

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01156

## 棘阿米巴延吉土壤分离株 CJY/S3 的 18S rDNA 基因型鉴定

朴成钢<sup>1</sup>, 玄英花<sup>2</sup>, 李红花<sup>2</sup>, 金松竹<sup>2</sup>, 崔春权<sup>2</sup>, 朴杰<sup>2\*</sup>

1. 延边大学福祉医院外科, 延吉 133002

2. 延边大学医学院病原生物学教研室, 延吉 133002

[关键词] 棘阿米巴; 核糖体基因型; 18S rDNA

[中图分类号] R 382.1

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2012)10-1156-02

### 18S rDNA genotyping of *Acanthamoeba sp.* CJY/S3 isolated from soil of Yanji city

PIAO Cheng-gang<sup>1</sup>, XUAN Ying-hua<sup>2</sup>, LI Hong-hua<sup>2</sup>, JIN Song-zhu<sup>2</sup>, CUI Chun-quan<sup>2</sup>, PIAO Jie<sup>2\*</sup>

1. Department of Surgery, Fuzhi Hospital, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin, China

2. Department of Pathogen Biology, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin, China

[Key words] *Acanthamoeba*; ribotyping; 18S rDNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10): 1156-1157]

致病性自由生活棘阿米巴(*Acanthamoeba sp.*)广泛存在于土壤、水、空气、腐败物等自然环境中,某些虫种可引起人体棘阿米巴性角膜炎(*acanthamoeba keratitis*, AK)和肉芽肿性阿米巴性脑炎(*granulomatous amoebic encephalitis*, GAE)<sup>[1-2]</sup>。棘阿米巴不仅可直接对人体致病,还可作为部分致病性细菌的宿主,如军团菌(*Legionella pneumophila*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli* O157)、分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)等<sup>[3-5]</sup>。

棘阿米巴根据其滋养体和包囊的特殊形态特征,在属的水平上的鉴定是不难的。Pussard 和 Pons<sup>[6]</sup>根据包囊的大小和形态特征将棘阿米巴分为 3 类。但由于不同虫种的棘阿米巴间形态差异甚微,或受实验室培养条件的影响,单靠形态很难在种的水平上鉴别。目前,18S rDNA 基因分型被作为最确切的棘阿米巴的分型方法<sup>[5]</sup>。本研究对延吉市土壤中分离的棘阿米巴 CJY/S3 株进行 18S rDNA 基因型的鉴定,探讨棘阿米巴 CJY/S3 株的分子生物学特性。

### 1 材料和方法

1.1 棘阿米巴 CJY/S3 的分离及培养 按文献<sup>[7]</sup>从延吉市土壤中分离并实验室培养、纯化棘阿米巴 CJY/S3。将纯化的棘阿米巴虫种置于 PYG 培养液培养,当多数棘阿米巴处于滋养体阶段时取棘阿米巴培养液 50 ml,用常规酚/氯仿法提取基因组 DNA。PCR 扩增引物为:5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT-3'和 5'-GGA TCC AAG CTT GAT CCT TCT GCA GGT TCA CCT AC-3'。反应条件:94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2.5 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。将 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分离, pGEM-T

easy System 连接到载体,转入到 *E. coli* 培养。选出阳性克隆,用 Wizard<sup>®</sup> plus Minipreps 试剂盒(Promega, USA)提取质粒 DNA, *EcoRI* 酶切,电泳确认目的基因并送 MacroGen 公司测序。

1.2 18S rDNA 基因型分析 将 CJY/S3 和广东土壤分离株 CG/S1 株的基因序列<sup>[8]</sup>与 GenBank 中已知的基因序列作 BLAST 比较分析,并采用 Clustal X 软件进行序列匹配排列分析以建立进化树。

