

HIV 相关性口腔念珠菌 RAPD 多态性分析

武有聪 白 丽* 袁有华 郭利军

(大理学院基础医学院医学微生物学及免疫学教研室 云南 大理 671000)

摘 要: 运用 RAPD 技术对 60 株分离自 HIV 感染者口腔的念珠菌进行分析, 其中 P2 随机引物扩增条带数量 0~5 条, 大小 300 bp~2 kb, 白色念珠菌以 300 bp、400 bp 和 600 bp 3 个主条带为主, 非白色念珠菌也存在类似条带。采用 SPSS13.0 聚类分析, 分为 5 个基因群, 14 个基因型, 白色念珠菌主要为 B 群。其中 P385 和 P403 对 5-氟胞嘧啶耐药, 聚为 C1 基因型(欧氏距离平方为 0.115), P321 和 P522 对两性霉素 B 耐药, 聚为 D1 基因型(欧氏距离平方为 0.221)。表明 HIV 感染者口腔来源的念珠菌存在丰富的基因多态性, RAPD 技术对于白色念珠菌的基因型鉴定具有重要意义; 念珠菌不同种间具有相对特征性的条带, 同种不同株间存在相似的条带特征; 某些条带特征可能与念珠菌的耐药性相关。

关键词: 基因多态性, 药物敏感性, 念珠菌, 人类免疫缺陷病毒

Analysis on RAPD Genetic Polymorphism of HIV Related Oral *Candida* Species

WU You-Cong BAI Li* YUAN You-Hua Guo Li-Jun

(Department of Medical Microbiology & Immunology, School of Basic Medicine, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: 60 *Candida* strains were analyzed with randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) from HIV-infected patients' oral cavity. The results showed that RAPD-PCR fingerprinting appeared from zero to five bands whose size rang from 300 bp to 2 kb with P2 primer, *Candida albicans* have three characteristic bands of 300 bp, 400 bp and 600 bp in size, non-*Candida albicans* have the similar bands. They can be classified five genetic clusters and 14 genotypes by Cluster Analysis, two *Candida albicans*(P385&P403) with fluorocytosine-resistance were classified into C1 genotype for "Squared Euclidean Distance" being 0.115, one *Candida albicans*(P321) and one *Candida glabrata*(P522) who were resistant against Amphotericin B were classified into D1 genotype for "Squared Euclidean Distance" being 0.221. So, an abundant genetic polymorphism appeared in *Candida* species related HIV, RAPD could be as a reference for genotype of *Candida albicans*; different *Candida* speices had some special bands, different *Candida* strains had similar bands in the same species; it is perhaps that some genotypes were relevant to drug resistance.

Keywords: Genetic polymorphism, Susceptibility, *Candida albicans*, HIV

近年来由各种原因(如 HIV 感染和肿瘤)导致的真菌病发病率愈来愈高,其中主要是念珠菌病^[1,2]。随着广谱抗真菌药物的广泛使用,念珠菌的耐药现象也日益严重。运用分子生物学技术,从基因水平反应出不同菌株的基因型特点,揭示不同菌株药物敏感性的分子差异,有利于判断是否发生了再感染或复发感染,追查感染的来源,对念珠菌病的诊断及流行病学调查具有重要意义。目前,从分子水平对各种念珠菌的鉴定不清楚,念珠菌耐药的分子机制不清楚,基因型与耐药表型的关系更是知之甚少^[3,4]。本文采用随机扩增多态性 DNA (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)分型方法对 60 株分离自 HIV 感染者口腔的念珠菌进行基因多态性研究,结合文献[5]中念珠菌对临床常用抗真菌药物的敏感性,探讨念珠菌 RAPD 多态性与念珠菌的鉴定和药物敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

