

1.4 荧光原位杂交技术^[4] 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是用生物素或地高辛等非放射性物质标记探针,根据碱基配对原则进行杂交,并通过荧光素偶联的抗原抗体检测系统,在组织、细胞及染色体上对 DNA 或 RNA 进行定性及定位分析的一种技术。FISH 技术经不断改革和完善,已衍生为一个系列,包括染色体涂染、间期荧光原位杂交、多色荧光原位杂交和 DNA 纤维荧光原位杂交等。FISH 技术在基础和临床都得到了广泛应用,例如基因制图、染色体进化、先天畸形诊断、肿瘤诊断和产前诊断等。

1.5 免疫组织化学技术^[5] 免疫组织化学又称免疫细胞化学,它利用抗体与抗原之间的结合具有高度特异性这一特性,将抗原抗体间的免疫反应引入组织切片或细胞标本中待测抗原或抗体作定性、定位、定量检测。免疫组织化学的全过程包括抗原的提取和纯化、免疫动物或细胞融合、抗体效价检测和纯化、标记抗体、细胞和组织切片的制备、免疫组织化学反应和显色、观察和分析结果等。目前常用的免疫组织化学方法有 3 种:过氧化酶-抗过氧化酶(抗体)复合物(PAP 法)、卵白素-生物素复合物(ABC 法)、链霉亲和素(SABC 法)。免疫组织化学技术可用于病原体、癌基因和抗癌基因及其表达水平等方面的检测。

1.6 基因芯片技术^[6] 基因芯片技术是一种建立在杂交测序基本理论上的全新技术,该技术是将许多特定的基因片段有规律地排列固定于支持物上,然后通过对待测的标记样品按碱基配对原理进行杂交,再通过检测系统对其进行扫描,并用相应软件对信号进行比较和检测,得到所需的大量信息,进行基因高通量、大规模、平行化、集约化的信息处理和功能研究。它的出现,使基因序列测定、基因功能测定等工作的程序得到了极大的简化。基因芯片技术使用了包括光控固相化学合成、激光共聚焦等在内的多项先进技术,试验实现了全部自动化,操作极为简便。该项技术,已经在基因多态性分析、基因表达分析等多方面得到了广泛的应用,并已开始应用于临床诊断。

2 基因诊断疾病的分类^[7]

2.1 感染性疾病的病原诊断 例如人乳头瘤病毒、肝炎病毒、结核杆菌、HIV、人类巨细胞病毒、疱疹病毒(EB)、淋病奈瑟菌、幽门螺杆菌、脑膜炎奈瑟菌、螺旋体及疟原虫、弓形虫以及支原体、衣原体、立克次体等的检测。

2.2 遗传病的基因异常分析 例如血红蛋白病、苯丙酮尿症、杜氏肌营养不良症等疾病的诊断。

2.3 各种肿瘤的生物学特性的判断^[8] 肿瘤是一类多基因病,其发展过程复杂,临床表现多样,涉及到多个基因的变化,并与多种因素有关,因而相对于感染性疾病及单基因遗传病来说,肿瘤的基因诊断难度较大。主要应用于以下几个方面:(1)肿瘤的早期诊断及鉴别诊断;(2)肿瘤的分级、分期及预后的判断;(3)微小病灶、转移病灶及血中残留癌细胞的识别检测;(4)在判断手术中肿瘤切除是否彻底、有无周围淋巴结转移方面也很有优势^[3]。

综上所述,与传统诊断方法相比较,基因诊断更灵敏、准确、快捷。而根据对致病基因的了解程度,基因诊断可采用不同的方法。分子诊断未来的发展方向是发挥其在疾病预测、预防 and 个性化治疗中的作用,充分发挥分子诊断在克服耐药性治疗中不可替代的作用^[9],同时必须关注分子诊断中的医学伦理和生物安全问题,并加强基因诊断技术的质量控制^[10]。

参考文献

- [1] 单祥年. 临床基因诊断[M]. 南京:南京师范大学出版社, 1999.
- [2] 周郁,周仲毅,周常文. 常用基因诊断技术及其进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10(5): 128-129.
- [3] 周逢仓,金明. 肿瘤的分子诊断及其研究进展[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2003, 2(1): 54-56.
- [4] 杜卫东. 现代分子生物学技术系列讲座(原位杂交技术)[J]. 徐州医学院学报, 1995, 15(3): 327-332.
- [5] 李金钢,杜央威,赵新全. 免疫组织化学实验技术研究[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版, 2006, 34(3): 145-147.
- [6] 曾争. 基因诊断技术在医学中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(7): 764-765.
- [7] 廖明星,周新颖,李晓琴,等. 基因诊断的进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(17): 2441-2442.
- [8] 殷正丰,温莹浩. 肿瘤分子诊断临床研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2006, 15(3): 9-11.
- [9] 吕学洗. 分子诊断学[M]. 北京:科学出版社, 2008.
- [10] 李金明. 临床分子诊断质量保证的重要性[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 11(7): 7-8.

