

一、緒論

1.1 前言

近年來，院內真菌感染的比率不斷的提升，在美國的統計中，真菌感染中念珠菌高居院內感染前四名。而在台灣也有相同的趨勢，院內感染真菌培養後分離出之菌種中白色念珠菌（*Candida albicans*）所佔比例至少約一半且可高達 60%（Hsueh, *et al.*, 2002；Wu, *et al.*, 2006）。白色念珠菌為伺機性病原菌（opportunistic pathogen），為多型態真菌，具有酵母菌（Yeast Form）、假菌絲（Pseudohyphae）、菌絲（Hyphae）等型態。從人類小嬰兒期，便可以少量存在於一般人的口腔、喉部、皮膚、指甲溝、大腸、陰道等黏膜組織。正常情況下，為人體內的正常菌叢，但當人體免疫力下降或受藥物副作用影響，導致體內菌落生態環境改變，便會伺機感染而造成臨床症狀，輕微症狀：例如鵝口瘡、陰道炎或是甲溝炎等局部感染，嚴重者可造成全身性的菌血症感染，特別是因疾病造成免疫系統變弱，例如進行器官移植、癌症治療或是患有後天免疫不全症候群（Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS）的病患以及長期服用抗生素之患者身上，白色念珠菌菌血症具有高達 40% 的死亡率（Wenzel and Gennings, 2005），不僅會造成病患住院時日延長還會增加醫療成本的負荷。

雖然白色念珠菌成為近年來院內感染的主要致病菌之一（Chen, *et al.*, 1997），然而，目前可用以治療真菌的藥物不多，而且有些真菌藥物的使用有其毒性、副作用等不良反應與限制，加上已有抗藥性菌株的產生（White, *et al.*, 1998），使得念珠菌感染成為新興的醫學問題。一般而言，早期診斷並立即給予適當治療是對抗高死亡率的重要方式，但是隨著後基因時代的來臨，分子生物學的進步與快速發展，我們可以從白色念珠菌基因中找尋可能造成伺機性感染之致病因子（virulence factor）與研究其調控機制，以

及其造成藥物抗藥性的機制，作為尋找新藥物目標 (drug target) 的契機，進一步發展出有效用、低毒性以及低副作用的新藥物。

1.2 白色念珠菌之致病因子

對於白色念珠菌造成致病的相關因素，目前可略分四類：第一、念珠菌於宿主細胞產生黏附能力 (Adhesin)；第二、產生水解酵素 (hydrolase)；第三、當環境改變時，念珠菌產生菌絲 (hyphal formation) 的細胞型態變化；第四、念珠菌其平滑白色的 white phase (W) 和 opaque phase (O) 之間的表現型的轉變 (phenotypic switching) (Lan, *et al.*, 2002 ; Slutsky, *et al.*, 1987 ; Haynes, 2001 ; Yang, 2003)。

1. 黏附能力 (Adhesin)

附著至宿主組織上，避免被宿主免疫防禦系統消滅，為一般病菌入侵宿主的首要侵略步驟，白色念珠菌也不例外，當其散佈於寄主血液中，會藉由黏附於血管內襯的表皮細胞，進而入侵組織 (Filler, *et al.*, 1996)，白色念珠菌會利用細胞表面的配體 (ligands) 或菌體表面生物分子 (biomolecules) 或接受器 (receptor) 進行黏附，這些由多醣類 (polysaccharides) 或醣蛋白 (glycoprotein) 所組成的生物分子，能與宿主的細胞外基質蛋白 (extracellular matrix protein, ECM protein)，例如：纖維蛋白原 (fibrinogen) (Casanova, *et al.*, 1992)、補體 (complement) (Calderone, *et al.*, 1994)、膠原蛋白 (collagen) (Klotz, *et al.*, 1993)、纖維黏連蛋白 (fibronectin) (Negre, *et al.*, 1994) 等結合，而達到黏附的目的。與黏附作用有關的基因已知的有 *INT1*、*HWPI*、*MMT1*、*PMT1*、*PMT6*、*ALS* 等。其中 *Int1p* 為一種 transmembrane protein，含有 Arginine-glycine-aspartic acid (RGD) 序列供 ligand 辨識，能與補體組成成份 C3 之降解產物 *iC3b* 結合 (Hostetter, 2000)，若將 *INT1* 突變破壞 (*int1/int1*) 之突變

株於小鼠體內進行致病力分析，發現其黏附能力下降，而小鼠的存活率明顯上升 (Gale, 1998)。另外，Hwplp 是存在於菌絲細胞壁的蛋白質，此蛋白之 NH₂ 端可作為哺乳類 transglutaminase 的受質，而該酵素可在人類內皮、上皮細胞中發現，這可能是增加白色念珠菌與宿主間的黏附能力的有關因素 (Staab, *et al.*, 1999)。將 *MNT1* (α -1,2-mannosyltransferase gene) 刪除掉，會影響黏著和致病力 (Buurman, *et al.*, 1998)。*PMT1*、*PMT6* (O-glycosylation mannosyltransferase) 對於黏附上皮細胞株也是必需的 (Timpel, *et al.*, 1998 & 2000)。這三個基因涉及甘露聚糖合成而且甘露聚糖為真菌細胞壁主要的組成要素，因此，Mntlp，Pmtlp，和 Pmt6p 可能涉及宿主辨識 (Calderone, *et al.*, 2001)。在白色念珠菌上有找到類似 *S.cerevisiae* 細胞表面黏附糖蛋白的一段序列 Agglutinin-like sequence (ALS) (Lipke, *et al.*, 1989 ; Hoyer, *et al.*, 1995)，這些蛋白後來被發現會造成黏附作用，而稱為 ALS 蛋白質 (Fu, *et al.*, 1998)。ALS 基因家族編譯 8 個大的細胞表面糖蛋白 (Hoyer, 2001; Zhao, *et al.*, 2004)，Als 蛋白由三個部分組成，N 端區域功能與黏附相關，中間的部分由保守的 36 個胺基酸序列一前一後的重複組成，C 端區域有多樣化的長度和序列 (Hoyer, 2001)，中間和 C 端的區域富有豐富的絲胺酸 (serine) 和蘇胺酸 (threonine) 殘基 (Kapteyn, *et al.*, 2000)。其中 *ALS1*、*ALS5* 分別對於人類口腔上皮細胞 HBEC (human buccal epithelial cells)、纖維黏蛋白有黏附作用 (Hoyer, 2001)，在感染初期，Als1p 對於生命體口腔黏液的附著很重要 (Kamai *et al.*, 2002)；若將 *ALS3* 突變破壞 (*als3/als3*) 會造成對臍帶靜脈內皮細胞 HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) 和口腔上皮細胞 BEC (buccal epithelial cells) 黏著作用減少 (Zhao, *et al.*, 2004)；*ALS4* 進行雙套基因剔除，發現會造成白色念珠菌對於血管內皮細胞 (vascular endothelial cells) 黏著減少 (Zhao, *et al.*, 2005)，雖然知道黏附作用會造成

感染宿主的機會增加，但和致病過程之間的關連性尚未明確知道。

此外白色念珠菌在一般的醫療導管中常被發現，主要原因是念珠菌會黏附在導管的周圍形成生物膜 (biofilm)，造成導管插入處有過多的念珠菌，生物膜的形成也會增加真菌對真菌藥物的抗藥性 (Douglas, 2003)。生物膜形成有幾個不同的階段像是細胞-受質和細胞-細胞的黏著，長菌絲形成和 quorum sensing (Mitchell and Blankenship , 2006)，其中牽涉生物膜形成的基因已知有 *ALS2*、*SUV3*、*NUP85*、*MDS3* 以及 *KEM1*。將 *SUV3*、*NUP85*、*MDS3* 進行雙套基因剔除之後白色念珠菌失去了初期形成物膜的能力，而剔除 *KEM1* 雙套基因則會造成中期形成生物膜能力被阻斷 (Richard, *et al.*, 2005)；降低 *ALS2* 表現，會讓芽管形成緩慢，減少對血管內皮細胞 (ascularendothelial cells) 和 RHE (oral reconstituted human epithelium) 黏著，減少對 RHE 的破壞以及削弱生物膜的形成 (Zhao, *et al.*, 2005)；另外 *Gcn4* 基因為胺基酸生合成基因的轉錄活化子，將其突變，會使很多胺基酸生物合成基因表現減少 (Tripathi, *et al.*, 2002)，也會使生成的生物膜生物量 (biomass) 減少 (Garcia-Sanchez, *et al.*, 2004; Murillo, *et al.*, 2005)。至於白色念珠菌抗藥基因與生物膜的關係，有研究指出，利用北方墨點法分析 (Northern blot) 比較兩種族群的膜轉運蛋白基因之表現情形，顯示在形成生物膜的過程中 *CDR1*、*CDR2* 與 *MDR1* 的 mRNA 皆大量表現，目前已知 ABC transporter (*CDR1*、*CDR2*) 和 major facilitator proteins (*MDR1*) 為控制藥物排出機制的膜蛋白輸出幫浦 (efflux pumps)，當其大量表現時，會促進藥物的排出 (Sanglard, *et al.*, 2003a)。進一步將三個基因作不同組合的剔除 (Deletion mutations)，結果造成 Planktonic cells 對於 Fluconazole 特別敏感，但 Sessile cells 卻仍保持抗藥性，由此推論生物膜的抗藥機制是許多複雜的原因共同造成，且可能和 Planktonic cells 產生抗藥的機制有所不同 (Ramage, *et al.*, 2002)。

2. 蛋白分解酶 (Secreted factors)

當病原菌附著到宿主細胞後，必需入侵宿主組織以進行致病，因此為了對抗宿主的表面障蔽及免疫系統之防禦，病原菌會分泌水解酵素 (hydrolase) 分解破壞宿主之細胞膜及免疫系統所產生的蛋白質，減少阻礙以利病原菌之 colonization。白色念珠菌產生之水解酵素包括 secreted aspartic proteinase (SAP)、磷酸脂解酶 (phospholipases) 及脂解酶 (lipase) 等。SAPs 所扮演的酵素生化活性主要在於入侵寄主細胞及疾病的擴散，因為SAPs 的受質範圍很廣，能分解許多宿主上的蛋白，如：免疫球蛋白、膠原蛋白、白蛋白 (albumin)、血紅素 (hemoglobin)、角質 (keratin) 及其他細胞蛋白等 (Hube, *et al.*, 1997; Sanglard, *et al.*, 1997)。SAP 目前已知有十個成員 (SAP1-SAP10) (Monod, *et al.*, 1998; Felk, *et al.*, 2000)，在體外和體內研究證實 SAP 基因表現會根據不同的感染型態 (口腔、陰道) 和感染過程的時間點而不同 (De Bernardis, *et al.*, 1995; Hube, *et al.*, 1994; Schaller, *et al.*, 2003)。SAP1p, SAP2p 和 SAP3p 會造成組織損傷並且侵入口腔上皮細胞、皮膚上皮細胞 (Naglik, *et al.*, 1999) 其中 SAP2p負責入侵步驟，使菌體得以穿越內皮層的屏障 (Ibrahim, *et al.*, 1998)，同時也是造成念珠菌在小鼠陰道模式中具有致病力的主因 (De Bernardis, *et al.*, 1999)；而 SAP4p-6p扮演逃避巨噬細胞的吞噬作用而使菌體得以生存 (Borg-von Zepelin, *et al.*, 1998) 當 SAP1 (PEP1) 失去表現時，會導致菌體在新生的老鼠皮膚上開始聚集 (colonization)，影響念珠菌入侵寄主能力，導致致病力減低 (Hube, *et al.*, 1997)；SAP9p 和 SAP10p 在黏著、細胞分離和細胞表面的健全 (cell surface integrity) 扮演一個角色。目前對於 SAP7p 和 SAP8p 扮演的角色仍不清楚 (Albrecht, *et al.*, 2006)。

磷酸脂解酶phospholipases(PL)，能水解一個或多個glycerophospholipid之酯鍵 (ester linkages)。根據不同和專一的酯鍵被切除，這些酵素已經被

分類 phospholipases A, B, C, 和 D (Mukherjee, *et al.*, 2002)。白色念珠菌中的磷酸脂解酶 B 是由 *PLB1*、*PLB2* 所調控 (Leidich, *et al.*, 1998; Hoover, *et al.*, 1998)。其中 *PLB1* 在動物實驗上發現是造成致病性所需要的因子：將 *PLB1* 突變破壞 (*plb1/plb1*) 的菌種，不會造成黏附作用改變，但會減低菌體的侵犯能力和會降低 phospholipases 的產生，並且降低對小鼠的毒性，亦較少引發免疫反應，在相較於野生菌種之致死率 100%，此突變菌種的致死率只有 40% (Leidich, *et al.*, 1998; Ghannoum, 2000)，但其對人類感染所扮演的角色和功能並不完全清楚。

脂解酶 lipase，能水解 triacylglycerol 之酯鍵 (ester bond)，在白色念珠菌中 *LIP* 目前有十個成員 (*LIP1-LIP10*)，主要是在 insoluble triacylglycerol 和 soluble aqueous 間的介面作用 (Anthonsen, *et al.*, 1995)。在臨床以及小鼠實驗中可以發現，以定量之白色念珠菌對小鼠進行 intraperitoneal (i.p.) 腹腔感染 24 小時後將肝臟細胞取出可以發現 *LIP5*、*6*、*8*、*9* 之 mRNA 皆有表現 (Hube, *et al.*, 2000)。而將定量白色念珠菌對小鼠進行感染 72 小時之後則可以在肝臟以及腎臟偵測到 *LIP5*、*6*、*8* 之 mRNA 表現；在人工合成的皮膚組織 RHE model 中以定量白色念珠菌感染也可以在 12、36、72 小時偵測到不同的 *LIP* 基因表現，其中 *LIP2*、*4-9* 皆可以被偵測到 mRNA 表現；偵測患有白色念珠菌感染的病患口腔檢體也可以發現 *LIP4*、*5*、*8* 皆有表現 (Stehr, *et al.*, 2004)。最後，在針對白色念珠菌所感染 21-28 天之病患之消化道以及腸胃道檢體進行 *LIP* 基因表現偵測，可以觀察到 *LIP4*、*5*、*6*、*7*、*8* 在每個部位皆有表現，而 *LIP9*、*10* 則是只在腸胃道檢體被偵測到表現 (Schofield, *et al.*, 2005)。雖然在體外和體內的研究都可以發現到 *LIP* 基因可能促成白色念珠菌對人類組織的感染，然後其在白色念珠菌感染時所扮演的角色和功能仍有待被探討。

3. 菌絲生成 (hyphal formation)

白色念珠菌為多型態 (polymorphic) 之菌體，會隨著各種環境因素的改變，可以轉變於出芽酵母菌型 (budding yeast form)、blastospore 與絲狀形式 (filamentous form)。絲狀形式包含了假菌絲型 (pseudohyphae) 與真菌絲型 (true hyphae) (Berman, J. 2006)。其多樣性的生長型態和其致病力的關係是多方面的，不同的環境與情況，所需要的生長形態是不一樣的，或許全身性的感染與散佈是需要靠酵母菌的生長形式，菌絲型則可能有助於逃避巨噬細胞之攻擊、侵犯組織，且菌絲生成 (hyphal formation) 之細胞型態變化與致病能力有關 (Mitchell, 1998)，即使白色念珠菌仍具有真菌絲的形成能力，但如果缺乏了分泌蛋白質水解酶、或是缺乏了固著宿主細胞的能力等等，也都可能使白色念珠菌失去或是降低致病的能力 (Gacser, *et al.*, 2007; Umeyama, *et al.*, 2005)。所以白色念珠菌的每一種生長形態，在不同的環境與功能需求下，都將會是致病力的關鍵。

型態的轉變會受生長環境的不同所影響，例如：溫度、酸鹼值、氮源或碳源是否充足、細胞密度、CO₂ 等。在溫度偏 37°C 時和 pH 大於 6.5 等情況下，會促使白色念珠菌以菌絲型態生長；此外血清亦為誘發菌絲生長之重要因素，在含有血清的培養基中進行培養，很容易誘發菌絲的生長；另外，還有其他的環境因子，例如：Spider medium、巨噬細胞的吞噬作用、老鼠的腎臟器官、生長於瓊脂的基質上、生長於缺乏鐵元素或是缺氧 (anoxia) 的環境中，或是利用 N-acetyl glucosamine 來誘導菌絲 (true hyphae、pseudohyphae) 形成 (Berman and Sudbery, 2002)。

這些生長條件影響型態間的轉變是透過多種不同的訊息傳遞途徑來調控，例如：cAMP-PKA (cyclic AMP-protein kinase A)、MAPK (mitogen-activated protein kinase) 等 (Ernst, 2000)。HSGs (Hyphal-specific genes) 是一群誘導白色念珠菌由酵母菌型轉變成菌絲生長型態 (假性或真菌絲) 的基因 (Berman and Sudbery, 2002)。這些基因包括: secreted

aspartyl proteases (*SAP4,5,6*), cell-wall proteins (*HWPI*), adhesins (*ALS3* 與 *ALS8*) 與侵入生長 (invasive growth) 所需的蛋白 (*RBT1*) 等 (Stoldt, *et al.*, 1997 ; Leng, *et al.*, 2001) 。 HSGs 會藉由不同的訊息傳遞路徑來調控其基因的表現，以進而誘導菌絲形態的生成與否 (Berman and Sudbery, 2002) 。當外在環境營養缺乏 (starvation) 或是有血清 (serum) 的存在時，白色念珠菌會透過 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 和 cAMP-PKA 路徑來活化 HSGs，進而誘導菌絲形態的生成 (Berman and Sudbery, 2002; Tripathi, *et al.*, 2002) 。

cAMP-PKA 途徑中包括了 Tpk2p 及 Efg1p。Tpk2p 為蛋白激酶 (protein kinase A)，在訊息傳遞途徑中位於 Efg1p 上游，透過磷酸化的方式對 Efg1p 進行活化 (Sonnerborn, *et al.*, 2000)，而 Efg1p 為 APSES 家族的 basic helix-loop-helix (bHLH) 之轉錄因子 (transcription factor)，能調控特定菌絲基因 (hyphal-specific gene, HSG) 表現 (Stoldt, *et al.*, 1997 ; Leng, *et al.*, 2001)。MAPK 途徑由 MAPK cascade 及 Cph1p 進行傳遞，MAPK cascade 包括 Cst20p-Hst7p-Cek1p，而 Cph1p 位於 MAPK 下游，和調控 *S. cerevisiae* 假菌絲的訊息傳遞途徑中的轉錄因子 Ste12 功能相似 (Liu, *et al.*, 1994)。若將 cAMP-PKA 途徑中之 *EFG1* 過度表現，會誘導白色念珠菌假菌絲的生長，所以是正向調控型態變化 (Stoldt, *et al.*, 1997)；將 *EFG1* 突變破壞 (*efg1/efg1*)，則會減少菌絲的生長 (Lo, *et al.*, 1997)。若將 MAPK 途徑之 *CPH1* 突變破壞 (*cph1/cph1*)，在 Spider 固態培養基 (spider solid medium) 中會降低菌絲侵犯培養基的能力，但仍可受血清誘發菌絲的生長 (Kohler, *et al.*, 1996)，這表示除 cAMP-PKA 及 MAPK 途徑外，尚有其他與菌絲調控有關的訊息路徑。若同時將 *EFG1* 及 *CPH1* 這兩個轉錄因子突變破壞 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)，則失去受血清誘發形成菌絲之能力，將此雙基因突變株於小鼠體內進行致病力分析，結果顯

示呈酵母菌型之雙基因突變株(*cph1/cph1 efg1/efg1*) 對小鼠是不致病的 (Lo, *et al.*, 1997) 。而 Tup1p、Nrg1p 及 Rfg1p 對白色念珠菌之型態轉變扮演負向調控的角色，將 *TUP1*、*NRG1* 或 *RFG1* 作 homozygous 突變破壞 (*tup1/tup1*、*nrg1/nrg1*、*rfg1/rfg1*)，則呈現菌絲狀生長的情況；若將這些基因之突變株於小鼠體內進行致病力分析，發現小鼠的死亡率並無顯著的差異 (Kadosh and Johnson , 2001 ; Murad, *et al.*, 2001 ; Burkhard, *et al.*, 2000)，表示調控型態轉變的因子並非一定是致病因子，此外，在白色念珠菌對胺基酸飢餓的探討，也發現 Gcn4 在胺基酸缺乏的情形下，不但可以促進胺基酸的合成機制，也可以透過對cAMP-PKA 路徑進行調控，以專一性地誘導假性菌絲的生成(Tripathi, *et al.*, 2002)。

目前是否有其他因子受這些訊息傳遞途徑調控，或是有其他的訊息傳遞機制仍不清楚，雖然調控型態轉變的因子不一定是致病因子，但是這些因子可能會透過對型態的轉變而影響致病力，因此可藉由研究白色念珠菌之相關基因在基因突變後是否對形態有所改變，來作為致病因子之初步鑑定，希望找到抗念珠菌藥物之目標及抗致病力有關的基因。

4. White (W) and Opaque (O) switch phenotypes

白色念珠菌中，在人體最主要的致病機制為可自發、可逆性且高頻率的發生轉換型態，可分為三種主要的轉換系統。第一、白色念珠菌株 3153A 其型態變化的轉換，可分為七種不同型態間的互換，包括原本的平滑形 (original smooth)、星形 (star)、不規則之皺折 (irregular wrinkle)、環狀 (ring)、雜色斑點 (mottled)、絨狀的 (fuzzy) 還有回復平滑形(revertant smooth) (Slutsky, *et al.*, 1985; Ramsey, *et al.*, 1994; Soll, 2002; Soll, *et al.*, 1987)。第二、白色念珠菌會在含有濃密的mycelation 及沒有mycelation 的菌體間轉換 (Soll, *et al.*, 1987)。第三、從病人分離出來的白色念珠菌株 WO-1，可從白色半球型，表面亮滑的菌落型 white (W) 轉換成灰色扁平的

菌落型 opaque (O)，W/O 的 phenotypic switching 影響到細胞的形狀和大小，而影響到菌絲的形成、細胞表面特性（例如：黏附力、滲透力等）、細胞膜的組成、抗藥物敏感性等性狀特徵（Lan, *et al.*, 2002; Slutsky, *et al.*, 1987）。此外，有研究指出此菌株在表現型態之間的轉換是與生物膜形成（Daniels, *et al.*, 2006）以及特殊致病病毒性有相關，而利用晶片偵測到牽涉在表現型態轉變的基因包括了 *CDR3*、*EFG1* 以及 *LIP4* 等基因皆被偵測到表現（Lan, *et al.*, 2002）。

