

PCR-SSCP 技术在假丝酵母属菌种鉴别中的应用

宋维娟 程 池*

(中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心 北京 100027)

摘 要: 选取中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)保藏的假丝酵母属的 7 个种 30 株菌, 对其 rDNA 的 ITS1 区及 ITS2 区进行了 PCR-SSCP 指纹图谱分析, 结果表明在假丝酵母属种水平的区分鉴定中, ITS1 区与 ITS2 区的 PCR-SSCP 图谱均能对本研究所选 7 个种的菌株进行显著区分, 比较两个区段的 PCR-SSCP 图谱及鉴别效果, 发现 ITS2 区的应用效果要优于 ITS1 区。

关键词: ITS1, ITS2, PCR-SSCP, 假丝酵母, 鉴别

Differentiation of *Candida* Species by PCR-SSCP Fingerprinting Analysis

SONG Wei-Juan CHENG Chi*

(China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, China Center of Industrial Culture Collection, Beijing 100027, China)

Abstract: Thirty strains of seven *Candida* species from CICC(China Center of Industrial Culture Collection) were studied. The strains were differentiated by ITS1 region PCR-SSCP fingerprinting analysis and ITS2 region PCR-SSCP fingerprinting analysis. Results showed that both ITS1 region and ITS2 region were able to differentiate the seven species of *Candida* clearly. Contrasting the maps and effects on the identification of *Candida* species of ITS1 region with that of ITS2 region, result indicated that on the identification of *Candida* species the application of ITS2 region was better than ITS1 region.

Keywords: Internal transcribed spacer 1, Internal transcribed spacer 2, PCR-SSCP, *Candida*, Differentiation

假丝酵母属(*Candida* Berkhout)是酵母菌中最大的一个属, 包括 163 个种, 约占目前已知酵母菌种数的 1/3^[1]。假丝酵母属菌种应用广泛, 在木糖醇、天然调味料、脂肪酶、单细胞蛋白的生产, 废水处理、水果防腐抑菌中均有应用。鉴于假丝酵母属菌种的经济价值及其在酵母菌中所占的比重, 其分类学研究愈来愈受重视。

近年来, PCR-SSCP(Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism)技术也开

始用于酵母菌的分类研究。PCR-SSCP^[2,3]是聚合酶链式反应与单链DNA非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术相结合的一种用于检测基因突变的方法, 利用不同构象单链DNA在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中泳动速率的差异, 能快速有效地检测出DNA短片段中存在的单核苷酸突变, 随凝胶的胶联度、浓度及DNA片段长度等因素的变化, 会产生不同的分辨率, 现已广泛应用于各种基因多态性的研究。王启明^[4]用rDNA PCR-SSCP技术对担子菌酵母进行了分类

研究;白逢彦等^[5]研究表明,PCR-SSCP分析在表型相近的酵母菌种的鉴别中是一种快速、简便、有效的方法;通过对rDNA序列的大量研究发现,大多酵母菌ITS区(ITS1-5.8S rDNA-ITS2)的变异率要高于26S rDNA D1/D2 区^[6],又有研究表明^[3,7],长度在100 bp~300 bp间的片段更适于SSCP分析。本文选取片段长度在150 bp~300 bp变异率较高的ITS1 区和ITS2 区对假丝酵母属的7个种30株菌进行PCR-SSCP指纹图谱分析,以期对*Candida*属菌株种水平的批量区分鉴定工作提供新的思路并积累基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:本研究选用 CICC 保藏的30株菌株作为研究对象,菌株情况见表1。

1.1.2 培养基:麦芽汁液体培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器:PCR引物由上海生工合成,PCR相关试剂购于上海生工,丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris等均为国产分析纯试剂,PCR仪(MJ MinicyclerTM),离心机(KUBOTA 3500),电泳仪(DYY-8B),制胶器(24EN),凝胶成像仪(D-77WL)等。

表1 供试菌株
Table 1 Test strains of *Candida* sp.

