

三种糖类对新生隐球菌荚膜相关基因 *CAP10* 启动活性的影响

赵志宇, 温 海*, 陈孙孝 (第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 研究葡萄糖、甘露糖、半乳糖对新生隐球菌荚膜相关基因 *CAP10* 启动活性的影响。**方法:** 用含 *CAP10* 编码区上游 5' 侧翼序列 (-951~0 bp) 和报告基因的重组体转化酵母, 分别用不同浓度 (10、20、40、60、80 mg/ml) 的葡萄糖、甘露糖、半乳糖对其进行干预, 用 ELISA 方法检测 CAT 表达值, 比较各组间 CAT 表达活性的不同。**结果:** 不同浓度的葡萄糖和甘露糖对 CAT 的表达强弱无明显的影响; 而不同浓度的半乳糖对 CAT 的表达强弱有明显的影响, 而且这种正向诱导作用在实验所用的剂量范围内具有剂量依赖关系。**结论:** 葡萄糖和甘露糖对 *CAP10* 启动活性无明显影响; 半乳糖对 *CAP10* 的启动活性有明显的诱导作用, 推测 *CAP10* 基因可能与新生隐球菌中半乳糖的代谢有关。

[关键词] 新生隐球菌; 荚膜; 基因; 启动子; 葡萄糖; 甘露糖; 半乳糖

[中图分类号] R 379.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0132-04

Effects of 3 carbohydrates on *CAP10* promoter activity of *Cryptococcus neoformans* capsule-associated gene

ZHAO Zhi-yu, WEN Hai*, CHEN Sun-xiao (Department of Dermatology and Venereology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effects of glucose, mannose and galactose on *CAP10* promoter activity of *Cryptococcus neoformans* capsule-associated gene. **Methods:** Yeast cells were transfected with plasmid containing a 951 bp length of 5' upstream flanking sequence of *CAP10* coding region and a reporter gene, chloramphenicol acetyl transferase (CAT); the transfectants were treated with different concentrations (10, 20, 40, 60, 80 mg/ml) of glucose, mannose and galactose. CAT activity was assessed by ELISA method and CAT activities of different groups were compared. **Results:** Different concentrations of glucose and mannose had no obvious influence on CAT activity; different concentrations of galactose had obvious influence on CAT activity and the influence was positively dependent with its dose within the experimental concentration range. **Conclusion:** Glucose and mannose have no obvious effect on the activity of *CAP10* promoter; galactose has obvious inductive effect on activity of *CAP10* promoter, suggesting that *CAP10* gene might be related with galactose metabolism.

[KEY WORDS] *Cryptococcus neoformans*; capsule; gene; promoter; glucose; mannose; galactose

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 132-135]

新生隐球菌是常见的致病真菌之一, 由于近年来艾滋病的流行及临床上免疫抑制剂的大量应用, 新生隐球菌病的发病率呈明显的上升趋势^[1,2]。多糖荚膜结构是新生隐球菌最主要的毒力因子之一, 作为一个天然的屏障, 可以帮助隐球菌逃避宿主吞噬细胞的吞噬作用、抑制炎症反应, 从而逃避宿主的免疫攻击^[3,4]。它主要由甘露聚糖、葡聚糖、木糖、半乳糖等组成。目前已知荚膜的合成与 *CAP60*、*CAP59*、*CAP64*、*CAP10* 等基因有关。这 4 个基因编码的荚膜蛋白是荚膜合成所必需的, 缺失任何一个基因都会导致荚膜的生成缺陷, 从而导致致病力的下降^[5~8]。

本实验构建了含 *CAP10* 上游启动序列及报告基因的重组质粒, 并转化酵母, 得到能表达报告基因的转化子。以此为平台, 以不同浓度的半乳糖、甘露糖、葡萄糖对转化子进行干预, 通过检测报告基因的表达强弱来探讨 3 种糖类对 *CAP10* 基因启动活性的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒 酿酒酵母 URA3 缺陷株 S-78、新生隐球菌 B-3501 由中国医学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室保存; 大肠杆菌 DH5 α 购自 Promega 公司; 质粒 Pcxj18 由复旦大学遗传所保存; Pcat-enhancer Vector 购自 Promega 公司。

1.2 主要试剂 酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自华舜试剂公司; Proofstart 高保真 PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司; 限制性内切酶及 T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司; 氯霉素乙酰基转移酶 (CAT) ELISA 检测试剂盒购自 Roche 公司; Glass Beads 购自 Sig-

[基金项目] 国家自然科学基金 (30270080). Supported by National Natural Science Foundation of China (30270080).

