

## 逆转座子样元件 Tca1 用于白色念珠菌的分类鉴定\*

陈江野 符 峰

(中国科学院上海生物化学研究所分子生物学国家重点实验室 上海 200031)

**摘 要** 已分离到一中等重复序列以及具有逆转座子样结构的元件 Tca1(Transposon *Candida albicans*)。Tca1 两端存在两个完全相同同向排列的序列 LTR(Long Terminal Repeat)388bp, 中间被一 5.5kbDNA 片段隔开。以 alpha 及 Tca1 为探针针对 40 多种来自美国和中国临床分离到的致病菌株进行杂交分析, 根据杂交图谱, 这些白色念珠菌可被分成若干组, 令人感兴趣的是来自同一地区菌种的遗传相关性比来自不同地区的大。比较 URA3 等基因的杂交结果, 支持这种分析。尚未观察到 alpha 重复序列与其他酵母菌染色体 DNA 杂交的杂交条带, 认为 Tca1 元件也许与 *C.albicans* 的遗传进化及其致病性有某种内在联系。

**关键词** 白色念珠菌, alpha 重复序列, Tca1 元件, 分类鉴定

至今已发现有一百多种念珠菌 (*Candida*), 其中 10 多种能致病, 致病能力最强就数白色念珠菌 (*Candida albicans*), 能引起组织表面及深处的念珠菌病 (Candidiasis)<sup>[1]</sup>。白色念珠菌是人类及动物体共生微生物菌丛之一。机会性地引起口腔炎, 阴道炎及多种皮肤炎症。白色念珠菌没有性别变化, 以两态 (酵母菌和菌丝态) 的形式存在, 种之间的表型、基因型差异较大。早期人们基于真菌的表型特征对菌种进行分类<sup>[2]</sup>, 但表型并不能反映菌种之间的遗传相关性。用血清型来分析白色念珠菌只能分成 A、B 两亚型<sup>[3]</sup>, 远不能说明白色念珠菌的多态性。根据其染色体核型 (karyotype) 的分析<sup>[4]</sup>, 认为表型变化可能是白色念珠菌遗传不稳定性结果。1993 年 Agudo 等人<sup>[5]</sup>利用 DNA 探针建立了一种白色念珠菌分类鉴定的方法, Bostock 等人<sup>[6]</sup>利用 PCR 方法也对白色念珠菌进行了分子分型 (molecular typing)。Scherer 等人<sup>[7]</sup>和 Sadhu 等人<sup>[8]</sup>曾分别从白色念珠菌染色体 DNA 中分离到一系列分散的 (dispersed) 重复序列, 以此为探针, 可把白色念珠菌与其他酵母菌区别开来, 并用于白色念珠菌亚种的分型。分子分型的方法现已广泛应用于各个领域, 如水稻, Morris Levy 等人<sup>[9]</sup>根据稻瘟病致病菌一重复序列 MGR 的 DNA 指纹图谱, 解析了病变型的多样性, 最近菲律宾的陈达虎 (待发表) 用 MGR586 探针对 2000 多株水稻进行基因组分组分类, 提出了一种全新的很有价值的杂交育种方法。

作者在寻找与白色念珠菌形态变化有关的基因时, 从 SC5314 菌的染色体 DNA 中分离到一个 500bp 重复序列, 称之为 alpha<sup>[10]</sup>, alpha 以多拷贝的形式存在于不同的染色体中, 分析这些 alpha 重复序列时发现了具有逆转座子样结构的 Tca1, Tca1 两端存在两个完全相同同向排列的重复序列 LTR, LTR 与 alpha 除一个碱基不同外完全相同,

\* 本课题得到国家自然科学基金和上海市青年科技启明星计划资助。

本文于 1995 年 1 月 4 日收到。

Tca1 的转录受温度调节, 25℃ 的转录产物大于 37℃ 的转录产物。以 alpha 及 Tca1 为探针与白色念珠菌 EcoR I 酶解的染色体 DNA 进行杂交, 证明 alpha 重复序列不仅仅具有 *C.albicans* 的种的特异性, 而且能反映出其亚种之间的内在联系。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

