

PCR/RFLP对临床标本沙眼衣原体直接基因分型^①

汪玓妍^② 郭辉玉¹ 罗宪玲² 蒋文玲² 李质怀²

(1 中山医科大学微生物学教研室; 广州, 510089 2 广东省老年医学研究所; 广州, 510080)

摘要 建立泌尿生殖系统沙眼衣原体感染阳性标本直接基因分型方法。先用敏感的扩增沙眼衣原体特异质粒的引物扩增 500份临床标本,初筛选出 100份阳性标本再用扩增沙眼衣原体主要外膜蛋白(MOMP)基因的引物扩增,并用嵌套式 PCR使阳性标本能扩增出 MOMP基因,对获得的 MOMP基因用限制性酶切片段长度多态性(RFLP)方法进行基因分型,并用银染观察结果。其中 E型比例最高,占 47%; F型为 16%; Da G型均为 6%; Ba D型各占 3%; H型及 K型均为 1%,混合型 K/F型 2%; 混合型 D/J E/G均为 1%; 未能分型有 9%。

主题词 衣原体,沙眼 遗传学; 基因型; 泌尿生殖系统疾病/微生物学

中图分类号 R 371.1

衣原体是 8种严重危害人类健康的致病微生物之一,我国于 1989年由徐帆等人首次从子宫分离出沙眼衣原体,证实我国存在泌尿生殖道沙眼衣原体感染,之后有关泌尿生殖道沙眼衣原体感染的报道日渐增多,无论从普通人群或性乱人群均可发现有泌尿生殖道沙眼衣原体感染^[1,2]。为了解我国人群沙眼衣原体泌尿生殖道感染的特点,为流行病学的追踪调查及变异株分布,以及预防诊断,设计疫苗提供理论及实验参考。本研究建立了泌尿生殖系统沙眼衣原体感染直接基因分型方法,并直接对临床阳性标本作基因分型研究,报告如下。

1 材料与方 法

1.1 沙眼衣原体毒株

沙眼衣原体标准毒株 A, B, Ba, D, E, F, L₂ 来源于美国 ATCC,并用 Hep-2 细胞传代培养^[1,2]。

1.2 临床标本

从广州、佛山、深圳等地的性病专科门诊收集 500份泌尿生殖道感染患者的标本,其中男性尿道拭子 100份,女性宫颈拭子标本 400份,这些患者年龄于 16~38岁之间,平均年龄(23.5岁±25岁)。

1.3 标本预处理

所有标本采取后均存于含 1 mL PBS试管中 4℃ 贮存,24 h 内用旋涡器振荡后用毛吸管吸取悬液于 1.5 mL 塑料离心管中,于 15 000 r/min 离心 30 min,

去上清,加入含 h(Tween-20)=0.3%,15 mmol/L Tris HCl(pH8.3),50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂ 的细胞裂解液 50 μL,100℃ 10 min 后放 -70℃ 冰箱贮存。或直接 15 000 r/min 5 min 取上清 5 μL 作 PCR 反应。

1.4 PCR 检测沙眼衣原体特异质粒筛选阳性标本

引物是根据沙眼衣原体特异的 7.5 kb 的质粒 DNA 设计^[3,4],上游引物 CHL₁ 5'-TAG TAA CTG CCA CTT CAT-3',下游引物 CHL₂ 5'-TCC CCT TGT AAT TCG TGC-3'。PCR 反应总体积 20 μL,内含 50 mmol/L KCl,1.5 mol/L MgCl₂,10 mmol/L Tris HCl(pH8.3),0.2 mmol/L dNTP,25 pmol/L 引物,DN A 模板用细胞裂解液上清 5 μL,于 94℃ 变性 5 min,置 72℃ 加 0.5 U Taq 酶(Promega USA),即用热启动以增加其扩增的特异性及敏感性,然后 94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1 min,35 次循环的特异性及敏感性,然后 72℃ 延伸 5 min(PE 公司 9600 扩增仪中扩增),取 10 μL PCR 扩增产物于琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色观察结果,扩增片段大小为 200 bp,同时作 Southern blot,具体操作按德国宝灵曼公司 DNA 地高辛(Digoxigenin, DIG)标记试剂盒说明书进行。探针用 PCR 法制备,即用沙眼衣原体 L₂ 血清型 DN A 作模板,于含有 DIG-dUTP 的 dNTP 中作 PCR 反应,其扩增产物用乙醇沉淀后用双蒸水溶解,于 94℃ 变性 5 min 后加入新配制的杂交液中, DIG 标记 DN A 探针质量浓度为 25 mg/L。

① 广东省卫生厅科研基金资助课题; ② 第一作者,1963年出生,女,助理研究员,博士研究生,现在广东省老年医学研究所工作(广州,510080)。

1.5 沙眼衣原体 MOMP基因扩增^[3-5]

