

眼部致病性不产孢子菌的 ITS 测序研究

何 宏¹, 杨 军¹, 陈晓莲¹, 钟兴武^{1,2}

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81371046); 2016 年海南省重点研发项目 (No. ZDYF2016111); 2016 年海南省自然科学基金 (No. 20168335); 2017 年海南省自然科学基金 (No. 2017CXTD011, 817365)

作者单位:¹(570102) 中国海南省海口市, 中山大学中山眼科中心海南省眼科医院 海南省眼科重点实验室;²(510060) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心 国家眼科重点实验室

作者简介: 何宏, 毕业于中山大学中山眼科中心, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者: 钟兴武, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 眼表疾病、近视防治。xingzh88@hotmail.com

收稿日期: 2018-05-19 修回日期: 2018-08-28

Identification of pathogenic nonsporulating molds in eyes by internal transcribed spacer sequences alignment

Hong He¹, Jun Yang¹, Xiao-Lian Chen¹, Xing-Wu Zhong^{1,2}

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81371046); Key Research and Development Program of Hainan Province (No. ZDYF2016111); Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 20168335) Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 2017CXTD011, 817365)

¹Hainan Eye Hospital, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University; Key Laboratory of Ophthalmology of Hainan, Haikou 570102, Hainan Province, China; ²Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University State; State Key Laboratory of Ophthalmology, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xing-Wu Zhong. Hainan Eye Hospital, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University; Key Laboratory of Ophthalmology of Hainan, Haikou 570102, Hainan Province, China; Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University; State Key Laboratory of Ophthalmology, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. xingzh88@hotmail.com

Received: 2018-05-19 Accepted: 2018-08-28

Abstract

• AIM: To identify the species and genus of pathogenic nonsporulating molds (NSM) by internal transcribed spacer (ITS) sequences alignment, and reveal the biodiversity of NSM in Hainan Island with tropical climate.

• METHODS: Nine teen fungal strains, identified as NSM by conventional method in the laboratory department of Hainan Province Eye Hospital, were involved in this study. All of the strains were isolated from the infectious eye tissues from patients, and cultured with potato -

dextrose agar and Sabourand's agar in 37°C incubator for 7 - 21d. Any reproductive structure was detected by microscopy for up to 21d. After growth for 3 - 7d, the genomic DNA of specimens were extracted by grinding method combined with chemical method. Then, ITS sequences in the ribosome were amplified by PCR and analyzed using the National Center for Biological Information (NCBI) GenBank database. Finally, the species and genus were confirmed by sequence alignment.

• RESULTS: The corresponding target bars could be observed in all 19 specimens after PCR. The results from genetic alignment classified the 19 specimens into 12 species, including *Lasiodiplodia theobromae* (6 isolates), *Curvularia lunata* (1 isolate), *Arthrinium* sp. (2 isolates), *neodeightonia subglabosa* (2 isolates), *Earliella scabrosa* (1 isolate), *Hypocreales* sp. (1 isolate), *phoma multirostrata* (1 isolate), *Trichophyton rubrum* (1 isolate), *Aspergillus westerdijkiae* (1 isolate), *roussoella siamensis* (1 isolate), *Ceriporia lacerata* (1 isolate), *Fusarium solqni* (1 isolate).

• CONCLUSION: ITS sequence alignment can identify NSM to genus and species level. The NSM in Hainan Island contains varies species, and is associated with multiple infectious diseases of the eye.

• KEYWORDS: nonsporulating molds; etiology; internal transcribed spacer sequence alignment

Citation: He H, Yang J, Chen XL, *et al.* Identification of pathogenic nonsporulating molds in eyes by internal transcribed spacer sequences alignment. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(10):1826-1829

摘要

目的: 运用真核生物核糖体 RNA 基因 (rDNA) 内部转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 测序技术对不产孢子菌进行菌属鉴定, 揭示海南岛眼部致病性不产孢子菌的生物多样性。

