

http://www.journals.zju.edu.cn/med

差异显示 PCR 技术在念珠菌基因表达研究中的应用

朱宇宁, 吕时铭

(浙江大学医学院 附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

[摘 要] 目的:探讨差异显示 PCR 技术(DD-PCR)在念珠菌基因表达研究中的方法学要点。方法:将临床阴道来源的白色念珠菌氟康唑敏感菌株 435 体外诱导氟康唑耐药性,于诱导 80d 得到耐药子代 435-2,采用长引物差异扩增、银染显示差异条带、反式点杂交预筛选及非放射性法标记探针的改良的 DD-PCR,比较 435 与 435-2 在有药及无药培养基中的表达差异。结果:在 435-2 含药培养组中得到较 435-2、435 无药培养组表达明显增强的片段 N2、N3、N12,分别与数据库中白色念珠菌的醇脱氢酶基因 ADH1、拓扑异构酶基因 TOP2 及多药耐药基因 CDR1 基因有高度同源性;半定量 RT-PCR 中证实了 ADH1、CDR1 基因在耐药株中的高表达。结论:ADH1、CDR1 基因的高表达与白色念珠菌氟康唑耐药性形成相关,ADH1 可能是新的耐药基因;改良的 DD-PCR 技术降低了假阳性率的生产,使确证步骤更加便捷,在念珠菌研究领域有很好的应用前景。

[关键词] 聚合酶链反应; 差异显示 PCR 技术; 念珠菌,白色/遗传学; 基因表达; 方法学

[中图分类号] R 379.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2005)02-0157-06

Application of differential display-PCR technique in fluconazole-resistance gene expression of *Candida*

ZHU Yu-ning, LU Shi-ming (The Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the application of differential display-PCR (DD-PCR) in research on gene expression of *Candida*. **Methods:** Resistance to fluconazole was induced in a *Candida albicans* isolate 435 from vagina by culturing in YEPD broth with increasing fluconazole concentration *in vitro*, and the resistant isolate 435-2 (MIC = 128 μ g/ml) was obtained after 80 days of incubation. Comparisons between 435 and 435-2 either in fluconazole-containing medium or in drug-free medium were performed with the modified DD-PCR including amplification with long primers, silver staining, reverse dot blot and non-radiographic labeling techniques. **Results:** Three differential displayed bands were found which showed high homology to alcohol dehydrogenase 1 (ADH1), TOP2 and CDR1, respectively. The up-regulating expression of ADH1 and CDR1 associated with fluconazole resistance was further identified by RT-PCR. **Conclusion:** The up-regulating expression of ADH1 and CDR1 was associated with fluconazole resistance in *Candida albicans*, ADH1 might be a candidate of novel fluconazole resistant gene.

[Key words] Polymerase chain reaction; Differential display-PCR; *Candida albicans*/genet; Gene expression; Methodology

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2005, 34(2):157-162.]

差异基因表达技术(DGE)因其高通量等特点,自 20 世纪 90 年代出现后大大加快了许多领域基因表达的研究。DGE 包括两大类:封闭的 DGE 技术和开放的 DGE 技术^[1]。封闭的 DGE 技术如寡核苷酸或 cDNA 芯片技术和定

收稿日期:2004-01-06 修回日期:2004-06-28
基金项目:浙江省自然科学基金(301546)资助项目
作者简介:朱宇宁(1971—),女,硕士,从事实验诊断学的临床及基础研究。
通讯作者:吕时铭(1954—),男,教授,从事妇产科学、实验诊断学的临床及基础研究;E-mail:zyn@zju.edu.cn

量聚合酶链反应,因被遗传的复杂性、数据库等因素限制而不适宜应用于探索性的功能基因组前沿;以差异显示 PCR 技术(DD-PCR)、cDNA 代表性差异分析(cDNA-RDA)、抑制性差减杂交(SSH)等为代表的开放的 DGE 技术则有其本质的优点:转录子的来源和遗传的复杂性(单个核苷酸多态性,选择性剪接, RNA 编码等)可以忽略,不会成为探索性研究的障碍。

