

血清 E 型沙眼衣原体的 Real-time PCR 定量分析

李 涛 , 向志光 , 林树柱 , 秦 川

(中国医学科学院 , 北京协和医学院 , 医学实验动物研究所 , 卫生部人类疾病比较医学重点实验室 ,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室 , 北京 100021)

【摘要】 目的 沙眼衣原体感染是最常见的性传播疾病 , 本文拟建立一种准确快速、标准化的感染动物组织衣原体载量检测体系。方法 体外扩增感染用沙眼衣原体血清 E 型 , 克隆衣原体特异基因 OMP1 基因片段作为标准品 , 用 Real time PCR 法测定衣原体基因组拷贝数进行衣原体定量。结果 Real time PCR 在 OMP1 基因片段 200 至 2×10^8 拷贝检测结果成线性 , 在模板中加入小鼠基因组未出现非特异扩增 , 同时未影响扩增效率。结论 针对衣原体特异基因 OMP1 的实时定量 PCR 方法可以较为灵敏的特有的定量检测感染动物样本中的衣原体。

【关键词】 衣原体 ; OMP1 ; Real-time PCR

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)05-0041-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.05.010

Quantitative Analysis of Chlamydia trachomatis (serovar E) by Real-time PCR

LI Tao , XIANG Zhi-guang , LIN Shu-zhu , QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine , Ministry of Health , Institute of Medical Laboratory Animal Science , Chinese Academy of Medical Sciences ; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models , State Administration of Traditional Chinese Medicine ; Beijing Union Medicine College , Beijing 100021 , China)

【Abstract】 Objective Chlamydia trachomatis infection is the most common sexually transmitted disease. The aim of this research is to set a standard system for determination of chlamydia load in tissues from infected animals. **Methods** Chlamydia trachomatis (serovar E) was amplified in vitro for infection. The gene fragment of the chlamydia-specific gene OMP1 was cloned as standard. The quantity of chlamydia was determined based on the copy number of chlamydia genome by real time PCR. **Results** The results of real time PCR were linear when the copy number of OMP1 gene was within the range from 200 to 2×10^8 . Unspecific amplification was not detected after adding mouse genome into the templates , nor was the amplification efficiency affected. **Conclusion** Real time PCR targeting chlamydia-specific gene OMP1 could be applied as a standard method to quantitatively analysis chlamydia in infected animal sample with adequate sensitivity and specificity.

【Key words】 Chlamydia trachomatis ; Real-time PCR ; Quantitative analysis

沙眼衣原体 (Chlamydia trachomatis) 是专性细胞内寄生的具有特殊生活周期的原核细胞型微生物 , 完成一个生活周期大约需要 48 ~ 72 h。沙眼衣原体感染后会出现一系列的临床疾病 , 其 D ~ K 血

物 , 完成一个生活周期大约需要 48 ~ 72 h。沙眼衣原体感染后会出现一系列的临床疾病 , 其 D ~ K 血

[基金项目] “十一五”国家重大科技专项 (2009ZX10004-402)。

[作者简介] 李涛 , 女 , 硕士生。E-mail: leta216@163.com。

[通讯作者] 秦川 , 教授。E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

清型可引起泌尿生殖系统感染^[1]。泌尿生殖道沙眼衣原体的感染是目前较为常见的性传播疾病,据世界卫生组织估计,每年有 9300 万新发病例,给社会造成严重的经济负担。泌尿生殖道沙眼衣原体感染的发病率在我国有逐年增加的趋势,已成为危害公共健康的一大问题^[2]。

目前国内外沙眼衣原体感染动物模型建立方法各异,模型研究标准化的方法有待验证。对于感染动物组织中衣原体的载量的分析可以采用临床上常用的体外细胞培养,并对感染细胞计数的方法。但是这种方法用时较长,定量不够精确。在模型动物感染过程的研究中需要更为快捷、简便并且精确的方法。real time PCR 是一种近年来较为常用的对 DNA 进行定量的方法,本文建立了一种针对衣原体特异基因 OMP1 (gene for major outer membrane protein) 的 Real time PCR 体系,用来检测衣原体的 DNA 拷贝数。

1 材料和方法

1.1 材料

沙眼衣原体血清 E 型标准株(ATCC:VR-348B)由中国医学科学院皮肤病研究所惠赠;Hela-229 细胞购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。细胞培养使用 DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清及青霉素、链霉素抗生素。衣原体生长用培养基为 DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两性霉素 B。衣原体分离培养基为 DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两性霉素 B 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 放线菌酮。衣原体运送培养基为 2-SP^[3]。

