

白色念珠菌 *CaECM25* 基因对细胞形态发生、细胞增殖及致病性的影响

张婷婷^①, 李万杰^①, 李迪^①, 王跃^{②*}, 桑建利^{①*}

① 北京师范大学细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875

② *Candida albicans* Molecular and Cell Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Proteos, 61 Biopolis Drive, Singapore 138673

* 联系人, E-mail: jlsang@bnu.edu.cn; mcbwangy@imcb.a-star.edu.sg

收稿日期: 2007-11-18; 接受日期: 2007-12-26

国家自然科学基金海外青年学者合作研究基金(批准号: 30228001)和国家重大科学研究计划(批准号: 2007CB914401)资助项目

摘要 白色念珠菌(*Candida albicans*)作为一种重要的机会性病原真菌,其致病性与细胞形态、细胞壁构成以及细胞生长速率都有着密切的关系.通过同源比对,在白色念珠菌中克隆了 *CaECM25* 基因,并构建了 *Caecm25Δ/Δ*缺失突变体,对其是否影响细胞形态发生、细胞壁代谢以及致病性等进行了分析.结果显示,该基因的缺失会导致母细胞和子细胞分离异常,细胞生长速率明显变慢,真菌丝和假菌丝的伸长受阻,细胞黏附能力有所降低.动物实验模型表明, *CaECM25* 基因的缺失会导致白色念珠菌毒力的下降.由此推测,白色念珠菌 *CaEcm25p* 为细胞壁合成与代谢以及细胞形态发生所需,并与其致病性相关.

关键词

白色念珠菌
(*Candida albicans*)
CaECM25
基因敲除
形态发生
致病性

白色念珠菌(*Candida albicans*)是一种重要的机会性病原真菌,经常在人类宿主免疫力低下时大量繁殖,对宿主器官造成严重损害及一系列的表皮感染^[1].由于白色念珠菌为真核生物,其生化代谢途径与人类宿主有很高的相似性,很多抗真菌药物都会有副作用或者只能抑制而不能真正杀死病原生物.因此,深入研究白色念珠菌的生化过程及形态构成的分子机制,寻找其特异的靶基因或蛋白就成为对其药物研究开发的热点^[2,3].白色念珠菌的一个非常明显的特性就是可以根据不同的生活环境在几种形态之间转变:单细胞酵母形态,真菌丝形态以及介于两者之间的假菌丝形态^[4,5],其致病性与这 3 种形态之间的变化密切相关,无法形成菌丝或者菌丝生成效率不高的突变株几乎不具有致病性^[6,7].很多环境

因子都能诱导白色念珠菌菌丝和假菌丝的生长,如血清、中性 pH(6.5~7)、适当的高温(大于 35℃)和一些合成培养基(lee's, Spider培养基)等^[8].DNA复制抑制剂HU(羟基脲)和微管毒素Nocodazole等细胞毒素也都可以通过破坏细胞周期进程而促使“酵母-菌丝”之间的转变^[9,10].除了菌丝生长,细胞壁的成分与结构对于白色念珠菌的致病性也起着关键作用^[11].宿主最先接触到的就是白色念珠菌的细胞壁,真菌细胞壁作为细胞和外界环境的中介,是具有多种生物学功能的细胞结构,对于细胞的黏附性、克隆的形成以及免疫修饰都至关重要,在真菌的生理和病理过程中均有着重要的意义^[12,13].因此,深入研究菌丝形态发生的分子机制以及细胞壁代谢的调控将有助于对这种病原真菌的致病机理的深入了解,为筛选

特异有效的抗真菌药物提供理论依据.

在酿酒酵母菌(*S. cerevisiae*)研究中, 筛选出了与细胞表面代谢有关的基因*ScECM25*, 其编码产物虽然不是细胞壁蛋白, 但是可能参与细胞壁的代谢^[14]. 据此推测, 在白色念珠菌中, *ScECM25* 的同源基因很可能也参与细胞壁的合成与代谢, 从而与其致病性相关, 但是目前为止还没有这方面的研究报道. 因此, 本研究通过同源比对的方法在白色念珠菌中克隆了酿酒酵母菌中*ScECM25* 的同源基因, 命名为*CaECM25*, 通过基因敲除的方法构建了白色念珠菌*CaECM25* 缺失突变体, 并对其是否影响细胞形态发生、细胞壁代谢以及致病性等进行了分析, 这也是该基因在白色念珠菌中功能的首次报道.

1 材料与方法

1.1 菌系、培养基和生长条件

本研究采用的所有菌系及来源列于表 1. 白色念珠菌常用的培养基是 YPD(2% 酵母提取物, 1% 胰蛋白胨, 2% 葡萄糖)和 GMM(0.67% YNB, 2% 葡萄糖). 诱导菌丝的培养基为添加 20% 血清的 YPD 培养基、Spider(1% 培养基, 1% 甘露醇, 0.2% K_2HPO_4)、RPMI1640 培养基(1.04% RPMI1640 粉末, 0.1% HEPES)(37°C), 相对应的固体培养基即在上述液体培养基中加入 1.5% 的琼脂. 假菌丝诱导所用的固体培养基为 SLAD 平板(0.05 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 30°C).

1.2 缺失突变体及回补菌株的构建

首先用 PCR 的方法分别从靶基因 ORF 两端 UTR 克隆出 300~500 bp 的片段, 命名为 AB 和 CD, 同时在 B 和 C 端加上 *Bam*H I 位点, 另外还有~10 bp 的重叠序列. 利用融合 PCR 获得 AB-*Bam*H I-CD 片段, 直接连入 PGEM-T EASY Vector(Promega), 从野生型白

色念珠菌 SC5314 基因组中扩增出 *ARG4*(1.9 kb)和 *HIS1*(1.6 kb)完整基因组序列(ORF)以及启动子和 3'UTR, 并在两端加上 *Bam*H I 位点, 分别连入 AB 和 CD 之间, 即为靶基因的敲除质粒. 用 *Not*I 单酶切敲除质粒得到 AB-*ARG4*-CD 的片段, 转入 BWP17, 使用 GMM+His+Uridine 作为筛选培养基, 得到的克隆通过 PCR 鉴定, 即为一个敲除菌株(1st KO). 其中用于 PCR 鉴定的引物包括一个位于敲除片段外侧的基因组上的序列, 即 A 的上游或者 D 的下游, 另一个引物则位于分子标记内. 挑取一个 1st KO 阳性克隆, 再转入 AB-*HIS1*-CD, 使用 GMM+Uridine 作为筛选培养基, 筛出的克隆提取基因组, PCR 鉴定正确后即为靶基因的缺失空突变体. 为了避免 *URA3* 缺失给突变体带来的影响, 利用 CIP10 载体上 *RP10* 中的 *Stu* I 将其线性化, 转入敲除菌株中, 从而将 CIP10 上的 *URA3* 转入敲除菌株, 得到只缺失 *CaECM25* 的敲除菌株.

为了验证靶基因的空突变体的所有表型都是由该基因缺失造成的, 而不是受到载体等影响, 从野生型菌株 SC5314 上扩增出完整的靶基因可读框以及启动子序列(1 kb), 插入到 CIP10 的 *Kpn* I 和 *Cla* I 两个位点之间, 利用 *RP10* 中的 *Stu* I 将其线性化, 转入空突变体中, 得到的阳性克隆即为回补菌株. 所采用的引物列于表 2.

