

- [5] Significance NR. Management of low TSH in pregnancy. In Lazarus J, Pirags V, Butz S (eds.). *The thyroid and reproduction* [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2009, 5(1):84-95.
- [6] Casey B, Leveno K. Thyroid disease in pregnancy [J]. *Obstet Gynecol*, 2006, 108(5):1283-1292.
- [7] de Escobar GM, Obregón MJ, del Rey FE. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2004, 18(2):225-248.
- [8] Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, et al. The reference range and within-person variability of thyroid stimulating hormone during the first and second trimesters of pregnancy [J]. *J Med Screen*, 2004, 11(4):170-174.
- [9] Cignini P, Cafà EV, Giorlandino C, et al. Thyroid physiology and common diseases in pregnancy: review of literature [J]. *J Prenat Med*, 2012, 6(4):64-71.
- [10] Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health [J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(5):702-755.
- [11] Negro R, Schwartz A, Gismondi R, et al. Universal screening versus case finding for detection and treatment of thyroid hormonal dysfunction during pregnancy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(4):1699-1707.
- [12] Yassa L, Marqusee E, Fawcett R, et al. Thyroid hormone early adjustment in pregnancy (the THERAPY) trial [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(13):3234-3241.
- [13] Allan WC, Haddow JE, Palomaki GE, et al. Maternal thyroid deficiency and pregnancy complications: implications for population screening [J]. *J Med Screen*, 2000, 7(3):127-130.
- [14] Lazarus JH, Bestwick JP, Channon S, et al. Antenatal thyroid screening and childhood cognitive function [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(6):493-501.
- [15] Patil-Sisodia K, Mestman JH. Graves hyperthyroidism and pregnancy: a clinical update [J]. *Endocr Pract*, 2010, 16(1):118-129.
- [16] Lee RH, Spencer CA, Mestman JH, et al. Free T4 immunoassays are flawed during pregnancy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2009, 200(3):260.
- [17] Glinoe D, Spencer CA. Serum TSH determinations in pregnancy: how, when and why? [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2010, 6(4):526-529.
- [18] Dosiou C, Sanders GD, Araki SS, et al. Screening pregnant women for autoimmune thyroid disease: a cost-effectiveness analysis [J]. *Eur J Endocrinol*, 2008, 158(6):841-851.
- [19] Thung SF, Funai EF, Grobman WA. The cost-effectiveness of Universal screening in pregnancy for subclinical hypothyroidism [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2009, 200(267):1-7.

(收稿日期:2014-05-08)

• 综 述 •

乳酸杆菌基因鉴定技术研究进展

姚 纲^{1,2}综述,张健鹏²△审校

(1. 陕西省凤翔县医院内五科, 陕西凤翔 721400; 2. 北京武警总医院呼吸科, 北京 100039)

关键词: 乳酸杆菌; 基因鉴定; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)18-2504-03

乳酸杆菌广泛分布于环境, 是人体正常菌群, 具有改善调节肠道菌群、增强机体免疫功能、降低血清胆固醇水平以及抑制肿瘤细胞形成等生理功能^[1], 被广泛地应用于食品、医药及化工等领域。如何对乳酸杆菌进行准确、规范地鉴定分类具有重要的意义。由于乳酸菌形态易受培养条件的影响, 而且生理生化特征差异较小, 故对于许多乳酸杆菌, 仅凭形态、生理生化特征等表型特征并不能准确地鉴定。目前对细菌的鉴定已深入到基因型性状, 一些新的分子标记技术相继被用于乳酸杆菌的基因鉴定, 如多位点序列分析 (Multilocus sequence analysis, MLSA)、随机扩增多态性 DNA (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)、限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP)、变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 及温度梯度凝胶电泳 (Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) 等。本文就乳酸杆菌基因鉴定技术的研究进展进行综述。

1 16 S rRNA 基因序列分析

16 S rRNA 基因序列有“细菌化石”之称^[2], 它揭示了物种间内在的亲缘关系及其演化过程, 目前已成为细菌鉴定的“金

标准”。16 S rRNA 基因序列全长约 1 550 bp^[3], 相对分子质量适中, 其核苷酸序列具有高度保守性, 同时在保守区之间存在 9~10 个可变区, 可变区在不同科、属、种间存在一定的变异, 可通过比较不同细菌的 16 S rRNA 基因序列间的差异对其进行分类鉴定, 也可以计算出这些细菌之间的进化距离从而构建系统进化树以进行系统发育分析。一般认为, 16 S rRNA 基因序列相似率大于 99% 鉴定为同一个种, 介于 95%~99% 鉴定为同一个属。王宏梅等^[4]利用 16 S rRNA 序列分析成功将 53 株分离自发酵乳样中的乳酸杆菌鉴定至种的水平。由于原核生物的 16 S rRNA 基因序列具有高度保守性, 故对于亲缘关系较近的种或同一种内不同菌株间的鉴别分辨力有限。

