

· 论著 ·

PCR-RFLP 和多重 PCR 技术检测常见病原性丝状真菌的实验研究

张晓利¹ 吕雪莲² 沈永年¹ 吕桂霞¹ 王淼淼¹ 葛一平¹ 刘维达¹

(1. 中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 210042; 2. 大连皮肤病医院, 大连 116011)

【摘要】 目的 建立检测常见丝状真菌感染病原菌的 PCR-RFLP 和多重 PCR 方法。方法 建立以 PCR 技术为基础的限制片段长度多态性 (RFLP) 方法, 首先用真菌通用引物扩增丝状真菌的 ITS 区, 然后用限制性核酸内切酶对 PCR 产物进行酶切。用 4 种丝状真菌的特异性引物建立多重 PCR 体系, 用该体系检测单模板、双模板和三模板的扩增情况, 并测定该体系的特异性和敏感性。结果 用 PCR-RFLP 技术能够鉴别 5 种常见丝状真菌, 多重 PCR 能够根据扩增片段的不同鉴别菌种, 在合适的反应条件下, 对单模板、双模板和三模板均能扩增出目的片段。结论 PCR-RFLP 和多重 PCR 技术能够快速鉴定丝状真菌感染病原菌, 有临床应用的良好前景。

【关键词】 丝状真菌; PCR-RFLP; 多重 PCR; 分子鉴定

【中图分类号】 R 379.6 R 379.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2010)02-0105-04

Experimental investigation on the detection of pathogenic molds by PCR-RFLP and multiplex PCR

ZHANG Xiao-li¹, LV Xue-lian², SHEN Yong-nian¹, LV Gui-xia¹, WANG Miao-miao¹, GE Yi-ping¹, LIU Wei-da¹

(1. Department of Mycology, Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042; 2. Dalian Hospital for Diseases of the Skin, Dalian 116021, China)

【Abstract】 Objective To establish diagnostic methods for pathogenic molds using PCR-RFLP and multiplex PCR. **Methods** A PCR-based restriction fragment length polymorphism method was developed. ITS region of molds was amplified with universal fungal primers, and for RFLP analysis with restriction enzyme. Multiplex PCR with 4 primer pairs was used to detect 1 template and 2 or 3 template mixtures. Sensitivity and specificity of multiplex PCR were measured. **Results** PCR-RFLP clearly differentiated the pathogenic molds. Multiplex PCR could amplify the corresponding 1, 2 or 3 DNA fragments. Five molds were identified through distinct amplicons. **Conclusions** PCR-RFLP and multiplex PCR are rapid methods for the identification of pathogenic molds.

【Key word】 mold; PCR-RFLP; multiplex PCR; molecular identification

[Chin J Mycol, 2010, 5(2):105-108]

近年,深部真菌感染的发病率大幅增加,其中丝状真菌引起的深部感染逐年增加,死亡率居高不下。目前诊断深部真菌感染仍依赖于真菌学、血清学、影像学以及组织病理等方法,均有耗时长、敏感性低及难以鉴定到菌种等弊端。由于丝状真菌感染中非烟曲霉和非曲霉属的比例在增加^[1],且土曲霉、尖端赛多孢等菌种对一线药物两性霉素 B 天然耐药,因此,对丝状真菌快速鉴定到种对指导临床合理选用抗真菌药物十分重要。

分子生物学技术凭借快速、敏感及特异性强等优势,被越来越多的学者选择进行深部真菌感染的实验室诊断的应用研究。我们在前期 PCR 快速分子诊断研究的基础上^[2],建立了限制片段长度多态性 (RFLP) 技术和多重 PCR 技术,以期能够快速、准确地将分离出来的常见丝状真菌病原菌鉴定到种,为实际应用于临床诊断打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及菌株

热启动 Taq 酶和 dNTP (Takara), 引物合成 (上海生工), 核酸内切酶 Hha I (宝生物工程(上海)有限公司)。实验所用标准菌株烟曲霉 [CMCCC (F)]。

