



# 微生物菌种分离和鉴定技术

# 微生物纯培养分离技术

- 获得纯培养物对微生物学研究至关重要。
- 纯培养物是指来源于同一单细胞的细胞群体。

## 液体培养基

菌悬液

连续稀释

培养容器中仅含1个菌体

单个菌体

纯培养物

方法冗长  
结果不稳定  
易污染

## 固体培养基

无菌  
土豆片  
(1881年)

很多细菌不能  
在土豆上生长

肉膏蛋白胨  
培养基  
(明胶固化)

明胶高温易溶化  
不能37° C培养

琼脂固体  
培养基  
(1882年)

一直沿用至今

# 微生物纯培养分离技术

## ■ 纯培养物分离方法

### □ 固体培养基分离

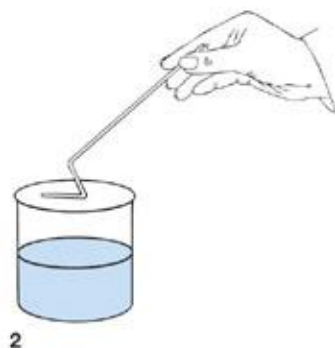
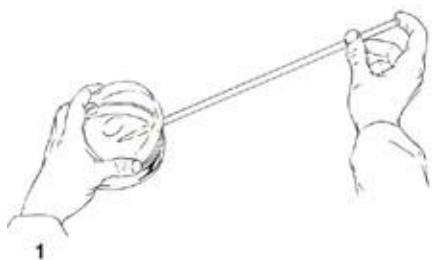
- 涂布平板法
- 平板划线法
- 平板倾注法
- 稀释摇管法

### □ 液体培养基分离

### □ 单细胞（孢子）分离

### □ 选择培养分离

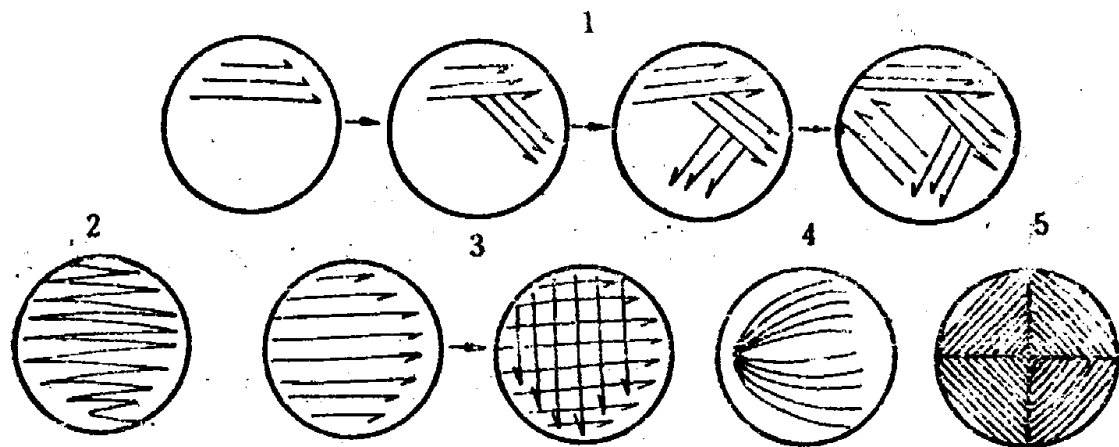
# 涂布平板法



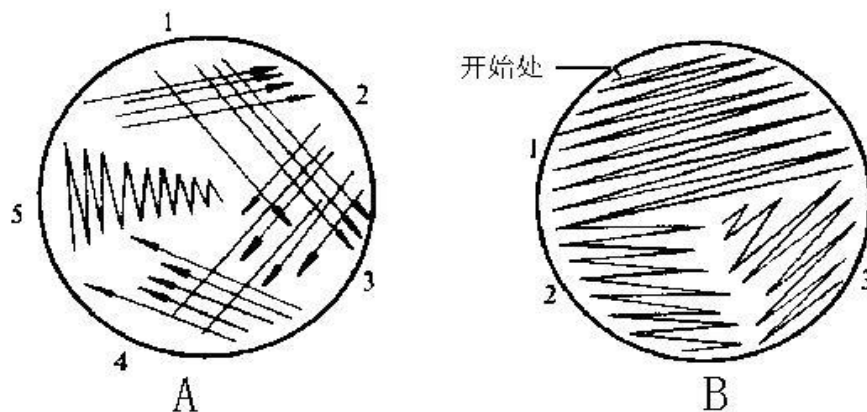
- 1、少量样品加到平板中央（1mL）
- 2、玻璃三角涂棒浸入酒精
- 3、沾有酒精的涂棒在火焰上灼烧后使其冷却
- 4、无菌涂棒将样品均匀涂布琼脂培养基表面，适当条件下培养

# 平板划线法

- ☐ 斜线法
- ☐ 曲线法
- ☐ 方格法
- ☐ 放射法
- ☐ 四格法



# 平板划线法



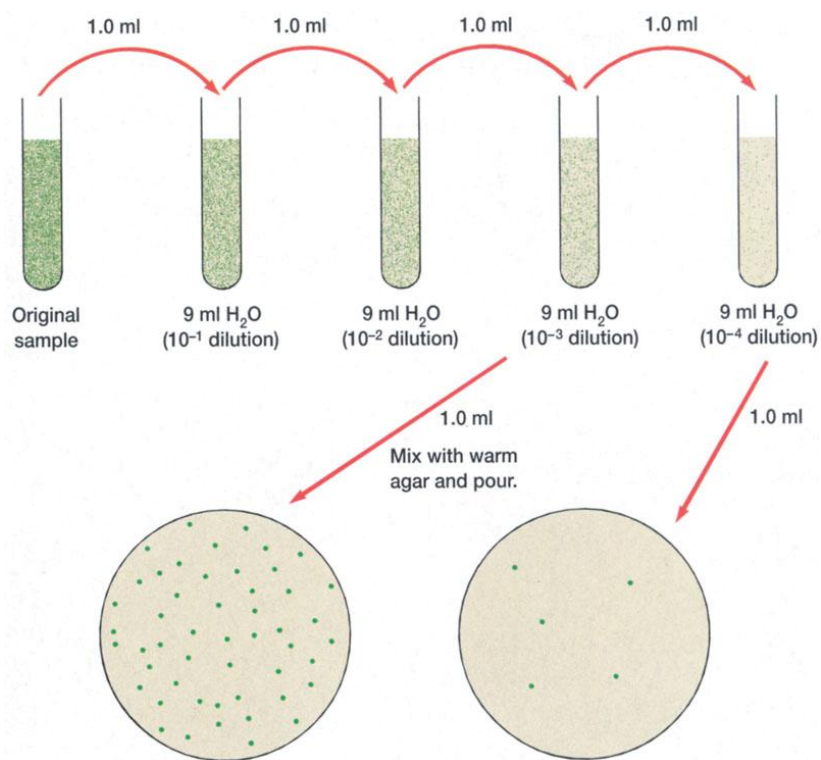
## 斜线法:

用接种环以无菌操作挑取菌悬液一环，先在平板培养基的一边作第一次平行划线3-4条，再转动培养皿70°角，并将接种环上剩余物烧掉，待冷却后通过第一次划线部分作第二次平行划线，再用同法通过第二次平行划线部分作第三次平行划线和通过第三次平行划线部分作第四次平行划线。

## 曲线法:

将挑取有样品的接种环在平板培养基上作连续划线。

# 平板倾注法

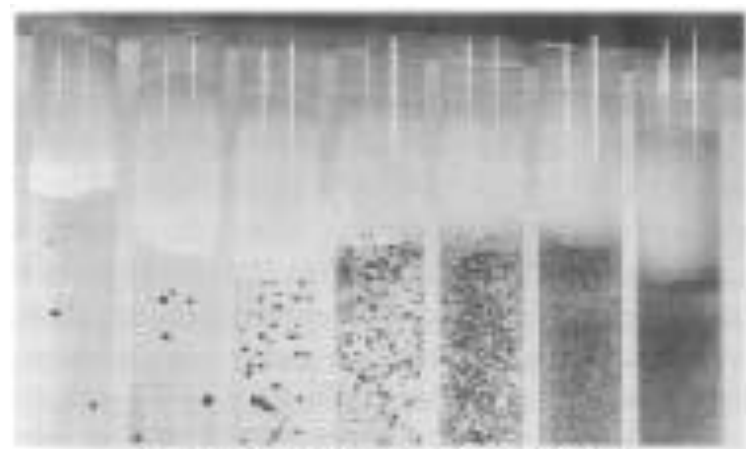
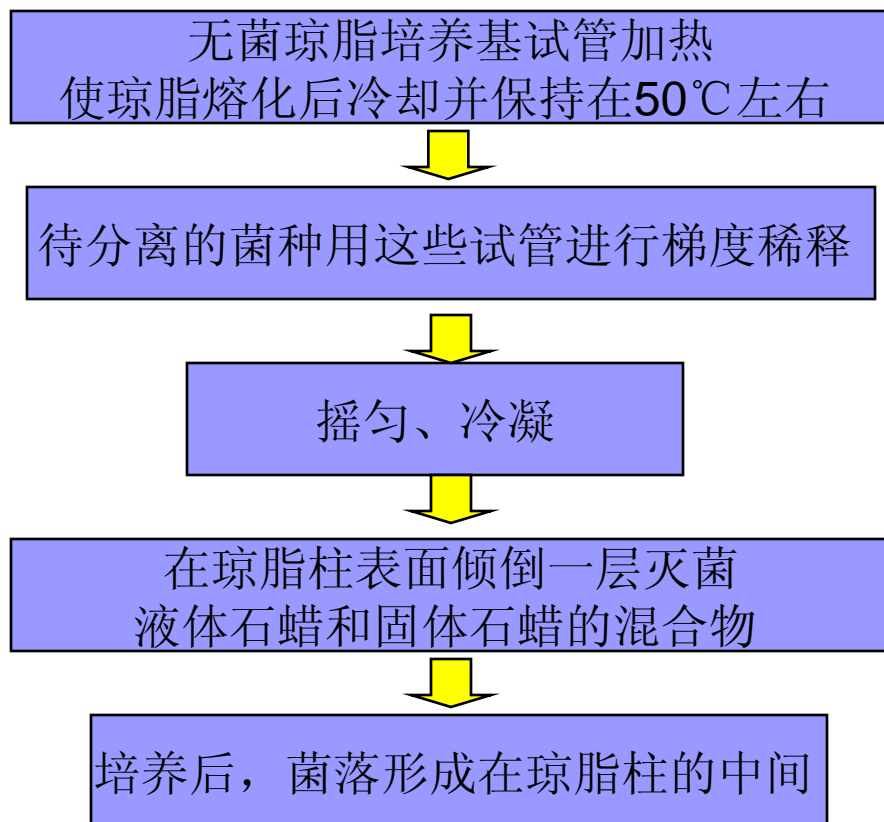


对起始样品进行连续**10**倍稀释，将高稀释倍数的样品与冷却至适当温度的溶化琼脂培养基倒入无菌平皿后混合均匀，培养后获得单菌落。

培养基表面菌落为圆形，而培养基内部菌落呈豆状或透镜状。

# 稀释摇管法

## ■ 适合厌氧菌的纯培养物分离



用稀释摇管法在琼脂柱中形成的菌落  
(从右到左稀释不断提高)

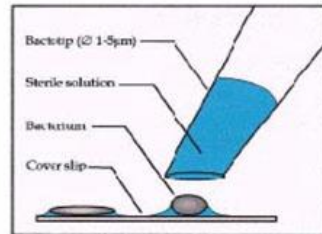
# 液体培养基分离

- 不能在固体培养基上生长的微生物仍需要用液体培养基分离来获得纯培养。
- 稀释法是液体培养基分离纯化常用的方法。
- 在同一个稀释度的许多平行试管中，大多数（一般应超过95%）表现为不生长。

