

# 基于淋病奈瑟菌外膜蛋白 *pIA-pIB* 融合基因重组产物酶联免疫吸附试验的建立和应用

孙爱华 范兴丽 严杰

**【摘要】** 目的 克隆淋病奈瑟菌外膜蛋白 *pIA*、*pIB* 基因并构建 *pIA-pIB* 融合基因及其原核表达系统以及建立基于 rPIA-PIB 的酶联免疫吸附试验(ELISA)。方法 采用连接引物 PCR 构建 *pIA-pIB* 融合基因,按常规分子生物学方法构建其原核表达系统。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 BioRad 凝胶图像分析系统检测目的重组蛋白 rPIA-PIB 表达情况, Ni-NTA 亲和层析法提纯 rPIA-PIB。以 rPIA-PIB 为包被抗原建立检测淋病患者血清标本中 rPIA 和/或 rPIB 特异性 IgG 的 ELISA,以 rPIA-PIB 抗血清为一抗建立检测淋病患者脓液标本中 rPIA 和/或 rPIB 的 ELISA,实验中以 rPIA、rPIB 及其抗血清相关 ELISA 为对照。结果 *pIA-pIB* 融合基因与原始核苷酸和氨基酸序列相似性均为 100%。rPIA-PIB 表达量为细菌总蛋白的 29.8%,其提纯物 SDS-PAGE 后显示单一条带。rPIA-PIB-IgG-ELISA 检测 119 例淋病患者血清标本的阳性率(98.3%)明显高于 rPIA-IgG-ELISA(30.3%)或 rPIB-IgG-ELISA(66.4%)( $P < 0.01$ )。rPIA-PIB-ELISA 检测 119 例淋病患者脓液标本的阳性率(91.6%)也明显高于 rPIA-IgG-ELISA(27.7%)或 rPIB-IgG-ELISA(62.2%)( $P < 0.01$ )。结论 成功构建淋病奈瑟菌 *pIA-pIB* 融合基因及其原核表达系统;较之单一的 rPIA 或 rPIB, rPIA-PIB 作为淋病相关检测试剂盒抗原具有明显的优越性。

**【关键词】** 淋病奈瑟菌;融合基因;酶联免疫吸附试验

**Establishment and application of enzyme linked immunosorbent assay based on the outer membrane *pIA-pIB* fusion gene of *Neisseria gonorrhoeae*** SUN Ai-hua\*, FAN Xing-li, YAN Jie. \*Faculty of Basic Medicine, Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China

Corresponding author: YAN Jie, Email: Med\_bp@zju.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To clone *pIA* and *pIB* genes of *Neisseria gonorrhoeae*, and to construct *pIA-pIB* fusion gene and its prokaryotic expression system, and to establish enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) based on rPIA-PIB for detecting serum and pus samples from gonorrhea patients and to evaluate the sensitivity and specificity of the ELISA. **Methods** *pIA-pIB* fusion gene was constructed by polymerase chain reaction (PCR) using linking primers and a prokaryotic expression system of the fusion gene was constructed by using routine molecular biological methods. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) plus BioRad Gel Image Analyzer was used to measure the expression of the target recombinant protein rPIA-PIB. Ni-NTA affinity chromatography was performed to extract and purify rPIA-PIB. An ELISA by using rPIA-PIB as the coated antigen for detecting the specific IgG against rPIA and/or rPIB in gonorrhea patients' sera as well as another ELISA by using rPIA-PIB antiserum as the first antibody for detecting the rPIA and/or rPIB in gonorrhea patients' pus samples were established. In these experiments, ELISAs associated with rPIA, rPIB and their antisera were applied as the controls. **Results** 100% similarities of the nucleotide and putative amino acid sequences of the *pIA-pIB* fusion gene were confirmed when compared with the original sequences. The output of rPIA-PIB was 29.8% of the total bacterial proteins. The purified rPIA-PIB only showed a single target protein segment in gel after SDS-PAGE. Using a positive rate (98.3%) of rPIA-PIB-IgG-ELISA to detect 119 cases of gonorrhea patients' serum samples was remarkably higher than that of rPIA-IgG-ELISA (30.3%) or rPIB-IgG-ELISA (66.4%) ( $P < 0.01$ ). The positive rate (91.6%) of rPIA-PIB-ELISA to detect 119 cases of gonorrhea patients' pus samples was also significantly higher than that of rPIA-IgG-ELISA (27.7%) or rPIB-IgG-

