

# 微卫星引物 PCR 快速鉴定兔皮肤病原真菌方法的建立及应用

李代军<sup>1</sup>, 周玉法<sup>2</sup>, 刘敬博<sup>1</sup>, 高丽丽<sup>1</sup>, 赵效楠<sup>1</sup>, 蔡玉梅<sup>1\*</sup>, 柴同杰<sup>1\*</sup>

(1. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271000; 2. 泰安市岱岳区畜牧兽医局, 泰安 271000)

**摘要:** 本研究旨在借助微卫星引物 PCR 和聚类分析软件, 建立一种快速准确鉴定兔皮肤病原真菌的分子生物学方法。本试验以寡核苷酸重复序列(GACA)<sub>4</sub> 为引物, 首先对 3 种常见兔皮肤病原真菌(须癣毛癣菌、犬小孢子菌和石膏样小孢子菌)标准菌株的 DNA 进行扩增, 然后用 NTSYS-pc2.10 软件分析其 DNA 指纹的多态性, 并根据其多态性的差异进行鉴定分析。最后, 用上述方法对临床上的分离株进行鉴定分析, 并与传统的形态学鉴定方法进行比较。结果表明, 3 种不同的兔皮肤病原真菌均呈现不同的 DNA 指纹, 且条带差异明显; 聚类分析图显示, 同种病原真菌的 DNA 指纹有很高的相似性(90%~100%); 该方法对分离株的鉴定结果与形态学鉴定结果一致。可见, 通过微卫星引物 PCR 结合聚类分析软件可以准确、快速地鉴定兔皮肤病原真菌。

**关键词:** 微卫星引物 PCR; 兔; 皮肤病原真菌; NTSYS-pc2.10 软件

中图分类号: S852.661

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)05-0779-06

## Development and Application of Microsatellite-primed PCR for Rapidly Identifying Dermatophytes from Rabbits

LI Dai-jun<sup>1</sup>, ZHOU Yu-fa<sup>2</sup>, LIU Jing-bo<sup>1</sup>, GAO Li-li<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-nan<sup>1</sup>,  
CAI Yu-mei<sup>1\*</sup>, CHAI Tong-jie<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, China;  
2. Animal Husbandry Bureau of Daiyue Region, Tai'an 271000, China)

**Abstract:** The study was carried out to establish an accurate and rapid method to identify dermatophytes from rabbits by microsatellite-primed polymerase chain reaction (PCR) and NTSYS-pc2.10 software. The DNAs of *Trichophyton mentagrophyton*, *Microsporum gypsum* and *Microsporum canis* were amplified by the primer (GACA)<sub>4</sub>, and then their DNA fingerprint polymorphism was analyzed using NTSYS-pc2.10 software. Based on the above results, the identification method was confirmed. Finally, a total of 21 clinical isolates identified by morphology were identified by the method. The results showed that: 1) The three kinds of rabbit dermatophytes have obviously different DNA fingerprints; 2) The rabbit dermatophytes of the same kind have high genetic similarity (90%-100%); 3) The identified results of clinical isolates by this method were consistent with the morphological identification results. The results indicated that dermatophytes from rabbits could be rapidly and accurately identified by the microsatellite-primed PCR in combination with NTSYS-pc2.10 software.

**Key words:** microsatellite-primed PCR; rabbit; dermatophyte; NTSYS-pc2.10 software

收稿日期: 2011-10-09

基金项目: 中德国际合作项目“动物疫源性人畜共患病的检测”(2009DFA32890); 山东农业大学博士后基金(76282)

作者简介: 李代军(1986-), 女, 山东潍坊人, 硕士生, 主要从事基础兽医学及环境微生物专业的研究, E-mail: ldj104@163.com; Tel: 0538-8241183

\* 通讯作者: 蔡玉梅(1969-), E-mail: caiyum@163.com; 柴同杰(1957-), E-mail: chaitj117@163.com

兔皮肤真菌病(Dermatophytosis)是一类传染性极强的人畜共患接触性皮肤病,常见病原真菌主要包括表皮癣菌属、小孢子菌属和毛癣菌属 3 个属<sup>[1]</sup>。该病主要侵害动物的毛发,出现皮屑增多、结痂、脱毛、渗出、毛囊炎及痒感等症状,严重的可引起动物营养不良、生长迟缓、饲料报酬降低等,直接影响其产量和品质,降低生产性能和幼仔成活率,给养殖业生产造成严重的经济损失<sup>[2-3]</sup>,同时对养殖人员的健康构成威胁。

