

## 念珠菌类细菌样变异株基因特征初步研究\*

王 华<sup>1a</sup>, 苍金荣<sup>1b</sup>, 王 曦<sup>2</sup>, 刘家云<sup>3</sup>, 任健康<sup>1b</sup>, 苏宝凤<sup>1b</sup>, 张利侠<sup>1b</sup>, 闫福堂<sup>1b</sup>, 归巧娣<sup>1b</sup>

(1. 陕西省人民医院, a. 陕西省临床检验中心; b. 检验科, 西安 710068;

2. 西安市红会医院, 西安 710054; 3. 空军军医大学西京医院, 西安 710032)

**摘要:**目的 在对念珠菌发生变异后其形态、结构等生物学性状研究的基础上,进一步探讨念珠菌类细菌样变异株基因特征。**方法** 在低温、营养缺乏条件下诱导白色念珠菌标准菌株使其变异;用不同浓度梯度的氟康唑等临床常用抗真菌药物诱导白色念珠菌标准菌株变异。采用煮沸法制备真菌基因模板,采用细菌保守基因 16S RNA 序列引物和真菌保守基因 18S RNA 序列引物分别扩增 16S RNA 和 18S RNA 序列,琼脂糖凝胶电泳,观察并记录结果。同时将细菌保守基因 16S RNA 扩增片段进行测序,所得序列进行 BLAST 比对分析。**结果** 念珠菌类细菌样变异株 16S RNA 序列均扩增阳性,而白色念珠菌标准株未出现相应的扩增条带。念珠菌类细菌样变异株 18S RNA 序列扩增除 2 号菌株有微弱的条带外,其余变异株均未扩增出目的条带,而白色念珠菌标准株则出现相应的扩增条带,表明念珠菌类细菌样变异株基因组中 18S RNA 序列所占比例不多或是因多次传代遗失。念珠菌类细菌样变异株 16S RNA 扩增片段经纯化后进行 DNA 序列测定, BLAST 进行比对分析,发现念珠菌类细菌样变异株序列与数据库中细菌序列有较高的相似性。**结论** 念珠菌类细菌样变异株基因组含有细菌保守基因及少量真菌保守基因,具有原核生物学性状的念珠菌类细菌样变异株是源于真核生物的念珠菌。此研究在生物进化特别是在原核细胞与真核细胞的进化联系上有非常重要的意义。

**关键词:**念珠菌类细菌样变异株;基因;PCR

**中图分类号:**R531.3;R381 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2018)01-019-04

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.005

### Preliminary Study on the Gene Characteristics of Oidiomyces Mutant Strains Like Bacterial Morphology

WANG Hua<sup>1a</sup>, CANG Jin-rong<sup>1b</sup>, WANG Xi<sup>2</sup>, LIU Jia-yun<sup>3</sup>, REN Jiang-kang<sup>1b</sup>, SU Bao-feng<sup>1b</sup>, ZHANG LI-xia<sup>1b</sup>, YAN Fu-tang<sup>1b</sup>, GUI Qiao-di<sup>1b</sup> (1a. Shaanxi Provincial Center for Clinical Laboratories; 1b. Department of Laboratory Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Xi'an Red Cross Hospital, Xi'an 710054, China;

