

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00929

## 异源性筛选标记对白假丝酵母菌耐受各种应激的影响

李星星,李德东,阎 澜\*,姜远英\*

第二军医大学药学院新药研究中心,上海 200433

**[摘要]** **目的** 考察以 His1-Leu2-Arg4 基因敲除策略敲除白假丝酵母菌基因后,异源性筛选标记 *C. dubliniensis* HIS1 (*C. d.* HIS1)、*C. maltosa* LEU2(*C. m.* LEU2)和 *C. dubliniensis* ARG4(*C. d.* ARG4)对菌株耐受各种应激的影响。**方法** 以 SN152 为亲本菌,融合 PCR 法构建重组片段,醋酸锂法转染白假丝酵母菌 SN152,分别构建上述 3 个标记的回复菌。采用套式 PCR 法鉴定回复菌的构建,spot assay 实验考察菌株对各种应激的敏感性。**结果** PCR 验证 7 种菌株构建成功,spot assay 结果显示各回复菌对 pH 应激、氧化应激、各种临床抗菌药应激、金属离子应激、细胞壁损伤相关药物应激、渗透应激、DNA 损伤化合物应激的敏感性与亲本菌 SN152 一致。而给予 0.02% SDS 时各菌株的敏感性不一致,缺乏 *C. d.* HIS1 标记的菌株在 0.02% SDS 的应激条件下不能生长。**结论** *C. d.* HIS1、*C. m.* LEU2 和 *C. d.* ARG4 3 个异源性筛选标记不影响白假丝酵母菌对大部分应激的敏感性,不同标记基因敲除菌间可以相互比较,且可以统一用 SN152 作为对照菌株。在考察 SDS 应激时,所用筛选标记不同,对结果有影响,不能用 SN152 代替作为统一对照,若要相互比较,要保证 *C. d.* HIS1 标记必须一致。

**[关键词]** 白假丝酵母菌;基因敲除;异源性筛选标记;应激

**[中图分类号]** R 379.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)09-0929-06

### Effect of heterologous auxotrophy markers on adaptation to various stresses in *Candida albicans*

LI Xing-xing, LI De-dong, YAN Lan\*, JIANG Yuan-ying\*

New Drug R & D Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of heterologous auxotrophy markers from non-*Candida albicans* (*C. albicans*) yeasts (*C. dubliniensis* HIS1[*C. d.* HIS1], *C. maltosa* LEU2[*C. m.* LEU2] and *C. dubliniensis* ARG4[*C. d.* ARG4]) on adaptation to various stresses of *C. albicans* knockout mutants (by His1-Leu2-Arg4 strategy). **Methods** Fusion PCR strategy was used to construct recombination fragment, which was then used to transform SN152 by lithium acetate method. Genomic PCR was used to confirm the integration of the three selection markers. Spot assays were employed to assess the sensitivities of different reintegrated strains to different stresses. **Results** The results of PCR showed that seven reintegrated strains containing *C. m.* LEU2, *C. d.* HIS1 and *C. d.* ARG4 were successfully constructed. The results of spot assay showed that there were no differences between the seven reintegration strains and SN152 in responses to the tested stresses, including pH stress, oxidative stress, antifungal agent stress, metal ion stress, cell wall stress, osmotic stress and DNA damage agent stress. We also found that only strains which integrated *C. d.* HIS1 marker could survive from the 0.02% SDS stress. **Conclusion** The three heterologous selection marker *C. m.* LEU2, *C. d.* HIS1 and *C. d.* ARG4 do not influence the sensitivity of *C. albicans* to most stresses; comparison can be made between *C. albicans* knockout mutants with different markers, and SN152 can be used as parental control. While assessing the sensitivity to SDS, the results vary with different selection markers, and SN152 can not be used as a unified control; therefore comparison should be made with *C. d.* HIS1 kept consistent.

**[Key words]** *Candida albicans*; gene knockout; heterologous auxotrophy markers; stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(9): 929-934]

白假丝酵母菌是人类重要的致病真菌,其发病率在假丝酵母菌感染中高居首位<sup>[1]</sup>。近年来白假丝酵母菌的致病和耐药机制研究越来越受到研究人员的关注,应用基因敲除技术研究其基因功能是一种

**[收稿日期]** 2012-03-03 **[接受日期]** 2012-06-29

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31000079),上海市基础研究重点项目(10JC1417500). Supported by National Natural Science Foundation of China (31000079), and Key Basic Research Program of Shanghai (10JC1417500).