白色念珠菌中, No.1~7, 9~22, 30, 31 由美国欧文加州大学 William A F 教授赠送, No.8 和 No.23~29 由美国辛辛那提大学 Lober J C 教授赠送, No.32~40 由中国医学科学院皮肤病研究所吴绍昭教授赠送。其他酵母菌中, 部分菌种由中国科学院上海生物工程有限公司龚毅先生赠送, 其余由本组提供。供试的白色念珠菌: 1.SC5314, 2.3C5314 Sondstrom, 3.759, 4.FC-18, 5.5457, 6.C9, 7.792, 8.CBS1755, 9.764, 10.3153a, 11.NCR663, 12.3183A, 13.7721B, 14.707, 15.B44, 16.36086, 17.36082, 18.312, 19.B311, 20.445, 21.Doran, 22.ATCC38696, 23.CBS113, 24.CDS2730, 25.CA1060, 26.CA1161, 27.CA982, 28.C.a001, 29.C.a002, 30.4918-φ, 31.MH315, 32.437, 33.318, 34.Cla, 35.406, 36.Clc, 37.270, 38.C1b, 39.338, 40.400。供试的其他酵母菌, *Candida tropicalis*: 41.CT750, 42.CT 15066, 43.CT DQ, 44.CT DQ tet, 45.CT DZ, 46.CT DZtet; 47.C.neo H99, 48.*Candida parapsilosis* CP 1006, 49.*Candida krusei* 6285, 50.*Candida glabrata* 3628; *Yarrowia lipolytica*: 51.ATCC 86661, 52.ATCC 20688, 53. B412, 54.C3, 55.CX39-74B; 56.*Lodderomyces elongisporys* 28481; *Saccharomyces cerevisiae*: 57.PCY2, 58.S288c, 59. SC 50252, 60. JL 223, 61.YYG 340; 62.*Schizosaccharomyces pombe* Sp 223。

### 1.2 培养基及生长条件

YEPD 培养基用于酵母菌的生长与保存, 30℃ 培养<sup>[11]</sup>。

### 1.3 染色体 DNA 的制备

Scherer 等人<sup>[7]</sup>的方法。

### 1.4 Southern 杂交分析

见 Molecular Cloning<sup>[12]</sup>。

### 1.5 试剂及 Kit

限制性内切酶等酶制剂购自 Boehringer Mannheim 公司, Random Primers DNA Labeling System 购自 BRL 公司。

### 1.6 探针的制备

已报道克隆到一 500bp 的 alpha 重复序列及逆转录转座子样元件 Tca1<sup>[10]</sup>, 分离 alpha 中 300bp Sty I-Kpn I 片段和 Tca1 内部不含 LTR DNA 片段, 用<sup>32</sup>P 标记分别称之为 alpha 探针, Tca1 探针, 从 pUR3 质粒<sup>[13]</sup>分离 1.4kb Xba I-Sca I URA3 基因编码区 DNA 片段, <sup>32</sup>P 标记, 称之为 URA3 探针。

