

致病酵母菌基因组多态性及亲缘关系的研究*

李冬梅 王端礼 李世荫 李若瑜

(北京医科大学真菌和真菌病研究中心 北京 100034)

朱 衡 朱立煌

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘 要 致病酵母是条件致病菌感染中最常见的菌群。其属间、种间及种内的分型具有重要的流行病学及临床意义。以随机扩增多态性(Randomly Amplified Polymorphism DNA markers, RAPD)的方法对 48 株临床上常见的酵母菌属间、种间及种内基因组型的多态性进行了研究,并以多种引物扩增带型的相似性系数的高低来评价酵母菌之间的亲缘关系。结果表明:RAPD 带型可清楚的显示出假丝酵母(*Candida*)及相关酵母属间、种间及种内的差异,亲缘关系的研究表明假丝酵母属与隐球菌属(*Cryptococcus*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)的相似性系数为 80%,除季也蒙假丝酵母(*C. guilliermondii*)外,假丝酵母属中不同种间的相似性系数为 82%~87%,同种不同株间的相似性系数 >90%。大多数属、种基因组分型的结果和形态学分类结果相符。

关键词 酵母,分类,基因组分型,多态性,亲缘关系

酵母菌可引起系统性的感染,在条件致病菌的感染中占有很重要的地位。临床上最常见的有假丝酵母属(*Candida*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)等。这些酵母菌属与属之间,种与种之间存在着明显的生物学差异^[1]。但是,现有的表型分类所提供的生物学标志还不能有效地反映出这些差异,而临床工作中也需要一种能显示种间甚至种内差异的分类方法用于医源性感染的诊断及流行病学的调查。

在生物的群体中,多种遗传上不同类型共存的现象称为多态性。表现在基因组型上则是某一座位的多个等位点。多态性的研究是进行基因组分型的依据。我们利用随机扩增多态性(RAPD)的方法对临床上常见的酵母菌属间、种间,甚至种内基因组型的多态性进行了研究,并以相似性系数的高低来评价酵母菌之间的亲缘关系。

1 材料和方法

1.1 菌株

共 16 株标准菌,32 株临床菌株,所有临床株均经过生化和血清分型鉴定(见表 1)。

* 卫生部基金资助项目。

本文于 1995 年 12 月 7 日收到。

表1 实验菌株

Table 1 Strains

标准菌 Standard strains	临床菌 Clinical strains
CA: ATCC 10231 <i>C. albicans</i>	A1-A3: <i>C. albicans</i>
CA: IFM 5856 <i>C. albicans</i>	AB1-AB2: <i>C. albicans</i> (serotype B)
CAB: IFM <i>C. albicans</i> (B)	P1-P3: <i>C. parapsilosis</i>
CT: ATCC 01463 <i>C. tropicalis</i>	G1-G2: <i>C. guilliermondii</i>
CT: IFM <i>C. tropicalis</i>	Kr1-Kr3: <i>C. krusei</i>
CG: IFM 5775 <i>C. guilliermondii</i>	Ke1-Ke3: <i>C. kefyri</i>
CP: IFM 5750 <i>C. parapsilosis</i>	T1-T3: <i>C. tropicalis</i>
CKR: IFM 5749 <i>C. krusei</i>	TG: <i>T. glabrata</i>
CKB: IFM 5773 <i>C. kefyri</i>	CR1-CR12: <i>Cr. neoformans</i>
TG: IFO 0622 <i>Torulopsis glabrata</i>	
TC: IFO 1198 <i>Trichosporon cutaneum</i>	
SC: ATCC 36375 <i>S. cerevisiae</i>	
CRA: IFM <i>Cr. neoformans</i> (serotype A)	
CRB: IFM <i>Cr. neoformans</i> (serotype B)	
CRC: IFM <i>Cr. neoformans</i> (serotype C)	
CRD: IFM <i>Cr. neoformans</i> (serotype D)	

注: "IFM" 为日本千叶大学真核微生物研究中心菌株(旧称日本千叶大学腐败研究所)。

"IFO" 为大阪发酵所菌株。

IFM Institute of food microbiology, Chiba University, Japan.

IFO Institute for fermentation, Osaka, Japan.

