

# FISH 技术在微生物生态学中的研究及进展\*

邢德峰\*\* 任南琪 王爱杰

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院 哈尔滨 150090)

**摘要:** 分子生物学技术在微生物生态学研究中具有灵敏、精确和快速的优势,但不能提供微生物的形态学、数量性状、空间分布等信息。荧光原位杂交技术结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性信息,可以在自然生境中监测和鉴定不同的微生物个体,尤其是对难培养和未被培养的微生物进行检测。荧光原位杂交技术被广泛用于微生物群落结构诊断和评价,现已成为微生物分子生态学研究中的热点技术。对荧光原位杂交技术的发展和在微生物分子生态学中的应用进行了综述,探讨了该技术应用中存在的问题和发展前景。

**关键词:** 荧光原位杂交, 16S rRNA, 探针, PNA, 微生物分子生态学

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0114-06

## APPLICATION OF FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION (FISH) IN MICROBIAL ECOLOGY

XING De-Feng   REN Nan-Qi   WANG Ai-Jie

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090)

**Abstract:** Molecular technologies are sensitive, fast, and cheap in the study on microbial ecology. However, these methods do not provide information about morphology, number, and spatial distribution of the microorganisms. In contrast, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) combines the precision of molecular biology with the visual information from microscope, and permits visualization and identification of individual microbial cells within their natural habitat. FISH not only allows the detection of slow growing microorganisms, but also of yet-to-be cultured. It is useful for many applications in diagnosis and assessment of the population structure of complex microbial communities, and is a powerful tool for molecular ecology studies in microbiology. In this paper, major techniques and progresses of FISH were described. Its application in microbial ecology, as well as problems, pitfalls, and perspectives of FISH are discussed.

**Key words:** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), 16S rRNA, Probe, PNA, Microbial molecular ecology

\* 国家 973 重点基础研究项目 (No. G2000026402)

\*\* 联系人 Tel: 0451-86282110 0451-82291744, E-mail: ixdf@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-12-06, 修回日期: 2003-02-05

微生物诊断及其群落多样性分析是微生物生态研究所采用的重要手段和内容,其最终目的是快速、准确鉴定在自然生境或人工生境中的微生物个体,并进行复杂微生物群落结构和演替规律的评价分析。传统菌种分离培养的鉴定方法不仅耗时费力,而且不能精确的反映混合菌群的组成和多样性,对于一些培养条件要求较苛刻或未被培养的细菌往往不能达到预期效果。近几年,借助分子生物学方法进行特异微生物的快速检测和鉴定已成为现代微生物诊断的重要手段。这些方法的缺点是不能提供微生物的形态学、数量、空间分布和细胞环境等信息。细菌染色的显微镜分析方法通过细胞的结构及形态学特征可以了解细菌的一些信息,但是由于有些细菌的形态学差异较少,因此仅仅依靠这种简单的显微学鉴定是不准确的。为克服上述问题免疫荧光技术被用于特定生境细菌的分析。然而,由于单克隆抗体的非特异性结合和严重依赖于表面抗原差异使这种方法的应用受到了限制。与此相比,荧光原位杂交技术(Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH)结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性,能够在自然的微生境中监测和鉴定不同的微生物个体,同时对微生物群落进行评价。目前,FISH 技术在微生物分子生态学研究中被广泛应用。尽管它的应用具有快速、简便、精确的优点,但是为保证结果的真实性和可靠性需要对整个技术过程进行优化和探讨。

## 1 FISH 技术原理

FISH 技术检测核酸序列通过荧光标记的探针在细胞内与特异的互补核酸序列杂交,通过激发杂交探针的荧光来检测信号。该技术主要包括以下几个步骤:①样品的固定;②样品的制备和预处理;③预杂交;④探针和样品变性;⑤用不同的探针杂交以检测不同的靶序列;⑥漂洗去除未结合的探针;⑦检测杂交信号,进行结果分析。