## 2 结果和讨论

### 2.1 alpha 重复序列、Tca1 元件及 URA3 基因与白色念珠菌染色体 DNA 的 Southern 杂交

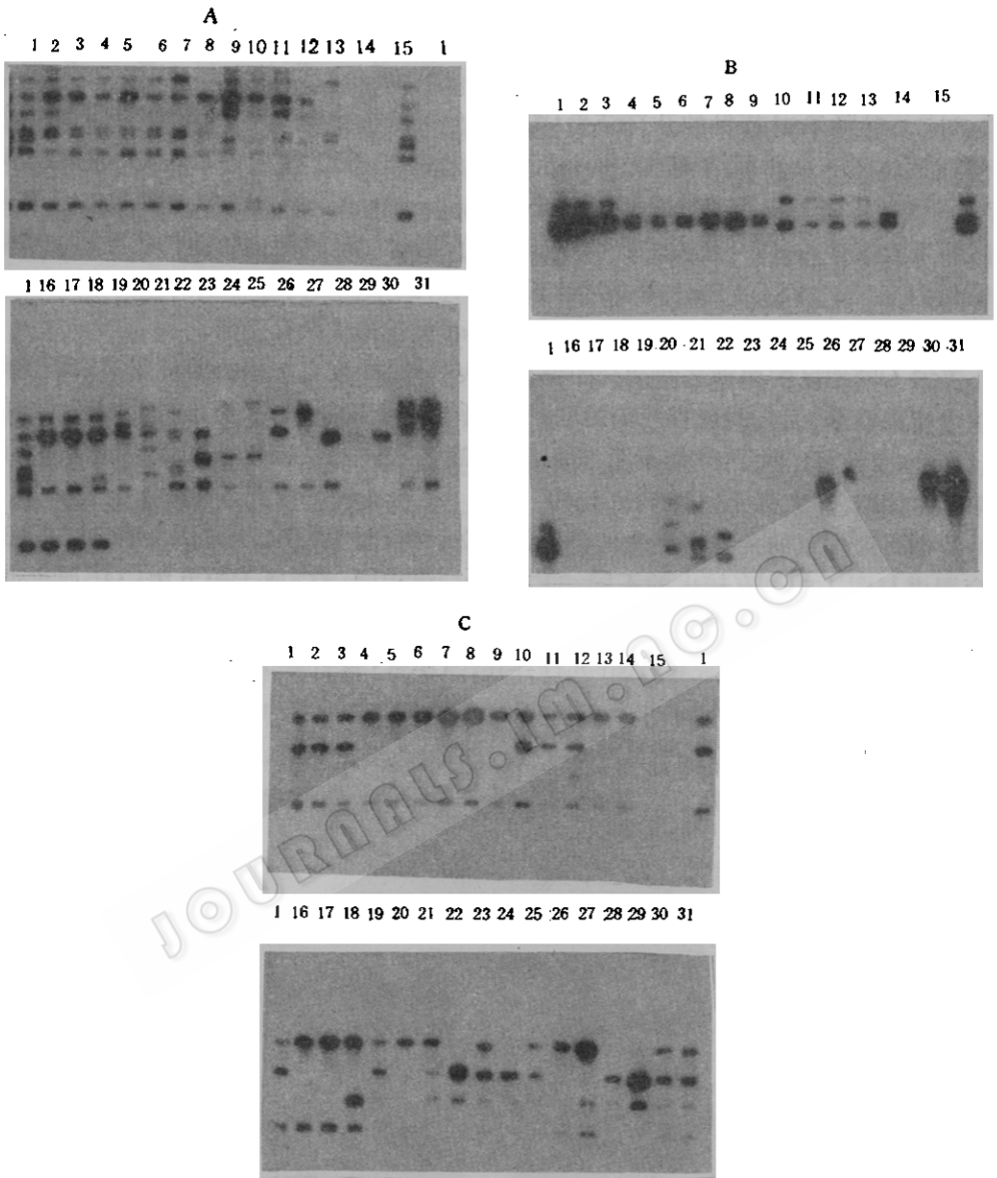


图1 白色念珠菌 Southern 杂交图谱的比较

1~31号菌株来自美国的不同地区,染色体DNA用EcoR I酶解。

A.以alpha重复序列为探针;

B.以Tcal元件内部1.8kb HindIII-EcoR I和0.8kb Nde I片段为探针;

C.以1.4kb Xba I-Sca I URA3编码区为探针。

Fig. 1 Comparison of Southern hybridization patterns of *Candida albicans* strains  
The isolates 1 to 31 are from different areas in USA. The genomic DNA digested with EcoR I.

