

rDNA-ITS 序列分析鉴定皮肤癣菌的应用评价

夏继宁^{1*}, 张能华², 范建国¹, 项晶¹

¹嘉兴市中医医院皮肤科, ²检验科, 浙江 嘉兴 314001

[摘要] 目的:探讨对核糖体RNA(ribosomal RNA, rDNA)内转录间隔区(internal transcribed space, ITS)的基因扩增测序技术在皮肤癣菌鉴定中的应用价值。方法:从39株临床收集的皮肤癣菌临床标本和经培养后的标本中分别提取DNA,应用通用引物ITS1和ITS4进行PCR扩增和基因测序,测序结果在NCBI的基因库中查询,通过BLAST工具比对分析进行rDNA-ITS序列分析分子鉴定。同时根据形态特征、生长特性以及生理生化指标对经培养后的标本进行表型鉴定,并与分子鉴定结果相比较。结果:两组标本均成功扩增到ITS靶基因,经测序分析,临床标本和经培养后标本rDNA-ITS序列分析结果一致,与表型鉴定结果相吻合。结论:直接从临床标本中提取致病菌DNA并进行ITS基因序列扩增和测序分析可快速、有效鉴定皮肤癣菌。

[关键词] 皮肤癣菌;内转录间隔区;菌种鉴定

[中图分类号] R692

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)11-1648-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20181138

浅部真菌病的主要致病菌种为皮肤癣菌。鉴定皮肤癣菌的方法通常为观察菌落及镜下形态学特征、生长特性以及生理生化指标。随着科技进步及临床需求的提高,真菌分型、鉴定研究逐步引入分子生物学。本研究以皮肤癣菌临床标本和经培养后的标本为研究对象,分别对其进行表型鉴定和核糖体RNA(ribosomal RNA, rDNA)内转录间隔区(internal transcribed space, ITS)序列分析分子鉴定,评价其应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

收集嘉兴市中医医院皮肤科门诊2015年6月—2017年10月皮肤癣菌临床株共39株,取材前先用75%乙醇局部消毒,刮取体癣、股癣、手足癣患者的皮屑或甲癣的甲内侧碎屑,头癣采集其断发及断发处皮屑。采集的标本分为两部分,一部分接种于沙氏琼脂(Sabouraud's dextrose agar, SDA)培养基,另一部分留取于无菌Ep管中以备提取DNA。

Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒、Taq酶dNTP、DNA marker D、真菌ITS基因通用引物ITS1和ITS4(上海生工公司);恒温金属浴、微量离心机、旋涡混合仪、ABI热循环仪。

1.2 方法

1.2.1 分离培养

临床标本接种于SDA培养基,25℃培养1~2周。

1.2.2 表型鉴定

根据形态特征、生长特性以及生理生化指标进行表型鉴定。诊断标准参考《医学真菌学——实验室检验指南》^[1]和《临床常见皮肤癣菌的特征和鉴定》^[2]。

1.2.3 分子生物学鉴定

选取临床标本和经SDA培养基上25℃培养1周的菌落标本,按照说明书使用Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒分别提取基因组DNA。采用通用引物ITS1和ITS4进行PCR扩增。ITS1 5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4 5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3'。反应体系的制备:2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, 10×buffer 5 μL, 10 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 10 μmol/L引物各1 μL, Taq DNA聚合酶2 U, 模板DNA 2 μL, ddH₂O补足至50 μL。反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性45 s, 53℃退火45 s, 72℃延伸75 s, 35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物扩增后送上海生工进行双向测序,测序结果在NCBI的基因库中查询,并通过BLAST工具比对分析。靶区域序列比对鉴定标准如下^[3]。①鉴定至种:与某确定的菌种序列相似度≥98%,且与另一不同种的相似度差至少0.8%;②鉴定至属:与某确定的菌种序列相似度≥95%但<98%,或与同一个属内的不同菌种序列相似度≥98%;③无法鉴定:与任何一菌种

[基金项目] 嘉兴市科技局科技计划项目(2014AY21033-4)

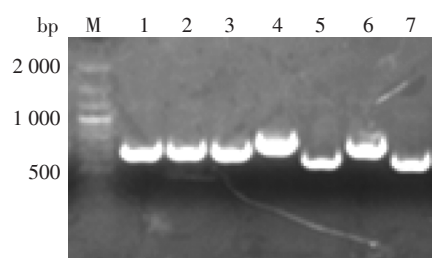
*通信作者(Corresponding author), E-mail: dermatoxia@163.com

序列的相似度 < 95% 或与不同属的菌种均有 ≥95% 的序列相似度。

2 结果

毛癣菌属 28 株(红色毛癣菌 15 株、须癣毛癣菌 8 株、断发毛癣菌 2 株、紫色毛癣菌 3 株),小孢子菌属 8 株(犬小孢子菌 5 株、石膏样小孢子菌 3 株),表皮癣菌属 3 株(絮状表皮癣菌 3 株)。

