

新生隐球菌交配型分析试验方法和培养基的研究*

李安生 吕桂霞 沈永年 陈 伟 吴绍熙

(中国医学科学院皮肤病研究所 南京 210042)

摘 要: 比较观察了 Hay agar (HA)、Mating agar (MA)、Hay cube agar (HCA)、稻壳琼脂 (RSA)、富营养 Hay agar (IHA) 以及沙保弱培养基 (SDA) 6 种培养基的新生隐球菌交配试验效果。按 2 周内产生阳性结果排列培养基的次序是 HCA (95%)、RSA (95%)、HA (86%)、MA (38%)、SDA (38%) 和 IHA (24%)。采用点状可以替代划线接种方法用于处理大批量标本并节省材料。此外, 先将诱导菌株和受试菌株混合预培养可以使原方法不能交配的菌株产生阳性结果。

关键词: 新生隐球菌, 有性期, 交配型分析, 培养基

中图分类号: R379 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 02-0209-07

新生隐球菌是一种有荚膜的担子菌病原真菌。临床和环境分离菌株一般为无性期的酵母相生长。1976 年 Kwon-Chung 发现新生变种的有性期为 *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*, 格特变种的有性期为 *F. neoformans* var. *bacillispora*^[1,2]。在实验室条件下可以分为与 α 型诱导菌株混合培养产生有性期生长的 α 型和与 α 型诱导菌株产生有性期生长的 a 型。在有性期生长时可见到菌丝形成, 显微镜下可观察到担子、担孢子和锁状联合结构^[3]。新生隐球菌交配型分析在菌种鉴定、流行病学、生态学、生物学等研究方面有着重要意义。

培养诱导是实验观察新生隐球菌有性期的主要方法, 新生变种培养诱导成功率较高, 而格特变种则很困难, 以至需要借助于分子生物学的方法^[4]。此外, 采取划线接种培养不能处理大批标本, 部分菌株不能分型 (untypable)。由于我国尚未见有关实验报告, 我们建立了有关的基础实验方法, 对培养基进行了比较研究, 为同时分析大批量标本 试用点状接种替代传统的划线接种方法。针对不能分型的菌株, 我们试用混合预培养后再接种以提高试验阳性率。

1 材料和方法

1.1 培养基

1.1.1 Mating agar (MA)^[5]: 1.0g KH₂PO₄; 0.5g MgSO₄; 0.1g CaCl₂; 5 μ g 生物素; 0.5g 酵母提取物; 10.0g 蔗糖; 2.0g 木糖; 40.0g 琼脂; 蒸馏水定容至 1L。

1.1.2 Hay agar (HA)^[5]: 将 50.0g 水稻杆剪碎, 置于 1L 蒸馏水中, 经 121℃ 30min 蒸煮

* 本课题受国家自然科学基金资助 (39670044)

作者简介: 李安生 (1957-), 男, 江苏省南京市人, 中国医学科学院皮肤病研究所检验科主任, 副主任技师, 1992 年和 1995 年赴日本千叶大学进修, 主要从事医学微生物和免疫学研究。

收稿日期: 2000-05-29, **修回日期:** 2000-10-16

后用定性滤纸过滤,补充蒸馏水至 1L 成 5% 稻秆提取液,再加入 2.0gKH₂PO₄ 和 40.0g 琼脂(pH6.2)。

1.1.3 Hay cube agar (HCA)^[6]:取 50.0g Hay cube (Nihon Seibutsu Zairyo Center, Tokyo)置于 1L 蒸馏水中,制备方法与 HA 相同。

1.1.4 富营养 Hay agar (IHA):10.0g 葡萄糖;10.0g 蛋白胨;10.0g 大豆蛋白胨;0.05g MgSO₄·7H₂O;0.1gCaCl₂;0.5g 酵母提取物;2.0gK₂HPO₄;40.0g 琼脂,5% 稻秆提取液 1L。

1.1.5 稻壳培养基(RSA):取水稻壳 50.0g,置于 1L 蒸馏水中,制备方法与 HA 相同。

1.1.6 SDA:按普通沙保弱培养基的制备方法制成平板备用。以上各培养基均经 121℃ 高压灭菌 15min 后制成平板备用。此外,YMPDA 培养基(3.0g 酵母提取物;3.0g 麦芽提取物;5.0g 蛋白胨;10.0g 葡萄糖;20.0g 琼脂;1L 蒸馏水;pH6.2)用于实验菌株的扩增。不加琼脂(YMPDB)用于预培养。