1.3 真菌藥物種類及抗藥機制

現今臨床上用於治療真菌感染的抗真菌藥物，可分為五大類：(1) polyenes (2) azoles (3) 5-flucytosine (4) allylamines (5) echinocandins，其中 azoles 與 allylamines 為 Ergosterol biosynthesis inhibitors 與 Polyenes 主要作用在麥角固醇（Ergosterol）本身或其生合成途徑中所參與的酵素，麥角固醇為真菌細胞膜上的主要固醇類，其成分和哺乳類細胞的膽固醇相似，生理功能除了調節膜的流動性（Fluidity）及完整性（Integrity）之外，也影響位於細胞膜上的蛋白質功能維持，例如：離子幫浦或轉運蛋白（transporters）（Hitchcock, 1993）還有基丁質合成酶（chitin synthetase），其功能為細胞分裂及細胞成長。5-flucytosine 則是阻斷細胞中核酸分子的合成。

1、polyenes：包括有 Amphotericin B 和 Nystatin，此類藥物主要作用於細胞膜上的角固醇，此類藥物為殺菌劑（fungicidals），由於具有細胞毒性之缺點，臨床上使用是以短期治療為主。Amphotericin B 為土壤中的放射菌（*Actinomycetes*），*Streptomyces nodosus* 的醱酵產物，是一種七烯巨環內脂（heptane macrolide），能靠著疏水性區域與細胞膜上的麥角固醇結合，使 Amphotericin B 能鑲在膜上以 8 個分子鍵結形成一離子通道

(channels),造成細胞膜的通透性 (permeability) 改變與細胞質特別是鉀離子的流失，導致細胞死亡，達到藥物治療; Amphotericin B 也可以和哺乳類細胞膜上的膽固醇結合，惟親合力較低，但是仍會造成毒性。它也可抑制膜上的酵素來達到作用，如黴菌的 proton ATPase 及哺乳類的 Na⁺/K⁺-ATPase 等。在體外可在遠低於標準劑量在血或組織中達到的濃度下表現出殺菌性 (fungicidal) 的特性，是一種和濃度有關 concentration-dependent 抗生素 (Vanden Bossche, *et al.*, 1994; 孔祥琪、陳宜君，90年)。Nystatin 被當作抗真菌劑已經50年了，其通透性化和殺死真菌細胞的效果很類似 Amphotericin B，但是因為其本身的毒性和可溶性的問題造成在臨床使用上有阻礙。

2、azoles：產生的細胞毒性副作用較小，為最常使用的抗真菌藥物，但只能抑菌 (Fungistasis) 而不是殺菌 (Fungicide)。包含治療黏膜或皮膚感染局部性使用的 imidazoles (ketoconazole、miconazole) 和以口服或注射方式治療侵入性黏膜感染的 triazoles (fluconazole、itraconazole、voriconazole) (Vermitsky & Edlind, 2004)。作用方式是藉由抑制 cytochrome P450 的 14- α -methylase (*ERG11* 基因產物) 而抑制黴菌細胞膜上的主要成分麥角脂醇 (ergosterol) 的合成，作用過程主要是讓結合酵素輔酶 (heme) 無法活化氧分子而阻斷酵素去甲基化的功能 (White,*et al.*, 1998)，當 Erg11p 功能被抑制時，其受質 lansterol 則會受到 $\Delta^{5,6}$ -desaturase (*ERG3* 基因產物) 催化形成 3,6-diol 衍生物，使該衍生物大量堆積而造成細胞毒性 (Sanglard and Odds, 2002)。

針對 azole 類藥物產生的抗藥機制，分為四點 (a) Ergosterol 生合成途徑中的其他酵素發生突變。(b) Azoles 類藥物目標基因 *ERG11* 突變 (mutation) 或過量表現 (overexpression)。(c) 細胞膜內的固醇類組成改變，降低了細胞膜的通透性 (permeability)。(d) 排藥幫浦，如 ATP-binding

cassette transporter (*CDRs*), 或是 major facilitator families (*MDR1*) 過量表現, 使得 azoles 類藥物大量排出菌體外, 無法累積於菌體內行使藥物功效 (Lamb, *et al.*, 1999 ; Sanglard, *et al.*, 1998)。已有實驗指出, 在 azoles-resistant 的白色念珠菌中, *ERG11*、*MDR1*、*CDR1* 和 *CDR2* 的 mRNA 表現量有上升趨勢 (White, 1997 ; White, *et al.*, 2002 ; Sanglard, *et al.*, 1997 & 1995 ; Albertson, *et al.*, 1996 ; Lyons & White, 2000 ; Perea, *et al.*, 2001)。因此這些基因在抗藥機制的角色就成了焦點 (St Georgiev, 2000; Yang & Lo, 2001; Lupetti, *et al.*, 2002; Lamping, *et al.*, 2007)。到目前為止, 大部分的研究指出排藥幫浦大量表現是造成抗藥性產生的主要機制之一 (Lupetti, *et al.*, 2002)。

3、5-flucytosine (5-FC)：為嘧啶類似物, 其作用機轉完全不同於azole 類藥物。透過 Cytosine permease 運送進入到細胞內, 然後被細胞內的 Cytosine deaminase 作用將其轉變為 5-fluorouracil, 接著 5-fluorouracil 再經由細胞內的代謝嘧啶相關酵素作用後形成 5-fluoro-dUMP 和 5-fluoro-dUTP, 然而 5-fluoro-dUMP 可專一性抑制核酸代謝過程中的重要酵素 Thymidylate synthetase, 進而阻斷 DNA 合成; 5-fluoro-dUTP 可嵌入 RNA 分子, 干擾 RNA 的轉譯, 透由以上兩步驟達到干擾蛋白質生成。 (Ghannoum and Rice, 1999 ; Sanglard and Bille, 2002 ; Alins, 2005)。5-FC 可專一性作用於真菌, 因為哺乳類細胞中只含微量的 Cytosine permease, 甚至是沒有此類滲透酶, 但是因為抗藥性問題普遍, 在臨床上治療的角色已示微。於研究中的 flucytosine-resistant 白色念珠菌發現, 這些菌株內和 5-FC 相關的酵素, 包括 cytosine deaminase, uracil phosphoribosyltransferase, 或 uridine monophosphate pyrophosphorylase 都具有相當程度的突變現象產生 (Fasoli, *et al.*, 1990)。

4、allylamines：主要作用為抑制 ergosterol 合成途徑酵素 squalene

epoxidase (*ERG1* 基因產物) 的作用。此類藥物為殺菌劑且其活體外作用 (in vitro) 範圍廣，但由於藥物動力學 (pharmacokinetics) 不佳，使得其臨床效用受到侷限。Terbinafine 為此類藥物唯一用於臨床上的治療 (Georgopapadakou, 1998)，以非競爭型抑制劑方式結合到 squalene epoxidase，造成 lanosterol 無法合成，進而造成麥角固醇減少或 squalene 累積，造成細胞膜及結構上的破壞，因此影響菌株生長。在一些 azole-resistant 菌株，大量表現 *CDR1* 或是 *MDR1* 被發現對於 Terbinafine 具有 cross-resistant 特徵 (Vanden-Bossche, *et al.*,1998)。

5、echinocandins：為抗真菌藥物中最新的一類，包括 micafungin、anidulafungin、Caspofungin，此類藥物中 Caspofungin 是唯一允許用於臨床治療，其為殺菌劑且對於宿主所產生的細胞毒性極小 (Georgopapadakou, 2001; Tkacz & DiDomenico, 2001)。Caspofungin 主要和 1,3- β -D-glucan synthase (由可溶性的 GTP-binding 和與細胞膜結合的成分所構成的 GTP-dependent 酵素) 結合 (Mazur & Baginsky, 1996)，抑制 β -(1,3)-D-glucan 合成，致使真菌細胞壁遭到破壞，使細胞死亡。利用 caspofungin 治療真菌感染已有逐漸提高的趨勢。至目前為止，對於 caspofungin 藥物產生完全抗藥性或敏感性降低的例子非常少 (Denning, 2003)。

1.4 簡述 *CDR1* 基因 (*Candida* Drug Resistance 1)

CDR1 為多重藥物抗藥性 (multi-drug resistance) 有關的基因，屬於 ABC (ATP-binding cassette) 家族，ABC 蛋白負責調節膜內外物質的運輸，利用分解 ATP 獲得能量將物質送進或排出。已知將 *CDR1* 轉形至啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) *PDR5* 雙套基因破壞突變株內，對於 cycloheximide、chloramphenicol、miconazole、oligomycin、nystatin 和

2,4-dinitrophenol 會產生抗藥性現象 (Prasad, *et al.*, 1995)。此外，臨床上對 azole 藥物有抗藥性的菌株其 *CDR1* 的 mRNA 表現量比藥物敏感性菌株來得高 (White, *et al.*, 1997)，同時 *CDR1* 基因缺失會造成對 azole 藥物的高敏感性，且對 terbinafine、amorolfine、一些代謝抑制劑也有相同現象 (Sanglard, *et al.*, 1996)。但是突變 *CDR1* 基因並不影響菌株對 amphotericin B 或 5-flucytosine 的敏感性。*CDR1* 如同 ABC 家族蛋白質的典型結構，具有兩個高度疏水性的跨膜區域(transmembrane domains, TMDs) 和兩個位於細胞質內的核苷酸結合區域(nucleotide-binding domains, NBD) 曝露在細胞質表面。每一個 TMD 主要由六個跨膜區段 (transmembrane segments) 構成，而此跨膜區段內陷於TMD 中提供了 Cdr1p 的受質特異性 (substrate specificity)。Cdr1p 受質範圍極廣，包括了 azoles類藥物、脂質與類固醇 (Prasad, *et al.*, 2002 & 2004 ; Prasad and Kapoor, 2005)。事實上，*CDR1*具有很多功能，像輸出幫浦 (efflux pump)、磷脂質轉位 (phospholipids translocation)。

經由連續的 *CDR1* 啟動子刪除實驗 (deletion analyses)，發現四個上游活化和四個下游抑制序列 (Puri, *et al.*, 1999)。啟動子近端區域 (-345/+1) 包含了多種藥物誘導的調控區 (regulatory domains)，而 miconazole 主要和遠端啟動子區域內 (-857/-1147) 的AP-1 (TGACCCA) 序列作用 (Puri, *et al.*, 1999)。Micheli 等人利用 oestradiol 誘導發現了一個基本表現區 BEE (basal expression element) 和一個 DRE (drug-responsive element) 序列 (de Micheli, *et al.*, 2002)。Karnani 等人於 *CDR1* 啟動子中發現了可被類固醇 β -oestradiol 和 progesterone 誘導的二個新的 cis-acting elements: SRE1 (-677 ~ -648)、SRE2 (-628 ~ -598)，其中 SRE1 可和 progesterone 反應而 SRE2 序列對兩者皆有反應的。SRE1 和 SRE2 專一性的與類固醇作用而不受其他藥物 (如 cycloheximide、miconazole 和 terbinafine) 影

響 (Karnani, *et al.*, 2004)。Gaur 等人發現涉及控制 *CDR1* 基本的表現的負向調控因子 NRE (negative regulatory element) (Gaur, *et al.*, 2004)。

TAC1，*CaNDT80* 和 *CKA2* 為排藥幫浦的異位調控子 (trans-regulatory) 涉及 azole 類藥物抗藥性。

(1) *TAC1* (transcriptional activator of *CDR*)：內含 Zn(2)-Cys(6)motif 的鋅指狀蛋白 (Zinc finger protein)，在有誘導者出現時，azole 敏感菌株的 *TAC1* 負責瞬間向上調節 *CDR1* 和 *CDR2*。於實驗中發現，在藥物 (fluphenazine) 誘導下，*TAC1* 雙套基因破壞突變株無法正向調控 *CDR1* 表現，且 *TAC1* 雙套基因破壞突變株對於 fluphenazine、fluconazole 和 terbinafine 之藥物敏感性提高，此現象可於 *tac1/tac1::TAC1* 單套基因置入補救株中彌補回來，可知 Tac1p 為 *CDR1* 的正向活化子 (positive activator) (Coste, *et al.*, 2004 and 2006)。

(2) Candt80p：*CaNDT80* 其序列會譯解 (encodes) 含有 DNA-binding domain 的蛋白，為一假定的轉錄因子。實驗發現於啤酒酵母內過量表現 *CaNDT80* 基因時，能夠增加 *CDR1p-lacZ* 的表現，且對於 fluconazole 和 itaconazole 的藥物敏感性降低。於白色念珠菌內破壞此基因時 (*Candt80/Candt80*)，會提高對 azoles 類藥物 fluconazole、voriconazole 以及 miconazole 的藥物敏感性。之後於 real-time PCR 實驗發現，在 miconazole 誘導下，*Candt80/Candt80* 雙套基因突變株內的 *CDR1* 表現量有下降趨勢 (約剩 15%)。綜合以上結果得知，Candt80p 為 *CDR1* 的正向調控子，且和白色念珠菌的抗藥性有關 (Chen, *et al.*, 2004)。

(3) Cka2p：和真核動物 serine/threonine 蛋白質激酶 (protein kinase) CK2 具催化功能的 α -subunit 具有相當程度之相似性。啤酒酵母的 Cka2p 為其最接近的相似者，他們之間的相似性高達 65%。實驗指出 *cka2/cka2* 雙套基因破壞突變株對於 azoles 類抗真菌藥物中的 fluconazole 敏感性降

低。其後之北方墨點法 (Northern blotting) 研究發現,和野生菌株 DAY185 (*CKA2/CKA2*) 相比,*cka2/cka2* 雙套基因破壞突變株內的 *CDR1/CDR2* 的 mRNA 表現量提高3至5倍。由於在缺少 Cka2p 的形況下會提高 *CDR1* 和 *CDR2* 的表現量,故作者推論 Cka2p 可能為 *CDR1* 和 *CDR2* 表現時的負向調控因子(negative regulator) (Bruno & Mitchell, 2005)。

1.5 醣解作用概述 (Glycolysis)

葡萄糖 (Glucose) 為醣類中最重要的單醣,並且為許多組織之主要燃料。一分子葡萄糖可以經由醣解作用 (Glycolysis) 被代謝形成二分子丙酮酸 (pyruvate) 及高能物質 ATP,此過程是在細胞液 (cytosol) 中進行。在絕大部分的生物體內,醣解作用是一個非常重要的代謝途徑,除了製造 ATP 外,還能產生許多中間代謝產物供生物合成利用。醣解作用在有氧或無氧狀況下均可進行,在有氧狀況下,丙酮酸會進入粒線體繼續代謝成 acetyl- CoA 而進入 citric acid cycle 完全分解成 CO₂ 和水;若在無氧狀況下,丙酮酸會被代謝成乳酸 (lactate);但是在酵母菌中,丙酮酸會經由發酵作用 (fermentation) 得到之產物為酒精及 CO₂ (Garrett and Grisham, 2002)。

葡萄糖需先被磷酸化 (phosphorylation) 才能進入醣解作用,經過一連串的反應才能產生丙酮酸及 ATP,參與其中催化反應的酶稱之為醣解酵素,在白色念珠菌的醣解作用路徑中,這些醣解酵素為 *PGI1*、*PFK1*、*PFK2*、*FBA1*、*TPI1*、*TDH3*、*PGK1*、*GPM1*、*ENO1* 與 *PYK1* 之基因產物 (附圖一)。首先被磷酸化的葡萄糖 (glucose-6-phosphate) 經由 phosphoglucose isomerase (Pgi1p)轉化成 6-磷酸果糖 (fructose-6-phosphate);接著由 phosphofructokinase (Pfk1p 及 Pfk2p 分別為其組成之 α 和 β subunit) 催化 fructose-6-phosphate 而生成 1,6-雙磷酸果糖 (fructose-1,6-biphosphate

)，此過程需要 ATP 的參與；fructose-1,6-biphosphate 受到 fructose biphosphate aldolase (Fba1p) 催化，產生兩個磷酸三碳糖為 dihydroxyacetone-phosphate 與 glyceraldehydes-3-phosphate，這兩個磷酸三碳糖可由 triose phosphate isomerase (Tpi1p) 互相轉化；接續 glyceraldehydes-3-phosphate 被 triose dehydrogenase (Tdh3p) 脫氫氧化再磷酸化而成 1, 3- diphosphoglycerate，此步驟需 NAD^+ 參與並產生 NADH；含高能磷脂鍵的 1, 3-diphosphoglycerate 由 phosphoglycerate kinase (Pck1p) 的催化下，將能量轉移到 ADP 分子上形成 ATP，反應之產物為 3-phosphoglycerate；之後 3-phosphoglycerate 中的磷酸根經由 phosphoglycerate mutase (Gpm1p) 轉位成 2-phosphoglycerate；而 2-phosphoglycerate 經由 enolase (Eno1p) 催化脫去一分子水並產生 phosphoenolpyruvate；最後 pyruvate kinase (Pck1p) 催化 phosphoenolpyruvate 形成最終產物丙酮酸(pyruvate) 及另一個 ATP。一分子葡萄糖經糖解作用代謝形成二分子丙酮酸，並產生 2ATP 及 2NADH (李建雄等, 1998)。

目前已知原本在細胞液中參與反應的白色念珠菌糖解酵素除了催化糖解作用外，也許還有著其他功能，研究指出在小鼠全身感染系統中，phosphoglycerate mutase (Gpm1p) 會展現其抗原性 (Fernandez-Arenas, et al.,2004)，而且被發現存在於細胞壁中(Poltermann, S , et al.,2007)，因此推測有可能與型態轉變或致病能力有關。

1.6 GPM1 之相關研究

1.6.1 啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中 GPM1 之研究

GPM1/YKL152C 基因產物為 phosphoglycerate mutase (Rodicio R and Heinisch J, 1987)，為四聚體酵素，在啤酒酵母糖解 (glycolysis) 反應中，可將 3-phosphoglycerate 轉位 2-phosphoglycerate (Peter, et al. 2000 ; Price

NC and Jaenicke R 1982)，同時在醣質新生作用 (gluconeogenesis) 可以逆轉反應(Lam KB and Marmur J, 1977 ; Sasaki R, *et al.* 1976)。在以 glucose , glycerol 或是酒精單作唯一碳源生長時，需要 Gpm1p 存在 (Rodicio R and Heinisch J, 1987)。將 *GPM1* 雙套基因突變，細胞無法形成孢子 (sporulate)，有一個觀察指出形成孢子需要醣質新生作用 (gluconeogenesis) (Dickinson JR and Williams AS, 1986)。醣質新生是指從非碳水化合物先驅物，藉以合成葡萄糖的過程，此過程使酵母細胞能生長在不是以糖為碳源，的情況下像酒精，甘油或是 peptone。醣質新生這個反應在這裡調解 pyruvate 變成葡萄糖，相對的醣解作用是從葡萄糖轉變形成 pyruvate。在這二個代謝途徑有幾個共有的反應，而且也不是完全可逆的。例如：在醣解作用中 phosphofructokinase (pfk1p , pfk2p) 酵素和 pyruvate kinase (Cdc19p) 都催化不可逆的反應。而在糖質新生途徑中，則用 pyruvate carboxylase (Pyc1p, Pyc2p)-和 phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1p)-產生 oxaloacetate，作為從 pyruvate 到 phosphoenolpyruvate 的中間物，取代了 pyruvate kinase 的功能。同樣的，fructose-1,6-bisphosphatase (Fbp1p) 酵素則取代 phosphofructokinase (Klein CJ, *et al.*, 1998)。整個糖質新生反應轉換二個 pyruvate 分子到一個 glucose 分子，從四個 ATP 和從二個 GTP，用掉六個高能磷酸鍵。

GPM1 啟動子的特性已經被廣泛的描繪(Rodicio R, *et al.*, 1993)。其轉錄活化 (transcriptional activation) 和抑制包含二個分散的調控元件 (separate regulatory elements)：二個上游抑制 (upstream repressing , URS) 位置 and 一個 UAS (upstream activating) 位置被發現在轉譯啟始碼的上游。這些區域同樣包含對醣解的轉錄活化子 (ranscriptional activator) Gcr1p 和 Rap1p 的結合位置。Gpm1p 的活化位殘基， His8， Arg59，及 His181 已經被確認 (White MF and Fothergill-Gilmore LA , 1992 ; White MF and

Fothergill-Gilmore LA, 1990)。二個啤酒酵母序列 *GPM2*、*GPM3* 與 *ScGPM1* 同源，*GPM2* 與 *GPM1* 胺基酸 identity 為 65%；*GPM3* 與 *GPM1* 胺基酸 identity 為 43%，*GPM1*、*GPM2* 與 *GPM3* 都包含一個保守區 LLRHGQSELN motif，為 phosphoglycerate mutase family 家族序列。而且 *GPM1*、*GPM2* 其活化殘基與 *GPM1* 也同源，然而這二個基因對於 *gpm1* 刪除突變沒有補救功能而且已經證實刪除突變一個或是二個 *gpm2* 或 *gpm3* 醣解作用皆不受影響。事實上，*GPM2* 和 *GPM3* 二個可能涉及複製事件和在酵母菌中為構成非功能的 *GPM1* 同源蛋白 (Heinisch JJ, *et al.*, 1998)。此外，最近文獻指出，利用 immunocytochemical 分析得到 *ScGPM1* 不僅在細胞質會出現，同樣在細胞壁也可以發現到。(Motshwene P, *et al.*, 2003)。

1.6.2 白色念珠菌中 (*Candida albicans*) 同源蛋白之探討

GPM2 分別位於 Contig 19-10087 中的 Orf 19.1067 (786 bp, 261 a.a) 和 Contig 19-20087 中的 Orf 19.8669 (786 bp, 261 a.a)，其基因產物為 phosphoglycerate mutase，同樣為醣解 (glycolysis) 作用中酵素，可將 3-phosphoglycerate 轉位 2-phosphoglycerate，與 *CaGPM1* 蛋白比對其 identity 為 44%。目前研究，利用 DNA Microarrays 分析，發現 *GPM2* 在 hyphae 型態會減少表現 (Nantel A, *et al.*, 2002)。在 DNA Microarrays 分析得到，高程度的 peroxide stress 情況下，會誘導 *GPM2* 的表現 (Enjalbert B, *et al.*, 2006)；從 *Candida albicans* CO23 菌株用 Two-dimensional electrophoresis 分析細胞壁裡 glucan-associated proteins (GAPs) 的成分，可以得到 *GPM1*，phosphoglycerate mutase isoforms (Angiolella, L, *et al.*, 2009)。