PCR 扩增结果显示,39 株皮肤癣菌以通用引物 ITS1 和 ITS4 进行扩增,均能扩增出目标条带,大小 500~1 000 bp(图 1)。



M: DNA marker D; 1: 须癣毛癣菌; 2: 红色毛癣菌; 3: 断发毛癣菌; 4: 絮状表皮癣菌; 5: 石膏样小孢子菌; 6: 犬小孢子菌; 7: 紫色毛癣菌。

图 1 部分皮肤癣菌 ITS1 和 ITS4 基因 PCR 产物电泳

测序结果在 NCBI 的基因库中检索,利用 BLAST 工具比对分析。临床标本和经培养后的标本 ITS 基因序列分析结果一致(表 1)。

表 1 39 株临床分离的皮肤癣菌 ITS 基因序列分析结果

属名	经 ITS 基因序列鉴定至种	株数
毛癣菌属 (n=28)	红色毛癣菌	15
	须癣毛癣菌	8
	断发毛癣菌	2
	紫色毛癣菌	3
小孢子菌属 (n=8)	犬小孢子菌	5
	石膏样小孢子菌	3
表皮癣菌属 (n=3)	絮状表皮癣菌	3

部分菌株 GenBank 登录号及相似度:红色毛癣菌(LC369522.1, 100%)、须癣毛癣菌(LC317438.1, 100%)、断发毛癣菌(AB094063.1, 100%)、紫色毛癣菌(LC317892.1, 100%)、犬小孢子菌(LC317666.1, 99%)、石膏样小孢子菌(KJ139449.1, 99%)、絮状表皮癣菌(LC317573.1, 100%)。

3 讨论

皮肤癣菌的诊断一直依赖真菌镜检和培养,至少需要 1~2 周。皮肤癣菌在培养鉴定过程中容易变异^[4],并且混合真菌感染培养过程中会出现菌种的优势生长和竞争性抑制而出现误差和意见分歧。

从临床标本中直接提取致病菌 DNA 进行目的基因的扩增及鉴定,有助于解决这一问题。真菌 DNA 的提取较为困难,主要与真菌特殊的细胞壁结构有关。真菌细胞壁中主要以几丁质构成其骨架结构,而几丁质是以 N-乙酰基葡萄糖胺为单体的聚合物,它的糖链上含有大量羟基,不易充分裂解。笔者先行使用蛋白酶 K 进行破壁,再用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒进一步裂解,然后去杂质纯化 DNA,完成真菌 DNA 提取。在对临床标本及培养标本进行真菌 DNA 提取过程中发现,部分样本量少的临床标本未能有效提取到足量真菌 DNA,和李筱芳等^[5]一致。

利用核酸序列分析鉴定真菌是近来真菌分类和鉴定研究的热点。目前常用的目的片段是核糖体 RNA 基因(rDNA),因为 rDNA 有着广泛的保守区域和可变区间,据此选用一个或几个适合的序列片段进行扩增测序分析和菌种鉴定。核糖体 rDNA 分为可变区和保守区,包含多个重复的串联结构。前体 RNA 由 18s rDNA、5.8s rDNA 和 28s rDNA 组成。核糖体 ITS 位于 18s rDNA 和 5.8s rDNA 之间(ITS1)以及 5.8s rDNA 和 28s rDNA 之间(ITS2)。在 18s rDNA 基因上游还有外转录间隔区(ETS),位于转录单元之间的部分称为非转录间隔区(NTS),ETS 和 NTS 构成基因间隔区(IGS)^[6]。18s rDNA 和 28s rDNA 序列相对保守,可以在属水平上检测和鉴定真菌。ITS 在不同真菌间可变性很大,分析 ITS 序列可以将真菌鉴定到种水平。因而鉴定真菌的通用引物都由 ITS 设计而成,通用引物 ITS1、ITS2、ITS3、ITS4 能扩增出部分 18s rDNA、ITS 全序列、5.8s rDNA 和部分 28s rDNA,是分子生物学鉴定的可靠方法,广泛应用于致病菌的鉴定和分型^[7]。笔者从检验标本中选取临床标本 DNA $D(260\text{nm})/D(280\text{nm})$ 比值为 1.6~1.8,高于 1.8 可能有 RNA 污染,低于 1.6 可能有蛋白质、酚类等污染。同时对应培养标本生长良好、无污染,共计 39 株入组。采用真菌鉴定通用引物 ITS1、ITS4 进行 PCR 扩增,结果进行基因测序,测序结果在 NCBI 的基因库中检索,利用 BLAST 工具比对分析,比对分析结果一致,并与表型鉴定结果相吻合。另外,颜丹等^[8]在酿酒工人皮损处皮屑中直接提取皮肤癣菌 DNA 与对应临床分离培养株扩增产生的特异性条带与标准株一致。吕雪莲等^[9]利用二次 PCR 技术研究临床标本真菌快速分子诊断过程中发现临床标本中真菌 DNA 提取率低会导致 PCR 反应敏感性降低,但若是产量足够可进行测序

