

國立交通大學

生物科技學院

生物科技系暨研究所

碩士論文

白色念珠菌 *CaGPM1* 糖解酵素基因對細胞型態及抗
藥性之影響

The involvement of the glycolytic pathway gene,
CaGPM1, in the morphology and drug resistance in
Candida albicans

研究生：李淑萍

指導教授：楊昀良博士

中華民國九十八年七月

白色念珠菌 *CaGPM1* 醣解酵素基因對細胞型態及抗
藥性之影響

The involvement of the glycolytic pathway gene, *CaGPM1*, in
the morphology and drug resistance in *Candida albicans*

研究生：李淑萍

Student: Shu-Ping Li

指導教授：楊昀良博士

Advisor: Dr. Yun-Liang Yang

國立交通大學

生物科技學院

生物科技系暨研究所

碩士論文

A thesis

Submitted to Institute of Biological Science and Technology

Department of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

in

Biological Science and Technology

July 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年七月

白色念珠菌 *CaGPM1* 醣解酵素基因對細胞型態及抗藥性之影響

研究生：李淑萍

指導教授：楊昀良博士

國立交通大學生物科技系暨研究所 碩士班

摘要

白色念珠菌為人類重要的伺機性病源菌。先前本實驗室利用抑制刪除雜交法 (Suppression Subtractive Hybridization , SSH) 經過定序後的分析比對，得到在野生株 (SC5314) 與失去致病力的 *efg1/efg1 cph1/cph1* 雙基因突變株 (HLC54) 兩者之間表現量有差異的基因。其中有一個是醣解作用中的基因 *CaGPM1*。利用北方墨點法分析，結果顯示 *CaGPM1* 基因在 *efg1/efg1 cph1/cph1* 雙突變株的表現量大於野生株。此外，在篩選影響抗藥性表現的基因時，發現 *CaGPM1* 的表現受 *CaNDT80* 之影響，因此本實驗研究目標想要了解醣解酵素基因 *CaGPM1* 與細胞型態及抗藥性是否有關係。

首先利用同源重組置換方式將 *CaGPM1* 基因剔除並且將 *CaGPM1* 單套基因重新置入 *Cagpm1/Cagpm1* 雙套基因破壞株進行基因補救，接著進行這些突變株之特性描述，分析其與型態及抗藥性，結果顯示於 Etest 試驗 *Cagpm1/Cagpm1* 雙套基因破壞株中對於 caspofungin、amphotericin B 兩種藥物的敏感具有提高現象，*Cagpm1/Cagpm1* 雙套基因破壞株影響初期的芽管形成，長菌絲型態介於野生株 SC5314 與失去致病力 HLC54 之間，*Cagpm1/Cagpm1* 雙套基因破壞株在固態 YPGE/uridine 培养基上，細胞菌落小，細胞生長緩慢，因此證實 *CaGPM1* 與藥物敏感性、型態變化有所相關並且會影響細胞生長。

Abstract

Candida albicans is an important pathogen of humans. It has been reported that the *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant strain of *C.albicans* is defective in filamentous growth and is also avirulent in a mouse model. The ability of *C. albicans* to switch between a yeast form and a filamentous form has been implicated in its virulence. Previous comparative genomics studies have profiled the expression differences between the wide-type and the *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant strains. Genes isolated from these experiments may be involved in virulence and / or filamentous growth. Among them, there was a glycolytic pathway gene, *CaGPM1*. The result of northern analysis showed that *CaGPM1* expressed at higher level in *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant strain than that in the wide-type strain. In addition, it is found that *CaNDT80* influenced the expression of *CaGPM1*. The purpose of present study was to elucidate the involvement of the *CaGPM1* gene on drug resistance and morphogenesis.

I have constructed a *Cagpm1/Cagpm1* null strain by gene replacement using *ARG4* and *URA3* as the selection markers to obtain homozygous knockout strains. The homozygous knockout strain was then rescued with single copy of the wild-type *CaGPM1* gene. The phenotypes of mutant strains were characterized and analyzed for the association with morphology and drug resistance. I found that in Etest, *Cagpm1/Cagpm1* homozygous mutants seemed to be more susceptible to caspofungin and amphotericin B. *Cagpm1/Cagpm1* strains showed significant alteration on germ tube formation and hyphal growth when compared to the wild type and *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant strain. Disruption of the *CaGPM1* gene has dramatic effects on growth rate of the strain by growth curve analysis. Besides, on YPGE/uridine agar, the colony of *Cagpm1/Cagpm1* mutant strain is smaller than the other strains. According to these results, it was suggested that Gpm1p may be involved in the drug resistance, morphogenesis and cell growth.

