

格特隐球菌交配型的多重 PCR 鉴定

冯晓博¹ 凌波¹ 付小花² 王磊² 廖万清^{3*} 姚志荣^{1*}

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院 皮肤科 上海 200092)

(2. 同济大学 环境科学与工程学院 上海 200092)

(3. 第二军医大学附属长征医院 病原真菌分子生物学研究所 上海 200003)

摘要:【目的】建立一种基于格特隐球菌 α 交配型位点内 *SXIIa* 基因和 a 交配型位点内 *SXI2a* 基因的多重 PCR 分析, 用于快速鉴定格特隐球菌的交配型。【方法】设计针对格特隐球菌 α 交配型位点内 *SXIIa* 基因部分片段和格特隐球菌 a 交配型位点内 *SXI2a* 基因部分片段的特异性引物, 用于多重 PCR 鉴定格特隐球菌的交配型; 并与交配试验以及已报道的扩增 α 交配型位点的引物 MF α 、STE12 α , 及扩增 a 交配型位点的引物 STE20a、STE3a 进行扩增效果的比较。【结果】基于 *SXIIa* 基因和 *SXI2a* 基因的多重 PCR 分析, 准确鉴定所有受试格特隐球菌(包括 VGI、VGII、VGIII 和 VGIV 基因型)的交配型, 引物 STE12 α 、STE20a 和 STE3a 在常规 PCR 鉴定中不能鉴定部分菌株的交配型; 66.7% 的受试菌株不能发生交配, 交配试验无法鉴定其交配型。【结论】建立的多重 PCR 方法明显优于常规 PCR 或交配试验鉴定。

关键词: 格特隐球菌, 基因型, 交配型, 聚合酶链式反应

Identification of mating types of *Cryptococcus gattii* by multiplex PCR

FENG Xiao-Bo¹ LING Bo¹ FU Xiao-Hua² WANG Lei² LIAO Wan-Qing^{3*}
YAO Zhi-Rong^{1*}

(1. Department of Dermatology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

(2. School of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

(3. Shanghai Key Laboratory of Molecular Medical Mycology, Shanghai Institute of Medical Mycology, Changzheng Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: [Objective] To establish a multiplex PCR assay on the basis of the *SXIIa* gene located at the mating type α (MAT α) locus and *SXI2a* gene located at the mating type a (MATa) locus for rapid identification of the mating types of *Cryptococcus gattii*. [Methods] The primers specific for the alleles of *SXIIa* gene fragment within the MAT α locus of *Cryptococcus gattii* was designed in

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000549); 上海市科委基金资助项目(No. 10dz2220100); 上海市医学真菌分子生物学重点实验室开放课题(No. 20110001)

*通讯作者: Tel: 86-21-65790000-6428; Fax: 86-21-65030840

✉: 廖万清: liaowanqing@sohu.com; 姚志荣: zryaosmu@sohu.com

收稿日期: 2013-06-14; 接受日期: 2013-07-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

combination with the primers specific for the alleles of *SX12a* gene fragment within the MAT α locus for multiplex PCR analysis of mating types of *Cryptococcus gattii*. The results were compared with those obtained from regular PCR using primers MF α and STE12 α specific for the MAT α locus, and primers STE20 α and STE3 α specific for the MAT α locus reported previously, as well as mating assays. **[Results]** The mating types of all strains including four major genotypes, VGI, VGII, VGIII and VGIV, were successfully identified by multiplex PCR analysis based on the *SX11 α* and *SX12 α* genes. However, the mating types of a part of strains could not be determined by regular PCR assays with primer STE12 α , STE20 α or STE3 α ; the mating types of 66.7% percent of strains involved here could not be determined due to their inability to mate with the tester strains. **[Conclusion]** The multiplex PCR analysis is superior to regular PCR or mating assay reported previously.

