

DOI:10.13350/j.cjpb.220703

• 论著 •

小鼠胃类器官培养中真菌污染的鉴定与控制*

李菁¹, 张莹^{1**}, 佟小涵¹, 何静¹, 吕心¹, 张锐清¹, 杜运秋¹, 刘岩红², 李波清^{1**}

(1. 滨州医学院病原生物学教研室, 山东烟台 264003; 2. 滨州医学院附属医院)

【摘要】 目的 探讨小鼠胃类器官培养过程中污染真菌的种类及其控制措施。方法 利用小鼠胃成体干细胞培养胃类器官;分离小鼠胃类器官培养过程中产生的污染物,革兰染色观察镜下形态;将污染物分离培养,并进行真菌 ITS 基因测序分析;梯度浓度试验探究可抑制污染物的药物及最适浓度。结果 小鼠胃类器官培养过程中的污染物为出芽短梗霉菌;500 μg/L 的两性霉素 B 可有效抑制污染物的出芽短梗霉菌;控制真菌污染后成功构建小鼠胃类器官,第 9 d 时检测类器官仍具有活性。结论 出芽短梗霉菌可引起小鼠胃类器官培养过程中的真菌污染,通过添加两性霉素 B 控制真菌污染可成功构建小鼠胃类器官。

【关键词】 胃类器官;真菌污染;出芽短梗霉菌

【中图分类号】 R379

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0757-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jul.;17(7):757-760, 765.]

Identification and control of fungal contamination in mouse gastric organoids culture

LI Jing¹, ZHANG Ying¹, TONG Xiao-han¹, HE Jing¹, LV Xin¹, ZHANG Rui-qing¹, DU Yun-qiu¹, LIU Yan-hong¹, LI Bo-qing¹ (1. Department of Pathogen Biology, Binzhou Medical College, Yantai 264003, Shandong, China; 2. Binzhou Medical University Hospital)

【Abstract】 **Objective** To explore the specific causes and solutions of common pollution in mouse gastric organoids culture. **Methods** Gastric organoids were cultured from mouse gastric stem cells. The sediment that obtained by centrifugation was stained with gram to observe the morphology under a microscope. The pollutants were isolated and cultured and the FUNGI were sequenced by ITS. The selection experiment of action concentration was conducted to explore the drugs and the optimal concentration that could inhibit the pollutants. **Results** In the process of mouse gastric organoids culture, the contaminant was *Aureobasidium pullulans*, and they were spore brachium. Amphotericin B at 500 μg/L could effectively inhibit the contamination of *A. pullulans*. After controlling the fungal contamination, the gastric organoid of mice were successfully constructed, and the gastric organoids were still active on the ninth day. **Conclusion** *A. pullulans* can cause fungal contamination in the process of gastric organoid culture in mice. Then mice gastric organoids were successfully constructed by adding amphotericin B to control fungal contamination.

【Key words】 gastric organoid; fungal contamination; *Aureobasidium pullulans*

***类器官是一种将干细胞体外培养产生的三维产物,含有多种细胞类型,具有与对应器官相似的结构与功能,能在体外较好地模拟器官的生理病理活动^[1-2]。2009年荷兰 Hans Clevers 成功分离 Lgr5⁺干细胞,并将其培养成小鼠小肠类器官^[3]。此后,陆续进行了肠、脑、肝等类器官培养^[4-6]。类器官培养需要组织少,可在体外长期传代培养,且冻存复苏后状态稳定。但类器官培养过程中易发生污染,污染后类器官的生长和增殖都受到严重影响,因此控制类器官培养过程中的污染非常重要。

真菌是一种广泛存在于自然界的真核生物,包括霉菌、念珠菌、酵母菌等,真菌可通过接触、吸入、食入等途径传播,引起相关疾病^[7]。在小鼠饲养过程中,真菌易污染小鼠饲料,进而在小鼠胃内存在,取胃部腺体细胞做类器官时会造成真菌污染。类器官培养过程中

出现的污染多为细菌,而在真菌污染方面研究鲜有报道,研究小鼠胃类器官培养过程中污染的真菌及其控制措施具有重要的现实意义。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 C57BL/6(6-8周龄)雄性,购自济南朋悦实验动物有限公司;L-Wnt 3A 细胞购自普诺赛。

