian A. Clinical value of multiplexed bead-based immunoassays for detection of autoantibodies

to nuclear antigens[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14(5): 505-509.

[14] Lud J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7403): 834-838.

[15] Dunbar SA, Vander zee CA, Oliver KG, et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAPTM system[J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 53(2): 245-252.

[16] 于晓波, 赵天明, 孙志丹, 等. 生物素-亲和素偶联探针蛋白芯片检测技术[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(3): 515-520.

[17] Fan R, Vermesh O, Srivastava A, et al. Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(12): 1373-1378.

[18] Kwong GA, Radu CG, Hwang K, et al. Modular nucleic acid assembled p/MHC microarrays for multiplexed sorting of antigen-specific T cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(28): 9695-9703.

[19] Wacker R, Schroder H, Niemeyer CM, et al. Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study[J]. *Analyt Biochem*, 2004, 330(2): 281-287.

[20] He M, Stoevesandt O, Taussig MJ. In situ synthesis of protein arrays[J]. *Analyt Biotechnol*, 2008, 19(1): 4-9.

[21] Ramachandran N, Raphael J, Hainsworth E, et al. Next-generation high density self-assembling functional arrays[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 535-538.

[22] Yamaguchi J, Naimuddin M, Biyani M, et al. cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(16): e108.

[23] Tao SC, Zhu H. Protein chip fabrication by capture of nascent polypeptides[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(10): 1253-1254.

[24] Li ZP, Wei L, Cheng YQ, et al. Chemiluminescent detection of DNA hybridization and single-nucleotide polymorphisms on a solid surface using target-primed rolling circle amplification[J]. *Analyt*, 2008, 133(9): 1164-1168.

[25] Ray S, Mehta G, Srivastava S, et al. Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges[J]. *Proteomics*, 2010, 10(4): 731-748.

(收稿日期: 2013-01-12)

• 综述 •

人巨细胞病毒实验室诊断进展*

夏宇综述, 张波[△]审校

(第三军医大学西南医院全军检验医学专科中心, 重庆 400038)

关键词: 人巨细胞病毒; 感染; 检测; 诊断
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 08. 037

文献标识码: A **文章编号:** 1673-4130(2013)08-0991-04

人巨细胞病毒(HCMV)是一种双螺旋 DNA 病毒, 属于疱疹病毒科乙组疱疹亚科, 是疱疹病毒家族中的重要成员之一。

HCMV 在世界范围内广泛传播, 感染大多数人口, 病毒长期潜伏于宿主细胞, 呈隐性感染。当妇女妊娠时, 造成胎儿宫内感

* 基金项目: 重庆市攻关课题资助项目(CSTC2012gg-yyjs10046); 第三军医大学回国人员启动基金资助项目(SWH2011LC022); 西南医院临床创新基金资助项目(SWH2012LC12)。 作者简介: 夏宇, 女, 主管技师, 主要从事临床检验诊断学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zbcq@yahoohoo. com. cn。

染,导致流产、早产、死胎或胎儿先天畸形^[1];当骨髓移植,肝、肾、心脏等器官移植患者免疫功能受损时,潜伏病毒被激活、增值而发生严重感染,将导致患者器官移植失败甚至死亡^[2-3]。新近研究表明,巨细胞病毒感染还与某些心血管疾病和癌症的发生密切相关^[4-5]。由此可见,巨细胞病毒感染已对人类健康造成极大的威胁,故对 HCMV 感染的早期诊断显得尤为重要,目前确诊 HCMV 感染主要依靠实验室检测。该综述中,主要对 HCMV 的实验室检测方法及其进展作一简要介绍。