皮肤病原真菌的传统诊断方法主要依赖于传统的形态学鉴定或病原菌的生理生化特征,但是这些方法既耗时又费力,一个鉴别周期至少需要 3~4 周<sup>[1, 4-5]</sup>,而且假阴性率较高<sup>[1]</sup>。随着分子生物学技术的发展,鉴定皮肤病原真菌的基因型方法逐渐发展起来,如内转录间隔区 1(ITS1)的序列分析<sup>[6]</sup>、随机引物 PCR<sup>[7]</sup>、随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)<sup>[8]</sup>、基因组总 DNA 的限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)分析<sup>[9]</sup>等,均被用于检测临床样品中的皮肤病原真菌,并取得显著成效。但是这些方法操作复杂,对 DNA 质和量的要求很高,不适于临床快速鉴定和大量样本的研究<sup>[10]</sup>。

微卫星引物 PCR 是以(GACA)<sub>4</sub>等寡核苷酸重复序列为引物对真菌的全基因组进行扩增<sup>[5, 10-11]</sup>,不同的菌株有其明显的 DNA 指纹,在真菌菌种鉴定和分类上具有高效、快速等特点<sup>[4, 12]</sup>。Faggi 和 Shehata 等曾以单纯微卫星引物 PCR 方法对病原真菌进行鉴定<sup>[5, 10]</sup>,但仅通过肉眼观察条带差异确定 DNA 指纹多态性,虽然这种方法较其他分子生物学方法更简便、快捷,但是仅用肉眼观察容易产生主观方面的误差。近年来,随生物信息技术的发展,聚类分析软件已广泛应用于细菌同源性的鉴定。本研究以微卫星引物 PCR 与 NTSYS-pc2.10 聚类分析软件相结合,旨在建立一种快速、准确检测兔皮肤病原真菌的分子生物学方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 标准菌株

3 株标准菌株,犬小孢子菌[CMCC(F)M3e]和石膏样小孢子菌[CMCC(F)M26]购于中国医学科学院皮肤病研究所,须癣毛癣菌(由第二军医大学上海长征医院皮肤科馈赠)。

### 1.2 DNA 提取

标准菌株于沙氏培养基(SDA,购于北京路桥

技术公司,中国)平皿中 28 ℃培养 2 周<sup>[10, 13-14]</sup>,分别用无菌牙签刮取菌丝体,采用氯化苜法提取基因组 DNA<sup>[15]</sup>。

### 1.3 PCR 扩增

利用引物(GACA)<sub>4</sub>(由大连宝生物公司合成),对提取的 3 种标准真菌菌株基因组 DNA 进行扩增,每种菌株设 4 个重复。

PCR 反应体积为 25 μL,扩增体系如下:10×PCR 反应缓冲液 2.5 μL(不含 Mg<sup>2+</sup>),2.5 mmol·L<sup>-1</sup>MgCl<sub>2</sub> 2 μL,dNTP(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL,引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 4 μL,DNA 模板 50 ng,1 U Taq DNA 聚合酶(5 U·μL<sup>-1</sup>),用灭菌双蒸水补足至 25 μL。

反应条件:起始变性 94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,退火 53 ℃ 1 min,延伸 72 ℃ 2.5 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。

产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,以 DL5000 Maker (TaKaRa)作为相对分子量标准,电泳结果在紫外分析仪(Tanon-2500, Shanghai, China)上观察并照相。

### 1.4 PCR 结果分析

采用与 NTSYS-pc2.10 聚类分析软件对 PCR 扩增结果进行分析。计算机软件记录下扩增及电泳谱带,每个样品的扩增带存在时赋值为“1”,不存在时赋值为“0”,用电泳图像分析软件(Gel Image System, Version 4.00)自动生成矩阵图。采用非加权对数算术平均法(Unweighted pair group method using averages algorithm, UPGMA),利用 NTSYS-pc2.10 软件构建聚类树状图<sup>[17]</sup>。另外,每个分离株看作是 1 个分类学单位(Operational taxonomic unit, OUT),并且把相似性大于或等于 90%的菌株看作起源相同的分离株<sup>[18]</sup>。

