

· 医药生物技术 ·

抗菌肽 AMP-17 抗白念珠菌作用靶点鉴定

杨隆兵^{1,2}, 田竺青¹, 周罗雄^{1,4}, 孙朝琴¹, 黄明娇¹, 田淳仁¹, 彭建^{1,2},
国果^{1,2,3*}

1 贵州医科大学基础医学院 现代病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州医科大学 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

3 贵州医科大学 转化医学研究中心, 贵州 贵阳 550025

4 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 贵州 贵阳 550025

杨隆兵, 田竺青, 周罗雄, 孙朝琴, 黄明娇, 田淳仁, 彭建, 国果. 抗菌肽 AMP-17 抗白念珠菌作用靶点鉴定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 304-317.

YANG Longbing, TIAN Zhuqing, ZHOU Luoxiong, SUN Chaoqin, HUANG Mingjiao, TIAN Chunren, PENG Jian, GUO Guo. Identification of the target site of antimicrobial peptide AMP-17 against *Candida albicans*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 304-317.

摘要: 白念珠菌(*Candida albicans*)是侵袭性真菌感染的主要致病性病原体。抗菌肽 AMP-17 有较强的抗念珠菌活性, 经 AMP-17 作用白念珠菌后的蛋白组学结果显示, 细胞壁(*XOG1*)和氧化应激(*SRR1*)蛋白基因表达差异显著, 提示 AMP-17 可能通过影响 *XOG1* 和 *SRR1* 基因发挥其抗白念珠菌作用。为进一步探究 *XOG1* 和 *SRR1* 基因是否为 AMP-17 的作用靶点, 本研究利用规律成簇间隔短回文重复序列相关蛋白 9 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats-associated protein 9, CRISPR/Cas9)系统构建了白念珠菌 *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌; 表型观察结果发现除 *XOG1* 基因缺失可影响白念珠菌的体外应激和菌丝形成, 2 个基因缺失对白念珠菌生长繁殖和生物膜形成无明显影响; 药敏实验分析显示 AMP-17 对 *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌的 MIC₈₀ 值从野生菌的 8 μg/mL 增至 16 μg/mL, 而对 *srr1Δ/Δ::srr1* 回补菌的 MIC₈₀ 值降至野生菌水平。此外, AMP-17 抑制 2 株缺失菌生物膜形成的能力均较野生菌明显降低, 表明缺失菌在酵母态及生物膜形成过程中对 AMP-17 的敏感性均降低, 提示 *XOG1* 和 *SRR1* 基因可能是 AMP-17 发挥抗白念珠菌的潜在靶点。本研究结果为进一步探讨新型肽类抗真菌药物的抗菌机制提供了一定的实验依据和基础。

关键词: 抗菌肽; AMP-17; 白念珠菌; *XOG1*; *SRR1*; 规律成簇间隔短回文重复序列相关蛋白 9 (CRISPR/Cas9)

资助项目: 国家自然科学基金(82060381); 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 345)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82060381) and the Science and Technology Planning Project of Guizhou Province (ZK [2022] general project 345).

*Corresponding author. E-mail: guoguo@gmc.edu.cn

Received: 2022-06-24; Accepted: 2022-08-17; Published online: 2022-08-24

Identification of the target site of antimicrobial peptide AMP-17 against *Candida albicans*

YANG Longbing^{1,2}, TIAN Zhuqing¹, ZHOU Luoxiong^{1,4}, SUN Chaoqin¹, HUANG Mingjiao¹, TIAN Chunren¹, PENG Jian^{1,2}, GUO Guo^{1,2,3*}

1 The Key and Characteristic Laboratory of Modern Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

3 Translational Medicine Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

4 School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: *Candida albicans* is one of the major causes of invasive fungal infections and a serious opportunistic pathogen in immunocompromised individuals. The antimicrobial peptide AMP-17 has prominent anti-*Candida* activity, and proteomic analysis revealed significant differences in the expression of cell wall (*XOG1*) and oxidative stress (*SRR1*) genes upon the action of AMP-17 on *C. albicans*, suggesting that AMP-17 may exert anti-*C. albicans* effects by affecting the expression of *XOG1* and *SRR1* genes. To further investigate whether *XOG1* and *SRR1* genes were the targets of AMP-17, *C. albicans xog1Δ/Δ* and *srr1Δ/Δ* mutants were constructed using the clustered regulatory interspaced short palindromic repeats-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) system. Phenotypic observations revealed that deletion of two genes had no significant effect on *C. albicans* growth and biofilm formation, whereas *XOG1* gene deletion affected *in vitro* stress response and mycelium formation of *C. albicans*. Drug sensitivity assay showed that the MIC₈₀ values of AMP-17 against *xog1Δ/Δ* and *srr1Δ/Δ* mutants increased from 8 μg/mL (for the wild type *C. albicans* SC5314) to 16 μg/mL, while the MIC₈₀ values against *srr1Δ/Δ::srr1* revertants decreased to the level of the wild type SC5314. In addition, the ability of AMP-17 to inhibit biofilm formation of both deletion strains was significantly reduced compared to that of wild type SC5314, indicating that the susceptibility of the deletion mutants to AMP-17 was reduced in both the yeast state and during biofilm formation. These results suggest that *XOG1* and *SRR1* genes are likely two of the potential targets for AMP-17 to exert anti-*C. albicans* effects, which may facilitate further exploration of the antibacterial mechanism of novel peptide antifungal drugs.

Keywords: antimicrobial peptide; AMP-17; *Candida albicans*; *XOG1*; *SRR1*; clustered regulatory interspaced short palindromic repeats-associated protein 9 (CRISPR/Cas9)

白念珠菌(*Candida albicans*)是临床常见的机会致病性真菌,在免疫力低下人群中易引发系统性真菌感染^[1-2]。此外,在人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者和获得性免疫缺陷综合征(acquired immune

deficiency syndrome, AIDS)患者中由白念珠菌引起的口腔念珠菌病亦是最早和最常见的机会性感染,患病率可达50%–90%^[3-4]。尽管最近在抗真菌治疗方面取得了一些进展,但每年归因白念珠菌感染的死亡率约为40%^[5]。因此,研发高效、

低毒、安全的抗真菌新药是解决念珠菌感染的重要手段之一,而抗真菌新药作用靶标的发现和机制研究是解决这一难题的瓶颈。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是先天免疫系统的重要组成部分,对宿主具有较好的保护作用^[6]。除直接的抗微生物活性外,AMP还具有抗肿瘤和免疫调节特性^[6-7]。因此,AMP有望代替抗生素成为新型的抗菌药物候选者。研究表明,AMP主要通过破坏微生物细胞壁、膜、核酸及蛋白质发挥抗菌活性^[7],但其具体的作用靶点却鲜见报道。本课题组前期研究证实AMP-17对*C. albicans*具有较好的抗真菌活性^[8]。AMP-17可通过破坏*C. albicans*细胞壁完整性及增加细胞膜通透性发挥抗菌功效^[9]。此外,AMP-17作用白念珠菌12 h后,蛋白组学结果显示有603个蛋白差异显著,主要涉及细胞壁、细胞膜以及细胞氧化应激相关蛋白,提示AMP-17可能通过靶向细胞壁、细胞膜及诱导氧化损伤等途径发挥其抗真菌活性^[10]。为进一步探究AMP-17对白念珠菌的作用靶点,本研究从差异蛋白中筛选出涉及细胞壁(*XOG1*)和抗氧化应激(*SRR1*)的潜在靶蛋白基因作为进一步研究对象。*XOG1*是编码白念珠菌细胞外葡聚糖酶的关键基因,主要参与白念珠菌细胞壁 β -1,3-葡聚糖的生物合成^[11]。*SRR1*是应答调节基因,在白念珠菌的形态发生、胁迫适应和毒力中发挥着重要作用^[12]。

