

## 高通量细菌鉴定方法研究进展

刘伟 王腾蛟 唐海琳 谢红卫\*

(国防科技大学 机电工程与自动化学院 湖南 长沙 410073)

**摘要:**高通量细菌鉴定是微生物领域的重要研究课题,对于疾病诊断和环境监测具有重要意义。相比传统的表型鉴定方法,分子遗传学鉴定方法具有稳定性高、检测周期短以及成本较低等特点,成为了主流的鉴定方法。特别是下一代 DNA 测序技术、核酸分子检测基础上的细菌检测芯片、质谱技术基础上的蛋白质图谱分析为高通量、快速、准确乃至定量的细菌鉴定提供了可行性方案。

**关键词:**细菌鉴定, DNA 测序, 核酸分子检测, 蛋白质图谱分析

## The research progress of high-throughput bacterial species identification

LIU Wei WANG Teng-Jiao TANG Hai-Lin XIE Hong-Wei\*

(College of Mechanical & Electronic Engineering and Automatization, National University of Defense Technology, Changsha, Hunan 410073, China)

**Abstract:** High-throughput bacterial species identification is an important research topic in the area of microbiology, which plays a pivotal role in the disease diagnosis and environmental monitoring. Compared to the traditional phenotypic identification methods, molecular methods have the features of higher stability, shorter detection period and lower cost, which are becoming the main trend in the bacterial species identification. Especially, next generation sequencing technique, the detection chips based on nucleic acid identification, the protein profile analyses based on mass spectrometry provide the valid means for high-throughput, fast, accurate and quantitative bacterial species identification.

**Keywords:** Bacterial species identification, DNA sequencing, Nucleic acid identification, Protein profile analyses

高通量细菌鉴定是微生物领域中重要的研究课题之一,对于疾病预防与环境检测具有重要意义<sup>[1]</sup>。鉴定(Identification 或 Determination)是指借助于现有的微生物分类系统,通过特征测定,确定未知的、新发现的或未明确分类地位的微生物所应

归属分类群的过程。原则上,一个具有广泛意义的细菌鉴定方法应符合以下标准:分辨大多数细菌的能力;从尽量少的样本中鉴定出全部细菌;根据显性的没有明显特征的细菌寻找到其同源的物种;能够对细菌样本进行立即、灵活和高通量的分析;操

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31000591, 31171266)

\*通讯作者:✉: xhwei65@gmail.com

收稿日期: 2014-04-04; 接受日期: 2014-08-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-11

作简单;迅速得到结果。

为达到此标准,研究人员发展了多种细菌鉴定方法。总体上,细菌分类鉴定方法包括表型鉴定法和分子遗传学鉴定法两大类,分成4个水平:细菌形态和生理生化水平、细胞组分水平、蛋白质水平和核酸水平<sup>[2]</sup>。细菌形态和生理生化水平是传统的细菌分类鉴定方法,后三者则是分子水平上的鉴定方法,它们能够为细菌分类鉴定提供相对于表型分析更可靠的依据。分子鉴定方法具有代表性的有免疫诊断技术、基因测序、核酸分子检测技术和蛋白质图谱分析等。与传统方法相比,这些方法由于基于分子层面,细菌中的基因和蛋白质在很长时间内都不会发生变化,因此具有更好的稳定性。同时,由于省去了繁琐的理化试验步骤,检测周期短,人力物力消耗相对较少。本文将对其中常用的DNA测序和核酸分子杂交方法,新发展的蛋白质组学鉴定方法加以详细介绍。

## 1 DNA 测序方法

生物细胞DNA分子的一级结构中既含有保守的片段,又含有变化的碱基序列。保守的片段反映了生物物种间的亲缘关系,而高变片段则表征了物种间的差异。这些保守或高变的特征性核苷酸序列构成了细菌按不同分类级别(如科、属、种)鉴定的分子基础。16S rDNA是编码原核生物核糖体小亚基rRNA(16S rRNA)的DNA序列,长度约为1 540 bp,存在于所有细菌染色体基因组中。16S rDNA分子大小适中,突变率小,是细菌系统分类学研究中最常用的“分子钟”。目前,已有上千种细菌的16S rDNA序列被测定,并载入基因库。由于16S rDNA序列的保守性和存在的普遍性,适于开展对细菌的各种分类研究。

