

· 实验室研究 ·

淋球菌毒力岛分类及 *sac-4* 基因对淋球菌血清抗性作用的研究

陈宏翔 吴志洪 陈嵘祎 帅俊 许莉 俞莺 涂亚庭

【摘要】 目的 研究淋球菌不同基因型别的毒力岛类型及其 *sac-4* 基因与淋球菌血清抗性作用的关系。方法 运用 NG-mast 和正常人血清 (NHS) 的抗性比较试验, 对 46 株淋球菌从分子水平上进行基因分型和毒力岛分类, 并在此基础上探讨毒力岛 *sac-4* 基因与淋球菌 NHS 抗性之间的关系。结果 46 株野生株中, GGI 阳性菌株占 80.43%, 可分为含有 *traG* 和 *altA*; 含带 *sac-4* 基因的 *traG* 和 *altA*; 只含有 *traG* 一部分保守序列的三种毒力岛类型。血清抗性实验表明 9 株 *sac-4* 阳性的淋球菌野生株均不具有血清抗性, 而 *sac-4* 阴性的 2 号和 11 号菌株却产生了部分血清抗性和完全抗性。结论 不同毒力岛类型有着不同的毒力特点和基因型别, 淋球菌血清抗性作用与毒力岛 *sac-4* 基因并无明显相关性。

【关键词】 淋球菌; 基因分型; 毒力岛

Study on the classification of gonococcal island of different genotypes and effects of *sac-4* gene on serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* CHEN Hong-xiang, WU Zhi-hong, CHEN Rong-yi, SHUAI Jun, XU Li, YU Ying, TU Ya-ting. Department of Dermatology, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: TU Ya-ting, Email: wslhss@163.com

【Abstract】 Objective Using molecular methods to study the relationship between genotypes and serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Wuhan area. **Methods** NG-mast and serum bactericidal assays at the molecular level were used to differentiate the 46 strains which were isolated from the outpatients of sexually transmitted disease clinics and the relationship between different genotypes while phenotypes was also studied. **Results** 80.43% of the 46 strains contained the island and we were able to define three different combinations of genes in the isolates. Results from serum bactericidal assays showed that all 9 *sac-4*⁺ strains did not provide any serum resistance. **Conclusion** Different isolates carried different gonococcal genetic islands (pathogenicity island) and certain phenotypes. There were no obvious relationship between *sac-4* gene and serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Genotype; Pathogenicity island

近年在淋球菌强毒株中发现了一个新的基因组 (gonococcal genetic island, GGI)^[1], 进一步研究发现在 57 kb 大小的 GGI 其前面的 27.5 kb 编码 24 个开放读码框架, 其中 18 个与已知大肠埃希菌的 F 质粒或其他一些编码 IV 型分泌系统 (T4SS) 基因高度同源, 淋球菌表面抗原变异和其他毒力、耐药信息可能是通过 T4SS 以转化的方式来传递给周围受体菌的。虽然 GGI 基因的转录子没有研究清楚, 序列显示 T4SS 基因至少有 3 个转录子。开始的 3 个基因

traD、*traL* 和 *yaf* 和其他序列方向相反为一个转录子, 从 *itgX* 到 *traF* 为第二个转录子, 在 *traH* 前面有个 σ^{70} 型启动子启动 *traH-traG-altA-yeh* 第三个转录子的转录, 在 *yeh* 之后包含一个反向重复序列可能形成转录终止子; 在第三个转录子中 *traG* 与 *altA* 基因在 DGI 患者中发现频率非常高, 可能决定着淋球菌的某些特殊表型^[2,3]。为研究淋球菌不同基因型别的 GGI 类型及其所导致不同淋球菌感染的关系, 本研究对分离出的淋球菌进行基因分型, 并对 GGI *sac-4* 基因与淋球菌对正常人血清 (NHS) 抗性关系进行了研究。

材料与方法

1. 细菌菌株: 标本采自 2007 年 2-8 月在同济

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30700717, 30371293);

教育部高等学校博士学科点新教师基金 (20070487140)

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院皮肤科

通讯作者, 涂亚庭, Email: wslhss@163.com

医学院附属协和医院皮肤科性病科就诊的 46 例患者, 女性 5 例, 男性 41 例; 年龄 18~54 岁, 36 例患者有性传播疾病(STD)史。男性标本采自尿道口内 3~4 cm 处, 女性标本采自宫颈口内 1~2 cm 处。分泌物接种于选择性培养基上, 于 36℃ 培养 24~36 h 后用无选择性培养基转种 1~2 次, 所有菌株经革兰染色、氧化酶和过氧化氢酶试验及糖发酵试验验证后将菌洗入脱脂牛奶, 保存于 -70℃ 冰箱中待用。

