

我国新生隐球菌临床株基因型分析

车付彬^{1*} 朱定衡^{2*} 赵瑾² 陈江汉^{2**}

(1. 北京军区第281医院 河北 秦皇岛 066000)

(2. 上海长征医院皮肤科 上海 200003)

摘要: 为了解中国大陆地区新生隐球菌临床株基因型分布情况,我们对来自我国中东部地区的18个省、直辖市的120株血清A型和9株血清B型新生隐球菌临床株采用PCR指纹分析、IGS序列测定和MLST(Multilocus sequencing test)方法进行分析。结果显示血清A型菌株的M13指纹图谱中主要条带与VNI型标准株相同,但次要条带与VNI现有各亚型均不相符,我们将这种新VNI亚型命名为VNic型,但VNic型并不只分布在中国大陆,MLST分析显示中国大陆地区的VNic型菌株同来自美国、日本、马拉维和巴西的7株菌株亲缘关系高达75,提示VNic型可能是一种世界范围内分布的基因型;对血清A型菌株采用(GACA)₄和URA-5 RFLP指纹分析则呈现与VNI标准株完全一致的主次条带;9株血清B型菌株基因型为VGI型。本研究初步揭示了我国大陆地区新生隐球菌临床株的基因型分布。

关键词: 新生隐球菌, 基因分型, 指纹分析, MLST, IGS

Genotype Analysis of *Cryptococcus neoformans* Clinical Strains in Mainland China

CHE Fu-Bin^{1*} ZHU Ding-Heng^{2*} ZHAO Jin² CHEN Jiang-Han^{2**}

(1. No. 281 hospital of PLA, Qinhuangdao, Hebei 066000, China)

(2. Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China)

Abstract: We analyzed the genotype of 120 *Cryptococcus neoformans* and 9 *Cryptococcus gattii* strains isolated from cryptococcosis patients residing in 16 provinces of mainland China, using methods of DNA fingerprint, IGS sequence, MLST and construction of dendrogram based on M13 fingerprint. 120 serotype A strains exhibited an identical M13-based VNI subtype, which was distinguishable from the reference VNI molecular type, MLST also showed the same result, for convenience we named this unique genotype VNic. (GACA)₄ and URA-RFLP could not separate VNic from other subtype of VNI. The 9 serotype B strains of *C. gattii* portrayed a typical VGI molecular type. This research showed that VNic is responsible for the majority of clinical cryptococcosis in China.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, Genotype, Fingerprint, MLST, IGS

基金项目: 美国国立卫生研究院 NIH (No. AI25783); 国家自然科学基金(No. 30872263)

* 对本文贡献相同

** 通讯作者: Tel: 86-21-81885492; 信箱: chenjianghan@126.com

收稿日期: 2008-12-28; 接受日期: 2009-04-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

新生隐球菌的基因型包括 VNI、VNII、VNIII、VNIV 和 VGI、VGII、VGIII、VGIV^[1], 目前世界各地大部份国家和地区的新生隐球菌的基因型分布都已明确, 但是国内尚未开展这方面的工作。分型的方法有很多种, 但以 M13-PCR、(GACA)₄ 重复序列引物和 URA-5 RFLP 得到广泛认可^[2,3], 近来应用 MLST 方法在非洲博茨瓦纳又成功发现了新的 VNIB 亚型(Serotype A, Bt 63, Botswana), 表明它具有更高的分辨率^[4]。因此我们采用上述手段对我国 129 株新生隐球菌临床分离株进行基因型测定, 以了解我国新生隐球菌的基因型分布情况。

1 材料

菌株: 129 株新生隐球菌临床株从不同的感染患者中分离获得, 他们来自于我国中东部地区的 18 个省、直辖市, 覆盖了 80%以上的人口, 这些菌株均保存于上海长征医院皮肤科新生隐球菌专业实验室。其中 120 株为血清 A 型, 9 株为血清 B 型。标准株 WM148 (VNI 血清型 A)、Bt63 (VNB 血清型 A)、WM626 (VNII 血清型 A)、WM628 (VNIII 血清型 D)、WM629 (VNIV 血清型 AD)和 WM179 (VGI 血清型 B)、WM178 (VGII 血清型 B)、WM161 (VGIII 血清型 B)、WM779 (VGIV 血清型 C)和 H99 (血清型 A) 则由美国国立卫生研究院(NIH)Kwon-Chung 教授提供。在研究过程中, 所有菌株均 25°C 保存在 YEPD 培养基中(1%酵母抽提物, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖)。