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2004A018)

作者单位:310053 杭州,浙江医学高等专科学校(孙爱华、范兴丽);浙江大学医学院病原生物学系(严杰)

通讯作者:严杰, Email: Med\_bp@zju.edu.cn

ELISA (62.2%) ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** In this study we successfully constructed *pIA-pIB* fusion gene of *N. gonorrhoeae* and its prokaryotic expression system while rPIA-PIB showed obvious superiority used as the antigen in gonorrhea associated detection kits compared to both the rPIA and rPIB.

**[Key words]** *Neisseria gonorrhoeae*; Fusion gene; Enzyme linked immunosorbent assay

淋病奈瑟菌感染引起的淋病是不少国家和地区发病率最高的性传播性疾病(STD)<sup>[1,2]</sup>。淋病奈瑟菌有多种抗原,位于细菌外膜的孔蛋白是其主要表面抗原<sup>[3]</sup>。孔蛋白可分为 P I、P II 和 P III 三类,其中 P I 占细菌外膜总蛋白的 60.0% 以上<sup>[4,5]</sup>。根据 *pI* 基因序列及其产物的免疫原性差异,可分为 *pIA* 和 *pIB* 两个基因型,其表达产物抗原性有明显差异,且 1 株菌株仅能含其中 1 个基因型<sup>[6,7]</sup>。流行病学调查资料显示,10.0%~30.0% 淋病奈瑟菌临床菌株表达 PIA,70.0%~90.0% 菌株表达 PIB<sup>[8,9]</sup>。若使用单一 *pIA* 或 *pIB* 基因表达产物为抗原建立相应实验室诊断方法,有可能因不同菌株 *pI* 基因型差异而漏检。本研究中克隆并构建了 *pIA*、*pIB* 基因和 *pIA-pIB* 融合基因及其原核表达系统,分别建立了以 rPIA、rPIB、rPIA-PIB 为包被抗原及以免疫 rPIA、rPIB、rPIA-PIB IgG 为包被抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA),并对 ELISA 检测淋病患者血清及脓液标本的敏感性和特异性进行了比较。

## 材料与方 法

1. 菌株、临床标本及质粒来源:分别含 *pIA*、*pIB* 基因的淋病奈瑟菌临床菌株 A36 和 B18 株由本实验室保存并提供<sup>[9]</sup>。119 例淋病患者脓液及其血清标本、38 例非淋菌性尿道炎患者血清及脓液标本、35 例健康体检者血清标本分别由浙江大学附属邵逸夫医院、杭州市第三人民医院和嘉兴市妇幼保健院提供。原核表达载体 pET42a 和表达宿主菌 *E. coli* BL21DE3 均购自 Novagen 公司。

2. DNA 提取:采用上海博彩生物科技有限公司(BioColor)的基因组提纯试剂盒提取淋病奈瑟菌 DNA。提取的 DNA 溶于 TE 缓冲液中,紫外分光光度法测定其浓度和纯度<sup>[10]</sup>。

3. *pIA* 和 *pIB* 基因的克隆:*pIA* 和 *pIB* 基因 5' 及 3' 端序列相同<sup>[9]</sup>,故参考 *pIA* 和 *pIB* 基因序列(GenBank No.:L19962,U75639)设计一对共用引物。上游引物序列:5'-CGC CAT ATG (*Nde* I) AAA AAA TCC CTG ATT GCC CTG-3',下游 5'-CGC CTC GAG (*Xho* I) GAA TTT GTG GCG CAG AAC GAC-3'。PCR 总体积为 100  $\mu$ l,内含

