

序

时光匆匆，不知不觉中，上一版《分子微生物学前沿》出版至今，已逾 10 年。在这十多年里，本书的主角——细菌、病毒、真菌等微生物从未停止活动，它们参与了许多举世瞩目的重大事件，持续更新着我们对微生物世界的认知。作为地球上最古老的生命形式，微生物始终是自然界中最具适应力与变革力的存在，它们以微小的个体承载着生命演化的深邃哲理。我们既惊叹于微生物的“个体智慧”与“群体演绎”；也从一次次传染病流行中汲取教训——当一波疫情尚未平息，另一波又来侵袭之时，基于大众智慧发展起来的“微生态调控”、“抗生素替代疗法”与“新型病毒疫苗”为我们提供了有力的武器。分类鉴定的进展如同一场微生物界的“人口普查”，不仅揭示了微生物的物种多样性与其系统发育史，也阐明了微生物群落构成与疾病健康的关系，在此基础上，对病原微生物的研究则更加深入；我们正在解析其致病的分子基础，如同翻阅一部“分子犯罪记录”，详细记录了病原体如何利用“钥匙分子”侵入宿主，又如何分泌“毒力因子”来破坏宿主的免疫防线，最终导致感染乃至肿瘤等疾病的发生。细菌的群体感应系统、分泌系统、防御系统、胞外囊泡及变异体等机制的出现，推动了微生物学研究从解析单一个体行为迈向系统性探索微生物与宿主相互作用网络。另一方面，在人类基因组中，约有 8% 的序列源于内源性逆转录病毒。这些古老的“分子化石”不仅是生命演化史的见证，更可能通过复杂的调控机制，参与人体的生理发育与疾病发生过程。正是这些日新月异的进展，促使我们重新审视并系统梳理了分子微生物学的知识框架，最终完成了第二版的修订。

本书秉持“以分子机制诠释微生物生命现象”的核心理念，在修订过程中突出了分子机制的前沿性、微生物种类的特殊性以及生命过程的复杂性。作为编者，我们试图采用更系统的框架、更前沿的视角，记录这场由微生物主导的“分子狂欢”。然而，不得不惊叹，微生物的进化是如此之神速，乃至刚刚写完一个章节，就发现它们又“更新版本”了，如 SARS-CoV-2 不同变异株的“现场直播”，而每次进化又都伴随着特定分子的有序改变。因此，本书不仅是分子微生物学知识的载体，更是一份无声的宣言：微生物堪称地球生命中的终极赢家，其个头虽小，却拥有超凡的生存智慧。

受限于编者学识与水平，书中难免存在不足之处，我们恳请聪慧的读者不吝批评指正，共同促进分子微生物学知识的传承与深化。

饶贤才

2025 年 4 月 2 日于重庆

前 言

自 19 世纪 60 年代微生物学由路易·巴斯德（Louis Pasteur）和罗伯特·科赫（Robert Koch）等先驱创立以来，这门学科历经 160 多年的发展，已成为生命科学领域中重要的组成部分。微生物，这些看不见摸不着的微小生命体，与我们的生活息息相关，不仅深刻影响着人类的健康，还在工业、农业、环境、医药等领域发挥着举足轻重的作用。在过去的几十年里，我们对微生物的认知已经从宏观转向微观，从表象深入到分子层面。在此背景下，分子微生物学作为一门充满活力和创新精神的交叉学科，犹如一颗璀璨的星辰，以其独特的视角和深邃的洞察力，为我们揭示着微生物世界的微观奇迹与宏观影响。随着生物信息学、系统生物学、合成生物学等交叉学科的蓬勃兴起，分子微生物学研究的边界正在不断拓宽，各个前沿领域的研究成果也不断涌现，及时捕捉并深入解析这些研究成果对于揭示微生物生命现象的奥秘、推动微生物学理论的创新以及开发新型生物技术产品都具有重要的科学意义。

在本书中，我们邀请了国内三十多位在分子微生物学领域具有深厚研究造诣的专家学者，共同撰写了各个章节。他们从不同的角度，深入梳理了微生物在分类鉴定、生理代谢、遗传进化、免疫调控、致病耐药等多个方面的最新研究成果，同时也对未来的研究方向进行了大胆的展望。同时，本书还特别关注了微生物与宿主之间的作用，探讨了微生物在人体健康与疾病中的角色，以及它们在环境变化和生物技术中的应用。这些研究成果不仅推动了我们对于微生物群落结构、功能和动态演变的认知，也为疾病诊断、药物研发和环境保护等领域提供了强大的科学支撑。当然，我们也必须承认，尽管分子微生物学取得了显著的进步，但在这个领域中仍然存在着许多未知和挑战。微生物的多样性和复杂性，使得我们对它们的了解还远远不够。我们希望通过《分子微生物学》这本书，能够激发更多人对分子微生物学的兴趣和热情，引导更多年轻人投身到科学研究的事业中来，共同推动这一领域的进步和发展。

我们要感谢所有为本书贡献智慧和力量的作者、编辑和审稿人。他们的辛勤付出和无私奉献，使得这本书能够以高质量的内容呈现在读者面前。同时，我们也要感谢每一位读者，是你们的支持和鼓励，让我们有动力继续探索科学的奥秘。我们相信，《分子微生物学》将成为科研人员、教育工作者和相关专业学生不可或缺的参考书。愿每位读者都能从这本书中汲取智慧和灵感，为未来的科学研究和实践贡献自己的力量。

李 明

2025 年 3 月 30 日于重庆

目 录

第一篇 总 论

第一篇 总论	1
第一章 微生物的分类与鉴定	1
第一节 细菌的分类与鉴定	1
第二节 病毒的分类与鉴定	11
第三节 真菌的分类与鉴定	19
展望	25
第二章 微生物群的构成与疾病	26
第一节 人体微生物群的构成与功能	26
第二节 微生态失衡与疾病发生	37
第三节 微生态调控与疾病治疗	48
展望	56
第三章 病原微生物致病的分子基础	57
第一节 病原体相关分子模式与识别	57
第二节 新型毒力因子的发现与鉴定	66
第三节 病原微生物感染与病理损伤	74
展望	85
第四章 病原微生物对抗宿主免疫的分子机制	87
第一节 细菌对抗宿主免疫的分子机制	87
第二节 病毒对抗宿主免疫的分子机制	90
第三节 真菌对抗宿主免疫的分子机制	96
展望	98
第五章 微生物感染与肿瘤	99
第一节 细菌感染与肿瘤	99
第二节 病毒感染与肿瘤	106
第三节 真菌毒素与肿瘤	115
展望	121

第二篇 细 菌 篇

第六章 细菌群体感应系统	122
第一节 革兰氏阴性菌的群体感应系统	122
第二节 革兰氏阳性菌的群体感应系统	125
第三节 不同细菌间及跨界群体感应系统	127
第四节 群体感应系统的进化	128
第五节 群体感应系统的功能	129
第六节 群体感应系统的应用	131
展望	133