分离自云南某地区 HIV 感染者,经形态染色、培养特性、芽管形成实验、假菌丝及厚膜孢子形成实验、YBC 酵母鉴定卡及 CHROMagar 培养基培养综合鉴定,其中包括 52 株白色念珠菌[*Candida*(*C.*) *albicans*], 3 株都柏林念珠菌(*C. dubliniensis*), 2 株光滑念珠菌(*C. glabrata*)、2 株季也蒙念珠菌(*C. guilliermondii*)和 1 株无名念珠菌(*C. famata*)。

1.2 主要试剂

DNA 扩增试剂盒, 100 bp DNA Marker, 随机引物参照文献[6-8]进行设计: P1 (5'-TCACCACGGT-3'), P2 (5'-CCAGATGCAC-3'), P3 (5'-AGTCAGC CAC-3')和 P4 (5'-TGGTCGCGGC-3')(HAP 方法纯化),均购自上海生工。

1.3 念珠菌 DNA 的提取

参照文献[9],受试菌株经 YPD 培养基两次激活后,取适量菌落调细胞浓度为 10^9 CFU/mL,离心后加入 0.5 mL 0.25 mol/L Tris(pH 8.0)-1.5%SDS 裂解液,煮沸 30 min,等体积酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V/V)抽提,加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和 2.2 倍体积的无水乙醇沉淀,洗涤后干燥,用 30 μ L Tris-EDTA(pH 7.6)溶解 DNA,紫外分析仪测

定 OD_{260}/OD_{280} 的比值,估计 DNA 的浓度和纯度,比值在 1.8~2.1 之间较理想, -20℃ 保存备用。

1.4 RAPD-PCR

反应条件参照文献[7](有改动)。总反应体积为 25 μ L, 1 μ L 模板 DNA(100 ng/ μ L~1000 ng/ μ L), dNTPs 2.5 μ L(2 mmol/L), *Taq* 酶 0.2 μ L(5 U/ μ L), 随机引物 2.5 μ L(10 μ mol/L), 10×PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L(25 mmol/L), 用去离子水补至 25 μ L。PCR 循环: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 45 个循环; 72℃ 退火 7 min。

1.5 电泳和分析

PCR 产物用 1.5%的琼脂糖(含 0.5 μ g/mL EB), 1 × TAE 缓冲液中电泳(2 V/cm~5 V/cm), 凝胶成像系统照相分析, 确定条带的大小。试验重复 2 次, 根据条带的有无、数量、碱基对大小建立数据库, 用 SPSS13.0 统计软件进行聚类分析。

2 结果

2.1 RAPD-PCR 扩增结果

在选择 4 条随机扩增引物中(P1~P4), 发现引物 P2 产生的条带数量最多, 带型更清楚, 结果稳定, 选取 P2 用作 60 株念珠菌 DNA 扩增。扩增条带数量 0~5 条, 条带大小在 300 bp~2 kb 之间, 65%的菌株具有约 300 bp 条带, 41.7%的菌株具有约 400 bp 条带, 90%的菌株具有约 600 bp 条带, 40%的菌株同时具有上述 3 种条带。少数菌株具有某些特殊条带, 如 350 bp、450 bp 和 650 bp 条带, 见表 1。

2.2 聚类分析

不同念珠菌其 RAPD 图谱不同, 以条带的有无、数量及大小作为数值分类指标, 如有条带记为 1, 无条带记为 0; 有 1 条带的记为 1, 有 2 条带的记为 2, 以此类推; 用 1 表示 300 bp 条带, 2 表示 400 bp 条带, 3 表示 600 bp 条带等等。采用 SPSS13.0 统计软件, 组间连接进行聚类分析(运用 Pearson correlation 法和 Z scores 标准化法), 绘制树状图(见图 1)。从图可以看出, 将 60 株念珠菌分为 2 类、4 类或 5 类时, 类间距离比较大, 各类的特点比较突出, 分为 6 类以上时, 有些类间区别不很明显。我们根据专业知识, 在 λ 值约为 13 处将 60 株念珠菌分为

