

PFGE 在真菌基因研究中的应用

韩 黎 谭耕雯 陈世平

(中国人民解放军总医院 北京 100853)

关键词 脉冲电场凝胶电泳, 真菌, 基因

分类号 Q93-31

脉冲电场凝胶电泳 (Pulsed field gel electrophoresis) 简称 PFGE, 是一种利用外加的正交交变脉冲电场分离大分子 DNA 片段的电泳技术^[1]。它已在细胞基因工程以及 DNA 分析 (> 50~100kb) 中得到广泛应用。最早是用以研究单细胞真核生物的染色体组成, 比如锥虫、疟原虫^[2]及酵母类等。后又渗透到真菌基因研究, 包括染色体核型、连锁群的定位、分子流行病学、酵母人工染色体以及人基因组中含有特定基因或生理标记的特异性片段的构建等。

1 PFGE 与连锁群

从酿酒酵母脉冲电场电泳研究到医学上重要酵母类真菌的分类, 人们已逐渐建立了参数随菌种各异的 PFGE 电泳条件, 以适于不同大小染色体的分离, 获得了一系列酵母类及丝状真菌, 包括四大纲以及非典型真菌的染色体核型及基因组大小 (表 1), 并利用已知基因探针进行染色体连锁群的定位。1987 年, Smith 等^[3]分离得到了粟酒裂殖酵母的 3 条巨大染色体, 使 PFGE 的分辨能力达到了 9mb, 极大促进了该菌株的基因图谱工作的进展。紧接着, 他们又得到了假丝酵母类具有种特异性的电泳核型, 并成为分子流行病学中酵母类致病真菌的分型依据。构巢曲霉的核型是由 Brody 等^[4]利用钳位均匀电场获得的, 同时对 8 个连锁群中的 4 个进行了染色体定位。结果表明, 构巢曲霉低水平的基因组核型变化以及较少的连锁群不平衡性的出现与有丝分裂有关, 也与异核重组打破菌落遗传的平衡有关。另外, 7 株携带构巢曲霉异源 *amdS* 基因的黑曲霉的核型研究表明^[5], 核型图谱不仅可以用于非诱变 *rRNA* 基因的定位, 还可用于估计插入高拷贝转化子中的质粒数目。1994 年, Verdoes 等^[6]人利用 PFGE 技术, 研究了一系列已知染色体大小变异的黑曲霉菌株的基因分布, 获得了清晰的已知克隆基因的染色体分布。不仅如此, 连锁群的确定与研究也促进了基因, 尤其是一些功能结构基因图谱工作的深入。1990 年, Ehringer 等对构巢曲霉的核组蛋白基因家族进行了 PFGE 核型分析, 定位了 8 个基因连锁群^[7]。其中 H3、H4-1 以及 H4-2 基因族均位于 VIII 连锁群, H2A、H2B 基因对则位于连锁群 III 或 VI。到目前为止, 人们已利用 PFGE 技术对真菌的许多重要结构和功能基因进行了染色体定位, 比如 *rDNA* 基因, MEL 基因^[8], *am-ADE 1* 基因^[9], *acu-3* 基因^[10]等。

2 PFGE 与抗药性基因

许多真菌基因组常含有某些分子量较小, 较为恒定的染色体, 但非宿主生存所必需, 称为超数或“B”型

表1 部分真菌的染色体数目与大小

菌种名	染色体数目	单条染色体长度(mb)
<i>Acanthamoeb polyphaga</i>	10	0.2~2
<i>Acanthamoeb castellanii</i>	20	0.22~2
<i>Agaricus bisporus</i>	13	1.2~3.5
<i>Aspergillus nidulans</i>	6	2.9~5.0
<i>Aspergillus niger</i>	4	3.5~6.6
<i>Aspergillus oryzae</i>	7	2.8~7.0
<i>Blastocystis hominis</i>	10~12	0.2~1
<i>Candida albicans</i>	7~9	0.42~3.0
<i>Candida parapsilasis</i>		0.7~3.0
<i>Cercospora kikuchii</i>	7	2.0~5.5
<i>Coccidioides immitis</i>	4	3.2~11.5
<i>Cryptococcus neoformans</i>		
serotype B & C	9	>0.58
serotype A & D	8	>0.7
<i>Dictyostelium discoideum</i>	5	<9
<i>Fusarium</i>	6~9	0.4~6.5
<i>Mucor circinelloides</i>	4~8	2.3~8.1
<i>Naegleria gruberi</i>	23	0.4~2
<i>Neurospora crassa</i>	7	4~12.6
<i>Pachysolen tannophilus</i>	7	1~3.1
<i>Penicillium janthinellum</i>	8~10	2~8
<i>Phaffia rhodozyma</i>	9~17	0.48~3.1
<i>Pneumocystis carinii</i>	16~20	0.32~1.5
<i>Podospora anserina</i>	6	3.8~6.0
<i>Septoria nodorum</i>	14~19	0.5~3.5
<i>Trichoderma harzianum</i>	7	2.8~6.9
<i>Trichoderma reesei</i>	6	2.2~7.4
<i>Trichoderma viride</i>	5	2.2~7.4

约62%的病人在氟康唑治疗期间被白色假丝酵母菌抗药性染色体亚型所感染,但在大多数情况下,很难判断感染菌株是原来敏感株的诱变株还是新的抗性株,所以氟康唑抗性株与敏感株间的基因型比较就十分必要。1994年,Millon等发现白色假丝酵母菌氟康唑抗性株与敏感株具有相似的电泳核型,其中与抗性机制相关的14- α 脱甲基酶基因与该菌核型变化密切相关^[16]。

