

鼠衣原体毒力基因的筛选和基因差异型菌株的建立

周洲^{1*} 吴移谋¹ 谭钢² 陈丽丽¹ 李忠玉¹ 钟光明³

(1. 南华大学医学院 病原生物学研究所 湖南 衡阳 421001)

(2. 南华大学附属第一医院眼科 湖南 衡阳 421001)

(3. Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas 78229, USA)

摘要:【目的】探讨鼠衣原体(*Chlamydia muridarum*, Cm)标准株与减毒株全基因组序列中存在的差异, 筛选毒力基因并建立不同基因型的单克隆菌株, 为后续致病机制的研究奠定基础。【方法】将 Cm 标准株 G0 和减毒株 G28 以高通量测序法进行全基因组测序, 通过全基因组序列比对分析并筛选潜在的毒力相关基因; 经空斑形成实验(Plaque assay)在混合菌 G0 和 G28 中大量挑取空斑, 以毒力靶基因的 PCR 测序鉴定从 G0 和 G28 中筛选含有不同毒力基因型的单克隆菌株。【结果】全基因组测序结果显示 Cm G0 与 G28 的 TC0412、TC0237 和 TC0668 基因明显不同。通过挑取空斑初步筛选了 111 个空斑样品, 通过 3 个毒力基因的 PCR 测序鉴定最终获得了 G0 和 G28 来源的 56 个单克隆菌株, 并根据 TC0412 蛋白型分成 B3、D1 和 E1 三组, 每组中含有 TC0237 和 TC0668 基因差异性菌株。【结论】Cm 的致病能力可能与 TC0412、TC0237 和 TC0668 基因有关, 筛选获得的单克隆菌株通过分组匹配后可用于后续的毒力基因功能研究。

关键词: 鼠衣原体, 毒力基因, 筛选, 空斑形成实验

Screening of virulence gene and establishment of isogenic *Chlamydia muridarum* clones with different genotype

ZHOU Zhou^{1*} WU Yi-Mou¹ TAN Gang² CHEN Li-Li¹ LI Zhong-Yu¹
ZHONG Guang-Ming³

(1. Institute of Pathogenic Biology, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

(2. Ophthalmology Department, The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

(3. Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas 78229, USA)

Abstract: [Objective] To find difference in whole genome sequence between *Chlamydia muridarum* standard strain and attenuated strain, screening virulence gene and establish the corresponding isogenic

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81100648); 湖南省自然科学基金项目(No. 13JJ4072); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(No. 12B109, 13B099); 分子靶标新药研究协同创新中心项目[No. 湘教通(2014) 405号]

*通讯作者: Tel: 86-734-8281907; 信箱: susiezhou99503@gmail.com

收稿日期: 2015-01-08; 接受日期: 2015-03-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-24

organisms with different genotype, and it may lay a foundation for analyzing pathogenic mechanism. **[Methods]** *C. muridarum* strain Nigg G0 and attenuated strain G28 were sequenced by deep sequencing. Virulence-associated genes were identified by whole genome sequencing and alignment. A plaque-forming assay was used to isolate many plaques from both CM.G0 and CM.G28 population organisms. Based on PCR sequencing results from virulence-associated gene, individual clones with different genotype were selected. **[Results]** Whole genome sequencing and alignment revealed that TC0412, TC0237 and TC0668 gene have much difference between CM.G0 and CM.G28. We had obtained 111 plaque samples by plaque-forming assay, and 56 individual clones from CM.G0 and CM.G28 were selected by PCR identification of TC0412, TC0237 and TC0668. Some clones were matched in three pairs (B3, D1, E1) by TC0412 proteiform, and each pair contained the matched organisms which lack of mutation or carrying 100% mutation of TC0237 and TC0668 gene. **[Conclusion]** The results showed that TC0412, TC0237 and TC0668 gene may be associated with pathogenicity of *C. muridarum*. The screened clones which have been matched in pair can be used for next function research of virulence gene.

