

额外拷贝 *ERG6* 基因对烟曲霉的影响*

乔建军 刘伟** 曹存巍 万哲 李若瑜

(北京大学第一医院皮肤科北京大学真菌和真菌病研究中心 北京 100034)

摘要: 通过构建烟曲霉 *ERG6* 基因额外拷贝株, 研究该基因对烟曲霉生长速度、抗药物敏感性的影响。在烟曲霉基因组找出烟曲霉可能的 *ERG6* 基因的开放读码框 (ORF), PCR 扩增 *ERG6* 的 ORF 连同其上下游各约 1 kb 的 DNA 片段, 利用 DNA 重组的方法将该片段克隆到载体 pRG-AMA1-NotI。用重组后的质粒转化烟曲霉尿嘧啶营养缺陷株 AF293.1。在 MM 和 YAG 培养基上观察转化子的生长速度。采用纸片扩散法和微量液基稀释法测定转化子对抗真菌药物敏感性。烟曲霉基因组中存在一个拷贝的 *ERG6* 基因, ORF 大小为 1,256 bp。其编码的蛋白与白念珠菌、酿酒酵母固醇甲基转移酶 (Erg6p) 的氨基酸相同率分别为 57% 和 50%, 相似率分别为 70% 和 63%。烟曲霉中 *ERG6* 基因被成功克隆到了 pRG-AMA1-Not I, 产生了质粒 pERG6。用 pERG6 和空载体 pRG-AMA1-Not I 转化 AF293.1 后, 分别得到转化子 AF-pERG6 和 AF-empty。AF-pERG6 在 MM 和 YAG 培养基上的生长速度均比 AF-empty 慢。AF-pERG6 和 AF-empty 对伊曲康唑、伏立康唑、特比萘芬、两性霉素 B、卡泊芬净、灰黄霉素的敏感性没有差异。*ERG6* 基因额外拷贝不影响烟曲霉对伊曲康唑、伏立康唑、特比萘芬、两性霉素 B、卡泊芬净、灰黄霉素的敏感性, 但是能使烟曲霉的生长速度减慢。

关键词: 烟曲霉, *ERG6* 基因, 额外拷贝, 抗真菌药物敏感性, 生长速度

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0191-04

Effect of *ERG6* Gene Extra Copies on *Aspergillus fumigatus**

QIAO Jian-Jun LIU Wei** CAO Cun-Wei WAN Zhe LI Ruo-Yu

(Department of Dermatology, Research Center for Medical Mycology, Peking University First Hospital, Beijing 100034)

Abstract: To investigate the role of *ERG6* gene in the growth rate and antifungal susceptibility, *Aspergillus fumigatus* strain with extra copies of *ERG6* gene was constructed. Open reading frame (ORF) of putative *ERG6* gene was searched in *A. fumigatus* genome. A PCR fragment, *ERG6* ORF sandwiched by its flanking sequences (about 1 kb respectively), was amplified and was then subcloned into vector pRG-AMA1-NotI to produce a recombinant plasmid pERG6, which was further transformed into uracil auxotroph *A. fumigatus* strain AF293.1 to produce the transformant AF-pERG6. In the same time, empty plasmid pRG-AMA1-NotI was also transformed into *A. fumigatus* strain AF293.1 to produce the transformant AF-empty as a control. Radial growth of the transformants was tested on minimal medium (MM) and YAG medium. Antifungal susceptibilities of these resulting transformants, AF-pERG6 and AF-empty, to the common antifungal agents were performed by using both disk diffusion and broth microdilution methods. *A. fumigatus* genome contains a *ERG6* gene, of which the ORF size is 1,256 bp. Comparing to *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* sterol methyltransferase, *A. fumigatus* Erg6p had 57% and 50% identity, and had 70% and 63% similarity in amino acid sequences, respectively. Radial growth of transformant AF-pERG6 was slower than that of transformant AF-empty. The antifungal susceptibilities of transformant AF-pERG6 to the antifungal drugs itraconazole, voriconazole, terbinafine, amphotericin B, caspofungin and griseofulvin were same to that of transformant AF-empty. In *A. fumigatus*, extra copies of *ERG6* gene have no effect on antifungal susceptibilities to itraconazole, voriconazole, terbinafine, amphotericin B, caspofungin and griseofulvin. Radial growth of *A. fumigatus* harboring extra copies of *ERG6* gene becomes slower compared to the control.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, *ERG6* gene, Extra copies, Antifungal susceptibility testing, Radial growth