1.3 细胞生长速率检测

克隆形成率(CFU)实验: 细胞 30°C 培养过夜, 倍比稀释至 1×10^6 , 2×10^5 , 4×10^4 , 8×10^3 , 1.6×10^3 细胞/mL. 各取 5 μ L 菌液滴至 YPD 固体培养基上, 30°C 培养 2 天, 拍照.

细胞生长曲线: 细胞 30°C 培养过夜, 稀释至 5×10^5 细胞/mL, 30°C 继续培养, 每 10 min 用血球计数板进行细胞计数, 持续 2 h. 绘出生长曲线.

表 1 白色念珠菌品系

品系	基因型	来源
SC5314	野生型	[15]
BWP17	<i>Ura3Δura3Δhis1Δhis1Δarg4Δarg4Δ</i>	[15]
TD1	<i>Caecm25::HIS1/Caecm25::ARG4</i>	本研究
TD2	<i>Caecm25Δ::ARG4/Caecm25Δ::HIS1, CaURA3</i>	本研究
TD3	<i>Caecm25Δ::ARG4/Caecm25Δ::HIS1, CaECM25, CaURA3</i>	本研究

表 2 引物序列

敲除质粒构建所用引物:

ECM25A Bf: 5'-TTTTTAAGTTTGCTGTGGCAGGTTTT-3'

ECM25A Br: 5'-ATGGATCCTGAGCAATGGTTGAAATGAC-3'

ECM25C Df: 5'-CATACATTACAGGATCCCATAGATAAATCACCATTA-3'

ECM25C Dr: 5'-GTCGTTTTGGTTTCCATAATCCTTCAAGAATTTC-3'

PCR 鉴定引物:

ECM25AA: 5'-TCATTAGTTGATCTAGAACTTAGTAGGTGCT-3'

Arg-Fw: 5'-GCTAGTGTGGAAAGAAGAGATGCTC-3'

Arg-Re: 5'-GCTAGTGTGGAAAGAAGAGATGCTC-3'

His-Fw: 5'-AGAAAAGCTGGTGAACCGATATAT-3'

His-Re: 5'-CACTGTATCCTCTTCTTGTCCCA-3'

ECM25-orf-f: 5'-CAGCGGCGGTACAAACAGCGGCACC-3'

ECM25-orf-r: 5'-AGTCATGCCTCGTAAAATTTCAATA-3'

回补质粒所用引物:

ECM25-rescue-f: 5'-ATGGTACCTGATCTAGAACTTAGTAGGTGCT-3'

ECM25-rescue-r: 5'-ACATCGAICTAAGTCATGCCTCGTAAAATTTCAATA-3'

1.4 药物(HU, Nocodazole)敏感性实验

细胞在YPD培养基中培养过夜后, 稀释至 1×10^6 细胞/mL, 在 30°C 培养 2 h 后, 在培养基中加入 HU (Sigma)(终浓度 50 mmol/L 或 Nocodazole(Sigma)(终浓度 50 μ mol/L), 30°C 培养. 在不同的时间点对细胞形态进行观察(Olympus 共聚焦显微镜), 并对伸长细胞进行计数.

1.5 几丁质及细胞核染色

几丁质染色: 添加 37% 甲醛至细胞悬液中, 甲醛终浓度达到 3.7%, 室温固定 30 min, 加入荧光增白剂 (Sigma) 进行染色, PBS 清洗, 荧光显微镜下(Olympus 共聚焦显微镜)观察, 紫外激发. 细胞核染色: 用同样的方法以 3.7% 的甲醛固定, 加入 DAPI(Sigma) 进行染色, PBS 清洗, 荧光显微镜下(Olympus 共聚焦显微镜)观察, 紫外激发.

1.6 细胞黏附能力检测

细胞培养过夜, 接种到 RPMI1640 液体培养基中使细胞浓度达到 3×10^3 细胞/mL, 将细胞悬液加入到聚乙烯孔板中, 37°C 孵育 3 h, 倒去培养基, 清洗, 加入沙氏葡萄糖琼脂(Sigma), 37°C 孵育 24 h. 对孔板上的克隆数进行计数.

1.7 动物致病性实验

普通 ICR 雄性小鼠随机分组, 每组 10 只(18~20 g). 收集 30°C GMM 中培养过夜的细胞, 清洗, 用 0.9% 生理盐水重悬得到 5×10^7 细胞/mL 的细胞悬液. 小鼠尾静脉注射(每只 100 μ L 菌液). 注射过的小鼠在 P3 实验室饲养, 观察其在 20 天内的健康状况及存活率. 为进行组织学观察, 接种菌液样品 5 天后的小鼠取右肾, 10% 福尔马林固定, 经脱水, 包埋, 切片, 六胺银染色, 光学显微镜下(Olympus 共聚焦显微镜)观察.

2 结果与分析

2.1 白色念珠菌中 *CaECM25* 基因的鉴定

通过同源比对在白色念珠菌基因组数据库 (<http://www.candidagenome.org>) 中获得了酿酒酵母菌 *ScECM25* 的同源物 orf19.4958, 命名为 *CaECM25*. *CaECM25* 编码蛋白质全长 622 个氨基酸, 比酿酒酵母中的 *ScEcm25* 略长. 通过 DNAMAN 软件对 *ScECM25* 和 *CaECM25* 的 DNA 序列及其编码蛋白的氨基酸序列进行比对发现, 前者 190~360aa 和后者 196~367aa 的一致性较高, 达到 35%, 相对应的 DNA 序列的一致性达到 51%. 并且, 通过 SMART 软件分析, *ScEcm25* 和 *CaEcm25* 的这一区域都含有明显的

RhoGAP. 所以它们可能是类 Rho/Rac/Cdc42 小 GTP 酶的活化蛋白(GAP), Rho 型 GTP 酶在细胞中担当重要的角色, 而 Rho1 可能参与细胞壁整合. 另外, CaEcm25 比 ScEcm25 缺少一个 Coiled Coil (ScEcm25: 533~563aa), 该结构域主要介导蛋白质间的互作(图 1). 酿酒酵母菌中, ScEcm25 虽然不是细胞壁蛋白, 但是它最初是在筛选和细胞表面相关的基因中获得并命名的, 因此认为其编码产物可能参与细胞壁的代谢^[14]. CaEcm25 和 ScEcm25 在序列上的一致性及相似的蛋白结构域排列表明, CaEcm25 很有可能就是 ScEcm25 在白色念珠菌中的同源基因, 二者在功能上可能有很大的相似性. 因此, CaEcm25 很可能也参与了白色念珠菌细胞壁代谢.