DNA测序技术在细菌鉴定上具有明显的优势。传统的细菌检测方法大多只针对特定的、可培养的细菌,并且耗时较长。对于可培养细菌约需2 d的检测时间,对于生长较慢的菌种需要7 d左右,对于实验室无法培养的细菌则无能为力。而且传统方法难以区分某一传染是由一个还是多个菌

种所引起。16S rDNA测序在分子水平上进行细菌鉴定,克服了传统培养方法的多种局限性,对于罕见细菌、慢生长细菌、未培养细菌等的鉴定尤为重要<sup>[3]</sup>。该技术不仅提供了传染病的病原学解释,而且能够帮助医生挑选抗生素、决定治疗时间、确定传染病控制过程。但基于第一代测序技术的细菌检测需要花费相当长的时间进行DNA序列扩增,并且成本较高。

第二代测序技术,又称下一代测序技术,是相应于以Sanger测序法为代表的第一代测序技术而得名。第二代测序中的3种主流测序技术为依次出现的Roche/454焦磷酸测序(2005年)、Illumina/Solexa聚合酶合成测序(2006年)和ABI/SOLiD连接酶测序(2007年)技术。与Sanger测序相比,下一代测序技术的突出特征是,单次运行产出序列数据量大,故而又称为高通量测序技术<sup>[4]</sup>。高通量测序技术的进步极大地促进了以测序为基础的细菌检测技术的发展,它能够以更高的速度进行大规模的平行分析,减少试剂成本和所需的样本量。由于其能够自动化、低成本、高通量地提供各种定性和定量的测序数据,使得基因测序技术成为目前实验室中最常用的细菌检测手段<sup>[5-7]</sup>。相比传统细菌检测,该技术不仅快速、准确,而且可靠性和重复性较好,方便不同实验室之间的比较。

元基因组(Metagenome)(也称微生物环境基因组, Microbial environmental genome)的提出和发展也促进了细菌检测技术的进步。它以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象,包含了可培养的和未可培养的微生物的基因,以功能基因筛选和测序分析为研究手段,来研究微生物多样性、种群结构、进化关系以及相互协作关系等<sup>[8]</sup>。最新的项目,包括MetaHIT<sup>[9]</sup>和NIH's Human Microbiome Project (HMP)<sup>[10-11]</sup>已经产出了兆碱基数量( $10^{12}$ )的元基因组序列数据。基因测序是元基因组研究的重要手段,如NIH's HMP计划中对上百个自愿者的样本进行深度测序来提取口腔、皮肤、鼻孔、胃肠道和生殖器的特征种群。影响元基因组分析结果的有两

个重要因素:一个是选择合适的培养条件以区分相近的细菌种属;另一个则是筛选合适的 16S rRNA 基因片段用于测序。

基于 DNA 测序的细菌鉴定技术的难点在于测序结果的解释,特别是在序列比对和分析上需要一定的技巧。尽管已有大量的软件和数据库支持,对于 16S rRNA 基因测序结果的解释仍是临床微生物学家和技术人员所面临的最困难的问题之一。最为著名的软件和数据库包括:GenBank, Ribosomal Database Project (RDP-II)<sup>[12]</sup>, MicroSeq<sup>[13]</sup>, Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM)<sup>[14]</sup> 以及 SmartGene Integrated Database Network System (SmartGene IDNS)<sup>[15]</sup>。RDP-II 和 SmartGene IDNS 数据库中的序列来自于 GenBank,而 RIDOM 和 MicroSeq 数据库中的序列则来自于各种文献的收集结果。由于 GenBank 中存在大量未被证实的 16S rRNA 基因序列,因此对于没有经验的用户很难决定“打分最高”还是“相近匹配”才是真正能够用于标识细菌的特征序列。如果数据库中不同菌种的 16S rRNA 基因序列的差别非常小,也将导致细菌鉴定的困难。一个细菌中存在多个 16S rRNA 拷贝则可能导致鉴定结果的偏性<sup>[16]</sup>。为解决此类问题,一方面研究人员试图建立更为全面、经过验证的 16S rRNA 基因数据库,另一方面开发功能强大、界面友好的软件以帮助用户进行结果分析<sup>[17]</sup>。数据处理软件包的精确性、数据库的质量和完整性都会影响细菌鉴定结果。因此,该技术的临床应用还需要分子生物学和生物信息学专家的密切配合。

