

新生隐球菌 Cap59 荚膜缺陷株 *ura5* 突变株的筛选方法*

郭秀军** 廖万清 任大明 王荫榆

(北京解放军 306 医院皮肤科 北京 100101)

摘要: 改进筛选新生隐球菌 Cap59 荚膜缺陷株 *ura5* 突变株的方法。采用硫酸二乙酯化学诱导新生隐球菌 Cap59 荚膜缺陷株, 利用 5-氟乳清酸 (5-FOA) 反筛选法筛选 *ura5* 尿嘧啶合成基因突变株。用新方法筛选到 2 株 Cap59 荚膜缺陷株 *ura5* 突变株。建立了一种筛选新生隐球菌荚膜缺陷株 *ura5* 突变株的简易方法。

关键词: 新生隐球菌, *ura5* 突变株

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文献编号:** 0253-2654 (2004) 02-0105-03

SELECTION FOR URAS MUTANTS OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* CAPSULE-DEFICIENT STRAIN CAP59

GUO Xiu-Jun LIAO Wang-Qing REN Da-Ming WANG Yin-Yu

(Dermatology Department of 306 Hospital of PLA, Beijing 100101)

Abstract: This study was to improve the way for selecting *ura5* mutants of *Cryptococcus neoformans* Cap59 capsule-deficient strains. They were induced by Diethyl Sulfate. *Ura5* mutants were screened by 5-fluoroorotic acid counter selection method. Using the new method, we obtained two *ura5* mutants of *Cryptococcus neoformans* Cap59 capsule-deficient strain. A easy method that was used to screen *ura5* mutants of *Cryptococcus neoformans* has been established.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, *ura5* mutant

在新生隐球菌的分子致病机理研究当中, 它的尿嘧啶合成基因 *URA5* 是一种常用的选择性标记, 因此筛选和鉴定新生隐球菌 *ura5* 突变株是一非常基础和重要的研究工作。以往的筛选方法时间周期长, 并且需要大量昂贵的化学试剂 5-氟乳清酸。本文在构建新生隐球菌荚膜 Cap59 缺陷株的转化系统时, 对 *ura5* 突变株的筛选方法进行了修改, 建立了一种较为经济、快速和准确的筛选方法, 现介绍如下。

1 材料与方方法

1.1 菌种

新生隐球菌 Cap59 荚膜缺陷株由美国退役管理局医学中心 ES Jacobson 教授惠赠。

1.2 培养基和主要试剂

酵母完全培养基 YPD (酵母提取物 10g, 蛋白胨 20g, 葡萄糖 20g), 酵母选择性培养基 SD (不含氨基酸的酵母基本氮硷 6.7g, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g), 含 0.005% 尿嘧啶选择性培养基 SDU, 含 0.1% (5-FOA) 的 SDUF 培养基。5-FOA 购自大连宝生物公司。

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39570043)

** 联系人 Tel: 010-66356729-2083, E-mail: guo_xiu9609@sina.com

收稿日期: 2003-05-30, 修回日期: 2003-09-25

1.3 新生隐球菌 *ura5* 突变株的诱导方法

采用硫酸二乙酯化学诱导方法^[1]。

1.3.1 Cap59 荚膜缺陷株于 50mL YPD, 30℃振荡培养至细胞计数 10^8 个/mL。

1.3.2 菌体离心, 用灭菌水洗 2 次。

1.3.3 菌体悬浮于 5mL 上述 0.1mol/L PH7.0 的磷酸钾 PBS 液中, 加 75 μ L 硫酸二乙酯并记时, 充分振荡 1min。

1.3.4 上述混合液放于 30℃振荡培养 1h, 菌体离心, 用 5% 的硫代硫酸钠洗 2 次, 菌体计数调整到 10^8 个/mL, 取 500 μ L 置于 50 mL YPD 培养基中, 30℃振荡培养, 直至细胞计数达 10^8 个/mL, 所得菌液保存于 4℃。

1.4 *ura5* 突变株的筛选方法^[2]

1.4.1 取 100 μ L 诱变菌液放于 1 mL 含 0.1% 5-FOA 的 YPD 液体培养基 30℃振荡培养 5d 左右, 可同时做多管。

1.4.2 选有 FOA 抗性的菌液, 稀释后 (菌体数约 10^5 个/mL) 100 μ L、200 μ L 和 400 μ L 涂于 YPD 平板, 单菌落影印到 SD 和 SDU 选择性培养基平板, 30℃培养 3~5d。

1.4.3 对不能在 SD 平板生长的菌株接着进行生长谱测定, 具体方法参见文献 [1]。

1.4.4 突变株的生长曲线测定: 突变株 30℃振荡培养至细胞计数 10^8 个/mL, 水洗菌体 2 次, 仍以 10^8 个/mL 的密度悬浮于水中, 3 mL SD 液体培养基中加入 100 μ L 的突变株菌液, 培养基中含尿嘧啶的量分别为 0 μ g/mL、20 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL 和 200 μ g/mL。于 30℃振荡培养, 用 721 分光光度计在 600nm 波长的条件下, 测定 0h、12h 和 24h 和 48h 突变株的吸光值 (OD)。

