

## 中国首株格特隐球菌 VGII 基因型分离株 XH91 的分子和表型特征鉴定

冯晓博<sup>1</sup>, 吴劲松<sup>2</sup>, 凌波<sup>1</sup>, 任大明<sup>3</sup>, 姚志荣<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 上海交通大学医学院附属新华医院皮肤科, 上海 200092)

(<sup>2</sup> 暨南大学第二临床医学院, 深圳市人民医院检验科, 深圳 518020)

(<sup>3</sup> 复旦大学遗传学研究所, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200092)

**摘要:**【目的】研究我国首次临床分离的一株格特隐球菌 VGII 基因型菌株(XH91)的分子和表型特征。【方法】对受试株 XH91 进行血清型的分子鉴定;选取核基因组和线粒体基因组中共 16 个基因片段进行多位点序列分型;对受试株进行单倍体繁育、同性交配及异性交配能力评价;观察受试株的黑色素生成、荚膜厚度及 37℃ 生长等表型特征。【结果】我国首株格特隐球菌 VGII 基因型菌株 XH91 为血清 B 型;该菌株在多位点序列分型上与温哥华岛致病基因型 VGIIb 一致;XH91 能与 a 交配型发生交配,产生担孢子,而不能与  $\alpha$  交配型发生交配且不具备单倍体繁育能力;XH91 的黑色素生成、荚膜厚度及 37℃ 生长等表型特征与参考株无明显差异。【结论】我国首株格特隐球菌 VGII 基因型菌株 XH91 在基因型、表型特征上均与温哥华岛 VGIIb 基因亚型一致,该结果将为我国格特隐球菌 VGII 基因型的分子流行病学和疾病监控提供重要资料。

**关键词:** 格特隐球菌; 基因型; 序列分析; 交配; 表型

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1460-06

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酵母,交配体系中存在  $\alpha$  和 a 2 种交配型。该菌常感染免疫正常人群,主要分布于热带、亚热带地区。分子分型结果表明,其由 VGI-VGIV 4 种主要基因型构成<sup>[1]</sup>。Kidd 等<sup>[2-3]</sup>对 1999 年至今在加拿大温哥华岛暴发的格特隐球菌病的致病株的分子分型结果表明,其流行株主要由 VGII 基因型中的 VGIIa 和 VGIIb 2 种亚型构成,且均为血清 B 型和  $\alpha$  交配型(MAT $\alpha$ )。其中,VGIIa 亚型占 90% 左右,其次为 VGIIb 亚型(约占 10%)。生物学特性分析显示,绝大部分 VGIIa 亚型和部分 VGIIb 亚型具备交配能力。Fraser 等<sup>[3]</sup>经遗传学分析表明,VGIIa 亚型很可能为 VGIIb 亚型与未知 VGII 基

因型经  $\alpha$ - $\alpha$  同性交配产生。近期的分子流行病学研究发现,温哥华岛流行株 VGIIa 和 VGIIb 亚型已向加拿大不列颠哥伦比亚低陆平原和美国西北部播散<sup>[4]</sup>。另有报道澳洲、加勒比等地区亦发现 VGIIb 亚型菌株<sup>[3]</sup>。

2008 年,我们在 4 个基因位点 MLST 分析的基础上,首次报道了在我国广东地区临床标本中存在 VGIIb 亚型相似株<sup>[5]</sup>。本研究将对我国首株 VGII 基因型和  $\alpha$  交配型菌株 XH91 进行进一步的分子和表型特征分析,以期阐明菌株 XH91 的特性及其与温哥华岛流行株间的关系,旨在为我国格特隐球菌病的分子流行病学研究和疾病监控提供重要资料。

**基金项目:** 国家自然科学基金(30870108);上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金

\* 通信作者。Tel: +86-21-65790000 转 6428; Fax: +86-21-65030840; E-mail: zryaosmu@sohu.com