## 2 核酸分子检测方法

核酸分子检测方法包括病原菌 PCR 检测、病原菌 MLST 分型以及 DNA 探针等。实时荧光定量聚合酶链反应(Real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR)是根据荧光共振能量转移原理,设计相应的荧光标记核酸探针,通过 PCR 反应对靶 DNA 进行定性、定量测定的技术<sup>[18]</sup>。与传统的细菌培养法或酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

法相比,Real-time PCR 准确性好、特异性强、敏感性高,不受标本中存在的抗菌药物或其他抑菌物质的干扰,被广泛应用于病原体检测。多重 Real-time PCR 可同时检测多种病原菌,并区分主要致病菌和次要致病菌,为临床诊治提供依据。进一步,针对病原菌种属特有靶基因设计 PCR 检测芯片可以实现快速、灵敏、高通量的检测,如 Ou 等<sup>[19]</sup>比较分析了多个已测序沙门氏菌基因组识别出了甲型副伤寒沙门菌的血清型特异靶基因。多位点测序分型(MultiLocus sequence typing, MLST)技术是一种以核苷酸测序为基础的病原菌分型方法<sup>[20]</sup>。该方法根据待分型病原菌的基因组序列注释信息,针对数个持家基因设计引物并选择数十甚至上百株菌的染色体 DNA 进行 PCR 扩增和产物测序来进行分析,可用于推断菌株间的系统发育关系,也可以直接鉴定病原菌的亚型。其局限性在于分辨能力由持家基因的变异情况所决定,如某些菌株的持家基因变异程度低或无变异则将导致 MLST 分型方法的失效。

DNA 探针检测技术是核酸分子杂交方法中的研究焦点。DNA 探针技术可以同时检测大量的目标片段,实现对多种目标基因的平行化鉴定,从而适合于多种细菌的同时鉴定。目前,DNA 探针主要以细菌核糖体 16S rRNA 为基础进行设计<sup>[21]</sup>。对于大规模细菌检测基因芯片,由于细菌家族种系庞杂,进化关系复杂,如何结合具体的研究背景、挑选设计合适的探针是基因芯片设计的中心问题。其目的是根据不同菌种在基因片段上的序列差异,设计相应的菌种特异性探针,从而检测样品中是否存在某个菌种,确定菌落中的菌种构成。对于少量病原微生物,如十几个菌种的检测,可应用“一条探针对应一个目标菌种”的传统细菌检测芯片设计方式。但是,当待检测的目标菌种规模增大时,传统细菌检测芯片的设计方式则无法适用,需要在探针设计和检测模式上有所突破,对探针进行特异性组合,以达到提高检测目标菌种覆盖率的目的。如 Wu 等<sup>[22]</sup>通过设计组合探针能够实现 997 个菌种的分类与识别。但目前还不存在通用的实验参数,能

够使芯片中每个探针保持相同的特异性<sup>[23]</sup>。因此,只有少部分的探针(不超过 50%)能够在实际中正常地工作。一种可能的解决办法是在线检查芯片结构和变性情况,以便使每个探针达到其最佳的杂交条件。

在新一代测序技术出现之前,DNA 探针技术以其快速、高通量的特点一度成为大规模细菌检测的重要手段。但不同于 DNA 测序直接分析比较各菌种的 DNA 序列,核酸分子杂交是间接比较不同微生物 DNA 碱基排列顺序的相似性,并且需要预先进行复杂的探针设计,因此不如 DNA 测序方法更加直接简便。这导致在实验室范围内,核酸杂交技术已逐步被 DNA 测序技术所取代。但核酸杂交技术并未完全退出历史舞台,仍陆续有研究人员在对其进行改进,使其适应于各种复杂情况下的细菌检测。如 Chung 等<sup>[24]</sup>尝试将磁性纳米微粒与寡核苷酸芯片结合,检测病原体中的目标核酸。该磁性 DNA 芯片含有针对目标细菌 16S rRNA 设计的通用和特异探针,能够利用小型化的核磁共振设备来检测放大的目标 DNA,其芯片设计步骤大大简化,并且检测更加快速、稳健。同时,随着 DNA 生物传感器探针等新技术的不断发展,现以研制出多种实用的 DNA 探针检测仪,用于微生物的快速和在线检测。

