

荧光原位杂交技术及其在微生物生态学中的应用

呼庆, 齐鸿雁*, 张洪勳

(中国科学院生态环境研究中心环境生物技术研究室, 北京 100085)

摘要:综述了荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization FISH)在微生物生态学领域的各种应用,同时就其发展过程、原理及种类做了介绍。

关键词:荧光原位杂交;微生物生态;16SrRNA;探针

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and its applications in microbial ecology

HU Qing, QI Hong-Yan*, ZHANG Hong-Xun (Environmental Biotechnology Lab., Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(5): 1048~1054.

Abstract: During recent years, molecular techniques such as PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or DNA sequencing have revolutionized all fields of microbiology, and sensitive detection and exact identification of bacteria are possible. Fluorescence in situ hybridization (FISH) using 16SrRNA probes does not rely on PCR amplification, and as such provides a useful complementary technique to DGGE for the analysis of organisms.

Because of FISH allowing nucleic acid sequences to be examined inside cells without altering the cell's morphology or the integrity of its various compartments and providing information about number, spatial distribution and cellular environment, it has become a powerful tool for phylogenetic, ecologic, diagnostic and environmental studies in microbiology.

Fluorescence in situ hybridization can detect nucleic acid sequences by a fluorescently labeled probe that hybridizes specifically to its complementary target sequence within the intact cell. Its general procedure in FISH analysis of microorganisms is as follows: (1) fixation of the specimen; (2) preparation of the sample, possibly including specific pretreatment steps; (3) hybridization with the respective probes for detecting the respective target sequences; (4) washing steps to remove unbound probes; (5) mounting, visualization and documentation of results.

Because FISH gives a detailed picture of the microenvironments without any selective purification or amplification steps, there is a large scope of FISH applications.

It has been extensively used in the field of environmental microorganisms diversity such as the investigation of microbial communities of aquatic habitats and soil habitats.

Most obligate microbial symbionts are as-yet uncultured. Using the 16SrRNA approach, they can be identified and phylogenetically classified. Using different FISH strategies, bacterial endosymbionts were detected in many microorganisms.

Population analysis by FISH has proven particularly useful for description of the normal flora or that of mixed microbial infections. This has been shown for medicine research such as oral cavity, gastro-intestinal flora, respiratory tract infections.

It should be pointed out that FISH is not free of biases as with other molecular methods. The most striking problem is autofluorescence of microorganisms themselves. In addition, accuracy and reliability of FISH is highly dependent on the specificity of the oligonucleotide probe.

基金项目:国家“十五”科技攻关重点资助项目(2001BA903B)

收稿日期:2003-10-21; **修订日期:**2004-01-10

作者简介:呼庆(1977~),男,内蒙古呼和浩特市人,博士生,主要从事环境微生物分子生态学研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: qihy@mail.rcees.ac.cn

Foundation item: the National “Tenth Five-year Plan” Key Technologies R&D Programme(No. 2001BA903B)

Received date: 2003-10-21; **Accepted date:** 2004-01-10

Biography: HU Qing, Ph. D. candidate, mainly engaged in molecular ecology of environmental microorganism.

FISH provides information about the presence, number, morphology and spatial distribution of microorganisms. We believe that FISH as a powerful tool will make more contributions to the assessment of the population structure of complex microbial communities.

Key words: fluorescence in situ hybridization; microbial ecology; 16SrRNA; probe

文章编号:1000-0933(2004)05-1048-07 中图分类号:Q93-3,Q938 文献标识码:A

微生物是地球生物圈的重要组成部分。研究自然界中微生物的生物多样性和微生物种群之间的相互作用以及测定自然界中微生物的活动并且监测它们对生态系统的影响是微生物生态学的主要任务。当前,许多涉及国计民生的重大理论问题的解决都需要微生物生态学知识的应用。尽管近十几年来,由于分子生物学技术的发展,微生物生态学的研究深度及广度有所增加,但还远远不够。随着现代工农业的发展和全球气候变化的影响,许多有用的微生物资源正在消失,这更增强了人们希望客观真实的认识微生物生态的迫切性。