DD-PCR 是目前应用最多的开放的 DGE 技术,它是 1992 年 Liang 和 Pardee 在 Welsh 等人建立的 AP-PCR 方法基础上建立起来的^[2,3]。其基本原理是将细胞中的 mRNA 逆转录为 cDNA,利用不同的锚定引物与随机引物组合,对 cDNA 进行 PCR 扩增、电泳显示差异基因,再经二次 PCR 扩增后,进行克隆及测序。与其他 DGE 技术相比,DD-PCR 具有简单易行、灵敏度高、所需起始材料少及可以同时进行多样本间的比较等优点,但也存在假阳性较高、重复性差及确证耗时费力等缺陷。

念珠菌是重要的医学病原菌,其基因表达的研究非常重要。鉴于 DGE 技术在该领域的应用较少,本研究以 DD-PCR 在白色念珠菌氟康唑耐药研究中的应用为例,探讨该项技术对念珠菌基因表达研究的价值。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 菌株 435(435 为本室保存菌株编号)采自一再发性念珠菌阴道炎患者的阴道分泌物,镜检及 Vittek-32 微生物自动生化鉴定系统(YBC 生化卡)鉴定为白色念珠菌。微量液基稀释法测定其氟康唑最小抑菌浓度(MIC)为 $4 \mu\text{g/ml}$ ($\text{MIC} < 8 \mu\text{g/ml}$ 即为氟康唑敏感株)。白色念珠菌标准菌 ATCC90028(氟康唑 $\text{MIC} = 0.25 \mu\text{g/ml}$)作药敏质控。

1.2 诱导耐药株的获得 氟康唑耐药诱导按文献方法进行^[4]。经 80d 诱导培养获得耐药子代 435-2 ($\text{MIC} = 128 \mu\text{g/ml}$, $\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g/ml}$ 为氟康唑耐药株),该耐药株在无药培养基上传代培养 24d 保持氟康唑耐药性稳定(其间 4 次测定 MIC 变化在一个稀释度内)。

1.3 实验分组 实验分 3 组,实验组(research group):435-2 接种于含 $64 \mu\text{g/ml}$ 氟

康唑的 YEPD 液基;对照组 1(control group 1):435-2 接种于无药的 YEPD 液基;对照组 2(control group 2):435 接种于无药的 YEPD 液基。30℃ 摇床培养至各菌液 A₆₀₀ 值达 0.6~0.8(对数生长早期),收集菌细胞,液氮速冻后于 -80℃ 保存。

1.4 菌株总 RNA 提取 取出冻存菌细胞,采用改良的热酚法同时提取各组酵母菌的总 RNA(波士顿大学医学院网页, http://www.bu.edu/genome/microarray/rna_isolation.htm),Dnase I (Promega 公司)去除痕量的 DNA。取适量纯化后的总 RNA 样品稀释后,测 A₂₆₀、A₂₈₀ 光密度值,并在 1.2% 普通琼脂糖凝胶上电泳,确定 RNA 的完整性及 DNA 污染情况。

1.5 差异显示 PCR 试剂盒采用 CLONTECH 公司的 Delta™ Differential Display Kit。

1.5.1 cDNA 第一链合成: 3 组菌细胞的总 RNA ($0.5 \sim 1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)各取 $2 \mu\text{g}$ 逆转录合成 cDNA 第一链,将 cDNA 用超纯水分别作 10 倍、40 倍稀释。

1.5.2 PCR 扩增: 在每一反应管中混合:10× 反应缓冲液 $2 \mu\text{l}$, dNTP ($5 \mu\text{M}$) $0.2 \mu\text{l}$, 试剂合中锚定引物 T 及随机引物 P 各 $1 \mu\text{l}$, ddH₂O $14.4 \mu\text{l}$, 1/10 或 1/40 浓度的 cDNA $1 \mu\text{l}$, Advantage Klen Taq Polymerase Mix ($50 \times$) $0.4 \mu\text{l}$ 。循环参数:94℃ 预变性 4 min;5 个循环:94℃ 1 min, 40℃ 1 min, 68℃ 1 min;25 个循环:94℃ 40 s, 60℃ 1 min, 68℃ 2 min;68℃ 延伸 7 min。每组模板采用 1/10 及 1/40 两种浓度的 cDNA,水及总 RNA 作模板的阴性对照。

1.5.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Neutral PAGE)显示差异条带:常规配制 6% 聚丙烯酰胺凝胶液,取 PCR 产物 $5 \mu\text{l}$,加等体积电泳上样缓冲液混匀上样,10V/cm 恒压电泳至指示剂二甲苯青达胶底。银染显示差异条带。