3 PFGE与分子流行病学

医学真菌的分子流行病学研究方法很多,包括线粒体DNA和基因结构重复单元^[17]或核糖体DNA的限制性酶切图谱,DNA随机扩增多态性^[18],DNA印迹法,PFGE基因组分型等,其中,PFGE是一种更敏感、特异、重复性更好的真菌分类研究工具,每株非相关菌株均有其独特的PFGE电泳核型,这尤其适用于临床真菌分离株的种内分型^[19,20]。

1989年,人们获得了14个由于染色体大小差异造成的具有显著区别的白色假丝酵母电泳图谱。继而Asakura等^[21]分析了从VAGINA的非住院病人分离的白色假丝酵母的电泳图谱,发现各菌株核型显著不同,但都与其中一株FC18相似。另外,对病人身体的不同部位,不同病房的白色假丝酵母的核型分析^[22]也得到了与菌株FC18相似的核型,且没有非典型的核型出现。因此优势核型与流行趋势是否有直接联系尚不可定论,但假丝酵母核型的显著不同与表型,如对鼠侵袭力、紫外线敏感性、体外生长率及在

染色体^[11~13]。令人感兴趣的是“B”染色体上常包含许多抗性基因,其中最著名的是腐皮镰孢的该类染色体上的解毒功能基因——细胞色素P-450基因族。它编码pisatin脱甲基酶,该酶在一定程度上决定该菌对豆科植物的侵袭性。1991年,Miao V. P.等利用PFGE技术对该基因族进行了染色体定位,并利用已克隆的Pda T9基因,定位了Pda基因家族的另一重要成员——Pda 6基因^[14]。该基因族与染色体核型变化相关,其非必需性、可塑性及在有丝分裂期间的不稳定性表明,真菌中某些抗药性基因可能位于基因组的不重要部分,就象细菌的抗性质粒,但有可能导致致病真菌的基因多变性,继而改变真菌对不同植物甚至人体的侵袭性。

另外,利用PFGE分型和体外敏感性试验,研究白色假丝酵母菌株及其氟康唑抗性的变化发现^[15],

pH 3.8 的牛血清白蛋白琼脂上的蛋白酶活性等的许多明显差异密切相关^[23]。

另外, PFGE 在隐球菌的流行病学、病理学研究中的应用也较为广泛。新型隐球菌的临床致病株染色体核型变化显著, 但表型基本稳定; 而环境株的染色体核型却基本不受地理区域的影响, 变化不大^[24]。这表明新型隐球菌的临床致病株的核型图谱与其感染部位、地理位置或宿主状态并非密切相关, 而有可能是在感染过程中新型隐球菌发生了染色体核型的改变。

4 展望

随着更先进、精确的脉冲电场电泳仪及计算机分析技术^[25]的应用, 将有更多物种、更为准确的核型图谱以及所需的基因组, 连锁群或特定基因展现在世人面前。PFGE 与嵌合质粒、YAC 文库、基因微图等其他技术的结合, 将会使我们对真菌, 乃至人类的基因的了解更加全面透彻。

参 考 文 献

- [1] Schwartz D C, Cantor C R. *Cell*, 1984, 37:67~75.
- [2] Kemp D I, Corcoran L M, Coppel R L et al. *Nature*. 1985, 315:347~350.
- [3] Smith C L, Matsumoto T, Niwa O. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15:4481~4489.
- [4] Brody H, Carbon J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6260~6263.
- [5] Debets A J, Holub E F, Swart K. *Mol Gen Genet*, 1990, 224:264~268.
- [6] Verdoes J C, Cail M R, Punt P J et al. *Mol Gen Genet*, 1994, 244:75~80.
- [7] Ehinger A, Denison S H, May G S. *Mol Gen Genet*, 1990, 222: 416~424.
- [8] Turakainen H, Hankaanpaa M, Korhola M et al. *Yeast*, 1994, 10(6):733~745.
- [9] Becher D, Schulze S, Kasuske A et al. *Mol Gen Genet*, 1995, 247(5):591~602.
- [10] Gainey L D, Kolbla K, Connerton I F. *Mol Gen Genet*, 1991, 229(2):253~260.
- [11] Jones R N, Rees H. B Chromosomes. New York: Academic Press, 1982.
- [12] Mills D, McCluskey K. *Mol Plant Microbe Interac*, 1990, 3:351.
- [13] Nagy R, Taborhegyi E, Wittner A. *Microbiology*, 1995, 141(Pt 3): 713~719.
- [14] Miao V P, Sarah F Covert, Hans D V. *Science*, 1991, 254:1773~1776.
- [15] Pfaller M A, Rhine C J, Redding S W et al. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(1):59~64.
- [16] Millon L, Manteaux A, Reboux G et al. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(4):1115~1118.
- [17] Polacheck I, Iebens G, Hicks J B et al. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:925~930.
- [18] Meyer W Mitchell T G, Freedman E Z et al. *J Clin Microbiol*, 1993, 31:2274~2280.
- [19] Merz W G, Khazan U, Jbra Rizk M A. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:449~454.
- [20] Stoltenburg R, Klinner U, Rtzterfeld P. *Curr Genet*, 1992, 22:441~446.
- [21] Asakura K, Iwaguchi S, Homma M et al. *J General Micro*, 1991, 137:2531~2538.
- [22] Doi M, Mizuguchi I, Homma M et al. *J Med Vet Mycol*, 1994, 32:133~140.
- [23] Kwon-Chung K J, Wickes B L, Merz W G. *Infect Immun*, 1988, 56(7):1814~1819.
- [24] Kwon-Chung K J, Wickes B L, Stockman L et al. *Infect Immun*, 1992, 60(5):1869~1874.
- [25] Lalande M, Noolandi J, Turmal C et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(22):8011~8015.

APPLICATION OF PFGE IN FUNGAL GENETICS

Han Li Tan Gengwen Chen Shiping

(Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853)