Keywords: *Cryptococcus gattii*, Genotype, Mating type, Polymerase chain reaction

格特隐球菌(*Cryptococcus gattii*)是导致人类和动物发生致命感染的病原酵母。格特隐球菌原名新生隐球菌格特变种,是一种带有荚膜的担子菌,在临床中多表现为无性相的酵母。2002年, Kwon-Chung 等根据遗传分类学、生物学和表形学上的差异,将格特变种上升至种的水平,并命名其为格特隐球菌,现已被国际上接受。与新生隐球菌不同,格特隐球菌多感染免疫力正常人群,主要分布于热带和亚热带地区,但近期的研究显示其地理分布区域正在扩大^[1]。分子分型结果显示,其由 VGI、VGII、VGIII 和 VGIV 4 种遗传上相对独立的单源谱系(基因型)构成,且各基因型的地理分布、生物学特性和致病特点存在明显差异^[2]。

1976年, Kwon-Chung 等发现格特隐球菌具有异宗配合的有性阶段,其交配体系中存在 α 和 a 两种交配型(Mating type, MAT),即 MAT α 和 MATa。相对交配型为 α 和 a 的细胞在一定条件下发生交配,并产生重组的担孢子。而担孢子由于其体积小、易于播散和高致病性的特点被认为很可能是起始致病微粒^[3]。目前,格特隐球菌交配型的鉴定多采用 α 、a 交配型特异性引物分别进行 PCR 扩增或进行交配试验,且国外文献报道的常规特异性 PCR 扩增未对格特隐球菌遗传上趋异的 4 种基因型的扩增效果进行系统评价^[2,4]。本文建立了基于 α 和 a 交配型位点内同源结构域基因(*SX11 α* 、*SX12 α*)的多重 PCR 方法用于鉴定格特隐球菌的交配型,并与其它方法的鉴定结果进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 57 株格特隐球菌由美国杜克大学医学中心、比利时热带病研究所、意大利米兰大学卫生与预防医学研究所提供和我国临床标本中分离。其中, VGI 基因型 30 株、VGII 基因型 10 株、VGIII 基因型 10 株、VGIV 基因型 7 株;包括 α 交配型 44 株、a 交配型 13 株;交配型测试株为 NIH312 (VGIII MAT α)和 B4546 (VGIII MATa);菌株类型及数量详见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* 酶、PCR 相关试剂购自北京全式金生物技术有限公司;培养基原料购自 Sigma、Campbell 和国药集团化学试剂有限公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 交配试验: 参照文献[4],将受试格特隐球菌菌株和交配型测试株分别接种于 YPD 斜面培养基,28 °C 培养 48 h 后,取等量分别与交配型测试株 NIH312 (MAT α)、B4546 (MATa)混合接种及单独接种于 V8 蔬菜汁平板培养基(5% V8 蔬菜汁, 0.5 g/L KH₂PO₄, 4%琼脂, pH 7.0)。培养全程在黑暗中进行,保持相对干燥,25 °C 培养 4 周。肉眼观察菌丝的产生,显微镜下观察菌丝、担子和担孢子等交配结构的形成。

1.2.2 DNA 模板制备: 参照 Lin 等^[6]的 CTAB 提取法制备基因组 DNA。

表 1 受试格特隐球菌菌株来源
Table 1 The origin of *Cryptococcus gattii* tested in this study

菌株 Strain	分离地区 Geographic origin	标本来源 Specimens origin	参考文献 Reference
α 交配型 MATα			
VGI	China (10), Australia (4), Vancouver Island (3), Belgium (3), Brazil (2), Congo (1), USA (1)	Clinical (19), Enviromental (3), Animal (2)	[5]
VGII	USA (2), Vancouver Island (2), Brazil (1), Australia (1), China (1), France (1)	Clinical (7), Enviromental (1)	[5]
VGIII	USA (5), Belgium (1)	Clinical (5), Enviromental (1)	[5]
VGIV	Botswana (4), South Africa (1), Italy (1)	Clinical (4), Animal (1), NA (1)	[5]
a 交配型 MATa			
VGI	Australia (6)	Clinical (1), Enviromental (5)	[5]
VGII	Aruba (1), Greece (1)	Clinical (1), Animal (1)	[5]
VGIII	USA (3), Brazil (1)	Clinical (4)	[5]
VGIV	Belgium (1)	Clinical (1)	[5]

注：括号内为菌株数；NA：无资料。

Note: Number of strains is depicted in parentheses; NA: Data are not available.