1 病毒分离培养法

HCMV 的高隐性感染率和活动性感染患者无典型的临床症状,给 HCMV 感染的临床诊断带来很大困难。目前,仍将病毒分离培养法作为诊断 HCMV 感染的“金标准”^[6]。有研究表明 HCMV 在体内主要感染内皮细胞和上皮细胞^[7],人胚肺纤维母细胞也具有较高的易感性^[7-8],在体外主要利用该细胞来进行 HCMV 的分离和培养。将感染者的体液或血液标本接种到人胚肺纤维母细胞上培养,病毒感染细胞后,细胞内病毒基因大量复制,病毒颗粒活跃增殖,导致细胞发生一系列的病理学改变。因此,可通过以下途径对 HCMV 感染进行检测:(1)通过光学显微镜观察有无具有典型形态的“猫头鹰眼细胞”,或将感染细胞染色后观察胞内有无巨细胞病毒包涵体的存在;(2)通过电镜直接观察感染细胞的病理学改变;(3)通过电镜观察胞内病毒颗粒的形态学变化。该方法作为实验诊断 HCMV 感染的可靠方法,还能为 HCMV 的后续研究提供样本,如基因型分析、DNA 提取、诊断和抗病毒治疗研究等;但该方法分离病毒的敏感性较差,检测周期长,容易污染,达不到早期快速检测的目的,且病毒包涵体无法与别的病毒区分,对于经药物治疗后的标本病毒分离常为阴性结果,因而临床应用受限,现主要应用于科研方面。随后将病毒细胞培养与免疫学分析方法结合建立起来的微量病毒检测技术,如快速增强组织培养免疫荧光技术^[9],提高了分离阳性率和检测效率,为病毒感染的早期诊断提供了重要的信息。

2 特异性抗体检测

特异性抗体检测主要是检测 HCMV 感染后刺激机体产生的巨细胞病毒 IgM 和 IgG 抗体。因血清 IgM 抗体在 HCMV 感染后的 1~3 个月以内会维持在一个比较高的滴度,而后逐渐降低,在免疫抑制性患者体内也可能长期维持在一个比较低的水平,当潜伏病毒激活或再感染又会刺激 IgM 抗体的产生。因此,临床应用中常将 IgM 抗体的检测结果作为判断 HCMV 近期感染或者活动性感染的依据,将血清 IgG 抗体作为 HCMV 既往感染的指标。运用传统的 ELISA 对其进行检测,其结果易被自身抗体、类风湿因子或 EB 病毒等的交叉反应所干扰^[10-11],引起假阳性结果。目前应用较多的是抗体捕获 ELISA^[12-13],该方法具有比较高的灵敏度和特异性,可以避免以上的干扰因素,有利于结果的分析、判断。但是抗体的产生存在一定的时间窗,且受机体免疫状态等因素的影响,尤其是免疫缺陷患者、免疫抑制患者或者使用强免疫抑制剂的患者,不能产生被测数量的特异性抗体,造成假阴性结果。因此,特异性抗体检测对巨细胞病毒感染早期诊断的临床价值不大。

3 抗原血症的检测

病毒抗原是具有高度保守性的一些病毒结构蛋白的特殊氨基酸区域,肽序列变异性小,已成为病毒学检测的理想标志物。HCMV 感染机体后可顺序表达即早期抗原,早期抗原和晚期抗原。近年来,人们对 HCMV 的一些抗原决定簇进行了免疫原性和特异性的研究,已发现 gp52 (UL44)、pp150 (ppUL32)、pp65 (ppUL83)、ppUL80a 等均具有强免疫原性且

有保守的 DNA 序列。现有研究表明, HCMV 的被膜蛋白 PP65 不仅肽序列具有高度的保守性,而且数量占病毒总蛋白的 15%。其在 HCMV 活动感染后 2~24 h 内就可表达于血液白细胞中,早于病毒核酸出现在血浆中的时间,并在病毒活动期间持续存在,治疗后随病毒消失而转阴,蛋白表达量与病毒载体量同步消长,具有极高的相关性^[14-15]。因此,检测 HCMV 的 PP65 抗原不仅能缩短病毒检测的窗口期,而且也能反映体内的病毒载量,对监测无症状活动性感染或新发感染,评估患者传染性和疗效等具有重要意义,被国际公认为早期诊断 HCMV 活动性感染的首选实验诊断指标。目前,临床检测 HCMV PP65 抗原的常用方法为免疫荧光技术,其敏感性和特异性可达 80%~85%。但是以白细胞为病毒抗原检测载体,对白细胞数目和形态要求高,其临床应用范围受限。