A. Alpha repeat sequence was used as a probe;

B. Tcal internal 1.8 kb HindIII-EcoR I and 0.8 kb Nde I fragments was used as probes;

C. 1.4 kb Xba I-Sca I URA3 coding region used as a probe.

以 alpha 探针与白色念珠菌 EcoR I 酶解的染色体 DNA 杂交, 根据杂交条带的多态性, 可把 31 种来自美国的白色念珠菌分成若干组(图 1A)。第一组 1<sup>#</sup>~3<sup>#</sup>, 第二组 4<sup>#</sup>~9<sup>#</sup>, 第三组 10<sup>#</sup>~13<sup>#</sup>, 第四组 16<sup>#</sup>~19<sup>#</sup>, 第五组 20<sup>#</sup>~22<sup>#</sup>, 第六组 23<sup>#</sup>~29<sup>#</sup>, 第七组 30<sup>#</sup>, 31<sup>#</sup>。对照 Tcal 探针的杂交结果(图 1B)分组分析。令人感兴趣的是有两组白色念珠菌染色体 DNA 中只含有 alpha repeat 而无完整 Tcal 存在, Tcal 很可能通过两个 LTR 的同源重组环出内部顺序而留下 solo-alpha repeat。用白色念珠菌 URA3 基因编码区顺序为探针, 对同一张膜进行杂交(图 1C), 同样能呈现组内的遗传相关性。我们曾用 actin, CEF3, LYS1, LEU2 等基因片段为探针, 结果也支持这种组内遗传相关性(未显示结果)。从杂交条带的多态性看, alpha-repeat 呈现最佳杂交图谱。

美国不同地区的菌种之间杂交图谱有较大的差异, 来自加州的第一到第四组菌种不仅组内相关性好, 组之间也有一定的联系, 似乎来源于同一祖先, 而来自美国东北部的菌种(Lober 实验室), 除了 8<sup>#</sup>属于第二组, 其余 23<sup>#</sup>~29<sup>#</sup>自成一组, alpha 探针杂交图谱虽与第五组相似, 却大都无完整 Tcal 元件。

我们又对南京的几株白色念珠菌作了杂交分析(图 2A, B), *C. albicans* 32<sup>#</sup>~40<sup>#</sup>的杂交图谱与图 1 的也有较大的不同, 32<sup>#</sup>与第二组相同, 33<sup>#</sup>属于第五组, 34<sup>#</sup>属于七组, 35<sup>#</sup>~38<sup>#</sup>可自成一组, 为第八组。从 alpha 杂交图谱看与第五组相似, 但 Tcal 杂交结果又说明与第六组一样, 无完整 Tcal 元件存在。URA3 探针杂交图谱(图 2C)表明这些菌种之间的遗传相关性不强。

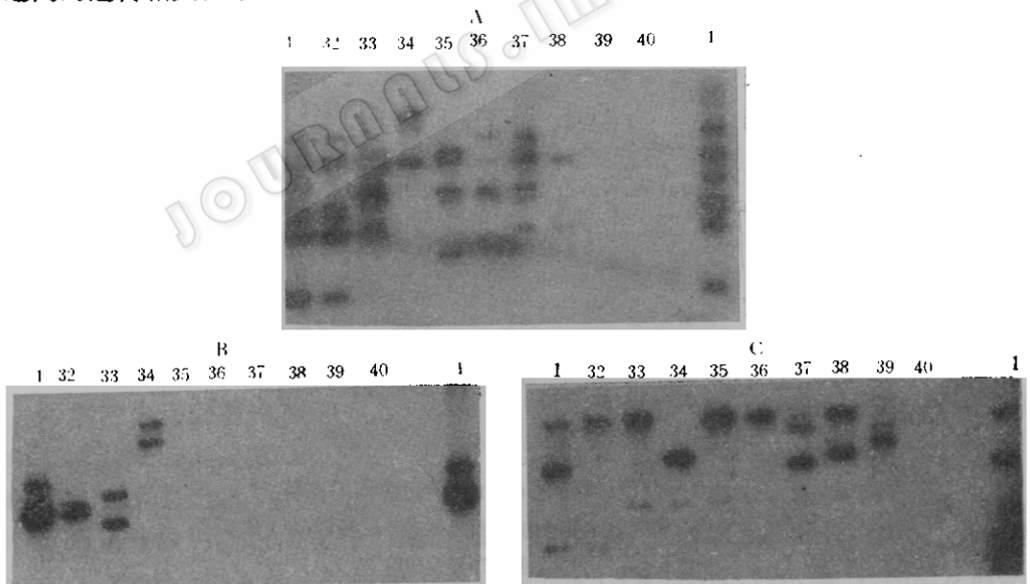


图 2 白色念珠菌的 Southern 杂交分析

32~40 号菌株来自中国南京。染色体 DNA 用 EcoR I 酶解。

A. 以 alpha 重复顺序为探针; B. 以 Tcal 元件内部 DNA 片段为探针; C. 以 URA3 基因片段为探针。

Fig. 2 Southern blot analysis of *C. albicans* strains

No. 32 to 40 which are from China Nanjing. The genomic DNA digested with EcoR I.