**作者简介:** 冯晓博(1981-),男,硕士,上海人,研究方向为医学真菌学。E-mail: fxb213@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2010-04-21; **修回日期:** 2010-06-01

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株:** 新生隐球菌 H99 (MAT $\alpha$ , 血清 A 型), 格特隐球菌 R265 (VGIIa MAT $\alpha$  血清 B 型)、R272 (VGIIb MAT $\alpha$  血清 B 型)、NIH312 (MAT $\alpha$  血清 C 型)、B4546 (MATa 血清 C 型) 由美国杜克大学医学中心 Heitman J 教授馈赠; 格特隐球菌 XH91 (VGII MAT $\alpha$ ) 由我科真菌室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 高保真 *Taq* 酶、PCR 相关试剂、PMD-18 T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司。感受态细胞 (大肠杆菌 Top10) 由复旦大学遗传所任大明教授馈赠。PCR 产物纯化回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成。测序仪为上海杰李生物技术有限公司的 ABI-3730。培养基原料购自 Sigma、Campbell 和国药集团化学股份有限公司。分光光度计为美国 UNICO 公司产品。

### 1.2 DNA 模板制备

参照 Lin 等<sup>[6]</sup> 的 CTAB 提取法制备基因组 DNA。

### 1.3 血清型的分子鉴定

参照参考文献 [7], 对 CAP59 基因部分片段进行扩增, 引物和 PCR 反应条件稍作改动如下: CH-Cap 59F2: 5'-CCTTGCCGAAGTCCGAAAC-3', CH-Cap 59R: 5'-AATCGGTGTTGGATTACAGTGT-3'。PCR 反应条件: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 6 min。PCR 产物纯化回收后, 与 PMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 利用氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆送测序。对扩增的序列进行 *Age*I 酶切位点和长度多态性分析。

### 1.4 多位点序列分型 (MLST)

根据参考文献 [1, 3, 8-9], 以同时能区分 VGIIa 和 VGIIb 亚型为主要原则, 选取核基因组中 12 个基因多态位点 (其中 11 个为非连锁位点), 其中包括对 SXi1、CAP59、URA5、TEF1、FTR1、ICL1、RPB1、RPB2 8 个位点进行测序和序列分析, 另 4 个位点 (GEF1、GPD1、PLB1、IGS1) 测序结果见参考文献 [5]; 选取线粒体基因组中 4 个基因多态位点包括 ND2、ND4、ND5、ATP6 进行测序和序列分析。PCR 产物纯化回收后直接测序。涉及的引物和反应条件见表 1。

表 1 MLST 分型所用引物和反应条件

Table 1 The primers and PCR condition for MLST used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Annealing temperature/°C	Extension time/s	Cycles	Source
TEF1F	GCACGCTCTTCTCGCCTTCAC	57	50	30	3
TEF1R	GGTAGTCGGCGTAGGTCTCAAC				*
CAP59F	TCCGCTGCACAAGTGATACCC	57	50	30	3
CAP59R	CCTCTACGTCGAGCAAGTCAAG				*
SXiF	AGGGTACGTTTGAGGCCAGTT	57	50	30	3
SXiR	GAAAGCGTTGGCAAGGAATGA				3
URA5F	ATGTCCTCCCAAGCCCTCGAC	55	50	30	2
URA5R	TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC				2
FTR1F	TCAACTGTACTGACGCTGACC	52	50	30	3
FTR1R	GATGCTCAACTTACACCACCA				3
ICL1F	CTTGGCTTGAACGTCTGAGGG	57	50	30	3
ICL1R	CGGAAGCAAATAAGAAGCGATGT				*
RPB1F	GCTGTGAAAACCTCAAGGCTCG	57	50	30	*
RPB1R	GCTTCTAGGTCAAATCGTCTTCAC				*
RPB2F	GGTCTTATTCGGCTCCAGTC	52	50	30	*
RPB2R	CAGACGCCAAGAATCATACTC				*
ATP6F	CGACACACTTTATTACATCTCCAC	52	50	30	*
ATP6R	GAAGTCAATGGCATCCTTG				9
ND2F	ACTCCTGCCATTGAAAATAGAC	52	40	30	*
ND2R	ATTGGGACCTGATGTATATG				*
ND4F	GCGAATACTCTATCATTTTGTATC	55	30	30	*
ND4R	ACTTAGAAAGAAACCAAGCCATAG				*
ND5F	CAACAGGATGTCTAATGGCA	52	30	30	*
ND5R	CTTCATACCTGCCTTATTTGC				*