表 1 60 株 HIV 相关性口腔念珠菌 RAPD-PCR 条带特征及其与念珠菌表型和药物敏感性的关系
Table 1 Banding characteristics of RAPD-PCR of 60 *C. species* related to HIV and relationship between polymorphism, phenotype and drug resistance

基因群 Genetic cluster	基因型 Genotype	RAPD-PCR 扩增条带特点 Banding characteristics of randomly amplified polymorphic DNA	念珠菌菌种(株数) Candida species(Num. of strains)	各种基因型与耐药性的菌株分布 Strains distribution of different genotypes and resistance
A	A1	有 4 条带, 大小约 550 bp、600 bp、1.3 kb 和 1.4 kb	季也蒙念珠菌 <i>C. guilliermondii</i> (2)	P414, P432
	A2	有 4 条带, 大小约 600 bp、650 bp、1.3 kb 和 1.4 kb	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (4)	P418, P473, P435, P416
B	B1	有 1 条带, 大小约 600 bp	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (10)	PP12, PP15, P229, P582, PP11, P507, P537, P452, P453, P447
	B2	有 2 条带, 大小约 300 bp 和 600 bp	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (9) 都柏林念珠菌 <i>C. dubliniensis</i> (2)	PP06, P110, P590, PP01, P557, P581, P449, P556, P399, PP17, P176
	B3	有 3 条带, 大小约 300 bp、450 bp 和 600 bp	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (1)	P155
	B4	有 4 条带, 大小约 300 bp、400 bp、500 bp 和 600 bp	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (5)	P134, P530, P13, P37, P131
	B5	有 3 条带, 大小约 300 bp、400 bp 和 600 bp	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (17)	P461, P534, P31, P445, P457, P405, P178, P311, P331, P10, P193, P136, P179, P121, P126, P75, P90
	B6	有 4 条带, 大小约 300 bp、400 bp、600 bp 和 650 bp	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (1)	P152
	B7	有 4 条带, 大小约 300 bp、400 bp、550 bp 和 600 bp	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (1)	P117
	B8	有 3 条带, 大小约 400 bp、600 bp 和 700 bp	光滑念珠菌 <i>C. glabrata</i> (1)	P45
C	C1	仅有 1 条约 550 bp 条带; 或者有 2 条大小约 300 bp、550 bp 条带	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (2)	P385 , P403
	C2	仅有 1 条约 650 bp 条带; 或者无条带	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (1) 都柏林念珠菌 <i>C. dubliniensis</i> (1)	P379 P185
D	D1	有 5 条带, 大小约 350 bp、500 bp、650 bp、1.2 kb 和大于 1.5 kb; 或大小约 300 bp、350 bp、500 bp、650 bp 和 1.2 kb	白色念珠菌 <i>C. albicans</i> (1) 光滑念珠菌 <i>C. glabrata</i> (1)	P321 P522
E	E1	有 4 条带, 大小约 300 bp、650 bp、1 kb 和大于 1.5 kb	无名念珠菌 <i>C. famata</i> (1)	P409

注: Δ: 为氟康唑耐药株; : 为酮康唑耐药株; : 为两性霉素 B 耐药株; : 为 5-氟胞嘧啶耐药。

Note: Δ: Indicates fluconazole-resistant strains; : For ketoconazole-resistant strains; : For amphotericin B-resistant strains; : For fluorocytosine-resistant strains.

