

人咽拭子中肺炎嗜衣原体基因型的初步鉴定

郑江花¹, 刘庆中², 刘佳强³, 刘卓然¹

(1. 南华大学附属第二医院检验科, 湖南 衡阳 421001; 2. 上海交通大学医学院附属第一人民医院检验科; 3. 湖南省株洲市第一人民医院检验科)

摘要: **目的** 了解中国咽部感染患者肺炎嗜衣原体(Cpn)的基因型。**方法** 从中国不同城市收集疑为Cpn感染患者的咽拭子标本465份, 巢式PCR扩增Cpn主要外膜蛋白基因(ompA)片段, 其中包括4个变异区, 对所得58份阳性标本进行ompA基因序列测序, 对照Cpn参考株基因, 根据同源性对这些临床株基因进行分型。

结果 从58份Cpn临床株标本中, 检出CpnA、CpnB、CpnC、CpnD共4种基因型, 14个基因变体, 其中以C型最为常见(89.7%), 其次依次为A型(5.2%)、B型(3.4%)、D型(1.7%)。**结论** 在中国部分城市, Cpn存在CpnA、CpnB、CpnC、CpnD等4个基因型, 其中以C型最为常见, 呈现较大的多态性, 可为其疫苗的研制提供重要的实验依据。

关键词: 肺炎嗜衣原体; 外膜蛋白基因A; 基因分型

中图分类号: R374.3 **文献标识码:** A

Identification of OmpA Genotype of Chlamydia Pneumoniae in Human Nasopharyngeal Swabs

ZHENG Jianghua, LIU Qingzhong, LIU Jiaqiang, et al

(Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To know ompA genotype of Chlamydia pneumoniae in human nasopharyngeal swabs. **Method** 465 human nasopharyngeal swabs were collected from different cities in China doubted Chlamydia pneumoniae (Cpn) infection. DNA was extracted by usual method, and an approximately 366 bp fragment from the major outer membrane protein(ompA) gene of Cpn was amplified by nested polymerase chain reaction(nPCR). The PCR products were purified by DNA agarose gel purification system and the sequence of the ompA gene was determined by sequencing analyzer. And genotype was performed by BLAST similarity search compared with Cpn reference strains. **Results** 58 clinical strains were identified from human nasopharyngeal swabs. The overall 14 genetic variants were detected and 4 genotype exactly A, B, C, D were confirmed. The most prevalent genotype was CpnC (89.7%), and the rest of all are CpnA (5.2%), CpnB (3.4%) and CpnD (1.7%). **Conclusion** There are a few genotype of Cpn in a few cities in China. CpnC was found mostly, and the others were appeared such as CpnA, CpnB and CpnD. It exhibits remarkable ompA DNA sequence polymorphism, which can encourage us for vaccine design and infection control.

Key words: chlamydia pneumoniae; ompA gene; genotype

肺炎嗜衣原体(chlamydia pneumoniae, Cpn)是一种严格真核细胞内寄生的原核细胞型微生物,

是种常见的人兽共患病原体, 主要引起社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)、咽炎、鼻窦炎、支气管炎等呼吸系统疾病; 还可引起中耳炎、虹膜炎、肝炎、心肌炎、心内膜炎、脑膜炎、结节性红斑等疾病; 另外肺炎衣原体感染与心血管疾病如动脉粥样硬化相关, 也是艾滋病、白血病等继发感染的

收稿日期: 2012-02-05

基金项目: 湖南省教育厅资助项目(08C732); 湖南省自然科学基金(10JJ3014); 南华大学附属第二医院科研项目(2009S14)。

通讯作者: 刘卓然, 电话: 0734-8899915, E-mail: lzz9656@163.com.

重要病原菌之一^[14],对人类健康构成极大的威胁,因此 Cpn 的感染与防治在全球范围内受到广泛关注。

传统的衣原体分型使用的靶基因是 MOMP、16SrRNA 等种特异性蛋白基因^[5],尤其 MOMP 外膜蛋白 A 基因(ompA)具有更强的特异性,在基因分型方面具有更大的价值。ompA 中有 4 个可变区(VD4),分别位于 5 个高度保守的恒定区内,在人和动物分离株之间变异区域小但变异程度大,被认为是基因分型的靶基因。目前 Cpn 基因分型主要是以 ompA 作为靶基因建立起来的^[6]。不同的 Cpn 基因型感染宿主范围存在一定的差异,而且有着明显的地理分布特点。基因分型对研究 Cpn 与疾病的关系、感染的诊断及疫苗的研制等方面具有重要意义^[7]。

本文拟从中国不同城市医院收集咽拭子临床标本,PCR 扩增 Cpn ompA 基因片段,通过序列测定、BLAST 分析,根据同源性分型并分析其多态位点,分析现有的不同的 Cpn 基因型,为 Cpn 疫苗的研制及进一步研究其致病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 2009 年 11 月~2011 年 11 月在衡阳市南华大学附属第二医院、上海市第一人民医院、株洲市第一人民医院等地,收集患有呼吸道疾病,怀疑感染了 Cpn 患者的咽拭子标本 465 份。