2.5 mol/L 各 dNTP、250 nmol/L 各引物、2.5 U Taq-Pfu 酶(TaKaRa)、100 ng DNA 模板、1 $\times$  PCR 缓冲液(pH 值 8.3)。PCR 参数:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、54 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测大小分别为 984 bp 和 1047 bp 的全长 *pIA* 和 *pIB* 基因扩增条带。

4. *pIA-pIB* 融合基因的构建:以重组质粒 pMD18-T-*pIA* (IA6 血清型)和 pMD18-T-*pIB* (IB3 血清型)作为 PCR 模板<sup>[10]</sup>,*pIA* 上游、*pIB* 下游引物与扩增全长 *pI* 基因引物相同。*pIA* 下游连接引物序列:5'-GCT ACC GCC ACC GCC GCT GCC ACC GCC ACC ACC GCC GAC AGT CGC-3',*pIB* 上游连接引物序列:上游 5'-GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GCC ATC AAA GCC GGC-3'(下划线部分为柔性肽 GGGSGGGGS 序列)。除不加引物外,其余反应成分及含量与上述 PCR 相同,反应参数:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、45 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 180 s,10 个循环;72 $^{\circ}$ C 15 min;通过引物中互补柔性肽序列形成复合模板。加入 *pIA* 上游及 *pIB* 下游引物各 250 nmol/L,PCR 参数:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、52 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 180 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 15 min。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 1965 bp 的 *pIA-pIB* 融合基因扩增条带。

5. T-A 克隆、亚克隆和测序:采用 DNA 小量快速纯化试剂盒(BioColor)提纯 PCR 产物,TaKaRa 公司 T-A 克隆试剂盒克隆目的扩增片段,Invitrogen 公司负责测序<sup>[10]</sup>。分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切经测序的重组质粒及表达载体 pET42a,回收各目的片段后分别与 pET42a 连接,转化入于 *E. coli* BL21DE3,经扩增、提取质粒后再次测序。

6. 目的重组蛋白表达、提纯及其抗血清制备:所构建的原核表达系统在含 50  $\mu$ g/ml 卡那霉素、0.5 mmol/L IPTG 的 LB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h,诱导目的重组蛋白 rPIA、rPIB 和 rPIA-PIB 表达。采用 10% SDS-PAGE 及 BioRad 凝胶图像分析系统测定上述目的重组蛋白表达量。经 Ni-NTA 亲和层析法提纯的 rPIA、rPIB、rPIA-PIB 各 1 mg 与弗氏完全佐剂混合,多点皮内注射免疫家兔,共免疫 4 次,每次间隔 1 周。末次免疫后 2 周,采集家兔心血

并分离血清,采用免疫双扩散试验测定兔抗血清的效价。

7. ELISA: 分别以 50 μg/ml 的 100 μl rPIA、rPIB 或 rPIA-PIB 为包被抗原, 1:200 稀释的血清标本为一抗、HRP 标记羊抗人 IgG (Jackson Immuno Research) 为二抗, 建立检测淋病患者血清标本中 rPIA 和/或 rPIB 特异性 IgG 的 ELISA。分别采用 rPIA-IgG-ELISA、rPIB-IgG-ELISA 或 rPIA-PIB-IgG-ELISA 检测 119 例淋病患者血清标本, 实验中以相同稀释度的 35 例健康体检者血清标本为阴性对照, 若患者血清标本吸光度 ( $A_{450}$  值)  $\geq$  阴性对照  $A_{450}$  均值 + 3 × 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 者为阳性<sup>[11]</sup>。根据预实验结果, 以 1:100 稀释的 119 例淋病患者脓液标本为包被抗原, 1:400 稀释的 rPIA、rPIB 兔抗血清或 1:800 稀释的 rPIA-PIB 兔抗血清为一抗、HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗, 建立检测淋病患者脓液标本中 rPIA 和/或 rPIB 的 ELISA。分别采用 rPIA-ELISA、rPIB-ELISA 或 rPIA-PIB-ELISA 检测 119 例淋病患者脓液标本, 实验中以相同稀释度的 38 例非淋菌性尿道炎患者脓液标本为阴性对照, 阳性结果判断标准同上。

