论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1784-04

PCR法检测人类脲原体 *U. Parvum* 和 *U. Urealyticum*

张 新,蒲晓允 (第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037)

提 要:目的 建立2个快速、同步检测脲原体 *U. Parvum* 和 *U. Urealyticum* 的PCR反应体系。**方法** 根据脲原体尿素酶B基因序列,设计2对分别针对 *U. Parvum* 和 *U. Urealyticum* 的特异性引物,建立2个PCR反应体系。通过脲原体标准株和临床阳性标本的PCR产物测序以及进行特异性和敏感性实验,对2个PCR体系进行评价。应用2个PCR反应体系对48例临床标本进行脲原体检测以及与培养法检测脲原体进行方法学比较。**结果** 2个PCR体系能够检测 *U. Parvum*、*U. Urealyticum* 标准株和临床标本中脲原体,扩增产物长度与目的片段大小一致。标准株和2个临床阳性标本扩增产物测序结果与GenBank中公布的序列完全一致。2个PCR体系与其他14株细菌(包括5株有尿素酶细菌)无交叉反应,检测限度均为10拷贝/ul的重组质粒DNA。对48例临床标本同时进行PCR和培养法脲原体检测,PCR的阳性检出率为54.2%,培养法为39.6%($P<0.05$)。与培养法比较,PCR的灵敏度为94.7%,而与PCR法相比,培养法的灵敏度为69.2%。**结论** 2个PCR反应体系能够快速、同步进行临床标本中脲原体的分种鉴别,具有高度特异性和灵敏度。

关键词: *U. Parvum*;*U. Urealyticum*;PCR

中图法分类号: R375; R446.9 **文献标识码:** A

PCR assays for differential detection of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*

ZHANG Xin, PU Xiao-yun (Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish two PCR assays to rapidly and simultaneously detect *U. parvum* and *U. urealyticum*. **Methods** Two PCR assays were established through designing two sets of specific primer targeting urease gene B of *U. parvum* and *U. urealyticum*, respectively. The standard strains of *U. parvum* and *U. urealyticum* and the clinical samples were detected by these PCR assays and PCR products of the standard strains and two clinical specimens were directly sequenced and carried out specific and sensitive assays. Forty-eight clinical specimens were tested for culture and the PCR assays and tow methods were compared. **Results** The standard strains of *U. parvum*, *U. urealyticum* and the clinical specimens were successfully and differentially detected by the PCR assays and the sequencing results were found to have a complete similarity to the GenBank sequences. The 14 strains of other bacterial genera including 5 strains that produced urease were not amplified by these PCR assays. Each assay had a detection limit of 10 copies/μl of plasmid DNA. The positive rate in 48 clinical specimens by PCR (54.2%) was higher than that by culture (39.6%) ($P<0.05$). The sensitivity of PCR was 94.5% and that of culture was 69.2%. **Conclusion** Tow PCR assays were successfully developed for the rapid and simultaneous detection of *U. parvum* and *U. urealyticum* in the clinical specimens and they are both specific and sensitive.

Key words: Ureaplasma; *U. parvum*; *U. urealyticum*; PCR

人类脲原体与许多疾病的发生有关,包括非淋菌性尿道炎、反应性关节炎、绒毛羊膜炎、不良妊娠结局、新生儿肺炎等。近年来,人们已经将脲原体14个血清型重新分类为2个种,即Ureaplasma parvum(*U. Parvum* 或U. P)和Ureaplasma urealyticum(*U. Urealyticum* 或U. U)[1]。目前国内外对于能快速、同步检测脲原体U. P和U. U的方法报道较少。我们依据脲原体尿素酶B基因序列在U. P和U. U之间存在大约8.0%的差异[2],设计了针对U. P和U. U的特异性引物,建立2个能够快速、同步检测临床标本脲原体U. P和U.