基金项目:科技重大专项 (2008ZX10004-002); 临床重点学科建设项目 [2007-2009 年度卫生部属 (管) 医院临床学科重点项目 (第 7 号)]; 卫生部公益性行业科研专项经费项目 (200802032)。

作者简介:张晓利,女 (汉族),博士研究生在读。E-mail:ZX1415@hotmail.com

通讯作者:刘维达, E-mail:liumyc@ hotmail.com

A1]、黄曲霉[CMCCC (F). A2]、土曲霉[CMCCC (F). A6]、黑曲霉[CMCCC (F). A3]、杂色曲霉[CMCCC (F). A5a]、构巢曲霉[CMCCC (F). A7]、尖端赛多孢[CMCCC (F). D13a]、串珠镰刀菌[CMCCC (F). B36b]、白念珠菌[CMCCC (F). C1a]、多变根毛霉[CMCCC (F). B50]、扩展青霉[CMCCC (F). B43]、伞状犁头霉[CMCCC (F). B69a]和红色毛癣菌[CMCCC (F). T1c],由中国微生物菌种保藏管理委员会医学真菌中心提供,金

黄色葡萄球菌由江苏省人民医院提供,人全血标本来自健康成年人。临床菌株 22 株分别来自我科收集的临床菌株和江苏省人民医院检验科赠送菌株,包括 12 株烟曲霉,4 株黄曲霉,1 株土曲霉和 5 株黑曲霉,另外 2 株环境分离株均为黑曲霉,共 24 株受试菌株。

1.2 实验所用引物情况

真菌通用引物,烟曲霉、黄曲霉、土曲霉和黑曲霉特异引物情况见表 1。

表 1 实验用通用引物和特异性引物

Tab. 1 Characteristics of universal fungal primers and species-specific primer pairs

	引物序列 (5'→3')	扩增片段大小 (bp)
真菌通用引物	TCCGTAGGTGAACCTGCCG TCCTCCGCTTATTGATATGC	随菌种的不同而略有不同
烟曲霉	TATGTCTTCCCTGCTCC CTATGCCTGAGGGCGAA	250
黄曲霉	CGACGTCTACAAGCCTTCTGGAAA CAGCAGACCCTCATTTCTTGTGTC	200
土曲霉	CTATTGTACCTTGTGCTTCGGCG AGTTGCAAATAAATGCGTCGGCGG	450
黑曲霉	CCAGTACGTGGTCTTCAACTC CATCACCATGACCATCGTTTGCT	150

1.3 受试菌株 DNA 的提取和纯化

首先将在 PDA 培养基上 (28℃) 生长 7~10 d 的真菌,刮到 5 mL 玻璃组织研磨器中,加入 0.8 mL 生理盐水充分研磨,然后采用 FastDNA SPIN 试剂盒 (美国 MP Bio 公司),按照步骤严格操作。

1.4 PCR 扩增

反应总体积为 25 μ L,含 4 μ L 10 \times 缓冲液,1.5 μ L MgCl₂ (10 mmol/L),2 μ L dNTPmix (10 μ mol/L),引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L (多重 PCR 为混合引物 4 μ L),DNA 模板 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 2 U。95℃ 5 min 预变性后,95℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1 min,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,每个加样孔点样 4 μ L,电泳缓冲液为 1 \times TAE,恒压 80 V,电泳约 30 min。电泳结束后,取琼脂糖凝胶在凝胶成像仪上紫外线透射下观察结果并摄片。

1.5 PCR-限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP)

将上述 PCR 扩增中获得的 rDNA-ITS 区 PCR 产物分别应用限制性核酸内切酶 Hha I 进行酶切。反应总体积为 20 μ L,含 10 \times M 缓冲液 2 μ L,限制性核酸内切酶 10 U,PCR 产物 10 μ L。置于 37℃ 水

浴 3~5 h,加入 10 \times 上样缓冲液中中止反应。

1.6 多重 PCR 体系

混合引物的特异性检测,所用 DNA 模板包括上述共 13 种真菌、1 种细菌和人体细胞,分别用 4 对特异性引物和 4 对特异性引物等比例混合而成的混合引物,进行 PCR 扩增扩增反应。DNA 模板按照循序渐进的原则,检测单模板、双模板和三模板。用烟曲霉 DNA 为模板进行多重 PCR 灵敏度的检测,将烟曲霉 DNA 用 TE 缓冲液连续的 10 倍倍比稀释,每个稀释浓度取 1 μ L 进行 PCR 扩增,检测到的最高稀释度即为 PCR 检测的灵敏度。

