

• 基础实验研究论著 •

建立白色念珠菌蛋白指纹库的研究*

杨永长, 喻 华, 刘 华, 肖代雯, 黄文芳[△]

(四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 四川成都 610072)

摘要:目的 探讨白色念珠菌蛋白指纹库的建立,为白色念珠菌感染快速诊断奠定基础。方法 收集 96 株临床分离的白色念珠菌,提取 DNA,采用聚合酶链反应(PCR)扩增其 ITS1-5.8S-ITS2 基因片段,利用限制性内切酶对其进行鉴定。应用表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)仪检测念珠菌蛋白指纹,Ciphergen ProteinChip 软件自动采集数据,筛选稳定表达蛋白峰建立白色念珠菌蛋白指纹库,运用经准确鉴定的念珠菌对建立的蛋白指纹库进行验证。结果 限制性片段长度多态性分析证实临床分离的所有菌株均为白色念珠菌。SELDI-TOF-MS 芯片能捕获 15 个蛋白峰,其中 5 个蛋白峰在所有白色念珠菌中均稳定表达,利用相似性分析软件建立白色念珠菌蛋白指纹库,白色念珠菌蛋白指纹与建立数据库的相似性大于 95%,而其他种类念珠菌蛋白指纹与数据库的相似性均小于 50%。结论 白色念珠菌蛋白指纹库的建立为快速诊断白色念珠菌感染提供了理论依据。

关键词:念珠菌,白色; 肽谱; 光谱法,质量,基质辅助激光解吸电离

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1240-03

A study on establishment of peptide mapping database of *Candida albicans**Yang Yongchang, Yu Hua, Liu Hua, Xiao Daiwen, Huang Wenfang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: **Objective** To explore the establishment of peptide mapping database of *Candida albicans*, laying the foundation for rapid diagnosis of *Candida albicans* infection. **Methods** 96 *Candida albicans* were collected clinically, and its DNA was extracted. Polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify the ITS1-5.8S-ITS2 gene fragments and restriction endonucleases were adopted to identify them. Surface enhanced laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry(SELDI-TOF-MS) instrument was applied to detect the *Candida albicans* peptide mapping, and Ciphergen ProteinChip software was used to collect data automatically. The established peptide mapping database was verified by confirmed *Candida*. **Results** According to restriction fragment length polymorphism analysis, 96 strains were confirmed as *Candida albicans*. 15 peptide peaks were captured by SELDI-TOF-MS chips. Five peptide peaks of them with stable expression were screened out, and the similarity analysis software was used to establish peptide mapping database of *Candida albicans*. More than 95% of similarity was found between peptide mapping of *Candida albicans* and established database, while less than 50% was found between peptide mapping of other *Candida* species and database. **Conclusion** The establishment of peptide mapping database of *Candida albicans* provides a theoretical basis for the rapid diagnosis of *Candida albicans* infection.

Key words: *Candida albicans*; peptide mapping; spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization

近年来,随着广谱抗菌药的广泛应用和免疫功能低下患者的日益增多,念珠菌成为临床真菌感染最重要的病原菌,在深部真菌感染中占第 1 位,在住院患者血液标本的病原体分离株中占第 4 位^[1]。白色念珠菌是临床感染最常见的机会致病菌^[2-3],传统实验室诊断大多是根据其生化反应和特异性酶显色法,具有耗时、准确性不高等缺点。因此,准确、快速鉴定白色念珠菌对深部真菌感染的临床治疗有着重要的指导意义。随着蛋白质组学的不断发展,质谱技术逐步应用于临床微生物的菌种鉴定^[4-9]。本研究对来自临床的 96 株白色念珠菌进行质谱分析,筛选白色念珠菌特征性蛋白标志物建立其蛋白指纹库,应用临床分离的白色念珠菌对建立的蛋白指纹库进行评价,为白色念珠菌感染的诊断和鉴定奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种来源 收集四川省人民医院临床感染标本(包括痰、