\* represent primers designed or modified in this study

## 1.5 交配能力

参照参考文献[2, 10], 将受试株(R265、R272、XH91)在YPD斜面培养基上生长48 h后, 取受试株分别与等量(菌悬液浓度 $10^6$ ) $\alpha$ 交配型和a交配型测试株(NIH312、B4546)混合均匀后, 接种于V8蔬菜汁培养基平板, 并设单独对照, 25℃培养4周。每天观察菌落周围菌丝的产生及显微镜下观察菌丝、担子和担孢子等结构的形成。单倍体繁育能力: 将受试株(R265、R272、XH91)在YPD斜面培养基上生长48 h后, 取等量受试株(菌悬液浓度 $10^6$ )分别划线接种促菌丝生成培养基, 25℃培养4周, 培养全程在黑暗中进行, 保持相对干燥。每天观察菌落周围菌丝的产生及显微镜下观察菌丝、担子和担孢子等结构的形成。

## 1.6 表型特征比较

参照参考文献[6, 10], 将受试株(H99、R265、R272、XH91)在YPD斜面培养基上生长48 h后, 调整菌悬液浓度依次为 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ , 分别接

种YPD培养基平板(30℃、37℃)、多巴培养基平板(30℃、37℃), 在24、48和72 h计算菌落平均生长速度和黑色素生成情况; 调整菌悬液浓度为 $10^6$ , 接种于DMEM液体培养基, 振荡培养48 h后, 经墨汁涂片, 显微镜下观测荚膜的平均厚度。采用SPSS13.0软件中的t检验对菌株间的表形分析结果进行比较,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清型鉴定

经片段长度多态性分析, 对XH91的CAP59基因扩增片段进行测序获得片段全长为373 bp, 表明为血清B型菌株; Age I酶切位点分析显示, XH91的CAP59片段在269 bp和270 bp间存在Age I限制性内切酶的酶切位点(图1), 亦符合血清B型菌株的判定标准。综合以上结果, 鉴定XH91为血清B型菌株。



图1 CAP59基因片段中Age I限制性内切酶的酶切位点

Fig. 1 The cutting site of restriction enzyme Age I in CAP59 gene fragment. Parentheses; serotype; Italic characters; the sequence recognized by Age I; Long arrow; the cutting site.

### 2.2 MLST分型结果

经对16个基因多态位点(核基因组12个、线粒体基因组4个)进行序列分析和比对, 结果显示我国首株VGII基因型菌株XH91的MLST基因型与

温哥华岛致病基因型VGIIb代表株R272完全一致, 结果见表2。GenBank登录号为HM132027-HM132038。

表2 菌株R265、R272和XH91的MLST分型结果示意图

Table 2 The schematic diagram of the MLST for strains R265, R272 and XH91

Strains	nuclear genes												mitochondria genes			
	SXi1	IGS1	TEF1	GPD1	PLB1	FTR1	GEF1	CAP59	ICL1	URA5	RPB1	RPB2	ND2	ATP6	ND4	ND5
R265	18	4	7	1	1	1	1	1	1	5	1	1	8	3	7	1
R272	19	10	5	6	2	2	1	2	2	7	2	1	7	3	8	2
XH91	19	10	5	6	2	2	1	2	2	7	2	1	7	3	8	2

The sequence information for reference strains R265 and R272 were cited from the references 1, 3, 5, 8 and 9.