根据沙眼衣原体 L₃血清型的 MOMP基因 (EMBL, 序列名为 CTMOMP1) 设计引物 CT-MOMP₁ 5'-ATG AAA AAA CTC TTG AAA TCG-3' (位于 1-21), CTMOMP₂ 5'-CTA ACT GTA ACT GOG TAT T-3 (位于 1140-1121) 扩增产物为 1.1 kbp 的 MOMP基因片段。PCR反应总体积为 50 μL, 含 10 mmol/L Tris HCl (pH8.3), 50 mmol/L KCl, 1.75 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 2.5 pmol/L 引物, DNA模板 5 μL 于 94°C 变性 5 min 于 72°C 加入 Tag 酶 1.5 U, 94°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 2 min, 40 循环后 72°C 延伸 5 min (PE-9600 扩增仪中扩增)。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯观察扩增片段大小为 1.1 kbp。同时作 Southern blot, DIG 标记探针亦是用 PCR 制备。对质粒 PCR 阳性, 而 MOMP 基因 PCR 阴性的标本采用另一套引物再次进行嵌套式 PCR 的反应: CTMOMP₃ TCC TGC AAG CTC CTG-3' (55-72), CTMOMP₄ 5'-TTT CTA GA (T/C) TTC ATT/C TTG-3' (1068-1051), PCR 反应条件如上进行, DNA 模板取第一套引物的扩增产物 2 μL。

1.6 沙眼衣原体 MOMP 基因的限制性酶切片段多态性 (RFLP) 分析

基因分型的标准参照文献发表的 18 种沙眼衣原体 MOMP 基因限制性酶切片段多态性 RFLP 图谱^[3,5]。具体采用 *AclI*, *HinfI*, *DddI*, *CfdI* 等限制性内切酶 (Boehringer Mannheim) 取 MOMP PCR 产物 10 μL, 加入 2.5 U *AclI*, 37°C 酶解 1 h 后于聚丙烯酰胺 50 mA 电泳 2 h, 标准为 pBR 322/*HinfI* I, 银染法观察结果^[6], 即用 φ (乙醇) = 10% 固定 10 min, 用 φ (HNO₃) = 1% 固定 3 min, 然后用 w (AgNO₃) = 0.2% 染色 20 min, 加入 ddH₂O 漂洗 5 min 加入含 φ (甲醛) = 0.019% 的 0.28 mol/L Na₂CO₃ 显色液, 10-30 min, 用 φ (乙酸) = 10% 终止反应, 于日光灯箱下观察结果。

2 结果

2.1 PCR 扩增沙眼衣原体特异性质粒 DNA

本实验用的引物 CHL₁ 和 CHL₂ 所限制的沙眼衣原体质粒 DNA 片段碱基数为 200 bp, 将沙眼衣原体 A, E, F, H, L₂ 几种血清型的参考株接种细胞传代培养后, 将其进行 10 倍稀释, 然后 15 000 r/min

离心 30 min, 取上清, 加入细胞裂解液 50 μL, 于 100°C 作用 10 min, 取上清 5 μL 作 PCR 反应, 结果显示能测 10~100 IFU/L (包涵体形成单位/L, Inclusion body forming unit IFU) 衣原体, 电泳后于 Marker 220 bp 附近有清晰的电泳带 (图 1)。用正常细胞, 肺炎衣原体 TW 183 (Washington University Research Foundation USA), 鹦鹉热衣原体 B₁₀₀ 株, 人巨细胞病毒 DNA, EB 病毒, 单纯疱疹病毒, 肺炎支原体, 解脲支原体, 结核杆菌作为阴性对照则均呈阴性。扩增产物用 DIG 标记探针检测也获同样结果。



图 1 沙眼衣原体特异质粒 PCR 结果

扩增片段 200 bp, 1 号为阳性对照, 2 3 5 6 7 8 为临床标本扩增结果, 7 8 为阳性标本, 4 号为片段长度标准 pBR 322/*HinfI*; 221/200bp 是其第 6 条带

2.2 PCR 扩增沙眼衣原体 MOMP 基因

本实验所用的 CTMOMP₁, CTMOMP₂ 的引物扩增出 MOMP 基因片段大小为 1.1 kbp 左右, 将上述沙眼衣原体于细胞传代培养后 10 倍稀释, 结果显示 MOMP-PCR 敏感性较质粒 PCR 敏感性低 10 倍, 再用另一套引物 CTMOMP₃, CTMOMP₄ 作嵌套式 PCR, 可以将其敏感性提高到质粒 PCR 水平, 亦扩增出大小约 996 bp 的产物, 而且所设阴性对照均未扩增出 PCR 产物。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳 EB 染色紫外灯下观察 (图 2)。同时亦用 DIG 标记探针, Southern blot 杂交检测也获同样结果。

