

## 论著·基础研究

白念珠菌 *ERG3* 基因敲除及其对耐药性的影响王钰婷<sup>1,2</sup>, 刘锦燕<sup>2</sup>, 史册<sup>1</sup>, 赵珺涛<sup>1,2</sup>, 项明洁<sup>1,2</sup>

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院检验科, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院卢湾分院放免检验科, 上海 200020

**[摘要]** **目的**· 构建白念珠菌 *ERG3* 基因敲除株, 分析 *ERG3* 敲除对白念珠菌唑类药物耐药性的影响及其常见耐药基因的表达。**方法**· 使用融合 PCR 和同源重组技术, 以白念珠菌 SN152 菌株基因组 DNA、带有筛选标记的质粒 DNA 为模板构建敲除组件。采用醋酸锂转染法将敲除组件转入 SN152 中, 从而获得 *ERG3*<sup>+/−</sup> 和 *ERG3*<sup>−/−</sup> 菌株。采用微量肉汤稀释法来判断 SN152、*ERG3*<sup>+/−</sup> 和 *ERG3*<sup>−/−</sup> 菌株对唑类药物的耐药性差异, 同时使用实时荧光定量 PCR 检测菌株中的常见耐药基因。**结果**· 获得白念珠菌 *ERG3* 敲除株。*ERG3*<sup>−/−</sup> 菌株对唑类药物的耐药性明显高于 *ERG3*<sup>+/−</sup> 和 SN152 菌株。*ERG3*<sup>−/−</sup> 菌株的常见耐药基因 (*CDR1*、*CDR2*、*MDR1*、*ERG11*) 表达显著上升 (均  $P < 0.05$ )。**结论**· 成功构建白念珠菌 *ERG3* 敲除株。*ERG3* 基因的敲除提高了白念珠菌唑类药物的耐药性, 且该基因表达下调的同时伴随其他耐药基因的表达上调。

**[关键词]** 白念珠菌; *ERG3* 基因; 基因敲除; 耐药性

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.02.004 **[中图分类号]** R519.3 **[文献标志码]** A

Knocking out *ERG3* gene of *Candida albicans* and its effect on drug resistanceWANG Yu-ting<sup>1,2</sup>, LIU Jin-yan<sup>2</sup>, SHI Ce<sup>1</sup>, ZHAO Jun-tao<sup>1,2</sup>, XIANG Ming-jie<sup>1,2</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Radioimmunity and Clinical Laboratory, Luwan Branch, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200020, China

**[Abstract]** **Objective**· To construct the *ERG3* gene knockout strain of *Candida albicans*, and to analyze the effect of *ERG3* knockout on the resistance of *Candida albicans* to azole drugs and the expression of its common resistance genes. **Methods**· Knockout components were constructed with genomic DNA of *Candida albicans* SN152 and plasmid DNA with screening markers as templates by fusion PCR and homologous recombination techniques. The knockout components were transfected into *Candida albicans* SN152 by lithium acetate transfection method to obtain *ERG3*<sup>+/−</sup> and *ERG3*<sup>−/−</sup> strains. The differences of drug resistance in SN152, *ERG3*<sup>+/−</sup> and *ERG3*<sup>−/−</sup> strains to azole drugs were determined by microbroth dilution method. Meanwhile, real-time quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of drug resistance-related genes in the three strains. **Results**· *Candida albicans* *ERG3* gene knockout strains were efficiently constructed. The resistance of *ERG3*<sup>−/−</sup> strains to azole drugs was significantly higher than that of *ERG3*<sup>+/−</sup> and SN152 strains. The expression of drug resistance-related genes (*CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG11*) in *ERG3*<sup>−/−</sup> strains increased significantly (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion**· *Candida albicans* SN152 *ERG3*<sup>−/−</sup> double allelic knockout strain is successfully constructed. The knockout of *ERG3* gene improves the resistance of *Candida albicans* to azole drugs, and the down-regulation of *ERG3* gene expression is accompanied by the up-regulation of other resistance related genes.

**[Key words]** *Candida albicans*; *ERG3* gene; gene knockout; drug resistance

白念珠菌是临床上最常见的条件致病性真菌, 可存在于人体的皮肤、口腔、胃肠道、阴道等部位。一般情况下, 该菌在正常机体中数量较少, 不会引起疾病。当人体免疫力低下时, 其可转换成致病菌引起表浅感染, 严重时则可引发危及患者生命的念珠菌血症<sup>[1-2]</sup>。近年来, 广谱抗生素的滥用以及免疫功能缺陷患者的不断增多致使临床念珠菌的感

染率和死亡率呈上升趋势, 其中以白念珠菌感染最常见<sup>[3-4]</sup>。

临床上用于治疗白念珠菌的常用药物有多烯类、唑类、嘧啶类和棘白菌素类等, 其中三唑类药物 [如氟康唑 (fluconazole, FCZ)、伏立康唑 (voriconazole, VRC)、伊曲康唑 (itraconazole, ITR)] 因其抗菌谱广、疗效显著、生物利用度高和毒副作用低等优点, 常作为临床治疗中的一线用

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81871706); 上海市卫生和计划生育委员会课题 (201840227, 201740069); 上海市黄浦区卫生和计划生育委员会课题 (HKM201702)。

**[作者简介]** 王钰婷 (1995—), 女, 硕士生; 电子信箱: yutingwang95@163.com。

**[通信作者]** 项明洁, 电子信箱: mjxiang123456@126.com。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81871706); Shanghai Municipal Planning Commission of Science and Research Fund (201840227, 201740069); Shanghai Huangpu District Municipal Planning Commission of Science and Research Fund (HKM201702)。