# 单细胞（孢子）分离

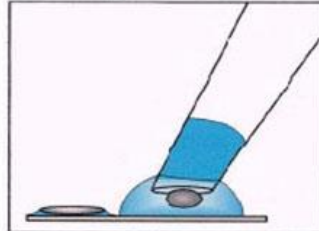
- **单细胞（或单孢子）分离法**是采取显微分离法从混杂群体中直接分离单个细胞或单个个体进行培养以获得纯培养。
- **较大的微生物**，可采用毛细管提取单个个体。
- **个体相对较小的微生物**，需采用显微操作仪，在显微镜下用毛细管或显微针、钩、环等挑取单个微生物细胞或孢子以获得纯培养。
- 单细胞分离法对**操作技术**有比较高的要求。

# 单细胞（孢子）分离

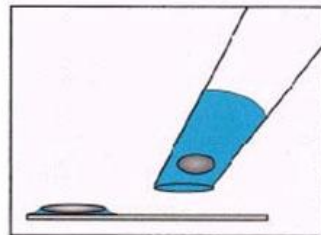


1. Spread bacterial culture on a cover slip

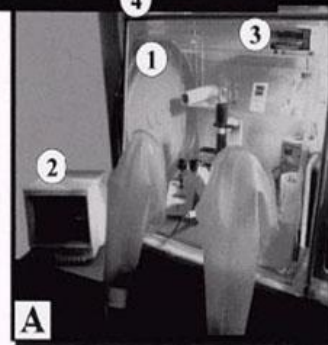
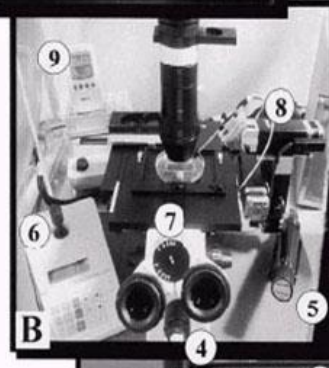
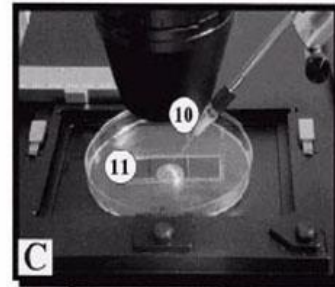
生物秀—专心做生物  
www.bbio.com



2. Resuspend bacterium using sterile solution



3. Aspirate suspended cell



# 选择培养基分离

## □ 传统**选择性培养基**

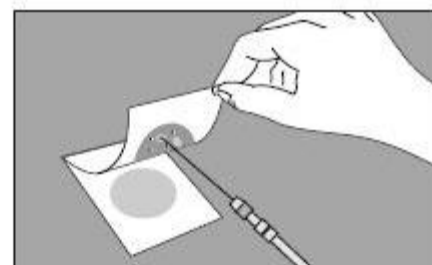
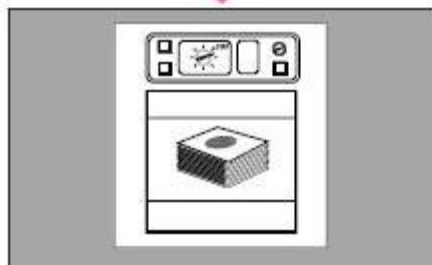
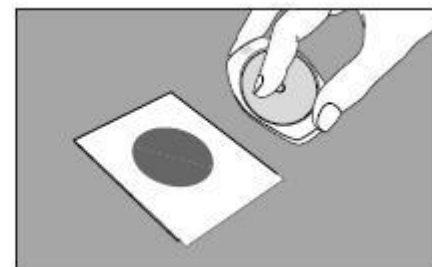
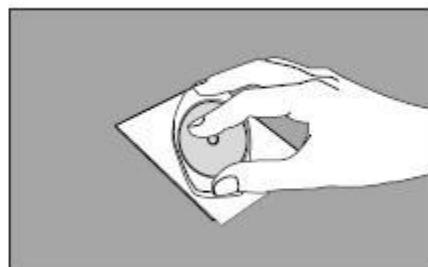
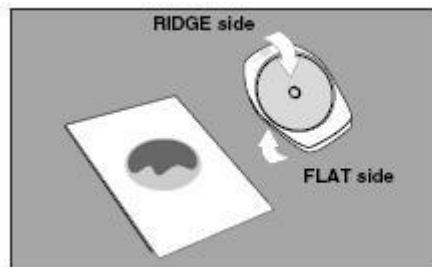
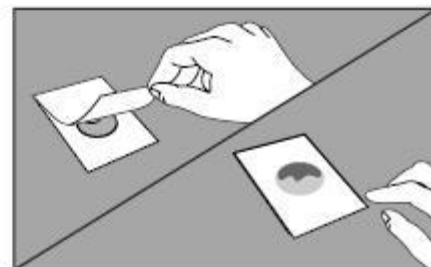
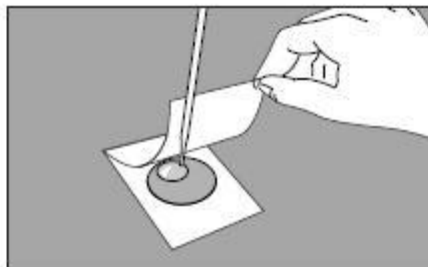
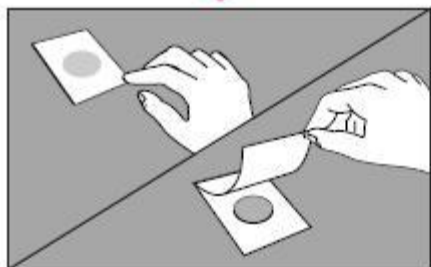
- **血平板**：适于各类细菌的生长，一般细菌检验标本的分离，都应接种此平板。
- **巧克力血平板**：其中含有V和X因子，适于接种疑有嗜血杆菌、奈瑟菌等的标本。
- **中国蓝平板或伊红美蓝平板**：可抑制革兰阳性细菌，有选择地促进G-菌生长，是较好的弱选择性培养基。
- **麦康凯平板**：具中等强度选择性，抑菌力略强，有较少革兰阴性菌不生长。
- **SS琼脂**：有较强的抑菌力，用于志贺菌和沙门菌的分离。
- **碱性琼脂**：用于从粪便中分离霍乱弧菌及其它弧菌。
- **血液增菌培养基**：用于从血液、骨髓中分离常见病原菌。
- **营养肉汤**：用于标本及各类细菌的增菌

## □ 新型**显色培养基**：

- 利用微生物自身代谢产生的酶与相应显色底物反应显色的原理来检测微生物的培养基。

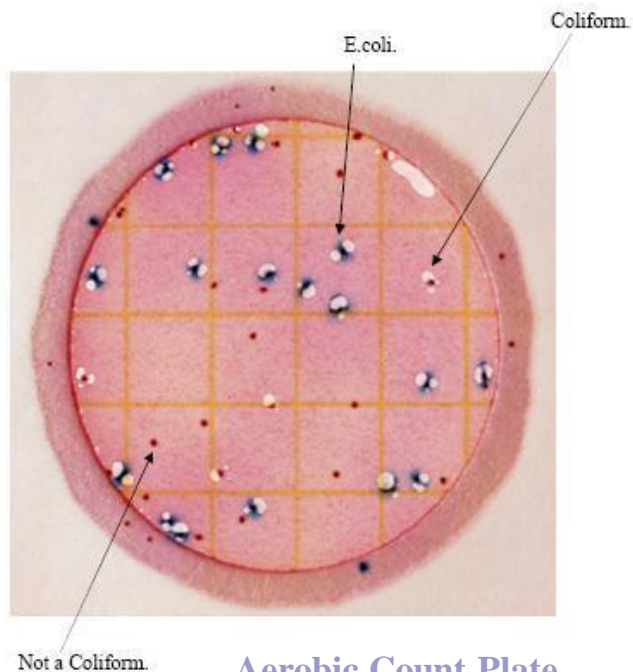
# 微生物快速分离、计数方法

## ■ Petrifilm Plate (3M)



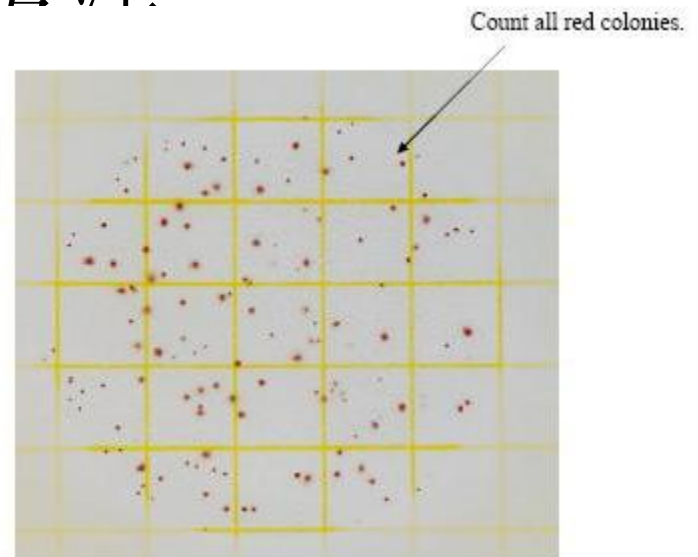
# 微生物快速分离、计数方法

## ■ 3M Petrifilm Plate

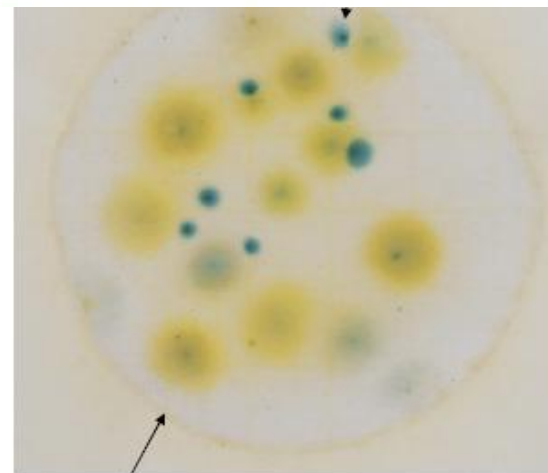


Aerobic Count Plate  
Coliform Count Plate  
Rapid Coliform Count Plate  
*E. coli* /Coliform Count Plate  
Enterbacteriaceae Count Plate  
Yeast and Mold Count Plate  
*Staph. aureus* Express Count Plate  
Environmental *Listeria* Plate

Aerobic Count Plate showing TTC reaction.

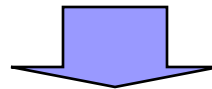
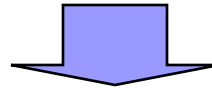


Moulds together on an YM plate.



