

白念珠菌 H310D 突变型 14 α -去甲基化酶的克隆、 表达及活性的初步研究

高平挥 曹永兵 徐 铮 刘洪涛 姜远英*

(第二军医大学药学院药理教研室 上海 200433)

摘 要 利用错配内部引物,采用重组 PCR 方法获得 H310D 突变型白念珠菌 14 α -去甲基化酶 (CYP51) 构建 H310D 突变型 CYP51 蛋白的表达载体 pYCYP51M,转化进入酵母菌 INV_{SC-1} 中,半乳糖诱导蛋白的表达,微量液基稀释法测定表达野生型及突变型 CYP51 蛋白的宿主酵母菌对氟康唑的 MIC。表达的 CYP51 蛋白占微粒体蛋白酶系的 15% ;表达突变蛋白的酵母菌 MIC 值是表达野生蛋白的酵母菌 MIC 值的 2 倍。CYP51 蛋白 H310D 的突变导致表达突变蛋白的酵母菌对氟康唑 MIC 的升高,证明 H310 残基对 CYP51 蛋白与氟康唑的结合有一定作用,为研究新型抗真菌前导化合物寻找新的靶点。

关键词 14 α -去甲基化酶 重组 PCR 微量液基稀释 MIC 值

中图分类号 :Q786 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2003)06-0712-05

近年来,深部真菌感染呈逐年上升趋势,其中白念珠菌是感染人类的主要机会致病真菌。氮唑类化合物是临床治疗真菌感染的主要药物之一,作用靶是 14 α -去甲基化酶 (CYP51),CYP51 在真菌麦角甾醇生物合成通路中起关键作用^[1],氮唑类药物通过与 CYP51 的结合阻断真菌麦角甾醇的合成通路,从而发挥其抗真菌作用。由于抗氮唑类化合物的菌株或菌种所致感染的报道大量出现,因此研究真菌的抗药机制将对新型抗真菌药物的设计研究具有指导意义。大量研究表明,真菌 CYP51 蛋白的变异导致真菌与氟康唑的亲合力下降是真菌产生抗药性的重要原因^[2],MIC 值的升高是一种直观表现^[3]。抗药性真菌中 CYP51 发生单氨基酸变异^[2,4,5]或多个氨基酸同时变异^[2]。国外有学者采用重组 PCR 方法突变 CYP51 蛋白的氨基酸残基,获得真菌的抗药性^[6~8]。

CYP51 是跨膜蛋白,其晶体目前无法纯化得到,根据已知晶体结构的 4 种 P-450 蛋白计算机模建 CYP51 结构成为一种常用手段,并取得较多成果^[9]。在计算机模建的 CYP51 结构中,H310(cat)位于蛋白羟基化反应中心,起传递质子的作用^[10,11],本实验将其突变为酸性氨基酸 D(gat),表达突变型 CYP51,测定表达蛋白菌株的 MIC 值的变化,探讨 H310 位点突变后的 CYP51 与氟康唑结合的变化,从而初步说明 H310 对于 CYP51 与氟康唑的结合有一定作用。

基金项目 国家自然科学基金(39770876);上海市科技发展基金(98QB14009)

* 通讯作者。Tel 86-21-25070371

作者简介 高平挥(1976-),女,长春人,第二军医大学助教,硕士,主要从事真菌抗药机制的研究。E-mail :gaoph@yahoo.com

收稿日期 2003-01-02,修回日期 2003-07-03

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、培养基和培养条件

供体菌为白念珠菌(*Candida albican*)标准株 ATCC 76615,本实验室保存;抗氟康唑的白念珠菌一株(长海医院馈赠的临床分离株);受体菌为大肠杆菌 TOP10F⁻,酵母菌 INV_{SC-1}及表达质粒 pYES2 购于美国 INVITROGEN 公司;含野生型 CYP51 蛋白基因的重组质粒 pGEM3Z(+)-CYP51,命名为 pGCYP51 由本实验室构建。经测序证明 CYP51 基因准确无突变。大肠杆菌 JM109 作为 pGCYP51 的受体菌。分别在 37℃、30℃ 培养白念珠菌、酵母和大肠杆菌。

培养基包括 YEPD 培养基(每升含酵母浸膏 10g,2% 蛋白胨 20g,2% 葡萄糖 20g);SC 选择培养基(酵母基质 6.7g,葡萄糖 20g,添加 16 种氨基酸);SC 诱导培养基(每升含酵母基质 6.7g,半乳糖 20g,添加 16 种氨基酸,尿嘧啶 0.1g);LB 培养基(每升含酵母浸膏 5g,蛋白胨 10g,NaCl 10g)添加氨苄青霉素 0.1mg/mL。