作者简介:张 新(1970-),男,河南省荥阳县人,硕士研究生,主管技师,主要从事医学快速检验方面的研究。电话:(023)68755637

通讯作者:蒲晓允,E-mail: puxiaoyun@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-01-16;修回日期:2006-04-15

U PCR 反应体系。这些方法的建立对于诊断泌尿生殖道脲原体感染性疾病和研究脲原体不同的种与疾病发生的关系以及进行脲原体不同的种在人群分布的流行病学调查有着重要的意义。

1　材料与方法

1.1　主要实验器材

DNA 扩增仪（FX2500）；凝胶图像处理分析仪（SX-300）；紫外分光光度计（DU-65 Beckman）

1.2　菌株及其来源

人类脲原体标准株 U. P（ATCC27813）和 U. U（ATCC33695）由第三军医大学新桥医院皮肤科惠赠。其他 14 株临床分离株和标准株细菌由第三军医大学西南医院检验科和新桥医院检验科惠赠，包括大肠埃希氏杆菌（临床分离株）、阴沟肠杆菌（临床分离株）、阴道加德纳菌（ATCC14018）、金黄色葡萄球菌（ATCC29213）、人型支原体（临床分离株）、绿脓杆菌（临床分离株）、淋病奈瑟氏球菌（临床分离株）、志贺氏菌（临床分离株）、沙门氏菌（临床分离株）以及 5 株尿素酶阳性菌：奇异变形杆菌（临床分离株）、流感嗜血杆菌（临床分离株）、幽门螺旋菌（临床分离株）、肺炎克雷伯杆菌（临床分离株）、无乳链球菌（临床分离株）。

1.3　模板 DNA 制备

脲原体 U. P 和 U. U 标准株冻干粉溶解在 50 μl 裂解液（华美生物工程公司 PCR 检测试剂盒）中，按操作说明提取 DNA。固体和液体培养基中生长的细菌溶解在生理盐水后，按操作说明提取 DNA。临床棉拭子悬液标本按照试剂盒操作说明提取 DNA。

1.4　引物设计与合成

登录 GenBank，查找脲原体 U. P 和 U. U 尿素酶 B 基因序列，参考国内外文献设计两对引物。U. P 上游引物：5′-CAGGGGCAATTAATTTCGCTAGT-3′，下游引物：5′-TTTA-AGTTTTCCATTAACTAAGCCA-3′。U. U 上游引物：5′- CAG-GAGCAATTAACTTCGCTGAA-3′，下游引物：5′-TTTAAGT-TTTCCGTTAACTAAGCCG-3′。通过 blast 证实两对引物为 U. P 和 U. U 特异性引物。两对引物扩增产物长度都为 326 bp。上述引物均由上海申能博彩生物科技有限公司合成。

1.5　PCR 反应

除引物不同外，U. P 和 U. U PCR 反应体系的其他成分相同，总反应体积均为 50 μl。反应体系中各成分的终浓度为：Tris-HCl 10 mmol/L 、KCl 50 mmol/L、0.01% TritonX-100、$MgCl_2$ 1.5 mmol/L、HotStart *Taq* DNA polymerase 2.5 U（Bio Basic Inc. Canada）、引物各 0.25 μmol/L、4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L（上海申能博彩生物科技有限公司）、无菌三蒸水 19.5 μl 以及 5μl 模板 DNA 。两个 PCR 体系循环条件相同：95 ℃ 15 min，94 ℃ 30 s、54 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s 共 35 个循环后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物在 1.7% 琼脂糖凝胶中电泳并在紫外检测仪中检测。

1.6　PCR 产物直接测序

U. P、U. U 标准株 DNA 以及 2 份临床标本经 PCR 扩增后，用 PCR 产物提纯试剂盒（上海申能博彩生物科技有限公司）按操作说明提取产物，由上海申能博彩生物科技有限公司进行产物测序。

1.7　PCR 产物克隆、重组质粒 DNA 提取

U. P 和 U. U 标准株 DNA 的 PCR 扩增提纯产物与 pMD18-T Simple Vector（TaKaRa）连接，得到 pMD-U. P 和 pMD-U. U 重组质粒，再分别转化入 JM109 感受态细胞，在含有氨苄青霉素及 X-gal、IPTG 的 LB 平板上，进行蓝白斑筛选，挑选白色克隆，在 LB 培养基中振荡过夜（210 r/min）。采用碱裂解法提取 pMD-U. P 和 pMD-U. U 重组质粒 DNA，用 PCR 法对提取的质粒进行靶基因扩增，出现阳性结果的质粒用通用引物 M13 测序（上海申能博彩生物科技有限公司）并测定质粒 A_{260} 值，根据分子量大小计算出拷贝数。将 10^{10} 拷贝/μl 浓度的重组质粒 U. P 和 U. U 进行 10 倍的梯度稀释：10^8 ~ 10^0 拷贝数/μl，用于 PCR 敏感性实验。