2. 培养基: 淋球菌选择培养基购自贝瑞特生物技术(郑州)有限责任公司(批号: 008719)。

3. 主要试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自 Promega 公司; PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司和上海赛百盛基因技术有限公司合成。其他试剂为国产分析纯, DNA 分子质量(DL2000)标准购自宝生物(大连)工程有限公司。

4. 细菌基因组的提取: 贝瑞特淋球菌选择培养基 5% CO₂ 培养菌株后, 用 1 ml 生理盐水收集细菌, 离心后重悬在 100 μl 双蒸水中, 制备菌数为 10⁷/ml 的悬浮液, 100℃ 煮沸 20 min 后冷却至室温, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清保存于 -20℃ 冰箱中, 取 2 μl 产物进行 PCR。

5. PCR 扩增目的 DNA: 根据已知基因序列以及实验目的设计合成引物: *traG* 上游: 5'-CTG CAG ACC GAG CAG AAA CAT C-3' 和下游: 5'-ACG TCT TTC ATT GCA TTA TCG-3', *sac-4* 上游: 5'-TAT CTG CAG CAT CTC CTT TCC AAC C-3' 和下游: 5'-TAG GAA TTC CTC TGA AGG TTA CGG-3' 由上海生工生物工程技术有限公司合成; *atIA* 上游: 5'-TTC AAC TGC TCA TAA TCA AGC-3' 和下游: 5'-AAA TCC TCT CTG CCT AAA GA-3', *GGIR* 上游: 5'-AGC CAT CAG GGA GGC GGA TA-3' 和下游: 5'-CAG GCA AAC AGC TAT TTG AG-3' 以及 *Por Mast* 上游: 5'-CAA GAA GAC CTC GGC AA-3' 和下游: 5'-CCG ACA ACC ACT TGG T-3', *tbpB Mast* 上游: 5'-CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC-3' 和下游: 5'-TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG-3' 均由上海赛百盛基因技术有限公司合成。取 2 μl 细菌基因组模板加入 50 μl PCR 反应体系扩增, 体系中含 dNTPs 0.25 mmol/L, 引物各 0.25 μmol/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, Taq 酶 1 U。 *altA*、*traG* 扩增参数设定为 94℃ 5 min; 变性后进行 30 个循环 94℃ 60 s, 52℃ 60 s, 72℃ 60 s, 最后一个循环延长条件为 72℃ 6 min。 *sac-4* 的退火温

度为 55℃, 延伸时间为 1 min。PCR 产物经酚: 氯仿: 异戊醇抽提后以乙醇沉淀纯化。将 *altA*、*traG* 和 *sac-4* 上述结果对 GGI 进行分型, *Por* 和 *tbpB* 产物送到上海生工生物工程技术有限公司测序。

6. NG-mast 对不同 GGI 型别菌株基因分型: 参照文献[4]方法, 选择 *por* 蛋白 pre-loop2 和 pre-loop8 的保守序列用 *PorMast1* 和 *PorMast2* 同时扩增 *por IA* 和 *IB*; 用 *tbpBMast1* 和 *tbpBMast2* 扩增 *tbpB* 基因。扩增退火温度为 58℃, 延伸时间为 1 min。产物纯化后送上海生工生物工程技术有限公司测序, *por* 基因的测序结果与 GenBank 中的 M21289 序列一起用 ClustalX 软件比对分析, 以 M21289 序列为基准截取从 455 个碱基开始的 490 bp 大小的片段; 然后进入 <http://www.ng-mast.net> 的数据库中检索得到相应的等位基因型别; 同样 *tbpB* 基因的测序结果与 GenBank 中的 U65222 一起用 ClustalX 软件比对分析, 以 U65222 序列为基准截取从 1118 个碱基开始的 390 bp 片段; *tbpB* 和 *por* 基因型别合并得到该菌株特异性的基因型(ST)。

7. 不同菌株对 NHS 的抗性比较试验: 取 10 名没有淋球菌感染史的健康成年人血清标本。菌株在贝瑞特淋球菌选择培养基上生长过夜后接种到 3 ml 的 GCBL 液体培养基生长 3 h, 15 000 r/min 离心 30 s 后重悬在 Eagle's 培养液中(生长至 2000 CFU 的对数生长期), 分别取 0.1 ml 菌液和 0.1 ml 的 10%、25% 和 50% 的 NHS 混合 37℃ 5% CO₂ 培养 30 min, 在 0 min 和 30 min 时分别取 25 μl 双份接种在巧克力琼脂平板上培养 24 h, 计算各种菌株的 CFU/ml, NHS 56℃ 加热 30 min 作为对照, 排除在 0 min 时菌株 CFU 的减少不是细菌凝集的结果。生存率 = 30 min 时 CFU 值 / 0 min 时 CFU 值 × 100%, 30 min 时 CFU 值超过 0 min 时 CFU 值的生存率判断为 100%。

