

实时荧光定量聚合酶链反应技术检测解脲脲原体生物群的研究*

董春雷, 朱长太(苏州大学附属常州肿瘤医院检验科, 江苏常州 213000)

【摘要】 目的 建立解脲脲原体生物群 Taqman 荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测方法。**方法** 根据解脲脲原体生物群 MBA 基因差异, 分别设计并合成引物和探针。优化引物和探针浓度及试验条件, 并进行试验的灵敏度、特异性和重复性评价。**结果** 生物 1 群最适缓冲体系: 25 μ L 反应体系中包含 2.5 U Taq 酶, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, 上、下游引物 0.1 pmol/L, TaqMan 探针 0.2 pmol/L, 模板 DNA 2 μ L。生物 2 群最适缓冲体系: 25 μ L 反应体系中包含 2.5 U Taq 酶, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, 上、下游引物 0.2 pmol/L, TaqMan 探针 0.3 pmol/L, 模板 DNA 2 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s; 55 $^{\circ}$ C (检测荧光信号) 20 s, 循环 40 次。该方法线性范围在 $1.0 \times 10^2 \sim 10^8$ copy/mL 之间, 检测限达到 100~200 copy/mL, 特异性达到 100%, CV 值为 2.5%。**结论** 本研究建立的 TaqMan 荧光 PCR 检测解脲脲原体生物群线性范围宽、灵敏度高、特异性及重复性好, 能够快速进行解脲脲原体生物群检测。

【关键词】 解脲脲原体; 实时荧光定量聚合酶链反应; 生物群; 检测

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.15.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)15-1800-03

Study on the detection of ureaplasma urealyticum biovars by real-time fluorescence quantitative PCR* DONG Chun-lei, ZHU Chang-tai (Department of Clinical Laboratory, Changzhou Cancer Hospital, Suzhou University, Changzhou, Jiangsu 213000, China)

【Abstract】 Objective To establish Taqman fluorescence quantitative PCR method for detecting ureaplasma urealyticum(UU) biovars. **Methods** Based on differences in MBA genes of UU, primers and probes which were designed. We optimized the concentration of primers and probes and test conditions, and assessed the sensitivity, specificity and reproducibility of the tests. **Results** Taqman fluorescence quantitative PCR buffer systems for biovar 1 were as follow: 25 μ L reaction systems contained 2.5 U Taq enzyme, the level of Mg^{2+} was 2.5 mmol/L, each of the upstream and downstream primer was 0.1 pmol/L, Taqman probe was 0.2 pmol/L, the template DNA was 2 μ L. Optimum buffer systems of biovar 2 were as follow: 25 μ L reaction system contained 2.5 U Taq enzymes, the level of Mg^{2+} was 2.5 mmol/L, each of the upstream and downstream primers was 0.2 pmol/L, Taqman probe was 0.3 pmol/L, the template DNA was 2 μ L. There were the PCR reaction conditions, step 1: 95 $^{\circ}$ C, 2 min; step 2: 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 55 $^{\circ}$ C (detection point of fluorescent signal), 20 s, 40 cycles. The linear range of the test ranges were from 1.0×10^2 copy/mL to 2.0×10^8 copy/mL. The sensitivity of detection reached 100—200 copy/mL, the specificity reached 100%, and CV value was 2.5%. **Conclusion** The new established Taqman fluorescent PCR method for detecting UU biovars, which has a wide linear dynamic range, a high sensitivity and specificity, and a good reproducibility, can be used to test quickly UU biovars.