Sample No.	Species	CICC No.	Origins
1	<i>Candida utilis</i>	1767	ATCC 22023
2		1768	ATCC 9226
3		1769	ATCC 9950
4		1314	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing
5	<i>Candida guilliermondii</i>	31346	The factory of Yeast, Shanghai
6		31552	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing
7		1274	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing
8		1945	Institute of Biobotany, Chinese Academy of Sciences, Shanghai
9	<i>Candida shehatae</i>	1951	ATCC 22984
10		1766	ATCC 34887
11		1962	Institute of Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Beijing
12		1658	Institute of Industrial Microbiology, Tianjin
13	<i>Candida maltosa</i>	1659	Institute of Industrial Microbiology, Tianjin
14		31590	Institute of Industrial Microbiology, Tianjin
15		31591	Institute of Industrial Microbiology, Tianjin
16		1956	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing
17	<i>Candida tropicalis</i>	1253	Institute of Industry, Shanghai
18		1254	Institute of Industry, Shanghai
19		1316	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing
20		1318	Paper Research Institute of the light industry Ministry
21		1403	Paper Research Institute of the light industry Ministry
22		1407	Jiang Men Chemical Plant of Sugar and Cane, Guangdong province
23		1426	Institute of Fermentation Industry, First Ministry of light industry
24		1655	Jiang Men Chemical Plant of Sugar and Cane, Guangdong province
25	<i>Candida parapsilosis</i>	1729	Buttery of the first light industry, Guangdong province
26		1627	The factory of Yeast, Shanghai
27		31253	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing
28		31271	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing
29	<i>Candida lipolytica</i> /Y. <i>lipolytica</i>	31861	Institute of light industry, Hunan province
30		1440	China Center of Industrial Culture Collection

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组DNA的提取参照白逢彦等^[8]基因组DNA提取方法进行。

1.3 ITS1 区与 ITS2 区的扩增

ITS1 区与ITS2 区扩增的通用引物^[9]及扩增程序见表 2。

ITS1 区、ITS2 区的 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 电泳条带清晰且无杂带的用于 SSCP 分析, PCR 产物-20℃ 储藏备用。

1.4 SSCP 分析

1.4.1 单链样品的制备: 参照Feng-Yan Bai等^[5]的方法, 略有改进。向 3 μL PCR产物中加 2 μL ddH₂O, 然后加入 5 μL变性剂, 95℃变性 10 min, 迅速置于冰上 15 min, 得到大部分为单链的产物, 用于SSCP 分析。

1.4.2 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳: 制备 8%的凝胶(40%丙稀酰胺/甲叉双丙稀酰胺母液(37.5:1, V/V) 8 mL, 10×TBE 缓冲液 4 mL, 100%甘油 2 mL, TEMED 40 μL, 10%过硫酸铵 400 μL, 蒸馏水

25.56 mL, 胶板大小\ 100 mm×130 mm×1.0 mm), 放置 1 h 待凝后进行电泳。将电泳缓冲液 1×TBE 预冷至 8℃, 变性后的 PCR 样品依次加入点样孔中, 上样量 2.5 μL, 200 V 电泳 10 min, 后 120 V 电泳 4 h~5 h, 电泳温度 8℃。

1.4.3 银染: 参照Wallace^[10]的方法并加以改进。具体步骤如下: 电泳后将凝胶从玻璃板上剥离, 置于白瓷盘中, 加入 300 mL 10%乙醇固定 5 min; 倒掉乙醇, 加入 300 mL 0.5%冰醋酸固定 5 min; 倒掉冰醋酸, 加入 300 mL 0.1%硝酸银, 在转速为 100 r/min 的振荡器上放置 15 min; 倒掉硝酸银溶液, 用 300 mL 蒸馏水漂洗一次; 加入 300 mL 1.5%氢氧化钠和 450 μL 甲醛进行显色, 2 min~5 min 后, 棕色带型出现, 显色适度后, 立即倒掉显色液, 用蒸馏水洗 2 次, 加入 300 mL 0.75%碳酸钠, 放置 15 min, 以终止反应。

