维普资讯 http://www.cqvip.com

第22卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.22 No.4
1997 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1997

沙眼衣原体基因分型及其应用*

基础医学院 微生物学教研室 夏 云** 朱道银

提 要 本文分别以沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis, Ct)隐蔽性质粒引物(Pp)及主要外膜蛋白基因(omp_1)引物(Pm),用PCR扩增Ct特异性DNA,并用单链构象多态性(Single-strand conformation polymorphism, SSCP)作基因分型。426份标本中,92例质粒PCR阳性,用质粒PCR阳性标本作omp_1 PCR,66例为阳性。其中52例标本经SSCP分析显示7种不同的电泳图谱,18例与标准株TE_{65}电泳图谱相同。其中两份标本分别取羊水及新生儿睑结膜,其SSCP图谱相同,表明两株Ct核酸序列完全相同,在分子水平上证实了Ct的垂直传播。临床标本可先采用敏感的质粒PCR作初筛,阳性者再作omp_1 PCR进行基因分型。应用PCR-SSCP对Ct作基因分型,在分子流行病学研究中有重要意义。

关键词 沙眼衣原体; 基因分型; 单链构象多态性; 垂直传播
中图分类号 R374

沙眼衣原体为性传播疾病的重要病原,根据其主要外膜蛋白(MOMP)的抗原性不同,可将其分成18个血清型。近年来根据编码MOMP基因(omp_1)的差异采用核酸测序或RFLP对Ct进行基因分型,发现与血清学分型有相关性。Ct的分型在血清学诊断,分子流行病学研究,疫苗研制等方面均有重要意义。本文根据不同型别Ct omp_1 Ⅳ可变区核酸序列的差异,采用SSCP对Ct作基因分型并初步应用于Ct母婴垂直传播的研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源 采集1995年6月~1996年6月本校临床学院泌尿科及妇产科门诊病人标本426份。标本分别取自尿液、前列腺液、宫颈上皮、阴道分泌物、剖宫产羊水及新生儿睑结膜。标本置2SP转送培养基中立即检测或-60°C保存。

1.2 标准菌株 E血清型标准株TE_{65}卵黄囊培养物购自北京眼科研究所。

1.3 引物序列及PCR方法 参见文献[1]。

1.4 SSCP分析 制备10%的聚丙烯酰胺凝胶(PAG,含5%甘油,1.6%过硫酸胺,0.1%四甲基乙二胺)。在10μl的PPCR产物或PmPCR产物中加入15μl甲酰胺染料(95%甲酰胺,20mmol/L EDTA,0.01%溴酚蓝)。经95°C5分钟变性后迅速置水浴中冷却以获取单链DNA,全部上样电泳,电泳缓冲液为0.5×TBE,室温(10±3°C)、恒流15mA,电泳6小时,取出凝胶,银染色法[2]观察结果。

2 结果

2.1 Ct特异性DNA扩增 用Pp及Pm作PCR均能检出Ct标准株TE_{65},人口腔上皮细胞检查结果均为阴性。426份标本中,92例PpPCR阳性,Ct检出率为21.6%(92/426)。Pp阳性标本中,66例PmPCR阳性,PmPCR敏感性低于PpPCR。

2.2 SSCP条件的优化及重现性

2.2.1 凝胶浓度 分别采用6%、8%、10%、12%的PAG作电泳,凝胶浓度越高,电泳条带越细、越清晰、但DNA迁移率降低。对Pp产物(503bp)采用6%PAG,Pm产物(277bp)采用10%PAG所获得的电泳图谱较为理想。

2.2.2 温度 室温(10~20°C)条件下可获得理想的电泳图谱,大于23°C DNA迁移率显著加快,条带增宽,在4°C时迁移率明显降低。故SSCP适宜于室温下进行。

2.2.3 电泳条件 分别以恒压20V/cm和恒流15mA进行电泳,前者需10~12小时可获得较理想的电泳图谱,而后者仅需6小时。

2.2.4 重现性实验 在严格控制PCR-SSCP各种实验条件的情况下,同一份标本不同批次的PCR-SSCP电泳图谱相同。

2.3 Ct基因分型 所有PpPCR产物经SSCP分析所得的电泳图谱完全一致,表明Ct隐蔽性质粒

* 国家自然科学基金资助项目 编号39270607
** 男,1966出生,主管检验师

维普资讯 http://www.cqvip.com



Lane 1:genetype Ⅰ:Lane 2:genotype Ⅱ(TE55)
Lane 3、6、9:genotype Ⅱ(exhibited the same profile as TE55
Lane 4:genotype Ⅲ;Lane 5:genotype Ⅳ;Lane 7:genotype Ⅴ
Lane 8:genotype Ⅵ;Lane 10:genotype Ⅶ
图1 Ct的PCR－SSCP分型



Lane 1:profile of the mother's amniotic fluid
Lane 2:profile of the infant's conjunctiva
Lane 3:profile of TE55

图2 配对母婴标本PCR－SSCP图谱

的核酸序列高度保守，不能用于Ct基因分型。52例PmPCR阳性标本经SSCP分析显示7种不同的电泳图谱(图1)。18例与TE_{55}电泳图谱相同，表明E型占34.6%(18/52)。由于无其他型别Ct标准株，其余6种电泳图谱不能确定血清型别。有两份标本分别取自配对剖宫产羊水及新生儿睑结膜，经SSCP分析电泳图谱完全一致(图2)。