2.2 Caecm25Δ/Δ 缺失突变体及回补菌株的构建

为了研究 CaEcm25 在白色念珠菌中的功能, 本实验通过反向遗传学的方法, 即将 CaEcm25 两个拷贝完全从基因组中敲除, 构建了 Caecm25Δ/Δ 缺失突变体. 具体方法是利用同源重组的原理将筛选标记 AGR4 和 HIS1 转入 BWP17 菌株的基因组内中, 从而分别替代两条染色体上 CaEcm25 的 ORF. PCR 检测

后得到的菌株是 Ura 缺失(TD1), 为了避免由于 Ura3 缺失对实验结果带来的影响, 将 CIP10 质粒上的 URA3 通过 RP10 位点上的整合转入缺失突变体中, 得到只缺失 CaEcm25 的菌株(TD2), 以下所有实验中涉及到的 Caecm25Δ/Δ 突变株均指 TD2. 同时将 CaEcm25 的全长 ORF 及其启动子转入到缺失菌株中, 获得的菌株(TD3)在下列实验中被证明和野生型的表型没有差别, 由此说明在 Caecm25Δ/Δ 缺失突变体中观察到的所有表型的确都是由于 CaEcm25 缺失引起的, 而不是由于其他因素造成的(图 2).

2.3 CaEcm25 基因缺失对白色念珠菌形态发生及生长速率的影响

Caecm25Δ/Δ 缺失突变体可存活, 并且在完全培养基和极限培养基中都没有观察到明显的生长缺陷. YPD 平板上的 CFU(克隆形成率)实验结果(图 3(a))表明 Caecm25Δ/Δ 缺失突变体的生长速率慢于野生型和回补菌株. 生长曲线实验结果(图 3(b))显示 Caecm25Δ/Δ 缺失突变体细胞的倍增时间明显长于野生型和回补菌株. 进一步证明 CaEcm25 基因缺失会导致细胞生长速率变慢.

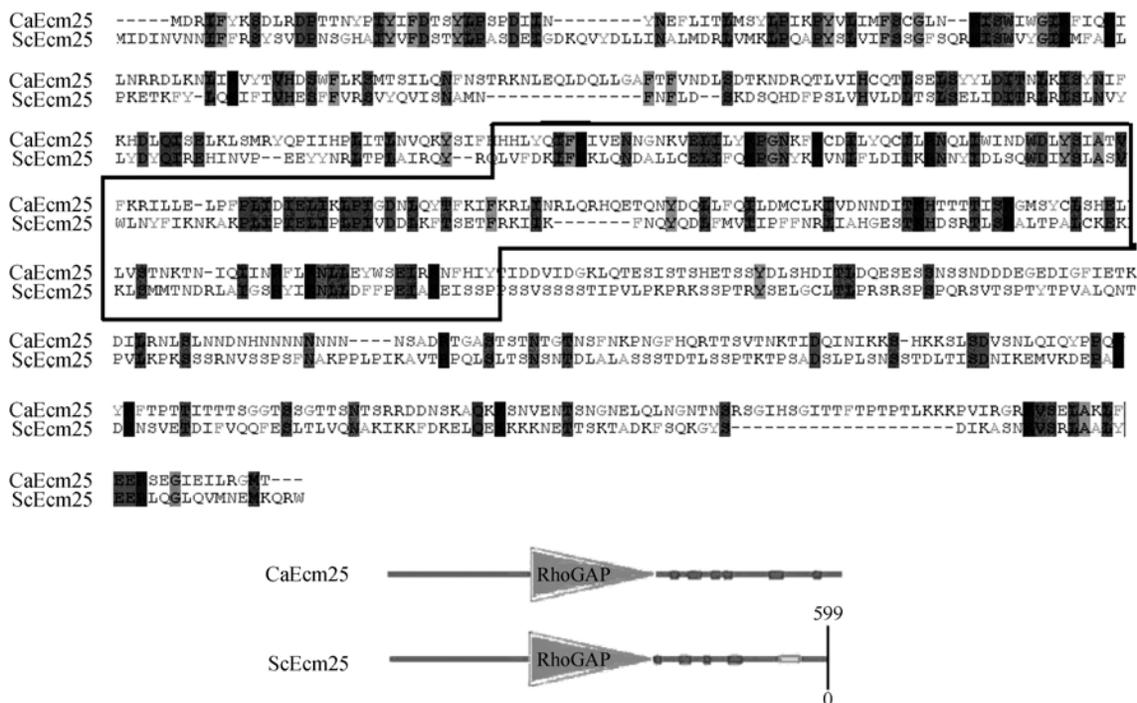


图 1 CaEcm25 和 ScEcm25 蛋白结构域的比对

SMART 软件分析表明二者均包括一个明显的 RhoGAP 结构域(黑框示 RhoGAP 的氨基酸序列比对)