Keywords: *Chlamydia muridarum*, Virulence gene, Selection, Plaque-forming assay

生殖道感染是全世界普遍关注的公共健康问题。沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)作为泌尿生殖系统感染的常见病原体之一,可引起包括不孕不育、异位妊娠、宫颈癌在内的多种严重的并发症^[1-2]。因此,阐明 Ct 致病机制,研制疫苗是有效防控 Ct 感染的关键。鼠衣原体(*Chlamydia muridarum*, Cm)是 1999 年被重新定名的衣原体种,以往归属于沙眼衣原体下的 3 个生物变种之一,由于 Cm 与 Ct 同源性高,且 Cm 在小鼠感染模型内的临床表现与 Ct 在人体中的非常相似,故 Cm 感染小鼠生殖道模型成为了研究 Ct 致病机制及其疫苗研制的理想模型^[3-6]。

前期工作中我们发现,在体外特殊条件下对野生型 Cm 连续传代可获得致病能力明显下降的减毒株。为进一步明确影响致病的毒力基因及其功能,将亲本代及后代减毒株进行全基因组序列比对及分析,发现亲本株(命名为 Generation 0, G0)及后代减毒株(命名为 Generation 28, G28)均为混合菌(Mixture),并在 TC0412、TC0237 以及 TC0668 基因上有明显差别。通过空斑形成实验(Plaque assay)大规模筛选出 G0 和 G28 的单克隆菌株并进行靶基因的 PCR 鉴定,挑取靶基因测序纯度高的单克隆菌株,并以 TC0412 基因为分组标准,进一步对 TC0237 和 TC0668 基因型别分组匹配,将单克隆菌株纯化

后进行全基因组测序鉴定,为后续靶基因在体内及体外的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

衣原体菌株及试剂: Cm (Nigg 株)亲本株 G0 及后代减毒株 G28,本实验室传代制备和/或保存于 -80°C 。HeLa 细胞,购自美国菌种典藏中心(ATCC, cat#CCL2)。KOD DNA 聚合酶,购自美国 Merck 公司;衣原体全基因组提取试剂盒,购自德国 QIAGEN 公司。

1.2 方法

1.2.1 Cm 的 G0 及 G28 菌株全基因组提取及分析:取适量纯化的具有感染性的衣原体原体(Elementary body, EB), 16 000 r/min 高速离心后,将 EB 沉淀用 EB 裂解液重悬,并加入终浓度 100 mg/L 的蛋白酶 K,混匀后 50°C 、200 r/min 振摇过夜,将裂解产物加入无 DNA 的 RNA 酶(终浓度 100 mg/L)后 37°C 作用 1 h,按基因组提取试剂盒说明提取菌株的全基因组标本,并以高通量测序仪行全基因组测序。将 G0 和 G28 的全基因组测序结果与 GenBank 上已公布的 CmNigg 株基因序列(NC_002620.2)通过 Burrows-Wheeler aligner mem algorithm 软件进行比对。比对结果及基因编码蛋白分析以 Genome Analysis Toolkit 和 MathWorks MATLAB r2014a

Bioinformatics Toolbox 软件完成。

1.2.2 空斑形成实验初步筛选 G0 及 G28 的单克隆菌株: 以 8×10^5 个/mL 的 MyCcoy 细胞预设 6 孔板, 使 12–24 h 内细胞丰度达到 95%。第 2 天按常规方法以系列稀释度的 Cm G0 或 G28 分别感染预设细胞, 并于皿盖上做好标记。感染后于 37 °C 放置 4–5 h, 吸弃旧培养液, 加入 2 mL/孔的琼脂糖培养基, 待琼脂凝固后, 补充 3–4 mL/孔的细胞培养液 (DMEM+10%胎牛血清+1%放线菌酮), 继续置于 37 °C 孵箱中培养 5–7 d 以形成空斑。空斑形成后, 挑取清晰可见又不易相互污染的单个空斑, G0 和 G28 各挑取 40–70 个空斑进行分析和筛选。将空斑溶于 100–200 μ L ddH₂O 后, 加灭菌玻璃珠振荡破碎细胞, 50 μ L (加入终浓度 1%的 SDS) 置于沸水中裂解 5–10 min, 用作 PCR 模板, 剩余的置于 -80 °C 保存用于后续样本扩增、纯化。