2 16~23 S rRNA 基因间隔区 (Intergenic spacer region, ISR) 序列分析

16~23 S rRNA ISR 位于 16 S rRNA 基因与 23 S rRNA 基因之间, 其进化速度是 16 S rRNA 的 10 倍, 不同细菌的序列长度和碱基差异较大, 序列特征更丰富, 更适于那些 16 S rRNA 无法鉴别的相近种或同一种内的不同菌株之间的鉴别^[5]。Water 等^[6]依据 ISR 序列分析成功将干酪乳杆菌、类干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌及玉米乳杆菌区分开来。但无论是 16 S rRNA 序列还是 ISR 序列分析, 都不是在全基因组水平进

行分析,只是针对基因组的一部分序列进行分析,因而具有一定的局限性。

3 MLSA

MLSA 技术通过对多个基因信息进行相互比较、综合分析,可以得到一个比较全面可信的物种间的关系^[7]。基于 MLSA 技术对乳酸杆菌进行鉴定一般选择编码蛋白的管家基因进行特异性扩增,如编码 RNA 聚合酶 α 亚基(RNA polymerase alpha subunit, rpoA)的 rpoA 基因、编码苯丙氨酰-tRNA 合成酶 α 亚基(Phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit, pheS)的 pheS 基因、编码翻译延伸因子 Tu(Translational elongation factor Tu, tuf)的 tuf 基因、编码热休克蛋白 60(60 kDa heat-shock protein, hsp60)的 hsp60 基因、编码 recA 蛋白的 recA 基因^[8]以及编码 ATP 合成酶 α 亚基(Alpha subunit of ATP synthase, atpA)的 atpA 基因等。这些基因较 16 S rRNA 基因的鉴定分辨率高,更适于亲缘关系较近的种或亚种之间的鉴定。通过分析代表 98 个种和 17 个亚种的 201 株乳酸杆菌的 pheS 及 rpoA 基因序列发现, pheS 基因的种间差异大多超过 10%,种内差异大多超过 3%; rpoA 基因的种间差异大多超过 5%,种内差异大多超过 2%^[9]。于洁等^[10]通过对比分析 234 株采自不同地区的乳酸杆菌的 hsp60、pheS 及 tuf 基因序列发现,对于亲缘关系较近的乳酸杆菌进行鉴定分类时, hsp60、pheS 及 tuf 基因的区分能力明显优于 16 S rRNA 基因序列。Ventura 等^[11]通过 PCR 扩增 tuf 基因的方法成功将德氏乳杆菌德氏亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种、德氏乳杆菌乳酸亚种、副乳酪乳杆菌副乳酪亚种、鼠李糖乳杆菌等 15 种乳酸杆菌进行了鉴别。虽然此项技术可以快速准确地对种、亚种甚至菌株水平鉴定细菌,但扩增多个编码蛋白的管家基因序列需要事先设计多对引物,设计策略较为复杂,且核酸数据库中已注册的蛋白编码基因序列远没有 16 S rRNA 基因丰富,部分乳酸杆菌的蛋白编码基因至今尚未被收录,因而对于此项技术的应用造成一定的限制。

4 多重 PCR

多重 PCR 是在一个反应体系中同时加入多个特异性引物以扩增多个目的片段的 PCR 技术,具有高效、经济的特点,且特异性及灵敏度均较高,适合大规模样本的分析与鉴定,目前已成为乳酸杆菌分类鉴定的一项重要且成熟的研究手段。该项技术的难点在于目的片段的选取、引物的设计、PCR 反应体系和扩增条件的优化^[12]。

5 DNA 探针技术

DNA 探针技术又称核酸分子杂交技术,具有高度的灵敏度和特异性,且不需要进行复杂的增菌培养及纯化过程,可直接从生态学标本中检测细菌,在乳酸杆菌的鉴定方面有着广阔的应用前景。DNA 探针技术的原理是将一段已知序列的多聚核苷酸用同位素、生物素或荧光染料等标记后制成探针,与固定在硝酸纤维素膜上的未知样品的 DNA 或 RNA 进行互补结合,经放射自显影或其他检测手段就可以判定未知样品中是否有互补的核酸分子存在,并可进一步判定其与已知序列的同源性。有研究者应用此项技术将 48 株乳酸杆菌成功地鉴定到种的水平^[13]。