(收稿日期:2010-06-27)

附睾与精子成熟

刘芙君 综述,李建远 审校(烟台毓璜顶医院中心实验室,山东烟台 264000)

【关键词】 附睾; 精子成熟; 男性不育

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.069

中图分类号:R698.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)20-2288-03

附睾精子成熟的概念最早在 20 世纪由 Young^[1] 提出,但当时并没有引起明显的反响,并且一直存在着两种不同观点,一种观点认为附睾精子成熟仅是时间依赖性的事件,即认为精子的成熟变化是随着精子在附睾转运过程中随时间推移而发生的,另一种观点认为附睾精子成熟是一个复杂的生理过程,主要受到来自附睾微环境和精子本身因素的影响。直到 20 世纪 60 年代 Bedford^[2] 和 Orgebin-Crist^[3] 根据试验明确提出了

附睾精子成熟的理论,睾丸产生精子并不成熟,缺乏运动和精卵结合能力,精子在附睾中的成熟不是自发和时间依赖的,而是通过与附睾分泌蛋白相互作用来完成。附睾液微环境组成随着不同区段而发生复杂和连续的变化。附睾上皮的分泌和吸收活动调节了附睾液的变化也因此决定了精子成熟的微环境^[4]。

20 世纪末,有关附睾精子成熟研究得到了快速发展,涌现

了一批附睾和精子成熟研究的专家。Yanagimachi 等^[5]发现仓鼠附睾具有特殊顶分泌方式,可参与附睾蛋白和精子质膜的相互作用。Kirchhoff^[6]于 1996 年首先建立了老年前列腺癌患者附睾 cDNA 文库,筛选出 6 个人附睾特异基因,后来试验表明这些基因对应蛋白结合在精子不同部位,发挥着不同功能。有学者一直致力于研究附睾结构功能,为了解附睾精子成熟和男性避孕提供了许多重要试验信息。这些学者的研究极大提升了人们对附睾精子成熟的认识。1992 年至今,已顺利开展了四届国际附睾专题会议,促进了附睾研究的快速进展,提升了附睾在男性生殖生物学研究的地位。

1 附睾的结构和功能

附睾由单根高度盘绕折叠的管道组成,通过输出小管与睾丸相连,通过输精管与尿道相连^[7]。形态学观察可以将附睾分为几个区段:附睾起始区(initial segment)、头部(caput)、体部(corpus)、尾部(cauda)和输精管(vas deferens)。人的附睾在所研究的物种中比较特殊,它没有明显的尾部,因此与其他物种相比,人附睾精子储备能力较弱。组织学观察,附睾管主要由上皮细胞组成,外面被平滑肌所包围,平滑肌外是结缔组织,体段的结缔组织较少,尾段相对较多。附睾上皮主要由以下几种细胞组成:主细胞(principal cell)、基细胞(basal cell)、晕细胞(halo cell)、狭窄细胞(narrow cell)、透明细胞(clear cell)和顶细胞(apical cell),每种细胞在附睾管中分布数量和大小并不均匀,这种显著的细胞组织结构差异反映了不同细胞在不同区段功能的差异^[8]。

超微结构观察,附睾细胞内一般可见有广泛的内质网和高尔基复合体,反映其活跃的蛋白合成活性。附睾细胞之间的紧密连接复合体组成了血睾屏障,构成了重要的生理和结构上的屏障,为附睾精子成熟提供了特殊的微环境,另外也为精子提供了免疫保护作用^[9]。

附睾具有较强的重吸收功能,99%的睾网液在附睾头部被重吸收;同时也具有活跃的分泌功能,可以分泌甘油磷酸胆碱、肉毒碱、糖蛋白及多种酶类,参与精子的成熟、代谢,维持附睾管腔的特殊微环境^[10];附睾的重吸收和分泌功能为精子浓缩、储存以及转运提供了基础;附睾还具有重要的免疫保护作用,分泌蛋白质附着于精子表面,可以保护精子固有抗原,附睾上皮细胞的微绒毛及其带有负电荷的糖蛋白构成的免疫屏障可以阻止精子抗原透过,同时血睾屏障可有效阻止大分子如精子抗原物质、血清蛋白等的交流,附睾基底细胞具有类似巨噬细胞功能,竞争性吞噬抗原物质,起屏障作用^[11]。