规律成簇间隔短回文重复序列相关蛋白9(clustered regulatory interspaced short palindromic repeats-associated protein 9, CRISPR-Cas9)基因编辑技术是基于细菌和古细菌中的固有免疫系统改造而建立的,通过gRNA介导核酸内切酶Cas9蛋白对目标DNA序列进行识别、切割,

从而对目的基因的靶位点实现基因的定点敲除和敲入^[13-14]。作为新一代基因定向编辑技术,CRISPR/Cas9相比于锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活子样效应子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)的基因打靶技术,具有效率高、耗时短、成本低和易于设计等优点^[13,15]。目前,CRISPR/Cas9技术已广泛应用于人、哺乳动物、大/小鼠、细菌、酵母等生物个体或细胞基因组的遗传学改造^[16-18]。Min等^[18]利用CRISPR/Cas9技术对白念珠菌NDT80家族转录因子进行了分子遗传学分析。Hameed等^[19]通过此技术成功敲除白念珠菌*Idh1*、*Ecol1*、*Rom2*和*Taf10*基因,以探讨相关基因的分子遗传学功能。因此,CRISPR/Cas9技术的诞生为白念珠菌药物靶标的研究奠定了一定的基础。

综上所述,本研究采用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建白念珠菌*XOG1*和*SRR1*基因缺失菌,进一步观察缺失菌的生长曲线和菌丝形成等表型变化,且考察AMP-17对缺失菌药物敏感性的影响,为肽类抗菌药物的抗菌机制研究提供一定的实验依据和工作基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株和质粒

白念珠菌(*Candida albicans* SC5314)由徐振波博士(华南理工大学)惠赠。质粒pADH99和pADH100购自HERNDAY实验室^[20];大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态购自TaKaRa公司;其他菌株均为本实验构建,各菌株基因型见表1,引物见表2,gRNA靶序列和前间隔序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)位点见表3。

表 1 实验所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Genotype	Parent strains	Sources
SC5314	Wild type (WT, clinical isolate)		
<i>xog1Δ/Δ</i>	<i>xog1Δ/xog1Δ</i>	SC5314	This study
<i>srr1Δ/Δ</i>	<i>srr1Δ/srr1Δ</i>	SC5314	This study
<i>srr1Δ/Δ::srr1</i>	<i>srr1Δ/srr1Δ::srr1</i>	SC5314	This study

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>XOG1</i> _Up_F	GAAGAGAGGATAAACCAAGCAATC	23
<i>XOG1</i> _Up_R	CCTCATGTGCGAGCACTCGTCTCGTTAAGGCGTCTTGATTCTACAAGAG	48
<i>XOG1</i> _Down_F	GACGAGTGCTCGACATGAGGAGCTGATTATGTATTAATCTTTGATATG	48
<i>XOG1</i> _Down_R	CTTTGTTGATCCAGTTTCAGTTTCA	25
<i>XOG1</i> _ORF_F	CCAACCTCCAGAAGACCCAG	19
<i>XOG1</i> _ORF_R	GGTGGCAACGAATACTCTG	19
<i>SRR1</i> _Up_F	CTGACATATTGTGTTGTCACATT	23
<i>SRR1</i> _Up_R	CCTCATGTGCGAGCACTCGTCTCGATGCATTCAGAACGGGTTTTTT	45
<i>SRR1</i> _Down_F	GACGAGTGCTCGACATGAGGTTAGTGTGTACAATGAATTCAATAATAAC	49
<i>SRR1</i> _Down_R	CTGCCTGCCTCAAATAATATT	22
<i>SRR1</i> _ORF_F	GTGGTTACAGCAACCATTCC	20
<i>SRR1</i> _ORF_R	CATTCTTCCACTGTTGACTAC	21
pADH100_F	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	25
pADH100_R	CAAATTAATAATAGTTTACGCAAG	24
CRISPR/Cas9_F	TCACCAACCGTAGCCTATTC	20
CRISPR/Cas9_R	CATCACCACCCAATTGAGA	19

Primers were designed using Snppgene3.2.1.

表 3 相关基因 gRNA 靶序列和 PAM 位点

Table 3 gRNA target sequences and PAM used in this study

Gene names	gRNA sequences (5'→3')	PAM	Sources
<i>XOG1</i>	TTGACCAGCGACGTTCCAAT	GGG	This study
<i>SRR1</i>	TGGAGATGGAACGACAGTGG	TGG	This study

gRNA: Guide RNA; PAM: Protospacer adjacent motif.

1.1.2 培养基、试剂及药品

LB 培养基、YPD 培养基、诺尔丝菌素、两性霉素 B、卡泊芬净和 5-氟尿嘧啶购自北京索莱宝科技有限公司；YeaStar Genomic DNA KitTM 购自 BioTeke 公司；DNA 产物纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒、DL2000、DL5000 DNA Marker、PrimeSTAR HS DNA

Polymerase 购自 TaKaRa 公司；FastDigest 限制性内切酶 *Mss* I / *Dpn* I 购自 Thermo 公司；RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司；2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, XTT 钠盐购自上海源叶公司；醋酸锂购自 BBI 公司；氟康唑购自 Sigma 公司。

1.1.3 仪器设备

NanoDrop 2000 超微量分光光度计, 购自 Thermo 公司; DYY-60D 型电泳仪、DYCP-31DN 型水平电泳槽, 购自北京六一公司; 4600SF 型凝胶成像分析系统, 购自上海 Tanon 公司; 80i 型荧光显微镜, 购自 Nikon 公司; D2012plus 型台式离心机, 购自北京 DLAB 公司; SPX-150B-Z 型生化培养箱, 购自上海博迅公司; iMark™ 微量酶标仪, 购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化及培养

将储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30%甘油-营养肉汤的 *C. albicans* SC5314 接种于 YPD 固体培养基中, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 继续接种活化 2 次。此后, 挑取活化 2 次的单个菌落接种至 5 mL 无菌 YPD 液体培养基中, 于旋转摇床($35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min)培养至对数生长期($OD_{600}=0.6-0.8$)。