4 核酸检测

HCMV 感染人体后,病毒核酸在体液中先于病毒感染的血清学证据和临床症状出现,因此可将病毒核酸的检测作为感染的早期诊断指标。核酸检测主要包括 HCMV DNA 的检测和 HCMV 基因转录产物 mRNA 的检测。聚合酶链反应 (PCR)检测 DNA 的高灵敏度和特异性,使其可作为 HCMV 感染的筛选指标。但 DNA 不能直接反应病毒的复制,无法分辨病毒是处于活动性感染或是潜伏感染,要明确诊断需做 RNA 检测。HCMV 基因转录是病毒活跃复制的标志,临床上常将 HCMV 早期 (IE)基因转录和晚期 (L)基因转录产物 mRNA 的检测作为诊断 HCMV 活动性感染的指标。核酸检测常用的方法包括核酸杂交技术、PCR、核酸序列依赖扩增法及基因芯片技术。如能将 mRNA 逆转录反应结合定量 PCR 进行检测则是最佳选择。

4.1 核酸杂交 核酸杂交技术是用同位素或非同位素标记针对 HCMV 基因特异序列的核酸,将其制备为探针,直接、准确地检测 HCMV。核酸杂交具有以下特点:(1)杂交探针序列特异,有很高的灵敏度和特异性;(2)对于 HCMV 潜伏型感染, DNA 核酸杂交技术可以确定 HCMV 的存在;(3)敏锐发现病毒包涵体;(4)受外因影响小;病毒 DNA 双螺旋结构稳定,即使受外因影响而解链,只要每条 DNA 链上的核苷酸序列未变,不影响探针与靶位的结合;(5)病毒 mRNA 的检测结果可作为临床诊断 HCMV 活动性感染的重要依据。但是核酸杂交所需的检测费用较高,难以在临床上推广普及。

4.2 HCMV DNA 的 PCR 检测 PCR 技术运用于 HCMV 感染的检测,是 HCMV 定量检测的一个重大突破,具有较高的灵敏度和特异性,能满足临床多种类样本的检测,且需要的标本量小,检测方法简便快捷,可作为感染的早期诊断指标。然而,早期的 PCR 检测本质上属于定性检测。依据传统 PCR 已衍生出逆转录 PCR、巢式 PCR、捕获探针 ELISA-PCR 和实时 PCR 等多种各具特色的技术^[6],极大地提高了 HCMV 感染检测的灵敏度和特异性。目前,实时荧光定量 PCR 法被广泛应用于 HCMV 感染的检测,它是基于传统 PCR 法建立起来的可精确定量 DNA 的检测方法,同时具有 PCR 法的敏感性和 DNA 杂交技术的特异性,有较高的阳性和阴性预测价值,可动态监测 HCMV 感染,反映其病毒载量,预示其感染严重程度,在 HCMV 感染诊断中有很好的实用价值^[16-17]。研究报道^[18-19],与 pp65 抗原血症分析相比,实时 PCR 技术监测 HCMV 感染具有更高的敏感性,但对于活动性感染的监测不如抗原血症分析。用 PCR 检测 HCMV DNA,大量扩增后的产物非常容易造成实验室环境的污染,出现假阳性的结果。然而,PCR 阴性对 HCMV 感染排除率高^[20-21],但 PCR 阳性只能证

明病毒存在,不能分辨病毒是处于活动感染或是潜伏状态,故要明确诊断需作 RNA 检测。

4.3 核酸序列依赖扩增法(NASBA) NASBA 是以 PCR 为基础发展起来的一种简便、快速、连续的检测方法,主要用于 RNA 的扩增和检测。该方法灵敏度高,极少量的 RNA 样本就可以被检测出来,且假阳性和假阴性的机会很少,检测结果较为客观、准确。目前该技术已经在很多领域展开研究应用,具有广阔的临床应用前景。国外已有相关文献报道采用定量 NASBA 法对不同细胞感染 HCMV 后 RNA 表达动力学进行分析,主要检测了 IE1(UL123),PP67(UL65)和免疫逃逸基因(US3、US6 和 US11),发现在病毒感染后的 4 h 以内能检测到以上几个基因的表达,可用于病毒感染的早期诊断^[22];应用多重实时定量 NASBA 法对编码 HCMV 即刻早期抗原 IE1 和晚期结构抗原 pp67 的 mRNA 进行检测,发现其敏感性、特异性均较高,为临床判断 HCMV 活动性感染和病毒复制情况,制定早期抗病毒治疗方案提供了可靠依据^[23]。