1.1.2 主要试剂 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;pfu DNA 聚合酶、dNTPs 购自 TaKaRa 公司;100 bp DNA marker 购自 Promega 公司。

1.2 DNA 模板制备

所有咽拭子标本经无菌生理盐水 5 mL 左右旋转摩擦冲洗收集后于 14 000 r/min 离心 15 min,再于沉淀中加入 50 μ L 裂解液(含 0.5 mol/L Tris-EDTA,1% SDS,0.1 mg/mL 蛋白酶 K),混匀,56 $^{\circ}$ C 恒温箱中过夜;14 000 r/min 离心 10 min,取上清液经酚氯仿抽提 DNA(最后得到 10~20 μ L)作 PCR 模板。

1.3 Cpn ompA 基因扩增和序列测定

参照 Bodetti 等^[8]设计的引物序列合成两对引物,扩增 Cpn 主要外膜蛋白基因(ompA)片段,外引

物序列为:P1:5'-CCA ATA TGC ACA GTC CAA ACC TAA AA-3',P2:5'-CTA GAT TTA AAC TTG TTG ATC TGA CAG-3';内引物序列为:P3:5'-CTC TGT AAA CAA ACC GGG C-3',P4:5'-GAT CTGACA GGA AAC AAT TTG CAT-3'。上述标本进行 ompA 基因扩增,反应总体积为 50 μ L:含 10 $\times$ PCR Buffer(含 $MgCl_2$)5 μ L,dNTPs 各 200 μ mol/L,引物 P1、P2 各 0.2 μ mol/L,模板 5 μ L,DNA 聚合酶 1.5 U,同时用双蒸水作阴性对照。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 1 min,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。取扩增产物 2 μ L 作模板,用内引物 P3、P4 再扩增 1 次,扩增体系及条件同上。取 5 μ L PCR 产物加入 1 μ L 6 $\times$ loading buffer,以 5 V/cm 在 1.2% (W/V)的琼脂糖凝胶中电泳,溴乙锭显色。切胶取阳性 PCR 产物,经 Gel Extraction Kit (Qiagen)纯化回收后,送上海生物工程技术有限公司进行双向测序,每一标本重复测 2 次。

1.4 BLAST 分析

Cochrane 等^[9]报道将所测得的序列进行 BLAST 分析(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast),与 GenBank 数据库中人类或动物 Cpn 标准株包括 AR39、CM1、CV3、CWL029、IOL207、J138、TW10、TW183、VR1356、WA97001 和 Koala type 1 序列进行碱基同源性比较,分析该临床株与参考株的 ompA 基因在核苷酸水平上的差异,对临床株进行基因分型。根据其与各血清型参考株的同源性进行分型,Cochrane 等将把 Cpn 临床株分为 4 个基因型,CpnA 为 Cpn J138 参考株基因型,CpnB 的 GenBank 序列号为 AY426606,CpnC 的 GenBank 序列号为 AY426607,CpnD 为 Koala type 1 基因型。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 Cpn ompA 基因

465 份咽拭子标本用特异性引物经巢式 PCR 扩增,58 例扩增出目的基因片段,与预期目的片段 366 bp 大小相符,阴性对照组未出现任何条带(见图 1)。

2.2 测序

58 份 Cpn 临床株共检出 4 种基因型,14 个基因型,其中以 C 型 52 株最为常见(89.70%),其次依次为 A 型 3 株(5.20%)、B 型 2 株(3.40%)、D 型 1 株(1.70%)。

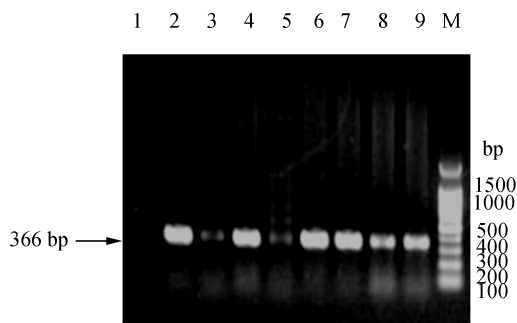


图 1 Cpn ompA 基因 PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱 1: 阴性对照 (ddH₂O); 2 ~ 9: 临床株扩增产物; M: DNA marker

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of Cpn ompA gene fragment

3 讨 论

Cpn 主要引起人类各种呼吸系统疾病,还可引起心内膜炎、动脉粥样硬化等多种慢性病,甚至导致难于治疗的并发症发生,对人类健康构成极大的威胁。因此,早期准确诊断 Cpn 感染,对有效控制 Cpn 的传播和预防并发症的发生具有重要意义。本研究分别采用巢式 PCR 法和基因测序法,将序列进行 BLAST 分析,根据其与各血清型参考株的同源性分型,检测分析呼吸道感染患者感染 Cpn 基因型的情况,为 Cpn 与疾病的关系研究、感染的诊断及疫苗的研制等临床应用奠定实验基础。