3. Xijing Hospital Affiliated to the Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract: Objective** To further explore the genetic characteristics of oidiomyces mutant strains like bacterial morphology on the basis of the study on morphology and structure of mutated candida. **Methods** The standard strains of candida albicans were induced by low temperature and under the condition of low temperature and nutrient deficiency. Variation of standard strains of Candida albicans were induced by clinical antifungal drugs such as fluconazole with different concentration gradient. Fungal gene template was prepared by boiling method, sequences of 16SRNA and 18SRNA were amplified using bacteria conservative gene sequence of 16SRNA and fungal conserved gene sequence of 18SRNA, and observed and recorded the results agarose gel electrophoresis. At the same time, the amplified fragment of bacterial conservative gene 16SRNA was sequenced, and the sequence was analyzed by BLAST comparison. **Results** the 16SRNA sequences of candida variant were amplified positive, while the standard strain of candida albicans did not show the corresponding amplification band. Except 2 strains which showed a faint band, the other variants of the 18SRNA sequences did not amplified the target band, while the standard strains of candida albicans showed a corresponding amplification bands. Suggested that proportion of 18SRNA sequences in the genome of oidiomyces mutant strains like bacterial morphology was not much even lack. The 16SRNA fragments amplified of oidiomyces mutant strains like bacterial morphology did determination of DNA sequence after purification. BLAST comparison analysis, it was found that sequence of oidiomyces mutant strains like bacterial morphology had higher similarity with bacterial sequences in the database. **Conclusion** Oidiomyces mutant strains like bacterial morphology contained bacterial and a small amount of fungus conservative gene. Oidiomyces mutant strains like bacterial morphology with original nuclear biological character are ones from eukaryotes. This study is great significance in biological evolution,

\* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(S2014JC8839)。

作者简介:王 华(1963-),男,主任检验师,主要从事临床微生物学研究。

通讯作者:苍金荣(1962-),女,副主任检验师,E-mail:cang1963@163.com。

especially in the evolution of prokaryotic cells and eukaryotic cells.

**Keywords:** Oidiomycetes mutant strains like bacterial morphology; genes; PCR

念珠菌可因生长的微环境和体内某些因素都可能引起念珠菌发生变异,使其培养特性、染色性、形态结构特征、生化反应、耐药性等发生改变<sup>[1]</sup>,这些生物学性状的变化,会给念珠菌病的实验诊断、临床治疗带来困扰,极易引起误诊或漏诊而贻误治疗。我们将这些念珠菌变异株称之为“念珠菌类细菌样变异株”。对念珠菌发生变异前后生物学性状及遗传学特征进行了深入研究<sup>[1~5]</sup>发现:念珠菌极易发生类细菌样变异,变异株无论菌落、菌体形态、核结构、生化反应、药敏试验均失去念珠菌固有的生物学特征而与普通细菌的生物学性状酷似。但是其基因特征尚不清楚,为此,我们对这些念珠菌类细菌样变异株的 16S RNA 序列、真菌 18S RNA 序列进行了分析比较。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** ATCC10231 白色念珠菌标准菌株,源于陕西省疾病预防控制中心;念珠菌类细菌样变异株是白色念珠菌标准菌株在低温、营养缺乏条件或氟康唑诱导下获得。Premix Taq PCR 试剂为 Takara 产品。细菌保守基因序列 16S RNA 通用引物,扩增片段长度约 1 400 bp,引物序列 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 1429R: GGT-TACCTTGTTACGACTT;真菌保守基因序列 18S RNA 通用引物,扩增片段约 500bp,引物序列 FF: ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG, FR: CCGA TCCCTAGTCGGCATAG。上述 PCR 引物及测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

## 1.2 方法

**1.2.1 念珠菌变异株的实验室诱导和临床分离:**在低温、营养缺乏条件下诱导白色念珠菌标准菌株使其变异;用不同浓度梯度的氟康唑等临床常用抗真菌药物诱导白色念珠菌标准菌株变异。

**1.2.2 真菌基因模板制备:**采用煮沸法制备模板,取培养平板上的菌落于盛有去离子水的 1.5 ml 离心管中,充分悬浮菌体,置 100℃ 沸水中煮沸 10 min,10 000 r/min 离心 5 min 后取上清液 2 μl 作模板进行 PCR 扩增。