1.5.4 差异片段回收及再扩增: 从凝胶上切下差异片段,压碎后加入 $40 \mu\text{l}$ ddH₂O,沸水浴 15 min,12 000 r/min 离心 10 min,取 $7 \mu\text{l}$ 上清为模板同前法行第二次扩增。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,切胶回收目标条带。

1.6 PCR 再扩增产物克隆及鉴定 按试剂盒

方法将 PCR 再扩增产物纯化片段与 T Vector (Takara 公司)连接,转化大肠杆菌 JM109,经蓝白斑筛选得到阳性克隆子。阳性克隆子用含氨苄的 LB 液体培养基培养过夜,提取质粒,用 EcoR I 及 Hind Ⅲ 进行双酶切分析。

1.7 反式 Northern 杂交筛选差异 cDNA 片段 采用 Roche 公司的 DIG-High prime DNA Labeling and Detection Kit,取重回收的质粒酶切目标产物及阳性对照 β -actin 点样于尼龙膜上。取各组总 RNA 5 μ g 同前法合成 cDNA,纯化后溶于 10 μ l DEPC 水中,按试剂盒方法作探针标记、杂交及化学发光法检测杂交信号。采用 Bio-Rad 的 Quantity One 软件分析各片段相对于看家基因 ACT1 的杂交信号强弱。

1.8 差异片段测序及同源性分析 测序在 ABI Prism 荧光自动测序仪上进行,由华大基因上海鼎安生物科技公司完成。在 GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)及斯坦福大学测序数据库 (<http://www.sequence.stanford.edu/group/candida>)中进行序列同源性比对。

1.9 半定量 RT-PCR 根据测序及同源性比对结果,得到 3 个明显差异片段,分别与数据库中白色念珠菌的醇脱氢酶基因 ADH1、多药耐药基因 CDR1 及拓扑异构酶基因 TOP2 有高度同源性。设计引物(表 1)作 ADH1、CDR1、ACT 1(看家基因)的半定量 RT-PCR 扩增。其中 ADH1 引物采用 Primer3 软件设计,CDR1、ACT 1 引物序列引自参考文献^[5]。3 对引物序列及预测长度见表 1。

扩增分管进行,各作 25、28、32 个循环。反应模板除同时制备的实验组、对照组 1、对照组 2 的 cDNA 外,另加同样条件下制备的在无药 YEPD 液基中生长的白色念珠菌 ATCC90028 (简称 90028 组,group 90028)的 cDNA。50 μ l 反应体系:10 $\times$ buffer 5 μ l,5mM dNTP 2 μ l,primer 各 1 μ l,Taq 酶 1 μ l,ddH₂O 39.75 μ l,模板 1 μ l。循环参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;25~32 个循环:94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖电泳检测指数扩增期的扩增产物,Quantity One 软件(Bio-Rad 公司)分析相对量。

表 1 用于 RT-PCR 的基因引物序列

Gene	Primer sequence(5'-3')	cDNA predicted
		size/bp
ADH1	TGTCTGTTACACTCACGATGG	502
	GCATCGAAACTGGAGCAGT	
CDR1	TTTTTTTTTTAGTTCATC	446
	AGAAACCAACTTGAACCTCTCC	
ACT 1	ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC	516
	GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA	

2 结 果

2.1 RNA 质量及完整性检测 经测定,本实验中各组提取的总 RNA $A_{260}/A_{280} \approx 2.0$,总 RNA 质量较好;在琼脂糖凝胶电泳上显示清晰的 25S、18S 条带, $25S/18S \geq 1$,提示提取的总 RNA 完整性良好(图 1)。

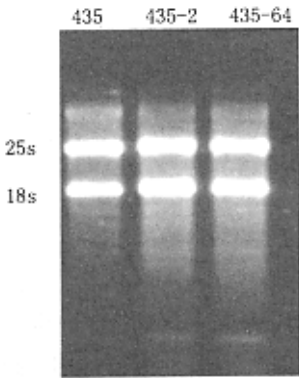


图 1 白色念珠菌总 RNA 电泳
Fig. 1 Electrophoresis of *Candida albicans*' total RNA
435;Control group 2; 435-2;Control group 1;
435-64;Research group