[作者简介] 赵志宇, 博士, 主治医师。

E-mail: zhaoyz412@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: wenhai98@sohu.com

ma公司;其余试剂为国产分析纯试剂,常用试剂配制参照文献[9]。

1.3 重组体Pcxjcat951的构建

1.3.1 含CAT报告基因重组体Pcxjcat的构建

根据Pcat-enhancer质粒说明书提供的CAT的全长序列,应用DNA分析软件和引物设计软件进行设计,在引物的两端分别加入限制性酶Sma I和Xba I的酶切位点,引物序列如下:5' tccccgggatg-gagaaaaaatcactgg,3' cgactctagattacgcccc。以Pcat-enhancer为模板,用Proofstart高保真PCR试剂盒扩增各重组体目的片段,扩增体系和扩增条件按操作说明进行。

扩增产物经切胶小量柱回收后,用限制性内切酶Sma I和Xba I酶切目的片段产物及Pcxj18。切胶回收酶切后的质粒和目的片段,定量。酶切后的目的片段和线性Pcxj18具有相同的黏末端,经T₄连接酶连接。感受态细菌的制备和转化参见文献[9]。经氨苄青霉素抗性筛选,小量酶切初步鉴定、测序正确后,大量扩增阳性克隆。所得重组体命名为Pcxjcat。

1.3.2 含终止子及CAT的重组体Pcxjcat951的构建

根据GenBank所提供的新生隐球菌TRP1基因的终止子序列(Accession M7491),应用DNA分析软件和引物设计软件Primer Premier 5进行引物设计,引物的两端分别加入限制性酶Xba I和Pst I的酶切位点,引物序列如下:5' atggtacctgtgaaggc-cgtaaggggtt,3' gcatcctgcaggcgacagaagaaatgggtga。

提取新生隐球菌B-3501基因组DNA(参见酵母基因组DNA提取试剂盒说明书)。以新生隐球菌B-3501基因组DNA为模板,扩增体系和扩增条件按操作说明进行。用限制性内切酶Xba I和Pst I酶切目的片段产物及Pcxjcat,目的片段和载体质粒连接、感受态细菌的制备和转化步骤同前。重组体经小量酶切鉴定、测序正确后,大量扩增阳性克隆。所得重组体命名为Pcxjcat951。

1.3.3 含CAP10基因上游序列及CAT、终止子的重组体Pcxjcat951的构建

根据GenBank所提供的CAP10阅读框上游的核苷酸序列(Accession AF144574),应用DNA分析软件和引物设计软件Primer Premier 5进行引物设计,在引物的两端分别加入限制性酶Sac I或Sma I酶切位点。拟插入的片段长度分别为951 bp,所设计引物序列为:5' cgagctcctgaaacacgagtgacg,3' atggtacctaaggtcca-caagtgc。模板为新生隐球菌基因组DNA,扩增体系和扩增条件按操作说明进行。用限制性内切酶Sac

I或Sma I酶切目的片段产物及Pcxjcat951,目的片段和载体质粒连接、感受态细菌的制备和转化步骤同前。重组体经小量酶切鉴定、测序正确后,大量扩增阳性克隆。所得重组体命名为Pcxjcat951。