### 2 结果

2.1 PCR 结果 应用棘阿米巴属 18S rDNA 特异性引物,PCR 扩增的产物用琼脂糖凝胶电泳分离出大小约 2 300 bp 的条带。

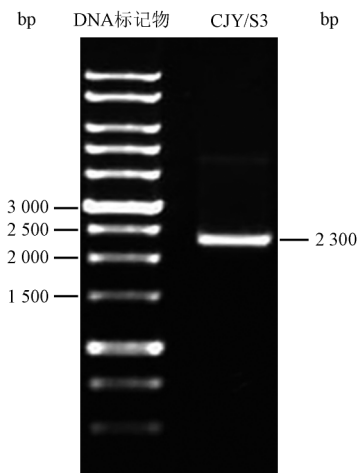


图 1 CJY/S3 18S rDNA PCR 产物

[收稿日期] 2012-05-18

[接受日期] 2012-07-03

[作者简介] 朴成钢, 主治医师. E-mail: yjpcg0102@hotmail.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0433-2435162, E-mail: piaojie@ybu.edu.cn

2.2 18S rDNA 基因测序结果 延吉市土壤分离株 CJY/S3 的 18S rDNA 基因长度为 2 292 bp。BLAST 比较分析显示, CJY/S3 株基因序列最接近于琳氏棘阿米巴 (*A. lenticulata*) 68-2 株 (T5), 与其有 99% 相同基因序列。Clustal X 软件进行序列匹配排列分析表明, CJY/S3 与琳氏棘阿米巴 68-2 和广东土壤分离株 CG/S1 的序列差异率分别为 0.26% 和 0.52%。

2.3 建立进化树状图 根据序列比较分析, 利用 Clustal X 软件的 Tree View 对 CJY/S3 株与 T1~T12 型和 CG/S1 株棘阿米巴构建进化树状图 (图 2)。

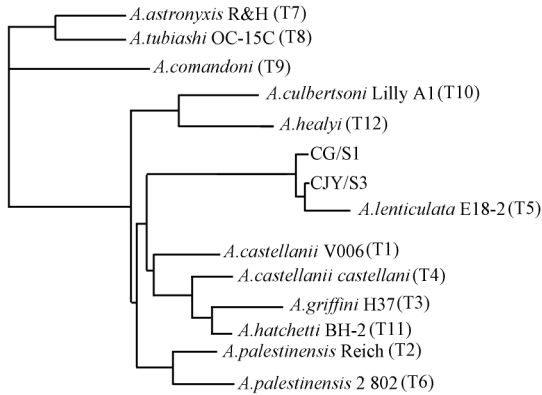


图 2 CJY/S3 与 T1~T12 型和 CG/S1 株棘阿米巴的树状图

### 3 讨论

自由生活的阿米巴种类繁多, 广泛分布于水及土壤等环境中。部分致病性阿米巴如耐格里属阿米巴、棘阿米巴、狒狒巴拉姆希阿米巴等可引起免疫功能低下人群中中枢神经系统感染。

本研究采用 18S rDNA 基因序列测序方法对棘阿米巴延吉土壤分离株 CJY/S3 进行其虫种的鉴定, 结果显示, 棘阿米巴 CJY/S3 株的 18S rDNA 全基因长度为 2 292 bp, 与琳氏棘阿米巴 68-2 株有 99% 相同基因序列。利用 Clustal X 软件进行序列匹配排列分析和进化树状图分析, 结果表明: CJY/S3 株的基因型为 T5, 与基因库中琳氏棘阿米巴 68-2 株的亲缘关系最近, 棘阿米巴 CJY/S3 株与琳氏棘阿米巴 68-2 的序列差异率为 0.26%, 虫种鉴定为琳氏棘阿米巴。