同时,有研究人员发现:16S rRNA 作为一种通用的分子标记,由于其高度的保守性,难以区分相近种属或同一种属内的不同菌株<sup>[11]</sup>。例如,在芽孢杆菌类的某些菌种中 16S rRNA 非常保守,以至于无法用于细菌分类。因此,有些研究人员建议使用不那么保守的基因和蛋白质,如旋转酶基因 *gyrB*、RNA 聚合酶基因 *rpoB* 以及超氧化物歧化酶基因 *sodA* 等,以便在某些菌种中达到更好的区分能力<sup>[25]</sup>。这也促使蛋白质模式、蛋白质标志物以及蛋白质组学方法成为细菌鉴定问题的流行解决方案。

### 3 蛋白质组学方法

蛋白质组学的发展为微生物的鉴定提供了新的途径<sup>[26-28]</sup>。蛋白质是生命活动的执行分子,因此

蛋白质的序列模式是区分不同物种的重要依据。目前,研究人员已经发展了多种可用于细菌分类和鉴定的质谱方法及软件工具。其中,大部分方法是利用蛋白质量模式(即蛋白质一级图谱)进行细菌检测<sup>[29]</sup>。其基本原理是:将已知的细菌质量谱作为特定的指纹存储于参考数据库中;通过质谱实验,从未知的细菌样本中提取蛋白质一级图谱;将实验谱与参考谱进行模式匹配,获得相关性打分;如果打分高于设定的阈值,那么匹配成功,将该细菌归为参考谱所属的类别。典型的组学水平的蛋白质鉴定技术路线包括自底向上(Bottom-up)和自顶向下(Top-down)策略,这两种策略适用于探索性较强的基础研究。对于有明确范围界定的物种鉴定来说,新发展的选择反应离子监测(SRM/MRM)技术则效率更高。

#### 3.1 质谱技术

由于质谱技术的高通量、敏感性和特异性,其在微生物学研究中应用十分广泛,如用于临床诊断和环境研究等。质谱法进行快速微生物鉴定具有以下特点:(1) 鉴定速度快:通常在数分钟内就可获得鉴定结果;(2) 鉴定准确:比常规微生物生化鉴定方法的符合率更高;(3) 操作简便:只需要简单的操作就可进行复杂的微生物鉴定;(4) 菌库大:相比生化鉴定方法,质谱法建立菌库更快,可鉴定的微生物种类更多,对于一些用常规方法难鉴定的微生物鉴定效果较好。因此基于质谱技术的微生物鉴定方法一经提出,就得到了多方面的关注,并有望在近年内用于大规模的装备各微生物实验室。按照所用技术的不同,用于细菌鉴定的质谱技术包括:气相色谱与质谱联用(GS-MS)技术、MALDI-MS 技术、基于 PCR 产物的 ESI-MS 技术等<sup>[30]</sup>。

在 GS-MS 技术中经气相色谱柱分离后的样品呈气态,流动相也是气体,与质谱的进样要求相匹配,容易将这两种一起联用,灵敏度和分辨率较高,可用于检测细菌中的脂肪酸谱或小分子(如糖类)<sup>[31-32]</sup>。但该方法比较费时,由于有机酸等代谢物的极性、挥发性低,往往不能直接进样分析,

需要较复杂的化学衍生步骤。MALDI-MS 技术, 如 MALDI-TOF MS 能够提供详细的基因组信息, 为基因测序提供了良好的替代性解决方案<sup>[33]</sup>。该方法在流行病学诊断上功能强大, 对于各种培养条件下的细菌变异不敏感, 适用于大部分临床相关细菌的检测, 正在成为医学上细菌基因分型的金标准。目前, MALDI-TOF MS 已发展成为一种成熟的分析方法, 生物梅里埃公司和布鲁克公司等多家公司的产品已经常规用于临床细菌鉴定。研究表明, 除细菌培养之外整个 MALDI-TOF MS 的细菌鉴定流程可以缩减至 10 min 或者更短的时间<sup>[34-36]</sup>。通常, 一个单独的菌落就足以用于 MALDI-TOF MS 分析, 但是很多情况下, 仍需要对细菌样品进行培养或者富集, 以便降低细菌样本的复杂性。在鉴定过程中, 可选的分子标志物相对较多, 如果基于常用的 16S rRNA 基因无法有效区分菌种, 那么对于凝固酶阴性葡萄球菌、链球菌和肠球菌可采用 *sodA* 基因, 对于洋葱伯克霍尔德菌可采用 *recA* 基因, 志贺氏杆菌分离采用 *ipaH* 基因。如 Dubois 等<sup>[35]</sup>结合多种分子标志物, 采用 MALDI-TOF MS 技术对 767 个常规临床菌种进行测试, 实现了 90% 以上的菌种鉴定。最近, 研究人员新发展出来一种