### 1.5 待测菌株的鉴定

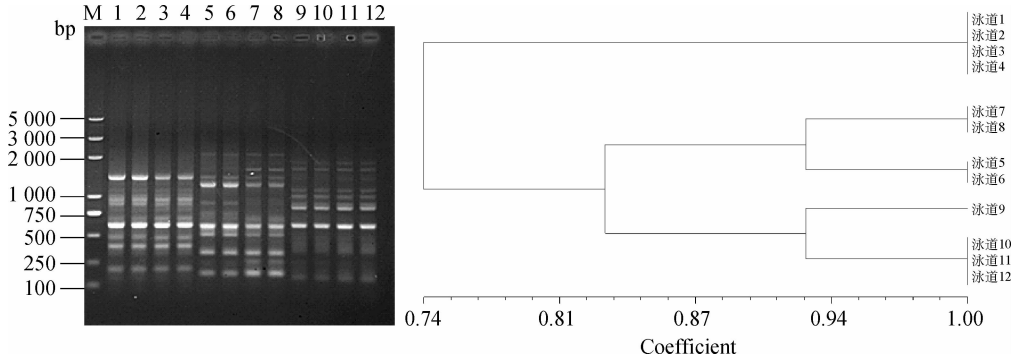
本试验待测样品是于 2009—2010 年在山东某兔场所采集的发病兔的皮屑和结痂,在 SDA 培养基中经 28 ℃培养 1~2 周后,经过形态学鉴定<sup>[16]</sup>及内转录间隔区 1(ITS1)的序列分析确定为须癣毛癣菌、犬小孢子菌和石膏样小孢子菌的 21 株病料。DNA 提取同 1.2,以标准菌株为对照,对临床分离株进行 PCR 扩增,体系同 1.3,为减少误差,把所有分离到的临床样品在同一个反应条件下一次完成。以 NTSYS-pc2.10 软件分析扩增条带的相似性,从而对真菌分离株进行分类。

## 2 结果

### 2.1 标准菌株的特异性

如图 1 所示,以 (GACA)<sub>4</sub> 为引物,须癣毛癣菌、犬小孢子菌和石膏样小孢子菌的标准菌株通过微卫星引物 PCR 扩增,在 200~2 000 bp 间可以获得清晰稳定的电泳条带(须癣毛癣菌主要扩增条带

有 6 条,特征主条带为 600 和 1 500 bp;石膏样小孢子菌主要扩增条带有 9 条,特征主条带为 300、600 和 1 400 bp;犬小孢子菌主要扩增条带有 7 条,特征主条带为 600 和 780 bp)。三者特征条带的差距清楚、直观。3 株标准菌株中 UPGMA 进化树结果显示,每株标准菌株的 4 个重复样品的相似性均超过了 90%,显示了良好的可重复性。



泳道 1~4 为须癣毛癣菌的标准菌株; 5~8 为石膏样小孢子菌的标准菌株; 9~12 为犬小孢子菌的标准菌株, M 为 DL5000 DNA 相对分子质量标准

1-4. *T. mentagrophytes*; 5-8. *M. canis*; 9-12. *M. gypsum*; M. DL5000 DNA marker

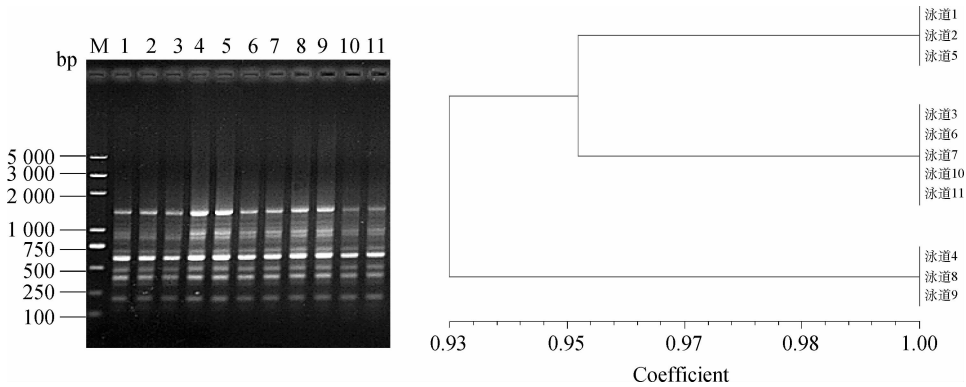
图 1 标准菌株的 PCR 扩增及聚类分析结果

Fig. 1 PCR amplification and clustering analysis results of standard strains

### 2.2 临床分离菌株的鉴定及聚类分析结果

以标准菌株作为对照,对临床分离菌株进行扩增,得到了与标准菌株带型基本一致的条带,经 NTSYS-pc2.10 聚类分析软件分析,得到了每一种临床分离株的遗传进化树状图,具有相同遗传进化关系的菌株具有相同的 PCR 指纹图谱。

