文章编号:1000-5404(2005)10-1009-03

论著

运用3′RACE验证LongSAGE文库构建后白念珠菌不同菌相的差异表达基因

张宝军[1],叶庆佾[1],何凤田[2],王 鲁[1],周村建[1],郝 飞[1] (第三军医大学:[1]西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 鉴定从LongSAGE文库筛选到的白念珠菌不同菌相表达基因差异表达标签JMD8和JSW10所代表基因。**方法** 诱导白念珠菌菌丝相的表达后,运用3′RACE技术扩增白念珠菌差异表达基因标签基因片段,纯化回收后,T/A连接,经氯化钙法转化大肠杆菌,X-gal/IPTG诱导表达,在阳性菌株中抽提质粒后酶切、测序。**结果** 两个片段均能在GenBank中找到同源序列,Score值小于40,Evalue小于0.5。**结论** 鉴定了白念珠菌LongSAGE标签JMD8和JSW10代表的基因分别为*EFT*2和*SHMI* I。

关键词: 白念珠菌;LongSAGE;3′RACE;菌相转换
中图法分类号: R379.4; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Identification of differential expression gene on *C. Albicans* phenotype using 3′RACE after LongSAGE library construction

ZHANG Bao-jun[1], YE Qing-yi[1], HE Feng-tian[2], WANG Lu[1], ZHOU Cun-jian[1], HAO Fei[1] ([1]Department of Dermatology, Southwest Hospital, [2]Department of Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify differential expression sequence tags JMD8 and JSW10 of *C. Albicans* distinct phenotype after LongSAGE library construction. **Methods** After *C. albicans* hyphal formation were cultured using conditional culture, 3′region of *C. Albicans* gene sequence tags were amplified with 3′RACE PCR and recombinant plasmid containing gene region of JMD8 and JSW10 tags was identified and sequenced. **Results** JMD8 and JSW10 gene regions were most close to *EFT*2 and *SHMI I*, respectively. **Conclusion** Differential expression sequence tags JMD8 and JSW10 of *C. Albicans* distinct phenotype were identified.

Key words: *C. Albicans*; LongSAGE; 3′RACE; phenotype switching

白念珠菌是临床上常见的致病菌,它的菌相转换与其粘附能力和致病性有关。为了全面阐述白念珠菌菌相转换的关键基因或全部基因,最终揭示白念珠菌菌相转换的分子机制,本研究以白念珠菌的菌丝相及酵母相表型生长差异为研究模型,运用基因表达系列分析技术(SAGE),建立了白念珠菌酵母相和菌丝相的SAGE文库。在此基础上,为比较菌丝相和酵母相SAGE文库间标签的差异表达,运用3′RACE(3′cDNA末端快速扩增),根据标签的表达序列,克隆其代表基因的cDNA片段,筛选并克隆标签代表的基因,从而寻找白念珠菌菌相转换的关键基因,期望为阐明菌相转换机制提供理论依据。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200013)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200013)
作者简介: 张宝军(1973-),男,天津市人,硕士研究生,主治医师,主要从事真菌学方面的研究。电话:(023)68772789
通讯作者: 叶庆佾,电话:(023)68754773
收稿日期: 2005-04-01;**修回日期:** 2005-04-15

1 材料与方法

1.1 材料

白念珠菌:ATCC-90028为本实验室保存的国际标准菌株;沙堡氏配方的葡萄糖-蛋白胨液体培养基;沙堡氏配方的葡萄糖-蛋白胨琼脂培养基;GSB培养基按照文献[1]要求配置后无菌过滤备用;RPMI1640培养基(HyClone公司购置的商品干粉)按说明书方法配制后,调pH 7.35,无菌过滤,备用;Tripure提取试剂购自Roche公司;冷酸洗波璃珠购北京鼎国公司;3′RACE kit Version E购自Invitrogen公司;RNA PCR kit(AMV)Ver.2.1购自Promega公司;PCR产物回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、X-gal/IPTG购自北京天为时代公司;T/A克隆连接试剂盒购自Takara公司。

1.2 方法

1.2.1 白念珠菌ATCC-90028的诱导(芽管诱导) 将冷藏备用的白念珠菌ATCC-90028接种于沙堡氏葡萄糖-蛋白胨琼脂培养基的斜面上,37 ℃、复苏24 h;无菌方法转种于沙堡氏葡萄糖-蛋白胨液体培养基中,37 ℃、24 h孵育;收集沙堡氏葡萄糖-蛋白胨液体培养液,离心10 min,无菌生理盐水洗涤沉淀3次后,无菌条件下,接种沉淀(白念珠菌孢子)于GSB培养液中,25 ℃