**1.1 寡核苷酸探针的标记** FISH 技术的探针必须要求具有较好的特异性、灵敏性和良好的组织渗透性。根据需要合成的寡核苷酸探针可识别靶序列内一个碱基的变化,能够用酶学或化学方法进行非放射性标记。表 1 中列举了 rRNA 为靶序列 FISH 检测的一些微生物的寡核苷酸探针。最常用的寡核苷酸探针一般是 15~30bp,短的探针易于结合到靶序列,但一般很难被标记。探针的荧光标记分为间接标记和直接标记。直接荧光标记是通过荧光素与探针核苷或磷酸戊糖骨架共价结合,或是掺入荧光素-核苷三磷酸,一个或更多荧光素分子直接结合到寡核苷酸上,在杂交后可直接检测荧光信号。在寡核苷酸的 5'端或 3'端加入一个带长碳链的氨基臂或巯基臂,活性的氨基和巯基进一步与荧光素反应,通常氨基臂或巯基臂加在寡核苷酸的 5'端,杂交时不会影响氢键的形成。间接荧光标记是指将标记物(如地高辛、生物素)连接到探针上,然后利用偶联有荧光染料的亲和素、链亲和素或抗体进行检测的方法。

**1.2 PNA 探针** PNA (Peptide Nucleic Acid) 即核酸肽,是一种不带电荷的 DNA 类似物,其主链骨架是由重复的 N-(2-氨基乙基)甘氨酸以酰胺键聚合而成,碱基通过亚甲基连接到 PNA 分子的主链上。PNA 分子骨架上所携带的碱基能与互补的核酸分子杂交,而且这种杂交与相应的 DNA 分子杂交相比结合力及专一性都较高。由于 PNA/DNA 分子之间没有电荷排斥力,使其杂交形成双螺旋结构的热稳定性高,这种杂交的结合强度和稳定性与盐浓度无关。PNA 是由碱基侧链和聚酰胺主链骨架构成,所以它不易被核酸酶和蛋白酶识别而降解。PNA 探针是 rRNA 靶序列的最理想的探针,在低盐浓度条件下二级结构的 rRNA 不稳定,使探针更易于接近靶序列。PNA 探针的最大优势是

能够接近位于 rRNA 高级结构区域中的特异靶序列, 极大提高了 PNA-FISH 检测的灵敏性, 而 DNA 探针不具备这一特性。由于 PNA 与核酸之间具有高亲和力, 因此, 以 rRNA 为靶序列的 PNA 探针通常比 DNA 探针短, 一般长度为 15 个碱基的 PNA 探针比较适宜。这样短的探针具有较高的特异性, 即使是一个碱基的错配也会不稳定, 表 2 中列举了微生物 FISH 检测中的一些 PNA 探针。一些研究表明 PNA 探针与 DNA 探针相比能有效的辨别一个碱基的差别。Worden 等<sup>[5]</sup>用 FISH 分析海洋浮游细菌时应用 PNA 探针与 DNA 探针相比信号强度提高 5 倍。

表 1 特异菌群 FISH 杂交中应用的寡核苷酸探针

探针	序列	特异性	靶位点
ARCH915 <sup>[1]</sup>	GTGCTCCCCGCCAATTGCT	Archaea	16S rRNA, 915-934
EUB338 <sup>[1]</sup>	GCTCCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	16S rRNA, 338-355
EUB338-III <sup>[2]</sup>	GCTCCACCCGTAGGTGT	Non-sulfur bacteria	16S rRNA, 338-355
NHGC <sup>[3]</sup>	TATAGTTACGGCCGCCGT	Low % G + C Bacteria	23S rRNA, 1901-1918
HGC69a <sup>[4]</sup>	TATAGTTACCACGCCGT	High % G + C gram-positive bacteria	23S rRNA, 1901-1918
ALF1b <sup>[1]</sup>	CGTTCG (CT) TCTGAGCCAG	$\alpha$ -Proteobacteria	16S rRNA, 19-35
ALF968 <sup>[4]</sup>	GGTAAGCTTCTGCGGTT	$\alpha$ -Proteobacteria, some $\delta$ -Proteobacteria	16S rRNA, 968-985
BET42a <sup>[1]</sup>	GCCTTCCCACTTCGTTT	$\beta$ -Proteobacteria	23S rRNA, 1027-1043
GAM42a <sup>[1]</sup>	GCCTTCCCACTTCGTTT	$\gamma$ -Proteobacteria	23S rRNA, 1027-1043
SRB385 <sup>[1]</sup>	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	$\delta$ -Proteobacteria, some gram-positives	16S rRNA, 385-402

