

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：线粒体蛋白 Mcu1 通过呼吸代谢调控白念珠菌共生的
分子机制研究

姓 名：马铭杨 学 号：20307110003

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学（强基计划）

指导教师：黄广华 职 称：教授

单 位：生命科学学院

完成日期：2024 年 5 月 16 日

线粒体蛋白 **Mcu1** 通过呼吸代谢调控 白念珠菌共生的分子机制研究

完成人

马铭杨

指导小组成员

黄广华 教授

陶丽 青年研究员

目 录

摘 要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 念珠菌感染及其诊疗现状	1
1.2 白念珠菌感染与形态可塑性	1
1.3 白念珠菌共生-致病形态转换的影响因素	4
1.3.1 TCA 循环影响白念珠菌形态转换、共生和致病	4
1.3.2 肠道特异感应因子 Mcu1 对菌株共生-致病机制的影响	4
二、材料与方 法	6
2.1 材料	6
2.1.1 白念珠菌	6
2.1.2 小鼠	7
2.1.3 实验所用引物	7
2.2 培养基与试剂	8
2.2.1 培养基	8
2.2.2 试剂	10
2.3 实验方法	14
2.3.1 菌株 white-opaque 转换测定频率	14
2.3.2 质粒构建（同源重组法）	14
2.3.3 构建白念珠菌敲除/回补株	18
2.3.4 体外传代模型构建	20

2.3.5 小鼠体内肠道定植模型构建	21
2.3.6 数据处理	22
三、研究结果	23
3.1 Mcu1 作为线粒体蛋白影响白念珠菌碳源代谢	23
3.2 检测 Mcu1 在不同条件下对白念珠菌 white-opaque 形态转换的影响	24
3.2.1 CO ₂ 诱导条件下 Mcu1 对 white-opaque 形态转换的影响	24
3.2.2 GlcNAc 诱导条件下 Mcu1 对 white-opaque 形态转换的影响	26
3.2.3 在空气条件下 Mcu1 对 opaque-white 形态转换的影响	27
3.3 检测 Mcu1 蛋白与 TCA 循环酶的互作和细胞定位	28
3.3.1 TCA 循环酶 Sdh3 在 CO ₂ 诱导下的 white-opaque 形态转换	28
3.3.2 Mcu1 影响 Sdh3 的细胞定位	29
3.4 Mcu1 与 TCA 循环酶对白念珠菌体内定植效率和 <i>WOR1</i> 表达的影响	30
3.4.1 Mcu1 和 TCA 循环酶突变株影响白念珠菌肠道定植	30
3.4.2 Mcu1 影响白念珠菌 <i>WOR1</i> 表达	31
四、讨 论	33
参考文献	35
致 谢	38

摘 要

白念珠菌 (*Candida albicans*) 是一种人体常见共生菌，也是一种重要的机会性致病真菌。通常可引发人体皮肤、口腔等浅表感染，在免疫力低下或免疫系统受损的人群中甚至造成具有较高死亡率的侵袭性感染。目前，针对白念珠菌感染的研究多集中在探索该菌的毒力因子及致病机制方面，但对其诱发感染的关键步骤“共生-致病”状态转换所知甚少。已有研究表明，白念珠菌能够通过体内三羧酸 (TCA) 循环来感应宿主环境变化，然而关于其调控形态转换的具体机制尚不明确。本研究依托前期研究结果，发现定位在线粒体膜上的 Mcu1 可能是白念珠菌利用 TCA 循环行使正常代谢功能的关键蛋白，该蛋白缺失导致体外 opaque 形态不稳定。通过构建 GFP 信号 *SDH3* 基因定位菌株，发现 *MCU1* 基因对 TCA 循环的功能非常关键。我们还发现 Mcu1 与 TCA 循环酶是白念珠菌体内共生的重要元件，两种基因敲除株均显示较弱的体内共生能力。且进一步研究发现 Mcu1 通过在体内调节共生关键调控因子 Wor1 的表达，调控 white-GUT 转换，进而影响体内定植。本研究为后续深入研究白念珠菌通过代谢重编程调控宿主环境的适应与致病性提供了可靠的实验模型和初步结论，也为揭示其影响共生-致病状态转换的调控机制与作用靶点打好基础，从而为开发新型抗念珠菌药物开拓思路。

关键词： 白念珠菌，Mcu1，三羧酸循环 (TCA)，共生-致病状态转换

Abstract

Candida albicans (*C.albicans*) is a common commensal fungus and a major opportunistic pathogen in human. It frequently causes superficial infections of the skin and oral cavity, and in immunocompromised individuals, it can lead to invasive infections with high mortality rates. Current research on *C.albicans* infection focuses on exploring its virulence factors and pathogenic mechanisms, but little is known about the key step in triggering infection, the "commensalism-pathogenesis" state transition. Previous studies have shown that *C.albicans* can sense host environmental changes through the tricarboxylic acid (TCA) cycle, but the specific mechanisms regulating its morphological transition remain unclear. Building on previous research, this study found that mitochondrial membrane protein Mcu1 is likely a key protein for *C.albicans* to utilize the TCA cycle for normal metabolic functions. The loss of this protein leads to instability of the opaque morphology *in vitro*. By constructing a GFP strain signaling *SDH3* gene localization, it was found that the *MCU1* gene is essential for the function of the TCA cycle. It was also found that Mcu1 and TCA cycle enzymes are important components of commensalism in *C.albicans*, and both gene knockout strains showed weaker commensalism ability *in vivo*. Further studies found that Mcu1 regulates the white-GUT transition by regulating the expression of the commensal key regulator Wor1 *in vivo*, thereby affecting colonization *in vivo*. This study provides a reliable experimental model and preliminary conclusions for further in-depth research on the adaptation and pathogenicity of *C.albicans* by regulating the host environment through metabolic reprogramming. It also lays the foundation for elucidating the regulatory mechanisms and target sites that affect the "commensalism-pathogenesis" state transition, thus opening up new ideas for the development of new anti-fungal drugs.

Key words: *Candida albicans* (*C.albicans*), Mcu1, tricarboxylic acid (TCA) cycle, "commensalism-pathogenicity" state transition

一、前 言

1.1 念珠菌感染及其诊疗现状

由于临床诊断困难,治疗药物欠缺,近年来侵袭性真菌感染呈持续上升趋势,严重威胁患者的健康。目前,临床上以念珠菌感染艾滋病患者和重症监护室 (ICU) 病人等最为常见。据统计,每年全球因念珠菌(尤其是白念珠菌)感染的人数约有 156.5 万人,由此导致的死亡人数高达 99.5 万人,死亡率达到 63.6%^[1]。白念珠菌 (*Candida albicans*) 是人体皮肤、肠道和泌尿生殖道的常见共生菌,也是一种重要的人体机会致病菌。在健康的宿主中,该菌通常以良性共生菌的形式存在,但也能够在免疫力低下或免疫系统受损的人群中引发浅表感染(如口腔、皮肤黏膜、生殖道念珠菌病等),严重者会引发侵袭性感染(如念珠菌血症、脑膜炎、系统性念珠菌病等)^[2,3]。尽管念珠菌病对人类健康有明显的不良影响,但由于其属于真核生物,在进化上与人类接近,临床上可用的药物种类有限^[4-6]。更糟糕的是,由于长期使用相同类别的药物(如唑类、多烯类和棘白霉素类等),对一种或多种药物具有获得性耐药性的菌株比例不断增加^[7]。因此,深入探究白念珠菌的感染特性,揭示致病机制,有助于发掘新的药物靶标,开发特异性更强的抗真菌药物,从而增强人体预防和治疗念珠菌感染的能力。

1.2 白念珠菌感染与形态可塑性

近年来,针对白念珠菌感染的研究多集中在探索该菌的毒力因子及致病机制方面,却忽视了它仍是一种人体内不可或缺的共生菌,由共生态向致病态转换是该菌诱发感染的关键环节。因此探究白念珠菌在宿主体内的共生特性,揭示其由共生态向致病态转换的诱导机制和重要分子阀门,将是维持人体内微生态平衡,发掘重要抗真菌药物靶点,遏制白念珠菌致病率的重中之重。目前的研究已经发现,白念珠菌的三种主要形态转换方式包括:酵母-菌丝转换^[8,9]、white-opaque (W-O) 转换^[10]和 white-GUT (肠道共生态) 转换^[11]。三种形态的细胞各自具有独特的共生/致病特性与代谢特征。white 细胞易于形成菌丝,偏向于血液感染和体内扩散^[12],在系统感染中毒性较强,偏好无氧发酵代谢;opaque 细胞的表面黏附能力更强,能够特异性分泌天冬氨酸蛋白酶 (secreted aspartyl proteinase, saps),

促进组织侵染和皮肤的定植^[13]，主要诱发浅表感染，造成有氧代谢的上调，表现出更强的逃避宿主免疫反应的能力^[14]；GUT 细胞目前仅在肠道中发现，具有极强的肠道定植能力和共生能力，偏好 GlcNAc 代谢，上调包括 GlcNAc 转运蛋白和 TCA 循环酶等代谢元件。而白念珠菌在体内对宿主环境的快速应答、形态可塑性与致病性均依赖于其灵活的代谢网络^[8, 11, 15]，该菌能够通过三羧酸 (TCA) 循环来感应宿主环境变化，调控形态转换，进而介导其共生-致病形态转换的正负向进行^[16-18]，但其中的具体机制尚不明确。

2017年 Böhm L. 等研究者利用无菌小鼠模型进行白念珠菌的肠道定植实验，重点关注了白念珠菌在宿主体内的共生机制。研究发现，在与宿主的共生状态下，白念珠菌主要以椭圆形的酵母态细胞定植在体内，并通过一系列的黏附分子与调节因子（如 *ZCF8*, *ZFU2* 和 *TRY4*）维持肠道共生状态；而当宿主免疫系统受损时，参与有氧代谢通路的多种 TCA 循环酶表达上调，诱导菌株由酵母态向菌丝态转变，引发危害宿主的侵袭性感染^[8]。

white-opaque 转换的关键在于 Ras1-cAMP/PKA 信号与调控因子 Wor1 和 Efg1。已有的研究表明，white 和 opaque 细胞的转录组数据约有 1/3 的差异基因与细胞代谢相关，主要包括了 TCA 循环、乙醛酸循环和糖酵解途径（如图 1）^[19]。在 white 细胞中，Ras1-cAMP/PKA 途径下游调控因子 Efg1 大量表达，激活了糖酵解代谢途径，抑制 TCA 循环，稳定细胞形态，抑制共生性^[20]；而 opaque 细胞中，TCA 循环中异柠檬酸脱氢酶基因 *IDP2* 和苹果酸脱氢酶基因 *MDHI* 表达显著上调，加速氧化代谢。同时，Wor1 能够在宿主的消化道中特异性表达（上调约 10,000 倍），同时通过异源启动子具有更强的共生适应性，促进 W-O 转换正向进行并稳定 opaque 细胞状态^[21]。

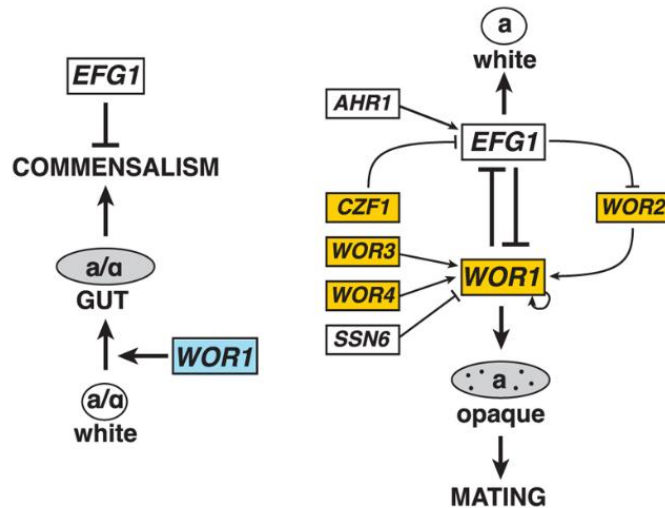


图 1. 白念珠菌共生适应性调控机制^[22]

Efg1 抑制共生的中枢抑制因子，Wor1 则是白念珠菌交配以及 W-O 转换的中枢激活因子，二者相互抑制。同时，Wor1 促进共生，且促进从 white 细胞到 GUT 细胞的发育转变

white-GUT 转换是白念珠菌最新在小鼠肠道中发现的近似于体外 W-O 转换的现象，该转换机制与念珠菌和宿主共生/致病的过程密切相关，调控因子 Wor1 和 Efg1 同样在过程中发挥重要作用。已有的研究通过表达 *WOR1*（体外几乎检测不到信号），细胞能够完全转变为体内定植能力显著上升的 GUT 形态，而过表达 *EFG1* 则会发生相反的效果，使白念珠菌定植能力显著下降。比较 white 和 GUT 细胞的基因表达谱发现，负责 GlcNAc 转运以及 TCA 循环的关键元件（例如 *HXK1*, *IDP2*, *DAC1*, *NAG1* 等）在 GUT 形态中的表达明显上调（如表 1）^[11]。考虑到 GlcNAc 是肠道中重要的屏障环境因子，且其经 TCA 循环进行代谢，推测 TCA 循环的代谢活性在感应 GlcNAc 调控白念珠菌在宿主肠道的共生和致病状态方面具有关键作用。

表 1 白念珠菌共生状态下上调蛋白^[11]