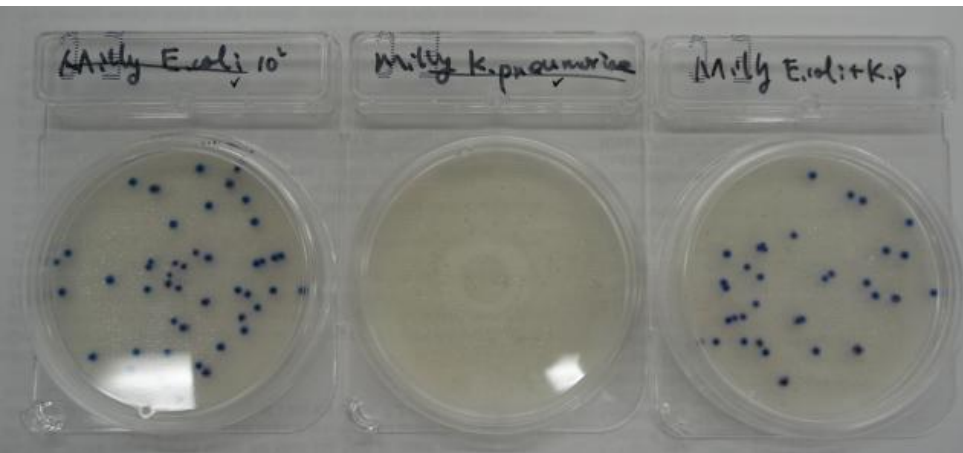
# 微生物快速分离、计数方法

## ■ Compact Dry (NISSUI)



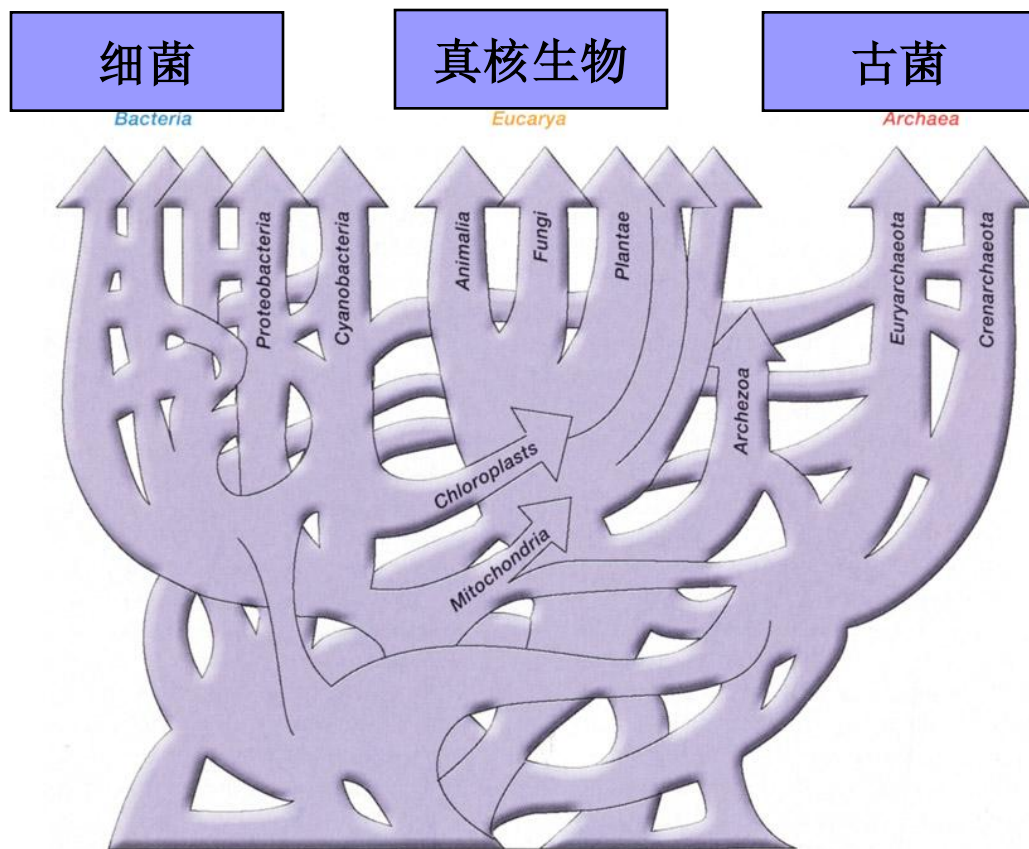
# 微生物快速分离、计数方法

## ■ Compact Dry (NISSUI)



	<b>Compact Dry "Nissui" TC</b> ◆ Count all colonies grown on the plate. ◆ Incubate 48 hours at 35±2°C.	 	
	<b>Compact Dry "Nissui" TCC</b> ◆ Count all colonies grown on the plate. ◆ Incubate 48 hours at 35±2°C.		
	<b>Compact Dry "Nissui" EOC</b> ◆ EOC is a medium for Enterobacteriaceae. Counted colonies are blue. ◆ Incubate 24 hours at 35±2°C.	 	
	<b>Compact Dry "Nissui" CF</b> ◆ Count Blue/Blue Green colored colonies as Coliform. ◆ Incubate 24 hours at 35±2°C.	 	
	<b>Compact Dry "Nissui" YM</b> ◆ Count Blue or White to Cream color for yeast. Mold forms the cottony colonies with characteristic color. ◆ Incubate 3-7 days at 20-25°C.	 	
	<b>Compact Dry "Nissui" X-SA</b> ◆ Count blue/blue green colonies for S. aureus. ◆ Incubate 24±2 hours at 35±2°C.		
	<b>Compact Dry "Nissui" SA</b> ◆ Count colonies whose peripheral media are white turbid. ◆ Incubate 48 hours at 35±2°C after dropping egg yolk suspension.		
	<b>Compact Dry "Nissui" VP</b> ◆ Count all Blue/Blue Green colored colonies as V. parahaemolyticus. ◆ Incubate 18-20 hours at 35±2°C.		
	<b>Compact Dry "Nissui" SL</b> ◆ Check black to green isolated or fused colonies are observed, and sheet around the colonies is changed to yellow. It means Salmonella Positive. ◆ Incubate 20-24 hours at 41-43°C.		

# 微生物菌种鉴定技术



三界系统发育树

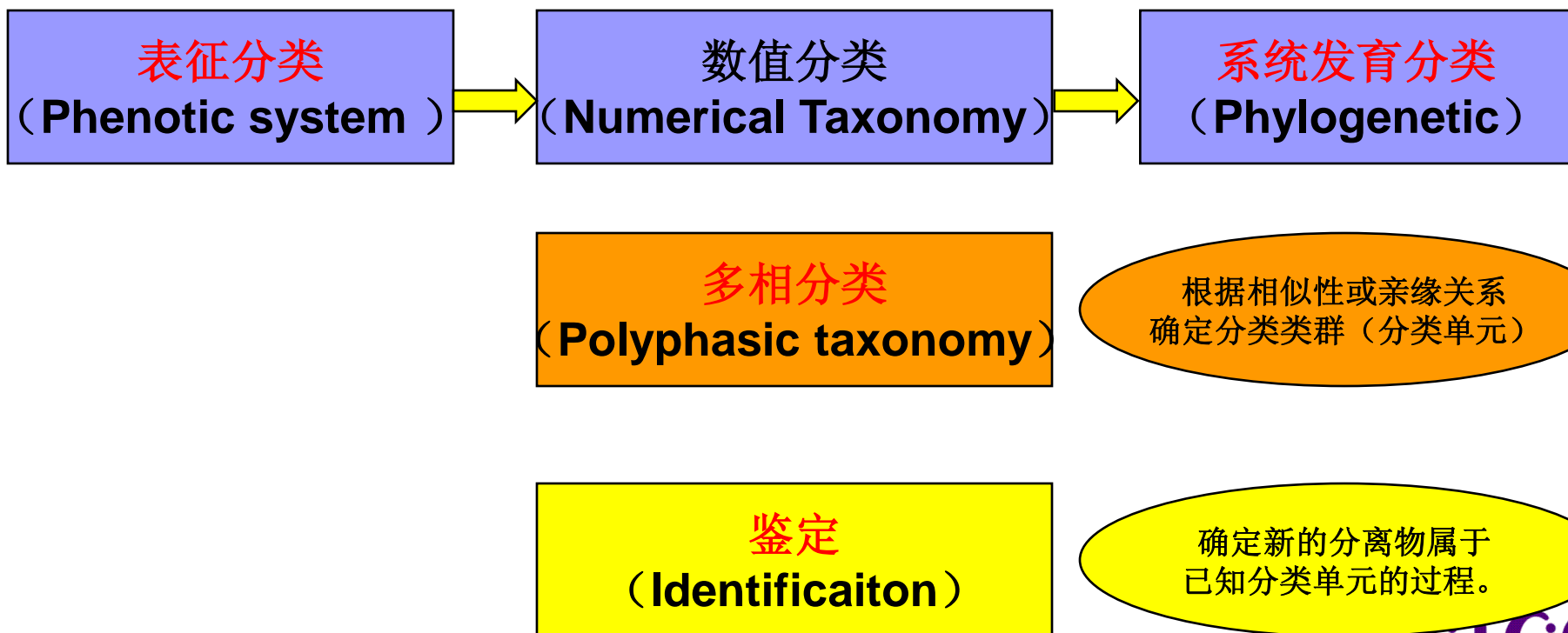
## ■ 分类等级

- ☐ 界 (Domain)
- ☐ 门 (Phylum)
- ☐ 纲 (Class)
- ☐ 科 (Family)
- ☐ 属 (Genus)
- ☐ 种 (Species)

“种” 微生物基本分类类群

# 微生物菌种鉴定技术

**“种”** 的定义：一个种（基因型种）是有相似**G+C**组成并通过**DNA**杂交试验判断有**70%**或更大相似性的菌株的集合。



# 微生物菌种鉴定技术

未知菌种鉴定:它是什么菌?

微生物菌种鉴定

常规鉴定

目标菌检验: 它是不是某一种菌?



微生物菌种检验

控制菌:

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)  
大肠菌群 (Coliform)  
沙门菌 (*Salmonella*)  
铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)  
金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)  
梭菌 (*Clostridium*)  
白假丝酵母 (*Candida albicans*)

致病菌:

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)  
大肠菌群 (Coliform)  
沙门菌 (*Salmonella*)  
金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)  
单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)  
阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazaki*)  
致贺氏菌 (*Shigella*)  
副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)  
空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*)  
产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)  
蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)

规范的检测鉴定方法

GB/T 4789.3-4.5.6.7.9.10.13.14.30.40

# 常规鉴定

- 首先掌握菌株的**基本特征**，如细胞的形状、革兰氏染色及其他**形态学特征**；营养类型、需氧性等**生理生化特征**。
- 在此基础上查阅分类（鉴定）手册，确定菌株属于哪一**大类**（群、组），进行特征测定。
- 根据测定结果逐步缩小菌株的归属范围，初步确定**科、属**。
- 如菌株需鉴定至**种**，则进一步测定种的鉴别特征。
- 如鉴定结果涉及**新的分类单元**，则进行包括基因型在内的全面鉴定。

# 用于鉴定的形态学特征

特征	微生物类群
细胞形状	所有主要类群
细胞大小	所有主要类群
菌落形态	所有主要类群
超微结构特征	所有主要类群
染色行为	细菌、一些真菌
纤毛和鞭毛	所有主要类群
运动机制	滑行细菌，螺旋体
内生孢子形状和位置	形成内生孢子细菌
孢子形态和位置	细菌、藻类、真菌
细胞内含物	所有主要类群
颜色	所有主要类群

# 用于鉴定的生理生化特征

碳源和氮源	运动性
细胞壁组成	渗透耐性
能源	氧关系
发酵产物	最适pH和生长范围
一般营养类型	光合作用色素
最适生长温度和范围	盐需求及耐性
发光	次级代谢产物形成
能量转换机制	对代谢抑制剂和抗生素的敏感性
贮藏内含物	