振荡培养 48 h;收集培养液离心 10 min,弃上清,洗涤 3 次后,用无菌生理盐水将沉淀重悬,加入 20 ml 菌丝相诱导液 RPMI1640,利用血球计数池,分别将诱导培养液中的细胞数调至 5×10^5、5×10^6、5×10^7/ml。同时制片,光学显微镜下观察其形态。

1.2.2 白念珠菌孢子及白念珠菌芽管细胞总 RNA 的提取 分别收集白念珠菌孢子及芽管细胞各约 5×10^7 个,运用冷的玻璃珠酸洗玻璃珠机械破壁,并按照 Tripure 提取试剂的说明操作并加以改进,获得细胞总 RNA 样品后测 A_{260}/A_{280} 比值分析纯度,1.2%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 引物的设计与合成 根据白念珠菌的通用表达基因 *HSP*90 和菌丝相的胞壁表达基因 *HWP*-1 的 cDNA 序列,设计 PCR 引物,上游引物:*HSP*90 5′-GGTTGGTCTGCCAATATGGAAAG-3′; *HWP*-1 5′-GTGCTGCTATTATTGGTATTGCTG-3′;下游引物:*HSP*90 5′-CAATCCCAAGGCAATCAATCTGT-3′; *HWP*-1 5′-GCTATCAACTATGAACCGAAAACA-3′交由上海博亚生物公司合成。

1.2.4 细胞总 RNA 的反转录 PCR 根据 Promega 公司 RNA PCR kit(AMV)Ver.2.1 说明进行操作,一步法进行 RT-PCR,终反应体系为 50 μl。反转录的条件:48 ℃,45 min;94 ℃,2 min(AMV 反转录酶灭活 RNA/cDNA/引物变性),PCR 条件(*HSP*90:94 ℃变性 30 s;53 ℃退火 1 min;68 ℃延伸 2 min;40 个循环。*HWP*-1:94 ℃变性 30 s;52 ℃退火 1 min ;68 ℃延伸 2 min;40 个循环),最终延伸均为 72 ℃ 7 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳进行目的片段分析。

1.2.5 SAGE 标签引物的 3′快速 cDNA 末端扩增 根据 Invitrogen 公司的 3′RACE Version E 试剂盒(AP 接头引物序列 5′-GGCCACGCGTCGACTAGTACT-3′; AUAP 削减通用扩增引物序列 5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3′)说明,分别配制白念珠菌酵母相、菌丝相细胞总 RNA 的 20 μl 反转录体系,反转录条件为:42 ℃,50 min;70 ℃,15 min;37 ℃ 20 min。将得到的结果加入 50 μl 的 PCR 反应体系(应用高保真热启动 *Taq* DNA 聚合酶);标签引物为:白念珠菌酵母相 JMD8 序列 5′-CATGAGAAGAGTTACTTACGC-3′; 白念珠菌菌丝相 JSW10 序列 5′-CATGACTACCAGAGGTTTAGG-3′,3′cDNA 扩增的 PCR 反应条件依次分别为:94 ℃预变性 3 min;(94 ℃变性 45 s;51 ℃退火 1 min;72 ℃延伸 1 min;35 个循环。94 ℃变性 45 s;53 ℃退火 1 min;72 ℃延伸 1 min;35 个循环)最终均为 72 ℃延伸 7 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳分析目的片断后凝胶纯化回收。

1.2.6 T/A 克隆连接及连接产物的细菌转化及重组质粒的构建 目的片断经纯化回收后,按天为时代公司 T/A 连接试剂盒说明进行操作,连接产物用热休克方法转化于非宿主表达菌大肠杆菌 DH5α,37 ℃摇菌 2.5 h。

1.2.7 重组质粒的筛选及质粒抽提、酶切鉴定测序 收集菌液 100 μl,涂布于 LB 平板(含 Amp 50 μg/ml),X-gal/IPTG 诱导表达 14 h 后,挑取白色单菌落(重组质粒的细菌形成白色菌落),接种至 5 ml 的 LB 液体培养基,37 ℃摇菌过夜,按照质粒提取试剂盒说明操作提取重组质粒;将挑选出的质粒利用重叠区限制酶切位点,选择限制型内切酶 *Sal* Ⅰ酶切分析后,将菌液送上海博亚公司测序。