棘阿米巴是 AK 和 GAE 的病原体, Byers 研究小组根据 18S rDNA 基因分型方法将棘阿米巴分为 T1~T12 型<sup>[7-9]</sup>, 近年来陆续有关于其新型的报道<sup>[10]</sup>。致病性的棘阿米巴的基因型多属于 T4 型, 其次为 T3 型, 少数为 T2、T5、T6、T11 型<sup>[11-15]</sup>。Zhang 等<sup>[11]</sup>对 26 例 AK 患者的角膜分离中的 18 种棘阿米巴进行 18S rDNA 基因型分析, 17 例为 T4 型, 1 例为 T3 型。Maghsood 等<sup>[12]</sup>报道从英国和伊朗的 24 例 AK 患者中分离的棘阿米巴中 17 例 (70.8%) 为 T4 型、3 例 (12.5%) 为 T2 型、3 例 (12.5%) 为 T3 型、1 例 (4.2%) 为 T11 型; 与此相反, 从伊朗环境中分离的 12 种棘阿米巴中, 7 种 (58.3%) 为 T2 型, 4 种 (33.3%) 为 T4 型 (有 1 种未分离)。Spanakos 等<sup>[13]</sup>报道, 5 例希腊 AK 患者中的 4 例为 T4 型棘阿米巴, 1 例为 T5 型琳氏棘阿米巴。本研究小组从延吉市土壤中分离并培养的 CJY/S3 株棘阿米巴为 T5 型, 其是否具有病原性, 还有待于进一步的研究。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Lackner P, Beer R, Broessner G, Helbok R, Pfausler B, Brennes C, et al. Acute granulomatous acanthamoeba encephalitis in an immunocompetent patient[J]. Neurocrit Care, 2010, 12: 91-94.
- [2] Maritschnegg P, Sovinz P, Lackner H, Benesch M, Nebl A, Schwinger W, et al. Granulomatous amoebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal antimicrobial therapy and hyperbaric oxygen [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49: 446-448.
- [3] Barker J, Humphrey T J, Brown M W. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 173: 291-295.
- [4] Kennedy G M, Morisaki J H, Champion P A. Conserved mechanisms of *Mycobacterium marinum* pathogenesis within the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii* [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78: 2049-2052.
- [5] 玄英花, 崔春权, 郑善子. 棘阿米巴土壤分离株 CB/S1 内共生细菌的 16S rDNA 序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29: 81-83.
- [6] Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du gene *Acanthamoeba* (protozoa Amoe-bida) [J]. Protistologica, 1977, 13: 557-598.
- [7] Gast R J, Ledee D R, Fuerst P A, Byers T J. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types [J]. J Eukaryot Microbiol, 1996, 43: 498-504.
- [8] 郑善子, 玄英花, 王月华. 棘阿米巴土壤分离株 CB/S1 的 18S rDNA 基因型鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22: 1039-1042.
- [9] Stothard D R, Schroeder-Diedrich J M, Awwad M H, Gast R J, Ledee D R, Rodriguez-Zaragoza S, et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types[J]. J Eukaryot Microbiol, 1998, 45: 45-54.
- [10] Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakank L, Jongwutiwes S. Identification of a novel t17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48: 4636-4640.
- [11] Zhang Y, Sun X, Wang Z, Li R, Luo S, Jin X, et al. Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in North China[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45: 1904-1907.
- [12] Maghsood A H, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan N A. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates[J]. J Med Microbiol, 2005, 54: 755-759.
- [13] Spanakos G, Tzanetou K, Miltakakis D, Patsoula E, Malamou-Lada E, Vakalis N C. Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece-report of a clinical isolate presenting T5 genotype[J]. Parasitol Int, 2006, 55: 147-149.
- [14] Blaschitz M, Köhler M, Aspöck H, Walochnik J. Detection of a serine proteinase gene in *Acanthamoeba* genotype T6 (Amoebozoa: Lobosea) [J]. Exp Parasitol, 2006, 114: 26-33.
- [15] Lorenzo-Morales J, Morcillo-Laiz R, Martín-Navarro C M, López-Vélez R, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, et al. *Acanthamoeba* keratitis due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain [J]. Cont Lens Anterior Eye, 2011, 34: 83-86.