1.4 重组体Pcxjcat951的CAT表达活性鉴定

1.4.1 酵母转化

将重组质粒Pcxjcat951及Pcxjcat951分别经化学转化法转化酵母S-78,转化方法步骤如下:从YPD平板上挑取S-78克隆,在3 ml YPD培养基中30℃震荡过夜;取上述菌液0.5 ml转接到50 ml YPD中,30℃震荡培养5 h,5 000 r/min离心,5 min收获细胞;用大约20 ml水洗菌,离心,弃水;上述沉淀中加入LiAc溶液(1 mol/L LiAc : 10×TE : H₂O=1 : 1 : 8)1 ml悬浮,即得感受态细胞;取鲑精DNA稀释成5 mg/ml,煮沸5 min,快速在冰中冷却;取感受态细胞200 μl,依次加入PEG3900液体(1 mol/L LiAc : 10×TE : 50% PEG=1 : 1 : 8)1.2 ml,变性载体DNA 20 μl(约102 μg),质粒1 μl(0.5~1 μg);30℃缓慢震荡培养30 min;42℃热休克15 min,离心;200 μl TE溶液洗1次,重新悬浮于200 μl TE溶液中,均匀涂布YSD平板。30℃倒置培养2~4 d。提取各转化子的基因组DNA,以此为模板,用CAT基因的扩增引物为引物,进行PCR扩增,产物送基因公司测序鉴定。

1.4.2 蛋白提取及定量

转化子在YSD液体培养基中30℃震荡培养96 h,用显微计数法定量,用YSD调整菌量为1×10⁸/ml,离心进行蛋白提取。用预冷的PBS洗3次后,加入裂解缓冲液(CAT ELISA试剂盒中提供)1 ml,加入玻璃珠剧烈震荡2 min,室温下静止30 min,离心10 min后,紫外分光光度计进行蛋白定量。

1.4.3 CAT活性测定及数据处理

按CAT ELISA试剂盒说明进行。200 μl细胞裂解液加入已包被抗体的96孔板,反应结束后加入底物显色,酶标仪405 nm和492 nm测定光密度值。所有测得的CAT值用蛋白浓度进行校正,实验重复3次,采用3次实验的均值计算各重组体的相对活性。

1.5 三种糖类对CAP10启动活性的影响

分别在100 ml YSD培养基中加入1、2、4、6、8 g的半乳糖、甘露糖、葡萄糖,接种Pcxjcat951酵母转化子,30℃震荡培养96 h,用显微计数法定量,用YSD调整菌量为1×10⁸/ml,离心提取蛋白。蛋白提取及定量、CAT活性测定、数据处理等方法和步骤同前。

1.6 统计学处理

利用SPSS统计软件进行统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用各组间的方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定结果 Pcxjcat、Pcxjcatt、

Pcxjcatt951 的酶切鉴定结果见图 1,图中的小片段为构建重组质粒时插入的片段。各重组质粒均经基因公司测序,证明插入片段正确。

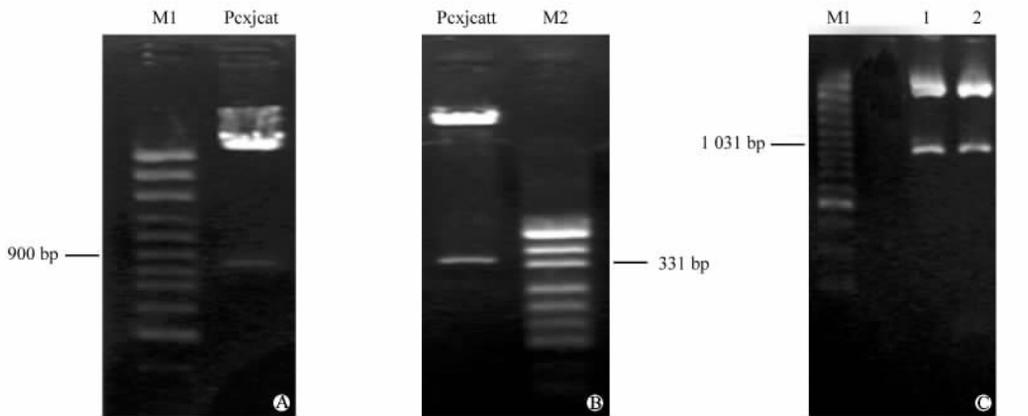


图 1 重组质粒限制性内切酶酶切结果

Fig 1 Recombinant plasmids digested by restriction endonuclease

A: Pcxjcat digested by *Sma* I and *Xba* I; B: Pcxjcatt digested by *Pst* I and *Xba* I; C: Pcxjcatt951 digested by *Sac* I and *Sma* I. M1: 1 kb DNA ladder marker; M2: PUC19 DNA ladder marker; 1,2: Pcxjcatt951