1.2 药品和试剂

氟康唑由第二军医大学附属第一医院—长海医院购入。EX Taq 酶、其它限制性内切酶及 T4DNA 连接酶从日本 TaKaRa 公司购得。PCR 产物纯化试剂盒购于上海华舜生物工程公司。序列测定在上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 H310D 突变型 CYP51 蛋白表达载体的构建

外引物 1:5'-AAATTGCTAAATTTGCTTTGACTACT-3',位于 CYP51 基因序列的 587 ~ 603 位;外引物 2:5'-TGGCATATGCATTCTGAGAGTTTCCTT-3',位于 1247 ~ 1273 位,两引物间的序列包含 Bgl II 和 Nsi I 限制性内切酶位点;内引物 1:5'-TAATGGGTGGTCAA-GATACTTCTGCTT-3',内引物 2:5'-AAGCAGAACTATCTTGACCACCCATTA-3',其中内引物 1、2 是完全互补的,带有 H310D 的突变(CAT→GAT)。首先以 pGCYP51 为模板,外引物 1/内引物 2 和外引物 2/内引物 1 为引物,PCR 反应条件为 94℃ 预热 5min,94℃ 变性 30s,55℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1min,循环 30 次,72℃ 延伸 7min。PCR 产物回收纯化,作为重组 PCR 反应的模板,以外引物 1/外引物 2 为引物,94℃ 5min,94℃ 1min,48℃ 2min,72℃ 3min,循环 30 次,72℃ 7min。PCR 产物带有 H310D 突变,经 Bgl II 和 Nsi I 酶切后连接到 pGCYP51 质粒,测序后再经 EcoR I 和 Hind III 酶切后连接到表达载体 pYES2 中,得到 pYCYP51M。

1.4 H310D 突变型 CYP51 蛋白的表达

pYCYP51M 转化大肠杆菌 Top10 F⁻,LB 平板(含 Amp)上选择阳性转化子;采用原生质体法转化酵母菌 INV_{SC-1},在 SC 选择培养基上选择阳性转化子,阳性单菌落于 250mL SC 中,30℃ 250r/min 振荡 36h,加入半乳糖至终浓度为 2%,培养 20h 以上。参考 Christophe Cullin 微粒体酶系提取方法^[12],利用 Lyticase 破壁提取微粒体酶系,SDS-PAGE 分析。

1.5 表达突变型 CYP51 蛋白的酵母菌对氟康唑 MIC 值的测定

液体稀释法测定 MIC 值^[13],具体方法是:首先用 RPMI1640 培养液调整菌液浓度至 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个/mL;然后取 96 孔板,于每排 1 号孔加 RPMI1640 100 μ L 作空白对照,3 ~ 12 号孔各加新鲜配置的菌液 100 μ L,2 号孔分别加菌液 190 μ L 和氟康唑 10 μ L,2 ~ 11 号孔 10 级倍比稀释,使各孔药物浓度分别为 32、16、8、4、2、1、0.5、0.125 和 0.0625 μ g/mL。12

号孔不加药物作为阳性对照,药敏板于 35℃培养。培养 24h 后,用酶标仪于 620nm 测各孔 OD 值。本实验设置阴性对照(白念珠菌 ATCC76615、酿酒酵母 INV_{SC-1}、转入 pYES2 空载体的酿酒酵母、表达野生型 CYP51 蛋白的酿酒酵母)及阳性对照(抗氟康唑的白念珠菌临床分离株)。与阳性对照孔相比,以 OD 值下降 80% 以上的最低药物浓度孔中的药物浓度作为 MIC 值进行评价,MIC 值高于最高浓度 32μg/mL 时,计为“>32μg/mL”;MIC 值为最低浓度或在最低浓度以下时,均计为“≤0.0625μg/mL”。根据 MIC 值的变化说明突变前后 CYP51 对氟康唑抗性的变化。

2 结果和讨论

2.1 表达载体的构建

以 pGCYP51 为模板,进行两次 PCR 反应,纯化 PCR 反应产物,分别获得大小为 506bp 和 212bp 的产物,再以这两种 PCR 产物为模板,两条外引物进行重组 PCR 反应,获得带有 H310D 突变的 PCR 产物片段,大小为 696bp。该 PCR 产物经 *Bgl* II 和 *Nsi* I 酶切后连接到 pGCYP51 质粒,得 pGCYP51M,在大肠杆菌 JM109 中扩增。pGCYP51M 经 PCR 及 *Eco*RI、*Hind*III 酶切鉴定含有目的片段,测序结果与 GenBank 中的序列(93503)比对,除 H310D 突变外,没有其它变异。将测序正确的质粒 pGCYP51M 经 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切后,回收 1700bp 的片段,表达载体 pYES2 经相同的两种酶消化后,回收载体,再经 T4DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 TOP10F',在含 Amp 的 LB 培养基中选择阳性转化子,经酶切鉴定含有目的片段,再获得含有突变 CYP51 基因的重组质粒 pYCYP51M。