1.2.3 G0 和 G28 空斑样品的基因鉴定: 根据 GenBank 提供的 Cm 标准株 Nigg 的 TC0412、TC0237、TC0668 基因序列, 分别设计 3 套引物用于每个空斑样品的 3 个靶基因扩增(表 1)。PCR 反应总体积 25 μ L: Cm 单个空斑样品模板 2 μ L, 引物 P1 和 P2 (终浓度 50 μ mol/L) 各 0.5 μ L, KOD DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 12.5 μ L, 10 \times 增强液 10 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 5 μ L, ddH₂O 4 μ L。PCR 扩增条件: 95 °C 3 min (TC0412 基因 94 °C 2 min); 95 °C 15 s (98 °C 2 s), 55 °C 30 s (60 °C 15 s), 68 °C 3 min; 35 个循环; 68 °C 10 min。取

5 μ L 扩增产物经 1%琼脂糖电泳鉴定其结果, 确认目的产物大小, 剩余扩增产物经 DNA 纯化系统回收、纯化后进行 PCR 产物的高通量测序鉴定。根据测序曲线的 Q20 值(用于衡量测序准确度的质量值)和平整度判断 PCR 产物纯度, 并筛选出 G0 和 G28 来源的单克隆菌株。

1.2.4 G0 和 G28 单克隆菌株的分组、纯化和鉴定: 根据测序图谱的质量和纯度挑选单克隆菌株。将 PCR 鉴定为单克隆菌株的样品进行第二代空斑形成实验以进一步纯化样品。以 TC0412 基因型为标准, 将所有的单克隆菌株进行分组, 每组在所有单克隆菌株的基础上, 按照 TC0237 和 TC0668 的基因型, 对所含单克隆菌株进一步细分匹配。选择一个代表性菌株, 按常规方法在 HeLa 细胞中逐步扩大培养, 最终收获适量 Cm 进行衣原体 EB 的纯化^[7-11]。通过密度梯度离心法对需要的代表性单克隆菌株进行纯化, 将获得的纯化 EB 部分经裂解并提取基因组后, 再次进行全基因组测序鉴定。余下 EB 以 1 mL SPG 溶液重悬后分管置 -80 °C 保存。

2 结果与分析

2.1 Cm 标准株 G0 和减毒株 G28 有 3 处明显差异的基因突变

全基因组测序结果显示, 与 GenBank 上已公布的 Cm 标准株 Nigg 株相比, 本实验室保存的 Cm 亲本代 G0 与后代减毒株 G28 间存在多个基因的不同(表 2)。在这些基因中, TC0237、TC0412 及 TC0668 基因上的区别最为明显。TC0237 基因在第 277310

表 1 用于扩增 TC0412、TC0237 和 TC0668 基因的引物序列
Table 1 The primers for amplification of TC0412, TC0237 and TC0668

Primer	Sequence (5'→3')	Size (bp)
TC0412 P1	GCAGTCACCATGGATGTTACTAG	23
TC0412 P2	AAGAATACCCCATACATTCCTGT	23
TC0237 P1	CACTTAAAAGAAAAGGGGTAAATAATA	28
TC0237 P2	TGTTACAATGGGCCCTATTATCTAGG	27
TC0668 P1	AAAACCTATCCTTTCCTCTCC	21
TC0668 P2	CGCATGAAACGCGAAGGAG	19

表 2 *C. muridarum* 亲本代 G0 及减毒株 G28 的基因组测序比对结果
Table 2 Genome alignment of *C. muridarum* G0 and G28