鉴定和监测微生物是微生物生态学研究的重要内容之一。其方法主要有以下几种:①显微镜检测。显微镜技术快速廉价,可以直接观察和大致分辨微生物,但是由于缺乏形态学方面的指标而不易得到可靠的结果。②微生物培养。培养的方法周期长,不适用于难培养的微生物,而且不能反映自然环境中微生物群落组成和多样性。③分子生物学检测。最近几年,数种分子标记方法如 SSR、ISSR、AFLP、RAPD、SSCP 和 DGGE 等的应用为研究微生物种群和鉴定微生物提供了新的途径。但是,这些基于 PCR 的方法可能会在扩增反应中引入误差,降低了所得信息的精确度。荧光原位杂交(FISH)技术作为一种不依赖 PCR 的分子分析技术是以上各种分子标记技术的有益补充,并同时提供形态学、数量、空间分布与细胞环境方面的信息^[1],使人们可以对自然环境中的微生物进行动态地观察和鉴定^[2]。

1 FISH 技术在微生物生态学中的应用

FISH 技术具有快速、准确、原位等诸多优点,故目前已成为微生物生态学各个领域研究中强有力的工具。

1.1 环境样品中微生物多样性的检测

环境中存在的微生物品种和数量远远超过已鉴定的微生物。在很长的一段时期内,微生物多样性的重要性未引起人们的重视。基于 rRNA 的分析技术改变了微生物种群结构描述困难的现状。但是,大部分的技术例如核酸抽提和 PCR 扩增都有一定程度的偏差。FISH 技术可以将整体微生物环境清晰的呈像出来而不需要额外的抽提和扩增等易引起偏差的步骤。所以,FISH 技术被广泛应用于环境微生物多样性的研究,例如水生环境中的微生物种群研究。Simon Nathalie, Biegala Isabelle 等在 2002 年利用 FISH 技术研究海水中细菌和有害藻类种群之间的相互作用^[3]。Araya Ruben; Tani Katsuji 等在 2003 年对溪流中和水中生物膜上的微生物群落进行了 FISH 研究^[4]。

FISH 技术不仅提供静止的实验结果,还可以动态地观察流动水体中的微生物种群变化,可以检测季节更替对高山湖泊中微生物群落的影响。Liu J, Leff L G 在 2002 年利用此技术监测了河流中微生物群落的动态变化^[5]。利用 FISH 技术得到了一些在人工条件下很难培养的菌种以及一些新的菌种信息。Girguis P R, Delong E F 在 2002 年用厌氧富集的方法从深海沉积物中培养到一些古菌,随后使用 FISH 技术对这些古菌进行了鉴定^[6]。Menamara Christopher J, Lemke Michael J, Leff Laura G 利用 FISH 技术对美国卡罗莱纳州南部溪流沉积物中可培养和不可培养的细菌群落进行了分析^[7]。所有这些研究对于人们理解环境中微生物种群的组成和动力学都有极大的重要性。

1.2 污水处理相关微生物多样性的研究

Ardern 和 Lockett 在 1914 年发明了活性污泥法处理污水^[8]。但是直到今天微生物种群在此工艺中的作用还没有完全了解清楚。培养的方法选择性强,不能提供可靠的信息。基于 rRNA 的 FISH 技术开始使人们逐渐摸清了微生物的作用机理。Lee T J 等在 2002 年利用 FISH 技术研究了活性污泥中聚磷酸盐积累型细菌(PABs)和糖原积累型细菌(GABs)的数量和空间分布^[9]。Coskuner G, Curtis T P 于 2002 年用 FISH 技术原位鉴定了活性污泥中硝化细菌群落的组成和分布,为理解污水处理中氮素循环提供了重要的信息^[10]。

1.3 内共生微生物的研究

大部分的内共生微生物是难于培养的。利用 16SrRNA 技术,它们可以被鉴定和系统分类。在原生动物和真核细胞生物中有很多摄食泡或肠内的微生物不易和真正的内共生微生物区分。利用 FISH 技术的原位杂交原理可以对它们进行鉴别。Peraud O, Yousaf M, Hamana M T 等于 2002 年对海绵体中微生物种群进行的分析,发现产生抗疟疾化合物 Manzamine A 的海绵可能仅仅只是真正产此化合物微生物的宿主^[11]。