**[作者简介]** 李星星,硕士生. E-mail: xingxingsf@yahoo.com.cn

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871277, E-mail: ylan20001228@sina.com; Tel: 021-81871357, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

普遍的方法。很长时间以来,白假丝酵母菌基因敲除方法只有 Ura-Blast 策略<sup>[2-4]</sup>,该策略以 URA3 为筛选标记,通过 2 次同源重组替换菌株的两条等位基因。研究表明 URA3 在白假丝酵母菌基因组不同位置表达水平不同,可能会影响菌株的毒力、形态转换和黏附等<sup>[5-7]</sup>。因此 Noble 等<sup>[8]</sup>构建了不依赖 URA3 的 His1-Leu2-Arg4 基因敲除策略,该策略以菌株 SN152 为亲本菌,以麦芽糖假丝酵母菌来源的 LEU2 (*Candida maltosa* LEU2, *C. m.* LEU2)、都柏林假丝酵母菌来源的 HIS1 (*Candida dubliniensis* HIS1, *C. d.* HIS1) 和 ARG4 (*Candida dubliniensis* ARG4, *C. d.* ARG4) 为筛选标记,分别用 3 个筛选标记中的任意 2 个替换菌株的两条等位基因。该策略不仅避免了敲除或回复 URA3 对白假丝酵母菌毒力的影响,同时具有不需要反筛步骤、节省实验时间的优点。此外,异源性筛选标记可以尽量避免转染片段与染色体标记位点发生非特异性重排<sup>[8]</sup>,从而提高转染成功率,因此该方案逐步被研究人员所接受和广泛应用<sup>[9]</sup>。

然而,以 SN152 为亲本菌的基因敲除策略中所用到的筛选标记 *C. d.* HIS1、*C. m.* LEU2 和 *C. d.* ARG4 不能像 Ura-Blast 策略那样可以通过重组而去除,所以亲本菌与缺失菌相比除了被敲除基因有无的差别,还包括了筛选标记的差别,即亲本菌中并不含有这些筛选标记基因,而缺失菌为了替换目的基因引入了这些筛选标记基因。Noble 等<sup>[8]</sup>研究表明,这些筛选标记对菌株的毒力没有影响,但是在考察缺失菌株其他表型,尤其是菌株对外界环境中各种应激的敏感性时,3 个筛选标记是否会影响菌株的表型从而干扰研究人员对目的基因功能的研究,目前尚未有报道。

本研究通过构建 SN152 的不同筛选标记回复菌,采用 spot assay 方法考察了不同筛选标记对菌株耐受各种应激条件的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与培养条件

菌株常规在 YPD 培养液 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) 中 30℃ 振荡培养。含药培养基是在 YPD 固体培养基 (YPD + 2% agar) 的基础上分别加入下述药物以构建不同应激条件,包括 (1) 氧化应激:过氧化氢 ( $H_2O_2$ , 6 mmol/L); (2) 各种临床抗菌药:氟康唑 (fuconazole, 4  $\mu$ g/ml), 酮康唑 (ketoconazole, 2  $\mu$ g/

ml), 咪康唑 (miconazole, 2  $\mu$ g/ml), 两性霉素 B (amphotericin B, 0.5  $\mu$ g/ml), 布雷菲德菌素 (brefeldin A, 15  $\mu$ g/ml); (3) 金属离子应激:氯化钾 (KCl, 1.5 mol/L), 氯化钠 (NaCl, 1.5 mol/L), 氯化钙 ( $CaCl_2$ , 125 mmol/L), 氯化锂 (LiCl, 200 mmol/L); (4) 细胞壁损伤相关药物:刚果红 (Congo red, 200  $\mu$ g/ml), 荧光增白剂 (calcofluor white, CFW, 25  $\mu$ g/ml), 0.02% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS), 卡泊芬净 (caspofungin, 0.25  $\mu$ g/ml); (5) 渗透应激:甘油 (glycerol, 250 mmol/L), 山梨醇 (sorbitol, 3 mol/L); (6) DNA 损伤应激:甲基黄酰甲酯 (methylmethane sulfonate, MMS, 0.02%), 羟基脲 (hydroxyurea, HU, 30 mmol/L); (7) pH 应激:用 150 mmol/L HEPES 缓冲液调 YPD 培养液 pH 为 4.0, 用 50 mmol/L Glycine-NaOH 缓冲液调 YPD 培养液 pH 为 9.0。