**1.2.3 细菌保守基因 16S RNA 序列的 PCR 反应体系和参数:**细菌保守基因 16S RNA 序列和真菌保守基因 18S RNA 序列均采用相同的反应体系和扩增条件:2×Taq PCR MasterMix (Takara 公司产品)进行 PCR,2×Taq PCR MasterMix 25 μl,模板 DNA 2 μl,正向引物 F(100 μmol/L) 0.2 μl,反向引物 R(100 μmol/L) 0.2 μl,无菌双蒸水 22.6 μl,总体积 50 μl。PCR 参数:在 Bio-Rad T100 型

PCR 仪上反应的参数为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,共 40 个循环;72℃ 延伸 7 min。扩增结束后取 PCR 产物 10 μl 在 1.2 g/dl 琼脂糖凝胶上电泳,观察并记录结果。

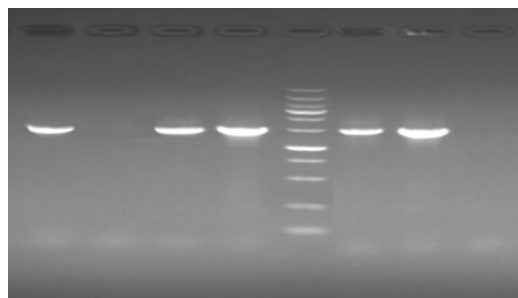
**1.2.4 真菌保守基因 18S RNA 序列的扩增:**采用与 16S RNA 反应体系和参数相同的条件进行 PCR 扩增,并对产物进行凝胶电泳分析。

**1.2.5 细菌保守基因 16S RNA 测序分析:**将细菌保守基因 16S RNA 扩增片段送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,所得序列进行 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对分析。

## 2 结果

**2.1 念珠菌类细菌样变异株 16S RNA 序列扩增阳性** 念珠菌类细菌样变异株经 16S RNA 引物扩增及琼脂糖凝胶电泳,发现念珠菌类细菌样变异株 16S RNA 序列均扩增阳性,而白色念珠菌标准株未出现相应的扩增条带(图 1)。表明念珠菌类细菌样变异株基因组中具有 16S RNA 序列。

*E. coli* 1 2 3 M 4 5 Negative



*E. coli*: 大肠埃希菌 ATCC25922; M: 100~6 000 bp DNA marker (100,250,500,750,1 000,2 000,4 000,5 000,6 000 bp); 1: ATCC10231 白色念珠菌标准株; 2: ATCC10231 白色念珠菌标准株,斜面传代-灰白粗大 G<sup>+</sup> 杆菌,类似芽孢状; 3: ATCC10231 白色念珠菌标准株,4℃ 传代-黄色 G<sup>+</sup> 杆菌; 4: ATCC90029 白色念珠菌标准株氟康唑诱导-灰白粗大 G<sup>+</sup> 杆菌,类芽孢状; 5: ATCC90029 白色念珠菌标准株氟康唑诱导-灰白粗大 G<sup>+</sup> 杆菌,类芽孢状传代-黄色 G<sup>+</sup> 杆菌。

图 1 念珠菌类细菌样变异株 16S RNA 基因扩增结果

**2.2 念珠菌类细菌样变异株 18S RNA 序列扩增结果** 念珠菌类细菌样变异株经 18S RNA 引物扩增及琼脂糖凝胶电泳,发现念珠菌类细菌样变异株除 2 号菌株有微弱的条带外,其余变异株 18S RNA 序列均未扩增出目的条带,而白色念珠菌标准株则出现相应的扩增条带(图 2)。表明念珠菌类细菌样变异株基因组中 18S RNA 序列所占比例不多或是因多次传代遗失。