8. 统计学分析: 采用 SPSS 10.0 软件, 对不同菌株对 NHS 的抗力比较试验结果用重复测量数据方差分析法比较。

结 果

1. GGI 基因检测结果: GGI *altA* 基因的 PCR 结果显示 14、17、19、22、23、28、32、33、34、35、36、38、39、40 和 46 号标本是阴性, *traG* 基因的 PCR 结果显示 14、23、28、32、33、34、35、36 和 46 是阴性; 菌株 1、3、8、12、26、41、43、44、45 的 *sac-4* 基因是阳性, 具体结果见图 1 和图 2。另外其余 9 株 GGI 阴性菌

株用 GGIR1 和 GGIR2 均扩出特异性片段证实这些菌株不含毒力岛, 图片未显示。

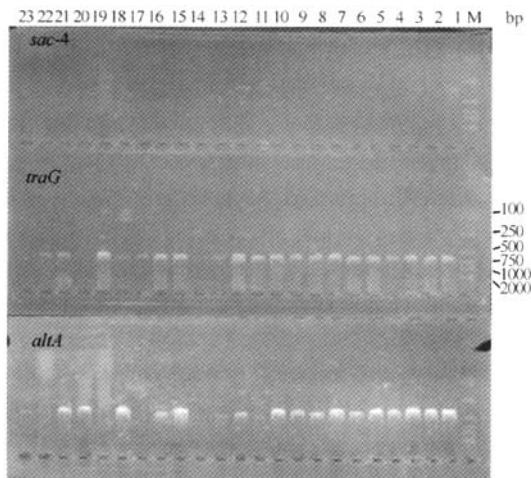


图1 1~23号菌株毒力岛基因检测

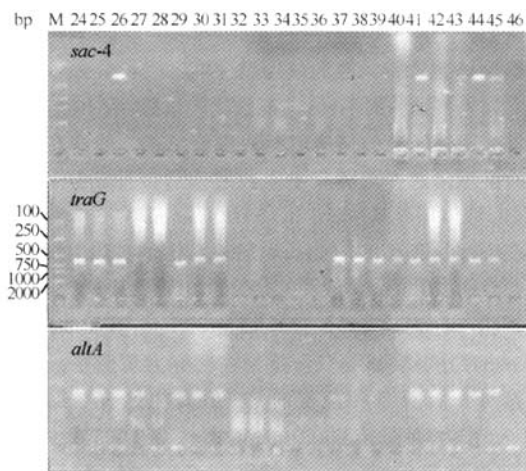


图2 24~46号菌株毒力岛基因检测

2. 不同菌株对 NHS 的抗性比较试验: 结果显示, 2号菌株具有部分的 NHS 抗性, 而 11 号菌株则可以产生完全的 NHS 抗性, 2 例患者为从事性服务的女性, 临床感染症状并不典型, 其他 9 株 *sac-4* 阳性的淋球菌野生株均不具有血清抗性, 44 号菌株甚至在 0 min 时就有 14.7% 的菌落死亡, 见图 3。

3. NG-mast 的结果: 选择 46 株野生株中相互之间有差异的菌株进行 NG-mast 基因分型, 用引物 PorMast1 和 PorMast2 均扩增出 737 bp 大小的特异性片段, 用 *tbpBMast1* 和 *tbpBMast2* 则扩增出 589 bp 大小的特异性片段, 测序软件分析后进入 NG-mast 的数据库中检索得到相应的 *por-tbpB* 等位