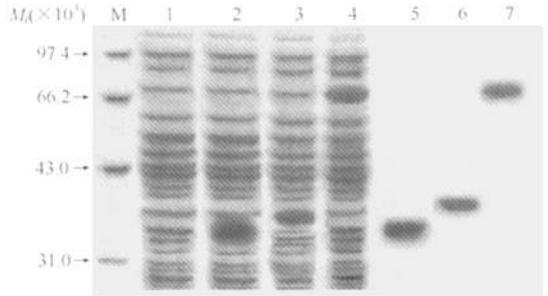
8. 统计学分析: 采用 Stata 8.0 软件进行  $\chi^2$  检验, 对不同检测方法的结果先进行阳性率行 × 列  $\chi^2$  值比较, 若差异有统计学意义则应用  $\chi^2$  分割法再进行两两比较。

### 结 果

1. 目的基因片段扩增结果: 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 采用 PCR 及连接引物 PCR 扩增出预期大小的 *pIA*、*pIB* 基因和 *pIA-pIB* 融合基因片段。

2. 目的基因克隆的测序结果: 与 *pIA* 基因 (GenBank No.: L19962) 和 *pIB* 基因 (GenBank No.: U75639) 序列比较, 淋病奈瑟菌 A36 株 *pIA* 基因核苷酸和氨基酸序列相似性均为 100%, B18 株 *pIB* 基因核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 98.1% 和 98.0%。T-A 克隆和亚克隆的序列测定结果完全相同。

3. 目的重组蛋白表达和提纯效果: 在 0.5 mmol/L IPTG 诱导下, rPIA、rPIB 和 rPIA-PIB 表达量分别为细菌总蛋白的 44.5%、28.6% 和 29.8%; 经 Ni-NTA 亲和层析后, rPIA、rPIB 和 rPIA-PIB 均显示为单一的蛋白条带(图 1)。



注: M: Protein marker (BioColor); 1: 无插入片段空质粒; 2~4: 分别为 IPTG 诱导表达的 rPIA、rPIB 和 rPIA-PIB; 5~7: 经 Ni-NTA 提纯的 rPIA、rPIB 和 rPIA-PIB

图1 rPIA、rPIB 和 rPIA-PIB 表达和提纯效果

4. 目的重组蛋白兔抗血清效价: 兔抗 rPIA、rPIB 和 rPIA-PIB 血清免疫双扩散效价分别为 1:4、1:4 和 1:8。

5. 血清标本 ELISA 检测结果与比较: 根据 rPIA-IgG-ELISA、rPIB-IgG-ELISA、rPIA-PIB-IgG-ELISA 的阳性标准, 上述 3 种 ELISA 对 119 例淋病患者血清标本中 rPIA 和/或 rPIB 特异性 IgG 检测阳性率分别为 30.3%、66.4% 和 98.3% (表 1), 无 rPIA-PIB-IgG-ELISA 阴性、rPIA-IgG-ELISA 或 rPIB-IgG-ELISA 阳性结果。rPIB-IgG-ELISA 检测阳性率明显高于 rPIA-IgG-ELISA ( $\chi^2 = 31.11, P < 0.01$ ), rPIA-IgG-ELISA 和 rPIB-IgG-ELISA 检测阳性率均明显低于 rPIA-PIB-IgG-ELISA ( $\chi^2 = 39.36, 117.79; P < 0.01$ )。