1.2 方法

1.2.1 衣原体的培养与包涵体的计量

1.2.1.1 衣原体的培养:将 Hela-229 细胞加入 6 孔板,每孔 10^6 个细胞,于衣原体生长培养基中 37°C , 5% CO_2 培养 24 h 至单层。 -80°C 保存的衣原体常温解冻,强力震荡 1 min,之后加入到准备好的含单层细胞的 6 孔培养板中,每孔 5 μL 或 50 μL 。培养板 35°C 3900 rpm 离心 60 min,然后置于 37°C 孵箱中静置 2 h,弃上清,每孔加 3 mL 衣原体分离培养基 37°C 5% CO_2 孵箱中孵育 60 ~ 72 h。显微镜下观察可见细胞内有包涵体形成。

1.2.1.2 包涵体的计量:6 孔板中预先放置 10 mm 直径盖玻片,衣原体按上述方法进行培养,培养结

束后,将玻片取出用甲醇固定 3 min,姬姆萨染液染色 50 min,冲洗,晾干,脱水,封片观察。高倍镜下随机选取 5 个视野中的 200 个细胞,统计感染细胞的比率。

1.2.2 衣原体的收集及其基因组 DNA 的提取:扩增培养的衣原体培养物弃去分离培养基,用 PBS 溶液清洗 1 次,每孔加 1 mL 衣原体运送培养基 2-SP,用细胞刮刀收集细胞,于 -80°C 冻存备用。将 -80°C 保存的衣原体常温解冻后,强力震荡 1 min, 4°C 3000 r/min 离心 5 min,去掉细胞碎片,上清 4°C 12000 r/min 再离心 20 min,沉淀用 DNA 裂解液(100 mM Tris-HCL, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.2% SDS, 离子水溶解,蛋白酶 K 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)重悬, 55°C 裂解 1 h,加入 0.3 mL 饱和 NaCl 溶液,混匀后置冰上 15 min, 4°C 12000 r/min 离心 15 min,取上清,加等体积的异丙醇,冰浴 15 min, 4°C 12000 r/min 离心 10 min,沉淀用 70% 乙醇洗涤后,用 100 μL 去离子水溶解 DNA^[4]。用分光光度计测定 DNA 浓度, -20°C 保存备用。

1.2.3 OMP1 基因片段的扩增:OMP1 是衣原体种属特异的基因,在不同衣原体型间该基因序列的个别位点存在少量的变异^[5]。本实验在基因保守位置设计了如下引物:omp1 上游引物:5'-AACTCTTGAAATCGGTATTAG-3'; omp1 下游引物:5'-CTCCATAGTAACCCATACG-3'。以 1 μg 衣原体 DNA 作为模板,扩增 OMP1 基因序列中 191 bp 的 DNA 片段。扩增程序为: 94°C 变性 30 s, $45 \sim 55^\circ\text{C}$ 温度梯度复性 30 s, 72°C 延伸 30 s。扩增 35 个循环。

1.2.4 标准品的制备:取 55°C 复性温度扩增的 OMP1 基因片段,经凝胶回收后与 pMD-19T 载体进行连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,经 IPTG 诱导,在含有 X-Gal 和 Amp 抗生素的 LB 培养基培养 16 h,选择白色菌落 4 个,扩增培养,提取质粒,经鉴定 4 个质粒均插入 OMP1 片段。测定质粒浓度,将该质粒作为 OMP1 基因的标准品。连入 OMP1 基因的 pMD-19T 载体质粒的分子量经计算为 1.8×10^6 ,根据标准品质粒 DNA 的浓度和分子量,调整稀释标准品,使其浓度达每微升的分子数为 200, 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 。

1.2.5 real-time PCR:使用 ABI stepone 实时定量 PCR 仪,采用 SYBR Green 荧光染料法进行衣原体的检测。设定标准品的稀释度与分子数的关系,同

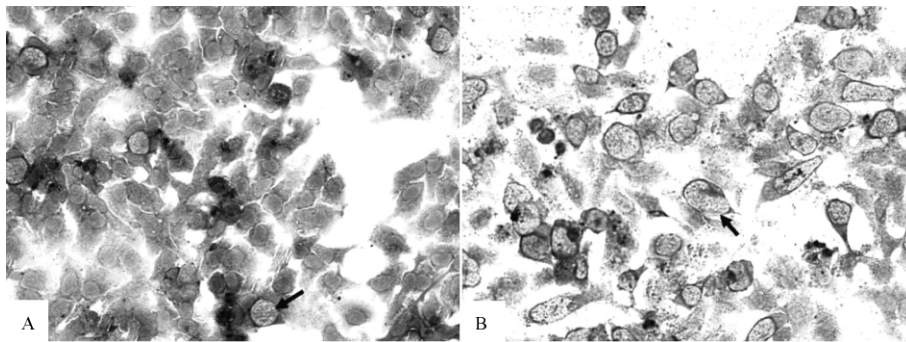


图 1 不同剂量的衣原体感染 HeLa-229 细胞形成的包涵体
 Fig. 1 Chlamydia infection at different doses in HeLa-229 cells