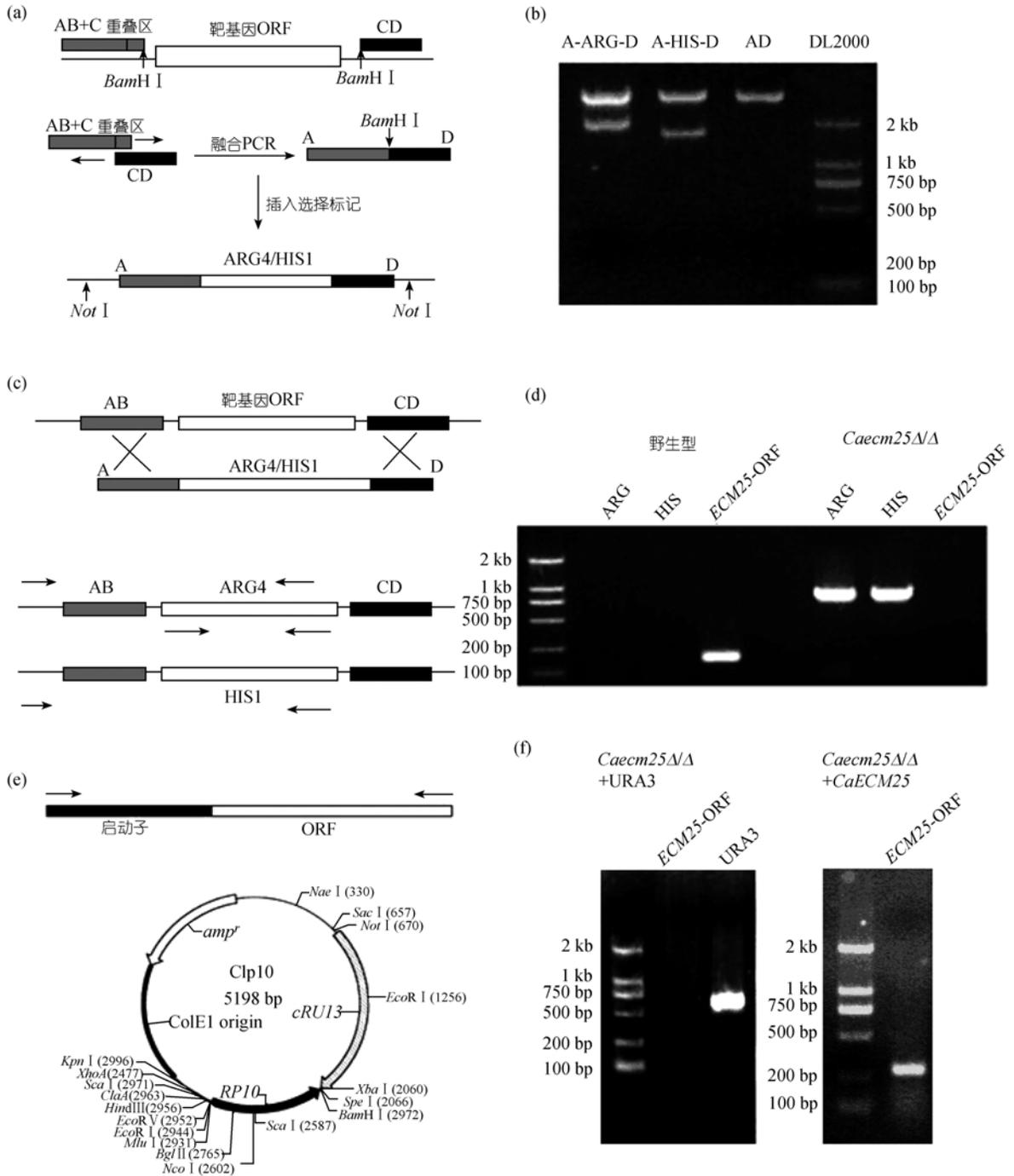


图 2 *CaECM25* 敲除菌株及回补菌株的构建

(a) 用PCR的方法分别从靶基因ORF两端UTR克隆出AB和CD两个片段, 同时在B和C端加上*BamH* I位点, 另外还有~10 bp的重叠序列. 利用融合PCR获得AB-*BamH* I-CD片段, 再将野生型白色念珠菌SC5314基因组中扩增出的*ARG4*(1.9 kb)和*HIS1*(1.6 kb)完整基因组序列(ORF)以及启动子和3'UTR分别连入AB和CD之间, 即为靶基因的敲除质粒; 右图为敲除质粒的酶切鉴定图. (b) 利用LiAc转化法分别将AB-*ARG4*-CD和AB-*HIS1*-CD转入BWP17(*ARG4*⁻*HIS1*⁻*URA3*⁻)菌株中. 用相应的营养缺失培养基筛选克隆, 并用PCR的方法鉴定得到敲除阳性克隆; 右图为敲除菌株的PCR鉴定图. (c) 将CIP10质粒上的*URA3*通过*RP10*位点上的整合转入缺失突变体中, 得到只缺失*CaECM25*的菌株. 右图左侧为该菌株的PCR鉴定图; 同时, 将*CaECM25*的ORF和启动子克隆到CIP10载体中, 并通过整合转入*Caecm25Δ/Δ*缺失突变体中. 右图右侧为*Caecm25Δ/Δ*+*CaECM25*回补菌株的PCR鉴定图

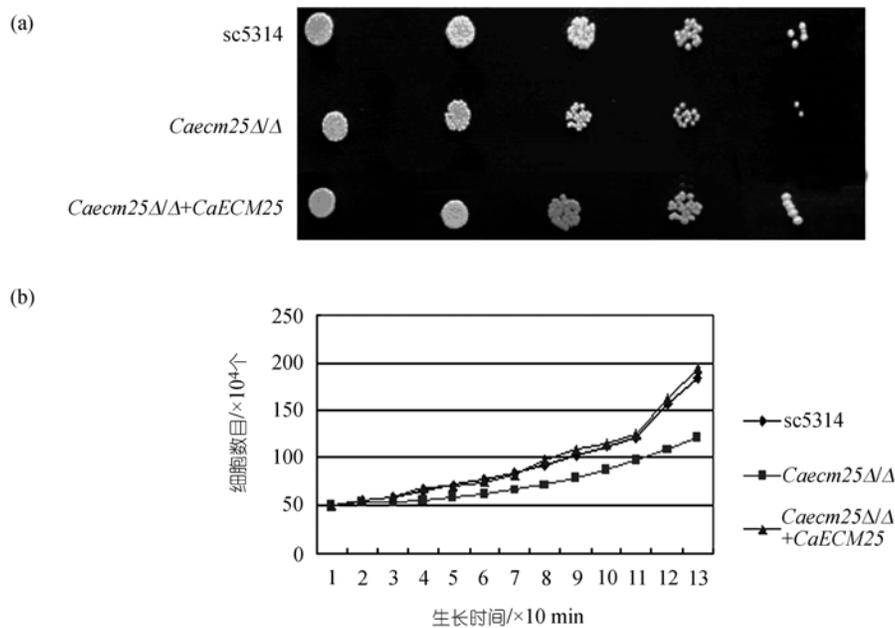


图3 野生型、*Caecm25*Δ/Δ缺失突变体及回补菌株细胞生长速率比较

(a) 细胞 30℃ 培养过夜, 倍比稀释至 1×10^6 , 2×10^5 , 4×10^4 , 8×10^3 , 1.6×10^2 细胞/mL. 各取 5 μL 菌液滴至 YPD 固体培养基上, 30℃ 培养 2 天, 拍照. (b) 细胞 30℃ 培养过夜, 稀释至 5×10^5 细胞/mL, 30℃ 培养, 每 10 min 用血球计数板进行细胞计数, 持续 2 h, 作出生长曲线, 根据生长曲线判断细胞倍增时间

同时, 我们在显微镜下观察了 *Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体在 GMM 液体培养基中的细胞形态. 如我们所预期, *Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体表现出细胞的少量聚集, 母细胞和子细胞不能够正常分离, 但是这种聚集现象并不是很稳定, 若给予一定的机械力或用甲醛固定后, 只能观察到 3~4 个细胞成团(图 4(a)). 为了进一步验证这种细胞成团现象是由于胞质分裂异常, 还是由于有丝分裂完成后细胞壁无法正常分开造成的, 我们用荧光增白剂(Calcofluor White)对细胞壁(几丁质环)进行了染色, 染色结果发现细胞之间有明显的间隔, 说明胞质分裂正常(图 4(b)). 因此, 我们推论, *Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体中观察到的细胞聚集是由于母细胞和子细胞之间的细胞壁无法正常分开造成的. 这与我们之前的推测相一致, 说明 *CaECM25* 基因的确在细胞壁代谢中扮演一定角色.

2.4 *CaECM25* 基因缺失对白色念珠菌丝状生长及细胞黏附能力的影响

通常诱导白色念珠菌真菌丝生长的条件包括加有 20% 血清的 YPD 培养基、Spider 培养基、RPMI1640

培养基等^[8]. 为了检测 *CaECM25* 基因缺失是否会影响真菌丝的生长, 我们观察了野生型、*Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体以及回补菌株在这 3 种液体培养基中的菌丝生长能力, 结果表明, 在诱导 1 h 后, 野生型和回补菌株细胞 100% 都长出菌丝, 而 *Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体大约只有 50% 长出菌丝, 并且生成的菌丝长度明显短于野生型和回补菌株生成的菌丝. 3 h 后, *Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体大约有 80%~90% 生成菌丝, 菌丝长度仍旧明显短于野生型和回补菌株(图 5(a)). 加有 20% 血清的 YPD 固体培养基中的结果和液体培养基中的结果相一致, *Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体的菌丝生成能力明显低于野生型和回补菌株(图 5(b)). SLAD(低氮培养基)可诱导假菌丝的生长, 比较野生型、*Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体以及回补菌株在 SLAD 板上假菌丝的生长情况, 野生型和回补菌株在 SLAD 板上形成的克隆周围可观察到明显的丝状伸长, 而 *Caecm25*Δ/Δ 缺失突变体在 SLAD 板上形成的克隆边缘相对光滑, 未见明显的丝状生长(图 5(c)).