4.4 基因芯片(gene chip)技术 基因芯片采用大量特定的寡核苷酸为探针,并置于特定固相载体表面,和待检样本的基因进行杂交检测。其与传统技术相比,具有以下优点:(1)高通量,通过一次实验获得大量的数据同时进行平行分析,很大程度上加快了实验进程;(2)可在同一阵列上进行多样本的分析比较,避免了实验内在误差;(3)试剂用量小,降低了检测成本;(4)反应系统与计算机图像分析系统相连,检测结果客观、准确。近年来,基因芯片检测技术正在逐步完善,初步研究显示该技术在病原体检测方面具有较高的特异性和敏感性,临床应用潜力大^[24-25]。但该技术仍然面临一些问题,如检测成本高,反应条件苛刻等。目前,基因芯片技术主要应用于 HCMV 的研究,随着技术的不断完善,基因芯片将在临床检测方面有很大的发展空间。

综上所述,在 HCMV 感染的实验室诊断技术中,病毒分离培养是诊断病毒感染的金标准,但培养技术复杂、实验条件苛刻、耗时长、敏感性差,不适合临床实验室开展。病毒抗体检测受制于 HCMV 高隐性感染率、免疫低下者抗体产生延迟或缺乏,诊断早期感染的临床价值不大。病毒抗原血症检测技术具有快速、敏感、可靠的优点,但是传统检测方法多以白细胞为病毒抗原检测载体,限制了其临床应用。而核酸诊断其敏感性与特异性均佳,但检测费用高且核酸提取方法还有待改进。因此,临床检验可以根据需要结合使用各种诊断技术,从而提高诊断的准确性。总之,改进现有技术,探索新技术,拓宽其临床应用范围是巨细胞病毒检测急需解决的问题。

参考文献

- [1] Halwachs-Baumann G. Recent developments in human cytomegalovirus diagnosis[J]. Expert Rev Expert Rev Anti Infect Ther, 2007, 5(3): 427-439.
- [2] Kosugi I. Cytomegalovirus (CMV)[J]. Uirusu, 2010, 60(2): 209-220.
- [3] Steininger C. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system[J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(10): 953-963.
- [4] Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? [J]. J Intern Med, 2006, 259(3): 219-246.
- [5] Saffert RT, Penkert RR, Kalejta RF. Cellular and viral control over the initial events of human cytomegalovirus experimental latency in CD34⁺ cells[J]. J Virol, 2010, 84(11): 5594-5604.
- [6] Drebbler U, Hardt A, Dienes HP, et al. Cytomegalovirus. Patho-