Standard Name	Gene Name	Description of Gene Product	Reported Specificity (Wh v. Op)			Relative Expression		
			Lan et al.	Tsong et al.	Tuch et al.	<i>WOR1</i> -OE GUT/Wh	Op/Wh	<i>WOR1</i> -OE GUT/Op
orf19.2154	<i>HXK1</i>	N-acetylglucosamine (GlcNAc) kinase; involved in GlcNAc utilization			Op	2.07	2.21	0.93
orf19.3733	<i>IDP2</i>	Isocitrate dehydrogenase	Op		Op	2.40	2.99	0.81
orf19.2157	<i>DAC1</i>	N-acetylglucosamine-6-phosphate (GlcNAcP) deacetylase; enzyme of N-acetylglucosamine utilization		Op	Op	8.29	5.49	1.83
orf19.2156	<i>NAG1</i>	Glucosamine-6-phosphate deaminase; enzyme of N-acetylglucosamine utilization	Op		Op	17.36	10.64	1.67

白念珠菌共生状态下上调蛋白 GlcNAc 代谢相关蛋白和 TCA 循环 Idp2 酶表达显著上调。

1.3 白念珠菌共生-致病形态转换的影响因素

1.3.1 TCA 循环影响白念珠菌形态转换、共生和致病

TCA 循环在白念珠菌共生和致病方面具有重要功能。Bennett 团队发现，白念珠菌 *EFG1* 具有基因剂量效应，能够响应宿主肠道环境变化调节自身转录水平和拷贝数，影响 TCA 循环代谢（如上调 *CIT1*, *IDP2*, *KGD1* 等基因表达），促进念珠菌共生-致病动态平衡移动^[23]。此外，Burgain 等人还发现，低氧条件下的白念珠菌可利用 SWI/SNF 复合物亚基 Snf5 协同腺苷酸环化酶 Cyr1（位于 Ras1-cAMP/PKA 途径），进行快速代谢重编程从而增加各种碳源的摄入，维持体内共生^[18]。

结合团队已有的研究成果^[16, 17]（如图 2），我们发现高浓度 CO₂ 能够受到热激反应蛋白 Sfl2 感应，同时上调多个 TCA 循环酶基因表达，产生大量的 cAMP，从而激活 Ras1-cAMP/PKA 信号通路，诱导白念珠菌菌丝态转换，提高致病性；而该通路还能够反向调控因子 Efg1 和 Sfl2 维持 TCA 循环的代谢水平以稳定菌丝状态。我们还发现，白念珠菌会在葡萄糖贫瘠条件下上调 TCA 循环酶基因（如 *SDH2*, *KGD1*, *IDP2* 等）表达，产生大量的活性氧 (ROS)，导致 Hsf1-Hsp90 压力应答途径超负荷运行，促进交配以提升菌株环境适应能力和遗传多样性。此外，我们还发现 TCA 循环酶能够显著调控念珠菌体内肠道共生能力和侵袭能力，但具体机制仍不清楚。

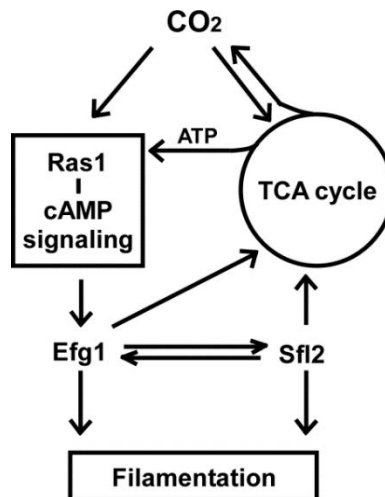


图 2. TCA 循环协同 Ras1-cAMP/PKA 信号通路感应 CO₂ 并调控菌丝发育^[16]

1.3.2 肠道特异感应因子 Mcu1 对菌株共生-致病机制的影响

肠道是人体内最大且最重要的内部屏障之一，作为人体天然免疫屏障对人类

健康至关重要，同时也是白念珠菌在人体内的主要定植与共生的场所，在定植过程中会经历一系列细胞状态的转变。一旦白念珠菌发生侵袭性致病状态的转换，肠道将会成为该菌需要突破的第一道屏障。确保肠道屏障完整性的机制包括了粘液凝胶、细胞间接触、C-反应蛋白、特异性急性炎症过程和再生系统等^[24]。其中，N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 同时作为肠道黏膜组织和共生菌细胞壁的主要组分，与宿主的免疫活性与疾病状态密切相关^[25, 26]。我们在前期工作中发现，白念珠菌中具有念珠菌特异性的 Mcu1 线粒体蛋白作为 GlcNAc 的特异性感应因子^[27]，能够显著影响白念珠菌的共生和致病能力，其可能与多个 TCA 循环酶(如 Kgd1, Sdh2, Idp2)存在互作，且 Mcu1 功能失活会影响 TCA 循环导致细胞内 NAD⁺ 水平下降产生大量 ROS，减弱白念珠菌共生能力^[28]，并主要聚集在酵母态细胞从而干扰菌株定植^[29]。考虑到 TCA 循环是白念珠菌 GlcNAc 代谢的必经途径，因此推测 Mcu1 蛋白能够通过代谢重编程调控白念珠菌在宿主体内共生-致病状态转换。

本研究将着眼于 Mcu1 蛋白功能和响应宿主环境变化的行为，揭示其影响共生-致病状态转换的调控机制与作用靶点，从而为开发新型抗念珠菌药物开拓思路。

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 白念珠菌

表 2 实验用菌株信息

菌株名称	菌株基因型或其他信息
SC5314	Wild-type, ATCC® MYA-2876™
SN152	As SC5314, but <i>MTLa/α ura3::λimm434::URA3-IRO1/ura3::λimm434, arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG/his1::hisG leu2::hisG/leu2::hisG, MTLa/MTLa</i>
XM57	As SC5314, but <i>MTLa/mtlα::FRT-SAT1-FRT</i>
XM58	As SC5314, but <i>mtla/MTLa::FRT-SAT1-FRT</i>
BWP17 (XM100)	As SC5314, <i>ura3::imm434/ura3::imm434 iro1/iro1::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4/arg4, MTLa/MTLa</i>
RM1000#2	As SC5314, but <i>ura3::imm434::URA3/ura3::imm434 iro1::IRO1/iro1::imm434 his1::hisG/his1::hisG, MTLa/MTLa</i>
SN78	As RM1000#2, but <i>leu2Δ/leu2Δ, ura3Δ/ura3Δ, his1Δ/his1Δ iro1Δ/iro1Δ, MTLa/MTLa</i>
SN1014	As SN78, but <i>wor1Δ::FLP-SAT1/WOR1, leu2Δ/leu2Δ, ura3Δ/ura3Δ, his1Δ/his1Δ, iro1Δ/iro1Δ, MTLa/MTLa</i>
SN1020 (XM41)	As SN1014, but <i>wor1Δ::FLP-SAT1/WOR1, leu2Δ::FRT URA3-FRT/leu2Δ, ura3Δ /ura⁺ ++3Δ, his1Δ/his1Δ, iro1Δ/iro1Δ, MTLa/MTLa</i>
XM91	As SN1020, but <i>mcu1::ARG4/mcu1::HIS1, MTLa/MTLa</i>
XM98	As BWP17, but <i>mcu1::arg4/mcu1::his1, MTLa/MTLa</i>
<i>sdh3/sdh3</i>	As SN152, but <i>sdh3::ARG4/sdh3::HIS1, MTLa/MTLa</i>
<i>sdh3/sdh3⁺</i>	As <i>sdh3/sdh3</i> , but <i>leu2::hisG/LEU2, MTLa/MTLa</i>
XM93	As <i>sdh3/sdh3⁺</i> , but <i>MTLa/mtlα::FRT-SAT1-FRT</i>
<i>aco1/aco1</i>	As SN152, but <i>aco1::ARG4/aco1::HIS1, MTLa/MTLa</i>
<i>kgd1/kgd1</i>	As SN152, but <i>kgd1::ARG4/kgd1::HIS1, MTLa/MTLa</i>
<i>cit1/cit1</i>	As SN152, but <i>cit1::ARG4/cit1::HIS1, MTLa/MTLa</i>
LTS674	As <i>sdh3/sdh3</i> , but <i>SDH3p-SDH3-LEU2, MTLa/MTLa</i>
LTS701	As XM98, but <i>MCU1p-MCU1-LEU2, MTLa/MTLa</i>
<i>aco1/aco1</i> + <i>ACO1p-ACO1</i>	As <i>aco1/aco1</i> , but <i>ACO1p-ACO1-LEU2, MTLa/MTLa</i>

续表 2

菌株名称	菌株基因型或其他信息
<i>kgd1/kgd1</i> + <i>KGD1p-KGD1</i>	As <i>kgd1/kgd1</i> , but <i>KGD1p-KGD1-LEU2</i> , <i>MTLa/MTLα</i>
<i>cit1/cit1</i> + <i>CIT1p-CIT1</i>	As <i>cit1/cit1</i> , but <i>CIT1p-CIT1-LEU2</i> , <i>MTLa/MTLα</i>
MMY13	As XM100, but <i>TETp-SDH3-GFP-SAT1</i> , <i>MTLa/MTLα</i>
MMY16	As XM98, but <i>TETp-SDH3-GFP-SAT1</i> , <i>MTLa/MTLα</i>
MMY17	As LTS674, but <i>mtla/MTLα::FRT-SAT1-FRT</i>
XM122	As BWP17, but <i>ura3/ura3::URA3</i> , <i>mcu1::ARG4/mcu1::HIS1</i> , <i>mtla::FRT-SAT1-FRT/MTLα</i>
XM123	As BWP17, but <i>ura3/ura3::URA3</i> , <i>mcu1::ARG4/mcu1::HIS1</i> , <i>MTLa/mtlα::FRT-SAT1-FRT</i>
MMY1	As LTS701, but <i>MTLa/mtlα::FRT-SAT1-FRT</i>
MMY4	As LTS701, but <i>mtla/MTLα::FRT-SAT1-FRT</i>

2.1.2 小鼠

BALB/c 小鼠，雌性，6 周龄，购自于北京维通利华实验动物技术有限公司。
本课题中的全部动物实验均已通过复旦大学动物伦理委员会的审核和批准。

2.1.3 实验所用引物

所用引物均合成于北京六合华大基因科技有限公司（上海分部）。

表 3 实验用引物信息

引物名称	引物序列 (5' to 3')	引物用途
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	鉴定白念珠菌物种
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	
<i>MTLa1_F</i>	TAAGAATGAAGACAACGAGG	验证 <i>MTLa1</i>
<i>MTLa1_R</i>	TTATCATCATCCATCTGGTC	
<i>MTLα1_F</i>	TTCGAGTACATTCTGGTCGCG	验证 <i>MTLα1</i>
<i>MTLα1_R</i>	TGTAAACATCCTCAATTGTACCCGA	
LTS3286_F	ATACAAATATAAATAGTCGACATGATTTCT	扩增 <i>SDH3</i> 片段
	CGTATIGGATTATTG	
LTS3287_R	TTCTTCTCCCTTACTCATCTTCCATAAGAA	
	AGCTAAATAACTICC	
SNO509_F	GTTGTGATTTTGCTATTCCGGCGCT	验证 <i>URA3</i> 片段被切除
SNO840_R	TCTCTCCGAATGAAGAGCC	
SNO1535_F	AGAAAGAAAGAGAGAGAGGGAACG	验证 <i>WOR1p-FLP</i> 上游臂
SNO1536_R	CTGTTCCGTTATGTGTAATCATCC	
SNO1537_F	CGCCTAACATATGTGAAGTGTGA	验证 <i>WOR1p-FLP</i> 下游臂
SNO1354_R	CGTTCAGATATTCATACATCCACCT	

续表 3

引物名称	引物序列 (5' to 3')	引物用途
LTS610_F	ATACACATCAACCGTACCAG	验证特殊基因定位
GFP_R	AGCATTGAAGACCATACGCG	的 GFP 质粒构建

2.2 培养基与试剂

2.2.1 培养基

2.2.1.1 LB 培养基 (1 L)

表 4 LB 培养基 (液体、固体、抗性)

组成	LB 培养基 (1 L)
Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

配置方法: 加入约 800 mL ddH₂O 至有磁转子且使用 ddH₂O 润洗后的量杯中, 将上述成分逐个充分溶解, 并用 ddH₂O 润洗后的量筒体积定容到接近 1 L。灭菌条件为 115°C, 高压湿热, 15 min。如需配制固体培养基, 可在液体培养基中加入 20.0 g (2%, w/v) BD Agar 粉末, 冷却至约 50°C 左右, 倒入 90 mm 无菌平板约 4 mm 厚度。将固体平板静置若干天干燥, 避光 4°C 保存。可在冷却后至 50°C 左右, 向其加入 10 mL Amp 储液 (100 mg/mL, 100×), 制备为 LB (Amp⁺) 抗性培养基。

2.2.1.2 YPD 培养基 (1 L)

表 5 YPD 培养基 (液体、固体、抗性、GFP 诱导)

组成	YPD 培养基 (1 L)
Tryptone	20 g
Yeast Extract	10 g
Glucose	20 g

配置方法: 加入约 800 mL ddH₂O 至有磁转子且使用 ddH₂O 润洗后的量杯中, 将上述成分逐个充分溶解, 并用 ddH₂O 润洗后的量筒体积定容到接近 1 L。灭菌条件为 115°C, 高压湿热, 15 min。如需配制固体培养基, 可在液体培养基中加入 20.0 g (2%, w/v) BD Agar 粉末, 冷却至约 50°C 左右, 倒入 90 mm 无菌平板约 4 mm 厚度。将固体平板静置若干天干燥, 避光 4°C 保存。可在冷却至约 50°C 左右, 加入 20 mL 中生菌素储液 (100 mg/mL, 100×), 制备为 Y+2C 抗性培养基; 也可在冷却至约 50°C 左右, 加入 800 µL doxycycline 储液 (50 mg/mL, 1250×), 制备为 Y+Dox GFP 诱导培养基。