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82172560, 81771709, 42077402);山东省高等学校青创科技支持计划(No. 2019KJK012)。

** **【通讯作者】** 张莹, E-mail: zhangying99g99@163.com; 李波清, E-mail: sdliboqing@163.com

【作者简介】 李菁(1996-),女,山西临汾人,硕士研究生,主要从事胃肠道致病菌致病机制研究, E-mail: 18403550750@163.com

1.2 主要试剂 基质胶(Bd); Advanced DMEM F12、无谷氨酰胺高糖 DMEM、谷氨酰胺、HEPES、B27、青链霉素购自美国 Gibco 公司; L-Wnt 3A 细胞购自普诺赛公司; 重组鼠头蛋白购自美国 R&D 公司; 重组鼠表皮生长因子、重组鼠成纤维细胞生长因子-10、重组鼠 R-Spondin 1 购自美国 Peprotech 公司; N-乙酰半胱氨酸购自美国 Sigma 公司; 人胃泌素、烟酰胺购自英国 Tocris 公司; DPBS 购自北京索莱宝科技有限公司; 两性霉素 B 购自大连美仑生物技术公司; PrestoBlue HS 细胞活力检测试剂购自美国 Invitrogen 公司; E-cadherin 与 PCNA 兔一抗购自美国 Abcam 公司; Hoechst 33342 染液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 主要仪器 倒置显微镜及倒置荧光显微镜均为日本 OLYMPUS 公司产品; 超净工作台为苏州安泰空气技术有限公司产品; 细胞培养箱为美国 Thermo Scientific 公司产品; 超速离心机为 Eppendorf 公司产品; 激光共聚焦显微镜为德国 ZEISS 公司产品。

2 方法

2.1 培养基的制备

2.1.1 Wnt 条件培养基的收集 取出 L-Wnt 3A 细胞于 25 cm² 细胞培养瓶中复苏后置含 10% FBS、1% GlutaMAX、1% P/S、G418(400 μg/ml)、DMEM 的培养基, 待细胞长满后代传至 75 cm² 细胞培养瓶中, 加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养。2 d 后将细胞以 1:3 传代至 175 cm² 细胞培养瓶中, 加入最终培养基(1% HEPES、10% FBS、1% GlutaMAX、1% P/S、DMEM-F12)培养 3 d, 收集培养基, 加入 25 ml 最终培养基, 连续培养 2 d, 收集培养基。将两批培养基混合、过滤、分装, -80 °C 保存备用。

2.1.2 类器官培养基的制备 配置类器官培养基: 50% Wnt 条件培养基, 2% B27, 1% 青/链霉素, 100 ng/ml 重组鼠头蛋白, 50 ng/ml 重组鼠表皮生长因子, 100 ng/ml 重组鼠 FGF-10, 1 μg/ml 重组鼠 R-Spondin 1, 10 nmol/L 胃泌素 I, 10 nmol/L 谷氨酰胺, 10 mmol/L 烟酰胺, 1 mmol/L N-乙酰半胱氨酸, 10 μmol/L Y27632, 500 μg/L 两性霉素 B, 25% Advanced DMEM F12。

2.1.3 消化液的配置 消化液含血清 20%, 青链霉素 1%, IV 型胶原酶 1 mg/ml, 透明质酸酶 0.5 mg/ml, 1640 培养基补至 10 ml。即每 10 ml 消化液中含 IV 型胶原酶 100mg, 透明质酸酶 50 mg, FBS 2 ml, 青/链霉素 100 μl, 余量用 1640 培养基补齐。

2.2 胃类器官培养

2.2.1 分离腺体 取小鼠 C57BL/6, 腹腔麻醉后处死, 无菌操作解剖取胃, 沿胃大弯剪开, 转移至新的 10

mm² 无菌培养皿中, 洗净胃内容物, 将胃组织剪成 1~2 mm² 的碎片, 使用预冷 DPBS 清洗至上清液澄清。将 37 °C 预热的消化液加至组织碎片中, 放置 37 °C 培养箱中消化 1h 后将组织转移至培养皿中, 使用无菌载玻片按压, 使腺体释出。