第七章 细菌的分泌系统	134
第一节 I 型分泌系统	134
第二节 II 型分泌系统	136
第三节 III 型分泌系统	137
第四节 IV 型分泌系统	139
第五节 V 型分泌系统	141
第六节 VI 型分泌系统	142
第七节 VII 型分泌系统	144
第八节 VIII 型分泌系统	147
第九节 IX 型分泌系统	149
展望	150
第八章 细菌的防御系统	152
第一节 限制-修饰 (R-M) 系统	152
第二节 毒素-抗毒素 (T-A) 系统	155
第三节 流产感染 (Abi) 系统	156
第四节 CRISPR-Cas 系统	158
第五节 其他防御系统	160
展望	161
第九章 细菌胞外囊泡	162
第一节 细菌胞外囊泡的产生与调节	162
第二节 细菌胞外囊泡的应用	168
展望	173
第十章 细菌的变异体	174
第一节 细菌 L-型	174
第二节 细菌小菌落变异体	179
第三节 细菌生物被膜	185
展望	194
第十一章 细菌耐药性	195
第一节 金黄色葡萄球菌耐药分子机制	195
第二节 铜绿假单胞菌耐药分子机制	201
第三节 肺炎克雷伯菌耐药分子机制	207
第四节 鲍曼不动杆菌耐药分子机制	212
第五节 结核分枝杆菌耐药分子机制	217
展望	222
第十二章 抗生素替代疗法	223
第一节 噬菌体治疗	223
第二节 抗毒力因子治疗	226
第三节 等离子体治疗	229
第四节 光动力学治疗	231
展望	233

第三篇 病 毒 篇

第十三章 新型病毒	234
第一节 新型病毒的发现	234
第二节 巨型病毒	235
第三节 噬病毒体	236
展望	238
第十四章 人内源性逆转录病毒	239
第一节 人内源性逆转录病毒概述	239
第二节 人内源性逆转录病毒的生理功能	240
第三节 人内源性逆转录病毒的激活	242
第四节 人内源性逆转录病毒与疾病	243
第五节 人内源性逆转录病毒的治疗	245
展望	246
第十五章 病毒的变异与流行	247
第一节 病毒的变异类型	247
第二节 病毒变异的分子机制	247
第三节 流行性感冒病毒的变异与流行	248
第四节 SARS-CoV-2 的变异与流行	251
展望	255
第十六章 病毒的整合与清除	256
第一节 HBV 整合与清除	256
第二节 HIV 的整合与清除	261
展望	265
第十七章 抗病毒药物及病毒耐药性	266
第一节 抗病毒药物的研发过程及策略	266
第二节 抗病毒化学治疗药物及作用机制	267
第三节 病毒性疾病的免疫治疗	275
第四节 病毒性疾病的基因治疗	279
展望	280
第十八章 病毒性疾病的疫苗	281
第一节 病毒疫苗的发展概述	281
第二节 病毒性疾病免疫接种的目标	282
第三节 疫苗的种类	283
第四节 疫苗的配方和递送	287
展望	290

第四篇 真 菌 篇

第十九章 抗真菌药物与真菌耐药性	291
第一节 抗真菌药物	291
第二节 真菌耐药性和耐药机制	293
展望	297

第二十章 念珠菌感染与致病机制	299
第一节 念珠菌的生物学特征	299
第二节 念珠菌的适应性与感染	299
第三节 念珠菌的致病机制	302
第四节 念珠菌病的诊断与防控	307
第五节 耳念珠菌感染	307
展望	308
第二十一章 隐球菌感染与致病机制	309
第一节 隐球菌的生物学特征	309
第二节 隐球菌生存适应性及其策略	312
第三节 隐球菌的毒力因子及致病机制	315
第四节 隐球菌感染的诊断与防控	319
展望	320
第二十二章 曲霉菌感染与致病机制	321
第一节 曲霉菌的生物学特征	321
第二节 曲霉菌的环境适应性与感染	322
第三节 曲霉菌的致病机制	325
第四节 曲霉菌感染的诊断与防控	331
展望	332
参考文献	333

第一篇 总 论



PPT

第一章 微生物的分类与鉴定

近年来,病原微生物引起的感染性疾病的发病率不断上升,同时引起人类感染的新病原微生物的种类还在不断出现。如何对目前出现的各种微生物进行准确的分类和鉴定,并对其所致感染进行精准诊断,对于民众健康具有重要意义。分类(classification)是人类认识客观事物的一种基本方法。微生物的分类和动物、植物的分类类似,旨在认识微生物、了解不同种群间的亲缘关系,并为微生物资源的开发、利用和改造及有害微生物的控制提供理论依据。微生物分类学是微生物学中的一个传统分支学科,专注于研究微生物分类的理论和技術方法,是微生物学中实践性最强的学科之一。微生物的鉴定(identification)是指通过对具体微生物的性状进行细致观察和特征测定,并借助现有的微生物分类系统,通过比较确定其分类地位。微生物的鉴定涉及微生物感染的检测以及确认特定微生物的存在和类型,是微生物导致的感染性疾病诊断和防控的关键。微生物的分类与鉴定方法随着科学技术的进步而快速发展,可为微生物学研究和公共卫生实践提供重要的理论和技术支持。本章主要介绍细菌、病毒和真菌的分类与鉴定。

第一节 细菌的分类与鉴定

随着科学技术的发展,我们对细菌的认识已经深入了许多,但在很多方面还不够。通过分类能够系统地了解不同细菌的特征及其之间的关系,这对深入研究细菌亲缘关系、进化特征、致病性、生物学特性等都具有重要的意义。细菌的鉴定即确认特定细菌的存在和类型,是细菌感染性疾病诊断和防控的关键。因此,摆在细菌学工作者面前的一项重要任务便是如何综合应用现有细菌学各方面的研究成果,深入挖掘细菌间的亲缘关系,建立更加接近自然的细菌分类体系,从而实现了对细菌的快速、精准的鉴定。

一、细菌的分类

(一) 细菌分类的研究历史

1676年,荷兰人安东尼·范·列文虎克(Antonie van Leeuwenhoek, 1632—1723)利用自磨的镜片制造了一架能放大266倍的显微镜,首次发现肉眼看不见的、被他称为“微小动物”的微生物。瑞典人卡尔·林奈(Carl Linnaeus, 1707—1778),被誉为“分类学之父”,他将自然界的生物分为动物界和植物界,界下设纲、目、属、种四级。在林奈的分类系统中,动物界中有一个纤毛虫纲,其中包括微生物。