近年来由烟曲霉引起的侵袭性曲霉病的发生 呈上升趋势。该病病情十分严重, 已成为白血病、

国家自然科学基金 (No. 30500027)

教育部留学归国人员科研启动基金的资助

* 通讯作者 Tel: 010-66551122-3056, E-mail: liuw90@yahoo.com

收稿日期: 2006-11-30, 修回日期: 2006-12-29

骨髓移植受者、实体器官移植和 AIDS 患者死亡的主要原因之一。真菌麦角固醇合成途径为抗真菌药物的开发提供了很好的潜在的作用靶点,已经在临床中广泛应用的唑类和丙烯胺类抗真菌药物均分别作用于该途径中一些相关的酶^[1]。由固醇甲基转移酶基因(sterol methyltransferase gene, *ERG6*)编码的固醇甲基转移酶,是催化麦角固醇合成途径中特有的一个关键酶,由于人类胆固醇合成不需要该酶的催化^[2],因此我们推测该酶有可能作为新型抗真菌药物的作用靶点。在本研究中,我们构建了烟曲霉 *ERG6* 基因额外拷贝株,并研究该基因对烟曲霉生长速度、抗真菌药物敏感性的影响,为新型抗真菌药物的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和抗真菌药物

烟曲霉 AF293 为烟曲霉基因组计划所用菌株,烟曲霉转化用宿主菌 AF293.1 为 AF293 的原嘧啶营养缺陷株,载体 pRG-AMA1-NotI^[3,4](图 1a)等均由美国德克萨斯大学 MD 安德森癌症中心 Dimitrios P. Kontoyiannis 教授惠赠;该质粒为一穿梭质粒,由 PUC19 改造而成,含氨苄青霉素抗性筛选标记、尿嘧啶合成基因 *pyrG3*,以及 AMA1 (Autonomous maintenance in *Aspergillus*),后者可使该质粒转化后不整合到宿主染色体上而随烟曲霉的生长自主复制;细菌转化用宿主菌为大肠杆菌 DH10B (Stratagene)。

抗真菌药物伊曲康唑 (ITZ, 1,600 $\mu\text{g/mL}$)、伏立康唑 (VOR, 1,600 $\mu\text{g/mL}$)、特比萘芬 (TBF, 1,600 $\mu\text{g/mL}$)、两性霉素 B (AMB, 1,600 $\mu\text{g/mL}$)、卡泊芬净 (CAS, 6,400 $\mu\text{g/mL}$)、灰黄霉素 (GRI, 6,400 $\mu\text{g/mL}$) 的储存液均用 100% DMSO 溶解,储存于 -20°C 。

1.2 计算机分析

(1) 在烟曲霉基因组 (www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/) 中通过与白念珠菌和酿酒酵母 *ERG6* 基因进行 BLAST,找出烟曲霉中可能的 *ERG6* 基因的开放读码框 (ORF)。(2) 用 clustalw (1.82) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 对烟曲霉、白念珠菌、酿酒酵母 *Erg6p* 的氨基酸序列进行同源性比对。

1.3 *ERG6* 基因克隆及其额外拷贝质粒的构建

1.3.1 目的 DNA 片段的扩增:设计一对引物: *ERG6*-F: 5' -atgcgcgatg(GGTACCGAAATATGCTAAAGGGACGTCTG-3', *ERG6*-R: 5' -aaggaatacGCCGCCGATTACCGAGAGA TATCCGAGATC-3' (划

