

16S rRNA 基因序列分析技术在细菌分
类中应用的研究进展

杨 霞,陈 陆,王川庆

(河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002)

[摘 要] 由于 16S rRNA 基因序列的保守性和存在的普遍性,应用 16S rRNA 作为分子指标已逐渐成为微生物检测和分类鉴定的一种强有力工具。文章就该基因的特征、研究方法、检测方法及临床应用与研究的新进展等作以简要综述,同时对存在的问题进行了探讨。

[关键词] 16S rRNA;分子指标;细菌分类鉴定

[中图分类号] S852.61

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)02-0055-06

Advance in application of 16S rRNA gene in bacteriology

YANG Xia,CHEN Lu,WANG Chuan-qing

(Engineering College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: The sequence of 16S rRNA gene is highly conserved and universally distributed. Thus, as an excellent molecule Marker, 16S rRNA is becoming a good tool for detecting organisms and their classification. In this paper, the character of this gene, methods for studying and detecting and clinic application, were reviewed in details and the existing problems were inquired.

Key words: 16S rRNA; molecule marker; classification

长期以来,对病原菌的传统分类鉴定主要采用分离培养、形态特征、生化反应和免疫学等方法,但这些方法均存在耗时长、特异性差、敏感度低等问题,难以满足现代细菌学研究的发展要求^[1-5]。随着分子生物学技术的迅速发展,特别是聚合酶链式反应(PCR)技术的出现及核酸研究技术的不断完善,产生了许多新的分类方法,如质粒图谱、限制性片段长度多态性分析、PCR 指纹图、rRNA 基因(即 rDNA)指纹图、16S 核糖体核糖核酸(ribosomal RNA, rRNA)序列分析等。这些技术主要是对细菌染色体或染色体外的 DNA 片段进行分析,从遗传进化的角度和分子水平进行细菌分类鉴定,从而使细菌分类更科学、更精确。特别是 16S rRNA 基因序列

分析技术的出现,使细菌进化与否可以通过试验研究来证实,这是细菌分类史上的一次革命。目前,关于 PCR 扩增 16S rRNA 基因用于细菌分类和鉴定的研究越来越多,大多数致病菌的 16S rRNA 基因均已被测序。本文就该基因的特征、研究方法、检测方法、临床应用与研究进展等作一简要综述,以供相关研究人员参考。

1 16S rRNA 基因及其特点

16S rRNA 为原核生物的一种核糖体 RNA。目前,细菌系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟是 rRNA,其种类少,含量大(约占细菌 RNA 总量的 80%),分子大小适中,在漫长的生物进化过程

* [收稿日期] 2007-02-08
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30671555)
[作者简介] 杨 霞(1973—),女,河南扶沟人,讲师,博士,主要从事微生物学和免疫学研究。
[通讯作者] 王川庆(1953—),男,河南濮阳人,教授,博士生导师,主要从事动物传染病发病机理及免疫防制研究。

中,其基因序列的变化非常缓慢,可以用来标记生物的进化距离和亲缘关系^[6],具有良好的时钟性质;在结构与功能上具有高度的保守性,素有“细菌化石”之称^[7]。

细菌中编码 rRNA 基因按 5′. 16S. 23S. 5S. 3′方式排列的,由 2 个非编码的间隔区序列(Internal Transcribed Spacers, ITS)分开,5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA 3 部分组成一个 RNA 操纵子,作为一个单位转录,再加工成为成熟 rRNA。16S rRNA 是所有原核生物蛋白质合成必需的 1 种核糖体 RNA,其具有以下特点:(1)多拷贝。每个细菌含 5~10 个 16S rRNA 拷贝,这使得检测敏感性较高^[6,8]。(2)多信息。16S rRNA 基因内部结构由可变区和保守区组成。保守区为所有细菌所共有,可变区在不同细菌之间存在不同程度的差异,具有属或种的特异性,可变区与保守区交错排列。因此,可根据保守区设计各种细菌的通用引物,也可根据可变区设计特定细菌的特异引物或探针。16S rRNA 基因可变区所含信息的种间差异,使检测具有特异性。(3)长度适中。16S rRNA 编码基因长度约 1 500 bp,包含大约 50 个功能域^[9-10]。