而完成菌种的分子鉴定。张晓利等^[10]利用菌落PCR技术完成丝状真菌的测序结果,与常规培养进行PCR扩增后的结果比较,BLAST比对结果相似度96%~100%。康道现等^[11-12]直接从病发及面部皮损中提取DNA进行菌种鉴定,与培养后菌落提取的DNA鉴定结果一致。综上所述,认为直接从皮损中刮取临床标本提取DNA的有效率及稳定性还有待提高,提取到高质量的DNA可以提高菌种鉴定的可靠性。本研究只选取了完成度高的临床标本和对应的分离培养株进行比较,若是把所有临床提取标本纳入研究,可能会出现较大差异。尽管如此,本研究认为rDNA-ITS序列分析方法可以作为一种皮肤癣菌鉴定的简便快捷准确的方法应用于临床。刘沐桑等^[13]基于常见医学真菌ITS-rDNA测序和汇总,使用NCBI数据库工具将汇总的序列构成DNA条形码数据库。随着数据库对致病菌种覆盖度的提高,进而促进rDNA-ITS序列分析方法的应用。以往DNA提取的对象为培养后菌株,培养周期长、容易污染及变异,尚能满足部分轻度感染和对诊断时限要求不高的感染性疾病。直接从临床标本提取DNA,通过rDNA-ITS序列分析鉴定菌种,可以尽早明确致病菌,指导用药,避免并发症的产生,可进一步应用于复杂性皮肤感染及甲真菌病,有着广阔的应用前景。鉴于直接从患者皮损中刮取临床标本提取DNA的效率和质量,笔者选取了部分提取质量高的常见皮肤癣菌菌株进行了表型鉴定、分子鉴定(临床标本、经培养后的标本),三者结果相吻合。还需要进一步增加样本量、扩大菌种范围来评价rDNA-ITS基因扩增测序技术在皮肤癣菌鉴定中的应用价值。

因此,从临床标本中提取致病菌DNA并进行ITS基因序列扩增和测序分析可快速、有效鉴定皮肤癣菌。若能进一步提高直接从临床标本中提取致病菌DNA的有效率和可靠性,将有利于临床的广泛应用,需要进一步扩大样本量以评估该方法的可

靠性。

[参考文献]

- [1] 王端礼. 医学真菌学——实验室检验指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 134-188
- [2] 徐红, 温海. 临床常见皮肤癣菌的特征和鉴定[J]. 中国真菌学杂志, 2006, 1(4): 237-240
- [3] 王璇, 李莉, 王睿莹, 等. 常见致病性真菌核糖体RNA基因分子鉴定[J]. 中华传染病杂志, 2013, 31(3): 138-143
- [4] 王家俊. 临床真菌检验[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1995: 5
- [5] 李筱芳, 陈辉, 崔凡, 等. 浅部真菌病临床标本致病菌DNA提取方法的初步研究[J]. 医学研究杂志, 2006, 35(3): 18-20
- [6] 匡治州, 许杨. 核糖体rDNA ITS序列在真菌学研究中的应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(2): 120-122
- [7] 赵正娟, 田伟, 赵敬军. DNA序列分析用于常见致病真菌鉴定和分型[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(5): 316-320
- [8] 颜丹, 陈德宇, 汪枫, 等. 患皮肤癣菌病的酿酒工人皮损处皮屑中真菌DNA的提取方法[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(8): 489-490
- [9] 吕雪莲, 刘泽虎, 梅亚宁, 等. 二次PCR用于临床标本真菌感染快速分子诊断的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2009, 42(6): 390-392
- [10] 张晓利, 吕雪莲, 沈永年, 等. 菌落PCR技术快速鉴别丝状真菌的实验研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2011, 44(8): 556-559
- [11] 康道现, 冉玉平, 代亚玲. 直接从病发提取DNA鉴定菌种诊治万博节皮菌所致脓癣[J]. 临床皮肤科杂志, 2013, 42(6): 348-350
- [12] 康道现, 冉玉平, 尹斌, 等. 转化医学真菌学实例--直接提取DNA鉴定菌种及体外药敏试验指导诊治面部难辨认癣[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(6): 324-327
- [13] 刘沐桑, 张莉莉, 吕桂霞, 等. 常见医学真菌DNA条形码BLAST数据库的建立[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2015, 31(7): 401-404

[收稿日期] 2018-04-12