2.2.2 制备单细胞悬液 加入 DMEM 培养基并转移至离心管中, 吹打细胞, 使用 200 目细胞滤网过滤, 制成单细胞悬液。

2.2.3 接种与培养 将获得的单细胞悬液与基质胶混匀后接种于预热的 24 孔板中, 置于细胞培养箱中固化 30 min 后取出, 加入配置好的类器官培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 环境下培养, 每隔 2 d 换液一次。

2.3 污染物的显微形态观察及培养 将含有污染物的培养基取出, 离心后, 取部分沉淀革兰染色后进行光学显微镜观察。

2.4 真菌 ITS 基因测序分析

2.4.1 真菌基因组 DNA 提取 取培养物使用直扩试剂盒提取基因组 DNA。

2.4.2 PCR 扩增 扩增采用 50 μL 体系: 1×T3 Mix 46 μL, 18 s, 28 s, 5.8 s 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 2 μL。PCR 反应扩增程序为: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 2 min, 4 °C 保存。

2.4.3 切胶回收 PCR 产物切胶回收后, 由北京擎科生物科技有限公司测序。

2.5 进化树构建 将测序所得序列进行 Blast 比对分析, 得到同源性较高的序列, 使用 MEGA7 软件、以 NJ 法构建系统进化树, 分析该菌与其他菌株间的关系。

2.6 两性霉素 B 作用浓度的选择 将不同量的两性霉素 B 加入小鼠胃类器官培养基中, 使其终浓度为 200 μg/L、400 μg/L、500 μg/L、1 mg/L。每组设置 5 个重复, 观察记录每组的污染控制情况。

2.7 细胞活力试验 将培养类器官的 24 孔板从冰箱取出, 加入 PrestoBlue HS 细胞活力试剂, 37 °C 孵育 30 min 后弃去, PBS 洗涤 3 次, 再加入 Hoechst 染液, 室温避光孵育 30 min 后弃去, 同上洗涤, 浸润 PBS, 倒置荧光显微镜观察。

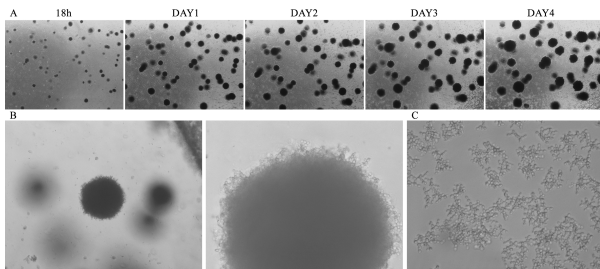
2.8 激光共聚焦检测细胞标志物 将小鼠胃类器官培养至第 7 d, 弃去培养基, 加入 4% 多聚甲醛固定过夜。吹打混匀, PBS 洗涤 3 次, 将沉淀与适量基质胶混匀接种于激光共聚焦皿中, 37 °C 固化 1 h, 待基质胶凝固后, 加入血清封闭 1 h, 同上洗涤, 加入一抗(E-cadherin 或 PCNA, 比例均为 1:500)孵育过夜, PBS 洗 3 次, 加入荧光二抗(Dylight488 或 594)避光孵育 2 h, 同上洗涤, 加入 Hoechst 染液(1:100)染 30 min, 同

上洗涤,用 PBS 浸润,激光共聚焦显微镜观察。

结果

1 污染物镜下形态观察

在小鼠胃类器官培养过程中,18h 后镜下可见污染,随着培养时间延长,污染物增殖速度加快,聚集产生的球状物直径亦迅速增大(图 1A)。污染物最初出现在基质胶中,因基质胶可在室温聚合成三维基质且具有生物学活性,故污染物可聚集成球状(图 1B),而培养基呈透明状态。但培养 1 d 后,培养基混浊并出现污染物,形态与基质胶中相似(图 1C),呈分散状。



