

## 改良醋酸锂转化法在白念珠菌质粒转化中的实验研究

夏金萍,章珍珍,徐双波,马 鸣,魏 昕\*

(南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室,南京医科大学口腔医学院 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**通过增加白念珠菌细胞壁通透性改良传统醋酸锂转化法的质粒转化率。**方法:**重组质粒经酶切线性化后,分别检测不同二甲基亚砜(DMSO)浓度(1%、5%和 10%)化学处理和热休克时间梯度(0.5、2.0、3.0 和 4.0 h)白念珠菌的质粒转化率,筛选最适宜 DMSO 浓度及热休克时间,构建改良醋酸锂转化法。随后,采用选择性培养法和 PCR 验证比较传统醋酸锂转化法及改良醋酸锂转化法白念珠菌的质粒转化率。**结果:**发现采用 5%的 DMSO 化学处理和将 42℃热休克时间调整为 3 h 后阳性克隆子数量增多最明显。改良醋酸锂转化法的白念珠菌质粒转化率为  $1.5 \times 10^5$  阳性克隆子/ $1 \mu\text{g}$  质粒 DNA/ $10^8$  个细胞,而传统醋酸锂转化法转化率为  $0.6 \times 10^5$  阳性克隆子/ $1 \mu\text{g}$  质粒 DNA/ $10^8$  个细胞。改良醋酸锂转化法的转化率明显高于传统醋酸锂转化法,两种方法质粒转化率的统计学比较存在显著性差异。**结论:**增加二甲基亚砜化学处理和调整热休克时间的改良醋酸锂转化法可以显著提高白念珠菌质粒转化率。

**[关键词]** 白念珠菌;醋酸锂转化法;转化率

**[中图分类号]** R392.12

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)02-199-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170213

## A study of modified lithium acetate transformation for plasmid transformation in *Candida albicans*

Xia Jinping<sup>1,2</sup>, Zhang Zhenzhen<sup>1,2</sup>, Xu Shuangbo<sup>1,2</sup>, Ma Ming<sup>1,2</sup>, Wei Xin<sup>1,2\*</sup>

(Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, School of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** Based on the traditional transformation methods of polyethylene glycol/lithium acetate, the membrane permeability of *Candida albicans* cell was increased by modifying chemical treatment method, and further to change the efficiency of plasmid transformation. **Methods:** The recombinant plasmid was linearized using restriction enzyme, and then the transformation efficiency was detected through adding different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) (1%, 5%, and 10%) or taking various length of heat shock (0.5 h, 2 h, 3 h and 4 h) based on the traditional transformation methods. The optimum concentration of DMSO and the best length of heat shock were determined according to the transformation efficiency experiment. Finally, we cultured the *Candida albicans* on the plates of SC select medium using these two methods to compare the plasmid transformation efficiency between these two groups. **Results:** The efficiency of plasmid transformation using the common method is  $0.6 \times 10^5$  transformants/ $1 \mu\text{g}$  plasmid DNA/ $10^8$  cells, while the efficiency of that using the improved method is  $1.5 \times 10^5$  transformants/ $1 \mu\text{g}$  plasmid DNA/ $10^8$  cells. The differences between those two groups were statistically significant. **Conclusion:** The improved method increases the *Candida albicans* plasmid transformation efficiency.

**[Key words]** *Candida albicans*; lithium acetate transformation; transformation efficiency

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02): 199-202]

白念珠菌的遗传分析因没有完整的生殖周期而受到限制,由于这种限制,转化对真菌类基因的

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81271151,81371156);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2014-37);江苏省高校“青蓝工程”(2012)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: weixinart@163.com

操纵很重要。Kurtz 等<sup>[1]</sup>研究证明白念珠菌的原生质体可以转化外源的 DNA,并将其重新整合到同源基因位点。转化是将外源性的 DNA 导入细胞内的重要技术,最终导致基因的修饰,从而针对性地研究目的基因所调控的生物学意义<sup>[2]</sup>。转化的方法有多种,包括醋酸锂转化法、电转化法、玻璃珠转化法等。

醋酸锂转化法是常用方法,具有操作简便、可靠且无需特殊仪器的特点。醋酸锂转化作用于酿酒酵母(酿酒酵母作为模式生物)最先于 1983 年被报道<sup>[3]</sup>,此方法同样适用于白念珠菌。但是 Sanglard 等<sup>[4]</sup>报道对于白念珠菌来说,其转化率较低,每微克质粒 DNA 只有 50~100 个转化子。近年来此方法不断地改进,简化步骤,提高转化子的数量<sup>[5]</sup>。前期研究发现增加鲑鱼精 DNA,通过调整鲑鱼精 DNA 浓度、质粒 DNA 浓度及细胞数量可提高转化率<sup>[6]</sup>。