基于 ESI-MS 的微生物检测方法, 该方法将 PCR 产物的高分辨率 ESI-MS 检测与细菌基因的核酸扩增以及碱基组成分析相结合<sup>[37-38]</sup>, 能够快速、定量地检测一系列微生物, 决定其种属。同时, 以该方法为基础设计的 PCR-ESI-MS 芯片还能够以较高的分辨率鉴定细菌亚类, 发现毒性因子和细菌抗药性。该方法的局限在于扩增子的核苷酸序列是不确定的, 因此, 在理论上基于 PCR 产物的 ESI-MS 检测方法比序列数据提供的信息要少。

以上分析方法主要利用一级质谱进行样品分析, 为了提高鉴定精度, 也有研究人员尝试将二级质谱应用于细菌分类和鉴定<sup>[39-40]</sup>。如 Dobryan 等<sup>[41]</sup>提出了一套简单、快速的蛋白质组学鉴定方法, 能够区分非常接近的菌种。其工作流程如图 1 所示, 相比其他基于一级质谱的方法(如 MALDI-TOF MS 和采用 GC-MS 的脂肪酸甲基脂分析), 该方法基于 LC-MS/MS, 需要更高精度的质谱仪和串联质谱, 同时也需要更加细致的样品准备。该方法的优势在于: (1) 不需要预先知道物种的知识; (2) 能够产生物种特异的序列数据; (3) 能够提供蛋白质相对表达水平; (4) 样品消耗更少, 检测效率更高, 易于执行。

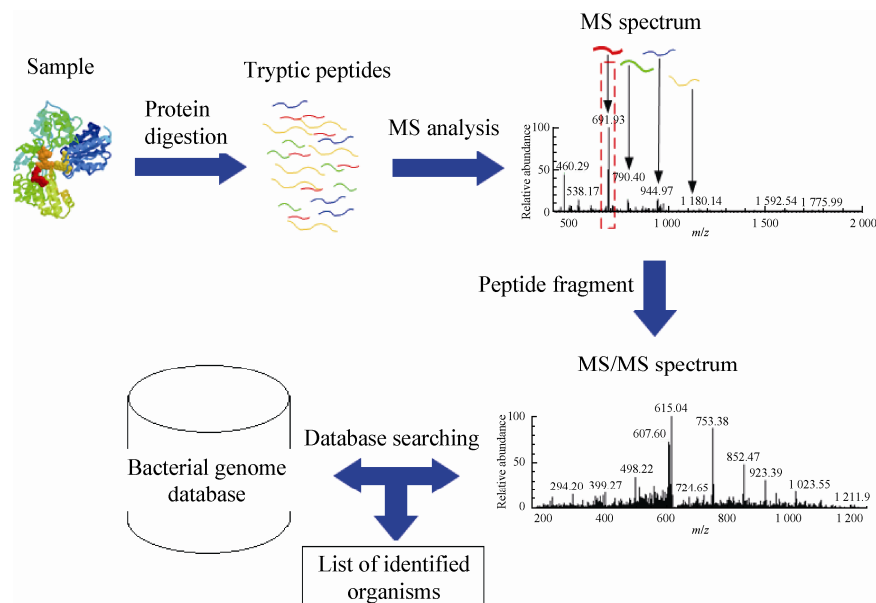


图 1 基于 LC-MS/MS 方法的细菌鉴定流程

Figure 1 The workflow of bacteria identification based on LC-MS/MS

尽管质谱技术作为蛋白质组学研究的有效方法得到了广泛的应用,并且关于质谱技术的理论也在不断成熟和完善,但该技术细菌鉴定方面仍存在一定缺陷。由于质谱技术的理论支撑是根据样本电离后粒子的质荷比得到的图谱进行分析,所以其可靠性取决于质荷比的唯一性。然而,同样的细菌,由于培养条件或化学提取方法的不同会产生不同的质谱,从而导致分析结果的误差。即使严格控制以上条件,质谱法仍不能完全准确的测定出细菌种类。目前,基于质谱的蛋白质组学研究方法中的主流技术是鸟枪法。由于蛋白质的分子量很大,不同细菌中蛋白质的相似性,同位素及其他质荷比相同但又属于不同类别的离子干扰的存在,通过鸟枪法对全部表达的蛋白质进行检测,显然效率不高,甚至可能由于噪声干扰得到错误的结果。一种可能的解决方案是将定向蛋白质组学方法(如选择反应离子监测 SRM 技术)应用于细菌的分类鉴定,根据数据库中的蛋白质序列来寻找能够最大程度区分不同细菌的目标肽段(蛋白质的一部分序列),以提高质谱分析的效率。