6 基因芯片技术

基因芯片又称 DNA 微阵列,是指将大量特定序列的 DNA 片段(基因探针)密集、有序地固定于固相支持物上,构成一个二维 DNA 探针阵列,然后与标记的样品分子进行杂交,通过

检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的序列和数量信息^[14]。由于此项技术可将大量探针固定于支持物上,因而可同时对大量的核酸分子实现快速、高效、低成本的分析 and 检测,可一次性快速检测多种乳酸杆菌,从而弥补了传统核酸印迹杂交技术自动化程度低、步骤繁琐、效率低等不足。Bae 等^[15]成功地应用此项技术对韩国泡菜中的多种乳酸杆菌进行了检测。

7 RAPD

RAPD 技术的基本原理是应用长度为 10 bp 左右的非特异性单引物,与待测细菌的基因组 DNA 进行 PCR 反应,引物之间的区域得到扩增,PCR 产物经电泳后形成的多态性图谱可作为细菌鉴定的依据。Schillinger 等^[16]成功应用此项技术将从乳酸酪中分离出的 20 株乳酸杆菌鉴定为嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌。RAPD 技术具有快速、简便、成本相对较低等优点,在不知道待测菌株基因组任何序列信息的情况下就可对其进行鉴定,缺点是重复性较差,很难在种以及亚种的水平上准确鉴定,且需要相关的模式菌株作为参照。

8 RFLP 和 PCR-RFLP

RFLP 是一种全基因组 DNA 指纹技术,被广泛应用于乳酸杆菌的分类及鉴定,可用于种内水平的鉴定。此项技术的基本原理是利用特定的限制性内切酶识别并切割细菌基因组 DNA,得到长度不一的 DNA 片段,通过对这些片段的多态性进行分析,从而达到鉴定的目的^[17]。Blaiotta 等^[18]应用 RFLP 技术将分离至乳酪和发酵腊肠的 43 种乳酸杆菌鉴定至种的水平。RFLP 技术结果稳定,适用于大批量样品的鉴定分类,缺点是步骤繁琐,酶的选择比较困难,且成本高昂。近年来,在 RFLP 技术的基础上研发的 PCR-RFLP 技术被普遍地应用于乳酸杆菌的分类鉴定中。该技术通过 PCR 扩增细菌基因组 DNA 中的保守基因序列,再用特异的限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切、电泳后进行分析。与单纯的 RFLP 技术相比,PCR-RFLP 技术对 DNA 样品质量要求较低,操作简单,成本较低,具有较大的应用潜力。

9 AFLP

AFLP 技术具有比 RAPD 和 RFLP 技术更大的优越性,近些年来被广泛地应用于乳酸菌的分类鉴定。其原理是不同物种基因组 DNA 存在差异,先用限制性内切酶切割出一系列含黏性末端的 DNA 片段,然后将双链寡核苷酸接头连接到 DNA 片段的末端,接着用选择性引物对限制性片段进行 PCR 扩增,将获得的扩增片段通过琼脂糖凝胶或变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测,根据扩增片段的多态性来鉴定细菌^[19]。AFLP 技术的多态性强、分辨率高、重复性好,完全可以在种的水平甚至亚种的水平对乳酸菌进行准确鉴定,但由于此项技术对标本 DNA 质量及操作人员素质要求较高,限制了其应用。

10 DGGE/TGGE

DGGE 是将待检的双链 DNA 片段在线性变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶中电泳,随着电泳的进行, DNA 片段向高浓度变性剂的方向迁移,当它到达其变性要求的最低浓度变性剂处,双链 DNA 形成部分解链状态,这就导致其迁移速率变慢,停留在与其相应的不同变性剂梯度位置,染色后在凝胶上呈现不同的条带,通过对电泳图谱进行分析便可对细菌进行鉴定。由于不同碱基组成的 DNA 双螺旋发生变性所要求的变性剂浓度不同,故这种变性具有序列特异性,即使是长度相同但只

有一个碱基构成差异的 DNA 片段,也可以很理想地被区分开来。TGGE 与 DGGE 相似,只是由变性剂形成的梯度被温度梯度所替代。此项技术能够提供群落中优势种类信息并同时分析多个样品,可用于研究复杂微生物群落结构及微生物多样性。Anukam 等^[20]运用 DGGE 技术对 241 位健康女性阴道的微生物群落进行了分析,结果表明惰性乳杆菌是优势菌株,同时分离鉴定出的其他乳酸杆菌还有加氏乳杆菌、植物乳杆菌及阴道乳杆菌等。

