

# 白念珠菌基因中断技术研究进展

## Progress of gene disruption technique in *Candida albicans*

黄杉, 曹颖璞, 姜远英\*

(第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 白念珠菌是能感染人体的重要微生物之一。由于白念珠菌的遗传学操作较困难, 因此其基因功能的研究主要依赖于酿酒酵母作为模型或替代性表达宿主。近年来, 以白念珠菌自身作为宿主的基因中断技术逐渐成为研究其基因功能的主要手段, 本文对这一领域的研究进展作一综述。

**[关键词]** 白念珠菌; 基因中断技术; 综述文献

**[中图分类号]** R 379.4      **[文献标识码]** B      **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0550-04

近年来, 随着免疫力低下患者数目的上升, 由白念珠菌引起的机会感染率不断增加<sup>[1]</sup>, 因而有关该微生物的生物学研究和为阐明其致病决定簇的研究明显增多。阐明一个基因生物学的重要方法是采用合适的微生物宿主菌进行基因中断或失活实验。但与模式生物酿酒酵母不同, 由于白念珠菌是二倍体生物, 缺乏完整的有性生活周期, 不能通过减数分裂重组进行分析, 因此遗传学操作较困难, 这在一定程度上阻碍了对其基因功能的研究。本综述概括了目前用于白念珠菌基因功能分析的基因中断技术。

### 1 URA-Blaster 策略

Ura-Blaster 策略是用于白念珠菌中单个基因的 2 个连续拷贝敲除的一种广泛且成功率较高的基因失活系统<sup>[2-4]</sup>。该方法基于同源重组原理, 主要以 hisG-URA3-hisG 盒(由来自白念珠菌的 URA3 基因及来自鼠伤寒沙门菌 hisG 定向重复构成)作为构建中心来以插入失活的方式中断 1 个基因。通过在盒两侧的靶基因特异序列与基因组中该基因的同源序列之间的同源重组, hisG-URA3-hisG 盒插入靶基因序列中, 随后在含有 5-氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)的培养基中, 经盒内 hisG 重复序列间的染色体内同源重组, URA3 标志得到删除, 选择得到 Ura<sup>-</sup> 回复子。按照同样的方法进行第二个等位基因的中断, 这样即可到特定基因缺失的菌株用于表型分析, 从而获得该基因的功能信息(图 1)。

Ura-Blaster 策略是用于白念珠菌基因功能研究的经典策略, 迄今为止约 60% 以上的白念珠菌基因功能的研究首先采用该策略进行基因失活。尽管如此, 该策略仍有几个重要的不足方面需要考虑: (1) 当相同的盒用于中断第二个完整的等位基因时, 所设计的构建子可能会在第二轮转化中与前面中断的等位基因重组。这种重组的频率可能会较第一次等位基因时更高, 原因可能是源于盒的序列(鼠伤寒沙门菌 hisG)的存在。为了尽可能减少 hisG-URA3-hisG 盒在前面中断的等位基因位点的整合, 可以使用不同的策略。例如, 在第二个重组步骤中可以这样构建 hisG-URA3-hisG 盒: 其插入方向与第一轮转化所用的相反; 还有一种方法就是可以

在 URA3 盒上连接不同的侧翼区。(2) 与 URA3 标志切除有关, 为了切除 URA3 标志以利于下一轮转化, 将在丰富培养基(补充尿嘧啶核苷以避免反向选择重组克隆)上生长的细胞置于含 5-FOA 培养基的平板, 以选择 Ura<sup>-</sup> 细胞。该系统允许在第一轮中选择 2 种独立类型的重组子: 一种为不需要的, 通过基因转换或有丝分裂重组事件来回收最初的野生型基因型; 另一种为需要的, 其染色体内重组切除了 1 个拷贝的 hisG 和 URA3 DNA。由于定向 hisG 重复序列靠近 URA3 标志的 5' 和 3' 端, 使得染色体内重组的效率增加(约为 1/10<sup>5</sup> 个细胞)与在酿酒酵母中测得的频率类似。

