维普资讯 http://www.cqvip.com

138-140

应用聚合酶链反应技术检测解脲脲原体

第一医院检验科 胥 飚 邢 艳 张玉洪 陈宏础 黄天禄 马志茹

提 要 本文就聚合酶链反应(PCR)技术检测解脲脲原体(UU)的方法建立与应用进行了探讨。利用互补于16SrRNA基因的一对引物，通过PCR对UU进行检测，扩增片段长度为397 bp。与46例培养对照，培养阳性9例，PCR阳性13例，而且其它相关微生物PCR检测无特异性扩增。对临床62例泌尿生殖道感染患者进行检测，阳性率为15/62(24.2%)。该法具有可靠、简便、快速等优点，用于解脲脲原体感染的临床诊断具有重要价值。

关键词 聚合酶链反应;解脲脲原体;核酸
中图分类号 R446.5

解脲脲原体(Ureaplasma Urealyticum,UU)是引起非淋菌性尿道炎(NGU)的主要病原体之一，首先由Shepard于1954年从尿道炎患者分泌物中分离获得。流行病学调查发现，UU感染占NGU的20－30%。UU除了引起NGU外，还可导致下列疾病:男性不育，尿路结石，女性生殖道感染，新生儿感染[1-2]。因此，UU致病性正日益受到重视。近年来发展起来的聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术，以其高敏感性和高特异性在微生物领域中广泛应用。我们选用互补于16SrRNA基因片段的一对引物，成功地建立了PCR检测UU的方法。

1 材料与方法

1.1 菌种由本科室培养、分离、鉴定 采用改良的Taylor－Robinson培养基[1-3]。

1.2 引物 选用互补于16SrRNA基因的特异性序列的一对引物。由北京大学生命中心合成、纯化。引物序列为:

UU－P_1 5′－CGAACGAAGCCTTTTAG－3′

UU－P_2 5′－CCTATCTTAGCGTTTCTTCCC－3′

利用此对引物进行PCR扩增，所获得的产物片段长度为397bp。

1.3 临床标本 采取本院门诊泌尿生殖道感染患者(诊断淋病的患者除外)的分泌物，共62例，其中男性14例，女性48例。采集方法是女性用棉拭子取宫颈分泌物，男性取前列腺液或尿道分泌物，均混悬于少许无菌生理盐水中。

1.4 模板DNA的制备 取标本100－300μl，加入1.5ml离心管中，加双蒸水补足至1.5ml，离心15000r/min，10min，弃上清;再用双蒸水洗涤一次，沉淀中加100ml标本处理液，弹匀沉淀，57℃孵育30min 取出煮沸10min，离心12000r/min，5min 上清液即为制备的模板DNA。

1.5 PCR扩增条件和方法 我们通过实验选择出最适反应条件，结果如下:

扩增反应总体积50μl，包括:10mmol/L Tris－HCl，50mmol/L KCl，1.5mmol/L $MgCl_2$，dNTPs各200μmol/L，Taq－DNA聚合酶1U(以上试剂均为华美生物公司产品)，再加入模板DNA 10μl，用50μl石蜡油覆盖，在温度循环仪(华美生物公司产品)上进行35个循环反应:94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 1min，最后72℃延伸10min。

1.6 扩增产物的检测 将扩增后的产物取20μl，加样于5%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，电泳完毕用EB染色，在紫外分析仪下参照DNA分子量标准进行结果判断。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2. 结果