# 微生物菌种鉴定的问题

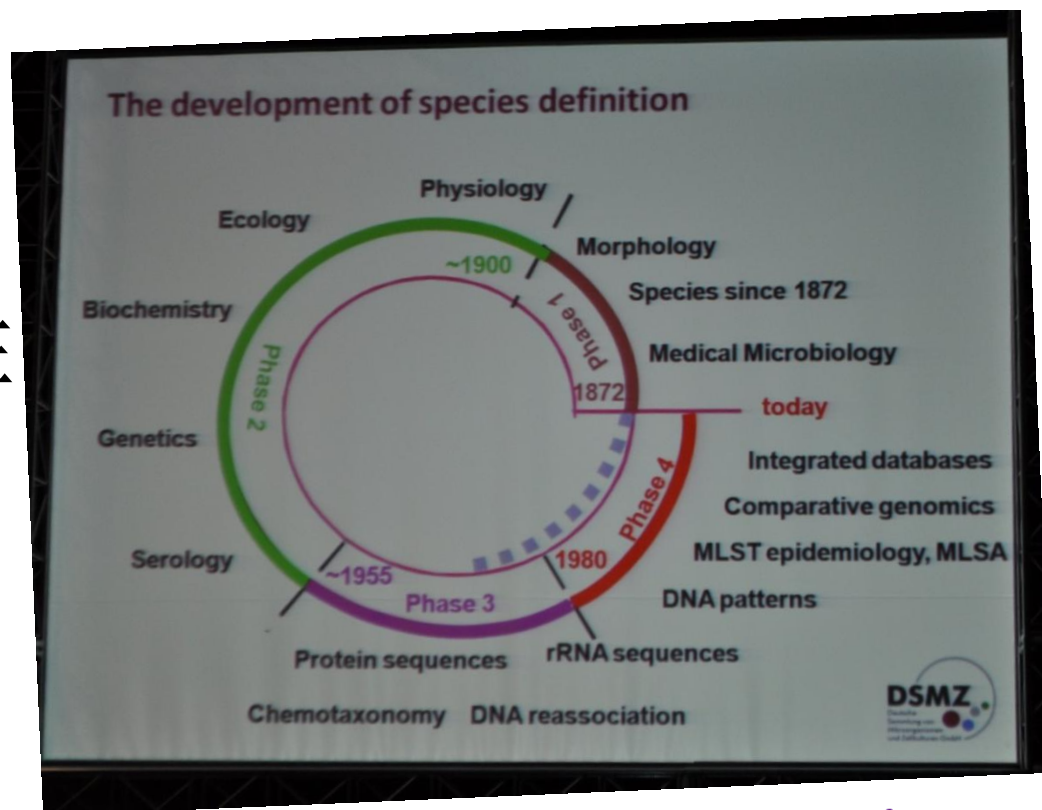
- 随着分类学的发展，微生物分类越来越多的以核酸序列系统发育分析来建立新的分类单元和对原有分类单元进行调整。
- 产生新的问题：将有越来越多的分类单元不能只以表型特征进行鉴别，必须结合基因型测定才能鉴定。

# 微生物菌种鉴定技术

## 多相鉴定技术 Polyphasic Identification Technology

- 表征（表型）特征
  - 形态特征
  - 生理和代谢特征
  - 生态特征
- 遗传（基因型）特征
  - 蛋白质比较
  - 核酸碱基组成
  - 核酸序列

分子标尺

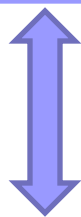


# 微生物菌种鉴定技术

1923(1)、1925(2)、1930(3)、1934(4)、1939(5)、1948(6)、1957(7)、  
1974(8)、1994(9)

伯杰氏鉴定细菌学手册

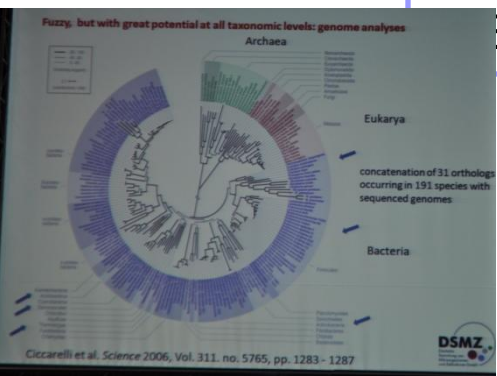
*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*



伯杰氏系统细菌学手册

*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

1984-1989(1)、2001-2010(2)



# 微生物菌种多相鉴定技术

## ■ 基因型鉴定 技术 **Genotype Identification**

- G+Cmol% , RAPD, SSCP, DGGE, LAMP, RFLP, DNA-DNA hybridization, rep PCR,
- 16S rDNA, 26S rDNA D1/D2, 5.8S rDNA ITS region,
- $\beta$ -tubulin gene, calmodulin gene, *gyrA* gene, *pheS* gene etc.
- DNA Barcoding gene sequence analysis, Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA)

# 基因型鉴定技术水平

■ 不

Family	Genus	Species	Subspecies	Strain
		DNA sequencing		
		16 S rDNA sequencing		
		ARDRA		
		DNA-DNA reassociation		
		tRNA-PCR		
		ITS-PCR		
		RFLP LERFA PFGE		
		Multilocus Isozyme		
		Whole cell protein profiling		
		AFLP		
		RAPD's APPCR		
		rep-PCR		

# 多相鉴定实例

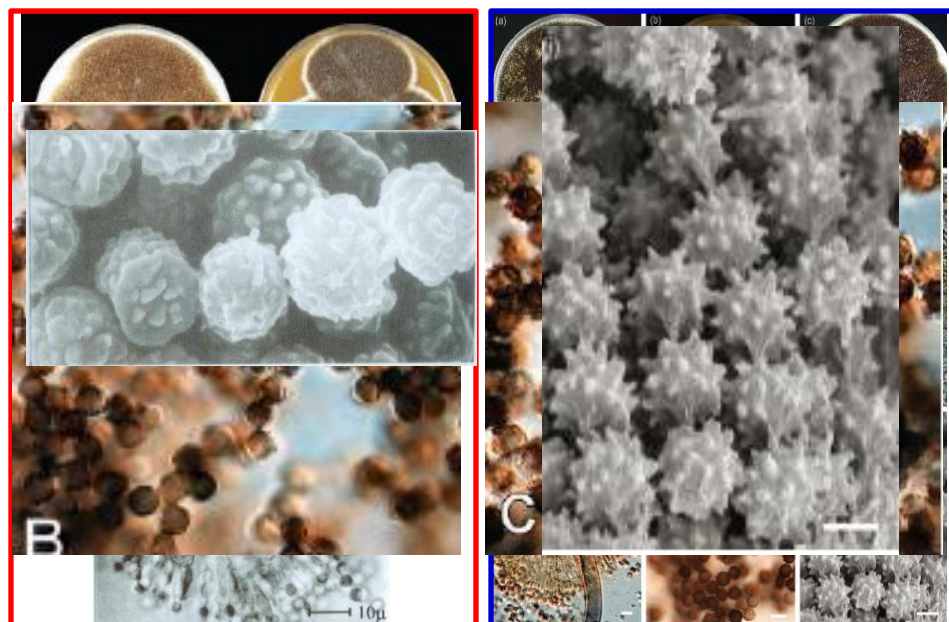
ATCC16404黑曲霉 *Aspergillus niger*

2007年 *Aspergillus brasiliensis* sp.nov.新种发表

2008年 ATCC 16404 鉴定为 *Aspergillus brasiliensis* sp.nov.

2010年 WDCM 将ATCC 16404 更名

2010年 USP 将ATCC 16404 更名



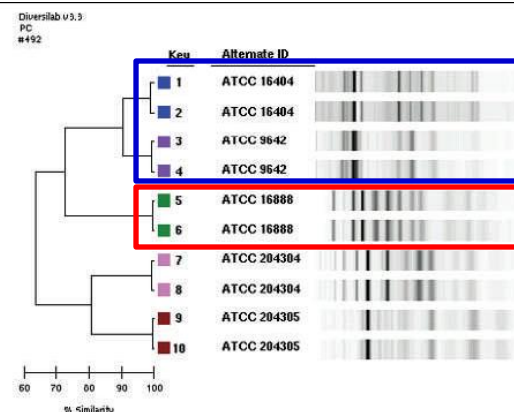
图：ATCC 16888和ATCC 16404的培养特征和显微形态  
a' nos Varga, Sa' ndor Kocsu' b' , Bea' ta To' th, et al. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 1925–1932

Position*	140	166	172	173	384
<i>Aspergillus niger</i> type strain ATCC 16888	A	T	A	A	Deleted
ATCC 16404	C	C	T	T	T
ATCC 9642	C	C	T	T	T
<i>Aspergillus brasiliensis</i> type strain IMI 381727	C	C	T	T	Deleted

Note: \* The first C in the border sequence (TTACCG) of 18S and ITS1 is here defined as position 1.

表 ITS序列特殊位点碱基差异

Table Difference of base position in ITS sequence



图：Rep-PCR条码系统发育树(DiversiLab平台)

Figure 2: Dendrogram of Rep-PCR Barcoding (DiversiLab Platform).

注：图片来源于Reclassification of ATCC® 16404TM and ATCC® 9642TM as *Aspergillus brasiliensis*.

Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter, 2008, Vol. 14 (10): 2–14

# ATCC16404 黑曲霉 *Aspergillus niger*

2007年 *Aspergillus brasiliensis* sp.nov.新种发表

2008年 ATCC 16404 鉴定为 *Aspergillus brasiliensis* sp.nov.

2010年 WDCM 将ATCC 16404 更名

2010年 USP 将ATCC 16404 更名

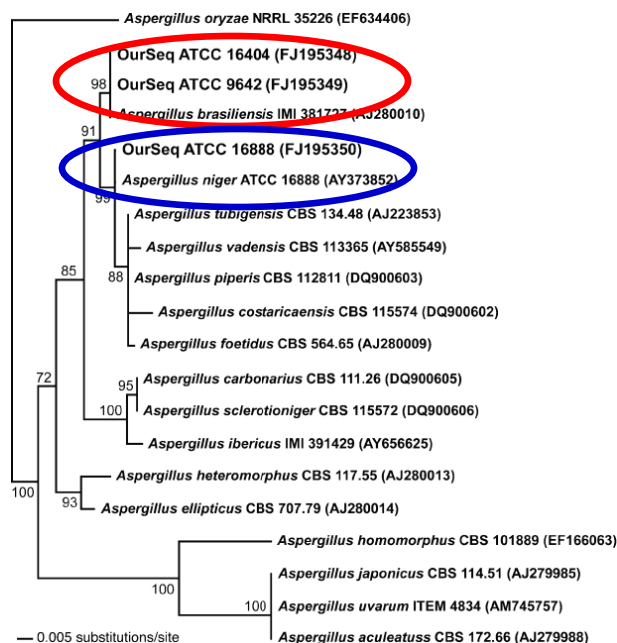


图1: 基于ITS DNA序列的黑色曲霉N-J树

Figure 1: A NeighborJoining Tree of Black *Aspergilli* based on Their ITS DNA Sequences.