【Key words】 ureaplasma urealyticum; real-time fluorescent quantitative PCR; biovar; detection

解脲脲原体(Ureaplasma urealyticum, UU)属脲原体(Ureaplasma),无细胞壁及前体,细胞器极少。UU通过黏附于呼吸道或泌尿生殖道的上皮细胞表面的受体定植^[1]。UU的致病物质主要有脲酶, IgA 蛋白酶及磷脂酶等^[2]。研究 UU 与疾病的关系最早是从非淋病性尿道炎开始的。近年来,大量研究证实: UU 与非淋病性尿道炎、前列腺炎、妇科疾病、不育症等多种疾病有关^[3-6]。由此, UU 对人体健康的危害不容忽视,有必要对其进行深入研究。目前, UU 可被分为生物 1 群(Ureaplasma parvum, biovar 1, parvo)和生物 2 群(Ureaplasma urealyticum, biovar 2, T 960)共 14 个血清型。UU 生物分群对于进一步研究 UU 的生物学特性及与临床致病性的关系都具有重要意义。鉴于目前临床上尚缺乏较好的 UU 快速分群的方法, 由此本课题拟采用的 Taqman 荧光定量 PCR 技术对 UU 进行生物群的检测, 其不仅可实现快速诊断(3 h 以内), 而且

还可以对 UU 进行生物群的定量分析。

1 材料与方法

1.1 引物和探针设计 在美国国立生物技术信息中心(NCBI)上查找出 UU 1~14 型多带抗原序列, 应用 DNAMAN 软件作多序列比对, 找出生物群保守性及特异性序列(图 1), 再以 primer express 3.0 软件设计引物及 Taqman 探针。UU 生物 1 群引物 F: 5'-ACA TCA G(T/C)TGA AAA CAA AAC AG-3'; R: 5'-GTT TTG GTT CAC GAG GTA AT-3'; 探针: 5'-FAM-AAA AGG TCA TTT G(G/A)TTG GTG AAA AA-TAM-RA-3'。生物 2 群引物 F: 5'-CAC TTA CTT AAC AA(A/G)AAA ATC(T/C)ACG T-3'; R: 5'-GCA GTT TTT AGT AA(T/G)CCA CCT T-3'; 探针: 5'-FAM-AAA TTA CCA CGT GAA CCA AAA GCT AAA-TAM RA-3'。

1.2 标准株及标准品

* 基金项目: 江苏省常州市卫生局资助课题(WZ200818)。

1.2.2 标准株 拟采用 UU 1~14 型(*Ureaplasma parvum* serovar 1~14, ATCC27813~27826)作为质控标准株。

1.2.3 标准品 由于核酸含有共轭双键,其在 260 nm 波长有吸收峰。DNA 的 $A_{260}=1.0$ 相当于 50 mg/L 双链 DNA(且呈一定的线性关系),由此,可以通过 A 值的测定确定待测核酸的绝对含量,进一步可依据已知核酸序列的理论分子量推算出待测核酸拷贝数(copy)。实验中,以紫外分光光度计测定聚合酶链反应(PCR)扩增获得的纯化目的产物的 A_{260} 值,通过 A 值获取目的产物的拷贝数。以 TE 缓冲液调整核酸液浓度分别至 1.0×10^2 、 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 copy/mL,放置于-20℃冰箱保存待用。

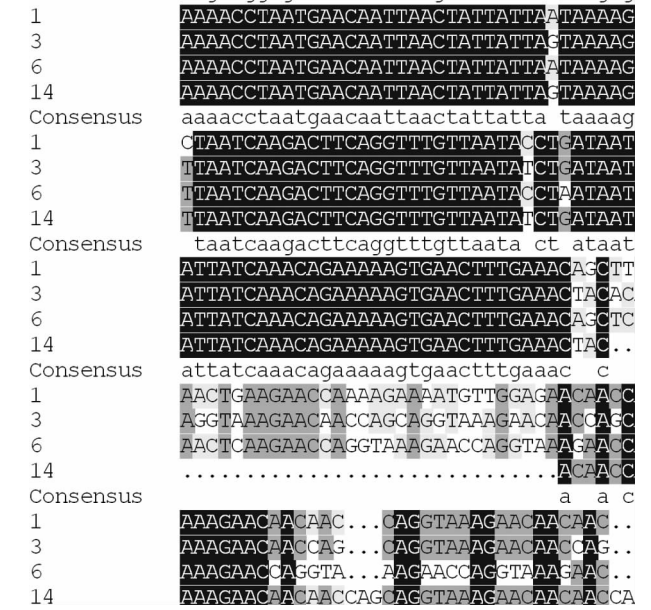


图1 DNAman 对生物 1 群(1,3,6,14 型)多序列比较结果(部分)