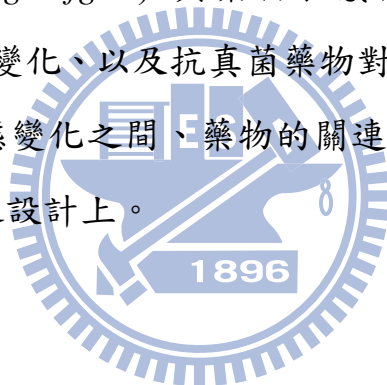
1.7 本論文研究源起及目的

先前本實驗室利用抑制刪除雜交法 (Suppression Subtractive

Hybridization, SSH) 比較不同白色念珠菌在 37°C, pH 6.5 並含血清之狀況下基因表現量的不同, 找出白色念珠菌長菌絲型且有致病力的野生種菌株 (SC5314) 與酵母菌型無致病力之 *efg1* 及 *cph1* 雙基因突變菌株 (HLC54) 兩者之間表現量不同的基因。若在長菌絲型 (SC5314) 某基因的表現量與酵母菌型 (HLC54) 不同, 表示此基因可能與致病力或菌絲生長的調控有關。所得到可能與致病能力或菌絲生長有關的 cDNA 選殖株 (徐貝帆, 2004 交大生科所), 經定序後與 Stanford 白色念珠菌基因資料庫 (<http://www-sequence.stanford.edu:8080/bncontigs19super.html>) 及 NCBI 資料庫中進行比對, 所得到的基因依照功能分類 (郭大榮, 2001; 林啟陽, 2001)。

其中參與代謝作用的基因有一些是屬於醣解作用的醣解酵素基因 (郭大榮, 2001; 林啟陽, 2001), 曾針對醣解酵素所有生合成途徑進行研究 (陳杏芳, 2004) (附圖一), 以北方墨點法作為第一步的實驗方法, 發現在 37°C, pH6.5 及加 10% 血清的 YPD 培養液下培養, 其中五個基因 *ENO1*、*TPI1*、*GPM1*、*PYK1*、*PGK1* (附圖一) 於酵母菌型菌體 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中之 mRNA 表現量是大於長菌絲型菌體 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*), 另外實驗室歐陽政中發現 *CaGPM1* 的表現可能受藥物的影響, 此外, 蕭婷尹, (2006) 以北方墨點法分析, 發現在 37°C, 加血清的 YPD 培養液下培養, *CaGPM1* 於 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、*CaNDT80* 突變株 YLO133、YLO136 其 mRNA 表現量皆明顯大於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*), 因此 *CaGPM1* 可能受 *EFG1*、*CPH1* 之各別負向調控而影響致病性, 同時 *CaGPM1* 也可能受 *CaNDT80* 基因的調控下影響其他未知性狀或白色念珠菌球菌對藥物的敏感性, 或者是 *CaNDT80* 基因其未知功能中, 可能包含了對型態變化的影響 (附圖二)。同樣發現於 37°C, 添加 miconazole/DMSO (10 µg/ml) 的 YPD 培養液下培養, 其 mRNA 在 JKC19

(*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、*Candt80/ Candt80* 突變株表現量皆大於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)，推測 *CaGPM1* 於 miconazole 誘導下，也同時受 *CPH1*、*EFG1* 及 *CaNDT80* 之各別調控 (附圖二)，因此可知 *CaGPM1* 之表現可同時受血清及藥物之調控。因此，本篇論文之研究目的，是想探究醣解酵素 *CaGPM1* 基因是否和致病力、型態或是與藥物抗藥性有相關性，實驗策略是利用同源重組的方式建構出 *CaGPM1* 突變株 (單套基因破壞株、雙套基因破壞株、單套基因置入補救株)，觀察基因破壞前後之性狀差異以及與野生株 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、非致病菌株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 與藥物敏感性菌株 YLO133 (*Candt80/ Candt80*) 之間的型態變化、以及抗真菌藥物對突變株的影響以作基因功能之研究，了解其與形態變化之間、藥物的關連性，以供將來之致病力研究及應用於抗真菌藥物之設計上。



二、材料

2.1 菌株

1. *Escherichia coli* : DH5 α

2. *Candida albicans* :

菌株 (Strain)	基因型 (Genotype)	Reference
SC5314	<i>CPH1/CPH1 EFG1/EFG1</i>	Gillum et al, 1984
HLC54	<i>cph1/cph1 efg1/efg1</i>	Lo et al, 1997
BWP17	<i>Arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3</i>	Wilson et al. , 1999
YLO133	<i>Candt80::GFP-Arg/ Candt80:: URA3-dp 1200</i>	(Chen, et al., 2004)
MAG01	<i>Cagpm1::ARG4/CaGPM1</i> [parental strain: BWP17]	歐陽政中， 楊昀良實驗室
MUG33	<i>Cagpm1::URA3/CaGPM1</i> [parental strain: BWP17]	歐陽政中， 楊昀良實驗室
MAU23	<i>Cagpm1::ARG4/ Cagpm1::URA3</i> [parental strain: MAG01]	本實驗
MAU214	<i>Cagpm1::ARG4/ Cagpm1::URA3</i>	本實驗

	[parental strain: MAG01]	
MUA55	<i>Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3</i> [parental strain: MUG33]	本實驗
MUA67	<i>Cagpm1::ARG4/ Cagpm1::URA3</i> [parental strain: MAG01]	本實驗
RGP212	<i>Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1</i> [parental strain: MAU214]	本實驗
RGP215	<i>Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1</i> [parental strain: MAU214]	本實驗
RGP673	<i>Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1</i> [parental strain: MUA67]	本實驗
RGP674	<i>Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1</i> [parental strain: MUA67]	本實驗

2.2 質體 (plasmid)

質體	特性	Reference
pGEM-HIS1	篩選標記為抗 Ampicillin ，並含 <i>HIS1</i> 基因。	Wilson et al. , 1999
pRGO1-5	將 <i>CaGPM1</i> 啟動子和 <i>CaGPM1</i> 基因置入質體 pGEM-HIS1 中，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pRGO1-11	將 <i>CaGPM1</i> 啟動子和 <i>CaGPM1</i> 基因置入質體 pGEM-HIS1 中，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗

2.3 引子 (primer)

2.3.1 建構突變株設計的引子

註：底線為外加之核苷酸，非「位置」欄所標記；紅色字體為限制酶切位

引子	序列 5'~3'	位置
SPL01	GGTGCCACTATTATTCTGT	orf19.900 gene: +33~+15
SPL02	ATTGAGAGGGGAATTCACTG	orf19.904 gene: +585~+604
SPL03	AAGGTATCAGATAAGCTGG	<i>CaGPM1</i> gene: -813~-831
RGPM1a	<u>ATTCCATATG</u> GGTGCCACTATTATTCTGT <i>NdeI</i>	orf19.900 gene: +33~+15
RGPM1b	<u>AACGAGCTCAA</u> AGATTTCGACTAAAAAATA <i>SacI</i>	orf19.904 gene: +172~+191

2.3.2 針對 *CaGPM1* 突變株確認設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
SPL04	TAGAAGCTCCAAACGCATTG	orf19.900 gene: +166~+147
SPL05	AAATGCTGGAGTTGACGATGATTGC	orf19.900 gene: +231~+207
SPL06	CATTATGTGTCTCGACATAAATTCAC TGG	orf19.904 gene: +481~++509
YLO001	GTGCCACTGATCCATTGA	pRS-ARG4△sp

		eI : 3356~3339
YLO002	TGTTGTCCTAATCCATCACC	pGEM-URA3: +4048~+4067 of ACCESSION No.AF173954
HJL241	TCAATGGATCAGTGGCAC	pRS-ARG4△sp eI:+3339~+3357 of NCBI ACCESSION No.AF173956
HJL133	ACCAGTAGCACAGCGATT	pGEM-URA3: 3459~3476
CGHAU-1	TTTCTTAATGGTAGTGTCAAATTGTAT TC	orf19.904 gene: +250~+278
GPM1-NF	TGAACTGAGGTAGGCAAGGAAGA	<i>CaGPM1</i> gene: +1018~+996

2.3.3 製備南方墨點法探針 (DNA probe) 之引子

引子	序列 5'~3'	位置
SGPM1-F	AGGCATTGGTGCCACTAT	<i>CaGPM1</i> gene: +40~+23
SGPM1-R	CTAGATGTGTGGTTTGATTTGT	<i>CaGPM1</i> gene: +814~+835

2.3.4 製備北方墨點法探針 (DNA probe) 之引子

引子	序列 5'~3'	位置
GPM1-F	CACGGTCAATCCGAATGG	<i>CaGPM1</i> gene: +25~+42
GPM1-R	TTGAGCAGCAACAGCAGC	<i>CaGPM1</i> gene: +732~+715
LPCpro-6F(ACT1)	GGATTCTGGTGATGGTGTTACTC	<i>ACT1</i> gene: +1120~1142
LPCpro-6R(ACT1)	GCAATACCTGGGAACATGGT	<i>ACT1</i> gene: +1590~+1571

2.4 藥品試劑

- AB BIODISK : Etest drug strips, amphotericin B (Cat.No.51002683), fluconazole (Cat.No.51001088), voriconazole (Cat.No.51003288), flucytosine (Cat.No.51001098)、Caspofungin (Cat.No.51003248)
- Alpha Biosciences : LB agar (Cat.No.L12-111)
- Amresco : Glycerol (Cat.No.0854-1L-PTM)、Phenol saturated solution (Cat.No.0945)、Agarose (Cat.No.0710-500G)、Tris (Cat.No.0826-1KG) 、Tris Hydrochloride(Cat.No.0234)
- AppliChem : Ampicillin (Cat.No.A2839)
- Bio-Rad : Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Cat.No.161-0729)
- BD Difco : Bacto agar (Cat.No.214010)、Yeast nitrogen base w/o amino acid (Cat.No.145368)、Difco YPD broth (Cat.No.242820)、Nutrient Broth (Cat.No.149018)、D-Mannitol、Bacto Peptone(Cat.No.211677)、Bacto Yeast

Extract(Cat.No.212750)

- Fermentas: T4 DNA ligase (Cat.No.1812)
- Fluka RDH: D-2-Phosphoglyceric acid sodium salt hydrate *(2-PGA) (Cat.No. 79470)
- GiBco BRL: Goat serum (Cat.No.16210-072)
- J.T.Baker : Dextrose (Cat.No.1916-01) 、 Formamide (Cat.No.33272) 、 Formaldehyde (Cat.No.15512) 、 3-(N-Morpholino propanesulfonic acid) (MOPS) (Cat.No.1132612) 、 Triton® X-100 (Cat.No.X198-07)
- Kodak : X-film (Cat.No.1651454)
- Merck : Dodecyl Sulfate Sodium Sat (SDS) (Cat.No.1.12012.0500) 、 Ethanol (Cat.No.1.00983.2500) 、 Sodium Acetate (Cat.No.1.06267.0500) 、 Sodium Citrate (Cat.No.1.11037.1000) 、 Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Cat.No.1.06346.0500) 、 Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (Cat.No.1.06580.0500) 、 Maleic acid (Cat.No.8.17058.1000) 、 Isoamyl alcohol (Cat.No.1.00979.1000)
- NEB : Phusion™ High-Fidelity PCR Kit (Cat.No.F-553S) 、 Taq DNA polymerase (Cat.No.M0261S) 、 Restriction Enzyme , *Aat* II 、 *Age* I 、 *Ban* I 、 *Bst*X I 、 *Bst*B I 、 *Spe* I 、 *Sac* I 、 *Nde* I 、 *Tth*111 I
- Premier : PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (Cat.No.N-DCE050)
- Promega : pGEM®-T vector System (Cat.No.8.A3600) 、 RNaseA (Cat.No.A7973)
- Protech: TAQ DNA Pol XL (Cat.No.P6a) 、 Pro-Taq plus (Cat.No.PT-526) 、 Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit (Cat.No.MP530XL)
- Riedel-deHaën : Sodium hydroxide (Cat.No.30620) 、 Sodium chloride (Cat.No.31434) 、 Chloroform (Cat.No.32211)

- Roche : DIG DNA Labeling mix (Cat.No.11277065910) 、 Anti-DIG-AP (Cat.No.11093274910) 、 CSPD(Cat.No.11655884001) 、 Blocking reagent (Cat.No.11096176001) 、 DIG Easy Hyb(Cat.No.11603558001)
- Scharlau : LB broth (Cat.No.02-385)
- SibEnzyme : 1 kb DNA ladder (Cat.No.SEM11C001)
- Sigma : Glass Beads acid-washed (Cat.No.G8772-500G) 、 Lithium Acetate (Cat.No.L-6883) 、 L-Arginine (Cat.No.A-5131) 、 Uridine (Cat.No.U-0750) 、 L-Histidine (Cat.No.H-8125) 、 Polyethylene Glycol₃₃₅₀ (Cat.No.P-4338) 、 Potassium phosphate (Cat.No.P-9666) 、 polyoxyethene-sorbitan monolaurate (Tween20) (Cat.No.P-1379) 、 Phenol (Cat.No.P-4682) 、 EtBr(Cat.No.E-7637) 、 DEPC(Cat.No.D-5758) 、 Phospho(enol) pyruvate*tri (cyclohexylammonium)(PEP) (CAS.No. P-7252-1G) 、 Sodium pyruvate (Cat.No. P-2256) 、 sorbitol (Cat.No. S-0900)

2.5 緩衝溶液及溶劑

- 50X TAE buffer
48.4 g Tris base , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml , 11.42 ml acetic acid added dd H₂O to 200 ml
- 5 M EDTA stock solution
186.1 g EDTA added dd H₂O to 800 ml (pH 8.0)
- RNA isolation buffer
2.5 M NaCl , 0.5 M Tris-Cl , 0.25 M EDTA , 1 % (w/v) SDS
- 10 X MOPS Electrophoresis buffer
0.22 M MOPS (pH 7.0) , 20 mM sodium acetate , 10 mM EDTA (pH 7.0)
- 20X SSC buffer

3 M NaCl , 300 mM sodium citrate (pH 7.0)

- Maleic acid buffer

0.1 M maleic acid , 0.15 M NaCl (pH 7.5)

- Washing buffer

0.1 M maleic acid , 0.15 M NaCl , 0.3% (v/v) Tween 20 (pH 7.5)

- Blocking solution

1% (w/v) blocking reagent dissolved in maleic acid buffer

- Detection buffer

0.1 M Tris-Cl , 0.1 M NaCl (pH 9.5)

- 1 M Lithium Acetate

40.8 g Lithium Acetate added dd H₂O to 400 ml (pH 7.5)

- 10X TE buffer

100 mM Tris-Cl (pH 8.0) , 10 mM EDTA

- 50% PEG₃₃₅₀

75 g polyethylene glycol₃₃₅₀ added dd H₂O to 150 ml

- 40% Dextrose

40 g Dextrose added dd H₂O to 100 ml

- LATE buffer

0.1 M Lithium acetate, 10 mM Tris HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA

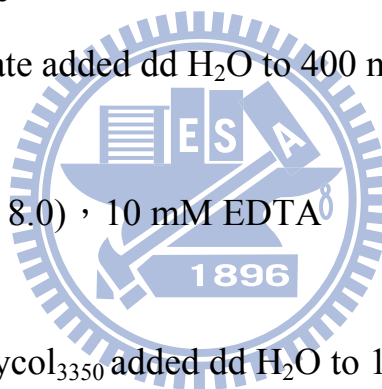
- PLATE buffer

40% polyethylene glycol₃₃₅₀ in LATE buffer

- Breaking buffer

10 mM Tris-Cl (pH 8.0) , 1% (w/v) SDS , 2% (v/v) Triton X-100 , 100 mM NaCl , 1 mM EDTA

- Denaturation Solution



0.5 M NaOH , 1.5 M NaCl

- Neutralization Solution

1.5 M NaCl , 0.5 M Tris-Cl (pH 7.5)

2.6 培養基配製

- LB (Luria-Bertni)培養液

1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl

- LB (Luria-Bertni)/Ampicillin 培養基

1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml Ampicillin

- YPD 培養液

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 2% dextrose

- YPD 培養基

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 2% dextrose , 2% agar

- YPD/Uridine 培養基

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 2% dextrose , 2% agar , 80 mg/liter uridine

- YPDS/Uridine 培養基

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 2% glucose , 2% agar , 4% Goat Serum , 80 mg/liter uridine

- YP/Uridine 培養基

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 2% agar , 80 mg/liter uridine

- YPE/Uridine 培養基

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 2%(v/v) ethanol , 2% agar , 80 mg/liter uridine

- YPG /Uridine 培養基

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 3% (v/v) glycerol , 2% agar , 80 mg/liter uridine

- YPDGE/Uridine 培養基

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 2% glucose, 3% (v/v) glycerol , 2% (v/v)ethanol , 2% agar , 80 mg/liter uridine

- YPGES /Uridine 培養液

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 3%(v/v) glycerol , 2% (v/v)ethanol, 10% goat serum , 80 mg/liter uridine

- YPGES /Uridine 培養基

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 3%(v/v) glycerol , 2% (v/v)ethanol, 4% goat serum , 2% agar , 80 mg/liter uridine

- YPP/Uridine 培養基

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 100 mM pyruvate , 2% agar , 80 mg/liter uridine

- YPDP /Uridine 培養基

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 2% glucose, 100 mM pyruvate , 2% agar , 80 mg/liter uridine

- YPGEP/Uridine 培養基

1% yeast extract , 2%Bacto-peptone , 3%(v/v)glycerol , 2%(v/v)ethanol, 100mM pyruvate , 2% agar , 80 mg/liter uridine

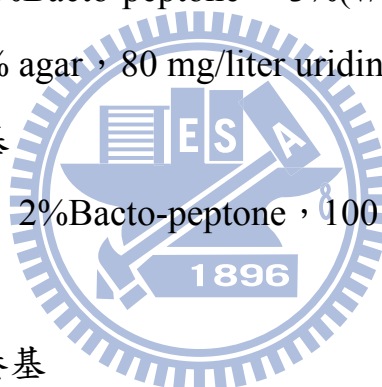
- YPG/Uridine 培養液

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 3%(v/v) glycerol , 80 mg/liter uridine

- YPGE 培養液:

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 3%(v/v) glycerol , 2%(v/v) ethanol

- YPGE 培養基



2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 3%(v/v) glycerol 、2%(v/v) ethanol ,
2% agar

- YPGE/Uridine 培養液

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 3%(v/v) glycerol , 2%(v/v) ethanol ,
80 mg/liter uridine

- YPGE/Uridine 培養基

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 3%(v/v) glycerol , 2%(v/v) ethanol ,
2% agar , 80 mg/liter uridine

- SE/Uridine/Histidine/Arginine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% (v/v)ethanol , 2%
agar , 80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter arginine

- SG/Uridine/Histidine/Arginine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 3% (v/v)glycerol , 2% agar ,
80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter arginine

- SGE/Histidine 培養液

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 3% (v/v) glycerol, 2% (v/v)
ethanol , 20 mg/liter histidine

- SGE/Histidine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 3% (v/v)glycerol, 2%
(v/v)ethanol , 2% agar , 20 mg/liter histidine

- SGE/Uridine/Histidine/Arginine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 3% (v/v)glycerol, 2%
(v/v)ethanol , 2% agar , 80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter
arginine

- SDGE /Uridine/Histidine/Arginine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% glucose, 3% (v/v)glycerol, 2% (v/v) ethanol , 2% agar , 80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter arginine

- S2P /Uridine/Histidine/Arginine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 5mM 2-PGA , 2% agar , 80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter arginine

- SPEP /Uridine/Histidine/Arginine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 1mM PEP , 2% agar , 80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter arginine

- SP /Uridine/Histidine/Arginine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 100 mM pyruvate 、2% agar , 80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter arginine

- SD /Uridine/Histidine/Arginine 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% dextrose , 2% agar , 80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter arginine

- solid Spider/Uridine/Histidine/Arginine 培養基

10 g of nutrient broth , 10 g of mannitol , 2 g of K_2HPO_4 and 13.5 g of agar in one liter H_2O , 80 mg/liter uridine , 20 mg/liter histidine , 20 mg/liter arginine

2.7 儀器設備

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

分光光度計 20GENES YS^{RT}(SPECTRONIC INSTRUMENTS)

試管震盪器 IKA-VIBRAX-VXR

乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)

電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)

恆溫式震盪培養箱 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

低溫培養箱 701 (WISOOM)

核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

電磁式奈米級偵測儀 ND-1000 (博克科技有限公司)

PCR 溫度控制儀 Gene CycloerRT (BIO-RAD)

梯度核酸增殖儀 labcycler (SENSOQUEST)

微量離心機 MICRO 240A (DINVILLE SCIENTIFIC INC.)

