

上进行,且最后加 Taq 酶;(3)PCR 结束后,产物不能在室温条件下放置时间过长;(4)也可通过适当增加 PCR 循环次数减少引物错配。因此,可保证多重 PCR 的稳定性,减少非特异性配对,减少二聚体发生。引物在本试验中,多重 PCR 可以扩增出与传统单重 PCR 一致的特异条带(图 1);47 株鲍曼不动杆菌通过用多重 PCR 检测,亦与传统单独的 PCR 扩增产物结果一致(图 2)。

此外,多重 PCR 除了上述的稳定性和灵敏性外,还具有一定的灵活性。其表现在随着研究的推进,此方法可以根据引物的退火温度、目的基因的长度及目的基因的临床意义,向引物复合物内加入检出率更高、与药敏关联更清晰的目的基因引物,也可以去除鲍曼不动杆菌中检出率低或临床意义不明确的耐药基因。

综上所述,可同时检测 blaOXA-23, CarO, aac(6′)-I, blaOXA-51, ant(3′′)-I 和 intI1 的多重 PCR 不仅灵敏度高、稳定性强还有较好的灵活性。此外,6 种耐药基因与细菌耐药有清晰的对应关系,可及早、高效地据此指导临床用药,控制医院内感染。

参考文献

[1] Munoz-Price LS, Weinstein RA. acinetobacter infection [J]. N Engl J Med, 2008, 358(12): 1271-1281.
[2] Maragakis LL, Perl TM. Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(8): 1254-1263.
[3] Khorsi K, Messai Y, Hamidi M, et al. High prevalence of multidrug-resistance in Acinetobacter baumannii and dissemination of carbapenemase-encoding genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like and blaNDM-1 in Algiers hospitals [J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(6): 438-446.
[4] Azimi L, Lari AR, Talebi M, et al. Comparison between phenotypic and PCR for detection of OXA-23 type and

metallo-beta-lactamases producer Acinetobacter spp [J]. GMS Hyg Infect Control, 2013, 8(2): Doc16.

[5] Hou C, Yang F. Drug-resistant gene of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51 and blaOXA-58 in Acinetobacter baumannii [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 13859-13863.
[6] Ji S, Chen Y, Ruan Z, et al. Prevalence of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase genes in Acinetobacter spp. isolates in China [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(6): 989-997.
[7] Solomennyy A, Goncharov A, Zueva L. Extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii belonging to the international clonal lineage I in a Russian burn intensive care unit [J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 45(5): 525-528.
[8] Wen JT, Zhou Y, Yang L, et al. Multidrug-resistant genes of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases in Acinetobacter baumannii strains [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2): 3842-3849.
[9] Chang-Tai Z, Yang L, Zhong-Yi H, et al. High frequency of integrons related to drug-resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii [J]. Indian J Med Microbiol, 2011, 29(2): 118-123.
[10] Bedenic B, Plecko V, Sardelic S, et al. Carbapenemases in gram-negative bacteria: laboratory detection and clinical significance [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 841951.
[11] Yang H, Huang L, Barnie PA, et al. Characterization and distribution of drug resistance associated β -lactamase, membrane porin and efflux pump genes in MDR A. baumannii isolated from Zhenjiang, China [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 15393-15402.

(收稿日期: 2017-02-02 修回日期: 2017-04-18)

• 临床探讨 •

职业性慢性苯中毒患者血小板线粒体基因组 9bp 序列基因多态性研究^{*}

王佃鹏, 杨祥丽, 曾亚楠, 李培茂, 张志敏, 林大枫, 杜晓倩, 张艳芳[△], 黄先青

(广东省深圳市职业病防治院 518001)

摘要:目的 探索轻度苯中毒者血小板线粒体基因 9 个碱基(9bp)序列基因多态性变化规律。方法 选取 27 例轻度苯中毒者作为病例组, 40 例健康检验者作为对照组。抽取其肘部静脉血, 乙二胺四乙酸抗凝, 分离纯化血小板然后进行血小板计数并提取脱氧核糖核酸, 聚合酶链式反应扩增线粒体基因, 测序并分析其基因 9bp 基因多态性频率。结果 轻度苯中毒者血小板线粒体基因 9bp 的删除基因型频率(33.3%)高于对照组(10.0%), 差异有统计学意义($\chi^2=5.090, P=0.024$), OR 值(95%CI)为 4.5 (1.21~16.62)。结论 说明线粒体基因组 9bp 序列删除基因型可能是苯中毒的风险基因之一, 携带删除基因型的个体苯中毒发生风险增高。

关键词: 苯中毒; 线粒体; 基因多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.037 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)12-1782-03

