

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.05.021

· 综述 ·

白假丝酵母菌基因分型方法的研究进展

Advances in genotyping methods of *Candida albicans*

肖 喻 (XIAO Yu), 曹先伟 (CAO Xian-wei)

(南昌大学第一附属医院, 江西 南昌 330006)

(The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[关键词] 真菌; 白假丝酵母菌; 基因分型; 流行病学

[中图分类号] R379.4 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2017)05-0482-05

随着医疗技术的快速发展,各种医用材料和侵入性操作技术在临床广泛应用,广谱抗菌药物、糖皮质激素和免疫抑制剂在临床的大量使用,医院内真菌感染的比例越来越高,其中白假丝酵母菌在真菌感染中所占比例最高,是临床中常见的致病菌之一。白假丝酵母菌主要引起皮肤、黏膜的浅表部位感染,侵袭性呼吸系统感染和血流感染等,其中血流感染相对严重,如白假丝酵母菌血症。早在二十世纪八十年代, Pfaller 等^[1]报道,侵袭性假丝酵母菌感染的发病率有上升趋势,应引起临床医生的重视。近十几年,假丝酵母菌在美国和欧洲引起医院感染的致病菌中分别占第四位和第六位^[2]。在亚洲假丝酵母菌引起医院感染的发病率也相对较高^[3]。尽管有较多抗真菌药物可以用来治疗侵袭性假丝酵母菌感染,但其病死率仍然在 30% 左右^[2-3]。利用分子生物学的方法,可以对假丝酵母菌进行同源性分析和查找传播途径。从而为制定预防和控制假丝酵母菌医院感染流行、传播的有效措施提供理论依据。

二十世纪,白假丝酵母菌的分型方法主要是根据白假丝酵母菌菌落形态和药物敏感性进行分类,如形态型分型、血清型分型和耐药性分型^[4]。而上述分型方法分辨率低,可重复性差,而且分型结果很容易受到外界环境的影响,因此不能作为白假丝酵母菌分型的标准方法。随着分子生物学的快速发展,以 DNA 为基础的分子生物学技术在白假丝酵母菌的分型、诊断及流行病学研究中得到广泛应用。

白假丝酵母菌流行病学研究中常用的基因分型方法主要有多位点酶电泳 (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、限制片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、微卫星长度多态性 (microsatellite length polymorphism, MLP) 和多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST)。本文将对此 7 种基因分型方法进行综述。

1 MLEE 分型

MLEE 是从“一酶一基因”的学说发展起来的,早在二十世纪六十年代就已经提出,1985 年 Selander 对 MLEE 改进后用于病原微生物的分型研究。MLEE 主要通过检测病原微生物的水溶性代谢酶,从而对菌株进行分型。MLEE 是检测酶蛋白的多态性来反映基因位点的多态性。酶蛋白的泳动度主要是由蛋白的分子结构及其所带电荷决定,而编码酶蛋白 DNA 序列中的任意一个碱基发生变化 (主要为碱基的替换、插入、删除) 均可能导致酶蛋白的泳动度发生变化。当两株菌的酶蛋白泳动度不同时,可认为其 DNA 序列不同,从而对菌株进行基因

[收稿日期] 2016-07-25

[作者简介] 肖喻(1990-),男(汉族),湖北省荆州市人,硕士研究生,主要从事真菌感染相关的研究。

[通信作者] 曹先伟 E-mail: ndyfygk@163.com

分型^[5]。

MLEE 是最早用于白假丝酵母菌流行病学研究的基因分型方法。Pujol 等^[6]首次用 MLEE 方法对白假丝酵母菌的菌群分布进行了研究,此后,MLEE 逐渐被用于其他假丝酵母菌的流行病学研究,如热带假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、都柏林假丝酵母菌等^[7]。MLEE 是一种分辨率一般但重复性较好的基因分型方法,重复性甚至优于以 DNA 为基础的其他基因分型方法^[5,8]。但是,MLEE 不能直接分析白假丝酵母菌的全基因组,且操作耗时较长。另外,MLEE 不能检测基因的全部序列,特别是碱基发生变化时未引起氨基酸和蛋白质的空间结构发生变化的基因序列。单一的酶切使得 MLEE 在检测白假丝酵母菌时并不敏感,但联合多个酶切位点可提高 MLEE 的敏感性。Boriollo 等^[5]联合 11 个酶切位点对白假丝酵母菌进行基因分型,结果显示多个酶切位点联合方法可明显提高 MLEE 的敏感性,可准确地对白假丝酵母菌进行基因分型。因此,MLEE 至今仍然是白假丝酵母菌分子流行病学研究中的重要分型方法。