此后,丹麦博物学家奥托·弗里德里希·穆勒(Otto Friedrich Müller, 1730—1784)生前曾提出一种新的分类系统,包括原生动物、藻类和细菌,并建议将细菌分成单胞菌属和弧菌属。这一分类系统发表于1786年。1838年,德国生物学家埃伦贝格(Christian Gottfried Ehrenberg, 1795—1876)对微生物分类的地位进行了修改,建议将细菌归属于动物界的纤毛虫纲,分为单胞菌科和弧菌科,后者再分为5个属。1857年,德国植物学家诺塞马·耐格里(Nosema Nageli, 1817—1891)指出这些微小生物具有细胞壁,应归属于植物界,并独立设为裂殖菌纲。1872年,德国生物学家费迪南德·科恩(Ferdinand Cohn, 1828—1898)根据形态特征将细菌分成4个族,每个族由1个或多个属构成,并第一次描述了细菌芽孢,指出它们具有耐热性能。

1854年,德国著名微生物学家罗伯特·科赫(Robert Koch, 1843—1910)发明了固体培养基,建立了细菌的纯培养方法。这不仅是微生物学研究方法上的革命,同时也对微生物分类学产生了深远影响,使得细菌分类的基础已不再局限于形态学特征,细菌的培养特性和生化反应依据在分类学中开始受到重视。1909年,丹麦人西格德·奥拉詹森(Sigurd Orla-Jensen, 1870—1949)提出了一种细菌分类法,该方法在采用细菌形态和病原性特征的同时,还利用了细菌的代谢活性。奥拉詹森分类法将裂殖菌纲分为两个目:一是丛毛菌目(Cephalotrichinae),该类细菌生长所需的能量主要来自氧化作用;另一个则是周毛菌目(Peritrichinae),这类细菌的能量代谢主要依靠糖类或氨基酸的分解。这种分类方法意义在于其突破了细菌纯形态的分类局限,强调了营养要求,在细菌分类学上迈出了重要的一步。1915年,美国微生物学家罗伯特·厄尔·布坎南(Robert Earle Buchanan, 1883—1973)等对细菌的分类进行了一系列研究,综合了细菌形态、染色反应、营养要求、生理生化及病原性等多方面特征,把细菌分成科、族和属,对细菌分类产生了重要影响。

1917年,美国细菌学家协会组成了一个细菌学鉴定和分类委员会,着手撰写了当代最著名的细菌分类学巨著《伯杰氏细菌鉴定学手册》(*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*),简称《伯杰氏手册》。该手册在1923—1984年共修订了8次。1984—1989年出版了《伯杰氏系统细菌学手册》(*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*)第一版,1994年出版的第九版《伯杰氏鉴定细菌学手册》为《伯杰氏系统细菌学手册》的精简版。该工具书已成为细菌分类鉴定的指南,享有“官方”分类系统之誉,反映了细菌种系分类的研究进展,每次出版都做了重大修改,收录的菌种也日渐增多,如第一版只列5个目,到第七版已增加到7个。

1953年,詹姆斯·杜威·沃森(James Dewey Watson, 1928—2025)和弗朗西斯·克里克(Francis Crick, 1916—2004)提出了DNA双螺旋结构模型,此后遗传学和分子生物学迅速发展,细菌分类学家开始从遗传学的角度去探索细菌各类群之间的亲缘关系,研究细菌的自然发育系统。1965年土井多贺子(Takako Doi, 1928—2014)等发现在细菌中,核糖体RNA(rRNA)顺反子比其全基因组更保守,这也许与rRNA在细胞中行使的重要功能有关,相对于其他不重要的基因而言,rRNA构成核糖体参与细胞蛋白质的合成,这种功能仅允许其核苷酸序列在很长的时期内发生极小的改变。由此而产生的一个想法便是rRNA-DNA杂交实验也许在推导细菌种以上的类群关系时比DNA-DNA更有效。例如,1973年帕莱罗尼(Palleroni)等利用rRNA-DNA杂交实验证实假单胞菌属含有5个不同的rRNA群,相当于5个不同的属。1977年,美国微生物学家沃泽(Woese, 1928—2012)采用16S rRNA分析的方法发现了古菌(archaea),并结合真核生物18S rRNA基因的分析将所有生物分为古生菌、细菌(bacterium)和真核生物(eukaryote)三个域(domain)。

(二) 细菌分类的原则与层次

1. 细菌分类的原则 细菌在原则上分为传统分类(classical classification)和种系分类(phylogenetic classification)两种。19世纪以来,以细菌的形态和生理特征为依据的分类奠定了传统分类的基础,即选择一些较为稳定的生物学性状,如菌体形态与结构、染色特性、培养特性、生化反应、抗原性差异等作为分类的标记。1957年,英国细菌学家斯内斯(Sneath, 1923—2011)把电子计算机应用于细菌分类,建立了数值分类(numerical taxonomy)法,即借助计算机将拟分类的细菌按其性状的相似程度进行归类(一般种的水平相似度>80%),以此划分细菌的种和属。传统分类重在应用,不涉及微生物进化或不以反映微生物亲缘关系为目标。由于对微生物分类性状的选择和重视程度有一定的主观性,所以传统分类又称为人为分类(artificial classification)。

20世纪70年代以来,化学分析和核酸分析方法引入细菌分类,使细菌种群的划分建立在更为客观的基础上。化学分析应用电泳、色谱、质谱等方法,对菌体组分、代谢产物组成与图谱等特征进行分析,为揭示细菌表型差异提供了有利的手段。核酸分析包括DNA碱基组成(G+C mol%)、核酸分子杂交(DNA-DNA杂交、DNA-rRNA杂交)和16S rRNA同源性分析等,在比较细菌大分子结构同源程度的基础上进行分类,揭示了细菌进化的信息。这种以细菌发育关系

为基础的细菌分类称为种系分类，又称为自然分类（natural classification）。因细菌 16S rRNA 在进化过程中保守、稳定，很少发生变异，故采用细菌 16S rRNA 分析而建立的种系分类应用最为广泛。

由此可见，细菌的分类原则，仅依靠形态特征来分类是不现实，也是不合理的。近代的细菌分类，除了形态特征外，还结合了细菌的生理生化特性、血清学反应、细胞学组分分析及遗传学分析，从综合的角度来划分各级分类单元。

2. 细菌分类的层次 微生物的分类层次（等级）与高等生物大体相同，包括域、门（phylum）、纲（class）、目（order）、科（family）、属（genus）、种（species）。种是细菌分类的基本单元。所谓的细菌“种”指的是具有高度特征相似性的菌株群，这个菌株群与其他类群的菌株有很明显的区别。如从基因序列出发，在表型特征高度相似的情况下，把 DNA 杂交同源性在 60% 以上，或者 16S rRNA 序列同源性达 97% 以上的菌株定为一个种。生物性状相近，关系密切的若干菌种组成一个菌属。同一菌种内的各个细菌，虽然表型特征基本相同，但某些方面仍可存在差异，差异明显的称为亚种（subspecies），差异较小的则称为型（type）。如根据细菌特殊的生理生化性状而分生物型（biovar），按抗原结构不同而分血清型（serovar），依据对噬菌体敏感性不同而分噬菌体型（phagovar）等。对不同来源的同一种细菌称为该菌的不同菌株（strain）。菌株是微生物分类和研究工作中最基础的操作实体。从自然界中分离得到的任何一种细菌的纯培养物都可以称为一个菌株；用实验方法（如通过诱变）所获得的某一菌株的变异型，也可以称为一个新的菌株，以便与原来的菌株相区别。