2.2.1.3 Lee's Glucose/GlcNAc 培养基 (1 L)

表 6 Lee's Glucose/GlcNAc 培养基（液体、固体）

组成	Lee's Glucose/GlcNAc 培养基 (1 L)	组成	Lee's Glucose/GlcNAc 培养基 (1 L)
Glucose/GlcNAc	12.5 g	L-Threonine	0.5 g
NaCl	5.0 g	L-Methionine	0.1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g	L-Ornithine	0.07 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	3.275 g	L-Arginine	0.07 g
L-Leucine	1.3 g	L-Histidine	0.07 g
L-Lysine	1.0 g	Uridine	0.07 g
L-Alanine	0.5 g	MgSO ₄	0.1 g
L-Phenylalanine	0.5 g	d-Biotin (1 mg/mL, 1000 ×)	100 μL
L-Proline	0.5 g	0.1 M ZnSO ₄	1 μL

配置方法：加入约 800 mL ddH₂O 至有磁转子且使用 ddH₂O 润洗后的量杯中，将上述成分逐个充分溶解，用 ddH₂O 润洗后的量筒体积定容到接近 1 L，并用 HCL 或 NaOH 调节溶液 pH 值至 6.8 左右。灭菌条件为 115℃，高压湿热，20 min。如需配制固体培养基，可在液体培养基中加入 20.0 g（2%，w/v）BD Agar 粉末，冷却至约 50℃ 左右，加入 500 μL Phloxine B 染料（10 mg/mL，2000×），倒入 90 mm 无菌平板约 4 mm 厚度。将固体平板静置若干天干燥，避光 4℃ 保存。可将 Glucose/GlcNAc 改为各加入 6.275 g。制备为 Lee's Glucose+GlcNAc 培养基。

2.2.1.4 SD 培养基 (1 L)

表 7 SD 培养基（液体、固体、抗性）

组成	SD 培养基 (1 L)	组成	SD 培养基 (1 L)
Glucose/GlcNAc	20.0 g	L-Serine	0.4 g
YNB	6.7 g	L-Valine	0.15 g
L-Adenine	0.04 g	L-Methionine	0.05 g
L-Tyrosine	0.03 g	L-Lysine	0.03 g
L-Isoleucine	0.03 g	L-Leucine	0.13 g
L-Phenylalanine	0.05 g	L-Tryptophan	0.04 g
L-Glutamine	0.1 g	Uridine	0.02 g
L-Aspartic Acid	0.1 g	L-Histidine	0.03 g
L-Threonine	0.2 g	L-Arginine	0.04 g

配置方法：加入约 800 mL ddH₂O 至有磁转子且使用 ddH₂O 润洗后的量杯中，将上述成分逐个充分溶解，用 ddH₂O 润洗后的量筒体积定容到接近 1 L，并用 HCL 或 NaOH 调节溶液 pH 值至 6.8 左右。灭菌条件为 115℃，高压湿热，20 min。如需配制固体培养基，可在液体培养基中加入 20.0 g（2%，w/v）BD Agar 粉末，冷却至约 50℃ 左右，倒入 90 mm 无菌平板约 4 mm 厚度。将固体平板静置若干天干燥，避光 4℃ 保存。可在配制过程中排除 Histidine、Arginine、Uridine 和 Leucine 四种氨基酸中的一种或多种，制备营养缺陷型 SD 培养基；也可在冷却后至 50℃ 左右，加入 10 mL 氯霉素储液（34 mg/mL，100×），制备为 SD (CPL⁺) 抗性培养基。

2.2.1.5 5-FOA 培养基 (1 L)

表 8 省却尿嘧啶的混合物（固体）

组成	质量	组成	质量
L-Adenine	0.5 g	L-Leucine	10.0 g
L-Alanine	2.0 g	L-Lysine	2.0 g
L-Arginine	2.0 g	L-Methionine	2.0 g
D-Aspartyl	2.0 g	Para-Aminobenzoic Acid	2.0 g
L-Aspartic Acid	2.0 g	L-Phenylalanine	2.0 g
L-Cysteine	2.0 g	L-Proline	2.0 g
L-Glutamine	2.0 g	L-Serine	2.0 g
L-Glutamic Acid	2.0 g	L-Threonine	2.0 g
Glycine	2.0 g	L-Tryptophan	2.0 g
L-Histidine	2.0 g	L-Tyrosine	2.0 g
Inositol	2.0 g	L-Valine	2.0 g
L-Isoleucine	2.0 g		

表 9 5-FOA 培养基（固体、抗性）

组成	质量
YNB	6.7 g
省却尿嘧啶的混合物	2.0 g
Uridine	0.025 g
5-FOA	1.0 g

配置方法：加入约 200 mL ddH₂O 至有磁转子且使用 ddH₂O 润洗后的玻璃烧杯中，开启磁力搅拌器的加热模块（温度不超过 50℃），将上述成分逐个充分加热溶解，过滤除菌备用。称取 20.0 g BD Agar 粉末溶解于 800 mL ddH₂O 中，灭菌条件为 115℃，高压湿热，20 min。冷却至约 40℃ 左右，混匀 2 部分溶液，倒入 90 mm 无菌平板约 4 mm 厚度。将固体平板静置若干天干燥，避光 4℃ 保存。可在冷却后至 50℃ 左右，加入 10 mL 氯霉素储液 (34 mg/mL, 100×)，制备为 5-FOA (CPL⁺) 抗性培养基。

2.2.2 试剂

2.2.2.1 主要试剂

表 10 实验所用主要试剂清单

试剂或试剂盒名称	厂商或品牌	试剂或试剂盒名称	厂商或品牌
D-Sorbitol	BBI Life Sciences	DTT (Dithiothreitol)	BBI Life Sciences
十二烷基硫酸钠 (SDS)	BBI Life Sciences	Uridine	BBI Life Sciences
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	BBI Life Sciences	L-Serine	BBI Life Sciences
KCl	BBI Life Sciences	L-Valine	BBI Life Sciences

续表 10

试剂或试剂盒名称	厂商或品牌	试剂或试剂盒名称	厂商或品牌
Chloramphenicol	BBI Life Sciences	L-Tyrosine	BBI Life Sciences
Kanamycin Sulfate	BBI Life Sciences	Doxycycline Hydrochloride	BBI Life Sciences
Ampicillin Sodium	BBI Life Sciences	Streptomycin sulfate	BBI Life Sciences
Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (YNB)	Becton Dickinson	<i>Sal</i> I	New England Bio-Labs
BD Peptone	Becton Dickinson	<i>Apa</i> I	New England Bio-Labs
BD Yeast Extract	Becton Dickinson	<i>Sac</i> II	New England Bio-Labs
BD Agar	Becton Dickinson	<i>Sac</i> I	New England Bio-Labs
Tryptone	OXOID	Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase	New England Bio-Labs
Na ₂ HPO ₄	Sangon Biotech	NaCl	Sigma-Aldrich
LiAc·2H ₂ O	Sangon Biotech	NaAc	Sigma-Aldrich
5-Fluoroorotic Acid (5-FOA)	Sangon Biotech	MgSO ₄	Sigma-Aldrich
甘油（丙三醇）	Sangon Biotech	L-Lysine	Sigma-Aldrich
乙二胺四乙酸（EDTA）	Sangon Biotech	L-Proline	Sigma-Aldrich
HCl	Shanghai Hushi	L-Leucine	Sigma-Aldrich
NaOH	Shanghai Hushi	L-Alanine	Sigma-Aldrich
H ₂ SO ₄	Shanghai Hushi	L-Adenine	Sigma-Aldrich
无水乙醇	Shanghai Hushi	L-Arginine	Sigma-Aldrich
冰乙酸（HAc）	Shanghai Hushi	L-Histidine	Sigma-Aldrich
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich	L-Ornithine	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Sigma-Aldrich	L-Threonine	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	L-Isoleucine	Sigma-Aldrich
L-Phenylalanine	Sigma-Aldrich	L-Glutamine	Sigma-Aldrich
Sodium chloride	Sigma-Aldrich	L-Methionine	Sigma-Aldrich
d-Biotin	Sigma-Aldrich	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma-Aldrich
Phloxine B	Sigma-Aldrich	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich	TIANprep Mini Plasmid Kit	TIANGEN
Extaq Series	TaKaRa	TIANquick Midi Purification Kit	TIANGEN

续表 10

试剂或试剂盒名称	厂商或品牌	试剂或试剂盒名称	厂商或品牌
rTaq Series	TaKaRa	DL5000 Maker	TSINGKE
GlcNAc	Unique	TS-GelRed Ver 210000×	TSINGKE
ClonExpress® II One Step Cloning Kit	Vazyme	<i>Trelief 5a</i>	TSINGKE

2.2.2.2 实验所用主要试剂配制

1) 1×TE buffer

将 10 mL 1 M Tris-HCl (pH=7.5) 以及 2 mL 0.5 M EDTA (pH=7.5) 充分混合溶解于 800 mL ddH₂O, 使用 ddH₂O 定容至 1000 mL。使用 110°C 高压蒸汽灭菌 15 min。

2) 1 M DTT

精准称取 15.4 g DTT, 充分溶解于 100 mL ddH₂O 中, 依次过滤除菌, 分装至干净的 1.5 mL 离心管中, 于-20°C 保存。

3) 10% SDS

精准称取 20.0 g SDS, 充分溶解于 160 mL ddH₂O 中, 定容至 200 mL。110°C 高压蒸汽灭菌 15 min。

4) 10 × PBS 缓冲液

分别称取 80.0 g NaCl, 14.4 g Na₂HPO₄, 2.0 g KCl, 2.4 g KH₂PO₄, 充分混合溶解于 800 mL ddH₂O 中, 定容至 1000 mL。用 HCl 调整 pH 值至 7.4, 110°C 高压蒸汽灭菌 15 min。使用时加适量 ddH₂O 稀释即可。

5) 0.2 M LiAc/1% SDS DNA Lysis Buffer

精准称取 2.04 g LiAc 和 1.0 g SDS, 充分混合溶解于 80 mL ddH₂O 中, 定容至 100 mL。110°C 高压灭菌 15 min。

6) 50 × TAE DNA 电泳缓冲液

精确称取 242.0 g Tris 充分溶解于 500 mL ddH₂O 中, 加入 100 mL 0.5M EDTA (pH = 8.0), 再加入 57.1 mL 冰醋酸, 用蒸馏水定容至 1000 mL, 室温储存。使用时加适量 ddH₂O 即可。

7) 1 g/L d-Biotin 储液 (1000×, 100 mL)

精确称取 0.1 g d-Biotin 充分溶解于 100 mL ddH₂O 中，4℃ 避光保存。

8) TE/0.1 M LiAc (pH = 8.0)

精确称取 1.02 g LiAc·2H₂O 充分溶解于 80 mL ddH₂O 中，加入 1 mL 1 M Tris-HCl (pH = 7.5) 和 0.2 mL 0.5 M EDTA (pH = 8.0)。充分混匀，用 ddH₂O 定容至 100 mL。115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

2.2.2.3 实验所用仪器

表 11 实验所用主要仪器清单

仪器或耗材	型号	厂商或品牌
PCR 仪 (Thermal Cycler)	T100	Bio-Rad
电泳仪主机系统	PowerPac Basic	Bio-Rad
振荡培养箱 (37℃)	AATM-032S	ChemStar
15 mL 离心管	SCT-5ML-S	CORNING
50 mL 离心管	430828	CORNING
塔式工作站	Precision 7920	DELL
移液器 (单道, 1-5 mL)	YE6K718427	DLAB/大龙仪器
台式冷冻离心机 (1.5 mL)	Centrifuge 5424 R	Eppendorf
核酸蛋白测定仪	BioPhotometer D30	Eppendorf
移液器 (8 道, 30-300 µL)	3122000051	Eppendorf
微波炉	D4W-S20	Galanz
磁力搅拌器	RH basic 2	IKA
电子显微镜成像系统	DL2500LED	Leica
多光子快速荧光寿命系统	TCS SP8 DIVE FALCON	Leica
0.22 µm 过滤器 Millex-GP	SLGP033RB	Merck Millipore
体式显微镜成像系统	NSZ-810 + Dig1600	Nexcope
医用低温冷藏箱 (4℃)	MPR-210	Panasonic
超低温冷冻冰箱 (-20℃)	MDF-339	Panasonic
超低温冷冻冰箱 (-80℃)	MDF-U54V	Panasonic
移液器 (单道, 1-10 µL)	Pipet Lite SL-10PL+	RAININ
移液器 (单道, 2-20 µL)	Pipet Lite SL-20PL+	RAININ
移液器 (单道, 20-200 µL)	Pipet Lite SL-200PL+	RAININ
移液器 (单道, 0.1-1 mL)	Pipet Lite SL-1000PL+	RAININ
电子分析天平	BSA124S	Sartorius
pH 计	PB-10	Sartorius
漩涡混合器	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
5 mm Solid-glass Beads	Z143944-1EA	Sigma-Aldrich
机载凝胶成像仪	BioDoc-It 220	UVP
高温高压灭菌器	Autoclave GI-T	Zealway Instrument
台式高速离心机 (5 mL)	2-16N	湖南恒诺仪器设备
冷冻型高通量组织研磨器	Scientz-48L	宁波新芝生物科技
2 mL 冻存管	ld-g005	品立实验器材

电热恒温培养箱（30 或 37℃）	LI-500	上海龙跃仪器设备
-------------------	--------	----------

续表 11

仪器或耗材	型号	厂商或品牌
电热恒温干燥箱	LY15-400	上海龙跃仪器设备
电热恒温三控水浴锅	LTF-8D	上海龙跃仪器设备
自动双重纯水蒸馏仪	SZ-93A	上海亚荣生化仪器
电子称量天平	YP30002	上海越平科学仪器
振荡培养箱（30℃）	ZQZY-75BS	上海知楚仪器