线处依次分别为引入的 *Not* I、*Kpn* I 限制性酶切位点,小写字母为酶切位点保护碱基),扩增 *ERG6* 基因的 ORF 连同其上下游各约 1 kb 的 DNA 序列。

PCR 反应体系: 10 \times Buffer 5 μL , dNTP 8 μL , AF293 基因组 DNA 2 μL , Taq 酶 0.5 μL , H_2O 2.5 μL , 上下游引物各 1 μL 。PCR 反应的条件: 95°C 5 min, 预变性; 95°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 3 min; 30 个循环; 72°C 充分延伸 15 min。

1.3.2 质粒和 PCR 产物的酶切、连接:载体和纯化的 PCR 产物 37°C 用 *Not* I 和 *Kpn* I 双酶切 4 h。酶切产物采用低熔点琼脂糖凝胶回收。酶切后的质粒连接体系如下: PCR 产物 2 μL , 质粒 6 μL , Buffer 1 μL , T4 连接酶 1 μL ; 25°C , 连接 2 h。

1.3.3 基因转化及转化子的鉴定:采用氯化钙法制备和转化感受态大肠杆菌,方法参照分子克隆实验指南^[5]进行。随机挑取 3 个耐氨苄青霉素的阳性转化子提取质粒进行酶切和测序,鉴定目的 DNA 片段是否已克隆到质粒 pRG-AMA1-NotI 的多克隆位点上。

1.4 烟曲霉的基因转化^[3,4]

1.4.1 烟曲霉原生质体的制备:将 0.25×10^9 个烟曲霉 AF293.1 的新鲜孢子接种于 25 mL 含尿嘧啶和尿苷的 MAC 液体培养基中, 25°C 振荡 20 h,离心弃上清液,在 32°C 用消化液处理 3.5 h,然后离心,并以 40 mL 的洗涤液洗涤两次;最后将原生质体溶于 1 mL 的保存液,在 4°C 孵育 6 h。

1.4.2 烟曲霉的基因转化:取 50 μL AF293.1 原生质体和 2 μL 新鲜提取的质粒,加入到 50 μL 转化液,置于冰上 20 min;再加入 500 μL 转化液,室温放置 30 min;将以上菌液加入到 47°C 的 3 mL 含 1 mol/L 蔗糖的基础琼脂培养基 (minimal medium, MM) 中,混匀后再倾倒在含 0.2 mol/L 蔗糖的 MM 培养皿中, 37°C 培养。以空白质粒 pRG-AMA1-NotI 作为对照。

1.4.3 烟曲霉转化子的鉴定:培养 48 h 后,随机挑取 1 个烟曲霉转化子,提取 DNA,并用该 DNA 转化大肠杆菌 DH10B,在含有氨苄青霉素 LB 培养基上 37°C 下培养;16 h 后,随机挑取 1 个大肠杆菌转化子,提取质粒,用 *Not* I 和 *Kpn* I 双酶切,酶切产物进行电泳。

1.5 烟曲霉转化子的抗真菌药物敏感性试验

分别用微量液基稀释法和纸片扩散法测定烟曲霉转化子对 ITZ、VOR、TBF、CAS、AMB、GRI 的敏感性。微量液基稀释法按照 CLSI 的 M38-A^[5] 程序操作,并做适当调整,即为了保持这些转化

