

表 3 两种方法检测 CSF 抗原滴度比较

	抗 原 滴 度						合计
	两法相同	BA-ELISA 为常规 ELISA 滴度倍数				常规 ELISA(-) BA-ELISA(+)	
		2	4	8	16		
份数	23	59	44	15	3	13	157
%	14.6	37.6	28.0	9.6	1.9	8.3	100

数;同样的 CSF 于不同实验日重复测定 7 次,每次每份 CSF 做 7 孔,计算批间变异系数。结果批内变异系数范围在 3.7—7.5%,批间变异系数在 5.4—10.6%。

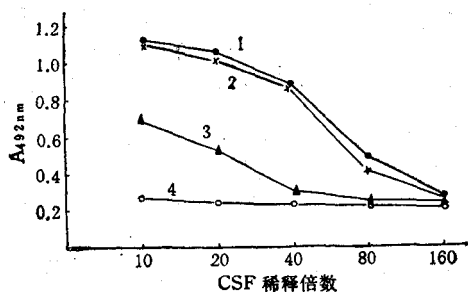


图 1 BA-ELISA 的特异性抑制试验结果  
1.加稀释液 2.加羊抗人 IgG100μg/ml  
3.加抗结核杆菌 IgG10μg/ml  
4.加抗结核杆菌 IgG100μg/ml

## 讨 论

结脑是目前发展中国家较为常见的疾病<sup>[9]</sup>。本病的早期临床表现极易被忽视,CSF 细菌学检查阳性率较低,生化检查对诊断虽有帮助,但缺乏特异性,而本病愈后与及时治疗关系密切,因此早期诊断至关重要<sup>[10]</sup>。本研究用生物素标记结核菌单克隆抗体,首次报道 BA-ELISA 检测 CSF 结核菌抗原,并与常规 ELISA 进行了比较。两法均采用 S/N 比值作为判定结果的标准,以消除不同实验间可能出现的差异,每块板上都设有空白对照、阴性和阳性 CSF 对照,

以消除板与板之间的差异,因此本文的结果有较严格的可比性。

本试验结果表明,BA-ELISA 检测 CSF 结核菌抗原阳性率为 88.5%,与常规 ELISA 的阳性率(80.3%)有显著性差异( $P < 0.05$ )。检测 CSF 抗原滴度,BA-ELISA 较常规 ELISA 敏感者 134 份(85.4%),抗原几何平均滴度 BA-ELISA (1:47.4)较常规 ELISA (1:18.8)灵敏 2.5 倍,尤其值得注意的是有 13 份 CSF BA-ELISA 阳性而常规 ELISA 阴性,说明 BA-ELISA 为结脑的免疫学诊断提供了一种比常规 ELISA 更为敏感的新方法,它有助于低抗原滴度患者的检出,以减少漏诊。此外,本法还有较高的特异性和较好的可重复性,因此不失为结脑有效的辅助诊断方法。

## 参 考 文 献

1. Wilchek M et al.: *Immunology Today*, 5:39,1984
2. Chang H C et al.: *J Immunol Method*, 72: 401, 1984.
3. 胡忠义等: *免疫学杂志*,2: 282,1986.
4. 王荣福等: *中国免疫学杂志*,1(5): 20,1985.
5. 郭春祥等: *上海免疫学杂志*,3: 97,1983.
6. Yolken R H et al.: *J Immunol Method*, 56: 319, 1983.
7. 胡忠义等: *中华内科杂志*,26: 146,1987.
8. Kendall C et al.: *J Immunol Method*, 56: 329, 1983.
9. Sada E et al.: *Lancet*, 2:651, 1983.
10. Tramb M et al.: *Quart J Med*, 209:81,1984.

(上接第217页)

蔡立勉等: 混合菌苗裸鼠人肝癌模型的实验性治疗。  
*中国免疫学杂志*, 5(3): 160, 1989。  
张丽华等: 结核抗体检测对判定结核病活动性的意义。  
*中国免疫学杂志*, 5(3): 164, 1989。

石平华等: 以生物素化酶免疫试验检测乙型肝炎。系统。  
*中国免疫学杂志*, 5(3): 175, 1989。  
葛振华等: 中国拟青霉对小鼠淋巴结 IgG 和 IgM 抗体形成细胞的影响。  
*中国免疫学杂志*, 5(3): 147, 1989。

# 分析微生物学及其现状

周 方

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

不久前,生物学一直是一门描述性的科学,是在整体或显微水平上,生物学家只能了解它们生命过程的结果,而不知引起结果的动力。由于电子显微镜、超速离心机以及各种色谱技术的应用,使人们认识到许多生物学现象的最后因果机理,是依赖于细胞内外各种特异性分子之间的纷杂关系,其中包括带有遗传信息和生物学活性的核酸、蛋白质、多糖和类脂等。

由于微生物是研究生命过程最理想的材料,但现有的常规方法和技术远远不能满足现代微生物学发展的需要,必须发明和创建更多更好的新方法、新技术和新工具,这就是分析微生物学发展的历史背景。