誌謝

時光飛逝，不知不覺研究生涯結束了，即將邁向人生的下一站。回想這些日子，非常感謝小楊老師，總是給學生很大的思考空間，而且不厭其煩的指導我正確的邏輯觀念及如何解決問題的能力，不曾放棄我並且和我一起闖過每一個實驗關卡，甚至到最後一個關卡仍細心修改我的碩士論文，幫我釐清概念，除了研究上的教導，在小楊老師身上我學到了包容和耐性，能在小楊老師的門下完成學業，真的讓我覺得很驕傲。同時，也感謝口試委員彭慧玲老師、羅秀容老師及藍忠昱老師在口試及論文修改上不吝指導，給予很多的寶貴意見，讓我的論文更完善。

實驗室的生活，讓我心情常常是大起大落，時而開心，時而失落，所幸實驗室這個大家庭，大家彼此會互相加油、鼓勵，切磋，讓我可以完成這個研究任務。記得初進小楊家族，受到幽默風趣的志豪學長的熱心關照、時尚路線的依瑾學姐的溫暖關懷、充滿女人味的欣彬學姐常給我鼓勵，獨立自主的金蓉學姐常提供實驗想法給我，熱心教學的育穎學長給我實驗操作上的指導，因為學長姐你們的照顧讓我更快進入狀況；另外特別感謝看似溫和卻有個性的惠菁學姐常常幫我送定序、和我討論實驗，還有最後送我的超實用禮物，我會好好珍惜；感謝同屆同學，好姐妹旻秀常常聽我抱怨，有主見的淑貞常常陪我去旅行，樂天派的敏書常常讓我哭笑不得，因為有你們一起共患難，日子不再辛苦了；感謝笑口常開的瀨云總是帶給我好心情、常常陷入自我思考的柏伶謝謝你常常來救援我、超有自信的毓駿總是介紹好電影給我、做事效率超好的佳真老師總是讓我做事有幹勁、大眼美女馨儀總讓我知道該認真了、吃苦耐勞的妍寧你是我燈塔接班人、傻裡傻氣的敬淳常帶給我歡樂、投影片總是很精緻的重延感謝你常帶台南的小吃孝敬我、安靜的禎憶感謝你的台南蝦餅，真好吃、思路清楚的幸璇感謝你常帶花蓮名產來、做人超客氣的睿賢謝謝你讓我知道我的極限在哪，雖然我是學姐，但是常常受到你們大家的照顧真的很感謝你們。此外還要感謝竹銘館的帥氣葉大哥、交大音樂所的瑞紋姐，謝謝你們長久以來對我的關心和照顧；好人助理蔡錕總是給我第一手實驗室消息；認真拼命的志達學長謝謝你常勉勵我；大楊家的直爽學妹咏馨謝謝你陪我玩耍；林

