

## 参考文献

- [1] 中国免疫学会临床免疫分会. 自身抗体检测在自身免疫病中的临床应用专家建议[J]. 中华风湿病学杂志, 2014, 18(7):437-443.
- [2] AGMON-LEVIN N, DAMOISEAUX J, KALLENBERG C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(1): 17-23.
- [3] GÓMEZ-PUERTA J A, CERVERA R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome[J]. J Autoimmun, 2014, 48(1): 20-25.
- [4] GARCIA D, ERKAN D. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome[J]. N Engl J Med, 2018, 378(21):2010-2021.
- [5] MIYAKIS S, LOCKSHIN M D, ATSUMI T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)[J]. J Thromb Haemost, 2006, 4(2):295-306.
- [6] 中国医师协会风湿免疫科医师分会自身抗体检测专业委员会. 抗磷脂抗体检测的临床应用专家共识[J]. 中华内科杂志, 2019, 58(7):496-500.
- [7] VIVEROS M E, CABIEDES J, REYES E, et al. Activated protein C resistance and lupus anticoagulant activity induced by plasma and purified monospecific human IgG anti-beta2-glycoprotein-I antibodies[J]. Rev Invest Clin,

2005, 57(4):563-571.

- [8] CHUNG Y, KIM J E, LIM H S, et al. Clinical performance of anticardiolipin and anti-β2 glycoprotein I antibodies using a new automated chemiluminescent assay: superior thrombotic prediction of combined results measured by two different methods [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2014, 25(1):10-15.
- [9] MENEGHEL L, RUFFATTI A, GAVASSO S, et al. The clinical performance of a chemiluminescent immunoassay in detecting anti-cardiolipin and anti-β2 glycoprotein I antibodies: a comparison with a homemade ELISA method [J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(7):1083-1089.
- [10] ZHANG S, WU Z, LI P, et al. Evaluation of the clinical performance of a novel chemiluminescent immunoassay for detection of anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein 1 antibodies in the diagnosis of antiphospholipid syndrome [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(46):e2059.
- [11] ZHOU J S, HOU X Z, ZHANG H, et al. The clinical performance of a new chemiluminescent immunoassay in measuring anti-b2 glycoprotein 1 and anti-cardiolipin antibodies [J]. Med Sci Monit, 2018, 24(1):6816-6822.
- [12] 中国医师协会风湿免疫科医师分会自身抗体检测专业委员会. 抗核抗体检测的临床应用专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(4):275-280.

(收稿日期:2020-10-11 修回日期:2021-08-26)

• 短篇论著 •

## 核酸适配体在败血症实验诊断中的初步应用\*

王志瑛<sup>1</sup>, 向 韡<sup>2</sup>, 李卫滨<sup>1,3Δ</sup>

1. 联勤保障部队第九〇〇医院检验科, 福建福州 350025; 2. 厦门大学公共卫生学院, 福建厦门 361100;  
3. 福建医科大学医学技术与工程学院, 福建福州 350025

**摘要:**目的 测定核酸适配体对于 3 种细菌(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌)亲和力, 初步建立 qPCR 定量分析新方法用于检测败血症细菌。方法 化学合成两条细菌肽聚糖特异性的适配体序列 Antibac1 和 Antibac2 及随机序列库, 定量分析适配体结合 3 种不同细菌的特异性、灵敏度和亲和力, 绘制标准曲线并计算解离常数 kd 值。结果 适配体 Antibac1 结合大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的特异性、灵敏度和亲和力较强, 解离常数 kd 值分别为 33.3、102.7、373.7 μmol/L。结论 适配体 Antibac1 可作为分子探针用于开发临床败血症实验诊断的生物传感器。

**关键词:**核酸适配体; 肽聚糖; 聚合酶链反应; 败血症

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.18.025

**中图法分类号:**R446.5

**文章编号:**1673-4130(2021)18-2283-04

**文献标志码:**A

败血症是由于各种细菌感染引起的全身炎症反应综合征, 是临床上常见的重症感染, 也是全球性的

\* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2018J01355)。

Δ 通信作者, E-mail:1061620885@qq.com。

本文引用格式:王志瑛, 向韡, 李卫滨. 核酸适配体在败血症实验诊断中的初步应用[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(18):2283-2286.