1.3 试验对照

1.3.1 阴性对照 分别以无菌等渗盐水和阴性标本作双阴性对照。

1.3.2 阳性对照 以 1.0×10^3 CCU UU3 标准株制备核酸模板作为生物 1 群荧光定量扩增临界阳性对照,以 1.0×10^6 CCU UU3 标准株制备核酸模板作为生物 1 群荧光定量扩增阳性对照。以 1.0×10^3 CCU UU4 标准株制备核酸模板作为生物 2 群荧光定量扩增临界阳性对照,以 1.0×10^6 CCU UU4 标准株制备核酸模板作为生物 2 群荧光定量扩增阳性对照。

1.4 DNA 提取 拭子样本加入 400 μ L 无菌等渗盐水,15 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;沉淀中加入 50 μ L 裂解液[配方:乙二胺四乙酸 0.05 mol/L,NaOH 0.05 mol/L,Triton 1.0%(V/V),Tris-HCl(pH 8.0)10 mmol/L],振荡混匀,100℃保温 10~15 min 后,稍振荡后 15 000 r/min 离心 5 min,备用。

1.5 Taqman 荧光定量 PCR 检测 (1)Taq 酶用量从 0.5~2.0 U,以 0.5 U 为梯度递增;Mg²⁺ 浓度从 1.0~4.0 μ mol/L,以 0.5 μ mol/L 为梯度递增;引物浓度从 0.1~1.0 pmol/L,以 0.2 pmol/L 为梯度递增;探针浓度从 0.1~0.5 pmol/L,以 0.1 mol/L 为梯度递增。(2)循环条件优化,循环条件 1:95℃ 2 min;95℃ 10 s;55℃ 20 s,循环 40 次。循环条件 2:95℃ 2 min;95℃ 5 s;60℃ 10 s,循环 40 次。通过扩增条件的优化,获得满意的扩增曲线。同时设立阴阳质控品和标准品对照,通过与标准品的 CT 值比较获得样本检测结果。

1.6 方法学评价 分别进行线性范围、敏感性、特异性、重复性试验等,以确定该方法可靠性。

A 线性范围以 Taqman 荧光定量 PCR 方法分别检测含 $1.0\times10^1\sim1.0\times10^8$ copy/mL UU 核酸,记录并以作回归分析,确定线性范围。B 敏感性以 Taqman 荧光定量 PCR 方法分别检测含 $10\sim10^5$ copy/mL 不同浓度的 UU 1~14 型标准株,重复试验 3 次,记录结果,分析其敏感性。C 特异性分别取淋球菌、衣原体、加德纳菌、乳酸杆菌、葡萄球菌、链球菌、白色念珠菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、棒状杆菌等微生物(泌尿道生殖道常见的寄生菌及致病菌),提取并制备样本 DNA,扩增后记录结果,作特异性分析。D 重复性试验将 12 份含不同拷贝数的阳性标本($1.0\times10^3\sim1.0\times10^8$ copy/mL)重复扩增 5 次,记录结果,作统计学分析。通过计算结果的变异系数(CV)来确定本试验的重复性。

1.7 临床标本采集及来源 105 例女性样本来源于本院皮肤性病科、泌尿外科及妇产科,标本以一次性无菌拭子采集宫颈口上皮细胞。

2 结果

2.1 最适 TaqMan 荧光 PCR 反应条件 生物 1 群:25 μ L 反应体系中包含 2.5 U Taq 酶,Mg²⁺ 2.5 mmol/L,上、下游引物 0.1 pmol/L,TaqMan 探针 0.2 pmol/L,模板 DNA 2 μ L。生物 2 群 25 μ L 反应体系中包含 2.5 U Taq 酶,Mg²⁺ 2.5 mmol/L,上、下游引物 0.2 pmol/L,TaqMan 探针 0.3 pmol/L,模板 DNA 2 μ L。PCR 反应条件:应用反应条件 1,实验获得的 CT 值最低和荧光强度增加值(ΔRn)最高,CT 值变化范围为 15~35。