2.2 cDNA 差异显示结果 以 45 对不同的锚定引物和随机引物组合,对 3 组 cDNA 进行差异显示 PCR 扩增,共找出 22 条差异条带,其中实验组较对照组高表达 14 条、降表达 4 条;对照组 1 较对照组 2 高表达 3 条;对照组 2 较实验组及对照组 1 高表达 1 条。各差异条带在两种模板浓度下都出现,说明了本实验 DD-PCR 系统的稳定性;阴性对照组未出现扩增条带(引物二聚体除外)。图 2 显示其中两对引物扩增后的差异结果。

2.3 PCR 再扩增产物克隆及鉴定结果 22 条差异条带经再扩增及 T-A 克隆,其中 20 个得到阳性克隆子。经酶切分析,各克隆子插入片段与目标长度一致。

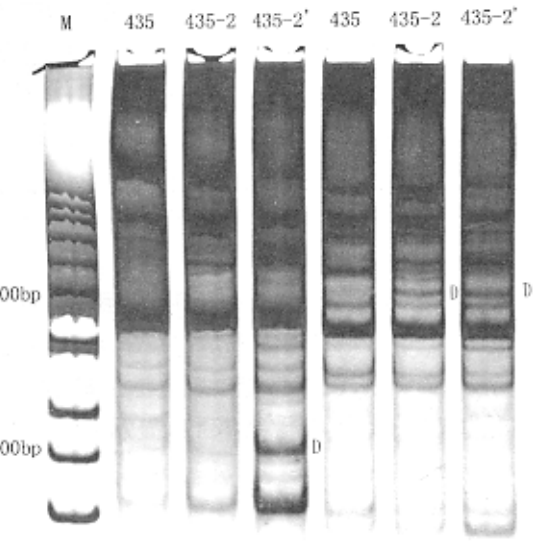


图 2 非变性 PAGE 胶电泳显示差异条带

Fig. 2 Bands differential-displayed in neutral PAGE

M:GeneRulerTM50bp DNA Ladder; D:Differential-displayed band; 435: Control group 2; 435-2: Control group 1; 435-2':Research group

2.4 反式点杂交筛选结果 通过尼龙膜上各个差异片段相对 ACT 1 的信号分析,选取相对强度差异两倍以上片段作下一步分析。其中有实验组高表达条带 N2、N3、N12,对照组 1 相对实验组弱但相对对照组 2 强的条带 N2、N12。图 3 显示各组 cDNA 探针杂交的部分结果,其中扫描信号相对值为 Dot1/ACT1: 1. 21(435)、0. 04(435-2)、1. 60 (435 -2'); Dot2/ACT1: 0. 11 (435)、0. 21 (435-2)、1. 80 (435-2'); Dot3/ACT1:1. 22 (435)、2. 31 (435-2)、5. 02 (435-2'); Dot4/ACT1: 0. 20 (435)、0. 88(435-2)、0. 01 (435-2'); Dot5 扫描信号

与阴性对照一致。

2.5 差异片段测序及同源性分析结果 片段 N2、N3 及 N12 序列分别长 208 bp、423 bp 及 542 bp,与数据库的白色念珠菌醇脱氢酶基因 ADH1(CAADH1)、拓扑异构酶基因 TOP 2 及已知多药耐药基因 CDR1 同源配对 90% 以上。

2.6 差异片段的半定量 RT-PCR 验证结果 各目标片段的 RT-PCR 反应在 28 个循环时均处于指数扩增期,取此期的 PCR 产物作半定量分析显示:ADH1、CDR1 在实验组中的表达高于两个对照组及 90028 组;同时 ADH1、CDR1 在对照组 1 中的表达介于实验组与对照组 2 之间,与杂交结果相符。所有半定量 RT 均重复两次以上。电泳结果见图 4,其中扫描信号相对值为 ADH1/ACT1: 0. 41 (435)、0. 60 (435-2)、0. 856 (435-2')、0. 42 (90028);CDR1/ACT1: 0. 04(435)、0. 09 (435-2)、0. 12 (435-2')、0. 02 (90028)。

3 讨 论

随着各种微生物基因组测序工作的不断完善和序列信息的积累,微生物基因组学的重点已由结构基因组学转向功能基因组学。在功能基因组学研究中,各种 DGE 的采用提供了一个很好的技术平台,其中 DD-PCR 应用最多,并伴随着不断的技术改进而日显优势。