注:A 为连续 4 d 污染物的镜下形态记录,B 为单个污染物分别在 100×、400× 时的镜下形态,C 为 24 孔板培养基中 400× 镜下观察结果。

图 1 污染物不同时间的形态

Note:A is the microscopic morphology record of pollutants for 4 consecutive days;B is the microscopic morphology of single pollutant at 100× and 400× respectively;C is the observation result of 400× microscope in 24-well plate medium

Fig. 1 Different forms of pollutants

2 DMEM 中污染物形态观察

将含污染物的培养基转移至离心管,离心弃上清,将沉淀转移至含高糖 DMEM 的细胞培养瓶,置于细胞培养箱中培养。污染物形态呈酵母状,排列方式呈单个、成串或短链状结果见图 2。

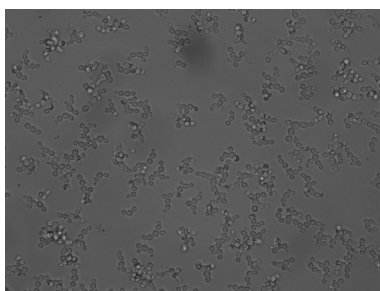


图 2 污染物在 DMEM 中的形态(400×)
Fig. 2 The form of pollutant in DMEM(400×)

3 污染物革兰染色镜下形态观察

将 DMEM 中的污染物离心沉淀,革兰染色结果见图 3,病原菌形态呈紫色,卵圆形,大小为 2~4 μm。

4 ITS 基因测序分析结果

ITS 基因测序结果得到长度 579 bp 的序列,具体为:CGGAATGCTCCTGATCCGAGGTCACCTAG-

AAAAATAAAGGTTTCAGTCGGCAGAGTTCCT-
CTCCTTTGACAGACGTTTGAATAAATTCTAC-
TACGCCTAAAGCCGGAGTGGCCTCGCCGAGG-
TCTTTAAGGCGCGCCCACTAAGGACGACGC-
CCAATACCAAGCATAGCTTGAGTGGTGTAA-
TGACGCTCGAACAGGCATGCCCCTCGGAATA-
CCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCG-
ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC-
TTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATG-
CGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT-
TTGATTTATTCAAATTTTTACTCAGACGAC-
CGGTTAAATAACAAGAGTTTGGTTTAACTCT-
GGCGGGCGCTCGCCTGGGACGAATCCCCAGC-
GGCTCGAGACCGAGCGGTCCCGCCAAAGCAA-
CAAGGTAGTTTTAACAACAAAGGGTTGGAG-
GTCGGGCGCTGAGCACCTTACTCTTTAATG-
ATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTT-
GTACATTTTTTTTACTTCCAAACCGG, 将所得
序列经 Blast 比对,得出同源性较高的序列,将测序结果
建立进化树见图 4。待测菌株与 HG532066.1 聚为
一支,结合菌的形态特征鉴定为出芽短梗霉菌。

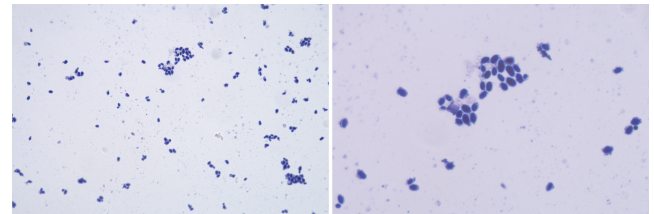


图 3 污染物革兰染色镜下观察
Fig. 3 Contaminant gram stain



图 4 测序结果构建进化树
Fig. 4 The results of sequencing were used to construct
an evolutionary tree

5 两性霉素 B 抑菌浓度选择

结果显示在浓度 ≤400 μg/L 时,出芽短梗霉菌仍可生长;浓度 ≥500 μg/L 时,出芽短梗霉菌生长受到抑制,连续培养 3 d,仍呈无菌状态(图 5)。提示两性霉素 B 浓度达到 500 μg/L 时可有效抑制出芽短梗霉菌的生长。