2 RAPD 分型

RAPD 是由 Williams 等提出的一种以随机排列的寡核苷酸单链(通常不超过 10 bp)为引物扩增基因组 DNA 的基因分型方法。该技术以 PCR 方法为基础,由一系列人工随机合成的寡聚核苷酸单链为引物,对碱基组进行单引物扩增。扩增片段经琼脂糖凝胶电泳,然后通过 EB 染色或放射自显影检测,从而观察待测 DNA 的多态性。这些扩增片段 DNA 的多态性主要由琼脂糖凝胶上条带的数量和位置决定。因此,当不相关菌株的基因差异较大时,RAPD 将呈现出较复杂的结果。目前,RAPD 已经在假丝酵母菌属和其他真菌的分型中得到广泛运用,如白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、烟曲霉等^[9-10]。RAPD 广泛用于菌株分型的原因主要是操作简便、耗时少、成本低、引物可以随意设计,而且不需要知道待测 DNA 的碱基序列^[9]。但是,RAPD 的分辨率一般,研究^[5-6]发现,RAPD 和 MLEE 的结果有很高的相似性。若研究者要得到分辨率较高的结果,需设计多对引物进行扩增^[5]。RAPD 可对不相关的、集群相关的、相同或相关的白假丝酵母菌进行基因分型,即 RAPD 适合所有白假丝酵母菌的流行病学研究^[9]。

尽管 RAPD 在白假丝酵母菌流行病学研究中已经得到广泛应用,但是仍然存在 2 个不足之处,即重复性和实验结果可比性差。由于该方法对实验室技术和设备要求不高^[9],仍广泛应用于假丝酵母菌属的基因分型研究。Biernasiuk 等^[11]用 RAPD 方法对 100 例非小细胞肺癌患者上呼吸道分泌物中分离的白假丝酵母菌进行分型,52 株白假丝酵母菌可分为 34 个基因型,其中 28 株白假丝酵母菌有 10 个基因型,且相似度高达 80% 以上,其余的 24 株白假丝酵母菌有 24 个基因型。该研究显示 RAPD 可对癌症患者上呼吸道分离的白假丝酵母菌进行基因分型,因此,RAPD 仍被广泛用于白假丝酵母菌的诊断及流行病学的研究。

3 AFLP 分型

AFLP 是二十世纪九十年代由 Zabeau 等发展起来的一种新的分子标记技术。该方法主要是通过使用 2 种不同的限制性内切酶对整个基因组 DNA 进行酶切,然后将人工合成的特异双链接头连接在这些片段的两端,形成一个带接头的特异片段,用这些特异片段作为 PCR 扩增反应的模板,通过接头序列与引物 3' 一端的荧光标记识别,然后对特异性片段进行选择性的扩增。扩增产物通过琼脂糖凝胶进行电泳,然后对电泳的条带进行分析,进而得到待测标本的基因型。

AFLP 是一种具有多位点标记和高分辨率的基因分型方法。该方法不需要了解待测标本的基因序列。AFLP 基因分型方法需要荧光标记的引物,并且实验条件也较严格^[12],因此 AFLP 的重复性比 RAPD 好。

尽管 AFLP 是一种分辨率高且重复性好的基因分型方法,但是因为该方法操作较繁琐,成本高,而且对实验者的操作技术要求较为严格^[12-13]。因此,在白假丝酵母菌的流行病学研究中使用较少。

4 RFLP 分型

RFLP 是由 Kan 等在 1978 年提出的一种方法,用不同的限制性核酸内切酶对检测的 DNA 进行酶切,根据酶切后 DNA 片段的分子量和长度推断 DNA 酶切位点数目和位置的差异,进而对菌株进行基因分型。目前,白假丝酵母菌进行 RFLP 分型常用的两个限制性核酸内切酶为 EcoR I 和 Msp I。