由于白念珠菌细胞壁结构中有几丁质,细胞壁厚度增加,与其他大多数真菌相比,转化时质粒进入白念珠菌细胞内部更困难一些。改善白念珠菌细胞壁通透性,有助于提高质粒转化率。基于这个设想,本研究采用二甲基亚砜(DMSO)改变白念珠菌细胞壁通透性,并进一步优化醋酸锂转化法,提高质粒转化效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

白念珠菌 CAI-4 (获赠于 William A. Fonzi, Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University, 美国)(亲本菌是 SC5314,基因型是 *ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434*)<sup>[7]</sup>,质粒 pCaEXP<sup>[8]</sup> (Biovector 公司,北京)。

YPD 培养基:1%酵母提取物、2%蛋白胨(Oxoid 公司,英国),2%葡萄糖(成都 Keshi 公司),100 μg/mL 尿苷(上海源叶生物技术有限公司),选择性营养缺陷培养基 SD-ura-met-cys (北京范基诺有限公司)。聚乙二醇 PEG4000、Tris-EDTA 缓冲液(合肥 Biosharp 公司),乙酸锂、DMSO(Sigma 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 感受态白念珠菌的制备

白念珠菌保存于-70℃,4℃溶解,复苏于含尿苷的 YPD 固体培养基。挑取单克隆白念珠菌,50 mL 含 100 μg/mL 尿苷的 YPD 培养液过夜培养。吸取 0.10~0.25 mL 的过夜培养液转至新鲜的 50 mL 含尿苷的 YPD 培养液,30℃,200 r/min,3~4 h。收集菌液,5 000 r/min 离心 5 min 收获白念珠菌。10 mL 无菌双蒸水洗涤,弃废液。

#### 1.2.2 质粒转化

传统的醋酸锂法:将上述获取的细胞团块重悬于 0.5 mL 提前预冷的 1×TELiAc(TE+LiAc);分别在两个空的灭菌 1.5 mL 离心管中加入 5 μL 10 mg/mL 鲑鱼精 DNA(鲑鱼精 DNA 使用前沸水 5 min,随后立即

放在冰上待用);1 个离心管中加入待转化的 pCa-EXP 质粒载体 1~5 μg DNA,与其中的鲑鱼精 DNA 温和混匀,另 1 个离心管中加入对照的空载质粒 DNA;2 管均加入 0.1 mL 上述菌液,轻微振荡混匀;室温孵育 30 min;2 管再加入 0.7 mL PLATE Mix (PEG+LiAc+TE),上下颠倒混匀,室温孵育过夜。上述菌悬液经 42℃热休克 1 h 后 5 000 r/min,离心 3 min,弃上清,细胞团块重悬于 0.2 mL 灭菌水中,涂布于选择性培养基上;选择性培养板 30℃孵育 2~3 d。

改良醋酸锂转化法:在传统醋酸锂转化法基础上,增加不同浓度(1%、5%和 10%)的二甲基亚砜(DMSO),诱导白念珠菌质粒转化,筛选出 DMSO 的最适宜浓度;在传统醋酸锂转化法基础上调整热休克时间(0.5、2.0、3.0 和 4.0 h),诱导白念珠菌质粒转化,筛选出最佳的热休克时间。与传统醋酸锂化学诱导转化法相比,不同之处在于:在 PLATE Mix 中加入最适宜的诱导表达试剂 DMSO 于离心管内菌悬液,上下颠倒混匀;菌悬液经最佳 42℃热休克时间处理。

#### 1.2.3 转化率检测

选择性培养基筛查:上述实验均在选择性培养基上 30℃孵育 2~3 d,获得的阳性克隆子经菌落 PCR 验证其阳性转化率,以获得阳性转化子供后续实验使用。统计上述实验培养皿中的菌落数,转化后在固体选择性培养基上长出的菌落即为阳性克隆子,根据菌落数可计算出阳性克隆子总数和转化率<sup>[9]</sup>:阳性克隆子总数=菌落数×稀释倍数×转化反应原液总体积/涂板菌液体积;转化率=阳性克隆子总数(个)/质粒 DNA 加入量(μg)/细胞的数量(10<sup>8</sup>)。

#### 1.2.4 菌落 PCR

反应体系 50 μL:2×Mix 25 μL,上游引物(5'-CTC-AAAACGTAATCGTCGGAAG-3')和下游引物(5'-TT-TTAGATACTGCTGGACAAGAAGAATA-3')各 1 μL,菌液 5 μL,ddH<sub>2</sub>O 18 μL。PCR 反应条件:95℃ 8 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 3 min,35 个循环;72℃ 5 min,42℃保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证。