公共卫生问题。在世界范围内,每年有超过 1 800 万人感染败血症,其病死率高达 40%<sup>[1]</sup>。败血症病原体的快速检测,对提高患者的生存率至关重要。目前,败血症实验诊断的方法主要是检测 C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、血细菌培养,存在特异度不理想和检测时间长等局限性。相比之下,近来出现的基于聚合酶链反应(PCR)能够将诊断时间缩短至数小时,但是难以在基层医院开展。核酸适配体是通过指数富集的配基系统进化(SELEX)技术产生的核酸分子探针,相比于传统的检测抗体,适配体的生产成本低,化学性质稳定,不存在批间差。检测靶标涵盖小的有机分子到复杂的蛋白质或全细胞,几乎能与自然界中所有的分子相互作用<sup>[2]</sup>。肽聚糖为革兰阳性和革兰阴性细菌共有的细胞壁聚合物<sup>[3]</sup>,占革兰阳性菌细胞壁干重的 50%~80%,革兰阴性菌的细胞壁干重的 5%~20%,Antibac1 和 Antibac2 为肽聚糖核酸适配体序列<sup>[4-5]</sup>,本研究旨在以 Antibac1 和 Antibac2 为分子探针初步建立基于适配体的 qPCR 新方法用于细菌检测。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 细菌菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922,金黄色葡萄球菌 ATCC 29213,铜绿假单胞菌 ATCC 27853,白色念珠菌,以上均为联勤保障部队第九〇〇医院检验科微生物室保存菌株。

**1.2 仪器与试剂** 磷酸盐缓冲液(PBS)由本实验室配制(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>);细菌培养平板为哥伦比亚血琼脂培养基,购自梅里埃生物制品有限公司;细菌培养温箱为 35 °C 二氧化碳培养箱,购自美国 SHELLAB-2306;比浊瓶为无菌生理盐水缓冲液,购自梅里埃生物制品有限公司;DENSIMAT 细菌比浊仪,购自梅里埃生物制品有限公司;PCR 仪为 Bio-Rad 的 CFX-96 Real-Time System, C1000 Thermal Cycler,操作系统为 Bio-Rad CFX Manager,购自美国伯乐公司;荧光染料 SYBR Green I、PCR Taq Mix、qPCR Mix 购自北京金全生物技术有限公司。

**1.3 适配体与随机序列库** 适配体 Antibac1: 5'-TCG CGC GAG TCG TCT GGG GAC AGG GAG TGC GCT GCT CCC CCC GCA TCG TCC TCC C-3'; 适配体 Antibac2: 5'-TCG CGC GAG TCG TCT GGG GGA CTA GAG GAC TTG TGC GGC CCC GCA TCG TCC TCC C-3'; 随机核酸序列文库: 5'-TCG CGC GAG TCG TCT GTT CCA ACA TAG TGT CTG ATT TTC TTA ATG GTA GGC GAG CCC GCA TCG TCC TCC C-3'; 随机核酸序列正向引物: 5'-TCG CGC GAG TCG TCT G-3'; 随机核酸

序列反向引物: 5'-GGG AGG ACG ATG CGG-3'。随机序列的正反向引物与 Antibac1 和 Antibac2 的 3'端和 5'端有相同结合位点<sup>[5]</sup>。以上适配体、随机序列核酸文库与引物均由上海生工生物技术公司合成。

## 1.4 方法

**1.4.1 菌株培养与调配** 实验菌株在 35 °C 二氧化碳温箱中培养 24 h,挑取 3~4 个单菌落加入去热源 EP 管中,振荡混匀,室温用 PBS 8 000 × g 离心 10 min 洗涤 3 次,弃上清液,用适量 PBS 将沉淀吹打混匀,加入测定浊度专用玻璃瓶中,在吸光度 600 nm 波长下将吸光度值调整为 0.5 个麦氏比浊单位。操作方法参考文献<sup>[6]</sup>并根据实验室的条件进行了优化。

**1.4.2 适配体-细菌结合反应** 将 50 μL 调制好的菌悬液加入经牛血清清蛋白(去除非特异结合)包被过夜的 EP 管中,再加入 50 μL 的适配体序列 Antibac1 及 Antibac2(0.1 μmol/L)在室温下震荡孵育结合 45 min。在上述适配子-细菌结合物中加入 1 mL PBS,颠倒混匀 3 次,8 000 × g 离心 6 min 洗涤结合物 3 次,最后一次洗涤将上清全部弃去。在 EP 管中加入 25 μL 无菌水重悬适配体,将 EP 管置于 95 °C 水浴锅中洗脱适配体 5 min,8 000 × g,4 °C 条件下离心 5 min,吸取 1 μL 上清(含洗脱适配体)加入 20 μL PCR 体系进行 qPCR 定量测定。