EcoR I 酶切和 Msp I 酶切后均可以产生 6 个基因型,两者联合酶切后可以产生 17 个基因型。RFLP 分型方法分辨力低但重复性好,容易操作,耗时少;但不能单独用来分析白假丝酵母菌菌种间的基因型关系。Ge 等^[12]用 RFLP 方法对 42 株白假丝酵母菌进行基因分型,共分为 1 个基因型,该研究显示单独应用 RFLP 不能较好地分析白假丝酵母菌基因型。有学者应用 RFLP 联合其他方法对白假丝酵母菌进行基因分型,结果显示两者联合后可以提高 RFLP 对白假丝酵母菌的分型能力,因此,此种 RFLP 联合方法在白假丝酵母菌的基因分型中可推广应用^[12,14]。

5 PFGE 分型

PFGE 是 1984 年由 Schwartz 等报道的一种以 DNA 为基础的基因分型方法,并用该方法首次成功分析了酿酒酵母菌的全基因组。PFGE 是通过改变脉冲电场的方向、时间和电流,使不同大小的 DNA 片段在琼脂糖凝胶上不断改变移动方向。随着电场方向变化,小的 DNA 分子比大的变化快,从而根据分子量的大小区分不同 DNA 片段,最后根据电泳带型对菌株进行基因分型。PFGE 分型首先是用低熔点琼脂糖包埋细菌染色体 DNA,在整个包埋过程中低熔点琼脂糖需阻止机械力对 DNA 的剪切作用,然后将蛋白酶和洗涤剂加入样品中进行水解,再根据待测 DNA 分子量的差异,使其在琼脂糖凝胶不同位置上出现条带,再对这些条带进行综合分析,根据条带类型确定菌株的基因型。PFGE 是一种容易操作,且重复性较好的基因分型方法。但由于该方法的实验成本高,耗时较长,且需要专门的仪器设备,临床研究中使用相对较少^[5,7]。白假丝酵母菌染色体 DNA 分子量大小为 1~4 Mb,PFGE 对此范围的 DNA 片段相对敏感。1987 年 Magee 用 PFGE 方法对白假丝酵母菌进行基因分型,此后越来越多的学者用 PFGE 方法研究白假丝酵母菌的流行病学,但该方法分辨力一般^[5,15]。有学者运用 PFGE 联合其他基因分型方法对白假丝酵母菌进行分型,可以明显提高基因分型的分辨率。Boriollo 联合运用 MLEE、PFGE 和 MLP 三种分型方法对 75 株白假丝酵母菌进行基因分型,MLEE 基因分型方法的同工酶包括以下 11 种:adh、sdh、mip、mdh、idh、gdh、g6pdh、asd、cat、po 和 lap;PFGE 用 CHEF 系统对白假丝酵母菌进行基因分型;MLP 用 3 个多态

性位点(EF3、CDC3 和 HIS3)对白假丝酵母菌进行基因分型,3 种基因型分型方法的分辨力均高达 95%,可较好的分辨 DNA 片段差异性,联合运用此 3 种基因分型方法可明显提高分辨力^[5]。因此,PFGE 常与其他基因分型方法联合用于假丝酵母菌的流行病学研究。

6 MLP 分型

MLP 又被称为短串联序列。MLP 是一种根据少数几个脱氧寡核苷酸(多数为 2~6 个)为单位进行多次 DNA 序列串联重复的微生物分型方法^[16]。MLP 的检测主要利用 PCR 方法,微卫星的标记物主要由侧翼序列和标记引物共同构成。人工合成微卫星标记引物的引物序列,然后通过引物序列对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,染色后对电泳结果进行分析。微卫星的标记引物主要由荧光和同位素组成,通过电泳成像后可以观察 PCR 扩增之后的目的片段大小,从而分析目的片段的多态性。若是无荧光标记的引物可通过银染显色观察结果^[17]。随着二代测序的推广,目的片段可监测其片段重复数。对于二倍体生物,如白假丝酵母菌,当重复数较单一时,表示该生物为纯合子;相反,如果重复数较复杂时,显示该生物为杂合子^[16]。Sampaio 等^[17]在 2005 年首次用此技术对白假丝酵母菌进行基因分型研究。

