

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00541

绿色荧光蛋白在白念珠菌研究中的应用

鹿 辉¹, 曹颖琰², 王 彦¹, 高平挥¹, 曹永兵¹, 姜远英^{1*}

1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院生化药理学教研室, 上海 200433

[摘要] 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一种来源于水母的生物发光蛋白。GFP 基因作为报告基因已被广泛应用于各种生物的研究中。白念珠菌感染在临床真菌感染中占有很大的比例,因此对白念珠菌进行深入研究具有重要意义。GFP 在白念珠菌的研究中已得到广泛的应用。GFP 基因可与目的基因融合形成融合基因,融合基因可表达融合蛋白,该融合蛋白可发出荧光信号,进行基因表达和蛋白定位等方面的研究。本文综述了 GFP 在白念珠菌研究中的应用。

[关键词] 绿色荧光蛋白; 白念珠菌; 基因表达; 蛋白定位

[中图分类号] R 379.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)05-0541-04

Green fluorescent protein in *Candida albicans*-related studies

LU Hui¹, CAO Ying-ying², WANG Yan¹, GAO Ping-hui¹, CAO Yong-bing¹, JIANG Yuan-ying^{1*}

1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] The green fluorescent protein (GFP) is a bioluminescent protein derived from the *Jellyfish Aequorea*. As a reporter gene, GFP has been used in a variety of biological researches. A large proportion of the clinical fungal infections are caused by *Candida albicans*, making it very important for further study. GFP has also been widely used in *Candida albicans*-related studies. The fusion genes harboring GFP gene can yield expression of the fusion protein, which can emit green fluorescence and can be used for gene expression and protein localization. This paper reviews the application of GFP in the *Candida albicans*-related studies.

[Key words] green fluorescent protein; *Candida albicans*; gene expression; protein location

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):541-544]

近几年,随着艾滋病患者、接受化疗的癌症患者、使用免疫抑制剂接受器官移植的患者和严重的糖尿病患者等免疫低下患者的增加,致病真菌,特别是念珠菌属在免疫低下患者身上引起非常普遍和严重的感染^[1]。念珠菌属在所有的血液感染中占 8%~9%,致死率高达 40%^[2]。而其中白念珠菌占有重要的比例,治疗白念珠菌的感染已成为临床治疗工作的重点。因此,深入研究白念珠菌的生物特性、耐药机制和致病机制具有重要的科研价值和临床意义。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)自 20 世纪 60 年代被发现以来,便作为报告和标记因子而得到了广泛应用。如用于研究新的癌基因表达及相关功能^[3]、示踪药物蛋白^[4]、建立细胞筛选模型^[5]、检测基因转染细胞的效率^[6]以及细胞动态研究^[7]等各个方面。GFP 在白念珠菌的研究中也有重要的应用。为了更深入地研究白念珠菌致病和耐药机制,已有 3 种旨在研究基因和蛋白功能的报告系统

在白念珠菌中应用,包括 β -半乳糖苷酶报告系统,荧光素酶报告系统和 GFP 报告系统。这 3 种报告系统都被用于研究基因表达和启动子的分析^[8]。GFP 报告系统较 β -半乳糖苷酶报告系统和荧光素酶报告系统具有更明显的优势,因此白念珠菌的研究中应用更加广泛。

1 GFP 概述

GFP 是一类生物发光蛋白,野生型 GFP 主要来自于像水母一类的海洋生物^[9]。GFP 的发现、研究和应用都经历了一段漫长的历史过程。GFP 由 Shimomura 等^[10]于 1962 年在水母中首先发现。随后,1992 年 Prasher 等^[11]克隆了 GFP 基因的 cDNA,分析了 GFP 的一级结构,并得到了 GFP 基因的碱基序列。1994 年由 Chalfie 等^[12]第一次在大肠杆菌细胞和线虫中在不添加任何辅助物质的情况下表达出 GFP,实现了 GFP 在除水母外的其他生物体内的表达。此项研究成果

[收稿日期] 2009-09-24 **[接受日期]** 2010-01-22

[基金项目] 国家自然科学基金(30630071, 30870105). Supported by National Natural Science Foundation of China (30630071, 30870105).