2.3 实验方法

2.3.1 菌株 white-opaque 转换测定频率

2.3.1.1 菌株活化

从-80℃接出菌株至固体 YPD 或 Y+2C 培养基上进行活化（保藏时为单克隆），置于 30℃恒温培养箱培养 2 天。

2.3.1.2 菌株纯化涂板

挑取部分菌体，使用灭菌的 ddH₂O 将白念珠菌细胞浓度稀释至 1×10⁴ cells/mL，取 10 μL 用 100 μL 灭菌的 ddH₂O 后混匀，再用灭菌玻璃珠涂布在含有 Phloxine B 的固体 Lee's Glucose 培养基上，于 25℃ 空气恒温培养箱中培养 5~10 天（营养缺陷型培养更久）。

2.3.1.3 表型观察

分别取典型 white 细胞和 opaque 细胞，重新涂板纯化。常规实验方案中，white 细胞涂于固体 Lee's Glucose 培养基上，置于 25℃ 5% CO₂ 恒温培养箱中培养；opaque 细胞涂于固体 Lee's Glucose + GlcNAc 培养基上，置于 25℃ 空气恒温培养箱中培养。5~10 天后，使用体视显微镜观察菌株的菌落形态，使用电子显微镜成像系统观察细胞的形态。转换效率计算公式为：

$$\text{W-O Frequency} = \frac{\text{opaque 菌落数} + \text{opaque-sector 菌落数}}{\text{总菌落数}} \times 100\% \quad (\text{公式 1.1})$$

$$\text{O-W Frequency} = \frac{\text{white 菌落数}}{\text{总菌落数}} \times 100\% \quad (\text{公式 1.2})$$

2.3.2 质粒构建（同源重组法）

本研究使用的质粒包括 pSFS2A 质粒和 pNIM1 质粒，具体原理参照 Sasse^[30], Park^[31]等。其中 pSFS2A-L23.14 用于 *MTL* 基因纯合化，该质粒的线

性化酶切位点为 *ApaI/SacI*。pNIM1-*SDH3*-GFP-*SAT1* 则以白念珠菌 SC5314 基因组 DNA 为模板,利用引物通过 Q5-PCR 体系扩增 *SDH3* 基因的上下游同源片段,并将 pNIM1 载体在 *SalI* 位点酶切并纯化扩增,使用同源重组法融合 PCR,制备融合质粒并纯化回收。该质粒的线性化酶切位点 *ApaI/SacII*。

2.3.2.1 酶切反应

根据载体质粒性质,选择适合的克隆位点和相应的限制性内切酶与缓冲液,按表 12 配制体系,于 37°C 水浴消化 3 hr,使用琼脂糖凝胶电泳跑胶验证质粒或者片段是否正确酶切,对于验证正确的酶切后回收。

表 12 酶切体系

成分		60 μL 体系
10× Buffer		6 μL
Restriction Enzyme(s)		各 2.5 μL
质粒/扩增片段	8 μg/3 μg (根据浓度计算体积)	
ddH ₂ O		补足至 60 μL

2.3.2.2 纯化回收

对带收集管的吸附柱 CB2 加入 500 μL 平衡液 BL, 12,000 rpm 离心 1 min 弃废液,完成柱平衡。合并 PCR 产物或酶切产物,加入 5 倍体积的结合液体 PB 混匀上柱(提及超过 800 μL 分批加入),于室温静置 2 min。12,000 rpm 离心 1 min,将收集管中液体重新上柱,重复离心后弃废液。加入 600 μL 漂洗液 PW (预先加入无水乙醇),于室温静置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min 后弃废液,重复此步一次。12,000 rpm 离心 2 min,将吸附柱 CB2 转移到 1.5 mL EP 管中,敞口室温静置若干分钟,尽可能晾干(尽量除去 PW,防止乙醇干扰后续酶反应)。悬空向柱膜中心滴加 40 μL 洗脱液 EB,于室温静置 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min,将收集管中液体重新上柱,重复离心收集,弃吸附柱。测定浓度后,保存于-20°C。

2.3.2.3 插入片段制备

根据插入片段与线性化载体序列,正向引物设计包括 5'-上游载体末端同源序列和基因特异性正向扩增引物序列,反向引物设计包括 5'-下游载体末端同源序列和基因特异性反向扩增引物序列,且需要保证扩增后的片段不含酶切位点与 poly A 序列,导致连接失败或出现扩增突变。按照表 13 配置 50 μL PCR 体系,按照表 14 设定 PCR 程序。

表 13 Q5-PCR 扩增体系

成分	50 μ L 体系
5 $\times$ Q5 Reaction Buffer	10 μ L
10 mM dNTPs	1 μ L
10 μ M Forward Primer	2.5 μ L
10 μ M Reverse Primer	2.5 μ L
Template DNA	自定 (> 500 ng)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 μ L
5 $\times$ Q5 High GC Enhancer (optional)	(10 μ L)
ddH ₂ O (Nuclease-Free)	补齐至 50 μ L

表 14 常规 PCR 程序

步骤	温度	时间	备注
1	94.0°C	5 min	
2	95.0°C	30 s	
3	56.0°C	30 s	循环 35 次
4	72.0°C	30 s (根据片段长度调整)	
5	72.0°C	10 min	
6	8.0°C	End	

2.3.2.4 重组反应

同源重组反应前需要对克隆载体进行线性化处理，并对线性化载体和插入片段均进行纯化回收。线性化克隆载体与插入片段的用量均应< 200 ng，体积> 1 μ L。反应用量计算见表 15，反应体系按表 16 配制。轻柔混匀体系，brief 离心。使用 PCR 仪器精确 37°C 孵育反应 30 min，立刻置于冰上冷却。产物可保存于-20°C 一周。

表 15 重组用片段/载体用量计算

最适使用量	计算公式
克隆载体	$[0.02 \times \text{克隆载体碱基对数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$
插入片段	$[0.04 \times \text{克隆载体碱基对数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$

表 16 重组体系（冰上配制）

组分	重组反应	阴性对照 1	阴性对照 2	阳性对照
线性化克隆载体	X μ L	X μ L	0 μ L	1 μ L
插入片段	Y μ L	0 μ L	Y μ L	1 μ L
5 $\times$ CE II Buffer	4 μ L	0 μ L	0 μ L	4 μ L
Exnase II	2 μ L	0 μ L	0 μ L	2 μ L
ddH ₂ O	补至 20 μ L	补至 20 μ L	补至 20 μ L	补至 20 μ L

2.3.2.5 重组产物转化大肠杆菌

于冰上解冻感受态细胞 DH5 α ，向 100 μ L 感受态细胞中加入 10 μ L 重组产物，转移到 1.5 mL EP 管中轻柔混匀，于冰上静置 30 min。置于 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中，精确热激 45 s 后立刻转移至冰上冷却 3 min。加入 900 μ L 无抗液体 LB，以 220 rpm 于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床摇菌 1 hr，同步于 37 $^{\circ}$ C 预热相应抗性的固体 LB 培养基平板。摇菌结束后，每板混合 50 μ L 菌液与 100 μ L ddH₂O 均匀涂板，于 37 $^{\circ}$ C 培养 16 小时。

2.3.2.6 鉴定转化结果

挑取 32 个阳性克隆，在固体 LB (Amp⁺) 抗性培养基上划方格筛选，于 37 $^{\circ}$ C 培养 1 天。按表 14 配制煮菌 PCR 体系，利用插入片段的引物进行扩增验证。反应结束后使用 1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳判断条带大小，并交由公司进行“Sanger 法”测序，确认质粒序列准确无误。

表 17 煮菌 PCR 验证体系

成分	20 μ L 体系
10 $\times$ Buffer	2 μ L
dNTPs	1.6 μ L
引物 P1	0.8 μ L
引物 P2	0.8 μ L
rTaq	0.1 μ L
ddH ₂ O	补充至 20 μ L

2.3.2.7 质粒提取

向带有 Amp 抗性的 20 mL 新鲜液体 LB 培养基中接入带有目标质粒的载体菌,于 37°C 恒温摇床以 220 rpm 摇菌过夜。对带收集管的吸附柱 CP3 加入 500 μ L 平衡液 BL, 12,000 rpm 离心 1 min 弃废液, 完成柱平衡。收集所有菌液, 分装至 4 管 5 mL 离心管中, 4,000 rpm 离心 3 min, 尽可能弃上清。将菌体沉淀转移至 4 个 1.5 mL 离心管中, 分别加入 250 μ L P1 溶液(预先加入 RNase A), 振荡混匀后分别加入 250 μ L P2 溶液, 轻柔地上下翻转 8 次(反应时间不宜过短, 但不超过 5 min)。使菌体充分裂解后, 加入 350 μ L P3 溶液, 立即温和地上下反转 8 次(避免出现局部沉淀), 出现白色絮状沉淀。12,000 rpm 离心 10 min 后, 将上清液尽可能转移至吸附柱 CP3 中, 12,000 rpm 离心 1 min, 将收集管中液体重新上柱, 重复离心。向每管分别接入 600 μ L 漂洗液 PW(预先加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液并重复一次。12,000 rpm 离心 2 min, 将吸附柱 CP3 转移到 1.5 mL EP 管中, 敞口室温静置若干分钟, 尽可能晾干(尽量除去 PW, 防止乙醇干扰后续酶反应)。悬空向柱膜中心滴加 50 μ L 洗脱液 EB, 于室温静置 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min, 将收集管中液体重新上柱, 重复离心并弃吸附柱。测定浓度后, 保存于 -20°C。

2.3.3 构建白念珠菌敲除/回补株

2.3.3.1 制备白念珠菌的感受态细胞

1) 菌株活化

从 -80°C 的甘油管中取出待转化菌株, 于 YPD 固体平板上划线接种。30°C 活化 2 天。挑选新鲜的单克隆菌体接至 3 mL 液体 YPD 中, 以 220 rpm 于 30°C 恒温摇床孵育过夜, 取约 2% (v/v) 转接至新鲜的 20 mL 液体 YPD 中, 保证 OD₆₀₀ 位于 0.8~1.0 之间。以 220 rpm 于 30°C 恒温摇床继续培养至 OD₆₀₀ 位于 1.8~2.0 之间。

2) 感受态细胞准备

将菌体置于冰上 15 min 停止生长, 摇匀分装至 5 mL 离心管中, 以 4,000 rpm 离心 3 min 弃上清, 合并菌体至 2 个 5 mL 离心管中, 并每管加入 3 mL 预冷的无菌 ddH₂O 混匀清洗菌体, 再以 4,000 rpm 离心 3 min 弃上清。每管加入 2 mL

TE/0.1M LiAc，轻弹混匀，以 150 rpm 于 30℃恒温摇床孵育 90 min。之后每管加入 50 μ L 1M DTT，以 150 rpm 于 30℃ 恒温摇床继续孵育 30 min。孵育结束后，加入 3 mL 预冷的无菌 ddH₂O 混匀清洗菌体，再以 4,000 rpm 离心 3 min 弃上清，重复 3 次。每管加入 2 mL 预冷的 1M Sorbitol 溶液重悬菌体，再以 4,000 rpm 离心 3 min 弃上清，合并菌体后加入 120 μ L 1M Sorbitol 溶液，从而得到感受态细胞。

2.3.2.2 白念珠菌的电转化

1) 制备线性化质粒

对已构建并验证好酶切位点的目标敲除/回补质粒（如 pSFS2A，pNIMI）进行双酶切，使用 TIANGEN 试剂盒回收酶切产物。线性化片段应提前制备并存于 -20℃，且为保证转化效率，浓度应 > 300 μ g/mL。

2) 电转化

取出 40 μ L 感受态细胞于 1.5 mL EP 管中，留 1 管做不加质粒的阴性对照。加入 10 μ L 线性化质粒（低浓度可加不超过 15 μ L），混匀后置于冰上孵育 5 min。转移至预冷的电转杯中，保证外壁干燥且内液无气泡。调整程序为 Fungi-SC: 2 后开始电击，最适时长为 5~6 ms 之间。迅速加入 1 mL 预冷的 1M Sorbitol 溶液，转移菌液至新的 1.5 mL 离心管中。

3) 菌株复壮

以 4,000 rpm 离心菌悬液 3 min 弃上清，加入 800 μ L 新鲜的液体 YPD，使用封口膜密封后以 220 rpm 于 37℃恒温摇床孵育 2hr。以 4,000 rpm 离心 3 min 弃上清，加入 100 μ L 无菌 ddH₂O 重悬细胞，以每板约 10 μ L 涂布筛选平板，于 30℃ 培养 2 天得到转化子，多次转板于 Y+2C 筛选板上纯化。

2.3.2.3 白念珠菌构建结果筛选

1) 提取转化子基因组

采用裂解法提取基因组 DNA，普通 PCR 定性使用。将 200 μ L DNA Lysis Buffer 加至 1.5 mL 离心管中，挑入约小米粒大小新鲜菌体充分混匀，于 70℃ 恒温水浴锅中孵育 15 min 后，放入 -80℃ 冰箱冰冻裂解，再于 70℃ 解冻。之后加

入 600 μL 无水乙醇，颠倒混匀，以 12,000 rpm 离心 2 min，弃上清后加入 600 μL 75%乙醇，以 12,000 rpm 离心 2 min，弃上清并重复一次，吸去剩余乙醇。空气中静置若干时间，待完全晾干后加入 40 μL 无菌 ddH₂O 混匀，以 12,000 rpm 离心 10 s 后得到 DNA 模板上清液。