1.8　临床标本的处理

48 例非淋菌性尿道炎患者的宫颈或尿道分泌物棉拭子样本各 2 份，1 份用于脲原体培养，1 份做 PCR 实验。患者均由新桥医院皮肤科门诊确诊为非淋菌性尿道炎。脲原体培养用脲原体肉汤培养基常规培养。

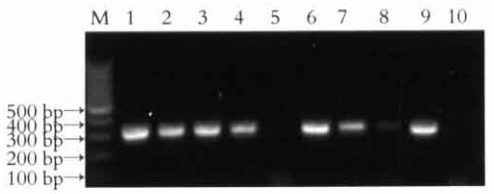
1.9　统计学分析

用 SPSS 10.0 软件进行 McNemar 检验。

2　结果

2.1　U. P、U. U 标准株 DNA 和临床标本的 PCR 扩增结果

U. P、U. U 标准株 DNA 分别在 U. P 和 U. U PCR 反应体系同步扩增，阳性结果见图 1。U. P 标准株 DNA 只能在 U. P 的 PCR 反应体系中得到扩增，在 U. U 反应体系中扩增为阴性结果（结果未记录）。U. U 标准株 DNA 也只能在 U. U 的 PCR 反应体系中被扩增，不能在 U. P 反应体系扩增（结果未记录）。U. P 和 U. U 标准株的扩增产物大小与目的片段大小一致均为 326 bp。每份临床标本同样也分别在 U. P 和 U. U PCR 反应体系中同步扩增，扩增产物的大小与目的片段大小一致均为 326 bp，阳性结果见图 1。



M：100 bp DNA 标准；1：U. P 标准株；2－4：临床标本 U. P 阳性；6：U. U 标准株；7－9：临床标本 U. U 阳性；5、10：阴性对照

图 1　标准株和临床标本的 PCR 扩增结果

2.2　扩增产物直接测序结果

标准株 U. P 和 U. U DNA 扩增产物的直接测序结果与 GenBank 中公布的序列完全一致。任选其中 1 份 U. P 和 1 份

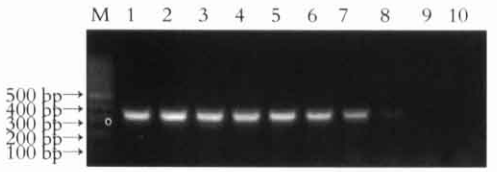
U.U 扩增阳性标本的 PCR 产物直接测序，测序结果与 GenBank 中公布的序列完全一致。

2.3 特异性实验

14 株其他细菌（包括 5 株尿素酶阳性菌）均不能在 2 个 PCR 反应体系中扩增。

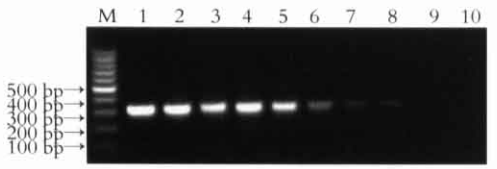
2.4 敏感性实验

pMD-U.P 和 pMD-U.U 重组质粒 DNA 经 PCR 扩增以及用共同引物 M13 测序，证实 U.P、U.U 标准株 PCR 扩增产物成功克隆。U.P 和 U.U PCR 反应体系检测限度均为 10 拷贝/μl 的重组质粒 DNA（图 2、3）。



M：100 bp DNA 标准；1－9：(10^8－10^0) 拷贝/μl 重组质粒 DNA；10：阴性对照

图 2 pMD-U.P 重组质粒 DNA 倍比稀释后的扩增结果



M：100 bp DNA 标准；1－9：(10^8－10^0) 拷贝/μl 重组质粒 DNA；10：阴性对照

图 3 pMD-U.U 重组质粒 DNA 倍比稀释后的扩增结果

2.5 培养法与 PCR 法检测临床标本脲原体的比较

同时用肉汤培养法和 PCR 法检测 48 例非淋菌性尿道炎患者临床标本中的脲原体，结果见表 1。培养法的阳性检出率为 39.6%，而 PCR 法的阳性检出率为 54.2%，两者阳性检出率有统计学差异（$P<0.05$）。PCR 法检测脲原体与培养法相比灵敏度为 94.7%，而培养法与 PCR 法相比灵敏度为 69.2%。26 例 PCR 阳性标本中 U.P 阳性 18 例（69.2%），U.U 阳性 8 例（30.8%）。