SC 培养基含 6.7 g yeast nitrogen base, 2% dextrose, 1.05 g dropoutmix; SC-HIS 和 SC + 0.02% SDS 培养基分别在 SC 培养基的基础上补充 histidine (20  $\mu$ g/ml) 或加入终浓度为 0.02% 的 SDS。

### 1.2 菌株构建

菌株 SN152 和质粒 pSN40、pSN69、pSN75 均由 Suzanne M. Noble 教授馈赠 (Department of Microbiology and Immunology, University of California-San Francisco, San Francisco, California, USA)。用融合 PCR 法构建重组片段, His1-Leu2-Arg4 基因敲除策略构建回复菌<sup>[8]</sup>, 向 SN152 中分别回复 *C. d.* HIS1、*C. m.* LEU2 和 *C. d.* ARG4 3 个标记。所用引物具体见表 1。

*C. m.* LEU2 和 *C. d.* ARG4 分别回复到白假丝酵母菌的 LEU2 和 ARG4 位点, 首先以白假丝酵母菌 SN152 基因组 DNA 为模板, 以 P1、P3 或 P4、P6 分别为引物进行 PCR 扩增得到用于重组的上下游片段, 用 pSN Universal F、pSN Universal R 为上下游引物, 以 pSN40、pSN69 为模板 PCR 扩增得到 *C. m.* LEU2 和 *C. d.* ARG4 筛选标记片段, 再将以上扩增出的片段为模板, P1、P6 为引物进行融合 PCR 得到融合片段。将融合片段用醋酸锂 (LiAc) 法转染入白假丝酵母菌 SN152 中, 涂于选择性培养基 SC-Leu 或 SC-Arg 培养基上, 48 h 后挑取长出的菌落, 抽基因组 DNA 进行套式 PCR 鉴定, 引物即表 1 中 upcheck、downcheck, 得到含 *C. d.* ARG4 和 *C. m.* LEU2 的重构菌 SNA、SNL。

表 1 PCR 扩增用到的引物

Tab 1 Primers used in PCR amplification

Primer	Sequence(5'-3')
ARG4 P1	GGA CAG AAA GTT ATT GTA CAG
ARG4 P3	cac ggc gcg cct agc agc ggG ATT ATT CTT GAT AGC TGT TAT G
ARG4 P4	gtc agc ggc cgc atc cct gcG TCA TAT AAT AAT CAC AGT ATT G
ARG4 P6	TCA GAC GAT CTT TAC AAT GG
ARG4 upcheck F	GAC ATA TTG ACC GAC ATA AT
ARG4 upcheck R	TTA CAA GTA TGA AAG GAG GGG
ARG4 downcheck F	CTT CAA CCT TTC AAA CGA TGC
ARG4 downcheck R	CTA ATG ACT GAA TTT GAT GTA
LEU2 P1	AAG CCG AAG TCG ACT ATG TC
LEU2 P3	cac ggc gcg cct agc agc ggG GAT ATT GGT TTT AAA AGA AAG G
LEU2 P4	gtc agc ggc cgc atc cct gcA CAG TAT ATA CAG TAG TTA GC
LEU2 P6	TGA CAA ATG AAT TCA GTC AG
LEU2 upcheck F	GCT TTG AGT TCT GGG TCA GC
LEU2 upcheck R	GCA CGC CGT TAC AGG AGT TA
LEU2 downcheck F	GAA GTT GGT GAC GCG ATT GT
LEU2 downcheck R	CGG TTT CGG AAA TGA CAA AT
HIS1-RPS1 upcheck F	TTG AAC GTG GCT TTT TAC ACC
HIS1-RPS1 upcheck R	TCA AGC CCT GTA GCT CCA TT
HIS1-RPS1 downcheck F	TCC GCT CAT TTG ATT TCC TC
HIS1-RPS1 downcheck R	AAC CAG ACT CGC CCT CTC TT
pSN Universal F	cgg ctg cta ggc gcg cgg tgA GCT CGG ATC CAC TAG TAA CG
pSN Universal R	gca ggg atg cgg cgg ctg acG CCA GTG TGA TGG ATA TCT GC