方法: 选取海南眼科医院检验科分离培养并镜检确定为不产孢子菌的真菌菌株 19 株, 所有菌株均分离自感染性眼病患者眼部感染组织, 接种于土豆葡萄糖琼脂培养基和沙氏培养基 37°C 温箱孵育 7 ~ 21d 后, 镜检未发现生殖结构。采用玻璃研磨器研磨联合化学法提取真菌 DNA, PCR 扩增核糖体 ITS 保守序列, 通过 GenBank 基因数据库对扩增出的 ITS 序列进行比对分析, 确定致病菌种属。

结果: 经 PCR 扩增后 19 株样本菌均得到清晰的目的条带。基因测序比对结果显示, 19 株不产孢子菌分属 12 个种属, 包括可可毛色二孢子菌 6 株, 月状弯孢霉 1 株, 节菱孢霉菌 2 株, *neodeightonia subglabosa* 2 株, 红贝菌 1

株,肉座菌 1 株,多喙茎点霉 1 株,红色毛癣菌 1 株,深海曲霉菌 1 株,roussoella siamensis 1 株,撕裂蜡孔菌 1 株,茄病镰刀菌 1 株。

结论:ITS 基因测序技术可较准确地鉴定不产孢子菌的种属,是对传统真菌鉴定方法的有益补充。我国海南岛这一热带地区致病性不产孢子菌种属多样,且与多种感染性眼病的发生相关。

关键词:不产孢子菌;病因学;ITS 测序

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.16

引用:何宏,杨军,陈晓莲,等.眼部致病性不产孢子菌的 ITS 测序研究.国际眼科杂志 2018;18(10):1826-1829

0 引言

真菌感染性眼病是一类在全球范围广泛发生的感染性疾病,具有诊断困难,预后不良的特点。临床检验工作中难于对真菌进行快速、准确鉴别的主要原因包括:(1)真菌分类极其复杂;(2)不同的培养条件对真菌的形态和生物学特点影响很大;(3)不同种属的真菌在形态和生物学行为方面可能具有高度的相似性^[1-2]。海南是我国热带海岛省份,常年湿热,是真菌生物多样性最丰富的地区之一。我们在之前的研究中报道,海南存在一类用传统真菌鉴定方法难于鉴别的眼病致病真菌—不产孢子菌^[3-4]。该类真菌的突出特点是在临床检验室常规真菌培养条件(种植于土豆葡萄糖培养基和沙氏培养基 38℃ 或 28℃ 3~21d)下只产生菌丝,不产生孢子。我们发现,与我国其它地区致病真菌菌谱不同,不产孢子菌在海南角膜溃疡致病菌谱中占主要地位(仅次于镰刀菌属),是严重影响海南地区人民健康的致病真菌。由于缺乏对不产孢子菌种属特点的了解,往往无法通过传统的真菌鉴定方法对其进行准确鉴定^[3-4]。为了了解中国热带地区真菌感染性眼病中致病性不产孢子菌的种属,本研究从海南省及南海诸岛屿热带地区真菌感染性眼病患者感染组织中分离出 19 株不产孢子菌,并采用真核生物核糖体 RNA 基因(rDNA)内部转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)测序技术对不产孢子菌菌属进行鉴定,以期弥补传统真菌检测方法的不足,实现对热带感染性眼病致病真菌库的有益补充。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 真菌菌株 真菌菌株均来自中山大学中山眼科中心海南眼科医院检验科菌种保藏中心,所有真菌样本均取自感染性眼病患者的感染组织,将标本直接接种于土豆葡萄糖培养基和沙氏培养基,置 37℃ 温箱中培养 7~21d 后未观察到菌株产生的孢子等繁殖结构。参照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)^[1]和《实用临床微生物学检验与图谱》^[2]确定此 19 株菌株均为不产孢子菌。

1.1.2 主要仪器与试剂 主要仪器:智能梯度 PCR 仪(B960)购于杭州晶格科学仪器有限公司,低温冷冻离心机购于珠海黑马医学仪器有限公司,微型离心机购于珠海赛乐奇生物技术有限公司,移液器购于德国 Eppendorf 公司。主要试剂:2×Taq Master Mix(Dye Plus)购于南京诺唯赞生物科技有限公司,RNase free EP 管和 RNase free 吸头购于美国 Thermo 公司,琼脂糖购自美国 Sigma 公司,