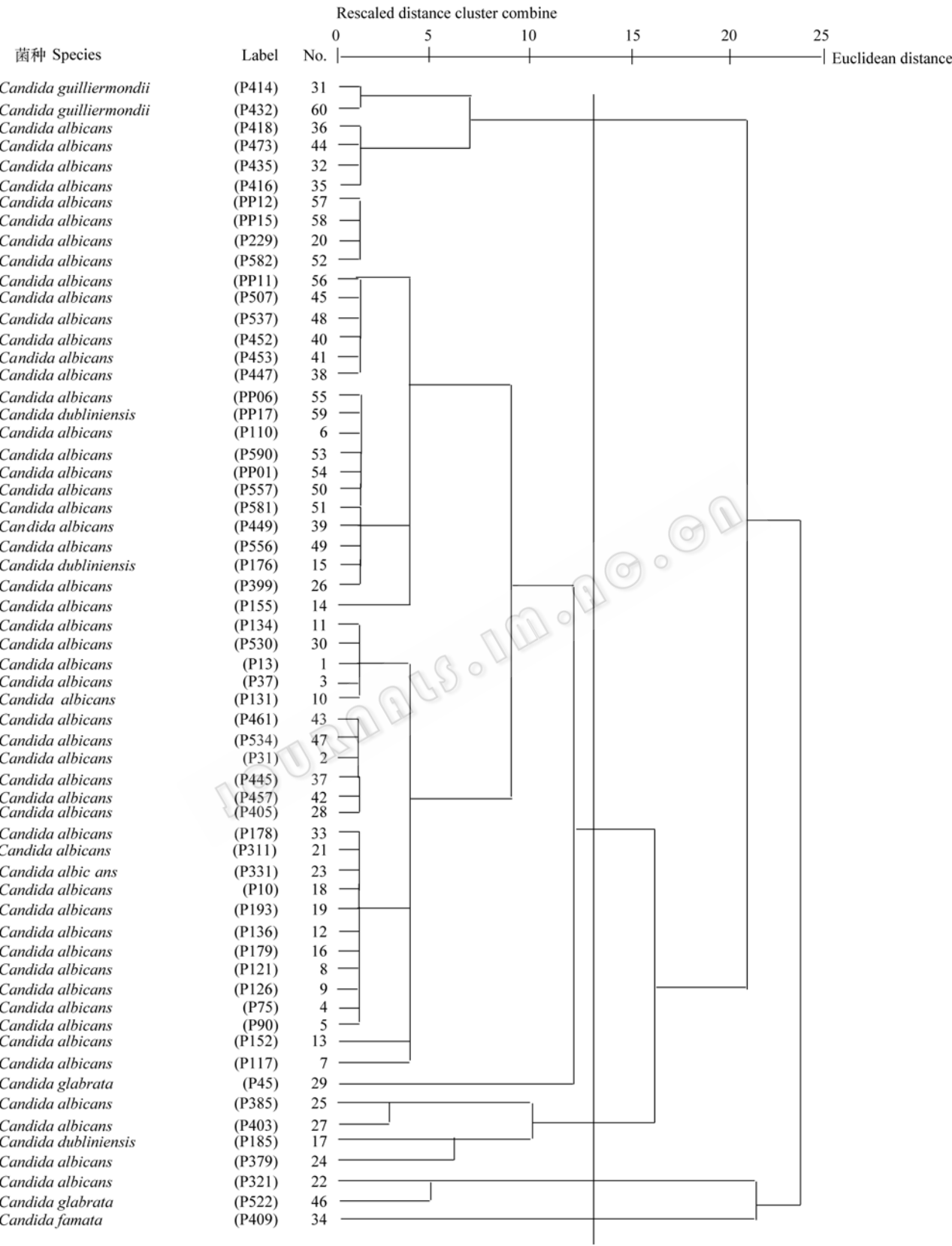


图 1 60 株 HIV 相关性口腔念珠菌 RAPD-PCR 聚类分析树图

Fig. 1 Cluster dendrogram of 60 *Candida* species related to HIV by RAPD-PCR

A~E 5 个基因群, 每个基因群中有不同的基因型, 按树状图上顺序依次命名, 见表 1。

2.3 各种念珠菌 RAPD-PCR 图谱特征

52 株白色念珠菌中主要聚为 B 基因群(A、C 和 D 基因群中有少量分布), 分为 11 个基因型, 其中 B5 基因型中分布最多(占 32.7%), 具有 300 bp, 400 bp 和 600 bp 三种特征性条带(图 2a), 其次是