2 16S rRNA 基因序列分析技术的基本原理

16S rRNA 基因序列分析技术就是从微生物样本中提取 16S rRNA 的基因片段,通过克隆、测序或酶切、探针杂交获得 16S rRNA 基因序列信息,再与 16S rRNA 数据库中的序列或其他数据进行比较,确定其在进化树中位置,从而鉴定样本中可能存在的微生物种类^[11]。

16S rRNA 基因序列既能体现不同菌属之间的差异,又能利用 PCR 技术较容易地得到其序列。所以,通过对其序列的分析及同源性比较,可以计算、了解不同菌属和菌种在遗传进化方面的距离^[12],判定不同菌属、菌种间遗传关系的远近,绘出进化树,从而达到对细菌进行分类的目的。目前,人类许多疾病的致病因子均是通过 PCR 扩增 16S rRNA 基因,然后进行序列分析而被发现的^[13-14]。所有种类细菌中至少有 1 个 16S rRNA 基因拷贝,而且不受观察者主观意识影响,因此如果不同细菌中有 2 个 16S rRNA 基因序列不同即可以认为他们属于不同菌种。可以认定,16S rRNA 基因序列分析技术在鉴别异常细菌引起的疾病上具有重要意义。

采用系统发育分析方法,如距离矩阵法(Dis-

tance Matrix Methods)、聚类分析法(Cluster Nalysis)以及一系列的简约法等,对 6S rRNA 基因测序结果进行分析,通过计算可知该样本在进化树中的位置。常用的序列比对软件有 MicroSeq、PAuP、BLAST 和 Phylip。值得注意的是,这些软件使用的计算方法不同,因此结果可能有一定的差异^[15]。

目前,研究人员可以通过互联网访问 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、RDP-II (<http://www.cme.msu.edu>)、EMBL(<http://www.ebi.ac.uk/embl>)、smart Gene IDNS(<http://www.smartgene.ch>)、RIDOM (<http://www.ridom.corn>)等数据库检索 rRNA 基因序列。截止 2004,GenBank 已经涵盖了不下 7 万种原核生物的 16S rRNA 基因序列信息^[16],这些共享资源极大地推动了细菌鉴定工作的进展^[15]。

3 16S rRNA 基因序列分析在细菌分类鉴定中的应用

与传统的以细菌形态和生理、生化特性为依据的表型特征分类方法相比,16S rRNA 基因序列测定在分析、鉴定细菌进化过程及亲缘性方面具有突出特点,其最大的优势是检测速度快,这是常规的细菌鉴定和培养方法无法比拟的。另外,一部分用表型方法鉴定有困难的细菌,用 16S rRNA 基因序列分析能进行准确地鉴定。目前,已对 2 000 种(约占真细菌总数的 50%)以上真细菌的 16S rRNA 基因进行了测序,不同菌属的 16S rRNA 基因序列同源性为 70%~95%。

3.1 鉴别常见病原菌

管宇等^[17]应用 16S rRNA 基因测序法,以强、弱毒株分别作为阳性对照,对分离鉴定的 2 株禽源多杀性巴氏杆菌进行 16SrRNA 基因测序分析,结果表明,2 株分离株与强、弱毒株对照菌之间的同源性均为 100%,从而完成了分离株的鉴定。吕志堂等^[18]和李志岗等^[19]分别从海洋环境中直接分离有害病菌的 DNA,以细菌特异的引物扩增 16S rRNA,构建质粒文库,用限制性内切酶消化获得 16S rRNA 基因型,用基因型的种类及频率成功地对细菌进行了鉴定。