### 3.2 SRM 技术

基于质谱的选择反应监测技术(Selected reaction monitoring, SRM),或称单反应监测技术(Single reaction monitoring),是定向蛋白质组研究中常用的方法。对于有明确范围界定的微生物鉴定来说,选择反应离子监测(SRM/MRM)技术效率更高<sup>[42-44]</sup>。质谱多反应监测技术(Multiple reaction monitoring, MRM)被认为是并行 SRM 技术,一般统称为 SRM。SRM 技术基于已知信息设定质谱检测规则,对目标肽段进行记录,由于可有效去除噪声干扰,因此相比基于鸟枪法的质谱技术检测结果更加可信。同时,SRM 技术通过有选择的监测部分离子并预测色谱保留时间,还可以实现准确鉴定和精确定量。

一个典型的 SRM 实验包括实验设计、数据获

取和数据分析 3 个步骤。其中,实验设计是指为目标蛋白选择对应的特异性肽段,是 SRM 实验的关键步骤。一个目标蛋白被酶切后可以得到数十至数百个肽段,其中可能有一个或者多个特异性肽段被用于 SRM 实验中的目标监测。选择合适的特异性肽段对于 SRM 实验至关重要。因此,肽段的筛选是 SRM 实验能够成功的关键。对于细菌鉴定而言,就是要选择那些既能够被质谱鉴定,又能够作为某个细菌特异表征的肽段。影响肽段选择的因素包括:质谱属性,即肽段的可检测性差异<sup>[45]</sup>;唯一性,即所选肽段能否唯一的表征目标蛋白质;翻译后修饰;化学诱导修饰;酶切位点等。

目前,蛋白质特异性肽段的选择有两大策略:第一类根据已有实验数据选择特异性肽段,这是一种简单、直接的方法,也有研究人员建立了相关数据库以方便特异性肽段的选择。然而,此类策略存在明显的局限性,它仅适用于以往实验检测到的蛋白质和肽段<sup>[46]</sup>。如果待检测的蛋白质和肽段从未在数据库中出现过,那么此类方法就无法奏效。第二类策略是根据生物信息学的计算工具选择特异性肽段。不管实验中待测的肽段和蛋白质以往是否被检测过,研究者都可以利用计算工具来预测每个菌种的特异性肽段。该策略利用肽段的理化性质,从已有的大规模数据集中挑选高可信度的结果进行分析,根据肽段序列、样品预处理流程、肽段的丰度等多方面的综合信息,在蛋白质的众多理论酶切肽段中选择特异性肽段<sup>[47-48]</sup>。但是,当待检测的样本较复杂时,如大规模的致病菌鉴定,现有的选择方法难以筛选出具有足够区分度的特异性肽段,尚缺乏有针对性的特异性肽段选择工具。

SRM 技术作为一种定向蛋白质组学的分析方法,具有特异性强、灵敏度高、重现性好、线性动态范围宽的突出优点,使其在细菌鉴定方面有着良好的发展前景。特别是根据该技术设计的目标蛋白质检测芯片<sup>[49-50]</sup>,将来有望用于快速的高通量细菌

鉴定。目前,制约该技术发展的瓶颈在于其对于实验参数和设计方法的严重依赖,因此它还停留在方法探索阶段,尚未有大规模的应用。

#### 4 总结与展望

细菌鉴定对于保障人类生命安全和生产社会生活具有重要意义。尽管目前已有多种方法可用于细菌鉴定,但是高通量、快速、准确的细菌鉴定仍是一个尚未完全解决的问题。本文介绍了几种代表性的细菌鉴定方法,其中 DNA 测序方法已成为细菌检测的主流方法,核酸分子检测基础上的芯片设计可导致高通量、在线、实用检测芯片的产生,而蛋白质组学方法,如质谱技术基础上的蛋白质模式、蛋白质标志物以及整个蛋白质组学分析代表了细菌检测的未来发展方向。相比 DNA 测序技术,蛋白质组学方法具有其独特的优势。无论蛋白质是否具有序列保守性,都可以直接对其进行分析而无需扩增实验,同时可选的蛋白质分子标志物有很多种,不像 16S rRNA 基因那样单一。因此,大规模蛋白质组学分析为基因组测序技术提供了良好的备选解决方案。