2.2 本试验的线性范围、灵敏度、特异性及重复性试验 梯度稀释的浓度与 CT 值表现出良好的线性关系。两生物群检测在 $1.0\times10^3\sim1.0\times10^8$ copy/mL 时呈良好线性。两生物群的最低检出限为 100~200 copy/mL。检测的特异度为 100%,即不与泌尿道、生殖道常见的寄生菌及致病菌呈现交叉阳性。重复性试验显示,CV 值为 2.5%。

2.3 临床标本 UU 生物群检测结果 UU 生物群检测结果显示,105 例样本 55 株(52.38%)属于生物 1 群,50 株(47.62%)属于生物 2 群。

3 讨论

目前,将 UU 分为生物 1 群(*Ureaplasma Parvum*, biovar 1, parvo)和生物 2 群(*Ureaplasma urealyticum*, biovar 2, T960)共 14 个血清型的分类观点已经被接受^[7]。生物 1 群包括血清型 1、3、6 和 14,生物 2 群包括其余 10 个血清型。由于生物群与致病性有关^[8-9],故对 UU 分群有着重要意义。目前,能将 UU 分群的引物靶序列有:MBA 基因、16SrRNA、16S~23S rRNA 基因间隔区、尿素酶基因^[10-13]。MBA 是 UU 感染中被识别的主要抗原,也可能是一个重要的毒力因子,具有种特异性^[10]。其编码基因长约 1 200 个碱基,长度为 409 个氨基酸残基。其 N 端 1/3 为保守区,可以作为分群序列标志。因此,本试验采用 UU 多条带抗原编码基因为 UU 分群检测靶序列。

目前,研究中常以生长抑制试验(growth inhibition test, GIT)或代谢抑制试验(metabolism inhibition test, MIT)检测 UU 的生物群和生物型,即通过将多克隆抗 UU 血清添加到 UU 的固体或液体培养基中,通过观察抑制 UU 生长情况判断实验结果。这一方法不仅成本高耗时(通常需要数天至一周),而且免疫血清易发生交叉反应(5 型和 2 型,14 型和 3 型,8 型和 13 型)导致结果特异性差^[14]。

Taqman 荧光定量 PCR 技术近年来发展迅速,同常规

PCR 技术比较,该技术不仅可以进行定量分析,而且大大提高了检测的特异性、灵敏度,减少了污染概率,同时也提高了自动化程度。本研究建立的 Taqman 荧光定量 PCR 技术对 UU 进行生物群的检测,不仅实现快速诊断(3 h 以内),而且还可以对 UU 进行生物群的定量分析。本研究结果表明:上述 Taqman 荧光定量 PCR 技术检测 UU 生物群,梯度稀释的浓度与 CT 值表现出良好的线性关系。试验的最低检出限为 100~200 cfu/mL,提示方法较为敏感。该试验的特异度为 100%,说明本试验不受泌尿道、生殖道常见的寄生菌及致病菌的干扰。重复性试验结果 CV 值为 2.5%,表明该试验有很好的稳定性。这项技术应用临床后将有助于临床判断 UU 感染或正常携带,这也将有利于 UU 感染性疾病的诊断及合理治疗。此外,本研究还表明在本地区人群中以 UU 生物 1 群略占优势,未发现 UU 混合生物群。

参考文献

- [1] Smith DG, Russell WC, Thirkell D. Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human epithelial cells[J]. *Microbiology*, 1994, 140(Pt 10):2893-2898.
- [2] Desilva NS, Quinn PA. Characterization of phospholipase A1, A2, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes[J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 201(1-2):159-167.
- [3] Salari MH, Karimi A. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in men with non-gonococcal urethritis[J]. *East Mediterr Health J*, 2003, 9(3):291-295.
- [4] 余平,石歆莹.慢性前列腺炎患者沙眼衣原体和解脲支原体感染的实验室诊断[J]. *湖南医科大学学报*, 1998, 23(6):537-539.
- [5] Taylor-Robinson D. Evaluation of the role of *Ureaplasma urealyticum* in infertility[J]. *Pediatr Infect Dis*, 1986, 5(6 Suppl):262-265.
- [6] Robertson JA, Stemke GW, Davis JW Jr, et al. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*,

2002, 52(2):587-597.