**[Corresponding Author]** XIANG Ming-jie, E-mail: mjxiang123456@126.com。



药。唑类药物的抑菌机制是其可作用于白念珠菌细胞膜麦角固醇合成中的关键酶,使白念珠菌细胞膜甾醇合成通路受阻、细胞膜完整性破坏及菌体内有毒的甲基化固醇类物质累积而达到抗真菌作用<sup>[5]</sup>。然而,在临床频繁的预防经验用药中,耐药性的产生给该类药物的应用带来很大困难<sup>[5-6]</sup>。

甾醇合成通路改变主要是由 $\Delta^{5,6}$ -去饱和酶的失活引起,该酶由 *ERG3* (Ergosterol 3) 基因编码<sup>[7]</sup>。唑类药物通过抑制 14 $\alpha$ -去甲基化酶 (14 $\alpha$ -demethylase, 14-DM) 发挥抑菌作用,当 *ERG3* 发生突变或缺失后就不能编码有活性的 $\Delta^{5,6}$ -去饱和酶,致使中间积聚的产物变成 14 $\alpha$ -甲基法尼醇,它可以代替部分麦角固醇的功能,使细胞继续生长继而导致耐药产生。

本研究在 Noble 等<sup>[8]</sup>提出的构建白念珠菌基因敲除株策略基础上稍作改进,高效获得白念珠菌 *ERG3* 基因敲除

株,并就 *ERG3* 敲除对白念珠菌唑类药物耐药性及其常见耐药基因的表达进行分析,以期为深入研究白念珠菌的耐药机制奠定基础。

### 1 对象与方法

#### 1.1 研究对象、引物及试剂

##### 1.1.1 菌株和质粒

药敏标准白念珠菌 ATCC90028 由本实验室保存, DH5 $\alpha$  大肠埃希菌化学感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司。实验中涉及的其他白念珠菌株和质粒信息见表 1。其中,质粒 pSN40 含有亮氨酸 (leucine 2, LEU2) 筛选标记,质粒 pSN52 含有组氨酸 (histidine 1, HIS1) 筛选标记。

表 1 白念珠菌株和质粒  
Tab 1 *Candida albicans* strains and plasmids

Strain/plasmid	Cenotype or description	Source or reference
SN152 strain	<i>ARG4<math>\Delta</math>/ARG4<math>\Delta</math>LEU2<math>\Delta</math>/LEU2<math>\Delta</math>HIS1<math>\Delta</math>/HIS1<math>\Delta</math>URA3/<i>URA3A::IMM434IRO1/IRO1A::IMM434</i></i>	Noble <sup>[8]</sup> , given from Department of Pharmacology, the Second Military Medical University
pSN40 plasmid	Derived from <i>C.m</i> with <i>LEU2</i> screening marker	Given from Department of Pharmacology, the Second Military Medical University
pSN52 plasmid	Derived from <i>C.d</i> with <i>HIS1</i> screening marker	Given from Department of Pharmacology, the Second Military Medical University
<i>ERG3</i> <sup>+/−</sup> strain	<i>SN152* ERG3A::C.mLEU2</i>	This study
<i>ERG3</i> <sup>−/−</sup> strain	<i>SN152* ERG3A::C.mLEU2/ERG3A::C.dHIS1</i>	This study

Note: \*SN152 background; *C.m*—*Candida maltose*; *C.d*—*Candida dublinensis*.

1.1.2 引物 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成,引物序列及合成片段见表 2 ~ 4。

表 2 敲除引物序列  
Tab 2 Primer sequences for knockout

Primer	Sequence (5' → 3')
P2	ccgctgctaggcgcgccgtgAGCTCGGATCCACTAGTAACG
P5	gcagggatgcggccgctgacGCCAGTGTGATGGATATCTGC
P1	AACGTGTGAAACCCAATCC
P3	cacggcgcgcctagcagcggTCGCGTAGTCTTCCTATGGC
P4	gtcagcggccgcacccctgcCTGTGTGACACGTGTGTGATG
P6	AAAGGTTGACGGTGAGTGG
P1'	TTCAATAATAACATAGTGGAGTG
P3'	cacggcgcgcctagcagcggCACAAATAGGGAAAGAAATGG
P4'	gtcagcggccgcacccctgcTTTTGGACATTGACTATT
P6'	ACAGATCCATGTAACCCCTTG

Note: The lowercase letters in the primer sequence were reverse complementary sequences. These primers were used to construct knockout components.

表 3 鉴定敲除组件的引物序列  
Tab 3 Primer sequences for identification of knockout components

Primer	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>LEU</i> left	AGCTTTGTGCGTGAAGAGAC	GATTCCCCTTCAATGTATGC
<i>LEU</i> right	CTTCAGTTATTCCAGTTCC	CGTGGTTTCCTGATTGGGAG
<i>HIS</i> left	CCGTTCGACCAATGAGGATT	ACTTGTGACAAACACAAC
<i>HIS</i> right	TGGTTCAGTTGAGGCTTCTT	CGTGGTTTCCTGATTGGGAG
<i>ERG3</i>	TCCCTAAAGATGGTGCTGTTTCA	ATGGCAGTAGTGGCACGTTTA

**Note:** These primers were used for identification of *ERG3* gene knockout strains.

表 4 耐药基因的引物序列  
Tab 4 Primer sequences for drug resistance

Primer	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>18S</i>	GAGAAACGGCTACCACAT	ATTCCAATTACAAGACCC
<i>ERG3</i>	GCTTCTCATGCTTTCATCCAG	GACAAGCGGTACCATTGACAAC
<i>CDR1</i>	TTTAGCCAG AACTTTCACATGATT	TATTTATTTCTTCATGTTTCATATGGATTGA
<i>CDR2</i>	GGTATTGGCTGGTCCTAATGTGA	GCTTGAATCAAATAAGTGAATGGATTAC
<i>MDR1</i>	TTACCTGAA ACT TTTGGCAAA ACA	ACTTGTGATTCTGTCGTTACCG
<i>ERG11</i>	AACTACTTTTGTTTATAATTTAAGATGGACTATTGA	AATGATTTCTGCTGGTTCAGTAGGT

**Note:** *CDR*—*Candida* drug resistance transporter; *MDR*—multidrug-resistance transporter. These primers were used to detect the expression of related drug resistance genes.