真菌基因组 DNA 提取试剂盒购于北京索莱宝生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 真菌样本 DNA 提取 依照真菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取 DNA 样本。首先用无菌刀片刮取培养基表面菌落 50~100mg。然后依次加入溶液 A、RNaseA、100mg 玻璃珠,高速振荡器振荡 5min 后加入蛋白酶 K,55℃ 水浴消化 30min,12 000r/min 离心 2min。取上清液,并依次加入溶液 B、无水乙醇,充分混匀,将溶液和絮状沉淀均加入吸附柱中,放置 2min,12 000r/min 离心 1min,弃废液,将吸附柱放入收集管中。向吸附柱中加入漂洗液,12 000r/min 离心 1min,弃废液,将吸附柱放回收集管中,并重复漂洗、离心、弃废液 2 次。将吸附柱置于室温或 50℃ 温箱放置数分钟。将吸附柱放入干净的离心管中,向吸附膜中央悬空滴加 50~200μL 经 65℃ 水浴预热的洗脱液,室温放置 5min,12 000r/min 离心 1min。离心所得洗脱液加入吸附柱中,室温放置 2min,12 000r/min 离心 2min,即得到基因组 DNA。

1.2.2 ITS 保守序列的 PCR 扩增 采用真菌保守基因通用引物^[5]:TS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应体系:2×Taq Master Mix 12.5μL,上游引物 0.5μL,下游引物 0.5μL,模板 DNA 2μL,无菌双蒸水 9.5μL,总体积 25μL。PCR 反应条件:95℃ 5min,1 个循环;95℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 30s,35 个循环;72℃ 10min,1 个循环。

1.2.3 电泳测序和种属鉴定 扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,电泳缓冲液采用 1×TAE,电压按 5V/CM,上样量为 5μL。电泳结束后将琼脂糖凝胶置于紫外灯下确认为目的条带后将 PCR 产物送至生工生物工程股份有限公司测序。将测序得到的序列在美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information,NCBI)GenBank 基因数据库进行核酸比对,确定真菌菌属。

2 结果

2.1 真菌 DNA 提取及 PCR 扩增结果 本研究选取的 19 株不产孢子菌样本均成功提取出 DNA,DNA 浓度为 10~50ng/μL,经 PCR 扩增后均得到清晰的目标条带(图 1)。

2.2 ITS 测序种属鉴定 本研究选取的 19 株不产孢子真菌阳性培养物均取自相关眼病患者的感染组织,菌株种类及患者的一般情况见表 1,其中 10 株取自角膜溃疡患者,致病真菌种类包括可可毛色二孢子菌、节菱孢霉菌、红贝菌、红色毛癣菌、茄病镰刀菌,7 例角膜溃疡患者有明显的外伤史,砂石、木屑、椰子、草叶、香蕉叶是导致损伤的原因。

3 讨论

临床医疗工作中常用的传统真菌鉴别方法包括真菌刮片镜检和真菌培养后镜检,其阳性率和敏感率除受到样本取材操作方法及真菌培养方法的极大影响外,还受限于实验室检查人员对病原菌形态学和生物学特点的认识^[1-2]。因此,在鉴别形态结构不典型的微生物以及少见或罕见致病微生物时,运用传统方法往往不能得到准确的结论。基于真菌核糖体的 ITS 基因测序技术则可以很好地弥补传统真菌鉴定方法的不足^[5-8]。ITS 即内转录间隔区,是真菌核糖体 RNA 基因中度保守区域,在生物进化过程中能容忍更多的变异。由于不同种属