## (一) 分析微生物学及其特点

分析微生物学是伴随工业微生物学的发展而产生的。原来的经典分析微生物学实际上是微生物分析技术,即利用一特定微生物来定量分析一些物质。理论上讲微生物学分析方法可以检验任何化学物质。只要对微生物显示出可计量的反应,从简单的无机元素到复杂的有机化合物,如维生素、氨基酸、抗生素和生物素等,都可用微生物分析方法来检测<sup>[1]</sup>。

随着生物技术和分子微生物学的飞速发展,现在的分析微生物学已远远超出经典分析微生物学的范畴,它已经发展成为利用化学、物理和数学上的最新知识和技术开拓研究和应用微生物的新途径,从而使人们更加有效地利用微生物,以及更加充分地探索生命奥秘的边缘学科。分析微生物学的研究内容大致有如下两方面:即微生物和与微生物利用有关的化学物质分离、提纯,以及定性、定量、定位和定序分析,微生物信息(包括物理、化学、生理生化、生物物理和形态等)的获取、存贮和处理。

将化学、物理、数学及其他学科的前缘技术引入微生物学的研究和开发应用,绝不是若干方法的简单叠加,其间有一个相互渗透和融合的过程。这是由于不但要涉及到应用专业的系统知识,而且还需进行适当加工改进,才能相互适应,进而做到有机结合。例如人们所熟悉的厌氧菌代谢产物的色谱分析,如果简单地将常规培养物直接进行色谱分析,会给结果的解析带来很大困难(尤其是定量分析),主要原因是培养基本底成分干扰。如果预先用一种方法除去本底干扰成分而又不影响细菌生长,则会给代谢产物分析提供有利条件<sup>[2]</sup>。又如电子计算机应用于微生物学,交叉点和

结合部位的选择,以及数学模型的建立和应用程序的编制,任何单一专业的专家都不能胜任,必须学科间通力合作,这说明,某些经典微生物学方法和技术必须在原有基础上加以改进或补充,同时开创新途径才能促进微生物学和生物技术的发展。

## (二) 分析微生物学现状

近年来,为满足生物技术和分子微生物学的迫切需求,分析微生物学得到迅速发展,形成了生命科学和其他学科的结合部。在美、英等国一些大学已设立了分析微生物学专业课程,有的研究单位已建立了分析细菌学专业实验室。还经常举办各种专题内容的国际学术讨论会,并出版相应的会议文集。但目前尚缺少相应的学术组织综合协调有关学术活动。

1. 微生物化学组分分析: 微生物化学组分包括细胞组分蛋白质、核酸、多糖、类脂、胞壁酸和肽聚糖等以及代谢产物,包括某些中间代谢产物和二次代谢产物等。上述化学组分的定性、定量、定序和定位分析已被广泛应用于微生物学的基础研究以及微生物的检出和鉴定、传染病的诊断,生物制品、制剂、生物工程中间原料、抗生素等微生物工业产品的质量保障和监控(QA/QC)。

氨基酸的定量分析已实现自动化,能准确测出毫微克分子的氨基酸,但进一步提高灵敏度受到茚三酮反应的限制。气-质联用和液-质联用方法很有前途,但目前的方法尚待完善。

多肽合成已经由原来的人工合成进展到按 R B Merrifield 固体合成法设计的多肽合成仪,可制备多肽形式的酶、激素、蛋白和某些其他药品。

色谱方法已广泛应用于核酸分析,在聚丙烯酰胺凝胶电泳基础上,实现了 DNA/RNA 碱基成分的定序分析。通过 A C G T 4 种碱基的不同配比定序可以合成无数个具有遗传特性的 DNA 遗传因子,该项工作已由 A Kornberg 的人工合成进展到自动化合成。最近几年问世的毛细管胶束电动色谱法(Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC)具有简便、快速、高效、价廉等优点<sup>[3]</sup>,这种新型电泳法的潜力有待进一步开发。

对热不稳定的生物大分子,如低聚肽、低核苷酸和低聚糖等的检测、鉴别和结构分析已开始采用静态二次离子质谱法(SIMS),这是 A Benninghoven 在研

究表面物理化学过程中开拓的新领域。例如用 Finnigan MAT TSQ70 型三重四极质谱计快原子轰击电离法分析短杆菌素。

微生物化学组分除上述有机化合物外,还有若干种微量无机元素。目前对微生物无机元素的研究远远落后于对有机化合物的研究。无机微量元素的分析方法除现有的原子吸收光谱(AAS)和发射光谱(OES)之外,电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)为微生物无机元素的超痕量分析提供了有利工具。

单细胞结构的定位分析可用激光诱导质谱法,也称作微探针分析(空间分析)。这种激光微探针质量检测器(LAMMA)是由激光器、飞越时间质谱计和紫外透射显微探针(空间分辨率为 $1\mu\text{m}$ )组成。用此方法研究气溶胶、生物细胞结构,以及生物组织中某些元素的主体分布。