**1.1.3 试剂** Ex Taq 酶、DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker、酵母总 RNA 提取试剂盒 (Yeast RNAiso Kit)、RNA 反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser)、实时荧光定量检测试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq Enzyme) 等购自日本 TaKaRa 公司, 药物 (FCZ、VRC、ITR) 及配置 YPD 培养基和 LB 培养基所需蛋白胨、酵母浸液、葡萄糖等购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 酵母营养缺陷筛选培养基 SD-HIS、SD-LEU 和醋酸锂转化试剂盒购自北京泛基诺科技有限公司, 配置药敏板的 RPMI 1640 培养基和 3-吗啉丙磺酸 (3-Morpholinopropanesulfonic acid, MOPS) 粉末购自美国 Gibco 公司, 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 有限公司, PCR 产物胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司, 无水乙醇、氯仿、异丙醇、酚/氯仿/异戊醇 (24:24:1) 等购自上海试剂一厂。

1.2 实验方法

**1.2.1 白念珠菌基因组抽提** 参照李文静等<sup>[9]</sup>和王影等<sup>[10]</sup>报道的方法对白念珠菌基因组进行抽提。挑取白念珠菌 SN152 的单克隆于 3 mL YPD 培养液, 于 30 ℃ 180 × g 振荡培养 16 h, 13 000 × g 离心 2 min 收集菌体。加入酵母

裂解液 (10% 十二烷基硫酸钠、0.5 mmol/L pH 8.0 乙二胺四乙酸蛋白酶 K) 后, 水浴 65 ℃ 2 h。加入 0.5 mL 酚/氯仿/异戊醇 (24:24:1) 混匀, 于 13 000 × g 4 ℃ 离心 5 min。吸取上清液转至新的离心管, 加入等体积氯仿, 混匀后离心。转移上清液至新的离心管, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 充分混匀后离心。弃去上清液, 沉淀用 0.5 mL 75% 乙醇洗涤并离心。弃上清, 室温下充分干燥, 加入 50 μL 灭菌去离子水溶解。DNA 采用超微量分光光度仪 (Thermo Nanodrop 2000) 进行定量后, -20 ℃ 保存备用。

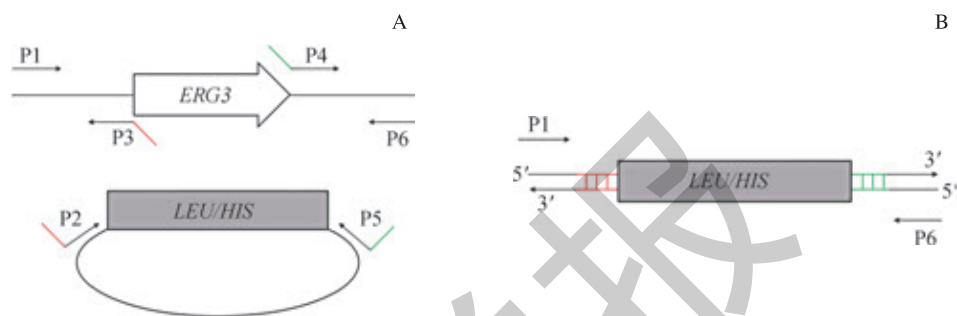
**1.2.2 质粒转化与抽提** 参照李文静等<sup>[9]</sup>和王影等<sup>[10]</sup>报道的方法进行质粒的转化与抽提。采用氯化钙法将质粒 pSN40 和 pSN52 转化至感受态大肠埃希菌 DH5α 内, 将菌液密涂于含氨苄青霉素的 LB 培养基上于 37 ℃ 过夜孵育。挑取该平板上的单克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 ℃ 180 × g 过夜培养, 参照柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒说明书抽提质粒。

**1.2.3 构建同源敲除组件** 以 SN152 菌株 DNA 为模板, P1/P1' 和 P3/P3' 为引物扩增 *ERG3* 基因编码区上游片段 UP-1/UP-2, P4/P4' 和 P6/P6' 扩增下游片段 DOWN-1/DOWN-2。以 pSN40 和 pSN52 质粒为模板, P2 和 P5 为引物扩增筛选标记 *LEU* 和 *HIS* 片段 (图 1A)。PCR 反应条件

为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min (30 个循环); 72 °C 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 并根据 PCR 产物胶回收试剂盒说明书进行纯化回收。

以纯化后的上述 PCR 产物 [上游片段 UP-1/UP-2 (50 ng) + 筛选标记 *LEU* 或 *HIS* 片段 (150 ng) + 下游片段 DOWN-1/DOWN-2 (50 ng)] 为模板, P1/P1' 和 P6/P6' 为引物进行融合 PCR 反应, 分别得到同源敲除组件 UP-

1-*LEU*-DOWN-1、UP-2-*HIS*-DOWN-2, 前者用以第 1 拷贝敲除而后者用以第 2 拷贝敲除 (图 1B)。融合 PCR 反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 52 °C 50 s, 68 °C 8 min (30 个循环); 68 °C 15 min。融合 PCR 产物经乙醇沉淀法回收, -20 °C 保存备用。融合片段即同源敲除组件送铂尚生物技术 (上海) 有限公司测序, 并使用 DNAMAN 软件进行多重序列比对, 证实序列的正确性。