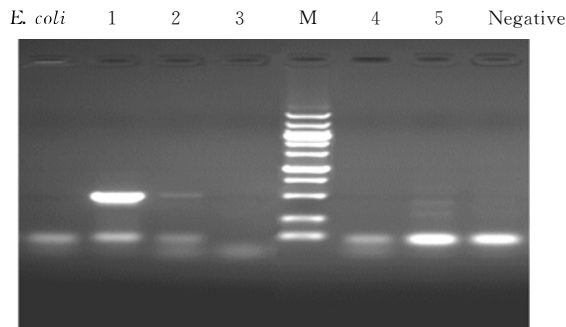


图2 念珠菌类细菌样变异株 18S rRNA 基因扩增结果

2.3 念珠菌类细菌样变异株 16S rRNA 序列比对结果 念珠菌类细菌样变异株 16S rRNA 扩增片段经纯化后进行 DNA 序列测定, BLAST 进行比对分析, 发现念珠菌类细菌样变异株序列与数据库中细菌序列有较高的相似性, 其中 2, 4 分别为内生芽胞杆菌(*Bacillus endophyticus*); 3, 5 为假棒形杆菌

属 (*Pseudoclavibacter terrae*)。部分菌株的 BLAST 比对结果见图 3。

3 讨论 微生物的鉴定除传统的生化反应外, 还可以采用测序方法对包括 16S rRNA 或 18S rRNA 等基因进行分析比对。16S rRNA 基因是细菌染色体上编码 rRNA 相对应的 DNA 序列, 约 1 542 bp, 存在于所有细菌的染色体基因组中。在 16S rRNA 分子中, 既含有高度保守的序列区域, 又有中度保守和高度变化的序列区域, 不同的物种 16S 序列具有一定的特异性, 常用于细菌分类和进化分析<sup>[6]</sup>。18S rRNA 片段相对比较长, 分辨能力也较强。由于片段中含有同源性较强的保守区和变异性较大的可变区, 因此利用不同的区域可以进行不同真菌的亲缘关系比对。目前已用于真菌的不同分类级别的鉴定, 包括目、科、属的鉴别<sup>[6]</sup>。

Sequences producing significant alignments:  
Select: All None Selected 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain SKYM15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1977	1977	99%	0.0	99%	HQ844498.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 44DMVR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1967	1967	99%	0.0	99%	KR140175.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain YN14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1967	1967	99%	0.0	99%	KJ542778.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus</i> sp. DY_IL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1967	1967	99%	0.0	99%	HQ317158.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain M45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	99%	0.0	99%	KY595445.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	99%	0.0	99%	KJ476709.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain IHB B 10265 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	99%	0.0	99%	KR233758.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain IHBB 9943 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	99%	0.0	99%	KR085883.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain Hbc603, complete genome	1964	21499	99%	0.0	99%	CP011974.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain B111 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	98%	0.0	99%	KP659614.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain SMR37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	99%	0.0	99%	KF600785.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 70 (BC7) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	98%	0.0	99%	KE254867.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus</i> sp. ITP21 partial 16S rRNA gene, strain ITP21	1964	1964	99%	0.0	99%	FR667179.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain L2S7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	99%	0.0	99%	EU221417.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus</i> sp. EEZMo-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	99%	0.0	99%	EF101989.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus endophyticus</i> strain ZDT 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	99%	0.0	99%	NR_025122.1
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus</i> sp. VITABR13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1960	1960	99%	0.0	99%	GU014293.1

图3 部分念珠菌类细菌样变异株 16S rRNA 序列比对结果

随着人口老龄化及疾病结构的改变, 念珠菌已成为机会感染的常见病原菌, 以往教科书未见对念珠菌类原核生物样变异方面的记载。目前临床常用的唑类、多烯类抗真菌药物抗真菌机理是与真菌细胞壁的麦角固醇结合而影响其细胞壁的合成, 因此, 不合理的抗真菌治疗及体内某些因素可能是引起念珠菌发生变异的一个重要因素, 这从我们的实验室诱导和临床分离出念珠菌变异株的事实得到验证<sup>[1~3]</sup>。本次实验中念珠菌类细菌样变异株经 18S rRNA 引物扩增及琼脂糖凝胶电泳, 发现念珠菌类细菌样变异株除 2 号菌株有微弱的条带外, 其余变异株 18S rRNA 序列均未扩增出目的条带, 而白色念珠菌标准株则出现相应的扩增条带; 4 号菌株曾经扩增出较强的 18S rRNA 序列条带, 经过数年 20 次传代后再扩增未见此条带, 表明念珠菌类细菌样变异株基因组中 18S rRNA 序列所占比例不多或是因多次传代遗失。电镜观察具有明确亲缘关系的念珠菌标准菌株、念珠菌类细菌样变异株、变异菌返祖株在核物质存在形式上确有质的改变,