B1 基因型(占 19.2%), 仅有 1 条大小约 600 bp 条带(图 2b), B2 基因型(占 17.3%), 具有 300 bp 和 600 bp 2 种特征性条带(图 2c), 有的白色念珠菌在上述 3 种条带的基础上多了 1 条约 500 bp 条带, 即 B4 基因型(图 2d), 78.8% 的白色念珠菌以这 4 种基因型为主, 这 4 种基因型可能是白色念珠菌以 P2 为引物的特征性条带。另外, 有 4 株白色念珠菌具有

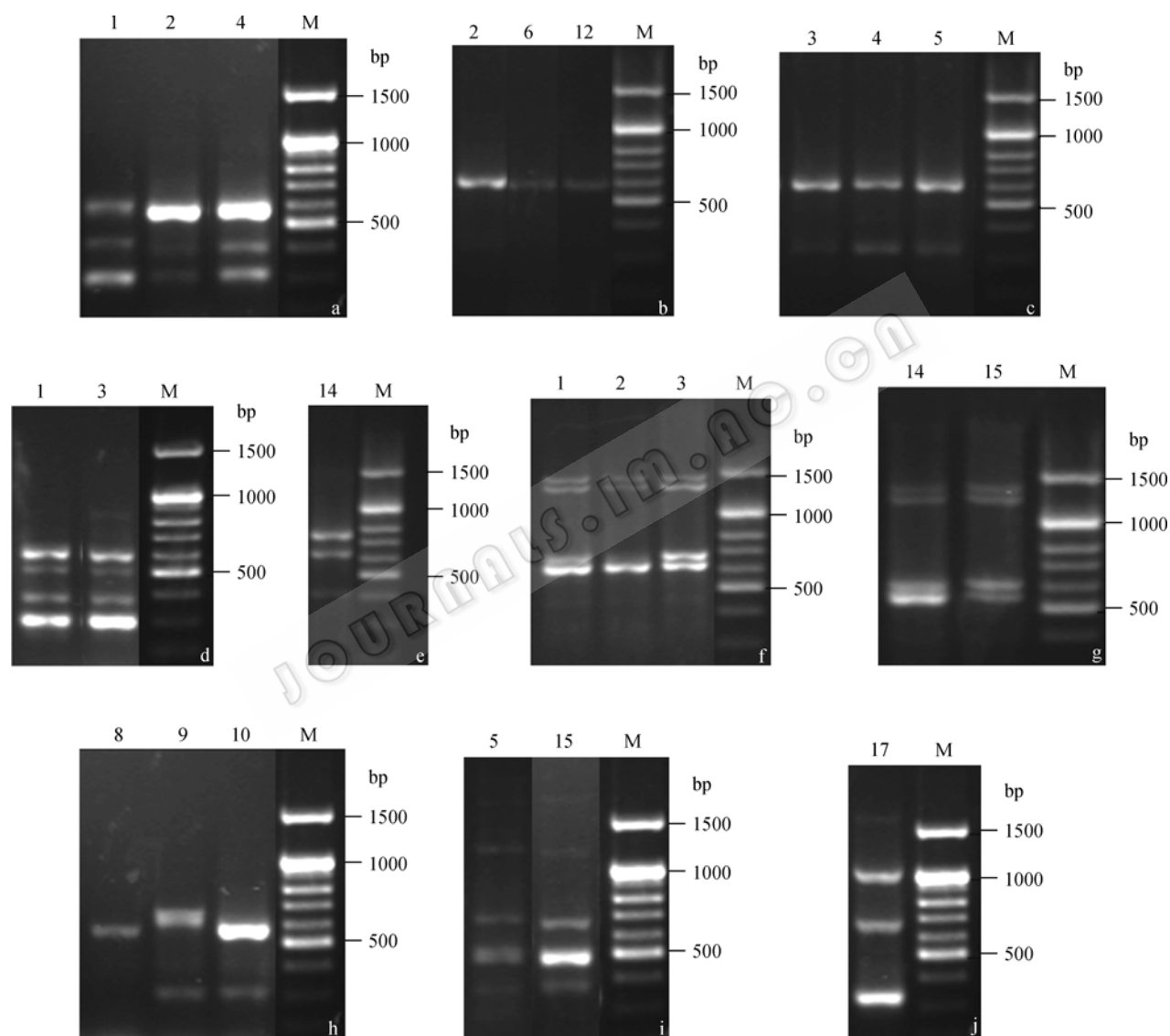


图 2 P2 引物 RAPD-PCR 条带特征模式

Fig. 2 Randomly amplified polymorphic DNA banding pattern with the primer P2

注: a: *C. albicans* B5 基因型; b: *C. albicans* B1 基因型; c: *C. albicans* or *C. dubliniensis* B2 基因型; d: *C. albicans* B4 基因型; e: *C. glabrata* B8 基因型; f: *C. albicans* A2 基因型; g: *C. guilliermondii* A1 基因型; h: *C. albicans* C1 基因型; i: *C. glabrata* 和 *C. albicans* D1 基因型; j: *C. famata* E1 基因型。

Note: a: B5 genotype of *C. albicans*; b: B1 genotype of *C. albicans*; c: B2 genotype of *C. albicans*; d: B4 genotype of *C. albicans*; e: B8 genotype of *C. glabrata*; f: A2 genotype of *C. albicans*; g: A1 genotype of *C. guilliermondii*; h: C1 genotype of *C. albicans*; i: D1 genotype of *C. glabrata* & *C. albicans*; j: E1 genotype of *C. famata*.