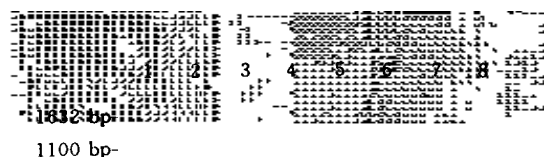


图 2 沙眼衣原体 MOMP-PCR 结果

扩增片段为 1.1 kbp, 1 号为阳性对照, 2 3 5 6 7 8 为临床标本扩增结果, 2 3 4 为阳性标本, 5 号为片段长度标准 pBR322/*HinfI*, 6 7 8 为弱阳性标本

2.3 沙眼衣原体基因分型

从 500份临床标本筛选出 100份阳性标本均成功地扩增出 1.1 kbp的 MOMP基因,接着用限制性酶切片段多态性及银染法对此 100份阳性标本进行基因分型,结果有 83份阳性标本(83%)用 *AluI* RFLP分析即可以分出基因型。E型比例最高占 47%,F型居次为 16%,然后是 G型占 6%,Ba型占 5%,K型为 1%;E/F,K/F混合各为 1%,然后用 *EcoRI* 加 *DdeI* 分出 H型及 D/J混合型占 1%,用 *CfeI* 区别出 Da型占 6%,有 9例由于图谱与 18种血清型标准图谱不一致,未能区别出来,需进一步序列分析,以确定其变异性(表 1,图 3)。

表 1 100例泌尿生殖系衣原体 MOMP基因型分布

基因型	临床标本 MOMP基因型例数 (%)		
	男 (n= 10)	女 (n= 90)	总数 (n= 100)
Ba		5 (5.5)	5 (5.0)
Da	1 (10.0)	5 (5.5)	6 (6.0)
D	1 (10.0)	4 (4.4)	5 (5.0)
E	6 (60.0)	41 (45.5)	47 (47.0)
F		16 (17.7)	16 (16.0)
G		6 (6.6)	6 (6.0)
H		1 (1.1)	1 (1.0)
K		1 (1.1)	1 (1.0)
混合型			
D/J		1 (1.1)	1 (1.0)
E/G		1 (1.1)	1 (1.0)
K/G		2 (2.2)	2 (2.0)
未能分型	2 (20.0)	7 (7.7)	9 (9.0)

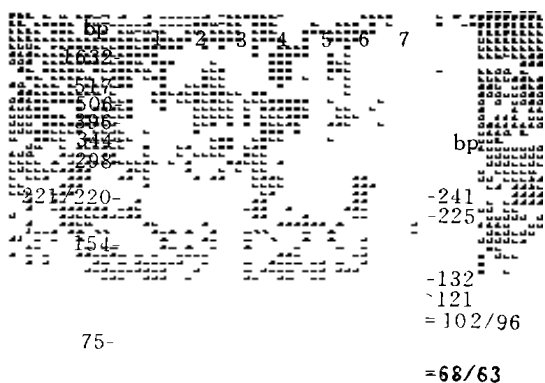


图 3 临床标本沙眼衣原体 MOMP-PCR RFLP 直接基因分型银染结果

第 1行为 PBR322/*HinfI*,第 2 3 4 5 6为临床标本 MOMP RFLP带谱,2 3 4行为变异图谱,与 18种标准血清型图谱不一致。第 7行为血清型 E型阳性对照,可见第 5 6号标本均为 E型

3 讨论

本实验用敏感的扩增沙眼衣原体特异质粒的引物扩增泌尿生殖道感染患者的尿道拭子标本及宫颈拭子标本,将筛选出的阳性标本用扩增沙眼衣原体主要外膜蛋白基因的引物扩增,对 MOMP-PCR阴性标本用嵌套式 PCR,使之能扩增 MOMP基因片段,对获得的 1.1 kbp的 MOMP基因片段用限制性酶切片段长度多态性(RFLP)的方法进行基因分型,并用银染法观察结果,使 100份阳性标本中 91例直接作基因分型,这种基因分型方法免去了选用细胞培养法分离培养鉴定沙眼衣原体,传代后纯化衣原体再用微量免疫荧光法对之进行血清分型等一系列繁琐步骤。并且用银染法观察结果使敏感性大大提高,而且结果可保存,无致癌物污染。