2 结 果

2.1 PCR-RFLP 结果

真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 能够扩增 ITS 区,烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉、尖端赛多孢和串珠镰刀菌均扩增出约 600 bp 的片段 (见图 1)。5 种菌的 PCR 扩增产物经 Hha I 酶切后电泳,条带数目和大小都有明显区别,其中烟曲霉和黄曲霉酶切条带类似,但仍然能够区分;黑曲霉有 4 条较清晰的条带,尖端赛多孢有两条;串珠镰刀菌最大条带为 300 bp

左右,相对其他菌种可以较易鉴别(见图2)。

2.2 多重 PCR 结果

多重 PCR 体系特异性检测 本实验的四对特异性引物和混合引物扩增出了对应的烟曲霉、黄曲霉、土曲霉和黑曲霉,其他种属真菌、细菌和人血细胞反应均为阴性(见图3)。

多重 PCR 反应结果 多重 PCR 反应体系中加

1 种、2 种或 3 种 DNA 模板,电泳图显示,均扩增出目的条带,DNA 模板仅与自身的特异性引物反应,引物的混合没有抑制模板与引物的结合,没有抑制 PCR 反应(见图4~6)。

多重 PCR 敏感性测定 多重 PCR 体系(以烟曲霉为模板)能够检测到 100 pg 的基因组 DNA(见图7)。

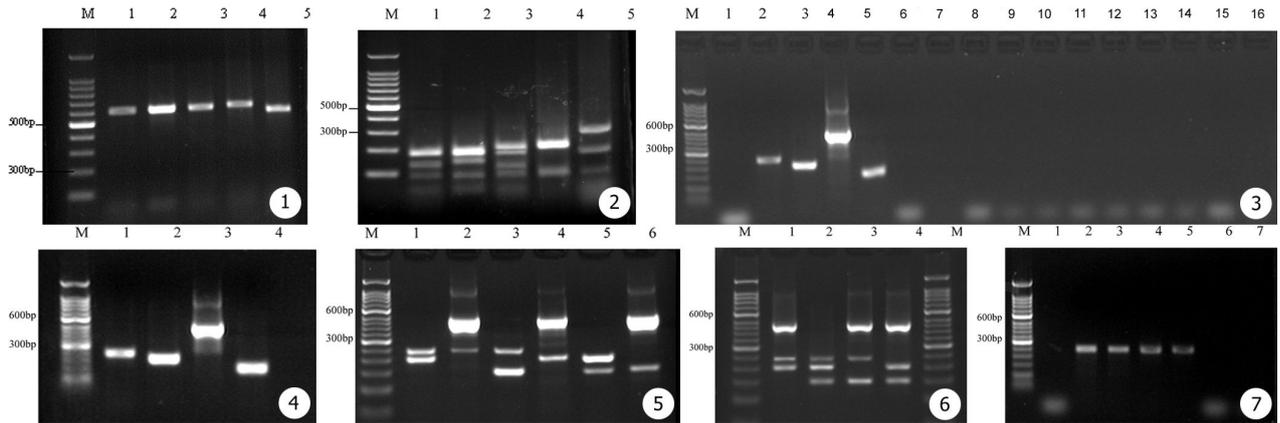


图 1 真菌通用引物 PCR 扩增电泳图 (M. 100 bp 标准参照物,1. 烟曲霉,2. 黄曲霉,3. 黑曲霉,4. 尖端赛多孢,5. 串珠镰刀菌) **图 2** PCR 产物经 *Hha I* 酶切后电泳图 (M. 100 bp 标准参照物,1. 烟曲霉,2. 黄曲霉,3. 黑曲霉,4. 尖端赛多孢,5. 串珠镰刀菌) **图 3** 多重 PCR 特异性检验结果 (M. 50 bp 标准参照物,1~16 分别为:阴性对照,烟曲霉,黄曲霉,土曲霉,黑曲霉,杂色曲霉,构巢曲霉,尖端赛多孢,串珠镰刀菌,白念珠菌,多变根毛霉,扩展青霉,伞状犁头霉,红色毛癣菌,人血细胞,金黄色葡萄球菌) **图 4** 单模板多引物 PCR 反应结果 (M. 50 bp 标准参照物,1. 烟曲霉,2. 黄曲霉,3. 土曲霉,4. 黑曲霉) **图 5** 双模板多引物 PCR 反应结果 (M. 50 bp 标准参照物,1. 烟曲霉 + 黄曲霉,2. 烟曲霉 + 土曲霉,3. 烟曲霉 + 黑曲霉,4. 黄曲霉 + 土曲霉,5. 黄曲霉 + 黑曲霉,6. 土曲霉 + 黑曲霉) **图 6** 三模板多引物 PCR 反应结果 (M. 50 bp 标准参照物,1. 烟曲霉 + 黄曲霉 + 土曲霉,2. 烟曲霉 + 黄曲霉 + 黑曲霉,3. 烟曲霉 + 土曲霉 + 黑曲霉,4. 黄曲霉 + 土曲霉 + 黑曲霉) **图 7** 混合引物敏感性检测结果 (M. 50 bp 标准参照物,1. 阴性对照,2. 100 ng,3. 10 ng,4. 1 ng,5. 100 pg,6. 10 pg,7. 