注: 图片来源于Reclassification of ATCC® 16404TM and ATCC® 9642TM as *Aspergillus brasiliensis*. Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter, 2008, Vol. 14 (10): 2–14

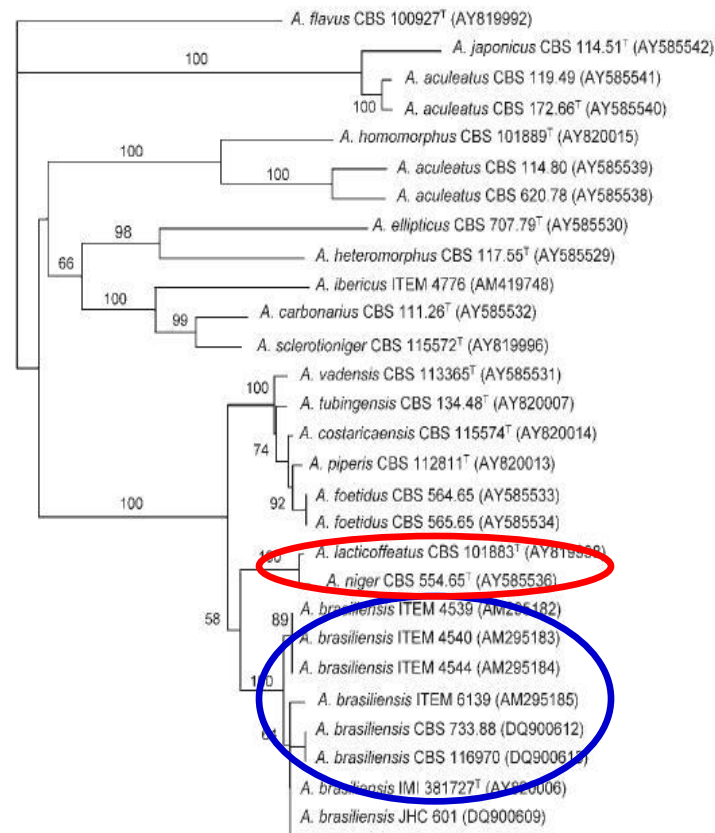
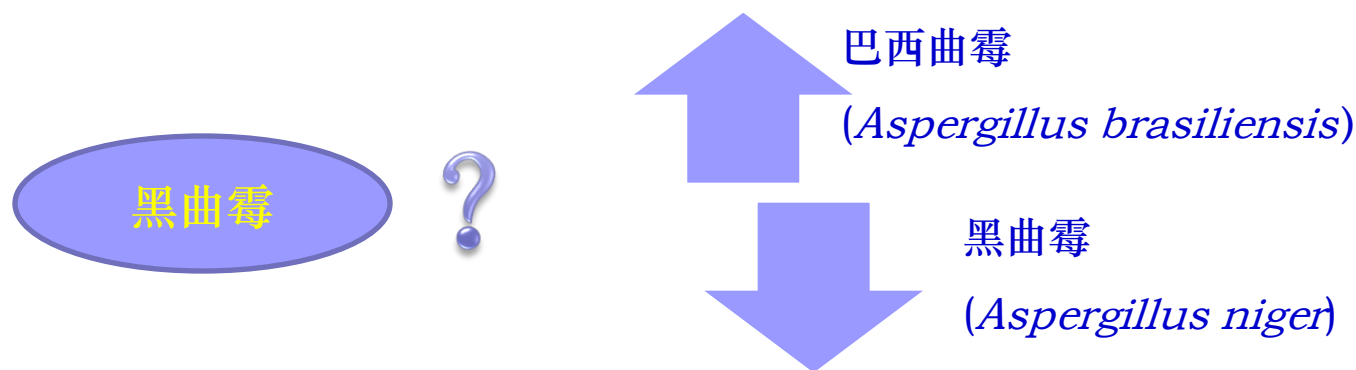


图: 基于曲霉黑色组β-微管蛋白基因序列的N-J树

Figure: Neighbour-joining tree based on β-tubulin sequence data of *Aspergillus* section *Nigri*.

注: 图片来源于*Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 1925–1932

- 各种标准中仍将继续采用ATCC 16404作为质控菌株。
- 各类标准中，其它被指定为参考菌株的黑曲霉菌株(CMCC(F) 98003),需要重新复核鉴定。



## ■ CMCC(F)98003

- 标准菌株CMCC(F)98003保藏于中国医学细菌菌种保藏管理中心。
- 2005年开始,CMCC(F)98003作为丝状真菌的代表菌株被《中国药典》(第8版)指定为标准菌株。
- 目前在公开的文献中,未能检索到该菌株的分离和鉴定研究信息。

CMCC(F) 98003  
黑曲霉 *Aspergillus niger*

# 多相鉴定

## ■ 形态学鉴定

- CYA培养基, 25° C培养7 d

## ■ Biolog鉴定

- 生长浊度试验

## ■ ITS rDNA区序列分析

- ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
- ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

## ■ $\beta$ -微管蛋白基因序列分析

- Bt2a: 5'-GGTAACCAAATCG GTGCTGCTTTC-3'
- Bt2b: 5'-ACCCTCAGTGTAGT GACCCTTGGC-3'

### 反应体系:

100  $\mu$ L, 10  $\times$  扩增缓冲液10  $\mu$ L;  
DNA模板1  $\mu$ L; dNTP (每种2.5 mmol/L) 8  $\mu$ L; 引物(10  $\mu$ L/L)各2.5  $\mu$ L;  
*Taq* DNA聚合酶(2.5 U/ $\mu$ L)1.3  $\mu$ L; 无菌超纯水补足总体积100  $\mu$ L。

### 反应程序:

94° C 5 min; 94° C 1 min, 55° C 1 min, 72° C 1 min, 30个循环; 72° C 10 min, 4° C 保存。

CMCC(F) 98003  
黑曲霉 *Aspergillus*  
*niger*

# 鉴定结论

## ■ 形态学鉴定

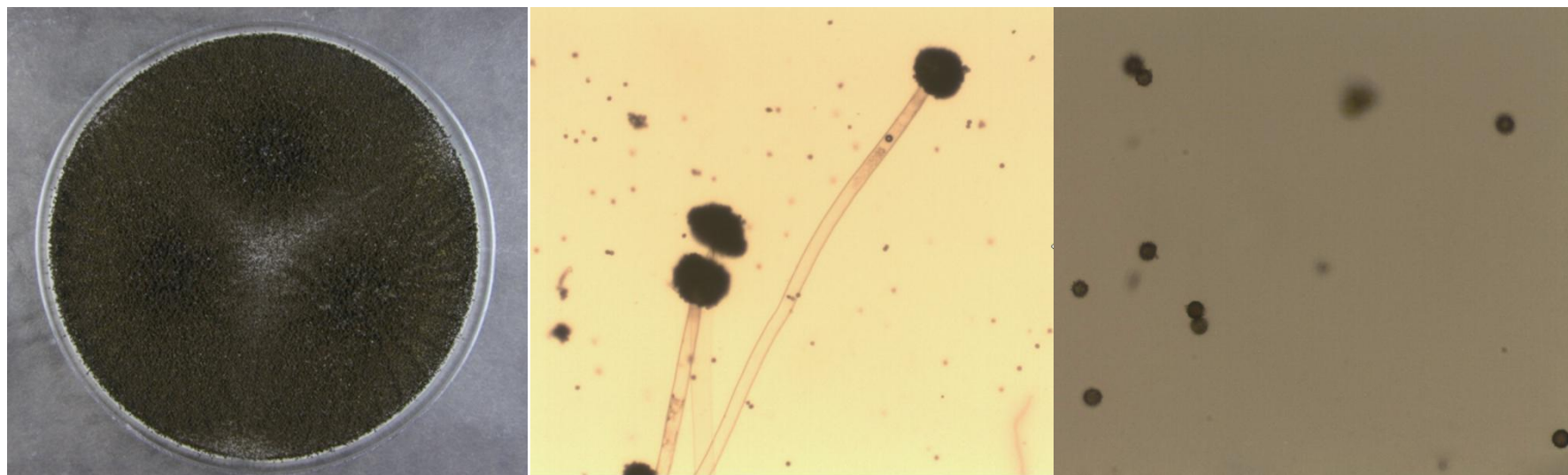


图 25° C培养7 d菌种的宏观形态和显微形态

Fig Macromorphology and micromorphology on 25° C, 7 d

注: A菌落形态; B: 分生孢子梗形态(× 100); C: 分生孢子形态(× 400).

Note: A: Colony morphology, B: Conidiophore morphology (× 100); C: Conidial morphology (× 400).

该菌株的形态学特征符合黑曲霉*A. niger*的形态特征

CMCC(F) 98003  
黑曲霉 *Aspergillus*  
*niger*

# 鉴定结论

## ■ Biolog鉴定

表 碳源利用情况 Table Carbon Source Utilization			
碳源 Carbon source	ATCC16888 <i>Aspergillus niger</i>	ATCC16404 <i>Aspergillus brasiliensis</i>	CMCC(F)9800 3
麦芽糖 Maltose	+	—	+
$\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	+	—	+
D-海藻糖 D-Trehalose	+	—	+
L-苹果酸 L-Malic Acid	v	+	—
$\alpha$ -酮戊二酸 $\alpha$ -Ketoglutaric acid	—	w	—
苦杏仁苷 Amygdalin	+	—	+
D-果糖	+	v	+

CMCC(F) 98003  
黑曲霉 *Aspergillus niger*

# 鉴定结论

## ■ ITS rDNA区序列分析

表 ITS序列特殊位点碱基差异

Table Difference of base position in ITS sequence

碱基位点 Base position	140	166	172	173
<i>Aspergillus brasiliensis</i> IMI 381727	C	C	T	C
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16888	A	T	A	A
CMCC(F)98003	A	T	A	A

注: 以18S和ITS1区之间的TTACCG序列中的第一个“C”为1位点.

Note: The first C in the border sequence (TTACCG) of 18S and ITS1 is here defined as position 1.

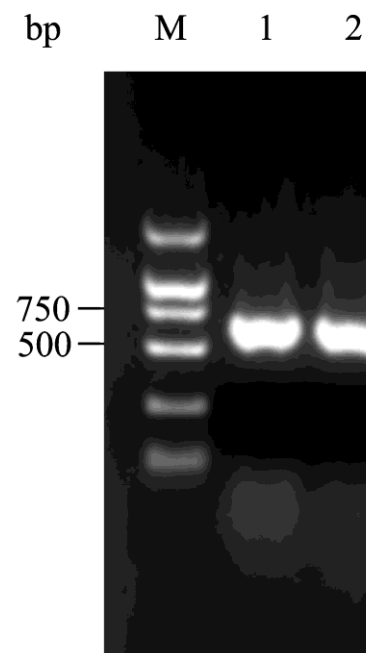


图 CMCC(F)98003的ITS rDNA区序列和 $\beta$ -微管蛋白基因序列PCR扩增结果

Fig ITS rDNA and  $\beta$ -tubulin gene PCR amplification results of CMCC(F)98003

注: M: DL2000 marker; 1: ITS rDNA区PCR扩增结果; 2: $\beta$ -微管蛋白基因PCR扩增结果.