子中质粒的持续存在,我们选用不含有尿嘧啶和尿苷的液体 MM 培养基以代替标准的 RPMI 1640。

1.6 烟曲霉转化子生长速度的测定

转化子菌悬液用生理盐水配成 10^5 个孢子/mL 的浓度,取 5 μ L 菌液接种在 MM 或 YAC 培养基上,置于 37℃ 培养,观察各菌株的生长情况。

2 结果

2.1 计算机分析

烟曲霉基因组中存在 1 个拷贝的 *ERG6* 基因,位于 4 号染色体,ORF 大小为 1,256 bp。其编码

的蛋白与白念珠菌、酿酒酵母 *Erg6p* 的氨基酸相同率分别为 57% 和 50%;相似率分别为 70% 和 63% (图 2)。烟曲霉 *Erg6p* 的 S-腺苷甲硫氨酸结合位点与白念珠菌、酿酒酵母完全相同 (图 2)。

2.2 *ERG6* 基因克隆和额外拷贝用质粒的构建

PCR 产物和空载体连接后转化 DH10B,产生约 20 个阳性克隆;随机选取 3 个克隆提取质粒 DNA, *Not* I 和 *Kpn* I 双酶切证实 PCR 产物成功克隆到了 pRG-AMA1-*Not* I 的多克隆位点上,产生了质粒 pERG6 (图 1b)。

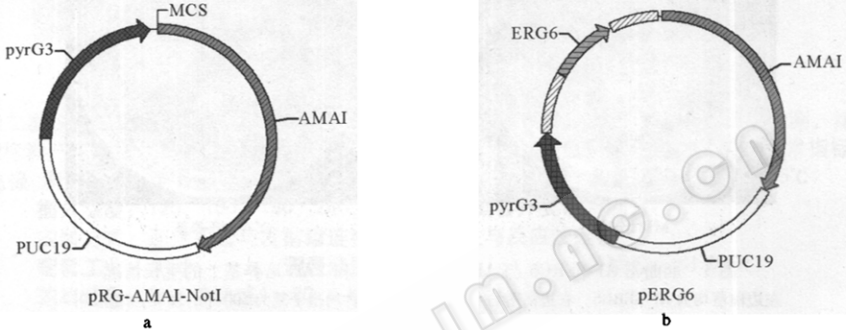


图 1 质粒 pRG-AMA1-*Not*I 和 pERG6 示意图

<i>S. cerevisiae</i>	MSETELRK-----RQAQFTRELGDDIGKKTGLSALMSKNNSAQKEAVQKYLNRNVDGRITDK	56
<i>C. albicans</i>	MSPVQLAEKNYERDEQFTKALHGESY-KKTGLSALIAKSKDAASVAAEGYFKHVDGGISK	59
<i>A. fumigatus</i>	MAPVALEQENHLRDAEFNRAMHGKSAQFRGGFAALRGKDSAAQKAAVDEYFKHVDNKPAE	60
<i>S. cerevisiae</i>	DAEER-----RLDYNEATHSYNNVVTDFEYGVGSSFFHSRFFYKGSFAASIAIRHEHYLA	112
<i>C. albicans</i>	DDEEK-----RLNDYSQLTTHYYNLTDFEYGVGSSFFHSRFFYKGEAFQATARHEHFLA	115
<i>A. fumigatus</i>	DETEETRAARRAEYATLTRHYNNLTDLFEYGVGTSFFHCCKFAQGEFFYQAIARHEHYLA	120
<i>S. cerevisiae</i>	YKAGIQRGDLVLDVGGGVGGPAREIARFTGCVNIGLNNDYQIAKAKYVAKKYNLSDQMD	172
<i>C. albicans</i>	HKHNLNENMKVLDVGGGVGGPGREITRTDCEIVGLNNNDYQIERANHYAKKYHLDBKIS	175
<i>A. fumigatus</i>	HQMGIKEGMKVLDVGGGVGGPAREIVKFTDANVVGGLNNDYQIERATRYAEREGLSHKIS	180
<i>S. cerevisiae</i>	FVKGDFNMKDFEENTFDKYAIEATVHAPVLEGVYSEIYKVLKPGGTFAVYEVVMTDKYD	232
<i>C. albicans</i>	YVKGDFNMKDFEESFDVYVIEATVHAPVLEGVYSEIYKVLKPGGIFGVYEVVMTDKYD	235
<i>A. fumigatus</i>	FVKGDFNMKDFEESFDVYVIEATVHAPDLEGVYKEIFRVLKPGGVFGVYEVVMTDAVD	240
<i>S. cerevisiae</i>	ENNPEHRKIAVEIELGDGIPKMFHVDVARKALKNCGFVFLVSEDLDADNDEIPVYVPLTG	292
<i>C. albicans</i>	ETNEPEHRKIAVGIEVGDGIPKMYSRKVAEQALKNVGFEIEYQKDLADVDEIPVYVPLSG	295
<i>A. fumigatus</i>	NDNPEHRRIRLGLIEGDGISMVKSVDGLTAFKNAGFELLNEDLADRPDAIPVYVPLAG	300
<i>S. cerevisiae</i>	EUKVYQNLANLAEFTTSVLGRQFTTAMVTVMKILGLAPEGSKVTAALENAAVGLVAGG	352
<i>C. albicans</i>	DLKFCQTFDGYLTVFRTSRIGRFITTSVGLMEKILGLAPKCSKQVTHALEDAAVNLVEGG	355
<i>A. fumigatus</i>	SEKHMSTFVDFFTIARTVTVGGRGIAHRFCGAMETIGLFPKGTKTADSLAIAGDCLVAGG	360
<i>S. cerevisiae</i>	KSCLFTPMMLFVARKPENAEPTPSQTSQEAATQ	383
<i>C. albicans</i>	ROKLFITPMMLYVVRKPLEKDD	376
<i>A. fumigatus</i>	EKKLFITPMMLYVVRKPLEKDD	377