1.2 DNA的提取

氯化苜法^[2]。

1.3 RAPD

参考文献[3], 引物为 OPERON 产品, 每种引物长度为 10 个碱基。共选择 53 种引物对上述标准菌及临床株进行了扩增。

1.4 统计学分析

随着选择引物的不同, PCR 扩增的带型在属间、种间、株间明显地不同, 同一引物的扩增产物中, 同种不同株间既可以相似, 也可以完全不同, 甚至于与其他种或者属相混淆。因此, 我们采用聚类分析的方法, 对各种引物获得的带型进行了分析, 以聚类的结果进行基因组分型。首先根据分子量标记(maker)测量出各条带的相对迁移率, 然后转化成数据, 如某条带出现, 记为"1", 无该带则为"0", 以此类推, 各种引物扩增的带型在任何一株菌中都转化成 1,0 组成的数据组, 根据相似性的计算公式 $Sm = (a + d) / \text{total} - Nc$ 计算出各菌株间的相似性系数^[4]。Sm: 相似性系数; a: 两菌共有带; d: 两菌均无的带; total: 两菌相加所有的带; Nc: 未进行的项目。聚类的方式为平均链锁聚类方式(average linkage cluster)。

2 结果

48株标准菌和临床菌株中,包括假丝酵母属、球拟酵母属(*Torulopsis*)、丝孢酵母属、酵母属(*Saccharomyces*)、隐球菌属,其中的假丝酵母属包括6个种及白色假丝酵母血清B型,隐球菌属为新型隐球菌的4个血清型(A, B, C, D),血清A及D型为新型隐球菌的新型变种,B和C为格特变种。实验中随机选用了53种引物,分别对标准菌株及临床菌株进行了PCR扩增。标准菌中的白色假丝酵母(*C. albicans*),热带假丝酵母(*C. tropicalis*)均为2株,在标准菌的预实验中,发现在某些引物作用下,同一种2株菌的带型差异较大,如图1,2所示。为此,我们将每个种扩大为3株(新型隐球菌12株)临床菌株进一步分型,根据多种引物带型的聚类分析结果,判断这种种内的差异是否超过了种间的差异。

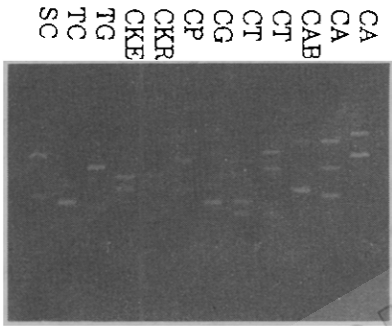


图1 标准株 OPI-3引物的 RAPD 带型
Fig. 1 Profiles of RAPD amplified by OPI-3 primer in standard strains

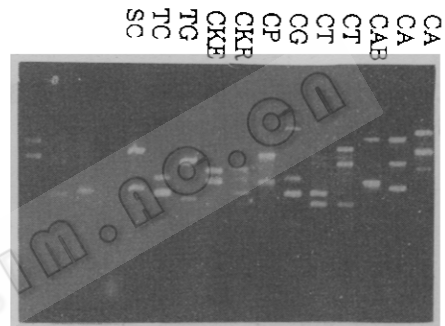


图2 标准株 OPK-6引物的 RAPD 带型
Fig. 2 Profiles of RAPD amplified by OPK-6 primer in standard strains

53种引物中的部分引物未能扩增出产物,如OPB-5,OPK-7等,有些引物的带型较模糊,分辨能力差。如OPA-16,OPK-8,OPC-16等,只筛选出24种引物的扩增带型,这些引物扩增出的带型较清晰,在不同株之间,随引物的不同,多态性的程度有所不同,所有引物扩增产物的范围多在200~2000bp左右,一般可以扩增出6~12条带。

大多数引物的RAPD带型可清楚的显示出假丝酵母及相关酵母菌属间、种间的明显差异,甚至种内的差异。即同种引物在不同菌种扩增产物的数目和大小不等,电泳时,这些产物的迁移率不同,经EB染色后,呈现出不同的带型。图1,2可清楚的表明这一点,假丝酵母与隐球菌、丝孢酵母、球拟酵母(*Torulopsis*)等不同属间的带型具有明显的差异,不同的假丝酵母种间差异也较为明显,而在这两种引物的带型中,属同一种的CA,CAB带型之间,两株同种不同株CT带型之间,有相似之处,但仍显示出明显的差异。临床株的扩增带型显示了同样的结果,图3a为不同假丝酵母种,光滑球拟酵母OPI-6的扩增带型,3b为新型隐球菌4种血清型和临床株的OPI-6扩增带型。结果显示,在同种引物作用下,属间、种间的带型差异明显,同种异株间的

差异较小,甚至可出现种与种之间的交叉,如 AB1 和 P1、A3, AB2 和 P2 之间。图 4a 为假丝酵母及球拟酵母 OPI-13, OPI-18 引物的扩增带型,图 4b 为新型隐球菌的扩增带型,同样可看到 A, AB 和 P 的部分交叉。