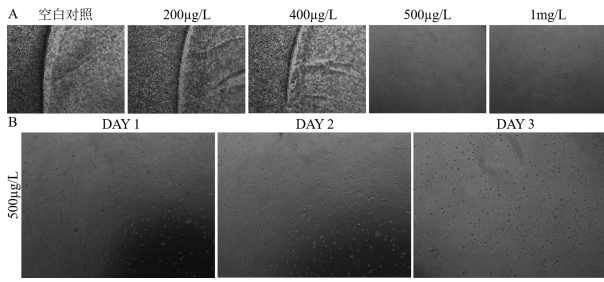


图 5 两性霉素 B 不同浓度的抑菌效果
Fig. 5 Amphotericin B concentration fumble test

6 小鼠胃类器官模型的建立

在基质胶中腺体细胞在各种细胞因子的作用下形成 3D 结构,24 h 便可形成中空结构。并且随着时间推移逐渐长大(图 6A),培养至第 9 d 时,类器官仍具有活力(图 6B),图 7C 为同一胃类器官连续生长至 10 d 的图像。

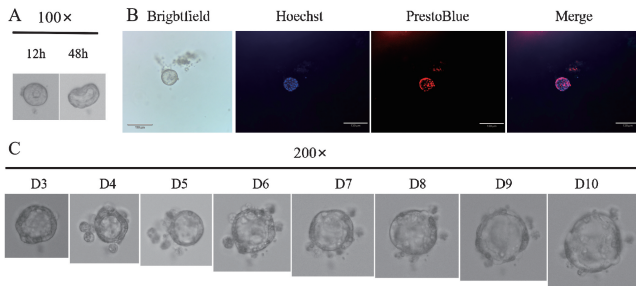


图 6 小鼠胃类器官形态及生长记录
Fig. 6 Morphology and growth records of gastric organoids in mice

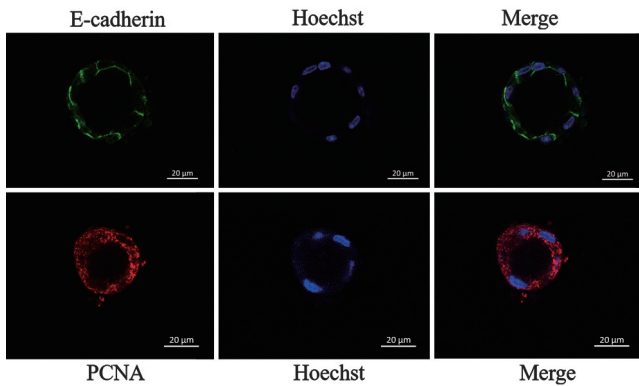


图 7 小鼠胃类器官表达 E-cadherin 上皮细胞与 PCNA 增殖细胞
Fig. 7 Mice gastric organoids expressed E-cadherin epithelial cells and PCNA proliferating cells

7 小鼠胃类器官模型中细胞标志物的检测

激光共聚焦结果表明小鼠胃类器官表达上皮细胞标志物 E-cadherin 以及增殖细胞 PCNA。E-cadherin 分布于上皮细胞表面。PCNA 是一种存在于增殖细胞中的蛋白质,可作为评价细胞增殖状态的指标,PCNA 有表达(图 8),说明类器官处于增殖期。

讨论

传统的胃部疾病研究主要以细胞系或动物实验为主,类器官的出现为生物学研究提供了新的方法。类器官技术相较于传统的疾病模型,类器官具有诸多优点,如需要的原组织材料较少,即使只有较少组织,也可培养生成相对应的类器官,并可进行进一步生理病理实验,还可为肿瘤的机制或治疗研究提供新的方向^[8];类器官培养成功后可进行长期传代培养,且性质功能稳定,这在一定程度上减轻了实验动物模型的浪费;类器官可进行药物筛选试验,具有特异性,有助于推动个体化医疗的发展^[9]。鉴于此,类器官培养成为目前热门的研究内容,研究者们尝试建立各种正常部位或肿瘤部位的类器官,用于研究疾病以及肿瘤的生理病理机制^[10-11]。