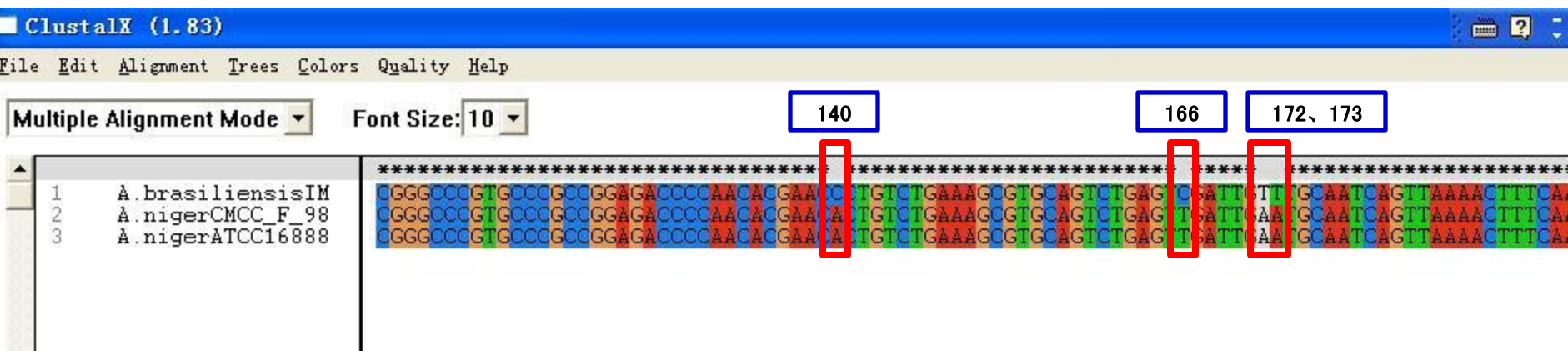
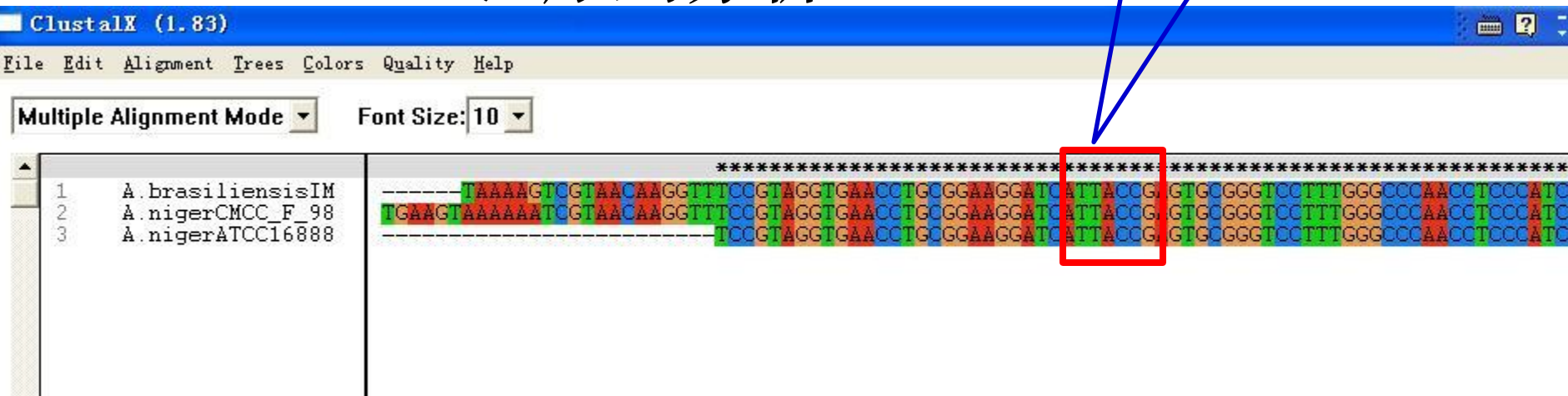
Note: M: DL2000 marker; 1: ITS rDNA PCR amplification result ; 2: $\beta$ -tubulin gene PCR amplification result.

CMCC(F) 98003  
黑曲霉 *Aspergillus niger*

# 鉴定结论

## ITS rDNA区序列分析

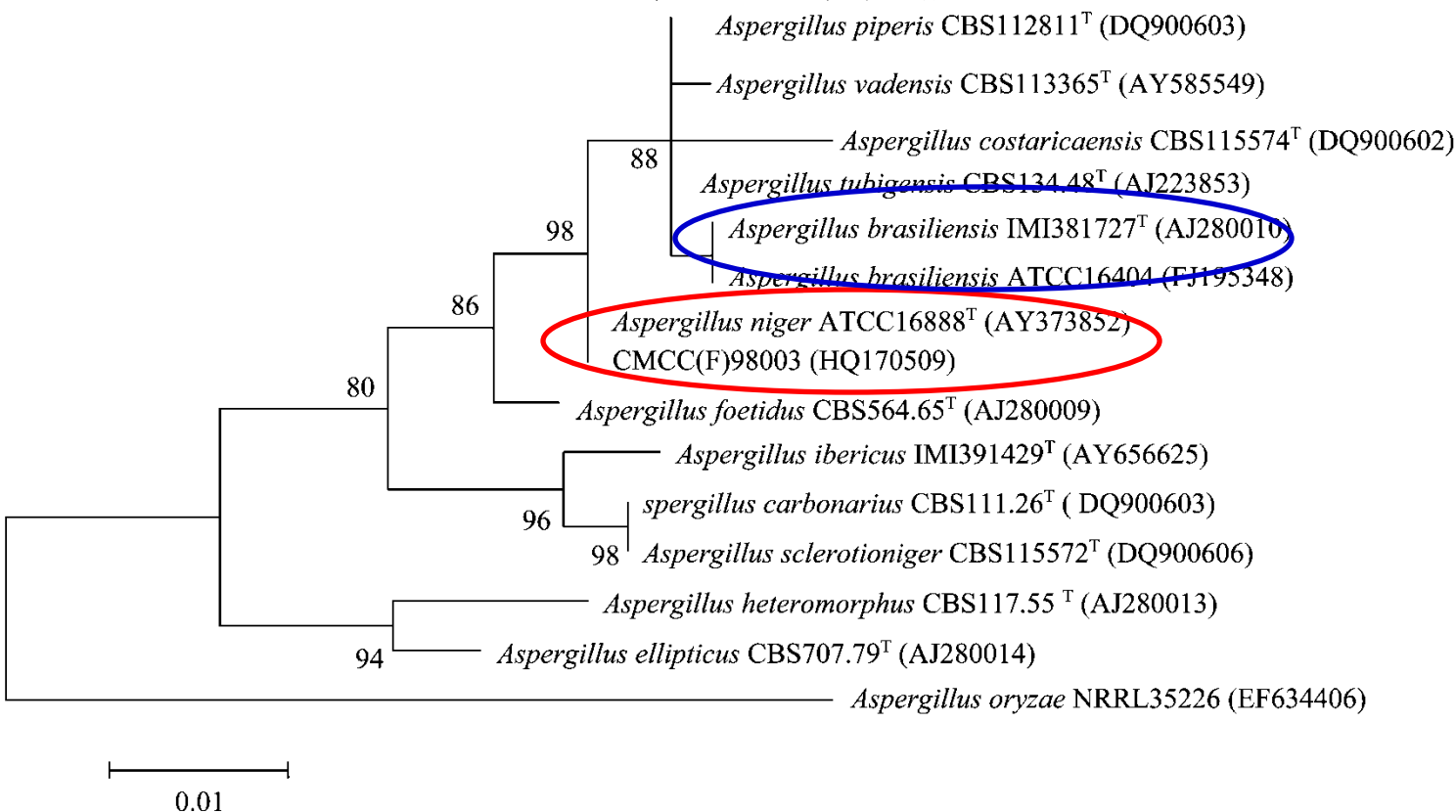
以18S和ITS1区之间的  
TTACCG序列中的第一个“C”  
为1位点。



CMCC(F) 98003  
黑曲霉 *Aspergillus niger*

# 鉴定结论

## ■ ITS rDNA区序列分析



CMCC(F)98003与与*A. niger* ATCC 16888聚类在分类距离最近的一个分支上, 序列相似性达100%。

CMCC(F)98003与黑色组的其他种序列同源性也具有很高的相似性, 序列同源性均在98.6%–100%之间。

图 基于ITS区rDNA序列的黑色组曲霉的NJ系统发育树

**Fig A Neighbor Joining Tree of *Aspergillus* section *Nigri*. based on Their ITS DNA Sequences**

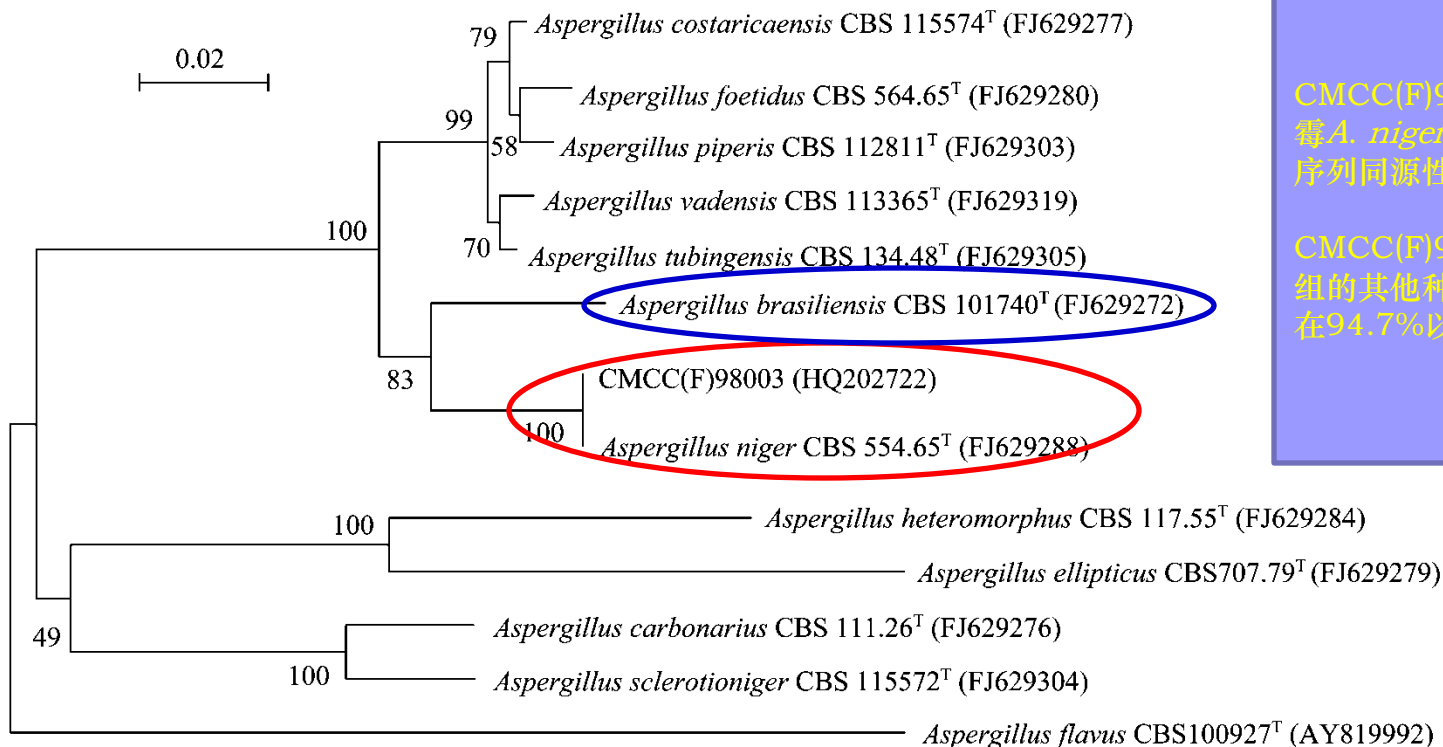
注: 图中发育树节点只显示Bootstrap值大于50%数值, 图例为遗传距离。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Only values above 50% are indicated. Bar, genetic distance.

CMCC(F) 98003  
黑曲霉 *Aspergillus niger*

# 鉴定结论

## ■ $\beta$ -微管蛋白基因序列分析



CMCC(F)98003与黑曲霉 *A. niger* CBS554.65<sup>T</sup> 序列同源性为100%。

CMCC(F)98003与黑色组的其他种序列同源性均在94.7%以下。

图 基于 $\beta$ -微管蛋白基因序列的黑色组曲霉的NJ系统发育树

Fig Neighbour-joining tree based on  $\beta$ -tubulin sequence data of *Aspergillus* section Nigri

注: 图中发育树节点只显示Bootstrap 值大于50%数值, 图例为遗传距离。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Only values above 50% are indicated. Bar, genetic distance.