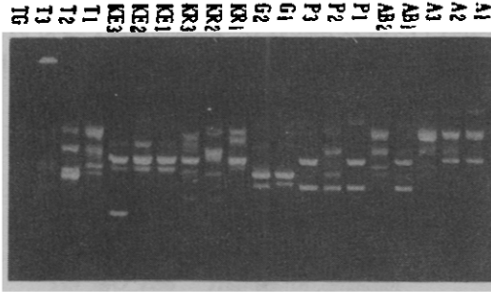


图 3a 假丝酵母临床 OPI-6 的 RAPD 带型
Fig. 3a Profiles of RAPD amplified by OPI-6 primer in *Candida* spp.

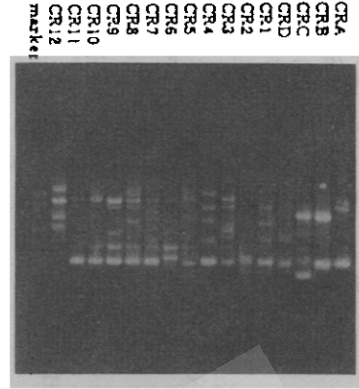


图 3b 新生隐球菌 OPI-6 引物的 RAPD 带型
Fig. 3b Profiles of RAPD amplified by OPI-6 primer in *Cryptococcus* spp.

OPI-3: 5' -CAGAAGCCCA-3'

OPK-6: 5' -CACCTTTCCT-3'

OPI-6: 5' -AAGGCGGCAG-3'

OPI-13: 5' -CTGGGGCTGA-3'

OPI-18: 5' -TGCCAGCCT-3'

很显然,在选择到合适的引物时,RAPD 带型可直观地反映出菌株之间的差异。但是如何评价这种方法所获得的多态性结果是否符合实际的分类情况,也就是说在个别种间的带型出现交叉时,是否打破了形态学上的属间、种间和株间的关系,有必要对多种引物、多个菌株的带型进行统计学的分析。我们采用数值分类法,在大量由带型资料转

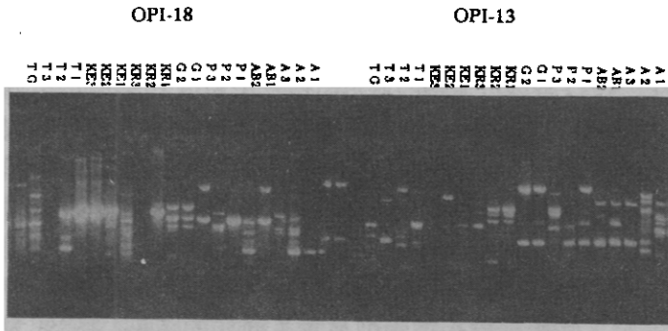
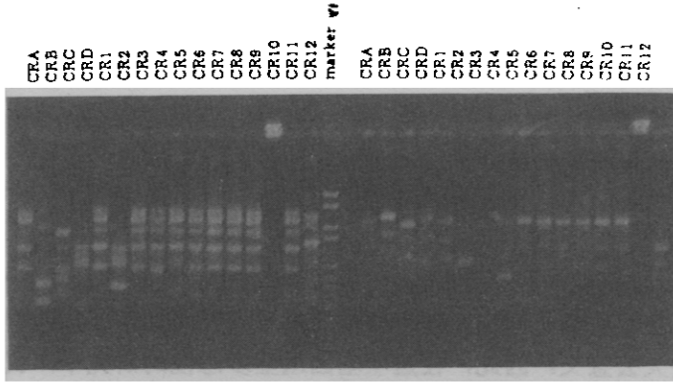


图 4a 假丝酵母 OPI-13, OPI-18 引物的 RAPD 带型
Fig. 4a Profiles of RAPD amplified by OPI-13, OPI-18 primers in *Candida* spp.



OPI-18

OPI-13

图 4b 新生隐球菌 OPI-13, OPI-18 引物的 RAPD 带型

Fig.4b Profiles of RAPD amplified by OPI-13, OPI-18 primers in *Cryptococcus* spp.