类器官培养过程复杂,不同部位或种类所需的培养条件及步骤也各不相同。从清洗组织到制成单细胞悬液均需冰上进行,且全程需无菌操作,这对环境及操作者要求较高,类器官培养过程中,各个阶段的不当操作均易造成污染。培养基中添加青霉素和链霉素可去除常见的细菌污染,但无法去除小鼠胃内可能存在的真菌,而真菌污染对小鼠胃类器官的培养有严重影响。Nam 等^[12]在培养病人来源的胃类器官时出现真菌感染。本研究发现在培养小鼠胃类器官过程中可发生出芽短梗霉菌污染,导致胃类器官培养失败。出芽短梗霉菌是一种真菌,Najafzadeh 等^[13]通过检测 104 株临床分离的出芽短梗霉菌的抗生素作用情况得出,两性霉素 B、伊曲康唑、泊沙康唑是总抑菌活性较好的药物,本研究选用两性霉素 B 控制出芽短梗霉菌污染。为探索小鼠胃类器官培养体系中两性霉素 B 的最适作用浓度,进行了浓度梯度抑菌实验,发现 500 µg/L 的两性霉素 B 可有效控制出芽短梗霉菌污染。综上,出芽短梗霉菌可引起小鼠胃类器官培养过程中的真菌污染,通过添加两性霉素 B 控制真菌污染可成功构建小鼠胃类器官。

【参考文献】

[1] Pang MJ, Burclaff JR, Jin R, et al. Gastric organoids: progress and remaining challenges[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2022, 13(1):19-33.

[2] McCracken KW, Cata EM, Crawford CM, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids[J]. Nature, 2014, 516(7531):400-404.

[3] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. Nature, 2009, 459(7244):262-265.

[4] Sato K, Zhang W, Safarikia S, et al. Organoids and spheroids as models for studying cholestatic liver injury and cholangiocarcinoma[J]. Hepatology, 2021, 74(1):491-502.

[5] Rahmani S, Breyner NM, Su HM, et al. Intestinal organoids: A new paradigm for engineering intestinal epithelium *in vitro* [J]. Biomaterials, 2019(194):195-214.

本研究从海南株类鼻疽伯克霍尔德菌 BPHN001 中新克隆得到一个 AraC 转录因子基因,并选用含有强启动子的 PET-28a(+)质粒对该 AraC 转录因子蛋白进行原核表达。该质粒可在表达的蛋白 N 端加入 6 个组氨酸重复标签,以用于蛋白的纯化。实验中观察了 IPTG 浓度对蛋白的诱导情况,结果显示 0.5~2.0 mmol/L 的 IPTG 对蛋白的诱导表达并无显著差异,故选择 IPTG 的终浓度为 0.5 mmol/L。同时对诱导温度进行了优化,结果显示 16 °C 和 37 °C 诱导效果并无差别,16 °C 低温诱导有利于蛋白活性的保持,因此确定 16 °C 为最佳诱导温度。为了得到高纯度的目的蛋白,对镍柱纯化的蛋白采用凝胶层析法进行了进一步的纯化,最终得到了高纯度的目的蛋白。

本实验克隆表达得到的 AraC 转录因子蛋白来源于海南株类鼻疽伯克霍尔德菌,可为开展 AraC 转录因子在调节鼻疽伯克霍尔德菌毒力等致病性方面的研究奠定基础。

【参考文献】

[1] Limmathurotsakul D, Golding N, Dance DA, et al. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis[J]. Nat Microbiol, 2016, 1(1): 15008.
[2] Anandraj VK, Priyadharshini A, Sunil SS, et al. *Burkholderia pseudomallei* infection in a healthy adult from a rural area of South India[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2012, 55(4): 578-579.
[3] Banerjee R, Roy A, Ahmad F, et al. Evolutionary patterning of hemagglutinin gene sequence of 2009 H1N1 pandemic[J]. J Biomol Struct Dyn, 2012, 29(4): 733-742
[4] Birnie E, James A, Peters F, et al. Melioidosis in Africa: Time to raise awareness and build capacity for its detection, diagnosis, and treatment[J]. Am J Trop Med Hyg, 2022, 106(2): 394-397.
[5] Savelkoel J, Dance DAB, Currie BJ, et al. A call to action: time to recognise melioidosis as a neglected tropical disease[J]. Lancet Infect Dis, 2021; S1473-3099(21)00394-7.
[6] Hautbergue GM, Wilson SA. BLF1, the first *Burkholderia pseudomallei* toxin, connects inhibition of host protein synthesis with melioidosis[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(4): 842-845.
[7] Jacob D, Sauer U, Housley R, et al. Rapid and high-throughput