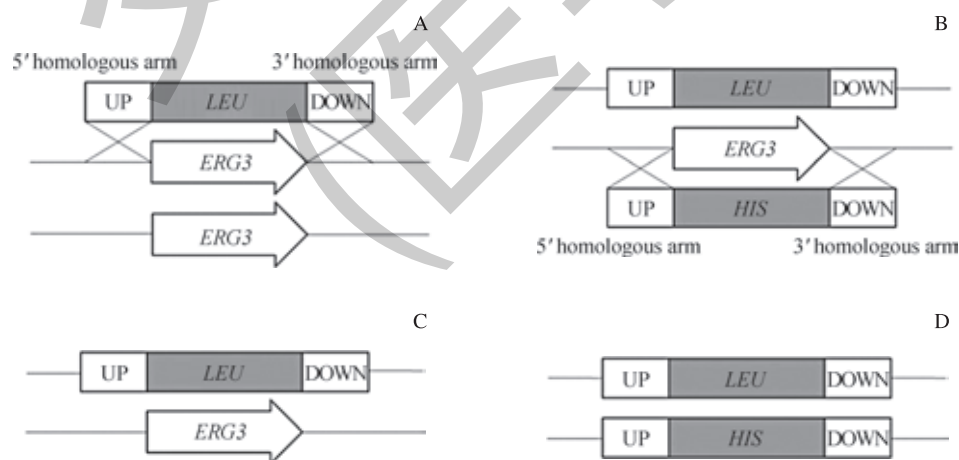
**Note:** A. Amplification of the upstream and downstream fragments of *ERG3* gene and screening markers of *LEU* and *HIS*. The red parts of P2 and P3 were reverse complementary, while the green parts of P4 and P5 were reverse complementary. B. Fusion PCR.

图 1 构建同源敲除组件

Fig 1 Construction of homologous knockout fragments

**1.2.4 目的基因 *ERG3* 敲除株的构建与鉴定** 按照醋酸锂转染法<sup>[11]</sup> 将第 1 拷贝敲除组件 UP-1-*LEU*-DOWN-1 转染到 SN152 菌株。在 SD-*LEU* 选择平板上培养 48 h, 挑单克隆于 YPD 培养液中过夜培养, 抽提基因组 DNA。采用套式 PCR 鉴定, 得到 *ERG3*<sup>+/−</sup> 菌株 (图 2)。LEU 上下游片段分别位于 P1、P3 的上游和下游, 引物 LEU 上下游片段

位于 LEU 标记的内部, 可鉴定第 1 拷贝敲除组件是否正确插入目的基因的所在位置 (图 3)。经套式 PCR 鉴定正确的 *ERG3*<sup>+/−</sup> 菌株, 用于转染第 2 拷贝敲除组件 UP-2-*HIS*-DOWN-2, 菌液密涂于 SD-*LEU*、SD-*HIS*、SD-*LEU*-*HIS* 选择性培养基上, 其余步骤及套式 PCR 鉴定原理同上。引物 *ERG3*-F 和 *ERG3*-R 用于鉴定目的基因是否被完全敲除。

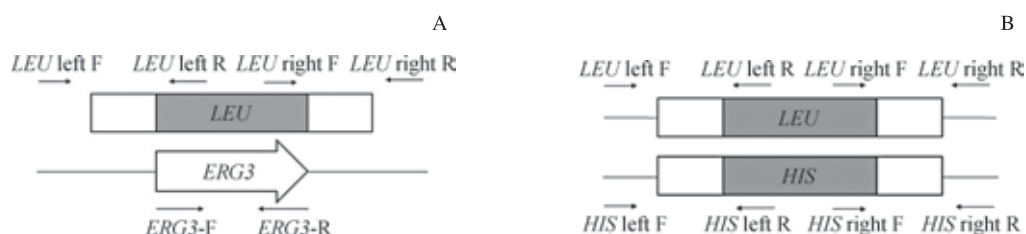


**Note:** A. Knockout of the first allele. B. *ERG3*<sup>+/−</sup> strain. C. Knockout of the second allele. D. *ERG3*<sup>−/−</sup> strain. The "X" indicated homologous recombination.

图 2 运用同源重组技术敲除 *ERG3* 基因

Fig 2 *ERG3* gene knocked out by homologous recombination





**Note:** A. Identification of *ERG3*<sup>+/+</sup> strain. B. Identification of *ERG3*<sup>-/-</sup> strain.

**图 3** *ERG3* 阳性敲除菌株的鉴定

**Fig 3** Identification of positive *ERG3* gene knockout strains

**1.2.5 药敏试验** 根据美国临床实验室标准化委员会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) M27-A3 相关标准, 使用微量肉汤稀释法确定白念珠菌对 FCZ、VRC、ITR 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。96 孔板中, 使得 FCZ、VRC、ITR 的最高终浓度分别为 128、32、16  $\mu\text{g/mL}$ , 并依次对倍稀释。结果判读参照 NCCLS 抗真菌药敏试验标准, 判定敏感 (susceptible, S)、中介 (intermediate, I)、耐药 (resistance, R) 3 种结果。FCZ MIC  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  为敏感, MIC=16 ~ 32  $\mu\text{g/mL}$  为中介, MIC  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  为耐药。VRC MIC  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  为敏感, MIC=2  $\mu\text{g/mL}$  为中介, MIC  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  为耐药。ITR MIC  $\leq 0.125 \mu\text{g/mL}$  为敏感, MIC=0.25 ~ 0.5  $\mu\text{g/mL}$  为中介, MIC  $\geq 1.0 \mu\text{g/mL}$  为耐药。