本研究采用改良的 DD-PCR 技术对白色念珠菌氟康唑耐药基因的差异表达作了研究,

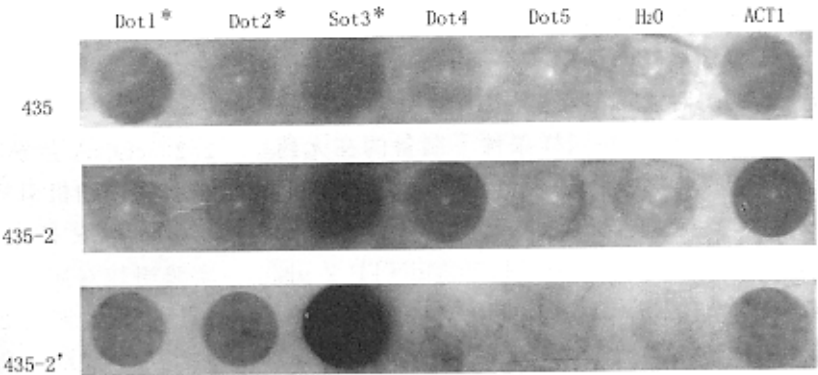


图 3 差异片段的反式点杂交检测

Fig. 3 Reversal dot blot detection of differential-displayed bands

Dot1-Dot5:cDNA bands for screening; H2O:Negative control;ACT1:House-keeping gene (Internal positive control); 435:Control group 2; 435-2:Control group 1; 435-2': Research group; *:Differential-displayed band

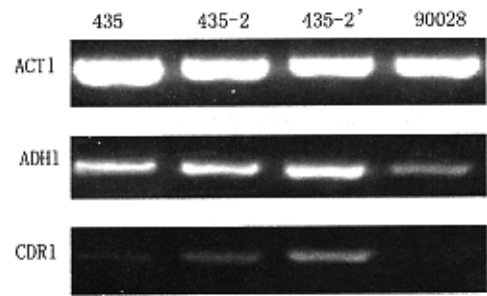


图 4 ADH1、CDR1 半定量 RT-PCR 电泳图

Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of ADH1, CDR1

435:Control group 2; 435-2:Control group 1; 435-2':Research group; 90028:Group 90028

最后顺利确证了 ADH1、CDR1 基因的高表达与白色念珠菌氟康唑耐药性形成相关,并首次发现 ADH1 可能是新的耐药基因。下面就以本研究为例对 DD-PCR 在念珠菌研究中的技术要点作了一些探讨。

3.1 总 RNA 的制备 DD-PCR 技术是基于全基因组表达谱的研究,总 RNA 的质量及完整性对最后的结果至关重要。念珠菌是单细胞的真核生物,对环境的变化存在灵活的调控^[6](瞬时调控),这要求各比较组的总 RNA 要在同样条件下同时快速制备,以避免所需要的差异信息在制备过程中改变。另外,念珠菌有较坚固的细胞壁,真核细胞常用的 Trizol(Gibco 公司)提取法如不加其它能迅速破壁的酶或玻璃珠,则可能在提取中使细胞内 Rnase 抑制不完全而导致 RNA 降解。

本实验将各处理组的菌细胞首先用液氮速冻,再用改良的热酚法提取 RNA,整个操作在 1h 左右完成,较传统的热酚法^[7]更快、质量更高。

3.2 DD-PCR 技术的改良

3.2.1 长引物的采用: Liang 在最初建立 DD-PCR 技术的时候,建议下游采用 12 个锚定引物(带 Oligo-dT 的引物),并认为与 10 碱基的随机引物配对能产生特异和可重复的结果^[2]。现在认为可以只需 3~4 条锚定引物^[8];更有研究者建议将等数量的 4 条锚定引物混合,只需一次逆转录反应即可^[9]。由于差异显示的产物大都含有 3' 端,产物太短则落在 3' 端的非转录

区而不能获得有效的信息,而长引物的应用可以增加产物的大小,并能提高实验的可重复性^[10]。

本研究直接采用 CLONTECH 公司的差异显示 PCR 试剂盒(Delta™ Differential Display Kit)。采用一次逆转录反应,随后采用长引物对(用 30 个碱基的锚定引物和 25 个碱基的随机引物)进行 PCR 扩增,配合使用试剂盒中的高保真热启动的 Taq 酶以及长片段 PCR 扩增条件,不仅获得了丰富的可重复的条带,而且条带的长度可达到 2 kb,有利于之后的序列同源性比对。