600 bp、650 bp、1.3 kb 和 1.4 kb 四种条带, 聚为 A2 基因型(图 2f), 与季也蒙念珠菌具有相似的条带特征; 3 株都柏林念珠菌中 1 株无扩增条带, 另 2 株与白色念珠菌 B2 基因型具有相同的条带特征; 2 株季也蒙念珠菌具有 550 bp、600 bp、1.3 kb 和 1.4 kb 四种条带, 聚为 A1 基因型(图 2g); 2 株光滑念珠菌分别聚入 B8 和 D1 基因型; 1 株无名念珠菌为 E1 基因型(图 2j)。

2.4 念珠菌 RAPD-PCR 多态性与耐药性的关系

60 株念珠菌中, 有 2 株白色念珠菌(P385 和 P403)对 5-氟胞嘧啶耐药, 它们的 RAPD-PCR 图上均含有约 550 bp 大小的条带, 不同于其它白色念珠菌常见的条带, 通过聚类分析欧氏距离平方为 0.115, 相似性较高, 归入 C1 基因型(图 2h)。同样, 有 1 株白色念珠菌(P321)和 1 株光滑念珠菌(P522)对两性霉素 B 耐药, RAPD-PCR 图上均含有 350 bp、650 bp 和大于 1 kb 的条带, 两菌株间欧氏距离平方为 0.221, 聚为 D1 基因型(图 2i)。推测 C1 基因型和 D1 基因型与念珠菌的耐药性相关。

3 讨论

HIV/AIDS 病人最易合并感染的真菌是白色念珠菌, 随着新型医疗技术和各种药物的广泛使用, 念珠菌的感染及耐药现象在真菌中的地位也越来越重要, HIV/AIDS 病人并发的念珠菌病已成为人类健康的一大威胁^[10]。从本质上说, 耐药的念珠菌在分子水平上是有差异的, 因此, 对念珠菌耐药的分子机制研究成为热点内容。RAPD 除了具有快速、简便、分辨力高、可大规模开展等优点外, 其显著特点是不需要预先知道模板基因信息即可进行多态性分析, 反应菌株基因水平上的差异。根据扩增的 PCR 指纹图的多态性, 转化为数值性数据, 建立数据库进行数值型分类, 计算相似系数或距离值(两者呈反比关系), 并比较耐药性相关的基因型, 以探讨念珠菌基因型与表型鉴定和耐药性之间的关系。