- logical-anatomical manifestations and detection methods[J]. Pathologie, 2011, 32(5): 418-427.
- [7] Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications[J]. Rev Med Virol, 2010; 20(3): 136-155.
- [8] Zhou S, Dong LQ, Guan LB, et al. Primary culture of human trophoblastic cells and their susceptibility to human cytomegalovirus[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2012, 43(3): 344-347, 377.
- [9] Alexander R, Lamb D, White D, et al. 'RETCIF': a rapid, sensitive method for detection of viruses, applicable for large numbers of clinical samples[J]. J Virol Methods, 2001, 97(1/2): 77-85.
- [10] Lang D, Vornhagen R, Rothe M, et al. Cross-reactivity of Epstein-Barr virus specific immunoglobulin M antibodies with cytomegalovirus antigens containing glycine homopolymers[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8(4): 747-756.
- [11] De Paschale M, Agrappi C, Manco MT, et al. Positive predictive value of anti-HCMV IgM as an index of primary infection[J]. J Virol Methods, 2010, 168(1/2): 121-125.
- [12] Sun P, Sun XB, Hu P, et al. Capture and detection of human cytomegalovirus (HCMV) IgM by a recombinant multi-epitope chimeric antigen[J]. Yi Chuan, 2007, 29(11): 1351-1356.
- [13] Gandhoke I, Aggarwal R, Hussain SA, et al. Congenital CMV infection; diagnosis in symptomatic infants[J]. Indian J Med Microbiol, 2009, 27(3): 222-225.
- [14] Chevillotte M, Landwehr S, Linta L, et al. Major tegument protein pp 65 of human cytomegalovirus is required for the incorporation of pUL69 and pUL97 into the virus particle and for viral growth in macrophages[J]. J Virol, 2009, 83(6): 2480-2490.
- [15] Tomtishen JP III. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28)[J]. Virol J, 2012, 9(1): 22.
- [16] Enan KA, Rennert H, El-Eragi AM, et al. Comparison of real-time PCR to ELISA for the detection of human cytomegalovirus infection in renal transplant patients in the Sudan[J]. Virol J, 2011, 8(1): 222.
- [17] Chen FH, Samson KT, Chen H, et al. Clinical applications of real-time PCR for diagnosis and treatment of human cytomegalovirus infection in children [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2004, 15(3): 210-215.
- [18] Ksouri H, Eljed H, Greco A, et al. Analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay, the amplicor CMV test, and a semi-quantitative polymerase chain reaction test after allogeneic marrow transplantation[J]. Transpl Infect Dis, 2007, 9(1): 16-21.
- [19] Gentile G, Picardi A, Capobianchi A, et al. A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation[J]. BMC Infect Dis, 2006, 6(167): 1471-2334.
- [20] Farfán UMJ, Torres TJP, Vergara AA, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction and antigenemia assay to detect cytomegalovirus in pediatric transplants[J]. Rev Chilena Infectol, 2011, 28(2): 113-117.
- [21] Martiny PB, de-Paris F, Machado AB, et al. Comparison of the performance of polymerase chain reaction and pp65 antigenemia for the detection of human cytomegalovirus in immunosuppressed patients[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2011, 44(3): 286-289.
- [22] Greijer AE, Adriaanse HM, Kahl M, et al. Quantitative competitive NASBA for measuring mRNA expression levels of the immediate early 1, late pp67, and immune evasion genes US3, US6 and

- US11 in cells infected with human cytomegalovirus[J]. J Virol Methods, 2001, 96(2): 133-147.
- [23] Greijer AE, Adriaanse HM, Dekkers CA, et al. Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA[J]. J Clin Virol, 2002, 24(1/2): 57-66.
- [24] Küllerich-Pedersen K, Poulsen CR, Jain T, et al. Polymer based biosensor for rapid electrochemical detection of virus infection of

- human cells[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 28(1): 386-392.
- [25] Chen Q, Bian Z, Chen M, et al. Real-time monitoring of the strand displacement amplification (SDA) of human cytomegalovirus by a new SDA-piezoelectric DNA sensor system[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(12): 3412-3418.

(收稿日期: 2012-12-18)

• 综 述 •

16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区在微生物鉴定中的应用

王艳萍 综述, 夏 云[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

关键词: RNA, 核糖体, 16S; 微生物学; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0994-03

目前临床上引起感染的病原菌种类繁多, 抗菌药物的不规范使用导致细菌培养阳性率进一步降低^[1]。因此, 传统分类方法的不足随着新型微生物菌株的分离的增多而越来越明显, 亟需一种能快速准确鉴定出微生物种类的新技术以便及时指导抗菌药物的合理使用从而控制临床感染疾病的进展。文章综述了 16S rRNA 及 16S~23S rRNA 基因间区快速鉴定微生物的基本原理、方法、存在的问题及进一步解决方案等。原核生物的 rRNA 有 3 类: 5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA, 其编码基因(rDNA)长度依次为 120、1 540 及 3 300 个核苷酸。它们位于同一操纵子序列中, 但被一些间隔区域所分开, 从 5'~3'端依次是: 16S、间隔区、tRNA、间隔区、23S、间隔区和 5S rRNA^[2], 一个操纵子进行转录后处理成为成熟的 16S、23S 和 5S rRNA。rRNA 结构既具保守性又具高变性, 保守性反映生物物种的亲缘关系, 高变性则揭示生物物种的特征核酸序列, 是属种鉴定的分子基础^[3]。因此, 可以利用保守区设计通用引物扩增细菌的相应靶序列, 再利用可变区的差异鉴别菌种。其中以 16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区在细菌鉴定中的应用最为成熟及广泛。