*C. d.* HIS1 回复到 *C. d.* 的 RPS1 位点。将质粒 pSN75 (质粒上含有 *C. d.* HIS1 marker 和 RPS1 位点上下游片段) 用限制性内切酶 *Not* I 线性化后直接转染 SN152。同样方法鉴定得到含 *C. d.* HIS1 的重构菌 SNH。同理, 在 SNA、SNL、SNH 的基础上重复转染不同标记可得双标记回复菌 SNHA、SNHL、SNAL 和 3 标记回复菌 SNHLA。各菌株基因型详见表 2。

1.3 Spot assay 实验 实验方法与文献<sup>[10]</sup>相同, 首先制备含药平板, 药物种类、浓度详见 1.1 项。将各菌株从 -80℃ 甘油冻存菌中吸取少量, 划线接种至 YPD 固体培养基 30℃ 培养 48 h; 从中挑取单个菌落于 1 ml YPD 液体培养基中 30℃ 振荡 16 h 活化, 使真菌处于指数生长期后期; 用 YPD 调整菌密度为  $5 \times 10^6$ /ml, 再依次 5 倍稀释 5 个浓度梯度, 每个浓度取 3  $\mu$ l 点于相应含药培养基上, 30℃ 避光静置培养 48 h 后观察菌落生长状态。

SC、SC-HIS、SC+0.02% SDS 三块平板的菌按上述同样方法活化 16 h 后, 于 1 500×g 离心 5 min, 吸弃上清, 菌沉淀用 1 ml 生理盐水重悬, 再于 1 500×g 离心 5 min, 吸弃上清, 如此反复 3 次, 彻底洗去 YPD 培养液; 菌沉淀用 1 ml 生理盐水重悬并调整菌密度为  $5 \times 10^6$ /ml, 之后稀释 1 000 倍并点板, 操作同上。

表 2 实验中用到的菌株基因型

Tab 2 Genotypes of strains used in the present research

Strain	Phenotype	Genotype
SC5314	Prototroph	Wild-type clinical isolate
RM1000	His <sup>-</sup> Ura <sup>-</sup>	his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup>
SN152 <sup>[8]</sup>	Arg <sup>-</sup> Leu <sup>-</sup> His <sup>-</sup>	arg4 $\Delta$ /arg4 $\Delta$ leu2 $\Delta$ /leu2 $\Delta$ his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /URA3 iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /IRO1
SNH	Arg <sup>-</sup> Leu <sup>-</sup>	rps1 $\Delta$ :: <i>C. d.</i> HIS1 $\Delta$ /RPS1 arg4 $\Delta$ /arg4 $\Delta$ leu2 $\Delta$ /leu2 $\Delta$ his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> / URA3 iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /IRO1
SNL	Arg <sup>-</sup> His <sup>-</sup>	leu2 $\Delta$ :: <i>C. m.</i> LEU2/leu2 $\Delta$ arg4 $\Delta$ /arg4 $\Delta$ his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /URA3 iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /IRO1
SNA	Leu <sup>-</sup> His <sup>-</sup>	arg4 $\Delta$ :: <i>C. d.</i> ARG4/arg4 $\Delta$ leu2 $\Delta$ /leu2 $\Delta$ his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /URA3 iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /IRO1
SNHL	Arg <sup>-</sup>	rps1 $\Delta$ :: <i>C. d.</i> HIS1 $\Delta$ /RPS1 leu2 $\Delta$ :: <i>C. m.</i> LEU2/leu2 $\Delta$ arg4 $\Delta$ /arg4 $\Delta$ his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> / URA3 iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /IRO1
SNHA	Leu <sup>-</sup>	rps1 $\Delta$ :: <i>C. d.</i> HIS1 $\Delta$ /RPS1 arg4 $\Delta$ :: <i>C. d.</i> ARG4/arg4 $\Delta$ leu2 $\Delta$ /leu2 $\Delta$ his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> / URA3 iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /IRO1
SNAL	His <sup>-</sup>	arg4 $\Delta$ :: <i>C. d.</i> ARG4/arg4 $\Delta$ leu2 $\Delta$ :: <i>C. m.</i> LEU2/leu2 $\Delta$ his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> / URA3 iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /IRO1
SNHLA	Prototroph	rps1 $\Delta$ :: <i>C. d.</i> HIS1 $\Delta$ /RPS1 arg4 $\Delta$ :: <i>C. d.</i> ARG4/arg4 $\Delta$ leu2 $\Delta$ :: <i>C. m.</i> LEU2/leu2 $\Delta$ his1 $\Delta$ / his1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /URA3 iro1 $\Delta$ ::imm <sup>434</sup> /IRO1