2 实验方法

2.1 DNA 提取

按照 Wang 等的氯化苜法操作^[5], 抽提出的 DNA 在 4°C 保存备用。

2.2 基因分型

基因分型包括 PCR 指纹分析和 DNA 序列测定, PCR 指纹分析包括 M13 微卫星 DNA 引物、(GACA)₄ 重复序列引物和 URA-5 RFLP, 序列测定涵盖了 rDNA 的部份 IGS1-5.8S-IGSII 区域, MLST 涉及位于新生隐球菌 7 个不同染色体上的 8 个不同基因, 它们分别是 CAP10、GPD、IGS1、LAC1、PLB1、SOD1、TEF1 和 URE1。

M13 的引物序列为: 5'-GAGGGTGGCGTTCT-

3', 它和(GACA)₄ 重复序列 PCR 的操作方法参考相关文献^[6,7], URA5-RFLP 则是通过 PCR 扩增 URA5 的基因序列, 并用 *Sau*961 和 *Hha* I^[8]降解扩增产物, URA-5 RFLP 引物 URA5 (5'-ATGTCCTCCCAAGCC CTCGACTCCG-3')和 SJ01(5'-TTAAGACCTCTGAA CACCGTACTC-3')。

IGSI 序列分析 LrDNA 基因扩增产物(1.7 kb), PCR 的引物序列包括 LR11 (5'-TTACCACAGGGA TAACTGGC-3')和 5SR (5'-GGATCGGACGGGGCA GGGTGC-3')^[9]。

PCR 反应体系: 反应总体积 50 μ L, 模板 DNA 50 ng~100 ng, 上游下游引物各 0.5 mmol/L, 1.0 U *DyNAzyme* II 聚合酶, 1.5 mmol/L 氯化镁, 200 mmol/L dNTP; 反应条件: 94°C 变性 1 min; 95°C 2 min, 57°C 1 min, 72°C 3 min, 40 个循环; 72°C 7 min。纯化采用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), 扩增产物采用纯化试剂盒 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)。

测序反应体系采用正向序列引物 IGS1F(5'-CA GACTTGAATGGGAACG-3'), 它位于 LrRNA 的 36133633 区域, 反向序列引物为 IG2R (5'-ATG CATAGAAAGCTGTTGG-3'), 位于 IGS1 的 791 区域, DNA 测序采用 ABI 3730 capillary 测序仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 操作参考 Diaz 等使用的方法^[9]。IGS 区域的测序连接和校正采用 Megalign (DNASar, Inc., Madison, WI, USA)。使用 Paup 4.0 绘制系统树。

2.3 以 M13 指纹分析结果为基础绘制系统树

选择 12 株来自我国大陆不同省份的血清 A 型菌株, 同 6 株标准株一起进行 M13 扩增, 再进行琼脂糖凝胶电泳, 共形成 15 个主条带, 长度范围 506 bp~3054 bp。在统计分析过程中, 若一条带出现则计为 1, 无则计为 0, 所有肉眼可见条带均计入统计, 这样就转化为只含 1 和 0 的两值变量, 数据被制成 Nexus 格式并导入 Paup 软件, 采用启发式搜索算法生成最大简约系统进化树, 并用 Bootstrapping 法重复 500 次进行检验。

2.4 MLST 分析

随机选择 6 株来自不同省份的中国新生隐球菌, 对待测基因片段(CAP10、GPD、IGS1、LAC1、PLB1、SOD1、TEF1 和 URE1)进行 PCR 扩增, 双脱氧法测

序并与公开发表的标准血清 A 型菌株的 DNA 序列对照,为进一步了解不同 MLST 基因型之间的联系,对获得的序列数据用 Sequencher4.1 对齐后输入 MacClade4.05 并人工编辑,同文献[4]中涉及的 88 株来自我国以外的菌株一起采用 Neighbour-joining method 分析,结果采用 Bootstrapping 法重复验证 1000 次。