小便、大便、伤口分泌物等),接种于沙保弱培养基,36℃培养 24 h 后转种于科玛嘉念珠菌显色培养基,36℃孵育 48 h,其中 96 株鉴定为白色念珠菌。

1.2 主要仪器与试剂 DNA 提取液购自中山大学达安基因股份有限公司;Taq DNA 聚合酶、*Sty* I 和 *Msp* I 酶购自美国 Promega 公司,引物由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成;聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增仪、电泳仪和 Bio-Rad 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;芥子酸、乙腈、三氟乙酸、甲酸和蛋白分子质量标准品购自美国 Sigma 公司;AU 芯片、表面增强激光解析电离飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)仪和 ProteinChip 分析软件购自美国 Ciphergen Biosystems 公司,GoldView™核酸染料购自北京赛百盛基因技术有限公司,2×Taq PCR Master Mix 购自北京康

* 基金项目:四川省卫生厅项目(130156)。 作者简介:杨永长,男,硕士,主管技师,主要从事微生物研究工作。 [△] 通讯作者,E-mail: huangwf2002@21cn.com。

润诚业生物科技有限公司, 100 bp DNA Ladder 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 检测 取念珠菌悬液 20 μ L, 加入 DNA 提取液 40 μ L, 振荡混匀; 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液 4 $^{\circ}$ C 保存备用。采用真菌通用引物对白色念珠菌核糖体 DNA 内部转录间隔区 ITS1-5.8S-ITS2 基因片段进行 PCR 扩增, ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'; ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。反应体系: 2 \times Taq PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, dH₂O 6 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 然后采用凝胶成像仪检测。根据 ITS1-5.8S-ITS2 序列用 *Msp* I 酶酶切 PCR 产物进行鉴定, 酶切体系: PCR 反应产物 15 μ L, RE 10 \times Buffer 2 μ L, dH₂O 1 μ L, 牛血清白蛋白 1 μ L, 10 U *Msp* I 酶 1 μ L, 反应总体积 20 μ L。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 5 h, 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后采用 Bio-Rad 凝胶成像仪检测。

1.4 SELDI 检测念珠菌蛋白指纹 采用 Sigma 蛋白标准品胰岛素(MW 5 733.49)、细胞色素 C(MW 12 230)、肌红蛋白(MW 16 950)对 SELDI-TOF-MS 仪进行分子质量校准。调整菌液浓度, 取 3 μ L 念珠菌悬液与 50% 饱和芥子酸(含 50% 乙腈, 0.5% 三氟乙酸)等量混匀, AU 芯片点样, 每个标本重复 4 次, 室温干燥 5 min, 每孔再加 1 μ L 50% 饱和芥子酸, 自然干燥, 选择最优条件检测念珠菌蛋白, 采用 Ciphergen Protein-Chip 分析软件自动采集数据。

1.5 白色念珠菌蛋白指纹库的建立与验证 将 96 株白色念珠菌分为 2 组, 每组 48 株, 一组用于蛋白指纹库的建立, 另一组用于蛋白指纹库的验证。将 SELDI 质谱数据转换为 Excel 文件, 采用蛋白相似性分析软件, 利用白色念珠菌共有蛋白建立蛋白指纹库。运用临床分离并经准确鉴定的念珠菌对建立的蛋白指纹库进行验证, 评价其临床应用的可行性。

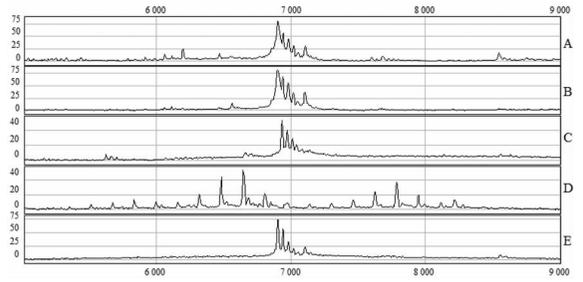
2 结果

2.1 PCR-RFLP 检测结果 所有白色念珠菌均能扩增出 537 bp 的 ITS1-5.8S-ITS2 基因片段, 限制性片段长度多态性分析证实 96 株临床分离的念珠菌均为白色念珠菌。

2.2 白色念珠菌蛋白指纹检测 经蛋白分子质量标准品标定质谱分子质量和条件优化, 选择激光强度 190, 检测敏感度 8, 优化相对分子质量范围为 3 000~30 000, 最高相对分子质量为 30 000, 采用 SELDI-TOF-MS 仪自动收集数据, 结果显示 AU 芯片能捕获近 15 个蛋白峰(图 1), 其中, 5 个蛋白峰在白色念珠菌临床分离株均有表达, 且与热带念珠菌、光滑念珠菌和克柔念珠菌蛋白峰的相对分子质量存在明显差异, 这些蛋白构成了白色念珠菌蛋白指纹图谱, 各蛋白峰在临床分离白色念珠菌间相对分子质量变异系数不超过 0.05%。

