

• 论著 •

两株希木龙假丝酵母 14α -去甲基化酶基因(*ERG11*)的克隆及其功能初步验证

张浩, 王千, 刘伟

北京大学第一医院皮肤性病科, 北京大学真菌和真菌病研究中心, 皮肤病分子诊断北京市重点实验室, 北京 100034

摘要:为探讨希木龙假丝酵母(假丝酵母又称念珠菌)的耐药机制,首先克隆出两株希木龙念珠菌 *ERG11* 基因,初步验证其功能,从而为后续研究奠定基础。从美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)基因数据库中获取白念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和光滑念珠菌 Erg11 蛋白的保守序列,设计简并引物,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增获得希木龙念珠菌 *ERG11* cDNA 部分片段;用快速 cDNA 末端扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)分别扩增其 5' 和 3' 端,获得完整的 *ERG11* 编码序列(coding sequence, CDS);将 CDS 克隆到 pYES2 表达载体中,在尿嘧啶营养缺陷型酿酒酵母中过表达 *ERG11*;用微量液基稀释法检测转化后的酿酒酵母对氟康唑的敏感性,初步验证其功能。结果显示,简并 PCR 扩增获得预期 708 bp 片段,5' RACE 和 3' RACE 分别获得 385 bp 和 1 336 bp 片段,经纯化、克隆、测序、比对分析,获得两株菌的 *ERG11* CDS;比对其编码的蛋白,与其他念珠菌的 Erg11 蛋白高度同源;分别检测克隆了这两株希木龙念珠菌 *ERG11* CDS 表达载体的酿酒酵母对氟康唑的敏感性,发现过表达 *ERG11* 明显降低其对氟康唑的敏感性。结果提示,简并 PCR 联合 RACE 能准确有效地克隆出希木龙念珠菌 *ERG11* 基因,用 pYES2 酿酒酵母表达系统能初步验证其功能。

关键词:希木龙假丝酵母;简并聚合酶链反应;快速 cDNA 末端扩增法

Cloning and functional identification of 14α -demethylase genes (*ERG11*) from two different *Candida haemulonii* strains with degenerate PCR combined with RACE

ZHANG Hao, WANG Qian, LIU Wei

Department of Dermatology and Venereology, Peking University First Hospital, Research Center for Medical Mycology, Beijing Key Laboratory of Molecular Diagnosis on Dermatoses, Peking University, Beijing 100034, China

Abstract: *ERG11* genes from two different *Candida haemulonii* strains were cloned and their functions were verified for studying the mechanism of antifungal resistance. To obtain *ERG11* gene, degenerate primers were designed according to the conserved sequences in Erg11 protein from the other four types of *Candida* spp. Partial *ERG11* cDNA was amplified by degenerate polymerase chain reaction (PCR). And 5' cDNA and 3' cDNA were amplified by rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. The full-length *ERG11* coding sequences (CDSs) were obtained after aligning and splicing. Furthermore, *ERG11* CDSs were cloned

基金项目:国家自然科学基金(81471925)

通信作者:刘伟

Corresponding author. LIU Wei, E-mail: liuwei@bjmu.edu.cn

into pYES2 and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) which is auxotrophic for uracil. The susceptibility of yeasts to fluconazole was assayed following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3. The results showed that the complete *ERG11* CDSs were obtained and identified through homologous alignment of Erg11 proteins with other *Candida* spp. Moreover, the susceptibility of yeasts to fluconazole was obviously reduced by overexpression of Erg11 proteins in *S. cerevisiae*. It is suggested that *ERG11* genes can be effectively cloned by degenerate PCR combined with RACE and their functions could be preliminarily verified in pYES2 yeast expression system.

