

· 短篇论著 ·

临床常见念珠菌的 PCR-RFLP 鉴定方法研究

窦娟 张全斌 金柳 张景萍 王萍 商润萍 郑新萍 周永安

【摘要】 目的 建立临床常见念珠菌的聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测技术。方法 用真菌通用引物 ITS1-ITS4 分别扩增白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌和近平滑念珠菌 5 种菌株的 ITS1-5.8 S rDNA-ITS2 区域,然后对扩增产物进行 Msp I 酶切分析。结果 5 种念珠菌标准菌株经 PCR-RFLP 分析后产生了 5 种不同的特异性条带,成功地将临床上常见的 5 种念珠菌区分开来。应用此方法鉴定了 60 株临床分离的念珠菌,其 PCR-RFLP 结果与标准菌株一致,测序结果进一步证实了此方法的可靠性。结论 PCR-RFLP 检测技术具有快速、稳定、特异、准确性高的特点,在常见致病念珠菌鉴定方面具有良好的临床应用前景。

【关键词】 念珠菌属; 聚合酶链反应

近年来,随着器官移植、癌症患者、HIV 感染患者的增多和免疫抑制剂、广谱抗真菌药物的广泛使用,临床真菌感染的发生率和死亡率明显上升。念珠菌感染在真菌感染中占首位,而白色念珠菌(*Candida albicans*)是念珠菌感染中最主要的病原菌^[1],但近年来的流行病学调查结果显示,念珠菌感染的类型发生了变迁,白色念珠菌的检出率逐渐下降,非白色念珠菌,比如热带念珠菌(*Candida tropicalis*)、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)、克柔念珠菌(*Candida krusei*)、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)等的检出率逐年上升^[2-3]。不同的念珠菌对抗真菌药物的敏感性存在差异,早期鉴定致病真菌有利于选择敏感有效的抗真菌药物,减少真菌感染的死亡率。

目前,临床上鉴定真菌大多依赖于直接镜检和显色培养基培养,直接镜检的阳性率低,而显色培养基只能鉴定白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌和克柔念珠菌四种念珠菌,而且一般至少需要 3 d 才可以报告结果,因此,建立一种简便、快速、敏感、特异的鉴定真菌的方法是临床上迫切需要解决的问题。本研究用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术初步建立了鉴定临床常见念珠菌的方法,并检测和鉴定了 60 株临床分离菌株,为此方法的临床应用奠定了基础。

一、材料与方法

1. 菌株来源:5 种常见念珠菌的标准菌株各 1 株和 60 株临床分离菌株,包括白色念珠菌(1 株 ATCC2091 和 20 株临床菌株)、热带念珠菌(1 株 ATCC01463 和 12 株临床菌株)、光滑念珠菌(1 株 ATCC90030 和 8 株临床菌株)、克柔念珠菌(1 株 ATCC6258 和 7 株临床菌株)、和近平滑念珠菌(1 株 ATCC22019 和 13 株临床菌株),铜绿假单胞菌(1 株 ATCC27853)和金黄色葡萄球菌(1 株 ATCC25923)。标准菌株,购自卫生部临床检验中心;临床分离菌株来源于 2010 年 1~7 月太原市中心医院检验科微生物室分离自痰、分泌物、尿液、粪便、血液等标本,菌株均经法国梅里埃 VITEK2 全自动微生物分析仪鉴定。

2. 念珠菌的培养:取 4℃ 保存的念珠菌标准菌株和临床分离菌株接种于沙保罗固体培养基中,32℃ 培养 24 h 后挑取菌落接种于沙保罗液体培养基中,30℃ 恒温摇床培养 24 h。

3. 念珠菌 DNA 的提取:采取化学改良方法^[4]提取念珠菌 DNA。收集菌液 1 ml 于 1.5 ml EP 管中,离心去上清,菌体用无菌双蒸水洗 1 遍;加 DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L EDTA,2% SDS)500 μl,于 65℃ 温浴 1 h,离心,取上清;加等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),离心,取上清;加等体积异丙醇,离心,弃上清;75% 乙醇洗涤一次;沉淀溶于 50 μl TE 溶液。保存于 -20℃ 冰箱备用。