表 2 特异菌群 FISH 杂交中应用的 PNA 探针<sup>[6]</sup>

探针	序列 (5'→3')	特异性	T <sub>m</sub> (°C)
EuUni-I	CTG CCT CCC GTA GGA	Eucarya	70.3
BacUni-1	ACC AGA CIT GCC CTC	Eubacteria	66.2
Eco16S06	TCA ATG AGC AAA GGT	<i>Escherichia . coli</i>	68.9
Pse16S32	CTG AAT CCA GGA GCA	<i>Pseudomonas . aeruginosa</i>	70.2
Sta16S03	GCT TCT CGT CCG TTC	<i>Staphylococcus . aureus</i>	61.8
Sal23S10	TAA GCC GGG ATG GC	<i>Salmonella</i>	73.9

**1.3 杂交后检测** 非同位素探针通过由荧光直接检测或酶法检测。目前, 多数情况下采用酶法间接检测, 通过将探针连接到类似地高辛的报告分子, 然后通过荧光抗体检测。用酶法信号放大可进一步增加 FISH 的灵敏性。地高辛标记的寡核苷酸可通过偶联有碱性磷酸酶地高辛抗体检测, 这个酶能将 HNPP (2-羧基-3-萘甲酸-苯胺磷酸) 转变成它的解磷酸化形式, 和固红 TR 结合生成淡红色荧光, 荧光强度是一个标记寡核苷酸的 8 倍。进一步改进的酶信号扩大方法被称作 TSA (Tyramide Singal Amplification) 系统, 寡核苷酸被用辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRPO) 标记, 它能以荧光素-酪胺为底物, TSA 系统能增加信号强度 10~20 倍。尽管如此, 与传统使用的单标记相比阳性细胞数目明显的减少, 这可能是由于高分子量的试剂进入细菌细胞的渗透力不充足。虽然通过裂解酶使细胞的通透性改善了信号的强度, 但对于某些革兰氏阳性菌和混合菌群仍然不能获得较好的效果。在自然样品中用几个荧光素分子标记的多聚核苷酸探针可显著的增强 FISH 检测的灵敏性。目前, 使用地高辛内标记的多聚核苷酸探针, 结

合 TSA 系统的 FISH 技术被广泛的应用。

## 2 Multicolor FISH (M-FISH) 技术

最近,多种标记的探针和荧光染料可以同时测多个靶序列,最新的多彩 FISH 可同时用 7 种颜色进行检测。荧光染料具有不同的激发和散射波可以同时检测一个或更多微生物。Perry-O' keefe 等<sup>[6]</sup>应用 4 种 PNA 探针的 M-FISH 对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和大肠杆菌进行了检测。为同时观察 M-FISH,应采用多波峰的滤镜,混合的荧光染料应该具有狭窄的散射峰,以防止探针间光谱重叠,从而去除背景问题和褪色,光稳定的高亮度染料应被用在低丰度的靶序列检测。M-FISH 中常使用具有狭窄波段滤镜的表面荧光显微镜检测。广视野消旋表面荧光显微镜(Widefield Deconvolution Epifluorescence Microscope)对细菌空间分布的数字分析得到了改善。共聚焦激光扫描显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)适合于厚度较大和背景较高的样品,如生物膜和污泥絮体,但是由于应用 CLSM 易导致荧光熄灭,因此要求样品具有较强的荧光信号。

