

# 泌尿生殖道沙眼衣原体 *omp1* 基因多态性研究

陈丽丽<sup>1</sup> 吴移谋<sup>1\*</sup> 雷 达<sup>2</sup> 吴志周<sup>3</sup> 黄澍杰<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 南华大学 病原生物学研究所 衡阳 421001)

(<sup>2</sup> 广东省第二人民医院 广州 510220)

(<sup>3</sup> 广东省江门市皮肤医院 江门 529000)

**摘 要** 从中国不同城市收集疑为沙眼衣原体(*Ct*)感染的泌尿生殖道标本 323 份,巢式 PCR 扩增 *Ct omp1* 基因片段(包括 4 个变异区),测定其中 96 份阳性标本 *omp1* 基因序列,根据同源性分型并分析其多态位点,根据氨基酸序列,用 Mega 3 软件构建进化树,分析临床株与相应参考株之间的亲缘关系。从 96 份沙眼衣原体阳性标本中,检出 28 种基因变体,其中 E 型最常见,同时发现 *Ct* E、F 型 *omp1* 基因高度保守,而其它基因型都显示一定的变异性。进化树分析发现,各临床株与相应参考株之间遗传距离较近。实验结果表明沙眼衣原体 *omp1* 基因呈现较大的多态性,可为其疫苗的研制及感染的防治提供重要的实验依据。

**关键词** 沙眼衣原体(*Ct*);*omp1* 基因;多态性

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)02-0214-05

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, *Ct*)是目前国内外最常见的性病病原体之一<sup>[1]</sup>,包括 A、B、Ba、C、D、Da、E、F、G、H、I、Ia、J、Ja、K、L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>2a</sub>、L<sub>3</sub> 等 19 种血清型。其中大部分血清型可引起泌尿生殖道感染<sup>[2]</sup>,并可引起严重的并发症,如不孕、异位妊娠、宫颈鳞状细胞癌等。因此,*Ct* 的感染与防治在全球范围内受到广泛关注。

*Ct* 主要外膜蛋白(MOMP)占外膜总蛋白的 60%左右,由于其含有血清型变体、亚种及种特异性表位,并在吸附和侵入组织细胞的过程中发挥重要作用,因此成为流行病学研究的热点及衣原体疫苗的主要候选者。*omp1* 基因是 MOMP 的编码基因,含 5 个稳定序列区(Consistent sequence region, CS)和相间隔的 4 个可变序列区(Variable sequence region, VS)。在 4 个可变序列区,基因序列呈现较大的变异性<sup>[3]</sup>,即 *omp1* 基因的多态性。而细菌基因型的遗传多态性是其致病性的基础<sup>[4]</sup>,也是基因分型的依据<sup>[5]</sup>。因此研究 *Ct* 的 *omp1* 基因的多态性,对其毒力的鉴定、疫苗的研制具有重要的意义。

本文拟从我国不同城市性病门诊收集临床标本,PCR 扩增 *Ct omp1* 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,再通过进化树分析,明确临床株与参考株之间的亲缘关系,从而为 *Ct* 疫苗的研制及进一步研究其致病机

制提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 2003 年 11 月~2004 年 5 月在上海、广州、衡阳、江门等地区的性病门诊收集拟诊为非淋球菌性尿道炎、慢性前列腺炎、附睾炎、宫颈炎和输卵管炎等患者的泌尿生殖道标本 323 份。

**1.1.2 标本采集** 男性用尿道拭子于尿道内 2~3cm 处取材;女性于宫颈管内 1~2cm 处取材,溃疡部位或腹股沟横痃取渗出液。标本置于运输培养基中 4℃ 保存。

**1.1.3 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 聚合酶购自 TaKaRa 公司;dNTPs、200bp DNA marker 购自 Promega 公司。

### 1.2 DNA 模板制备

所有尿道或宫颈拭子标本经 14000r/min 离心 15min,再于沉淀中加入 50μL 裂解液(含 0.5mol/L Tris-EDTA,1% SDS,0.1mg/mL 蛋白酶 K),混匀,100℃煮沸 10min;14000r/min 离心 10min,取上清液作 PCR 模板。

### 1.3 *Ct omp1* 基因扩增和序列测定

参照 Frost 等设计<sup>[6]</sup>合成两对引物,扩增 *Ct* 主要外膜蛋白基因(*omp1*)片段,外引物序列为:P1 5'-

基金项目 湖南省科技厅重点资助项目(04SK2003)