1.2 实验菌株

8 株临床和环境的新分离新生隐球菌新生变种菌株(表 1)用于预试验;20 株(包括标准株,临床株和环境株,表 2)用于 6 种培养基的比较观察;2 株诱导菌株(B3501 和 B3502)由日本千叶大学竹尾汉治教授实验室引入(表 2)。全部菌株均在 SDA 斜面培养基上传代保藏。试验时先接种于 YMPDA 斜面经 25℃ 培养 72h 扩增。

表 1 用于预试验的 8 株新生隐球菌新生变种菌株

Table 1 The isolates of *C. neoformans* used for the fundamental experiments

| Isolates | Source | Serotype | Mating type |
|----------|-------------------|----------|-------------|
| WRX4 | Clinic, Guangzhou | A | Unknown |
| WRX3 | Clinic, Guangzhou | A | Unknown |
| WRX2 | Clinic, Guangzhou | A | Unknown |
| WRX5 | Natural, Xiamen | A | Unknown |
| JNC2-11 | Natural, Jinan | A | Unknown |
| SYB4-9 | Natural, Shenyang | A | Unknown |
| FCZ2-11 | Natural, Fuzhuo | A | Unknown |
| GSB10 | Natural, Shantou | A | Unknown |

表 2 交配型试验培养基比较研究的受试菌株

Table 2 The isolates used for the comparison of different media

| No. | Isolate | Source | Serotype | Mating type |
|-----|---------|------------------------|----------|-------------|
| 1 | HCN N-1 | IFM45708/Clinic, China | A | α |
| 2 | HCN N-2 | IFM45709/Clinic, China | A | α |
| 3 | HCN N-3 | IFM45710/Clinic, China | A | α |
| 4 | HCN N-5 | IFM45712/Clinic, China | A | α |
| 5 | ID1242 | Clinic, China | A | ? |
| 6 | IFM5857 | NIH52 | D | ? |

续表 2

| | | | | |
|----|----------|---------------------|----|-------------------|
| 7 | IFM5854 | CDC551 | A | ? |
| 8 | IFM5833 | RIB12 | A | α |
| 9 | IFM41469 | ID61 Natural, China | A | α |
| 10 | IFM41470 | ATCC64538 | A | α |
| 11 | IFM5889 | UFPR2536 | AD | ? |
| 12 | TLD ui57 | Natural, Japan | A | ? |
| 13 | TLD ui76 | Natural, Japan | A | ? |
| 14 | TLD ui61 | Natural, Japan | A | ? |
| 15 | BJA 4-1 | Natural, China | A | ? |
| 16 | XZA10 | Natural, China | A | ? |
| 17 | XZB20-1 | Natural, China | A | ? |
| 18 | BJB4-1 | Natural, China | A | ? |
| 19 | XZA4 | Natural, China | A | ? |
| 20 | XZA5-3 | Natural, China | A | ? |
| 21 | IFM5844 | B3501 (NIH) | D | α (tester) |
| 22 | IFM5845 | B3502 (NIH) | D | α (tester) |

1.3 实验方法

1.3.1 交配型分析方法:参照 Jong SC 方法^[6],将受试株(表 1)分别与 α 和 α 诱导株混合接种在 MA 和 HA 上,同时受试株单独划线接种,并用两型诱导株作为阳性对照。接种完成后用塑料胶带贴封平皿边缘,置 25℃ 孵箱培养。阳性结果为:肉眼可见的菌丝;显微镜下的菌丝形成情况以及是否出现担子、担孢子以及锁状联合等特殊形态结构^[7]。交配型可判别为:与 α 诱导株混合出现阳性结果的受试菌株为 α 交配型;与 α 诱导株混合出现阳性结果的受试株为 α 交配型;单独接种出现阳性结果表示自身发育为菌丝相(self-fertile);将观察期延长至 4 周,但以上 3 种情况都不出现提示不能分型(untypable)。

1.3.2 6种培养基的试验比较:取 YMPDA 斜面 25℃ 72h 培养的菌株(表 2),按预试验方法分别接种到 6 种培养基上,限定培养时间为 2 周,阴性标本观察到 4 周。