注:A. 低剂量组;B. 高剂量组;黑色箭头所示为衣原体包涵体。

Note: A: low-dose group; B: high-dose group; the black arrow show the chlamydia inclusion bodies.

时包含无 DNA 样品的阴性对照。将小鼠的组织基因组 DNA 加入作为组织提取物系统对照。衣原体基因组 DNA 分别稀释 10、100、1000 倍,取 2 μL 作为 DNA 样品进行扩增,另取 1 μL 衣原体基因组 DNA 同时加入含 1 μL 小鼠组织 DNA 作为对照样本。每个样本作平行复孔。

2 结果

2.1 衣原体的培养与包涵体的计量

将冻存的衣原体复苏后,感染细胞 HeLa-229,孵育,在不同的时间点将玻片取出用甲醇固定 3 min,姬姆萨染液染色 50 min,冲洗,晾干,脱水,封片观察。衣原体感染细胞后孵育 48 h 开始观察到明显的包涵体,此后包涵体形态完整但不断变大,孵育 65 h 后能看到包涵体肿胀导致细胞破裂,释放出原体。取感染后孵育 60 h 染色的盖玻片,进行感染细胞的统计,每孔加入 50 μL 衣原体感染的细胞比率约为 73.83 ± 17.52%,而每孔加入 5 μL 衣原体感染的细胞比率为 4.3 ± 3.16%。图 1 显示感染的 HeLa-229 细胞经 Gimesa 染色的结果。

2.2 Omp1 片段的克隆与标准品的制备

收集细胞内培养扩增的衣原体,提取了衣原体 DNA,用分光光度计测定 DNA 浓度,以 1 μg 衣原体 DNA 作为模板,以 45、50 和 55℃ 复性均可从衣原体的基因组中扩增扩出 191 bp 大小的 DNA 片段(见图 2)。将 55℃ 复性扩增得到的 Omp1 片段该连入载体,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α,提取质粒经测序正确。测定质粒的浓度为 555 ng/μL,根据分子量该浓度每微升含有约为 1.5 × 10⁹ 个质粒分子,调整浓度,达到每微升的分子数为 200、2 × 10³、2 × 10⁴、2 × 10⁵、2 × 10⁶、2 × 10⁷、2 × 10⁸,制备了衣原体

real time PCR 检测的标准品。

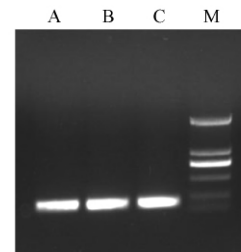


图 2 扩增的 Omp1 片段

Fig. 2 Omp1 amplification

注:A、B、C 扩增的复性温度分别是 45、50、55℃;M, DNA 分子量标准为 DL2000, 扩增出的片段大小为 191 bp。

Note: A, B, C respectively; the annealing temperature for the 45, 50, 55℃; M, DNA marker DL2000; The amplified fragments is 191 bp

2.3 real time PCR 法检测衣原体拷贝数的灵敏度和特异性

在 ABI stepone 上检测到标准品在 200 至 2 × 10⁸ 拷贝 R² 值为 0.982,标准曲线成线性(图 3 右所示);以 OMP1 质粒、衣原体基因组以及含有小鼠基因组的衣原体基因组作为模板,分别得到黄、绿、蓝三条溶解曲线,分析显示三种样本的溶解曲线较为一致,三条曲线均在 83.51℃ 达到峰值(图 3 左所示)。将衣原体基因组做梯度稀释,样品中加入 100 ng 小鼠基因组,检测结果不受影响(表 1 所示)。