MLP 在白假丝酵母菌的分型研究中有较高的分辨率^[17]。但是,该方法分辨率的高低与微卫星标记物的选择有关。目前,已有文献^[4]报道白假丝酵母菌的微卫星标记物主要有 EF3、CDC3、HIS3、ERK1、2NF1、CCN2、CPH2、EFG1、CAI、CAII 和 CAVIII。上述微卫星标记物的分辨率在 0.57~0.97(CAI)之间^[16-17]。微卫星标记物的选取主要依据标记物的分型性能、突变率和分辨率三个方面。两种或三种微卫星标记物联合可以明显提高分辨率。Botterel 等^[18]联合使用 EF3、CDC3 和 HIS3 三种微卫星标记物对白假丝酵母菌进行分型,联合后的分辨率高达 0.97。目前,已报道的文献中分辨率最高的组合是 Sampaio 等^[17]联合使用的 CAI、CAII 和 CAVI 组合,其分辨率高达 0.998。有学者利用高分辨率的熔解曲线技术和 MLP 对白假丝酵母菌进行基因分型,可明显提高 MLP 的分辨率^[15,19]。

MLP 分型与其他的基因分型方法相比,更适合多样本分析^[17-18]。该方法重复性好,但由于实验室

之间的设备存在较大差异, 数据交流不方便^[19]。

MLP 广泛应用于白假丝酵母菌、烟曲霉菌和隐球菌的流行病学研究, 但其实验设备的费用较高^[19-20]。为尽量降低实验室检测费用, 我国学者采用单链构象多态性和微卫星标记物 CAI 联合对白假丝酵母菌进行基因分型, 分辨率高达 0.993^[20], 实验成本低, 易推广应用。

7 MLST 分型

MLST 是由 Maiden 在 1998 年提出的通过分析 6~10 个管家基因(400~500 bp)核苷酸序列的多态性, 对致病微生物进行基因分型的一种方法。MLST 选择的管家基因均相对保守, 受环境因素影响较小, 其次可以得到多个等位基因分型。在每个管家基因中, 不同的碱基序列可认为是不同的等位基因。MLST 主要是通过设计管家基因引物, 运用 PCR 方法对 DNA 进行扩增, 得到待测菌株的管家基因片段。每个管家基因片段对应一个等位基因, 每株菌的多位点序列分型是由多个等位基因共同得到的一个序列型(ST)。由于白假丝酵母菌为二倍体生物, 在 MLST 的核苷酸分型时可出现同一位点的杂合性(同一位点出现 2 个碱基), 因此 Bounoux 等^[21]将白假丝酵母菌的 MLST 分型结果定义为二倍体序列型(DSTs)。

二十世纪, MLST 首次用于白假丝酵母菌的基因分型, 随着白假丝酵母菌 MLST 方法的不断改进, 2003 年 Bounoux 提出了白假丝酵母菌 MLST 的标准实验方案, 且创建了白假丝酵母菌的 MLST 数据库(<http://calbicans.mlst.net/>)。该数据库为全球公用数据库, 可随时对数据库中白假丝酵母菌 MLST 信息进行更新^[21], 不仅有利于全球白假丝酵母菌的信息交流, 而且有利于研究全球白假丝酵母菌的流行病学和微进化关系^[22]。已有学者利用白假丝酵母菌 MLST 数据库进行了大样本的流行病学研究^[22-23]。为了解某教学医院白假丝酵母菌基因多态性, 中国学者收集 40 例白假丝酵母菌感染患者分离的 62 株白假丝酵母菌, 经过 7 个管家基因扩增后, 共获到 50 个二倍体序列型, 其中有 41 个为新发现的二倍体序列型^[23]。

在白假丝酵母菌的 MLST 分型研究中, 通过分析 7 个管家基因对菌株分型, 而 7 个管家基因的分子量相对白假丝酵母菌全基因组则非常小, 管家基因主要集中在第 3、5 和 7 号染色体上, 因此 MLST

基因分型方法不够准确^[4]。但是, 与其他分型方法相比, 该方法省时, 便于操作, 且分辨率和重复性都较好^[17, 22-23], 实验室之间的数据交流方便。因此, 越来越多的学者用 MLST 方法研究白假丝酵母菌的流行病学和微进化关系。

7 种基因分型方法各有优点和缺点, 见表 1。

表 1 7 种白假丝酵母菌基因分型方法优缺点

方法	分辨率	重复性	操作性	理解性	花费	交流性	时间
MLEE	高	好	非常难	难	低	差	耗时
RAPD	高	差	非常容易	容易	中等	中等	省时
AFLP	高	好	难	容易	中等	中等	较省时
RFLP	高	好	容易	容易	中等	中等	较省时
PFGE	高	好	容易	容易	高	中等	较省时
MLP	非常高	非常好	非常容易	非常容易	非常高	中等	省时
MLST	非常高	非常好	中等	非常容易	非常高	非常好	较省时