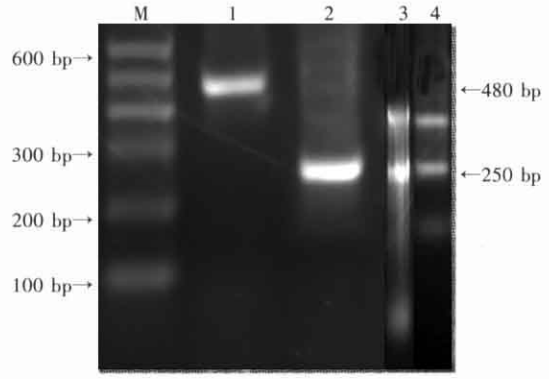
2 结果

2.1 白念珠菌 ATCC-90028 芽管诱导观察

白念珠菌 ATCC-90028 孢子于 RPMI1640 培养液 37 ℃(pH 7.35)孵育后,光学显微镜下可见 98%白念孢子有芽管生成,并有菌丝分隔。

2.2 白念珠菌酵母相、菌丝相细胞总 RNA 及 RT-PCR 产物

白念珠菌酵母相、菌丝相细胞抽提的总 RNA 分别进行紫外分光光度计测得 A_{260}/A_{280} 比值分别为1.843 6、1.931 2,表明样品纯度较高,符合提取标准;1.2%琼脂糖凝胶电泳分析结果显示有 28 s、18 s 和 5 s 明显条带,并且 18 s:28 s 比值接近 2:1,RT-PCR 产物电泳分别得到约 250 bp 和 480 bp 左右的条带,与预知的目的片段大小一致,见图 1。



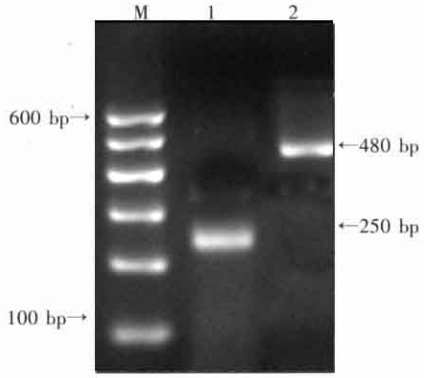
M: DNA marker; 1: RT-PCR product of *C. Albicans* yeast; 2: RT-PCR product of *C. Albicans* hyphae; 3: Total RNA of *C. Albicans* yeast; 4: Total RNA of *C. Albicans* hyphae phenotype and RT-PCR product on 1.5% agarose gel

图 1 1.5%琼脂糖电泳分析白念珠菌不同菌相的总 RNA 及其 RT-PCR 产物

Fig 1 Electrophoresis of total RNA extracted from *C. Albicans* distinct phenotype on 1.5% agarose gel

2.3 SAGE 标签引物的 3′快速 cDNA 末端扩增产物

1.5%琼脂糖凝胶进行扩增产物电泳分别得到 250、450 bp 左右的两个基因片断(图 2)。



M: DNA marker; 1: 3′RACE product of SAGE tag JSW10; 2: 3′RACE product of SAGE tag JMD8

图 2 SAGE 标签引物的 3′RACE 产物电泳图

Fig 2 3′RACE products of SAGE tags JMD8 and JSW10

2.4 重组质粒转化结果的酶切鉴定

纯化回收 SAGE 标签引物的 3′快速 cDNA 末端扩增产物,

经 T/A 克隆连接，细菌转化构建的重组质粒，随机挑取 4 个白色的单菌落，进行质粒小抽，经 *Sal* Ⅰ酶切，进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，结果显示 4 个样品均能扩增出250、450 bp 左右的片断，与 TA 克隆前 PCR 电泳结果一致。证实质粒构建成功。将初筛的菌落以菌液的方式送交上海博亚公司测序。

2.5　同源性检索和分析

将测得序列输入计算机，通过国际互联网进入美国国家生物信息中心(NCBI)的 GenBank。应用标准核酸 BLAST 程序与库中所有的核酸序列进行同源性比较，所有片断均能在 GenBank 中找到同源序列，同源性均大于 80%，Score 值小于 40，Evalue 小于 0.5，标签引物 JMD8、JSW10 序列克隆结果为 *EFT*2 *SHMI* 1 两个基因的不同片断。

3　讨论

白念珠菌菌相的转换与白念珠菌的感染与致病密切相关[2,3]，但目前对白念珠菌菌相转换的机制不清楚，为阐明白念珠菌菌相转换的分子机制，我们构建了白念珠菌菌相 LongSAGE 文库，获得了数以千计的序列表达标签(EST)，能在短期内检测细胞内几乎所有表达基因的 mRNA，并且能对其表达进行定量与定性分析，不仅可用于白念珠菌表型差异的基因分析，同时也能发现潜在的功能未知基因。应用 LongSAGE 研究，不仅获得了不需进行其它检测的、可以检索到唯一与之匹配的基因标签，而且也获得了需另行相关检测的、在现有数据库中能检索到多个与之匹配的表达序列的多重匹配标签，以及在现有数据库中没有与之匹配的基因，而需要对其重新鉴定的未知标签。