## 2 结果

### 2.1 菌株的构建 pSN75、pSN40、pSN69 质粒上

分别含有 *C. d.* HIS1、*C. m.* LEU2 和 *C. d.* ARG4 3 段基因序列, 其编码蛋白分别影响组氨酸、亮氨酸和精氨酸的生物合成, 缺失后使菌株不能在相应营

养缺陷培养基上生长,因此可以作为筛选标记应用于基因敲除过程。如图 1A 所示,我们以 SN152 为亲本菌,通过构建分别含 3 种筛选标记的融合 PCR 敲除盒,构建了不同标记的回复菌。如图 1B 所示,通过套式 PCR 验证各标记已转入亲本菌基因组序列且位置正确。目的条带的大小分别为: HIS1-RPS1 upcheck 2 044 bp, HIS1-RPS1 downcheck 2 076 bp, ARG4 upcheck 511 bp, ARG4 downcheck 332 bp, LEU2 upcheck 1 221 bp, LEU2 downcheck 678 bp, 条带位置正确。

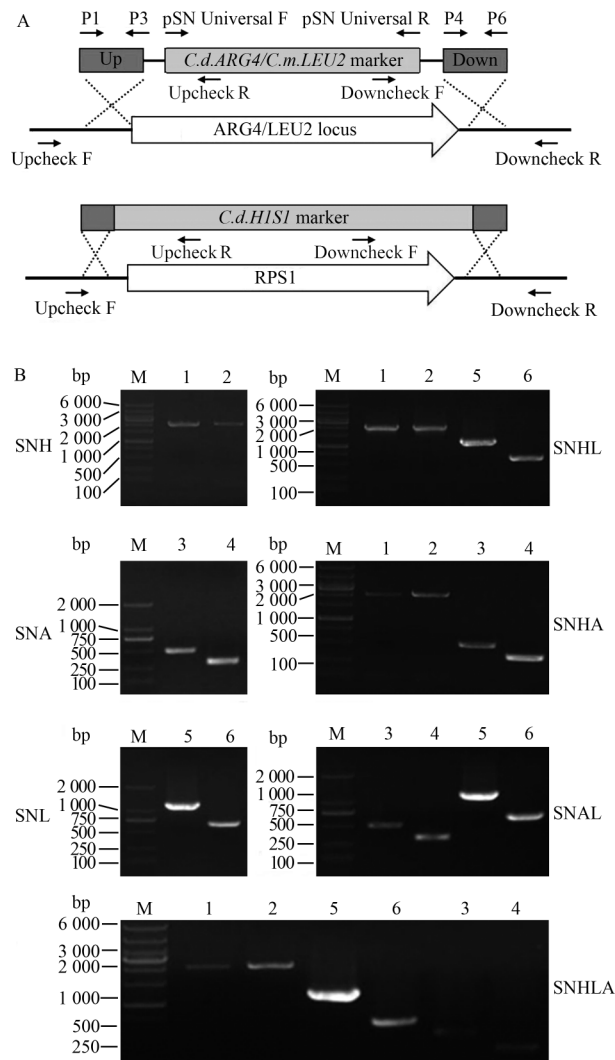


图 1 菌株构建及鉴定

Fig 1 Strain construction and verification

A: Fusion-PCR-based cassette method for re-introduction is diagrammed in this schematic. Small arrows represent orientation and approximate position of primers used for PCR. B: Construction of the SNH, SNA, SNL, SNHL, SNHA, SNAL and SNHLA reintegrated strain was verified by genomic DNA and amplified with the primers. 1: HIS1 upcheck; 2: HIS1 downcheck; 3: ARG4 upcheck; 4: ARG4 downcheck; 5: LEU2 upcheck; 6: LEU2 downcheck; M: Marker