**1.2.6 耐药相关基因表达水平检测** 按照酵母总 RNA 提取试剂盒说明书提取 SN152、*ERG3*<sup>+/+</sup> 和 *ERG3*<sup>-/-</sup> 菌株的总 RNA。根据反转录试剂盒对抽提的总 RNA 进行去基因组和反转录反应, 获得 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq 酶试剂盒对 3 株菌株的 cDNA 行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 检测, 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$

30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min (40 个循环)。溶解曲线反应为: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min、95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。引物序列见表 4。每个菌株均做复孔, 重复 3 次, 以 18S RNA 为内参基因, 应用 ABI 7300 SDS 软件系统进行检测,  $C_T$  值通过  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法进行相对基因表达分析。

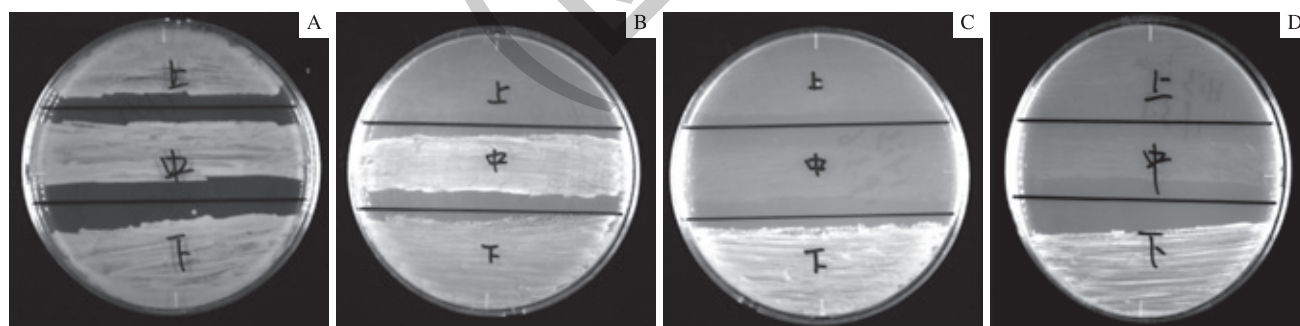
### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7 软件对研究数据进行统计分析。定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析进行比较。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *ERG3* 基因缺失菌株构建成功

白念珠菌 SN152 仅能在 YPD 培养基上生长; 第 1 拷贝敲除株 *ERG3*<sup>+/+</sup> 可在 YPD 培养基和 SD-LEU 营养缺陷培养基上生长; 双敲除菌株 *ERG3*<sup>-/-</sup> 在 YPD、SD-LEU、SD-HIS 和 SD-LEU-HIS 缺陷培养基上均可生长 (图 4)。继而说明 *LEU* 和 *HIS* 筛选标记已成功转入 SN152 菌株并表达。

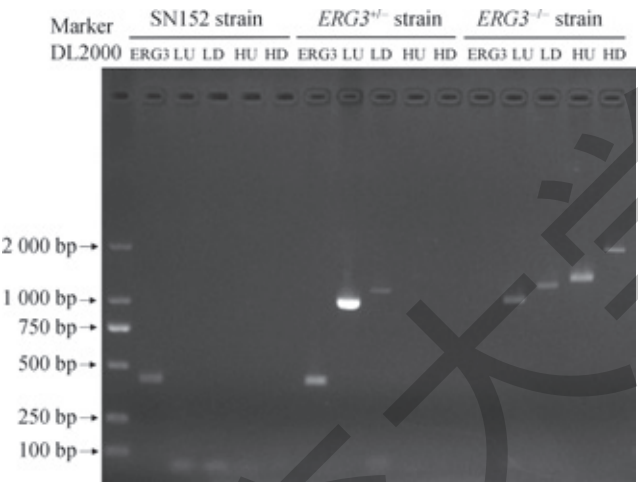


**Note:** A. YPD medium. B. SD-LEU minus medium. C. SD-HIS minus medium. D. SD-LEU-HIS minus medium. Top part—SN152 strain; Middle part—*ERG3*<sup>+/+</sup> strain; Bottom part—*ERG3*<sup>-/-</sup> strain.

**图 4** 菌株营养型鉴定

**Fig 4** Identification of nutritional type in strains

为了进一步验证敲除组件是否正确插入目的基因所在位置, 需采用套式 PCR 进行验证。利用 *LEU* 上下游引物扩增出 *LEU* 上下游片段, 长度分别为 1 009 bp 和 1 155 bp; 利用 *HIS* 上下游引物扩增出 *HIS* 上下游片段, 长度分别为 1 214 bp 和 1 906 bp。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 各筛选标记已转入亲本菌基因组序列的正确位置, 目的条带与预期一致。*ERG3* 双敲株的 4 个鉴定片段 (*LEU* 上下游片段、*HIS* 上下游片段) 均在预期位置且目的基因 *ERG3* 位置无条带出现; 而亲本菌 SN152 只有 *ERG3* 片段 (454 bp)、无 4 个鉴定片段 (图 5)。由此提示, *ERG3* 基因敲除成功。



**Note:** ERG3—internal amplification fragment of *ERG3* gene with 454 bp; LU—upstream fragment of *LEU* in knockout strain with 1 009 bp; LD—downstream fragment of *LEU* in knockout strain with 1 155 bp; HU—upstream fragment of *HIS* in knockout strain with 1 214 bp; HD—downstream fragment of *HIS* in knockout strain with 1 906 bp.