1.3.3 混合预培养和点状接种法效果比较:取 13 株受试株(包括前试验不能分型的菌株)和诱导株分别制成 YMPDB 和 Hay 液体培养基的菌悬液(1×10^6 /mL),按 1:1(受试株:诱导株)细胞量混合,30℃ (振荡 150r/min)预培养 24h,离心沉淀细胞接种到 RSA 上。同时,用接种环将受试和诱导株在 RSA 上直接混合接种 3 点,每个平皿 3 个菌株。其余方法与预试验相同。

2 结果

2.1 8 株新生隐球菌新生变种交配型分析预试验结果

采用 HA 和 MA 所进行的交配型分析均得到阳性结果,即肉眼观察到菌丝生长(图版 I -a)和显微镜下观察到菌丝、担子、担孢子和锁状联合结构(图版 I -b)。由不同时间观

察到的实验结果见表 3:①显微镜观察能够早期发现阳性结果;②采用 HA 的分型效果优于 MA;③除菌株 GSB10 的观察时间延长到 4 周以上仍然为阴性结果性,培养 2 周可得到分型结果。

表 3 8 株新生隐球菌交配型分析预试验结果

Table 3 The results of the fundamental experiments from 8 isolates

| Isolate | MA | | | | HA | | | | Mating type |
|----------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| | 3 | 1 | 2 | 4 | 3 | 1 | 2 | 4 | |
| | Days | Week | Weeks | Weeks | Days | Week | Weeks | Weeks | |
| WRX4 | + / + * | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | α |
| WRX3 | - / - | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | α |
| WRX2 | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | α |
| XMB5 | - / - | - / - | - / - | - / - | - / + | - / + | - / + | + / + | α |
| JNC2-11 | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | - / + | + / + | α |
| SYB4-9 | - / - | - / - | - / - | - / - | - / + | - / + | + / + | + / + | α |
| FCZ2-11 | - / - | - / - | - / - | - / - | - / + | - / + | - / + | + / + | α |
| GSB10 | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | ? |
| Control | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + | |
| Positive | 3/3 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/7 | 4/7 | 5/8 | 8/8 | |

* Direct observation/under the microscope

2.2 交配型分析培养基的比较结果

比较 6 种培养基的交配型分析试验 2 周的结果(表 4)可见:①4 种含稻秆(壳)提取物的培养基交配型分析效果按阳性率排列为 HCA(95%),RSA(95%),HA(86%)和 IHA(24%);②与预试验结果相似,MA 的阳性率不高(仅 38%);③作为生长对照的 SDA 上也可见菌丝形成(38%);④IFM41469 在所有培养基上都未出现阳性结果,延长培养至 4 周仍然为阴性。

表 4 6 种交配分型实验培养基的比较结果

Table 4 Comparison of mating results of the mating tests on six media

| Time | n* | MA | | RSA | | HCA | | HA | | IHA | | SDA | |
|----------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | DO# | UM# | DO | UM | DO | UM | DO | UM | DO | UM | DO | UM |
| | | | | | | | | | | | | | |
| 3 days | | 1 | 5 | 4 | 17 | 6 | 19 | 4 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 week | 21 | 1 | 5 | 10 | 20 | 17 | 20 | 12 | 16 | 0 | 3 | 0 | 8 |
| 2 weeks | | 3 | 8 | 20 | 20 | 20 | 20 | 17 | 18 | 3 | 5 | 0 | 8 |
| Positive rates | | 14% | 38% | 95% | 95% | 95% | 95% | 85% | 86% | 14% | 24% | 0% | 38% |

* Total 21 paired tests containing with one control

DO:direct observation;UM:under the microscope

2.3 预培养和点植法接种的效果观察

由受试株和诱导株经 2 种液体培养基预培养再按点植法接种于 RSA 的实验结果(表 5)可见:①点植法接种 12/14 株于 2 周内出现阳性结果;②经 YMPDB 预培养后再接种可

以使菌丝生长加快,包括 IFM41469 和 GSB10 在内 14 株全部呈阳性结果;③经 Hay 液基预培养后接种对交配分型阳性率没有明显影响。图版 I -c 至 f 显示点植法接种的菌落和显微镜下的观察结果(菌丝、担子和担孢子),其中图版 I -c 和 d 为直接点种,图版 I -e 和 f 为经过 YMPDB 预培养后接种。