3 实验结果

1) 120 株血清 A 型临床株具有一致的 M13 指纹图谱,其主要条带同 VNI 型标准株相同,但次要条带不同于本试验涉及已知 VNI 各亚型,属于一种新的亚型,我们将其命名为 VN1c 型,见图 1A。

2) 120 株血清 A 型临床株的 URA-5 RFLP、(GACA)₄ 图谱无论大小条带均与 VNI 型一致,分别见图 1B 和图 2。

3) 基于 M13 指纹图谱的系统树分析显示来自大陆不同省份血清 A 型临床株亲缘关系接近,高达 68,见图 3。

4) 大陆血清 A 型临床株 IGS 分型为 1A,见图 4。

5) 在同其他菌株 M13 指纹图谱比对的过程中,我们偶然发现来自美国(A5、35-17、c48 和 c8)、日

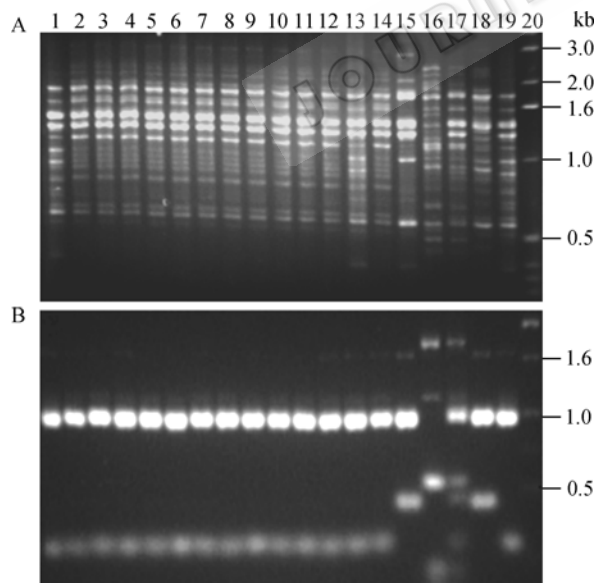


图 1 12 株中国血清 A 型临床株(编号 1-12)同标准株(13-19)DNA 指纹图谱比较

Fig. 1 DNA fingerprint patterns of 12 strains from China and the molecular type reference strains

注: A: M13 指纹图谱; B: URA5 RFLP 指纹图谱。

Note: A: M-13 based PCR pattern; B: URA5 restriction fragment length polymorphism.

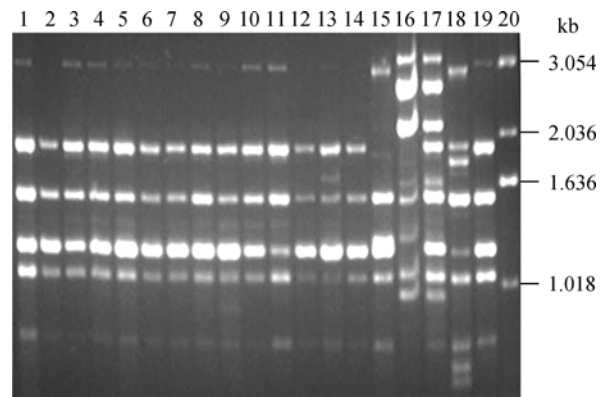


图 2 12 株来自大陆不同省份的血清 A 型临床株同标准株(GACA)₄ 指纹图谱比较

Fig. 2 (GACA)₄ comparison between fingerprint pattern of Chinese *Cryptococcus neoformans* strains and reference strains

注: 编号 1-12 为血清 A 型大陆临床株; 13-19 为标准株。

Note: 1-12: Serotype A clinical strains from China mainland; 13-19: Reference strains.