2.3 白色念珠菌蛋白指纹库的建立与验证 48 株经过鉴定的白色念珠菌质谱检测结果显示, 白色念珠菌均有 5 个蛋白峰, 将这些蛋白输入蛋白相似性分析软件, 成功建立了白色念珠菌蛋白指纹库。同时将验证组蛋白峰导入蛋白相似性分析软件, 结果发现所有导入念珠菌蛋白峰与白色念珠菌相似性均大于 95%。为了验证白色念珠菌蛋白指纹库的特异性, 笔者分别收集了准确鉴定的白色念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌

及光滑念珠菌各 5 株, SELDI 检测念珠菌蛋白指纹, 将念珠菌蛋白指纹与建立的数据库进行相似性分析, 白色念珠菌蛋白指纹与数据库的相似性均大于 95%, 而热带念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌蛋白指纹与数据库的相似性均小于 50%。



A、B: 白色念珠菌; C: 克柔念珠菌; D: 光滑念珠菌; E: 热带念珠菌。

图 1 念珠菌蛋白指纹图谱

3 讨论

目前, 临床实验室对念珠菌的鉴定多采用念珠菌显色培养基和生化实验, 具有耗时、准确性不高等缺点。临床分离念珠菌中, 以白色念珠菌居多, 因此, 如何早期、简单、准确、快速鉴定白色念珠菌成为临床实验室关注的焦点^[10-11]。

蛋白组学的发展为念珠菌鉴定提供了强有力的技术基础。研究发现, 不同念珠菌具有不同的蛋白表达^[12-15], 且在不同培养条件下, 有的蛋白峰恒定表达, 提示这些蛋白可作为念珠菌鉴定的标志物。本实验采用 PCR-RFLP 分析鉴定临床分离念珠菌, 利用 SELDI-TOF-MS 仪检测念珠菌蛋白表达, 比较白色念珠菌与热带念珠菌、光滑念珠菌和克柔念珠菌蛋白峰的相对分子质量差异, 筛选白色念珠菌的共有蛋白标志物, 利用共有蛋白标志物的相关信息成功建立了白色念珠菌蛋白指纹库。将临床分离鉴定的 48 株白色念珠菌的蛋白标志物相关信息与建立的蛋白指纹库进行相似性分析, 结果发现所有白色念珠菌的相似性均大于 95%, 说明利用建立的蛋白指纹库对白色念珠菌鉴定的准确度高。另外, 笔者收集了临床分离并准确鉴定的白色念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌和光滑念珠菌各 5 株, 采用 SELDI-TOF-MS 仪检测白色念珠菌的蛋白表达, 将这些蛋白的相关信息导入蛋白相似性分析软件, 与建立的白色念珠菌蛋白指纹图谱进行相似性比较分析, 结果发现, 白色念珠菌的相似性很高, 而其他种类念珠菌的相似性均小于 50%, 说明建立的白色念珠菌蛋白指纹图谱的特异性高。

本实验联合应用蛋白组学方法和生物信息学方法, 成功建立了白色念珠菌蛋白指纹库, 建立的蛋白指纹库鉴定白色念珠菌的准确性和特异性均很高, 而且检测时间短, 为白色念珠菌感染的快速诊断提供了一种可靠的方法。

参考文献

- [1] Ma L, Matsuo H, Ishii Y, et al. Characterization of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* isolates from a nosocomial outbreak at three geriatric hospitals[J]. J Infect Chemother, 2002, 8(2): 155-162.
- [2] Taj-Aldeen SJ, Kolecka A, Boesten R, et al. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern[J]. Infection, 2013 Dec 19. [Epub ahead of print]
- [3] Eddouzi J, Lohberger A, Vogne C, et al. Identification and antifun-

gal susceptibility of a large collection of yeast strains isolated in Tunisian hospitals [J]. *Med Mycol*, 2013, 51(7): 737-746.