[作者简介] 鹿 辉,硕士生. E-mail: luhui20080630@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871201, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

使 GFP 的应用范围得到了扩展,使 GFP 在作为基因标记方面具有更加重要的意义。为了扩展 GFP 的使用范围,使其在生命科学研究中发挥更大的作用,需要对野生型的 GFP 进行改造优化。研究者对 GFP 基因进行了一系列的改造优化,使 GFP 变体的立体结构发生变化,生色基团得到改造,拓展了 GFP 的发射光谱,提高了 GFP 在除水母外的其他生物体内的稳定性和发光强度^[13-14]。

GFP 之所以被广泛的应用于生命科学研究的各个领域,是因为它具有以下显著的优点:(1)GFP 的荧光反应不需要其他辅助因子或基质,只需紫外光或蓝光激发,即可发出绿色荧光;检测方便,用荧光显微镜甚至肉眼就可以观察到,且灵敏度高。Niedenthal 等^[15]利用 GFP 的荧光信号很方便地进行了基因表达水平的测定。(2)GFP 的相对分子质量相当小,只有 27 000 左右,它的 N 和 C 端都能与蛋白融合,操作方便,对功能基因蛋白基本无影响,可用于研究蛋白的定位和细胞间蛋白的运动。文献报道将 GFP 用于真菌中作为蛋白定位的报告因子^[16]。(3)GFP 对受体细胞的生长繁殖基本无毒害。Sheen 等^[17]证明在玉米转 GFP 基因植株中,即使 GFP 在细胞中高表达,对细胞也不会产生明显毒害。(4)GFP 没有种属特异性,也没有细胞种类和位置的限制。Chalfie 等^[18]用 PCR 方法扩增 GFP 基因的 cDNA 后,克隆到原核表达载体上,转化大肠杆菌,经 IPTG 诱导后,在紫外光照射下转化细菌发出绿色荧光,说明 GFP 在除水母外的其他生物体内亦可表达。

2 GFP 在白念珠菌研究中的应用

GFP 被认为是进行细胞生物学的有力工具,也是许多生物体内检测蛋白表达和定位的重要报告因子。GFP 已用于动物、植物、细菌、真菌等多种生物,同样在白念珠菌中也得到了广泛的应用,如菌体内基因表达检测和蛋白定位等方面的研究。但白念珠菌的编码序列和水母的编码序列有一定的差别,在白念珠菌的转录过程中,密码子 CUG 代表的是丝氨酸的密码子,而不是亮氨酸的密码子^[19]。因此野生型 GFP 基因改造后才能用于白念珠菌。Cormack 等^[20]将野生型 GFP 基因进行重新构建,使 GFP 239 个氨基酸密码子都得到优化,经优化的 GFP 为酵母增强型绿色荧光蛋白(yeast-enhanced green fluorescent protein, yEGFP),在白念珠菌应用的 GFP 多为 yEGFP。

2.1 基因表达 GFP 基因可与目的基因融合形成融合基因,融合基因可表达出包含 GFP 的融合蛋白。由于含有 GFP,融合蛋白在适当条件的诱导下可发出荧光信号。根据发射的荧光信号的强度,可检测目的基因是否表达。Green 等^[21]在白念珠菌中将 yEGFP 基因置于启动子细胞凝集素相关序列 (agglutinin-like sequence, ALS) 的调控下,构建成 PALS-GFP 重组子。将 PALS-GFP 报告菌株在培养液中培养一段时间以后,利用流式细胞仪对报告菌株产生的荧光信号进行检测,通过荧光信号的强弱来判断基因 ALS 的表达水平。

Barelle 等^[22]分别将 PCK1、ICL1、PFK2 和 PYK1 启动子整合到 pGFP 载体 yEGFP 的上游,并且稳定地整合到白念珠菌基因组的 RPS1 位点,分别形成融合基因 PCK1-GFP、ICL1-GFP、PFK2-GFP 和 PYK1-GFP。PCK1-GFP 中包含编码磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的编码序列,ICL1-GFP 包含编码异柠檬酸裂解酶的编码序列,PFK2-GFP 和 PYK1-GFP 包含糖酵解过程中所需酶的编码序列。将上述 4 种融合基因转染到白念珠菌体内,并将含有不同融合基因的白念珠菌在含 2% 氨基酸和 2% 葡萄糖的培养液中培养。通过检测 GFP 荧光信号的强度,发现 PCK1-GFP 和 ICL1-GFP 在含有 2% 葡萄糖的培养液中表达受到抑制,而 PFK2-GFP 和 PYK1-GFP 在 2 种培养液中的表达未受到影响,说明葡萄糖抑制了磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因和异柠檬酸裂解酶基因的表达。