基于分子生物学技术的基因鉴定具有高效、准确、快速的特点,已逐渐代替传统的表形特征鉴定方法成为乳酸杆菌鉴定分类的主要手段,且各种新的技术手段还在不断地涌现,但每种技术都有自己的优缺点,目前还没有任何一种分子生物学技术可以单独胜任对乳酸杆菌的鉴定。发展和完善现有的核酸分型技术,创建更新更完备的鉴定分类技术将是未来研究的重点。只有根据鉴定目的和要求的不同,合理地选择适宜的技术方法,并将表型特征鉴定方法和基因型特征鉴定方法有机地结合起来,才会使乳酸杆菌的鉴定更为准确、便捷。

参考文献

- [1] 毛友辉,朱薇,邓放明,等. 益生菌的研究进展及其在食品中的应用[J]. 现代生物医学进展,2011,11(20):3978-3980.
- [2] 张志明,孙海英,李建平. 16S rRNA 在医学微生物鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(4):349-350.
- [3] 刘朝军. 16SrDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. 军医进修学院学报,2011,32(7):774-776.
- [4] 王宏梅,于洁,包秋华,等. 利用 16S rDNA 序列及 tuf-RFLP 鉴定蒙古国发酵乳中的乳酸菌[J]. 中国乳品工业,2011,39(7):4-7.
- [5] 周宁,张建新,樊明涛,等. 分子分型技术在乳酸菌鉴定及多态性研究中的应用[J]. 食品工业,2012,4(5):69-73.
- [6] Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, et al. Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(1):297-303.
- [7] 赵婷,程池. MLSA 用于双歧杆菌快速鉴定研究进展[J]. 中国乳品工业,2011,39(6):46-50.
- [8] Tanigawa K, Watanabe K. Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of Lactobacillus delbrueckii[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 3):727-738.
- [9] 姚纲,胡红焱,梁慧,等. 用多位点序列分析技术鉴定 9 株产高光

学纯度 D-乳酸野生菌株[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(20):2647-2649.

- [10] 于洁. 利用 tuf, hsp60 和 pheS 基因的部分序列对乳杆菌进行分类研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.
- [11] Ventura M, Canchaya C, Meylan V, et al. Analysis, characterization, and loci of the tuf genes in Lactobacillus and Bifidobacterium species and their direct application for species identification[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(11):6908-6922.
- [12] Sheu SJ, Hwang WZ, Chen HC, et al. Development and use of tuf gene-based primers for the multiplex PCR detection of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei group, Lactobacillus delbrueckii, and Bifidobacterium longum in commercial dairy products[J]. J Food Prot, 2009, 72(1):93-100.
- [13] 张家超,孙志宏,刘文俊,等. 适用于乳酸菌分类鉴定的分子生物学技术[J]. 乳业科学与技术,2009,32(2):89-93.
- [14] 包秋华,孙志宏,乌日娜,等. 乳酸菌基因芯片应用研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(6):113-119.
- [15] Bae JW, Rhee SK, Park JR, et al. Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(12):8825-8835.
- [16] Schillinger U, Yousif NM, Sesar L, et al. Use of group-specific and RAPD-PCR analyses for rapid differentiation of Lactobacillus strains from probiotic yogurts[J]. Curr Microbiol, 2003, 47(6):453-456.
- [17] 刘斌,黄少磊,刘彦民,等. 分子标记技术应用于乳酸菌分类鉴定的研究进展[J]. 中国微生物学杂志,2012,24(7):670-673.
- [18] Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, et al. Lactobacillus strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(1):208-215.
- [19] 刘静. AFLP 分子标记的发展及应用[J]. 山东农业科学, 2010(5):10-14.
- [20] Anukam KC, Osazuwa EO, Ahonkhai I, et al. Assessment of lactobacillus species colonizing the vagina of apparently healthy nigerian women, using PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequencing[J]. World J of Micro Bio, 2006, 22(10):1055-1060.

(收稿日期:2014-02-28)

• 综 述 •

肺癌血清自身抗体及其应用的研究进展

祁松楠,钱忠萍 综述,顾国浩[△],蒋敏 审校

(苏州大学附属第一医院检验科,江苏苏州 215000)

关键词:肺癌; 自身抗体; 肿瘤相关抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)18-2506-04

肺癌是全球范围内发病率和病死率均较高的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康。肺癌已成为男性恶性肿瘤中发病率占第 1 位的肿瘤,在所有癌症致死病例中,23% 由肺癌引起^[1]。

肺癌的预后与诊断时的临床分期密切相关:0 期肺癌患者术后 5 年生存率可达 90% 以上, I 期为 60%, II ~ IV 期患者则从 40% 下降至 5% 以下。肺癌早期多无特异临床症状,难以被