2 结果

2.1 ITS1 PCR-SSCP 分析结果

图 1 中 1A 与 1B 显示了假丝酵母属 7 个种 30

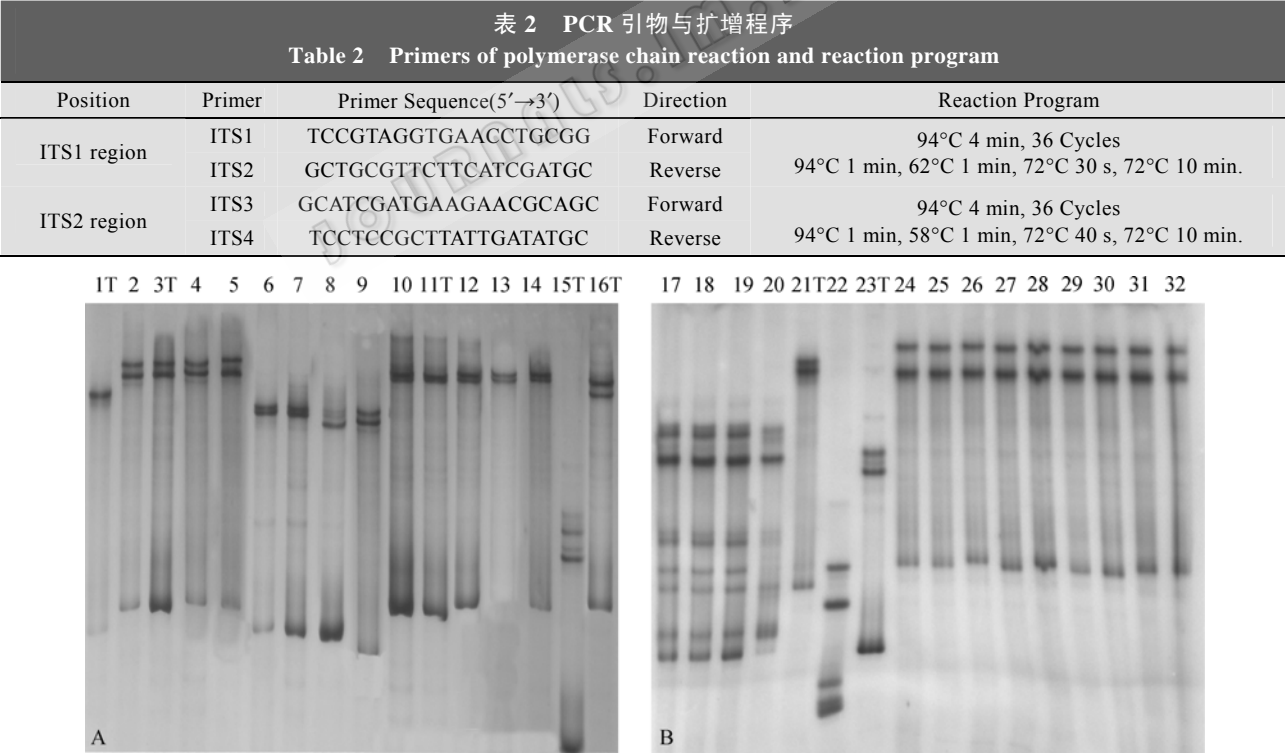


图 1 ITS1 PCR-SSCP 指纹图谱

Fig. 1 SSCP patterns of ITS1 region from type or authentic strains of seven *Candida* species

Note: A: 1: *C. maltosa* (CICC 1962); 2~5: *C. utilis* (*P. jadinii*) (CICC 1768, CICC 1767, CICC 1769 and CICC 1314, respectively); 6~9: *C. parapsilosis* (CICC 31271, CICC 31861, CICC 1627 and CICC 31253, respectively); 10~14: *C. guilliermondii* (CICC 1951, CICC 1945, CICC 1274, CICC 31552 and CICC 31346, respectively); 15: *C. tropicalis* (CICC 1956); 16: *C. shehatae* (CICC 1766); B: 17~21: *C. maltosa* (CICC 31591, CICC 31590, CICC 1659, CICC 1658 and CICC 1962, respectively); 22: *C. lipolytica* (*Y. lipolytica*) (CICC 1440); 23~32: *C. tropicalis* (CICC 1956, CICC 1729, CICC 1655, CICC 1426, CICC 1407, CICC 1403, CICC 1318, CICC 1316, CICC 1254 and CICC 1253, respectively); T was instead of type strain.