表1 不同 ELISA 对淋病患者血清标本的检测结果

组别	血清标本	检测方法	阳性例数	阳性率 (%)	阴性例数
淋病患者	119	rPIA-IgG-ELISA	36	30.3	83
		rPIB-IgG-ELISA	79	66.4	40
		rPIA-PIB-IgG-ELISA	117	98.3	3
非淋菌性尿道炎患者	38	rPIA-IgG-ELISA	0	0	38
		rPIB-IgG-ELISA	0	0	38
		rPIA-PIB-IgG-ELISA	0	0	38
健康体检者	35	rPIA-IgG-ELISA	$\bar{x} + 3s = 0.16 + 3 \times 0.04 = 0.28$		
		rPIB-IgG-ELISA	$\bar{x} + 3s = 0.15 + 3 \times 0.04 = 0.24$		
		rPIA-PIB-IgG-ELISA	$\bar{x} + 3s = 0.16 + 3 \times 0.03 = 0.25$		

6. 脓液标本 ELISA 检测结果与比较: 根据 rPIA-ELISA、rPIB-ELISA、rPIA-PIB-ELISA 的阳性标准, 上述 3 种 ELISA 对 119 例淋病患者脓液标本中 rPIA 和/或 rPIB 检测阳性率分别为 27.7%、62.2% 和 91.6% (表 2), 无 rPIA-PIB-ELISA 阴性、rPIA-ELISA 或 rPIB-ELISA 阳性结果。rPIB-IgG-ELISA 检测阳性率明显高于 rPIA-IgG-ELISA ( $\chi^2 =$

28.54,  $P < 0.01$ ), rPIA-IgG-ELISA 和 rPIB-IgG-ELISA 检测阳性率均明显低于 rPIA-PIB-IgG-ELISA ( $\chi^2 = 28.97, 100.84; P < 0.01$ )。

表2 不同 ELISAs 对淋病患者脓液标本的检测结果

组别	脓液标本	检测方法	阳性例数	阳性率 (%)	阴性例数
淋病患者	119	rPIA-IgG-ELISA	33	27.7	86
		rPIB-IgG-ELISA	74	62.2	45
		rPIA-PIB-IgG-ELISA	109	91.6	10
非淋菌性尿道炎患者	38	rPIA-IgG-ELISA	$\bar{x} + 3s = 0.20 + 3 \times 0.06 = 0.38$		
		rPIB-IgG-ELISA	$\bar{x} + 3s = 0.21 + 3 \times 0.05 = 0.36$		
		rPIA-PIB-IgG-ELISA	$\bar{x} + 3s = 0.19 + 3 \times 0.05 = 0.34$		

## 讨 论

人是淋病奈瑟菌自然感染的惟一宿主,近年来感染率仍呈上升趋势<sup>[12]</sup>。由于淋病奈瑟菌培养条件较为苛刻、产量低以及主要表面抗原 PI 变异较大、全菌死疫苗不良反应较大等原因,因而研制淋病全菌疫苗及基于 PI 抗原的实验室诊断试剂盒有一定困难<sup>[13,14]</sup>,故目前尚无相关产品上市。

PI 不仅是淋病奈瑟菌主要外膜蛋白,同时在该菌感染过程中发挥重要病理作用,如参与黏附宿主细胞、诱导感染细胞凋亡等<sup>[7,15]</sup>。然而,淋病奈瑟菌 *pl* 基因有 A 和 B 两个基因型,且 *pIA* 和 *pIB* 还可进一步细分为若干血清型,不同地区流行的 *pIA* 或 *pIB* 血清型存在一定的差异<sup>[7,15]</sup>。我们以往的研究资料显示,国内临床分离的淋病奈瑟菌株中,约 1/3 携带 *pIA* 基因,均属于 IA6 血清型;另约 2/3 菌株携带 *pIB* 基因,所属血清型较多,但以 IB3 血清型、IB3 血清型与其他血清型的嵌合型为主<sup>[9]</sup>。因此,本研究选择属于 IA6 血清型的 *pIA* 基因、属于 IB3 血清型 *pIB* 基因作为目的克隆基因,以及构建 *pIA-pIB* 人工融合基因有其依据和必要性。