1.2.2 抗菌肽 AMP-17 制备

根据课题组前期的方法^[8-10], 制备重组 AMP-17 蛋白。将前期构建好的 pET-28a(+)-AMP-17 表达质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 构建重组菌株 BL21/pET-28a(+)-AMP-17。挑取鉴定的阳性克隆接种至含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日按 1:100 比例转接至含卡那霉素的 LB 培养基中扩增培养。此后, 离心收集菌液, 将菌液进行超声破碎、包涵体溶解、蛋白纯化和超滤等步骤获得有活性的 AMP-17。

1.2.3 靶基因缺失菌的构建与鉴定

根据 Nguyen 等^[20]构建的 CRISPR/Cas9 方法敲除白念珠菌 *XOG1* 和 *SRR1* 基因。首先, 利用在线软件 Benchling (www.benchling.com) 上的“Design and Analyze Guides”工具设计 CRISPR 靶序列。将设计获取的 20 bp 靶序列添加至以下侧翼序列: 5'-CGTAACTATTTTAA TTTG (20 bp gRNA) GTTTTAGAGCTAGAA

ATAGC-3', 送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。利用单寡核苷酸环状聚合酶延伸克隆(single-oligonucleotide circular polymerase extension cloning, soCPEC)将合成的 20 bp gRNA 靶序列引入至线性化表达质粒 pADH100-1。其次, 通过 overlap-PCR 方法将 *XOG1* 和 *SRR1* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)上下游各 500 bp 左右的 DNA 序列通过 ADD-TAG 序列扩增出一条 1 kb 左右的修复同源臂。继而使用 FastDigest *Mss* I 酶切质粒 pADH99 和 pADH100-1-gRNA 使之线性化, 然后连同修复模板一起转化至 *Candida albicans* SC5314 感受态细胞中, 离心收集菌体并涂布于含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NAT 的 YPD 固体培养基上, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 随机挑选单克隆进行菌落 PCR 鉴定。为去除基因缺失菌中的 CRISPR 组分和营养抗性标记(NAT), 将上述转化鉴定成功的单菌落接种至 YP-麦芽糖液体培养基中以诱导 FLP 重组酶的产生, 从 HIS-FLP 系统转化的菌株中去除 CRISPR 组分和 NAT 标记。

1.2.4 回补菌的构建与鉴定

根据上述基因敲除策略对缺失菌进行基因回补, 回补与敲除方法类似, 主要区别在于 gRNA 靶序列的不同, 用于回补的 gRNA 靶向 ADD-TAG 序列: CGAGACGAGTGCTCGACATG。其余实验步骤均与敲除方法一致。

1.2.5 生长曲线测定

分别从 *xog1 Δ/Δ* 和 *srr1 Δ/Δ* 缺失菌的 YPD 固体培养基上挑取单克隆接种至 5 mL YPD 液体培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h, 离心收集菌体, 用无菌磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 次。用改良牛鲍血细胞计数板将菌悬液浓度调至 1.0×10^6 CFU/mL, 各取 200 μL 于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中培养, 每隔 2 h 取出并用 iMark™ 微量酶标仪检测 OD_{630} 并绘制

时间-生长曲线。

1.2.6 菌丝诱导测定

液体培养：分别用 YPD+10% FBS、RPMI1640+10% FBS、Spider 液体培养基调节菌浓度至 1.0×10^6 CFU/mL, 37 °C 静置培养 2.5 h 后观察菌丝的生长情况。固体培养：用无菌 PBS 缓冲液调节菌浓度至 1.0×10^6 CFU/mL, 取 10 μ L 菌液滴在 YPD+10% FBS、Spider、Lee's 固体培养基上, 37 °C 培养 5 d 后观察菌丝生长情况。

1.2.7 体外应激应答测定

菌株活化, 并将菌浓度调至 1.0×10^7 CFU/mL。用无菌 PBS 缓冲液连续 10 倍比稀释 5 个浓度梯度。取 2.5 μ L 菌液滴至含 AMP-17、两性霉素 B (AMB)、氟康唑 (FLC)、5-氟胞嘧啶 (5-FC)、卡泊芬净 (CAS)、高盐 (NaCl、CaCl₂) 和细胞壁干扰剂 Congo Red 的 YPD 固体培养基上, 30 °C 静置培养 48 h, 观察各缺失菌菌落生长状态并拍照。

1.2.8 AMP-17 对缺失菌的药物敏感性

根据美国临床与实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的 M27-A3^[21] 文件进行药物敏感性检测。简言之, 将活化过夜的菌株用无菌 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 并将菌浓度调节至 2.0×10^3 CFU/mL。取 100 μ L AMP-17 (0–64 μ g/mL) 和 100 μ L 菌悬液接种至 96 孔板中, 30 °C 培养 48 h, 用酶标仪检测各孔 OD_{630} 值, 并辅以目测。临床常用抗真菌药物 AMB、FLC、5-FC、CAS 作为对照药物。与阴性对照组相比, 生长抑制 $\geq 80\%$ 孔所对应的最低药物浓度即为该受试药物的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值。

1.2.9 AMP-17 对缺失菌生物被膜形成的抑制作用

菌株活化, 用 RPMI1640+10% FBS 液体培养基将菌浓度调至 1.0×10^6 CFU/mL。取 100 μ L AMP-17 (0–64 μ g/mL) 和 100 μ L 菌悬液接种至

96 孔板中, 37 °C 培养 48 h。弃上清, 用无菌 PBS 清洗 3 次, 向各检测孔中加入 100 μ L XTT/甲萘醌 (menadione) 混合液, 避光孵育 2 h。用 iMark™ 微量酶标仪检测各孔 OD_{490} 吸光度值。

1.2.10 AMP-17 对缺失菌成熟被膜的清除作用

菌株活化, 用 RPMI1640+10% FBS 液体培养基将菌浓度调至 1.0×10^6 CFU/mL。取 200 μ L 菌悬液于 96 孔板中培养 48 h 至成熟被膜后, 吸弃并清洗。向各孔中分别加入 200 μ L 含不同浓度的 AMP-17 (0–256 μ g/mL), 37 °C 培养 48 h。弃上清, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 向各检测孔分别加入 100 μ L XTT/甲萘醌混合液, 避光孵育 2 h。用 iMark™ 微量酶标仪检测各孔 OD_{490} 吸光度值。

1.2.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 (Graph Pad Software) 软件及 Student's *t*-test 对实验数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 CRISPR/Cas9 方法成功构建白念珠菌 *XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失菌

为构建白念珠菌 *XOG1* 和 *SRR1* 基因的修复同源臂, 通过 overlap-PCR 方法将上述基因 ORF 上下游各 500 bp 左右的 DNA 序列进行连接 (图 1A)。结果如图 1B 所示, *XOG1* 和 *SRR1* 基因上、下游同源臂均于 500 bp 左右处 (*XOG1* 上下游同源臂: 504 bp 和 516 bp; *SRR1* 上下游同源臂: 537 bp 和 501 bp) 有预期目的条带。随后通过 overlap-PCR 扩增后均于 1 kb 左右处 (*XOG1* 修复同源臂: 1 020 bp; *SRR1* 修复同源臂: 1 038 bp) 有预期目的条带 (图 1C), 提示 *XOG1* 和 *SRR1* 基因修复同源臂构建成功。