Nucleotide mutation	Nigg G0 ¹	Nigg G28 ²	Gene location	Codon mutation	Protein mutation	Mutation type
G126406-	93.11	94.51	Intergenic			
-126416A	90.35	81.59	Intergenic			
A126475-	95.84	93.18	Intergenic			
-141409A	93.71	93.29	TC0118			Non-CDS
---169449TTT	90.91	90.81	TC0138	ATT->ATT	I26M	AA Insertion
G277310C	0	100.00	TC0237	CAA->GAA	Q117E	Conservative
T403623A	100.00	99.89	TC0341	TTA->TAA	L341*	Nonsense
A403624C	100.00	99.90	TC0341	TTA->TTC	L341F	Conservative
T403652C	99.86	99.91	TC0341	TCA->CCA	S351P	Missense
A404884-	98.43	98.66	TC0342	CAA->CAT	Q313H	Frameshift
G472759A	6.21	0	TC0412	ATG->ATA	M1M	Silent
T472827G	6.64	0	TC0412	TTA->TGA	L24*	Nonsense
-472840T	12.13	51.63	TC0412	ACT->ACT	T28T	Frameshift
-472921C	7.43	2.75	TC0412	TAT->TAC	Y55Y	Frameshift
C472961T	17.12	0.47	TC0412	CAG->TAG	Q69*	Nonsense
G473018T	7.37	26.12	TC0412	GAG->TAG	E88*	Nonsense
-473191T	7.53	9.22	TC0412	TCT->TCT	S145S	Frameshift
C543343-	5.42	29.94	Intergenic			
G797659T	0	6.39	TC0668	GGA->TGA	G216*	Nonsense
G797977A	0	26.09	TC0668	GGA->AGA	G322R	Missense
G846474-	98.41	98.00	TC0708	TTG->TTG	M1M	Frameshift

注: 1: Cm G0 中某个基因的突变率(%); 2: Cm G28 中某个基因的突变率(%); *: 产生终止密码子; -: 1 个碱基位点; ---: 3 个碱基位点; 碱基突变包括碱基置换、碱基缺失和碱基插入, 如“G277310C”表示第 277 310 位碱基位点由 G 置换为 C; “G126406-”表示第 126 406 位碱基位点的 G 缺失了; “-126416A”表示第 126 416 位碱基位点处插入了一个 A。

Note: 1: Mutation rate of a certain gene in *C. muridarum* G0 (%); 2: Mutation rate of a certain gene in *C. muridarum* G28 (%); *: Stop coden; -: One base site; ---: Three base sites; Nucleotide mutation include base substitution, base deletion and base insertion, such as “G277310C” means base G had been substituted by base C in 277 310 base site, “G126406-” means base G had been deleted in 126 406 base site, while “-126416A” means base A had been inserted in 126 416 base site.

号碱基位置上, 存在碱基由“G”变成“C”的点突变, 该突变在 G0 中的突变率为 0, 在 G28 中突变率为 100%; TC0412 基因存在多种突变类型, 其中, “-472840T”插入突变在 G0 中突变率约为 12.13%, 在 G28 中突变率约为 51.63%; 而 TC0668 基因存在 2 种突变, “G797977A”点突变在 G0 中突变率为 0, 在 G28 中突变率约为 26.09%。

2.2 CmG0 和 G28 单克隆菌株的获得及其基因鉴定

经空斑形成实验初筛 G0 后共获得了 44 份空斑样品, G28 获得 67 份空斑样品。将初筛的单个样

品制备相应的 PCR 模板后, 由 TC0412 基因引物扩增测序, 若 PCR 产物测序图谱显示其为纯化样品, 进一步将测序结果经 NCBI 的 ORF Finder 分析并对其蛋白型别(Proteiform)进行分组。经 TC0412 测序图谱分析, 初筛的样品中 18 份 G0 及 38 份 G28 空斑样品为单克隆菌株, 通过 ORF Finder 分析显示, 这 56 份单克隆菌株的 TC0412 基因可分为 8 种蛋白类型, 以 GenBank 上公布的 Nigg 序列为参照(A1), 根据对比后的相关性, 分别命名为 B1、B2、B3、C1、C2、D1、E1 及 G1 (图 1)。将 56 份单克隆菌株的 PCR 模板再通过 TC0237 和 TC0668 引物进行

PCR 扩增、测序鉴定, 结果显示, TC0668 基因在筛选的单克隆菌株中以无突变、“G322R”突变以及“G216*”突变 3 种形式存在, TC0237 基因在筛选的单克隆菌株中同样以无突变、“Q117E”突变两种形式存在。56 份单克隆样品的 TC0412、TC0237 及 TC0668 基因型别检测结果总结如表 3 所示。