**1.4.3 实时 qPCR 分析** PCR 体系: 10 μL Mix, 3 μL 上游引物(10 μmol/L), 3 μL 下游引物(10 μmol/L), 3 μL 无菌水, 1 μL 模板(0.1 μmol/L)。qPCR 条件: 95 °C 预变性 1 min, 40 个循环的 95 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 最后 72 °C 延伸 5 min, 平行实验 3 次,以随机序列库作为对照。

**1.4.4 亲和力标准曲线测定** 配制 PCR 反应混合体系,先在各管加入 17 μL 混合体系,再在 1~6 各管依次加入 3 μL 梯度浓度的模板,第 7 管加入 3 μL 无菌水,各管浓度依次设为 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-1</sup>、1 μmol/L。

**1.5 统计学处理** 根据不同浓度适配体 qPCR 测定结果进行 Lineweaver-Burk 的非线性回归分析,使用公式  $1/[\text{complex}] = kd/[\text{Cmax}] \times 1/[\text{aptamer}] + 1/[\text{Cmax}]$  进行计算解离常数(kd)值。其中 kd 值是稳定状态下适配体的解离常数; [complex] 是细菌-适配体复合物的浓度; [Cmax] 是在适配体的最大结合效率下,也就是细菌的所有位点都被适配体占据的情况下复合物的浓度; [aptamer] 是实验中适配体的浓度<sup>[5]</sup>。

## 2 结果

**2.1 适配体 Antibac1 的特异性** qPCR-CQ 值显示, 0.1 μmol/L 适配体 Antibac1 能够识别大肠埃希菌、

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌,与白色念珠菌结合 CQ 值很低,说明特异度较好,见图 1。

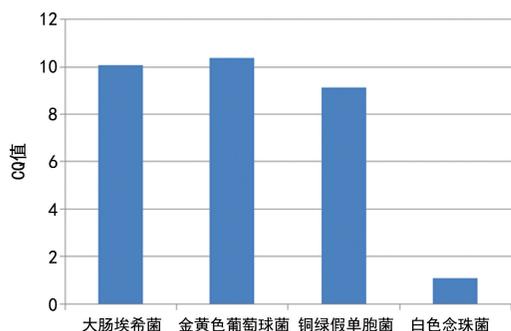


图 1 适配体 Antibac1 结合特异度实验

2.2 适配体 Antibac1 的灵敏度 将不同浓度适配体 Antibac1 分别与 0.5 个麦氏单位的大肠埃希菌、金黄

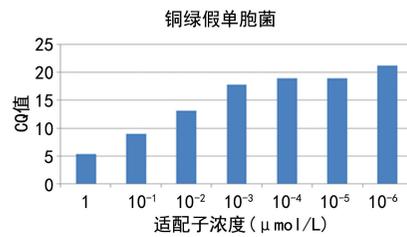
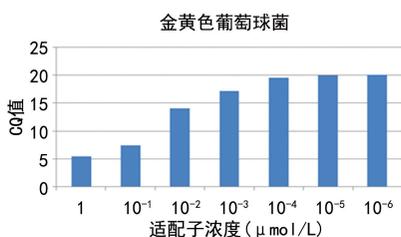
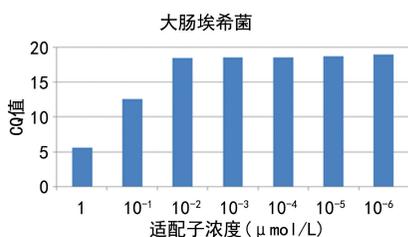
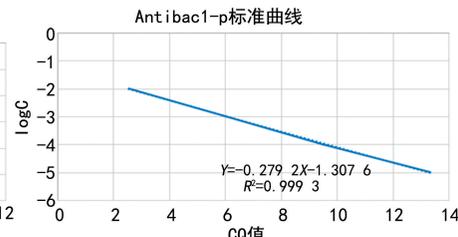
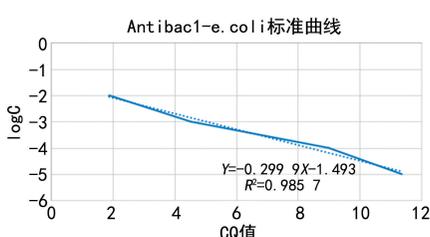
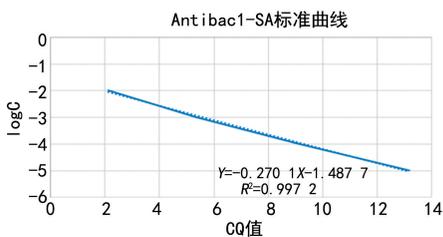