苔吟實驗室的昶文、秉博、晨圃、毓緯學長們謝謝你們平常的噓寒問暖。
謝謝您們讓我在交大的生活過的這麼精彩歡樂。

感謝科管所的仁聖學長、正宇、小朱、毛怪、幽靈、佩容、小伯因為你們的體諒，讓我可以專心的做實驗，也很開心有這個機會和你們一起參加創業競賽。

特別感謝在大學時，指導過我的吳淑黎老師、張瑞璋院長、許德賢老師、黃清龍老師、陳鳴泉老師、林文文老師，您們都是我求學中的貴人，真的很謝謝您們。

感謝我的大學好友靖皓、貞儀、昱翔、銘諄、若誼、佳螢、惠昀、雅婷、建志、阿梅及大學學長們小景、少東、可敬、小葉、阿伯、小馬、政賢一路的陪伴和關心。

感謝我的家人長久以來的支持和包容，因為您們的體諒，我才能撐到最後，特別是老爸老媽，因為您們一直以來的栽培我才有機會完成學業，真的很謝謝您們，我愛您們。

最後，一路走來，一直有很多貴人拉我一把，因此感謝所有幫助過我的人，我會記在心上的。



目錄

	頁次
中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	v
圖表目錄.....	x
附圖目錄.....	xii
一、緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 白色念珠菌之致病因子.....	2
1.3 真菌藥物種類及抗藥機制.....	10
1.4 簡述 <i>CDR1</i> 基因 (<i>Candida</i> Drug Resistance 1).....	13
1.5 醣解作用概述 (Glycolysis).....	16
1.6 <i>GPM1</i> 之相關研究.....	17
1.6.1 啤酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 中 <i>GPM1</i> 之研究.....	17
1.6.2 白色念珠菌中 (<i>Candida albicans</i>) 同源蛋白之探討.....	19
1.7 本論文研究源起及目的.....	19
二、材料.....	22
2.1 菌株.....	22
2.2 質體 (plasmid).....	23
2.3 引子 (primer).....	24
2.3.1 建構突變株設計的引子.....	24
2.3.2 針對 <i>CaGPM1</i> 突變株確認設計的引子.....	24
2.3.3 製備南方墨點法探針 (DNA probe) 之引子.....	25
2.3.4 製備北方墨點法探針 (DNA probe) 之引子.....	26
2.4 藥品試劑.....	26
2.5 緩衝溶液及溶劑.....	28

2.6 培養基配製	30
2.7 儀器設備	33
三、方法	36
3.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的轉形(Transformation).....	36
3.1.1 大腸桿菌勝任細胞的製備	36
3.2 質體 DNA 之萃取	36
3.3 限制酵素反應 (Sambrook et al, 1989)	37
3.4 萃取洋菜膠內之 DNA 片段	38
3.4.1 結晶紫洋菜膠的製備	38
3.4.2 洋菜膠內之 DNA 片段之萃取	38
3.5 DNA 連結反應	39
3.6 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction ; PCR)	39
3.7 雙套基因破壞株之建立 (homozygous knockout strain)	39
3.7.1 確認 <i>CaGPM1</i> 單套基因突變株	40
3.7.1.1 抽取染色體 DNA 方法一	40
3.7.1.2 利用 PCR、送定序檢查 <i>CaGPM1</i> 單套基因 (heterozygous knockout) 破壞株	40
3.7.1.3 以南方墨點法 (Southern blot) 確定 <i>CaGPM1</i> 單套基因破 壞	41
3.7.1.3.1 利用 PCR DIG labeling 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling)	41
3.7.1.3.2 抽取染色體 DNA 方法二	43
3.7.1.3.3 限制酶作用	44
3.7.1.3.4 限制酶作用後 DNA 產物跑電泳	44
3.7.1.3.5 利用毛細作用將 DNA 轉漬到 nylon membrane(Transferring DNA to a membrane)	44
3.7.1.3.5.1 洋菜膠事先處理	44
3.7.1.3.5.2 裝置 upward capillary transfer	45

3.7.1.3.6 固定(Fix).....	46
3.7.1.3.7 Prehybridization.....	46
3.7.1.3.8 Post-hybridization washes.....	46
3.7.1.3.9 免疫偵測 (Detection).....	47
3.7.2 製備含篩選標記及同源重組區域序列之 DNA 片段.....	47
3.7.3 電穿孔方式進行白色念珠菌轉形 (electroporation transformation).....	49
3.7.3.1 白色念珠菌勝任細胞製備(competent cell).....	49
3.7.3.2 以電穿孔方式進行轉形 (electroporation transformation).....	49
3.7.4 確認所得之 <i>CaGPM1</i> 雙套基因破壞株 (knockout).....	50
3.7.4.1 利用 PCR 方式確認雙套基因之破壞.....	50
3.7.4.2 以南方墨點法確認 <i>CaGPM1</i> 雙套基因破壞株.....	50
3.8 建構 <i>CaGPM1</i> 單套基因置入補救株.....	50
3.9 以北方墨點法 (Northern blot) 確認 <i>CaGPM1</i> 突變株.....	51
3.9.1 萃取 RNA (RNA extraction).....	51
3.9.2 轉漬 RNA (transfer).....	52
3.10 突變株之性狀分析 (characterization).....	53
3.10.1 抗真菌類藥物敏感性試驗-Etest.....	53
3.10.2 生長曲線之測定.....	54
3.10.3 菌落生長情形之觀察.....	54
3.10.3.1 不同碳源培養基之生長分析.....	54
3.10.3.2 在 YPGE/uridine 之固態培養基.....	56
3.10.4 誘發菌絲生長環境觀察型態改變.....	56
3.10.4.1 在含山羊血清之 YPGE/uridine 固態培養基.....	56
3.10.4.2 含山羊血清的 YPGE/uridine 培養液之生長.....	57
3.10.4.2.1 芽管試驗(germ tube assay).....	57
3.10.4.2.2 長菌絲實驗分析.....	57
3.10.4.3 在含山羊血清之 Bacto agar 培養基.....	57