[4] Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7): 2267-2272.

[5] Hof H, Eigner U, Maier T, et al. Differentiation of candida dubliniensis from candida albicans by means of MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Clin Lab*, 2012, 58(9/10): 927-931.

[6] Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of Candida species[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(2): 153-158.

[7] Buchan BW, Ledebner NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(5): 1359-1366.

[8] Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates[J]. *Mycoses*. 2013, 56(3): 229-235.

[9] Sendid B, Ducoroy P, François N, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals [J]. *Med Mycol*, 2013, 51(1): 25-32.

[10] Hamprecht A, Christ S, Oestreicher T, et al. Performance of two MALDI-TOF MS systems for the identification of yeasts isolated

from bloodstream infections and cerebrospinal fluids using a time-saving direct transfer protocol[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2013 Dec 6. [Epub ahead of print]

[11] Chen JH, Yam WC, Ngan AH, et al. Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(12): 3981-3987.

[12] Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of Candida non-albicans isolates from bloodstream infections[J]. *J Microbiol Methods*, 2013, 94(3): 262-266.

[13] Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of Candida strains isolated from blood cultures[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 73(1): 65-67.

[14] van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(3): 900-907.

[15] Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8862.

(收稿日期: 2013-12-09)

(上接第 1239 页)

23 主要流行于亚洲、南美洲及欧洲, OXA-58 主要流行于欧洲, OXA-24、OXA-40 主要发现于亚洲及伊比利亚半岛, 但在伊朗、比利时、捷克、美国均有报道^[6]。本研究收集的 80 例菌株中, 以 OXA-51 及 OXA-23 为主, 这与沈定霞^[7]、张伟红等^[8]报道结果相似。

B 类酶因活性位点为金属离子 Zn²⁺, 称为金属 β-内酰胺酶。可水解除单环类抗菌药外的其他 β-内酰胺类抗菌药, 其水解活性可被乙二胺四乙酸抑制, 不能被 β-内酰胺酶抑制剂抑制, 使细菌对青霉素类、头孢菌素类、β-内酰胺酶抑制剂、碳青霉烯类等常见药物耐药。目前, 报道的鲍氏不动杆菌 B 类酶主要包括 IMP、VIM、SIM、GIM、SPM、AIM、NDM-1 型酶^[9]。B 类酶主要由整合子上的基因盒编码, 大部分为 I 类整合子。本研究中, B 类金属酶中未检测出 GIM、SIM、SPM 基因, 检出 IMP、VIM 基因, 低于汤荣睿等^[10]的报道。

鲍氏不动杆菌的耐药机制复杂, 同一菌株可携带不同的耐药基因, 表现为多重耐药性, 耐药基因又可通过质粒、整合子等遗传单元实现水平传播, 导致医院感染的暴发和流行。对细菌耐药基因进行分子分型以及整合子、质粒等可移动遗传单元的研究, 可快速进行耐药菌的克隆传播分析, 为控制病原菌的传播提供参考。

参考文献

[1] 宋彩虹, 陈维贤. 鲍曼不动杆菌多重耐药机制研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(15): 1856-1858.

[2] Naas T, Levy M, Hirschauer C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia

[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(9): 4826-4829.

[3] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27(4): 351-353.

[4] Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(2): 544-547.

[5] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(9): 826-836.

[6] Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2009, 3(5): 335-341.

[7] 沈定霞, 闫中强, 罗燕萍, 等. 检测多耐药鲍氏不动杆菌的碳青霉烯酶及整合酶基因[J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, 18(1): 11-13.

[8] 张伟红, 叶惠芬, 杨银梅, 等. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌耐药表型和碳青霉烯酶基因型分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2011, 11(1): 45-48.

[9] Pogue JM, Mann T, Barber KE, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, surveillance and management [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013, 11(4): 383-393.

[10] 汤荣睿, 龚雅利, 张晓兵. 碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌耐药性分析及金属 β-内酰胺酶检测[J]. *重庆医学*, 2011, 40(21): 2094-2095.

(收稿日期: 2014-02-21)