**图 5** PCR 验证 *ERG3* 基因敲除株  
**Fig 5** Identification of *ERG3* gene knockout strains by PCR

2.2 *ERG3* 基因敲除对白念珠菌唑类药物耐药性的影响

用标准菌株 ATCC90028 作为对照, 比较野生型菌株 SN152、单拷贝缺失株 (*ERG3*<sup>+/−</sup>)、双拷贝缺失株 (*ERG3*<sup>−/−</sup>) 对唑类药物敏感性的变化。前述菌株对 FCZ、VRC、ITR 的 MIC 值显示, *ERG3*<sup>+/−</sup> 株与野生型 SN152 菌株均表现出对以上 3 种唑类药物一致的敏感。*ERG3*<sup>−/−</sup> 株的 MIC 值明显高于 *ERG3*<sup>+/−</sup> 株和 SN152 菌株; 且当 *ERG3* 基因被敲除后, 白念珠菌对唑类药物的耐药性增强, 即由敏感转为耐药 (表 5)。

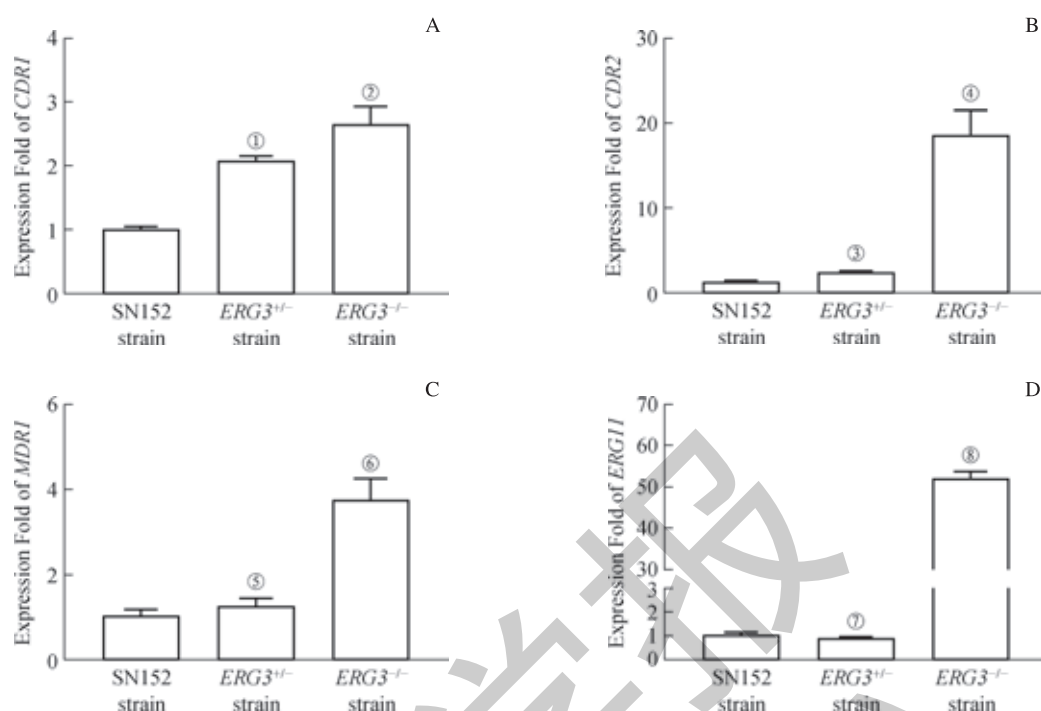
**表 5** 各菌株对 FCZ、VRC、ITR 的 MIC 值  
**Tab 5** MIC values of FCZ, VRC and ITR in different *Candida albicans* strains

Strain	MIC/ (mg · L <sup>−1</sup> )		
	FCZ	VRC	ITR
ATCC 90028	0.25 (S)	≤ 0.125 (S)	≤ 0.125 (S)
SN152	0.25 (S)	≤ 0.125 (S)	≤ 0.125 (S)
<i>ERG3</i> <sup>+/−</sup>	0.25 (S)	≤ 0.125 (S)	≤ 0.125 (S)
<i>ERG3</i> <sup>−/−</sup>	>128 (R)	>16 (R)	>32 (R)

**Note:** (S/R)—the interpretation of drug resistance results.

2.3 *ERG3*<sup>+/−</sup> 株耐药基因水平的变化

在白念珠菌唑类药物耐药机制中, 除了由 *ERG3* 基因编码的Δ<sup>5,6</sup>-去饱和酶参与的甾醇合成通路改变之外, 药物外排增加和唑类药物靶酶的改变也是常见原因。介导白念珠菌药物外排的转运蛋白家族主要有 2 类: 一种是 ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白超家族, 其中最重要的是 CDR1p (*Candida albicans* drug resistance protein 1) 和 CDR2p, 分别由白念珠菌耐药基因 *CDR1* 和 *CDR2* 编码, 它们通过水解 ATP 释放能量将药物转运出细胞<sup>[12]</sup>; 另一种是易化扩散载体超家族 (major facilitator superfamily, MFS), 其中 MDR1p (multidrug-resistance protein 1) 由多药耐药基因 *MDR1* 编码, 它不依赖于水解 ATP 的能量, 而是通过细胞膜中氢离子的交换达到转运药物的目的<sup>[13]</sup>。此外, 14-DM 是由 *ERG11* 基因编码产生的唑类药物的靶酶。若 *ERG11* 基因发生突变或者过表达时, 将会导致白念珠菌产生耐药性<sup>[14-15]</sup>。当 *ERG11* 发生突变, 会影响 14-DM 的空间构象, 使得药物与靶酶结合的亲和力降低; 当 *ERG11* 过表达, 药物作用靶酶量增多, 导致同等药量下, 未被药物结合的靶酶量也相应增高, 药物不能达到预期的抗菌效果, 从而产生耐药。因此为了探究 *ERG3* 基因敲除是否也与白念珠菌其他耐药机制相关, 故采用 qPCR 检测各菌株中前述耐药基因 (*CDR1*、*CDR2*、*MDR1*、*ERG11*) 的表达情况, 以 SN152 作为对照 (图 6)。结果显示, 与 SN152 相比, *ERG3*<sup>+/−</sup> 株的 *CDR1* (2.05 倍) 表达上升, 但 *CDR2*、*MDR1* 和 *ERG11* 无显著变化; 而 *ERG3*<sup>−/−</sup> 株的 *CDR1* (2.63 倍)、*CDR2* (18.47 倍)、*MDR1* (3.72 倍)、*ERG11* (51.71 倍) 表达均显著上升, 尤以 *ERG11* 的上调最为显著。由此可见, *ERG3* 基因敲除的同时伴随着其他耐药基因的高表达。