- [7] 鲁梅格,石建莉,徐晨,等.溶脲脲原体生物分型方法的建立及应用[J]. *中华男科学杂志*, 2005, 11(3):175-184.
- [8] Chua KB, Ngeow YF, Lim CT. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovars to the presence or absence of bacterial vaginosis in pregnant women and to the time of delivery[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001, 20(1):65-67.
- [9] Ekimov AN, Zagrebina OS, Kisina VI. A method of genotyping clinical isolates of *Ureaplasma urealyticum* biovar Parvo[J]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 2001, (1):28-32.
- [10] Kong F, Zhu X, Wang W, et al. Comparative analysis and serovar-specific identification of multiple-banded antigen genes of *Ureaplasma urealyticum* biovar 1[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(3):538-543.
- [11] Robertson JA, Vekris A, Bebear C, et al. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of *Ureaplasma urealyticum*[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(4):824-830.
- [12] Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, et al. Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions[J]. *Res Microbiol*, 1993, 144(6):489-493.
- [13] Blanchard A. *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon[J]. *Mol Microbiol*, 1990, 4(4):669-676.
- [14] Echahidi F, Muyldermans G, Lauwers S, et al. Development of monoclonal antibodies against *Ureaplasma urealyticum* serotypes and their use for serotyping clinical isolates[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, 7(4):563-567.

(收稿日期:2011-03-16)

(上接第 1799 页)

醉方法对 TEG 各参数均无影响,静脉复合诱导插管七氟醚维持比全静脉麻醉术中更不易致高凝状态,如麻醉手术中出现凝血功能异常,应多从麻醉方法以外并结合患者全身情况去分析,并及时对症治疗。麻醉手术中如有可能应尽量减少用药的种类,否则当出现凝血功能异常时难对症处理。

参考文献

- [1] 区锦燕,廖荣宗,周曙,等.股骨多段闭合骨折患者术前凝血功能的变化[J]. *中华麻醉学杂志*, 2004, 24(7):534-536.
- [2] 廖荣宗,区锦燕,吴征杰,等.股骨骨折术前血栓弹力图的价值[J]. *中国骨伤*, 2005, 18(3):129-131.
- [3] 陈新,张国祯,张红.血栓弹力图在高凝状态检测中的应用[J]. *上海医科大学学报*, 1994, 3(21):125-127.
- [4] 赖启明.应用血栓弹力图描记术动态观察高凝状态的改变[J]. *临床检验杂志*, 1996, 14(6):316-319.
- [5] Hollmann MW, Kathrin S, Wiczorek MS, et al. Epidural anesthesia Prevents hypercoagulation in patients undergoing major orthopedic surgery[J]. *Reg Anesth Pain Med*,

2001, 3(26):215-222.

- [6] Sharma SK, Philip J. The effect of anesthetic techniques on blood Coagulability in parturients as measured by thromboelastography[J]. *Anesth Analg*, 1997, 1(85):82-86.
- [7] Brueckner S, Reinke U, Roth-Isigkeit A, et al. Comparison of general and Spinal anesthesia and their influence on hemostatic markers in patients undergoing total hip arthroplasty[J]. *J Clin Anesth*, 2003, 9(15):433-440.
- [8] 胡戈,葛衡江.麻醉对凝血的影响. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2007, 28(5):406-408.
- [9] 庄心良,曾因明,陈伯銓. *现代麻醉学*[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2009:167.
- [10] Harn N, de Rossi L, Robitzsh T, et al. Sevoflurane inhibits unstimulated and agonist-induced platelet antigen expression and platelet function in whole blood in vitro[J]. *Anesthesiology*, 2001, 95(5):1220.

(收稿日期:2011-05-18)