因为菌丝的伸长可增加细胞的黏附能力, 而细胞的黏附能力又和致病性密切相关. 因此我们检

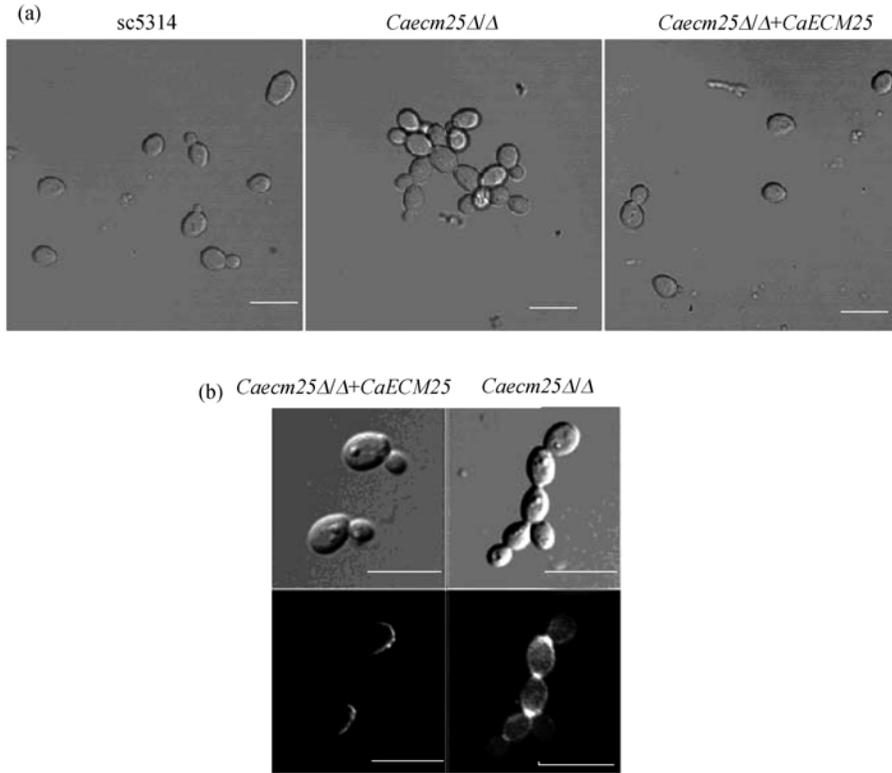


图 4 野生型、*Caecm25Δ/Δ*缺失突变体及回补菌株的细胞形态观察

(a) 细胞在液体 GMM 培养基中 30℃ 培养过夜, DIC 显微镜下观察. (b) 荧光增白剂对几丁质进行染色: 细胞用 3.7% 甲醛固定 30 min, 荧光增白剂染色, 紫外激发观察. 标尺为 10 μm

测了野生型、*Caecm25Δ/Δ*缺失突变体及回补菌株对聚苯乙烯孔板的黏附能力. 结果表明 *Caecm25Δ/Δ*缺失突变体的黏附力比野生型和回补菌株有一定程度的下降(图 5(d)), 这一结果和我们之前对突变体菌丝生长的观察结果相一致.

2.5 *CaECM25* 基因缺失对细胞毒剂 HU 及 Nocodazole 所引发的细胞丝状生长的影响

以前的报道已经证明 DNA 抑制毒剂 HU 和微管毒素 Nocodazole 都可以引起白色念珠菌细胞的丝状生长^[9,10,16]. 为了检测 *CaECM25* 基因是否影响这种由细胞毒素所引起的细胞丝状生长, 我们分别用 50 mmol/L HU 和 50 μmol/L Nocodazole 对野生型、*Caecm25Δ/Δ*缺失突变体以及回补菌株进行处理, 在不同的时间点对细胞形态进行观察并对伸长细胞进行计数. 显微镜观察结果表明, 野生型和回补菌株细胞在 50 mmol/L HU 和 50 μmol/L Nocodazole 的处理下

均出现明显的伸长, 而 *Caecm25Δ/Δ*缺失突变体在 HU 处理下, 并没有出现如酿酒酵母中 *ScECM25* 基因缺失所出现的丝状伸长现象消失^[17], 只是伸长细胞数目略有降低. 在 Nocodazole 的处理下, 突变体菌株与野生型细胞及回补菌株的细胞伸长情况差异十分显著. 处理 8 h 后, 只有 <5% 的突变体细胞表现出丝状伸长, 并且生成的丝状体的长度明显短于野生型和回补菌株. 大部分的细胞仍旧呈现酵母菌状态, 部分出现了芽体变大及多芽的现象. 但是细胞核染色结果显示大部分细胞的细胞核并没有正常的分离, 说明细胞周期仍旧被药物阻断(图 6).

2.6 *CaECM25* 基因缺失对白色念珠菌致病性的影响

白色念珠菌作为一种常见的致病菌, 其致病性与菌丝形态、细胞壁代谢及细胞生长速率都密切相关^[11,18,19]. 因此, 我们检测了野生型、*Caecm25Δ/Δ*缺