表 5 预培养和点植法接种效果比较

Table 5 The mating tests by the dot inoculation and through pre-cultivation

| Isolates | Direct dot inoculation | | | Dot inoculation after cultivation in hay broth | | | Dot inoculation after cultivation in YMPDB | | |
|-----------|------------------------|-------|-------|--|------|-------|---|-------|-------|
| | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| | Days | Week | Weeks | Days | Week | Weeks | Days | Week | Weeks |
| HCN N-5 | + /+ * | + /+ | + /+ | - /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| ID1242 | + /+ | + /+ | + /+ | - /+ | + /+ | + /+ | - /+ | + /+ | + /+ |
| IFM5857 | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | - /+ | - /+ | - /+ | - /+ | - /+ |
| IFM5833 | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| IFM41469 | - /- | - /- | - /- | - /- | - /- | - /- | - /- | - /+ | - /+ |
| IFM41407 | - /- | - /- | - /+ | - /- | - /- | - /+ | - /+ | + /+ | + /+ |
| IFM5889 | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| TLDui57 | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| XZA10 | - /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| XZB20 - 1 | - /+ | - /+ | + /+ | - /+ | - /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| BJB4 - 1 | - /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| GSB10 | - /- | - /- | - /- | - /- | - /- | - /+ | - /- | - /+ | + /+ |
| XZA4 | - /+ | + /+ | + /+ | - /- | - /- | - /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| Control | - /+ | + /+ | + /+ | - /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| Positive | 6/11 | 10/11 | 11/12 | 6/10 | 8/10 | 9/13 | 9/12 | 11/14 | 12/14 |

* Direct observation/under the microscope

3 讨论

为了建立交配实验的基本方法,使用新分离菌株以排除菌株经长期保藏后交配活力减低可能对实验结果产生的影响。结果可见虽然用传统的培养基可以观察到菌丝相生长、担子和担孢子结构(图版 I -a、b),但由于 HA 的实验效果明显优于 MA,并存在不能分型菌株(表 3)提示有必要考虑培养基对交配型分析实验的影响。

用于新生隐球菌交配型实验的培养基有多种,除 HA 和 MA 外还有 Sucrose-Yeast extract agar,Neutral V-8 Juice agar,Wheat bran agar 等^[7,8]。HCA 是最近报告的用一种以水稻秆为主的动物饲料提取物制成的培养基^[5]。但是,值得注意的是各种培养基的实际使用效果可能有差别。我们的初步实验结果表明含天然成分的 HA 优于合成培养基 MA(表 3)。进一步比较 6 种培养基,结果(表 4):含有稻秆或稻壳提取物的培养基明显优于

合成培养基,其中,HCA 和 RSA 培养基的效果最好,HA 其次,添加营养成分的 IHA 效果不理想。Hay cube 是由一种动物饲料,主要成分是稻秆和饲料添加剂,用 Hay cube 提取物制成的培养基可能含有利于有性期形成的基物。采用 IHA 的目的试图通过添加蛋白质和微量元素提高 HA 的培养效果,但实际结果却与作为生长对照的 SDA 相似,其原因可能在于 IHA 和 SDA 都没有提供有性期形成的葡萄糖饥饿信号^[8]。此外,培养时间不够可能是 MA 分型阳性率较低的原因。然而,培养时间延长可造成培养基的污染和水分大量蒸发。所以,MA 不是新生隐球菌交配型分析的理想培养基。RSA 培养基的原材料容易得到,制备简便,交配分型阳性率高,可在我国大多数实验室推广使用。

经典的新生隐球菌有性期实验是将诱导和受试菌株在平皿上划线混合,每个平皿只能用于 1 株菌的分析(图版 I-a),处理大批的菌株需消耗大量的实验材料。因此,我们试用了点状接种取代划线接种。由表 5 和图版 I-c 至 f 的结果可见采取点状接种方法可以得到明确的交配型分析结果,每个平皿可以至少用于 3 个株菌的分型,只需原方法 1/3 的材料,给大批量分析实验带来了方便。