图 2 酿酒酵母、白念珠菌、烟曲霉 C-14 固醇甲基转移酶氨基酸序列同源性比对
黑色框中为 C-14 固醇甲基转移酶的 S-腺苷甲硫氨酸结合位点

2.3 烟曲霉的转化和转化子的鉴定

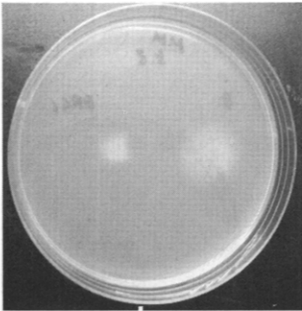
转化 48 h 后,得到约 50 个克隆。pERG6 和空载体 pRG-AMA1-*Not* I 的转化子各取 1 个克隆在 MM 培养基上培养,分别命名为 AF-pERG6 和 AF-

empty。用 AF-pERG6 和 AF-empty 的总 DNA 转化大肠杆菌后能使后者产生氨苄青霉素抗性。从用 AF-pERG6 和 AF-empty 的总 DNA 转化的大肠杆菌转化子内提取质粒 DNA 后分别进行酶切,得到的

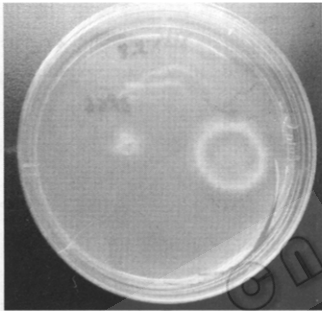
酶切产物 (*Not* I 和 *Kpn* I 双酶切) 电泳带型分别与 pERG6 和 pRG-AMA1-*Not* I 的带型相同, 序列测定证实重组 DNA 即烟曲霉的 *ERG6* 基因。

2.4 烟曲霉转化子抗真菌药物敏感性试验

微量液基稀释法显示, 烟曲霉 AF-pERG6 和 AF-empty 对以上 6 种抗真菌药物的敏感性没有差异 (表 1)。纸片扩散法也得出与微量稀释法一致的结果 (结果未列出)。