2 精子在附睾中的成熟

附睾精子成熟主要表现为运动能力与受精能力的获得,与其质膜的变化特别是膜蛋白的改变相关,成熟过程中膜蛋白发生复杂变化,包括膜蛋白质消失或增加、膜蛋白糖基化或磷酸化修饰、剪切、表面抗原的遮盖或暴露等^[12]。附睾蛋白可以直接或间接地参与精子膜复合物的构成和改变,或有助于保护精子的完整性来参与精子的成熟过程。以下列举了附睾蛋白与精子的主要相互作用关系。

2.1 直接修饰精子膜表面或其成分 通过体外或体内状态下共孵育附睾蛋白和精子可以了解附睾蛋白对精子膜的作用。通过顺序方法提取精子发现多数结合于精子膜表面的蛋白可以通过等渗盐溶液除去,少量可以通过去污剂提取出来^[13],而且,利用高离子强度洗脱液也只是获得了少数附睾精子膜蛋白。说明多数的结合在精子表面的附睾蛋白主要依赖周围环境的离子强度、低亲和性或直接作用于精子膜表面。这些蛋白

可以防止精子之间的相互作用,掩盖精子表面的一些位点,这些位点可以在附睾后精子功能活动中被激活如精卵结合、融合等过程。

2.2 整合入精子膜表面的蛋白 不同物种的研究中发现一些附睾蛋白可紧密结合或嵌入精子膜表面,这可能和附睾小体转运相关^[14]。大鼠附睾蛋白 D/E 是第 1 个被报道在附睾转运过程中结合在精子膜表面蛋白,属于 CRISP 家族,由附睾的近端分泌,和精卵融合相关,同时有助于精子的存活^[15]。这些蛋白可通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接在精子膜表面,如糖蛋白 HE5 结合在成熟人精子,并且结合强度和精子的成熟状态、附睾管腔蛋白浓度有关^[16]。

2.3 存在于精子膜外周环境 附睾液为精子成熟提供了特殊的微环境,丛生蛋白和乳铁蛋白是较为常见的管腔液蛋白,这些蛋白可能参与了精子转运过程中管腔液微环境的调控,同时一些蛋白也结合在精子上,但是随着精子在附睾转运过程中可能会部分的从精子表面脱落,这可能与外部蛋白浓度或精子成熟过程中膜表面性质改变有关系^[17]。

综上所述,附睾是精子成熟和存储的场所,精子在附睾管的转运过程中获得运动和受精的能力,然后以静息状态储存在附睾的尾部。其受精能力的获得除了来自精子膜的修饰、染色质的凝聚、运动和获能能力外,还是与某些附睾分泌蛋白相互作用的结果。因此,研究主要的附睾蛋白是全面了解精子成熟的关键,本实验室一直从事附睾精子成熟研究,已完成人附睾转录组和蛋白质组工作^[18],发现一批重要附睾蛋白,部分蛋白结合在精子表面直接参与精子成熟过程,以后将研究相关蛋白作用网络和调控途径,揭示更多精子成熟的关键蛋白和作用机制,期望对男性不育的诊断、治疗和男性避孕研究提供新的思路。

参考文献

- [1] Young WC. A study of the function of the epididymis. III. Functional changes undergone by spermatozoa during their transit through the epididymis and vas deferens in the guinea pig[J]. J Exp Biol, 1931, 8: 109-210.
- [2] Bedford JM. The status and the state of the human epididymis[J]. Hum Reprod, 1994, 9(11): 2187-2199.
- [3] Orgebin-Crist MC. The epididymis across 24 centuries [J]. Reprod Fertil Suppl, 1998, 53: 285-92.
- [4] Gatti JL, Castella S, Dacheux F, et al. Post-testicular sperm environment and fertility[J]. Anim Reprod Sci, 2004, 83: 321-339.
- [5] Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, et al. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster[J]. Am J Anat, 1985, 172(4): 317-330.
- [6] Kirchhoff C. Gene expression in the epididymis[J]. Int Rev Cytol, 1999, 188: 133-202.
- [7] Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function[J]. Hum Reprod Update, 2009, 15(2): 213-227.
- [8] Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M, et al. Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia[J]. Am J Anat, 1991, 191(3): 261-279.
- [9] Hermo L, Smith CE. The structure of the Golgi apparatus: a sperm's eye view in principal epithelial cells of the

- rat epididymis[J]. *Histochem Cell Biol*, 1998, 109(5-6): 431-447.
- [10] Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1998, 53: 119-136.
- [11] Moore HD. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage [J]. *Andrologia*, 1998, 30(4-5): 233-239.
- [12] Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation [J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 61(1): 7-17.
- [13] Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1998, 53: 119-136.
- [14] Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit [J]. *Asian J Androl*, 2007, 9(4): 483-491.
- [15] Cohen DJ, Rochwerger L, Ellerman DA, et al. Relationship between the association of rat epididymal protein "DE" with spermatozoa and the behavior and function of the protein [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56(2): 180-188.
- [16] Lamontagne N, Légaré C, Gaudreault C, et al. Identification and characterization of P31m, a novel sperm protein in *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59(4): 431-441.
- [17] Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, et al. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2005, 5(4): 1003-1012.
- [18] Li JY, Wang HY, Liu J, et al. Transcriptome analysis of a cDNA library from adult human epididymis [J]. *DNA Res*, 2008, 5(3): 115-122.