微量冷凍高速離心機 centrifuge 5415R (eppendorf)

桌上型低溫高速離心機 centrifuge 5804R (eppendorf)

桌上型高速離心機 5100 (KUBOTA CORPORATION)

4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)

-20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)

-80°C 超低溫冷凍櫃 925/926 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

無菌操作台 VCM-420 (造鑫)

倒立相位差螢光顯微鏡 TE2000-U (Nikon)

實體顯微鏡 M&T OPTICS

倒立顯微鏡 OLYMPUS CK40

數位相機 C-5050ZOOM (OLYMPUS)

光子成像系統 G:BOX (SYNGENE)

脈衝器 Micro pulserTM 411BR 0897 (BIO-RAD)



三、方法

3.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的轉形 (Transformation)

3.1.1 大腸桿菌勝任細胞的製備

挑大腸桿菌 DH5 α 單一菌落於 5 ml 的 LB 培養液、37°C 震盪培養 (180 rpm) 隔夜 (12 小時) 後，取 2 ml 的菌液轉養於 100 ml 的 LB 培養液 (包含 5% glucose, 2 mM MgCl₂)，37°C 震盪培養 (280 rpm) 至 O.D_{600nm} 約 0.4~0.7，將培養的 100 ml 菌液分二管到 50 ml 離心管，靜置於冰上 20 分鐘後，以 3000 rpm (約 1620 g) 於 4°C 離心 10 分鐘 (Eppendorf 5804R)，去除上清液，將離心管倒放 3 分鐘，用 25 ml 預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘，再以 2000 rpm (約 720 g) 於 4°C 離心 10 分鐘，離心後去除上清液，以 2.5 ml 預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，於 4°C 靜置 12~20 小時後，以 2000 rpm (約 720 g) 於 4°C 離心 5 分鐘，離心後去除上清液，以 2.5 ml 的 0.05 M CaCl₂ (含 15% Glycerol) 懸浮菌體，以每管 100 μ l 體積分裝至預冷的微量離心管，儲存於 -80 °C。

3.1.2 勝任細胞的轉形 (Sambrook et al, 1989)

將儲放於 -80°C 的勝任細胞取出置於冰上解凍，然後加入質體 DNA 0.1~1 μ g，冰浴 25 分鐘，在 42°C 水浴中進行熱休克 (heat shock) 45 秒後，迅速置於冰上 5 分鐘，加入 500 μ l 的 LB 培養液於 37°C 震盪培養 (180 rpm) 1 小時後，用 3000 rpm (約 1620 g) 室溫離心 2 分鐘後，吸掉 500 μ l 的上清液，剩下約 100 μ l 菌液混均後塗抹於含 Ampicillin (50 μ g/ml) 之 LB 培養基上，置於 37 °C 溫箱中培養 12~18 小時。

3.2 質體 DNA 之萃取

使用 ExcelPureTM Plasmid Miniprep Purification kit (Cat.No.MP530XL)，

萃取出大腸桿菌內之質體 DNA。先將菌落接種於含 Ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$) 之 5 ml 的 LB 培養液、於 37°C 溫箱中震盪培養 (150 rpm) 12~16 小時後，菌液以轉速 2400 rpm 離心 12 分鐘 (KUBOTA5100)，將上清液去除掉，儘可能將上清液取乾淨，加入 200 μl solution I Buffer 懸浮菌體，於室溫下分裝菌液至 1.5 ml 微量離心管中，取 200 μl solution II Buffer 緩等地混合均勻後，再加入 200 μl 的 solution III Buffer 再次緩等地混合均勻 (與 solution II Buffer 加入後的時間不要拖太長)，以 13000 rpm (約 16100 g) 室溫離心 5 分鐘 (eppendorf 5415R)，離下菌體，取上層液至 spin Column 中，室溫 13000 rpm (約 16100 g) \times 1 分鐘離心，倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml 的 Washing buffer，室溫 13000 rpm (約 16100 g) \times 1 分鐘離心，倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml 的 Washing buffer，室溫 13000 rpm (約 16100 g) \times 1 分鐘離心，倒掉收集管內液體，再以室溫 13000 rpm (約 16100 g) \times 5 分鐘空轉離心，將 spin Column 移至新的 1.5 ml 微量離心管中，開蓋於乾燥加熱板上 60°C 加熱 5 分鐘，以 50 μl 的二次無菌水或 1X TE buffer 加入 spin Column 濾膜中心，靜置 1 分鐘後，以室溫 13000 rpm (約 16100 g) \times 1 分鐘離心後，所得到的溶液內即含有質體 DNA，以電磁式奈米級偵測儀 ND-1000 測量濃度及純度後，儲存於 -20°C。

3.3 限制酵素反應 (Sambrook et al, 1989)

酵素的用量及作用溫度以個別的需求而定，用於分析 DNA 則用量較少，用於 Cloning 或是其他實驗則需使用較多的 DNA。

A. 分析 DNA：加 0.1~1 μg DNA 到適量反應體積 20 μl (或 10 μl) 以限制酶切割(酵素的用量、反應及終止的溫度、時間都依照廠商所提供的條件資料進行)，反應完後，利用洋菜膠體跑電泳，在電泳影像處理系統進行分析。

B. 用於 Cloning 或是其他實驗：加 5~10 μg DNA 到反應總體積 10~50 μl ，反應進行及終止作用完後，以膠體電泳分析，所需的 DNA 片段在經限制酵素切割後，視需要以 Gel Extraction System 或 PCR Clean-up Kit 來純化 DNA 並去除限制酵素及鹽類。

3.4 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

3.4.1 結晶紫洋菜膠的製備

取 0.4 g 的 agarose 加入 50 ml 的 1X TAE Buffer，利用微波爐加熱溶解後，於電磁加熱攪拌器上加熱約 3 分鐘，以去除可能的雜物，稍冷卻之後加入約 40 μl 的結晶紫溶液 (crystal violet solution) (1 ml 1X TAE Buffer 加入 0.8 μl crystal violet solution)，倒入製膠皿中，冷卻約 1 小時後在使用。跑電泳時使用 50V，跑電泳時間視 DNA 大小而定，一般不超過 1 小時。

3.4.2 洋菜膠內之 DNA 片段之萃取

使用 PREMIER 之產品 Gel Extraction Kit (Cat.No.N-DCE050)，萃取出洋菜膠或是結晶紫洋菜膠內之 DNA 片段。將切下之洋菜膠 (約 50~200 mg)，置於 1.5 ml 微量離心管內，加入等量的 Binding Buffer (1mg 洋菜膠加入 1 μl Binding Buffer；若膠體濃度超過 2%，Binding Buffer 則需增加一倍)，於 60°C 加熱 10~20 分鐘至完全溶解，冷卻至室溫後，將混合液移至 spin Column (一次最多約 1.5 ml)，以室溫 13000 rpm (約 16100 g) 室溫離心 1 分鐘 (eppendorf 5415R)，倒掉收集管內液體；加入 0.7 ml 的 Washing buffer，以室溫 13000 rpm (約 16100 g) \times 1 min 離心，倒掉收集管內液體，將此步驟重覆一次；再以室溫 13000 rpm (約 16100 g) 空轉離心 2 min，將 spin Column 移置新的 1.5 ml 微量離心管，加入 30 μl 的二次無菌水或 TE buffer 於 spin Column 中，靜置 1 分鐘後，以室溫 13000 rpm (約 16100

g) \times 1 min 離心，將萃取出之 DNA 取 1 μ l 出來以電磁式奈米級偵測儀 ND-1000 測量濃度及純度後，並且跑電泳分析，其於 DNA 儲存於-20 $^{\circ}$ C。

3.5 DNA 連結反應

目的是用來連接 DNA 片段 (Insert DNA) 和載體 (vector)，實驗條件：將 0.5 unit 的 T4 DNA ligase (Fermentas (Cat.No.1812)、pGEM[®]-T vector System (Cat.No.8.A3600))、1 倍緩衝液、50 ng 的 vector 和適量的 Insert (欲連接的 DNA 片段與載體 DNA 以莫爾濃度比 3 : 1) 混合於 1.5 ml 微量離心管內，總反應體積為 10 μ l 或是 20 μ l，於 4 $^{\circ}$ C 反應 18 小時或 16 $^{\circ}$ C 反應 18 小時後，直接進行大腸桿菌勝任細胞的轉形。

3.6 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction ; PCR)

本實驗聚合酶連鎖反應主要之模板為質體DNA 或白色念珠菌之染色體DNA，利用所設計的引子夾出並放大所需之DNA 片段。將下列物質混合於 0.5 ml 微量離心管內：總體積 50 μ l 的反應液中包含 5 μ l 的 10 x PCR buffer、2.5 unit Tag Polymerase (5 unit/1 μ l)、200 μ M dNTP、primer F 和 primer R 約0.2 ~ 1.0 μ M、模板 DNA (白色念珠菌染色體 DNA 約 0.1 ~ 1 μ g，質體DNA 約 1ng)，無菌二次水。反應步驟為：(1) 94 $^{\circ}$ C，5 分鐘 (2) 94 $^{\circ}$ C，1分鐘 (3) 50 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C，1分鐘 (依引子Tm 值減 2 $^{\circ}$ C) (4) 72 $^{\circ}$ C 或是68 $^{\circ}$ C，1~3 分鐘 (依 Taq 的種類而決定溫度；時間依目標片段的大小而定) (5) 重複 (2) ~ (4) 步驟30次反應 (6) 72 $^{\circ}$ C 或是 68 $^{\circ}$ C，6~10 分鐘 (時間依目標片段的大小而定) (7) 4 $^{\circ}$ C 停止反應。

3.7 雙套基因破壞株之建立 (homozygous knockout strain)

本實驗首先確認轉形株是否為正確 *CaGPM1* 單套基因破壞株，再利用

PCR、限制酶反應作用取得帶有篩選標記 (*ARG4*、*URA3*) 及欲研究基因相同序列的 DNA 片段，再與單套基因破壞株進行轉形 (transformation)，因相同的基因序列會與染色體 DNA 發生基因重組置換，可藉此方式將篩選標記帶入以達到基因破壞的目的 (Wilson, *et al.*, 1999)，利用適當的培養基作初步篩選可破壞單套或是雙套基因。

3.7.1 確認 *CaGPM1* 單套基因突變株

3.7.1.1 抽取染色體 DNA 方法一 (Susanna, *et al.*, 2004)

挑取單一菌落 (SC5314、BWP17、MAG01、MUG33)，接種至 5 ml YPD/uridine 培養液中，30°C 隔夜震盪培養 (200~250 rpm)，約 18~20 小時，取 1 至 1.5 ml 菌液至 1.5 ml 微量離心管，以 13,000 rpm (約 16100 g) 室溫離心 5 分鐘 (eppendorf 5415R)，去除上清液，加入 200 μ l 的 Lysis buffer (or breaking buffer)，以 vortex 充份混合後，將微量離心管置於 -80°C 冰箱 2 分鐘，隨即置於 95°C 乾浴中 1 分鐘，重覆兩次，結束後 vortex 30 秒鐘，加入 200 μ l chloroform，vortex 2 分鐘，於室溫 13,000 rpm (約 16100 g) 最高轉速離心 10 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管，加入兩倍體積冰的 100% ETOH 以及八分之一體積 3M 之 NaOAc (pH5.2)，置於 -20°C 沉降 10 分鐘至 2 小時，以 4°C 轉速 13,000 rpm (約 16100 g) 離心 5 分鐘，去除上清液，加入冰的 500 μ l 70% ETOH 沖洗管壁沉澱物，以 13,000 rpm (約 16100 g) 離心 5 分鐘，用微量吸管吸掉上清液並將微量離心管斜放乾燥或置於 60°C 乾浴 5 分鐘，以 30 μ l 的無菌二次水溶解 DNA，加入 1U 的 RNase A 以分解 RNA，放 4°C 隔夜後，以電磁式奈米級偵測儀 ND-1000 測量濃度及純度後，-20°C 存放。

3.7.1.2 利用 PCR、送定序檢查 *CaGPM1* 單套基因 (Heterozygous knockout) 破壞株

利用引子 SPL05/SPL06，SPLO5/YLO001，SPL06/HJL133 分別進行

聚合酶連鎖反應，以確認*CaGPM1*單套基因是否已被剔除及篩選標記 *ARG4* 或 *URA3* 基因是否置換到正確位置。PCR 反應完成後，利用洋菜膠電泳觀察 PCR 產物之片段大小是否正確，作為初步的確認；同時利用引子 HJL241/SPL02，YLO001/SPL04，HJL133/SPL02，YLO002/SPL04 進行 PCR 反應得到四個帶有部分篩選標記與同源置換區之DNA片段，分別有 *ARG4* 的3' 端片段與 *CaGPM1* 基因下游的部分片段、*ARG4* 的 5' 端片段與 *CaGPM1* 基因上游的部分片段、*URA3* 的5' 端片段與與 *CaGPM1* 基因下游的部分片段、*URA3* 的 3' 端片段與 *CaGPM1* 基因上游的部分片段，利用 3.5 方法與 pGEM-T vector (Promega ，Cat.No.8.A3600) 連接，再利用 3.1 方式進行轉行後，萃取質體DNA並以限制酵素做初步確認後，將得到的質體送定序，進一步確認得到的篩選標記與欲同源置換區的DNA序列無誤。

PCR溫度設定如下:

Step 1: 94°C ,

5 mins

Step 2: 94°C ,

1 mins

Step 3: 60°C/53°C/50°C , 1 mins

Step 4: 68°C , 3 mins30secs / 72°C , 2mins/2mins20secs

Step 5: Repeat Step 2 ~4 for 30 cycles

Step 6: 68°C , 10 mins / 72°C , 6mins/8mins

Step 7: 4°C

∞

3.7.1.3 以南方墨點法 (Southern blot) 確定 *CaGPM1* 單套基因破壞株 (3.7.1.3.1~3.7.1.3.9 依 Roche 廠商產品操作手冊進行)

將所得到之突變株可利用南方墨點法確認目標基因被置換之位置是否正確以及 copy numbers 。

3.7.1.3.1 利用 PCR DIG labeling 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling)

使用 Roche DIG Labeling mixture (Cat. NO. 11277065910)，藉由聚合酶連鎖反應直接將 digoxigenin-11-dUTP (DIG) 標定在 DNA 上，將下面成分加到已滅菌且置於冰上的微量離心管：

Reagent	DIG-labeling Probe	Unlabeled DNA control
10 X High Fidelity PCR buffer with MgCl ₂	5 µl	5 µl
10 X PCR DIG Labeling Mix (Roche, Cat. NO. 11277065910)	2.5 µl	—
2.5 mM dNTP stock solution	2 µl	4 µl
25 µM upstream primer	1 µl	1 µl
25 µM downstream primer	1 µl	1 µl
Template (plasmid ; Genomic DNA)	1 µl (0.01~1 ng/µl ; ~1µg)	1 µl (0.01~1 ng/µl ; ~1µg)
Enzyme mix, High Fidelity (Protech, TAQ DNA Pol XL (Cat.No.P6a))	0.5 µl (5 units/µl)	0.5 µl (5 units/µl)
Sterile double dist. Water	37 µl	37.5 µl
Total	50 µl	50 µl

混合均勻後，稍微離心將所有樣品集合於 PCR 用的微量離心管底部，進行 PCR 反應，反應結束後，取 2 µl 的 PCR 產物跑電泳膠確認，而有標定上 DIG 的 DNA 在膠體內移動的會比對照組 DNA 還要慢，所以帶有 DIG 標定的 DNA 在膠體上的片段大小會比預測中對照組 DNA 大小還要大，將製備完成之 DNA 探針分裝 (10 µl/ tube)，儲存於 -20°C (至少可存放一年)。PCR 溫度設定如下：

Program :

Step 1 :	94°C	2 min
Step 2 :	94°C	30s
Step 3 :	50~60°C	30s (55°C)
Step 4 :	72°C	1kb/min (40s)
Step 5 :	Repeat step2~step4	29 cycles
Step 6 :	72°C	7 min
Step 7 :	4°C	∞

3.7.1.3.2 抽取染色體 DNA 方法二

將欲進行萃取染色體 DNA 之單一菌落 (SC5314、BWP17、MAG01、MUG33) 接種至 5 ml 的 YPD/uridine 培養液中, 30°C 培養 18~20 小時(180 rpm , 培養箱 B206 FIRSTEK SCIENTIFIC) 後, 以 3000 rpm (KUBOTA5100) × 10 分鐘離心, 去除上清液, 加入 5 ml 的無菌二次水振盪懸浮菌體, 將菌液移至新的 15 ml 離心管, 以 3000 rpm (約 1620 g) (eppendorf 5804R) × 10 分鐘離心, 去除上清液, 加入 0.5 ml 的 Breaking buffer, vortex 約 1 分鐘, 然後加入約 400 µl 體積的玻璃珠, 再加入 500 µl phenol/chloroform /isoamyl alcohol (25:24:1) , 室溫下最高轉速 vortex 10 分鐘 (試管震盪器 IKA-VIBRAX-VXR) , 加入 500 µl TE vortex 幾秒 ; 於室溫 3000 rpm (約 1620 g) 離心 15 分鐘, 將上清液吸至新的 15 ml 離心管中, 加入約 850µl (等體積) phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) , vortex 約 1 分鐘, 重複此步驟二次, 總共 phenol 萃取 3 次 ; 再將上清液移至二個新的 1.5 ml 微量離心管中 (~400 µl /tube) , 加入 1 ml (2.5 倍體積) 的 100% 冰乙醇並且翻轉混均, 於 4°C , 13000 rpm (約 16100 g) (eppendorf 5415R) × 10 分鐘離心, 小心去除上清液, 在室溫下晒乾 DNA pellet 約 10~15 分鐘 (或是於 60°C 乾浴器下放 10~15 分鐘) , 加入 0.4 ml TE 緩衝液 (含 3µl 的 10

mg/ml RNaseA) 將 DNA pellets 復溶，放到 37°C 培養箱反應約 15 分鐘，加入 40 μ l 的 3 M 醋酸氨 (醋酸鈉亦可) (pH 5.2) 和 1 ml 的 100% 冰乙醇輕輕混合內容物，於 4°C 轉速 13000 rpm (約 16100 g) \times 10 分鐘離心，小心去除上清液，加入 1 ml 的 75% 冰乙醇清洗管壁沉澱物，於 4°C 轉速 13000 rpm (約 16100 g) \times 5 min 離心，用微量吸管吸掉上清液並將微量離心管斜放乾燥約 10~15 分鐘 (或是於 60°C 乾浴器下放 10~15 分鐘)，以 50 μ l 的無菌二次水溶解 DNA (或是 TE buffer)，以電磁式奈米級偵測儀 ND-1000 測量濃度及純度後，儲存於 -20°C

3.7.1.3.3 限制酶作用

將所萃取的染色體 DNA (\sim 10 μ g) 與 1 μ l 的 *Ban*I 限制酶 (20 U/ μ l)、1 μ l 的 10 X buffer⁴，最後補水至反應總體積 10 μ l，混均後於 37°C 反應 10 小時後，在將反應後的產物於 65°C 作用 20 分鐘，終止酵素作用。

3.7.1.3.4 限制酶作用後 DNA 產物跑電泳

將經由限制酶作用後的 DNA 產物，以微量吸管置入 0.7 % 洋菜膠 (視目標片段大小決定) 之孔洞中，以 50 伏特之電壓進行電泳約 140 分鐘分離 DNA 片段，電泳結束後，將洋菜膠置於新鮮的 EtBr (0.25~0.5 μ g/ml) 染色 20 分鐘，再用水退染 2 分鐘，在電泳影像機器置膠處鋪上一層包鮮膜，將洋菜膠置於保鮮膜上，放上一枝尺於洋菜膠旁，以便之後比對 marker 的位置，利用電泳影像處理系統照相，之後依 Roche 廠商產品操作手冊進行。

3.7.1.3.5 利用毛細作用將 DNA 轉漬到 Nylon membrane (Transferring DNA to a membrane)

3.7.1.3.5.1 洋菜膠事先處理

將洋菜膠浸入於 50 ml (蓋過膠面即可) 的 Denaturation Solution 中，使 DNA 變成單股，在室溫下平面震盪 15 分鐘兩次。(要更新 Denaturation

Solution)，用無菌二次水清洗後，將洋菜膠放入 50 ml (蓋過膠面即可) 的 Neutralization Solution 中，使其中和 PH 值和洗去鹽類讓洋菜膠恢復到中性，在室溫下平面震盪 15 分鐘兩次 (要更新 Neutralization Solution)。將洋菜膠放在 50 ml 10 X SSC 至少 10 分鐘，水平震盪，可讓洋菜膠內鹽類更均衡，更接近 transfer buffer，如果省略這個動作，在 transfer 時可能會出現洋菜膠縮小或是破掉。

3.7.1.3.5.2 裝置 upward capillary transfer

剪一張和膠的大小差不多的 positively charged nylon membrane (在膠體左上角，用一個缺刻，標記為第一條 lane，而 membrane 的右上角剪一角)，並且將其完全浸溼在水中，然後再浸泡在 transfer solution 中約 10 分鐘，以平衡 Nylon Membrane，此外再剪三張和洋菜膠差不多大小的 Whatman 3MM 濾紙，額外剪一張寬和洋菜膠一樣大小，但是長度較長的 Whatman 3MM 濾紙，將上述的濾紙泡在以 10 X SSC 為 transfer buffer 的溶液中 (高鹽可以幫助 DNA 吸附到 nylon membrane)。

將塑膠盤填滿 transfer solution，放一個平台在塑膠盤上，將大張的 Whatman 3MM 放在平台上，讓紙的兩邊浸泡在 transfer solution，並且輕柔的移走氣泡，取另一張大小和洋菜膠相似的 Whatman 濾紙疊在此大張的濾紙上，再次輕柔的移走氣泡。將洋菜膠疊在上述的大小和洋菜膠相似的 Whatman 3MM 濾紙上並且移走氣泡。剪一個合適的投影片中間挖空，挖空的部分大小為膠的大小，以便將多餘的濾紙蓋住，不要蓋到洋菜膠，避免水直接由濾紙往上，而不經過中間的洋菜膠因而影響 transfer。再來放事先已經潤溼的 membrane 到洋菜膠上面，再次移走氣泡，避免氣泡影響 transfer 效果。疊二張事先用 transfer solution 潤溼的 Whatman 3MM 到 membrane 上面，移走氣泡，而且每張濾紙都不要有皺起，可增加吸水效果。放一堆擦手紙 (約 8~10 公分) 到 Whatman 3MM 上面，再放適度的重量

在 Whatman 3MM 上面，確保每一個表面有很好的接觸，但是不要太重，會造成膠變型而讓阻止 transfer。轉漬 16 小時到隔天。

3.7.1.3.6 固定 (Fix)

移走擦手紙和濾紙，用鉛筆在正面的 membrane 上標誌膠體的 well 位置，不要用原子筆，因為在 hybridization solution 會溶解掉，將電泳膠片再染色並照相以了解轉移效率。用鑷子夾 membrane 的邊緣，置於 2 X SSC 緩衝液中以潤絲膜，避免太多的鹽類在膜上。將有 DNA 那面溼的 membrane 朝上放到已被 2 X SSC 浸溼過的濾紙上於 UV 燈下曝光，以 120 mJ/pluse，20 秒的能量下處理兩次進行 UV crosslinker，將 DNA 固定在 nylon membrane 上，可將進行過 UV crosslinker 的 membrane 風乾或是繼續下個步驟。