## 3 FISH 技术用于微生物多样性和原位功能研究

近几年,应用 FISH 技术研究自然环境微生物多样性的报道较多,如河水和高山湖雪水的浮游菌体、海水沉积物的群落以及土壤和根系表面的寄居群落。FISH 技术也被用于监测环境中的微生物群落动态,如季节变化对高山湖水微生物群落的影响、原生动物的摄食对浮游生物组成的影响等。此外,应用 FISH 技术检测和鉴定未被培养的种属或新种属,如巨大硫酸盐细菌(*Thiomargarita namibiensis*)<sup>[7]</sup>、未被培的芽孢杆菌属细菌(*Bacillus*)<sup>[8]</sup>等。16S rRNA 为靶序列的 FISH 检测技术是快速可靠的分子生物学工具,可以不依赖培养方法监测环境样品中的种群并对其进行系统分类。这种方法被用于检测活性污泥微生物群落结构和数目,同时对特异菌群进行空间定位和原位生理学的研究,如动胶菌属(*Zoogloea*)<sup>[9]</sup>、不动杆菌属(*Acinetobacter*)<sup>[10]</sup>和氨氧化细菌<sup>[11]</sup>等被进行了检测。Silyn-Roberts 等<sup>[12]</sup>应用 FISH 技术对废水处理湿地生物膜进行了研究,探明了影响氨氧化的主要功能菌群。Sekiguchi 等<sup>[13]</sup>研究了 UASB 反应器中高温和中温颗粒污泥的厌氧微生物群落,揭示了微生物的空间分布和多样性,并对其原位生理学和功能进行了探讨。大多数专性共生的微生物都未被培养,应用 16S rRNA 能够进行鉴定和分类,然而不能从共生体区分出微生物,应用 FISH 技术能够在共生体中对微生物进行鉴定和定位分析。

## 4 FISH 技术应用存在的问题

**4.1 FISH 检测的特异性** FISH 检测的精确性和可靠性依赖于寡核苷酸探针的特异性,因此探针的设计和评价十分重要。在每次 FISH 检测中都要设置阳性对照和与靶序列相似具有几个错配碱基的探针作为阴性对照。阴性对照探针的错配碱基数量和位置十分重要,通常在 18 个碱基的寡核苷酸探针中一个错配碱基是足够鉴别不同的微生物细胞。因此,即使未获得系统发育上十分接近的非靶细菌的 rRNA 序列,靶细菌也能够很快被检测到。对于一些未被培养的微生物,首先应该用杂交(如点杂交)分析探针的特异性,以确定探针设计的合理性,否则就要从新分离菌株,然后重新设计探针。另

外探针的特异性和灵敏性也取决于杂交条件, 杂交和洗脱温度、变性剂的浓度等都要进行优化。

**4.2 FISH 检测的假阳性** 微生物的自身荧光也会干扰 FISH 检测, 目前在一些细菌如假单孢菌属、军团菌属、世纪红蓝菌、蓝细菌属和古细菌如产甲烷菌中存在这样的荧光特性。环境样品中自发荧光的生物或化学残留物总是存在于微生物周围的胞外物质中, 这种自身荧光的特性使应用 FISH 分析环境微生物变得复杂。尽管自身的背景荧光利于复染, 但经常是降低信噪比, 同时掩饰了特异的荧光信号。通过分析样品的自身背景荧光和避免其对 FISH 检测的影响是很困难的, 应用传统的表面荧光显微镜则很难检测到信号, 而应用 CLSM 则能获得较好的效果。微生物的培养基、固定方法和封固剂对荧光的信号强度均有很大的影响。使用狭窄波段的滤镜和信号放大系统可能降低自身背景荧光, 不同的激发波长对自身背景荧光强度也有影响。因此, 在检测未知混合菌群时要进行防止自身背景荧光的处理, 以防止假阳性的发生。