2.2 菌株对各种应激条件的敏感性 Spots assay 实验考察各菌株对相关应激的敏感性,包括 pH 应激(pH 4.0、pH 9.0)、氧化应激(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、各种临床抗菌药应激(氟康唑、酮康唑、咪康唑、两性霉素 B、布雷菲德菌素)、金属离子应激(NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、LiCl)、细胞壁损伤相关药物应激(CFW、刚果红、卡泊芬净、SDS);渗透应激(山梨醇、甘油)、DNA 损伤应激(MMS、HU)。为减少菌株可能的突变带来的结果不可信的情况,每种菌株都有 2 株以上用于表型测试。回复单个标记的 3 个菌 SNH、SNL、SNA 对各应激条件的结果如图 2 所示,除 SDS 外,在其他应激条件下各菌株表型与 SN152 一致,即 *C. d. HIS1*、*C. m. LEU2* 和 *C. d. ARG4* 标记不影响菌株对上述应激(除 SDS 外)的敏感性。

由于白假丝酵母菌的基因组是双倍体,在研究基因功能时需进行 2 次转染即分别用 2 个筛选标记替换两条等位基因,所以进行表型考察时作为对照,应在亲本菌中也回复同样的标记。如果几株突变菌敲除时用的标记不一致,放在一起比较则没有相同的对照,且不能排除不同标记对结果的影响。为解决此问题,我们构建了双标记回复菌 SNHL、SNHA、SNAL 及 3 标记回复菌 SNHLA,并考察了不同应激条件下各菌株的相关表型。如图 2 所示,与单回复菌株相同,除 SDS 外,在其他应激条件下各菌株表型与 SN152 一致。

此外从图 2 中可以看出,在含 0.02% SDS 的 YPD 固体培养基上只有 SNH、SNHL、SNHA 和 SNHLA 4 株菌株能够生长,而其余 4 株菌株 SN152、SNL、SNA 和 SNAL 不能生长。由于 SNH、SNHL、SNHA 和 SNHLA 菌株都回复了 *C. d. HIS1* 标记,而另外 4 株菌株不含有此标记,故我们推测 *HIS1* 基因对于菌株耐受 SDS 应激起到了关键性作用。

由于 *HIS1* 基因编码组氨酸合成酶,我们推测组氨酸的自身合成对于菌株耐受 SDS 起到关键作用,故我们考察了野生型菌 SC5314 和 *HIS1* 缺失菌株 RM1000 对 SDS 的敏感性。结果显示,SC5314 在含 0.02% SDS 的培养基上生长良好,而 RM1000 不能在含 0.02% SDS 的培养基上生长(图 3)。同时图 3 结果显示凡是在缺乏组氨酸培养基上不能生长的菌株在含 0.02% SDS 的培养基上同样不能生长,表明组氨酸合成障碍会导致菌株对 SDS 高度敏感。