使用 FastDigest *Mss* I 酶切质粒 pADH99 和 pADH100-1-gRNA 使之线性化, 然后连同修

复模板一起转化至 *C. albicans* SC5314 感受态细胞中, 且对转化子进行菌落 PCR 鉴定。鉴定结果如图 1D 所示, *XOG1* 和 *SRR1* 基因转化子经侧翼特异性引物对 *XOG1*_Up_F/Down_R 和 *SRR1*_Up_F/Down_R 扩增后, 分别在 1 020 bp 和 1 038 bp 处有预期大小目的条带, 而经 Target ORF 特异性引物对 *XOG1*_ORF_F/ORF_R 和 *SRR1*_ORF_F/ORF_R 扩增后未出现目的条带,

说明白念珠菌 *XOG1* 和 *SRR1* 基因成功敲除。此外, 将上述鉴定成功的转化子接种至 YP-麦芽糖液体培养基中以去除 CRISPR 组分和 NAT 标记。结果显示, 2 个基因缺失菌经 CRISPR/Cas9_F/R 特异性引物扩增后均未出现目的条带(图 1D), 说明各基因缺失菌的 CRISPR 组分和 NAT 已被去除。

随后, 本研究对 *SRR1* 基因回补菌进行构

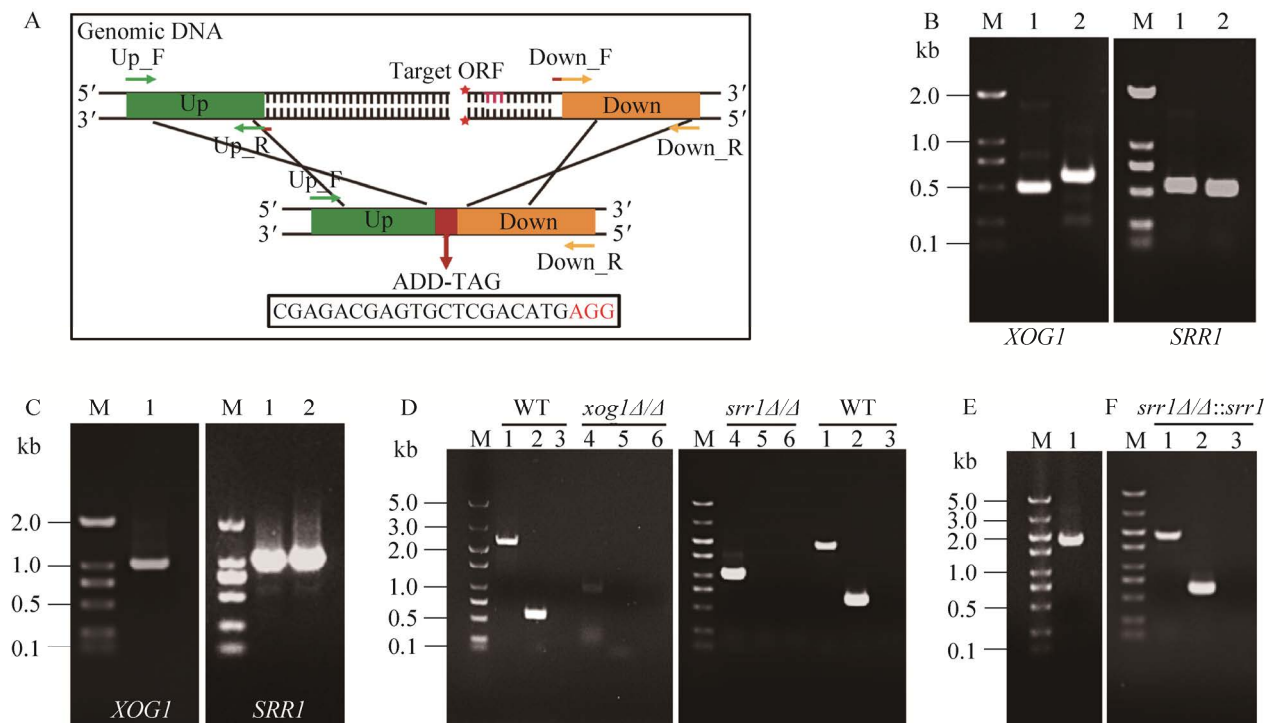


图 1 PCR 验证 *XOG1*、*SRR1* 基因敲除菌株和 *SRR1* 基因回补菌株

Figure 1 Validation of *XOG1*, *SRR1* gene deletion mutants and *SRR1* gene reconstitution mutant. A: Schematic diagram of the repair homology arm. B: Construction of the upstream and downstream flanking homologues of the *XOG1* and *SRR1* genes. Line 1–2: PCR amplification products of *XOG1*, *SRR1*_Up_F/R (upstream: 504 bp and 537 bp) and Down_F/R (downstream: 516 bp and 501 bp) primers. C: The repair homologues of *XOG1* and *SRR1* genes were constructed by using overlap PCR. Line 1: PCR amplification products of *XOG1*, *SRR1*_Up_F/Down_R (1 020 bp and 1 038 bp) primers. D: Validation of *XOG1*, *SRR1* gene deletion mutants. Line 1–6: PCR products of parental and gene deletion mutant strains after amplification of *XOG1*, *SRR1*_Up_F/Down_R, and *XOG1*, *SRR1*_ORF_F/ORF_R and CRISPR/Cas9_F/R specific primer, respectively. E: Construction of the repair homologous fragments of the *SRR1* gene deletion mutant. Line 1: PCR amplification products of *SRR1*_Up_F and Down_R primers. F: Validation of *SRR1* gene revertant mutants. Line 1–3: PCR products after amplification of the transformants by the flanker-specific primers *SRR1*_Up_F/Down_R, target ORF-specific primers *SRR1*_ORF_F/ORF_R and CRISPR/Cas9_F/R-specific primers, respectively.

建。结果显示, *SRR1* 基因回补菌修复同源臂经侧翼特异性引物对 *SRR1*_Up_F/Down_R 扩增后, 于 1 864 bp 处有预期目的条带(图 1E), 说明修复同源臂构建成功。此外, 转化子经侧翼特异性引物对 *SRR1*_Up_F/Down_R 和 Target ORF 特异性引物对 *SRR1*_ORF_F/ORF_R 扩增后, 分别在 1 864 bp 和 632 bp 处有预期大小目的条带(图 1F), 说明白念珠菌 *SRR1* 基因回补成功。另外, 回补菌经 CRISPR/Cas9_F/R 特异性引物扩增后未出现目的条带(图 1F), 说明回补菌的 CRISPR 组分和 NAT 已被去除。上述结果表明白念珠菌 *XOG1*、*SRR1* 基因缺失菌(*xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ*)和 *SRR1* 基因回补菌(*srr1Δ/Δ::srr1*)构建成功。