2) 验证转化子

使用相应引物，按表 18 配制常规 PCR 验证体系，按表 14 设置 PCR 程序，进行扩增验证。反应结束后使用 1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳判断条带大小，确认是否为目标转化子。

表 18 常规 PCR 验证体系

成分	20 μL 体系
10 $\times$ Buffer	2 μL
dNTPs	1.6 μL
引物 P1	0.8 μL
引物 P2	0.8 μL
DNA 模板	2 μL
rTaq	0.1 μL
ddH ₂ O	补充至 20 μL

3) 菌种保藏

在确保单克隆的阳性转化子无误后，纯化转板，保至甘油管中存于-80 $^{\circ}\text{C}$ ，至少保藏 6 个阳性转化子，得到该目的基因的敲除/回补突变株。

2.3.4 体外传代模型构建

2.3.4.1 接菌传代

从-80 $^{\circ}\text{C}$ 接出 *WOR1_{prom}-FLP* 野生型菌株和突变型菌株，于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温空气培养箱中利用固体 YPD 和 SD (H⁻, L⁻) 缺陷板筛选培养 1 天。分别接入 3 管 3 mL 新鲜液体 SD 培养基中，调整 OD₆₀₀ = 0.1。以 220 rpm 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床摇菌至 OD₆₀₀ = 2~3（保持菌株处于生长对数期，活力更高），取 1 mL 菌液接入预热的 20 mL 新鲜液体 SD 培养基中，以 220 rpm 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床摇菌至 OD₆₀₀ = 2~3，重复传代 8 次。

2.3.4.2 涂板观察

最后一次摇菌至 $OD_{600} = 2\sim 3$ ，调整浓度后取 150 μL 菌液使每板涂 400~500 个细胞，分别涂板在非选择性固体 SD 培养基和选择性固体 5-FOA (25 $\mu\text{g/ml}$ Uridine) 培养基^[32]上，于 30°C 恒温空气培养箱中培养 3 天，筛选尿嘧啶缺陷型菌株。通过菌落 PCR 记录，验证 flp 介导重组的 *URA3* 缺失。估计表达 *WOR1* 的细胞频率计算公式为：
$$WOR1 \text{ 表达频率} = \frac{\text{5-FOA}^R, \text{PCR 阳性菌落}}{\text{菌落总数}} \times 100\% \quad (\text{公式 1.3})$$

2.3.5 小鼠体内肠道定植模型构建

2.3.5.1 小鼠抗生素前处理

利用添加了抗生素的水 (1mg/mL Amp, 1mg/mL Kana, 1mg/mL Chloramphenicol, 1mg/mL Streptomycin) 先喂养 18-21 克 BALB/c 雌性小鼠 3 天，并每天对每只小鼠灌胃 200 μL 该抗生素水前处理第 2、3 天时，每只小鼠收集粪便 3~4 颗，利用 1 $\times$ PBS 混匀后取 200 μL 涂板固体 YPD 培养基（验证去除其他微生物污染，为白念珠菌定植创造良性生境）。

2.3.5.2 灌胃用菌体准备

从 -80°C 接出野生型菌株和突变型菌株，于 30°C 恒温空气培养箱中利用固体 YPD 和 SD (H^+L^-) 缺陷板筛选培养 1 天。

1) 探究定植效率

向 20 mL 新鲜液体 YPD 培养基中接入带有目标菌株，于 30°C 恒温摇床以 220 rpm 摇菌过夜。

2) 探究 white-GUT 转换效率

向 20 mL 新鲜液体 SD 培养基中接入带有目标菌株，于 30°C 恒温摇床以 220 rpm 摇菌过夜。取 200 μL 菌液，加入到新的 2 瓶 20 mL 新鲜液体 SD 培养基中二次活化，于 30°C 恒温摇床以 220 rpm 摇菌约 19 hr。

2.3.5.3 小鼠菌液灌胃

测量 OD_{600} 保证菌液浓度合适后，将菌液合并转移至 50 mL 离心管，3,000 rpm 离心 5 min，去上清后用 20 mL 1 $\times$ PBS 重悬清洗，再以 3,000 rpm 离心 5 min 收

集菌体沉淀。取 2 mL 添加过抗生素的 $1 \times \text{PBS}$ 溶液（抗生素成分、浓度同前处理所用）将菌体沉淀重悬，精确调整菌液浓度为约 $5 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ ，每只小鼠灌胃 200 μL 。同步取稀释到 $5 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ 的菌液 10 μL ，混匀 100 μL 无菌 ddH₂O 涂布固体 YPD 培养基，设置 3 个平行组。验证浓度无误。

2.3.5.4 样品收集

灌胃后依旧保持每天灌胃 200 μL 抗生素水。灌胃后 3 天开始，收集小鼠的粪便 3~4 颗，用添加过抗生素的 $1 \times \text{PBS}$ 溶液混匀。调整为原液、 $10 \times$ 稀释、 $100 \times$ 稀释三个梯度。最后将小鼠处死，取盲肠，用冷冻组织研磨机于 4°C 采用 70Hz 破碎 2 min，重复 1 次。同样将破碎液调整为原液、 $10 \times$ 稀释、 $100 \times$ 稀释三个梯度。

1) 探究定植效率

每个浓度梯度设置 3 个平行组，收集完粪便或盲肠后将每个梯度的破碎液各取 150 μL 涂板在固体 YPD 培养基上，于 30°C 恒温空气培养箱中培养 3 天，比较各突变株和野生型菌株在肠道中的定植率。

2) 检测 white-GUT 转换效率

每个浓度梯度设置 3 个平行组，收集完粪便或盲肠后将每个梯度的破碎液各取 150 μL 涂板在固体 SD 培养基和固体 5-FOA 培养基上，于 30 °C 恒温空气培养箱中培养 3 天，估计表达 *WOR1* 的细胞频率（计算公式见公式 1.3）。

2.3.6 数据处理

图像处理与分析使用 Alphafold 与 ImageJ，数据分析使用 Microsoft Excel 和 GraphPad Prism 9，制图使用 Microsoft Powerpoint 和 Canvas X GIS 2020。数据以平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ S.E.M.) 表示。

三、研究结果

3.1 Mcu1 作为线粒体蛋白影响白念珠菌碳源代谢

如图 3.A 所示，通过查阅真菌基因组库 CGD (www.candidagenome.org)，获知 Mcu1 蛋白是由 271 个氨基酸组成，具备一段跨膜区域和卷尾。该蛋白定位在线粒体膜上，表明 Mcu1 很有可能与线粒体参与的相关功能有关。于是我们使用 Lee's 与 SD 两种氨基酸培养基做基质，培养 WT 野生型菌株、*mcu1/mcu1* 突变株和 *mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1* 回补株三种白念珠菌，分别针对白念珠菌对 Glucose, GlcNAc, Amino acid 三种不同碳源的利用效率进行检测。图 3.B 中的培养结果表明，WT 野生型菌株与 *mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1* 回补株均能够利用发酵碳源 (Glucose) 和非发酵碳源 (GlcNAc, Amino acid) 行使正常的代谢功能，而 *mcu1/mcu1* 突变株在任意一种培养基上均不能利用非发酵碳源，即只能利用葡萄糖并通过其主导的糖酵解途径完成碳源代谢。这一结果证明 Mcu1 作为线粒体膜定位蛋白对白念珠菌 TCA 循环正常运转十分重要。因此，我们推测 Mcu1 是白念珠菌中感应 GlcNAc 调控 TCA 循环，影响共生和致病状态及其转换的关键元件。

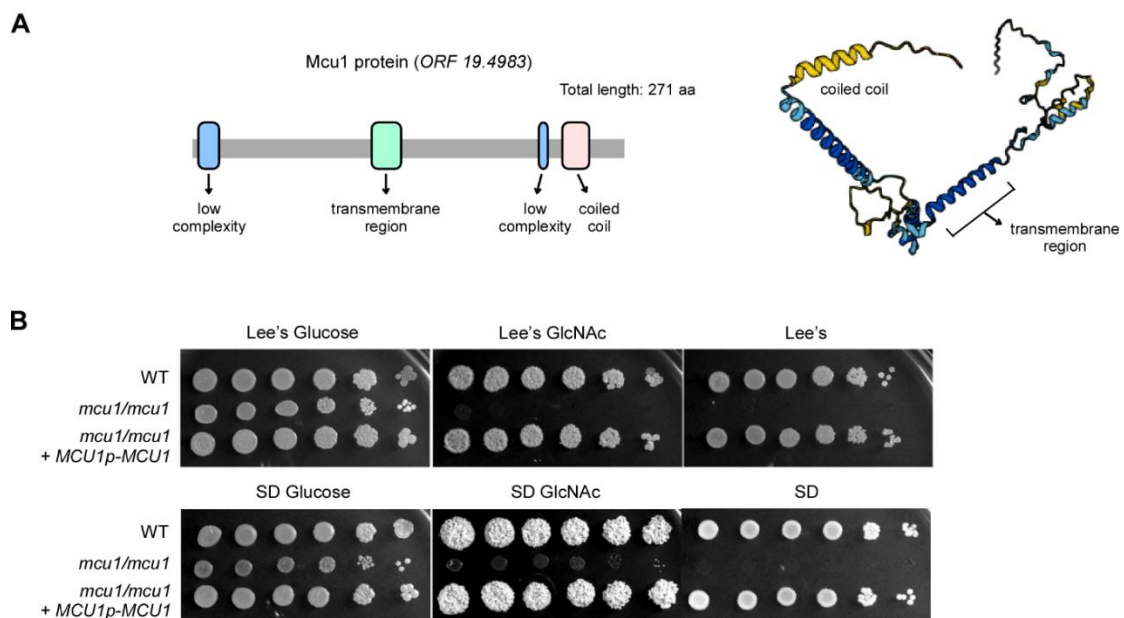


图 3. Mcu1 的线粒体定位与功能

(A) Mcu1 蛋白结构与定位。蛋白信息引自 CGD (www.candidagenome.org)，用 Microsoft Powerpoint 绘图。三维结构图使用 AlphaFold 预测；(B) 菌株碳源利用比较。收集用液体 YPD 培养基过夜培养的 WT (SC5314), *mcu1/mcu1* (XM91), *mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1* (LTS701)

菌体，并用无菌 ddH₂O 洗涤 2 次。将细胞浓度调整为 2×10^8 cells/mL，并使用无菌 ddH₂O 进行 $10 \times$ 稀释。各取 5 μ L 进行点板，共点板 6 种培养基 (Lee's Glucose, Lee's GlcNAc, Lee's, SD Glucose, SD GlcNAc, SD)，每种设置 6 个重复组，于 25°C 恒温空气培养箱中孵育 3 天，观察拍摄

3.2 检测 Mcu1 在不同条件下对白念珠菌 white-opaque 形态转换的影响

白念珠菌的 white-opaque 形态转换是一种十分典型的表型转换系统，对白念珠菌适应外界环境和调整有性生殖方面具有重要作用。研究表明，在常规的空气培养条件下，白念珠菌发生 white-opaque 形态转换的频率并不高甚至较低，且该转换过程受到交配型位点 (mating type locus, MTL) 和多种信号通路的调控。*MTL a/ α* 杂合型的白念珠菌需要在环境因子（如以 GlcNAc 为碳源、CO₂ 为培养环境等）的诱导下才能发生低频率的 white-opaque 转换，而 *MTL* 交配型位点纯合的白念珠菌可以在酸性的 pH 环境或高浓度的 CO₂ 等条件下，于 25°C 发生较高频率的 white-opaque 表型转换。根据前期研究成果，我们推测 Mcu1 在 TCA 循环正常运转中起到关键作用，而该代谢途径与 white-opaque 转换息息相关。于是，我们进一步设计实验检测 Mcu1 在不同环境下对 white-opaque 形态转换产生的影响，确定其功能。

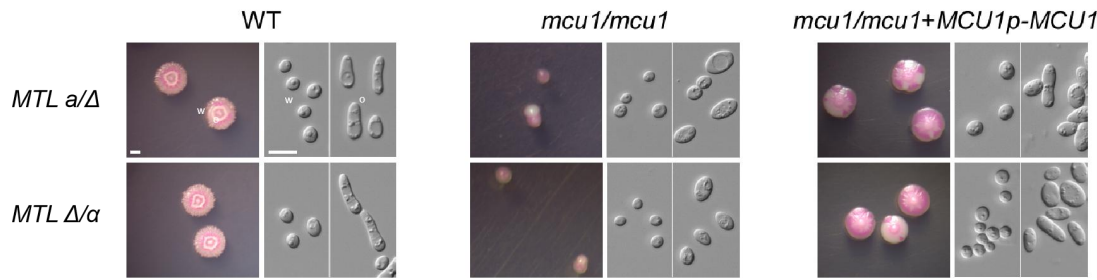
3.2.1 CO₂ 诱导条件下 Mcu1 对 white-opaque 形态转换的影响

我们利用 pSFS2A-L23.14 质粒，通过同源重组法成功构建白念珠菌 *mcu1/mcu1+MCU1p-MCU1* 回补株的 *MTL a/ Δ* 和 *MTL Δ / α* 纯合株。结合已构建的 WT 野生型和 *mcu1/mcu1* 突变株的 *MTL* 基因纯合株，经过在 Lee's Glucose (pH=6.8) 上于 25°C 空气中培养 5~10 天分纯 white 细胞，并将其重新涂布在 Lee's Glucose (pH=6.8) 上于 25°C 5% CO₂ 环境下培养 5~10 天，观察 opaque 细胞的形成，得到 white-opaque 形态转换表型如图 4.A 所示。