1.1 16S rRNA 基因结构特点及序列分析的基本原理 16S rDNA 基因是细菌染色体上编码 16S rRNA 相对应的 DNA 序列, 其可变区与恒定区序列交错排列。恒定区在各种细菌中基本保持不变, 而可变区因不同细菌, 不同科、种、属而异, 且变异程度与细菌的系统发育密切相关。相比之下, 5S rRNA 虽易分析, 但核苷酸少, 没有足够的遗传信息用于分类研究; 而 23S rRNA 含有的核苷酸数几乎是 16S rRNA 的 2 倍, 分析较困难, 故以 16S rRNA 作为研究对象最为理想。16S rRNA 序列分析技术的基本原理就是利用恒定区序列设计通用引物从微生物样本中扩增出 16S rRNA 的基因片段, 通过克隆测序、探针杂交、酶切片段多态性分析或凝胶电泳等方法^[4] 获得 16S rRNA 序列信息, 再与 16S rRNA 基因数据库中的序列数据或其他数据进行同源对比及分析, 从而鉴定样本中可能存在的病原菌种类。

1.2 16S rRNA 基因序列分析的基本方法 目前绝大多数的研究都是先将 16S rRNA 反转录为 16S rDNA 再进行进一步的研究。也可以提取细菌总的 DNA 之后, 利用细菌通用引物对样品总 DNA 中的 16S rRNA 基因进行全长扩增, 再对 PCR

产物进行进一步研究。具体包括: (1) 将 PCR 产物克隆到质粒载体上进行测序, 与 16S rRNA 数据库中的序列进行比较。目前, 大量已知微生物的 DNA 都被测定并输入国际基因数据库, 成为对微生物鉴定分类非常有用的参照系统, 从而可以通过测定某种未知微生物 16S rDNA 序列, 与基因库中已有菌株的 16S rDNA 序列进行同源对比及分析, 即可得出待测菌的菌属类别, 从而达到对其进行快速、有效的鉴定分类的目的^[5]。Bosshard 等^[6] 用 16S rRNA 序列同源性大于等于 95% 至大于等于 99% 定义同属细菌, 用大于等于 99% 定义同种细菌。(2) 通过 16S rRNA 种属特异性的探针与 PCR 产物杂交以获得微生物组成信息, 或利用基因芯片将 DNA 片段制作成探针固定在支持物上, 与荧光标记的待检 DNA 片段杂交, 通过观察荧光信号的位置, 即可确定待检细菌的种类。杨祖钦等^[7] 根据引起化脓性脑膜炎的常见致病菌, 成功地建立了 DNA 芯片, 可对该疾病快速、准确的诊断, 明确病原菌。(3) 对 PCR 产物进行限制性片段长度多态性分析(RFLP), 即使用特异的限制性核酸内切酶作用在扩增的核糖体不同序列位置产生不同长度的片段, 经过凝胶电泳后将大小不同的片段分开, 所检测细菌 DNA 碱基组成不同, 电泳图谱亦不同。通过观察酶切电泳图谱、数值分析, 便可分析样品中微生物组成或不同微生物的种属关系。王蓉美等^[8] 利用 16S rRNA 对 14 种临床常见病原菌同时进行 PCR 扩增, 并根据扩增片段内变异区特点分别选择限制性内切酶 Hae III、Mn II、Alu I、Dde I 和 BstB I 酶切后电泳, 建立了各细菌菌株特有的酶切图谱, 达到了对临床常见病原菌种属进行快速鉴定的目的。(4) 对扩增产物进行变性梯度凝胶电泳、温度梯度凝胶电泳(TGGE)分析, 直接观察其多样性^[9-10]。Goldenberg 等^[11] 还在此基础上建立了变性高效液相色谱(DHPLC)技术, 并成功的分析了大便中菌群的组成, 监测抗菌药物治疗前后肠道菌群的动态变化。

2 16S~23S rRNA 基因间隔区

2.1 16S~23S rRNA 基因间区结构特点及序列分析的基本原理 16S~23S rRNA 区间 ISR 是位于 16S rRNA 基因与 23S rRNA 基因之间的区间序列, 不仅序列长度存在差异, 而且序列中间有 tRNA 的插入、缺失、突变等特征。经研究发现, 大多数革兰阳性菌含有 tRNA^aala、tRNAⁱile, 少部分只含 tRNA^gglu 基因。相比而言, 大部分革兰阴性菌不含 tRNA 基因,