经形态学鉴定为须癣毛癣菌的分离株中 UPGMA 进化树结果显示(图 2),10 株须癣毛癣菌分离株与标准菌株的相似性都超过了 90%(最低达到 93%),其中 4 株分离株与标准菌株的相似性高达 100%。表明这 10 株须癣毛癣菌与标准菌株为同一种类的病原真菌<sup>[19]</sup>。



泳道 1~10 为须癣毛癣菌的临床分离株; 11 为须癣毛癣菌的标准菌株; M 为 DL5000 DNA 相对分子质量标准

1-10. *T. mentagrophytes* clinical strains; 11. *T. mentagrophytes* strain; M. DL5000 DNA marker

图 2 须癣毛癣菌临床分离株的 PCR 扩增及聚类分析结果

Fig. 2 PCR amplification and clustering analysis results of *T. mentagrophytes* strains

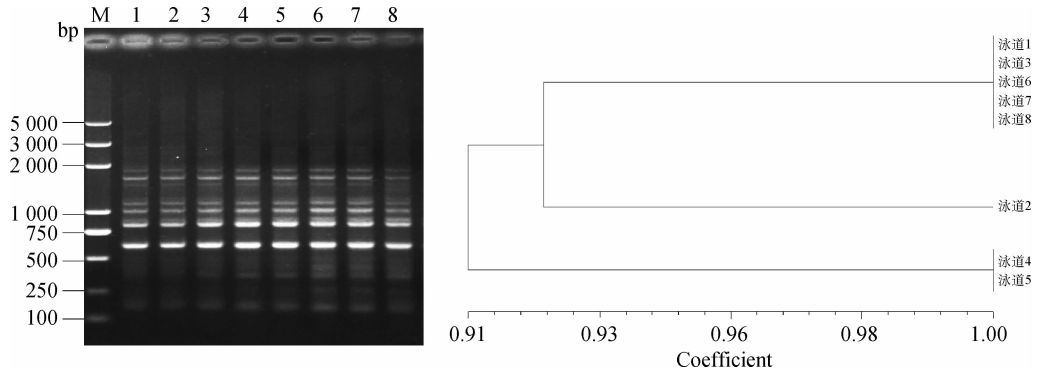
同样,在犬小孢子菌的 7 株临床分离株中,4 株与标准菌株的相似性达到 100%,其余 3 株均在 91%

到 93% 之间(图 3)。4 株石膏样小孢子菌的临床分离株中 2 株与标准菌株的相似性达到 100%,其余 2

株均达到 92 % 以上(图 4)。

以上 3 种皮肤真菌的树状分析图中,临床分离株与标准菌株的相似性均超过 90%,表明这临床分

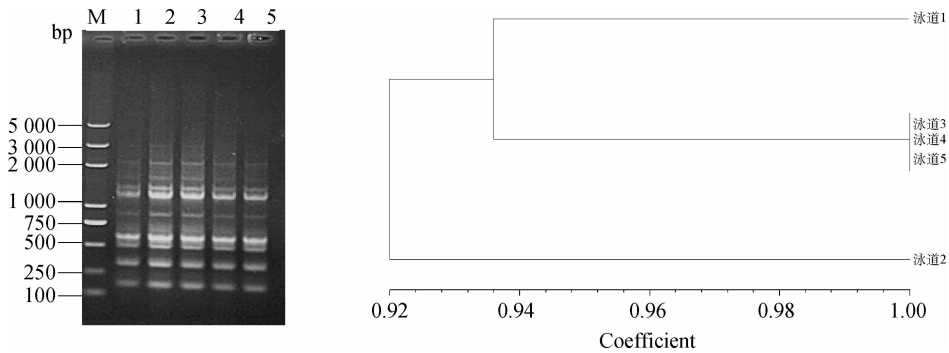
离株与 3 株标准菌株相同,鉴定结果与形态学鉴定结果一致。



泳道 1 为犬小孢子菌标准菌株;2~8 为犬小孢子菌临床分离株;M 为 DL5000 DNA 相对分子质量标准  
1. *M. canis* strain;2-8. *M. canis* clinical strains; M. DL5000 DNA marker