CMCC(F) 98003  
黑曲霉 *Aspergillus*  
*niger*

## 鉴定结论

- 结合形态学、碳源利用情况和ITS rDNA序列系统发育分析等多相鉴定的结果, 将CMCC(F)98003鉴定为黑曲霉。

# 微生物菌种鉴定技术进展

## ■ 快速检验、鉴定技术

- ☐ PCR-SSCP
- ☐ DDGE
- ☐ REAL-TIME PCR
- ☐ LAMP
- ☐ FT-IR

## ■ 快速检验、鉴定系统

- ☐ BIOLOG Automatic Identification System
- ☐ API Identification System
- ☐ VITEK
- ☐ VIDAS

## ■ 菌株分型鉴定系统

# PCR-SSCP

- **PCR-SSCP**是聚合酶链式反应与单链DNA 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术相结合的一种用于检测基因突变的方法, 利用不同构象单链DNA 在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中泳动速率的差异, 能快速有效地检测出DNA短片段中存在的单核苷酸突变, 随凝胶的胶联度、浓度及DNA片段长度等因素的变化, 会产生不同的分辨率, 广泛应用于各种基因多态性的研究。

# PCR-SSCP

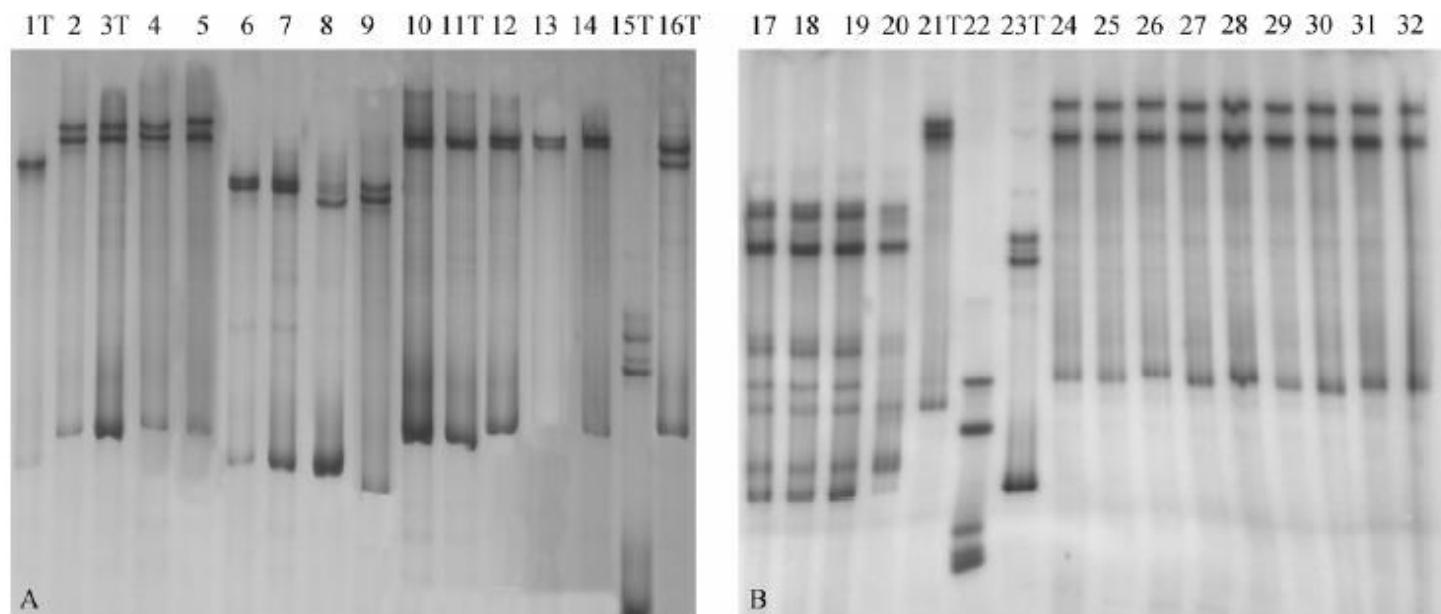
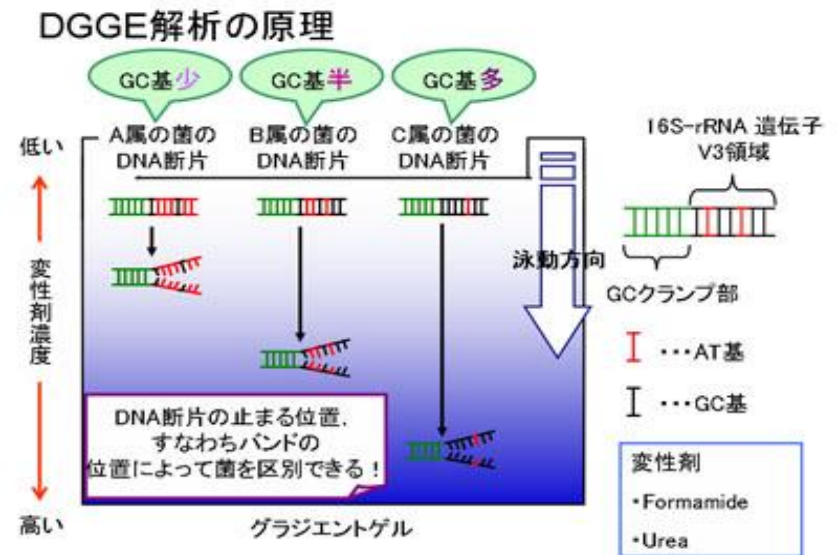
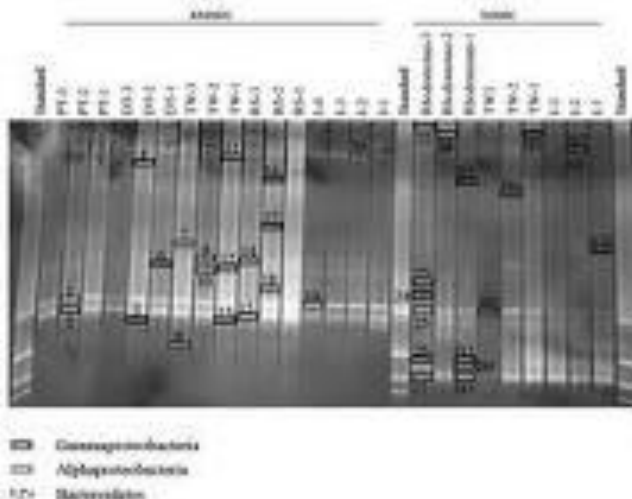


图 1 ITS1 PCR-SSCP 指纹图谱

**Fig. 1** SSCP patterns of ITS1 region from type or authentic strains of seven *Candida* species

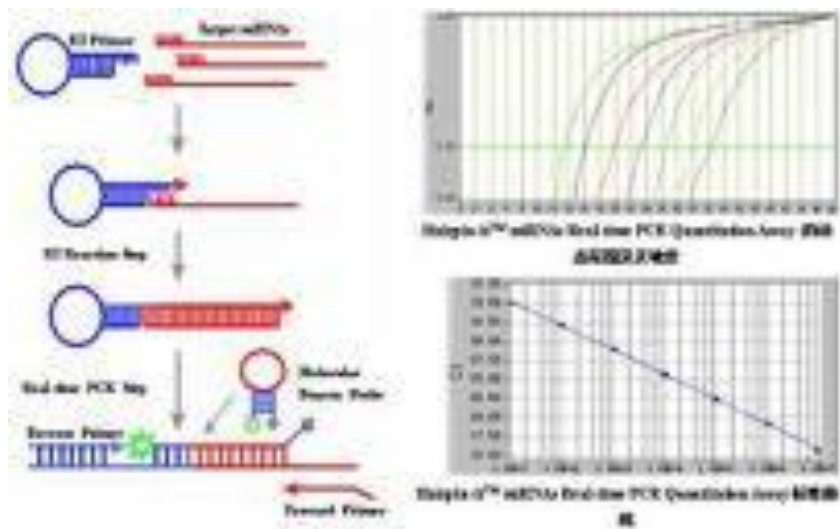
Note: A: 1: *C. maltosa* (CICC 1962); 2~5: *C. utilis* (*P. jadinii*) (CICC 1768, CICC 1767, CICC 1769 and CICC 1314, respectively); 6~9: *C. parapsilosis* (CICC 31271, CICC 31861, CICC 1627 and CICC 31253, respectively); 10~14: *C. guilliermondii* (CICC 1951, CICC 1945, CICC 1274, CICC 31552 and CICC 31346, respectively); 15: *C. tropicalis* (CICC 1956); 16: *C. shehatae* (CICC 1766); B: 17~21: *C. maltosa* (CICC 31591, CICC 31590, CICC 1659, CICC 1658 and CICC 1962, respectively); 22: *C. lipolytica* (*Y. lipolytica*) (CICC 1440); 23~32: *C. tropicalis* (CICC 1956, CICC 1729, CICC 1655, CICC 1426, CICC 1407, CICC 1403, CICC 1318, CICC 1316, CICC 1254 and CICC 1253, respectively); T was instead of type strain.

- 变形梯度凝胶电泳（DDGE）能把长度相同而核苷酸顺序不同的双链DNA片段分开。
- 这种方法利用了DNA分子从双螺旋型变成局部变性时会下降的现象，不同DNA片段发生这种变化所需梯度不同。
- 此方法可作为测序的初始步骤在杂合个体中分离等位基因。
- DDGE分离能力很强，可以把仅差1bp的DNA片段分开。



# REAL-TIME PCR

- 原理：实时荧光定量PCR技术是指在PCR反应体系中加入**荧光基团**，利用**荧光信号积累实时监测**整个**PCR**进程，最后通过标准曲线对未知模板进行**定量分析**的方法。

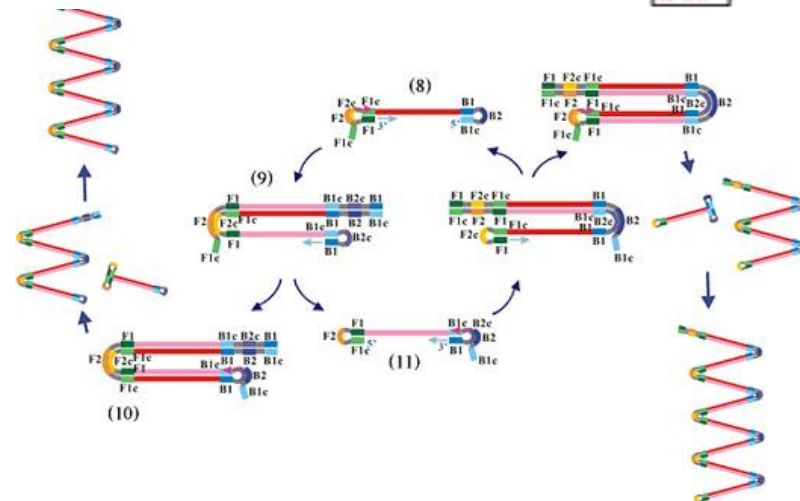
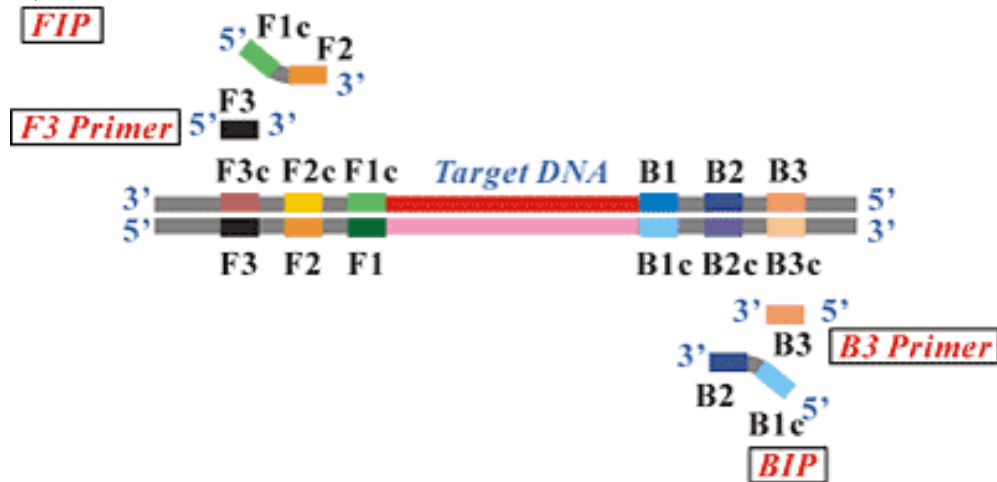