为了使 *pIA-pIB* 融合基因重组表达产物有较好的空间构型而不影响各自的抗原性,我们在该融合基因中 *pIA* 和 *pIB* 片段之间加入柔性肽序列,并利用柔性肽序列设计了互补的连接引物,如此可通过较为简便的连接引物 PCR,获得了 *pIA-pIB* 人工融合基因,测序结果证实 *pIA-pIB* 融合基因与原始序列完全一致,表明连接引物 PCR 用于构建融合基因有很高的可靠性。上述实验结果为建立基于 rPIA-PIB 的实验室检测方法乃至更合理的疫苗候选抗原提供了基本条件。

本研究中, rPIA 和 rPIB 表达量分别为细菌总蛋白的 44.5% 和 28.6%, rPIA-PIB 则为 29.8%,提

示应是 *pIA-pIB* 融合基因中 *pIB* 片段影响了表达量,若深入分析 *pIB* 片段密码子序列、依据大肠埃希菌偏爱密码子改建 *pIB* 片段,则有可能进一步提高 *pIA-pIB* 融合基因表达产量。本研究中采用的 Ni-NTA 亲和层析法对 rPIA、rPIB 和 rPIA-PIB 有良好的提纯效果,在 SDS-PAGE 图谱中均显示为单一的蛋白条带。

如前所述,约 1/3 淋病奈瑟菌临床菌株表达 PIA,约 2/3 菌株表达 PIB,故本研究中着重建立了基于 *pIA-pIB* 融合基因表达产物 rPIA-PIB 相应 ELISA。应用 rPIA-PIB-IgG-ELISA 检测 119 例淋病患者血清标本的结果表明,其阳性率(98.3%)明显高于 rPIA-IgG-ELISA (30.3%) 或 rPIB-IgG-ELISA (66.4%) ( $P < 0.01$ )。应用 rPIA-PIB-ELISA 检测 119 例淋病患者脓液标本的结果显示,其阳性率(91.6%)也明显高于 rPIA-IgG-ELISA (27.7%) 或 rPIB-IgG-ELISA (62.2%) ( $P < 0.01$ )。rPIA-PIB-IgG-ELISA 检测患者血清标本或脓液标本阳性例数分别为 117 例和 109 例,而 rPIA-IgG-ELISA 与 rPIB-IgG-ELISA 检测上述标本的合并阳性例数则分别为 115 例和 107 例,这可能与任一淋球菌菌株只能含 *pIA* 或 *pIB* 基因有关。上述实验结果提示, rPIA-PIB 作为相关检测试剂盒抗原较单一的 rPIA 或 rPIB 更有优越性。

## 参 考 文 献

- [1] Peterman TA, Tian LH, Metcalf CA, et al. High incidence of new sexually transmitted infections in the year following a sexually transmitted infection: a case for rescreening. *Ann Intern Med*, 2006, 145(8):564-572.
- [2] Center for Disease Control and Prevention, Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. 2006. *MMWR Recomm Rep*, 2006, 55(RR-11):1-94.
- [3] Gill MJ, Simjee S, Al-Hattawi K, et al. Gonococcal resistance to  $\beta$ -lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the *penB* locus. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(11):2799-2803.
- [4] Olesky M, Zhao SQ, Rosenberg RI, et al. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with *penB* mutations. *J Bacteriol*, 2006, 188(7):2300-2308.
- [5] Fudyk TC, Maclean IW, Simonsen JN. Genetic diversity and mosaicism at the por locus of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, 1999, 181(18):5591-5599.
- [6] Mee BJ, Thomas H, Cooke SJ, et al. Structural comparison and epitope analysis of outer-membrane protein PIA from strains of *Neisseria gonorrhoeae* with differing serovar specificities. *J Gen Microbiol*, 1993, 139(11):2613-2620.
- [7] Muller A, Gunther D, Dux F, et al. Neisserial porin (ProB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO J*, 1999, 18(2):339-352.
- [8] Perez-Losada M, Viscidi RP, Demma JC, et al. Population genetics of *Neisseria gonorrhoeae* in a high-prevalence community using a hypervariable outer membrane porB and 13 slowly evolving housekeeping genes. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(9):1887-1902.
- [9] 孙爱华, 罗冬娇, 胡美多, 等. 淋病奈瑟菌临床菌株外膜孔蛋白

porin I 优势基因型及 *pIB* 基因点突变与耐药性相关性分析. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 27(9): 790-794.