1.4 FISH 技术在医学微生物生态学方面的应用

1.4.1 分析复杂的微生物群落

(1) 口腔中的微生物 已经证明, FISH 技术是分析正常的微生物群落和混合细菌感染的强有力的工具。利用 FISH 技术检测到在人类口腔中有 300 余种不同的细菌, 其中大多数是很难培养或根本不能培养的品种。口腔疾病, 如牙根骨膜炎和牙龈炎等都和相应的细菌群有关。Brinig Mary M; Lepp Paul W; Ouverney Cleber C 等在 2003 年通过 FISH 技术研究了难于培养的 TM7 细菌在人类口腔中的分布和传染机理^[12]。2003 年 Foster Jamie S; Palmer Robert J 等通过 FISH 技术以人类口腔细菌群落为模型研究了基因对基因相互作用 (genome-genome interactions)^[13]。

(2) 胃肠菌群 肠胃是微生物在人体最大的定居和活动场所, 所以研究正常健康的肠胃菌群和其形成的生物膜是非常重要的。同样的, 用常规的培养方法会低估微生物的数量和种类。Swidsinski Alexander; Ladhoff Axel 等于 2002 年利用 FISH 技术研究了肠炎患者的肠粘膜菌群, 发现随着病人疾病程度的加重, 其肠粘膜上的菌群密度也增大^[14]。2002 年 Zoetendal Erwin G; Ben-Amor Kaouther 等利用 FISH 技术对人类粪便中难于培养的卵胃球菌样细菌 (*Ruminococcus obeum*-like bacteria) 进行了鉴定和计数, 发现此类细菌是人类粪便中极其重要的组成部分^[15]。

(3) 呼吸道菌群 社区获得性肺炎是近年来开始流行的严重的呼吸系统疾病。Buccat A; Juretschko S 等于 2002 年利用 FISH 技术对能够引起社区获得性肺炎的病原体进行了快速鉴定^[16]。军团菌病也是一种较严重的呼吸系统流行病。2002 年 Buchbinder Susanne; Trebesius Karlheinz 等利用 FISH 技术对 32 份来自医疗单位的水样和 68 份来自普通家庭的水样中的军团菌 (*Legionella* spp.) 进行了鉴定^[17]。

2 荧光原位杂交技术的发展过程、原理及常用 FISH 技术简介

2.1 荧光原位杂交技术的发展过程

荧光原位杂交技术由原位杂交技术 (In situ Hybridization ISH) 发展而来, 其间经历了放射性标记探针阶段和荧光标记探针阶段, Pardue, Gall, John, Giovannoni 和 DeLong 等的研究作为此项技术的发展做出了贡献^[18-23]。与放射性探针相比, 荧光探针具有以下优点: ①安全; ②分辨率好且不需要额外的检测步骤; ③荧光探针可以用发射不同波长的染料标记, 从而在一个检测步骤中可同时处理多条目标序列。最近 10a, 迅速而敏感的 FISH 技术已经成为微生物系统发育、微生物生态学、传染病和医学诊断以及环境微生物研究中强有力的分析工具^[24]。

2.2 荧光原位杂交技术的原理

荧光原位杂交是指通过荧光标记的寡核苷酸探针特异地和互补核酸序列在完整的细胞内结合^[25]。具体过程包括以下几步: ①固定标本; ②预处理样品; ③用相应的探针进行杂交; ④洗掉未结合的探针; ⑤封固、呈像及结果分析。

2.2.1 探针和标记 设计和选择探针要考虑探针的特异性、敏感性以及组织穿透力。一个典型的探针长度应在 15~30bp 左右。短探针较容易接近目标序列, 但相应携带荧光染料的能力降低^[26]。常用的探针可分 3 类:

(1) 染色体特异重复序列探针 (probe to chromosome-specific repeated sequence)。像 α 卫星、卫星 III 类的探针, 它们的杂交靶位常大于 1Mb, 不含散在重复序列, 与靶位结合紧密, 杂交信号强, 易于检测, 常用于监测细胞间期非整倍染色体。