图 3 犬小孢子菌临床分离株的 PCR 扩增及聚类分析结果

Fig. 3 PCR amplification and clustering analysis results of *M. canis* strains



泳道 1~4 为石膏样小孢子菌临床分离株;5 为石膏样小孢子菌标准菌株;M 为 DL5000 DNA 相对分子质量标准  
1-4. *M. gypseum* clinical strains;5. *M. gypseum* strain;M. DL5000 DNA marker

图 4 石膏样小孢子菌临床分离株的 PCR 扩增及聚类分析结果

Fig. 4 PCR amplification and clustering analysis results of *M. gypseum* strains

### 3 讨论

近年来,兔皮肤真菌病的感染和发生在世界范围内比较普遍<sup>[20-21]</sup>,已成为危害社会公共卫生的一大难题。而且多数病原真菌为人畜共患致病菌,世界上有超过 20%~25% 的人群受到该类疾病的困扰<sup>[22]</sup>。因此,准确、快速地鉴定兔皮肤病原真菌的种类显得尤为重要,而传统的鉴定方法主要是依靠镜检和体外培养等形态学方法进行,这些方法或耗时,或特异性低。近年来分子生物学方法以其简便、准确的优点逐渐应用到皮肤病原真菌的种类鉴别中。

在本研究中,微卫星引物 PCR 结合 NTSYS-pc

2.10 软件鉴定病原真菌的方法与目前国内所广泛应用的分子生物学方法相比又有其优势所在,与 ITS 序列分析相比其优势在于该方法不需要测序,直接通过比较不同带型之间的差异来检测 DNA 指纹多态性,从而对不同的真菌菌株进行鉴定,更简便、快速<sup>[19]</sup>;与随机引物 PCR、随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、基因组总 DNA 的限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)分析等方法相比,该方法不需要内切酶酶切,而是直接用寡核苷酸简单重复序列作为特殊单一引物扩增真菌高度可变、重复的微小卫星 DNA 序列,通过种、株 DNA 多态性检测,更能有效地区分真菌种类和说明菌株之间在分类学上的关系<sup>[4,19]</sup>。

本试验用寡核苷酸简单重复序列(GACA)<sub>4</sub>为引物,须癣毛癣菌、犬小孢子菌和石膏样小孢子菌的标准菌株作为对照,对须癣毛癣菌、犬小孢子菌和石膏样小孢子菌的不同表型临床分离株的基因组DNA进行扩增,然后根据产物电泳的条带差异,可以明确地将这3种菌区分开来,且特异性和可重复性均较高,说明该引物对须癣毛癣菌、犬小孢子菌和石膏样小孢子菌具有种特异性的区分能力。

但是,以往所运用的微卫星引物PCR方法仅通过肉眼观察比较PCR产物的电泳扩增条带来区分<sup>[4-5]</sup>,容易出现主观方面的误差,如电泳条带的大小、亮度很难用肉眼区分其差距。为此,笔者结合聚类分析软件对其电泳条带进行分析,将PCR扩增产物电泳图像经过软件分析自动生成了矩阵图,并利用NTSYS-pc 2.10软件构建了聚类树状图,经过分析,获得同种真菌间,标准菌株和临床菌株间的相似性大小,从而更直观准确的确定其遗传性关系。从树状分析图不难发现,所有临床分离株经微卫星引物PCR鉴定所得结果与形态学方法鉴定得到的结果一致,证明本方法实用、有效。

本试验的检测结果与传统的形态学鉴定方法结果一致,但用微卫星引物PCR结合聚类分析软件对兔皮肤病原真菌(须癣毛癣菌、犬小孢子菌和石膏样小孢子菌)进行检测,不仅缩短了鉴定时间,而且大大提高了鉴定的准确性和可靠性。

## 4 结 论

用NTSYS-pc 2.10软件对微卫星引物PCR电泳条带进行分析,可自动生成矩阵图。通过分析,可以获得同种真菌间,标准菌株和临床菌株间的相似性大小,从而更直观准确地确定其遗传性关系。通过对临床分离株的鉴定表明,该方法确实快速、有效。