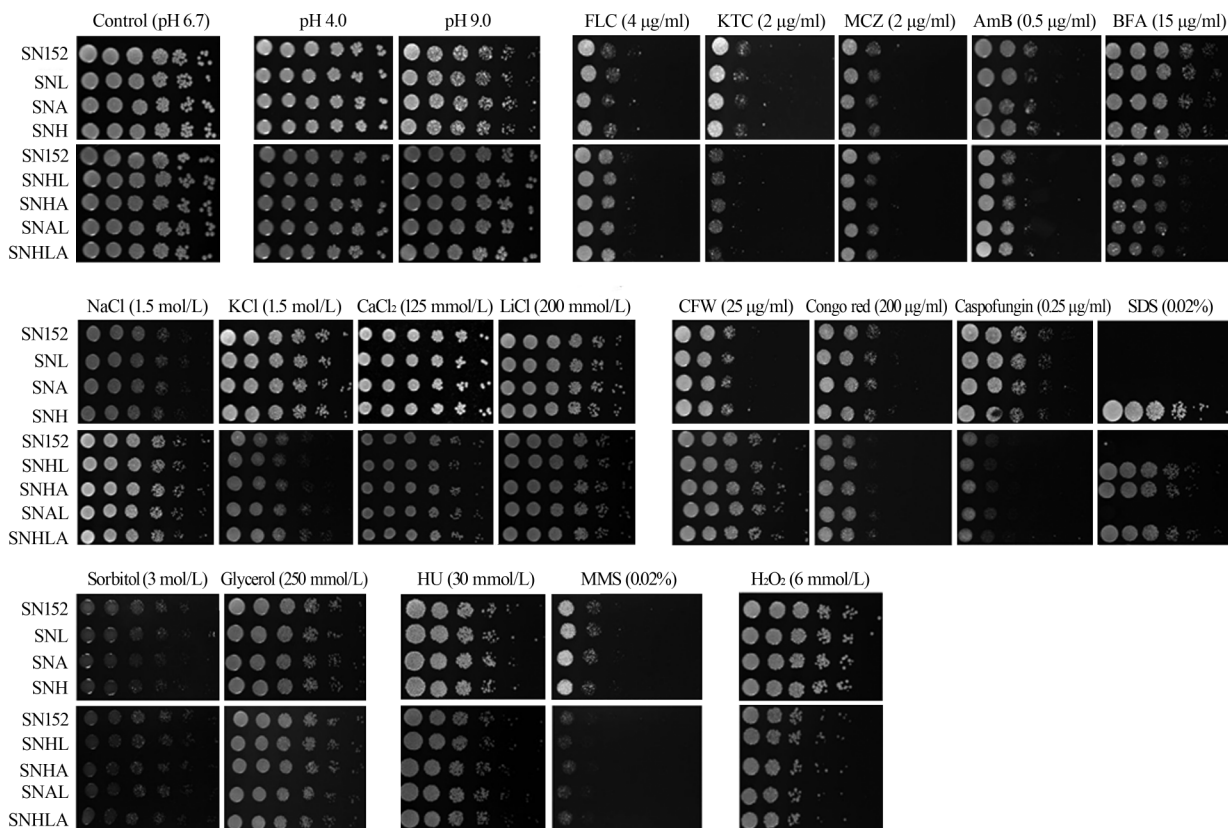


图 2 各回复菌对各种应激条件的敏感性

Fig 2 Adaptation of reintegrated strains to various stresses

All strains were grown to post-log phase and then spotted in 5-fold dilutions onto YPD plates with or without chemical agents as indicated. Growth differences were detected after a 48 h incubation. Single marker reintegrated strains SNL, SNA and SNH; double marker reintegrated strains SNHL, SNHA, SNAL and triple marker reintegrated strains SNHLA were compared with wild-type SN152. FLC: Fluconazole; KTC: Ketoconazole; MCZ: Miconazole; AmB: Amphotericin B; BFA: Brefeldin A; CFW: Calcofluor white; SDS: Sodium dodecyl sulfate; HU: Hydroxyurea; MMS: Methylmethane sulfonate

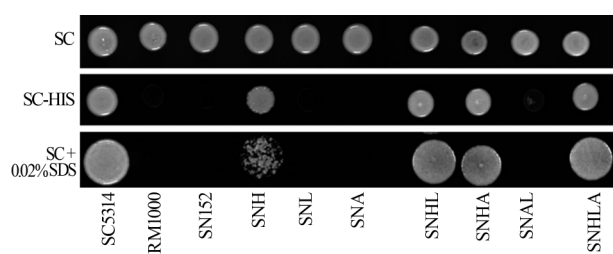


图 3 各菌株对 SDS 的敏感性

Fig 3 Strain adaptation to SDS stress

SC5314, RM1000, SN152, SNH, SNL, SNA, SNHL, SNHA, SNAL and SNHLA were all grown to post-log phase and then spotted onto SC plates and with SDS or with histidine. Growth differences were detected after a 48 h incubation

### 3 讨论

本研究结果显示, *C. d. HIS1*、*C. m. LEU2* 和 *C. d. ARG4* 标记对白假丝酵母菌耐受 pH 应激(pH

4.0、pH 9.0)、氧化应激( $H_2O_2$ )、抗菌药应激(氟康唑、酮康唑、咪康唑、两性霉素 B、布雷菲德菌素)、金属离子应激(NaCl、KCl、 $CaCl_2$ 、LiCl)、细胞壁损伤相关应激(CFW、刚果红、卡泊芬净)、渗透应激(山梨醇、甘油)、DNA 损伤应激(MMS、HU)的表型考察无影响,不同标记敲除菌间可以相互比较,且可以统一用 SN152 作为对照。但是在考察菌株对 SDS 应激时,所用标记不同,对实验结果有较大影响,故不能用 SN152 作为统一对照。在进行相互比较时,要注意 *C. d. HIS1* 标记必须一致。