### 1.3 统计学方法

实验结果采用 SPSS 17.0 分析软件进行分析,并且 *t* 检验分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DMSO 浓度和热休克时间

与传统醋酸锂转化法未用 DMSO 处理比较,采用不同浓度 DMSO(1%、5%和 10%)化学处理后的

阳性克隆子数量增多。5%的 DMSO 化学处理阳性克隆子数量增多最明显(图 1), 差异有统计学意义。

采用不同热休克时间 (0.5、2.0、3.0 和 4.0 h) 处理后发现, 将 42℃热休克时间调整至 3 h 后阳性克隆子数量增多最明显。与传统醋酸锂转化法 (1 h 42℃热休克) 相比差异有统计学意义(图 2)。

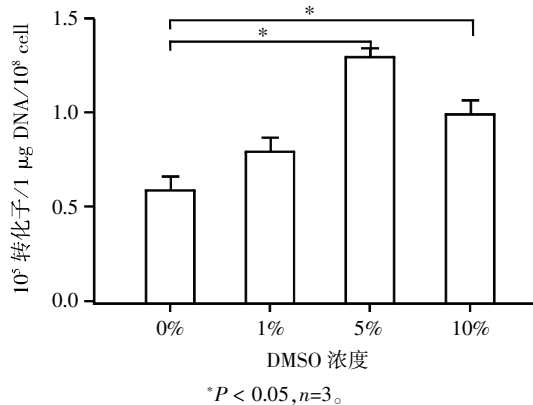


图 1 不同浓度 DMSO 处理下质粒转化率

Figure 1 The transformation efficiency of different concentrations of DMSO

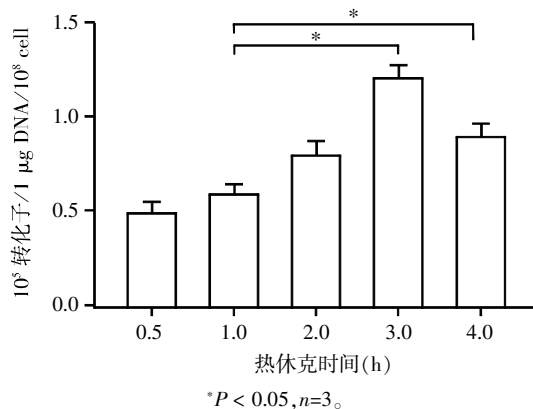


图 2 不同热休克时间处理下质粒转化率

Figure 2 The transformation efficiency of different lengths of heat shock

### 2.2 改良醋酸锂转化法与传统醋酸锂转化法比较

改良醋酸锂转化法阳性克隆子数量增多, 其转化率为  $1.5 \times 10^5$  阳性克隆子/ $1 \mu\text{g}$  质粒 DNA/ $10^8$  个细胞(图 3), 与传统醋酸锂转化法转化率相比有统计学差异。同时, 白念珠菌阳性克隆子经菌落 PCR 检验, PCR 产物由琼脂糖凝胶电泳验证, 结果显示: 改良醋酸锂转化法的阳性转化率更高(图 4B), 而传统醋酸锂转化法的阳性克隆子在多次重复实验中验证的结果假阳性率偏高(图 4A)。

### 3 讨论

传统醋酸锂法的转化原理是利用碱性锂离子

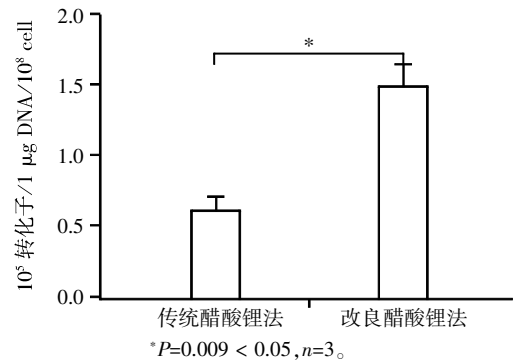
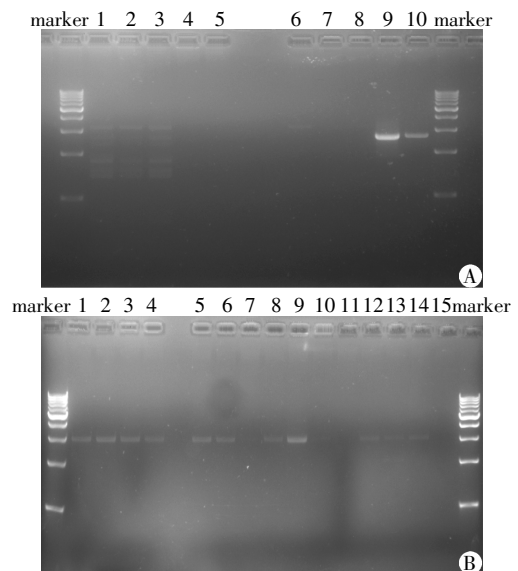