### 2 URA-Flipper 策略

URA-Blaster 策略的一种优化方法(Ura-Flipper)是运用酿酒酵母 2u 质粒的 FLP 重组酶。Staub 等<sup>[5]</sup> 按照白念珠菌独特的遗传密码设计了一种 FLP 重组酶基因。基因中断方案采用 URA3 标志, 其侧翼含有短(34 bp)区域作为 FLP 重组酶的识别位点。FLP 重组酶由 SAP2 启动子在基因中断构建盒内控制产生。在完成特定染色体区域的同源重组后, 通过低氮刺激 SAP2 表达等方法删除选择标记(图 2)。虽然此方案在概念上与 URA-Blaster 策略相似, 但有几个优点: (1) 它使染色体内重组频率提高约 10 000 倍, 由此我们可以使用在基因中断中无阳性反向选择的标志; (2) 该系统也可用于检测某个特定基因是否在某种实验条件下表达(如在感染期存在的基因)。在这种情况下, 应将 FLP 重组酶置于被检测基因的调控区的控制之下。但与经典的 URA-Blaster 策略相比, 该方法所需的遗传操作更加复杂, 且在对基因缺失菌进行表型分析时受到干扰的因素更多。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30400020); 上海市基础研究重点项目(03JC14006)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400020) and the Key Scientific and Technological Program of Shanghai(03JC14006)。