4. PCR 扩增:应用真菌通用引物 ITS1-ITS4 对标准菌株和临床分离菌株进行扩增,反应体系为 20 μl:10× Buffer 2 μl;MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μl;dNTP (2 mmol/L)2 μl;引物 ITS1、ITS4^[5] (10 μmol/L)各 1 μl;TaqDNA 聚合酶(1 U/1 μl)1 μl;DNA 模板 1 μl;去离子水 10 μl。反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。取 5 μl PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

5. RFLP 分析:用 Msp I 酶对 PCR 产物进行酶切分析,酶切体系为 20 μl,体系组成:Msp I 1 μl,10× Buffer 2 μl,PCR 产物 4 μl,去离子水 13 μl。37℃ 温浴 6 h。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

6. 测序:60 株临床分离菌株的 PCR 产物由上海英骏生物技术有限公司完成测序,所得序列与 Genbank 核酸库已登录的序列进行 BLAST 比对。

二、结果

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.01.086

作者单位:030001 太原,山西医科大学[窦娟(2008 级硕士研究生)];太原市中心医院检验科(张全斌、金柳、张景萍、王萍、商润萍、郑新萍、周永安)

通讯作者:周永安,Email:zya655903@163.com

1. 真菌通用引物的通用性及特异性分析:标准菌株和临床分离菌株的扩增结果均为阳性,在大约 500 ~ 900 bp 扩增出 1 条清晰的条带,而铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、HPV 病毒及正常人外周血 DNA 扩增结果为阴性(图 1)。

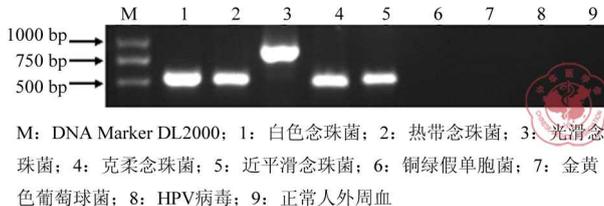


图1 5种念珠菌PCR产物电泳图

2. RFLP 分析:白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌和克柔念珠菌的 PCR 产物中均含有 Msp I 的酶切位点,均产生了特异的两条带,而近平滑念珠菌的 PCR 产物没有该酶的酶切位点,酶切结果见图 2。

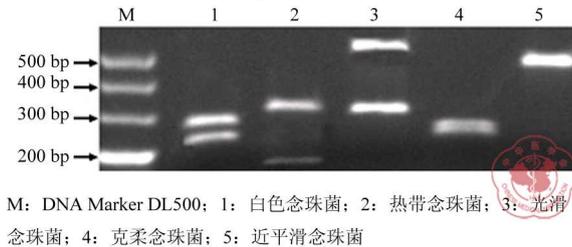


图2 5种标准念珠菌PCR产物的Msp I 酶切电泳图

60 株临床分离株酶切后均可产生与其标准株相同的带型,其酶切结果见图 3,其中白色念珠菌 20 株,热带念珠菌 12 株,光滑念珠菌 8 株,克柔念珠菌 7 株,近平滑念珠菌 13 株,其鉴定结果与法国梅里埃 VITEK2 全自动微生物分析仪的鉴定结果的符合率为 100%。5 种念珠菌的 PCR 产物以及酶切产物片段长度见表 1。