Key words: *Candida haemulonii*; Degenerate polymerase chain reaction; Rapid amplification of cDNA ends

近年来,希木龙假丝酵母(*Candida haemulonii*, *C. haemulonii*;假丝酵母又称念珠菌)感染所致真菌性疾病的发病率逐渐增高,特别是新生儿感染^[1-4]。希木龙念珠菌作为机会性致病菌,主要引起免疫低下或受损者发生感染^[5],所致疾病包括甲癣、导管相关真菌血症等^[6-7]。希木龙念珠菌对多种抗菌药物耐药,临幊上治疗其引起的侵入性念珠菌病的效果较差^[7-9],因此研究其耐药机制具有重要临床意义。念珠菌对氟康唑的耐药机制主要包括靶酶14 α -去甲基化酶基因(*ERG11*)突变或过表达、外排泵过表达及细胞应激反应异常。其中,*ERG11*突变或过表达是最常见的原因^[10-11]。研究希木龙念珠菌中氟康唑靶酶的差异,首先要克隆出希木龙念珠菌*ERG11*基因。鉴于希木龙念珠菌基因组序列未知,本研究采用简并聚合酶链反应(degenerate polymerase chain reaction, degenerate PCR)及快速cDNA末端扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE),成功克隆出希木龙念珠菌*ERG11*基因,并在pYES2酿酒酵母表达系统中初步验证其功能^[12-15]。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

两株希木龙念珠菌临床分离株编号为BMU05228(*Candida haemulonii*)和BMU05314(*Candida duobushaemulonii*),分属两个群。

1.2 主要数据库和软件

主要数据库和软件有:美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、BlockMaker软件(http://blocks.fhcrc.org/blocks/make_blocks.html)、共有序列简并杂合寡核苷酸引物(consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers, CODEHOP)软件

(<http://blocks.fhcrc.org/blocks/codehop.html>)。

1.3 试剂

TRIzol购自Thermo Fisher公司,PFU DNA聚合酶、Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶购自NEB公司,cDNA扩增试剂盒购自Thermo Fisher公司,5'RACE和3'RACE试剂盒购自Clontech公司,酵母基因组提取试剂盒购自Bioflux公司,pYES2质粒和酿酒酵母表达系统购自Thermo Fisher公司。

1.4 菌株DNA和RNA提取及cDNA生成

将两株菌分别接种于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)斜面培养基上复苏,30℃培养48 h,转接于酵母膏胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)液体培养基中,30℃,200 r/min,培养24 h,离心收集孢子。一部分菌用酵母基因组提取试剂盒提取基因组DNA,另一部分经液氮研磨后用TRIzol法提取总RNA,然后用cDNA扩增试剂盒反转录获得cDNA。

1.5 简并PCR扩增获得中间段cDNA序列

在NCBI数据库中分别选取*Candida albicans* Erg11 protein(GenBank: ACT21069.2和XP_716761.1)、*Candida parapsilosis* Erg11 protein(GenBank: ACT67904.1)、*Candida tropicalis* Erg11 protein(GenBank: AAX39316.1和AAX39313.1)、*Candida glabrata* Erg11 protein(GenBank: AAX39317.1和ACI24047.1)序列。经BlockMaker和CODEHOP在线软件处理获得分数较高(>75)的引物(表1),进行简并PCR。反应体系:cDNA 3.0 μL、2×PFU mix、上下游引物各1 μL,加水至25 μL。反应条件为:95℃3 min,95℃30 s,50℃30 s,72℃1 min,共30循环,且每一个循环退化温度上升0.3℃;72℃延伸10 min。PCR产物经纯化、克隆、测序、比对分析,获得中间段目的片段。

表 1 本研究中使用的引物

Tab. 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
Degenerate primers	
5'RACE	BMU05228 F: CCCCATGGTGTCTACTGGATHCCNTGG R: CGATCAGCAGGTTGGCGATYTCYTGR GSP1: GCCTCGGCAGAACGTCAGCGAGCTT GSP2: TTCTGCCGAGGCCGCTTACTCGCATT
3'RACE	BMU05314 GSP1: GGGCGTAAGCTGCCTCGGCGAAC GSP2: CGCCGAGGCAGCTTACGCCACTTG
<i>ERG11</i> CDS	BMU05228 F: ATGGGCTATCTCGTTGATCTT R: TTAGTACACGCATGTCTCCCT BMU05314 F: ATGACCTTGAAAGGATCATCTTG R: TTAGTAAACACAAGTCTCTCTTC