图 3 传统醋酸锂转化法和改良醋酸锂转化法质粒转化率的比较

Figure 3 The comparison of transformation efficiency of two methods



A: 传统醋酸锂转化法; 泳道 1~10 分别表示 10 个阳性克隆子, 其中泳道 9、10 表示阳性转化子; B: 改良醋酸锂转化法; 泳道 1~15 分别表示 15 个阳性克隆子, 其中泳道 1、2、3、4、5、6、8、9、12、13、14 表示阳性转化子。

图 4 传统醋酸锂转化法和改良醋酸锂转化法阳性克隆子菌落 PCR 结果鉴定

Figure 4 The identification of PCR products of transformants of two methods

改变细胞膜的通透性, 促进感受态菌株的形成使细胞易于吸收外源性的 DNA<sup>[10]</sup>。鲑鱼精 DNA 可以保护要转化的 DNA, 主要原因是外源基因被转入真核生物的时候会被识别并被降解, 加入一定的鲑鱼精 DNA, 使得白念珠菌降解鲑鱼精 DNA, 从而保护外源 DNA。另外, 鲑鱼精 DNA 还可能在细胞摄取外源性质粒 DNA 中发挥协助作用。而传统醋酸锂法的转化中的聚乙二醇(PEG)能在高浓度的醋酸锂环境下保护细胞膜; 减少醋酸锂对细胞膜结构的过度损伤; 促进质粒与细胞膜接触更紧密。TE 缓冲液则对

DNA 碱基有保护作用。

本研究中改良醋酸锂转化法是在传统醋酸锂转化方法的基础上增加了 DMSO 和调整了热休克时间。DMSO 与水可形成氢键, 故具脂溶性和水溶性, 并具有高度的穿透性和运载能力<sup>[11]</sup>。热休克在转化机制中起着重要作用<sup>[12]</sup>, 热休克蛋白作为分子伴侣, 在压力诱导下对结构性蛋白和酶起保护作用。热休克诱导的特殊蛋白的改变可能会影响质粒 DNA 的转运<sup>[13]</sup>。白念珠菌在 42℃ 经热冲击处理后立即冰浴, 在冷热变化刺激下产生裂隙, 使外源 DNA 进入, 促使细胞吸收质粒 DNA。因为白念珠菌的细胞壁较厚, 所以我们增加了热休克的时间, 利于质粒 DNA 穿越白念珠菌的细胞壁和细胞膜, 提高转化率。本研究在传统转化法的基础上经改良后质粒转化率有所提高。目前各文献报道质粒转化率各不相同, 但研究表明, 关于转化的精确机制至今尚不明确<sup>[10]</sup>, 因此需要进一步研究以利于增加转化效率。

#### [参考文献]

- [1] Kurtz MB, Cortelyou MW, Kirsch DR. Integrative transformation of *Candida albicans*, using a cloned *Candida ADE2* gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(1): 142-149
- [2] Gietz RD. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1205(1): 1-12
- [3] Ito H, Fukuda Y, Murata K, et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations[J]. *J Bacteriol*, 1983, 153(1): 163-168
- [4] Sanglard D, Ischer F, Monod M, et al. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(10): 2300-2305
- [5] Gietz RD, Schiestl RH. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 38-41
- [6] Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure[J]. *Yeast*, 1995, 11(4): 355-360
- [7] Rowbottom L, Munro CA, Gow NA. *Candida albicans* mutants in the BNI4 gene have reduced cell-wall chitin and alterations in morphogenesis[J]. *Microbiology*, 2004, 150 (Pt 10): 3243-3252
- [8] Care RS, Trevethick J, Binley KM, et al. The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics[J]. *Mol Microbiol*, 1999, 34(4): 792-798
- [9] Gietz R D, Woods R A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 313: 107-120
- [10] Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism[J]. *Bioeng Bugs*, 2010, 1(6): 395-403
- [11] Kakolyri M, Margaritou A, Tiligada E. Dimethyl sulphoxide modifies growth and senescence and induces the non-revertible petite phenotype in yeast[J]. *FEMS Yeast Res*, 2016, 16(2): fow008
- [12] Munna MS, Humayun S, Noor R. Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01[J]. *BMC Res Notes*, 2015, 8: 369
- [13] Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones[J]. *Ann Rev Biochem*, 1991, 60: 321-347

[收稿日期] 2016-03-29