1.2.3 交配型的常规 PCR 鉴定：采用基于 MAT α 位点内 *STE12 α* 和 *MF α* 基因的引物 *STE12 α F* (5'-CTGAGGAATCTCAAACCAGGGA-3')、*STE12 α R* (5'-CCAGGGCATCTAGAAACA ATCG-3')、*MF α F* (5'-CTTCACTGCCATCTTCACCA-3')、*MF α R* (5'-GACACAAAGGG TCATGCCA-3')；基于 MATa 位点内 *STE20a* 和 *STE3a* 基因的引物 *STE20aF* (5'-ATCCGCCCTCGAGTCAAA-3')、*STE20aR* (5'-TGGCGACCGACTGTAGAT-3')，*STE3aF* (5'-ACCTTTGCGGTTTCATCAAC-3')、*STE3aR* (5'-AAGGTCGCATGGGTAATGAG-3')，分别对受试格特隐球菌菌株的 DNA 模板进行 PCR 扩增，扩增条件参照文献[7-8]。根据是否扩增出目的条带来鉴定交配型。PCR 重复 2 次。

1.2.4 多重 PCR 鉴定交配型：经 ClustalX 2 软件对格特隐球菌 4 种不同基因型间进行多重比对来设计特异性和通用性强的引物，在格特隐球菌 *SXII α* 基因的 1 号外显子上设计正向引物 *SXII α F* (5'-AACGGAACCTCAGAATAGAGTCAC-3')，在 *SXII α* 基因的 2 号外显子上设计反向引物 *SXII α R* (5'-CCCTCCTTCATCGTCAAATAATC-3')，在 *SXII α*

基因 4 号外显子上设计正向引物 *SXI2aF* (5'-CGAGTGCCTCCACCATATCAG-3')和反向引物 *SXI2aR* (5'-TCTGGGGTACAGTTTTGAGCTG-3')。以上 4 条引物加入同一 PCR 体系进行多重 PCR 分析。PCR 反应体系 25 μ L，包含 DNA 模板 40 ng，10 \times Buffer 2.5 μ L，dNTPs 0.2 mmol/L，4 条引物浓度均为 0.2 μ mol/L，*Taq* 酶 2.5 U，ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 5 min；95 $^{\circ}$ C 30 s，53 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 50 s，共 30 个循环；72 $^{\circ}$ C 6 min。PCR 重复次数 2 次。取 5 μ L 扩增产物上样于 1.2% 琼脂糖凝胶，120 V 电泳 20 min，紫外成像系统下摄像。

2 结果与分析

2.1 交配能力检测结果

19 株(33.3%)格特隐球菌可以与 α 或 a 交配型测试株中的其中一种发生交配，从而可鉴定其交配型，其余 38 株格特隐球菌不能与任何一种交配型测试株交配，从而无法鉴定其交配型。其中， α 交配型中发生交配的菌株占 27.3%，a 交配型中发生交配的菌株占 53.8%；发生交配的菌株在 4 种基因型中的比例分别为(表 2)：VGI 基因型(6.7%)、VGII 基因型(70.0%)、VGIII 基因型(80.0%)、VGIV 基因

型(28.6%)。

2.2 交配型的常规 PCR 鉴定结果

在 VGI-VGIV 4 种基因型的 α 交配型中,引物 STE12 α 的鉴定成功率依次为:100%、87.5%、83.3%、100%;引物 MF α 的鉴定成功率为:100%、100%、100%、100%。在 VGI-VGIV 4 种基因型的 a 交配型中,引物 STE20a 的鉴定成功率为:100%、100%、100%、0;引物 STE3a 的鉴定成功率为:0、0、100%、0。所有 4 对引物均未对其相对交配型产生阳性扩增(表 2)。两次 PCR 结果一致。