化成数值资料的基础上,分别计算不同属间、种间、同种异株间的相似性系数,根据相似性系数进行聚类分析。如图 5, 6 所示,其结果综述如下:(1)假丝酵母属与隐球菌属的相似性系数 S_m 为 78% ~ 79%,与酵母属为 81%,与丝孢酵母属为 79%;(2)假丝酵母属种间的相似性系数多在 82% ~ 87% 之间;只有季也蒙假丝酵母(*C. guilliermondii*)例外,与白色假丝酵母关系较远, S_m 值为 79%;(3)光滑球拟酵母与假丝酵母各种间的相似性系数也在 82% ~ 87% 之间;(4)假丝酵母种内的相似性系数多 > 90%。

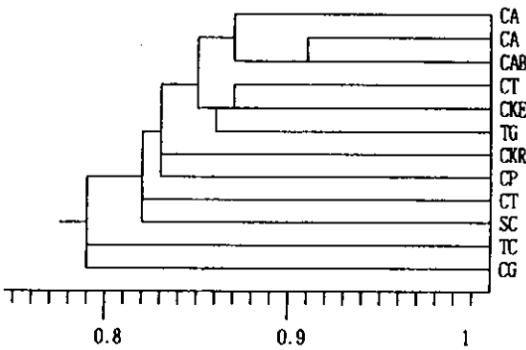


图 5 不同酵母标准菌株 RAPD 的聚类分析树状谱
 Fig.5 An average linkage clustering dendrogram from all patterns produced by RAPD in standard strains of yeast

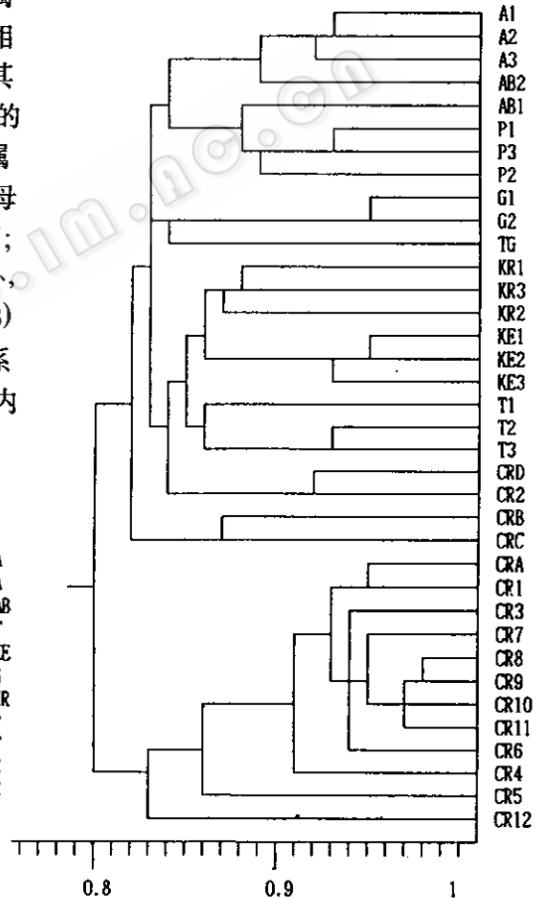


图 6 不同酵母临床菌株 RAPD 的聚类分析树状谱
 Fig.6 An average linkage clustering dendrogram from all patterns produced by RAPD in clinical strains of yeast

3 讨论

酵母的分类和其他微生物一样,经历了由肉眼形态、细胞生化到分子水平的过程^[5]。分子生物学技术的出现,已从分子水平对酵母菌各属、种间的多态性补充了新的生物学标志,如 rRNA 和 mtDNA 的限制性片段长度多态性^[6],rRNA 大、小亚基核苷酸序列分析^[7]。RAPD 所获得的 DNA 指纹图中,多态性是基因组中与引物对应碱基序列的不同造成的^[8]。在这项研究中,不难看出这种基因组分型方法在显示多态性方面具有明显的优势。但是,并不是多态性越显著,分类的效果越好,如果多态性显著导致分类等级之间混淆,就会失去意义。因此,在这项基因组多态性的研究中,我们贯穿了相似性的研究。

数值分类是近年来提出的新的分类法,将实验结果量化后分类,可以更准确的衡量物种之间的亲疏关系。我们以相似性系数对所有假丝酵母菌和相关酵母菌的 RAPD 带型进行分类,对比于形态学上的属间、种间和种内,分别得到 <80%,82%~87%,>90% 的三个“等级”,为这些菌属种之间亲缘性关系的研究提供了一定的依据。