A. alpha probe; B. internal fragment probes; C. URA3 probe.

## 2.2 alpha、URA3 探针与非白色念珠菌酵母染色体 DNA 的杂交

用 alpha 探针与 EcoR I 酶解的其他酵母菌染色体 DNA 杂交时, 发现 alpha-repeat 的种族专一性 (species specific) 很强, 包括人肝, 鱼肝, 鸡肝, 鼠肝组织的 DNA, 在非严格的条件下杂交与洗膜时除了对照白色念珠菌 SC5314 外, 未能看到明显的杂交条带。(图版 I-A) 在严格条件下, 同一张膜用 URA3 探针杂交, 虽然大部分菌种 DNA 不能杂交, 但 *S. cerevisiae*, PCY2, JL223 和 *C.p.*CP10006 能给出较强的杂交条带, 相对而言 URA3 的种族专一性比 alpha-repeat 差。利用 alpha-repeat 的种族特异性可对 *C. albicans* 进行菌种鉴定, 如 15<sup>+</sup>, 40<sup>+</sup> 两株菌是作为 *C. albicans* 而被分离的, alpha 探针杂交为阴性结果, 进一步用 actin, URA3, LEU2 等探针也不能杂交, 看来这两株菌不属于 *C. albicans*, 可能是 *Candida* 的其它菌种。39<sup>+</sup> 菌株 DNA 不能与 alpha 探针杂交, 但能与 URA3 探针杂交, 可见 39<sup>+</sup> 不是 *C. albicans*, URA3 杂交条带可能是其种族非特异性同源杂交片段。因此 alpha-repeat 的种族特异性可直接用来确证分离菌是否是白色念珠菌。

## 2.3 alpha-重复序列与其他重复序列的比较

Scherer 等人<sup>[7]</sup>曾用 27A 重复序列对 *C. albicans* 菌种进行分析, Sadhu<sup>[8]</sup>等人曾用 Ca3 鉴定 *Candida*, 认为 Ca3 不仅具有种族特异性而且是菌种特异性 (strain specific), 我们的 alpha 探针与 27A、Ca3 片段不能杂交 (数据没显示), 说明 alpha 与这些 repeat 无同源性, 比较基因库中的核苷酸序列, 也未能找到任一同源序列, 因此认为 alpha-repeat 是一种新的重复序列。分别以 alpha、27A、Ca3 为探针对几种白色念珠菌 EcoR I 酶解的染色体 DNA 杂交 (图 3), 杂交图谱非常不同。从杂交条带的多态性看, 27A 不及 alpha 与 Ca3, 比较图 1、2、3, alpha-repeat 不仅仅具有种族特异性, 而且能反映白色念珠菌亚



图 3 白色念珠菌与不同重复序列的杂交图谱

A. 比较 alpha 重复序列与 27A 重复序列的图谱; B. 比较 alpha 重复序列与 CA3 重复序列的图谱。

Fig. 3 Hybridization patterns of *Candida albicans* strains with different repeat sequence probes

A. Comparison between alpha repeat and 27A;

B. Comparing alpha repeat with CA3.

种之间的遗传相关性,这点 alpha 就优于 Ca3。尽管 *C. albicans* 菌种之间差异很多,用 alpha-repeat 的杂交图谱,似乎能找到它们的内在联系,为 *C. albicans* 亚种的分类提供一新的分子工具。国内的 *Candida* 及 *Candida albicans* 的分类研究已初有报道<sup>[14~16]</sup>,但还停留在形态学与生化试验阶段,因此用 alpha 重复序列来对国内大量的 *Candida* 及 *Candida albicans* 进行分类分型研究是很有应用价值的。

alpha 及 Tcal 的转录受温度控制,低温能诱导转录产物,这与 *C. albicans* 的毒性表现有共同之处<sup>[17]</sup>,25℃生长的 *C. albicans* 的毒性比 37℃生长的强,这是否表明 Tcal 的表达与 *C. albicans* 的毒性表现有某种内在联系?经 alpha 与 Tcal 分型的各组之内,及各组之间菌种的致病性是否也有一定的规律性,这些正有待进一步的研究。