(2) 全染色体或染色体区域特异性探针 (whole-chromosome or chromosome region-specific probes)。由一条染色体或其上某一区域特异性高的核酸片段组成, 可由克隆到噬菌体或粘粒上的染色体特异性大片段文库制取。这类探针可用于中期染色体重组和间期核型分析。

(3) 特异位置探针 (specific-locus probe)。这种探针通常由一个或几个克隆序列组成, 可由特定 DNA 大片段的分子克隆或 cDNA 克隆制取, 主要用来进行基因克隆、DNA 序列定位和检测靶 DNA 序列拷贝数及其结构的变化^[27]。现将一些探针序列列于表 1 中供参考。

标记探针有直接标记和间接标记两种^[28]。直接荧光标记法有两种方式, 一种方式是用化学合成的方法将一个或多个荧光染料分子以氨基连接于寡核苷酸的 5' 端。另一种是用末端转移酶将荧光标记的核苷酸连接于寡核苷酸的 3' 端。通过中间物将异硫氰酸荧光素 (Fluorescein-Isothiocyanate FITC) 偶联于寡核苷酸可增加信号强度。同时在寡核苷酸两端进行标记也可增加信号强度。一般是在 3' 端加一个荧光分子, 在 5' 端加 4 个荧光分子, 在此 4 个荧光分子间以适当的间隔物如寡核苷酸等分开防止荧光的淬灭^[29]。

间接标记法是将地高辛或生物素等和探针结合, 然后用荧光抗地高辛抗体或荧光抗生物素抗体检测。FISH 的敏感性可通过酶促信号放大而得到提高^[30]。例如将地高辛抗体和碱性磷酸酶偶联来检测地高辛标记的寡核苷酸链, 其信号强度是单荧光分子标记法的 8 倍^[31]; 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记寡核苷酸, 以荧光标记的酪胺为底物的酪胺信号放大技术 (Tyramide Signal Amplification TSA) 可以提高信号强度 10~20 倍^[32]。目前最敏感的方法是用多种荧光分子进行标记同时结合 TSA 信号放大系统。此方法已成功用于李斯特氏菌毒力因子检测^[33]。

2.2.2 荧光染料 用具有不同波长的荧光染料可同时检测两种或多种微生物。应用染料的原则是: 最明亮的染料要用来检测丰度最低的对象。微生物研究中常用的荧光染料见表 2^[34]。

表 1 探针序列

Table 1 Probe sequence

探针序列 (5'~3') Sequence of probe	目标位点 Target position	特异性 Specificity
通用级 universal		
ACGGGCGGTGTGTRC	16S, 1392~1406	通用 Universal
GWATTACCGCGGCKGCTG	16S, 522~536	通用 Universal
界级 Kingdom level		
GTGCTCCCCGCAATTCCT	16S, 915~934	古菌 Archaea
TCCGGCRGGATCAACCGGAA	16S, 2~21	古菌 Archaea
GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338~355	细菌 Bacteria
ACCGCTTGTGCGGGCCC	16S, 927~942	细菌 Bacteria
ACCAGACTTGCCCTCC	16S, 502~516	真核 Eucarya
类群级 Group level		
CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S, 19~35	α 蛋白菌 Alpha subclass of Proteobacteria
GCCTTCCCCTTCGTTT	23S, 1027~1043	β 蛋白菌 Beta subclass of Proteobacteria
GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027~1043	γ 蛋白菌 Gamma subclass of Proteobacteria
属级 Genus level		
TAACCCAGGGCGGACGAG	23S, 1325~1342	乳酸乳球菌属 <i>Lactococcus lactis</i>
GCTGGCCTAGCCTTC	23S, 1432~1446	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>
GCAGTTACTCTAGAAGACGTTCTTCCCTGG	16S, 442~470	类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i>
种级 Species level		
AACACCCCTACTTCTTTTCG	23S, 1428~1447	钝全孢螺菌 <i>Holospora obtusa</i>
ACTACCCCTCTCCATACT	16S, 655~672	溶解军团菌 <i>Legionella lytica</i>