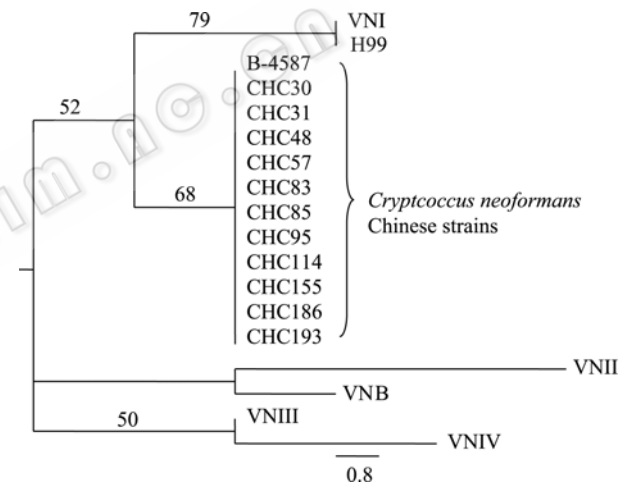


图 3 基于不同省份 12 株血清 A 型隐球菌 M13 指纹图谱构建的系统树

Fig. 3 The phylogenetic tree for maximum parsimony analysis composed on the basis of the M13-PCR pattern of 12 Chinese *C. neoformans* strains

注: 横线上数字代表亲缘度; 大括号内为大陆血清 A 型临床株; 彼此间亲缘关系高达 68。

Note: Numbers above the branches represent bootstrap support percentages based on 500 replicates; Strains in the right brace are separated from clinical cryptococcosis patients from 12 provinces.

本(jp1086 和 jp1088)、巴西 Jt743 和马拉维 mal 212 的 7 株隐球菌也呈现出 VN1c 指纹图谱的特点,见图 5。随后对 6 株血清 A 型大陆临床株和 88 株来自他国的菌株(包括上述 7 株在 M13 指纹分析中呈现 VN1c 特征的菌株)进行 MLST 分析发现,中国新生隐球菌该 7 株菌株构成独特的 M5 组,明显区别于 VNI 标准株 WM148 所属的 M1 组,见图 6。

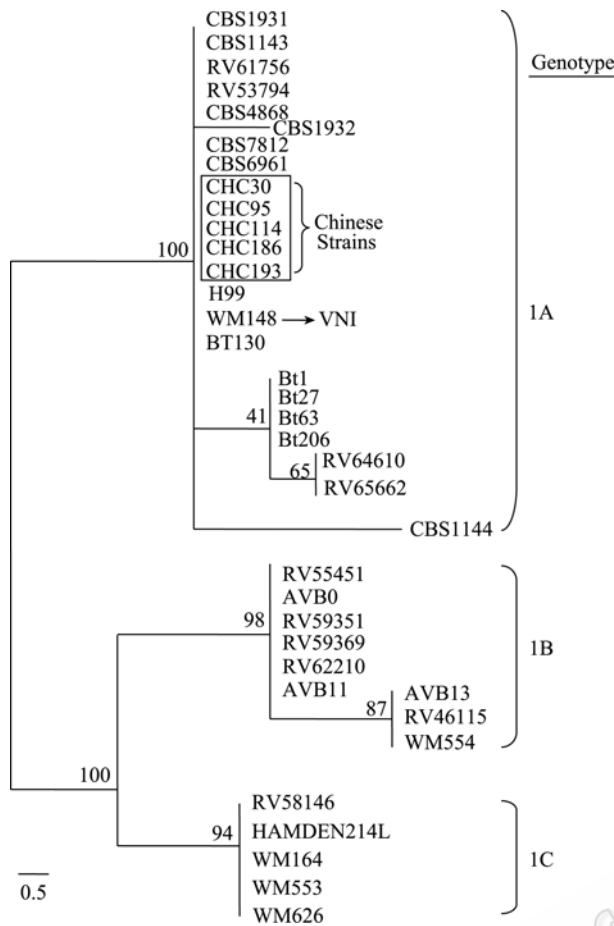


图 4 基于 IGS 序列测定构建的系统树
Fig. 4 Phylogenetic tree constructed on the partial sequence of intergenic spacer region 1(IGS)1-5.8S-IGSII region
 注: 横线上数字代表亲缘度; 方框内为大陆血清 A 型临床株; IGS 分型为 1A.
 Note: Numbers above the branches represent bootstrap values of 500 replicates; Strains in the box are randomly selected from serotype A Chinese clinical strains.