2.2 基因缺失不影响白念珠菌的生长

为考察 *XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失是否对白念珠菌生长繁殖有影响, 测定了各基因缺失菌的时间-生长曲线。结果如图 2A 所示, 与亲本菌 SC5314 相比, *xog1Δ/Δ* 缺失菌在 12 h 前, 生长速度较亲本菌 SC5314 稍慢, 12 h 后生长速度较亲本菌 SC5314 稍快, 但差异无统计学意义($P>0.05$); 而 *srr1Δ/Δ* 缺失菌生长繁殖速度在 0–24 h 较亲本菌 SC5314 稍快(图 2B), 但差异

无统计学意义($P>0.05$)。上述结果提示 *XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失不显著影响白念珠菌的生长。

2.3 基因缺失对白念珠菌菌丝形成的影响

为考察 *XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失是否影响白念珠菌菌丝的形成, 使用显微镜观察在不同菌丝诱导培养基中各缺失菌菌丝的生长情况。结果如图 3A 所示, 与亲本菌 SC5314 相比, *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌在 RPMI 1640+10% FBS 液体培养基中均能正常形成菌丝。在 YPD+10% FBS 和 SPIDER 液体培养基中, *xog1Δ/Δ* 突变体的菌丝生长受到明显抑制, 未能诱导菌丝的形成。而 *srr1Δ/Δ* 突变体在上述培养基中能够正常诱导菌丝的形成。在固体培养基中(图 3B), *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌在 YPD+10% FBS 固体培养基中显示出菌落形态皱纹的表面, 与亲本菌 SC5314 的菌落形态基本一致。在 SPIDER 和 LEE'S 固体培养基中, 各缺失菌的菌丝呈现出长短不一的形态, 其中 *xog1Δ/Δ* 突变体的菌丝生长缺陷较为明显, 而 *srr1Δ/Δ* 缺失菌的菌丝生长未受到明显抑制。上述结果提示, *XOG1* 基因缺失可影响白念珠菌菌丝在上述培养基中生长, 其中在 SPIDER 培养基中的缺陷最为严重。

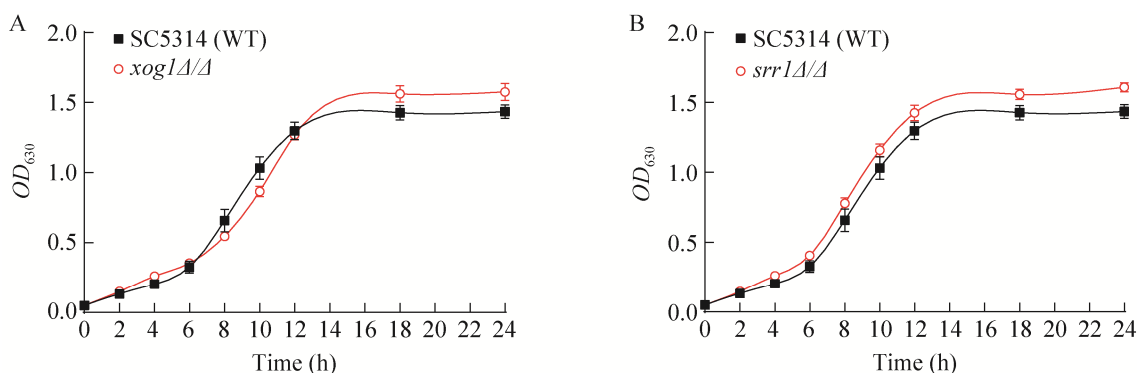


图 2 基因缺失菌的时间-生长曲线

Figure 2 Growth curve of gene deletion strains. Deletion of *XOG1* (A) and *SRR1* (B) genes did not affect the growth of *C. albicans*. Data are represented as the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments and were analyzed by Student's *t*-test. Compared to the SC5314, $P>0.05$.

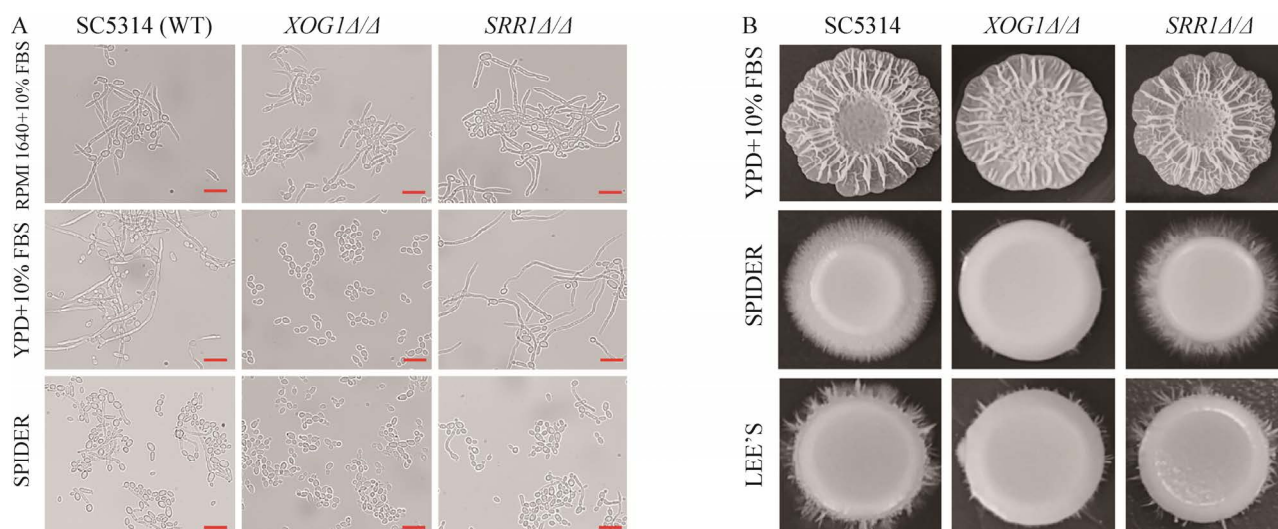


图3 基因缺失对白念珠菌菌丝形成的影响

Figure 3 Effect of gene deletions on mycelium formation in *Candida albicans*. Mycelium formation of *XOG1* and *SRR1* deletion mutants in RPMI 1640+10% FBS, YPD+10% FBS, SPIDER liquid medium (A) and YPD+10% FBS, SPIDER, LEE'S solid medium (B). Scale bar=20 μm .