1.6 RACE 法获得 *ERG11* cDNA 全长

根据上述获得的目的片段序列,设计 5'RACE 和 3'RACE 所需 GSP1 和 GSP2 引物(表 1)。按 Clontech RACE 试剂盒说明书进行 5'RACE 和 3'RACE,分别获得 *ERG11* cDNA 5'端和 3'端片段。经纯化、克隆和测序,获得片段序列。将上述 3 种方法获得的 3 段序列进行拼接,得 *ERG11* cDNA 全长序列。

1.7 *ERG11* 编码序列(coding sequence, CDS)分析

根据上述获得的 *ERG11* cDNA 全长序列,于头尾设计一对引物(表 1),以希木龙念珠菌基因组为模板,扩增 *ERG11*。经克隆测序分析,获得 *ERG11* CDS。

1.8 pYES2 表达载体的构建

根据 *ERG11* CDS 头尾序列分别设计含有 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点的引物,PCR 扩增,回收纯化 PCR 产物。用 *Kpn* I 和 *Xba* I 限制性内切酶酶切 pYES2 质粒,使 PCR 产物与质粒酶切产物在 T4 连接酶作用下进行连接,获得含有 BMU05228 和 BMU05314 *ERG11* CDS 的质粒,命名为 p28ERG 和 p14ERG。

1.9 质粒转化和菌株筛选

根据 Thermo Fisher 公司 pYES2 酿酒酵母表达系统说明书,用醋酸锂转化法将 p28ERG 和 p14ERG 分别转入尿嘧啶营养缺陷型酿酒酵母(INVSC1)中,涂布于 SC-U 培养基。待菌落长出后进行鉴定。挑取菌落,用 T7 引物进行 PCR,测序鉴

定 PCR 产物。

1.10 氟康唑敏感性测定

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M27-A3 方案,测定转化后的 INVSC1 对氟康唑的敏感性。

2 结果

2.1 简并 PCR 结果

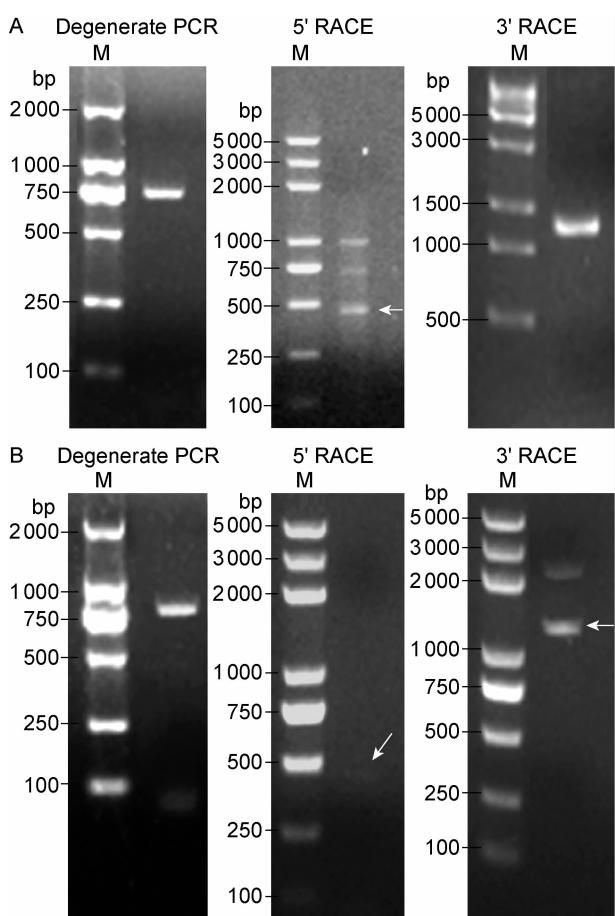
PCR 产物于预期 708 bp 处出现目的条带,经切胶纯化、克隆、测序、分析,并与其它酵母的 *ERG11* 序列进行比对,确证该片段为希木龙念珠菌 *ERG11* cDNA 片段。

2.2 5'RACE 和 3'RACE 结果

BMU05228 和 BMU05314 *ERG11* cDNA 经 5'RACE 和 3'RACE 分别获得 385 bp 和 1 336 bp 产物,经切胶纯化、克隆、测序、比对分析,确证这两段序列分别为 *ERG11* cDNA 5'端和 3'端序列(图 1)。