2.3 筛选的单克隆菌株的分组及全基因组测序鉴定

将 56 份单克隆菌株的 TC0412、TC0237 及 TC0668 基因型别进行分析总结。以同种型别的 TC0412 菌株为一组, 按照 TC0237 基因有/无“Q117E”突变与 TC0668 基因有/无“G322R”突变进行匹配的原则, 选取相应菌株划分为同一实验组。经筛选匹配, 最终仅选取 3 种 TC0412 基因型别作为分组依据, 分别为 B3、D1 和 E1。B3 组中又根据 TC0237 基因和 TC0668 基因突变的匹配原则分成 3a、3b、3c 三个亚组; D1 组中仅含有 TC0237 与 TC0668 基因同时突变/不突变的 6a 与 6c 组; E1

组含有仅 TC0237 突变/不突变的 7a 与 7b 组。单克隆菌株的分组如表 4 所示。分组后在各组中各挑取一株代表菌用于扩增、纯化, 再次全基因组测序后证实为单克隆菌株, 并符合基因筛选要求。

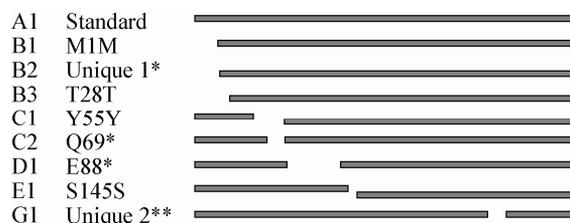


图 1 56 份单克隆菌株 TC0412 基因对应的蛋白型别
Figure 1 TC0412 corresponding proteoforms to their genotype from 56 plaque-purified clones

注: Unique 1*: “T473758-”基因突变, 该突变将导致编码蛋白出现“I344I”改变; Unique 2**: “T472758g”基因突变, 该突变将导致编码蛋白出现“M1 终止密码子”的改变。

Note: Unique 1*: Gene mutation “T473758-” which result in “I344I” protein mutation; Unique 2**: Gene mutation “T472758G” which result in “M1stop coden” protein mutation.

表 3 56 份单克隆菌株的 TC0412、TC0237、TC0668 基因型别
Table 3 Genotype of 56 organisms characterized with TC0412, TC0237 and TC0668

Plq #	TC0412	TC0668	TC0237	Plq #	TC0412	TC0668	TC0237	Plq #	TC0412	TC0668	TC0237
G0.1	S145S	-	-	G28.3	T28T	-	Q117E	G28.45	T28T	-	Q117E
G0.2	I334I	-	-	G28.4	E88*	G322R	Q117E	G28.46	E88*	G322R	Q117E
G0.3	I334I	-	-	G28.5	T28T	-	Q117E	G28.48	T28T	-	Q117E
G0.4	I334I	-	-	G28.6	T28T	G322R	Q117E	G28.49	T28T	-	Q117E
G0.5	S145S	-	-	G28.7	T28T	-	Q117E	G28.51	M1*	G216*	Q117E
G0.6	M1M	-	-	G28.8	E88*	G322R	Q117E	G28.52	E88*	G322R	Q117E
G0.7	Y55Y	-	-	G28.9	S145S	-	Q117E	G28.53	T28T	-	Q117E
G0.8	Y55Y	-	-	G28.11	T28T	-	Q117E	G28.54	T28T	G322R	Q117E
G0.10	T28T	-	-	G28.12	E88*	G322R	Q117E	G28.55	E88*	G322R	Q117E
G0.11	Y55Y	-	-	G28.14	E88*	G322R	Q117E	G28.56	T28T	-	Q117E
G0.13	T28T	-	-	G28.25	E88*	G322R	Q117E	G28.57	T28T	G322R	Q117E
G0.14	Y55Y	-	-	G28.30	T28T	-	Q117E	G28.58	T28T	-	Q117E
G0.16	M1*	-	-	G28.38	S145S	-	Q117E	G28.59	T28T	G322R	Q117E
G0.17	S145S	-	-	G28.39	E88*	G322R	Q117E	G28.62	T28T	-	Q117E
G0.18	M1M	-	-	G28.40	Y55Y	-	Q117E	G28.64	E88*	G322R	Q117E
G0.20	Q69*	-	-	G28.41	E88*	G322R	Q117E	G28.65	T28T	-	Q117E
G0.21	E88*	-	-	G28.42	T28T	-	Q117E	G28.66	S145S	-	Q117E
G0.22	E88*	-	-	G28.43	S145S	-	Q117E	G28.67	E88*	G322R	Q117E
G28.2	M1*	-	Q117E	G28.44	E88*	G322R	Q117E				

注: -: 该基因与 GenBank 上公布的序列结果比对一致, 无任何突变; *: 终止密码子。

Note: -: No mutation comparing with the sequence published on GenBank; *: Stop coden.