（三）细菌分类的依据

细菌分类主要依据形态学特征、培养特性、生理生化特性、抗原性差异、噬菌体反应以及遗传学特征等，现分述如下。

1. 细菌的形态学特征

（1）个体形态：细菌在合适的培养基中生长，经染色后，在显微镜下测量菌体的大小，观察菌体的染色性、菌体形态、排列方式和分支情况等；观察有无荚膜及荚膜的厚薄；观察鞭毛的有无及鞭毛着生的部位和数目；观察有无芽孢，芽孢的形状、着生的位置以及形成芽孢后芽孢囊是否膨大；观察细胞内有无异染颗粒等。

（2）群体形态：细菌在一定的培养基上呈现的群体形态，即培养特征。在固体培养基上，可观察菌落的大小、形态、颜色、质地、光泽度、黏稠度、隆起特征、透明度、边缘特征、迁徙性、是否产生水溶性色素等。在液体培养基中注重观察浑浊度、沉淀及表面生长特征。在半固体培养基上观察经穿刺接种后的生长及细菌运动情况。

2. 细菌的生理生化特征

（1）碳源和氮源的利用：检测细菌对多种糖类、醇类或有机酸作为碳源被利用情况，以及对一定的有机化合物或 CO_2 的利用能力。氮源的利用可以检测细菌对蛋白胨、氨基酸、铵盐和硝酸盐的利用能力，以及对大气中氮的利用情况。

（2）代谢产物的测定：不同细菌因各自具有的生理特性和酶系不同而产生各种不同的代谢产物。因此，检测代谢产物，可以作为鉴别菌种的重要依据。在培养基中，测定细菌在代谢过程中产生的有机酸、乙醇、碳氢化合物、气体及其他化合物；测定细菌是否分解色氨酸产生吲哚；能否分解糖类生成 3-羟基-2-丁酮；能否将硝酸盐还原成亚硝酸盐或氢；是否产生色素等来鉴别细菌。

（3）牛乳鉴定：不同细菌对牛乳中的乳糖和蛋白质的分解利用情况不同。有些细菌，使牛乳中的乳糖发酵产酸，由于酸产生过多，可使牛乳中的蛋白质凝固；有些细菌具有蛋白酶，能使酪蛋白分解成较简单的蛋白胨；另一些细菌则能把牛乳中的含氮物质分解成氨，使牛乳变成碱性。因此，在利用牛乳培养基鉴定细菌时，可以观察牛乳是凝固还是胨化，是产酸还是产碱等反应。在牛乳中加入石蕊作指示剂时，能观察到石蕊的颜色变化。

3. 细菌的生态学特征

(1) 氧：氧对细菌的生长繁殖和生理反应的影响很大，根据各类细菌对氧要求的不同，分为好氧菌、厌氧菌和兼性厌氧菌三大类。例如，在芽孢杆菌科中，芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的细菌都是好氧菌或兼性厌氧菌，而芽孢梭菌属 (*Clostridium*) 则都是专性厌氧菌。

(2) 温度：不同类群细菌要求的生长温度范围并不相同，因此，鉴定细菌时必须查明对于特定细菌的最适生长温度、最低生长温度和最高生长温度。例如，嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的最低生长温度为 30~45℃，最适生长温度为 50~55℃，最高生长温度为 65~75℃。又如假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的细菌，有些能在 41℃ 生长，而个别能在 4℃ 下生长。

(3) 酸碱度：绝大多数细菌倾向生长于中性或弱碱性 (pH7.0~7.6) 的环境中，但有些细菌则不然，有的能耐酸，如乳酸杆菌能在 pH5.5 或更低的环境中生长良好，又如硫杆菌属 (*Thiobacillus*) 的细菌，能从硫氧化为硫酸中获得能量，培养过程中，培养基 pH 可降至 1~1.5。有些细菌则能在高度碱性条件下生长，如弧菌属的霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 能在 pH 为 9 的条件下生长。

(4) 寄生、共生关系：寄生和共生虽然不一定是绝对专性的，可是它们往往具有专一性，因此也常常用作细菌分类鉴定的依据。例如，根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的分类，主要以共生的对象作为鉴定依据。同时，微生物之间也存在着寄生程度和寄生范围的差异。有些寄生范围狭窄的细菌，只能侵染亲缘关系较近的植物体。例如，菜豆黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae*) 在自然条件下只能寄生在一种植物上，而根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 寄生范围有番茄、胡萝卜等 51 种高等植物。细菌的致病性在分类上也有一定的参考价值，尤其是在医学微生物的鉴定上显得更重要。

4. 血清学反应 抗原 (菌体及其成分) 和相应的抗体 (抗血清) 在体内或体外均能发生特异性结合，称为免疫反应。在体外进行体液免疫反应，一般用血清进行实验，通常称为血清学反应。血清学反应具有高度特异性，在微生物分类鉴定中，常采用血清学反应来进行未知菌的鉴定和抗原组成分析。例如，可以用已知的抗原测定抗体，也可以用已知的抗血清检测相应的抗原。随着检测技术的发展，在血清蛋白质分析、抗原或抗体的超微量测定方面有长足进步。如应用火箭电泳自显影、放射免疫测定、免疫酶测定法等技术，对检测抗原或抗体的灵敏度可达到极微量的水平，其精确性和敏感性已大大超过常规的生化分析。通过检测分析，可以获得很多有关细菌间亲缘关系的有益资料，为研究分类体系提供可靠的信息和依据。

5. 噬菌体反应 与血清学反应相似，噬菌体感染也具有高度的特异性。所以，不仅可以用噬菌体来进行细菌的鉴定，而且可以进一步把它分型。噬菌体反应时带菌平板上产生噬菌斑，噬菌斑的形状和大小可以作为鉴定的依据。在液体培养基中，噬菌体的侵染使培养液由浑浊变为澄清。噬菌体的寄生有菌株型的差别，寄生范围广的称为多价噬菌体，能侵染同一属的许多细菌。单价噬菌体只侵染同一种的细菌，极端专一化的噬菌体甚至只对同一种菌的某一菌株有侵染力。因此，可以寻找适当的噬菌体作为鉴定各种细菌的生物试剂。