2.3 多重 PCR 鉴定结果

所有受试格特隐球菌 α 交配型菌株(包括 VGI-VGIV 4 种基因型)经多重 PCR 扩增均获得 520 bp 左右目的片段;所有受试格特隐球菌 a 交配型菌株(包括 VGI-VGIV 4 种基因型)经多重 PCR 扩增均获得 750 bp 左右目的片段;VGI 基因型 α 、a 交配型混合株(WM276 & E566)及 VGII 基因型 α 、a 交配型混合株(R265 & CBS1930)经多重 PCR 扩增均获得 520 bp 和 750 bp 左右的两条目的条带(表 2、图 1)。两次 PCR 结果一致。

表 2 格特隐球菌的交配试验和交配型的 PCR 鉴定结果

Table 2 Results of mating assay and PCR analysis of mating types of *Cryptococcus gattii*

菌株 Strain	交配试验 Mating assay	常规 PCR Single PCR				多重 PCR Multiplex PCR
		STE12 α	MF α	STE20a	STE3a	SXI1 α & SXI2a
α 交配型 MAT α						
VGI	2/24	24/24	24/24	0/24	0/24	24/24 (α)
VGII	5/8	7/8	8/8	0/8	0/8	8/8 (α)
VGIII	4/6	5/6	6/6	0/6	0/6	6/6 (α)
VGIV	1/6	6/6	6/6	0/6	0/6	6/6 (α)
a 交配型 MATa						
VGI	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6	6/6 (a)
VGII	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	2/2 (a)
VGIII	4/4	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4 (a)
VGIV	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1 (a)

注:/前:阳性菌株数;/后:所测菌株数;(α): α 交配型引物扩增阳性;(a):a交配型引物扩增阳性。

Note: Characters in front of /: Number for positive strains; Characters behind /: Number for strains tested; (α): Amplified with α -specific primers; (a): Amplified with a-specific primers.

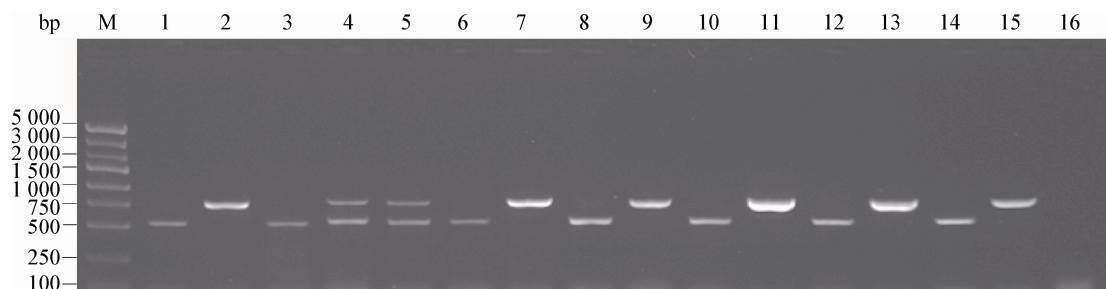


图 1 格特隐球菌交配型的多重 PCR 鉴定结果

Figure 1 The results of multiplex PCR analysis for identification of mating types of *Cryptococcus gattii*

Note: M: DNA marker; 1-15: Strains WM276 (VGI MAT α), E566 (VGI MATa), WM179 (VGI MAT α), WM276 & E566, R265 & CBS1930, R265 (VGII MAT α), CBS1930 (VGII MATa), WM178 (VGII MAT α), CBS10090 (VGII MATa), WM161 (VGIII MAT α), B4546 (VGIII MATa), NIH312 (VGIII MAT α), ATCC32608 (VGIII MATa), WM779 (VGIV MAT α), IHEM14941 (VGIV MATa); 16: Negative control.