\* 通讯作者。Tel 86-734-8281555;Fax 86-734-8282907;E-mail: yimouwu@sina.com

作者简介 陈丽丽(1975-),女,湖南省攸县人,硕士研究生,研究方向为沙眼衣原体的诊断与防治。E-mail: chlili720612@163.com

收稿日期:2005-06-29;接受日期:2005-08-29;修回日期:2005-11-16

ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG-3' ,P2 :5'-TTTCTAGA ( T/C)TTCAT( T/C)TTGTT-3' ;内引物序列为 :P3 :5'-GGGAATCCTGCTGAACCAAG-3' , P4 : 5'-AATTGCAA ( G/C)GA( A/G)ACGATTTG-3'。上述标本进行 *omp1* 基因扩增 ,反应总体积为 50 $\mu$ L :含 10  $\times$  PCR Buffer (含 MgCl<sub>2</sub>) 5 $\mu$ L ,dNTPs 各 200 $\mu$ mol/L ,引物 P1、P2 各 0.2 $\mu$ mol/L ,模板 5 $\mu$ L ,*pfu* DNA 聚合酶 1.5U ,同时用双蒸水作阴性对照。反应条件 :94 $^{\circ}$ C 5min ;94 $^{\circ}$ C 1min 50 $^{\circ}$ C 1min ,72 $^{\circ}$ C 3min ,38 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 10min。取扩增产物 2 $\mu$ L 作模板 ,用内引物 P3、P4 再扩增一次 ,扩增体系及条件同上。取 5 $\mu$ L PCR 产物加入 1 $\mu$ L 6  $\times$  loading buffer ,以 5V/cm 在 1.2%( W/V )的琼脂糖凝胶中电泳 ,溴乙锭显色。取阳性 PCR 产物 ,委托上海基康生物技术有限公司双向测序 ,每一标本重复测 2 次。测序仪型号为 ABI PRISM 3700。

1.4 BLAST 分析

将所测得的序列进行 BLAST 分析( [www. ncbi. nlm. nih. gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) ) ,与 Ct 标准株 A/SA1/OT ( M58938 ) B( M33636 ) Ba/Apache-2( AF063194 ) C/ TW3/OT ( M17343 ) D/B-120( X62918 ) D/IC-cal-8 ( X62920 ) E/Bour( X52557 ) F/IC-Cal3( X52080 ) G/ UW57/Cx( AF063199 ) H/Wash( X16007 ) I/UW12/Ur ( AF063200 ) Ia/IU-4168 ( AF063201 ) J/UW36/Cx ( AF063202 ) Ja/IU-A795 ( AF063203 ) K/UW31/Cx ( AF063204 ) Li( M36533 ) L2( M14738 ) L3( X55700 ) 进行同源性比较 ,对临床株分型 ,同时分析该临床株与所属血清型参考株的 *omp1* 基因在核苷酸和氨基酸水平上的差异 ,将新检出序列通过 BankIt 程序登录 GenBank。

1.5 进化树分析

根据氨基酸序列 ,用 Clustal X ( 1.8 ) 软件进行序列比对 ;利用 Mega 3 软件构建分子进化树 ,分析临床株与相应参考株的亲缘关系。

2 结果

2.1 PCR 扩增 Ct *omp1* 基因

323 份泌尿生殖道标本用特异性引物经巢式 PCR 扩增 ,96 例扩增出目的基因片段 ,与预期目的片段 980bp 大小相符 ,阴性对照组未出现任何条带 ,琼脂糖凝胶电泳图见图 1。

2.2 测序

将 96 份 Ct 临床株的 *omp1* 基因扩增产物送上海基康公司双向测序 ,将序列进行 BLAST( [www. ncbi. nlm. nih. gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) )分析 ,根据其与各血清型参

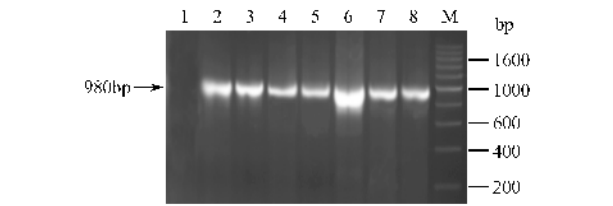


图 1 Ct *Omp1* 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of Ct *omp1* gene fragment. 1. Negative control ( ddH<sub>2</sub>O ); 2 ~ 8. 980bp amplification products from clinical strains ; M. 200bp DNA marker .