### 2.3 交配及单倍体繁育能力评价

菌株XH91、R265均能与a交配型测试株B4546发生异性交配, 其中R265在接种后第16天发现明显的交配现象, XH91在第26 d时发现明显的交配现象, R272在4周观察期结束时仍无交配现

象; XH91、R265和R272均不能与 $\alpha$ 交配型测试株NIH312发生同性交配; XH91与R265、R272在促菌丝生成培养基上均不具备单倍体繁育能力(部分结果见图2)。

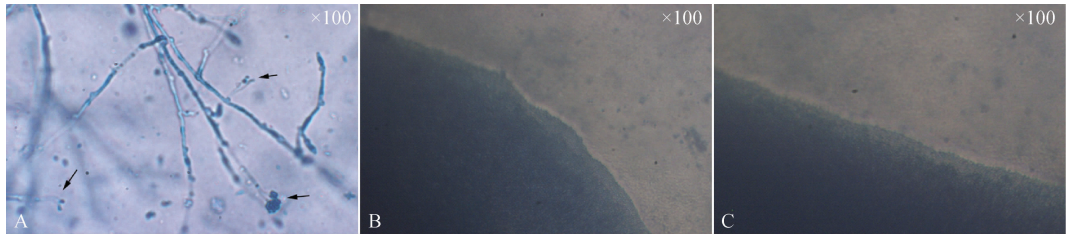


图 2 XH91 的异性交配 (A)、同性交配 (B) 及单倍体繁育能力 (C) 镜下观察结果

Fig. 2 Heterosexual mating (A), homosexual mating (B) and haploid fruiting (C) analysis under microscope. A: Hypha, basidium and basidiospores form; basidium and basidiospores are directed by arrows ( $400\times$ ); B and C: No hypha, basidium or basidiospores develop ( $100\times$ ).

## 2.4 表型分析

受试株 XH91 与参考株 H99、R265、R272 在  $37^{\circ}\text{C}$  下的 24、48、72 h 观察点上生长速度无明显差异, 受试株 XH91 与 H99、R265、R272 在 24、48、72 h

观察点上的黑色素产生上无明显差异; 但所有受试株在  $30^{\circ}\text{C}$  时的产黑能力均明显强于在  $37^{\circ}\text{C}$  时的产黑能力 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。XH91 的荚膜厚度与菌株 H99、R265、R272 无明显差异 (图 4)。

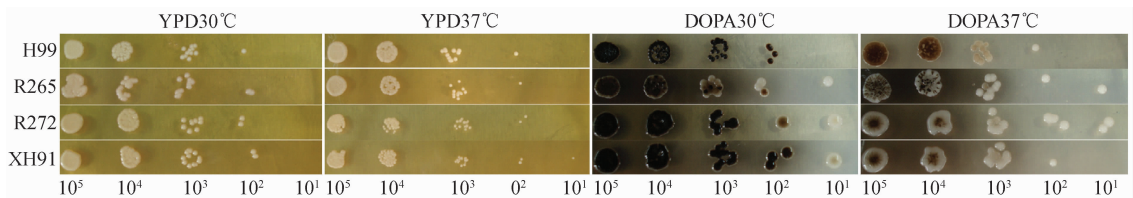


图 3 表型分析结果

Fig. 3 Phenotypic analysis. From left to right: growth at  $30^{\circ}\text{C}$ , growth at  $37^{\circ}\text{C}$ , melanin production at  $30^{\circ}\text{C}$ , melanin production at  $37^{\circ}\text{C}$ ;  $10^5$  to  $10^1$ : 10-fold serial dilutions.