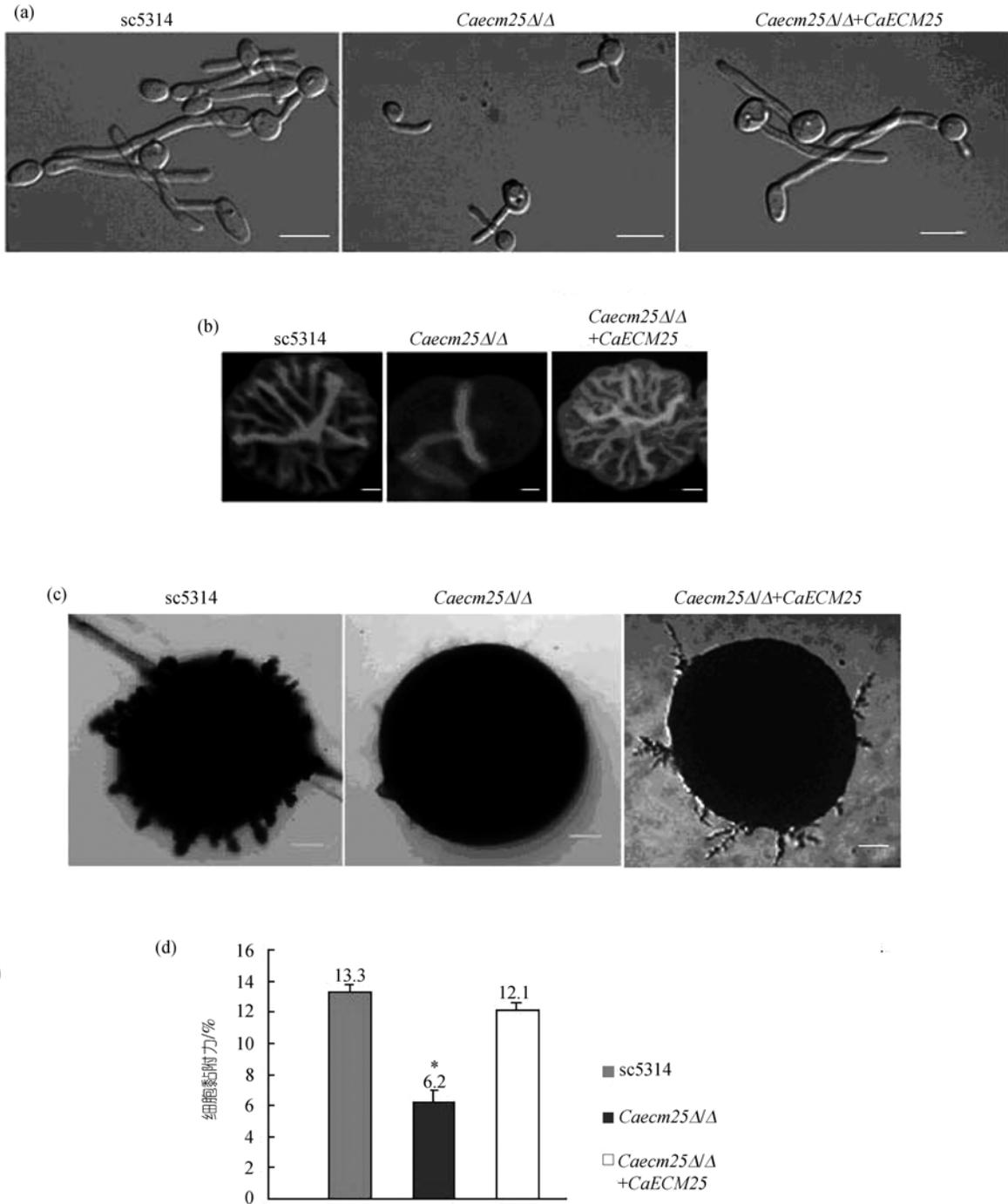


图 5 野生型、*Caecm25Δ/Δ*缺失突变体以及回补菌株在特定生长环境下的菌丝(假菌丝)生长情况以及黏附能力检测

(a) 将一定浓度的细胞接种到添加 20% 血清的 YPD 液体培养基中, 37°C 培养 2 h, DIC 显微镜观察细胞形态。(b) 固体培养基 (YPD+20% 血清) 上接种相同浓度的细胞, 37°C 培养 2 天, 观察单克隆的形态并拍照。(c) *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变体在低氮培养基 (SLAD) 上的丝状伸长受阻, 生成的克隆形态在光学显微镜下进行观察。(d) 细胞培养过夜, 接种到 RPMI1640 液体培养基中使细胞浓度达到 3×10^3 细胞/mL, 将细胞悬液加入到聚乙烯孔板中, 37°C 孵育 3 h, 倒去培养基, 清洗, 加入沙氏葡萄糖琼脂, 37°C 孵育 24 h。对孔板上的克隆数进行记数, 结果用柱状图表示, * 示差异显著 ($P < 0.05$, *t* 检验)。标尺为 10 μ m

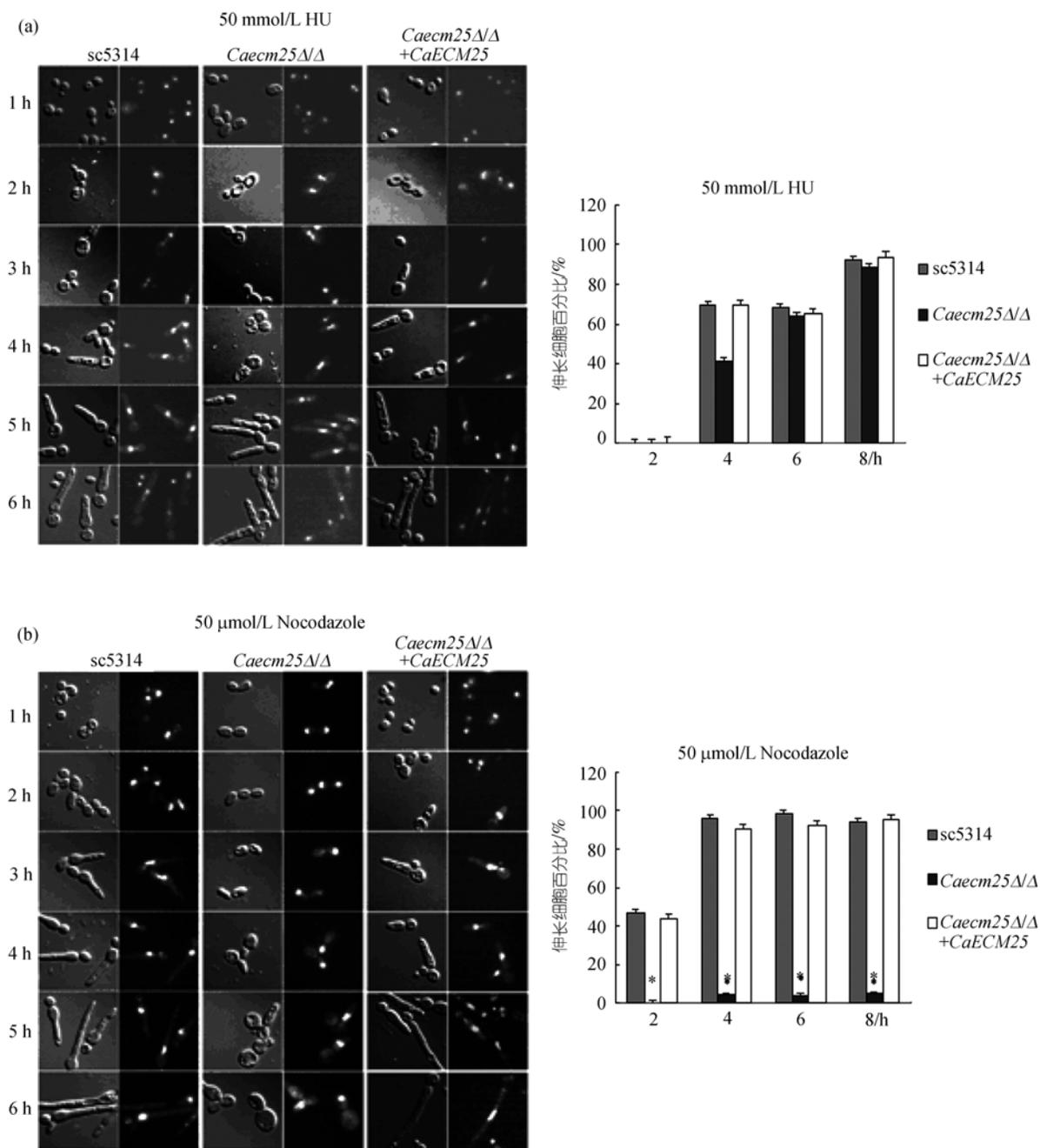


图 6 HU 和 Nocodazole 所引起的细胞持续丝状生长

(a) 细胞在YPD液体培养基中培养过夜, 稀释细胞浓度至 1×10^6 细胞/mL. 加入HU至终浓度为 50 mmol/L, 30°C 培养, 每隔 1 h 取样, 显微镜下观察细胞形态(DIC)及细胞核分布(紫外激发). 并在 2, 4, 6, 8 h 对伸长细胞进行计数, 计算百分比. 野生型和突变体差异不显著 ($P > 0.05$, t 检验). (b) 细胞在YPD液体培养基中培养过夜, 稀释细胞浓度至 1×10^6 细胞/mL. 加入Nocodazole至终浓度为 50 μmol/L, 30°C 培养, 每隔 1 h 取样, 显微镜下观察细胞形态(DIC)及细胞核分布(紫外激发). 并在 2, 4, 6, 8 h 对伸长细胞进行计数, 计算百分比. * 示差异显著 ($P < 0.05$, t 检验)

失突变体以及回补菌株对小鼠的致病性. 采用普通 ICR 雄性小鼠, 随机分组, 10 只一组, 通过尾静脉给每只老鼠注射 5×10^5 个酵母菌形态的细胞. P3 实验室饲养, 监控其健康状况 20 天. 结果表明, 野生型对照组和回补菌株组分别在 11 和 12 天内, 小鼠全部死亡, 而此时几乎 50% 的 *Caecm25Δ/Δ* 实验组的小鼠都存活. 到第 20 天, *Caecm25Δ/Δ* 实验组的小鼠还有 40% 存活(图 7(a)). 这些结果表明 *CaECM25* 基因的缺失会导致菌株感染力和致病性的下降.