2.2 转化子的 PCR 鉴定结果 两种转化子的 PCR 产物(图 2)分别经基因公司测序,序列与 CAT 基因序列一致,证明转化正确。

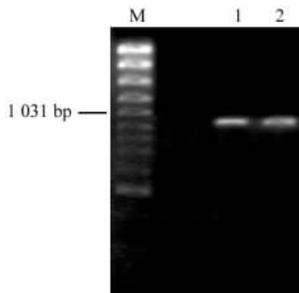


图 2 酵母转化子 PCR 结果

Fig 2 PCR results of yeast transformants

M: 1 kb DNA ladder marker; 1: Pcxjcatt951; 2: Pcxjcatt

2.3 重组体 Pcxjcatt951 的 CAT 表达活性鉴定结果 CAT 测定结果用相应的转染的质粒摩尔数、蛋

白浓度校正后,以第 1 次实验中 Pcxjcatt951 酵母转化子 CAT 表达量为 1,各转化子 CAT 相对表达量的最终结果如下 ($n=3$): Pcxjcatt951 为 0.207 ± 0.019 , Pcxjcatt 为 0.043 ± 0.012 ($P < 0.01$)。说明 Pcxjcatt951 有明显的 CAT 表达活性, CAP10 阅读框上游序列 -951~0 bp 有明显的启动活性。

2.4 不同浓度葡萄糖、甘露糖、半乳糖对 CAP10 启动序列启动活性的影响 Pcxjcatt951 酵母转化子分别用浓度为 10、20、40、60、80 mg/ml 葡萄糖、甘露糖、半乳糖进行干预, CAT 表达活性用 ELISA 方法定量,各浓度的 D 值经蛋白含量校正, CAT 的相对表达量的结果如表 1。经方差分析,葡萄糖各浓度组间相比无显著性差异;甘露糖各浓度组间相比亦无显著性差异;而半乳糖各浓度组间相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。在同一培养条件下半乳糖对 CAT 的表达有明显的诱导作用,而且这种正向诱导作用在实验所用的剂量范围内具有剂量依赖关系。

表 1 不同浓度的葡萄糖、甘露糖、半乳糖对 CAP10 基因启动子活性的影响

Tab 1 Effects of different concentrations of glucose, mannose, galactose on activities of CAP10 promoter

($n=3, \bar{x} \pm s$)

Carbohydrate	Concentration(ρ_B /mg · ml ⁻¹)				
	10	20	40	60	80
Glucose	0.214 ± 0.098	0.197 ± 0.079	0.191 ± 0.112	0.200 ± 0.121	0.189 ± 0.099
Mannose	0.133 ± 0.016	0.128 ± 0.012	0.132 ± 0.035	0.134 ± 0.027	0.127 ± 0.023
Galactose	0.184 ± 0.016	0.282 ± 0.040**	0.472 ± 0.056**	0.625 ± 0.044**	0.816 ± 0.040**

** $P < 0.01$ vs 10 mg/ml concentration group

3 讨论

本实验构建了含CAP10启动子及报告基因的重重组体,获得了重组体的转化子。通过报告基因表达活性的比较,证明了CAP10阅读框上游序列-951~0 bp具明显的启动活性,为进一步研究CAP10基因的启动子诱导机制奠定了基础。在此基础上,以不同浓度的半乳糖、甘露糖、葡萄糖对转化子进行干预,通过检测报告基因的表达强弱来探讨3种糖类对CAP10基因启动活性的影响。结果表明,不同浓度的葡萄糖和甘露糖对CAT的表达强弱无明显的影响,说明这2种糖类对CAP10启动活性无明显的诱导作用。而不同浓度的半乳糖对CAT的表达强弱有明显的影响,说明半乳糖对CAP10的启动活性有明显的诱导作用,而且这种正向诱导作用在实验所用的剂量范围内具有剂量依赖关系。