3.7.1.3.7 Prehybridization

加入非專一性的核酸結合在非目標 DNA 區域。事先將正確的 DIG Easy Hyb 量 (100cm^2 ($10 \times 10 \text{ cm}$) 的 membrane 取 10 ml 的 DIG Easy Hyb (Roche, Cat. No.11603558001))，放到滅菌過的 15 ml 離心管，並且放到水浴，溫度設定為 hybridization 溫度 (42°C)，約 15 分鐘。將 nylon membrane 放到含 10ml 的 prehybridization buffer (DIG Easy Hyb) 的保鮮盒，於 42°C 平面震盪 30 分鐘 (仍有 buffer 可在平面上搖動，沒有完全被膜吸乾) 之後將 prehybridization buffer 倒掉，將含標記探針的 15 ml 的 hybridization buffer 加到保鮮盒中 (探針使用前先取 $7.5 \mu\text{l}$ 到滅菌過的 1.5 ml 微量離心管，於 95°C 作用 10 分鐘，使 probe 變性雙股打開，迅速放在冰上 5 分鐘；探針與 DIG Easy Hyb 體積比為 1 : 2)，於 42°C 平面震盪至少 18 小時 (將蓋緣用膠帶密封)。

3.7.1.3.8 Post-hybridization washes

將 nylon membrane 移至 75 ml (視膜大小而不同) 的 low stringency buffer (2 X SSC , 0.1% SDS) 在室溫下平面震盪 5 分鐘兩次，使其表面 probe 或有機的 buffer 洗掉，倒掉 buffer。再加入 50 ml 的預熱 65°C 的 high stringency buffer (0.5 X SSC , 0.1% SDS)，並且在 65°C 下平面震盪 15 分鐘兩次，以便洗掉結合在非專一性地方的 probe，整個過程膜在任何懸浮液中都要完全的泡在 solution 裡，不可以有乾掉的情形，不然會造成不必要的背景。

3.7.1.3.9 免疫偵測 (Detection)

將盒內的 high stringency buffer 倒掉，加入 Washing buffer 潤絲 nylon membrane，平面震盪 5 分鐘，倒掉 Washing buffer，加入 50 ml 的新鮮 1 X Blocking buffer (Roche Blocking reagent, Cat.No.11096176001) 於室溫下平面震盪 30 分鐘後，倒掉 1 X Blocking buffer，加入 40 ml 的 Antibody solution (Roche Anti-DIG-AP, Cat.No.11093274910) 於室溫下平面震盪 30 分鐘後，倒掉 Antibody solution，加入 50 ml 的 Washing buffer 於室溫下平面震盪 15 分鐘兩次，洗掉膜上非專一性的 Antibody。將先前 buffer 倒掉，再以 50 ml 的 Detection buffer 於室溫下平面震盪 5 分鐘，最後將 nylon membrane 置放於投影片夾層中，有 DNA 面的 membrane 朝上，取 20 µl 的 CSPD (Roche, Cat.No.11655884001) 加入 2 ml 的 Detection buffer 中混勻後加到 nylon membrane 上，於 37°C 避光反應 15 分鐘後，將整個投影片夾層放至 G-BOX 照像系統進行分析，或是於暗房內以 X 光底片進行壓片，感光適當時間後，沖洗底片 (Develop buffer 中沖洗 2 分鐘，再置於 Fix buffer 沖洗 2 分鐘)。

3.7.2 製備含篩選標記及同源重組區域序列之 DNA 片段

將 37.5 µl 的二次水、5 µl 的 10 X PCR Buffer、4 µl 的 2.5 mM dNTP、1 µl 的 25 µM SPL01 引子及 1 µl 的 25 µM SPL02 引子、0.5 µl 的 TAQ DNA

Pol XL (Potech , Cat.No.P6a) (5 U/ μ l)、1 μ l 的 MAG01 (*CaGPM1::ARG4*/ *CaGPM1*) 染色體 DNA，加入 0.5 ml 的微量離心管內混合均勻，最終反應體積 50 μ l，於聚合酶溫度循環機中進行反應。反應完成後，利用洋菜膠電泳確認 PCR 產物片段大小是否正確，再利用 PCR Clean-up Kit (Premier , Cat.No.N-DCE050) 來純化 DNA 並去除酵素及鹽類，將經過 PCR Clean-up Kit 純化的 DNA，利用 3.3 B 方式限制酶 *Aat*II 作用於 *CaGPM1* 片段，使其變成小片段 DNA，因此與具有同源重組區域的篩選標記 *ARG4* 片段差距變大，跑洋菜膠電泳確認 DNA 片段大小是否正確，再利用 3.4.2 洋菜膠內之 DNA 片段之萃取方法，得到一片段是由 *CaGPM1* 下游 67 bp 位置取得一段大小為 443 bp 的 DNA 序列，此段序列稱之為 A region 與篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段大小為 2062 bp 以及 *CaGPM1* 上游 727 bp 位置取得一段 237 bp 的 DNA 此段序列稱之為 B region 所組成，此片段大小約 2.7 Kb。

PCR 溫度設定如下：

Step 1 :	94°C	5 min
Step 2 :	94°C	1 min
Step 3 :	51°C	1 min
Step 4 :	68°C	3min
Step 5 :	Repeat step2~step4	29 cycles
Step 6 :	68°C	10 min
Step 7 :	4°C	∞

同理利用引子 SPL01 / SPL03 對 MUG33 (*CaGPM1::URA3*/*CaGPM1*) 單套基因破壞株之染色體 DNA 進行 PCR，利用限制酶 *Age*I 作用於 *CaGPM1* 片段，因此取得一片段由 *CaGPM1* 上 746 bp 的位置取得一段大小為 513 bp 的 DNA 序列，此段序列稱之為 C region 與篩選標記 *URA3* 之 DNA 片段

約 1613 bp 加上 24 個多出來的 bases 以及 *CaGPM1* 上游 248 bp 的位置取得一段大小為 582 bp 的 DNA 此段序列稱之為 D region 所組成，此片段大小約 2.7 Kb。接著利用 3.6.1.2 轉形至單套基因已被破壞之白色念珠菌轉形株 MAG01、MUG33 (heterozygous knockout strain) 中，將 *ARG4* 或是 *URA3* 標記置入 (knockin) 所欲研究之基因。

3.7.3 電穿孔方式進行白色念珠菌轉形 (electroporation transformation)

3.7.3.1 白色念珠菌勝任細胞製備 (competent cells)

將白色念珠菌 (MAG01、MUG33) 之單一菌落接種至 5 ml 的 YPD 培養液 (含 uridine) 中，於 30°C 震盪培養 (150 rpm) 隔夜後，取其中 5 μ l 的菌液轉養至 50 ml 的 YPD 培養液 (含 uridine)，於 30°C 震盪培養 (150 rpm) 16~24 小時至 O.D_{600nm} 約 1.6~2.2，分裝至 50 ml 無菌離心管，以 1900 g \times 5 分鐘離心 (eppendorf 5804R)，去除上清液，加入 8 ml 的無菌二次水和 1 ml 的 10 X TE 及 1 ml 的 1 M Lithium acetate 懸浮菌體，放置 30°C 溫箱中震盪培養 (150 rpm) 1 小時，加入 250 μ l 的 1 M DTT，放置 30°C 溫箱中震盪培養 (150 rpm) 30 分鐘，加入 40 ml 的無菌二次水，室溫下以 1900 g \times 5 分鐘離心，去除上清液，下面步驟皆在冰上操作，加入 25 ml 冰的無菌二次水懸浮菌體，以 4 °C 1900 g \times 5 分鐘離心，去除上清液，加入 5ml 冰的 1 M sorbitol 將菌體懸浮起來，以 4°C 1900 g \times 5 分鐘離心，去除上清液，加入 5 ml 冰的 1 M sorbitol 將菌體懸浮起來，以 4°C 1900 g \times 5 分鐘離心，去除上清液，加入 50 μ l 冰的 1 M sorbitol 與菌體混均，放置冰上，即為念珠菌之勝任細胞。利用 3.7.3.2 方式將白色念珠菌以電穿孔方式進行轉形 (electroporation transformation)。

3.7.3.2 以電穿孔方式進行轉形 (electroporation transformation)

取 3.7.2 製備的線性 DNA 片段 (~1 μ g) 及 3.7.3.1 製備的 40 μ l 的念珠菌之勝任細胞於 1.5 ml 微量離心管，混合均勻，再將細胞全部取到 0.2 cm

cuvette 中，於冰上靜置 5 分鐘後，進行電穿孔控制條件如下：1.8 KV, 200 Ω ，5.5 ms，迅速放回冰上，加入 1 ml 的 1 M sorbitol，混均菌體，再用微量吸管將菌體吸至 15 ml 離心管中，以 4°C 1900 g \times 5 分鐘離心，用微量吸管去除上清液，加入 1 ml 的 SGE/histidine 培養液，於 30°C 震盪培養 (150 rpm) 1 小時後，取出 100 μ l 菌液塗抹至適當的篩選培養基 (selective medium)，在此實驗用的篩選培養基為 SC (0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid, 2% agar) 加上 3% (v/v) 甘油和 2% (v/v) 的酒精，再添加 histidine 營養素，置於 30°C 培養 3~5 天。

3.7.4 確認所得之 *CaGPM1* 雙套基因破壞株 (knockout)

3.7.4.1 利用 PCR 方式確認雙套基因之破壞

利用 3.7.1.3.2 抽取染色體 DNA 方法二 (Chia-Geun)，得到染色體 DNA，但此時欲萃取染色體 DNA 之單一菌落改成接種至 5 ml 的 YPGE (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 3% (v/v) glycerol, 2% (v/v) ethanol) /uridine 培養液中，30°C 培養 24~72 小時，利用引子 SPL05/SPL06、SPL05/YLO001 及 SPL06/HJL133 進行聚合酶連鎖反應，確認是否已將 *CaGPM1* 雙套基因正確地置入轉形株內後，將正確的轉形株分別命名為 MAU23、MAU214、MUA55 以及 MUA67。

3.7.4.2 以南方墨點法確認 *CaGPM1* 雙套基因破壞株 (knockout)

利用南方墨點法確認目標基因被置換之位置是否正確以及 copy numbers。依照 3.7.1.3.1~3.7.1.3.9 的方法。

3.8 建構 *CaGPM1* 單套基因置入補救株

將包含 *CaGPM1* 完整基因及上下游基因部分片段之 *NdeI*、*SacI* 的 DNA 片段接入質體 pGEM-HIS1 中，將此質體以限制酶 *BstXI*、*Tth1111* 作用作為初步確認，命名為 pRGO1-5、pRGO1-11，並且送定序。以限制酶

素 *Bst*BI 切割 pRGO1-5，切割位置位於 *CaGPM1* 基因的上游基因中，此一步驟將質體切割成線型，之後將質體轉形至白色念珠菌 MAU214 與 MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞株) 中。萃取所得轉形株之染色體 DNA，利用引子 GPM1-NF 及 CGHAU-1 進行聚合酶連鎖反應，確認是否已將 *CaGPM1* 單套基因正確地置入轉形株內，將轉形株分別命名為 RGP212、RGP215、RGP673、RGP674；接著以南方墨點法更進一步確認轉形株，依照 3.7.1.3.1~3.7.1.3.9 的方法，此時限制酶改為 *Spe* I。

3.9 以北方墨點法 (Northern blot) 確認 *CaGPM1* 突變株

3.9.1 萃取 RNA (RNA extraction)

將單一菌落之真菌接種至 5 ml 的 YPGE/uridine 培養液，於 30°C 隔夜 (18 小時~24 小時) 震盪培養 (150 rpm)，再取其中 2 ml 的菌液轉養至 50 ml 的 YPGE/uridine 培養液，30°C 震盪培養 (150 rpm) 4 小時~15 小時 (因為 *CaGPM1* 雙套基因破壞株生長緩慢) 至 O.D_{600nm} 吸光值達到約 0.6~0.8，分裝至 50 ml 無菌離心管，於 4°C 以 1900 g × 10 分鐘離心 (eppendorf 5804R)，去除上清液，可放置 -80 冷凍，或是繼續往下做。加入 2 ml 的 DEPC-treated H₂O 懸浮菌體，於 4°C 以 1900 g × 10 分鐘離心，去除上清液，之後的操作過程皆儘可能地置於冰上進行，加入 0.3 ml 的 RNA isolation buffer 及 30 µl 的 10 % SDS 懸浮菌體，加入 1/3 倍體積的玻璃珠，vortex 5 分鐘，加入 0.3 ml 的 phenol，vortex 5 分鐘，再加入 1/3 倍體積的玻璃珠，vortex 5 分鐘，加入 0.5 ml 的 RNA isolation buffer 與 50 µl 的 10 % SDS，vortex 5 分鐘，於 4°C 以 1900 g × 15 分鐘離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管中 (分成 2 管)，於 4°C 以 13147 g × 10 分鐘離心 (eppendorf 5415R)；將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，加入等體

積 phenol 混合，vortex 30 秒，於 4°C 以 13147 g × 15 分鐘離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管；重複此步驟一次，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，加入 1/8 倍體積的 2.5 M 醋酸鈉 (pH5.2) 及 2.5 倍體積的 100% 冰乙醇混合均勻，置於冰上 30 分鐘後，於 4°C 以 13147 g × 20 分鐘離心，將上清液倒掉，加入 1 ml 的 75% 冰乙醇清洗管壁沉澱物，於 4°C 以 13147 g × 10 分鐘離心，用微量吸管吸掉上清液，並將微量離心管斜放在室溫下乾燥至微乾狀態，將 RNA 溶於 50 µl 的 DEPC-treated H₂O 中，儲存於 -80°C。

3.9.2 轉漬 RNA (transfer)

(依 Roche 廠商產品操作手冊進行)

首先進行 1 % ~1.5 % 洋菜膠配製，秤取 0.5 g 的 agarose 於 36 ml 的 DEPC-treated H₂O 中，微波加熱溶解，待稍微冷卻後加入 5 ml 的 10X MOPS 及 9 ml 的甲醛 (formaldehyde) 混合均勻並製成膠體。而 RNA 樣品進行電泳前之處理：將 12 µg 的 RNA、3.5 µl 的 10X MOPS、5 µl 的 37% formaldehyde、10 µl 的 formamide、3 µl 的 dye 以及 1 µl 的 10 mg/liter ethidium bromide 分別加入微量離心管內並充分混合均勻，於 65°C 加熱 10 分鐘後置於冰上 5 分鐘。將處理好之 RNA 樣品以微量吸管置入洋菜膠之孔洞中，以 50 伏特之電壓進行 RNA 電泳 70 分鐘，電泳結束後，在電泳影像處理系統照相 (放一枝尺在洋菜膠旁一起照相)，之後將膠體浸泡於 50 ml 的 10 X SSC 中 20 分鐘，接著進行轉漬。利用毛細現象之原理，引導 10 X SSC 溶液向上流動，進而帶動膠體中的 RNA 脫離膠體，吸附於耐龍膜 (nylon membrane) 上進行轉漬，接著依照 3.7.1.3.5.2~3.7.1.3.9 方法進行，其中 3.7.1.3.7 的 prehybridization 溫度改為 50°C 作用 1 小時，hybridization 溫度也改為 50°C；probe 製備利用 3.7.1.3.1 方法取得；3.7.1.3.8

Post-hybridization washes 的 High stringency buffer 濃度改為 0.2 X SSC , 0.1% SDS 。

3.10 突變株之性狀分析 (characterization)

3.10.1 抗真菌類藥物敏感性試驗-Etest

將培養於 YPGE (1% yeast extract , 2% Bacto-peptone, 2% agar , 3% (v/v) glycerol, 2% (v/v) ethanol) /uridine 培養基上 30 °C 之三天的菌落，懸浮於 0.85 % NaCl，調整菌液濃度直到如同標準之 0.5 McFarland 。於150 mm 培養皿內製備總體積 60 ml，厚度約 4 ± 0.5 mm 之 YPGE/uridine 培養基。以無菌棉棒浸入菌液內，於管內旋轉數圈後以相異之 3 個方向均勻塗抹至 YPGE/uridine 培養基上。室溫下放置 5 ~ 10 分鐘，待多餘水氣消失後以乾淨之尖頭鑷子夾取藥物試片，試片以濃度高的靠近培養皿邊緣而濃度低的靠近培養基中心方向擺放。除去試片和培養基之間的大氣泡（由濃度低至高的方向去除），由於小氣泡並不會影響判讀故可忽略不管。啤酒酵母需於 30 °C 培養 48 ~ 72 小時，白色念珠菌則於 35 °C 培養24 ~ 48 小時，由於 *CaGPM1* 雙套基因突變株生長緩慢，所以培養3~11天。

◆ 藥品名稱與 MIC 濃度範圍

藥品名稱	簡寫	MIC 濃度範圍 ($\mu\text{g/ml}$)
amphotericin B	AP	0.002 - 32
caspofungin	CS	0.002 - 32
flucytosine	FC	0.002 - 32
fluconazole	FL	0.016 - 256
voriconazole	VO	0.002 - 32

Etest 中，MIC 讀法為抑菌圈邊緣和試片交接之最小濃度。當菌落沿著試片

生長，也就是沒有抑制現象產生時，MIC 讀法為“>”最高之藥片 MIC 濃度。對於 flucytosine，MIC 為近乎完全抑制菌落生長（95 %）之數值，而 amphotericin B 則是完全抑制菌落生長（100 %）之數值為 MIC 值。azoles 類藥物包括 fluconazole、ketocanazole、itraconazole 和 voriconazole 則是最先產生明顯抑制現象或菌落生長濃度明顯降低點，通常是以 80 % 抑制現象為 MIC 值。echinocandins 類藥物，例如：caspofungin，同樣是以最先產生明顯抑制現象或菌落生長濃度明顯降低點，通常是以 80 % 抑制現象為 MIC 值。（以上的判斷是以 glucose 培養基，僅供參考。因為使用的是 YPGE/uridine 培養基，非平常所用的 glucose 培養基，所以只能互相比較抑制情況）。

3.10.2 生長曲線之測定

將新鮮單一菌落於 YPGE/uridine 培養液，30 °C 隔夜培養 1~2 天，取適量隔夜培養之菌液，至新鮮之 5 ml 的 YPG 培養液中，調整菌液之 O.D_{600nm} 吸光值約為 0.4，再取 2ml 菌液轉養至新鮮之 50 ml YPGE（1% yeast extract，2% Bacto-peptone，3% (v/v) glycerol，2% (v/v) ethanol）/uridine 培養液，此時菌液之 O.D_{600nm} 吸光值約為 0.1~0.2，於 30 °C 培養箱中震盪培養（150 rpm）。每隔 2 小時，取 100 µl 的菌液稀釋十倍或二十倍測量其 O.D_{600nm} 吸光值。

3.10.3 菌落生長情形之觀察

3.10.3.1 不同碳源培養基之生長分析

將不同的菌株塗在 YPGE/uridine 培養基上，於 30°C 培養 2~3 天，用絨布複製（replica）於不同的碳源培養基上，於 30°C 培養 3 天，觀察菌落之生長情形。下面所列為所用的培養基：

a. YP（1% yeast extract，2% Bacto-peptone）系列

培養基名稱	培養基配方 (並添加營養素 uridine)
YPGE agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 3% (v/v) glycerol , 2% (v/v) ethanol , 2% agar
YP agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% agar
YPE agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% (v/v) ethanol , 2% agar
YPG agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 3% (v/v) glycerol , 2% agar
YPD agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% glucose , 2% agar
YPDGE agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% glucose , 3% (v/v) glycerol , 2% (v/v) ethanol , 2% agar
YPDS agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% glucose, 4 % goat serum , 2% agar
YPGES agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 3% (v/v) glycerol , 2% (v/v) ethanol , 4% goat serum , 2% agar
YPP agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 100 mM pyruvate , 2% agar
YPDP agar	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% glucose, 100 mM pyruvate , 2% agar
YPGEP	1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 3% (v/v) glycerol , 2% (v/v) ethanol , 100 mM pyruvate , 2% agar

b. SC (0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid) 系列

培養基名稱	培養基配方 (並添加營養素 uridine 、 histidine 、 arginine)
-------	---

SE agar	0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% (v/v) ethanol , 2% agar
SG agar	0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 3% (v/v) glycerol , 2% agar
SD agar	0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% glucose , 2% agar
SGE agar	0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 3% (v/v) glycerol , 2% (v/v) ethanol , 2% agar
SDGE agar	0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% glucose , 3% (v/v) glycerol , 2% (v/v) ethanol , 2% agar
SP agar	0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 100 mM pyruvate , 2% agar
S2P agar	0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 5 mM 2-PGA , 2% agar
SPEP agar	0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 1 mM PEP , 2% agar

3.10.3.2 在 YPGE/uridine 之固態培養基

挑新鮮單一菌落接種於 YPGE/uridine 培養基中，置於 30℃，培養五天，於實體顯微鏡下觀察單一菌落之表面型態變化，並且於倒立式顯微鏡下觀察菌落邊緣形態。

3.10.4 誘發菌絲生長環境觀察型態改變

3.10.4.1 在含山羊血清之 YPGE/uridine 固態培養基

將新鮮單一菌落放置 YPGE/uridine 培養液中稀釋後，取 100 μ l 塗於含

有 4 % 山羊血清之 YPGE/uridine 培養基中，平均一個培養基上有 40~200 顆菌落，置於 37°C，培養七天，於實體顯微鏡下觀察單一菌落之表面型態變化，並且於倒立式顯微鏡下觀察菌落邊緣形態。

3.10.4.2 含山羊血清的 YPGE/uridine 培養液之生長

3.10.4.2.1 芽管試驗 (germ tube assay)

將含 10 % 山羊血清之 YPGE/uridine 培養液，加至 6-well plate 中，每個 well 有 2 ml 培養液，用牙籤沾一點新鮮的單一菌落（從凍管畫出單一菌落於 YPGE/uridine，30°C 培養三天完後，約 4~6 小時即進行實驗）於 well 裡，於 37°C 反應 4 小時，於倒立式顯微鏡下以 400 X 觀察是否有芽管形成。

3.10.4.2.2 長菌絲實驗分析

延續 3.10.4.2.1 實驗，分別在 8、16、32 小時，稀釋菌液，於倒立式顯微鏡下以 400 X 觀察菌絲之型態（Hwang et al, 2003）。

3.10.4.3 在含山羊血清之 Bacto agar 培養基

挑新鮮單一菌落接種於含有 4% 山羊血清 Bacto agar 另外添加 arginine、uridine、histidine 於培養基中，置於 37°C，培養七天，於倒立式顯微鏡下以 40 X、100 X、200 X、400 X，觀察菌絲生長型態。

3.10.5 侵犯力分析 (invasion assay)

將菌落接種於 solid Spider 培養基（Federico et al, 1998），並且於培養液中添加 uridine、histidine、arginine，置於 37°C 培養七天，觀察菌落型態，之後以固定水流沖洗菌落，觀察菌落是否因菌絲侵入培養基而殘留於平板上。