近年来, 苯及苯系物中毒病例报道逐年上升, 苯中毒后致白血病死亡病例也逐年上升, 危害非常严重。苯主要致病机制

存在争论, 之前大量的研究发现苯中毒主要是中间活性代谢产物作用于线粒体通过氧化损伤引起的^[1]。有研究表明慢性苯

^{*} 基金项目: 广东省深圳市卫生计生系统科研项目(201607059); 广东省深圳市科技计划项目(JCYJ20160429090813380)。

[△] 通信作者, E-mail: 1392343151139@139.com。

中毒的发生除与苯的接触浓度有关外,还与接触者的遗传易感性有关。线粒体细胞色素 C 氧化酶亚单位 II (MTCO2) 和线粒体转运核糖核酸(tRNA) 赖氨酸(MTTK) 基因间的小片段非编码序列含有 2 个串联重复的 9bp 序列(CCCCCTCTA), 存在着删除和插入基因多态性。这种位点的基因多态性与多种遗传疾病的发生有关^[2], 但未见与苯中毒易感基因方面的研究。血小板的主要细胞器之一是线粒体, 线粒体是其唯一具有遗传功能的细胞器^[3], 分离后的血小板可直接提取 DNA 用于线粒体基因分析。本研究对职业性慢性苯中毒患者进行线粒体基因 9bp 基因多态性频率的分析, 探讨线粒体基因 9bp 基因多态性与职业性慢性苯中毒发病的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组选择 2012 年 1 月 1 日至 2015 年 12 月 31 日来本院就诊的 27 例轻度苯中毒患者, 其中男 6 例, 中位年龄 39.8 岁; 女 21 例, 中位年龄 40.7 岁。病例组纳入标准: 根据 GBZ68-2013《职业性苯中毒诊断标准》确诊为职业性慢性苯中毒患者。对照组选择同期 40 例体检健康者, 其中男 24 例, 中位年龄 42.1 岁; 女 16 例, 中位年龄 35.3 岁。对照组纳入标准: (1) 无职业性苯接触史; (2) 无吸烟、饮酒史; (3) 无遗传疾病或家族史; (4) 近 3 个月无内无感染史、服药史; (5) 近 3 个月内无 X 射线或其他放射线接触史。全部受试者抽取肘部静脉血标本 5 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA) 抗凝。

1.2 仪器与试剂 ABI Step one pluss 荧光聚合酶链反应(PCR) 扩增仪(美国应用生物公司)、可调定量加液器(德国塞默科学公司)、超净工作台(中国济南鑫贝西生物技术有限公司)、分光光度计(日本日立科学仪器公司)、XE-5000 血液分析仪(日本 Sysmex 公司)、电动离心机(美国贝克曼库尔特)。天净沙系列柱式血液 DNA 提取试剂(中国北京天恩泽基因公司), GoTaq® Long PCR Master Mix PCR 反应试剂(普洛麦格(北京)生物技术有限公司), 双蒸水(中国上海生工生物工程公司), DNA 引物合成物(中国上海生工生物工程公司)。

1.3 方法

1.3.1 血小板提取 取 2 mL 全血离心(100×g, 离心 15 min) 分离上清液即为富血小板血浆, 并对其进行全血细胞计数。

1.3.2 细胞 DNA 的提取 吸取 200 μL 富血小板血浆, 按照天净沙系列柱式血液 DNA 提取试剂说明书提取。

1.3.3 荧光 PCR 反应体系 反应体系采用 GoTaq® Long PCR Master Mix 反应试剂, 其中 Master Mix 反应液 10 μL, 上下游引物(10 pmol/μL) 各 1 μL, 双蒸水 8 μL, 总体积 20 μL。反应条件: 95℃ 10 s; 95℃ 5 s, 58℃ 30 s, 72℃ 50 s, 35 个循环。上游引物: 5'-TATGCCCTTTTCCTAACACT-3', 下游引物: 5'-TTGGGTG ATGAGGAATAGTGTAAG-3'。PCR 扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳分离, 用于分析评估扩增产物的大小(748 bp)。对 PCR 产物进行纯化和测序分析(中国上海生工生物工程公司)。获得的序列与 GenBank 认可的标准线粒体基因序列(NC_012920.1) 通过 nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) 和 BioEdit 软件对比分析, 检测 MTCO2 和线粒体 tRNA 赖氨酸(MTTK) 基因间的小片段非编码序列间 CCCCCTCTA 碱基基因多态性情况。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS16.0 统计软件处理, 组间比较采用 χ^2 检验分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, 采用 Logistic 回归分析比较两组样本基因型、相对优势比(OR), 95% 置信区间(CI) 来衡量风险等位基因与苯中毒发病风险之