2.4 基因缺失菌对 AMP-17 的药物敏感性

为考察 AMP-17 对 *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌和 *srr1Δ/Δ::srr1* 回复菌的药物敏感性, 采用微量液体稀释法和琼脂斑点实验(spot assay)检测了缺失菌和回复菌对 AMP-17 及其他抗真菌药物的敏感性。结果显示, AMP-17 对 *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌的 MIC₈₀ 值升高一个浓度梯度, MIC₈₀ 值由 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增至 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对 *srr1Δ/Δ::srr1* 回复菌的 MIC₈₀ 值降至野生菌水平, 而其他药物对缺失菌无明显影响(表 4),

说明 *XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失后可影响上述缺失菌对 AMP-17 的药物敏感性。此外, 斑点实验结果显示, 与亲本菌 SC5314 相比, *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌对 AMP-17 的药物敏感性均降低, 而对其他抗真菌药物的敏感性无明显影响(图 4)。上述结果表明 *XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失后, 2 个基因缺失菌对 AMP-17 的敏感性均降低, 提示 *XOG1* 和 *SRR1* 基因可能是 AMP-17 发挥抗菌作用的潜在靶标。

表 4 抗真菌药物对基因敲除菌株的体外活性

Table 4 Antifungal susceptibility test of antifungal agents against *Candida albicans* strains

Strains	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
	AMP-17	FLC	CAS	AMB	5-FC
SC5314 (WT)	8	2	0.125	0.25	4
<i>xog1Δ/Δ</i>	16	4	0.125	0.25	2
<i>srr1Δ/Δ</i>	16	2	0.250	0.50	4
<i>srr1Δ/Δ::srr1</i>	8	2	0.125	0.50	4

MIC was a representative consensus value for at least three independent replicate experiments. MIC: Minimal inhibitory concentration; AMP-17: Antimicrobial peptide-17; FLC: Fluconazole; CAS: Caspofungin; AMB: Amphotericin B; 5-FC: 5-fluorocytosine.

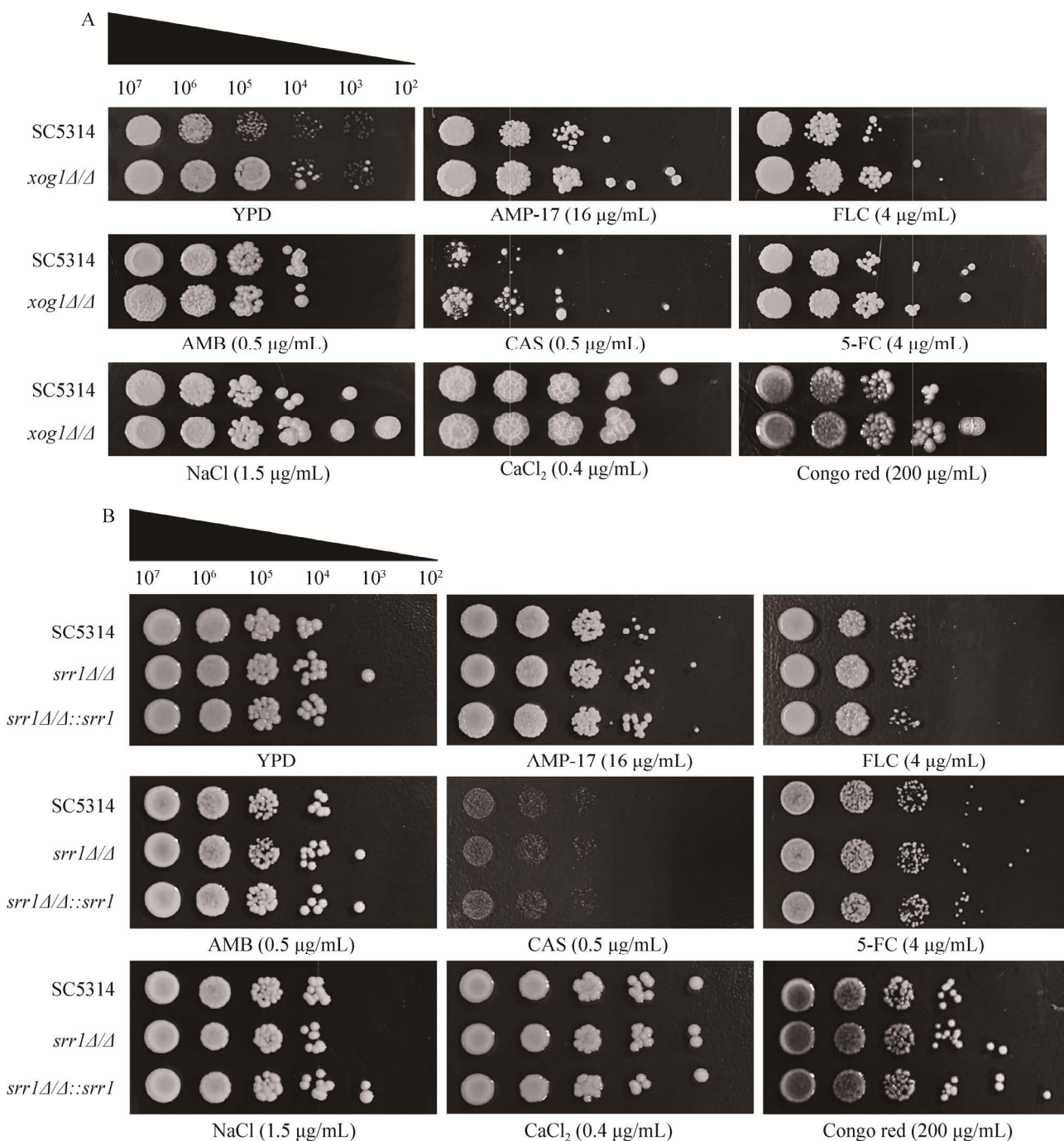


图 4 缺失菌对抗真菌药物的体外应激

Figure 4 *In vitro* stress response of deletion mutants to multiple antifungal agents. A: Spot assay to determine the sensitivity of *C. albicans* SC5314 and *xog1Δ/Δ* to AMP-17 and antifungal agents. B: Spot assay to determine the sensitivity of *C. albicans* SC5314, *srr1Δ/Δ* and *srr1Δ/Δ::srr1* to AMP-17 and antifungal agents.

2.5 抗菌肽 AMP-17 对缺失菌生物膜的影响
为了探讨 AMP-17 对 *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺

失菌生物膜的影响, 本研究通过 XTT 还原法测定了缺失菌生物膜的形成能力、抗菌肽 AMP-17

对生物膜形成的抑制作用和成熟被膜的清除作用。结果如图 5A 所示, *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌生物膜的形成能力与亲本菌株 SC5314 基本一致($P>0.05$), 提示上述基因缺失不影响白念珠菌生物膜的形成。关于生物膜形成的抑制活性(图 5B), 抗菌肽 AMP-17 对 2 株缺失菌生物膜的形成均具有抑制作用。与亲本菌株 SC5314 相比, *XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失可降低抗菌肽 AMP-17 对白念珠菌生物膜形成的抑制活性。关于成熟生物被膜(图 5C), AMP-17 对 2 株缺失菌成熟被膜均具有清除作用。与亲本菌株 SC5314 相比, *SRR1* 基因缺失可增加高浓度 AMP-17 对白念珠菌成熟生物被膜的清除作用, 而对 *xog1Δ/Δ* 缺失菌生物被膜无明显清除作用。

3 讨论

抗菌肽是生物体抵御外界病原体侵袭时产生的一类小分子多肽, 是对抗微生物病原体防御机制的重要组分^[6]。这些小分子多肽的抗真菌活性机制通常较为复杂。目前为止, 抗菌肽对白念珠菌的作用机制尚未完全阐明。有研

