

· 短篇论著 ·

# 白念珠菌相转换基因 HYR1 上游 N-乙酰葡萄糖胺激活序列的初步定位

## Location analysis of N-acetylglucosamine activation region of promoter sequence of *Candida albicans* yeast-hyphal transition gene

陈江汉, 温海, 汪晓军, 顾菊林, 潘炜华, 刘晓刚, 陈孙孝, 廖万清\*

(第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**对白念珠菌相转换基因 HYR1 上游 N-乙酰葡萄糖胺激活序列进行初步定位,探讨菌相转换可能的调控机制。**方法:**DNAssist 2.0 软件分析 HYR1 基因上游 1 800 bp 内可能的 N-乙酰葡萄糖胺激活序列片段,选择 -1 800~+43 bp、-1 400~+43 bp、-1 000~+43 bp、-600~+43 bp、-400~+43 bp、-200~+43 bp 这些区域作为分析目标,PCR 扩增这些片段,将其分别克隆至含 β-半乳糖苷酶(LacZ)报告基因的载体 PNG17 中构建质粒重组体,分别命名 pHYR1.8、pHYR1.4、pHYR1.0、pHYR 0.6、pHYR0.4、pHYR0.2,测序确认后转化酵母菌 EGY48,培养含有不同重组体的酵母转化子,将不同的酵母转化子接种于含有 N-乙酰葡萄糖胺和 β-半乳糖苷(X-gal)的培养基上,在不同条件下观察培养基的颜色变化。**结果:**成功构建 6 种重组体 pHYR1.8、pHYR1.4、pHYR1.0、pHYR 0.6、pHYR0.4、pHYR0.2,经测序,插入片段与预期序列完全一致。酵母菌转化子生长良好,在 N-乙酰葡萄糖胺作用下,含 pHYR1.8 和 pHYR1.4 的转化子使培养基成蓝色,含其他重组体 pHYR1.0、pHYR 0.6、pHYR0.4、pHYR0.2 的转化子不使培养基显色。**结论:**N-乙酰葡萄糖胺可能通过 HYR1 上游 -1 400~-1 000 bp 区域内的启动元件激活 HYR1 基因诱导白念珠菌相转换。

**[关键词]** 白念珠菌;菌相转换基因;N-乙酰葡萄糖胺

**[中图分类号]** R 379.4 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0794-03

白念珠菌是最重要的致病真菌,在院内感染中,念珠菌血症排在第四位<sup>[1]</sup>,占 10%,死亡率可达到 35%<sup>[2]</sup>。它的形态转化,即由酵母相向菌丝相的转化,是白念珠菌乃至其他念珠菌侵袭性感染最重要的毒性因子。有许多基因参与这一过程,如 HYR1 基因,它已被证明是白念珠菌菌相转换的特异基因<sup>[3]</sup>,其表达调控可发生在转录和翻译水平<sup>[4,5]</sup>,以转录水平为主,但目前研究主要集中于翻译水平,鲜见转录水平的研究。Milewski 等<sup>[6]</sup>研究发现 N-乙酰葡萄糖胺能明显诱导菌丝生长,但具体机制尚不明确。本研究应用基因重组及酵母转化技术,对白念珠菌菌相转换特异基因 HYR1 上游(-1 800~+43 bp)N-乙酰葡萄糖胺激活序列进行初步定位,探讨其诱导菌相转换可能的作用机制。

### 1 材料和方法

**1.1 白念珠菌株的培养** 将白念珠菌 ATCC10261 株在 YEPD 培养基中(2%葡萄糖,2%蛋白胨,1%酵母抽提物)培养至对数生长期后期,标准抽提法分离其染色体 DNA 用作模板。

**1.2 激活片段的选择** DNAssist 2.0 软件调控元件分析表明,在 HYR1 基因上游 1.8 kb 左右的序列中,可能的启动调控元件具有一定的区域集中,根据这一特征,我们分段克隆了可能的 DNA 片段,它们分别是距 HYR1 基因转录起始位点上游 200、400、600、1 000、1 400、1 800 bp 的基因片段。

