DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.036
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
832 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)09-0832-02

白念珠菌菌丝的诱导培养

Hypha formation of *Candida albicans* by induced culture

周村建,郝 飞,王 鲁,钟白玉 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨培养条件对白念珠菌菌丝形成的影响。方法 改变培养基成分、pH值及培养温度,诱导白念珠菌芽管(早期菌丝相)的形成。结果 M199、1640培养在pH 7.0、37 ℃振荡培养时可诱导白念珠菌生长为纯的菌丝。结论 优化培养条件可获得纯的白念珠菌菌丝相细胞。

白念珠菌是人类生态菌群的正常成员之一,也是重要的条件致病真菌。近年研究集中在与白念珠菌毒力相关的因素如粘附能力、分泌的酶类及其表型转换等方面[1]。白念珠菌生长形态可表现为酵母样呈圆形,条件改变时可呈细长状如芽管或菌丝,这种形态转换称为表型转换,与其致病能力密切相关,白念珠菌菌丝的形成与发病有着密切的关系。

芽管的形成(菌丝的早期形态)是鉴定白念珠菌的重要依据,常受到诸如菌株来源、培养温度、培养基pH值、培养基成分等诸多因素的影响,获得较纯的白念珠菌菌丝相细胞是研究其表型转换分子机制的前提,但目前尚无统一的标准。为此,我们对上述各种因素影响白念珠菌芽管的形成进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:白念珠菌SC 5314为W A. Fonzi赠送,ATCC 01332(血液来源)及ATCC 01815(尿液来源)由北京医科大学真菌保存中心李若瑜教授惠赠,白6(分离于皮肤)为本院临床分离菌株;培养基:YPD(丰富培养基),含1%酵母提取物、2%蛋白胨、2%葡萄糖,按比例配制并高压消毒;低硫酸盐培养基(LSM),每升含NH_4Cl 1.33 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g,K_2HPO_4 14.0 g,KH_2PO_4 6.0 g,NaCl 5 g,葡萄糖12.5 g,D-生物素0.001 g,按文献提供方法配制后调pH为7.0,过滤除菌备用;M199及1640培养基,按说明书配制,将pH值分别调至4.5和7.0,无菌过滤处理。

1.2 实验步骤

将YPD斜面生长48 h的白念珠菌转种于YPD液体培养基,血球计数板计数,细胞调至5.0×10^6/ml,置摇床150 r/min、25 ℃振荡培养;48 h后到达对数生长晚期,此时计数细胞约4×10^8/ml~5×10^8/ml,移至离心管,3 000 r/min离心15 min,弃上清,以无菌去离子水将细胞调至1×10^8/ml;螺口锥形瓶中加入上述各种诱导培养基,加入高浓度的细胞悬液,调细胞数为5×10^6/ml,分别置25 ℃和37 ℃水浴摇床,以150 r/min振荡培养;每1 h取样观察细胞形态并在高倍镜下观察100个细胞中形成芽管的细胞数;所有试验均重复3次,并以人血清芽管试验作为对照组。

2 结果

2.1 不同诱导培养基、pH值、培养温度对白念珠菌SC 5314菌株芽管形成的影响见表1

表1 培养基成分、pH值、培养温度对芽管形成的影响

培养基	诱导时间(h)	pH 4.5		pH 7.0	
		25 ℃	37 ℃	25 ℃	37 ℃(%)
1640	1	0	0	0	10
	2	0	0	0	85
	3	0	0	0	99
M199	1	0	0	0	10
	2	0	0	0	80
	3	0	0	0	97
LSM	3	—	—	—	40
人血清	3	—	—	—	90

"0":白念珠菌以芽生生长;"—":示无操作;百分率为芽管形成率

当以M199及1640为培养基时,只有同时满足培养基pH为7.0及培养温度为37 ℃时,才能诱导出较纯的菌丝相白念珠菌(芽管),不能同时满足上述两种条件则以芽生的方式生长(图1);LSM可诱导出用于白念珠菌鉴定所需的芽管量(>5%),但不能获得纯的菌丝相白念珠菌;临床对白念珠菌进行快速鉴定的传统方法是观察血清中芽管的形成以鉴定白念珠菌,本实验观察到人血清可将大部分白念珠菌(90%)诱导成菌丝生长。

显微镜下观察到,当以M199及1640为培养基,pH为7.0及培养温度为37 ℃诱导白念珠菌芽管(菌丝)形成的过程中,只需3 h即可诱导出较纯的菌丝相白念珠菌,此时可见菌丝分隔,诱导时间过长,菌丝相白念珠菌可出现旁侧芽生生长方式,影响菌丝的纯度(图2,3)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200013)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200013)
作者简介:周村建(1970-),男,重庆市梁平县人,博士研究生,讲师,主要从事医学真菌方面的研究。电话:(023)68754416
收稿日期:2003-07-07;修回日期:2003-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