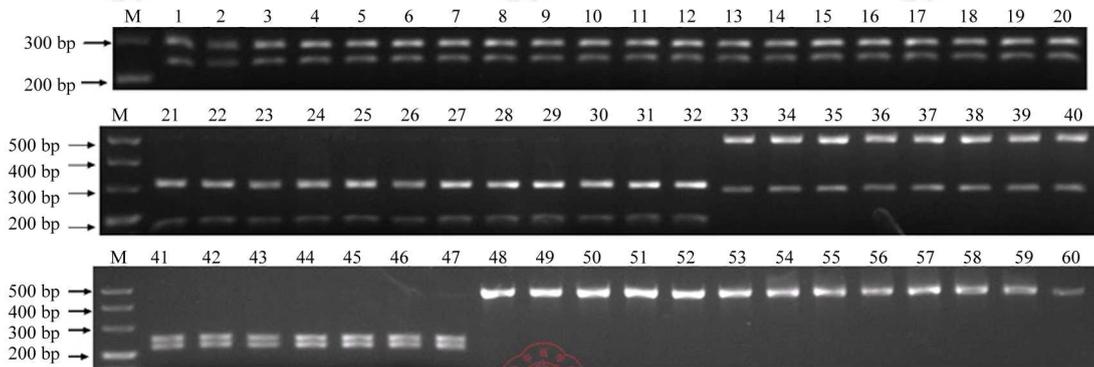


图3 60株临床分离念珠菌PCR产物的Msp I 酶切电泳图

表 1 5 种念珠菌的 PCR 产物及 Msp I 酶切片段大小 (bp)

念珠菌菌种	PCR 产物长度	Msp I 酶切片段长度
白色念珠菌	535	297, 238
热带念珠菌	524	340, 184
光滑念珠菌	871	557, 314
克柔念珠菌	510	261, 249
近平滑念珠菌	520	520

3. PCR 产物测序结果:PCR 产物经测序所得序列与 Genbank 核酸库已登录的序列进行 BLAST 比对,结果显示:临床分离

的20株白色念珠菌、12株热带念珠菌、8株光滑念珠菌、7株克柔念珠菌和13株近平滑念珠菌与Genbank核酸库提供的序列相似度分别为99%~100%、97%~99%、98%~99%、97%~99%、97%~98%，其中部分菌株与Genbank核酸库已登录的序列的同源性比对结果如图4所示。VITEK2全自动微生物分析仪、PCR-RFLP与测序三种方法鉴定结果一致。

```

白色念珠菌      ACAACCAATTTTTATCAACTGTCACACCAGATTATTACTAATAGTCAAAACTTTCAAC
FN652297.1      ACAACCAATTTTTATCAACTGTCACACCAGATTATTACTAATAGTCAAAACTTTCAAC
                  *****
白色念珠菌      AACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGA
FN652297.1      AACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGA
                  *****
热带念珠菌      ACGCTAGGTTTGTGAAAGAATTTACGTGGAACCTTATTTTAAGCGACTTAGGTTTATC
FN652304.1      ACGCTAGGTTTGTGAAAGAATTTACGTGGAACCTTATTTTAAGCGACTTAGGTTTATC
                  *****
热带念珠菌      CAAAAACGCTTATTTGCTAGTGGCCACCACAATTTATTTTCATAACTTTGACCTCAAATC
FN652304.1      CAAAA-CGCTTATTTGCTAGTGGCCACCACAATTTATTTTCATAACTTTGACCTCAAATC
                  *****
光滑念珠菌      ACTACTATTCTTTTGTTCGTTGGGGGAACGCTCTCTTTTCGGGGGGGAGTTCTCCAGTGG
FN65230.1      ACTACTATTCTTTTGTTCGTTGGGGGAACGCTCTCTTTTCGGGGGGGAGTTCTCCAGTGG
                  *****
光滑念珠菌      ATGCAAACACAAACAAATATTTTTTTTAAATAATTCAGTCAACACAAGATTCTTTTAGT
FN65230.1      ATGCAAACACAAACAAATATTTTTTTTAAACTAATTCAGTCAACACAAGATTCTTTTAGT
                  *****
克柔念珠菌      AGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGC
fm199972.1      AGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGC
                  *****
克柔念珠菌      ACATTGCGCCCTCCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCCTCTTGCG
fm199972.1      ACATTGCGCCCTCCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCCTCTTGCG
                  *****
近平滑念珠菌    CTT-CACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC
fn652300.1      CTTACACATGTGTTTTCTTTTTTTGAAACTTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGC
                  ***
近平滑念珠菌    CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA
fn652300.1      CTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAA
                  *****
    
```

图4 部分菌株与Genbank核酸库已登录的序列的同源性比对结果

三、讨论

念珠菌属是临床上最常见的条件性致病真菌,在住院患者,尤其是免疫力低下者、异物植入者以及过度使用广谱抗菌药物者中易引起黏膜、口腔、皮肤、血液、尿道或系统性感染。近年来,念珠菌败血症的发病率逐年升高,在有些国家,念珠菌已经成为第三位或第四位致病病原菌。所以,早期、准确地将念珠菌鉴定种,对选择敏感、有效的抗真菌药物,减少真菌感染的死亡率显得尤为重要。目前临床上采用的鉴定真菌感染的方法存在着一定的局限性,近年来飞速发展的分子生物学技术为