表 4 单克隆菌株根据 TC0412、TC0237 及 TC0668 的分组情况
Table 4 Groups of isogenic clones based on TC0412, TC0237 and TC0668

Group	TC0412 type	TC0668 G322R mutation	TC0237 Q117E mutation	Matching plaques
3a	B3	-	-	G0: 10, 13
3b	B3	-	+	G28: 3, 5, 7, 11, 30, 42, 45, 48, 49, 53, 56, 58, 62, 65
3c	B3	+	+	G28: 54, 57, 59
6a	D1	-	-	G0: 21, 22
6c	D1	+	+	G28: 4, 8, 12, 14, 25, 41, 44, 46, 55, 64, 67
7a	E1	-	-	G0: 1, 5, 17
7b	E1	-	+	G28: 9, 38, 43

3 讨论

通过衣原体基因结构和功能的研究, 研究者们已经逐渐揭示了许多与衣原体致病有关的毒力基因。但常规研究往往通过相似性比较发现单个毒力基因, 无法系统地解释致病机制。以标准致病株和减毒株为对象进行比较基因组学研究, 不仅能发现致病基因, 还能提供进一步了解致病机制的良好模型。卡介苗的问世提示我们, 微生物物种在体外经连续多次传代后, 毒力会逐渐减弱甚至丧失。究其原因, 可能与物种在体外培养时, 为适应环境维持生长, 将能量用于生长繁殖而非毒力有关, 因此经连续多次体外传代后, 后代菌株与原始亲本株相比, 致病能力会下降, 而毒力基因会出现变异^[12-13]。我们在前期研究工作中, 以本实验室保存的 Cm 标准致病株 Nigg 为亲本株并命名为 Generation 0 (G0), 通过在体外特定条件下的连续传代获得第 28 代(G28)。通过动物实验证明, G28 与 G0 相比, 对小鼠上生殖道的致病能力大大降低, 并具有统计学意义(数据待发表)。在此基础上, 获得了进一步分析致病基因及机制的标准株和减毒株。

比较基因组学使人们可以从全基因角度对物种的遗传与进化进行系统分析。对于物种间毒力丢失的研究, 该方法可以快速鉴定物种间发生的所有突变, 进而阐明毒力丢失的分子机制^[14]。因此, 本文采用了全基因组测序和比较基因组学分析的策略来进行毒力基因的筛选。通过高通量全基因组测序比对, G0 和 G28 菌株与已经公布的 CmNigg II 标

准株(NC_002620)相比, 在全基因组序列上存在多个基因突变位点, 其中 G0 和 G28 在基因突变位点及突变频率上均有差异(表 2)。排除测序深度和覆盖率的误差, G0 和 G28 在 3 处基因突变上有明显差异, 分别为: (1) TC0412 的“-472840T”突变, 该突变在标准株 G0 上的出现概率约为 12%, 而在减毒株 G28 上出现的概率约为 51%; (2) TC0237 的“G277310C”突变, 该突变在标准株 G0 上出现的概率几近 0, 而在减毒株 G28 上出现的概率几近 100%; (3) TC0668 的“G797977A”突变, 该突变在 G0 上的发生率几近 0, 而在 G28 上出现的概率约 26%。综上所述, 对于 Cm 菌株 G0 和 G28 毒力差异的机制, 我们认为主要从 TC0412 (-472840T)、TC0237 以及 TC0668 基因方面进行深入研究。但同时, 全基因组测序的结果提示我们, G0 和 G28 均为混杂菌, 要鉴定某个基因的特异功能, 需分离获得单一菌株以确保靶基因突变形式为“全”或“无”。因此, 我们对 G0 和 G28 混杂菌进行单克隆菌株筛选。