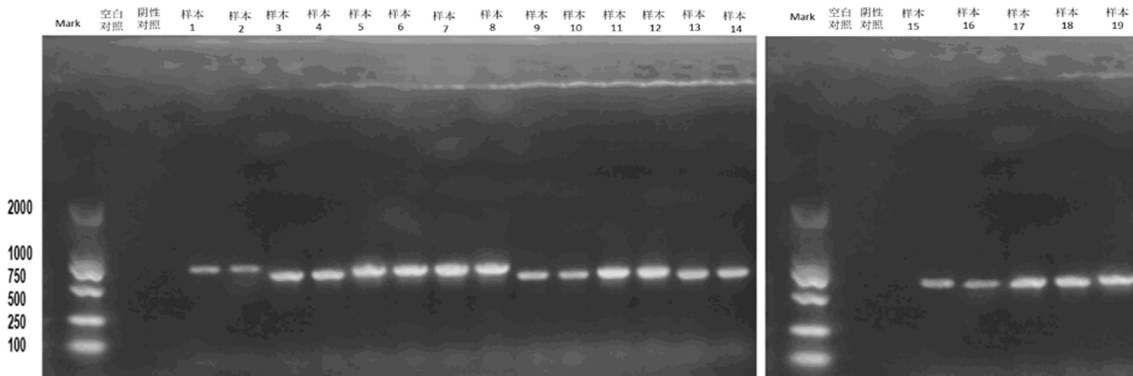


图1 PCR 扩增条带。

表1 本研究中19株真菌菌株种类及患者的一般情况

序号	临床诊断	真菌种类	是否有外伤史	外伤原因
1	角膜溃疡	可可毛色二孢子菌	是	砂石擦伤
2	角膜溃疡	可可毛色二孢子菌	是	砂石擦伤
3	角膜溃疡	可可毛色二孢子菌	是	椰子击伤
4	角膜溃疡	可可毛色二孢子菌	是	木屑擦伤
5	角膜溃疡	可可毛色二孢子菌	是	草叶擦伤
6	角膜溃疡	可可毛色二孢子菌	是	草叶擦伤
7	角膜溃疡	节菱孢霉菌	否	-
8	角膜溃疡	红色毛癣菌	否	-
9	角膜溃疡	红贝菌	否	-
10	角膜溃疡	茄病镰刀菌	是	香蕉叶擦伤
11	感染性眼内炎	撕裂蜡孔菌	是	钢管击伤
12	慢性泪囊炎	肉座菌	否	-
13	感染性眼内炎	多喙茎点霉	是	尖刀刺伤
14	慢性泪囊炎	月状弯孢菌	否	-
15	感染性眼内炎	节菱孢霉菌	是	钢丝刺伤
16	感染性眼内炎	neodeightonia subglabosa	是	木屑入眼
17	义眼座暴露感染	neodeightonia subglabosa	否	-
18	慢性泪囊炎	深海曲霉菌	否	-
19	感染性眼内炎	roussoella siamensis	是	树枝刺伤

真菌的 ITS 序列表现出较高的特异性,并且具有片段较短(区域长度一般为 650 ~ 750bp),易于扩增的特性,目前已被广泛应用于不同种属真菌的鉴定^[9-12]。

目前认为不产孢子菌与侵袭性疾病及过敏性疾病相关^[13]。感染性眼病属于侵袭性疾病。本课题组先后对广州和海南省的致病性不产孢子菌导致的眼部感染进行了初步研究^[3-4],我们发现,与国内其它地区相比,不产孢子菌在海南省眼病致病性真菌谱中占据非常重要的位置,分析可能与海南省独特的地理位置(地处热带),长年湿热的气候特点有关。国内目前对于致病性不产孢子菌的研究还十分有限,至今并未见国内关于不产孢子菌种属的相关报道。国外关于不产孢子菌的研究报道也十分有限。关于真菌感染性肺部疾病及过敏性肺部疾病的研究中, Singh 等^[13]运用 ITS 测序检测发现了撕裂蜡孔菌、phanerochaete stereoides 等 7 种相关的不产孢子菌。Pounder 等^[14]从肺部、指甲、皮肤等组织标本中分离培养了可可毛色二孢子菌、节菱孢霉菌、弯孢壳属、镰刀属等 16 种致病性不产孢子菌。上述研究丰富了研究者对不产孢子菌与感染性疾病及过敏性疾病相关性的认识,但均未涉及眼部疾病。本研究从眼科感染性疾病的角度阐释了