6. 基于遗传学的分类依据

(1) DNA 的碱基组成 (G+C mol%)：在分类学上，用 G+C 占 DNA 全部碱基的摩尔百分数 (G+C mol%) 来表示各类生物的 DNA 碱基组成特征。细菌的 G+C mol% 范围为 25%~75%，变化范围最大，因此适合于细菌的分类鉴定。根据 DNA 双链分子在适宜温度下发生解链时具有增色反应特性 (即 OD260 的值升高)，从 DNA 解链曲线中可读出 T_m 值，再根据公式： $G+C \text{ mol}\% = (T_m - 53.9) \times 2.44$ 即可计算出 G+C mol% 值。

G+C mol% 值是在新细菌种分类时必须提供的分类学指标。在细菌鉴定中，G+C mol% 测定主要用于对表型特征难以区分的微生物做出鉴定，并可检验表型特征分类的合理性，从分子水平上判断物种的亲缘关系。亲缘关系近的细菌，它们应该具有相似的 G+C 含量，若不同细菌之间 G+C 含量差别大表明它们关系远。但具有相似 G+C 含量的细菌并不一定表明它们之间具有近的

亲缘关系。

(2) 核酸的分子杂交: 不同生物 DNA 碱基排列顺序的异同直接反映生物之间亲缘关系的远近。碱基排列顺序差异越小, 它们之间的亲缘关系就越近, 反之亦然。在分类鉴定工作中, DNA-DNA 杂交常用于亲缘关系相对近的细菌之间的比较; DNA-rRNA 杂交常用于亲缘关系相对远的微生物之间的比较; 核酸探针杂交则利用探针特异性 (图 1-1), 被用作细菌的快速鉴定。通常, 将 DNA-DNA 杂交同源性 $> 85\%$ 的细菌判为同一个菌株, 同源性为 $60\% \sim 85\%$ 的定为同一个种, 为 $20\% \sim 60\%$ 则定为同一个属, 小于 20% 者则属于不同的菌属。

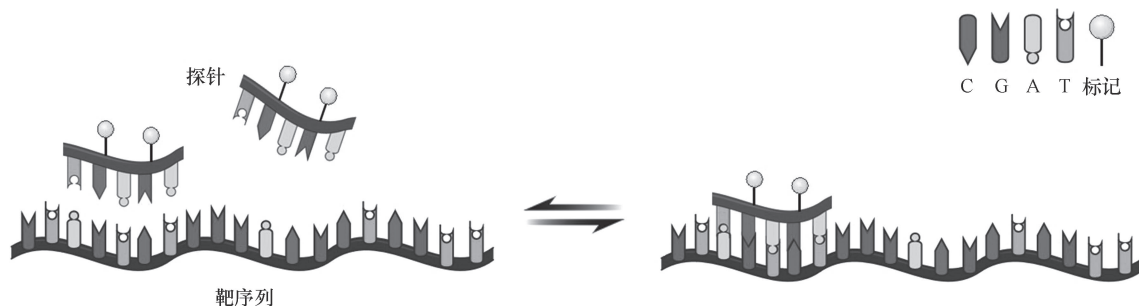


图 1-1 细菌基因组 DNA 的探针杂交

(3) rRNA 寡核苷酸序列分析: 16S rRNA 普遍存在于原核生物细胞中, 故可用以比较微生物在进化上的相互联系。rRNA 被称作细胞中的“活化石”。通过分析微生物细胞中的 rRNA 寡核苷酸序列同源程度, 以确定不同微生物间的亲缘关系和进化谱系的方法, 通常将 16S rRNA 基因序列同源性在 97% 以上的菌株定为同一个种。最新研究表明, 可以通过测定 16S rRNA 实现细菌的定量。

(4) 微生物全基因组序列的测定: 随着微生物基因信息, 特别是全基因组完全测序的不断增加, 我们可以通过各种计算机软件对不同物种的遗传信息进行直接比较, 从而分析不同微生物间的亲缘关系。

(四) 细菌的分类系统

目前使用的是 2000~2004 年编撰的《伯杰氏系统细菌学手册》第二版。该版本的主编是美国密歇根大学微生物学家乔治·M. 加里蒂 (George M. Garrity) 教授, 组织了来自美国、加拿大、英国、德国、法国、澳大利亚、中国、日本、印度等 23 个国家的 339 位微生物工作者参与编写。全书编写历时 4 年多, 第一卷于 2001 年 5 月由德国施普林格 (*Springer*) 出版社正式出版发行, 第二卷在 2004 年 2 月出版。《伯杰氏手册》第二版的编撰得益于 DNA 序列数据库的积累, 共收集了 4000 多种模式菌株 16S rRNA 序列, 进行了种系发育分析, 并结合生物学分类的模式, 将原核生物分为古生菌和细菌 2 个域, 前者再分 2 个门, 后者分为 24 个门, 再依次分为纲、目、科、属、种。

近年来, 新菌种不断被发现, 特别是在变形杆菌门中发现了许多新菌种, 新增了许多目。根据细菌古菌分类学数据库 (list of prokaryotic names with standing in nomenclature, LPSN) 的分类信息, 变形杆菌门下包含了丰富的分类学信息, 具体现有的变形杆菌门下的目见 LPSN (数字资源表 1-1~1-5)。这些新的分类补充了变形杆菌门的多样性, 展示了微生物分类学研究的进展。

(五) 细菌分类的参考菌株及其保藏

由于细菌分类单元的划分缺乏一个易于操作的统一标准, 为了减少因采用不同标准界定分类单元所造成的混乱, 细菌系统分类也像其他生物分类一样采用“模式概念”, 即在属以上至目级分类单元中指定模式属 (type genus), 在亚属和属中指定模式种 (type species), 这种水平指定模式株 (type strain), 也称标准株 (standard strain), 作为细菌分类鉴定和科学研究的参考。标准菌



数字资源表 1-1



数字资源表 1-2



数字资源表 1-3



数字资源表 1-4



数字资源表 1-5



数字资源表 1-6

株通常交由专门的机构进行保藏，以便科研工作者在需要时进行索要，部分保藏机构见数字资源表 1-6。

二、细菌的鉴定

(一) 常用的细菌鉴定原理与策略

细菌鉴定的原理是依据现有的分类系统，采用一系列方法对特定培养物的特征进行测定，确定目标细菌归属的过程。可测定的培养物特征既有 DNA 水平、RNA 水平和蛋白质水平的，也有一般的生物学特征和化学组分标志物。

在 DNA 层面，首先，获取并处理细菌样本以提取 DNA，然后从样本中提取并纯化 DNA。接下来，通过三种不同的方法进行细菌鉴定。16S rRNA 测序方法通过 PCR 扩增和测序 16S rRNA 基因，将结果与数据库比对进行鉴定与分类。多位点序列分型 (MLST) 方法则扩增和测序多个保守基因 (housekeeping genes)，进行数据分析和比对，并进一步验证结果。全基因组测序 (WGS) 方法对基因组进行测序、组装和注释，进行功能分析，也需要进一步验证结果。最终，通过脉冲电场凝胶电泳 (PFGE)、限制性片段长度多态性 (RFLP)、PCR 等方法进行进一步验证，以确认细菌鉴定结果的准确性。