四、結果

4.1 *CaGPM1* 蛋白質在不同菌種的序列比對

白色念珠菌之 *CaGPM1* 基因為一對偶基因，分別位於 Contig 19-10076 中的 Orf 19.903 (747 bp , 248 a.a) 和 Contig 19-20076 中的 Orf 19.8522 (747 bp, 248 a.a)，*CaGPM1* 的基因產物為 phosphoglycerate mutase，為白色念珠菌糖解反應的酵素之一，可將 3-phosphoglycerate 轉成 2-phosphoglycerate。將 *CaGPM1* 蛋白質序列與下列菌種的同源蛋白作比較：包括酵母菌亞門的菌種：白色念珠菌 (*C. albicans* SC5314)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata* CBS 138)、熱帶念珠菌 (*Candida tropicalis* MYA-3404)、葡萄牙念珠菌 (*Candida lusitaniae* ; *Clavispora lusitaniae* ATCC 42720)、季氏畢赤氏酵母 (*Pichia guilliermondii* ATCC 6260 ; *Candida guilliermondii*)、*Candida dubliniensis* CD36、啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、畢赤酵母 (*Pichia stipitis*)、漢氏德巴利氏酵母 (*Debaryomyces hansenii*)、乳酸克魯維酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、*Lodderomyces elongisporus* NRRL YB-4239、以及裂殖酵母綱裡的粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)，可在這些菌種得到相似度即高的蛋白質 (表一)，大部份的蛋白質作用目前已知為可將 3-phosphoglycerate 轉換成 2-phosphoglycerate，除了 *C. albicans* 與 *S. cerevisiae* 之外，很少有文獻提及其他的作用。圖一 為其蛋白質比對後的親緣樹狀圖，可得到 *CaGPM1* 與 *C. dubliniensis* CD36 的 GeneID: 8045838 基因編譯為 phosphoglycerate mutase 1, putative 的蛋白最相似，identity 有 97%，其次為 *C. tropicalis* 的 phosphoglycerate mutase 1，其 identity 為 93%。

4.2 建構 *CaGPM1* 雙套基因破壞株之結果

本實驗是利用含有欲破壞基因相同某段序列及篩選標記 (*ARG4* 、 *URA3*) 之 DNA 片段，與缺少 *ARG4* 、 *URA3* 、 *HIS1* 三種篩選標記之白色念珠菌株 (BWP17) 發生同源重組置換 (homologous recombination)，在白色念珠菌中進行特定基因的破壞 (Wilson *et al.*, 1999)。先前實驗室歐陽政中已進行 *CaGPM1* 單套基因的破壞 (未發表)，但並未將單套基因破壞轉形株確認，因此將篩選出來的 *CaGPM1* 單套基因破壞株，先利用 PCR、定序及南方墨點法進行分析後再建構雙套基因破壞株。

4.2.1 以 PCR 確定 *CaGPM1* 單套基因已被篩選標記 *ARG4* 或 *URA3* 破壞

前人將含有 *CaGPM1* 相同序列及篩選標記 *ARG4* 或 *URA3* 之 DNA 片段與白色念珠菌 (BWP17) 進行第一次轉形，各得到一個菌落，將所得之菌落與 SC5314、BWP17 菌株萃取出染色體 DNA，再利用三組引子 SPL05/SPL06、SPL05/YLO001、SPL06/HJL133 進行 PCR 以確認 *CaGPM1* 之單套基因是否被破壞。圖二之 < A > 顯示，若含篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段經第一次轉形成功地置換掉染色體上 *CaGPM1* 之單套基因，以引子 SPL05 (位 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子)、SPL06 (位 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子) 進行 PCR，可在被置換成功含 *ARG4* 的染色體上得到大約 3.1 Kb 之 DNA 片段，而在另一套染色體上則得到原有 ORF 大小約 2.5 Kb 之 DNA 片段；若含篩選標記 *URA3* 之 DNA 片段經第一次轉形成功地置換掉染色體上 *CaGPM1* 之單套基因，以引子 SPL05 (位 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子)、SPL06 (位 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子) 進行 PCR，可在被置換成功含 *URA3* 的染色體上得到大約 3.2 Kb 之 DNA 片段，而在另一套染色體上則得到原有 ORF 大小約 2.5 Kb 之 DNA 片段。圖二 < B > 是以 0.8 % 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，對照組 WT (SC5314)、BWP17 可得到約 2.5 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 A 所示)，實驗組則為轉形株，編號為 1-1 及 2-1，在編號 1-1 轉形株中，可得到約 3.1 Kb 與

2.5 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 A、B 所示)，而編號 2-1 轉形株可得到約 3.2 Kb 與 2.5 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 A、C 所示)。此外，圖三 < A > 利用引子 SPL05 (位 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子)、YLO001 (位在 *ARG4* 上之正向引子) 進行 PCR，可在被置換成功含 *ARG4* 的染色體上得到大約 2.1 Kb 之 DNA 片段；利用引子 SPL06 (位 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子)、HJL133 (位在 *URA3* 上之反向引子) 進行 PCR 會在被置換成功含 *URA3* 的染色體上得到約 1.9 Kb 之 DNA 片段。圖三 < B > 是以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，negative 對照組 WT (SC5314)、BWP17 無法得到約 2.1 Kb 大小的 DNA 片段，實驗組轉形株 1-1 可得到約 2.1 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 A 所示)，編號 2-1 轉形株不帶有篩選標記 *ARG4* 所以無法得到 2.1 Kb 大小的 DNA 片段。圖三 < C > 是以 0.8 % 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，negative 對照組 WT (SC5314)、BWP17 無法得到約 1.9 Kb 大小的 DNA 片段，實驗組轉形株 1-1 不帶有篩選標記 *URA3* 所以無法得到約 1.9 Kb 大小的 DNA 片段，編號 2-1 轉形株則可得到 1.9 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 B 所示)。將編號 1-1 之 *CaGPM1* 破壞菌株 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 命名為 MAG01；而編號 2-1 之 *CaGPM1* 破壞菌株 (*Cagpm1::URA3/ CaGPM1*) 命名為 MUG33。

4.2.2 定序確認篩選標記 *ARG4*、*URA3* 與欲同源置換區 DNA 之序列

利用引子 HJL241 (位在 *ARG4* 上之反向引子)/SPL02 (位 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子)，YLO001 (位在 *ARG4* 上之正向引子)/SPL04 (位 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子)，HJL133 (位在 *URA3* 上之反向引子)/SPL02 (位 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子)，YLO002 (位在 *URA3* 上之正向引子)/SPL04 (位 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子) 進行 PCR 反應得到四個帶有部分篩選標記與同源置換區之 DNA 片段，

分別有 *ARG4* 的 3' 端片段與 *CaGPM1* 基因下游的部分片段、*ARG4* 的 5' 端片段與 *CaGPM1* 基因上游的部分片段、*URA3* 的 5' 端片段與 *CaGPM1* 基因下游的部分片段、*URA3* 的 3' 端片段與 *CaGPM1* 基因上游的部分片段，將其連接到 pGEM-T vector，轉形後得到的質體送定序，將得到的各部份定序結果，分別組合成為完整的篩選標記 *ARG4* 連接欲同源置換區的 DNA 之序列（大小為 2876 bp）以 GAC1 表示、完整的篩選標記 *URA3* 連接欲同源置換區 DNA 之序列（大小為 2996 bp）以 GUC1 表示。將 GAC1、GUC1 分別與質體 pRS-*ARG4*、pGEM-*URA3* 完整的 *ARG4*、*URA3* 序列（Wilson, *et al.*, 1999）和 *Candida* Genome Database (CGD) 中的 *CaGPM1* 及其下游 DNA 至 orf19.900（+15~+33）與上游 DNA 至 orf19.904（+585~+604）序列，整個序列大小為 2220 bp，做核苷酸比對。圖四之 < A > 顯示，為篩選標記 *ARG4* 與欲同源置換區的 DNA 之連接處序列比對結果，得到篩選標記 *ARG4*（大小為 2063 bp）分別與 *CaGPM1* 基因下游 67 bp 位置連接下游 DNA（如圖 4A-1）；與 *CaGPM1* 基因上游 727 bp 位置連接上游 DNA，但在篩選標記 *ARG4* 與 *CaGPM1* 基因上游序列連接處有多一個 base，而且不位在此二個 DNA 序列中（如圖 4A-2）。圖四 < B > 顯示，為篩選標記 *URA3* 與欲同源置換區的 DNA 之連接處序列比對結果，得到篩選標記 *URA3*（大小為 1613 bp）分別與 *CaGPM1* 基因上 746 bp 位置連接下游基因，但在連接處有多出 14 個 bases，而且不位在此二個 DNA 序列中（如圖 4B-1）；與 *CaGPM1* 基因上游 248 bp 位置連接上游 DNA，但在篩選標記 *URA3* 與 *CaGPM1* 基因上游序列連接處有多 10 個 bases，而且不位在此二個 DNA 序列中（如圖 4B-2）。

4.2.3 *CaGPM1* 單套基因破壞株的南方墨點法結果。

將白色念珠菌之染色體 DNA 以 *Ban*I 限制酵素處理後，再以南方墨點法分析，圖五之 < A > 顯示，利用 DNA probe (以引子 SGPM1-F、SGPM1-R 進行 PCR 之產物所製備的探針約 450 bp) 進行雜交反應，可在 SC5314 和 BWP17 得到約 4.3 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 5A-1) ；在 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 得到約 4.3 Kb 與 1.9 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 5A-1+2) ；在 MUG33 (*Cagpm1::URA3/ CaGPM1*) ，則應得到約 4.3 Kb 以及 4.9 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 5A-1+3) 。圖五 < B > 為 *CaGPM1* 單套基因破壞株的南方墨點法結果 (G-BOX 照相系統拍攝) 。分析的結果顯示，Lane 1 的 SC5314 有得到大約 4.3 Kb 的片段 (如箭頭 A 所示) 。Lane 2 的 BWP17 同樣可得到約 4.3 Kb 的片段 (如箭頭 A 所示) 。在 Lane 3 中 MAG01 的 strain 亦有大約 4.3 Kb 與 1.9 Kb 之片段 (如箭頭 A、B 所示) 。Lane 4 的 MUG33 結果可看到約 4.3 Kb 以及 4.9 Kb 大小的片段 (如箭頭 A、C 所示) 。

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

如圖六所示，利用引子 SPL01 (位於 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子) / SPL02 (位於 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子) 對 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 單套基因破壞株之染色體 DNA 進行 PCR，預期得到二個片段 (圖七 < A >) ，其中一片段是由 *CaGPM1* 下游 67 bp 位置取得一段大小為 443 bp 的 DNA 序列，此段序列稱之為 A region 與篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段大小為 2063 bp 以及 *CaGPM1* 上游 727 bp 位置取得一段大小為 237 bp 的 DNA 此段序列稱之為 B region 所組成，此片段整個大小約 2.7 Kb，另一片段為原有 ORF 大小約 2.2 Kb 之 DNA 片段 (圖七 < C >) ，經限制酶 *Aat*II 將原有 ORF 大小約 2.2 Kb 之 DNA 片段切成三個大小為 407 bp、633 bp、1180 bp 之 DNA 片段 (如圖七 < B、D >) ，進行膠體純化，因此可得到一段帶有完整篩選標記 *ARG4* 且前後分

別有同源重組置換區域 A、B region 大小約 2.7 Kb 之 DNA 片段 (如圖七 < E >)，將此片段與 *CaGPM1* 單套基因破壞株 (MUG33) 進行第二次轉形作用，此時進行的篩選培養基為 SC (0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% (v/v) agar) 加上 3% 甘油和 2% 的酒精，再添加 histidine 營養素。同理 (圖八 < A >) 利用引子 SPL01 (位於 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子) / SPL03 (位於 *CaGPM1* 上游之正向引子) 對 MUG33 (*Cagpm1::URA3/CaGPM1*) 單套基因破壞株之染色體 DNA 進行 PCR，預期得到二個片段，其中一片段由 *CaGPM1* 基因上 746 bp 的位置取得一段 513 bp 的 DNA 序列，此段序列稱之為 C region 與篩選標記 *URA3* 之 DNA 片段約 1613 bp 以及 *CaGPM1* 上游 248 bp 的位置取得一段大小為 582 bp 的 DNA 此段序列稱之為 D region 所組成，此片段整個大小約 2.7 Kb 及原有 ORF 大小約 2.0 Kb 之 DNA 片段 (圖八 < C >)，經限制酶 *AgeI* 將原有 ORF 大小約 2.0 Kb 之 DNA 片段切成二個大小為 891 bp、1196 bp 之 DNA 片段 (如圖八 < B、D >)，進行膠體純化，因此可得到一段帶有完整篩選標記 *URA3* 且前後分別有同源重組置換區域 C、D region 大小約 2.7 Kb 之 DNA 片段 (如圖八 < E >)。將此片段與 *CaGPM1* 單套基因破壞株 (MAG01) 進行第二次轉形作用，此時進行的篩選培養基為 SC 加上 3% (v/v) 甘油和 2% (v/v) 酒精，再添加 histidine 營養素。

4.2.5、以 PCR 確認 *CaGPM1* 雙套基因之破壞菌株

將含有與 *CaGPM1* 相同序列及篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段與 *CaGPM1* 單套基因破壞株 (MUG33) 進行第二次轉形作用，得到二個菌落；同時也將含有與 *CaGPM1* 相同序列及篩選標記 *URA3* 之 DNA 片段與 *CaGPM1* 單套基因破壞株 (MAG01) 進行第二次轉形作用，也得到二個菌落，將所得之四個菌落與 WT (SC5314)、BWP17、*CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、MUG33 (*Cagpm1::URA3/*

CaGPM1) 萃取出染色體 DNA 後，利用三組引子 SPL05 / SPL06、SPL05 / YLO001、SPL06 / HJL133 進行 PCR 以確認 *CaGPM1* 之雙套基因是否被破壞。圖九之 <A> 顯示，若含篩選標記 *ARG4*、*URA3* 之 DNA 片段經過兩次轉形成功地置換掉染色體上 *CaGPM1* 之雙套基因，以引子 SPL05 (位於 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子)、SPL06 (位於 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子) 進行 PCR，可在被置換成功含 *ARG4*、*URA3* 的染色體上各得到大約 3.1 Kb、3.2 Kb 之 DNA 片段，若是 negative control: WT (SC5314)、BWP17 只會得到約 2.5 Kb 之 DNA 片段，如果是在 positive control，單套基因突變株上 (MAG01、MUG33) 則分別會得到約 3.1 Kb、2.5 Kb 以及 3.2 Kb、2.5 Kb 之 DNA 片段。圖九 <C> 是以 0.8 % 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，對照組 negative control : WT (SC5314)、BWP17 可得到約 2.5 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 A 所示)，positive control 單套基因突變株 : MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、MUG33 (*Cagpm1::URA3/CaGPM1*)，分別可得到約 3.1 Kb、2.5 Kb 以及 3.2 Kb、2.5 Kb 之 DNA 片段 (如箭頭 A、B、C 所示)，實驗組則為編號 1~4 轉形株均可得到約 3.1 Kb、3.2 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 B、C 所示)。此外，圖十 <A> 顯示，利用引子 SPL05 (位於 *CaGPM1* 下游 ORF 上之反向引子)、YLO001 (位在 *ARG4* 上之正向引子) 進行 PCR，可在被置換成功含 *ARG4* 的染色體上得到大約 2.1 Kb 之 DNA 片段；利用引子 SPL06 (位於 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子)、HJL133 (於在 *URA3* 上之反向引子) 進行 PCR 會在被置換成功含 *URA3* 的染色體上得到約 1.9 Kb 之 DNA 片段。圖十 是以 0.8 % 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，實驗組轉形株 1~4 皆可得到約 2.1 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 A 所示)。圖十 <C> 是以 0.8 % 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，實驗組轉形株 1~4 皆可得到約 1.9 Kb 大小的 DNA 片段 (如箭頭 B 所

示)。可知編號 1~4 的菌株符合預期。將編號 1~4 的 *CaGPM1* 雙套基因破壞菌株 (*Cagpm1::ARG4/ Cagpm1::URA3*) 依序命名為 MAU23、MAU214、MUA55、MUA67。

4.2.6 *CaGPM1* 雙套基因破壞株的南方墨點法結果

將白色念珠菌之染色體 DNA 以 *BanI* 限制酵素處理後，再以南方墨點法分析，圖十一之 < A > 顯示，利用 DNA probe (以引子 SGPM1-F、SGPM1-R 進行 PCR 之產物所製備的探針) 進行雜交反應，可在 SC5314 和 BWP17 得到約 4.3 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 11A-1)；在 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 得到約 4.3 Kb 與 1.9 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 11A-1+2)；在 MUG33 (*Cagpm1::URA3/CaGPM1*)，則應得到約 4.3 Kb 以及 4.9 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 11A-1+3)；在 MAU23、MAU214、MUA55、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 得到約 4.3 Kb 與 1.9 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 11A -2+3)。圖十一 < C > 為 *CaGPM1* 雙套基因破壞株的南方墨點法結果。分析的結果顯示，Lane 1 的 SC5314 有得到大約 4.3 Kb 的片段 (如箭頭所示)。Lane 2 的 BWP17 同樣可得到約 4.3 Kb 的片段 (如箭頭所示)。在 Lane 3 中 MAG01 的 strain 亦有大約 4.3 Kb 與 1.9 Kb 之片段 (如箭頭所示)。Lane 4 的 MUG33 結果可看到約 4.3 Kb 以及 4.9 Kb 大小的片段 (如箭頭所示)。Lane 6~9 的 MAU23、MAU214、MUA55、MUA67 結果可看到約 1.9 Kb 以及 4.9 Kb 大小的片段 (如箭頭所示)。

4.3 建構 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1* 單套基因置入補救株

4.3.1 建構帶有 *CaGPM1* 基因及其啟動子之質體

如圖十二所示，利用 PCR 方式設計一對引子 RGPM1a (*CaGPM1* 下游

ORF : +1~+33 位置)、RGPM1b (*CaGPM1* 上游 ORF: +170~+702) 從染色體 DNA 上可得到 2633 bp 的 DNA 片段，引子 (RGPM1a、RGPM1b) 兩端分別帶有限制酶 *NdeI*、*SacI* 切位，和質體 pGEM-HIS1 分別經過限制酶 *NdeI*、*SacI* 作用後，進行接合反應。經過轉形選殖後，可得到帶有篩選標記 *HIS1*、*CaGPM1* 基因及其啟動子、下游 ORF 部分 DNA 大小約 33 bp 以及上游 ORF 的部分 DNA 大小約 531 bp 之質體，全長約為 8.0 Kb。圖十三之 < A > 顯示，在質體的載體部分找到一個限制酶 *BstXI*，進行酵素切割，如果是連接正確的質體，會得到一個約 8.0 Kb 大小之 DNA 片段；此外，在 insert 上可找到二個 *Tth1111* 限制酶作用位置並且在 vector 可找到一個 *Tth1111* 限制酶作用位置，因此將會得到三個大小約 1.0 Kb、1.5 Kb、5.6 Kb 之 DNA 片段。圖十三 < C > 是以 0.8 % 洋菜膠分析限制酶作用之 DNA 產物，結果顯示在編號 1~11 是轉形選殖後的菌落，經限制酶 *BstXI* 作用後可看到只有編號 5 和 11 得到預期約 8.0 Kb 大小之 DNA 片段；此外，從圖十三 < C > 得到符合預期結果的轉形選殖株編號 5、11 利用限制酶 *Tth1111* 作用，圖十三 < D > 是以 0.8 % 洋菜膠分析限制酶作用之 DNA 產物，結果顯示，編號 5 和 11 得到預期的三個大小約 1.0 Kb、1.5 Kb、5.6 Kb 之 DNA 片段。將編號 5、11 質體分別命名為 pRGO1-5、pRGO1-11，並將其送定序。將建構的 pRGO1-5、pRGO1-11 質體的 *CaGPM1* 基因與 *C.albicans* Genome Database (CGD)(<http://www.candidagenome.org/>) 資料庫序列做比對，確認 *CaGPM1* 胺基酸有無改變，圖十四核苷酸序列比對結果顯示，有部分核苷酸改變；再將其轉譯為胺基酸進行序列比對，圖十五結果顯示這些改變的核苷酸並不會造成胺基酸序列改變，因此 pRGO1-5、pRGO1-11 質體皆可做為 rescued plasmid。

4.3.2 以 PCR 確認 *Cagpm1::Cagpm1::CaGPM1* 單套基因置入補救株

圖十六所示，將含有 *CaGPM1* 單套基因和篩選標誌 *HIS1* 基因之質體

pRGO1-5 經限制酶 *Bst*BI 作用成為線形再轉形至 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞株 MAU214 與 MUA67 內，利用同源重組置換到帶有篩選標記 *ARG4* 的染色體上，或是帶有篩選標記 *URA3* 的染色體上產生單套基因置入補救株，將轉形後得到的菌株與 BWP17、MAU214、MUA67 萃取染色體 DNA 及質體 pRGO1-5，進行 PCR 反應，確認 *CaGPM1* 單套基因是否已成功地置入。圖十七之 < A > 顯示，若質體 pRGO1-5 已置換入 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞株內，應有一段完整的 *CaGPM1* 基因啟動子加 *CaGPM1* 基因位於帶有篩選標記 *ARG4* 或是 *URA3* 之任一股染色體上，以引子 GPM1-NF (位於 *CaGPM1* 下游之反向引子) 及 CGHAU-1 (位於 *CaGPM1* 上游 ORF 上之正向引子) 進行 PCR 反應後，可在被成功置入含有 *CaGPM1* 單套基因和篩選標誌 *HIS1* 基因之補救株的染色體得到三種 DNA 片段，分別是置入的 *CaGPM1* 基因約 2.3 Kb、篩選標記 *ARG4* 基因 2.9 Kb，篩選標記 *URA3* 基因 3.0 Kb 之 DNA 片段。若是 positive 對照組：BWP17、質體 pRGO1-5 只會得到 2.3 Kb 之 DNA 片段，如果是在雙套基因破壞突變株上 MAU214、MUA67 則分別會得到 2.9 Kb 以及 3.0 Kb 之 DNA 片段。圖十七之 < B > 是以 0.8 % 洋菜膠分析 PCR 反應所得產物。結果顯示，positive 對照組：BWP17、質體 pRGO1-5 得到 2.3 Kb 之 DNA 片段 (如右方箭頭所示)，雙套基因破壞突變株上 MAU214、MUA67 分別得到 2.9 Kb 以及 3.0 Kb 之 DNA 片段 (如右方箭頭所示)。實驗組為轉形至 MAU214 所得到的轉形株編號 1~6，編號 2、4、5、6 可得到約 2.3 Kb、2.9 Kb、3.0 Kb 大小的 DNA 片段 (如右方箭頭所示)；實驗組為轉形至 MUA67 所得到的轉形株編號 1~6，編號 3~6 可得到約 2.3 Kb、2.9 Kb、3.0 Kb 大小的 DNA 片段 (如右方箭頭所示)。後將由 MAU214 所得到的編號 2、5 二株 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1* 單套基