**[作者简介]** 黄杉, 硕士, 药师。

\* Corresponding author. E-mail: smmu\_jyy@sina.com

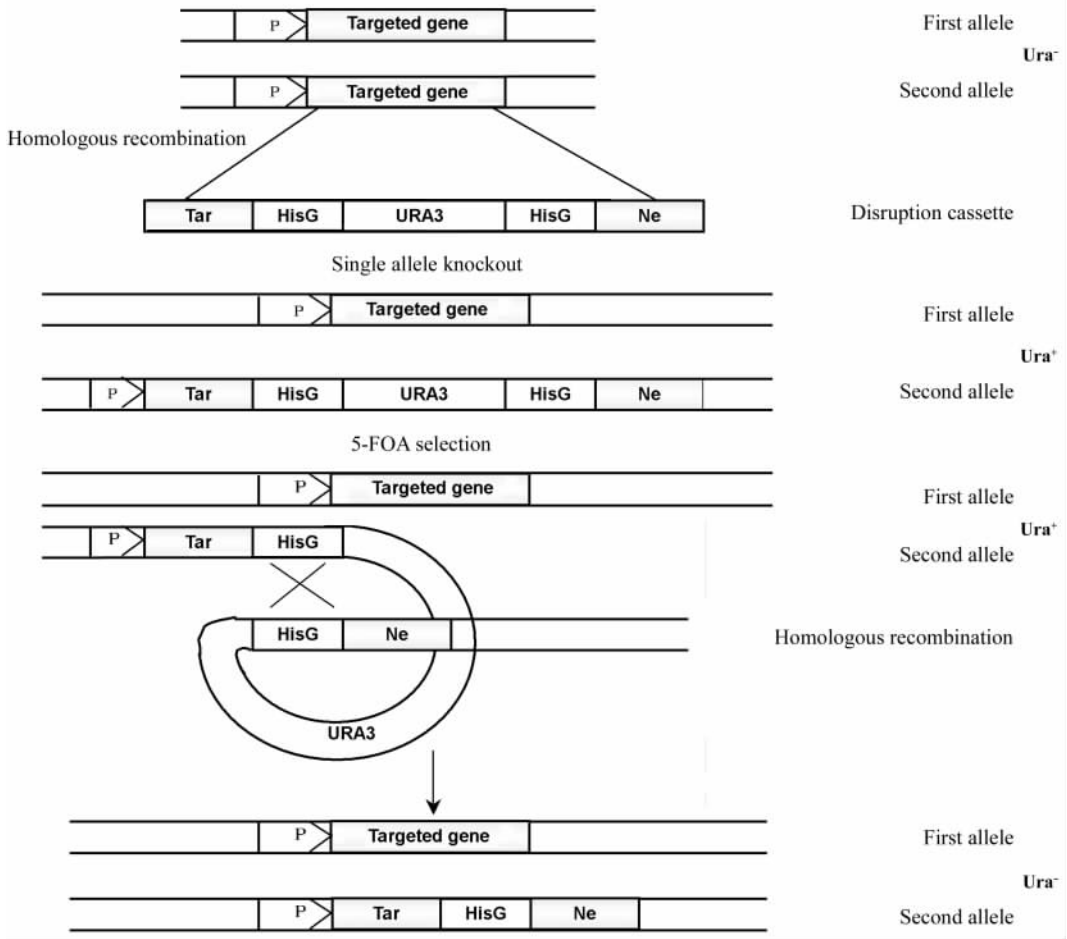


图 1 Ura-Blaster 策略的白念珠菌基因中断技术示意图

Fig 1 URA-Blaster strategy of gene disruption technique in *Candida albicans*

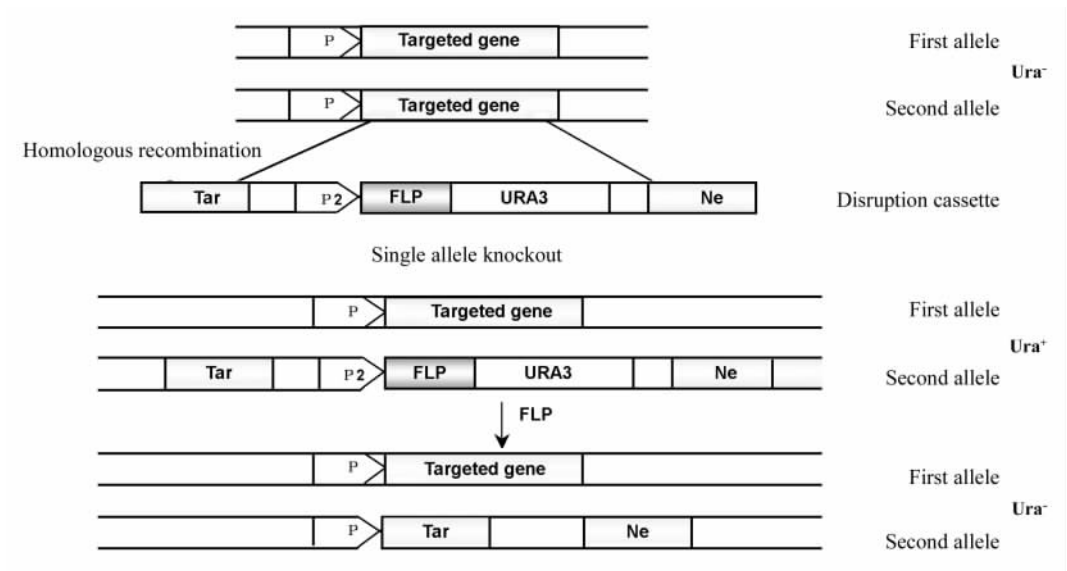


图 2 URA-flipper 策略的白念珠菌基因中断技术示意图

Fig 2 URA-flipper strategy of gene disruption technique in *Candida albicans*

### 3 基于 PCR 的基因中断

近年来,一种以前开发用于酿酒酵母的 PCR 介导的基因敲除策略被改用于白念珠菌<sup>[6]</sup>。在该方法中,合成长寡核苷酸作为重组靶位并用来从载体中扩增选择标志。产生的白念中断盒在选择标志的每一端都有与基因组靶序列一致的 50~60 bp。这与在 URA-Blaster 方法中使用的较长侧翼区(通常是几百碱基对)相比具有较大的优越性,可以避免任何克隆步骤,从而加快了缺失盒的构建。不过,由于此短侧翼序列较短,故在染色体内重组频率大大降低,成功获得特

定基因缺失菌的可能性也大大降低。

### 4 一步法基因中断

该方法需要在宿主菌中有两个不同的营养缺陷型标志。这个系统最早是 Kurtz 等<sup>[7]</sup>报道用来分离 hem3 突变子,使用克隆的 URA3 和 LEU2 基因作为选择标志。

Negredo 等报道了使用来源于国际通用株 SC5314 谱系的一个 *ura3 his1* 菌株来中断白念的 ARG5,6 基因,从而产生 Arg<sup>-</sup>营养缺陷型<sup>[8]</sup>。