空斑形成实验是利用某些能破坏宿主细胞的病毒去感染致密单层细胞, 通过一段时间培养导致感染细胞溶解而形成肉眼可见空斑的技术^[15]。由于一个空斑是由一个感染性菌体繁殖引起的, 将其用于衣原体研究, 理论上通过挑取空斑即可获得由一个衣原体 EB 增殖成的衣原体菌株。利用空斑形成实验从 G0 和 G28 中初步筛选获得 111 份空斑样品。为鉴定靶基因的突变, 并确保筛选样品的纯度, 以

高通量测序法首先对从 111 份菌株模板扩增出的 TC0412 基因产物进行验证。结果显示, 56 份空斑样品的测序结果纯度较高, 且获得的 8 种 TC0412 突变中, 除未检测到混杂菌出现的“T472827G”突变外, 有 6 种突变与混杂菌 TC0412 基因检测结果相符。不仅如此, 在空斑样品中, 我们还发现 2 种新的 TC0412 突变型, 即“T473758-”突变和前 10 位碱基的多重突变。以 TC0412 基因型别作为鉴定单克隆菌株的方法和后续实验分组的依据, 结合 56 份样品 TC0237 及 TC0668 基因型别的鉴定结果。最终获得来源于 G0 和 G28 的 56 份单克隆菌株样本, 并根据 TC0412 的基因型别, 56 份样本中的若干菌株被分成 3 个实验组。

值得注意的是: 将筛选的单克隆样品, 在 TC0412 基因基础上进一步按 TC0237 及 TC0668 基因型别分组匹配, 是根据实验结果设计展开的。在 G0 和 G28 的全基因组序列比较中, TC0412 展现出多基因型的特点, 且未检测到不突变的基因型, 这说明 TC0412 基因不突变的概率极低, 挑取含野生型 TC0412 菌株的可能性不大; 而 TC0237 “G277310C”突变在 G0 中概率为“0”, 在 G28 中为“100%”, 说明来自 G0 菌株的 TC0237 没有突变, 来自 G28 菌株的 TC0237 均发生同种基因突变; 同理, TC0668 “G797977A”基因突变概率在 G0 菌株中为“0”, 而在 G28 中超过 25%。相对于 TC0412 而言, 获得其他两种基因野生型及突变型菌株的可能性更大。因此, 为更好地找出能独立分析 TC0237、TC0668、TC0412 基因功能的菌株, 实验最终确定方案: 以 TC0412 相同基因型为分组依据, 建立 TC0237 和 TC0668 基因差异型单克隆菌株组别, 阐明单个基因功能。

我们在研究中虽然发现了 8 种类型的 TC0412 基因突变, 但通过分析发现“-472840T”突变最具有研究价值, 通过在某处碱基位置插入“T”造成后续阅读框移位, 导致编码氨基酸出现改变, 也因此可能造成蛋白功能的变化。这一点在 Ct 中得到了证实, Ct 的 CT135 基因与 Cm 的 TC0412 为同源序列,

CT135 在 152143 号碱基位置插入或缺失“T”后会出现移码突变, 也因此导致 Ct 在小鼠生殖道的感染能力增强^[16]。但究竟 TC0412 的“-472840T”突变是否具有与 CT135 突变类似的功能, 还有待在后续的实验中进行进一步研究。Cm 的 TC0237 基因全长 480 bp, 与相邻基因 TC0235、TC0236 共用一个启动子反向编码 DUF720 蛋白家族成员。尽管 DUF720 蛋白功能目前尚不清楚, 但研究发现 TC0236 基因的“Q119K”突变可能与 Cm 质粒缺失株 CM972 及其衍生株 CM3.1 在致病和感染能力上的差异有关^[17]。在本研究制备的致病株 G0 和减毒株 G28 中, TC0237 基因也存在“Q117E”突变的差异。因此, 鉴于蛋白质家族结构和功能上的相关性, 我们推测, TC0237 基因编码蛋白可能与 TC0236 蛋白功能相似, 也参与 Cm 的致病与感染。