可以清楚地观察到，从菌落形态来看，white 细胞在含有 Phloxine B 的固体培养基上显现为白色凸面圆形，而 opaque 细胞呈现为深粉红色，大多与 white 细胞以混合的形式出现，表现为粉色扇面，即为 sector - opaque。从细胞形态看，white 细胞体积较小，呈圆球或椭球型；而 opaque 细胞两端更长，呈长杆状偏椭圆形，单个体积约比 white 细胞大 2~3 倍，且中央存在明显的大液泡。此外，实验中观察到 *mcu1/mcu1* 突变株生长速度过于缓慢，需要延长培养时间。

结合图 4.B 的数据统计结果来看，无论是 *MTL a/Δ* 还是 *MTL Δ/α* 纯合型，WT 野生型菌株、*mcu1/mcu1* 突变株和 *mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1* 回补株均保持了较高的 white-opaque 转换效率，且均逼近于 100% 完全转换，表明 *MTL* 交配基因型不影响 white-opaque 转换。相较而言，菌丝生长较旺盛的 WT 野生型菌株整体转换率低于 *mcu1/mcu1* 突变株和 *mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1* 回补株。这代表 *mcu1/mcu1* 突变株依旧能够有效利用 CO₂ 进行 white-opaque 转换，Mcu1 似乎并没有对白念珠菌 white-opaque 形态转换的正向进行起到决定性作用，这与我们猜测 Mcu1 将在此过程中发挥关键效果的预期有差异。

A



B

white-opaque switching rate		
Strain	Total colonies	% op colonies
WT <i>MTL a/Δ</i>	109	(75.1±5.4)
<i>mcu1/mcu1 MTL a/Δ</i>	227	(100±0.0)
<i>mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1 MTL a/Δ</i>	238	(88.3±2.8)
WT <i>MTL Δ/α</i>	107	(99.1±1.5)
<i>mcu1/mcu1 MTL Δ/α</i>	187	(100±0.0)
<i>mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1 MTL Δ/α</i>	206	(100±0.0)

图 4. CO₂ 诱导的 *MTL* 纯合化菌株的 opaque-white 形态转换

(A) *MTL* 交配型基因纯合化菌株细胞的 white-opaque 转换与形态比较。活化 6 种菌株，包括 WT *MTL a/Δ* (XM57), WT *MTL Δ/α* (XM58), *mcu1/mcu1 MTL a/Δ* (XM123), *mcu1/mcu1 MTL Δ/α* (XM122), *mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1 MTL a/Δ* (MMY1), *mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1 MTL Δ/α* (MMY4)，细胞分别划线接种在固体 YPD 培养基上于 30°C 恒温空气培养箱中培养 2 天，之后涂板到固体 Lee's Glucose (pH = 6.8, containing 5 μg/mL phloxine B)。培养平板在 25°C 恒温空气培养箱中孵育 5~10 天，促进 white 细胞和 opaque 细胞的分纯。随后将 white 细胞重新接种到固体 Lee's Glucose (pH = 6.8, containing 5 μg/mL phloxine B)上，每个基因型设置 3 个平行组，于 25°C 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 5~10 天。其中，WT 野生型菌株和 *mcu1/mcu1 + MCU1p-MCU1* 回补株分纯与培养时间为 5 天，而 *mcu1/mcu1* 突变株生长速度较慢，分纯与培养时间延长至 10 天。组图左侧为菌落图，右侧为细胞图。菌落和细胞图的比例尺分别为 1 mm 和 10 μm。w 表示 white，op 表示 opaque; (B) CO₂ 诱导的 *MTL* 交配型

基因纯合化菌株细胞的 white-opaque 转换效率。计算公式参见公式 1.1, 数据以平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ S.E.M.) 表示

3.2.2 GlcNAc 诱导条件下 Mcu1 对 white-opaque 形态转换的影响

为探究不同生长环境对于白念珠菌 white-opaque 形态转换的影响, 我们调整了 CO₂ 诱导条件下的实验方案。在保证其他条件和流程不变的前提下, 将分纯后的 white 细胞培养条件改为 25°C 的空气环境中。同时考虑到前期实验中 *mcu1/mcu1* 突变株几乎难以在只含有 GlcNAc 的 Lee's 培养基上生长, 为保证 white 细胞正常生长并发生形态转换, 我们调整培养基为 Lee's Glucose + GlcNAc (pH = 6.8, GlcNAc 浓度为 Lee's Glucose 中 Glucose 的 1/2)。从表 19 的数据统计结果来看, WT 野生型菌株、*mcu1/mcu1* 突变株和 *mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1* 回补株的 *MTL a/Δ* 和 *MTL Δ/α* 纯合型菌株均几乎没有发生任何 white-opaque 转换, 大多停留在 white 形态。这一现象虽然说明 Mcu1 作为 GlcNAc 的感应因子, 其对 white-opaque 转换在中等浓度的 GlcNAc 条件下的正向发生可能有所作用, 但由于相同条件下 WT 野生型菌株和 *mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1* 回补株中也难以观察到 white-opaque 转换现象, 因此 Mcu1 通过 GlcNAc 调控白念珠菌 white-opaque 转换的作用并不显著。

表 19 GlcNAc 诱导的 *MTL* 纯合化菌株的 white-opaque 转换效率
white-opaque switching rate

Strain	Total colonies	% op colonies
WT <i>MTL a/Δ</i>	128	< 0.78
<i>mcu1/mcu1 MTL a/Δ</i>	205	< 0.49
<i>mcu1/mcu1</i> + <i>MCU1p-MCU1 MTL a/Δ</i>	224	(15.7 $\pm$ 7.2)
WT <i>MTL Δ/α</i>	148	< 0.67
<i>mcu1/mcu1 MTL Δ/α</i>	250	< 0.40
<i>mcu1/mcu1</i> + <i>MCU1p-MCU1 MTL Δ/α</i>	213	(4.8 $\pm$ 0.8)

活化 6 种菌株, 包括 WT *MTL a/Δ* (XM57), WT *MTL Δ/α* (XM58), *mcu1/mcu1 MTL a/Δ* (XM123), *mcu1/mcu1 MTL Δ/α* (XM122), *mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1 MTL a/Δ* (MMY1), *mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1 MTL Δ/α* (MMY4), 分别划线接种在固体 YPD 培养基上于 30°C 恒温空气培养箱中培养 2 天, 之后涂板到固体 Lee's Glucose (pH = 6.8, containing 5 μg/mL phloxine B)。培养平板在 25°C 恒温空气培养箱中孵育 5~10 天, 促进 white 细胞和 opaque

细胞的分纯。随后将 white 细胞重新接种到固体 Lee's Glucose + GlcNAc (pH = 6.8, containing 5 μ g/mL phloxine B)上, 每个基因型设置 3 个平行组, 于 25°C 空气恒温培养箱中培养 5~10 天。其中, WT 野生型菌株和 *mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1* 回补株分纯与培养时间为 5 天, 而 *mcu1/mcu1* 突变株生长速度较慢, 分纯与培养时间延长至 10 天。数据计算公式参见公式 1.1, 数据以平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ S.E.M.) 表示。

3.2.3 在空气条件下 Mcu1 对 opaque-white 形态转换的影响

之前的实验表明, *mcu1/mcu1* 突变株依旧能很好地受 CO₂ 诱导发生 white-opaque 转换, 且转换率达到了 100%。但按照我们的猜想, Mcu1 对白念珠菌 white-opaque 转换应当起正向促进作用, 这一结果与预期有所出入。因此, 为确定 Mcu1 对 white-opaque 转换结果的影响是否稳定, 我们设计了 opaque-white 转换实验。在保证其他条件和流程不变的前提下, 使用 Lee's Glucose + GlcNAc (pH = 6.8, GlcNAc 浓度为 Lee's Glucose 中 Glucose 的 1/2) 促进 opaque 细胞分纯, 并将分纯后的 opaque 细胞涂板。从表 20 的数据统计结果来看, WT 野生型菌株和 *mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1* 回补株均几乎没有发生任何 opaque-white 转换, 大多停留在 opaque 形态, 与预期和前期实验结果一致。而 *mcu1/mcu1* 突变株却全部发生 opaque-white 转换。结合图 4 结果分析, *mcu1/mcu1* 突变株的 opaque 形态可能非常不稳定, 这一现象启示我们 Mcu1 很可能在 white-opaque 转换中起重要作用, 但由于其影响的上下游通路十分敏感, 很大概率会是一个动态的调控过程。

表 20 Mcu1 影响白念珠菌的 opaque-white 转换效率
opaque-white switching rate

Strain	Total colonies	% wh colonies
WT	154	(5.7 $\pm$ 3.5)
<i>mcu1/mcu1</i>	59	(100 $\pm$ 0)
<i>mcu1/mcu1</i> + <i>MCU1p-MCU1</i>	69	< 1.4

活化 3 种菌株, 包括 WT (XM58), *mcu1/mcu1* (XM122), *mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1* (MMY4), 分别划线接种在固体 YPD 培养基上于 30°C 恒温空气培养箱中培养 2 天, 之后涂板到固体 Lee's Glucose + GlcNAc (pH = 6.8, containing 5 μ g/mL phloxine B)上, 培养平板在 25°C 空气恒温培养箱中孵育 5~10 天, 促进 opaque 细胞的形成。随后将 opaque 细胞重新接种到 Lee's Glucose (pH = 6.8, containing 5 μ g/mL phloxine B)上, 每个基因型设置 3 个平行组, 于 25°C 空气恒温培养箱中培养 5~10 天。其中, WT 野生型菌株和 *mcu1/mcu1* +

MCU1p-MCU1 回补株分纯与培养时间为 5 天，而 *mcu1/mcu1* 突变株生长速度较慢，分纯与培养时间延长至 10 天。数据计算公式参见公式 1.2，数据以平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ S.E.M.) 表示。

3.3 检测 Mcu1 蛋白与 TCA 循环酶的互作和细胞定位

根据已有实验结果，Mcu1 显著影响白念珠菌 TCA 循环代谢的正常运行，且在 white-opaque 转换过程中很可能发挥关键作用。由于已知 Mcu1 可能与多个 TCA 循环酶（如 Kgd1, Sdh2, Sdh3, Idp2）存在互作，且该蛋白功能失活后会减弱白念珠菌共生能力^[25]。因此，我们将进一步聚焦于 Mcu1 与 TCA 循环酶的相互作用情况与其细胞中的定位，理清其关键功能。

3.3.1 TCA 循环酶 Sdh3 在 CO₂ 诱导下的 white-opaque 形态转换

实验方案与方法与图 4 类似，TCA 循环酶 Sdh3 在 CO₂ 诱导下的 white-opaque 形态转换结果如图 5 所示。可以清楚地看到，*sdh3/sdh3* 突变株和 *sdh3/sdh3* + *SDH3p-SDH3* 回补株均几乎没有发生任何 white-opaque 形态转换，无法说明 TCA 循环酶 Sdh3 对白念珠菌 white-opaque 形态转换的影响，有待实验进一步探索具体原因。

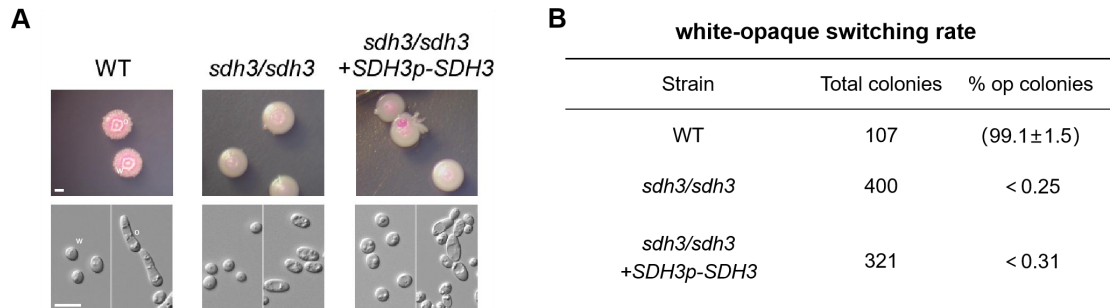


图 5. CO₂ 诱导 *sdh3/sdh3* 突变株的 white-opaque 形态转换

(A) *sdh3/sdh3* 突变株的 white-opaque 转换与形态比较。活化 3 种菌株，包括 WT (XM58), *sdh3/sdh3* (XM93), *sdh3/sdh3*+*SDH3p-SDH3* (MMY17)，细胞分别划线接种在 30°C 的固体 YPD 培养基上培养 2 天，之后涂板到固体 Lee's Glucose (pH = 6.8, containing 5 μ g/mL phloxine B)。培养平板在 25°C 恒温空气培养箱中孵育 5 天，促进 white 细胞和 opaque 细胞的分纯。随后将 white 细胞重新接种到固体 Lee's Glucose (pH = 6.8, containing 5 μ g/mL phloxine B) 上，每个基因型设置 3 个平行组，于 25°C 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 5 天。组图左侧为菌落图，右侧为细胞图。菌落和细胞图的比例尺分别为 1 mm 和 10 μ m。w 表示 white，op 表示 opaque; (B) CO₂ 诱导的 white-opaque 转换效率。计算公式参见公式 1.1，数据以平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ S.E.M.) 表示。WT 野生型菌株数据与图 4 数据同一起来源

3.3.2 Mcu1 影响 Sdh3 的细胞定位

为了进一步探究 Mcu1 如何影响 TCA 循环酶 Sdh3 的细胞定位,我们利用同源重组法成功构建 Sdh3 蛋白定位的 GFP 绿色荧光蛋白质粒 pNIMI-SDH3-GFP-SAT1,并顺利在 WT 野生型菌株和 *mcu1/mcu1* 突变株中构建融合表达菌株 WT-SDH3-GFP 与 *mcu1/mcu1*-SDH3-GFP。通过在 Y + Dox 培养基上诱导 GFP 信号表达,观察荧光表达情况。