3.10.5 侵犯力分析 (invasion assay).....	57
四、結果.....	58
4.1 <i>CaGPM1</i> 蛋白質在不同菌種的序列比對	58
4.2 建構 <i>CaGPM1</i> 雙套基因破壞株之結果	58
4.2.1 以 PCR 確定 <i>CaGPM1</i> 單套基因已被篩選標記 <i>ARG4</i> 或 <i>URA3</i> 破壞.....	59
4.2.2 定序確認篩選標記 <i>ARG4</i> 、 <i>URA3</i> 與欲同源置換區 DNA 之序....	60
4.2.3 <i>CaGPM1</i> 單套基因破壞株的南方墨點法結果.....	61
4.2.4 利用 PCR 與限制酶取得具有同源重組區域的篩選標記 DNA 片段.....	62
4.2.5 以 PCR 確認 <i>CaGPM1</i> 雙套基因之破壞菌株.....	63
4.2.6 <i>CaGPM1</i> 雙套基因破壞株的南方墨點法結果.....	65
4.3 建構 <i>Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1</i> 單套基因置入補救株.....	65
4.3.1 建構帶有 <i>CaGPM1</i> 基因及其啟動子之質體.....	65
4.3.2 以 PCR 確認 <i>Cagpm1::Cagpm1::CaGPM1</i> 單套基因置入補救株.....	66
4.3.3 <i>Cagpm1::Cagpm1::CaGPM1</i> 單套基因置入補救株之南方墨點法分析.....	68
4.4 <i>CaGPM1</i> 突變株基因表現的北方墨點法結果.....	69
4.5 突變株之性狀分析 (characterization).....	70
4.5.1 藥物敏感性試驗 (Etest).....	70
4.5.2 於 YPGE/uridine 培養液中觀測生長曲線 (growth curve) 之結果.....	71
4.5.3 觀察菌落生長情形之結果.....	73
4.5.3.1 菌落在不同碳源培養基之生長.....	73
4.5.3.2 菌落在 YPGE/uridine 培養基之生長.....	74
4.5.4 細胞及菌落型態改變之結果.....	74

4.5.4.1 在含山羊血清的 YPGE/uridine 培養基之生長.....	75
4.5.4.2 在含山羊血清的 YPGE/uridine 培養液之生長.....	76
4.5.4.2.1 芽管試驗 (germ tube assay).....	76
4.5.4.2.2 觀察增長型菌絲實驗.....	76
4.5.4.3 在含山羊血清的 Bacto agar 培養液之生長.....	77
4.5.5 侵犯力分析 (invasion assay) 之結果.....	77
五、討論.....	79
5.1 目標基因 <i>CaGPM1</i> 之探討.....	79
5.2 建構 <i>CaGPM1</i> 單套基因破壞、雙套基因破壞、單套基因置入補救突 變菌株確認之探討.....	81
5.3 性狀分析之探討.....	84
5.3.1 藥物抗藥性之探討.....	84
5.3.2 生長情形之探討.....	86
5.3.3 型態變化之探討.....	87
5.4 未來展望.....	90
六、參考文獻.....	92
圖表.....	112
附圖.....	155
簡歷.....	159