2.3 *ERG11* CDS 分析

以两株菌 *ERG11* cDNA 为模,分别获得 3 段序列(5'端、3'端和中间段),将这 3 段序列进行比对拼接,获得两株菌的 *ERG11* cDNA 全长序列。用 cDNA 头尾引物,以两株菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增,获得 *ERG11* 基因。测序、比对分析后得知序列中无内含子,所得序列即为 *ERG11* CDS。BMU05228 *ERG11* CDS 全长 1 566 bp,编码 521 个氨基酸。而 BMU05314 *ERG11* CDS 全长 1 575 bp,编码 525 个氨基酸。将其蛋白序列与其他念珠



A: BMU05228. B: BMU05314. M, DNA marker.

图1 简并PCR、5'RACE 和 3'RACE PCR 产物电泳图

Fig. 1 The electrophoretogram of the products from degenerate PCR, 5'RACE and 3'RACE PCR

菌的Erg11蛋白序列进行比对,发现序列之间具有很高的同源性,证实所得序列为希木龙念珠菌*ERG11*基因序列。

2.4 p28ERG 和 p14ERG 转化后的 INVSC1 鉴定

挑取 SC-U 平板上的菌落,用 T7 引物进行菌落 PCR,于 1 700 bp 处出现阳性条带菌落,为转化成功的菌落。将 PCR 产物进行测序、比对分析,提示为 *ERG11*。

2.5 氟康唑敏感性检测

采用 CSLI M27-A3 方案,检测转化 p28ERG 和 p14ERG 质粒后的 INVSC1 对氟康唑的敏感性。结果显示(表 2),转化 p28ERG 和 p14ERG 质粒后,INVSC1 对氟康唑的敏感性明显降低。这一方面表明表达载体能在酿酒酵母中使插入的 *ERG11* 基因过度表达,并导致其对氟康唑的敏感性明显下降;另一方面初步验证了 RACE 法获得的希木龙念珠菌 *ERG11* 基因的功能,即作为氟康唑的靶酶。

表 2 酿酒酵母转化 pYES2-ERG11 表达载体后对氟康唑的耐药性

Tab. 2 The susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* to fluconazole after transforming with pYES2-ERG11

	MIC ₅₀ of fluconazole (μg/mL)
INVSC1	2
pYES2 vector	4
p28ERG11	32
p14ERG11	64

3 讨论

研究希木龙念珠菌对氟康唑的耐药机制,首先要关注氟康唑的靶酶 Erg11 蛋白的突变或过表达,但其基因组序列未知,因此克隆其基因序列并验证其功能是急需解决的问题。针对这一问题,最常用的方法是简并 PCR 联合 RACE 法^[13-15]。

简并 PCR 是根据其他已知同源基因序列扩增未知基因片段。本研究利用其他念珠菌 Erg11 蛋白的保守序列设计简并引物,包括白念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌和近平滑念珠菌,然后以 cDNA 为模板进行简并 PCR,最后成功获得两株希木龙念珠菌 *ERG11* cDNA 的中间片段。在进行简并 PCR 过程中,为有效扩增出目的片段并减少非特异性扩增,退火温度的设置尤其重要。本研究中,简并 PCR 的退火温度以低于引物较低 Tm 值 5 ℃ 开始,每一个循环退火温度上升 0.3 ℃,进行 30 个循环。以此条件进行简并 PCR 能有效获得目的条带,并减少非特异性扩增。

目前,5'RACE 和 3'RACE 法很成熟,有多种试剂盒选择。本研究中的 Clontech RACE 试剂盒使用方法简单,效率较高,但获得的 5' 端序列从翻译起始密码子 ATG 开始,因此不能确定 *ERG11* mRNA 的 5' 端是否含有 5' 非翻译区 (5'-untranslated region, 5'UTR),3'RACE 也不能确定是否含有 3'UTR。

念珠菌 Erg11 蛋白作为氟康唑的靶酶,其突变和过表达均能导致念珠菌对氟康唑的敏感性减低,可用于初步鉴定克隆出的基因是否为 *ERG11*。本研究将 *ERG11* 克隆到 pYES2 载体中,并转化进尿嘧啶营养缺陷型酿酒酵母中,使其在酿酒酵母中过表达,药敏结果显示转化后的酿酒酵母对氟康唑的敏感性明显降低。这一方法能较快速准确地对克隆