[10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1. 21-1. 52, 2. 60-2. 80, 7. 30-7. 35, 9. 14-9. 22.

[11] Lewis SM, Osei-Bimpong A. Haemoglobinometry in general practice. Clin Lab Haematol, 2003, 25(6): 343-346.

[12] Cohen MS, Cannon JG. Human experimentation with *Neisseria gonorrhoeae*: progress and goals. J Infect Dis, 1999, 179(2): 375-379.

[13] Cooke SJ, de la Paz H, La Poh C, et al. Variation within serovars of *Neisseria gonorrhoeae* detected by structural analysis of outer-

membrane protein PIB and by pulsed-field gel electrophoresis. Microbiology, 1997, 143(4): 1415-1422.

[14] Sechman EV, Kline KA, Seifert HS. Loss of both Holliday junction processing pathways is synthetically lethal in the presence of gonococcal pilin antigenic variation. Mol Microbiol, 2006, 61(1): 185-193.

[15] Bauer FJ, Stein M. Mutagenesis of the *Neisseria gonorrhoeae* porin reduces invasion in epithelial cells and enhances phagocyte responsiveness. Mol Microbiol, 1999, 31(3): 903-913.

(收稿日期: 2007-07-19)  
(本文编辑: 尹廉)

• 疾病控制 •

西宁市 2000 名学龄前儿童血铅和血镉状况分析

胡艾莉

铅、镉是对人体有害的重金属, 可导致儿童智力和体格发育迟缓。为了解西宁市 3~6 岁儿童血铅和血镉状况, 于 2005 年 6 月至 2006 年 9 月对城区 2000 名儿童进行血铅、血镉水平检测, 结果报告如下。

1. 对象与方法: 检测对象为 4 个城区入托体检的 2000 名儿童。其中男 1092 名、女 908 名, 年龄分组为 3~ 岁 784 名、4~ 岁 543 名、5~ 岁 510 名、6~ 岁 163 名。

以无铅酒精消毒皮肤, 采静脉血 20  $\mu$ L, 滴入铅、镉测定专用液中。采用北京博晖创新光电技术公司生产的 BH2100 型原子吸收光谱仪检测血铅、血镉含量, 实验前进行标准曲线测定(标准曲线的相关系数  $r > 0.995$ ), 在测定样本前和每隔 20 份样本测定质控样(质控样由中国疾病预防控制中心提供), 对实验条件进行质量控制, 严格按照实验室操作规程操作。血铅  $\geq 100 \mu\text{g/L}$  无论有无相应的临床表现或生化改变, 均诊断铅中毒, 轻度  $100 \sim 199 \mu\text{g/L}$ , 中度  $200 \sim 449 \mu\text{g/L}$ <sup>[1]</sup>。血镉标准值为  $0.1 \sim 5 \mu\text{g/L}$ , 血镉  $> 5 \mu\text{g/L}$  为镉异常<sup>[2]</sup>。

统计学分析采用 SPSS 11.5 软件, 运用百分率(%), *t* 检验和方差分析。

2. 结果与分析: ①血铅、血镉水平及中毒检出率: 2000 名儿童血铅范围  $5 \sim 234 \mu\text{g/L}$ , 均值  $(65.10 \pm 33.25) \mu\text{g/L}$ ; 血铅  $\geq$