**1.3 质粒载体的构建** 以白念珠菌 ATCC10261 染色体为模板,PCR 扩增不同调控区片段,分别为 HYR1 基因上游 -1 800~+43 bp, -1 400~+43 bp, -1 000~+43 bp, -600~+43 bp, -400~+43 bp, -200~+43 bp 6 个片段,所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,

序列如下(下划线处为酶切位点):5'-CC G TCG AC C CAA TTC CCC CAT TAG AAC AC-3';5'-CC G TCG AC T TGG TTA TGA ACAC TGC AAC T-3';5'-CC G TCG AC A GAA AGG GAA AGG CGT GTA AGG-3';5'-CC G TCG AC C ACG AAT ACA ATG GGA ACA CGA-3';5'-CC G TCG AC G GCA AAT GCT TAG TAT GAC AGC-3';5'-CC G TCG AC C ACA CGC CTA TTA TAT GCA CAG-3';公用反向,5'-GC G TCG AG T GGT TTC AAC AAA CTG GAA TAC TT-3'。循环设定为 94℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,32 个循环,72℃ 5 min(PE 9600 PCR 仪)。不同扩增产物用 PCR 产物回收试剂盒(杭州维特洁)回收,取 1 μg 左右的产物用 *Xho* I 及 *Sal* I 酶酶切(NEB 公司)。含 β-半乳糖苷酶(LacZ)报告基因的载体 PNG17 准备则用保种菌接种于 30 ml 液体 LB 培养基摇瓶培养过夜,质粒小抽提试剂盒(杭州维特洁)抽提质粒,取 1 μg 左右的质粒用上述两种酶酶切,碱性磷酸酶(CIP,MBI 公司)脱磷并胶回收,电泳估测浓度并保存。取合适量的已酶切的目标片段与酶切的质粒载体(PNG17)用 *T<sub>4</sub>* 连接酶(NEB 公司)连接,4℃ 过夜,构建相应的重组体,分别命名为 pHYR1.8、pHYR1.4、pHYR1.0、pHYR 0.6、pHYR0.4、pHYR0.2。

**1.4 质粒的转化** 将上述连接液转化感受态大肠杆菌 DH5α,涂板培养过夜。挑取转化子划线分离,菌落 PCR 鉴定。将鉴定阳性的菌落小摇培养(3 ml LB),抽提质粒并测序。鉴定正确的阳性克隆保种,并小抽提质粒(杭州维特洁)。酵母菌 EGY48 感受态制备与酵母菌转化方法如下:

**[作者简介]** 陈江汉,副教授,副主任医师。

\* Corresponding author. E-mail: LiaoWanqing@sohu.com

EGY48 接种于 YEPD 液体培养基中(5 ml),培养过夜(16~18 h),菌液离心(14 000 r/min, 30 s),弃上清,用 1 ml 双蒸水洗涤 1 次,离心弃上清。用 1 ml 醋酸锂 TE 洗涤 1 次,吸干剩余液体,振松菌体,加入 50  $\mu$ l 醋酸锂 TE,5  $\mu$ l 鲑精 DNA,1~2  $\mu$ l 上述已抽提的质粒,混匀,振动至无菌块,加入 300  $\mu$ l 醋酸锂 TE/PEG,振匀,置于 30 $^{\circ}$ C 30 min,再转置于 42 $^{\circ}$ C 热激 30 min,再放回 30 $^{\circ}$ C 5 min,离心 12 000 r/min 1 min,弃上清,加入 100  $\mu$ l 双蒸水,用枪吹打混匀,吸 50  $\mu$ l 于平板(SC-u/SGR-u)上涂布,30 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d(48 h 以上)。

1.5 转化后  $\beta$ -半乳糖苷酶(LacZ)活性分析 在 SC-u/SGR-u 培养基中加入 X-gal 1 mg/ml 和 1 mg/10 ml N-乙酰葡萄糖胺,常规浇取 petri 培养皿。将 SC-u/SGR-u 平板上生长的不同的酵母转化子接种于其上,这些菌落分别含有上述构建的 6 个重组体 pHYR1.8、pHYR1.4、pHYR1.0、pHYR0.6、pHYR0.4、pHYR0.2,同时设阳性对照,37 $^{\circ}$ C 培养 48~72 h 后直接观察酵母转化子能否分解 X-gal(菌落变蓝色)。