detection of highly pathogenic bacteria by Ibis PLEX-ID technology[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39928.
[8] Mc Kenney ES, Sargent M, Khan H, et al. Lipophilic prodrugs of FR900098 are antimicrobial against *Francisella novicida* in vivo and in vitro and show Glp T independent efficacy[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e38167.
[9] Wiersinga WJ, Virk HS, Torres AG, et al. Melioidosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 1(4): 17107.
[10] Yang J, Tauschek M, Robins-Browne RM. Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals[J]. Cellpress, 2011, 19(3): 128-135.
[11] Sahebi M, Tarighi S, Taheri P. The Arac-like transcriptional regulator YqhC is involved in pathogenicity of *Erwinia amylovora* [J]. J Appl Microbiol, 2022, 132(2): 1319-1329.
[12] Marghani D, Ma Z, Centone AJ, et al. An AraC/XylS family transcriptional regulator modulates the oxidative stress response of *Francisella tularensis* [J]. J Bacteriol, 2021, 203(23): e0018521.
[13] Lim BS, Chong CE, Zamrod Z, et al. Genome-wide prediction and annotation of *Burkholderia pseudomallei* AraC/XylS family transcription regulator[J]. In Silico Biol, 2007, 7(4-5): 389-397.
[14] Lowden MJ, Skorupski K, Pellegrini M, et al. Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(7): 2860-2865.
[15] Nakata M, Podbielski A, Kreikemeyer B. MsmR, a specific positive regulator of the *Streptococcus pyogenes* FCT pathogenicity region and cytolysis-mediated translocation system genes[J]. Mol Microbiol, 2005, 57(3): 786-803.
[16] Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection[J]. J Infect Dis, 2011, 204(6): 937-941.
[17] Lei MG, Cue D, Roux CM, et al. Rsp inhibits attachment and biofilm formation by repressing *fmbA* in *Staphylococcus aureus* MW2[J]. J Bacteriol, 2011, 193(19): 5231-5241.
[18] Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Transcription factor drug targets[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(12): 2693-2696.
[19] Withey JH, DiRita VJ. Activation of both *acfA* and *acfD* transcription by *Vibrio cholerae* ToxT requires binding to two centrally located DNA sites in an inverted repeat conformation[J]. Mol Microbiol, 2005, 56(4): 1062-1077.

【收稿日期】 2022-02-22 【修回日期】 2022-05-09

(上接 760 页)

[6] Grenier K, Kao J, Diamandis P. Three-dimensional modeling of human neurodegeneration: brain organoids coming of age[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(2): 254-274.
[7] Yew SM, Chan CL, Lee KW, et al. A five-year survey of dematiaceous fungi in a tropical hospital reveals potential opportunistic species[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104352.
[8] Lin M, Gao M, Cavnar MJ, et al. Utilizing gastric cancer organoids to assess tumor biology and personalize medicine[J]. World J Gastrointest Oncol, 2019, 11(7): 509-517.
[9] Seidlitz T, Koo B K, Stange DE. Gastric organoids-an in vitro model system for the study of gastric development and road to personalized medicine[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(1): 68-83.
[10] Seidlitz T, Merker S R, Rothe A, et al. Human gastric cancer

modelling using organoids[J]. Gut, 2019, 68(2): 207-217.
[11] Lee SH, Hu W, Matulay JT, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer[J]. Cell, 2018, 173(2): 515-528.
[12] Nam SY, Lee SJ, Lim HJ, et al. Clinical risk factors and pattern of initial fungal contamination in endoscopic biopsy-derived gastrointestinal cancer organoid culture[J]. Korean J Intern Med, 2021, 36(4): 878-887.
[13] Najafzadeh MJ, Sutton DA, Keisari MS, et al. In vitro activities of eight antifungal drugs against 104 environmental and clinical isolates of *Aureobasidium pullulans* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(9): 5629-5631.

【收稿日期】 2022-02-19 【修回日期】 2022-05-06