3.2 鉴别难于区分的细菌

在细菌鉴定中,16S rRNA 基因序列分析技术能够精确到种的水平,可以用来鉴定用其他方法难于区分的细菌。比如,众所周知,草绿色链球菌(*Streptococcus viridaus*)能够导致心内膜炎,但该

菌包括了变异链球菌(*Streptococcus mutaus*)、血链球菌(*Streptococcus sanguis*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、轻型链球菌(*Streptococcus mitis*)和米勒链球菌(*Streptococcus milled*)，它们的致病能力差别很大，因此如果能够早期鉴定血液中分离细菌的种类，对临床诊断和预测病情均有重要的作用。然而，这5种链球菌通过表型分析难于区分，采用16S rRNA 基因序列分析，就能快速地鉴定出标本中的细菌种类。最近，Paul 等从马来半岛的一种蝙蝠尿标本中找到1种病原菌，采用16S rRNA 基因序列分析技术发现，其与2种 *Waddlia chondrophila* 具有一定的同源性(分别为94%和96%)，而16S和23S rRNA 基因图谱相似性为91%，因而认为其是一种新的病原菌，命名为 *Waddia malaysiensis*^[20]。

3.3 鉴定分枝杆菌(*Mycobacterium*)

分枝杆菌分为人类病原菌、动物寄生致病菌和腐物寄生菌3大类，形态、结构类似，种类繁多，区分起来有一定的困难；同时致病分枝杆菌大多生长缓慢、培养时间长，有的甚至不能培养。因此，16S rRNA 基因序列分析技术很快被应用于临床分枝杆菌的鉴定^[15]。Hall 等^[21]评估了一种基于16S rRNA 基因序列分析技术鉴定微生物的系统——MicoSeq500，结果显示，Micro-Seq500对59株分枝杆菌 ATCC(American Type Culture Collection)标准菌株鉴定的符合率达到98.3%。

3.4 鉴定微环境中存在的多种细菌

在实际生活中，很多条件下存在的细菌都由复杂群体组成。医学临床取样标本，比如口腔菌群或者体内插管形成的生物膜上往往有多种细菌混合生长，其中包括一些目前还无法培养的细菌，因此很难全面了解特定环境中细菌的种类和作用。近年来，人们采用不依赖细菌培养的方法，对生长在特定微环境的细菌进行研究，取得了一定突破。Wendemth 等^[22]对胆管支架上形成的生物膜进行了研究，首先提取了在胆管支架上形成生物膜所有细菌群落的全部DNA和RNA，利用16S rRNA 通用引物扩增16S rRNA 基因序列，再通过单链构象多态性(SSCP)分析获得细菌群落的指纹图谱，对指纹图谱中的主要条带进行测序分析发现，胆管支架上的生物膜主要由6种细菌形成的，其中包括2种新的、无法培养的细菌。这个结果对于研究生物膜的形成以及细菌间的相互作用具有重要意义。另外，Janus 等^[23]为了研究CO₂含量变化对土壤中微生物群落

的影响，利用16S rRNA 基因序列对土壤细菌群落组成的变化进行分析发现，大气中CO₂浓度变化对土壤中的营养和微生物群落均具有重要影响^[15]。

4 16S rRNA 基因序列分析的其他常用方法

4.1 DNA 多态性分析

目前，DNA 多态性分析方法有多种，如单链构象多态性分析(SSCP)、末端限制性片段长度多态性分析(TRFLP)等^[24]。细菌16S rRNA 基因保守区是理想的引物目标识别区，而可变区对种类鉴别有意义，其变异性导致的DNA片段构象很容易被SSCP证实^[25]。TRFLP是对标本中核酸的核糖体序列进行扩增，由于特异的限制性核酸内切酶在核糖体序列位置的不同，可以产生具有不同长度的扩增片段，这些带有各种信息的片段被经典荧光标记，因此可以在自动DNA测序仪上被检测到^[26]。