但不可避免的,各种检测技术因其自身特点,都存在着一定局限性。首先,基因测序方法多基于 16S rRNA 基因开展细菌鉴定与分类,难以区分某些相近的种属,对于测序结果的解读也较为复杂;核酸分子检测方法通常需要复杂的芯片设计,存在杂交特异性和重复性较差等问题,限制了它的使用范围,使得该技术在很大程度上已被测序方法所取代;基于鸟枪法的蛋白质组学鉴定结果可能受到各种噪声的干扰,尽管定向蛋白质组学方法,如 SRM 技术可部分地解决噪声干扰问题,但受限于现有设计工具和方法,发展还不够成熟。这就需要研究人员不断探索,发展完善现有检测技术,并致力于开发更稳定、可靠的分子标志物。同时,细菌分类与检测技术的进步离不开生物信息学方法的支持,不管是序列数据处理、芯片设计还是蛋白质图谱分

析,都需要实验技术与生物信息学方法的密切配合。

#### 参考文献

- [1] Busse HJ, Ewald BM, Lubitz DW. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic[J]. Journal of Biotechnology, 1996, 47(1): 3-38.
- [2] Ludwig W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120: 225-236.
- [3] Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2008, 14(10): 908-934.
- [4] 岳桂东, 高强, 罗龙海, 等. 高通量测序技术在动植物研究领域中的应用[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(2): 107-124.
- [5] Kemp M, Jensen KH, Dargis R, et al. Routine ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria[J]. Future Microbiology, 2010, 5(7): 1101-1107.
- [6] Pallen MJ, Loman NJ, Penn CW. High-throughput sequencing and clinical microbiology: progress, opportunities and challenges[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(5): 625-631.
- [7] Chiu CM, Lin FM, Chang TH, et al. Clinical detection of human probiotics and human pathogenic bacteria by using a novel high-throughput platform based on next generation sequencing[J]. Journal of Clinical Bioinformatics, 2014, 4(1): 1.
- [8] Conlan S, Kong HH, Segre JA. Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH human microbiome project[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47075.
- [9] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome[J]. Nature, 2011, 473(7346): 174-180.
- [10] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. Nature, 2012, 486(7402): 207-214.
- [11] Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research[J]. Nature, 2012, 486(7402): 215-221.
- [12] Cole JR, Chai B, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(Database issue): D294-D296.
- [13] Patel JB, Leonard DG, Pan X, et al. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(1): 246-251.
- [14] Harmsen D, Rothganger J, Frosch M, et al. RIDOM: Ribosomal differentiation of medical micro-organisms