6) 9 株格特隐球菌均来自我国南部, 它们的 M13、(GACA)₄ 和 URA-5 RFLP 指纹图谱均为典型的 VGI, IGS 分型为 4B, 见图 7。

4 讨论

第 7 届世界隐球菌和隐球菌病大会已将新生隐球菌分为新生隐球菌(*C. neoformans*)和格特隐球菌(*C. gattii*)两个种, 基因型是重要的分类依据, 但国内尚缺乏隐球菌基因型的研究。

我们的研究结果显示, 我国大陆新生隐球菌临床株血清 A 型的基因型呈现明显的同质化倾向, 这同亚洲的其他国家, 如印度、日本十分相似^[10]; 但与其它大洲存在明显差异, 如北美的美国、欧洲的意大利、大洋洲的澳大利亚和南美的巴西等^[6,11], 这

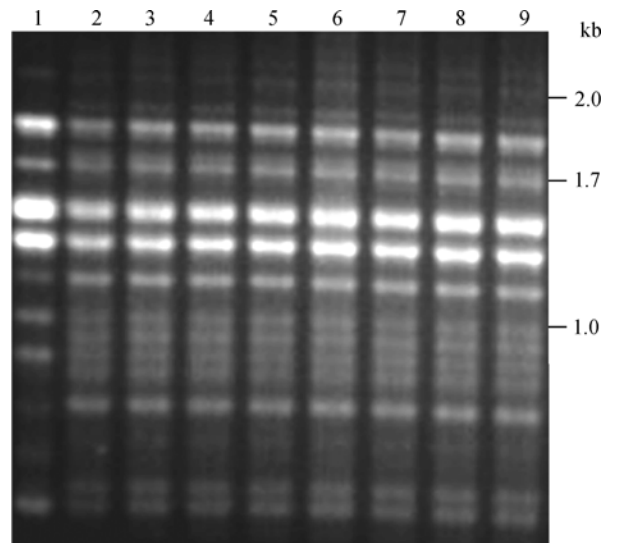


图 5 M5 组菌株和 VNI 型标准株 WM148 M13 指纹图谱比较
Fig. 5 M13-PCR fingerprint pattern of the M5 cluster and WM148
 注: 编号 1 为 WM148, 编号 2 为大陆血清 A 型菌株 CHC123; 编号 3~9 为 M5 组中来自世界其他地区的 7 株菌株。
 Note: 1: WM148; 2: Chinese strain CHC123; 3-9: the 7 strains from other part of the world of M5 cluster.

些国家的菌株基因型存在显著的异质性。我们研究的 120 株血清 A 型临床菌株的 M13 指纹图谱主要条带同 VNI 标准株相同, 但次要条带同目前已知的任何亚型都不相符, 所以是一独特的亚型。

在 MLST 分析中, 6 株随机选择的大陆血清 A 型临床株与来自美国、日本、马拉维和巴西的 7 株菌一同分在 M5 组, 亲缘关系高达 75, 说明 VNIc 型可能并非中国大陆所特有, 这一点与博茨瓦纳 VNB 型的情况不同, VNB 型只存在博茨瓦纳地区, 因此 VNIc 型究竟起源于何处, 通过何种方式散布于世界各地有待进一步研究。

同 M13 指纹图谱比较, 采用(GACA)₄ 重复引物和 URA-5 RFLP 对 120 株血清 A 型大陆临床株分析, 生成的指纹图谱主次条带均一致, 不能区分 VNI 和 VNIc 型, 说明采用 M13 指纹图谱分析和 MLST 分型有更高的分辨率。