感染性眼病相关不产孢子菌的种属,最终确定 19 株临床分离培养的致病性不产孢子菌包含 12 个菌种/属,分别是可可毛色二孢子菌、月状弯孢菌、节菱孢霉菌、neodeightonia subglabosa、红贝菌、肉座菌、多喙茎点霉、红色毛癣菌、深海曲霉菌、roussoella siamensis、撕裂蜡孔菌、茄病镰刀菌,其中 neodeightonia subglabosa、红贝菌、肉座菌、多喙茎点霉、红色毛癣菌、深海曲霉菌、roussoella siamensis、月状弯孢菌均为首次报道。本研究中,19 株不产孢子菌分离自角膜溃疡、感染性眼内炎、慢性泪囊炎、义眼座暴露感染患者的眼部组织及分泌物,表明不产孢子菌与感染性眼病相关,其中感染性角膜溃疡是不产孢子菌所致最主要感染性眼病(10/19),其次为感染性眼内炎(5/19)。

我们在研究过程中发现,运用特殊诱导方法可以诱导部分不产孢子菌产生孢子,可可毛色二孢子菌就是其中一种。在后期研究中,本研究小组通过调整培养湿度、温度,加入连续光照刺激,在培养可可毛色二孢子菌 2wk 后诱导出子座,3wk 后诱导出孢子。但其它菌种仍未能诱导出孢子。此外,部分常规认为属于产孢子有丝真菌的种属也被发现存在常规培养不产孢子的现象,如镰刀菌属。我们的

研究和 Pounder 等^[14]的研究都发现不产孢子菌中包括镰刀菌属,我们认为这与真菌的多样性有关,即使同属的真菌也存在生物行为上的种间差异。

综上所述,本研究通过 ITS 基因测序技术弥补了传统真菌检测方法的不足,发现了 12 个种属的不产孢子菌,实现了对热带感染性眼病致病真菌库的有益补充。但我们的研究仍然存在以下不足:(1)基于 ITS 基因测序技术的真菌种属鉴定最终依赖基因序列比对,因此真菌基因库信息的完善程度极大地影响着鉴定结果的准确性。ITS 基因测序技术不适用于对基因库中没有记录的真菌种属进行鉴定。(2)本研究未对所发现的不产孢子菌进行药物敏感性试验。在以后的研究中我们将进一步完善药物敏感实验,为提高临床治疗不产孢子菌相关感染性眼病提供理论依据。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程. 第 3 版. 南京:东南大学出版社 2006:873-884,896-897
- 2 陈东科,孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱. 北京:人民卫生出版社 2011:626-660
- 3 陈晓莲,刘红山,何宏,等. 中国热带地区真菌性角膜溃疡致病菌种类及药物敏感性分析. 中华实验眼科杂志 2017;35(2):156-160
- 4 何宏,刘红山,陈晓莲,等. 海南省 81 例真菌性角膜溃疡病原学分析. 国际眼科杂志 2017;17(7):1330-1333
- 5 Xu J. Fungal DNA barcoding. *Genome* 2016;59(11):913-932

- 6 姜雨萌,牛永春,邓晖. rDNA ITS 序列在 ACCC 真菌鉴定中的应用. 微生物学通报 2016;43(5):942-947
- 7 Badotti F, de Oliveira FS, Garcia CF, *et al.* Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiol* 2017;17(1):42
- 8 Truong C, Mujic AB, Healy R, *et al.* How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. *New Phytol* 2017;214(3):913-919
- 9 Monard C, Gantner S, Stenlid J. Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;84(1):165-175
- 10 李营,屈平华,陈东科,等. ITS 基因测序分析对 89 株病原真菌鉴定的应用评价. 临床检验杂志 2015;33(11):860-863
- 11 柳朔怡. 分子系统学在真菌分类命名中的应用与进展. 微生物学免疫学进展 2015;43(1):48-53
- 12 李颖,郭莉娜,徐英春. 内转录间隔区 (ITS) 序列分析技术对丝状真菌临床分离株鉴定能力的评估. 中华微生物学和免疫学杂志 2017;37(8):607-610
- 13 Singh PK, Kathuria S, Agarwal K, *et al.* Clinical significance and molecular characterization of nonsporulating molds isolated from the respiratory tracts of bronchopulmonary mycosis patients with special reference to basidiomycetes. *J Clin Microbiol* 2017;51(10):3331-3337
- 14 Pounder JI, Simmon KE, Barton CA, *et al.* Discovering potential pathogens among fungi identified as nonsporulating molds. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):568-571