基于 RNA 层面对细菌进行鉴定。首先进行样本采集与处理，提取和纯化 RNA。鉴定分为两种主要分析路径：一是通过 16S rRNA 测序，先进行 PCR 扩增和测序，再将结果与数据库进行比对，从而进行细菌的鉴定与分类；二是通过 RNA-seq 技术，进行高通量测序，随后进行数据分析和比对，以实现细菌的鉴定与功能分析。最后，通过进一步验证方法，如实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 或逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)，对鉴定结果进行确认，确保结果的准确性和可靠性。

从蛋白质层面对细菌进行鉴定。首先进行样本采集与处理，提取样品中的蛋白质。鉴定分为两种主要分析路径：一是通过双向凝胶电泳 (2D-GE)，对蛋白质进行分离和鉴定，随后通过质谱分析确认蛋白质的身份；二是通过质谱分析 (如 MALDI-TOF MS 或 LC-MS/MS)，直接获取蛋白质的指纹谱，将其与数据库进行比对，进行蛋白质的鉴定与分类。最后，使用进一步验证方法 (如 Western blot 或 ELISA) 对鉴定结果进行确认，以确保结果的准确性和可靠性。以上从 DNA、RNA 和蛋白质三个层面进行鉴定的基本流程见数字资源图 1-1、图 1-2。

1. 细菌鉴定的四个层次分析

(1) 细胞形态和习性分析：观察细胞的形态特征、运动性能、酶学反应、营养要求和生长条件等。

(2) 细胞组成成分分析：例如细胞壁成分、细胞氨基酸种类、脂类、醌类、光合色素等。

(3) 蛋白质水平分析：包括编码蛋白的氨基酸序列、凝胶电泳和各种免疫标记技术检测等。

(4) 核酸水平分析：包括核酸分子杂交、G+C mol% 值测定、遗传信息转化和转导、16S rRNA 寡核苷酸序列、重要看家基因序列和全基因组测序等。

2. 测定待鉴定细菌的指标 采用的检测方法可因细菌的不同而异，但通常为鉴定一种细菌而设计的鉴定方案应符合以下要求。

(1) 依靠一组特征：鉴定一种细菌需靠一组特征，而不是个别或者有限的几个特征。例如，虽然马尿酸盐水解是鉴别空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 的重要实验，但也有马尿酸盐水解阴性的菌株仍属于空肠弯曲杆菌。

(2) 少数分类学特征：鉴定只需测定数百个特征中的若干个关键特征。

(3) 相对廉价：鉴定方法应相对廉价。

(4) 快速结果：鉴定方法应能快速给出鉴定结果。

(5) 标准化方法：方法应标准化，以减少各实验室之间的鉴定误差。



数字资源图 1-1



数字资源图 1-2

(6) 明确阳性和阴性界定：方法产生的结果应有明确的阳性和阴性界定，并最好有阳性和阴性对照作比较。

(7) 从普通到特殊的鉴定原则：遵循从普通到特殊的鉴定原则，如先测定革兰氏染色性、形态、菌落特征、单糖利用能力等，再根据一些明显的形态特征（如形成芽孢、抗酸阳性、分枝状排列等）缩小鉴定范围，明确鉴定的方向。

通过以上层次的分析 and 严格的鉴定方案，可以有效地鉴定出目标细菌。

（二）细菌鉴定的常用方法

1. 形态学鉴定 细菌鉴定的形态学方法主要包括显微镜观察、染色技术和菌落特征分析等，现分述如下。

(1) 显微镜观察：显微镜主要观察的内容如下。①细胞形态：观察细菌的基本形态，如球形（球菌）、杆形（杆菌）、螺旋形（螺旋菌）等。②细胞排列：确定细菌的排列方式，如链状（链球菌）、簇状（葡萄球菌）、单个存在等。③结构特征：观察细胞壁、鞭毛、荚膜、芽孢等特征。

(2) 染色技术：常用的染色方法主要包括以下几种。①革兰氏染色：区分革兰氏阳性细菌（紫色）和革兰氏阴性细菌（红色），这是细菌鉴定的基本方法。②抗酸染色：用于鉴定抗酸性细菌，如结核分枝杆菌。③荚膜染色：检测细菌是否具有荚膜，如肺炎链球菌。④鞭毛染色：观察细菌鞭毛的数量和排列，帮助鉴定运动性细菌。

(3) 菌落特征分析：菌落特征分析主要包括如下。①形态：观察菌落的形状，如圆形、纺锤形、不规则形等。②颜色：不同细菌可能产生不同颜色的菌落，如金黄色葡萄球菌形成黄色菌落。③质地：观察菌落的质地，如光滑、粗糙、黏液状等。④边缘：观察菌落边缘的形态，如整齐、锯齿状、波状等。⑤表面：观察菌落表面的特征，如光滑、皱褶、颗粒状等。

综上，细菌形态学鉴定具有直观、快速的优点，但同时也具有分辨率有限、经验依赖性高和主观性较强等缺点，其在细菌的初步筛查和分类中具有重要作用，但常需结合分子生物学、化学分析等其他方法进行更精确的鉴定。

2. 生化反应 细菌鉴定的生化反应方法是基于细菌的代谢特性，通过检测细菌对特定底物的代谢反应来进行鉴定，现分述如下。

(1) 氧化酶试验（oxidase test）：氧化酶试验是指检测细菌是否具有细胞色素 c 氧化酶。将氧化酶试剂（如四甲基对苯二胺）加入细菌培养物中，如果存在细胞色素 c 氧化酶，试剂会被氧化呈现蓝紫色。应用氧化酶试验可以区分氧化酶阳性和阴性的细菌，如氧化酶阳性的假单胞菌属与阴性的肠杆菌科细菌。

(2) 触酶试验（catalase test）：触酶试验是指检测细菌是否具有触酶。将过氧化氢溶液加入细菌培养物中，如果存在触酶，会分解过氧化氢生成氧气和水，产生气泡。应用触酶试验可以区分触酶阳性和阴性的细菌，如触酶阳性的葡萄球菌与阴性的链球菌。

(3) 糖发酵试验（carbohydrate fermentation test）：糖发酵试验是指检测细菌发酵特定糖类（如葡萄糖、乳糖、麦芽糖等）产生酸和气体的能力。通常使用含有 pH 指示剂的培养基，发酵产生的酸会改变指示剂的颜色，产生气体则会在培养管中形成气泡。应用糖发酵试验可以区分不同的肠杆菌科细菌，如大肠埃希菌能发酵乳糖，而沙门菌则不能。