4.2 核酸(RNA)印迹杂交及基因芯片技术

RNA 印迹杂交是16S rRNA 基因序列分析最常用的技术之一。该技术可被用于测定特定微生物种群16S rRNA 在总rRNA 中的比例。RNA 印迹杂交技术的集成化产生了基因芯片技术。基因芯片又称为DNA微阵列(DNA arrays)，具有高度的并行性、多样性、微型化和自动化等特点，对于短的基因产物和阵列杂交更有效，PCR效果更好^[27]。

4.3 荧光定量技术

该技术利用 *Taq* 酶的5'-3'外切酶核酸活性，在普通引物5'端和3'端添加一条荧光双标记探针，分别标记荧光报告基团(R)和淬灭基团(Q)。当探针保持完整时，R基团的荧光信号被Q基团抑制，一旦探针被切断，Q基团的抑制作用消失，R基团的荧光信号就可以被检测到^[28]。该方法完全在密闭条件下进行，避免了PCR产物的交叉污染，结果判断由计算机完成，步骤简单且结果可靠。

4.4 通用引物PCR(UP-PCR)结合探针杂交技术

该技术的原理是先在16S rRNA 基因保守区设计一对通用引物进行PCR扩增，判断标本中是否存在病原菌，然后在变异区设计种或属的特异性探针检测阳性扩增产物。Shang 等^[29]在16S rRNA 基因保守区内设计引物，对不同菌以及临床检样进行扩增，并分别采用细菌通用探针、革兰氏阳性菌通用探针和革兰氏阴性菌通用探针进行杂交，结果显示，试验敏感度达到 1×10^{-12} g，PCR最小DNA检出量为1 pg，所检测细菌均获得371 bp的扩增产物，不与

人基因组 DNA 以及病毒交叉反应。谢辉等^[30]采用 16S rRNA 基因通用引物 PCR(UP-PCR),并结合探针杂交技术对前列腺炎组织进行了检测,为临床治疗提供了帮助。

4.5 UP-PCR 结合限制性内切酶图谱

该技术的原理是在 16S rRNA 基因保守区设计一对通用引物,然后以限制性内切酶酶切扩增产物进行鉴定。Jiang 等^[31]设计一套引物,扩增出了金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、化脓性链球菌(*Staphylococcus pyogenes*)、无乳链球菌(*Staphylococcus agalactiae*)、肺炎链球菌(*Staphylococcus pneumoniae*)、肠球菌(*Enterococcus*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、大肠埃希菌(*E. coli*)、克雷伯杆菌(*Klebsiella*)等的 16S rRNA 部分基因序列,扩增产物均为 996 bp,但大部分 PCR 产物的 *Hae* III 酶切图谱不同,金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌不能被 *Hae* III 酶切,以 *Mn* I 消化则可产生不同的模式;肺炎链球菌和肠球菌可产生相同的 *Hae* III 酶切图谱,但 *Alu* I 消化模式不同;大肠埃希菌、克雷伯杆菌、粘质沙雷菌、阴沟肠杆菌也有相同的 *Hae* III 酶切图谱,*Dde* I 或 *Bst* I 酶切产物不同,得到了 996 bp 的扩增产物,并用 *Hae* III、*Mn* II、*Alu* I、*Dde* I 等不同的限制性内切酶进行酶切,结果产生了不同的酶切图谱,应用该方法可以较好地鉴定临床标本的病原菌,其敏感度可达到检测 10 个大肠埃希菌或 250 个金黄色葡萄球菌的水平。张政等^[32]利用 16S rRNA 基因探针分析了浙江省不同时期分离的 88 株霍乱弧菌,经 *Bgl* I 消化的 16S rRNA 基因限制性酶谱,以多重 PCR 法对 140 株霍乱弧菌 6 种毒力相关基因(*ctxA*、*rtxA*、*Ace*、*TcpA*、*Cri*、*Zot*)进行了检测分析,了解浙江省霍乱弧菌毒力基因携带情况和 16S rRNA 基因型状况,为霍乱防治提供了科学依据。与培养法相比,该方法较敏感,显示 UP-PCR 结合限制性内切酶图谱可用于快速检测、鉴定临床标本中的病原菌^[6]。