真菌的鉴定提供了新的途径。其中,PCR技术具有灵敏、特异等特点,近年来,已有多种PCR相关技术应用于真菌的检测与鉴定中,如PCR-RFLP技术^[6]、套式PCR技术^[7]、PCR-ELISA微孔板杂交技术^[8]、实时荧光定量PCR技术等^[9]。

具有保守特点的真菌核糖体基因常常作为分子生物学鉴定的靶基因。真菌基因组中编码核糖体的基因(rDNA)包括18S rDNA、5.8S rDNA和28S rDNA,它们在进化过程中保守性强,在染色体上以首尾相连的方式串联排列,相互之间分别由内转录间隔区1(internal transcribed spacer, ITS1)和内转录间隔区2(ITS2)隔开。其ITS1区和ITS2区进化较快,具有一定的种间特异性和种内保守性,是进行真菌种间分类极好的靶点。

Cirak等^[10]采用PCR-RFLP的方法,对白色念珠菌、近平滑念珠菌和克柔念珠菌的ITS区域进行了扩增,再用Bfa I、Hae III、Dde I三种限制性内切酶对其扩增产物进行酶切,成功地将三种念珠菌区分开,并证明此法具有较好的稳定性和特异性。Morace等^[11]扩增8种念珠菌细胞色素P450L1A1基因,用限制性内切酶Hinc II、Sau3A和Nsi I对扩增产物进行酶切,得到完全不同的指纹图,将8种念珠菌鉴定到种的水平。本研究仅用一对通用引物、一种限制性内切酶即可将临床上常见的5种念珠菌鉴定到种的水平,与其他分子生物学方法相比操作简便;而传统的鉴定方法相比,具有快速、可靠性高的特点,从真菌DNA的提取到酶切鉴定可以在一个工作日内完成,而培养法需要数天甚至数周才能完成菌种的鉴定。但PCR方法鉴定真菌也可能会出现假阳性的现象,即可以检测到已经死亡的真菌的DNA,所以,建议将PCR-RFLP技术与传统的鉴定真菌的方法相结合,以达到准确鉴定的目的。

总之,我们建立的应用PCR-RFLP技术鉴定临床常见念珠菌的方法取得了较好的结果,该技术在早期、快速、准确的检测和鉴定念珠菌方面有着良好的临床应用前景,将为肿瘤、血液病和免疫抑制患者的诊断和救治工作起到积极的作用。

参 考 文 献

- [1] López-Martínez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol*, 2010, 28(2):178-184.
- [2] Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol*, 2006, 55(Pt 7):809-818.
- [3] 陈方淳, 林梅. 念珠菌感染菌种的变迁及耐药现象的研究进展. *国际口腔医学杂志*, 2007, 34(5):358-360.
- [4] 谷艳昌, 侯瑛, 王海磊, 等. 一种简易有效的提取真菌DNA化学改良方法. *安徽农业科学*, 2009, 37(15):6884-6886.
- [5] Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, et al. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9):2476-2479.
- [6] Landlinger C, Basková L, Preuner S, et al. Identification of fungal species by fragment length analysis of the internally transcribed spacer 2 region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28(6):613-622.
- [7] Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A, et al. Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(12):841-848.
- [8] Badiée P, Kordbacheh P, Alborzi A, et al. Prospective screening in liver transplant recipients by panfungal PCR-ELISA for early diagnosis of invasive fungal infections. *Liver Transpl*, 2007, 13(7):1011-1016.
- [9] Soeta N, Terashima M, Gotoh M, et al. An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 8):1037-1044.
- [10] Cirak MY, Kalkanç A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003, 98(8):1027-1032.
- [11] Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, et al. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6):1871-1875.

(收稿日期:2010-08-20)

(本文编辑:戚红丹)

窦娟,张全斌,金柳,等. 临床常见念珠菌的PCR-RFLP鉴定方法研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(1):251-254.