考株的同源性分型 ,共检出 10 个基因型 ,28 个基因变体 ,其中 E 型 33 株 ( 34.4% ) J 型 24 株 ( 25.0% ) D 型 12 株 ( 12.5% ) F 型 8 株 ( 8.3% ) G 型 7 株 ( 7.3% ) H 型 3 株 ( 3.1% ) Ba 型 3 株 ( 3.1% ) K 型 3 株 ( 3.1% ) Da 型 2 株 ( 2.1% ) I 型 1 株 ( 1.1% ) ( 表 1 )。

表 1 28 个基因变体的 *omp1* 基因多态性

Table 1 Nucleotide changes found in 28 genetic variants of 96 clinical *C. trachomatis* specimens compared to reference sequences

Genotype ( No. of cases )	No. of strains with nucleotide changes/total	Nucleotide change	Position	Domain	Amino acid change	GenBank No.
Ba1 ( 1 )	1/3	A→G	154	CDI	Thr→Ala	AY950626
		A→G	184	CDI	Met→Val	
		G→T	186	CDI		
		T→C	195	CDI	Silent	
		T→A	198	CDI	Silent	
		A→T	228	CDI	Silent	
		C→T	246	CDI	Silent	
		A→G	249	CDI	Silent	
		A→G	511	VDII	Ser→Gly	
		G→A	586	CDIII	Val→Ile	
		T→G	760	VDIII	Ser→Ala	
Ba2 ( 2 )	2/3	C→T	129	CDI	Silent	AY950630
		A→G	154	CDI	Thr→Ala	
		A→G	184	CDI	Met→Val	
		G→T	186	CDI		
		T→C	195	CDI	Silent	
		T→A	198	CDI	Silent	
		A→T	228	CDI	Silent	
		C→T	246	CDI	Silent	
		A→G	249	CDI	Silent	
		A→G	511	VDII	Ser→Gly	
		G→A	586	CDIII	Val→Ile	
		T→G	760	VDIII	Ser→Ala	
D1 ( 2 )	No variants					
D2 ( 1 )	1/12	C→T	711	CDIII	Ala→Val	AY950628
D3 ( 1 )	1/12	C→T	1092	VDIV	Ala→Val	AY950633
D4 ( 1 )	1/12	C→T	1113	VDIV	Ala→Val	
D5 ( 6 )	6/12	G→A	1091	VDIV	Ala→Thr	
D6 ( 1 )	1/12	C→T	244	CDI	Silent	AY950634
		A→G	338	CDI	Lys→Glu	
		T→A	343	CDI	Silent	
		T→C	361	CDI	Silent	
		G→C	364	CDI	Gln→His	
		A→T	751	CDIII	Silent	

续表 1

Genotype (No. of cases)	No. of strains with nucleotide changes/total	Nucleotide change	Position	Domain	Amino acid change	GenBank accession numbers
Da1 (1)	No variants					
Da2 (1)	1/2	G→A	1092	VDIV	Ala→Thr	AY950629
E1 (30)	No variants					
E2 (1)	1/33	T→C	984	VDIV	Silent	AY950632
E3 (1)	1/33	T→C	150	CDI	Silent	AY950623
E4 (1)	1/33	G→A	997	VDIV	Ala→Thr	AY950619
F1 (8)	No variants					
G1 (3)	No variants					
G2 (1)	1/7	A→G	985	VDIV	Ser→Gly	AY950624
G3 (1)	1/7	A→G	985	VDIV	Ser→Gly	AY950627
		T→G	1003	VDIV	Ser→Ala	
G4 (2)	2/7	C→T	129	CDI	Silent	AY950618
		A→G	154	CDI	Thr→Ala	
		G→A	487	VDII	Gly→Ser	
		T→A	1003	VDIV	Ser→Thr	
H1 (2)	No variants					
H2 (1)	1/3	A→G	439	VDI	Asn→Gly	AY950631
		A→G	440	VDI		
		C→T	446	VDI	Ala→Val	
		C→A	449	VDI	Ala→Glu	
		A→G	452	VDI	Asp→Gly	
		C→A	683	VDII	Thr→Lys	
		G→T	690	VDII	Lys→Asn	
		A→G	866	CDIII	Asn→Ser	
		C→T	1018	CDIV	Silent	
		G→A	1168	VDIV	Ala→Tyr	
I2 (1)		T→C	764	VDIII	Ile→Thr	AY950625
J2 (21)	21/24	C→T	369	CDII	Silent	
J3 (1)	1/24	C→T	369	CDII	Silent	AY950620
		G→A	1010	VDIV	Ser→Asn	
J4 (1)	1/24	C→T	281	VDI	Ala→Val	AY950635
		C→T	369	CDII	Silent	
J5 (1)	1/24	T→C	132	CDI	Silent	AY950622
		A→G	684	CDIII	Silent	
		T→C	720	CDIII	Silent	
		A→G	991	VDIV	ThrAla	
		G→T	1000	VDIV	Ala→Ser	
		C→A	1020	VDIV	Asp→Glu	
K1 (1)	No variants					
K2 (2)	2/3	A→G	293	VDI	Asn→Ser	AY950621