表 1 培养法和 PCR 法检测临床标本脲原体结果比较

PCR 法	培养法		合计
	+	−	
+	18	8	26(54.2%)
−	1	21	22
合计	19(39.6%)	29	48

3 讨论

柔膜体纲微生物是一类个体微小、缺乏细胞壁结构的原核微生物，与人类疾病有关的柔膜体纲微生物包括支原体和脲原体两个属。尽管临床标本中脲原体检测的“金标准”为培养法，但脲原体基因组小、缺乏细胞壁结构，其生长依赖于宿主细胞提供营养物质，因此在体外培养难度较大、时间长、易受多种因素影响而灵敏度差，并且必须进行选择性培养才能鉴定脲原体不同的种。PCR 检测脲原体具有高度灵敏性并可快速鉴别脲原体不同的种。在对临床标本同时进行培养法和 PCR 法检测脲原体的研究中，培养法的灵敏度是 40% ~91%，而 PCR 法的灵敏度为 90% ~100%[1]。尽管人类脲原体与多种疾病的发生有关，但确切的致病机制并不清楚。有学者提出某些人类脲原体感染性疾病与脲原体某一个种或某一个血清型的脲原体感染有关。Deguchi 等[3]研究发现 U.U 与男性非淋菌性尿道炎的发病有显著的相关性。但目前这样的提法并没有得到研究者们的普遍认可[1]。因此建立脲原体快速分种鉴别方法，对于脲原体致病机制的研究意义重大。PCR 已经成功用于临床标本中脲原体的检测，但国内外对于可同步鉴别脲原体不同种的 PCR 法报道较少。

在代谢过程中产生尿素酶分解尿素是脲原体的一个重要特征，因此脲原体尿素酶基因常作为 PCR 扩增的靶基因[1,4]。脲原体尿素酶基因族中有 7 个基因，其中尿素酶 B 基因序列在 U.U 和 U.P 之间存在 8.0% 的差异，而在每一种的各血清型之间高度保守[2]。因此我们依据该基因序列在 U.U 和 U.P 间的差异设计 2 对引物，建立 U.P 和 U.U PCR 反应体系，成功检测了 U.P 和 U.U 标准株以及对泌尿生殖道棉拭子标本中的脲原体进行分种鉴别。U.P、U.U 标准株和 U.P、U.U 临床阳性标本扩增产物的直接测序结果与 GenBank 中公布的序列完全一致，证实了 U.P 和 U.U PCR 反应体系对于脲原体分种鉴别的特异性。2 个 PCR 反应体系对 14 株其他细菌（包括 5 株有尿素酶基因的细菌）无交叉反应，说明 U.P 和 U.U PCR 反应体系对于检测脲原体具有高度的特异性。

我们成功地构建了 pMD-U.P 和 pMD-U.U 重组质粒 DNA，用于 U.P 和 U.U PCR 体系敏感性评价。2 个 PCR 反应体系检测限度均为 10 拷贝/μl 的重组质粒 DNA，比 Mallard 等[4]报道的用 Taqman 探针实时定量检测脲原体的敏感性低了 10 倍，这是由于琼脂糖凝胶电泳检测本身的局限造成。

对 48 例临床标本进行脲原体检测，PCR 法的阳性检出率为 54.2%，高于培养法 39.6% 的检出率，有统计学差异。因为我们未对临床标本做进一步的分类统计，所以无法对 PCR 法 54.2% 的脲原体阳性检出率与其他文献做比较。PCR 与培养法相比 PCR 的灵敏度是 94.7% 而培养法的灵敏度为 69.2%，与国外的报道一致[1]。在 19 例脲原体培养阳性的临床标本中，除 1 例 PCR 检测阴性外其他均为阳性，我们首先考虑该标

本中可能存在PCR反应抑制物。但对此标本用生理盐水进行了3次洗涤以及对模板DNA稀释后，重复PCR检测仍为阴性结果，可能为培养假阳性。因为我们采用肉汤培养基用于脲原体的培养，根据培养基的颜色变化判断阴、阳性结果，而没有转种固体培养基，因此不能判断此标本一定为培养阳性标本。所以用肉汤培养法对PCR法进行确切的评价，有一定的局限性。

Povlsen等[5]通过液相杂交法对脲原体阳性临床标本进行分型。生物Ⅰ型为80%，生物Ⅱ型为13.5%，两者同时存在为6.5%。我们的研究显示U.P阳性标本为69.2%，U.U阳性为30.8%，没有检测到U.P和U.U同时存在的标本，可能与标本量少有关。