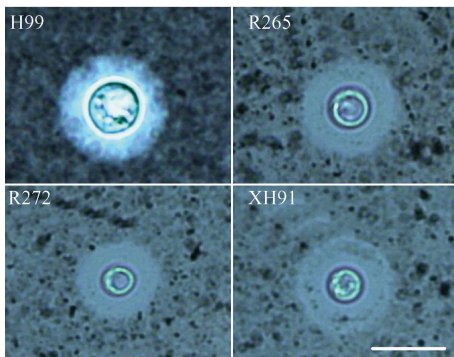


图 4 菌株荚膜厚度比较 ( $400\times$ )

Fig. 4 The results for phenotypic analysis (capsule comparison under microscope,  $400\times$ ). Scale bar:  $10\ \mu\text{m}$ .

## 3 讨论

格特隐球菌是一种致命的病原真菌, 多感染免疫力正常人群, 感染多形成肉芽肿病变, 需要较长的治疗周期。该菌主要分布于热带、亚热带地区, 一直以来只占临床株的少数。然而, 地处温带地区的加拿大温哥华岛及周边地区却暴发格特隐球菌病的流行。从 1999 到 2007 年止, 该地区格特隐球菌感染病例超过 200 例, 且被感染的宿主大部分免疫力正

常, 就医患者大部分出现呼吸道症状或肺部隐球菌肉芽肿 ( $>75\%$ )<sup>[11]</sup>。

Goddard 等<sup>[12]</sup>研究发现, 酵母菌经有性繁殖后产生的子代比无性克隆的子代具有更强的环境适应能力。分子流行病学调查发现, 温哥华岛分离的致病菌几乎均为 VGII 基因型 ( $>97\%$ ), 且大部分具有交配能力, 被证明为有性交配后产生的重组子代<sup>[2-3]</sup>。其中, 流行株由 VGIIa 和 VGIIb 2 种亚型构成, 尽管 VGIIa 亚型毒力较强, 但 VGIIb 亚型更与较高的致死率相关<sup>[3,11]</sup>。经 MLST 分析表明, 该地区的 VGIIa 亚型除与菌株 NIH444 (分离于美国西雅图) 序列相同外, 与世界范围内其它地区菌株的序列均不相同 (多个位点存在碱基差异); 而 VGIIb 亚型除发现于该地区外, 还发现于其它地理上远隔的地区如泰国、澳洲等<sup>[3,8]</sup>。本文经 16 个基因位点的 MLST 分型进一步证实了我国首株 VGII 基因型菌株 XH91 即为 VGIIb 亚型, 从而表明 VGIIb 亚型可有更广的分布范围。

有性交配产生的担孢子由于其直径小、易于播散和强致病性被怀疑与此次暴发流行相关。据报

道,隐球菌的担孢子可由异性交配、同性交配及单倍体繁育这3种生物学行为产生<sup>[3]</sup>。Fraser等<sup>[3]</sup>经遗传学分析认为,主要致病亚型 VGIIa 很可能是  $\alpha$ - $\alpha$  同性交配后产生的重组子代,而 VGIIb 被怀疑是其父本之一。本文对受试株的测试未发现 VGIIb 菌株的同性交配和单倍体繁育能力,可能与实验室环境与自然环境的差异有关,亦或暗示这2种亚型的其它可能来源,有待进一步研究。最近研究发现,此次暴发流行与致病菌线粒体基因组的高表达相关,而格特隐球菌的线粒体基因组已发现存在重组现象<sup>[9,13]</sup>。本文对菌株 XH91 的4个线粒体基因多态位点分析后,发现其与菌株 R272 序列完全一致。另外,对黑色素生成、荚膜厚度及 37°C 生长等表型特性分析未发现 XH91 与参考株间的差异,与文献报道相似<sup>[13]</sup>。本研究对首次分离自我国临床的格特隐球菌 VGII 基因型菌株的分子和表型特征进行了报道,以期为我国格特隐球菌 VGII 基因型的分子流行病学和疾病监控提供重要资料。