间的相关性。

2 结果

2.1 基因测序结果 所有的 PCR 片段都被成功测序, 这些片段来自于轻度苯中毒患者线粒体 DNA 中的基因(图 1)。

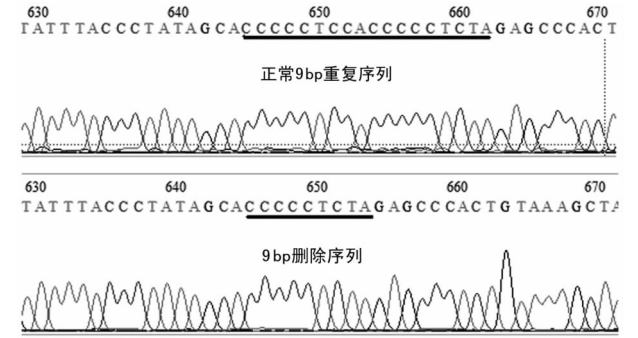


图 1 血小板线粒体基因 9bp 序列对比

2.2 血小板线粒体基因 9bp 基因多态性结果 血小板线粒体基因 9bp 序列基因多态性结果见表 1。

表 1 血小板线粒体基因 9bp 序列基因多态性频率

基因型	病例组 [n(%)]	对照组 [n(%)]	OR(95%CI)	χ^2	P
9bp 重复	18(66.7)	36(90.0)	1	5.612	0.018
9bp 删除	9(33.3)	4(10.0)	4.5(1.21~16.62)	5.090	0.024

3 讨论

苯通过多种有毒代谢产物导致血液毒性和白血病的发生。最近研究表明, 单独加入浓度非常高的苯到 HL60 细胞中, 可以增加活性氧(ROS) 的水平, 并引起细胞毒性^[4]。苯的基本代谢到毒性代谢物形成过程一般被认为是苯致毒性的一个关键因素。部分切除肝脏的大鼠和氧化应激调控基因敲除的小鼠的苯代谢毒性却显示明显下降。有研究表明一定剂量的苯可以降低线粒体膜电位, 诱导骨髓细胞发生凋亡^[5]。线粒体是最重要的细胞器, 通过氧化磷酸化这一个重要途径, 产生三磷酸腺苷(ATP)。这个途径是由一组蛋白质复合体和线粒体呼吸链共同参与完成, 它们受到核和线粒体基因组的共同控制。线粒体基因组与核基因组最显著的区别是它们对损伤的遗传易感性。线粒体 DNA 更容易损伤, 是由于它缺乏组蛋白的保护, 修复能力有限, 并靠近电子传递链, 它不断产生超氧自由基可对其自身造成损伤^[6]。线粒体在 ATP 新陈代谢、自由基的产生和细胞凋亡的调节起重要作用^[7], 线粒体 DNA 的基因多态性影响着线粒体整体功能的发挥, 从而会影响细胞能量的能力, 增加氧化应激, 触发由 ROS 介导的 DNA 损伤, 并改变细胞免疫系统对凋亡诱导的反应能力^[8]。因此线粒体基因在苯中毒的进程中发挥了重要的作用。

血小板包含完整功能的线粒体, 而且血小板无细胞核, 线粒体是其唯一具有遗传功能细胞器。外周血液的血小板通过抽血进行简易离心就可以获得, 血小板线粒体代表代谢活性器官的线粒体, 已经作为一些疾病的生物标志物被检测^[9]。血小板线粒体的变化被发现是糖尿病和动脉粥样硬化中的敏感指标。MTCO2 和线粒体 tRNA 赖氨酸基因间的 9bp 基因型可能影响下游基因如线粒体三磷酸腺苷 6、线粒体三磷酸腺苷 8、线粒体细胞色素 C 氧化酶亚单位 III, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和线粒体细胞色素 B 的表达, 这些基因都是呼吸链的关键结

构组成。他们的变化影响着氧化磷酸化的功能,从而整体影响 ATP 的合成^[10]。本研究发现职业性慢性苯中毒患者血小板线粒体基因 9bp 删除基因型频率明显高于对照组,其原因可能是 9bp 删除基因型导致线粒体功能下降,对于苯代谢物毒性作用更加敏感。有研究表明苯中毒患者出血倾向比较严重,苯中毒进程中血小板参数发生明显的变化,说明血小板对苯中毒是比较敏感的指标。

本研究表明血小板线粒体基因 9bp 删除基因型是苯中毒患者的易感基因,由于样本量的限制,未来的研究中有必要扩大样本量,并协同靶点蛋白表达功能进行进一步的群体遗传学验证。

