

啤酒酵母对杀假丝菌素抗性的遗传分析

蔡金科 孙玉琴 刘玉方

(中国科学院微生物研究所, 北京)

杀假丝菌素 (Candididin) 在 $0.8 \mu\text{g/ml}$ 的 YEPG 平板上能完全抑制啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) H802-1B (α , lys2) 及 H802-5D (a , ade, ural) 的生长。将 H802-1B 涂布在含有 $5-70 \mu\text{g/ml}$ 的抗生素平板上分离得到抗性突变体。第一次突变体的最高抗性水平是 $50 \mu\text{g/ml}$, 从 $5-50 \mu\text{g/ml}$ 抗生素平板上共获得 39 株自发突变株, 第二次抗性突变株是将第一次突变体涂布在更高浓度 ($70-90 \mu\text{g/ml}$) 的抗生素平板上分离到的。

部分抗性突变株 ($70 \mu\text{g/ml}$ 和 $90 \mu\text{g/ml}$) 与亲株 H802-5D 交配, 测其分离子的抗性, 所有杂合二倍体表现: 抗性: 敏感性为 2:2 分离现象。

H1121-1A (α , lys2, CAD $_{30}^R$) X H1113-8A (a , ural, CAD $_{30}^R$) 的杂种抗性分离行为: PD(17 个子囊), NPD (2 个子囊) T (4 个子囊)。遗传分析证明, 实验用的抗性突变体有两个显性抗性基因 CAD $_{30}^R$ 和 CAD $_{90}^R$ 。

关键词 杀假丝菌素; 啤酒酵母; CAD $_{30}^R$; CAD $_{90}^R$ 。

杀假丝菌素 (亦称球红霉素, 克念菌素) 是真菌抗生素, 用于治疗假丝酵母致病菌引起的人类疾病, 在实验室可用来防止酵母菌污染。使用过久就会产生抗药性突变株, 而且随着使用年限的增加, 抗药性愈来愈严重。至今国内外杀假丝菌素抗性的遗传机理均未见报道。假丝酵母 (Candida) 属不完全菌纲, 进行遗传分析较困难。我们就选用啤酒酵母作为实验菌进行杀假丝菌素抗性的遗传机理研究。

药物抗性标记对基因工程载体的构建具有很大价值, 至今酵母菌的药物抗性可供载体构建使用的为数甚少^[1], 因此酵母菌抗生素抗性的遗传分析以及抗性基因分离是很重要的。

材料和方法

(一) 实验菌株

酵母菌 A364A (a , ade1, ade2, ural, his7, lys2, tyr1, gcl1) 加州大学 R. W. Mortimer 教授赠。E4-2D (α , 野生型) 本组保藏。上述二

株菌用细胞杂交法形成杂合二倍体, 随机挑选杂种 H802 的单倍体菌株 H802-1B (α , lys2) H802-5D (a , ade, ural) 为实验出发菌株。

(二) 培养基

1. YEPD 培养基: 其组成为 (%): 酵母粉 1, 多肽 2, 葡萄糖 2, 固体培养基加琼脂。常规培养酵母菌用。

2. McClary 等人培养基: 其组成为 (%): KAC 0.98, 葡萄糖 0.1, 酵母粉 0.25, 琼脂 2。生孢子用

3. YEPG 培养基: 除以 3% 甘油取代葡萄糖外其它组成同 YEPD。选择杀假丝菌素抗性突变体用。

4. YNB 培养基: 为基本培养基, 加上突变体营养要求物质, 2% 葡萄糖。供四分体分析用。

(三) 杀假丝菌素抗性突变株的分离

将 H802-1B 单倍体菌株接在 YEPD 斜面上, 于 30°C 培养 16—18 小时, 用生理盐水洗下细胞, 做成菌悬液, 倒入盛玻璃珠的三角瓶中, 充分摇动分散细胞, 离心收集菌体, 用生理盐水洗二

本文于 1985 年 6 月 19 日收到。

杀假丝菌素系福建微生物所赠送。

次,经适当稀释之后,取 0.1ml 菌液分别涂布在含有不同浓度杀假丝菌素(0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 和 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$) YEPG 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3—5 天, 将生长出的单菌落挑出后, 再在含原来浓度抗生素的平板上划线培养, 然后用显微操作器进行单细胞分离, 获得纯系, 冰箱保藏, 供进一步遗传分析。

(四) 突变株抗药性决定子的检测

为检测抗性决定子的控制系统, 将纯化过的抗性菌株划线培养在原来抗生素浓度的 YEPG 平板上, 待菌落形成后, 随机挑选菌落接到含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭 (EB) 的基本培养基 (YNB + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 赖氨酸 + 2% 葡萄糖) 中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养过夜, 消除 DNA, 诱发小菌落形成, 生成的小菌落与另一亲株 H802-5D (a, ade⁻ ural cad⁺) 进行交配, 采取细胞 \times 细胞杂交, 形成正常二倍体杂种。测定杂种在原来浓度抗生素平板上的抗性, 能形成菌落者其抗性受突变株的核基因控制, 反之可能是受线粒体基因所控制^[2-4]。