5 结 语

由于 16S rRNA 基因序列的保守性和存在的普遍性,以及基因序列本身的稳定性,因而 16S rRNA 基因序列分析的重现性极高。基于当今分析技术的改进,应用 16S rRNA 作为分子指标,可以实现对微生物进行快速、微量、准确简便地分类鉴定和检测。随着分子分类理论和方法的日趋成熟,其已逐步成

为微生物检测和分类鉴定的一种强有力工具。但是,16S rRNA 基因序列分析技术还存在着一些亟待解决的问题。首先是数据库的完整性,16S rRNA 基因序列分析技术产生仅 20 年左右,尽管数据库收录的细菌种类在不断增加,但还会遇到不能确定的情况;早期所测定的结果也不尽正确;另外数据库中有些序列中还存在很多不清楚的位点,这些均给 16S rRNA 基因序列分析带来很多不便。其次,由于要准确测定 16S rRNA 基因突变的速率还存在一些困难,如不同的分类群有不同的进化速度,同一分类群的进化也不一定匀速,而且在 16S rRNA 基因序列中存在着突变速度很快的“热点”区域和高度保守的区域^[33],因此其确切的进化速度目前还不清楚。尽管如此,16S rRNA 基因序列分析技术对于物种水平的鉴定还是一项里程碑式的发现。目前常将 16S rRNA 基因序列分析技术与形态学方法相结合,对细菌进行系统分类,用于临床常规的检测鉴定^[15]。

[参考文献]

- [1] Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(2): 335-351.
- [2] Shang S, Chen Z, Yu X. Detection of bacterial DNA by PCR and reverse hybridization in the 16S rRNA gene with particular reference to neonatal septicemia [J]. Acta Paediatr, 2001, 90(2): 179-183.
- [3] 罗 雯, 万雅各. 采用 16S rRNA 基因 PCR 检测病原菌的研究进展 [J]. 南昌大学学报:理科版, 2000, 24(3): 302-306.
Luo W, Wan Y G. The progress of identification of pathogens by means of 16S rRNA gene PCR [J]. Journal of Nanchang University: Natural Science, 2000, 24(3): 302-306. (in Chinese)
- [4] Lenoard J, Lascolea J R, Dryyia D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children and its diagnostic significance [J]. Clin Microbiol, 1984, 19(2): 187.
- [5] Teng K, Li M, Yu W, et al. Comparison of PCR with culture for detection of ureaplasma urealyticum in clinical samples from patients with urogenited infections [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(9): 2232.
- [6] Harmsen D, Karch H. 16S rDNA for diagnosing pathogens: aliening tree [J]. ASM News, 2004, 70: 19-24.
- [7] 刘 毅, 韩金祥. 16S rRNA 基因在脑脊液细菌鉴定中的应用 [J]. 临床检验杂志, 2002(4): 245-246.
Liu Y, Han J X. The application of 16S rRNA gene sequencing for identification of bacterial from CSF [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2002, 20(4): 245-246. (in Chinese)
- [8] 苏维奇, 纪迎春, 姜 岩. 16S rRNA 基因检测在临床细菌学鉴定中的应用 [J]. 世界感染杂志, 2005, 5(1): 79-81.