基因和菌株序列分型(ST), 结果见表 1。

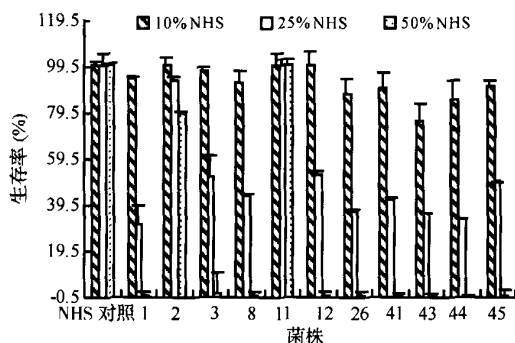


图3 *sac-4* 阳性菌株对 NHS 的生存率

表1 淋球菌毒力岛基因的特点及与血清抗性的关系

野生株	性别	血清敏感性	<i>altA</i>	<i>traG</i>	<i>sac-4</i>	GGI	ST(<i>por-tbpB</i>)
1	男	S	+	+	+	+	421(206-156)
2	女	R	+	+	-	+	N(217-86%同源 178)
3	男	S	+	+	+	+	436(90-21)
8	男	S	+	+	+	+	N(217-86%同源 178)
11	女	R	+	+	-	+	436(90-21)
12	男	S	+	+	+	+	N(217-86%同源 178)
14	男	S	-	-	-	-	369(256-137)
17	男	S	-	+	-	+	809(543-33)
19	男	S	-	+	-	+	N(94%同源 217-107)
20	男	S	+	+	-	+	436(90-21)
22	女	S	-	+	-	+	809(543-33)
23	男	S	-	-	-	-	94(81-33)
26	男	S	+	+	+	+	421(206-156)
28	男	S	-	-	-	-	195(90-49)
32	男	S	-	-	-	-	641(90-186)
33	男	S	-	-	-	-	N(580-33)
34	男	S	-	-	-	-	1217(85-137)
35	男	S	-	-	-	-	369(256-137)
36	男	S	-	-	-	-	641(90-186)
38	男	S	-	+	-	+	809(543-33)
39	女	S	-	+	-	+	33(5-44)
40	男	S	-	+	-	+	33(5-44)
41	男	S	+	+	+	+	421(206-156)
43	男	S	+	+	+	+	735(242-4)
44	男	S	+	+	+	+	N(94%同源 217-107)
45	女	S	+	+	+	+	568(90-33)
46	男	S	-	-	-	-	641(90-186)

注: S: 对 NHS 敏感; R: 对 NHS 有抗性; N: 是新基因

讨 论

在本研究中发现武汉市本地感染的 46 株野生株中, GGI 阳性菌株占 80.43%, 其中 80% 包含 *traG*, 67% 有 *altA*, 19.56% 有 *sac-4*。进一步可以将 GGI 基因分为三类: 第一类同时含有 *traG* 和 *altA*; 第二类同时含有带 *sac-4* 等位基因的 *traG* 和 *altA*, 第三类含有 *traG* 一部分保守序列, 没有 *sac-4* 及 *altA*。但这种分类是否与毒力岛功能相关值得进一步研究。我们在本地野生株中发现了 2 个淋球菌 NG-mast 数据库中没有的序列 N(217-86% 同源 178) 和 N(94% 同源 217-107), 非常有意思的

是 2 号菌株 [N(217-86% 同源 178)] 的毒力岛分类属于第一类, 而相同 ST 基因型的 8 号和 11 号菌株毒力岛分类却属于第二类, 19 和 44 号菌株也是如此, 这可能是相同基因型的菌落毒力岛基因发生了重组互换。淋球菌 GGI 一端有一个 23 bp 直接重复序列, 和 *H. influenzae* 及 *E. coli* 的 dif 位点有很高的同源性, dif 可被位点特异性的重组酶 XerCD 识别, 而 GGI 可能就是被这个 XerCD 插入到染色体中去的, 而且频繁的与种属相近的菌株发生水平传播^[2]。群集在基因岛中的一些毒力基因也随之发生互换, 从而使其致病性增强。

毒力岛中相毗邻的 *sac-4* 和 *altA*, 作为 DGI 株 2 种关键调节基因, 在淋球菌毒力增强导致播散性感染的发生发展中均起着重要作用。有研究发现淋球菌 GGI 中的 *altA* 基因与噬菌体转糖基酶有很高的同源性, 它可能编码淋球菌细胞溶解型的肽聚糖转糖基酶, 水解肽聚糖产生细胞毒素 PGCT^[3]。而 *traG* 是 *sac-4* 的等位基因, 可导致淋球菌对 NHS 抗性。McShan 等^[5] 提出从淋球菌 DGI 株 JC1 上获得的一个 2.2 kb 大小 *sac-4* 基因的克隆能使 F62 株从 NHS 敏感转化成 NHS 抗性, Nowicki 等^[6] 在此基础上进一步对 *sac-4* 基因克隆质粒测序并发现它仅仅存在于某些菌株中, 他们也认为 *sac-4* 在淋球菌 NHS 抗性的分子机制中起重要关键作用。带有 *sac-4* 等位基因的 *traG* 和大肠埃希菌 F 因子的 TraT 同源分析后发现两者很相似, 在 *E. coli* 中只有表面表达的 TraT 蛋白才能提供足够的血清抗性^[7], 但尚不清楚 *sac-4* 或 *traG* 蛋白是否表面表达^[3]。他们的结论均认为 *sac-4* 与血清抗性存在直接的关联。