8 结论与展望

综上所述, 7 种白假丝酵母菌基因分型方法均可有效地、准确地研究白假丝酵母菌的流行病学和微进化关系, 可为临床疾病的防治提供实验室依据。随着基因测序的飞速发展, 白假丝酵母菌的基因分型方法将逐渐完善, 更加精准。

[参考文献]

- [1] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1): 133-163.
- [2] Bassetti M, Merelli M, Righi E, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(12): 4167-4172.
- [3] Tan BH, Chakrabarti A, Li RY, et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratory-based surveillance study[J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(10): 946-953.
- [4] Saghrouni F, Ben Abdeljelil J, Boukadida J, et al. Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: a review[J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(6): 1559-1574.
- [5] Boriollo MF, Dias RA, Fiorini JE, et al. Disparity between multilocus enzyme electrophoresis, microsatellite markers and pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological tracking of *Candida albicans*[J]. J Microbiol Methods, 2010, 82(3): 265-281.
- [6] Pujol C, Reynes J, Renaud F, et al. The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infec-

- ted human immunodeficiency virus-positive patients[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(20): 9456-9459.
- [7] Araujo R. Towards the genotyping of fungi: methods, benefits and challenges[J]. Curr Fungal Infect Rep, 2014, 8(3): 203-210.
- [8] Santos PO, Melo JO, Ponzzes CM, et al. Multilocus enzyme electrophoresis analysis and exoenzymatic activity of *Candida albicans* strains isolated from women with vaginal candidiasis [J]. Mycoses, 2012, 55(1): 64-72.
- [9] Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(12): 3249-3254.
- [10] Ao JH, Hao ZF, Zhu H, et al. Environmental investigations and molecular typing of *Aspergillus* in a Chinese hospital[J]. Mycopathologia, 2014, 177 (1-2): 51-57.
- [11] Biernasiuk A, Korona-Główniak I, Grzegorzczak A, et al. Differentiation by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) of *Candida albicans* isolated from upper respiratory tract in patients with non-small cell lung cancer[J]. Acta Biochim Pol, 2014, 61 (4): 727-729.
- [12] Ge YP, Wang L, Lu GX, et al. A simple and reliable PCR-restriction fragment length polymorphism assay to identify *Candida albicans* and its closely related *Candida dubliniensis* [J]. Braz J Microbiol, 2012, 43 (3): 873-879.
- [13] Levterova V, Panaiotov S, Brankova N, et al. Typing of genetic markers involved in stress response by fluorescent cDNA-amplified fragment length polymorphism technique[J]. Mol Biotechnol, 2010, 45 (1): 34-38.
- [14] Vijayakumar R, Giri S, Kindo AJ, et al. Molecular species identification of *Candida* from blood samples of intensive care unit patients by polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism [J]. J Lab Physicians, 2012, 4 (1): 1-4.
- [15] Ben Abdeljelil J, Saghrouni F, Emira N, et al. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from patients and health care workers in a neonatal intensive care unit[J]. J Appl Microbiol, 2011, 111(5): 1235-1249.
- [16] Sampaio P, Gusmão L, Alves C, et al. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2): 552-557.
- [17] Sampaio P, Gusmão L, Correia A, et al. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3869-3876.
- [18] Botterel F, Desterke C, Costa C, et al. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(11): 4076-4081.
- [19] Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M, Bretagne S. Typing *Candida* species using microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1356: 199-214.
- [20] Li J, Bai FY. Single-strand conformation polymorphism of microsatellite for rapid strain typing of *Candida albicans* [J]. Med Mycol, 2007, 45(7): 629-635.
- [21] Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(11): 5265-5266.
- [22] Tavanti A, Davidson AD, Fordyce MJ, et al. Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (11): 5601-5613.
- [23] Wu K, Luo T, Li L, et al. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida albicans* isolates collected from a teaching hospital in Shanghai, China: a molecular epidemiology study [J]. PloS One, 2015, 10(4): e0125245.

(本文编辑:孟秀娟)