R = A or G; W = A or T; K = G or T; Y = C or T

2.2.3 FISH 的基本操作^[35~40] 制作样品的玻片首先要用覆膜剂处理, 这样可以使样品更好的和玻片结合。常用的覆膜剂有明胶、聚-L-赖氨酸以及硅烷等^[41]。

(1) 固定 常用的固定液有, FAA (Formalin-Acetic Acid); Paraformaldehyde (低聚甲醛); Glutaraldehyde (戊二醛)。配 100ml FAA 固定液, 其组分为: Ethanol 50ml, Acetic Acid 5ml, 37% Formaldehyde 10ml, DEPC-H₂O 35ml。

(2) 脱水 脱水采用梯度脱水法, 用 8 个梯度依次脱水, 自然干燥, 最后到 100% 叔丁醇(表 3)。

(3) 杂交 ① HCl 处理和 Proteinase K 消化, 将样品在 0.2M HCl 中室温处理 20min 然后浸入 H₂O 中 2min 终止反应。37℃ 下, 2XSSC 中, 浸泡 30min。配新鲜的 Proteinase K 母液 20mg/ml, 取 2.5 μ l 加入 50ml 的 Proteinase K Solution (多加至没过载片的顶部, 将整张片子进行 Rnase 处理) 中, 终浓度为 1 μ g/ml, 37℃ 温育 30min。加入含 2mg/ml Glycine 的 PBS 中, 室温处理 2min 终止反应。② 再固定和脱水, 新配制 40 mg/ml Paraformaldehyde / PBS, 微波炉中(50℃)加热助溶冷至室温后使用, 将样品浸入其中处理 20min 固定。浸入 1XPBS 中处理 2 次, 每次 5min。新配制 1 ml/L Acetic Anhydride(醋酸酐)溶于 0.1mol/L TEA(三乙醇胺)。将样品浸入其中室温下处理 10min, 期间不断轻摇。浸入 1XPBS 中处理 2 次, 每次 5min。乙醇

梯度脱水, H₂O, 15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%。自然干燥后待杂交。③ 杂交, 杂交液用前充分振荡。将探针加到杂交液中, 浓度为 400~800ng/ml。预热杂交液至 45℃, 提前打开 42℃ 培养箱, 预热湿盒。每个片子涂 40 μ l, 轻轻盖一片等大的方形盖片, 两端堵上截短的载片, 盖上大载片, 形成一小室, 用 parafilm 封紧边缘。将载片放于湿盒中, 42℃ 过夜。将玻片放入 37℃ 2XSSC 的冰盒中, 漂去盖片, 再洗脱。

(4) 洗脱和 Rnase 处理 ① 洗脱, 首先 37℃ 下在染色缸中用 2XSSC 洗 2X15min, 然后 37℃ 下在染色缸中用 1XSSC 洗 2X15min。② Rnase 处理, 40 μ l 20mg/ml Rnase 储液 加入到 40ml NTE 中(终浓度 20 μ g/ml), 放入载片, 37℃ 温育 30min。37℃ 下用 0.5XSSC 洗 2X15min。放入 PBS 中, 4℃ 过夜或直接进行检测。

表 2 微生物 FISH 研究中常用的荧光染料

Table 2 Fluorochromes used for the detection of microorganisms by FISH

荧光染料 Fluorochrome	波长(nm) Wavelength		颜色 Color
	吸收光谱 Excitation	发射光谱 Emission	
止血环酸 AMCA	351	450	蓝色 Blue
异硫氰酸盐荧光素 FITC	492	528	绿色 Green
5-(6) 羧基-N-羧琥珀酰亚胺荧光素 FluoX	488	520	绿色 Green
四甲基异硫氰酸盐若丹明 TRITC	557	576	红色 Red
德克萨斯红 Texas Red	578	600	红色 Red
花青 3Cy3	550	570	橙/红 Orange/red
花青 5Cy5	651	674	红外线检测 Infrared

表 3 梯度脱水

Table 3 gradient dehydration

级别 Degree	1 2 3 4 5 6 7 8							
	DEPC 水 DEPC water	40	30	15	0	0	0	0
无水乙醇 Ethanol	50	50	50	50	25	0	0	0
叔丁醇 Tert-butyl alcohol	10	20	35	50	75	100	100	100