究发现, 细胞壁作为白念珠菌抵御外界侵入的第一道防线, 在维持细胞生长和正常生理功能中起着重要作用^[22-23]。此外, 由于细胞壁独特的组成成分, 细胞壁成为多数抗真菌药物的潜在作用靶点^[24]。例如, 棘白菌素类药物卡泊芬净可通过抑制 *FKSI* 基因所编码的 β -1,3-D-葡聚糖合酶破坏真菌细胞壁完整性而发挥其抗真菌作用^[25]。另外, 研究还发现抗菌肽可通过引起白念珠菌的氧化应激而导致细胞发生氧化损伤^[26]。在前期研究中发现经抗菌肽 AMP-17 作用后, 参与白念珠菌细胞壁生物合成和抗氧化应激的差异表达蛋白 P29717 (*XOG1*) 和 Q59M56 (*SRR1*) 显著上调^[10]。*XOG1* 是编码白念珠菌细胞外葡聚糖酶的关键基因, 其在乳酸诱导的 β -葡聚糖“掩盖”途径的下游起作用, 以促进 β -1,3-葡聚糖“剃须”^[11]。*SRR1* 是白念珠菌的应答调节基因, 在白念珠菌的形态发生、胁迫适应和毒力中发挥着重要作用^[12]。本研究结果发现, *XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失均可降低抗菌肽 AMP-17 对白念珠菌的敏感性及对生物膜形成的抑制活性, 表明 AMP-17 可能通过影响上述基因的功能来发挥其抗真菌作用。

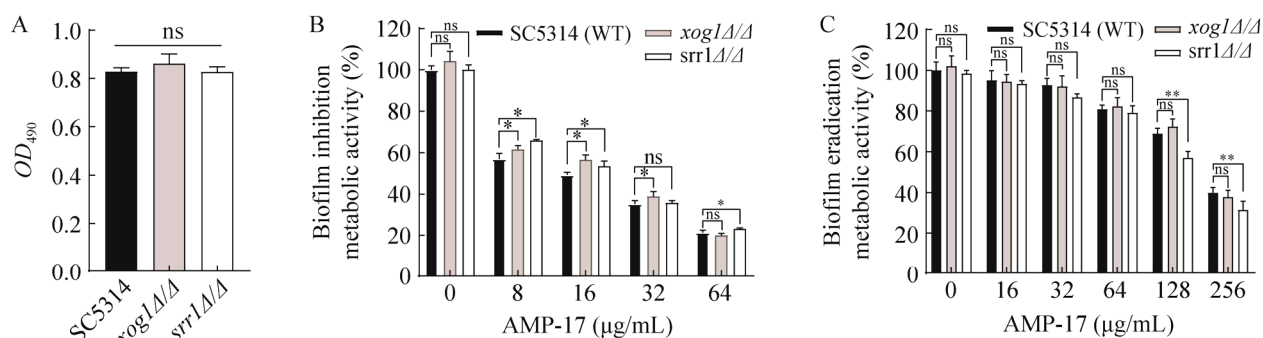


图 5 AMP-17 对基因缺失菌生物膜的影响

Figure 5 Effect of AMP-17 on biofilm of gene deletion mutants. A: Deletion of *XOG1* and *SRR1* genes did not affect the formation of *C. albicans* biofilms. B: Deletion of *XOG1* and *SRR1* genes reduced the inhibitory activity of AMP-17 against *C. albicans* biofilm formation. C: Effect of AMP-17 on mature biofilms in *XOG1* and *SRR1* deletion mutants. Compared to strain SC5314, ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

近年来,随着 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的深入研究,其已成为白念珠菌基因功能研究的重要技术手段。Nguyen 等^[20]开发了一种可在白念珠菌中高效、快速、可回收的 CRISPR 系统,该系统不仅回避了 *URA3* 标记对白念珠菌的表型影响,而且敲除效率高、无需分子克隆、不会在基因组中留下永久性筛选标记。因此,CRISPR/Cas9 基因编辑技术的诞生为白念珠菌药物靶标的研究提供了更多的新途径。本研究利用 Nguyen 等^[20]开发的 CRISPR 系统对前期蛋白质组学实验筛选出的潜在靶蛋白基因 *XOG1* 和 *SRR1* 进行敲除,且成功构建了 *xog1Δ/Δ*、*srr1Δ/Δ* 缺失菌和 *srr1Δ/Δ::srr1* 回补菌。生长动力学结果发现,*XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失不显著影响白念珠菌的生长繁殖,提示上述基因可能不是白念珠菌生长所需的必需基因。药物敏感性结果显示,*xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌对 AMP-17 的 MIC₈₀ 值升高一个浓度梯度,提示 *XOG1* 和 *SRR1* 基因可能与 AMP-17 发挥抗真菌作用有关,但还不是关键靶点。究其原因可能是:上述基因本身对抗真菌剂的敏感性影响不大;其次,亲本菌株 SC5314 为敏感菌株,其对抗真菌剂具有较高的敏感性,故基因敲除后 MIC₈₀ 值降低或升高的差异不显著。因此,需待进一步深入探讨。

据报道,白念珠菌是二相性真菌,即酵母相和菌丝相相互转换,其中菌丝相具有较强的黏附性、侵袭性和致病性^[27-28]。基于上述背景,本研究对 *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌的菌丝形成能力进行测定。结果发现,与亲本菌株 SC5314 相比,*xog1Δ/Δ* 缺失菌在液体和固体菌丝诱导培养基中的菌丝形成能力受到抑制,不能正常形成菌丝;而 *srr1Δ/Δ* 缺失菌可正常形成菌丝,说明 *XOG1* 基因缺失可抑制白念珠菌菌丝的形成,提示 *XOG1* 基因可能在白念珠菌致病力

方面发挥作用。目前,已有研究表明生物膜的形成是导致白念珠菌发挥侵袭性和致病性的重要因素,且是临床上念珠菌产生耐药性的关键^[29-30]。本研究结果发现,*xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌生物膜的形成能力与亲本菌 SC5314 基本一致,提示上述基因缺失不显著影响白念珠菌生物被膜的形成能力。为进一步探讨抗菌肽对上述基因缺失菌生物膜形成的抑制作用和对成熟被膜的清除能力,本研究采用 XTT 还原法进行定量检测。结果发现,抗菌肽 AMP-17 对 *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌生物膜的形成均具有抑制作用。与亲本菌 SC5314 相比,*XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失降低了抗菌肽 AMP-17 对白念珠菌生物膜形成的抑制活性。关于成熟被膜,AMP-17 对 *xog1Δ/Δ* 和 *srr1Δ/Δ* 缺失菌成熟被膜均具有清除作用。与亲本菌 SC5314 相比,*SRR1* 基因缺失可增加高浓度 AMP-17 对白念珠菌成熟生物被膜的清除能力,而对 *xog1Δ/Δ* 缺失菌成熟被膜无明显清除作用。上述结果提示 *XOG1* 和 *SRR1* 基因可作为抗菌肽 AMP-17 抗白念珠菌的潜在作用靶点。