如图 6 所示,作为阴性对照的非 GFP 质粒表达菌株并不表达绿色荧光信号,而在相同激发光强下的 *mcu1/mcu1*-SDH3-GFP 和 WT-SDH3-GFP 菌株则有明显荧光信号表达。可以清晰地观察到,WT-SDH3-GFP 菌株中的 Sdh3 蛋白主要表达在细胞膜附近,呈现包围状。由于线粒体通常分布在细胞功能旺盛的区域,参与 TCA 循环的相关分子也定将与之相邻。白念珠菌作为真菌,其细胞膜周围功能丰富,生理活动包括出芽生殖、生成菌丝与生成交配结合管等发生频繁,呼吸作用参与度高。因此,TCA 循环酶 Sdh3 的定位与白念珠菌细胞线粒体分布大体一致;相反,*mcu1/mcu1*-SDH3-GFP 菌株中的荧光信号则呈现弥散状,较为均匀地分布在细胞质中。考虑到 Mcu1 作为线粒体膜定位蛋白深度参与到 TCA 循环中,因此可以推断出 *MCU1* 基因被敲除后会影响到线粒体功能定位,进而可能影响到线粒体参与的代谢等过程,对白念珠菌各类生命活动造成影响,这与我们的预期相吻合。

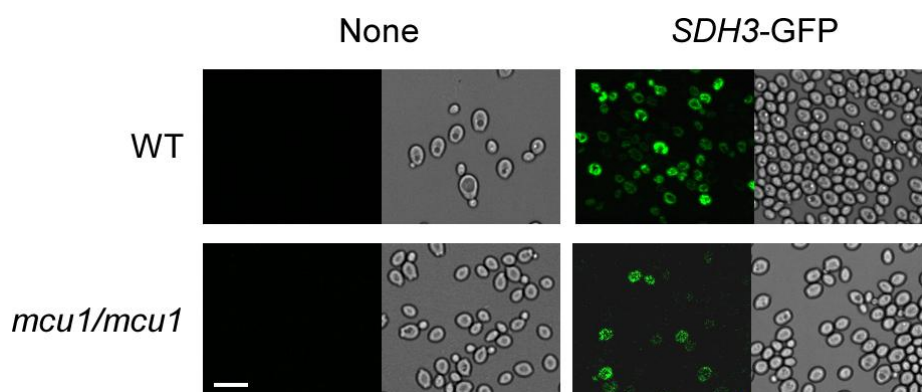


图 6. Sdh3 在不同菌株内的细胞定位

将 WT (XM100), *mcu1/mcu1* (XM98) 和带有绿色荧光蛋白定位信号的 WT-SDH3-GFP (MMY13), *mcu1/mcu1*-SDH3-GFP (MMY16) 的细胞分别划线接种在固体 YPD 培养基上于 30°C 空气恒温培养箱培养 2 天,之后涂板到固体 Y+Dox GFP 诱导培养基 (containing 40 $\mu\text{g/mL}$ doxycycline) 上。培养平板在 30°C 恒温空气培养箱中避光孵育 4 天,促进 GFP 信号表达。组图左侧为 488 nm 蓝色激光激发下的绿色荧光图,右侧为细胞图。比例尺均为 10 μm

3.4 Mcu1 与 TCA 循环酶对白念珠菌体内定植效率和 *WOR1* 表达的影响

已有研究表明，白念珠菌能够响应宿主肠道环境变化，调节自身的 TCA 循环代谢（如上调 *CIT1*, *IDP2*, *KGD1* 等基因表达），同时引起共生-致病动态平衡移动^[22]。此外，近年来新发现的白念珠菌 white-GUT 转换也揭示了共生-致病转换的调控因子 *Wor1* 仅在体内促进白念珠菌 white 细胞完全转变为定植能力显著提升的 GUT 形态，而过表达另一个同时与 TCA 循环相互作用的调控因子 *EFG1* 则会发生相反的效果^[11]。我们将进一步检测 *Mcu1* 蛋白是否会协同 TCA 循环对白念珠菌在宿主体内定植状态产生影响，并确定 *Mcu1* 是否会影响 *Wor1* 表达，进而破坏白念珠菌体内共生-致病转换平衡。

3.4.1 *Mcu1* 和 TCA 循环酶突变株影响白念珠菌肠道定植

我们针对 *Mcu1* 和 TCA 循环酶 (*Cit1*, *Aco1*, *Kgd1*, *Sdh3*) 敲除突变株与回补株的小鼠体内定植能力进行了检测，结果如图 7 所示。可以清晰地观察到，WT 野生型菌株与 *Mcu1* 和各个 TCA 循环酶敲除回补株的定植能力在整个实验过程中并无明显差别，维持在较高水平 ($> 4 \times 10^7$ CFU/g)，整体上随实验进行呈下降趋势。而对于各突变株而言，无一例外均发现明显下降。其中，只有 *Kgd1* 和 *Sdh3* 两个突变株还能在实验第 5 天被检测出定植细胞，且在实验第 10 天后没有任何突变株被检测到定植。这一结果表明 *Mcu1* 与 TCA 循环酶对于白念珠菌在小鼠体内共生状态具有关键作用，对它们的敲除会导致白念珠菌定植效率显著下调，共生能力减弱。因此，结合针对白念珠菌共生-致病转换的调控因子 *Wor1* 的已有研究，我们进一步推测 *Mcu1* 蛋白与 TCA 循环酶很可能是通过影响 *Wor1* 表达从而作用于共生-致病状态平衡改变。

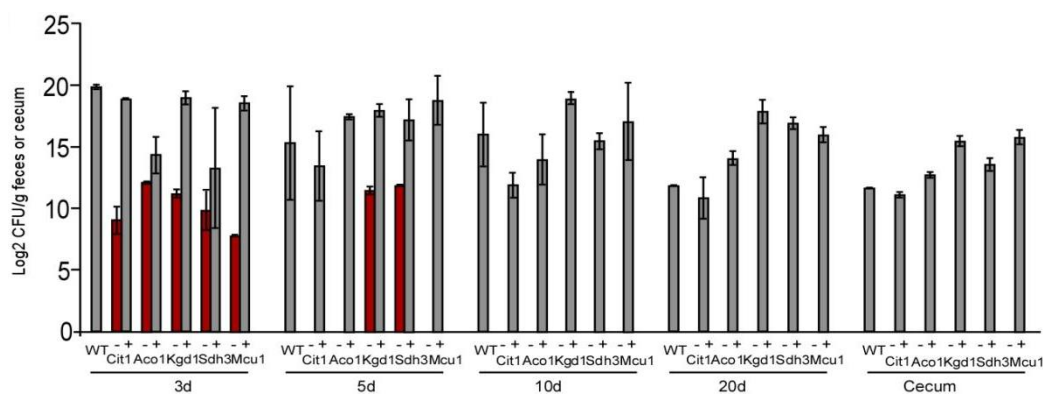


图 7. *Mcu1* 与 TCA 循环酶敲除株肠道定植能力

采用已使用抗生素水 (1mg/mL Amp, 1mg/mL Kana, 1mg/mL Chloramphenicol, 1mg/mL Streptomycin) 前处理 3 天的 BALB/c 雌性小鼠，每只小鼠灌胃 200 μ L 约 5×10^8 cells/mL 浓

度的菌液, 包括有 WT (SN152), *mcu1/mcu1* (XM98), *cit1/cit1*, *kgd1/kgd1*, *acol/acol*, *sdh3/sdh3*, *mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1* (LTS701), *cit1/cit1* + *CIT1p-CIT1*, *kgd1/kgd1* + *KGD1p-KGD1*, *acol/acol* + *ACOLp-ACOL*, *sdh3/sdh3* + *SDH3p-SDH3* (LTS674), 并持续使用抗生素水后处理。在菌液灌胃后第 3, 5, 10, 20 天收集粪便并称重, 破碎液各取 150 μ L 涂板在固体 YPD 培养基上, 设置 3 个平行组; 在菌液灌胃后第 20 天, 处死小鼠并取盲肠并称重, 于 4°C 使用 70Hz 破碎 2 min, 同样取 150 μ L 涂板在固体 YPD 培养基上, 设置 3 个平行组。各平行组置于 30°C 空气恒温培养箱培养 3 天, 观察记录。数据处理采用 Graphpad prism 9 进行, Error bar 表示同一菌株组内标准误差

3.4.2 Mcu1 影响白念珠菌 *WOR1* 表达

结合已有研究^[1], 白念珠菌 *Wor1* 表达会影响 white-opaque/white-GUT 形态转换, 由此我们设计了体内、外诱导 *Wor1* 表达的实验, 探究 *Mcu1* 之于 *Wor1* 表达的影响, 从而得到 *Mcu1* 对白念珠菌共生-致病状态转换的潜在功能。

我们采用的 *WOR1_{prom}-FLP* 菌株包含一个内源性 *WOR1* 启动子与 *Flp* 重组酶基因融合的位点, 还包含一个用于筛选的片段拷贝 *URA3*, 它对 5-FOA 十分敏感, 且侧面具有 *FRT* 重组位点。按照预期, *WOR1* 启动子正常激活时会介导 *FLP* 的表达, 进而引发 *URA3* 片段在 *FRT* 位点被剪切, 从而产生对 5-FOA 的抗性 (暂不考虑 *URA3* 基因的基因突变或重组等)。因此, 我们选择将 *MCU1* 基因在 *WOR1_{prom}-FLP* 菌株中进行敲除, 设计了体内、外 *Wor1* 表达效率检测实验, 如图 8.A 所示。通过分别统计固体 5-FOA 筛选培养基和固体 SD 非筛选培养基上的菌落数量, 分析 *Mcu1* 对于白念珠菌在小鼠体内定植和体外条件下 *Wor1* 表达的影响, 得到结果如图 8.B 和图 8.C 所示。

结果表明, 小鼠体内环境下, WT 野生型 *WOR1_{prom}-FLP* 菌株能够被正常诱导 *Wor1* 表达, 但转换频率不高。而 *mcu1/mcu1* 突变株则完全没有表达情况; 对于体外环境, 无论是 WT 野生型 *WOR1_{prom}-FLP* 菌株还是 *mcu1/mcu1* 突变型 *WOR1_{prom}-FLP* 菌株, 均没有成功诱导 *Wor1* 表达。这一研究结果验证了 *Wor1* 确实难以在体外被诱导表达, 且 *Mcu1* 对 *Wor1* 在体内的表达起到促进效果, 敲除 *Mcu1* 可能会引起白念珠菌共生状态的稳定性下降。

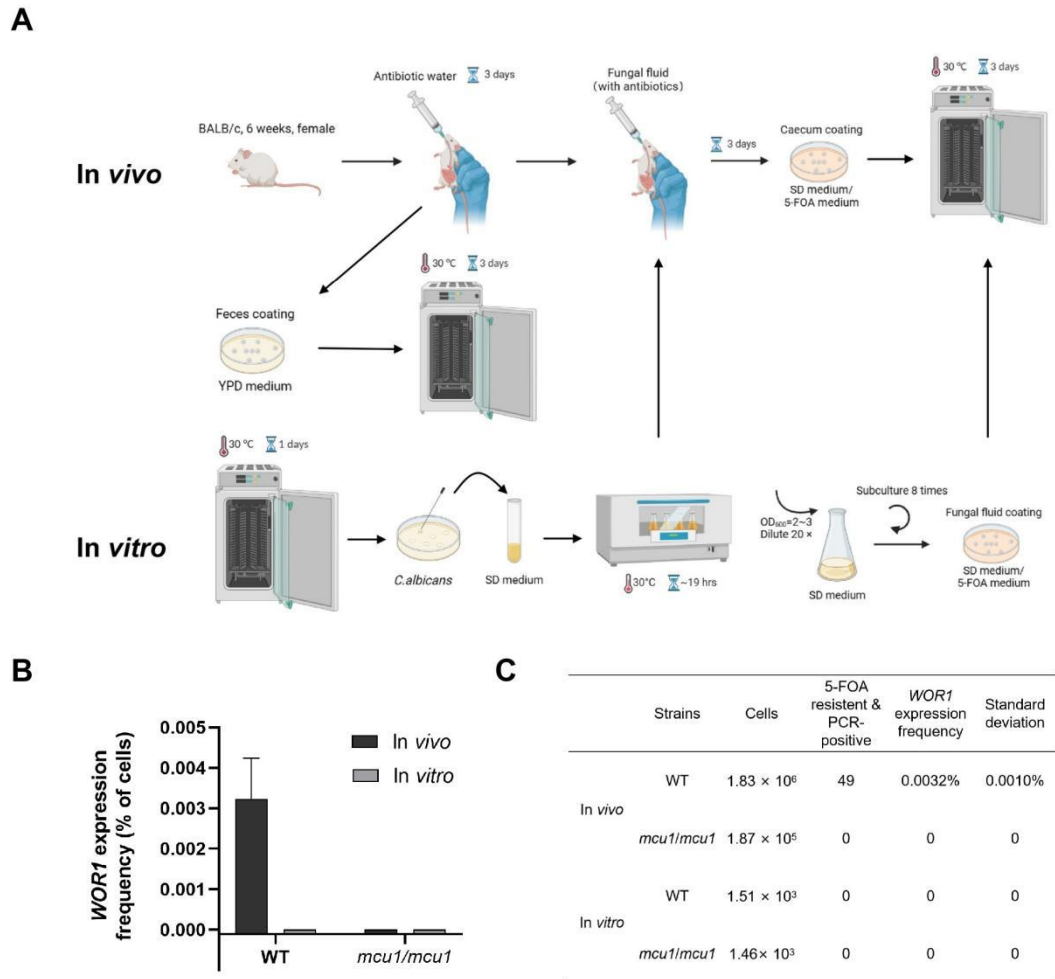


图 8. Mcu1 影响白念珠菌体内外 Wor1 表达效率

(A) 体内、外 Wor1 表达效率检测实验示意图。体内实验采用已使用抗生素水 (1mg/mL Amp, 1mg/mL Kana, 1mg/mL Chloramphenicol, 1mg/mL Streptomycin) 前处理 3 天的 BALB/c 雌性小鼠，同时将收集的新鲜粪便涂板至固体 YPD 培养基上验证抗生素处理效果。每只小鼠灌胃 200 μ L 约 5×10^8 cells/mL 浓度的 WT 野生型 *WOR1_{prom}-FLP* 菌株 (SN1020) 与 *mcu1/mcu1* 突变型 *WOR1_{prom}-FLP* 菌株 (XM91) 的菌液，并持续使用抗生素水后处理。在菌液灌胃后第 3 天处死小鼠收集盲肠，于 4°C 使用 70Hz 破碎 2 min，取 150 μ L 涂板在固体 5-FOA 筛选培养基和固体 SD 非筛选培养基上，各设置 3 个平行组。各平行组置于 30°C 培养 3 天，观察记录；体外实验采用已在固体 YPD 培养基上活化的野生型 *WOR1_{prom}-FLP* 菌株 (SN1020) 与 *mcu1/mcu1* 突变型 *WOR1_{prom}-FLP* (XM91)，在液体 SD 培养基中稀释至 $OD_{600} = 0.1$ ，在 30°C 下以 220 rpm 振荡培养，维持细胞在对数生长期，并当菌液达到 $OD_{600} = 2 \sim 3$ 时，用预热的液体 SD 培养基 1:20 稀释，传代 8 次，取适量菌液涂于固体 5-FOA 筛选培养基和固体 SD 非筛选培养基上（每板约 500 个细胞），筛选尿嘧啶营养缺陷型细胞；