## 2 结果

2.1 含不同启动子序列 PNG17 质粒载体的构建 成功克隆相应的目的基因片段,经酶切鉴定正确;经测序证实构建的 6 种重组体 pHYR1.8、pHYR1.4、pHYR1.0、pHYR0.6、pHYR0.4、pHYR0.2 的插入片段与以往文献<sup>[7]</sup>报道的序列完全一致。

2.2 质粒的转染和酵母转化子的获得 将 6 种重组体转化啤酒酵母 EGY48,在 SC-u/SGR-u 培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d,可见酵母菌菌落生长(图 1A),重组体转染成功,获得预期的酵母转化子。

2.3 N-乙酰葡萄糖胺作用下各转化子  $\beta$ -半乳糖苷酶(LacZ)的活性 含有 6 个不同重组体的各酵母转化子生长良好,在 N-乙酰葡萄糖胺作用下,培养 2 d 后含 pHYR1.8 和 pHYR1.4 的酵母转化子的培养基呈蓝色(图 1B),含其他转化子的培养基不显色,表明只有含 pHYR1.8 和 pHYR1.4 的转化子具有  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,它们能分解培养基中的 X-gal 而使菌落呈蓝色。

## 3 讨论

多种因素<sup>[8~10]</sup>影响白念珠菌菌相转换,如作用较为明显的 N-乙酰葡萄糖胺可能是通过调节 HYR1 基因在内的特异调节基因<sup>[1,11,12]</sup>而发挥作用。但目前的研究主要集中于翻译水平,鲜见关于对相关基因上游转录调控序列和各反应元件的定位研究。

真核生物中,许多基因的表达受到其上游调控元件的控制。本研究用 DNAssist 2.0 软件对 HYR1 基因上游 1.8 kb 左右的序列进行调控元件分析。分析结果发现,在这 1.8 kb 上游片段里,可能的调控元件具有一定的区域集中的特征,据此我们分段克隆了不等长的片段,构建到带 LacZ 报告基因的载体 PNG17 上。由于有研究<sup>[7]</sup>发现 HYR1 基因上游存在 3 个可能的 Efg1 转录因子结合位点(E-box),其中 2 个 E-box 位于上游 360 bp 内,而另一个则在上游 400~500 bp 内,因此我

们添加了 400 bp 和 600 bp 这两个片段以方便研究。

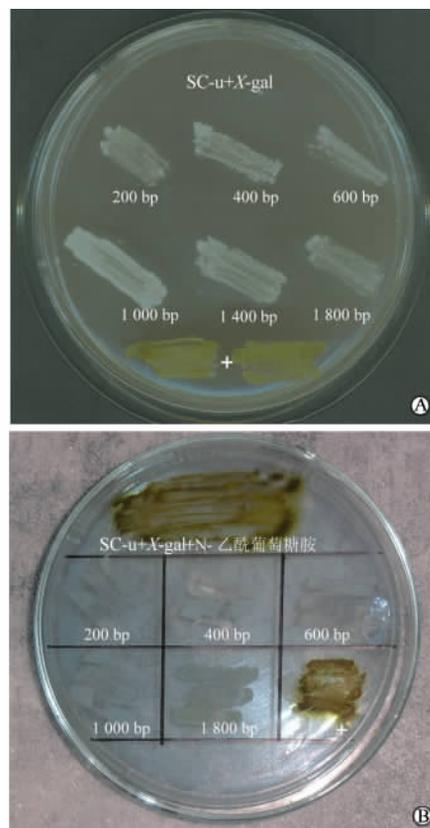


图 1 转染后质粒在选择培养基 SC-u/SGR-u(A)和含 N-乙酰葡萄糖胺和 X-gal 的 SC-u/SGR-u(B)上的生长、显色情况

接种区 1 800、1 400、1 000、600、400 和 200 分别对应于转化子 pHYR1.8、pHYR1.4、pHYR1.0、pHYR0.6、pHYR0.4 和 pHYR0.2