因置入補救株命名為 RGP212、RGP215，將由 MUA67 所得到的編號 3、4 二株 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1* 單套基因置入補救株命名 RGP673、RGP674。

4.3.3 *Cagpm1::Cagpm1::CaGPM1* 單套基因置入補救株之南方墨點法分析

將白色念珠菌之染色體 DNA 以 *SpeI* 限制酵素處理後，再以南方墨點法分析，圖十八之 < A > 顯示，利用 DNA probe (以引子 SGPM1-F、SGPM1-R 進行 PCR 之產物所製備的探針大小約 450 bp) 進行雜交反應，可在 SC5314 和 BWP17 得到約 4.4 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 18A-1)；在 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 得到約 4.4 Kb 與 4.9 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 18A-1+2)；在 MUG33 (*Cagpm1::URA3/CaGPM1*)，則應得到約 2.6 Kb 與 4.4 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 18A-1+3)；在 MAU214、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 得到約 4.9 Kb 與 2.6 Kb 大小的 DNA 片段 (如圖 18A-2+3)；在 RGP212、RGP215、RGP673、RGP674 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 可能會得到二種情形，如果質體 pRGO1-5 已置換入帶有篩選標記 *ARG4* 的染色體上產生單套基因置入補救株約經過 *SpeI* 作用，會得到大小約 2.6 Kb、13 Kb 大小的片段 (如圖 18A-3+4)，或是已置換入帶有篩選標記 *URA3* 的染色體上產生單套基因置入補救株經過 *SpeI* 作用，會得到大小約 2.6 Kb、4.9 Kb、10 Kb 大小的片段 (如圖 18A -2+5)。圖十八 < D > 為 *CaGPM1* 單套基因置入補救株的南方墨點法結果。分析的結果顯示，Lane 1 的 SC5314、Lane 2 的 BWP17 同樣可得到約 4.3 Kb 的片段 (如右方箭頭所示)。在 Lane 3 的 MAG01 亦有大約 4.3 Kb 與 4.9 Kb 之片段 (如右方箭頭所示)。Lane 4 的 MUG33 結果可看到約 2.6 Kb 以及 4.4 Kb 大小的片段 (如右方箭頭所示)。Lane 5、6 的 MAU214、MUA67 結果可看到約 2.6 Kb 以及 4.9 Kb

大小的片段 (如右方箭頭所示)。Lane 8、9、10、11 的 RGP212、RGP215、RGP673、RGP674 得到大小皆為 2.6 Kb、4.9 Kb、10 Kb 的 DNA 片段 (如箭頭所示)。

4.4 *CaGPM1* 突變株基因表現的北方墨點法結果

利用北方墨點法，來分析醣解作用基因 *CaGPM1* 突變株基因在不同菌株的 mRNA 表現量，確定是否已在染色體正確的位置破壞 *CaGPM1* 基因。將不同菌株培養在 30°C，不加山羊血清的 YPGE (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 3% (v/v) glycerol, 2% (v/v) ethanol) 培養液並且額外添加營養素 uridine 的情況下，萃取出 RNA，比較其 *CaGPM1* mRNA 表現量。*CaGPM1* 其 ORF mRNA 大小為 747 bp (249 amino acid)，位置約在 internal control *ACT1* (大小約為 1.0 kb) 上方。判讀基準以 *ACT1* 作為 internal control，ORF 大小約 1.1 Kb，mRNA 位置大約略低於 18S rRNA。圖十九 < A > 結果顯示在 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、BWP17、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 YLO133 (*Candt80/ Candt80*) 皆可看到 *CaGPM1* 之基因表現量，其中 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 的 *CaGPM1* mRNA 表現量明顯小於 SC5314。*CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 與 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 皆有得到預期的 *CaGPM1* mRNA 表現量，而 *CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 中並沒有 *CaGPM1* mRNA 表現跡象。圖十九 < B > 為 *CaGPM1* 其他突變株之北方墨點法結果，SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、*CaGPM1* 單套基因破壞株 MUG33 (*Cagpm1::URA3/CaGPM1*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP215、RGP673、RGP674 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 皆合乎預期有出現 *CaGPM1* mRNA 表現，而且其中 MUG33、RGP215、

RGP673、RGP674 表現量明顯比 SC5314 少，至於 *CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214、MAU23、MUA55、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 也合乎預期，沒有 *CaGPM1* mRNA 表現跡象。

4.5 突變株之性狀分析 (characterization)

將轉形後所得到 *CaGPM1* 單套基因突變株 (heterozygous knockout strain) MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、MUG33 (*Cagpm1::URA3/CaGPM1*) 二株、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU23、MAU214、MUA55、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 四株、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212、RGP215、RGP673、RGP674 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 四株，從上述不同的突變菌株中各挑出一株，*CaGPM1* 單套基因突變株 (heterozygous knockout strain) MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 為實驗組，將其進行藥物敏感性試驗及培養在不同的環境 (碳源、溫度、medium、加入血清) 中，觀察並比較這些轉形株對於藥物的敏感性還有生長與型態是否因基因突變而有所變化。

4.5.1 藥物敏感性試驗 (Etest)

由於先前實驗室的人，進行篩選影響抗藥性表現的基因時，發現 *CaGPM1* 基因可能有涉及，故推測 *CaGPM1* 基因可能和白色念珠菌之抗藥性有關。為了釐清 *CaGPM1* 基因在白色念珠菌中所扮演的角色，故以同源重組置換方式 (homologous recombination) 破壞 *CaGPM1* 基因，進行藥物敏感性試驗 (Etest) 為將特定菌株均勻塗布至特定培養基上 (此實驗採用 YPGE (1 % yeast extract , 2 % Bacto-peptone, 3 % (v/v) glycerol, 2%

(v/v) ethanol, 2 % agar) /uridine 培養基), 後放上 5 個不同的藥物試片, 放置於 35 °C 培養 3 ~ 11 天, 本實驗採用 2 種 azoles 類藥物-fluconazole、voriconazole 與 polyene 類藥物 amphotericin B 與 5-Flucytosine 與 Caspofungin, 主要目的在於測試特定菌株對於不同藥物之敏感性。如圖二十<A> 培養五天、 培養八天觀察之結果可知, 對於受試藥物 Caspofungin 而言, 雖然 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞株 MAU214 與 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 與 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 和野生型 SC5314、BWP17 相比, 其 MIC 值皆為約 0.016~0.023 µg/ml, 雖然 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞株 MAU214 的 MIC 值與其他菌株相比沒有明顯改變, 但是可以看到 MAU214 抑制圈明顯比其他菌株寬。在抗真菌藥物 amphotericin B 作用下, 觀察到 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞株 MAU214 雖然菌數不多, 但仍可從另一邊的抑制圈判斷其 MIC 值約為 0.002~0.006 µg/ml 而 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 與 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 和野生型 SC5314、BWP17 的 MIC 值約為 0.75 ~ 1.5 µg/ml, *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞株 MAU214 與其他菌株相比 MIC 值較低, 抑制圈較大。而所有菌株 (包含野生型 SC5314、BWP17) 對於 5-Flucytosine 的敏感性極低, 沒有明顯的抑制現象。在抗真菌藥物 fluconazole 與 voriconazole 作用下, 可看到 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 和野生型 SC5314、BWP17 對於 fluconazole MIC 值約為 0.094~0.19 µg/ml; voriconazole MIC 值約為 0.004~0.006 µg/ml, 但是 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞株 MAU214 因為菌數太少, 無法看出明顯的抑制圈, 因此無法判斷出 MIC 值以及是否被抑制。

4.5.2 於 YPGE/uridine 培養液中觀測生長曲線 (growth curve) 之結果

以野生株 SC5314、BWP17、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*) 作為對照，比較 SC5314、BWP17、HLC54、YLO133 和 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 之生長，以 YPGE (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 3% (v/v) glycerol, 2% (v/v) ethanol) /uridine 為營養源，於 30℃ 隔夜培養，各個時間點量測其 O.D_{600nm} 吸光值，觀察 *CaGPM1* 基因對菌株之生長是否有影響。圖二十一之 <A> 為二次實驗各個時間點測量結果之紀錄表。圖二十一之 為比較各菌株轉養 0~34 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 WT (SC5314)、BWP17 和 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 的生長沒有差別；HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 在轉養後的 20 小時之前和上述的菌株生長沒有差異，但是在轉養後 20 小時後可以發現菌液細胞數逐漸較 WT (SC5314)、BWP17、MAG01、RGP212 少；YLO133 (*Candt80/Candt80*) 生長趨勢與 HLC54 相似，但是其細胞數一直相對於其他對照組少；WT (SC5314)、BWP17、HLC54、YLO133 (*Candt80/Candt80*)、MAG01、RGP212 約在轉養後 8 小時已進入對數期，轉養後約 32 小時仍未進入靜止期，但可以觀察到 YLO133 生長傾向趨緩；而 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 菌株中，發現其生長遠較其他六個菌株緩慢，約在轉養後 16 小時才開始進入對數期，在轉養 32 小時後可觀察到細胞數已比 HLC54 和 YLO133 高，同時進入靜止期。以 8 小時與 12 小時的吸光值計算這些突變株之細胞倍增時間 (doubling time)，SC5314 菌株倍增時間為 2.35 小時，BWP17 菌株的倍增時間是 2.4 小時，HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 的倍增時間為 2.69 小時，YLO133 (*Candt80/Candt80*)

的倍增時間為 2.66 小時，MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 的倍增時間為 2.36 小時，RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 的倍增時間為 2.24 小時，至於 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 菌株計算出的倍增時間為 8.3 小時。

4.5.3 觀察菌落生長情形之結果

將七個不同的菌落野生株 WT (SC5314)、BWP17、HLC54 (*cph1/cph1* *efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*) 和 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 複製 (replica) 於不同的碳源培養基上，於 30°C 培養 3 天與 YPGE/uridine 培養基中，於 30°C 培養 5 天，觀察菌落的生長情形。

4.5.3.1 菌落在不同碳源培養基之生長

將七個不同的菌株塗於 YPGE/uridine 培養基中，再複製 (replica plating) 到不同的培養基上，在 30°C 培養 2~3 天，觀察菌落的生長情形。圖二十二 <A>、 的結果顯示雙套基因破壞菌株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 無法在 YPD (glucose)、YPDGE (glucose、glycerol、ethanol)、YPDS (glucose、4 % goat serum)、YPDP (glucose、pyruvate)、SD (glucose)、SDGE (glucose、glycerol、ethanol) 這些包含有 2% 葡萄糖的培養基上生長，即使在另外加入 3% 甘油，2% 酒精或是 pyruvate 仍無法生長。在 YPGE/uridine 添加 4% goat serum 的培養基上可觀察到菌株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 仍有生長，並不受血清裡的葡萄糖影響。在圖二十二 < B > SC 系列培養基可以看到菌株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 不僅在 SGE (glycerol、ethanol) 培養基上有生長而且在 SG 只以 glycerol 當碳源情況下

也有生長；但是在 SP (pyruvate)、S2P (2-PGA)、SPEP (PEP) 這些單獨以 pyruvate、2-PGA、PEP 為碳源的培養基上，沒有發現 MAU214 生長。

4.5.3.2 菌落在 YPGE/uridine 培養基之生長

將七個不同的菌株塗於 YPGE/uridine 培養基中，在 30℃ 培養 5 天，觀察菌落的生長情形，以野生株 WT (SC5314)、BWP17、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*) 作為對照組，觀察 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*)，其單一菌落形態變化。圖二十三 < A > 結果顯示，每一個紅框面積約 2.25 cm²，菌株 MAU214 其單一菌落的面積小於野生株 SC5314 (0.42 cm²)、BWP17 (0.25 cm²)、HLC54 (0.20 cm²)、YLO133 (0.20 cm²)，面積約為 0.06 cm²；單套基因突變株 MAG01 大小與 BWP17、HLC54、YLO133 接近、單套基因置入補救株 RGP212 大小與 SC5314 接近。圖二十三 < B > 實體顯微鏡下觀察單一菌落表面，SC5314、BWP17、HLC54、MAG01、RGP212 表面光滑，但細胞外圍皆有突狀物及絨毛產生，其中 RGP212 與 SC5314 可以明顯看出菌落邊緣有粗的突狀物及一圈毛絨菌絲包圍，YLO133 表面光滑無毛絨菌絲，MAU214 與其他菌株一樣表面光滑，但沒有明顯的看到毛絨菌絲生成。圖二十三 < C > 於倒立式顯微鏡下觀察，可以看到 MAU214 與 YLO133 菌落邊緣沒有菌絲生成。

4.5.4 細胞及菌落型態改變之結果

將七個不同的菌落野生株 WT (SC5314)、BWP17、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*) 和 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212

(*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 置於 medium 中加入適當比例之山羊血清，並在 37°C 較高溫度下培養，營造誘發菌絲生長之環境，觀察菌落與細胞的型態是否改變。

4.5.4.1 在含山羊血清的 YPGE/uridine 培養基之生長

將菌株接種於含 4% 山羊血清之 YPGE/uridine 培養基 37°C 培養七天，利用血清誘發菌絲之生長，觀察菌落其表現型 (phenotype)。以野生株 SC5314、BWP17、EFG1 及 CPH1 雙突變破壞株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54、YLO133 (*Candt80/Candt80*) 作為對照，觀察 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*)，其單一菌落形態變化。圖二十四之 < A > 結果顯示，每一個紅框面積約 2.25 cm²，菌株 MAU214 其單一菌落的面積小於野生株 SC5314 (1.21 cm²)、BWP17 (0.56 cm²)、HLC54 (0.12 cm²)、YLO133 (0.25 cm²)，面積約為 0.09 cm²；單套基因突變株 MAG01 (0.56 cm²) 大小與 BWP17 接近、單套基因置入補救株 RGP212 (0.81 cm²) 大小與 SC5314、BWP17 接近。圖二十四之 < B > 觀察單一菌落表面，觀察到 SC5314、BWP17、MAG01、RGP212 的單一菌落之外觀均呈現突狀物和以中間為主向外延伸出一圈菌絲如棉絮一般，其中 SC5314 毛茸狀更為激烈讓中間圓形的面積變的較小，BWP17 與 MAG01 的表面有一點點皺摺，而 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 與 YLO133 (*Candt80/Candt80*) 外觀則呈現平滑狀；至於 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 的單一菌落之外觀則呈現不規則皺摺狀及不對稱的茸毛狀。圖二十四之 < C > 於倒立式顯微鏡下觀察菌落型態，可見到 SC5314、BWP17、MAG01、RGP212 細胞邊緣均有規則毛茸的放射狀呈現，HLC54 菌落與 YLO133 (*Candt80/Candt80*) 外觀則呈現平滑

狀，其中 YLO133 仍有觀察到 20% 菌落邊緣有短的毛茸呈現；至於 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 的單一菌落邊緣則呈現不對稱的毛茸放射狀。

4.5.4.2 在含山羊血清的 YPGE/uridine 培養液之生長

為了得知 *CaGPM1* 基因是否與白色念珠菌型態轉換有關，故於誘發菌絲生長之環境中 (37°C 高溫培養及加入山羊血清) 觀察其芽管與長菌絲生成狀況。本實驗以構築好 *CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 進行芽管試驗，並選用野生菌株 SC5314、BWP17 及雙基因突變破壞株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54、YLO133 (*Candt80/Candt80*) 作為正負對照。將菌落接種於含 10 % 山羊血清之 YPGE/uridine 液態培養液中，於 37°C 反應四小時、八小時、十六小時、三十二小時後於倒立式顯微鏡 400X 下觀察菌絲型態變化。

4.5.4.2.1 芽管試驗 (germ tube assay) 之結果

圖二十五之 < A > 於 37°C 反應四小時結果顯示，野生菌株 SC5314、BWP17、MAG01、RGP212 皆可發現芽管形成；而 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 約 87% 的細胞仍為酵母菌型態，只有 13% 細胞有芽管形成；雙基因突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 則無芽管之形成；YLO133 (*Candt80/Candt80*) 也無芽管形成，但是可看見細胞呈現聚集的狀態。

4.5.4.2.2 觀察增長型菌絲實驗

圖二十五之 < B >、< C >、< D > 於 37°C 反應八小時、十六小時、三十二小時的結果，可以觀察到隨著培養時間變長，野生菌株 SC5314、BWP17、MAG01 與 RGP212 也從先前芽管型態變成長菌絲型態，而雙基

因突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 仍無菌絲形成 ; YLO133 (*Candt80/Candt80*) 也無菌絲形成，細胞一直呈現聚集的狀態 ; MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1:: URA3*) 從少部分芽管形成變成大部份細胞呈現芽管型態，且菌絲長度似乎比一開始 4 小時芽管長度長一點。

4.5.4.3 在含山羊血清的 Bacto agar 培養基之生長

將菌落接種於含 4% 山羊血清的 Bacto agar 培養基，於 37°C 中培養七天，於倒立式顯微鏡下觀察菌絲在培養基上的型態。以野生株 SC5314、BWP17、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*) 作為正負對照，圖二十六之 < A > 、< B > 的結果顯示，野生菌株 SC5314、BWP17 、 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 與 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1:: URA3::CaGPM1-HIS1*) 在營養缺乏的 bacto agar 培養基中皆有菌落生成而且其單一菌落之外觀均呈現菌絲生長的毛茸放射狀；而 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 沒有菌絲出現，呈現平滑的酵母菌型態；YLO133 (*Candt80/Candt80*) 型態除了有平滑型態佔約 10%，大部分的型態約 90% 是圓型帶有部份毛茸放射並非整個菌落呈現菌絲毛茸放射狀，MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1:: URA3*) 沒有單一菌落生成，但在顯微鏡下有觀察到菌株細胞分佈。

4.5.5 侵犯力分析 (invasion assay) 之結果

將菌株接種於 solid Spider 培養基，37 °C 培養七天，若菌株有菌絲生成則會侵入培養基內，經水流沖洗後，不會被洗去。以野生株 SC5314、BWP17、EFG1 及 CPH1 雙突變破壞株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54、YLO133 (*Candt80/Candt80*) 作為正負對照，圖二十七的結果顯示菌株野生菌株 SC5314、BWP17、MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 與 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1:: URA3::CaGPM1-HIS1*) 皆具有侵入培養基之能力，至於雙突變破壞株 HLC54 無侵入培養基之能力，而 YLO133

(*Candt80/Candt80*) 可發現表面細胞大部分會被沖洗掉，但似乎仍有細胞殘留在表面；而 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 菌落遠小於其他菌株，但亦有侵入培養基之能力。



五、討論

本論文的研究延續之前實驗室利用 Suppression Subtractive Hybridization, SSH 技術，得到了許多可能與致病力或調控菌絲生長有關的基因，分析比對後發現其中有些是醣解酵素的基因。因此，實驗室前人（陳杏芳，2004）將整個生化合成途徑上的十一個基因（附圖一），以北方墨點法分析這些基因在野生株 SC5314、HLC54（*cph1/cph1 efg1/efg1*）、HLC52（*CPH1/CPH1 efg1/efg1*）、JKC19（*cph1/cph1 EFG1/EFG1*）等四菌株內的 mRNA 表現量差異為何，分析該醣解酵素十一個基因的結果中，*TPI1*、*ENO1*、*GPM1*、*PGK1*、*PYK1* 等五個基因表現量差異最為明顯（附圖一）。因此推測此五個基因可能和菌絲生長或致病力有所關聯。而早先實驗室進行篩選影響抗藥性表現的基因，發現醣解酵素 *CaGPM1* 基因可能與抗藥性相關。此外實驗室前人（蕭婷尹，2006）利用北方墨點法分析 *TPI1*、*GPM1*、*PGK1*、*PYK1* 等四個基因，得到這些基因之表現皆可同時受血清及藥物所影響，推測與致病力/型態變化及抗藥性途徑皆有關連（附圖二）。因此本研究想進一步探討，醣解酵素 *CaGPM1* 基因是否真的與致病力/型態變化及抗藥性途徑有關連性，利用同源重組的方式建構 *CaGPM1* 單套基因破壞株、*CaGPM1* 雙套基因破壞株與 *CaGPM1* 單套基因置入補救株經由 PCR、定序、南方墨點法及北方墨點法（圖二至圖十九）確認無誤，接著對這些突變株進行性狀分析，觀察基因突變前後對生長及型態變化與藥物抗藥性之影響（圖二十至圖二十七），綜合結果之結論推測醣解酵素基因 *CaGPM1* 與型態變化、細胞生長以及藥物抗藥性確實是有相關的。

5.1 目標基因 *CaGPM1* 之探討

CaGPM1 基因位於白色念珠菌的contig19-10076，ORF 號碼為19.903。

Gpm1p 具有 248 個胺基酸，大小約 27.5 kDa 的蛋白質 (Poltermann, S, *et al.*, 2007)，與 *Saccharomyces cerevisiae* 的 *GPM1* (YKL152C) 蛋白質有 78% 高度相似性。*CaGPM1* 的基因產物為 phosphoglycerate mutase，為白色念珠菌醣解反應的酵素之一，可將 3-phosphoglycerate 轉位成 2-phosphoglycerate。從 *Candida albicans* CO23 菌株用 Two-dimensional electrophoresis 分析細胞壁裡 glucan-associated proteins (GAPs) 的成分，可以得到 *GPM1* (Angiolella, L, *et al.*, 2009)；利用螢光染色 (immunostaining)、flow cytometry 以及 western blot 分析更確認 *CaGPM1* 不僅在細胞質會出現，在細胞壁也會存在；此外在 hyphae 型態時，更可在菌絲尖端明顯看到有螢光 (Poltermann, S, *et al.*, 2007)。