失去真核生物应有的特征, 而与原核细胞生物学特性酷似, 这种遗传学特征的改变可能是念珠菌发生类原核生物样变异的根源<sup>[7]</sup>。实验<sup>[4]</sup>还证实, 念珠菌和其类细菌样变异体在条件合适时可在真核细胞与原核细胞之间互变, 此研究在生物进化特别是在原核细胞与真核细胞的进化联系上有非常重要的意义, 念珠菌很可能是真核生物和原核生物间的一个过渡体。16S rRNA 和 18S rRNA 序列分析表明, 念珠菌类细菌样变异株基因组含有细菌保守基因及少量真菌保守基因, 证明具有原核生物学性状的念珠菌类细菌样变异株是源于真核生物的念珠菌。念珠菌类细菌样变异是一个复杂且少有的研究课题, 我们期待获得更多分子生物学信息, 来进一步阐明原核细胞与真核细胞的进化相互关系。

参考文献:

[1] 王 华, 苍金荣, 任健康, 等. 念珠菌类细菌样变异形态学特征[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(3): 61-64, 67.  
Wang H, Cang JR, Ren JK, et al. Study on morphology of mutable candida like bacteria[J]. (下转 24 页)

(上接 21 页)J Mod Lab Med,2013,28(3):61-64,67.

[2] 苍金荣,任健康,苏保凤,等. 临床分离类细菌样变异念珠菌的实验室诊断[J]. 现代检验医学杂志,2009,24(1):59-61.

Cang JR, Ren JK, Su BF, et al. J Mod Lab Med, 2009, 24(1):59-61.

[3] 苍金荣,王 华,任健康,等. 变异念珠菌常见菌落和菌体形态[J]. 现代检验医学杂志,2011,26(2):12-14,18.

Cang JR, Wang H, Ren JK, et al. Variable candida albicans common morphology of colonies and mycelium [J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(2):12-14, 18.

[4] 王 华,苍金荣,任健康,等. 类细菌样念珠菌变异株真菌保守基因检测[J]. 现代检验医学杂志,2011,26(3):39-40,43.

Wang H, Cang JR, Ren JK, et al. Detection of conserved gene in bacteria-like candida albicans variants [J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(3):39-40, 43.

[5] 王 华,苍金荣,任健康,等. 类细菌样念珠菌变异株

对普通抗细菌药物敏感性观察[J]. 现代检验医学杂志,2011,26(4):45-47.

Wang H, Cang JR, Ren JK, et al. Observation of the sensitivity of bacteria-like candida to normal antibiotics[J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(4):45-47.

[6] Karst SM, Dueholm MS, McIlroy SJ, et al. Retrieval of a million high-quality, full-length microbial 16S and 18S rRNA gene sequences without primer bias[J]. Nat Biotechnol, 2018, 1(1). doi:10.1038/nbt.4045. [Epub ahead of print]

[7] 王 华,苍金荣,任健康,等. 类细菌样念珠菌变异株生物学形状及遗传学特征研究[J]. 现代检验医学杂志,2015,30(4):47-49,52.

Wang H, Cang JR, Ren JK, et al. Study on biological characters and genetic characteristics of oidiomycetes mutant strains like bacterial morphology[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(4):47-49, 52.

收稿日期:2017-09-05

修回日期:2017-10-23