许多新生隐球菌交配型分析实验的报告中都有不能分型的(untypable)菌株,除可能和经长期保存菌株的活性有关外,真正原因不明^[4,6,7]。本实验中也见同样情况。和其它真菌的有性期过程一样, α 或 α 型菌株产生的性激素类物质(pheromones)和对应的 α 或 α 型菌株细胞表面的受体(pheromone receptors)特异性结合,从而诱发有性期反应^[9,10]。所以,在接种到交配型试验培养基前将诱导和受试菌株混合于富营养的液体培养基(YM-PDB)中作预培养有可能促进激素类物质的产生和作用。由表 5 所示结果可见,与经过低营养的 Hay 提取物预培养相比,经 YMPDB 预培养后交配成功率有所增加,尤其是 IFM41407 和 GSB10 之前经多次试验均为阴性结果,经 YM-PDB 预培养后被观察到了有性期。该结果提示混合预培养有可能提高交配型试验的成功率。事实上增加预培养的过程加大了操作难度,而且反复处理菌株极易导致污染,所以建议预培养处理适用于常规方法不能分型的菌株。

致谢 日本千叶大学真菌研究中心竹尾汉治教授和田中玲子副教授提供实验菌种和技术支持;日本帝京大学中村游香教授提供实验菌株。

参 考 文 献

- [1] Kwon-Chung K J. *Mycologia*, 1975, **67**:1179~1200.
- [2] Kwon-Chung K J. *Mycologia*, 1976, **68**:942~946.
- [3] Kwon-Chung K J. *Molecular Biology of Pathogenic Fungi-A Laboratory Manual* 2nd ed. New York: Telos Press, 1995. 341~344.
- [4] Halliday C L, Bui T, Krockenberger M, et al. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**:2920~2926.
- [5] Tanaka R, Nishimura K, Miyaji M. *Jpn J Med Mycol*, 1999, **40**:31~34.
- [6] Jong S-C. *Molecular Biology of Pathogenic Fungi-A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Telos Press, 1995. 337~340.
- [7] Kwon-Chung K J, Bennett J E. *Am J Epidemiol*, 1978, **108**:337~340.
- [8] Hsu M M L, Chang J C, Yokoyama K, et al. *Mycopathologia*, 1994, **125**:77~81.
- [9] Kues U, Casselton L A. *Mycol Res*, 1992, **96**:993~1006.

[10] Nasmyth K, Shore D. *Science* 1987, 237:1162~1170.

STUDIES ON THE METHODS OF MATING TEST FOR *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* *

Li Ansheng Lu Guixia Chen Wei Shen Yongnian Wu Shaoxi

(*Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Science, Nanjing 210042, China*)

Abstract: Six media (MA: Mating agar, HA: Hay agar, HCA: Hay cube agar, RSA: Rice shell agar, IHA: additional nutrition in HA and SDA: Sabouraudia dextrose agar) were compared for their efficiencies of the mating test for *Cryptococcus neoformans*. The positive rates in 2-week-cultivation were 95% (HCA and RSA), 86% (HA), 38% (MA and SDA) and 24% (IHA). The streaking inoculation was equally replaced by the dot inoculation for the mating tests. However, the dot method saves much more materials, and is suitable for testing in large number of isolates. Additionally, the precultivation of the tester and tested isolates in broth medium (YMPDB) could enhance the positive mating rates.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, Teleomorph, Mating type, Medium

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39670044)

图版说明

Explanation of plate

图版 I-a 和 b: 新生隐球菌新生变种在 HA 培养基上的交配型实验的直接和显微镜(1000x)观察结果; 图版 I-a, 左: 受试株; 中: a 诱导株加受试株; 右: a 诱导株加受试; 图版 I-c 和 d: YMPDB 预培养后点状接种(RSA); 图版 I-e 和 f: 直接点状接种; 图版 I-c 和 e 中: 每平皿接种 3 株, 每行中左: a 诱导株加受试株; 中: 受试株; 右: a 诱导株加受试株; 单个菌落; 阳性对照; 图版 I-d 和 f 为倒置显微镜下(400x)的观察结果。

Fig. a and b: *F. neoformans* var. *neoformans* on HA, and observation under the microscope (1000x); In Fig. a, left: the tested isolate, middle: the a tester and tested isolates, right: the a tester and tested isolates; Fig. c and d: the dot inoculation on RSA after the pre-cultivation in YMPDB; Fig. e and f: direct dot inoculation on RSA; In Fig. c and e, the left rows: the a tester and tested isolates, the middle rows: the tested isolates only; the right rows: the a tester and tested isolates; two single dots: the positive controls; Fig. d and f: observation under the conversed microscope (400x).