尽管不同的引物扩增产生的条带在数量和大小上不尽相同, 但都显示出一个共同特征: 白色念珠菌和非白色念珠菌都存在各自相对特异性的带型, 但这种差异尚不能完全将念珠菌鉴定到种。有的白色念珠菌不具有白色念珠菌的典型带型特征(如

P152、P117 等), 有的非白色念珠菌具有白色念珠菌相同或相似的带型特征(如 P176、PP17、P45 等), 这与国内外文献报道的相似。以 P2 为引物的扩增条带, 经聚类分析, 把耐药的念珠菌都聚为一个基因型, 如耐 5-氟胞嘧啶的白色念珠菌 P385 和 P403 聚为 C1 型, 耐两性霉素 B 的白色念珠菌 P321 和光滑念珠菌 P522 聚为 D1 型, 它们都具有其它菌株不常见的特殊条带, 具有较高的相似性。在排除基因片段插入错误和缺失的情况下, 有理由相信这些特殊条带的产生是由耐药性引起的。但确凿的证据尚需测序比对, 寻找到耐药基因, 克隆表达后用药物敏感性试验证明。有的学者^[11]采用 RAPD 对 16 株白色念珠菌菌丝相基因组 DNA 进行扩增, 发现对氟康唑耐药的白色念珠菌 RAPD 图谱较敏感株 RAPD 图谱多了 1 条约 450 bp 条带。由此可见, RAPD 多态性可作为念珠菌分子生物学分型鉴定的重要依据(还应结合表型特征综合鉴定), 亦是念珠菌耐药机制研究的重要思路。

参考文献

- [1] Lu JJ, Lee SY, Chiueh TS. *In vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida* blood isolates and evaluation of the E-test method. *Journal of microbiology, immunology, infection*, 2004, **37**(6): 335–342.
- [2] 陈翠珠, 徐英春, 王 澎, 等. 1557 株酵母菌的鉴定及其药敏试验分析. *中国真菌学杂志*, 2006, **1**(3): 134–138.
- [3] Barada G, Basma R, Khalaf RA. Microsatellite DNA identification and genotyping of *Candida albicans* from Lebanese clinical isolates. *Mycopathologia*, 2008, **165**(3): 115–125.
- [4] Tacconelli E, Bertagnolio S, Posteraro B, *et al.* Azole susceptibility patterns and genetic relationship among oral *Candida* strains isolated in the era of highly active anti-retroviral therapy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 2002, **31**(1): 115–125.
- [5] 武有聪, 白 丽, 袁有华, 等. 人类免疫缺陷病毒相关性口腔念珠菌的药物敏感性分析. *中国新药与临床杂志*, 2008, **27**(9): 682–685.
- [6] 钱 骏, 查国章, 余 平. 白色念珠菌的耐药性和随机扩增 DNA 多态性分型研究. *湖南医科大学学报*, 2000, **25**(4): 327–330.
- [7] Robert F, Lebreton F, Bougnoux ME. Use of randomly

- amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, **33**(9): 2366–2371.
- [8] Xu J, Ramos AR, Vilgalys R, *et al.* Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, **38**(3): 1214–1220.
- [9] Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, *et al.* Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, **31**(2): 463–464.
- [10] Patel M, Shackleton JT, Coogan MM. Effect of antifungal treatment on the prevalence of yeasts in HIV-infected subjects. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, **55**(Pt 9): 1279–1284.
- [11] 金 艳, 张 宏, 乔建军. 白色念珠菌耐药性与 DNA 多态性关系的研究. *中国皮肤性病学杂志*, 2004, **18**(9): 516–517.

编辑部公告

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐 号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武 文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>