菌株的 ITS1 区的 PCR-SSCP 指纹图谱。从图 1A 看出假丝酵母属 6 个种间的带型存在明显差异; 同种内带型相似, 但不完全相同; 如图 1A 所示, *C. parapsilosis*(6~9)中, 6 与 7 带型相同, 8 与 9 带型相同, 而两种带型间存在差异; *C. utilis*(2~5)与 *C. guilliermondii*(10~14)同种内菌株的带型不存在显著差异。图 1B 中, *C. maltosa*(17~21)与 *C. tropicalis*(23~32)及 *C. lipolytica*(22)菌株间的带型存在显著差异; 在 *C. maltosa* 菌株的带型中模式菌株(21T)带型与其它 4 株菌的带型及带的位置均有不同(17~20 带型相同); 在 *C. tropicalis* 菌株的带型中模式菌株(23T)带型与其他 9 株菌的带型相似、带的位置显著不同。图 1A 与图 1B 中都有部分菌株的单链条带多于 2 条的现象(图 1A: 8、9、15, 图 1B: 17、18、19、20)。图 1A 与图 1B 中, ITS1 区 PCR-SSCP 指纹图谱可将所选假丝酵母属的 7 个种区分开, 有 2 个种的模式菌株与同种内其它菌株带间存在显著差异, 1 个种内菌株间带型略有差异。

2.2 ITS2 PCR-SSCP 分析结果

图 2 中 A 与 B 展示了假丝酵母属 7 个种 30 株菌的 ITS2 区的 PCR-SSCP 指纹图谱。从图 2A 中可以看出 6 个种的电泳谱带存在明显差异, 同种内菌株间不存在明显差异; *C. parapsilosis*(1~4)4 个菌株的带型相同; *C. guilliermondii*(6~10)5 个菌株的带型

基本相同, *C. utilis*(11~14)4 个菌株的带型相同。图 2B 中, *C. tropicalis*(17~25)、*C. maltosa*(27~32)及 *C. lipolytica*(26)3 个种菌株的带型存在显著差异; 在 *C. tropicalis* 菌株的带型中模式菌株(25T)带型与其它 8 株菌的带型相似、而带的位置显著不同, 其它 8 株菌带型基本相同; 在 *C. maltosa* 菌株的带型中模式菌株(32T)带型与其它 4 个菌株的带型及带的位置均存在显著差异(27~31 带型相同), 前两条单链与其他 4 株菌相同。在图 2A 与 2B 中, 亦存在部分菌株的单链条带多于 2 条的现象(图 2A: 1~4 及 15, 图 2B: 17~25 及 32)。综合以上实验结果, ITS2 区 PCR-SSCP 可将所选假丝酵母属的 7 个种区分开, 有两个种的模式菌株与同种内其它菌株带间存在显著差异。

3 讨论

本文研究了 ITS1 区与 ITS2 区 PCR-SSCP 技术在 *Candida* 属种水平区分鉴定中的应用, 结果表明: 1) ITS1 区与 ITS2 区的 PCR-SSCP 指纹图谱均能将本研究的 7 个种区分开, 同种菌株间一般无明显差异; 2) 在 *Candida* 属种水平的区分鉴定中, ITS2 区 PCR-SSCP 图谱中同种内菌株带型存在差异的现象比 ITS1 区少, 故 ITS2 区的应用效果要好于 ITS1 区, 这可能由于大部分种的 ITS2 区长度较 ITS1 区短, 且碱基变异率较 ITS1 区低^[11]; 3) ITS1 区及 ITS2 区