出的基因功能进行初步验证。为进一步验证克隆出的*ERG11*功能,可在对氟康唑敏感的希木龙念珠菌中过表达*ERG11*,或在对氟康唑耐药的希木龙念珠菌中敲除*ERG11*后检测其对药物的敏感性。常见的希木龙念珠菌为多重耐药菌,其耐药机制可能不仅仅与*ERG11*基因相关,后续研究可进行全基因组测序和转录组测序,从中寻找耐药机制。

参考文献

- [1] Ramos LS, Figueiredo-Carvalho MH, Barbedo LS, Ziccardi M, Chaves AL, Zancopé-Oliveira RM, Pinto MR, Sgarbi DB, Dornelas-Ribeiro M, Branquinha MH, Santos AL. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70 (1): 111-115.
- [2] Hou X, Xiao M, Chen SC, Wang H, Cheng JW, Chen XX, Xu ZP, Fan X, Kong F, Xu YC. Identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida haemulonii* species complex clinical isolates from a multicenter study in China [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54 (11): 2676-2680. doi:10.1128/JCM.01492-16.
- [3] de Almeida JN Jr, Assy JG, Levin AS, Del Negro GM, Giudice MC, Tringoni MP, Thomaz DY, Motta AL, Abdala E, Pierroti LC, Strabelli T, Munhoz AL, Rossi F, Benard G. *Candida haemulonii* complex species, Brazil, January 2010-March 2015 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22 (3): 561-563.
- [4] Jie Q, Lin S, Zhang H, Hu Y, Huang X, Chen S, Chen S, Lin Z. Clinical analysis of 8 cases of neonatal septicemia caused by *Candida haemulonii* in neonatal intensive care unit [J]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2016, 54(3): 197-200.
- [5] Kumar A, Prakash A, Singh A, Kumar H, Hagen F, Meis JF, Chowdhary A. *Candida haemulonii* species complex: an emerging species in India and its genetic diversity assessed with multilocus sequence and amplified fragment-length polymorphism analyses [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5: e49.
- [6] Merseguel KB, Nishikaku AS, Rodrigues AM, Padovan AC, e Ferreira RC, de Azevedo Melo AS, Briones MR, Colombo AL. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 57.
- [7] Cendejas-Bueno E, Kolecka A, Alastrauey-Izquierdo A, Theelen B, Groenewald M, Kostrzewa M, Cuénca-Estrella M, Gómez-López A, Boekhout T. Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (C. *haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (C. *haemulonii* group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(11): 3641-3651.
- [8] Kim MN, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, Ryoo N, Lee JS, Jung SI, Park KH, Kee SJ, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features [J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(6): e57-e61.
- [9] Ruan SY, Kuo YW, Huang CT, Hsue HC, Hsueh PR. Infections due to *Candida haemulonii*: species identification, antifungal susceptibility and outcomes [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35(1): 85-88.
- [10] Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(2): 213-267.
- [11] Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlman DS. Mechanisms of antifungal drug resistance [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 5(7): a019752.
- [12] Hoot SJ, Brown RP, Oliver BG, White TC. The UPC2 promoter in *Candida albicans* contains two cis-acting elements that bind directly to Upc2p, resulting in transcriptional autoregulation [J]. *Eukaryot Cell*, 2010, 9 (9): 1354-1362.
- [13] 王晓慧, 刘伟, 李若瑜. 简并PCR结合RACE技术克隆申孢子丝菌未知过氧化氢酶基因 [J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(5): 271-275.
- [14] 曹存巍, 刘伟, 李若瑜. 简并PCR结合RACE技术克隆马尔尼菲青霉未知基因 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2007, 21 (11): 660-662.
- [15] Okeke CN, Tsuboi R, Kawai M, Yamazaki M, Reangchainam S, Ogawa H. Reverse transcription-3' rapid amplification of cDNA ends-nested PCR of ACT1 and SAP2 mRNA as a means of detecting viable *Candida albicans* in an in vitro cutaneous candidiasis model [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 114(1): 95-100.

(收稿日期:2016-11-10)