PNG17 载体是大肠杆菌、酵母菌的穿梭质粒,带有 LacZ 基因,但基因上游没有启动元件,在正常情况下是无法表达 LacZ 的。LacZ 基因所编码的  $\beta$ -半乳糖苷酶可催化无色的底物 X-gal 变成蓝色,通过观察含有 X-gal 的培养基是否会变蓝色可以判断是否有 LacZ 基因表达。如果能克隆到 LacZ 上游的 HYR1 基因片段可能的调控区,则该酵母克隆可以分解 X-gal 而显蓝色。

由于白念珠菌并非使用 CUG 密码子,常规报告基因系统不适用于白念珠菌<sup>[13]</sup>。而在该实验中,带有相关启动子序列的重组体能分解培养基中的 X-gal,使菌落成蓝色,表明 LacZ 报告基因系统稳定可靠,重复性好。由于啤酒酵母与白念珠菌亲缘性相近,因此该系统的建立克服了在白念珠菌研究中缺乏合适报告基因的问题,为进一步研究白念珠菌基因的调控奠定了基础。

本研究结果表明,含有重组体 pHYR1.8 和 pHYR1.4 的转化子在 N-乙酰葡萄糖胺诱导下分解培养基中的 X-gal 而使菌落成为蓝色,即在 HYR1 基因上游 -1 400~-1 000 bp 基因之间存在转录启动活性,含有与 N-乙酰葡萄糖胺相关的调控元件。N-乙酰葡萄糖胺通过特殊的信号转导通路,

激活该调控区的启动子,使得 HYR1 基因表达,从而参与了白念珠菌菌相转换的调节。这些调控元件的定位,为调控区的准确定位及与相应 DNA 结合蛋白的研究,阐明 HYR1 等菌相转换基因的转录调节机制奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Harbarth S, Ruef C, Francioli P, et al. Nosocomial infections in Swiss university hospitals: a multi-centre survey and review of the published experience. Swiss-Noso Network[J]. Schweiz Med Wochenschr, 1999, 129: 1521-1528.
- [2] Domer JE. Intra-gastric colonization of infant mice with *Candida albicans* induces systemic immunity demonstrable upon challenge as adults[J]. J Infect Dis, 1988, 157: 950-958.
- [3] Bailey DA, Feldmann PJ, Bovey M, et al. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins[J]. J Bacteriol, 1996, 178: 5353-5360.
- [4] De-Groot PW, Hellingwerf KJ, Klis FM. Genome-wide identification of fungal GPI proteins[J]. Yeast, 2003, 20: 781-96.
- [5] Brown AJ, Barelle CJ, Budge S, et al. Gene regulation during morphogenesis in *Candida albicans* [J]. Contrib Microbiol, 2000, 5: 112-125.
- [6] Milewski S, Gabriel I, Olchoway J. Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast[J]. Yeast, 2006, 23: 1-14.
- [7] Leng P, Lee P R, Wu H, et al. Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein[J]. J Bacteriol, 2001, 183: 4090-4093.
- [8] Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62: 130-180.
- [9] Ernst JF. Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis[J]. Microbiology, 2000, 146 (Pt 8): 1763-1774.
- [10] Kwon-Chung KJ, Riggsby WS, Uphoff RA, et al. Genetic differences between type I and type II *Candida stellatoidea* [J]. Infect Immun, 1989, 57: 527-532.
- [11] Birse CE, Irwin MY, Fonzi WA, et al. Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans* [J]. Infect Immun, 1993, 61: 3648-3655.
- [12] Kelly R, Miller SM, Kurtz MB. One-step gene disruption by cotransformation to isolate double auxotrophs in *Candida albicans* [J]. Mol Gen Genet, 1988, 214: 24-31.
- [13] Staab JF, Bahn YS, Sundstrom P. Integrative, multifunctional plasmids for hypha-specific or constitutive expression of green fluorescent protein in *Candida albicans* [J]. Microbiology, 2003, 149(Pt 10): 2977-2986.

[收稿日期] 2005-12-09

[修回日期] 2006-05-15

[本文编辑] 贾泽军