The following reference strains were used for comparison with sequences obtained in this study : Ba/Apache-2 , D/B-120 , identical to D1 , D/IC-Cal8 , identical to Da1 , E/Bour , identical to E1 , F/IC-Cal3 , identical to F1 , G/UW57/Cx , identical to G1 , H/Wash( H/UW4 ) , identical to H1 , I/UW12/Ur , identical to I , J/UW36/Cx , identical to J1 , and K/UW31 , identical to K1 .

### 2.3 C. trachomatis omp1 基因进化关系分析

根据检出的 28 个基因突变体和从 GenBank 中获取的沙眼衣原体 18 个参考株 *omp1* 基因对应的氨基酸序列 ,用 Mega 3 软件构建进化树(图 2)。进化树分析发现 ,沙眼衣原体主要分为 3 群 ,其中两个基因差距较小 ,一个包括 F、G 型 ,另一个包括 A、I、Ia、J、Ja、H、C、K、L<sub>3</sub> 型 ;第三群包括 B、Ba、D、Da、E、L<sub>1</sub>、

L<sub>2</sub>、L<sub>2a</sub> ,与前两群显示较大的遗传距离 ;而且 Ba、Da、Ja 及 Ia 亚型与相应原型之间的遗传距离均较大 ;同时可见 Ct 各临床株与参考株 *omp1* 基因密切相关。

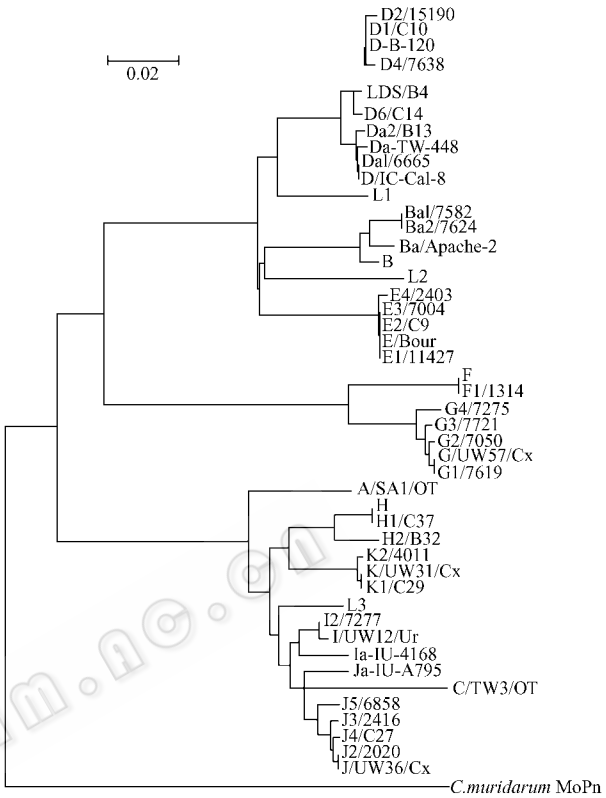


图 2 沙眼衣原体 28 个基因变体和 18 个参考株的氨基酸序列进化树

Fig.2 The distance neighbor-joining tree based on the *C. trachomatis* MOMP amino acid sequences from 28 genetic variants in the clinical material and 18 reference sequences available from GenBank. The sequence from *C. muridarum* is used as an outgroup to root the tree.