3 讨论

衣原体在动物感染模型中荷菌量的传统检测方法是组织样品感染 HeLa-229 或是 McCoY 细胞,衣原体是一种细胞内寄生的微生物,在细胞内会形成包

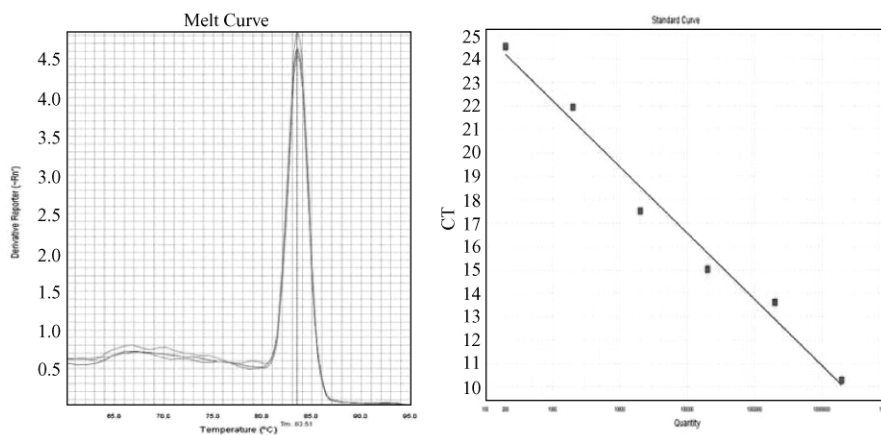


图 3 real time 定量的结果

Fig. 3 real time PCR on OMP1

注:左图为溶解曲线;右图为标准曲线

Note: left: melt curves; right: standard curve

涵体 往往通过是否形成包涵体来判断临床样本是否有衣原体感染。通过包涵体计数分析感染衣原体的数量,但是这种计量方法更多的是一种定性的分析,进行定量研究不是十分准确。我们的研究结果也显示了这一点,不同浓度的衣原体感染靶细胞形成包涵体的数量不能完全显示原始包涵体浓度。

表 1 衣原体基因组在不同浓度,不含或含有小鼠基因组时的 Ct 值

Tab. 1 Ct value of different concentrations of Chlamydia genomes without or with mouse genome

稀释度 Dilution	不含小鼠基因组的 Ct 值 Ct value without mouse genome	含小鼠基因组的 Ct 值 Ct value with mouse genome
10^{-1}	14.51	14.94
10^{-2}	17.99	17.96
10^{-3}	21.58	21.55

实时定量 PCR 是近年来在病原体载量分析中广泛应用的方法。目前也有人衣原体进行相关研究。作为定量研究方法,PCR 扩增会受到诸多条件的影响。比如引物的特异性、模板的质量以及扩增体系的稳定性。OMP1 基因是衣原体特异的基因,在衣原体的基因组中只有一个拷贝。不同血清型的衣原体在该基因的某些位点存在突变,引物的扩增位置也会影响到该引物在不同型衣原体的扩增。我们根据目前已经测序的各 OMP1 基因中的保守序列设计引物,可以扩增各种血清型的衣原体。

提取基因组的方法会影响到基因组的质量。我们提取衣原体 DNA 的方法类似于动物组织 DNA 的提取方式,因此在动物感染研究中组织样本中难免会

受到动物组织 DNA 的干扰。我们的研究中在不同稀释度的衣原体 DNA 中掺入小鼠组织 DNA 基因组,结果发现小鼠基因组没有影响到衣原体的扩增。

临床研究表明,衣原体首先感染女性宫颈柱状上皮细胞,继而可上行感染输卵管和盆腔,也可下行感染阴道鳞状上皮细胞。在沙眼衣原体小鼠生殖道感染模型中,主要在宫颈上皮细胞中可检测到衣原体,因此提取模型小鼠宫颈上皮细胞中的 DNA 即可进行衣原体载量的分析。

使用 real time PCR 的方法对衣原体进行定量具有一定的灵敏度,特异性较好,不受感染动物基因组的影响,作为一种标准化的方法可以用于衣原体感染动物组织样品中衣原体载量的定量分析。

参考文献:

- [1] Mania-Pramanik J, Potdar S, Kerkar S. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infection[J]. J Clin Lab Anal 2006 20:8-14.
- [2] 中国性病控制中心. 2004 年全国性病疫情分析报告[J]. 性病情况简报 2005, 195:2-8.
- [3] 刘全忠等. 衣原体与衣原体疾病[M]. 天津科学技术出版社. 2004, 1.
- [4] K. D. Quint, R. J. M. Bom, S. M. Bruisten, et al. W. J. G. Melchers, H. J. C. de Vries, S. A. Morre, W. G. V. Quint, Comparison of three genotyping methods to identify Chlamydia trachomatis genotypes in positive men and women[J]. Molecular and Cellular Probes 2010 24:266-270.
- [5] V. Borges, R. Ferreira, A. Nunes, P. Nogueira, et al. Normalization strategies for real-time expression data in Chlamydia trachomatis[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010 82:256-264.

(修回日期) 2011-02-18