2.1 PCR特异性鉴定

将UU与淋球菌、沙眼衣原体、大肠杆菌、铜绿杆菌、液化沙雷氏菌、粘液沙雷氏菌、变形杆菌同时检测，结果只有UU有特异性扩增带出现。

2.2 与培养法对照 我们将46例临床标本同时做了培养，结果培养有9例阳性，PCR检测有13例阳性，且培养结果为阳性的标本，PCR检测也均为阳性。

2.3 临床标本的检测 共收集标本62例，其中阳性15例。阳性电泳条带清晰，无非特异性干扰。如图。

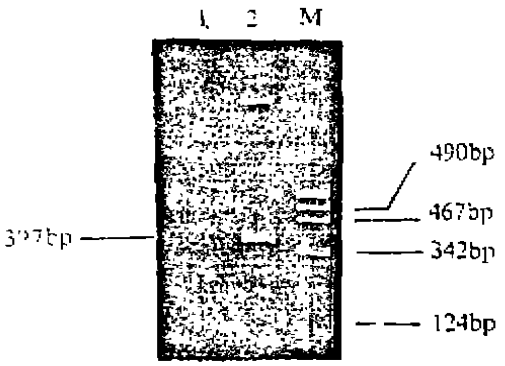


图:PCR检测UU结果(EB染色)
M:DNA分子量标准
1:阴性 2:阳性

3 讨论

解脲脲原体的检测方法已建立的有:培养法、斑点免疫结合试验(DIBA)、ELISA、ABC－ELISA、免疫斑点试验(IDT)等。培养法操作费时繁琐，需1周才能出报告。DIBA法需制备抗血清，如果所选用的抗原不能包括所有血清型的菌株，可能会出现漏检。ELISA、ABC－ELISA、IDT都具有一般抗体检测的缺点，易受人体免疫系统的影响。目前检测UU的DNA所用序列主要有两个:尿素酶基因和16SrRNA基因。16SrRNA基因是在进化上具有保守性的区域，同源性较高，可利用其进行特异性检测。UU的尿素酶基因也是特异的高度保守区域。我们根据文献[2]选用互补于16SrRNA基因的一对引物扩增目的基因，产物长度为397bp，取得了满意的效果。

方法的建立重要的是优化实验条件，我们通过对各个实验参数的逐一摸索，确定了PCR检测UU的最佳反应浓度和循环参数。在这种反应条件下，扩增后电泳结果出现一条清晰的特异性条带。为了证明其特异性，我们将UU与其它泌尿生殖道感染的常见病原体同时用PCR技术进行检测，结果只有UU出现特异性扩增，而淋球菌等七种病原微生物没有出现扩增，呈阴性结果。最后，我们利用该法检测了62例临床标本，阳性率与文献报道的20－30%基本一致，敏感性较培养法高。

该法简便快速，从处理标本到出结果仅4h左右，较常规采用的培养法大大节省了时间，只要把握好标本的处理及防污染等环节，结果是可靠的。由于UU的结构简单，极易破坏，有的文献报道直接用无菌双蒸水煮沸，即可使UU裂解，我们用此法效果不好，后来改用为Tris－EDTA缓冲液配制的蛋白酶K(浓度为200μg/dl)进行裂解，大大提高了检出率，而且此种裂解液成份简单，对PCR扩增反应的影响很小。因此，利用PCR检测UU明显地提高了临床诊断水平。

参考文献

1. 夏克栎、等.中华泌尿科杂志 1991;12(6):446
2. Scheurlen W,et al. Eur J Pediatr, 1992;151:740

维普资讯 http://www.cqvip.com

3. 叶应妩，王毓三 主编．全国临床检验操作规程．东南大学出版社．1991年，457
4. 多田晃司、出口隆、米田尚生，他．感染症学．1992;66(12):1621

(收稿日期 1995－10－16)

DETECTION OF UREAPLASMA UREALYTICUM BY POLYMERASE CHAING REACTION

Xu Biao, et al
The First Hospital

A polymerase chain reaction (PCR) procedure was developed for detection of Ureaplasma Urealyticum(UU). Seqences within a 16S ribosomal RNA gene from UU were used as extension primers for the PCR. A single DNA fragment of 397bp was amplified. The culture and the PCR were carried out for detection of UU In 46 urogenital swabs obtained from patients in our hospital. The culture－positive specimens were 9 cases and they were confirmed by PCR. in 4 of 37 culture－negative specimens, 397bp DNA fragment was detected and in the remaining specimens, PCR was negative for UU. No amplified product was detected in Chlamydia trachomatis DNA, N.gonorrhoeae DNA or other bacterial DNAs. UU sequences were detected by PCR in 15 of 62(24.4%)clinical specimens. The method was reliable and simple, and it could be applied for diagnosis of UU infection.

KEY WORDS Polymerase Chain Reaction, Ureaplasma Urealyticum, DNA

(上接第122页)

9. Astre C, et al. Clin Nutr 1992;11:30.
10. Smith RJ, et al. JPEN 1990;14:94.

(收稿日期 1995－11－21)

CHANGES OF PLASMA CLUTAMINE LEVEL IN RATS AFTER MASSIVE SMALL BOWET RESECTION

Wu Feng, et al
Dept. of Pediatric Surgery, Children Hospital

Recent studies demostrated that glutamine is the principal fuel used by the gastrointestinal tract, and the small intestine is the main organ of glutamine consumption. This study was desiqned to investigate the series changes of plasma glutamine in rats after massive small bowel resection, and explored the relation between the changes of ci culating glutamine and the remnant intestinal mucosa adaptatior. In the 1st to 14th postoperative days, a high fasting level of plasma glutamine was found with the highest value on the 7th postoperative day. However,there was no statistical difference in comparison with the control group($P>0.05$). This paper discussed that glutamine has trophic effect on the intestinal mucosa and suggested that glutamine may have widespread application in the repair of remnant gastrointestinal tissue after massivc small bowel resection.

KEY WORDS Glutamine; Small bowel; Resection