对感染野生型菌株、*Caecm25Δ/Δ* 缺失突变株以及回补菌株的小鼠肾脏切片观察显示, 感染野生型菌株和回补菌株的肾脏切片中可见清晰的伸长菌丝; 而感染 *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变株的肾脏切片中, 菌丝数量明显减少(图 7(b)). 该结果和动物存活率实验的结果相一致.

3 讨论

在酿酒酵母菌研究中, *ScECM25* 最初是在筛选与细胞表面代谢相关的基因中发现并且命名的, 其编码产物可能参与细胞壁的代谢^[4], 因此, 我们推测

ScECM25 在白色念珠菌中的同源基因很可能参与了白色念珠菌细胞壁的合成及代谢. 我们通过同源比对的方法在白色念珠菌的基因组数据库中得到了酿酒酵母菌 *ScECM25* 的同源序列, 并首次克隆出其全基因 *CaECM25*. 从生物信息学的角度, 通过 DNAMAN 以及 SMART 软件对 *CaEcm25* 和 *ScEcm25* 的同源性及其蛋白结构域进行了分析, 发现二者中间区域均含有一个明显的 RhoGAP 结构域, 所以该蛋白可能是类 Rho/Rac/Cdc42 小 GTP 酶的活化蛋白 (GAP). Rho 型 GTP 酶在细胞中担当重要的角色, 控制着细胞骨架极性以及细胞形态, 而 Rho1 可能参与细胞壁整合^[20]. 另外, 已经证明在酿酒酵母菌中, *ScEcm25* 可以与类 Polo 激酶 *Cdc5* 结合, 而 *Cdc5* 和 Rho1 可共同促进胞质分裂^[21]. 由此我们推测在白色念珠菌中, *CaEcm25* 可能也参与细胞形态的发生以及细胞壁的代谢.

作为一个新克隆出的基因, *CaECM25* 的功能还没有任何报道. 为了进一步证实我们对该基因功能的推测, 采用了同源重组的方法, 将 BWP17 菌株基因组两条染色体上的 *ECM25* 的 ORF 分别用 *HIS1* 和

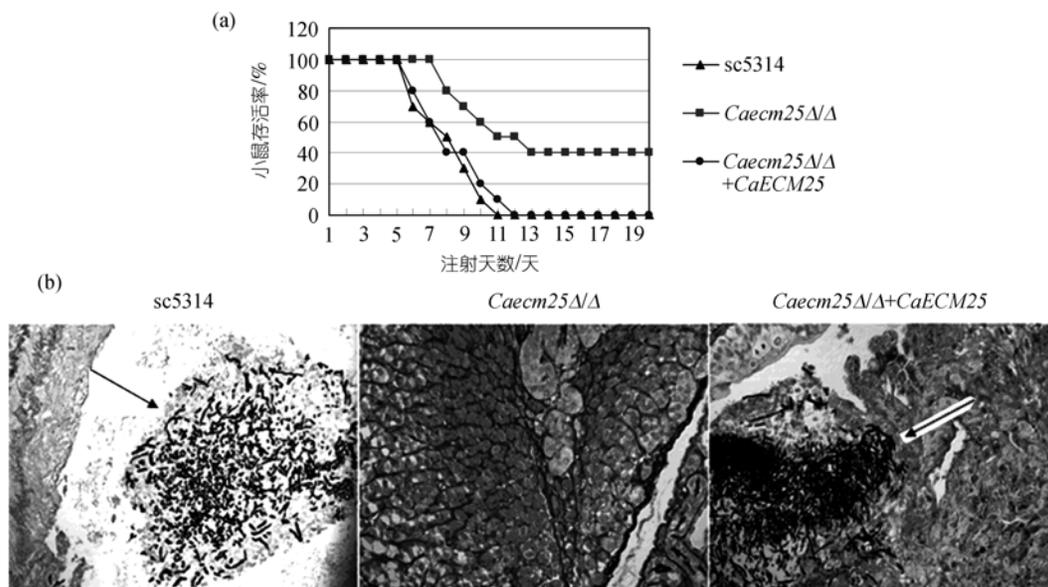


图 7 *CaECM25* 基因缺失对白色念珠菌毒力的影响

(a) 分别将野生型、*Caecm25Δ/Δ* 缺失突变体以及回补菌株细胞通过尾静脉注射到小鼠体内, 观察小鼠的死亡情况, 从小鼠的死亡曲线判定菌株的毒力. (b) 取注射相应菌株的小鼠肾脏, 制作切片, 六胺银染色. 光学显微镜下观察, 箭头所指为白色念珠菌菌丝

ARG4 替换, 得到了 *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变体菌株. 接着构建了其回补菌株, 以证明我们在突变体中观察到的所有表型均是由 *CaECM25* 缺失造成的, 而不是由其他因素造成的.

本实验结果表明 *CaECM25* 基因缺失会造成细胞出现较低程度的聚集, 母细胞和子细胞不能够正常分离. 但是这种聚集现象并不稳定, 很容易在机械力或其他因素作用下消失. 在酵母中, 细胞不能正常分裂有两种原因, 一是胞质分裂异常; 二是有丝分裂后细胞壁不能正常分离. 为了证明是哪一种原因导致细胞不能正常分离. 本实验用荧光增白剂(Calcofluor White)对细胞壁(几丁质环)进行了染色, 结果表明细胞胞质分裂正常, 因此, 证明 *CaECM25* 基因缺失所造成的细胞聚集现象是由于细胞壁不能正常分离而造成的. 这与酿酒酵母菌中的同源物 *ScEcm25* 在细胞壁合成和代谢过程的研究结果相一致, 从而间接证明, 在白色念珠菌中, *CaEcm25* 为细胞壁成分合成与代谢所需要.