# LAMP

- 核酸环介导等温扩增技术（LAMP）主要是针对靶基因的六个不同的区域，基于靶基因3'端的F3c、F2c和F1c区以及5'端的B1、B2和B3区等6个不同的位点设计4种引物。
- 具有操作简单、快速高效、高特异性和高灵敏度的特点。

# LAMP

## ■ 引物设计



# FT-IR

- 应用傅里叶变换红外光谱方法（**FT-IRA**）结合多变量统计分析的手段，可以实现对致病菌进行分类和鉴别。
- 能在菌种(**species**)甚至菌株(**strain**)水平上提供可靠的检定结果。

# BIOLOG 鉴定系统



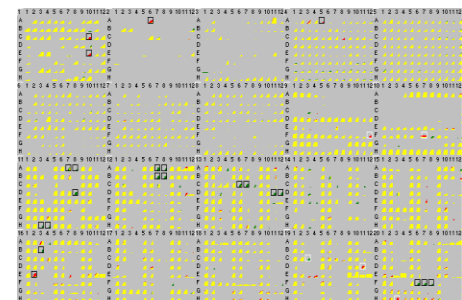
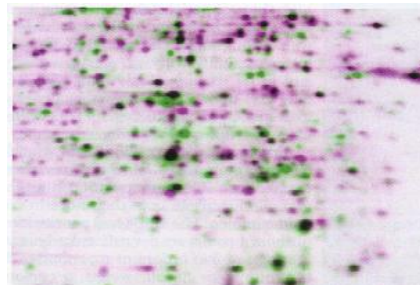
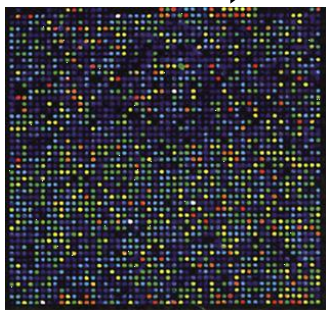
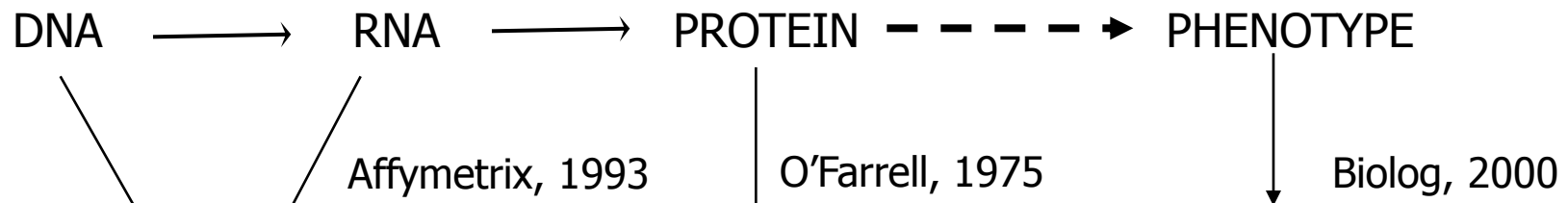
# Microstation



# Omnilog

# BIOLOG 鉴定系统

**Biolog's Technology Platform:  
Phenotyping Cellular Response**



**Molecular Analyses**

**Cellular Analysis**

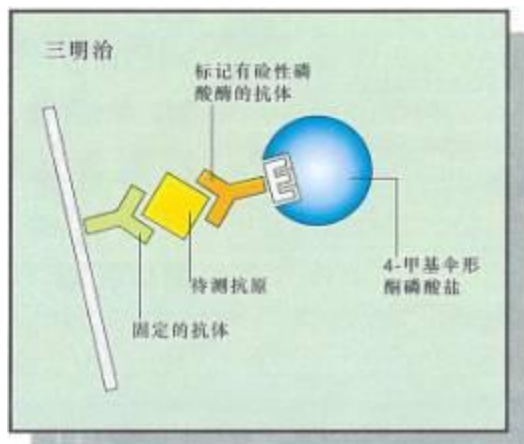
# 生化鉴定 -VITEK®

- VITEK对细菌的鉴定是以每种细菌的微量生化反应为基础，不同种类的VITEK试卡（检测卡）含有多种的生化反应孔。
- 目前VITEK系统的检测卡有14种，微生物常用的有7种，即：革兰氏阳性菌鉴定卡（GPI）、革兰氏阴性菌卡（GNI+）、非发酵菌卡（NFC）、酵母菌卡（YBC）、厌氧菌卡（ANI）、芽胞杆菌卡（BAC）、奈瑟氏菌嗜血杆菌卡（NHI），以及药敏检测卡等。
- 可鉴定405种细菌。



# 致病菌筛选 -VIDAS®

- 原理：应用酶联免疫法，检测蓝色荧光（ELFA）抗原（细菌、蛋白）的含量与标本中抗原的含量成正比。
- 测试范围：沙门氏菌、李斯特菌、单核细胞增生李斯特菌、葡萄球菌肠毒素、大肠埃希菌O157、弯曲菌、免疫浓缩沙门氏菌、免疫浓缩大肠埃希菌O157。



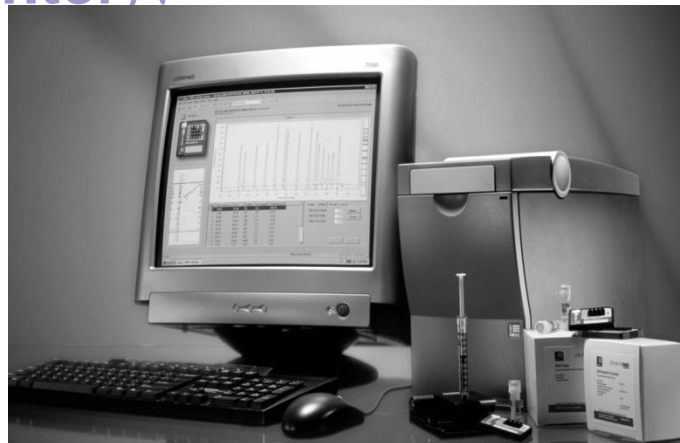
# 菌株分型鉴定系统

## ■ 菌株分型 -DiversiLab®

### □ 基因分型-分子方法进行多态性分析

- 限制性片段长度多态性(RFLP)
- 随机扩增的多态性DNA(RAPD)
- 脉冲场凝胶电泳(PFGE)
- 细菌的核糖体基因分型(Riboprinter)、
- 多位点序列分析(MLST)
- 扩增片段长度多态性(AFLP)
- 重复序列扩增(rep-PCR)

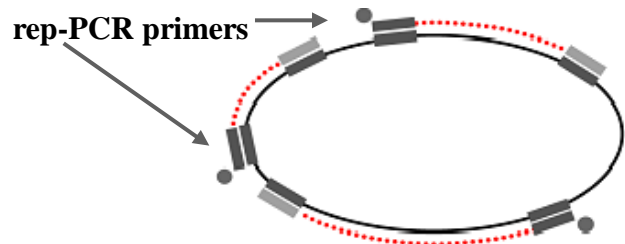
食品、制药生产过程  
质控，确定污染、溯源



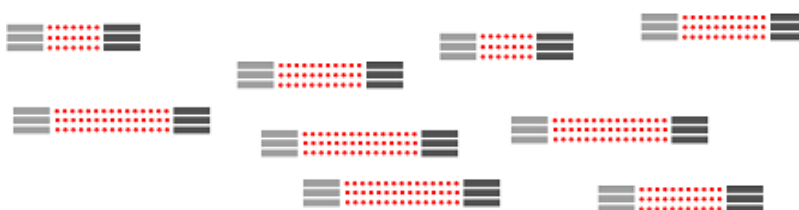
# 菌株分型鉴定系统

## DiversiLab<sup>®</sup>特定指纹图谱的形成

1. rep-PCR引物与许多分布在整个基因组上的、特异性的重复序列配对



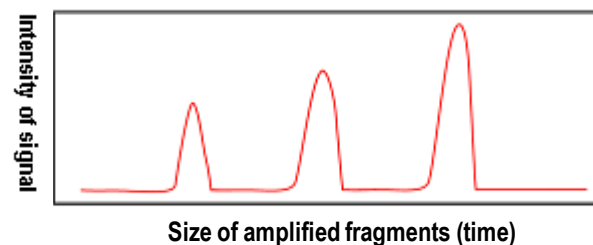
2. 经过PCR扩增形成多个不同长短的片段



3. 这些扩增的片段根据其质量差异，经电泳被分离



4. 得到由多条带组成的、强弱不一的、专一性rep-PCR DNA指纹图谱



■ DiversiLab®软件



# 菌株分型鉴定系统

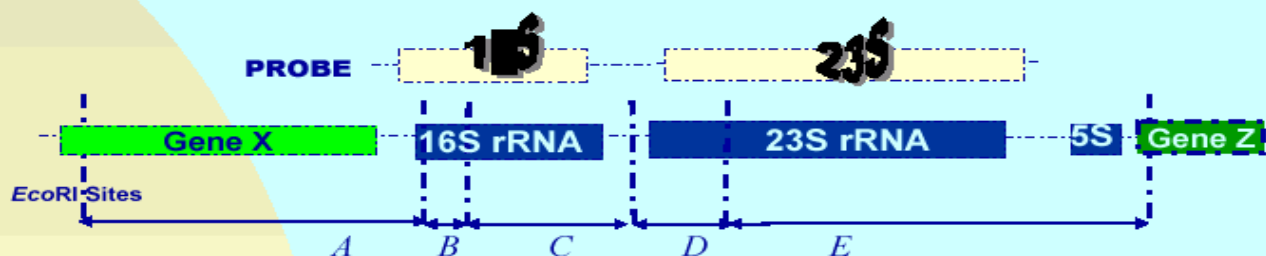
## ■ Riboprinter®全自动微生物鉴定系统



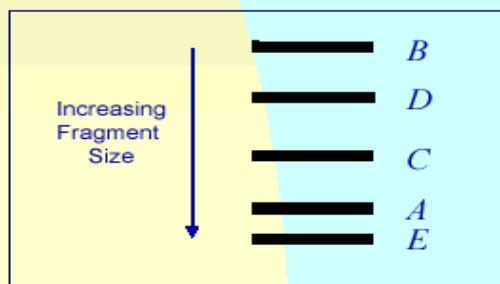
# 菌株分型鉴定系统

## ■ Riboprinter®全自动微生物鉴定系统

Ribotyping (RiboPrinter): Example Using *EcoRI*



细菌核糖体基因分型



Ribotype pattern generated by *EcoRI* restriction of one ribosomal RNA operon

使用基因检测方法提供基因“指纹”图谱  
跟内设资料库比较，得到鉴别结果

# 菌株分型鉴定系统

## ■ ABI –DNA测序方法(MicroSeq)

- 检测基因组上不同的区域16S, 18S, 23S, 28S, 5S, ITS –核糖体r-RNA 基因
- 其他特异基因组上的区域:
- 多位点序列分析(**MLST**) Multi locus sequence typing
- 扩增片段长度多态性(**AFLP**) AFLP- DNA Fingerprinting ABI



## ■ MicroSeq工作流程



# 菌株分型鉴定系统

- PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) 脉冲凝胶电泳序列分析仪



# 不同菌株分型鉴定方法比较

系统名称	Riboprinter	MicroSeq	Bio-Rad PFGE	DiversiLab
技术员手工操作时间	1 小时	2-4 小时	4-16 小时	1 小时
技术员技术要求	低	中-高	高	低
分辨级别	属/种, 偶尔到型	属/种	亚种/菌型	属/种/型
分辨力	中等	低	高	高
重复性	中-低	高	低	高
质控试剂	无	有	无	有
结果分析难度	中等	中等	难	容易
软件升级	收费	收费	不适用	免费
获得结果时间	1 天	1-2 天	3-7 天	4小时



谢谢!