本研究临床阳性标本中 47%为基因 E型,16%为基因 F型,其次为 Da, G, Ba等占 5%~6%,还有混合型,占 1%~2%,未能分型的占 9%,提示本组沙眼衣原体泌尿生殖系统感染的基因型主要为 E, F, Da, G等,与欧美等国家报道相符^[3,5,7,8],国内宁波等^[9]用微量免疫荧光法对广州衣原体分离株进行血清分型,提示血清型 E型比例最高,然而尚存一定数目的变异型,需作进一步的序列分析,以确定其变异性^[10]。

本实验室从 1991年起开始用 PCR法检测泌尿生殖系统沙眼衣原体感染^[11],开始用蛋白酶 K消化,酚抽提,乙醇沉淀以及用 *NaI*法抽提等。最后确定用细胞裂解液(如前所述)于 100℃处理 10 min即能获得满意结果。由于确定了简便的标本处理方法及选择敏感性高的引物序列,使沙眼衣原体 MOMP-PCR-RFLP的方法能直接用于大量标本的直接基因分型。为了解我国人群沙眼衣原体泌尿生殖道感染的特点,为流行病学的追踪调查,以及衣原体主要外膜蛋白基因变异分析,设计有效的疫苗提供理论及实验参考。

参 考 文 献

- 汪玎妍,蒋文玲,李质怀,等. 细胞培养法检测泌尿生殖系沙眼衣原体感染. 中华皮肤病学杂志, 1992, 25: 369
- 汪玎妍,蒋文玲,李质怀,等. 沙眼衣原体感染的实验诊断方法的建立与应用(摘要). 中华微生物学与免疫学杂志, 1992, 1: 30

- 3 Lan J, Wabloomers JMM, Roosendaal R, *et al.* Direct detection and genotyping of chlamydia trachomatis in cervical fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 1060
- 4 Griffais R, Tnibon M, Detection of chlamydia trachomatis. *Res Microbiol*, 1989, 140: 139
- 5 Frost EH, Deslandes S, Veilleux S, *et al.* Typing chlamydia trachomatis by detection fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. *J Infect Dis*, 1991, 163: 1103
- 6 Herring AJ, Inglis NF, Ojen CK, *et al.* Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamid gels. *J Clin Microbiol*, 1982, 16: 473
- 7 Frost EH, Deslands S, Borgaux RD. Chlamydia trachomatis serovars in 435 urogenital specimens by restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Infect Dis*, 1993, 168: 497
- 8 Lan J, Ingeborg M, Chris JL, *et al.* Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical chlamydia trachomatis infection as determined by highly sensitive PCR. *J Clin Microbiol*, 1995, 33 (12): 3194
- 9 宁波,涂裕英,徐帆,等.广州地区性病沙眼衣原体分离株血清型分析. *中国人兽共患病杂志*, 1994, 3: 23
- 10 Poole E, Lamont I. Chlamydia trachomatis serovar differentiation by direct sequence analysis of the variable segment 4 region of the major outer membrane protein gene. *Infect Immun*, 1992, 60(3): 1089
- 11 汪玓妍,陈火胜,蒋文玲,等. PCR检测沙眼衣原体及其质粒特异核酸. *中华流行病学杂志*, 1992, 13(2): 94

(1996-09-09收稿 1996-12-06修回)

DIRECT GENOTYPING OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN CLINICAL SAMPLES BY PCR-RFLP METHODS

Wang Dingyan¹ Guo Huiyu¹ Luo Xianling² Jiang WenLing² Li Zhihua²

(1 Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089

2 Guangdong Provincial Institute of Geriatric Medicine, Guangzhou, 510080)

Five hundred clinical samples from urogenital infection patients were simply pretreated by boiling for 10 min and screened for chlamydia trachomatis plasmid PCR. One hundred positive samples tested by plasmid PCR were subjected to PCR for *Omp-1* gene amplification, seventy eight samples were found positive by direct *Omp-1* PCR while 22 direct *Omp-1* negative samples became positive by the nested *Omp-1* PCR. The amplified *Omp-1* genes were treated with restriction enzymes *AluI*, *HinfI*, *DdeI* and *CfoI* and the digested fragments were run on polyacrylamide gel with silver staining. Genotypes of Chlamydia trachomatis in the 100 clinical samples were identified by analysis of their restriction fragment length polymorphisms. The results showed that the genotype E was the most prevalent types found in the urogenital infection patients in our study, accounting for 47% (47/100) and the next prevalence was the genotype F 16% (16/100). Both genotypes Da and G made up 6% (6/100), both genotype Ba and D were 5% (5/100), and genotype H and K each was 1% (1/100). Mixed genotypes K/F were found in 2% and mixed genotypes D/J and E/G occurred in 1%. Nine samples were not identifiable because their RFLP patterns did not correspond to that of any of the 18 C. Trachomatis serovars tested in this study.

Subject headings chlamydia trachomatis/genetics; genotype; urogenital diseases/microbiology