9 株血清 B 型中国临床株表现为典型的 VGI 型, 其分布同其他地区报告一致^[12], 主要来自热带和亚热带地区。

综上所述, 我们尚不能肯定 VNIc 型是我国最常见的基因型, 因为本研究纳入菌株的数量有限, 且仅限于临床株, 因此我们不但需要研究更多临床

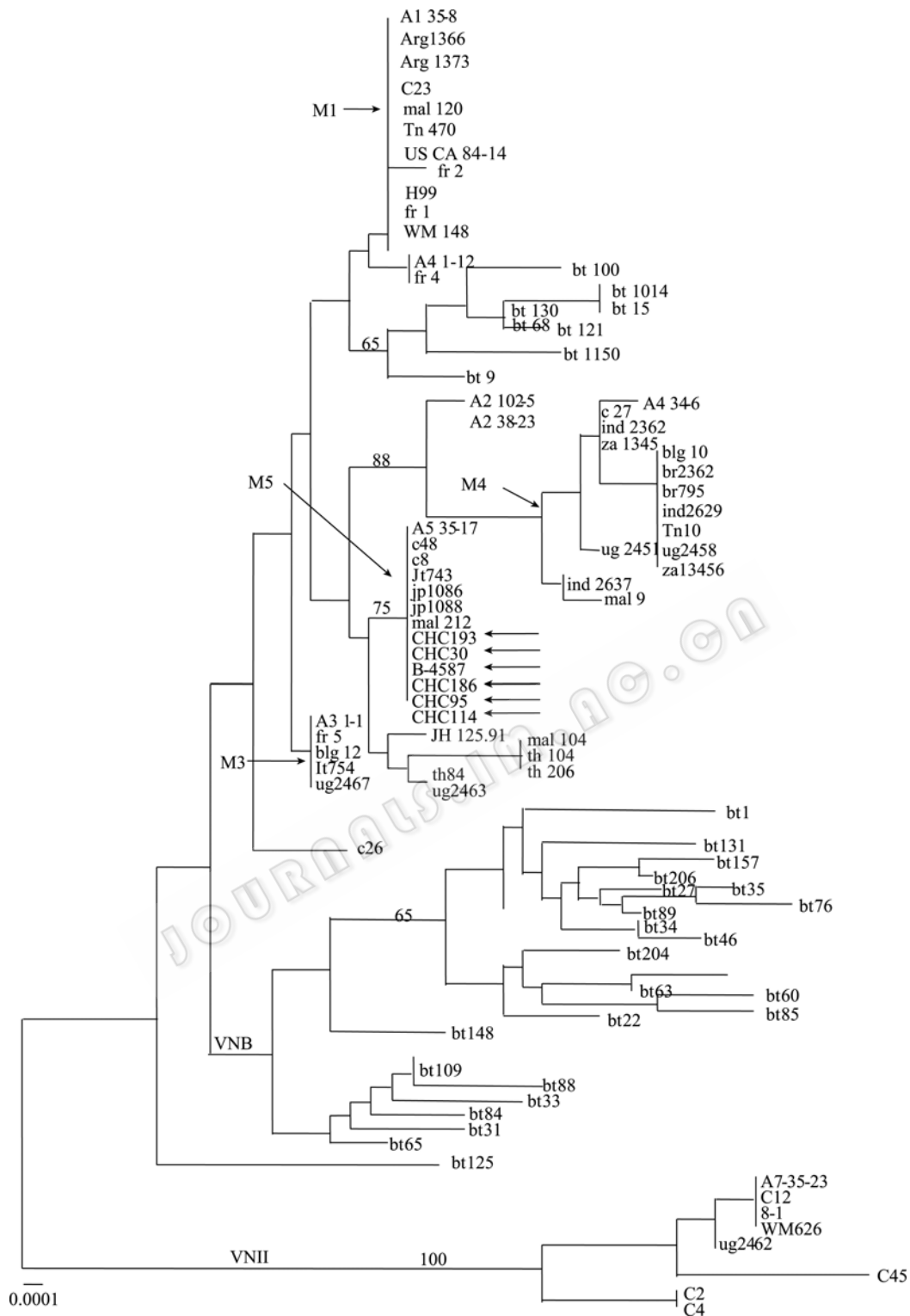


图 6 6 株来自大陆血清 A 型临床株和文献[4]中 88 株世界其他地区菌株构成的 MLST 分析结果

Fig. 6 Genetic relationship of multilocus sequence typing (MLST) genotypes among 94 isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A (88 strains from reference [4]) and 6 representative Chinese strains) visualized by the neighbor-joining dendrogram

注: 横线上数字代表亲缘度; 竖线代表属同一基因型菌株; 左向箭头所指为中国大陆临床株; 6 株大陆菌株和 7 株来自美国, 日本, 马拉维和巴西的菌株同分为 M5 组, 亲缘关系高达 75.