GFP 也可用于白念珠菌基因表达的定量研究。Barelle 等^[23]为了定量分析感染组织中白念珠菌个体中基因的表达水平,发展了一个基于质粒 pGFP 构建的检测系统。该系统包括 CaADH1 启动子,ScCYC 终止子以及位于 CaADH1 和 ScCYC 之间的 yEGFP 序列。构建重组质粒 pPCK1-GFP 和 pMET3-GFP,并使其在白念珠菌中表达,利用定量荧光显微镜观测个体细胞 GFP 的表达水平。结果表明 GFP 随着基因诱导表达而迅速表达升高,随着基因抑制而迅速表达降低。因此,单个细胞的荧光测定值可能准确反映了基因的实时表达水平,说明 GFP 可用于基因表达的监控。另外,他们发现 pACT1-GFP 基因无论是在白念珠菌生长的酵母型或菌丝型期间,还是在白念珠菌感染老鼠模型的组织时,表达水平都是恒定的,为将来定量分析真菌感染期间白念珠菌的分子反应提供了参考。

除此之外,Green 等^[24]利用 GFP 监测白念珠菌 ALS 基因在传播性念珠菌的鼠科动物模型中的表达,以便研究 ALS 基因在白念珠菌的传播性和致病性中所起的作用。Barelle 等^[25]将 GFP 基因与 SAP(SAP4、SAP5、SAP6)基因融合,检测到在唑类抗真菌药物的影响下,SAP 基因的表达水平有升高趋势,因此他们认为 SAP 基因与白念珠菌的致病性有密切相关性。Vogel 等^[26]将 GFP 基因与 MDR1 基因融合,利用 GFP 荧光信号的强弱显示 MDR1 基因在不同化合物刺激下的表达水平,结果表明利福平(rifampicin)对 MDR1 的表达水平影响较大。

2.2 蛋白定位和功能的研究 GFP 基因可与感兴趣的基因融合构成融合基因,并在生物体内表达出融合蛋白。GFP 与目的蛋白融合并不影响目的蛋白的生物功能,可根据 GFP 的荧光信号位置来判断目的蛋白的位置,从而得出目的蛋白的结合位点和结合特性与条件、目的蛋白的功能及其与其他蛋白的功能差异。

Nejad 等^[27]发明了一系列包含荧光蛋白基因的重组质粒,可用于构建含由 PCR 介导的标记基因的白念珠菌菌株。他们利用基因工程技术将 GFP 及 GFP 的变种 YFP 和 CFP 的序列进行优化使其与白念珠菌的遗传密码子一致。并将荧光蛋白的序列通过 PCR 扩增后,直接转染到白念珠菌中。

荧光蛋白基因通过同源重组整合到感兴趣基因的3'末端序列,可对目的基因表达的蛋白进行定位。他们利用该技术构建融合基因 Cdc3-CFP 和 Tub1-YFP,通过荧光微克隆和定位使结果可视化,对基因 Cdc3 和 Tub1 表达的蛋白进行定位。此外,他们发现 Tub1-YFP 和 Cdc3-CFP 可在同一个细胞中表达,产生不同的荧光信号,可同时分别将2种不同蛋白进行定位。这项技术可直接一步构建多种荧光蛋白的融合,便于在白念珠菌中研究蛋白的共表达和共定位。Dias 等^[28]将 GFP 编码序列插入 Tn5 转座子中,构成重组转座子,并转入白念珠菌中产生融合蛋白。重组转座子 Tn5-CaGFP 和 Tn5-CaGFP-URA3;FLIP 能够产生 C 端融合的 GFP,通过对白念珠菌的基因表达进行检测,可对蛋白分布定位。Dias 等构建的重组转座子提供了一个新的系统来获得白念珠菌内基因表达和蛋白定位的情况。