为了验证 SAGE 中多重匹配标签所代表的基因，本研究首先利用 RPMI1640 进行白念珠菌菌丝相的诱导培养，获得了较纯的菌丝相细胞，进而对白念珠菌的两种菌相细胞总 RNA 提取，由于白念珠菌胞壁坚硬，本研究采用直径 0.45 ~ 0.50 mm 玻璃珠破碎胞壁[4]，然后每 10^6 细胞加 1.5 ml 的 Tripure，使得核酸蛋白复合物完全分离，然后利用 RNA 与细胞内其它大分子在溶解性和沉降性上的差异进行物理分离，从而获得完整且均一的 RNA[5]。利用白念珠菌的通用表达基因 *HSP*90 以及白念珠菌菌丝相的胞壁基因 *HWP*-1，进行 RT-PCR 检测两种菌相细胞 RNA 的均一性，结果证实两种菌相细胞的 RNA 可以满足进一步实验的需要，随机在 LongSAGE 中抽取白念珠菌酵母相、菌丝相多重匹配标签各 1 个，将其合成引物序列，进行 3′快速 cDNA 末端扩增(RACE)，克隆出代表基因的 cDNA 片段，纯化后经 T/A 克隆连接，重组质粒构建并抽提后，经酶切测序，验证出标签代表的基因为 *EFT*2 和 *SHMI* Ⅰ，获得了理想的结果，证实了表达序列标签(expressed sequence tags, EST)[6] 可行大规模基因检测及可能发现新基因。尽管 SAGE 还存在一些缺陷，但它是仍然是目前获得特定组织的全部表达基因的最好方法。国外 Chen 等[7,8] 利用 SAGE 标签产生长片段 cDNA 应用于基因识别(generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification, GLGI)技术，以期获得的表达标签的 3′端全长序列，方法虽然新颖，但实际应用有一定困难，只有在拥有大规模测序分析的实验室内才能进行，实际操作需对大量的多重匹配标签筛选使用，且技术条件尚未成熟。据报道国外 Lee 等[9] 仅从人 $CD15^+$ 的髓性前体细胞 SAGE 中选择 59 个多重匹配标签进行了 GLGI 分析并最终确认。本研究使用的 3′RACE 是一种从标签引物转录体中快速扩增 cDNA3′末端是一种简单有效的方法，早在 1988 年，Frohman 等在研究中采用过，本研究在原始方法的基础上，通过独特设计的 dT 区域及 3 sites Adaptor Primer 中含有 *Mlu* Ⅰ、*Spe* Ⅰ、*Sal* Ⅰ的限制酶切位点，进行优化和改进，可以方便地进行克隆，为进一步验证 LongSAGE 文库标签的阳性库容奠定了基础。

通过验证 LongSAGE 文库的成功构建为下一步寻找白念珠菌菌相转换的关键基因以及运用 RNAi 技术对部分差显基因进行初步功能鉴定打下基础，从而为阐明白念珠菌菌相转换的调控机制以至最终为揭示白念珠菌菌相转换这一毒力因子致病性的分子机制做出了积极的贡献。

参考文献：

[1] Sundstrom P M, Kenny G E. Characterization of antigens specific to the surface of germ tubes of Candida albicans by immunofluorescence[J]. Infect Immun, 1984, 43(3): 850 - 855.

[2] Odds F C. Candida and candidosis[M]. London: Bailliere Tindall, 1988.

[3] Navarro Garcia F, Sanchez M, Nombela C, *et al*. Virulence genes in the pathogenic yeast Candida albicans[J]. FEMS Microbiol Rev, 2001, 25(2): 245 - 268.

[4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社, 1999. 120 - 129, 524 - 525.

[5] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al*. Short Protocols in Molecular Biology[M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons. Inc, 1995. 4 - 7.

[6] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, *et al*. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and the human genome project[J]. Science, 1991, 252(5013): 1651 - 1656.

[7] Chen J J, Rowley J D, Wang S M. Generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(1): 349 - 353.

[8] Chen J, Lee S, Zhou G, *et al*. High-throughput GLGI procedure for converting a large number of serial analysis of gene expression tag sequences into 3′ complementary DNAs[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2002, 33(3): 252 - 261.

[9] Lee S, Zhou G, Clark T, *et al*. The pattern of gene expression in human $CD15^+$ myeloid progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(6): 3340 - 3345.

(编辑　薛国文)