**致谢** 本实验得到美国 UC Irvine 的 William A. Fonzi 教授的帮助与指导,深表感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Odds F C. A Review and Bibliography. London: Bailliere Tindal, 1988.
- [2] Jones J H. *Clin Microbiol Rev*, 1990, 3: 32~45.
- [3] Hansenlever H R, Mitchell W O. *J Bacteriol*, 1961, 82: 570~573.
- [4] Rustchenko-Bulgac E P, Howard D H. *J General Microbiology*, 1993, 139: 1195~1207.
- [5] Agudo L C, Soria A N, Sentandreu R et al. *J Current Microbiology*, 1993, 26: 57~60.
- [6] Bostock A, Khattak M N, Matthews R et al. *J General Microbiology*, 1993, 139: 2179~2184.
- [7] Scherer S, Stevens D A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 1452~1456.
- [8] Sadhu C, Mceachern M J, Rustchenko-Bulgac E P et al. *J Bacteriol*, 1991, 173: 842~850.
- [9] Levy M, Romao J, Machetti M A et al. *The Plant Cell*, 1991, 3: 95~102.
- [10] Chen Jiang ye, Fonzi W A. *J Bacteriol*, 1992, 174: 5624~5632.
- [11] Sherman F, Fink G R, Hieks J B. *Methods in Yeast Genetics*. New York: Cold Spring Harbor, 1986.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- [13] Kelly R, Miller S M, Kurtz M B et al. *Mol Cell Biol*, 1987, 7: 199~207.
- [14] 史国利,周与良.真菌学报, 1991, 10: 318~325.
- [15] 孙鸿祺,林飞卿,秦慧莲,等.中华医学检验杂志, 1988, 11: 92~94.
- [16] 杨文玲,张凤珍,陈桂芳,等.真菌学报, 1993, 12: 71~76.
- [17] Antley P P, Hazen K C. *Infect Immun*, 1988, 56: 2884~2890.

## A RETROTRANSPOSON-LIKE ELEMENT TCA1 WAS USED FOR TAXONOMIC DETERMINATION OF *CANDIDA ALBICANS*

Chen Jiangye      Fu Zheng

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of  
Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

**Abstract** We had isolated from *Candida albicans* a moderately repetitive sequence designated alpha and a retrovirus-like transposable element Tcal(Transposon *Candida albicans*). The Tcal consisted of two 388bp direct repeats of the alpha element, called LTR(Long Ter-

mination Repeat), which was separated by approximately 5.5kb of DNA. A large number of strains from America and China have been grouped based on patterns of hybridization bands visualized on Southern blots of EcoR I digested genomic DNA probed with alpha and Tca1 element internal sequence. Strains from same area have higher relatedness than those from different area. The hybridization patterns with URA3 and other DNA probes were also conserved within the groups. alpha element are species specific, no hybridization was observed with genomic DNA of other yeast species. The data presented here indicate that the alpha element can be employed to distinguish between species and to assess strain relatedness within *C.albicans*, we suggest that Tca1 may be relevant to the genomic evolutions of *C.albicans* and the pathogenic potential of the organism.

**Key words** *Candida albicans*, alpha Repeat sequence, Tca1 element, Taxonomic determination

### 图版说明

#### Explanation of plate

其他酵母菌的杂交分析。63~66 分别为人、鱼、鸡、小鼠的肝脏染色体 DNA 用 EcoR I 酶解。A.alpha 重复序列为探针。杂交条件为 37℃, 10% 甲酰胺, 杂交过夜; 洗膜条件为 37℃, 非严谨条件。B. 以 URA3 基因编码区为探针。杂交条件为 42℃, 50% Formamide, 杂交过夜; 在严谨条件下洗膜。

Autoradiogram of EcoR I -digested DNA from the other yeast strains. No.63 to 66 are human, fish, chicken and mouse liver DNA digested with EcoR I. A.alpha probe. Hybridization was 37℃, 10% formamide, overnight. Washing at 37℃, in less stringent condition. B. Gene coding region used as a probe. Hybridization was 42℃, 50% formamide, overnight. Washing in stringent condition.