**Note:** A. The expression of *CDR1*. B. The expression of *CDR2*. C. The expression of *MDRI*. D. The expression of *ERG11*. <sup>①</sup>  $P=0.004$ , <sup>②</sup>  $P=0.000$ , <sup>③</sup>  $P=0.629$ , <sup>④</sup>  $P=0.000$ , <sup>⑤</sup>  $P=0.586$ , <sup>⑥</sup>  $P=0.000$ , <sup>⑦</sup>  $P=0.986$ , <sup>⑧</sup>  $P=0.000$ , compared with SN152 strain.

**图 6** 各菌株耐药相关基因的表达

**Fig 6** Expression of drug resistance-related genes in the three strains

### 3 讨论

基因敲除技术是研究白念珠菌基因功能的重要方法。经典的白念珠菌基因敲除方法为 URA-Blaster 策略, 该方法以基因同源重组为基础, 通过连续 2 次的 hisG-URA3-hisG 敲除筛选组件替代靶基因的 2 个等位基因, 从而阻断靶基因的功能<sup>[16-17]</sup>。URA-Blaster 策略是最早用到营养筛选的白念珠菌基因敲除的方法, 但此法需要构建重组质粒, 敲除效率低、周期长; 而且有研究<sup>[18-19]</sup>表明, 乳清苷 5-磷酸脱羧酶 (*URA3* 基因编码) 缺失的白念珠菌生长缓慢, 即使在基因敲除过程中可将 *URA3* 基因恢复, 也同样会影响菌株的毒力、黏附及形态转换等性质。2005 年 Noble 等<sup>[8]</sup>构建了不依赖 *URA3* 的 *HIS1-LEU2-ARG4* 基因敲除策略, 该方法以 SN152 为亲本菌, *HIS1*、*LEU2*、*ARG4* 是异源的筛选标记, 可任意选择 2 个标记进行基因敲除。本实验所采用的 *HIS1-LEU2* 策略回避了 *URA3* 对白念珠菌毒力的影响, 且具有周期短、转染效率高等特点<sup>[20-21]</sup>。此外, Noble 等<sup>[8]</sup>构建的 2 条基因敲除组件上游和下游同源臂 (即 UP 和 DOWN) 均为 350 bp, 存在第 1 条敲除组件被第 2 条敲除组件所替换的可能性, 导致敲除效率降低。本研究在 Noble 等<sup>[8]</sup>的方法基础上稍加改进, 即 UP-1 为 359 bp、DOWN-1 为 470 bp、UP-2 为 354 bp、DOWN-2

为 393 bp, 第 2 条敲除组件的上下游同源臂均短于第 1 条敲除组件的同源臂, 因此可有效避免被替换的情况。

白念珠菌是临床上常见的机会致病性真菌, 唑类药物常作为临床治疗中的一线用药; 然而, 近年来白念珠菌对唑类药物的耐药性日益严重, 已成为治疗失败的主要原因之一<sup>[22]</sup>。白念珠菌对唑类药物存在多种耐药机制, 其中甾醇合成通路的变化主要是因为  $\Delta^{5,6}$ -脱氢酶失活而引起, 从而使唑类药物的作用减弱。Martel 等<sup>[23]</sup>的研究显示, *ERG3* 的错义突变可以引起白念珠菌对唑类药物的耐药性, 部分突变菌株甚至在 FK506 (一种多药物外排抑制剂) 存在的情况下仍体现出唑类耐药表型。Vale-Silva 等<sup>[24]</sup>在临床上筛到了一株分离株 (VSY2), 测序显示该菌株 *ERG3* 双碱基缺失导致  $\Delta^{5,6}$ -脱氢酶失活, 该菌株对唑类药物具有高耐药性, 缺乏麦角甾醇但丝状结构正常。由此可见, 白念珠菌 *ERG3* 的突变或缺失对于其唑类药物耐药性有着重要意义。

在本研究中, 我们使用同源重组和 LEU-HIS 标记筛选的方法获得了白念珠菌 *ERG3* 缺失株。*ERG3*<sup>-/-</sup> 株对 3 种唑类药物的 MIC 值明显高于亲本株 SN152 和 *ERG3*<sup>+/-</sup> 株, 说明只有当 *ERG3* 被完全敲除时, 白念珠菌对唑类药物的耐药性才会升高, *ERG3* 单条基因的缺失不足以引起耐药性的改变, 该耐药性结果与 Luna-Tapia 等<sup>[25]</sup>采用