## 参考文献:

- [1] WEITZMAN I, SUMMERBELL R C. The dermatophytes [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1995, 8(2): 240-259.
- [2] 赵长城, 訾士鲁, 李福宝. 兔皮肤真菌病的流行病学和诊断[J]. *动物医学进展*, 2005, 27(1): 104-107.
- [3] LYNN A D, FARMER E R, GOLTZ R W, et al. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin; tinea corporis, tinea cruris, tinea faciei, tinea manuum, and tinea pedis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1996, 34(2): 282-286.
- [4] GRASER Y, FARI M, PRESBER W, et al. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions [J]. *Br J Dermatol*, 1998, 138(4): 576-582.
- [5] SHEHATA A S, MUKHERJEE P K, ABOULATTA H N, et al. Single-step PCR using (GACA)<sub>4</sub> primer; utility for rapid identification of dermatophyte species and strains [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(8): 2641-2645.
- [6] MAKIMURA K, TAMURA Y, MOCHIZUKI T, et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequence of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(4): 920-924.
- [7] LIU D, COLOE S, BAIRD R, et al. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 136(2): 147-150.
- [8] MOCHIZUKI T N, SUGIE N, UEHARA M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes [J]. *Mycoses*, 1997, 40(11-12): 405-409.
- [9] JACKSON C J, BARTON R C, GEVANS E. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(4): 931-936.
- [10] FAGGI E, PINI G, CAMPISI E, et al. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9): 3382-3385.
- [11] ROQUE H D, VIEIRA R, RATO S, et al. Specific primers for rapid detection of *Microsporum audouinii* by PCR in clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(12): 4336-4341.
- [12] LIU D, COLOE S, BAIRD R, et al. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi [J]. *J Med Microbiol*, 2000, 49(2000): 493-497.
- [13] ABU-ELTEEN K H, MALEK A M. Prevalence of dermatophytoses in the Zarqa district of Jordan [J]. *Mycopathologia*, 1999, 145(3): 137-142.
- [14] MEHRABAN F, LAME A, ABDOLAZIZ R L, et al. Epidemiology of dermatophytoses in an area south of Tehran, Iran [J]. *Mycopathologia*, 2003, 156

- (4): 279-287.
- [15] ZHU H, QU F, ZHU L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride [J]. *Nucl Acids Res*, 1993, 21 (22): 5279-5280.
- [16] RIPPON J W. Medical Mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes [M]. 3rd edition. Philadelphia; W. B. Saunders Co. 1988.
- [17] ROHLF F J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system[CP]. Version 2.1. New York; Exeter Software, Setauket, 2000.
- [18] BORGES L G A, VECHIA V D, CORCA G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 45 (2): 173-180.
- [19] MEYER W, MITCHELL T G. Polymerase chain reaction finger-printing in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(9): 1648-1656.
- [20] MARTINO P A, LUZI F, VERGA M. Microbiological control of the environment in an intensive rabbit rearing[C]. Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Pueblo, Mexico, 2004: 7-10.
- [21] EFUNTOYE M O, FASHANU S O. Fungi isolated from skins and pens of healthy animals in Nigeria [J]. *Mycopathologia*, 2002, 153(1):21-23.
- [22] MEHRABAN F, LAME A, ABDOLAZIZ R L, et al. Epidemiology of dermatophytoses in an area south of Tehran, Iran [J]. *Mycopathologia*, 2003, 156 (4): 279-287.

(编辑 白永平)

## 常年供应仔猪

正阳养猪场是河南省政府、省畜牧厅重点扶持品种改良单位,在2007年9月28日从美国引进360头种猪,本场现有母猪群体1800多头(原种猪800多头),后备二元母猪数千头,每月面向全国各地出售三元苗猪3000多头。仔猪主要品种有二元杂、三元杂、四元杂、长白、大约克和杜洛克。

本场是一个重合同、守信用单位,对外出售仔猪、种猪,严格防疫,仔猪上车前统一注射畜牧专家配制的防疫防病药物,途中无拉稀、无应激。客户所购仔猪、种猪运输途中有伤残,原款包赔,种猪配不上种包换,可报销路费。凡来购猪数量大者,可免费送货。

本场永保诚信一生的服务宗旨,以高效求实的销售方法,以心换心的销售品德,深受全国各地养殖户的信赖。

销售部电话:0396 8935776

余经理手机:13839675185

地址:正阳良种苗猪繁育基地