圖表目錄

頁次

表一、phosphoglycerate mutase 在酵母菌亞門的菌種及裂殖酵母菌的胺基酸序列比對	113
表二、白色念珠菌醣解作用基因 <i>CaGPM1</i> 與其下游基因 <i>CaENO1</i> 在藥物感受性與型態的比較	114
圖一、 <i>CaGPM1</i> 蛋白質與不同菌種比對後的親緣樹狀圖	115
圖二、PCR 確認 <i>CaGPM1</i> 單套基因已被篩選標記 <i>ARG4</i> 或 <i>URA3</i> 破壞 (I)	116
圖三、PCR 確認 <i>CaGPM1</i> 單套基因已被篩選標記 <i>ARG4</i> 或 <i>URA3</i> 破壞 (II)	117
圖四、sequence 確認篩選標記 <i>ARG4</i> 、 <i>URA3</i> 與欲同源置換區的 DNA 序列	119
圖五、 <i>CaGPM1</i> 單套基因破壞株的南方墨點法結果	120
圖六、建構 <i>CaGPM1</i> 雙套基因之破壞示意圖	121
圖七、利用 PCR、限制酶製備之具有同源置換區域的篩選標記 <i>ARG4</i> ...	122
圖八、利用 PCR、限制酶製備之具有同源置換區域的篩選標記 <i>URA3</i> ...	123
圖九、PCR 確認 <i>CaGPM1</i> 雙套基因已被篩選標記 <i>ARG4</i> 與 <i>URA3</i> 破壞 (I)	124
圖十、PCR 確認 <i>CaGPM1</i> 雙套基因已被篩選標記 <i>ARG4</i> 與 <i>URA3</i> 破壞 (II)	125
圖十一、南方墨點法確認 <i>CaGPM1</i> 雙套基因已被篩選標記 <i>ARG4</i> 與 <i>URA3</i> 破壞	126
圖十二、Construction of <i>CaGPM1</i> rescue plasmid (pRGO1-5、pRGO1-11)	127
圖十三、以限制酶檢驗質體 <i>CaGPM1</i> rescue plasmid (pRGO1-5、pRGO1-11)	128
圖十四、 <i>CaGPM1</i> rescue plasmid (pRGO1-5、pRGO1-11)與 <i>Candida</i> Genome	

Database (CGD)的 <i>GPM1</i> 核苷酸序列比對	129
圖十五、 <i>CaGPM1</i> rescue plasmid (pRG01-5、pRG01-11) 與 <i>Candida</i> Genome Database (CGD)的 <i>GPM1</i> 胺基酸序列比對.....	130
圖十六、 <i>Cagpm1/Cagpm1::CaGPM1</i> 單套基因置入補救株建構示意圖。	131
圖十七、 PCR 確認 <i>CaGPM1</i> 單套基因是否正確置入 <i>Cagpm1/Cagpm1</i> 雙 套基因破壞突變株內	132
圖十八、南方墨點法確認 <i>CaGPM1</i> 單套基因是否正確置入 <i>Cagpm1::ARG4/ Cagpm1::URA3</i> 雙套基因破壞突變株內	134
圖十九、 <i>CaGPM1</i> 突變株北方墨點法之結果	136
圖二十、 <i>CaGPM1</i> 基因突變株之藥物敏感性試驗 (Etest) 結果	138
圖二十一、 <i>CaGPM1</i> 突變株在 YPGE/uridine 培養液之生長情形。	140
圖二十二、 <i>CaGPM1</i> 突變株對生長的影響分析。	141
圖二十三、觀察 <i>CaGPM1</i> 突變株於 YPGE/uridine 固態培養基上單一菌落型 態變化	144
圖二十四、 在含山羊血清的 YPGE/uridine 培養基之生長.....	146
圖二十五、在含山羊血清之 YPGE/uridine 培養液之生長.....	151
圖二十六、在含山羊血清的 Bacto agar 培養基之菌落形態。	153
圖二十七、在 Solid Spider 培養基上進行侵犯力試驗(invasion assay).....	154

附圖目錄

	頁次
附圖一、白色念珠菌醣解作用.....	155
附圖二、根據北方墨點法分析(Northern blot analysis)，推測醣解酵素基因 <i>GPM1</i> 能調控性狀改變之途徑示意圖.....	156
附圖三、白色念珠菌醣解及醣質新生作用途徑.....	158