3 讨论

以往认为,格特隐球菌的生态小生境与澳洲的桉树有关,格特隐球菌感染的获得多与环境中的桉树有关。然而,1999年至今在加拿大温哥华岛及周边地区暴发的格特隐球菌病引起了人们对这种致病菌的极大关注^[1,3]。环境采样显示,在除桉树以外的较多树种、树根周围泥土、空气及水中分离到格特隐球菌^[1]。格特隐球菌感染主要由宿主从环境中吸入隐球菌的酵母细胞或担孢子引起,而后者正是由有性交配产生^[3]。在环境和临床中, α 交配型占了格特隐球菌分离株的绝大部分,而在少数报道中,环境中也存在较大比例的 a 交配型^[1,4,9-10]。这种特殊的分布是否与毒力差异相关还有待进一步研究证实。有研究报道,在桉树的同一树洞中存在 VGI 基因型的 α 和 a 交配型菌株^[9];另一项研究显示,VGII 基因型的 α 和 a 交配型菌株均可分离自桉树^[10],间接表明两者可以存在于同一生态小生境中。基于以上环境株分离结果,本文将 VGI 基因型、VGII 基因型的 α 和 a 交配型菌株分别混合后提取 DNA,行多重 PCR 鉴定,结果同时获得 α 和 a 交配型的扩增条带,表明该方法可鉴定出环境株中 2 种交配型混合的现象。研究报道,VGII 和 VGIII 基因型多具备交配能力,而 VGI 和 VGIV 基因型则多不具备交配能力^[4,11]。本文的交配试验得出相似结果,印证了不同基因型交配特性上的差异。

研究显示,*SXI1a* 基因为 α 交配型位点内特有,而 *SXI2a* 基因为 a 交配型位点内特有,笔者对 *SXI1a* 和 *SXI2a* 2 对引物在其相对的交配型位点内进行同源性回检,未发现同源序列,而进一步的多重 PCR 在实验中 100% 的特异扩增结果说明了这 2 对引物具有高度的特异性。本文建立的多重 PCR 方法快速、准确地鉴定了受试格特隐球菌(包括所有 4 种基因型)的交配型,而常规 PCR 中部分引物无法鉴定少数菌株的交配型,交配试验更是不能鉴别大部分菌株的交配型。本文的多重 PCR 方法明

显优于常规 PCR 或交配试验,为格特隐球菌的生物学研究提供了一种有效的交配型检测方法。

参 考 文 献

- [1] MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13(1): 42-50.
- [2] Ngamskulrungrroj P, Gilgado F, Faganello J, et al. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties[J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e5862.
- [3] Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak[J]. *Nature*, 2005, 437(7063): 1360-1364.
- [4] Campbell LT, Fraser JA, Nichols CB, et al. Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Australia that retain sexual fecundity[J]. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(8): 1410-1419.
- [5] Feng X, Yao Z, Ren D, et al. Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, 57(Pt12): 1481-1490.
- [6] Lin X, Patel S, Litvintseva AP, et al. Diploids in the *Cryptococcus neoformans* serotype A population homozygous for the alpha mating type originate via unisexual mating[J]. *PLoS Pathogen*, 2009, 5(1): e1000283.
- [7] 冯晓博,姚志荣,凌波,等. 中国致病格特隐球菌的基因亚型分析[J]. *中华皮肤科杂志*, 2009, 42(2): 138-140.
- [8] 冯晓博,姚志荣,凌波,等. 国内110株新生隐球菌临床株变种、基因型和交配型分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(3): 193-197.
- [9] Saul N, Krockenberger M, Carter D. Evidence of recombination in mixed-mating-type and alpha-only populations of *Cryptococcus gattii* sourced from single eucalyptus tree hollows[J]. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(4): 727-734.
- [10] Escando P, Sanchez A, Martinez M, et al. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia[J]. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6(4): 625-635.
- [11] Litvintseva AP, Thakur R, Reller LB, et al. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2005, 192(5): 888-892.