3.2.2 差异产物的银染显示:经典的 DD-PCR 技术是采用放射性同位素掺入到 dNTP 中,最后用放射自显影技术来显示差异条带,这种方法存在放射性污染的可能,并且需要在专门的实验室操作。因此,灵敏度相似的其它显示方法如银染、荧光技术开始作为替代手段应用于 DD-PCR。

本室采用一般的银染方法,时间在 2h 左右;能在每条泳道显出 15~40 条条带,灵敏度及分辨率不逊于同位素法;差异条带煮沸回收率也接近 100%。因此,在一般实验室进行 DD-PCR,银染显示法值得推荐。

3.2.3 反式点杂交初筛差异条带: DD-PCR 技术的致命弱点是假阳性率高,有报道称最高的假阳性率可达 70%^[11]。用 Northern 杂交一次次确证初步获得的众多差异片段无疑费时费力,而用反式 Northern 杂交来进行差异片段的初筛则使步骤大大简化。反式 Northern 印迹是将所有待筛选的片段点在一张膜上,用标记好的 mRNA 或 cDNA 探针进行杂交,一次就能完成所有筛选,再与 Northern 杂交或 RT-PCR 确证结合起来,不仅可节省时间、经费,还可快速确定阳性片段。

本研究采用地高辛标记的 cDNA 探针配合化学发光检测法(Roche 公司试剂盒)来进行反式 Northern 印迹筛选,迅速地 20 条片段中找到目标片段(差异在 2 倍以上的片段),并为 RT-PCR 证实。整个操作在一天内完成,省时省力,且无需放射性防护。

DD-PCR 技术是一个不断发展的技术,在

功能基因组研究中还有很大的应用潜力。念珠菌作为重要的机会性致病原,加强 DD-PCR 技术在念珠菌基因表达研究的应用,不仅有助于发现药物靶点和疫苗抗原、加深对微生物致病性的认识,更可为研究复杂生物体的基因功能提供参考。

References:

[1] CYNTHIA D G, JAN F S, Bruce E T, et al. Open systems: panoramic views of gene expression [J]. *J Immunol Method*, 2001, 250(1-2): 67—79.

[2] ZHANG Wei-dong, CHEN Hui, YU Zhong-sheng(张卫东, 陈 晖, 余 钟 声). Influence of different DNA extractions on the identification of streptococcus sanguis group by arbitrary primed polymerase chain reaction [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences*(*浙江大学学报: 医学版*), 2002, 31(6): 464—466. (in Chinese)

[3] LIANG P and PARDEE A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257(5072): 967—971.

[4] BARCHIESI F, CALABRESE D, SANGLARD D, et al. Experimental induction of fluconazole resistance in candida tropicalis ATCC750 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(6): 1578—1584.

[5] HENRY K W, NICKELS J T, EDLIND T D. Upregulation of ERG genes in Candida species by

azoles and other sterol biosynthesis inhibitors [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(10): 2693—2700.

[6] CHEN San-feng, LIU De-hu(陈三凤, 刘德虎). *Modern Microbial Genetics*(*现代微生物遗传学*) [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2003. 172. (in Chinese)

[7] AUSUBEL F M, et al. *Short Protocols in Molecular Biology* (精编分子生物学实验指南) [M]. Beijing: Science Publishing House, 1998, 524—525. (in Chinese)

[8] LIANG P, ZHU W, ZHANG X, et al. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(25): 5763—5764.

[9] RUSSELL M E, RAISANEN-SOKOLOWSKI A, UTANS U. Differential mRNA display. Adaption for in vivo studies of diseased tissues [J]. *Methods Mol Biol*, 1997, 85: 233—247.

[10] MARTIN K J and PARDEE A B. Principles of differential display [J]. *Methods Enzymol*, 1999, 303: 234—257.

[11] SUN Y, HEGAMYER G, COLBURN N H. Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells; one is homologues to human tissue inhibitor of metallo-proteinase -3 [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(5): 1139—1144.

[责任编辑 张荣连]

国家自然科学基金面上项目批准数我校名列全国第一

据国家自然科学基金委国科金计函(2004)65 号通知,2004 年度集中受理期间申报的国家自然科学基金面上、重点项目已经过严格评审正式批准立项。我校申报的面上项目 1 049 项,其中批准 248 项,批准项目经费数 5 163.5 万元;申报重点项目 44 项,其中批准 10 项,批准项目经费数 1 435 万元。这次我校在面上、重点项目批准项目数排名中均进入全国前三位,尤其是我校再次在面上项目批准数排名中名列全国第一位。