(4) 硝酸盐还原试验（nitrate reduction test）：硝酸盐还原试验是指检测细菌是否能将硝酸盐还原为亚硝酸盐或氮气。培养细菌后，加入硝酸盐还原试剂，如果培养液变红，表示存在亚硝酸盐；如果不变色，再加入锌粉，若仍不变色，表示已还原为氮气。应用硝酸盐还原试验区分能还原硝酸盐的细菌，如大肠埃希菌与不能还原的链球菌。

(5) 尿素酶试验（urease test）：尿素酶试验是指检测细菌是否能分解尿素生成氨和二氧化碳。使用含有尿素和 pH 指示剂的培养基，尿素分解生成的氨会使培养基碱化，指示剂变色。应用该试验可以区分尿素酶阳性的细菌（如幽门螺杆菌）与尿素酶阴性的细菌。

(6) 硫化氢产生试验 (H_2S production test): 硫化氢产生试验是指检测细菌是否能产生硫化氢。使用含有铁离子的培养基, 硫化氢与铁离子结合形成黑色沉淀。可以区分能产生硫化氢的细菌 (如沙门菌) 与不能产生的志贺菌。

(7) 脂酶试验 (lipase test): 脂酶试验是指检测细菌是否具有脂肪水解酶的能力。将细菌接种于含有脂肪的培养基上, 若产生透明圈, 表示具有脂肪水解能力。应用该方法可以区分具有脂肪分解能力的细菌, 如革兰氏阳性的棒状杆菌。

(8) 明胶液化试验 (gelatin hydrolysis test): 明胶液化试验是指检测细菌是否能分解明胶。将细菌接种于含有明胶的培养基中, 培养后若明胶液化, 表示细菌具有明胶酶。应用该方法可以区分明胶酶阳性和阴性的细菌, 如金黄色葡萄球菌和链球菌。

综上所述, 基于生化反应的细菌鉴定方法具有操作简单、鉴定成本低等优点, 但也具有鉴定时间较长、经验依赖性强和鉴定精确度低等缺点, 通常需要结合形态学方法和分子生物学方法, 才能获得更准确和全面的鉴定结果。

3. 血清学鉴定 细菌的血清学鉴定是基于抗原-抗体反应的原理, 通过检测细菌表面特异性抗原与特异性抗体的结合, 来鉴定细菌种类和分型。这些抗原包括细菌细胞壁、鞭毛、荚膜等结构中的多糖、蛋白质或脂多糖。血清学反应通过检测细菌表面特异性抗原与特异性抗体的结合, 可以有效鉴定和分型各种细菌。这些方法在临床诊断、食品安全、公共卫生和流行病学研究中发挥着重要作用。

4. 常用的分子生物学鉴定方法

(1) 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR): PCR 技术是一种利用特异性引物对 DNA 或 RNA 进行扩增的技术, 通过设计针对目标序列的特异性引物, 可以实现对病原体的快速、准确检测和鉴定。该技术适用于多种感染性疾病的诊断, 例如结核病、性传播疾病和食源性病原体的检测。该技术能够快速、准确地检测和鉴定病原菌, 适用于各种感染性疾病的诊断, 例如结核病、性传播疾病和食源性病原体的检测。

(2) 实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, qPCR): 结合荧光染料或荧光探针, 在 PCR 扩增过程中实时监测荧光信号强度, 定量分析目标基因的拷贝数。可用于病原体载量检测、基因表达分析和微生物群落定量研究。

(3) 多重 PCR (multiplex PCR): 使用多对引物同时扩增多个目标基因, 在一个反应体系中检测多种细菌或多种基因。适用于同时检测多种病原菌, 如在食品安全检测中, 同时检测沙门菌、大肠埃希菌和李斯特菌。

(4) 环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测: 是一种高效、快速、灵敏的核酸扩增技术, 能够在恒定温度下进行 DNA 扩增。LAMP 技术依赖于特异性引物和 Bst DNA 聚合酶, 通过一系列循环反应迅速扩增目标 DNA。可快速检测病原体 DNA, 适用于现场诊断和资源有限的环境。

(5) 随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD): RAPD 技术的原理是基于 PCR 技术, 使用一系列人工合成的、碱基顺序随机排列的寡聚核苷酸单链 (通常 9~10 bp) 作为引物, 以从组织分离得到的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。可用于细菌种类鉴定、遗传多样性分析和菌株分型。通过随机引物 PCR 扩增, 生成特异性 DNA 指纹图谱, 识别不同细菌株系, 适用于临床诊断、食品安全和环境微生物研究。

(6) 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP): 通过限制性内切酶切割 DNA, 产生特定长度的片段, 并利用琼脂糖凝胶电泳对这些片段进行分离, 形成独特的图谱。这种方法结合了特定序列识别和长度差异分析, 能够准确区分不同细菌种类和株系。这一技术广泛应用于细菌种类鉴定、菌株分型及遗传多样性分析, 尤其在临床诊断、流行病学调查和微生物生态学研究具有重要价值。通过特异性片段图谱, 不仅能够识别病原菌, 还可用于溯源和微生物群落结构的解析。

(7) DNA 杂交 (DNA hybridization): 该技术利用两条互补的单链 DNA 在适宜条件下结合形成双链结构, 从而进行靶序列的检测和鉴定。可用于检测和定位特定基因序列, 常用于基因组研究和诊断。

(8) 序列分型 (sequence-based typing, SBT): SBT 通过测定特定基因的核苷酸序列, 比较不同菌株间的序列差异, 实现细菌的精确分型。用于高分辨率的菌株鉴定, 特别是在流行病学研究中。主要用于分析环境样品中的细菌群落结构和多样性, 研究环境中细菌的生态分布和功能。

(9) 多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST): 通过测定多个保守基因的部分序列, 分析不同菌株间的基因变异, 从而实现细菌的精确分型和分类。主要应用于细菌的精确分型和流行病学研究, 通过分析多个保守基因序列, 追踪病原体的来源和传播动态。

(10) 脉冲电场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE): 是一种改进的电泳技术, 专门用于分离大分子量的 DNA 片段 (通常在 30 kb 到 10 Mb 之间)。与传统的凝胶电泳不同, PFGE 通过交替改变电场的方向, 促使大分子量 DNA 更有效地通过凝胶孔隙。主要用于菌株间的分型和溯源, 常用于流行病学调查。用于快速鉴定和分型临床样本中的病原菌, 辅助临床诊断和治疗决策, 研究抗生素耐药性基因在病原菌中的传播, 帮助制定抗感染策略。

(11) 变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE): DGGE 通过在凝胶中建立变性剂梯度 (如尿素和甲酰胺), 根据 DNA 片段的变性特征将其分离。主要用于分析混合样本中 DNA 片段的多样性, 如微生物群落分析。在临床样品 (如血液、粪便、呼吸道分泌物) 中检测和分析病原微生物群落结构, 辅助疾病诊断和治疗, 研究抗生素治疗前后微生物群落的变化, 评估抗生素对微生物群落的影响。