大多数种、属基因组分型结果和形态学分类结果相符,但仍有例外,根据分类结果,季也蒙假丝酵母是假丝酵母属中的一员,但在图 5 中的季也蒙假丝酵母和白色假丝酵母的相似性系数为 79%,与其他假丝酵母种的关系远近不等,但多数相似性系数在 80%~83% 的范围内。比较以上三个“等级”,似乎季也蒙假丝酵母和白色假丝酵母的关系超出了种间的等级范围。Barns^[7]比较了白色假丝酵母、热带假丝酵母、近平滑假丝酵母(*C. parapsilosis*)和季也蒙假丝酵母的 18S rRNA 序列后,将这些菌种归纳入假丝酵母属中的一个亚组中,认为季也蒙假丝酵母与白色假丝酵母的亲缘关系仅次于近平滑假丝酵母。但是,我们在另一项假丝酵母的核型研究中发现,季也蒙假丝酵母的核型明显的不同于这一亚组中的其他成员。以白色假丝酵母的 rDNA 探针对各种假丝酵母菌的 DNA 酶切片段进行杂交,所得到的 rDNA 限制性酶切图谱中,发现季也蒙假丝酵母明显的不同于其他的假丝酵母,而其他种间的差异却很小^[8]。另一项不支持季也蒙假丝酵母与白色假丝酵母亲缘关系较近的研究中,以一种在各假丝酵母菌种中保守的肌动蛋白基因(这是一种控制假丝酵母形态转化的基因),对各假丝酵母菌种酶切片段进行杂交,结果所有假丝酵母种都有 3 个特征,即肌动蛋白基因中无 EcoRI 和 Sall 位点,内部都有一个 HindIII 位点,只有季也蒙假丝酵母例外,缺少 HindIII 位点^[9]。有可能季也蒙假丝酵母 DNA 序列与其他假丝酵母种的差异较大,这种序列上的较大差异可能是我们实验结果中,季也蒙假丝酵母和白色假丝酵母亲缘关系较远的原因。

白色假丝酵母、热带假丝酵母、近平滑假丝酵母是临床上常见的致病菌种,尽管在 RAPD 带型分析中可以看到一些交叉相似的带型,但三种之间的相似性系数并未明显高于其他种间的关系,带型的易于交叉性符合形态及血清分型结果中三者易于混淆的现象。致病力较强的三个假丝酵母种,其 DNA 序列的相似性,有可能为我们以后致病力的研究提供一定的线索。

致谢 中国科学院微生物研究所的赵玉峰、马俊才老师为本实验做了聚类分析,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Walsh T J, Pauw B De, Anaissie E *et al.* *J Med Vet Mycol*, 1994, 32 (supple 1): 33 ~ 51.
[2] Zhu H, Jun F, Zhu L H. *Nucl Acid Res*, 1993, 21: 5279.
[3] 李冬梅, 王端礼, 李若瑜, 等. 真菌学报, 1995, 14 (2): 123 ~ 129.
[4] 马俊才, 赵玉峰. 微生物学通报, 1986, 13 (5): 225 ~ 228.
[5] De Hoog G S, Sigler L, Untereiner W A *et al.* *J Med Vet Mycol*, 1994, 32 (supple 1): 113 ~ 122.
[6] Verma A, Kwon-Chung K J. *J Gen Microbiol*, 1989, 135: 3353 ~ 3362.
[7] Barns S M, Lane D J, Sogin M L *et al.* *J Bacteriol*, 1991, 173: 2250 ~ 2255.
[8] Magee B B. *J Bacteriol*. 1987. 169: 1639 ~ 1643.

POLYMORPHISM AND POLOGENETIC AFFINITIES OF
GENOTYPE IN PATHOGENIC YEAST

Li Dongmei Wang Duanli Li Shiyin Li Ruoyu

(Research Center for Medical Mycology, Beijing Medical University, Beijing 100034)

Zhu Heng Zhu Lihuang

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Abstract The classification of pathogenic yeast, which is one of the most common reasons of opportunistic infection in human body, will be useful for the epidemiological survey and clinical works. The genotypic polymorphism of intergenus, interspecies and intraspecies in 48 isolates, including *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Saccaromyces* had been administered carefully with patterns amplified by RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) in 53 primers. The pologenetic affinities had been evaluated by similarity coefficients obtained from these profiles. The results indicated that there are significant difference among intergenus, interspecies and intraspecies in *Candida* and related yeast. The similarity coefficients among *Candida* and *Cryptococcus*, *Trichosporon* were maintained about 80%; The similarity coefficients among interspecies of *Candida* ranged from 82% ~ 87%, and ones of intraspecies of different *Candida* species were more than 90%. The genotypic typing of species except *C. guilliermondii* seems to be related to morphological classification.

Key words Yeast, Classification, Genotype, Polymorphism, Polygenetic relation