研究发现引起人体免疫应答的 Cpn 种、属、型特异性抗原均分布在外膜复合物和主要外膜蛋白 (MOMP) 上,因此一般的血清学分型法均以 MOMP 为分类依据,将 Cpn 分为 TW-183、CM-1、CWL-029、CWL-050、CWL-011、IOL-207、FIL、Kajaani-6、Helsinki-12、Parjaanomen 等多种血清型。传统的衣原体分型使用的靶基因是 MOMP、16SrRNA 及 Cpn 种特异性蛋白基因,随后发现外膜蛋白 A 基因 ompA 中有可变区 (VD) 是基因分型的常用靶基因。

巢式 PCR (nested PCR, nPCR) nPCR 使用两对 PCR 引物 (巢式引物) 来扩增完整的 DNA 片段。第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似,第二对引物称为巢式引物,结合在第一次 PCR 产物内部,使得第二次 PCR 扩增片段短于第一次的,再将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,鉴别 Cpn 各基因型。Bodetti 等^[10]利用 nPCR 法将从动物组织中分离的 Cpn 菌株进行基因分型,将其分为 A 型、B 型、C 型、

D 型;Cochrane 等^[9]利用 nPCR 法扩增 ompA 的 VD4 区,将从动脉粥样硬化患者的斑块组织和外周血单个核细胞 (PBMC) 标本中分离的 Cpn 菌株分成 A、B、C、D 四型。由于 nPCR 反应有两次 PCR 扩增,从而降低了扩增多个靶位基因的可能性 (因为与两对引物都互补的模板很少),增加了检测的敏感性;又因为有两对 PCR 引物与检测模板的配对,从而增加了 Cpn 基因分型的特异性,在 Cpn 临床诊断中起着重要作用。

不同的 Cpn 基因型感染宿主范围存在一定的差异,而且有着明显的地理分布特点,基因分型对研究 Cpn 与疾病的关系、感染的诊断及疫苗的研制等方面具有重要意义。因此本研究从 465 份咽拭子临床标本中扩增出 58 份 Cpn 阳性标本,阳性率为 12.47%。根据序列同源性,从 58 份阳性标本中,共检测出 14 种基因变体,4 个基因型,即 A、B、C、D,其中以 C 型最为常见 (89.70%),另外几种是 A 型 (5.2%)、B 型 (3.4%)、D 型 (1.7%),与其它国家报道的 Cpn 基因型分布特征基本一致^[9]。

很多学者认为 ompA 基因变体是由于在免疫压力选择作用下发生的点突变和重组。因为 MOMP 诱导中和抗体产生的抗原表位主要位于 VD1、VD2 和 VD4,因此一般认为点突变多发生于这些区域,而且认为 CDs 区的氨基酸组成稳定,因为它们参与跨膜转运作用。总之,ompA 基因序列测定发现 Cpn 临床株的 ompA 基因呈现较大的多态性,对进一步探讨 Cpn 的致病机制、感染的诊治以及疫苗的研制发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Kılıç ZB, Poyraz O, Kılıç AT. Investigation of chlamydia pneumoniae seropositivity and risk factors in patients with atherosclerotic vascular disease in sivas [J]. Mikrobiyol Bul, 2012, 46 (1): 156-158.
- [2] Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. Chlamydia pneumoniae [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15 (1): 29-35.
- [3] Burillo A, Bouza E. Chlamydia pneumoniae [J]. Infect Dis Clin North Am, 2010, 24 (1): 61-71.
- [4] Cho MC, Kim H, An D, et al. Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of mycoplasma pneumoniae, chlamydia pneumoniae and legionella pneumophila [J]. Ann Lab Med, 2012, 32 (2): 133-138.

(上接第 359 页)

- [5] Carter MW, al-Mahdawi SA, Giles IG, et al. Nucleotide sequence and taxonomic value of the major outer membrane protein gene of *Chlamydia pneumoniae* IOL-207 [J]. J Gen Microbiol, 1991, 137(3): 465-475.
- [6] Kutlin A, Roblin PM, Kumar S, et al. Molecular characterization of *Chlamydia pneumoniae* isolates from western barred bandicoots [J]. J Med Microbiol, 2007, 56 (Pt 3): 407-417.
- [7] Mitchell CM, Hutton S, Myers GS, et al. *Chlamydia pneumoniae* is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(5): e1000903.
- [8] Bodetti TJ, Timms P. Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA and antigen in the circulating mononuclear cell fractions of humans and koalas [J]. Infec Immu, 2000, 68(5): 2744-2747.
- [9] Cochrane M, Walker P, Gibbs H, et al. Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque [J]. Microbiology, 2005, 151 (P7): 2285-2290.
- [10] Bodetti TJ, Jacobson E, Wan C, et al. Molecular evidence to support the expansion of the host range of *Chlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians [J]. Syst Appl Microbiol, 2002, 25(1): 146-152.