见图 3。

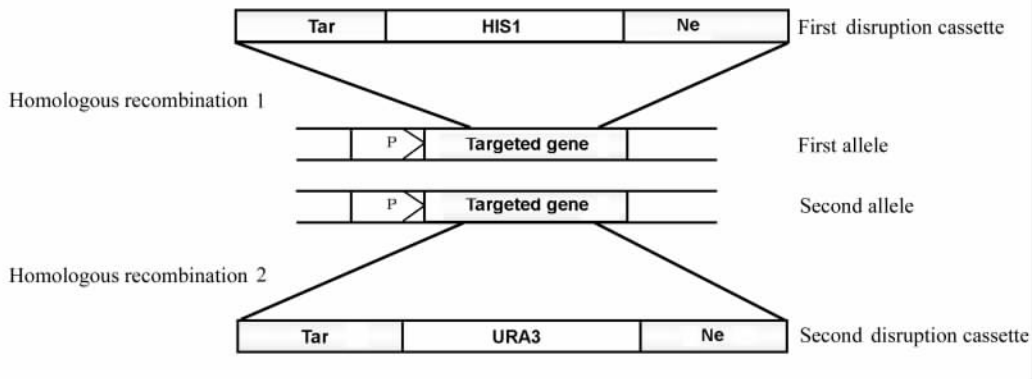


图 3 一步法白念珠菌基因中断技术示意图

Fig 3 One-step disruption technique for *Candida albicans*

该系统的主要优点是它们通常不需要很长时间来达到基因缺失,因为它们不需要回收原先的 Ura 营养缺陷型,也因为这样有可能在一个转化事件中把某一基因的两个等位基因都中断。虽然这对于普通的基因中断策略来说是一个重要的改进且可用来更快地鉴定基因敲除株,但仍有获得目的转化子的可能性低引起的技术局限。这个可能性确实是白念中整合性转化频率的产物( $10^{-1} \sim 10^{-2} / \mu\text{g DNA}$ ),共转化(2%~15%)和 2 个等位基因的同源重组。只有在可预测的易检测表型存在时才有可能分离某基因的两个拷贝都被中断的菌株。

### 5 大规模基因中断技术

近年来,随着斯坦福大学基因组技术中心对白念珠菌基因组测序(<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/index.html>)的完成,不断有研究小组报道大规模筛选白念珠菌突变株的方法。

5.1 插入性杂合子库 为寻找调控白念珠菌形态转换的基因,Uhl 等<sup>[9]</sup>基于许多调控菌丝生长的基因具有单倍剂量不足的特点,即仅失去一个等位基因即能产生可检测到的表型变化这一前提,通过 URA3 标记的转座子在白念珠菌文库中的体外转座建立了随机插入子,将混合的插入子文库转化白念珠菌产生了 18 000 个白念珠菌突变株。筛选该库得到了 146 个与菌丝转换相关的基因,其中包括 39 个在酿酒酵母中无同源基因的预测的丝状生长调节因子。另外,某些突变子具有特异的血清应答性菌丝形成缺陷,而血清是一种仅对白

念珠菌的诱导剂,酿酒酵母对此无反应。由于白念珠菌在感染过程中可遇到血清,因此通常认为该反应与致病性密切相关。这个工作为阐明许多白念珠菌特有基因的功能意义提供了很好的证据。另外,与仅依靠酿酒酵母模型相比,该工作更加细致地剖析了酵母-菌丝转换的调节通路。

5.2 插入性纯合子库 为了鉴定 pH 依赖性丝状生长——一种白念珠菌毒力相关特征的必需基因及调节子,Davis 等<sup>[10~12]</sup>用 UAU1 盒从杂合子中选择纯合性突变子。杂合子突变株偶尔会经历有丝分裂重组或基因转变而产生纯合子,纯合子表达两个 UAU1 编码的替代标记因而得到选择,杂合性 UAU1 插入突变子只能表达其中的一个标记。通过将 UAU1 标记的转座子插入白念珠菌基因组文库中的方法产生突变,利用测序鉴定开放阅读框架中的插入。在 253 个转化进入白念珠菌的 *orf::UAU1* 中,有 36 个基因的插入没有产生纯合性突变子,有 217 个在经过 UAU1 纯合子选择后平均产生 4~8 个纯合性突变子,这些插入子含有 197 个 ORFs。在预测的必需基因中有 29 个与酿酒酵母中的必需基因同源,有 3 个酿酒酵母中的必需同源基因在白念珠菌中为非必需基因,还有 12 个基因为酿酒酵母的非必需同源基因,4 个基因与酿酒酵母中的无明显同源性。这些发现强调了白念珠菌中的非保守基因的功能意义,提示白念珠菌中的必需基因谱可能比酿酒酵母中的广泛。这可能是由于白念珠菌中缺乏一个总体转录压力反应,因而对遗传学干扰更为敏感<sup>[13]</sup>。