URA-Blaster 策略获得的 *ERG3* 缺失株结果一致。此外,我们还发现 *ERG3* 基因敲除的同时也伴随着其他耐药基因的改变。qPCR 结果显示, *ERG3*<sup>-/-</sup> 株的 *CDR1*、*CDR2*、*MDR1*、*ERG11* 基因表达水平均显著上升;而 *ERG3*<sup>+/-</sup> 株除了 *CDR1* 基因表达有上升外,其余 3 个耐药基因未显示出差异。*ERG3*<sup>-/-</sup> 和 *ERG3*<sup>+/-</sup> 菌株耐药基因的结果和药敏实验的结果存在一定的一致性。*CDR1*、*CDR2*、*MDR1* 是与外排泵编码相关的基因,这些基因的过表达可导致进入菌体内的药物外排,细胞内药物浓度降低从而导致耐药。而在 *ERG3*<sup>-/-</sup> 株中上升最为显著的是 *ERG11* (51.71 倍),*ERG11* 所编码的羊毛甾醇 14-DM 是唑类药物的作用靶酶,若 *ERG11* 基因过表达将会导致菌株耐药。本研究证实了 *ERG3*<sup>-/-</sup> 株中的外排泵基因 *CDR1*、*CDR2*、*MDR1* 和药物

靶酶编码基因 *ERG11* 的高表达,从基因水平提示 *ERG3* 基因的缺失除了导致白念珠菌甾醇合成通路改变,或也伴随着其他耐药机制的发生。后续可深入检测 *ERG3* 敲除带来的功能变化,即检测 *ERG3*<sup>-/-</sup> 株罗丹明 6G 外排情况和 14-DM 的活性,从而进一步明确 *ERG3* 敲除与菌株药物外排的能力和药物靶酶变化的联系。同时, *ERG3* 基因是如何参与介导白念珠菌对其他唑类药物耐药机制也仍待进一步研究。

综上所述,本研究成功利用同源重组的方法构建了白念珠菌 *ERG3* 基因缺失菌,并对其唑类药物耐药性之间的关系进行了初步探究,揭示了在白念珠菌中敲除 *ERG3* 基因可提高菌株唑类药物的耐药性,为进一步研究 *ERG3* 基因与白念珠菌多种耐药机制之间的关系提供了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4(9): a019778.
- [2] Jia XJ, Li CY, Cao J, et al. Clinical characteristics and predictors of mortality in patients with candidemia: a six-year retrospective study[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(9): 1717-1724.
- [3] Fu JJ, Ding YL, Wei B, et al. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C. albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in Western China[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 329.
- [4] Dadar M, Tiwari R, Karthik K, et al. *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control: an update[J]. Microb Pathog, 2018, 117: 128-138.
- [5] Pais P, Galocha M, Viana R, et al. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection[J]. Microb Cell, 2019, 6(3): 142-159.
- [6] Borman AM, Muller J, Walsh-Quantick J, et al. Fluconazole resistance in isolates of uncommon pathogenic yeast species from the united kingdom[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(8): e00211-e00219.
- [7] Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, et al. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(8): 2404-2412.
- [8] Noble SM, Johnson AD. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*[J]. Eukaryotic Cell, 2005, 4(2): 298-309.
- [9] 李文静,刘锦燕,史册,等.融合 PCR 结合同源重组技术敲除白色假丝酵母菌 *FLO<sub>1</sub>* 基因[J].上海交通大学学报(医学版),2016,36(3): 334-339.
- [10] 王影,吕权真,阎澜,等.白念珠菌簇转录因子编码基因 *mrr2* 敲除与鉴定[J].诊断学理论与实践,2015,14(2): 164-168.
- [11] Walther A, Wendland J. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*[J]. Curr Genet, 2003, 42(6): 339-343.
- [12] Prasad R, Goffeau A. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance[J]. Annu Rev Microbiol, 2012, 66: 39-63.
- [13] Sun N, Li DM, Fonzi W, et al. Multidrug-resistant transporter *mdr1p*-mediated uptake of a novel antifungal compound[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(12): 5931-5939.
- [14] Gołębek K, Strzelczyk JK, Owczarek A, et al. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs[J]. Acta Biochim Pol, 2015, 62(2): 247-251.
- [15] Liu JY, Shi C, Wang Y, et al. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China[J]. Res Microbiol, 2015, 166(3): 153-161.
- [16] Fonzi WA, Irwin MY. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*[J]. Genetics, 1993, 134(3): 717-728.
- [17] Staab JF, Sundstrom P. *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes[J]. Trends Microbiol, 2003, 11(2): 69-73.
- [18] Cheng SJ, Nguyen MH, Zhang ZD, et al. Evaluation of the roles of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express *URA3* from the native locus[J]. Infect Immun, 2003, 71(10): 6101-6103.
- [19] Brand A, MacCallum DM, Brown AJ, et al. Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus[J]. Eukaryotic Cell, 2004, 3(4): 900-909.
- [20] 谭宏月,陈丽华,皇幼明,等.白念珠菌基因敲除技术的研究进展[J].中国真菌学杂志,2012,7(6): 375-379.
- [21] 李星星,李德东,阎澜,等.异源性筛选标记对白假丝酵母菌耐受各种应激的影响[J].第二军医大学学报,2012,33(9): 929-934.
- [22] Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruay-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(12): e383-e392.
- [23] Martel CM, Parker JE, Bader O, et al. Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(11): 4527-4533.
- [24] Vale-Silva LA, Coste AT, Ischer F, et al. Azole resistance by loss of function of the sterol  $\Delta^5,6$ -desaturase gene (*ERG3*) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(4): 1960-1968.
- [25] Luna-Tapia A, Butts A, Palmer GE. Loss of C-5 sterol desaturase activity in *Candida albicans*: azole resistance or merely trailing growth?[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(1): e01337-e01318.

[收稿日期] 2019-07-03

[本文编辑] 张慧俊