(B) 体内、外 Wor1 表达效率结果。呈现 Wor1 在不同环境下的不同菌株内的表达效率，以柱状图表示，其中黑色为体外表达效率，灰色为体内表达效率。数据处理采用 Graphpad prism 9 进行，Error bar 表示同一菌株组内标准误差 (S.E.M.)；

(C) 体内、外 Wor1 表达效率详细数据。统计了各组细胞数和 5-FOA 抗性 & PCR 验证阳性细胞数，Wor1 表达效率以平均值 (Mean) 和标准误差 (S.E.M.) 表示

四、讨 论

本研究主要 Mcu1 和 TCA 循环酶对白念珠菌体外 white-opaque 转换（体内 white-GUT 转换）的调控机制。现根据前期实验发现 *mcu1/mcu1* 突变株只能通过糖酵解途径完成碳源代谢，启示我们定位在线粒体膜上的 Mcu1 可能是白念珠菌利用 TCA 循环行使正常代谢功能的关键蛋白。考虑到 Mcu1 能够特异性感应肠道因子 GlcNAc^[27]，我们推测其就是通过 GlcNAc 调控 TCA 循环，从而影响白念珠菌体外 white-opaque（体内 white-GUT）转换与共生-致病状态改变。之后，我们通过构建一系列 *MTL* 交配型基因纯合化菌株并进行 5% CO₂ 和 GlcNAc 诱导下的表型观察，虽然并没有得到 Mcu1 利用 GlcNAc 影响 white-opaque 转换的影响结论，但发现 *MTL* 交配型基因不参与白念珠菌的 white-opaque 转换的调控，且 Mcu1 在 white-opaque 转换中的感应十分敏感，其作用效果可能受上下游通路影响较大。进一步，我们关注 Mcu1 和 TCA 循环酶的互作情况与细胞定位情况，并构建了 GFP 信号 *SDH3* 基因定位菌株。虽然并没有得到 TCA 循环酶 Sdh3 对白念珠菌 white-opaque 形态转换的影响效果，但同时发现 *MCU1* 基因对线粒体参与 TCA 循环的功能非常关键。最后，我们通过设计体内外白念珠菌共生状态相关调控因子 Wor1 的表达实验，并比对已有研究结果，发现 Mcu1 与 TCA 循环酶对于白念珠菌在小鼠体内共生状态具有关键的正向作用，验证了 Wor1 几乎无法在体外被诱导表达的假设，且 Mcu1 功能受损抑制 Wor1 在体内的表达，导致 white-GUT 转换被限制，这些可能与白念珠菌体内共生能力的下降有关。

本研究得到的结果部分揭示了 Mcu1 如何协同 TCA 循环酶共同调控白念珠菌形态转换和共生-致病转换的，但仍旧存在不足和缺漏需要进一步完善。首先是有关 Mcu1 影响 white-opaque 转换的具体机制和调控因素，需要进一步针对 Mcu1 在不同条件下（如培养基、培养温度等）影响 white-opaque 转换的情况进行探究，对现有数据的条件进行补全与扩充；其次是本研究选用的野生型菌株 SC5314 在 5% CO₂ 诱导下的固体 Lee's Glucose (pH = 6.8) 培养基上菌丝生长过快，一定程度上影响了 white 和 opaque 细胞的观察与检测。结合 Sdh3 突变株和回补株均发生了与预期 white-opaque 转换效率不符的情况，计划将培养

基 pH 值调低、更换野生型菌株或改变其他环境变量等，对实验进行优化；GFP 菌株拍摄时细胞状态不佳，胞内有巨大液泡影响激光激发荧光信号。将尝试液体培养基摇菌观察，保证细胞生长速度和状态同步化。

下一步工作将依托于已有的实验结果，重点关注 *Mcu1* 具体功能、和 TCA 酶之间的相互作用和如何协同影响白念珠菌形态变化。计划继续完善 *Mcu1* 和 TCA 循环酶突变株的表型转换实验与 GFP 定位菌株构建。考虑常规条件下 white-opaque 转换会收到交配型位点 (mating type locus, MTL) 调控，且与有性生殖过程密切相关，因此还将关注 *MTL* 基因纯合型菌株交配效率与 white-opaque 转换的关联；此外，计划使用 RT-PCR 检测 *mcu1/mcu1* 突变株与野生型菌株、*mcu1/mcu1* + *MCU1p-MCU1* 回补株相比，白念珠菌共生-致病状态转换关键基因 *WOR1*, *EFG1*, *WH11*, *OP4* 是否有表达差异；采用 Western blot 等技术，结合线粒体质谱的提取，定性并定量研究 *Mcu1* 与 TCA 酶的互作；利用代谢组学、蛋白质组学和酶活试剂盒，测定 *mcu1/mcu1* 突变株中 TCA 循环酶活性差异、ATP 和 cAMP 含量以及 Ras1-cAMP/PKA 通路基因表达差异，确定 *Mcu1* 蛋白对 TCA 循环的具体作用机制，构建由 *Mcu1* 和 TCA 循环协同诱导的代谢重编程调控信号网络。

参考文献

1. D.W. Denning. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 2024.
2. R. Calderone and C. Clancy. *Candida and candidiasis, Second Edition*, ed. R.A. Calderone and C.J. Clancy. Washington, DC, USA: ASM Press. 2011.
3. A. Koh, et al. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathogens*. 2008. 4(2): p. e35.
4. T. Roemer and D. Krysan. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014. 4(5): p. a019703-a019703.
5. N.M. Revie, et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current Opinion in Microbiology*. 2018. 45: p. 70-76.
6. D.S. Perlin, R. Rautemaa-Richardson, and A. Alastruey-Izquierdo. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017. 17(12): p. e383-e392.
7. N. Robbins, T. Caplan, and L. Cowen. Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annual Review of Microbiology*. 2017. 71(1): p. 753-775.
8. L. Böhm, et al. The yeast form of the fungus *Candida albicans* promotes persistence in the gut of gnotobiotic mice. *PLoS Pathogens*. 2017. 13(10): p. e1006699.
9. B. Slutsky, J. Buffo, and D. Soll. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*. 1985. 230(4726): p. 666-669.
10. B. Slutsky, et al. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*. 1987. 169(1): p. 189-197.
11. K. Pande, C. Chen, and S.M. Noble. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nature Genetics*. 2013. 45(9): p. 1088-1091.
12. C.A. Kvaal, T. Srikantha, and D.R. Soll. Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infection and Immunity*. 1997. 65(11): p. 4468-4475.
13. C. Kvaal, et al. Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*. 1999. 67(12): p. 6652-6662.
14. C. Sasse, et al. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. *Eukaryotic Cell*. 2013. 12(1): p. 50-58.
15. J. Pierce, et al. Normal adaptation of *Candida albicans* to the murine gastrointestinal tract requires Efg1p-dependent regulation of metabolic and host defense genes. *Eukaryotic Cell*. 2012. 12(1): p. 37-49.
16. L. Tao, et al. Integration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with cAMP

- signaling and Sfl2 pathways in the regulation of CO₂ sensing and hyphal development in *Candida albicans*. *PLOS Genetics*. 2017. 13(8): p. e1006949.
17. G. Guan, et al. Environment-induced same-sex mating in the yeast *Candida albicans* through the Hsf1–Hsp90 pathway. *PLOS Biology*. 2019. 17(3): p. e2006966.
 18. A. Burgain, et al. A novel genetic circuitry governing hypoxic metabolic flexibility, commensalism and virulence in the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. 2019. 15(12): p. e1007823.
 19. C. Lan, et al. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. 99(23): p. 14907-14912.
 20. J.N. Witchley, et al. *Candida albicans* morphogenesis programs control the balance between gut commensalism and invasive infection. *Cell Host & Microbe*. 2019. 25(3): p. 432-443.e436.
 21. G. Huang, et al. Bistable expression of *WOR1*, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. 103(34): p. 12813-12818.
 22. J.N. Witchley, et al. Recording of DNA-binding events reveals the importance of a repurposed *Candida albicans* regulatory network for gut commensalism. *Cell Host & Microbe*. 2021. 29(6): p. 1002-1013.e1009.
 23. S.-H. Liang, et al. Hemizygoty enables a mutational transition governing fungal virulence and commensalism. *Cell Host & Microbe*. 2019. 25(3): p. 418-431.e416.
 24. N. Buchon, et al. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes & Development*. 2009. 23(19): p. 2333-2344.
 25. P.A.D. Bastos, R. Wheeler, and I.G. Boneca. Uptake, recognition and responses to peptidoglycan in the mammalian host. *FEMS Microbiology Reviews*. 2021. 45(1): p. fuaa044.
 26. G. Huang, et al. N-acetylglucosamine induces white to opaque switching, a mating prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. 2010. 6(3): p. e1000806.
 27. G. Guan, et al. The mitochondrial protein Mcu1 plays important roles in carbon source utilization, filamentation, and virulence in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*. 2015. 81: p. 150-159.
 28. X. Huang, et al. Mitochondrial complex I bridges a connection between regulation of carbon flexibility and gastrointestinal commensalism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. 2017. 13(6): p. e1006414.
 29. C. Urban, et al. Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Letters*. 2003. 544(1-3): p. 228-235.
 30. C. Sasse and J. Morschhäuser. Gene deletion in *Candida albicans* wild-type strains using the SAT1-flipping strategy. *Methods in Molecular Biology*. 2012.

845: p. 3-17.

31. Y.-N. Park and J. Morschhäuser. Tetracycline-Inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 2005. 4(9): p. 1603-1603.
32. C. Guthrie and G. Fink. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Mycologia*. 1993. 85(4): p. 714.

致 谢

行文至此，东方既白。感激之心永驻，远胜于此文。本科四年一瞬若白驹过隙，回首过往种种，慨叹万千。于仓促中入学，离校又惴惴将近，常留恋。

感谢复旦大学生命科学学院黄广华教授和陶丽青年研究员，是你们渊博的学识与严谨的科研态度深深影响了我，让我领略了微生物学研究的魅力。感谢复旦大学生命科学学院 Huanglab 全体老师、师兄师姐和同门，是你们的帮助和谆谆教导让我在科研的路上少了许多迷茫，带我体验科研的魅力与不易。感谢复旦大学代谢与整合生物科学研究院张景彦青年研究员和 Zhanglab 全体师兄师姐，是你们带我走入了生命科学系统研究的大门，让我受益匪浅。

感谢我的父母和我的家人，给了我坚实的后盾和永远的港湾。

感谢我的恋人小哇，是你让我学会爱和被爱，陪伴我一路走来，又将向前走去。

感谢新时代青年群的各位朋友们，从大一到现在，是大家给了我很多勇气向前开拓；感谢垃圾桶群的两位，承包了我所有的科研苦水和乐趣；感谢喜剧人群的两位，虽是萍水相逢，但并不妨碍曾是一段美好的共事时光；感谢 Tomb of Annihilation 群和南区 30 号楼的兄弟们以及 20sky 的朋友们，是你们让我的科研学习之路并不孤单，为我带来了太多帮助。

感谢演协第 34 届理事和干事们，大家是我共事过最棒的团队之一；感谢团艺，四年留下了太多难忘的故事；感谢广播台，虽然我似乎始终是一位游离者，但你依旧是很多人心中温暖之所在。

感谢所有在这四年求学期间帮助过我的老师、学长姐、朋友与校园工作者。

感谢我的电脑，虽然经常嫌弃你卡，不来噻，而且现在说可能有点早，但是感谢你在关键时候似乎都没掉过链子。

感谢我自己的身体，你辛苦了，这么折磨你实在是愧疚更甚。

四年前入学我对自己说相信过程，虽充斥曲折，但此文不虚。相信自己是向前迈的第一步，感谢自己一直没有放弃。

山高水长，望各自珍重，毕业快乐。