### 3 讨论

Ct 是严格的活细胞内寄生物 ,包括 19 个血清型 ,血清型间的差异主要表现在 *omp1* 基因核苷酸的差异 ,即 *omp1* 基因的多态性。然而目前对 *omp1* 基因的多态特点及 MOMP 表位的进化了解不多。随着基因组学分析技术的建立及用于序列分析的生物学信息学工具的出现 ,人类病原菌的基因特征及传染病的流行病学特征均取得了很大的进步 ,对 Ct 的研究也不例外。

本研究从 323 份临床标本中扩增出 96 份 Ct 阳性标本 ,阳性率为 29.7%。根据序列同源性 ,从 96 份阳性标本中 ,检出 10 个基因型 ,即 E、J、D、F、G、H、K、Ba、Da、I 28 种基因变体。其中 E 型最常见 ,其次是 J、D、F 型 ,与全球其它国家报道的 Ct 血清型分布基本一致

核苷酸序列分析发现,E、F型基因高度保守,测定的8株F型序列,均与参考株F/IC-Cal3序列相同。而33个E型序列中,只发现3个突变位点,其中2株为同义突变,有1株在997位发生错义突变,由G→A(Ala→Thr),此基因变体曾在瑞士被检出过<sup>[7]</sup>。而其它基因型均发现有一个或多个核苷酸突变,并且有些核苷酸突变导致氨基酸变化,并可能改变MOMP的功能和抗原性。值得注意的是所有J型株均有核苷酸突变,其中大部分与Jurstrand等<sup>[8]</sup>报道的为同一基因变体,即在369位(C→T)有一无义突变。

很多学者认为 *omp1* 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<sup>[9]</sup>,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。实际上,*omp1* 基因核苷酸序列差异不仅发生于VDs,至少在一定水平上也发生于CDs区。本研究中,60%左右的核苷酸突变均见于VD1、VD2和VD4区(表1),且几乎100%核苷酸突变引起氨基酸变化,而在这些区域中,近50%的突变发生于VD4区;同时也发现发生于CDs的突变,但大部分为同义突变,这反映了CDs区在维持MOMP蛋白结构的稳定性方面发挥重要的作用。

基因重组是Ct为逃避机体的免疫监视作用而呈现基因多态性的另一原因。本研究未检出典型的重组体,但发现类似重组体的基因变体,即Ba1/7582和Ba2/7624,其CD1区序列与D/B-120的CD1序列相同,分别在154位由A→G(Thr→Ala)和184位由A→G(Met→Val)。这种发生于CD1区的重组,也见于其它报道<sup>[7]</sup>,并且该报道指出这类重组主要在于维持蛋白结构稳定,而不是干扰机体的免疫机制。

以前总是以实验室保存菌株或GenBank公布的序列推断Ct种群的系统发育关系,来表明*omp1*的遗传多态性。而*omp1*进化树构建仅适于阐明衣原体的短期进化,因为曾有报道该基因可发生基因内或基因间的重组,而基因重组可使进化树的结构发生变化<sup>[10]</sup>。因此,本文收集半年左右的临床标本,构建进化树推断Ct的短期进化关系。28个基因变