MM培养基



YAG培养基

图3 烟曲霉 AF-pERG6 与 AF-empty 在 MM 和 YAG 培养基上的生长情况
左边菌落均为 AF-pERG6, 右边菌落均为 AF-empty, 接种的孢子量为 500 个, 35℃, 培养 48 h

3 讨论

May 研究小组^[3]建立了一种 *pyrG* 基础上的烟曲霉转化系统。该系统通过增加基因在细胞内的拷贝数, 观察细胞功能的变化, 以了解该基因的功能。利用该系统他们证实额外拷贝的构巢曲霉 14 α -脱甲基酶编码基因可以导致烟曲霉对伊曲康唑耐药; 刘伟等^[4]用该系统证实了额外拷贝的 *ERG1* 基因能导致烟曲霉对 TBF 耐药。以上说明这种转化系统能够很好地应用于基因功能研究, 也可以应用于抗真菌药物敏感性的分子机制方面的研究。为研究 *ERG6* 基因的功能以及其在烟曲霉抗真菌药物敏感性中的作用, 我们在本研究中, 克隆了烟曲霉 *ERG6* 基因, 并利用该系统成功构建了 *ERG6* 基因额外拷贝株烟曲霉。

本研究发现含有 *ERG6* 基因额外拷贝株烟曲霉 AF-pERG6 生长速度非但没有增快, 反而变慢; 液基稀释法显示, 对各种抗真菌药物的敏感性, 譬如 TBF 和 AMB 的敏感性也没有改变, 这种情况经纸片扩散法得以证实。以往研究发现, 在酿酒酵母, 敲除其 *ERG6* 基因后, 突变子出现生长变慢、膜的渗透性增强; 而在白念珠菌, 敲除该基因后, 突变子对 TBF 高度敏感、对 AMB 耐药, 但对唑类敏感性没有变化^[2]。从以上酵母菌的研究推测,

表 1 6 种抗真菌药物对烟曲霉 AF-pERG6 与 AF-empty 的 MIC 值 ($\mu\text{g/mL}$)

	ITC	VOR	CAS	AMB	TBF	GRI
AF-pERG6	1-2	2	>64	1-2	0.5-1	>64
AF-empty	1-2	2	>64	1	0.5-1	>64

2.5 烟曲霉转化子生长速度

AF-pERG6 无论在 MM 培养基还是在 YAG 培养基上的生长速度均比 AF-empty 慢 (图 3)。

如果 *ERG6* 基因表达量增高可能会出现与敲除该基因后相反的表现, 即生长速度变快、对 TBF 耐药、对 AMB 敏感等。然而我们在本研究中发现, 含额外拷贝 *ERG6* 基因的烟曲霉生长速度不但没有变快, 反而减慢; 另外, 对 TBF 和 AMB 敏感性没有改变。由于烟曲霉是丝状真菌, 以上现象的产生可能是由于其 *ERG6* 基因的功能和表达调控的机制与酵母菌不同所致。为进一步阐明上述问题, 我们拟构建烟曲霉 *ERG6* 基因敲除株, 以从另外一个角度了解烟曲霉 *ERG6* 基因的功能。

致谢 感谢美国德克萨斯大学 MD 安德森癌症中心 Dimitrios P. Kontoyiannis 教授惠赠烟曲霉 AF293、AF293.1, 质粒 pRG-AMA1-*Not*I。

参考文献

[1] White T C, Marr K A, Bowden R A. Clin Microbiol Rev, 1998, 11: 382 ~ 402.
[2] Oshero N, Kontoyiannis D P, Romans A, et al. J Antimicrob Chemother, 2001, 48: 75 ~ 81.
[3] Liu W, May S G, Lionakis S M, et al. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 2490 ~ 2496.
[4] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 (第 3 版). 北京: 科学出版社, 2002.
[5] Jensen - Pergakes K L, Kennedy M A, Lees N D, et al. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42: 1160 ~ 1167.