1 pg)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of ITS PCR product (M. 100 bp Ladder, 1. *A. fumigatus*, 2. *A. flavus*, 3. *A. niger*, 4. *S. apiospermum*, 5. *F. moniliforme*) **Fig. 2** Agarose gel electrophoresis of ITS PCR product after digestion with *Hha I* (M. 100 bp Ladder, 1. *A. fumigatus*, 2. *A. flavus*, 3. *A. niger*, 4. *S. apiospermum*, 5. *F. moniliforme*) **Fig. 3** Specificity of multiplex PCR (M. 50 bp Ladder, 1. negative control, 2. *A. fumigatus*, 3. *A. flavus*, 4. *A. terreus*, 5. *A. niger*, 6. *A. versicolor*, 7. *A. nidulans*, 8. *S. apiospermum*, 9. *F. moniliforme*, 10. *Candida albicans*, 11. *Rhizomucor variabilis*, 12. *Penicillium expansum*, 13. *Absidia corymbifera*, 14. *Trichophyton rubrum*, 15. blood cell, 16. staphylococcus aureus) **Fig. 4** Multiplex PCR with single genomic DNA (M. 50 bp Ladder, 1. *A. fumigatus*, 2. *A. flavus*, 3. *A. terreus*, 4. *A. niger*) **Fig. 5** Multiplex PCR with 2 genomic DNA (M. 50 bp Ladder, 1. *A. fumigatus* + *A. flavus*, 2. *A. fumigatus* + *A. terreus*, 3. *A. fumigatus* + *A. niger*, 4. *A. flavus* + *A. terreus*, 5. *A. flavus* + *A. niger*, 6. *A. terreus* + *A. niger*) **Fig. 6** Multiplex PCR with 3 genomic DNA (M. 50 bp Ladder, 1. *A. fumigatus* + *A. flavus* + *A. terreus*, 2. *A. fumigatus* + *A. flavus* + *A. niger*, 3. *A. fumigatus* + *A. terreus* + *A. niger*, 4. *A. flavus* + *A. terreus* + *A. niger*) **Fig. 7** Sensitivity of multiplex PCR (M. 50 bp Ladder, 1. negative control, 2. 100 ng, 3. 10 ng, 4. 1 ng, 5. 100 pg, 6. 10 pg, 7. 1 pg)

3 讨 论

随着器官移植、介入操作的增多以及放疗化疗和免疫抑制剂等的广泛应用,丝状真菌导致的深部感染逐年增多,并且非烟曲霉和非曲霉属的比例在增加,例如镰刀菌属和接合菌属的感染在某些地区成倍增长^[3],死亡率居高不下。研究表明在这些逐渐增多的致病菌种中,有相当部分对常用抗真菌药物天然耐药或不敏感^[4],例如土曲霉、尖端赛多孢等对两性霉素 B 有天然耐药性,镰刀菌对卡泊芬净