体和18个参考株的进化树分析发现,Ct基因型主要分为3群,即B、C和F-G群。

总之,*omp1*基因序列测定发现Ct临床株的*omp1*基因呈现较大的多态性,对进一步探讨Ct的致病机制、感染的诊治及疫苗的研制发挥重要的作用。

致谢 感谢南华大学遗传学教研室郑济芳博士在数据分析方面提供的帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Millman K, Black CM, Johnson RE. Population-based genetic and evolutionary analysis of *Chlamydia trachomatis* urogenital strain variation in the United States. *J Bacteriol* 2004, **186**(8): 2457 - 2465.
- [2] Morrison RP, Manning DS, Caldwell HD. Immunology of *Chlamydia trachomatis* infections: immunoprotective and immunopathogenic responses. New York: Raven press, 1992.
- [3] Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, et al. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect Immun*, 1989 **57**(4): 1040 - 1049.
- [4] 刘锐,董小平,杨圣辉,等.牙根卟啉单胞菌 *prtH* 基因分布与多态性研究.中华微生物学和免疫学杂志,2004 **24**(4): 263 - 267.
- [5] 李冬梅,王瑞礼,李世荫,等.致病酵母菌基因组多态性及亲缘关系的研究.微生物学报,1997 **37**(2): 135 - 141.
- [6] Frost EH, Deslandes S, Bourgaux-Ramoisy D. Sensitive detection and typing of *Chlamydia trachomatis* using nested polymerase chain reaction. *Genitourin Med* 1993, **69**(4): 290 - 294.
- [7] Lysen M, Osterlund A, Rubin CJ, et al. Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish County. *J Clin Microbiol* 2004, **42**(4): 1641 - 1647.
- [8] Jurstrand M, Falk L, Fredlund H, et al. Characterization of *Chlamydia trachomatis omp1* genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden. *J Clin Microbiol* 2001, **39**(11): 3915 - 3919.
- [9] Batteiger BE. The major outer membrane protein of a single *Chlamydia trachomatis* serovar can possess more than one serovar-specific epitope. *Infect Immun* 1996, **64**(2): 542 - 547.
- [10] Holmes EC, Urwin R, Maiden MC. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* 1999, **16**(6): 741 - 749.

## DNA sequence polymorphism of *Chlamydia trachomatis* omp1 gene

CHEN Li-li<sup>1</sup>, WU Yi-mou<sup>1</sup>, LEI Da<sup>2</sup>, WU Zhi-zhou<sup>3</sup>, HUANG Shu-jie<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Pathogenic Biology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

(<sup>2</sup> Guangdong Second People's Hospital, Guangzhou 510220, China)

(<sup>3</sup> Jiangmen Skin Disease Hospital, Jiangmen 529000, China)

**Abstract** : A method for detection and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* infections based on omp1 gene amplification and sequencing was developed, and the character of omp1 gene of *Chlamydia trachomatis* was analysed. Urethral or endocervical specimens were collected from 323 patients attending STD clinics in Hengyang, Shanghai, Guangzhou and Jiangmen from November, 2003 to May, 2004. DNA was extracted by usual method, and an approximately 980bp fragment from the major outer membrane protein (omp1) gene of *Chlamydia trachomatis* was amplified by nested polymerase chain reaction (nPCR). The PCR products were purified by DNA agarose gel purification system and the sequence of the omp1 gene was determined by using an ABI PRISM 3700 Genetic Analyser, and genotyping was performed by BLAST similarity search. Multiple alignment was performed with CLUSTAL package (CLUSTAL X), and a phylogenetic tree was constructed by Mega3 software to illustrate the evolutionary relationships between clinical isolates and reference strains of *C. trachomatis* obtained from GenBank. All variable sequences were submitted to GenBank by BankIt programme. The overall prevalence of urogenital chlamydial infection was 29.7% (96 of 323). All the 96 *C. trachomatis*-positive cases were sequenced, and 10 genotypes and 28 genetic variants were detected. The most prevalent genotype was E (34.4%), followed by J (25.0%), D (12.5%), F (8.3%), G (7.3%), H (3.1%), Ba (3.1%), K (3.1%), Da (2.1%), L (1.1%). The distribution of *C. trachomatis* genotypes in the four cities in south China was similar to other countries in the world. The omp1 gene was highly conserved for genotype E and F, but appeared slightly less conserved for other genotypes, where the sequences displayed one or several nucleotide substitutions related to the corresponding reference sequence. And a similar recombination was found between genotypes Ba and D in CD1. Phylogenetic tree showed that *Chlamydia trachomatis* genotypes were mainly divided into three clusters, according to previous grouping in the B, F-G, and C complexes. Clusters F-G and C were characterized by small genetic distances within each cluster, but clusters B displayed larger genetic distances. And the clinical isolates were highly related to the reference strains. It is concluded that the isolated *Chlamydia trachomatis* strains exhibit remarkable omp1 DNA sequence polymorphism, which can encourage for vaccine design and infection control.

**Keywords** : *Chlamydia trachomatis*; omp1 gene; Gene polymorphism

Foundation item : The Key Project of Hunan Provincial Science and Technology Department (04SK2003)

\* Corresponding author. Tel : 86-734-8281555 ; Fax : 86-734-8282907 ; E-mail : yimouwu@sina.com

Received 29 June 2005 / Accepted 29 August 2005 / Revised 16 November 2005