计算机模拟分析表明在CAP10编码区上游5'侧1 000 bp内有多个GAL4的结合位点,如图3。

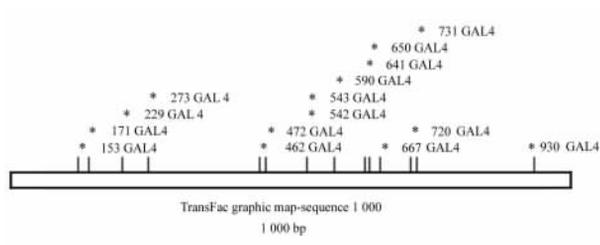


图3 计算机模拟的核因子GAL4可能结合位点示意图(DNAssist 1.0)

Fig 3 Computer analysis of transcription factor GAL4 binding sites(DNAssist 1.0)

GAL4是酵母半乳糖代谢酶转录所必需的蛋白质因子,以二聚体的形式起作用,受半乳糖的诱导,能与基因上游激活序列中的反转对称结构结合^[10]。实验结果表明CAP10启动子活性受半乳糖的正向诱导,在一定浓度范围内随半乳糖剂量增加而表达增强。综上所述,可以推测CAP10基因有可能和新生隐球菌中半乳糖的代谢有关。

新生隐球菌多糖荚膜中含有半乳糖多聚体成分,其参与合成GALXM,与GXM(由葡聚糖、甘露聚糖、木糖组成的荚膜多糖)相比,是一种更复杂的荚膜多糖。GALXM相对分子质量远远小于GXM,占多糖成分的7%~12%,其与蛋白结合成糖蛋白

形式,某些荚膜的突变株仅含有GALXM,而无GXM^[11,12]。CAP10基因编码荚膜形成所需要的蛋白,实验结论提示其所合成的蛋白可能与半乳糖的结合有关。可能机制是:当菌体环境的半乳糖含量在一定范围内增加后,CAP10基因的启动序列上的GAL4受半乳糖的诱导,解除其抑制作用,从而促进了相应的蛋白合成,合成的蛋白与半乳糖结合,参与荚膜的生成。以上机制是否存在还需进一步实验证实。

[参考文献]

- [1] Blasi E, Colombari B, Orsi CF, et al. The human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitor indinavir directly affects the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004, 42: 187-195.
- [2] Shrestha RK, Stoller JK, Honari G. Pneumonia due to *Cryptococcus neoformans* in a patient receiving infliximab; possible zoonotic transmission from a pet cockatiel [J]. Respir Care, 2004, 49: 606-608.
- [3] Bose I, Reese AJ, Ory JJ, et al. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans* [J]. Eukaryot Cell, 2003, 2: 655-663.
- [4] Ellerbroek PM, Walenkamp AM, Hoepelman AI, et al. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators [J]. Curr Med Chem, 2004, 11: 253-266.
- [5] Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14: 4912-4919.
- [6] Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence [J]. Infect Immun, 1996, 64: 1977-1983.
- [7] Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans* [J]. Infect Immun, 1998, 66: 2230-2236.
- [8] Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans* [J]. Bacteriol, 1999, 181: 5636-5643.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T 著. 分子克隆实验指南 [M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] 徐晋麟, 徐泌, 陈凉. 现代遗传学原理 [M]. 北京: 科学出版社, 2005. 256.
- [11] Vaishnav VV, Bacon BE, O'Neill M, et al. Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* CAP67 [J]. Carbohydr Res, 1998, 306: 315-330.
- [12] James PG, Cherniak R, Jones RG, et al. Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans* CAP67 [J]. Carbohydr Res, 1990, 198: 23-38.

[收稿日期] 2005-09-09

[修回日期] 2005-11-01

[本文编辑] 贾向春