(12) 噬菌体分型 (phage typing): 是基于噬菌体与特定的细菌宿主之间的高度专一性, 利用烈性噬菌体快速裂解细菌而形成直观清晰的噬菌斑原理来进行细菌分型的方法。可为流行病学追踪传染源、切断传播途径、控制疫情、探讨流行规律提供科学依据。该方法简单、价格相对较低、省时, 是一种实用而有效的分型技术。

(13) 细菌素分型 (bacteriocin typing): 利用细菌素, 即某些细菌产生的抗菌蛋白, 来鉴定和分型细菌。待测细菌接种在琼脂平板上以生产细菌素, 将对细菌素敏感的指示菌株接种在同一平板上。经过孵育, 产生抑菌圈。通过分析抑菌圈的形成, 生成细菌素敏感性图谱, 不同细菌株对细菌素的敏感性不同, 从而实现分型和鉴定。主要用于鉴定和分型细菌株, 特别是在流行病学研究中追踪细菌感染源头和传播途径。它也用于监测细菌群体的遗传多样性, 帮助食品安全和环境微生物监测。

(14) 质谱 (mass spectrometry, MS) 技术: 特别是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF) 和聚合酶链式反应电喷雾电离四极飞行时间质谱 (polymerase chain reaction electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry, PCR-ESI-QTOF) 在细菌鉴定上的应用给临床微生物, 特别是病原微生物的鉴定带来了极大便利。

在此基础上, 质谱成像 (mass spectrometry imaging, MSI) 技术进一步拓展了质谱技术在微生物研究中的应用。MSI 了解人类微生物发病过程中的生物分子代谢, 引入 MSI 来评估宿主-病原体的相互作用。这些分子特征可以使用 MSI 进行量化和可视化, 它们表明了宿主-病原体相互作用中感染的进展。MSI 是一种强大的分析技术, 通过在样品表面直接获取空间分布的分子信息, 生成分子图谱, 用于细菌鉴定。MSI 结合了质谱技术的高灵敏度和成像技术的空间分辨率, 可以同时检测样品中的多种生物分子, 如蛋白质、脂质和代谢物。

MSI 技术通过高灵敏度和空间分辨率的分子成像, 提供了细菌鉴定的强大工具, 在临床诊断、食品安全检测和环境监测中的应用展示了其广泛的潜力和优势。通过分析细菌特异性的分子图谱, MSI 可以快速、准确地识别病原菌, 为细菌鉴定提供了新的视角和方法。

(15) 核酸测序技术: 核酸测序技术是指对生物体的核酸进行测序的技术, 可以分为以下几

种不同的方法，每种方法在原理和应用上有所不同。① **Sanger 测序**：即第一代测序技术，基于链终止法，通过使用带有荧光标记的二脱氧核苷酸（ddNTP）中断 DNA 链延伸，生成不同长度的 DNA 片段。然后通过毛细管电泳分离片段并检测荧光信号，确定序列。主要用于小片段 DNA 的测序，如质粒、PCR 产物和小基因组。作为高通量测序的补充，用于验证变异和拼接结果。② **二代测序（next-generation sequencing, NGS）**：即高通量测序技术，通过将基因组 DNA 片段化、连接接头、扩增并进行大规模平行测序，生成大量短读长序列。常用的平台包括 Illumina、Roche 454、Ion Torrent 和华大基因（Beijing Genomics Institute, BGI）等。其被广泛用于基因组学研究，包括人类基因组、病原体基因组和环境微生物基因组。应用于突变检测、基因表达分析、群体遗传学和环境 DNA 分析。③ **三代测序（third-generation sequencing, TGS）**：三代测序技术是基于单分子实时测序（SMRT）和纳米孔测序技术的最新一代核酸测序技术，能够直接读取长链 DNA 序列。主要平台包括 Pacific Biosciences（PacBio）和 Oxford Nanopore Technologies（ONT）。适用于复杂基因组的拼接和变异检测。用于分析结构变异、大规模重复区域和表观遗传修饰。

综上，核酸测序技术通过多种方法提供全面的基因组信息，适用于不同的研究需求。**Sanger 测序**适用于小片段 DNA 测序和验证，**二代测序（NGS）**适用于高通量基因组学研究，而**三代测序（TGS）**则在长读长测序和复杂基因组分析中具有显著优势。选择适当的方法需根据具体的实验目标和资源条件，如表 1-1 所示。

表 1-1 不同核酸测序技术的原理和应用比较表

方法	原理	应用
Sanger 测序	基于链终止法，通过 ddNTP 中断 DNA 链延伸，毛细管电泳分离片段并检测荧光信号，确定序列	小片段 DNA 测序（如质粒、PCR 产物、小基因组），验证变异和拼接结果
二代测序（NGS）	高通量并行测序技术，DNA 片段化、连接接头、扩增并进行大规模平行测序，生成大量短读长序列	基因组学研究（人类基因组、病原体基因组、环境微生物基因组）、突变检测、基因表达分析、群体遗传学和环境 DNA 分析
三代测序（TGS）	基于单分子实时测序（SMRT）和纳米孔测序技术，直接读取长链 DNA 序列	复杂基因组拼接和变异检测、结构变异分析、大规模重复区域和表观遗传修饰分析

（三）细菌鉴定的新方法

在最近几年中，细菌鉴定领域引入了一些创新方法，大大提高了鉴定的效率和准确性。以下是几种新的细菌鉴定方法：

1. NOVA 分析方法 NOVA（novel organism verification and analysis）是一种基于全基因组测序的新鉴定方法。该方法通过分步协议和设定的阈值，指导科学家逐步进行越来越精细和昂贵的测试。该方法使用全基因组测序结合人工智能数据分析工具来识别细菌，并在传统方法无法识别时提供可靠的结果。这一方法在医院诊断实验室中已成功识别出 35 种新细菌株。

2. 拉曼光谱法 拉曼光谱法（Raman spectroscopy）结合新的定量算法，能够快速、准确地识别细菌。这种技术通过检测细菌细胞的拉曼光谱来识别不同的细菌种类。拉曼光谱法被证明在鉴定铜绿假单胞菌等细菌时具有很高的分析和诊断敏感性，并且不需要长期的样本准备和昂贵的试剂。

3. 高分辨率解链曲线（HRM）分析 是一种通过检测 DNA 双链解链温度差异来鉴定细菌的方法。HRM 技术简单快速，可以检测和区分细菌种类及其抗性基因，广泛应用于临床诊断和食品安全检测中。

4. 微流控芯片技术 微流控芯片技术利用微型芯片上的微小通道和反应室进行细菌的快速鉴定。这种方法具有高通量、低成本和自动化的优势，适用于大规模样本的快速筛查和分析。微流控芯片技术在十多年前开始应用于细菌检测，近年来取得了显著进展。这项技术利用微小的流体通道和反应室，实现了快速、准确的细菌鉴定。