图 2 适配体 Antibac1 结合灵敏度实验



注:SA 表示金黄色葡萄球菌;e. coli 表示大肠埃希菌;p 表示铜绿假单胞菌。

图 3 适配体 Antibac1 亲和力标准曲线

2.4 适配体 Antibac1 解离常数 kd 值的测定 适配体 Antibac1 对于大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的 kd 值分别为 33.3、102.7、373.7 μmol/L。而 Antibac2 对于金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的结合不理想, kd 值无法计算。适配体 Antibac1 与大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的结合亲和力见图 4, kd 值越小,亲和力越高,说明 Antibac1 与大肠埃希菌结合亲和力最强。

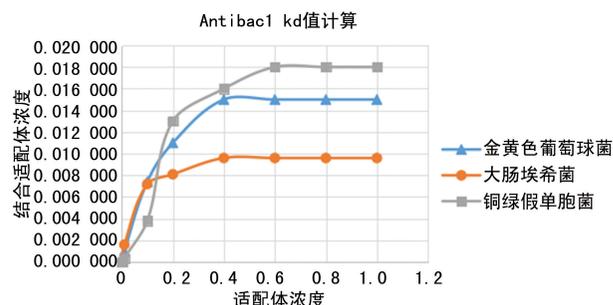


图 4 Antibac1 结合亲和力 kd 值计算

色葡萄球菌、铜绿假单胞菌菌液结合,测定 CQ 值,说明 10<sup>-6</sup> μmol/L 适配体可以检测到 1.5×10<sup>8</sup> 细菌数,见图 2。

2.3 适配体 Antibac1 亲和力标准曲线 为了进一步分析适配体的结合效率,采用实时 qPCR 的方法测定了适配体 Antibac1 和 Antibac2 对于金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的结合力。DNA 稀释度-ΔCQ 值的图表(图 3)显示适配体 Antibac1 对不同细菌的扩增效率大致相同,相对于随机序列文库,适配体 Antibac1 能够以更高的结合效率与临床常见的致病性金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌相结合。

### 3 讨论

本研究目标聚焦细菌细胞壁肽聚糖的适配体 Antibac1 和 Antibac2 对细菌的检测,采用 qPCR 方法分析 Antibac1 和 Antibac2 与 3 种败血症主要细菌的特异度与灵敏度及结合亲和力。本研究结果表明, Antibac1 对不同的细菌结合效率都较高,不仅能结合革兰阳性菌种(金黄色葡萄球菌),还结合革兰阴性细菌(大肠埃希菌、铜绿假单胞菌),说明 Antibac1 能够识别这 3 种细菌细胞壁中的靶分子, Antibac1 的结合亲和力甚至有可能反映出这些细菌的细胞壁上肽聚糖的差异<sup>[4]</sup>。理论上 Antibac1 与金黄色葡萄球菌结合亲和力应该强于大肠埃希菌和铜绿假单胞菌,但结果其与大肠埃希菌结合亲和力最强,下一步将增加细菌种类进一步验证<sup>[5]</sup>。目前,基于核酸适配体的生物传感器已经开始应用于细菌性疾病的检测<sup>[7]</sup>。这些细菌易引发败血症、败血症,甚至脓毒血症,是重要的医院获得感染病原体,是重症监护病房感染的常见病原因<sup>[8]</sup>。

适配体 Antibac1 和 Antibac2 检测结果的差异,可能是两个适配体的 qPCR 扩增、洗脱条件不同,需要进一步优化 Antibac2 与细菌结合条件以及 PCR 扩增条件。下一步将合成荧光标记的适配体序列,在荧光显微镜下确认适配体与菌体的结合,佐证适配体结合的特异性。另外,qPCR 扩增时增加“内参序列”,并加入其对应的引物序列一起扩增以监测扩增体系的稳定性,确保整个扩增过程的标准性。