白色念珠菌有 3 种形态: 酵母菌形态、菌丝形态以及介于两者之间的假菌丝形态. 在 20% 血清, RPMI1640, Spider 等诱导菌丝的培养基中, 比较野生型、*Caecm25Δ/Δ* 缺失突变株以及回补菌株的细胞形态, 结果显示, 突变体生成真菌丝的细胞百分数明显低于野生型和回补菌株, 并且生成真菌丝的长度也明显短于野生型和回补菌株. 另外, 我们也检测了 *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变体细胞假菌丝生成的能力, SLAD 板(低氮培养基)上培养细胞的结果显示 *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变体假菌丝的伸长程度明显低于野生型和回补菌株. 这些结果表明 *CaECM25* 基因缺失会使得细胞的丝状生长(真菌丝和假菌丝生长)在一定程度上受到抑制. 对于这种抑制作用, 我们认为有两种可能的解释: 已有报道证明, 在白色念珠菌中, 参与细胞壁合成和代谢的基因很可能也参与细胞丝状生长的过程^[11], 因为 *CaEcm25* 与细胞壁合成代谢之间有着密切关系, 该基因很可能通过对细胞壁组成的作用从而间接影响细胞的丝状生长; *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变体的生长速率变慢, 这可能也是其丝状生长受到抑制的一个原因^[19].

已有研究显示, 在细胞毒素 HU 和 Nocodazole 阻断细胞周期进程而引起的细胞丝状伸长过程中, 细胞

周期检验点起到十分重要的作用^[22]. Chen 等人报道^[10], 纺锤体组装检验点蛋白在 Nocodazole 所诱发的细胞丝状伸长中是必需的. Shi 等人^[9]报道, DNA 复制检验点蛋白在 HU 所诱导的细胞丝状伸长中具有重要作用. 在我们的研究结果中, 也观察到 *CaECM25* 基因缺失在一定程度上抑制了 Nocodazole 所引发的细胞丝状伸长, 但细胞核染色结果证明 *CaECM25* 基因的缺失并未导致细胞周期检验点功能的丧失, 细胞周期的正常进程仍然在药物的处理下被阻断. 那么, 对于细胞丝状伸长程度的降低, 可能的原因是 *CaECM25* 基因缺失后导致细胞生长速率变慢, 也可能有其他的原因, 其中具体的机理还需要进一步研究证明.

白色念珠菌作为一种致病菌, 与其致病性相关的因素很多, 深入探究其致病机理对治疗由白色念珠菌引起的疾病很有必要. 近些年的研究表明, 菌丝生长, 细胞壁以及细胞生长速率等都对白色念珠菌致病性有一定的影响. 白色念珠菌中与这 3 个因素相关的基因的缺失都会改变其致病性, 影响细胞壁合成的基因 *CaACE2* 的缺失、影响细胞生长速率的基因 *CaAAF1* 的缺失以及影响细胞丝状伸长的基因 *CaMP65* 的缺失均会减弱白色念珠菌在鼠体内的致病性^[11,18,19]. 本实验结果表明 *CaECM25* 基因与白色念珠菌的菌丝生长, 细胞壁形成以及细胞生长速率均有所关联. 因此, 本研究检测了 *CaECM25* 基因缺失对白色念珠菌致病性的影响.

动物实验结果表明, 与野生型相比, *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变体的致病性有一定程度的降低, 这与细胞黏附能力实验结果相一致, 分析其原因, 本研究认为造成其致病性下降的因素有多种: (i) *CaEcm25* 与细胞壁的合成代谢相关, 该基因的缺失可能会造成细胞壁成分或结构的改变. 而细胞壁作为真菌与宿主接触的首要部位, 对致病性有着很大的贡献^[23-25]. (ii) 细胞生长速率会影响到白色念珠菌侵染宿主细胞时的致病性. 而 *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变株细胞生长速率较野生型慢, 这很可能也是造成其致病性下降的一个原因^[19]. (iii) 我们之前分析过, 生长慢或细胞壁结构的改变都可能造成菌丝生成受阻. 而菌丝生成率低的菌株致病性也会降低^[7]. 因此, *Caecm25Δ/Δ* 缺失突变株致病性下降的一个直接因素可能来自于其菌丝伸长能力的降低.

参考文献

- 1 Calderone R A, Fonzi W A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 2001, 9: 327–335 [\[DOI\]](#)
- 2 Morgan J. Global trends in candidemia: Review of reports from 1995 to 2005. *Curr Infect Dis Rep*, 2005, 7: 429–439 [\[DOI\]](#)
- 3 Richardson M D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56(Suppl): 5–11 [\[DOI\]](#)
- 4 Berman J, Sudbery P E. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 918–930 [\[DOI\]](#)
- 5 Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 2004, 12: 317–324 [\[DOI\]](#)
- 6 Zheng X D, Wang Y M, Wang Y. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J*, 2004, 23: 1845–1856 [\[DOI\]](#)
- 7 Lo H J, Kohler J R, Fink G R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 1997, 90: 939–949 [\[DOI\]](#)
- 8 Ernst J F. Transcription factors in *Candida albicans*—Environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 2000, 146: 1763–1774
- 9 Shi Q M, Wang Y M, Wang Y. Critical role of DNA checkpoints in mediating genotoxic-stress-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 815–826 [\[DOI\]](#)
- 10 Chen B, Narendrakumar R, Wang Y. Spindle assembly checkpoint component CaMad2p is indispensable for *Candida albicans* survival and virulence in mice. *Mol Microbiol*, 2002, 45: 31–44 [\[DOI\]](#)
- 11 Mary T K, Donna M M, Geraldine B. The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol*, 2004, 53: 969–983 [\[DOI\]](#)
- 12 Osumi M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. *Micron*, 1998, 29: 207–233 [\[DOI\]](#)
- 13 Odds F C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol*, 1985, 12: 45–93
- 14 Marc L, Ann-Marie W, Howard B, et al. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1997, 147: 435–450
- 15 W.A. Fonzi and M.Y. Irwin, Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*, *Genetics*, 1993, 134: 717-728
- 16 Bachewich C, Nantel A, Whiteway M. Cell cycle arrest during S or M phase generates polarized growth via distinct signals in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 2005, 57: 942–959 [\[DOI\]](#)
- 17 Kang C M, Jiang Y W. Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast*, 2005, 22: 79–90 [\[DOI\]](#)
- 18 Silvia S, Roberto L V, Antonio C. The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative β -glucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity. *Cell Microbiol*, 2007, 9: 1223–1238 [\[DOI\]](#)
- 19 Rieg G, Fu Y, Ibrahim A S, et al. Unanticipated heterogeneity in growth rate and virulence among *Candida albicans* AAF1 Null Mutants. *Infect Immun*, 1999, 67: 3193–3198
- 20 David E L. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69: 262–291 [\[DOI\]](#)
- 21 Satoshi Y, Keiko K, David P, et al. Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science*, 2006, 133: 108–111
- 22 Jiang Y W, Kang C M. Induction of *S. cerevisiae* filamentous differentiation by slowed DNA synthesis involves Mec1, Rad53 and Swe1 checkpoint proteins. *Mol Biol Cell*, 2003, 14: 5116–5124 [\[DOI\]](#)
- 23 Bulawa C E, Miller D W, Becker J M. Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 10570–10574 [\[DOI\]](#)
- 24 Lousie A, Dixon D, Burnett J W. Relationship between *Candida albicans* spidermyotic protein activity and virulence in mice. *J Med Vet Mycol*, 1994, 32: 59–64 [\[DOI\]](#)
- 25 Duopont P E. *Candida albicans*, the opportunist: A cellular and molecular perspective. *JAM Podiatr Med Assoc*, 1995, 85: 104–105