$100 \mu\text{g/L}$  者 300 例(15.0%), 其中轻度 297 例(99.0%), 中度 3 例(1.0%)。血镉水平为  $0.81 \mu\text{g/L}$ 。②各年龄组儿童血铅、血镉水平比较: 3~6 岁年龄组儿童血铅水平( $\mu\text{g/L}$ )和中毒检出率分别为  $(62.54 \pm 29.74, 12.8\%)$ 、 $(62.20 \pm 33.06, 13.8\%)$ 、 $(70.37 \pm 35.00, 17.1\%)$ 、 $(70.59 \pm 41.06, 23.3\%)$ , 经方差分析  $F = 8.772, P < 0.001$ , 结果显示差异有统计学意义, 说明随着年龄的增长血铅水平及铅中毒检出率在增高。各年龄组血镉水平( $\mu\text{g/L}$ )分别为  $0.75 \pm 0.67, 0.74 \pm 0.99, 0.97 \pm 5.17, 0.85 \pm 0.88$ , 经方差分析  $F = 0.769, P > 0.5$ , 各年龄组差异无统计学意义。③血铅、血镉水平的性别比较: 各年龄组男童血铅水平均高于女童, 但 5 岁组及总体男、女童血铅水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 各年龄组血镉水平 4 岁组及总体男、女童血镉水平, 统计学分析差异有统计学意义。其余各年龄组差异无统计学意义(表 1)。

综上所述, 本次调查结果高于 2005 年中国城市儿童血铅平均水平( $59.52 \mu\text{g/L}$ )和铅中毒发生率(10.45%)的全国平均水平<sup>[3]</sup>。同时显示各年龄组血铅水平及发生率随着年龄的增长有上升的趋势。从不同性别儿童血铅水平比较, 5、6 岁年龄组及总体男、女童血铅水平的差异有统计学意义。本次调查血镉水平低于我国血镉均值  $0.93 \mu\text{g/L}$ <sup>[4]</sup>。

表1 西宁市 2000 名 3~6 岁儿童血铅、血镉水平各年龄组比较( $\mu\text{g/L}, \bar{x} \pm s$ )

年龄组 (岁)	男童			女童			血铅		血镉	
	例数	血铅值	血镉值	例数	血铅值	血镉值	$t_1$ 值	P 值	$t_2$ 值	P 值
3~	421	63.68 $\pm$ 28.68	0.67 $\pm$ 0.49	363	61.23 $\pm$ 30.92	0.83 $\pm$ 2.39	1.149	>0.05	1.383	>0.05
4~	291	62.45 $\pm$ 34.01	0.67 $\pm$ 0.56	252	61.92 $\pm$ 32.00	0.82 $\pm$ 1.32	0.183	>0.05	1.783	<0.05
5~	281	74.37 $\pm$ 35.00	0.74 $\pm$ 0.96	229	65.47 $\pm$ 34.44	1.25 $\pm$ 7.65	2.870	<0.05	1.101	>0.05
6~	99	76.45 $\pm$ 40.75	0.81 $\pm$ 0.64	64	61.52 $\pm$ 40.47	0.91 $\pm$ 1.16	2.298	>0.05	0.701	>0.05
合计	1092	67.27 $\pm$ 33.43	0.70 $\pm$ 0.67	908	62.50 $\pm$ 32.88	0.94 $\pm$ 4.20	3.199	<0.05	1.870	<0.05

参 考 文 献

[1] CDC. Preventing in lead poisoning young children a statent from the CDC. Atlanta GA: CDC, 1991: 1-20.

[2] 沈惠麟. 生物监测理论基础及应用. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996: 343.

[3] 张帅明, 戴耀华, 谢晓桦, 等. 中国 15 城市儿童血铅水平及影响因素现状调查. 中华流行病学杂志, 2005, 26(9): 651-653.

[4] 刘仁平, 张宜明. 苏州工业园区外企职工血镉尿镉水平调查. 江西预防医学, 2004, 15(4): 40-41.

(收稿日期: 2007-09-20)

(本文编辑: 张林东)