依据微生物化学组分的指纹图鉴别微生物,有的已达到自动化程度。例如 AMBIS 微生物自动鉴定系统可对蛋白质电泳图的自动识别, HP5898A 微生物鉴别系统可对微生物脂肪酸图谱的自动识别,目前都有商品出售。

2. 微生物物理化学特性的测量: 由于对微生物的光学、电学、热学等物理化学特性的深入研究,不仅促进了基础研究的深入开展,而且还研制出各种不同类型的自动化仪器。

通过研究细胞在电场中的迁移行为来分离细胞和分析细胞表面结构与功能关系的细胞电泳法,自1902年至今已有近90年的历史。80年代后期,经典的细胞电泳仪配上了微机、显微照相现代技术。1960年以来,在免疫学、临床医学、遗传工程等学科推动下,涌现出多种新的、有效的电泳方法。首先是显微细胞电泳,能在生理条件下测定细胞,并可直接观察细胞形态、测定不同深度的细胞运动速度和速度分布。本法测定细胞数目少于200个,不能用于制备;流式细胞电泳,具有分析和制备功能,流动过程中可任意截取所需滴度的细胞组分;激光-多普勒细胞电泳仪可不经分离同时测定多种细胞混合物,准确、快速,能在生理条件下测定;密度梯度细胞电泳也是同时利用电场力和重力分离细胞,由于用大管做分离室,有效地克服电渗影响,适于制备兼分析;高压毛细管细胞电泳设备简单、操作方便、快速可靠、结果处理简单,适用于常规分析和制备,但不能在生理条件下使用;电磁场法细胞电泳同时利用电场和磁场力分离细胞,目前尚未推广采用<sup>[4]</sup>。

细菌生长过程中其周围液体的电导率会发生有规则的变化,通过对电导或阻抗的变化可以估计微生物的数量和鉴别某些细菌的种、属名称。目前市售商品有英国 Malthus 仪器公司生产的 Malthus Microbial Analyser 系统,它是测定电导率的变化。另一种是美

国 McDonnell Douglas 卫生保健系统公司生产的 Bactometer 微生物监控系统,它可测定电阻抗变化,也叫做自动化工业微生物监控系统。主要用于乳类和乳制品、肉类及肉制品、水果和果汁、化妆品、药物、冷冻食品、特殊包装材料等。

根据细菌生长时热量变化的测量进行细菌检出和鉴别的方法称微量量热法。利用萤火虫酶系统和生物ATP接触后发光的原理研制的生物发光测定仪。微生物自动检测系统,即麦道公司生产的 Vitek AMS,它是利用计算机监控细菌生长过程浊度或颜色变化来实现对微生物的检出和鉴别,自动化程度高,基本上覆盖了临床和食品微生物常见种类,但试剂昂贵,需进行更有效地利用和开发。

3. 微生物传感器: 由固态化学、电化学、膜技术和生物膜转运机制综合应用而派生的传感器称做生物传感器(Biosensors)。

微生物传感器是能感受化学量,并将其转变成电信号的装置。其识别元件是固定化的活的微生物(细菌、酵母菌、霉菌等),而转换器则是电化学电极或场效应晶体管,前者称为微生物电极,后者称为微生物场效应晶体管,二者统称微生物传感器。其选择性低于酶电极,但和酶电极相比具有简便价廉、寿命长及再生反复应用的优点。因此自1975年乙醇细菌电极问世以来得到迅速发展,在食品分析、环境监测、临床检验、发酵过程监控等方面具有广阔应用前景。目前已生产多种电位型和电流型微生物传感器供选用。

免疫电极是根据免疫测定原理发展的一类传感器,包括标记和非标记免疫电极。标记免疫电极有免疫球蛋白G(IgG)与免疫球蛋白M(IgM)传感器,非标记免疫电极有血型传感器和梅毒传感器等。自1980年免疫化学场效应晶体管问世以后,由此引出生物敏感场效应晶体管,主要优点是微型化、集成化,如果和电脑相结合其前景是可观的。

4. 免疫标记技术: 化学标记方法和免疫学中的抗原抗体反应相结合形成免疫标记技术。自19世纪40年代开始,相继推出免疫荧光技术、铁蛋白标记技术、放射免疫技术、免疫酶标技术和酶联免疫吸附技术(ELISA),由酶标技术又引出了目前正在推广应用的ABC技术。随着固相抗体技术的发展,常规的颗粒凝集技术,如血凝、乳胶凝集等又获得新的生命力。

人们在实践过程中逐步认识到放免试剂寿命短、后期产物的放射性污染,使放免技术的推广受到限制;酶标技术的弱点是酶试剂的纯度和作用易受种种因素的干扰而不易标准化。因此,探索新的非放射性标记的竞争分析法就成为近年来的发展方向。1979年推出的标记时间分辨荧光免疫分析法使传统的荧光免疫分析法获得新进展。通常用直接夹心双位点荧光免疫分析法测抗原;用固相竞争荧光免疫分析法测抗体或