(五) 遗传分析技术

杂交是采用不同交配型细胞与细胞交配法, 单细胞与单孢分离以及四分体分析方法如前文^[5]。

结果与讨论

(一) 杀假丝菌素抗性突变株的分离

观察 H802-1B 涂布在含不同浓度杀假丝菌素的平板上自发形成的抗性菌落, 发现它的抗药性极限是 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在此抗生素浓度的平板上即可完全抑制其生长。同时在 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗生素平板上未曾出现过自发性抗性突变株菌落 (一次性自发突变株)。从不同浓度抗生素的平板上挑出单菌落, 共获得 39 株突变株 (表 1)。然后对抗性菌株进行单细胞纯化后, 测定其对不同抗生素浓度的抗性。实验表明, 经培养大多数一次自发突变株在原抗生素浓度的平板上生长良好, 仅有少数单孢菌株失去了对抗生素原有的抗性, 成为敏感株。

为分离抗杀假丝菌素更高浓度的突变

表 1 一次抗性突变株的抗性水平

Table 1 Resistance levels of first-step mutants

杀假丝菌素浓度 Concentration of candidicin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	突变体数 Number of mutant
5	20
10	2
20	7
30	5
40	4
50	1
70	0

株, 将所有一次抗性突变株的单孢菌株分别制成菌悬液, 涂布在 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 杀假丝菌素平板上, 培养后发现其中极少数菌株能在 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗生素平板上生长 (表 2), 即为二次突变株。进而对二次突变株进行单细胞纯化, 获得纯系供进一步遗传研究用。

表 2 二次抗性突变株的分离

Table 2 Isolation of second-step mutants

一次突变株 First-step mutant	抗性 Resistance ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	二次突变株 Second-step mutant	抗性 Resistance ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
5-1	5	70	70-1(1)
10-1	10	70	70-2(1)
20-1	20	70	70-3(4) 70-4 70-5 70-6
30-3	30	70	70-7(4) 70-8 70-9 70-10
40-2	40	70	70-11(4) 70-12 70-13 70-14
50-1	50	70	70-15(1)
		90	90-1(3) 90-2 90-3

(二) 抗性突变株决定子的测定

我们选用抗 70 $\mu\text{g/ml}$ 抗生素的抗性菌株,按前述条件进行抗性突变体的选择,挑选出小菌落突变体进行单细胞纯化。从不同来源的抗 70 $\mu\text{g/ml}$ 抗生素菌株中随机选出 24 株失去呼吸能力小菌落突变株,分别与另一亲株 H802-5D (a , ade^- , $ura1$, cad^s) 进行交配,生成杂合二倍体。测定二倍体菌株对原抗生素浓度的抗性,发现大部分菌株仍保持其抗性,也有少数失去抗性。由于 EB 引起酵母菌线粒体 DNA 的消除, H802-5D 又是杀假丝菌素敏感株,因此二倍体的抗性是由抗性突变体的核基因所控制。而少数失去抗性的二倍体菌株,可能是由于突变株线粒体 DNA 的消

除使之抗性消失,也可能是由于抗性基因在杂合状态为隐性等原因引起的,待进一步研究。

(三) 杀假丝菌素抗性突变株的遗传分析

随机挑选 4 株抗 70 $\mu\text{g/ml}$ 抗生素的单细胞菌株(α , $lys2$ CAD^{R_0})与 H802-5D 杂交,结果所有杂合二倍体都能在含 70 $\mu\text{g/ml}$ 杀假丝菌素平板上生长,随后对杂合二倍体进行四分体分析,其结果列于表 3。

从表 3 看出杀假丝菌素抗性在杂合状态呈显性,杂种的交配型分离行为是正常的,同时也证明抗性标记的分离是单因子分离。

表 3 抗性突变体的遗传分析

Table 3 Genetic analysis of resistant mutants

杂 种 Hybrid	杂 交 组 合 Cross combination	表 型 Phenotype (F1)	交配型的分离 Segregation of mating type			抗性标记的分离 Segregation of resistant marker (CAD:cad)			
			2 α :2 a	1 a :3 a	1 α :3 a	2:2	1:3	3:1	0:4
H1111	70-4-1-1(CAD^{R_0}) × H802-5D-2(cad)	+	16	0	1	16	1	0	0
H1113	70-2-1-1(CAD^{R_0}) × H802-5D-2(cad)	+	22	0	0	19	2	1	0
H1116	70-3-1-1(CAD^{R_0}) × H802-5D-2(cad)	+	19	1	0	19	1	0	0
H1121	70-15-1-2(CAD^{R_0}) × H802-5D-2(cad)	+	20	0	0	18	2	0	0