3 讨论

Ct不仅可引起泌尿生殖道感染，还可垂直传播导致新生儿Ct感染。由于大多数Ct引起的泌尿生殖道感染无临床症状，故诊断主要依靠实验室检查。Ct隐蔽性质粒为多拷贝基因，而omp_1为单拷贝基因，故检测Ct质粒较omp_1更为敏感，可用于Ct感染的快速诊断[3]。本文同时用Pp及Pm为引物检测Ct．质粒的敏感性高于omp_1，故PpPCR可作为Ct筛检的理想方法。

目前Ct的分型除血清学分型外，多采用分子生物学分型的方法。Ctomp_1含4个易变区(VS)。不同血清型，亚型间VS核酸序列不同，此为Ct基因分型的依据[4]。PCR扩增omp_1结合RFLP分析可用于Ct分型[5]。但omp_1为单拷贝基因，且扩增片段较长，故敏感性较差[6]，且对omp_1十分相近的Ct分型有明显的局限性。omp_1 VS核酸测序精确灵敏，可检出单个核苷酸的变化，鉴定新的亚型及混合感染[7]。但操作繁琐，费用昂贵。

1989年由日本学者Orita创建的单链构象多态性(Single－strand conformation polymorphism,SSCP)技术是一种DNA单链凝胶电泳技术，用于检测DNA点突变及染色体多态性[8]。其原理是长度相同的DNA单链在中性非变性PAG电泳时，DNA迁移率主要受单链构象的影响，DNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

碱基顺序不同甚至单个碱基变异均可造成构象改变而使电泳迁移率不同。使用放射性同位素标记引物后放身自显影或银染色法可观察电泳结果[8]。该技术操作简便、快速，对于小于400bp的DNA片段分析敏感性高，国内外主要用于癌基因及抗癌基因突变的鉴定，遗传病致病基因分析和基因诊断。近年来SSCP亦用于微生物的分型研究。目前用SSCP对Ct作基因分型国内外无报道。

本文PmPCR产物长度为277bp，跨$ompI$ VS_4，由于不同型、亚型Ct VS_4核酸序列不同，故理论上适宜于对Ct进行基因分型。对52份标本进行SSCP分析得到7种不同的电泳图谱，通过与TE_{55}电泳图谱比较，迅速鉴定出18株为E血清型，占34.6%，这与泌尿生殖道Ct感染E型常见的报道相符[10]。

SSCP用于Ct的基因分型具有下列优点：(1)操作简单，无需特殊仪器及试剂，本文用国产电泳仪即可满足要求。(2)实验步骤少，周期短。PCR－SSCP可在18小时内完成。(3)检测灵敏度高，理论上可检出单一碱基改变。(4)重现性好。(5)可作为核酸测序前的筛选方法用于已知和未知基因变异的检测，有助于Ct$ompI$的免疫生物学、遗传特性的研究。

本文从1例剖宫产羊水中检出Ct，证实了Ct的子宫内感染，从配对新生儿睑结膜中检出Ct，经SSCP分析母婴两份标本的电泳图谱相同，表明宫内及出身后感染的Ct为同一株Ct，这在分子水平上证实了Ct垂直传播的一种新的途径，即Ct的子宫内感染而致新生儿Ct感染。

参考文献

1.朱道银，杨晓燕，夏 云，等.重庆医科大学学报 1996;21(S):12
2.Budowle B, Chakrabory R, Giusti AM, et al. Am J Hum Genet 1991;48:137
3.Lan J, Ossewaarde JM, Walboomers JM, et al. J clin Microbiol 1994;32(2):528
4.Yuan Y, Zhang YX, Watking NG, et al. Infeit Immun 1989;57(4):1040
5.Lan J, Walboomers JM, Roosendaal R, et al. J clin Microbiol 1993;31(5):1060
6.Lan J, Melgers I, Walboomers JM, et al. J clin Microbiol 1995;33(12):3194
7.Poole E. Lamont Immun 1992;60(30):1089
8.Orita M, Suzuki Y, Sekiga T, et al. Genomics 1989;5:874
9.张 学，孙开来.国外医学遗传学分册 1992;(5):225
10.Ossewaarde JM, Rieffe M, Vries AD, et al. J clin microbiol 1994;32(12):2968

(收稿日期 1997－)

Application of polymerase chain reaction－single strand comformation polymorphism(PCR－SSCP)in genotyping of chlamydia trachomatis

Xia Yun,et al
Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences

Rapid diagnosis of chlamydia frachomatis infection was done by using PCR to amplify C. trachomatis specific DNA with the cryptic plasmid primer and the major outer membrane protein gene(ompl)primer seperately. Of 426 samples, 92 were positive for plasmid PCR. Of plasmid PCR positive samples, 66 were positive for ompl PCR. 52 samples were analysed by SSCP and 7 different profiles were detected. 18 samples showed the same profile compared with TE55 reference strain. An amniotic sample and a conjunctival sample obtained from a neonate exhibited identical SSCP profile. It indicated that the DNA sequences of the two C.trachomatis strain were identical, and vertical transmission of C. trachomatis was confirmed in the case. When genotyping was performed by using clinical specimens, it was suitable to screen the samples by plasmid PCR and the positive specimens were further performed by ompl PCR for genotyping. Genotyping of C. trachomatis could be performed by PCR－SSCP and it was important in molecular epidemiological research.

KEY WORDS Chlamydia trachomatis; genotyping; vertical transmission