Pasrija 等^[29]利用 GFP 研究膜脂组成的改变对来自白念珠菌不同超家族的2种膜药物外转移蛋白的影响。他们比较白念珠菌的多药转运蛋白 CaMdr1p 和转运蛋白 CaCdr1p。CaCdr1p 定位在叫“筏”的抗去污剂的微结构域。CaCdr1p 和 CaMdr1p 作为 GFP 标记的蛋白在缺失鞘脂或麦角固醇的基因的异种宿主啤酒酵母中是过量表达的。当 Cadr1p-GFP 在上述基因突变菌中表达时,通过观察发现质膜上没有荧光信号,说明 Cadr1p 不能正确地结合到质膜上,这导致了耐药性的严重受损。相反,CaMdr1p-GFP 在上述基因突变菌中表达时,荧光信号的位置没有异常,说明 CaMdr1p 能很好地定位在表面,耐药性也没有发生变化。通过实验,他们认为 CaCdr1p 具有能选择性地结合到酵母质膜的膜抗去污剂微结构域,并且任何“筏”脂组成的失衡都将造成 CaCdr1p 的错误排序。此实验利用 GFP 发出荧光信号的位置,比较了2种目的蛋白结合位置的不同,并进一步反映了2种蛋白之间结合特异性之间的差异,即利用 GFP 确定了目的蛋白的位置,并由此对目的蛋白进行了功能比较。

GFP 应用于目的蛋白的研究不局限于利用其荧光信号,也可利用抗 GFP 抗体来识别含 GFP 的融合蛋白,进行定位和功能研究。González-Novo 等^[30]构建融合基因,表达了一系列的由隔蛋白和 GFP 组成的融合蛋白(CDC10-GFP、CDC3-GFP、CDC12-GFP、SEP7-GFP),利用抗 GFP 抗体进行蛋白印迹和免疫沉淀实验,验证蛋白间的相互作用及功能。他们研究认为隔蛋白 SEP7 在改变白念珠菌的胞裂动力学以及在抑制白念珠菌的分离方面都起到了重要作用。

2.3 其他方面 Enjalbert 等^[31]将 GFP 作为白念珠菌氧化应激的生物检测器。他们将 GFP 基因与 CTA、TRX 和 TTR1/GRX2 的启动子融合,分别组成 CTA-GFP、TRX-GFP 和 TTR1/GRX2-GFP 报告因子,并且确证这些报告因子只对氧化应激作出反应,而不对热休克应激、亚硝化应激和渗透压应激作出反应。他们用这些报告因子检测到生物体内的单个白念珠菌细胞氧化应激是由中性粒细胞的噬菌作用引起,而不是巨噬细胞。此外,Davis-Hanna 等^[32]将 GFP 用于白念珠菌信号通路的研究,利用 CTA1-GFP、HWPI-GFP 报

告因子及其他实验,他们认为金合欢醇(farnesol)和十二烷醇对 Ras-Cdc35 通路有重要作用。Li 和 Palecek^[33]利用含有 GFP 的报告因子进行了白念珠菌细胞间相互作用及细胞与基底物相互作用的研究。

3 展望

近年来,随着对 GFP 研究的深入,GFP 在哺乳动物、植物、真菌中都有较为成功的应用。GFP 在致病菌白念珠菌中已有广泛应用,如在基因表达的检测、目的蛋白的定位、蛋白质间相互作用及细胞间相互作用等方面都取得了良好的实验效果。但是由于 GFP 的发光机制还不是很明显以及白念珠菌的编码序列与野生型 GFP 基因的编码序列有一定的差异,GFP 在白念珠菌中的应用受到一定程度的限制。但是随着对 GFP 研究的深入和生命科学技术的发展,GFP 必将得到更好的优化改造以更适于在白念珠菌中表达和应用,从而在白念珠菌的研究中有更加广泛的应用。

[参考文献]

- [1] Aperis G, Myriounis N, Spanakis E K, Mylonakis E. Developments in the treatment of candidiasis: more choices and new challenges[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2006, 15: 1319-1336.
- [2] Pfaller M A, Diekema D J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20: 133-163.
- [3] 李刚, 金钢, 周旭宇, 胡先贵, 王军, 李铁军. 胰腺癌新基因 S100P 与绿色荧光蛋白融合基因慢病毒载体的构建[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 1230-1233.
Li G, Jin G, Zhou X Y, Hu X G, Wang J, Li T J. Construction of lentivirus carrying novel human pancreatic cancer gene S100P and green fluorescent protein gene[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 1230-1233.
- [4] 范向军, 周元, 朱铭岩, 王志伟. 转染绿色荧光蛋白-胰岛素融合基因的小鼠骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病小鼠[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 1455-1459.
Fan X J, Zhou Y, Zhu M Y, Wang Z W. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells harboring fusing gene of enhanced green fluorescent protein and human insulin gene in treatment of diabetic mice[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 1455-1459.
- [5] 郭峰, 刘彦信, 郑德先, 蒋澄宇. 维甲酸受体为靶点的高通量药物筛选细胞模型的建立[J]. 药学报, 2005, 40: 908-911.
- [6] 张未, 潘仕荣, 张璇, 罗昕, 王持. 聚乙二醇-壳聚糖共聚物作为基因传递载体的体外研究[J]. 药学报, 2008, 43: 848-854.
- [7] Wan F, Anderson D E, Barnitz R A, Snow A, Bidere N, Zheng L, et al. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation[J]. Cell, 2007, 131: 927-939.
- [8] Sturtevant J. Reporter gene assays in *Candida albicans* [J]. Method Mol Biol, 2009, 499: 157-167.
- [9] Pakhomovl A A, Martynovl V I. GFP family: structural insights