- Su W Q, Ji Y C, Jiang Y. Application of the 16S rRNA gene assay in clinical bacterial identification [J]. World Journal of Infection, 2005, 5(1): 79-81. (in Chinese)
- [9] Teng J J, Hsueh P R, Huang Y H, et al. Identification of bacteroides thetaiotaomicron on the basis of an unexpected specific amplicon of universal 16S ribosomal DNA PCR [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(4): 1727-1730.
- [10] 张 芳, 宋 力. 16S rRNA 基因检测在新生儿败血症早期诊断中的研究进展[J]. 医学综述, 2006, 12(17): 1035-1037.
Zhang F, Song L. Progress about the detection of 16S rRNA gene in the diagnosis of neonatal Septi [J]. Medical Recapitula, 2006, 12(17): 1035-1037. (in Chinese)
- [11] 洪兴国, 孙 谧, 张云波, 等. 16S rRNA 在海洋微生物系统分子分类鉴定及分子检测中的应用[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(1): 58-63.
Hong Y G, Sun M, Zhang Y B, et al. The application of 16S rRNA in molecular classification [J]. Marine Fisheries Research, 2002, 23(1): 58-63. (in Chinese)
- [12] 焦振泉, 刘秀梅. 16S rRNA 序列同源性分析与细菌系统分类鉴定[J]. 国外医学: 卫生学分册, 1998(1): 12-16.
Jiao Z Q, Liu X M. The sequence homology analyses of 16S rRNA genes and identification and classification of bacteria [J]. Foreign Medical Sciences, Section of Hygiene, 1998(1): 12-16. (in Chinese)
- [13] Cee J E, Sacchi C T, Glass M B, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4647-4654.
- [14] Drancourt M, Berger P, Raoult D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of a typical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2197-2202.
- [15] 李 霞, 高 谦. 16S rRNA 基因序列分析在临床微生物学中的应用[J]. 微生物与感染, 2006, 1(3): 184-186.
Li X, Gao Q. The application of the 16S rRNA gene assay in clinical microbiology [J]. Journal of Microbes and Infection, 2006, 1(3): 184-186. (in Chinese)
- [16] Rappe M S, Giovannoni S J. The uncultured microbial majority [J]. Annu Rev Microbiol, 2003, 57: 369-394.
- [17] 管 宇, 沈志强, 刘吉山, 等. 应用 16S rRNA 基因测序鉴定禽多杀性巴氏杆菌的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(5): 349-352.
Guan Y, Shen Z Q, Liu J S, et al. The application of 16S rRNA gene sequence analysis in the identification of avian pasteurella multocida [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2003, 25(5): 349-352. (in Chinese)
- [18] 吕志堂, 刘志恒. 糖单胞菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析[J]. 微生物学报, 2000, 40(6): 567-572.
Lv Z T, Liu Z H. PCR-RFLP analysis of the genus Saccharomonospora [J]. Acta Microbiologica, 2000, 40(6): 567-572. (in Chinese)
- [19] 李志岗, 杨官品, 朱艳红. 水环境细菌 16S rRNA 限制性片段长度多态性及群落结构分析[J]. 水生生物学报, 2001, 25(2): 111-114.
- Li Z G, Yang G P, Zhu Y H. The relationship between polymorphism of bacterial 16S rRNA Restriction fragment length and community structure of Aquatic environment [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(2): 111-114. (in Chinese)
- [20] Chua P K, Corkill J E, Hooi P S, et al. Isolation of Waddlia malaysiensis, a novel intracellular bacterium, from fruit bat (*Eonycteris spelaea*) [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11: 271-277.
- [21] Hall L, Doerr K A, Wohlfiel L S, et al. Evaluation of the microseq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1447-1453.
- [22] Wendemth D F, Ferslev B, Macarri G, et al. Leitbacteria of microbial biofilm communitites causing occlusion of biliary stents [J]. Environ Microbiol, 2003, 5: 859-866.
- [23] Janus L R, Angel N L, McCormack J, et al. Elevated atmospheric CO₂ alters soil microbial communities associated with trembling aspen (*Populus tremuloides*) roots [J]. Microb Ecol, 2005, 50: 102-109.
- [24] 张 彤, 方汉平. 微生物分子生态技术: 16S rRNA/DNA 方法 [J]. 微生物学报, 2003, 30(2): 97-101.
Zhang T, Fang H P. Molecular eco-technique: 16S rRNA/DNA methods [J]. Microbiology, 2003, 30(2): 97-101. (in Chinese)
- [25] Turenne C Y, Wittwick E, Hoban D J, et al. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 513.
- [26] Rogets G B, Hart C A, Mason J R, et al. Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling [J]. J Clin microbiol, 2004, 42(8): 3548-3558.
- [27] Call D R, Bomcki M K, Lo F J. Detection of bacteria pathogens in environmental samples using DNA microassays [J]. J Microbiol Methods, 2003, 53(2): 235-243.
- [28] Corless C E, Guiver M, Borrow R, et al. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1747-1752.
- [29] Shang S, Chen Z, Yu X. Detection of bacterial DNA and reverse hybridization in the 16S rRNA gene with particular reference to neonatal septicemia [J]. Acta aediatr, 2001, 90(2): 179-183.
- [30] 谢 辉, 黄慧聪, 杨亦荣, 等. 成年人前列腺组织细菌 16S rRNA 基因的检测[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(14): 976-978.
Xie H, Huang H C, Yang Y R, et al. Detection of 16S ribosomal RNA gene of bacteria in prostate tissues of adults [J]. National Medical Journal of China, 2006, 86(14): 976-978. (in Chinese)