Note: Numbers on each branch indicate the bootstrap values >50%, based on 500 replicates; Vertical lines represent strains with identical genotypes; MLST results for Chinese strains are indicated by arrows; The Chinese strains of *C. neoformans* formed a cluster with 7 strains from other part of the world and formed a distinct cluster, M5.

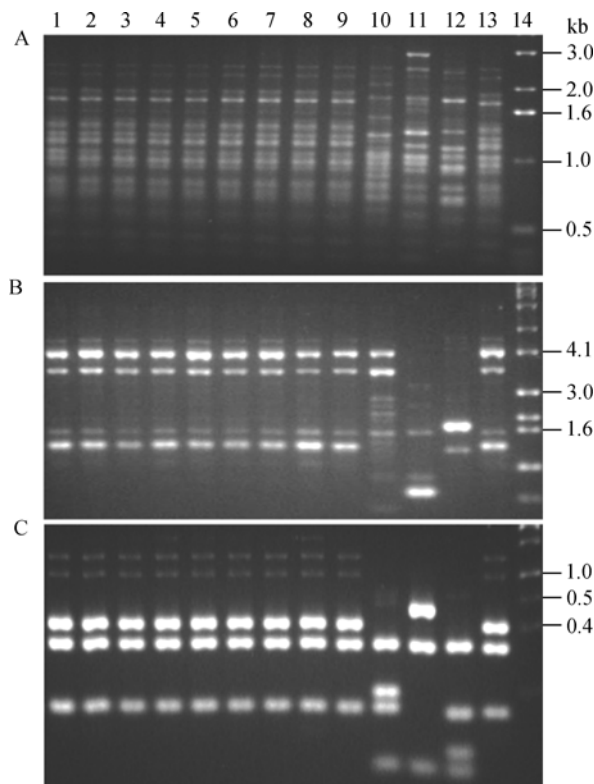


图7 9株血清B型中国大陆临床株指纹图谱比较

Fig. 7 Comparison of the PCR pattern of 9 Chinese *Cryptococcus gattii* isolates with reference *C. gattii* strains

注: 1~9: 血清B型临床株; 10~13: 为血清B型标准株; A: M13指纹图谱; B: URA5限制片段长度多态性分析; C: $(GACA)_4$ 指纹分析。

Note: 1~9: Serotype B clinical strains from China mainland; 10~13: Serotype B reference strains; A: M-13 based PCR pattern; B: URA5 restriction fragment length polymorphism; C: $(GACA)_4$ based PCR pattern.

株, 而且还要了解环境株中的基因型情况, 唯有如此, 才能更好地理解 VN1c 型在新生隐球菌感染中的意义。

参考文献

- [1] Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*: American Society for Microbiology. Washington, 1998, pp.45-47.
- [2] Xu J, Luo G, Vilgalys RJ, et al. Multiple origins of hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. *Microbiology*, 2002, **148**(Pt 1): 203-212.
- [3] Dias AL, Brigagao MR, Colepicolo P, et al. Superoxide dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubi*, and *neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006, **101**(1): 107-109.

- [4] Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, et al. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*, 2006, **172**(4): 2223-2238.
- [5] Wang S, Miao X, Zhao W, et al. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycol Res*, 2005, **109**(Pt 12): 1364-1372.
- [6] Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, 1999, **20**(8): 1790-1799.
- [7] Cogliati M, Allaria M, Tortorano AM, et al. Genotyping *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* with specific primers designed from PCR-fingerprinting bands sequenced using a modified PCR-based strategy. *Med Mycol*, 2000, **38**(2): 97-103.
- [8] Meyer W, Castaneda A, Jackson S, et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*, 2003, **9**(2): 189-195.
- [9] Diaz MR, Boekhout T, Kiesling T, et al. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 2005, **5**(12): 1129-1140.
- [10] Jain N, Wickes BL, Keller SM, et al. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. *J Clin Microbiol*, 2005, **43**(11): 5733-5742.
- [11] Barreto de Oliveira MT, Boekhout T, Theelen B, et al. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**(3): 1356-1359.
- [12] Chen S, Sorrell T, Nimmo G, et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis*, 2000, **31**(2): 499-508.