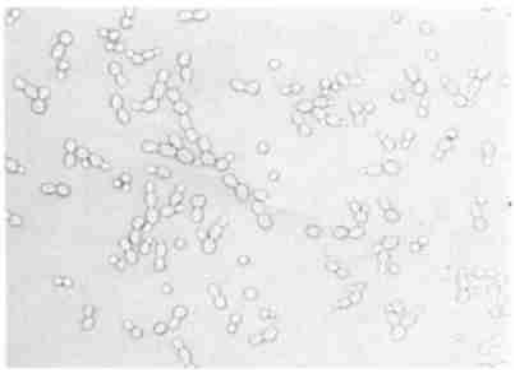


图 1　芽生白念珠菌　(× 200)



图 2　白念珠菌芽管形成　(诱导培养 2 h, × 200)

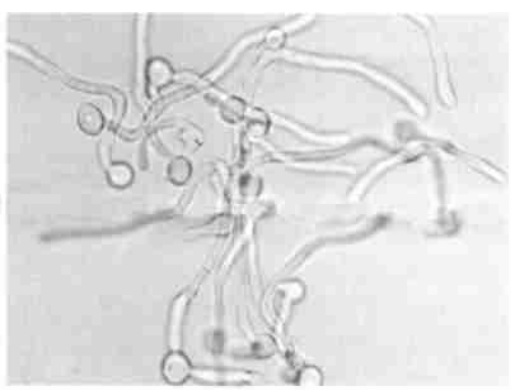


图 3　白念珠菌菌丝形成　(诱导培养 3 h, 可见菌丝分隔, × 400)

2.2　不同来源菌株的芽管形成率见表 2

表 2　菌株来源对芽管形成的影响(%)

诱导时间(h)	SC5314	ATCC1332	ATCC1815	白 6
1	10	10	7	5
2	85	80	35	18
3	99	98	48	30

3　讨论

实验显示, 白念珠菌 SC 5314 在人血清中经 3 h、37 ℃的诱导培养虽可形成高达 90%的芽管, 但不能获得纯的白念珠菌菌丝相细胞, 这与人血清中可能含有抗白念珠菌的抗体, 也可能与含有转铁蛋白等物质相关, 这些物质对白念珠菌的芽管形成具有抑制作用。此外, 不加选择的血清也可能含有肝炎病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)等传染因子, 如操作不当, 可危害实验室工作人员的安全, 因此很多实验室开始合成并使用非人血清培养基, 如 LSM。但本研究结果显示, 虽然 LSM 能诱导出临床诊断所需的芽管形成率, 但仍不能获得较纯的白念珠菌菌丝; 1640、M199 培养基为细胞培养研究中常用的两种合成培养基, 成分明确且已商品化, 其中含有多种能促进菌丝形成的因子, 如脯氨酸、D-生物素等, 将其用于诱导培养白念珠菌菌丝时, 在 37 ℃、pH 7.0 的条件下, 可获得 98% ~ 99%的菌丝相细胞, 可满足白念珠菌菌相转换的分子生物学研究。

影响白念珠菌菌丝形成的因素除上述外, 与白念珠菌菌株的来源也密切相关。本研究表明, 从血液来源的两株白念珠菌 SC5314、ATCC1332 能被诱导出 99%的芽管, 而从皮肤来源的白 6 只能诱导出 30%的芽管, 尿液来源的 ATCC 01815 菌株介于其间, 这种菌丝形成的差异可能与不同来源白念珠菌的活力及毒力密切相关。临床研究显示, 从急性感染患者分离的白念珠菌比共生的白念珠菌更易形成菌丝, 这与上述研究相吻合。

白念珠菌的菌相转换是其毒力因子之一, 菌丝的形成使其更容易入侵和逃避宿主的防御[2], 其菌相转换已成为当前真菌学界研究的热点, 本研究获得了较纯的白念珠菌菌丝相细胞, 为进一步研究白念珠菌菌相转换的分子机制提供了基础。

关键词: 白念珠菌; 二态性; 菌丝; 条件培养

中图法分类号: R379.4; R446.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Richard A, Calderone, Fonzi W A. Virulence factors of Candida albicans [J]. Trends microbiol, 2001, 9(7): 327－335.

[2] Odds F C. Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder[J]. Mycoses, 1997, 40(2): 9－12.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net