2.3 常用 FISH 技术

以上简单介绍了 FISH 技术的基本原理和操作,在此基础上,FISH 技术逐渐形成了从单色到多色、从中期染色体到粗线期染色体再向 DNA 纤维的发展趋势,灵敏度和分辨率正在由 mb 向 kb、百分距离向碱基对、多拷贝向单拷贝、大片段向小片段再向 BAC/YAC 等方向深入^[42]。

2.3.1 多色荧光原位杂交(mFISH) FISH 可利用不同颜色的荧光染料标记不同的探针,同时对一张玻片进行杂交,从而同时检测和定位不同的靶 DNA,即 mFISH。由于不同的荧光素之间可能发生光谱的重叠,故同时最多只能用 3 种荧光染料进行标记^[43]。

2.3.2 DNA 纤维荧光原位杂交(DNA fiber-FISH) Wiegant 等和 Heng 等在抽提 DNA 时尽量保持 DNA 的完整性从而得到 DAN 纤维,再以此线性化的 DNA 纤维为载体进行 FISH 杂交,使 FISH 的分辨率显著提高^[44,45],其主要特点就是高分辨率和高灵敏性。

2.3.3 酪胺信号放大荧光原位杂交(Tyramide signal amplification FISH TSAFISH)。即用辣根过氧化物酶(HRP)标记寡核苷酸,以荧光标记的酪胺为底物。TSA 系统可以提高信号强度 10~20 倍。

3 结语

荧光原位杂交技术是 1989 年在已有的放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传学技术,距今已经有十多年时间。在这段时间中,FISH 技术经历了一系列的发展,逐渐形成了快速、精确、原位以及可动态观察等特点。在 DNA 物理图谱构建,转基因的细胞学鉴定,检测外源染色体片段和探讨其渗入特点,研究基因组的结构、变异以及空间分布规律,研究物种间的亲缘关系等方面具有不可替代的作用。近几年来,FISH 技术逐渐向生态学领域尤其是微生物生态学领域渗透,利用此技术已经在微生物生态学研究取得了一系列重大成果。但是,任何技术都有不足之处,FISH 技术也不例外。样品自身产生的荧光,以及探针的特异性都会影响试验的结果^[46]。所以在进行微生物生态学研究应结合传统的培养、镜检等方法及现代分子生物学的多种方法,使得到的结果更加可信。随着技术的不断进步,FISH 的准确性和灵敏度将进一步提高,必将在微生物生态学研究领域得到更加充分的应用。

References:

- [1] Choi B K, Paster B J, Dewhirst F E, *et al.* Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect Immun*, 1994, **62**: 1889~1895.
- [2] Raap A K. Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutat. Res.*, 1998, **400**: 287~298.
- [3] Simon Nathalie, Biegala Isabelle C. Kinetics of attachment of potentially toxic bacteria to *Alexandrium tamarense*. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, **28**: 249~256.
- [4] Araya Ruben, Tani Katsuji, Takagi Tatsuya. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **43**: 111~119.
- [5] Liu J, Leff L G. Temporal changes in the bacterioplankton of a Northeast Ohio (USA) River. *Hydrobiologia*, 2002, **489**: 151~159.
- [6] Girguis P R, Delong E F. Anaerobic enrichment of methane-oxidizing archaeal/bacterial consortia in deep-sea marine sediments. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*, 2002, **102**: 327.
- [7] McNamara Christopher J, Lemke Michael J, Leff Laura G. Culturable and non-culturable fractions of bacterial populations in sediments of a South Carolina stream. *Hydrobiologia*, 2002, **482**: 151~159.
- [8] Ardern E, Lockett W T. Experiments of the oxidation of sewage without the aid of filters. *J. Soc. Chem. Ind.*, 1914, **33**: 523~539.
- [9] Lee T J, Kawaharasaki M, Matsumura M, *et al.* Microbial community structures of activated sludges dominated with polyphosphate-accumulating bacteria and glycogen-accumulating bacteria. *Environmental Technology*, 2002, **23**: 747~755.
- [10] Coskuner G, Curtis T P. *in situ* characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: Detection of *Nitrobacter* Spp. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **93**: 431~437.
- [11] Peraud O, Yousaf M, Hamann M T, *et al.* Microbial community analysis of a marine sponge that contains the anti-malarial compound manzamine A. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*, 2002, **102**: 337.
- [12] Brining Mary M, Lepp Paul W. Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 1687~1694.
- [13] Foster Jamie S, Palmer Robert J Jr. Human oral cavity as a model for the study of genome-genome interactions. *Biological Bulletin*, 2003, **204**: 200~204.
- [14] Swidsniski Alexander, Ladhoff Axel. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2002, **122**: 44~54.
- [15] Zoetendal Erwin G, Ben-Amor Kaouther. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by

- fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes, *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 4225~4232.
- [16] Buccat A, Juretschko S. Rapid identification of bacterial agents in community acquired pneumonia (CAP) using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*, 2002, **102**:144.
- [17] Buchbinder Susanne. Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture, *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, **292**: 241~245.
- [18] Pardue M L, Gall J G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, **64**:600~604.
- [19] John H, Birnstiel M, Jones K. RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature*, 1969, **223**: 582~587.
- [20] Ekong R, Wolfe J. Advances in fluorescence in situ hybridization. *Curr. Opin. Biotech*, 1998, **9**:19~24.
- [21] Giovannoni S J, DeLong E F, Olsen G J, *et al.* Phylogenetic group specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.*, 1988, **170**:720~726.
- [22] Pinkel D, Ladegent J, Collins C, *et al.* Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**:9138~9142.
- [23] DeLong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science*, 1989, **243**: 1360~1363.
- [24] Amann R, Krumholz L, Stahl D A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, 1990, **172**: 762~770.
- [25] Landegent J E, Baan R A, Hoeijmakers J H. 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp. Cell. Res.*, 1984, **153**:61~72.
- [26] Annte Moter, Ulf B. Gobel. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiological Methods*, 2000, **41**:85~112.
- [27] Li Zhen Ma Fluorescence in situ hybridization technology and application. *J. Qinghai University*, 2001, **1**:18~21.
- [28] Moter A, Hoenig C, Choi B K, *et al.* Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**:1399~1403.
- [29] Spear R N, Li S, Nordheim E V, *et al.* Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence in situ hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*. *J. Microbiol. Methods*, 1999, **35**:101~110.
- [30] Kagiya N, Yoshida K, Hamabata T, *et al.* A novel fluorescent method for in situ hybridization. *Acta Histochem. Cytochem.*, 1993, **26**: 441~445.
- [31] Yamaguchi N, Inaoka S, Tani K, *et al.* Detection of specific bacterial cells with 2-hydroxy-3-naphthoic acid-29-phenylanilide phosphate and Fast Red TR in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**:275~278.
- [32] Schonhuber W, Fuchs B, Juretschko S, *et al.* Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**:3268~3273.
- [33] Wagner M, Schmid M, Juretschko S, *et al.* In situ detection of avirulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, **160**: 159~168.
- [34] Cullander C. Fluorescent probes for confocal microscopy. *Methods Mol. Biol.*, 1999, **122**:59~73.
- [35] Krimmer V, Merkert H, von Eiff C, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:2667~2673.
- [36] Erhart R, Bradford D, Seviour R J, *et al.* Development and use of fluorescent in situ hybridization for the detection and identification of *Microthrix parvicella* in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.*, 1997, **20**:310~318.
- [37] Moter A, Leist G, Rudolph R, *et al.* Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology*, **144**:2459~2467.
- [38] Jurtshuk R J, Blick M, Bresser J, *et al.* Rapid in situ hybridization technique using 16S rRNA segments for detecting and differentiating the closely related gram-positive organisms *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**:2571~2578.
- [39] Roller C, Wagner M, Amann R, *et al.* in situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G1C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, 1994, **140**:2849~2858.
- [40] Lathe R. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J. Mol. Biol.*, 1985, **183**:11~12.
- [41] Lee N, Nielsen P H, Andreasen K H, *et al.* Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography — a new tool for

structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**:1289~1297.