(四) 抗性突变体 CAD 基因的鉴定

在测定杂种分离子的抗性水平时,发现大部分抗性分离子在含 70 $\mu\text{g/ml}$ 杀假丝菌素平板上生长良好,而在含 90 $\mu\text{g/ml}$ 的平板上不生长,但是也有少数抗性分离子在含 90 $\mu\text{g/ml}$ 抗生素的平板上生长良好,同样有少数分离子在含 70 $\mu\text{g/ml}$ 的杀假丝菌素平板上不生长,而在含 30 $\mu\text{g/ml}$ 的平板上正常生长。随机挑选几株抗 30

$\mu\text{g/ml}$ 和抗 90 $\mu\text{g/ml}$ 的杀假丝菌素突变体分别与敏感株 H802-5D-2 交配,测定四分体的抗性标记的分离现象。所有的抗性标记在杂合状态都呈显性,四分体分析结果指出抗性和敏感性的分离比为 2:2,又是典型的单因子分离现象。

(五) 杀假丝菌素基因的等位性测定

随机挑选不同抗性水平的突变体间进行交配,对杂种进行抗性基因的等位性测

定, 其结果列于表 4。实验所用来源不同但抗性水平相同的两株突变株的抗性因子是等位基因, 如 CAD_{90}^R 和 CAD_{90}^R , 而不同抗性水平菌株间杂交, 遗传分析指出两抗性因子是非等位基因, 如 CAD_{30}^R 和 CAD_{90}^R 。

表 4 抗性基因等位性测定

Table 4 Allelism test of resistant genes

杂种 Hybrid	杂交组合 Cross combination	子囊类型 Ascus type (Resistant: sensitive) 2:2 3:1 4:0
H1202	H1121-1A(α , lys2, ade, CAD_{90}^R) × H1113-8A(α , ural, CAD_{90}^R)	17 4 2
H1161	H1111-2C(α , lys2, CAD_{90}^R) × H1121-1B(α , ural, CAD_{90}^R)	0 0 23
H1154	H1116-6A(α , ade, ural, CAD_{90}^R) × H1121-2A(α , lys2, CAD_{90}^R)	1 0 41

根据 Mortimer 等人^[6]所指出的由 X_p 值推算 X_s 值的结果, 这两个基因是属同一连锁群, 相距约 37cM。

随着杀假丝菌素广泛用于治疗人类的疾病, 对此抗生素的抗性现象会日渐出现, 本文报道一部分杀假丝菌素抗性突变体的遗传分析, 将对此抗生素的抗性机理的探讨有所帮助。

参 考 文 献

- [1] Jimenez, A. and J. Davies: *Nature* **287** 869—871, 1980.
- [2] Ahmed, A. and R. A. Woods: *Genet. Res. Camb.* **9**: 179—193, 1967.
- [3] Thomas, D. Y. and D. Wilkie: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**: 368—373, 1968.
- [4] Avner, P. R. et al.: *MGG*, **125**: 9—52, 1973.
- [5] 蔡金科等: 遗传学报, **5**: 9—18, 1978.
- [6] Mortimer, R. K. and D. Schild: *Microbiological Reviews*, **44**: 519—571, 1980.

GENETIC ANALYSIS OF CANDICIDIN RESISTANCE IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Cai Jinke Sun Yuqin Liu Yufang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Candicidin completely inhibited the growth of *Saccharomyces cerevisiae* H802-1B (α lys2) and H802-5D (α ade ural) on YEPG plates containing 0.8 μ g/ml of the drug. Resistant mutants were selected by spreading H802-1B on plates containing in concentrations from 5—70 μ g/ml of candicidin. Plates experiments showed that the highest level of resistance observed in the first step mutation was 50 μ g/ml. 39 spontaneous mutants were isolated from plates containing from 5—50 μ g/ml. The second step mutants were isolated from cells of first step mutants by plating on higher concentration of candicidin (70—90 μ g/ml).

Some of the mutants resistant to 70

μ g/ml and 90 μ g/ml were crossed to a original strain H802-5D and individual segregants were tested for the resistance. A strict 2:2 segregation of resistance:sensitivity was seen in the all heterozygous diploids.

Hybrids H1121-1A (α lys2 CAD_{90}^R) × H1113-8A (α ural CAD_{90}^R) gave resistance patterns as follows: PD (17 asci), NPD (2 asci), T (4 asci). Genetic analysis of these mutants demonstrated the existence of two dominant resistance genes: CAD_{30}^R and CAD_{90}^R .

Key words

Candicidin; *Saccharomyces cerevisiae*; CAD_{30}^R ; CAD_{90}^R