与 Nowicki 等^[6] 的结论相反, 本研究的水清抗性实验表明, 双份平板 CFU 计数结果一致, 9 株 *sac-4* 阳性的淋球菌野生株均不具有血清抗性, 44 号菌株甚至在 0 min 时就有 14.7% 的菌落死亡。而 *sac-4* 阴性的 2 号和 11 号菌株却产生了部分血清抗性和完全抗性, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。从上述实验结果分析, 表达 *sac-4* 与血清抗性并无明显相关性, 我们推测 Nowicki 等的实验结果可能是由于 *sac-4* DNA 能和染色体上一些其他的基因重组, 重组后的杂合子使 F62 转化株变为具有血清抗性, 而且必须注意到 F62 没有 GGI 和 *traG* 基因。

NHS 能在体外有效的抑制淋球菌活性, 这种活性是依靠正常的淋球菌脂多糖 IgM 抗体和补体的经典激活途径。淋球菌脂多糖由常见单糖组成, 缺

少重复 O 抗原, 所以又称为脂寡糖 (LOS)。但有些菌株在其生长培养基里加入 CAM-NANA 造成淋球菌 LOS 的唾液酸化, 唾液酸化的 LOS 能直接结合补体因子 H 从而获得 NHS 抗性, 但这种抗性是短暂和不稳定的容易失去^[8]。Ram 等^[9] 通过研究发现, DGI 株主要外膜蛋白 Por1A 多肽的第五个环能结合补体因子 H 从而减弱补体活化的替代途径。而 Shafer 等^[10] 认为 Ram 等阐述的这种机制是发生在补体替代途径占优势的时候, Por 与补体成分结合后影响毗邻的 LOS 空间构像可能是其 NHS 抗性产生的原因。从上述分析可以看出 NHS 抗性是一个非常复杂的表型, 我们结合本课题组其他实验结果 (数据尚未发表) 认为, 稳定的 NHS 抗性涉及 LOS 结构的改变而非 por 依赖性的, 与 *sac-4* 并无明显相关性。 *sac-4* 对淋球菌毒力的作用 (有学者曾推测 *sac-4* 基因增加了淋球菌混合感染衣原体的概率^[11,12]) 等问题尚不清楚, 值得进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Hamilton HL, Dillard JP. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol*, 2006, 59(2):376-385.
- [2] Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, et al. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol*, 2005, 55(6):1704-1721.
- [3] Dillard JP, Seifert HS. A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol Microbiol*, 2001, 41(1):263-277.
- [4] Martin IM, Ison CA, Aanensen DM, et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis*, 2004, 189(8):1497-1505.
- [5] McShan WM, Williams RP, Hull RA. A recombinant molecule from a disseminating strain of *Neisseria gonorrhoeae* that confers serum bactericidal resistance. *Infect Immun*, 1987, 55(12):3017-3022.
- [6] Nowicki S, Ram P, Pham T, et al. Pelvic inflammatory disease isolates of *Neisseria gonorrhoeae* are distinguished by C1q-dependent virulence for newborn rats and by the *sac-4* region. *Infect Immun*, 1997, 65(6):2094-2099.
- [7] Sukupolvi S, O' Connor CD. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. *Microbiol Rev*, 1990, 54(4):331-341.
- [8] Gulati S, Cox A, Lewis LA, et al. Enhanced factor H binding to sialylated gonococci is restricted to the sialylated lacto-N-neotetraose lipooligosaccharide species; implications for serum resistance and evidence for a bifunctional lipooligosaccharide sialyltransferase in gonococci. *Infect Immun*, 2005, 73(11):7390-7397.
- [9] Ram S, Sharma AK, Simpson SD, et al. A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med*, 1998, 187(5):743-752.
- [10] Shafer WM, Datta A, Kolli VS, et al. Phase variable changes in genes *lgtA* and *lgtC* within the *lgt*ABCDE operon of *Neisseria gonorrhoeae* can modulate gonococcal susceptibility to normal human serum. *J Endotoxin Res*, 2002, 8(1):47-58.
- [11] Gretton S, Patrizio C, Young H. The *sac-4* gene of *Neisseria gonorrhoeae* correlates with gonococcal subtype not co-existing chlamydial infection. *Int J STD AIDS*, 2002, 13(3):174-177.
- [12] Chillips DJ, Patrizio C, Moyes A, et al. The *sac-4* gene of *Neisseria gonorrhoeae* and co-existing chlamydial infection. *Sex Transm Infect*, 2000, 76(5):400-402.

(收稿日期:2007-10-25)

(本文编辑:尹廉)