4 结论

本研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功构建了 *xog1Δ/Δ*、*srr1Δ/Δ* 缺失菌和 *srr1Δ/Δ::srr1* 回补菌。*XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失可降低抗菌肽 AMP-17 对白念珠菌的药物敏感性, MIC₈₀ 值上升一个浓度梯度。同时,*XOG1* 和 *SRR1* 基因缺失降低了 AMP-17 对白念珠菌生物膜形成的抑制活性,提示 *XOG1* 和 *SRR1* 基因可能是 AMP-17 抗白念珠菌的潜在靶点,但如何影响还需进一步深入研究。此外,由于本文尚未构建 *XOG1* 敲除菌的回补株,在后续研究中会进一步构建 *XOG1* 敲除菌的回补株并深入探讨其与抗菌肽 AMP-17 的相关性。

REFERENCES

- [1] PAPPAS PG, LIONAKIS MS, ARENDRUP MC, OSTROSKY-ZEICHNER L, KULLBERG BJ. Invasive candidiasis[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4: 18026.
- [2] D'ENFERT C, KAUNE AK, ALABAN LR, CHAKRABORTY S, COLE N, DELAVY M, KOSMALA D, MARSAUX B, FRÓIS-MARTINS R, MORELLI M, ROSATI D, VALENTINE M, XIE ZX, EMRITLOLL Y, WARN PA, BEQUET F, BOUGNOUX ME, BORNES S, GRESNIGT MS, HUBE B, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2021, 45(3): fuaa060.
- [3] TERÇAS ALG, MARQUES SG, MOFFA EB, ALVES MB, de AZEVEDO CMPS, SIQUEIRA WL, MONTEIRO CA. Antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, maranhão, Brazil[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 298.
- [4] BERBERI A, NOUJEIM Z, AOUN G. Epidemiology of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus/acquired immune deficiency syndrome patients and CD4+ counts[J]. Journal of International Oral Health: JIOH, 2015, 7(3): 20-23.
- [5] da SILVA DANTAS A, LEE KK, RAZIUNAITE I, SCHAEFER K, WAGENER J, YADAV B, GOW NA. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 34: 111-118.
- [6] LAZZARO BP, ZASLOFF M, ROLFF J. Antimicrobial peptides: application informed by evolution[J]. Science, 2020, 368(6490): eaau5480.
- [7] JIANG YJ, CHEN YY, SONG ZY, TAN ZZ, CHENG JJ. Recent advances in design of antimicrobial peptides and polypeptides toward clinical translation[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2021, 170: 261-280.
- [8] GUO G, TAORY, LI Y, MA HL, XIU JF, FU P, WU JW. Identification and characterization of a novel antimicrobial protein from the housefly *Musca domestica*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 490(3): 746-752.
- [9] MA HL, ZHAO XY, YANG LB, SU PP, FU P, PENG J, YANG N, GUO G. Antimicrobial peptide AMP-17 affects *Candida albicans* by disrupting its cell wall and cell membrane integrity[J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 2509-2520.
- [10] YANG LB, GUO G, TIAN ZQ, ZHOU LX, ZHU LJ, PENG J, SUN CQ, HUANG MJ. TMT-based quantitative proteomic analysis of the effects of novel antimicrobial peptide AMP-17 against *Candida albicans*[J]. Journal of Proteomics, 2022, 250: 104385.
- [11] CHILDERS DS, AVELAR GM, BAIN JM, PRADHAN A, LARCOMBE DE, NETEA MG, ERWIG LP, GOW NAR, BROWN AJP. Epitope shaving promotes fungal immune evasion[J]. mBio, 2020, 11(4): e00984-e00920.
- [12] DESAI C, MAVRIANOS J, CHAUHAN N. *Candida albicans* SRR1, a putative two-component response regulator gene, is required for stress adaptation, morphogenesis, and virulence[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(10): 1370-1374.
- [13] SAHEL DK, MITTAL A, CHITKARA D. CRISPR/cas system for genome editing: progress and prospects as a therapeutic tool[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, 370(3): 725-735.
- [14] SINGH V, BRADDICK D, DHAR PK. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology[J]. Gene, 2017, 599: 1-18.
- [15] SINGH V, GOHIL N, RAMÍREZ GARCÍA R, BRADDICK D, FOFIÉ CK. Recent advances in CRISPR-Cas9 genome editing technology for biological and biomedical investigations[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(1): 81-94.
- [16] MALI P, YANG LH, ESVELT KM, AACH J, GUELL M, DiCARLO JE, NORVILLE JE, CHURCH GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.
- [17] RAZZAQ A, SALEEM F, KANWAL M, MUSTAFA G, YOUSAF S, IMRAN ARSHAD HM, HAMEED MK, KHAN MS, JOYIA FA. Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(16): 4045.
- [18] MIN K, BIERMANN A, HOGAN DA, KONOPKA JB. Genetic analysis of *NDT80* family transcription factors in *Candida albicans* using new CRISPR-Cas9 approaches[J]. mSphere, 2018, 3(6): e00545-e00518.
- [19] HAMEED A, HUSSAIN SA, IJAZ MU, UMER M. Deletions of the *Idh1*, *Eco1*, *Rom2*, and *Taf10* genes differently control the hyphal growth, drug tolerance, and virulence of *Candida albicans*[J]. Folia Biologica, 2020, 66(3): 91-103.
- [20] NGUYEN N, QUAIL MMF, HERNDAY AD. An efficient, rapid, and recyclable system for CRISPR-mediated genome editing in *Candida*

- albicans*[J]. mSphere, 2017, 2(2): e00149-e00117.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. Approved Standard, edn 3, CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [22] WALKER L, SOOD P, LENARDON MD, MILNE G, OLSON J, JENSEN G, WOLF J, CASADEVALL A, ADLER-MOORE J, GOW NAR. The viscoelastic properties of the fungal cell wall allow traffic of AmBisome as intact liposome vesicles[J]. mBio, 2018, 9(1): e02383-e02317.
- [23] SAMALOVA M, MÉLIDA H, VILAPLANA F, BULONE V, SOANES DM, TALBOT NJ, GURR SJ. The β -1,3-glucanosyltransferases (Gels) affect the structure of the rice blast fungal cell wall during appressorium-mediated plant infection[J]. Cellular Microbiology, 2017, 19(3): e12659.
- [24] CORTÉS JCG, CURTO MÁ, CARVALHO VSD, PÉREZ P, RIBAS JC. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(6): 107352.
- [25] REVIE NM, IYER KR, ROBBINS N, COWEN LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact[J]. Current Opinion in Microbiology, 2018, 45: 70-76.
- [26] CARLISLE PL, KADOSH D. A genome-wide transcriptional analysis of morphology determination in *Candida albicans*[J]. Molecular Biology of the Cell, 2013, 24(3): 246-260.
- [27] CARLISLE PL, BANERJEE M, LAZZELL A, MONTEAGUDO C, LÓPEZ-RIBOT JL, KADOSH D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(2): 599-604.
- [28] LI P, SENEVIRATNE CJ, ALPI E, VIZCAINO JA, JIN LJ. Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persisters[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(10): 6101-6112.
- [29] PONDE NO, LORTAL L, RAMAGE G, NAGLIK JR, RICHARDSON JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2021, 47(1): 91-111.

(本文责编 陈宏宇)