总之，我们建立的2个PCR反应体系能够快速、同步对临床标本中脲原体进行U.P和U.U分种鉴别，具有高度特异性和灵敏性，可以用于临床泌尿生殖系统脲原体感染性疾病的检测以及用于研究脲原体不同种与疾病发生的关系和进行脲原体不同的种在人群分布的流行病学调查，同时为我们下一步建立脲原体U.P和U.U实时定量检测方法奠定了基础。

参考文献：

[1] COLAIZY T T, KUFORIJI T, SKLAR R S, *et al*. PCR methods in clinical investigations of human ureaplasmas: a minireview[J]. Mol Gen Metab, 2003, 80(4): 389-397.
[2] KONG F, JAMES G, MA Z, *et al*. Phylogenetic analysis of Ureaplasma urealyticum--support for the establishment of a new species, Ureaplasma parvum [J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49(Pt 4): 1879-1889.
[3] DEGUCHI T, YOSHIDA T, MIYAZAWA T, *et al*. Association of Ureaplasma urealyticum (biovar 2) with nongonococcal urethritis [J]. Sex Transm Dis, 2004, 31(3): 192-195.
[4] MALLARD K, SCHOPFER K, BODMER T. Development of real-time PCR for the differential detection and quantification of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum [J]. J Microb Meth, 2005, 60(1): 13-19.
[5] POVLSEN K, JENSEN J S, LIND I. Detection of Ureaplasma urealyticum by PCR and biovar determination by liquid hybridization [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(11): 3211-3216.

（编辑 龙 亮）

文章编号：1000-5404(2006)17-1787-01

个案与短篇

AMPA受体拮抗剂对新生鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

王丽雁，赵聪敏，张雨平，温恩鑫 （第三军医大学新桥医院儿科，重庆 400037）

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage，HIBD)是造成新生儿死亡和神经系统发育障碍的主要原因之一，目前尚无理想治疗方案。研究表明α-氨基-3-羟基-5-甲基异恶唑-4-丙酸(alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid，AMPA)谷氨酸受体在HIBD发生发展过程中起重要作用[1]。本实验建立HIBD动物模型，应用选择性非竞争性AMPA受体拮抗剂GYKI-52466进行干预，测定大鼠脑半球横截面积和脑内高分子量神经丝(heavy neurofilament，NF-H)蛋白表达变化，观察AMPA受体拮抗剂对HIBD的保护作用，为临床治疗HIBD提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

7日龄Wistar大鼠24只，体质量10～13 g，雌雄不限(第三军医大学实验动物中心提供)。小鼠抗大鼠磷酸化NF-H单克隆抗体(NeoMarkers公司)。AMPA受体拮抗剂GYKI-52466(Sigma公司)。SABC试剂盒、DAB显色试剂(武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及标本采集 7日龄Wistar大鼠分为假手术组、缺氧缺血组及GYKI-52466干预组，每组8只。参照Rice法制备HIBD模型：结扎左侧颈总动脉后置于缺氧仓内，以氧氮混合气(N 92%/O 8%)灌注2.5 h。缺氧缺血(HI)后出现自发左旋或夹尾左旋者纳入实验。假手术组暴露颈总动脉，不结扎，不缺氧；干预组于HI后即刻开始腹腔注射GYKI-52466，每次10 mg/kg，每小时1次，共4次；缺氧缺血组予等量生理盐水腹腔注射。各组大鼠于HI后1周4%多聚甲醛心脏灌注，断头取前脑，切除额极2 mm，剩余脑组织前半部分冰冻切片，片厚20 μm。

1.2.2 NF-H免疫组化 采用SABC法，磷酸化NF-H单克隆抗体(1∶200)室温孵育24 h。

1.2.3 图像分析 免疫组化染色结果用image-proplus 4.5图像分析处理软件进行分析。参照Paxinos[2]鼠脑立体定位图谱，选取前联合水平(Paxinos鼠脑立体定位图谱(13-14层面)冠状切片，于双侧脑半球选择3个位置相应、不重复的视野(胼胝体、外囊、纹状体各1个)，测出阳性染色积分光密度(IOD)

（下转1797页）

作者简介：王丽雁(1975-)，女，浙江省义乌市人，博士研究生，主治医师，讲师，主要从事缺氧缺血性脑损伤方面的研究。电话：(023)68774602，E-mail：wanglivan@163.com
通讯作者：赵聪敏，电话：(023)68755602
收稿日期：2005-10-31；修回日期：2006-06-16