**4.3 FISH 检测的假阴性** 细胞壁的结构影响探针的渗透力, 可能导致杂交信号强度降低。革兰氏阴性菌通透性较好, 即使是多聚核苷酸探针也能很好的渗透到细胞内。革兰氏阳性菌则必须进行特殊的固定和前处理, 以提高探针的渗透力。有时由于 RNA 形成二级结构, 存在发夹、颈环结构和 RNA-蛋白质的复合体, 使寡核苷酸探针无法接近靶序列, 阻碍了杂交, 这也就是在杂交中即使将 RNA 或 DNA 变性也不能获得理想结果的原因。探针设计不合理形成的自身退火或发夹结构也能导致杂交信号降低。采用 PNA 探针可能解决上述问题, 提高杂交效果, 从而避免 FISH 检测的假阴性。细菌细胞中 rRNA 含量对其杂交也有较大的影响, 不同种属 rRNA 含量变化较大, 即使是同一菌株的不同生理状态其含量也不同, 休眠的细胞或代谢不活跃的细胞可能导致信号强度降低或假阴性。此外, 当细胞呈现不规则形状或形成链状和紧密的群体时, 微生物的定量可能会很困难。使用高亮度的荧光染料 Cy3 或 Cy5 和多重探针标记, 以及应用信号放大系统或多聚核苷酸探针均可增强杂交信号。由于许多荧光染料在激发后很快就发生光熄灭, 因此最好使用狭窄波段的滤镜和光稳定的荧光染料, 防褪色的封固剂也是十分重要的。

## 5 展望

微生物的原位杂交与功能研究结合是 FISH 技术进一步发展的方向, 如进行基因表达和代谢水平的研究。与生物传感器相结合也将是 FISH 技术在环境微生物学中应用的又一技术手段。近年来, 绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 分子被应用到微生物生态学的研究中, 将不同的基因插入微生物的质粒或染色体 DNA, 表达的绿色荧光蛋白分子能在单细胞水平可视化和监测启动子活性或基因的表达。目前, 流式细胞计常被用于记录和检出液相中 FISH 的荧光信号, 尽管不能获得微生物的形态学和空间分布信息, 但是对于悬浮细菌或浮游的混合群落可自动化和定量分析, 并且能够对微生物进行高频率的分选。FISH 技术与其它技术结合可为微生物生态学研究提供更多的信息, FISH 技术已经成为微生物生态学研究中最有前景的技术手段之一。

## 参考文献

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Microbiol Rev, 1995, 59: 143 ~ 169 .

- [2] Daims H, Bruhl A, Amann R I, *et al.* Syst Appl Microbiol, 1999, **22**: 434 ~ 444.
- [3] Roller C, Wagner M, Amann R I, *et al.* Microbiology, 1994, **140**: 2849 ~ 2858.
- [4] Anja B F, Isabell F, Peter P, *et al.* FEMS Microb Ecol, 2001, **38**: 105 ~ 113.
- [5] Worden A Z, Chisholm S W, Binder B J. Appl Environ Microbiol, 2000, **66**: 284 ~ 289.
- [6] Perry-O' keefe H, Rigby S, Oliveira K, *et al.* J. Microbiol Methods, 2001, **47**: 281 ~ 292.
- [7] Schulz H N, Brinkhoff T, Ferdelman T G, *et al.* Science, 1999, **284**: 493 ~ 499.
- [8] Felske A, Akkermans A D L, De Vos W M. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**: 4588 ~ 4590.
- [9] Rossell-Mora R A, Wagner M, Amann R, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1995, **61**: 702 ~ 707.
- [10] Wagner M, Erhart R, Manz W, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 792 ~ 800.
- [11] wagner M, Rath G, Amann R, *et al.* System Appl Microbiol, 1995, **18**: 251 ~ 264.
- [12] Silyn-Roberts G, Lewis G. Wat Res, 2001, (35) **11**: 2731 ~ 2739.
- [13] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Ohashi A, *et al.* Water Sci Technology, 2002, **45** (10): 19 ~ 25.