- into spectral tuning[J]. *Chem Biol*, 2008, 15: 755-764.
- [10] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea* [J]. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59: 223-239.
- [11] Prasher D C, Echenrode V K, Ward W W, Prendergast F G, Cormier M J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. *Gene*, 1992, 111: 229-233.
- [12] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W, Prasher D C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263: 802-805.
- [13] Campbell R E, Tour O, Palmer A E, Steinbach P A, Baird G S, Zacharias D A, et al. A monomeric red fluorescent protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7877-7882.
- [14] Tsien R Y. The green fluorescent protein[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509-544.
- [15] Niedenthal R K, Riles L, Johnston M, Hegemann J H. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast[J]. *Yeast*, 1996, 12: 773-786.
- [16] Cormack B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi[J]. *Curr Opin Microbiol*, 1998, 1: 406-410.
- [17] Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H, Galbraith D W. Green fluorescent protein as a new vital maker in plant cells[J]. *Plant J*, 1995, 8: 777-784.
- [18] Chalfie M, Prasher D. Green fluorescent protein; US, 6146826 [P]. 2000-11-14.
- [19] De Backer M D, Magee P T, Pla J. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans* [J]. *Ann Rev Microbiol*, 2000, 54: 463-498.
- [20] Cormack B P, Bertram G, Egerton M, Gow N A, Falkow S, Brown A J. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans* [J]. *Microbiology*, 1997, 143: 303-311.
- [21] Green C B, Zhao X M, Yeater K M, Hoyer L L. Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells[J]. *Microbiology*, 2005, 151: 1051-1060.
- [22] Barelle C J, Priest C L, McCallum D M, Gow N A, Odds F C, Brown A J. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen[J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8: 961-971.
- [23] Barelle C J, Manson C L, MacCallum D M, Gow N A, Odds F C, Brown A J. GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans* [J]. *Yeast*, 2004, 21: 333-340.
- [24] Green C B, Zhao X M, Hoyer L L. Use of green fluorescent protein and reverse transcription-PCR to monitor *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression in a murine model of disseminated candidiasis [J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 1852-1855.
- [25] Barelle C J, Duncan V M, Brown A J, Gow N A, Odds F C. Azole antifungals induce up-regulation of SAP4, SAP5 and SAP6 secreted proteinase genes in filamentous *Candida albicans* cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61: 315-322.
- [26] Vogel M, Hartmann T, Köberle M, Treiber M, Autenrieth I B, Schumacher U K. Rifampicin induces MDR1 expression in *Candida albicans* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61: 541-547.
- [27] Nejad M G, Berman J, Gale C A. Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans* [J]. *Yeast*, 2001, 18: 859-864.
- [28] Dias M V, Basso L R, Coelho P S. New transposons to generate GFP protein fusions in *Candida albicans* [J]. *Gene*, 2008, 417: 13-18.
- [29] Pasrija R, Panwar S L, Prasad R. Multidrug transporters CaCdr1p and CaMdr1p of *Candida albicans* display different lipid specificities: both ergosterol and sphingolipids are essential for targeting of CaCdr1p to membrane rafts[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52: 694-704.
- [30] González-Novo A, Correa-Bordes J, Labrador L, Sánchez M, Vázquez de Aldana C R, Jiménez J. Sep7 is essential to modify septin ring dynamics and inhibit cell separation during *Candida albicans* hyphal growth[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 1509-1518.
- [31] Enjalbert B, MacCallum D M, Odds F C, Brown A J. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans* [J]. *Infect Immun*, 2007, 75: 2143-2151.
- [32] Davis-Hanna A D, Piispanen A E, Stateva L I, Hogan D A. Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis [J]. *Mol Microbiol*, 2008, 67: 47-62.
- [33] Li F, Palecek S P. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt4): 1193-1203.

[本文编辑] 尹 茶