通过将 Cm G0、G28 与已公布 Nigg 标准株的全基因组序列进行比较, 我们获得了两种菌株上发生的所有突变信息, 进一步比较 G0 和 G28 的突变信息, 从而确定了减毒株 G28 所特有的基因突变。对这些突变的分析可以使我们发现致病基因, 并从分子生物学水平上研究衣原体毒力丢失的可能机制, 为阐明致病机理, 寻找候选疫苗奠定实验基础。

参 考 文 献

- [1] Rodgers AK, Budrys NM, Gong S, et al. Genome-wide identification of *Chlamydia trachomatis* antigens associated with tubal factor infertility[J]. Fertility and Sterility, 2011, 96(3): 715-721
- [2] Land JA, van Bergen JE, Morre SA, et al. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection in women and the cost-effectiveness of screening[J]. Human Reproduction Update, 2010, 16(2): 189-204
- [3] Shah AA, Schripsema JH, Imtiaz MT, et al. Histopathologic changes related to fibrotic oviduct occlusion after genital tract infection of mice with *Chlamydia muridarum*[J]. Sexually Transmitted Diseases, 2005, 32(1): 49-56
- [4] Morrison RP, Caldwell HD. Immunity to murine chlamydial genital infection[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(6): 2741-2751
- [5] de la Maza LM, Peterson EM. Vaccines for *Chlamydia trachomatis* infections[J]. Current Opinion in Investigational Drugs, 2002, 3(7): 980-986
- [6] Rockey DD, Wang J, Lei L, et al. *Chlamydia* vaccine candidates and tools for chlamydial antigen discovery[J].

- Expert Review of Vaccines, 2009, 8(10): 1365-1377
- [7] Yang Z, Conrad T, Zhou Z, et al. Complement factor C5 but not C3 contributes significantly to hydrosalpinx development in mice infected with *Chlamydia muridarum*[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(8): 3154-3163
- [8] Zhang H, Zhou Z, Chen J, et al. Lack of long lasting hydrosalpinx in A/J mice correlates with rapid but transient chlamydial ascension and neutrophil recruitment in the oviduct following intravaginal inoculation with *Chlamydia muridarum*[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(7): 2688-2696
- [9] Chen J, Zhang H, Zhou Z, et al. Chlamydial induction of hydrosalpinx in 11 strains of mice reveals multiple host mechanisms for preventing upper genital tract pathology[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95076
- [10] Gong S, Yang Z, Lei L, et al. Characterization of *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded open reading frames[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(17): 3819-3826
- [11] Ding H, Gong S, Tian Y, et al. Transformation of sexually transmitted infection-causing serovars of *Chlamydia trachomatis* using blasticidin for selection[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80534
- [12] Hawgood BJ. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination[J]. Toxicon, 1999, 37(9): 1241-1258
- [13] Hanley KA. The double-edged sword: how evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine[J]. Evolution, 2011, 4(4): 635-643
- [14] Zheng HX, Jin Y, Shang YJ, et al. Comparative analysis of the genomes of foot-and-mouth disease virus isolates from porcine and cattle origin[J]. Microbiology China, 2010, 37(9): 1312-1319 (in Chinese)
郑海学, 靳野, 尚佑军, 等. Asia1型口蹄疫病毒第V群猪源和牛源毒株全基因组比较分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1312-1319
- [15] Yu CM, Chen X, Zhang JH, et al. Establishment of plaque assay titration for GFP-labeled recombinant human metapneumovirus[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2010, 30(8): 771-774 (in Chinese)
余春梅, 陈昕, 张金辉, 等. 绿色荧光标记重组人偏肺病毒空斑形成滴度测定方法的建立[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(8): 771-774
- [16] Sturdevant GL, Kari L, Gardner DJ, et al. Frameshift mutations in a single novel virulence factor alter the *in vivo* pathogenicity of *Chlamydia trachomatis* for the female murine genital tract[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(9): 3660-3668
- [17] Russell M, Darville T, Chandra-Kuntal K, et al. Infectivity acts as *in vivo* selection for maintenance of the chlamydial cryptic plasmid[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(1): 98-107