参考文献

- [1] 宋学术,张华,梁艳,等. 2004—2013 年青岛市职业性慢性苯中毒发病特点分析[J]. 职业与健康, 2015, 31(20): 2862-2864.
- [2] Yis U, Ezgu FS, Karakaya P, et al. A novel mutation in the mitochondrial DNA cytochrome b gene (MTCYB) in a patient with Prader Willi syndrome[J]. J Child Neurol, 2015, 30(3): 378-381.
- [3] Puskarich MA, Kline JA, Watts JA, et al. Early alterations in platelet mitochondrial function are associated with survival and organ failure in patients with septic shock[J]. J Crit Care, 2016, 31(1): 63-67.
- [4] Singh MP, Ram KR, Mishra M, et al. Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to Drosophila melanogaster; alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS gen-

eration and oxidative stress markers[J]. Chemosphere, 2010, 79(5): 577-587.

- [5] Sarma SN, Kim YJ, Song M, et al. Induction of apoptosis in human leukemia cells through the production of reactive oxygen species and activation of HMOX1 and Noxa by benzene, toluene, and o-xylene[J]. Toxicology, 2011, 280(3): 109-117.
- [6] Salehi MH, Kamalidehghan B, Houshmand M, et al. Gene expression profiling of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) complex I in Friedreich ataxia (FRDA) patients[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94069.
- [7] 黄恬. 线粒体功能障碍与脓毒症诱导的 MODS 研究进展[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(19): 2136-2138.
- [8] Yang Y, Jiang L, She Y, et al. Olaquinox induces DNA damage via the lysosomal and mitochondrial pathway involving ROS production and p53 activation in HEK293 cells[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 40(3): 792-799.
- [9] Zharikov S, Shiva S. Platelet mitochondrial function; from regulation of thrombosis to biomarker of disease[J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(1): 118-123.
- [10] Komandur S, Venkatasubramanian S, Alluri RV, et al. Mitochondrial insertion-deletion polymorphism; role in disease pathology[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2011, 15(5): 361-364.

(收稿日期: 2017-01-07 修回日期: 2017-03-23)

• 临床探讨 •

沙眼衣原体 mRNA 和 DNA 检测的临床应用评价^{*}

罗茗月, 熊礼宽[△], 夏 勇, 肖克林, 邵聪文

(广东省深圳市宝安区妇幼保健院/暨南大学医学院附属宝安妇幼保健院中心实验室 518133)

摘要:目的 比较实时荧光核酸恒温扩增技术(SAT)检测沙眼衣原体 mRNA 和聚合酶链反应(PCR)检测质粒 DNA 的灵敏度和特异度,探讨其临床应用价值。**方法** 分别通过 SAT 和 PCR 检测尿液或生殖道分泌物标本 789 例,两种方法结果不一致的标本采用巢式 PCR 扩增沙眼衣原体外膜蛋白(omp1)基因验证。**结果** 759 例(96.2%)标本 SAT 和 PCR 结果一致(Kappa=0.64)。SAT 和 PCR 方法的检测结果差异有统计学意义($P<0.01$),SAT 方法检出的阳性率更高。30 例不一致标本通过巢式 PCR 扩增外膜蛋白验证,14 例与 SAT 检测 mRNA 相符,16 例与 PCR 检测质粒 DNA 相符。以两种检测结果一致为“扩大标准”,SAT 技术的灵敏度和特异度分别为 97.6% 和 98.0%,PCR 技术为 71.4% 和 99.7%;沙眼衣原体感染率为 5.3%,男性和女性感染率差异无统计学意义($P>0.05$),不同年龄组感染率差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** SAT 技术灵敏度高、特异度好、耗时短且无需昂贵设备,值得临床推广应用。

关键词: 沙眼衣原体; 实时荧光核酸恒温扩增技术; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.038 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)12-1784-04

沙眼衣原体是主要的性传播感染病原体之一,其引起的泌尿生殖系统感染在全世界范围内呈上升趋势,长期感染和反复感染会引起严重并发症,无症状或轻微症状的感染患者是重要的传染源^[1]。因此,简单、廉价且准确的检测方法可快速早期诊断其感染及隐性感染,能有效遏制沙眼衣原体的传播。沙眼

衣原体的传统检测方法如细胞培养检测周期长,不能在感染早期及时指导临床治疗。核酸扩增技术如普通聚合酶链反应(PCR)、巢式 PCR、荧光定量 PCR 检测技术灵敏度高、操作简单,但 PCR 对标本中抑制物敏感、DNA 扩增产物易污染并且需要昂贵设备和专业技术人员,限制了其在偏远地区等条件落

^{*} 基金项目:广东省深圳市宝安区科技计划项目(2016CX235);广东省深圳市知识创新计划基础研究项目(JC20140302120929060)。

[△] 通信作者, E-mail: xionglk@sina.cn。