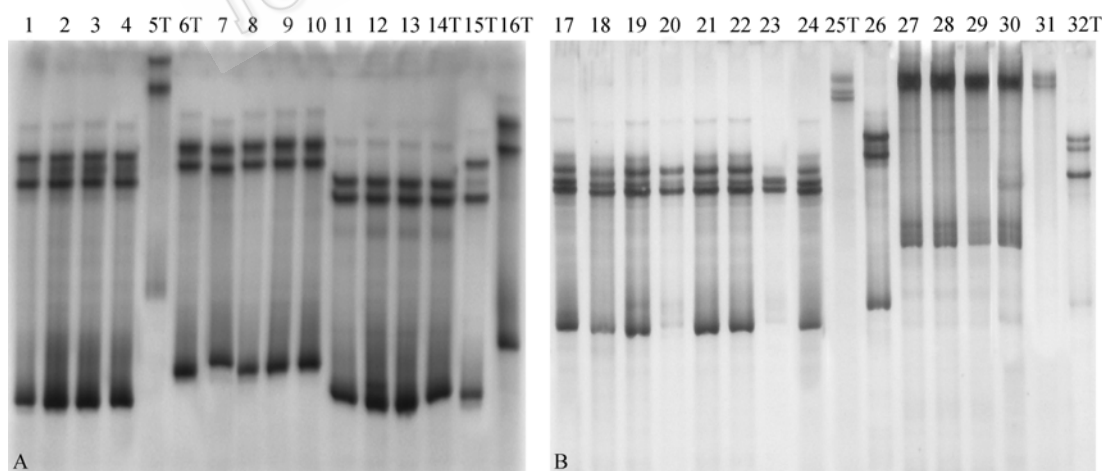


图 2 ITS2 PCR-SSCP 指纹图谱

Fig. 2 SSCP patterns of ITS2 region from type or authentic strains of seven *Candida* species

Note: A: 1~4: *C. parapsilosis* (CICC 1627, CICC 31861, CICC 31271 and CICC 31253, respectively); 5: *C. tropicalis* (CICC 1956); 6~10: *C. guilliermondii* (CICC 1945, CICC 1951, CICC 1274, CICC 31552 and CICC 31346 respectively); 11~14: *C. utilis* (*P. jadinii*) (CICC 1314, CICC 1769, CICC 1768 and CICC 1767, respectively); 15: *C. maltosa* (CICC 1962); 16: *C. shehatae* (CICC 1766); B: 17~25: *C. tropicalis* (CICC 1729, CICC 1254, CICC 1316, CICC 1407, CICC 1403, CICC 1318, CICC 1655, CICC 1956, CICC 1426, respectively); 26: *C. lipolytica* (*Y. lipolytica*) (CICC 1440); 27~32: *C. maltosa* (CICC 31590, CICC 31590, CICC 1659, CICC 31591, CICC 1658 and CICC 1962, respectively); T was instead of type strain.

序列分析发现(数据未列出), 一般情况下, ITS1 区及 ITS2 区碱基差异为: 种间均高于 10% (>15 bp), 种内一般不高于 1% (<3 bp); 结合实验结果可知, 本实验条件对小于 3 bp 的碱基差异不能检出。

实验发现: *C. tropicalis* 与 *C. maltosa* 模式菌株带的位置与其相应种其它菌株带的位置存在显著差异, 可能是由模式菌株与其它菌株的碱基差异或长度差异所致, 具体原因需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kurtzman CP. The yeasts, a taxonomic study. Holland: Elsevier, 1998, pp.454–475.
- [2] 桂 芳, 张卓然. PCR-SSCP 技术及其在微生物学研究中的应用. 微生物学杂志, 2005, 1(25): 89–93.
- [3] Orita M, H Iwahana, H Kanazawa, *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86: 2766–2770.
- [4] 王启明. 中国担子菌酵母的分类与分子系统学研究. 中科院微生物所博士学位论文, 2004.
- [5] Qi-Ming Wang, Juan Li, Feng-Yan Bai, *et al.* Rapid differentiation of phenotypically similar yeast species by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 5: 2604–2611.
- [6] Scoretti G, Fell JW, Fonseca A, *et al.* Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res*, 2002, 2: 495–517.
- [7] Masato Orita, Youichi Suzuki, Takao Sekiya, *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5: 874–879.
- [8] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统, 2002, 21(1): 27–32.
- [9] Manish Kumar, Shukla PK. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of Mycotic Keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(2): 662–668.
- [10] Wallace AJ. SSCP/Heteroduplex analysis in PCR mutation detection protocols. *Methods in molecular biology*, 2000, 187: 151–163.
- [11] Leaw SN, Barton R, Chang SC, *et al.* Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 3: 693–699.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(°C 和 % 除外), 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3°C~5°C 不可写成 3~5°C; 3%~6% 不可写成 3~6% 等。