- [42] Wang Ling. Progresses and application of fluorescence in situ hybridization, *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**:1101~1107.
- [43] Ning S B, Song Y C. Maize stress-related genes *nacl* and *clt* were localized on 10 L and 4 L respectively. *Chromosome Res.*, 2000, **8**:273.
- [44] Wiegant J, Kalle W, Mullenders L, et al. High resolution in situ hybridization using DNA halo pre-parations, *Hum Mol Genet.*, 1992, **1**:587~591.
- [45] Heng H H Q, Squire J, Tsui L C. High-resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**:9509~9513.
- [46] Margo C E, Bombardier T. The diagnostic value of fungal autofluorescence. *Surv. Ophthalmol.*, 1985, **29**:374~376.

参考文献:

- [27] 马莉贞. 荧光原位杂交技术及其应用. 青海大学学报, 2001, **19**(1):18~19.
- [42] 王玲. 荧光原位杂交的发展和应. 植物学报, 2000, **42**(11):1101~1107

2002 年生物类期刊影响因子排序表 * (节选)

名次	期刊名称	总被引频次	影响因子
1	生态学报	2257	1.206
2	植物生态学报	1045	0.968
3	植物学报	2927	0.904
4	遗传学报	983	0.888
5	生物多样性	333	0.842

2002 年环境类期刊影响因子排序表 * (节选)

名次	期刊名称	总被引频次	影响因子
1	自然资源学报	579	0.931
2	环境科学	1353	0.883
3	环境科学学报	885	0.761
4	水处理技术	522	0.626
5	环境污染治理技术与设备	128	0.612

2002 年 1534 种科技期刊影响因子总排序表 * (节选)

名次	期刊名称	总被引频次	影响因子
1	WORLD J OF GASTROENTEROLOG	1633	2.579
2	冰川冻土	674	2.426
3	地理学报	1204	2.301
4	地质学报	935	2.133
5	世界华人消化杂志	4151	1.926
6	中华肝脏病杂志	767	1.858
7	中华医院管理杂志	1638	1.708
8	草业学报	342	1.676
9	中国科学 D	1020	1.453
10	地理研究	559	1.418
11	中华传染病杂志	763	1.416
12	物理学报	2870	1.397
13	中华心血管病杂志	1649	1.370
14	中华医院感染学杂志	1362	1.349
15	CHIN PHYS	563	1.277
16	地理科学进展	276	1.245
17	中华结核和呼吸杂志	1812	1.239
18	生态学报	2257	1.206
19	高原气象	536	1.203
20	岩石学报	711	1.197

2002 年生物类期刊总被引频次排序表 * (节选)

名次	期刊名称	总被引频次	影响因子
1	植物学报	2927	0.904
2	生态学报	2257	1.206
3	应用生态学报	1087	0.684
4	植物生理学通讯	1430	0.348
5	植物生态学报	1045	0.968

2002 年环境类期刊总被引频次排序表 * (节选)

名次	期刊名称	总被引频次	影响因子
1	环境科学	1353	0.883
2	中国环境科学	922	0.610
3	环境科学学报	885	0.761
4	自然资源学报	579	0.931
5	上海环境科学	538	0.334

2002 年 1534 种科技期刊总被引频次总排序表 * (节选)

名次	期刊名称	总被引频次	影响因子
1	世界华人消化杂志	4151	1.926
2	科学通报	3321	0.706
3	植物学报	2927	0.904
4	物理学报	2870	1.397
5	高等学校化学学报	2707	0.782
6	中华外科杂志	2653	0.604
7	中华骨科杂志	2463	0.834
8	分析化学	2268	0.608
9	生态学报	2257	1.206
10	中华放射学杂志	2241	0.975
11	中国实用外科杂志	2044	0.989
12	第四军医大学学报	2025	0.769
13	中国中西医结合杂志	2003	0.472
14	中华医学杂志	2002	0.636
15	中草药	1999	0.478
16	中国临床康复	1984	0.927
17	中华内科杂志	1902	1.117
18	中华儿科杂志	1838	0.800
19	中华妇产科杂志	1838	0.800
20	中华结核和呼吸杂志	1812	1.239

* 数据源于 2003 年版“中国科技期刊引证报告”。