2.2 野生型及突变型 CYP51 蛋白的表达

经上述鉴定的阳性转化子,在大肠杆菌中大量扩增后,抽取质粒后采用原生质体法转

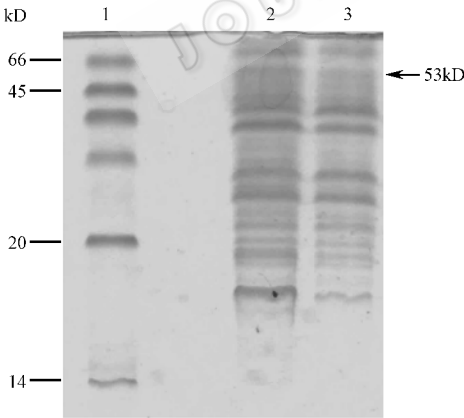


图 1 野生型 CYP51 的 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE of wild CYP51

1. Protein marker 2. The microsome protein extracted, arrow indicated the wild CYP51 3. The negative control (the microsome proteins extracted from the yeast transformed by pYE32).

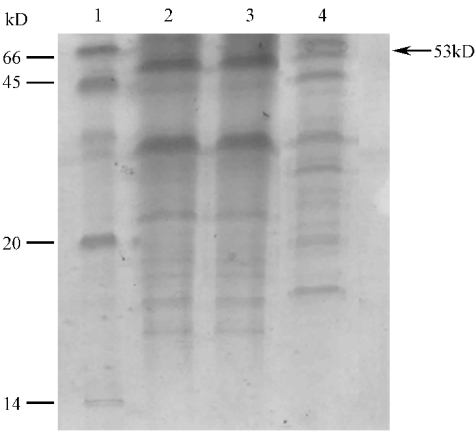


图 2 突变型 CYP51 的 SDS-PAGE 图

Fig.2 SDS-PAGE of H310D mutant CYP51

1. Protein marker 2~3. The microsome extracted from the yeast expressed the H310D mutant CYP51 4. The negative control (the microsome proteins extracted from the yeast transformed by pYES2).

化酵母菌,终浓度 2% 的半乳糖诱导蛋白表达,提取微粒体蛋白酶系进行 SDS-PAGE(图 1 和图 2),所有样品的上样量为 20 μ L,蛋白标准的上样量为 5 μ L,CYP51 的分子量是 53kD 左右。通过图 1 可以看出,在转入野生型 CYP51 重组质粒的酵母菌中,CYP51 的表达量多于转入质粒 pYES2 的酵母菌中 CYP51 的表达。从图 2 的结果可以看出,转入重组质粒 pYCYP51 的酵母菌表达的 CYP51 量大于转入质粒 pYES2 的酵母菌中 CYP51 的表达量。通过 SDS-PAGE 灰度扫描,结果初步确定表达蛋白占微粒体蛋白酶系的 15%。

2.3 MIC 测定结果

采用液基稀释法重复 3 次测定酵母菌对氟康唑的 MIC,结果稳定(表 1)。阴性对照菌的 MIC 远远低于转入 pYCYP51 及 pYCYP51M 质粒的酵母菌的 MIC,表达突变型 CYP51 的酵母菌的 MIC 是表达野生型 CYP51 的酵母菌 MIC 的 4 倍,均低于临床分离的抗氟康唑的白念珠菌。

表 1 不同菌株对氟康唑的 MICs

Table 1 MICs of fluconazole for different strains

Strains	MICs of fluconazole(μ g/mL)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressed CYP51M1	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressed CYP51	4
Resistant <i>Candida albicans</i> *	> 32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformed pYES2	≤ 0.0625
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INV _{SC-1}	≤ 0.0625
<i>Candida albicans</i> Y01.09	≤ 0.0625