组氨酸自身合成障碍白假丝酵母菌对 SDS 高度敏感的机制目前并不明确。SDS 是一种阴离子表面活性剂,与阴离子、非离子复配伍性好,具有良好的乳化、发泡、渗透、去污和分散性能。在生物化学方面,SDS 分子中疏水长链与蛋白质分子内部的非极性基团相互作用,而带负电荷的硫酸根可以与水作用,使蛋白质分子构象发生很大的变化,导致蛋白质

变性,在较高温度下,破坏蛋白质与DNA的结合。在对白假丝酵母菌的研究中,SDS经常被作为破坏细胞表面结构的阳性对照药物<sup>[11]</sup>。基于SDS的性质,我们推测可能由于SDS与组氨酸发生反应或破坏组氨酸结构,耗竭培养基中组氨酸,使不能自身合成组氨酸的菌株由于组氨酸匮乏而死亡,而自身能够合成组氨酸的菌株则无影响。具体的机制需进一步的研究确定。

His1-Leu2-Arg4基因敲除策略经2次同源重组就可替换目的基因序列,不需要构建重组质粒,不需要反筛,方法简便快速,大大提高了敲除效率,便于之后基因功能的研究。但由于筛选标记的存在,使得菌株之间的比较不能形成严格意义上的对照关系,使得研究结果存在一定的不确定性。我们的研究证实,在大部分应激条件下,3种筛选标记的存在对于菌株的表型并没有明显影响,菌株之间可进行相互比较,但在SDS应激条件下,*C. d.* HIS1标记的存在与否将严重影响实验结果。该结果将会对今后研究人员采用His1-Leu2-Arg4基因敲除策略研究白假丝酵母菌基因功能起到重要指导作用。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S M, Seifert H, Wenzel R P, Edmond M B. Nosocomial bloodstream infections in us hospitals: analysis of 24 179 cases from a prospective nationwide surveillance study[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39: 309-317.

[2] Fonzi W A, Irwin M Y. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*[J]. Genetics, 1993, 134: 717-728.

[3] Negredo A, Monteoliva L, Gil C, Pla J, Nombela C. Cloning, analysis and one-step disruption of the *arg5,6* gene of *Candida albicans*[J]. Microbiology, 1997, 143(Pt 2): 297-302.

[4] Wilson R B, Davis D, Mitchell A P. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions[J]. J Bacteriol, 1999, 181: 1868-1874.

[5] Brand A, MacCallum D M, Brown A J, Gow N A, Odds F C. Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the *rps10* locus[J]. Eukaryot Cell, 2004, 3: 900-909.

[6] Cheng S, Nguyen M H, Zhang Z, Jia H, Handfield M, Clancy C J. Evaluation of the roles of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express Ura3 from the native locus[J]. Infect Immun, 2003, 71: 6101-6103.

[7] Sundstrom P, Cutler J E, Staab J F. Reevaluation of the role of *hwp1* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker Ura3 targeted to the *eno1* locus[J]. Infect Immun, 2002, 70: 3281-3283.

[8] Noble S M, Johnson A D. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*[J]. Eukaryot Cell, 2005, 4: 298-309.

[9] Noble S M, French S, Kohn L A, Chen V, Johnson A D. Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity[J]. Nat Genet, 2010, 42: 590-598.

[10] Yan L, Zhang J D, Cao Y B, Gao P H, Jiang Y Y. Proteomic analysis reveals a metabolism shift in a laboratory fluconazole-resistant *Candida albicans* strain[J]. J Proteome Res, 2007, 6: 2248-2256.

[11] Bahnan W, Koussa J, Younes S, Rizk M A, Khalil B, Sitt S E, et al. Deletion of the *Candida albicans* Pir32 results in increased virulence, stress response, and upregulation of cell wall chitin deposition[J]. Mycopathologia, 2012, 174: 107-119.

[本文编辑] 尹 茶