近年来在诊断领域,核酸适配体广泛应用于特异性地识别和结合多种类型的靶标,包括活细胞或细菌。适配体作为小分子,化学性质稳定、生产成本低、生产不存在批间差,另外,其对 pH 值和温度等环境变化具有很强的适应性,并且在结构设计中具有显著的灵活性。因此,基于适配体的生物传感器能够克服传统的抗体生物传感器的一些缺点,目前已经开发了多种用于微生物病原体检测的适配体传感器<sup>[9]</sup>。

总之,本研究证实,靶向细菌肽聚糖的 ssDNA 适配体能够识别败血症几种相关的革兰阳性与阴性细菌,Antibac1 可用于开发生物传感器探针,在临床中快速检测细菌,亦可联合使用不同的核酸适配体,提高对于不同类型细菌的检测效率,加速诊断和治疗,提高败血症患者的生存率。

## 参考文献

[1] DELLINGER R P, LEVY M M, CARLET J M, et al.

• 短篇论著 •

Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock[J]. Crit Care Med, 2008, 36(1): 296-327.

[2] LI W, ZHAO M, YAN H, et al. Aptamer oligonucleotides as potential therapeutics in hematologic diseases[J]. Mini Rev Med Chem, 2019, 19(10): 788-795.

[3] PAZOS M, PETERS K. Peptidoglycan[J]. Subcell Biochem, 2019, 92(1): 127-168.

[4] FERREIRA I M, LACERDA C M, DE FARIA S L, et al. Selection of peptidoglycan-specific aptamers for bacterial cells identification[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 174(7): 2548-2556.

[5] GRAZIANI A C, STETS M I, LOPES A L K, et al. High efficiency binding aptamers for a wide range of bacterial sepsis agents[J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27(4): 838-843.

[6] MARTON S, CLETO F, KRIEGER M A, et al. Isolation of an aptamer that binds specifically to E. coli[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153637.

[7] SU L, JIA W, HOU C, et al. Microbial biosensors: a review[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(5): 1788-1799.

[8] 李莉, 刘静. 重症监护病房患者医院感染病原菌分布与耐药性分析[J]. 实用医技杂志, 2020, 27(4): 478-479.

[9] LI W. Prospective application of aptamer-based assays and therapeutics in bloodstream infections[J]. Mini Rev Med Chem, 2020, 20(10): 831-840.

(收稿日期: 2021-01-25 修回日期: 2021-08-02)

# 尿液细菌培养与尿沉渣细菌定量计数在泌尿系统感染筛查中的对比分析

侯素君, 闫秀中, 王晓梅, 周绪云, 焦玲  
山东省日照市中医医院, 山东日照 276800

**摘要:**目的 研究比较尿液细菌培养与尿沉渣细菌定量计数筛查泌尿系统感染的准确率。方法 选取 2019 年 3 月至 2020 年 2 月该院就诊的疑似泌尿系统感染患者 200 例, 收集患者的中段尿, 分别采用尿液细菌培养与尿沉渣细菌定量计数进行检测, 以尿液细菌培养结果为金标准。对比两种检查方法的检验结果。结果 尿液细菌培养及尿沉渣细菌定量计数的标本检测阳性率分别为 63.00%、64.50%, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 尿液细菌培养结果显示, 阳性标本中以革兰阴性菌所占比例最高(70.63%); 尿沉渣细菌定量计数与尿液细菌培养结果相比, 阳性标本、阴性标本符合率分别为 96.90%、97.18%, 两种方法符合率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 尿沉渣细菌通道检测革兰阳性球菌和革兰阴性杆菌的符合率、灵敏度、特异性分别为 88.00%、60.00%、92.94% 和 88.50%、77.53%、97.30%。结论 尿沉渣细菌定量计数法的筛查速度更快, 在泌尿系感染患者的早期针对性选择抗菌药物方面有更好的参考价值, 尤其在革兰阴性杆菌引起的泌尿系感染中有更高的参考价值。

**关键词:**泌尿系统感染; 尿液细菌培养; 尿沉渣细菌定量计数

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.18.026

中图法分类号: R691.3

文章编号: 1673-4130(2021)18-2286-04

文献标志码: A

泌尿系统感染(UTI)是一种常见且多发的感染性疾病<sup>[1-2]</sup>, 是由病原菌侵犯泌尿系统、引发炎症反应