* Clinical resistant strain

真菌抗药性的产生是临床治疗深部真菌感染失败的主要原因,对大量临床分离抗药菌株的研究发现真菌抗药性可以由多种原因引起:可以由多药转运泵基因—CDR1、CDR2 及 BENr 过高表达引起^[14,15],也可以由于 CYP51 蛋白的高表达或变异引起抗药性。本实验将 CYP51 中 310 位组氨酸突变为天冬氨酸。结果中菌株Ⅳ和Ⅴ的 MIC 值相同,说明载体的转入不影响真菌对氟康唑的敏感性;菌株Ⅱ的 MIC 高于Ⅳ,表明 CYP51 的表达使酵母菌中 CYP51 拷贝数增加,导致真菌对氟康唑的敏感性下降,证明 CYP51 拷贝数增加是真菌抗药机制之一;菌株Ⅰ MIC 值是Ⅱ的 4 倍,说明 H310D 的突变降低 CYP51 与氟康唑的结合,导致真菌对氟康唑的敏感性下降,MIC 升高,证实 CYP51 变异是真菌抗药性产生的重要原因。结果初步证明 H310 在 CYP51 与氮唑类药物正确结合中发挥重要作用。本研究为进一步了解 CYP51 构效关系奠定基础。

参 考 文 献

[1] 徐 铮,曹永兵,姜远英. 麦角甾醇生物合成途径中的抗真菌药作用靶酶. 国外医学抗生素分册, 2001, 22(5):193 ~ 197.

[2] Dominique S, Francoise I, Luc K, *et al.* Amino acid substitution in the cytochrome P-450 lanosterol 14(demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(2) 241 ~ 253.

[3] Vanden Bossche H, Marichal P, Gorrens J, *et al.* Mutation in cytochrome P-450-dependent 14 alpha-demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem Soc Trans*, 1990, 18 56 ~ 59.

[4] Delye C, Laigret F. A mutation in the 14 alpha-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(8) 2966 ~ 2970.

[5] White T C. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α -demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(7) :1488 ~ 1494.

[6] David C Lamb, Diane E Kelly. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes reduced enzyme ac-

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- tivity and fluconazole resistance through reduced affinity. *The Journal of Biological Chemistry* ,1997 **272** (9) :5682 ~ 5688.
- [7] Steven L Kelly , David C Lamb. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinical through reduced affinity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* ,1999 **262** :174 ~ 179.
- [8] Lamb D C , Kelly D E. The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 **44** (1) :63 ~ 67.
- [9] 季海涛 ,张万年 ,周有骏 ,等. 白色念珠菌羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶三维结构分子模型研究. 生物化学与生物物理学报 ,1998 **30** (6) :585 ~ 592.
- [10] Ji H , Zhang W , Zhou Y , *et al.* A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J Med Chem* ,2000 **43** (13) :2493 ~ 2505.
- [11] Bernhardt R. Cytochrome P450 : structure , function , and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* , 1995 **127** :137 ~ 221.
- [12] Christophe C , Denis P. Synthesis of functional mouse cytochromes P-450 P1 and chimeric P-450 P3-1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* , 1988 **65** :203 ~ 217.
- [13] 曹永兵 ,姜远英. 微量液基稀释法测定化合物特苄康唑的体外抗真菌活性. 中国抗生素杂志 ,2000 **25** (3) :183 ~ 187.
- [14] Sanglard D , Ischer F , Monod M , *et al.* Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents-characterization of CDR2 , a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* , 1997 **143** :405 ~ 416.
- [15] Sanglard D , Kuchler K , Ischer F , *et al.* Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* ,1995 **39** :2378 ~ 2386.

Cloning and Expression of the Mutant 14 α -Demethylase Containing the Alteration of H310D in *Candida albicans* and the Preliminary Study on its Functions

Gao Pinghui Cao Yongbing Xu Zheng Liu Hongtao Jiang Yuanying*

(Department of Pharmacology , Second Military Medical University , Shanghai 200433 , China)

Abstract : The method of recombinant PCR was employed to obtain H310D mutation in 14 α -demethylase in *Candida albicans*). The expression vector pYCYP51M harboring the mutant CYP51M gene was constructed. The mutant CYP51 was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* induced by 2% galactose. At last the MICs of yeasts to Fluconazole were determined by broth microdilution testing. Expressed protein was 15% of the total microsome proteins. The MICs of yeasts expressed the mutant CYP51 were 4-fold as that of the yeasts expressed the wild CYP51. The increase of the MICs was due to the alteration H310D in CYP51. It could be concluded that the residue of H310 was important to the function of CYP51.

Key words : CYP51 , Recombinant PCR , Broth microdilution testing , MICs

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (39770876) , Foundation for Science and Technology Development of Shanghai (98QB14009)

* Corresponding author. Tel 86-21-25070371

Received date 01-20-2003