## 参考文献

- [ 1 ] Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal genetics and biology*, 2008, 45(4):400-421.
- [ 2 ] Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the national academy of sciences*, 2004, 101(49):17258-17263.
- [ 3 ] Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*, 2005, 437(7063):1360-1364.
- [ 4 ] MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, Kronstad JW, Morshed MG, Bartlett KH. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerging infectious diseases*, 2007, 13(1):42-50.
- [ 5 ] Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W, Wu J. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8(6):930-938.
- [ 6 ] Lin X, Patel S, Litvitseva AP, Floyd A, Mitchell TG, Heitman J. Diploids in the *Cryptococcus neoformans* serotype A population homozygous for the alpha mating type originate via unisexual mating. *PLoS Pathogen*, 2009, 5(1):e1000283.
- [ 7 ] Enache-Angoulvant A, Chandener J, Symoens F, Lacube P, Bolognini J, Douchet C, Poirot JL, Hennequin C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *Journal of clinical microbiology*, 2007, 45(4):1261-1265.
- [ 8 ] Kidd SE, Guo H, Bartlett KH, Xu J, Kronstad JW. Comparative gene genealogies indicate that two clonal lineages of *Cryptococcus gattii* in British Columbia resemble strains from other geographical areas. *Eukaryotic cell*, 2005, 4(10):1629-1638.
- [ 9 ] Xu J, Yan Z, Guo H. Divergence, hybridization, and recombination in the mitochondrial genome of the human pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*. *Molecular ecology*, 2009, 18(12):2628-2642.
- [ 10 ] Chaturvedi S, Ren P, Narasipura SD, Chaturvedi V. Selection of optimal host strain for molecular pathogenesis studies on *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia*, 2005, 160(3):207-215.
- [ 11 ] Galanis E, Macdougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerging infectious disease*, 2010, 16(2):251-257.
- [ 12 ] Goddard MR, Godfray HC, Burt A. Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature*, 2005, 434(7033):636-640.
- [ 13 ] Ma H, Hagen F, Stekel DJ, Johnston SA, Sionov E, Falk R, Polacheck I, Boekhout T, May RC. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2009, 106(31):12980-12985.

# Molecular and phenotypic characterization of a VGII genotype *Cryptococcus gattii* XH91 isolated in China

Xiaobo Feng<sup>1</sup>, Jingsong Wu<sup>2</sup>, Bo Ling<sup>1</sup>, Daming Ren<sup>3</sup>, Zhirong Yao<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Dermatology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, School of Medicine, Shanghai 200092, China)

(<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Shenzhen People's Hospital, the Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, China)

(<sup>3</sup>State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** [Objective] To characterize the molecular and phenotypic traits of the VGII genotype of *Cryptococcus gattii* isolate XH91 firstly isolated in China. [Methods] The serotype was identified by molecular method; multi-locus sequence typing (MLST) was performed based on 16 gene fragments both of nuclear and mitochondria genomes; the abilities of haploid fruiting, same-sex mating and opposite sex mating were all evaluated; the phenotypic traits including melanin production, capsule size, and growth at 37°C were characterized. [Results] The isolate XH91 firstly isolated in China was serotype B. The isolate shared the same MLST genotype with the minor outbreak genotype VGIIb from Vancouver islands. Strain XH91 could mate with the reference strain of opposite mating type and produced basidiospores, but could not mate with the reference strain of same mating type and had no ability of haploid fruiting. We did not observe obvious difference between XH91 and reference strains for melanin production, capsule size, and growth at 37°C. [Conclusion] Based on the results from MLST and phenotypic analysis, the *Cryptococcus gattii* strain XH91 is identical with the minor outbreak genotype VGIIb from Vancouver islands. This study will be critical to gain further insight into the emergence and molecular epidemiology of the VGII genotype of *Cryptococcus gattii* from China.

**Keywords:** *Cryptococcus gattii*; genotype; sequence analysis; mating; phenotype

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870108)

\* Corresponding author. Tel: +86-21-65790000 ext 6428; Fax: +86-21-65030840; E-mail: zryaosmu@sohu.com

Received: 21 April 2010 / Revised: 1 June 2010

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。