- database[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 416-417.
- [15] Simmon KE, Croft AC, Petti CA. Application of SmartGene IDNS software to partial 16S rRNA gene sequences for a diverse group of bacteria in a clinical laboratory[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(12): 4400-4406.
- [16] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity in 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969.
- [17] Woo PC, Teng JL, Yeung JM, et al. Automated identification of medically important bacteria by 16S rRNA gene sequencing using a novel comprehensive database, 16SpathDB[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(5): 1799-1809.
- [18] Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, et al. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(6): 2610-2617.
- [19] Ou HY, Ju CT, Thong KL, et al. Translational genomics to develop a *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A multiplex polymerase chain reaction assay[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2007, 9(5): 624-630.
- [20] 刘金华, 贺丹, 杨艳秋, 等. 多位点测序分型技术在病原微生物分型鉴定中的应用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1188-1191.
- [21] Uttamchandani M, Neo JL, Zhung BN, et al. Applications of microarrays in pathogen detection and bio defence[J]. Trends in Biotechnology, 2008, 27(1): 53-61.
- [22] 吴一波, 伯晓晨, 颜莉蓉, 等. 基于组合探针识别的大规模细菌分类16S rRNA 基因芯片设计[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(8): 1025-1034.
- [23] McLoughlin KS. Microarrays for pathogen detection and analysis[J]. Briefings in Functional Genomics, 2011, 10(6): 342-353.
- [24] Chung HJ, Castro CM, Lee HI, et al. A magneto-DNA nanoparticle system for target specific bacterial identification[J]. Nature Nanotechnology, 2013, 8(5): 369-375.
- [25] Dworzanski J, Dickinson DN, Deshpande SV, et al. Discrimination and phylogenomic classification of *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* strains, based on LC-MS/MS analysis of whole cell protein digests[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(1): 145-155.
- [26] Fox K, Fox A, Rose J, et al. Speciation of coagulase negative staphylococci, isolated from indoor air, using SDS page gel bands of expressed proteins followed by MALDI-TOF MS and MALDI TOF-TOF MS-MS analysis of tryptic peptides[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(2): 243-250.
- [27] Chiu TC. Recent advances in bacteria identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using nanomaterials as affinity probes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(5): 7266-7280.
- [28] Wang YF, Fu J. Rapid laboratory diagnosis for respiratory infectious diseases by using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Journal of Thoracic Disease, 2014, 6(5): 507-511.
- [29] Young JI, Fox A. Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 92(3): 381-386.
- [30] Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2009, 4(5): 732-742.
- [31] Bohin A, Bouchart F, Richet C, et al. GC/MS identification and quantification of constituents of bacterial lipids and glycoconjugates obtained after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 340(2): 231-244.
- [32] Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(1): 74-82.
- [33] Fox A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: past, present, and future[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(8): 2677-2680.
- [34] Kern CC, Usbeck JC, Vogel RF, et al. Optimization of Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry for the identification of bacterial contaminants in beverages[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 93(3): 185-191.
- [35] Dubois D, Grare M, Prere MF, et al. Performances of the MALDI-TOF mass spectrometry system VITEK MS for the rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(8): 2568-2576.
- [36] Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekar J, et al. Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2012, 73(1): 21-26.
- [37] Martiny D, Busson L, Wybo I, et al. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption Ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(4): 1313-1325.
- [38] Ecker DJ, Sampath R, Massire C, et al. Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(7): 553-558.
- [39] Ecker DJ, Massire C, Blyn LB, et al. Molecular genotyping of microbes by multilocus PCR and mass spectrometry: a new tool for hospital infection control and public health surveillance[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 551: 71-87.
- [40] Fox K, Fox A, Rose J, et al. Speciation of coagulase



- negative staphylococci, isolated from indoor air, using SDS page gel bands of expressed proteins followed by MALDI-TOF MS and MALDI TOF-TOF MS-MS analysis of tryptic peptides[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(2): 243-250.
- [41] Dobryan MT, Stuart JM, Patrick MC, et al. A simple shotgun proteomics method for rapid bacterial identification[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 94(1): 54-57.
- [42] Lange V, Picotti P, Domon B, et al. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial[J]. Molecular Systems Biology, 2008, 4: 222.
- [43] 常乘, 吴松锋, 马洁, 等. 基于质谱的选择反应监测技术相关策略和方法的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(11): 1118-1127.
- [44] Gallien S, Duriez E, Demeure K, et al. Selectivity of LC-MS/MS analysis: Implication for proteomics experiments[J]. Journal of Proteomics, 2013, 81: 148-158.
- [45] 徐长明, 张纪阳, 刘辉, 等. 蛋白质组学质谱平台肽段可检测性预测研究进展[J]. 分析化学, 2010, 38(2): 286-292.
- [46] Calvo E, Camafeita E, Fernandez-Gutierrez B, et al. Applying selected reaction monitoring to targeted proteomics[J]. Expert Review of Proteomics, 2011, 8(2): 165-173.
- [47] Webb-Robertson BJ, Cannon WR, Oehmen CS, et al. A support vector machine model for the prediction of proteotypic peptides for accurate mass and time proteomics[J]. Bioinformatics, 2008, 24(13): 1503-1509.
- [48] Fusaro VA, Mani DR, Mesirov JP, et al. Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(2): 190-198.
- [49] Kuzyk MA, Parker CE, Domanski D, et al. Development of MRM-based assays for the absolute quantitation of plasma proteins[J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 1023: 53-82.
- [50] Carr SA, Abbatiello SE, Ackermann BL, et al. Targeted peptide measurements in biology and medicine: best practices for mass spectrometry-based assay development using a fit-for-purpose approach[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2014, 13(3): 907-917.



稿件书写规范

## 论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括9以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。