耐药,所以选择一种方法,能够快速准确地诊断丝状真菌深部感染,并鉴定到种,对指导临床治疗用药有非常大的指导意义。

以 PCR 为基础的分子技术迅速发展,越来越广泛地应用到真菌快速诊断中来。RFLP 技术常用于基因组遗传图谱构建、基因定位等的研究,近年来也被应用到菌种鉴定中^[2,5-6]。我们先用真菌通用引物进行聚合酶链反应扩增 ITS 区,然后用内切酶将扩增的 ITS 区进行切割,不同的菌种酶切后的

片段数量和长度各不相同,可以鉴定至属和种的水平。在预实验中我们用了多种内切酶进行实验,最后筛选出分辨力最高的 *Hha I*, 5 株常见病原菌 PCR 扩增产物经该酶酶切后的电泳带型无论数量还是长度都有很大区别。

免疫抑制患者发生的真菌感染有可能是混合真菌感染^[7], 这样 PCR-RFLP 技术就显得有些乏力, 针对该情况, 我们引入了多重 PCR 诊断技术。多重 PCR (Multiplex PCR) 是在同一 PCR 反应体系里加上二对以上引物, 同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应^[8], 由于在同一 PCR 反应管中同时加上多种特异性引物, 进行一次 PCR 扩增, 即可同时检测多种病原体, 为临床提供更多更准确的诊断信息。我们本实验中所用的 4 种特异性引物扩增的片段之间相差 50 bp 以上, 在电泳图中能够很好辨别。并且无论是单模板还是多模板均能扩出相应的目的条带, 而没有明显的优势扩增或错误扩增, 能够用于临床上的混合感染。再者, 该技术也适用于临床疑似标本中真菌靶分子的直接检测, 因为用单一引物检测菌种单一, 很可能漏检非引物适配的真菌, 而多重引物可以一次检测多个菌种, 提高了检测效率。

本实验中所用的 PCR-RFLP 技术和多重 PCR 技术均可以在一个工作日内完成, 较真菌培养等传统方法节省较多时间。PCR-RFLP 方法较多重 PCR 方法多酶切的步骤, 稍显复杂, 但有很好的扩展性, 能够根据需要增加其他菌种的鉴别; 多种 PCR 因为体系内可能发生交叉反应的限制, 难以覆盖较多的菌种, 但对混合感染的诊断有明显的优势。在本实验中我们用标准株建立了两种能快速

鉴定菌种的分子生物学方法, 以后的实验会逐步将该技术应用到模拟临床标本、动物实验以至最后的临床标本, 其实用性也将会在以后的临床标本直接检测中进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends [J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(3): S3-S14.
- [2] 刘军, 刘维达. 聚合酶链反应检测深部致病真菌的实验研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 2005, 38(8): 503-505.
- [3] Kontoyiannis DP, Lionakis MS, Lewis RE, et al. Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of Aspergillus-active antifungal therapy: a case control observational study of 27 recent cases [J]. J Infect Dis, 2005, 191(8): 1350-1360.
- [4] Malani AN, Kauffman CA. Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy [J]. Drugs, 2007, 67(13): 1803-1812.
- [5] 秦振宇, 吴绍熙, 吕桂霞, 等. PCR-RFLP 鉴别念珠菌、曲霉和隐球菌的探讨 [J]. 临床皮肤科杂志, 2000, 29(2): 76-78.
- [6] Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, et al. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species [J]. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2006, 47(3): 225-229.
- [7] Orzechowski Xavier M, Pasqualotto AC, Uchoa Sales Mda P, et al. Invasive pulmonary aspergillosis due to a mixed infection caused by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* [J]. Rev Iberoam Micol, 2008, 25(3): 176-178.
- [8] Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. Biotechniques, 1997, 23(3): 504-511.

[收稿日期] 2009-11-15

[本文编辑] 卫凤莲