5.3 可调节性基因突变库 为了寻找白念珠菌的必需基因

以确定有效的药物靶标, Roemer 等<sup>[14,15]</sup>对 1 152 株由四环素调控基因表达的白念珠菌进行了研究, 其中 823 个是酿酒酵母中的同源必需基因。他们通过删除一个等位基因, 同时将第二个等位基因与四环素调控性启动子( $P_{TET}$ )融合的方法建立了条件性表达, 产生“GRACE”(基因替换和条件性表达)株。必需性的判断取决于菌株对四环素的敏感性, 后者阻断了 GRACE 转录激活子的 DNA 结合性, 也可以通过对 5-FOA (对 GRACE 激活子基因盒的丢失具有选择性)的敏感性进行判断。他们鉴定了 567 个白念珠菌的必需基因。令人惊讶的是, 具有酿酒酵母同源必需基因的白念珠菌基因中有 61% 同样是白念珠菌所必需的。白念珠菌与酿酒酵母必需基因之间中等程度的重叠反映了在基因或途径功能中可能存在实质性差异, 也有可能白念珠菌中存在广泛的基因重叠。对这些白念珠菌意外存活的 GRACE 株的更详细研究可能揭示是否某些常见的白念珠菌基因有着不寻常的生物学功能。

在当今生命科学蓬勃发展的 21 世纪, 一系列微生物的基因组序列信息的获得加速了对新的分子药靶的鉴定, 一个发明抗微生物药物的新时代已到来。白念珠菌有许多不同于酿酒酵母的独特生物学特征, 包括其显著的黏附性、形成菌丝的能力、多种表型转换系统、新交配过程、生物被膜形成以及与宿主细胞间不同作用等<sup>[16~20]</sup>。这些特征决定了其毒力、耐药性及群体结构因而直接影响了我们对白念珠菌感染的理解。现在通过公共和专有数据库可获得白念的完整基因组序列, 为了将这些大量的序列数据转变成有意义的生物学信息, 需要适用于该病原性真菌的遗传学工具。我们相信不断发展的适用于白念珠菌的基因中断技术必将大大加快对该生物体病原性起重要作用的基因功能的分析。

#### [参考文献]

- [1] Zhang S, Ahearn DG, Mateus C, et al. *In vitro* effects of Ag<sup>+</sup> on planktonic and adhered cells of fluconazole-resistant and susceptible strains of *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* [J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 2755-2760.
- [2] Dennison PMJ, Ramsdale M, Manson CL, et al. Gene disruption in *Candida albicans* using a synthetic, codon-optimised Cre-loxP system [J]. *Fungal Gene Biol*, 2005, 42: 737-748.
- [3] Reuß O, Vik A, Kolter R, et al. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans* [J]. *Gene*, 2004, 341: 119-127.
- [4] Staab JF, Sundstrom P. *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes [J]. *Trends Microbiol*, 2003, 11: 69-72.
- [5] Morschhauser J, Michel S, Staib P. Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination [J]. *Mol Microbiol*, 1999, 32: 547-556.
- [6] Wilson RB, Davis D, Mitchell AP. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181: 1868-1874.
- [7] Kurtz MB, Marrinan J. Isolation of hem3 mutants from *Candida albicans* by sequential gene disruption [J]. *Mol Gen Genet*, 1989, 217: 47-52.
- [8] Negredo A, Monteoliva L, Gil C, et al. Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans* [J]. *Microbiology*, 1997, 143: 297-302.
- [9] Uhl MA, Biery M, Craig N, et al. Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *Candida albicans* [J]. *EMBO J*, 2003, 22: 2668-2678.
- [10] Davis DA, Bruno VM, Loza L, et al. *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis [J]. *Genetics*, 2002, 162: 1573-1581.
- [11] De Bernardis F, Mühlshlegel FA, Cassone A, et al. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans* [J]. *Infect Immun*, 1998, 66: 3317-3325.
- [12] Davis D, Edwards Jr JE, Mitchell AP, et al. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for Host-Pathogen interactions [J]. *Infect Immun*, 2000, 68: 5953-5959.
- [13] Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response [J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14: 1460-1467.
- [14] Roemer T, Jiang B, Davison J, et al. Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 50: 167-181.
- [15] Giaever G, Shoemaker DD, Jones TW, et al. Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency [J]. *Nat Genet*, 1999, 21: 278-283.
- [16] Sundstrom P. Adhesion in *Candida spp* [J]. *Cell Microbiol*, 2002, 4: 461-469.
- [17] Liu H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans* [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4: 728-735.
- [18] Hull M, Heitman J. Fungal mating: *Candida albicans* flips a switch to get in the mood [J]. *Curr Biol*, 2002, 12: R782-R784.
- [19] Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, et al. Cell biology of mating in *Candida albicans* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2: 49-61.
- [20] Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection [J]. *Trends Microbiol*, 2003, 11: 30-36.

[收稿日期] 2006-02-20

[修回日期] 2005-03-20

[本文编辑] 尹茶