(收稿日期: 2010-04-27)

K-B 纸片扩散法药敏试验

谭 瑶, 赵 清 综述, 舒为群, 陈 浩 审校(第三军医大学军事预防医学院环境卫生教研室, 重庆 400038)

【关键词】 药敏试验; 纸片扩散法; 耐药监测

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.070

中图分类号: R446.5; R969.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)20-2290-02

细菌的耐药性和抗生素的合理使用是全球广泛关注的问题。其中细菌对抗生素敏感试验(以下简称药敏试验)在延缓和控制细菌耐药性、合理使用抗生素方面发挥着重要作用。它能对抗生素临床治疗的效果进行预测、监测耐药量、减少治疗错误。目前药敏试验的方法主要有: Kirby-Bauer 法(以下简称 K-B 纸片扩散法)、稀释法、E test 法以及运用全自动微生物分析仪(Vitek、Microscan、Sensititre ARIS、ATB 等)进行药敏测试。其中由 Bauer 和 Kirby 所建立的纸片琼脂扩散法, 即 K-B 纸片扩散法是各国临床微生物学实验室广泛采用的药敏试验方法^[1]。

早在 1993 年美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)法规指出, K-B 纸片扩散法适用于快速生长的细菌, 它们包括肠杆菌科、葡萄球菌科、假单胞菌属、不动杆菌属、产单核细胞李斯特菌和某些链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎球菌等稍加修改也同样适用, 但对苛养菌、厌氧菌、真菌、分枝杆菌等应遵照 NCCLS 的其他文件规定进行药敏试验^[2]。我国于 1995 年开始采用 NCCLS 1993 年和 1994 年关于药敏纸片法文件中的实验方法, 实现了国内耐药监测方法的标准化。虽然 K-B 纸片扩散法是 WHO 推荐使用的药敏试验方法, 但该方法与其他方法相比有其自身的优点和不足。

1 K-B 纸片扩散法的特点

1.1 K-B 纸片扩散法的优点 药敏试验具有重复性较好、操作简便、试验成本相对较低、结果直观、容易判读、便于基层开展的优点。在头孢西丁纸片法检测 *mecA* 基因介导的耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA)试验中, 头孢西丁纸片扩散法的特异性优于苯唑西林纸片扩散法、苯唑西林琼脂稀释法, 无假阳性出

现, 与 *mecA* 基因检测完全相符^[3]。有文献报道头孢西丁纸片扩散试验可用于检测各种表型的 MRSA, 尤其对低水平、异质性耐药的 MRSA, 其敏感性高于苯唑西林琼脂稀释法和 VITEK2 系统检测^[4]。进口的细菌自动快速监测仪、细菌抑菌圈测定系统虽然仪器先进可靠, 自动化程度高, 但这些仪器设备昂贵, 并且需要专业技术人员操作, 试验的仪器设备必须要有专用生物试剂, 价格较高, 不利于基层医院使用。

1.2 K-B 纸片扩散法的缺点 K-B 纸片扩散法虽然是一种传统、经典的药敏试验方法, 但随着计算机的发展为细菌检验自动化奠定了良好基础, 全自动微生物分析仪的推广和应用, K-B 纸片扩散法出现药敏试验假耐药、受人为因素影响较大、试验耗时长缺点也渐渐体现出来, 同时快速性、准确性方面存在不足。

尽管半自动细菌鉴定和药敏分析系统有诸多优点, 但是半自动细菌鉴定和药敏分析系统是一种不连续稀释, 通过检测浊度判读药敏结果, 并且对药物的选择缺乏灵活性, 在检测一些特殊菌株的耐药性时可靠性欠佳, 因此目前在临床工作中尚不能完全取代纸片扩散法。

2 K-B 纸片扩散法的操作技术要点

K-B 纸片扩散法受培养基的质量、细菌接种量、培养基、药敏纸片的质量、纸片含药的准确性和均匀性等诸多因素的影响较大^[5], 但是至今未对其做出明确的规范。现将纸片扩散法的操作技术要点总结如下, 为实现 K-B 纸片扩散法标准化提供参考。

2.1 菌液浓度

2.1.1 菌液浓度判定标准 对于任何细菌的药敏试验, 将提