[31]

Jiang J L,Cheng L P,Shi Y L,et al. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestion and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid [J]. J Clin Microbiol,2000,38(6):2076.

[32]

张 政,朱水荣. 霍乱弧菌毒力基因检测与 16S rRNA 基因分型研究[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(5):531-533.

[33]

Zhang Z,Zhu S R. Toxigene detection and 16S rRNA gene typing of *Vibrio cholerae*[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology,2006,16(5):531-533. (in Chinese)

[33]

Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy;the new mycobacteria of the 1990s[J]. Clin Microbiol Rev.2003,16:319-354.

(上接第 54 页)

[15]

Gurol A O,Yillar G,Kursun A O,et al. A modified automated method for isolation of viable pancreatic islets in laboratory animals [J]. Transplantation Proceedings, 2004, 36: 1526-1527.

[16]

陈创奇,詹文华,汪建平,等. 多种分离纯化大鼠胰岛细胞的实验方法比较 [J]. 中山医科大学学报,2002,23(2):118-120.
Chen C Q,Zhan W H,Wang J P,et al. Experimental comparisons of several methods for isolating and purifying of rat islets of langerhans [J]. Academic Journal of Sun Yat-Sen University of Medical Science,2002,23(2):118-120. (in Chinese)

[17]

Fernandez L A,Hatch E W,Barbara A,et al. Validation of large particle flow cytometry for the analysis and sorting of intact pancreatic islets [J]. Transplantation,2006,80(6):729-737.

欢迎订阅 2008 年《中国粮油学报》

《中国粮油学报》是中国粮油学会主办的学术性刊物,已纳入全国食品工业类中文核心期刊,属全国重点期刊之一,并被美国《化学文摘》收录。《中国粮油学报》主要登载谷物、油脂化学方面的学术论文;报道优质粮油品质资源选育、贮藏、加工利用、以及品质检测方法方面的研究成果,它对指导粮油学科的发展,提高粮油资源的深度开发利用水平,具有实用价值。

《中国粮油学报》是国内外公开发行的一级刊物,国内统一刊号:CN 11-2864/ TS,国际标准连续出版物刊号:ISSN 1003-0174,邮发代号:80-720。双月刊,逢双月出版,胶版印刷,大 16 开,128 页,每期定价 10 元,全年定价 60 元(含邮费)。

通过邮局汇款:
邮汇和来函地址:北京市西城区百万庄大街 11 号粮科大厦中国粮油学会《中国粮油学报》编辑部
邮政编码:100037
通过银行汇款:
账户:中国粮油学会
开户银行:北京银行报国寺支行
账号:201050385-70
编辑部联系电话:010-68357507 68357510 传真:010-68357510
E-mail:lyxuebao@public. bta. net. cn;lyxuebao@ccoa. info