2 结果

2.1 突变株的 5-FOA 抗性

共获得 8 个具有 5-FOA 抗性的菌落。

2.2 营养缺陷鉴定

8 个具有 5-FOA 抗性菌落的 2 个菌落 (编号 4 和 20), 菌株能在 YPD, SDU 固体培养基上生长, 不能在 SD 培养基上生长。

2.3 生长谱测定

2 个突变株只能在尿嘧啶补充之处生长。

2.4 两个突变株的生长曲线测定

见以下 4 个图。

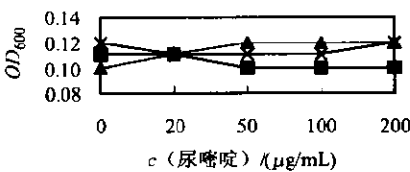


图1 尿嘧啶缺陷株和野生株 0h 吸光值

■-4号菌株, ▲-20号菌株, ×-3501

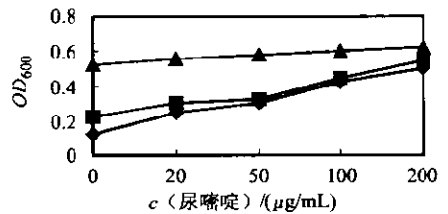


图2 尿嘧啶缺陷株和野生株 12h 吸光值

◆-4号菌株, ■-20号菌株, ▲-3501

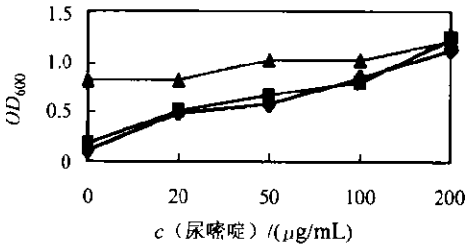


图3 尿嘧啶缺陷株和野生株 24h 吸光值

◆ 4号菌株, ■ 20号菌株, ▲ 3501

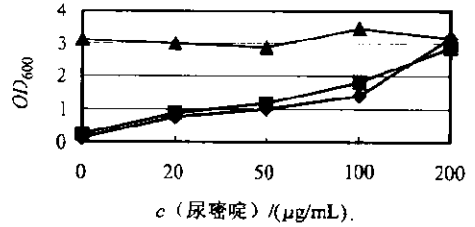


图4 尿嘧啶缺陷株和野生株 48h 吸光值

◆ 4号菌株, ■ 20号菌株, ▲ 3501

根据图1~4的数据可以发现,突变株在不含尿嘧啶的基础培养液中是不生长的,随着尿嘧啶浓度的增加,突变株的生长密度增加,在含尿嘧啶200µg/mL的基础培养液中,其生长密度和野生株的生长密度是一样的,因此突变株的生长速度依赖于尿嘧啶的提供量;而野生株的生长密度与尿嘧啶的浓度无关。

通过以上的筛选方法初步证实:筛选到的2株营养缺陷株是新生隐球菌 Cap59 荚膜缺陷株的 *ura5* 突变株。

3 讨论

构建新生隐球菌转化系统常以酵母细胞普遍存在的尿嘧啶合成基因 *URA5* 基因作为选择标记,因为 *URA5* 基因编码的产物可以将 5-FOA 催化为 5-氟乳清苷酸 (5-FUMP),这种物质是一种很强的胸苷合成酶的抑制剂,对细胞有毒性作用,因此野生株不能在含有 5-FOA 的培养基存活,而新生隐球菌 *URA5* 基因突变株对 5-FOA 有抗性,用 5-FOA 抗性平板可筛选到 *ura5* 突变株。

按常规报道的方法^[4],一次诱导后将全部菌液涂于 SDUF 平板,5-FOA 的用量很大,由于突变株的数量有限,基础培养基营养成分缺乏氨基酸,酵母细胞的生长很慢,筛选突变株的时间长(2w 左右),得到突变株的机率很低。我们在诱导后将全部菌液放于 50mL YEPD30℃ 振荡培养过夜,这样可以保证所有突变株在良好的生长条件下存活,并得到一定数量的扩增,随后用 5-FOA 进行抗性选择,可在较短的时间(5d)和使用较少量的 5-FOA 得有 5-FOA 抗性的菌株。

理论上具有 5-FOA 抗性的突变株不一定是 *ura5* 突变株^[1],因此再用 SD 和 SDU 培养基进一步筛选。本研究筛选到的 2 株突变株,能在 YPD、SDU 平板生长,不能在 SD 平板生长,说明突变株为尿嘧啶营养缺陷株。测定突变株的生长曲线,随着尿嘧啶浓度的增加,突变株的生长密度增加,在含尿嘧啶 200µg/mL 的基础培养液中,其生长密度和野生株的生长密度是一样的,说明突变株的生长速度依赖于尿嘧啶的提供量。以上的筛选结果说明获得的 2 株突变株,可作为新生隐球菌 Cap59 荚膜缺陷株尿嘧啶缺陷株受体菌,我们的筛选方法具有快速,经济和准确的优点,值得在今后的工作中使用。

参考文献

- [1] A 亚当斯, D E 戈特施林, C A 凯泽等著. 酵母遗传学方法实验指南. 刘子铎译. 北京: 科学出版社, 2000. 45 ~ 60.
- [2] Edman J C, Kong-Chong K J, Penoyder L A, et al. Mol Cell Biol, 1990, 10 (9): 4538 ~ 4544.
- [3] Chang Y C, Sarah P F, Junia S H, et al. J Bacteriol, 1999, 181 (18): 5636 ~ 5643.
- [4] Jef D B, Francois La C, Gerald R F. Mol Gen Genet, 1984, 197 (2): 345 ~ 346.