白色念珠菌的 Gpm1p 是會與 Factor H，FHL-1 和 Plasminogen 結合的表面蛋白，可以藉由抑制 complement activation 調控免疫逃避和降解 extracellular matrix components，為多功能的毒力因子 (Crowe, J. D., 2003; Poltermann, S, *et al.*, 2007)。目前已知在小鼠全身感染系統中，此酵素會展現其抗原性 (Fernandez-Arenas, *et al.*, 2004)，因此可能涉及致病性的影響。當白色念珠菌形成生物膜時、培養過程加入抗真菌藥物 fluconazole 時，或是當環境為氨基酸營養缺乏時 (3-aminotriazole treatment)，*GPM1* 基因皆有過度表現的情形，已知此途徑之上游調控因子有 Efg1p 和 Gcn4p。此外，利用 Proteomic analyses 分析，得到 *efg1/efg1* mutant 會影響 30 個 surface-associated proteins 表現，其中一個為 *CaGPM1* (Saville SP, *et al.*, 2006)。Efg1p 已知可調控型態變化/致病性及抗藥性 (Lo, *et al.*, 2005)，Gcn4p 為正常生物膜生長所必須之調控因子 (Garcia-Sanchez, *et al.*, 2004)，又已知當菌體生物膜產生時，會隔絕菌體細胞和藥物的接觸，而使菌體對於藥物的感受性改變。所以由文獻推測，*GPM1* 可透由 Efg1p 和 Gcn4p 而影響菌體對藥物的感受性，另外，phosphoglycerate mutase 是念珠

菌細胞壁上主要glucan-associated protein (GAPs) 之一，當藥物敏感性菌株，在 fluconazole的處理下，會改變念珠菌 GAPs 的組成，其組成比例變成和抗藥性菌株的組成相當，例如：主要的 GAPs，enolase 和 phosphglycermutase (*GPM1* 基因產物) 的成分減低，而被 exoglucanase 取而代之。然後，這些 GPAs 具有高抗原性，所以當它在細胞壁上出現量減低，即減低了抗原性，使得念珠菌不但得以逃避宿主免疫系統的攻擊，也因而改變了 GAPs 組成而導致抗藥性 (Angiolella, *et al.*, 2002)。這些現象說明了*CaGPM1*很有可能與致病力或是和型態變化有關，加上 *CaGPM1* 是源自於 SSH 技術的基因，因此挑選 *CaGPM1* 為目標基因。

5.2 建構 *CaGPM1* 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

本論文在破壞雙套基因時所製備的篩選標誌DNA片段，包括 *ARG4* 以及 *URA3*，而在篩選標誌的 3' 以及 5' 加上了目標基因上下游的同源區域以利在白色念珠菌之轉形作用下可以與目標基因進行同源重組作用。此外為了找出 *CaGPM1* 基因的功能關係，利用同源重組技術將篩選標記 *HIS1* 與已置換掉的 *CaGPM1* 重新回復到白色念珠菌的染色體中，以產生 rescued strain，用以確認此敏感性的改變的確是由於*CaGPM1* 基因所造成。

將實驗室前人歐陽政中所得到的 *CaGPM1* 單套基因破壞株做確認，在圖二、三可以看到 PCR 確認的各個片段大小正確、定序比對確認篩選標記 *ARG4*、*URA3*與欲同源置換區DNA之序列由 (圖四) 得知篩選標記 *ARG4* 與*CaGPM1* 基因下游 DNA 片段連接處多一個 base；篩選標記 *URA3* 與*CaGPM1* 基因下游 DNA 片段連接處多 14 個 bases；篩選標記 *URA3*與*CaGPM1* 基因上游 DNA 片段連接處多 10 個 bases，推測可能是前人歐陽政中做construction 時利用 fusion PCR 方法所造成的。圖五可看到南方

墨點法分析的結果符合預期，可以確定現有的 *CaGPM1* 單套基因破壞株分別為 *Cagpm1::ARG4/CaGPM1* (MAG01) 與 *Cagpm1::URA3/CaGPM1* (MUG33)。

因此設計引子針對 *Cagpm1::ARG4/CaGPM1* (MAG01) 進行 PCR，獲得含有欲研究基因相同序列及篩選標誌 *ARG4* 之 DNA 片段大小約 2.7 kb 以及一段卻研究的目標基因大小約 2.2 kb 之 DNA，因為此二個 DNA 片段太過接近，不易進行膠上純化，因此找到一個合適限制酶只在目標基因上進行酵素切割作用，將其作用成小片段，取得大小約 2.7 kb 的含有欲研究基因相同序列及篩選標誌 *ARG4* 之 DNA 片段 (圖七)。將之轉形至白色念珠菌 *Cagpm1::URA3/CaGPM1* (MUG33) 中，因白色念珠菌的轉型效率本來就比其它真菌低很多，故所得的菌落皆較少，但依然可挑選到 *CaGPM1* 雙套基因破壞株 MAU23、MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)。同樣方法取得含有欲研究基因相同序列及篩選標誌 *URA3* 之 DNA 片段大小約 2.7 kb (圖八)，將其轉形至白色念珠菌 *Cagpm1::ARG4/CaGPM1* (MAG01) 中，得到 *CaGPM1* 雙套基因破壞 MUA55、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)。將 *CaGPM1* 雙套基因破壞株 MAU23、MAU214、MUA55、MUA67 經由適當的 PCR 確認無誤 (圖九、十)。

在南方墨點法之確認結果中，圖十一的 *CaGPM1* 雙套基因破壞轉形株的南方墨點法結果顯示由 <C>圖中之 1.9 Kb、4.9 Kb 大小的片段確認 MAU23、MAU214、MUA55、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 突變株中被篩選標誌 (*ARG4*、*URA3*) 重組置換破壞，而且 4.3 Kb 大小的片段已不復見，因此推測 *CaGPM1* 之原有基因已被破壞。

利用同源重組技術將篩選標記 *HIS1* 與已置換掉的 *CaGPM1* 重新回復到白色念珠菌的染色體中，以便於判斷 *CaGPM1* 基因的功能關係。如圖

十二到圖十五所示，先將所需的質體建構出來，此質體帶有篩選標記 *HIS1* 與 *CaGPM1* 啟動子及 *CaGPM1* 基因，一小部份的 *CaGPM1* 下游的 ORF19.900 之 DNA 片段與一部分的 *CaGPM1* 基因上游的 ORF19.904 之 DNA 片段，將質體做序列比對（圖十四、十五）確認 *CaGPM1* 基因胺基酸沒有改變後，以 *CaGPM1* 基因上游的 ORF19.904 部分 DNA 片段大約 0.5 Kb 做為同源重組置換區，在此區以限制酶切開後轉型至白色念珠菌 *CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214、MUA67 中（圖十六），此方法無法掌控重組的質體會換進哪一套染色體，為其缺點，但因同源重組區相同（皆為 *CaGPM1* 上游 ORF19.904 部分 DNA 片段），故換進任一套的位置都應相同。將轉形後得到的菌株，經由適當的 PCR 確認（圖十七所示），初步推測得到 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212、RGP215、RGP673、RGP674 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS 1*)。

在南方墨點法之確認結果中，圖十八的 *CaGPM1* 單套基因置入補救株的南方墨點法結果顯示由 <C> 圖中可看到 RGP212、RGP215、RGP673、RGP674 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS*) 轉形株的結果中雖然可看到 DNA 片段有點往下傾斜，但仍可看到預期的大小 2.6 Kb、4.9 Kb 與 10 Kb 之 DNA 片段，因此推測此四個轉形株皆成功將篩選標誌 *HIS1* 與 *CaGPM1* 基因置換進 *CaGPM1* 雙套基因突變株內，而且因為出現的片段大小為約 2.6 Kb、4.9 Kb 與 10 Kb，所以可以推測 *CaGPM1* 單套基因置入到帶有篩選標誌 *URA3* 的染色體上了。

利用北方墨點法來確認同源重組置換後所得之 *CaGPM1* 單套基因破壞、雙套基因破壞與單套基因置入補救突變株 *CaGPM1* 基因表現量，進而推測是否成功建構 *CaGPM1* 突變株，在 30°C，YPGE/uridine 沒有加入山羊血清的環境下，以白色念珠菌野生株 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、BWP17、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 與 YLO133

(*Candt80/Candt80*) 為對照組，連同挑選到的 *CaGPM1* 單套基因破壞株 MAG01(*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)與MUG33 (*Cagpm1::URA3/CaGPM1*) 、*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU23、MAU214、MUA55、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212、RGP215、RGP673、RGP674 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 進行北方墨點法，以*ACT1* 為 internal control，觀察 *CaGPM1* 的表現量。由圖十九之可看出，*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU23、MAU214、MUA55 與 MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 中並沒有觀察到 *CaGPM1* 的 mRNA 表現，而 *CaGPM1* 單套基因破壞株 MAG01 和 MUG33 與 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212、RGP215、RGP673 與 RGP674 皆可觀察到 *CaGPM1* 的表現而且比 SC5314、BWP17 對照組的表現量較少。由以上結果進一步確定各個 *CaGPM1* 突變株確實已被篩選標記置換成功，故無法順利轉錄出 *CaGPM1* 之 RNA。

5.3 性狀分析之探討

白色念珠菌為多種型態之菌體，會隨著各種環境因素的改變，產生型態之變化。將轉形後所得之突變菌株在不同的環境中，觀察並比較這些突變株的生長與形態之變化，以了解其基因功能與藥物抗藥性和生長及型態之關係。

5.3.1 藥物抗藥性之探討

從 *CaGPM1* 突變株的藥物敏感性結果，以所得到的 *CaGPM1* 單套基因破壞株 MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、*CaGPM1* 雙套基因破壞突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 同時也將 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::*

CaGPM1-HIS1) 進行藥物敏感性試驗(Etest), 以確認此敏感性的改變的確是由於 *CaGPM1* 基因所造成, 而不是 *His1* 的差別, 故以 *CaGPM1* 單套基因補救實驗來驗證結果。RGP212 為將 *CaGPM1* 單套基因重新置入 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3* 雙套基因破壞突變株 MAU214 後, 所得到的 *Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1* 單套基因置入補救株。於圖二十<A>、 和 *CaGPM1* 雙套基因破壞突變株 MAU214 相比, *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 對於 caspofungin 的藥物敏感性 MIC 值雖然皆約為 0.016~0.023 $\mu\text{g/ml}$, 但是可以看到抑制圈寬度恢復與 SC5314、BWP17、*CaGPM1* 單套基因破壞株 MAG01 一樣。對於 amphotericin B 的藥物敏感性有回復現象 [MIC 值由 0.002~0.006 $\mu\text{g/ml}$ 回復至 (0.75~1.5 $\mu\text{g/ml}$)], 雖然實驗室前人 (吳宛真, 2005) 提到 *HIS1* 基因可能與 amphotericin B 的敏感性有關, 缺少此基因時會影響 amphotericin B 的判讀, 不過本實驗的 *CaGPM1* 雙套基因缺陷株雖然沒有將篩選標誌 *HIS1* 置入, 但是本實驗有 BWP17 (有3個營養缺陷分別為 ARG4-、URA3-與 HIS1-) 及 *CaGPM1* 單套基因缺陷株 MAG01 當作對照組, 因此本實驗結果的判讀仍有參考性。對於 5-Flucytosine 的敏感性極低, 沒有明顯的抑制現象。對於 fluconazole 和 voriconazole 藥物作用下, *CaGPM1* 雙套基因破壞突變株 MAU214 因為出現菌數過少, 無明顯的抑制圈, 無法判讀 MIC 值, 所以無法得知對此二種藥物有無敏感性或是抗藥性, 因為和 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 相比無法推測有無回復相象, 但如果又與 *CaGPM1* 單套基因破壞株 MAG01 相比, fluconazole MIC 值從 0.094~0.19 $\mu\text{g/ml}$ 變成無法判斷, 對 voriconazole MIC 值從 0.004~0.006 $\mu\text{g/ml}$ 變成無判斷, 因此推測 MAU214 也可能對 fluconazole 與 voriconazole 具敏感性, 所以不太有菌落產生。在 Etest 實驗可知道 *CaGPM1* 雙套基因突變株 MAG214 對於 caspofungin、

amphotericin B 藥物呈現敏感情況，對於 fluconazole 和 voriconazole 藥物也可能是呈現敏感情況，證實 *CaGPM1* 與藥物抗藥性有相關。

5.3.2 生長情形之探討

由圖二十一 YPGE/uridine 培養液之生長曲線試驗、圖二十二 (< A >、< B > YPGE/uridine 培養基) 及圖二十三 < A > 在 YPGE/uridine 培養基中觀察菌落之生長三者實驗的差別僅在於固態與液態 YPGE medium 的不同，其結果一致，就單套基因破壞株 (heterozygous knockout strain) MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 和 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 而言，是與 BWP17 與野生株 SC5314 生長趨勢無異；*CaGPM1* 雙套基因破壞突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 生長速度較對照組 SC5314、BWP17、HLC54、YLO133 緩慢，在轉養 16 小時後才可觀察到 *CaGPM1* 雙套基因突變株開始進入對數期 [exponential (log) phase]，而其他菌株在轉養後 8 小時即進入對數期，而且 *CaGPM1* 雙套基突變株 MAG214 在 32 小時即進入靜止期 (stationary phase)，其他對照組仍然在對數期，此時的細胞數已比 HLC54 與 YLO133 高；圖二十二 (< A >、< B > YPGE/uridine 培養基)可以觀察到 *CaGPM1* 雙套基突變株 MAG212 在 YPGE/uridine 培養基中看不出與其他對照組 SC5314、BWP17、HLC54 與 YLO133 之差異，雖然在液態 YPGE medium 培養，轉養初期生長緩慢，但在 32 小時卻可觀察到細胞數高於 HLC54 與 YLO133，因此推測長時間培養後可以達到相似狀態，圖二十三 < A > 在 YPGE/uridine 培養基中可以發現 *CaGPM1* 雙套基因破壞株單一菌落比其他菌株小顆約 0.25 cm²，而對照組 SC5314 與 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 相似，由生長曲線可以推測 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 在 32 小時即進入靜止

期，其他菌株並未進入，因此長時間固態培養，可以發現單一菌落會較小，此三個的結果一致。這顯示 *CaGPM1* 基因剔除在 YPGE 培養基中對白色念珠菌的生長造成明顯影響。

由圖二十二 < A >、< B > 突變株在不同碳源培養基之生長結果顯示，菌株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 無法在 YPD (glucose)、YPDGE (glucose、glycerol、ethanol)、YPDS (glucose、4% goat serum)、YPDP (glucose、pyruvate)、SD (glucose)、SDGE (glucose、glycerol、ethanol)、這些包含有 2% 葡萄糖的培養基上生長，即使在另外加入 3% 甘油或 2% 酒精甚至二者都加入或是 pyruvate 仍無法生長，推測是在有 glucose 存在下，微生物會先以 glucose 當作能量來源，因為 *CaGPM1* 雙套基因突變株的 phosphoglycerate mutase 已破壞，無法利用 glucose，因此會造成菌落無法生長。但是在 YPGE/uridine 添加 4% goat serum 的培養基上可觀察到菌株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 仍有生長，並不受血清裡的葡萄糖影響，猜測是因為山羊血清裡的葡萄糖只有 0.05~0.075% (Smith M.C., 1994)，濃度太低，因此不影響 *CaGPM1* 雙套基因突變株生長。在圖二十二 < B > SC (synthetic complete medium) 系列培養基可以看到 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 菌株不只在 glycerol 加 ethanol 培養基上會生長 (Poltermann, S., 2007) 而且在只用 glycerol 為碳源的培養基上亦會生長，但是在以 *CaGPM1* 醣解基因下游的化合物 pyruvate、2-PGA 或是 PEP 單獨當作碳源的培養基卻無法生長，猜測在代謝途徑上可能有不同的調控機制。

5.3.3 型態變化之探討

由圖二十三 < A >、< B >、觀察 *CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 於 YPGE/uridine 固態培養皿上，其單一菌落的外觀與 YLO133 相似，外觀平滑，沒有絨毛，其單一菌落的面積小於野生株 SC5314、BWP17、

HLC54、YLO133，面積約為 0.06 cm^2 ，只有 SC5314 的 $1/7$ 大小，明顯小許多；而 *CaGPM1* 單套基因破壞菌株 MAG01 與 BWP17 菌株外觀相似，外圍有絨毛產生，但不明顯；*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 與 SC5314、BWP17 菌株外觀一樣外圍皆有一圈的絨毛產生。在圖二十三 < C > 顯微鏡下同樣可以看到 *CaGPM1* 雙套基因突變株菌落邊緣平滑且沒有長出菌絲，與 YLO133 相似，而 SC5314、BWP17、*CaGPM1* 單套基因突變株 MAG01、*CaGPM1* 單套單因置入補救株 RGP212 皆有菌絲生長，由此可知 *CaGPM1* 基因在 YPGE/uridien 培養基，使菌落型態呈現與對照組不同。

進行芽管實驗了解芽管是否生成，結果顯示 *CaGPM1* 雙套基因突變株 MAG214，約 13% 的細胞芽管生成，但主要的細胞型態仍為酵母菌型約 87% (圖二十五 < A >)，*CaGPM1* 單套基因破壞株 MAG01、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 和 WT、BWP17 幾乎皆為芽管型態，而 YLO133 呈現聚集現象，顯示 *CaGPM1* 可能在細胞形成芽管初期有影響的能力。為了在更進一步了解，觀察到芽管生成是否是因觀察時間較短，而看不出性狀差異，所以再一步將時間點增長為 8、16、32 小時培養，(圖二十五 < B >、< C >、< D >) 結果顯示，培養到 32 小時，*CaGPM1* 雙套基因突變株細胞主要呈現芽管形態，菌絲長度似乎比 4 小時的芽管型態時長一點，但與 WT、BWP17 對照組比其菌絲卻很短，HLC54 不長菌絲，YLO133 可以看到細胞聚集如葡萄串；*CaGPM1* 單套基因破壞株 MAG01 與 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 和 WT、BWP17 一樣為長菌絲型態，*CaGPM1* 基因對於長型菌絲生成能力會有明顯影響；*CaGPM1* 雙套基因破壞株 MAG214 在含山羊血清培養液的細胞型態似乎介於 HLC54 不長菌絲，與 SC5314 會生成長菌絲之間，可知 *CaGPM1* 基因會影響菌絲生長。*CaGPM1* 基因突變後，會明顯地影響菌絲的生長，也損害

血清誘導所長出的 germ tube 及菌絲的形成。

另外，觀察突變株在 YPGE/uridine 添加 4% 血清培養基上，(圖二十四 <A>、、<C>)，結果顯示，*CaGPM1* 雙套基因突變株 MAG214 其菌絲毛茸的放射性存在，但與野生株 SC5314 相比其菌絲似乎是以不規則、不對稱方式存在，而且突變株的菌落表面佈滿皺摺，而野生株 SC5314 卻是以中心為主向外伸長出一圈規則的絨毛在外圍而且範圍很大，其表面沒有皺摺產生，但在 BWP17 除了有一圈絨毛，其表面有不明顯的皺摺，HLC54 與約 80% YLO133 表面皆為光滑、無皺摺產生的，YLO133 有 20% 細胞在倒立式顯微鏡下可以觀察到有菌絲在外圍，此外可以看到其單一菌落的面積小於野生株 SC5314、BWP17、HLC54、YLO133，面積約為 0.09 cm²，只有 SC5314 的 3/7 大小，明顯小許多；而 *CaGPM1* 單套基因破壞株 MAG01 細胞型態大小與 BWP17 較為相似；*CaGPM1* 單套單因置入補救株 RGP212 其細胞型態大小卻與 SC5314 較為相似，因此推測在固態血清誘導細胞型態，*CaGPM1* 基因剔除掉，可能還牽扯到其他調控機制，才會引發細胞以不規則、不對稱激烈型態存在。

另外，觀察突變株在含 4% 山羊血清的 Bacto agar 培養基上，(圖二十六 <A>、)，結果顯示，在營養缺乏的 bacto agar 培養基中 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 沒有單一菌落生成，但在顯微鏡下有觀察到菌株細胞，細胞呈現死亡或是停止生長，此結果與圖二十二 <A> YP (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% agar) YPGES (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 3% (v/v) glycerol, 2% (v/v) ethanol, 4% goat serum, 2% agar) 培養基生長結果去推測 *CaGPM1* 雙套基因突變株在營養缺乏的 bacto agar 只含有 4% 血清是不夠的，需要靠其他的營養源走其他的代謝途徑，才能生長 (附圖三)。

在圖二十七侵犯力分析試驗中可見 *CaGPM1* 雙套基因破壞株對於

solid spider 的侵犯力相當高，在固定水量（水龍頭水不關），沖刷 *CaGPM1* 雙套基因突變株 MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*) 約一分十五秒，即使菌落較其他菌株小顆，但仍不影響其侵犯力，大部分的菌落仍留在培養基上，而對照組 HLC54 沖刷一分十五秒時，已被沖洗乾淨了，此結果與 圖二十四、圖二十五受血清誘發菌絲生長一致，雖然 *CaGPM1* 雙套基因被刪除時，對於開始的芽管生成數少、長菌絲形成型態較 SC5314 短，但又不像 HLC54 不長菌絲，仍有菌絲形成，單一菌落型態與 SC5314 相比卻出現不規則皺摺、不對稱的毛茸生長，所以可推測 *CaGPM1* 基因和型態變化的相關性極高，所造成的型態變化，有可能影響到真菌聚落能力和入侵寄主細胞的能力，而影響致病。

因為在醣解途徑中，*CaGPM1* 為在 *CaENO1* 的上游，因此將本實驗的性狀分析結果與實驗室柯惠菁所做的 *CaENO1* 雙套基因突變株性狀分析結果做比較（表二），可以發現有些許不同，因此可以得知，*CaGPM1* 與 *CaENO1* 雖然同樣是醣解作用中的酵素，但在其它方面的角色扮演上仍有些不同。

5.4 未來展望

本論文主要採用 gene targeting 之方法（Wilson, *et al.* , 1999）將目標基因以同源重組的方式進行突變及單套基因置入補救之建構，以醣解酵素基因 *CaGPM1* 為目標基因，利用同源重組之方式將單套、雙套基因進行破壞以及將帶有單套 *CaGPM1* 基因和其啟動子與篩選標記 *HIS1* 的質體置換到雙套基因使 *CaGPM1* 恢復基因功能，將三種菌株作基因功能之研究。所得到之突變菌株以 PCR、南方墨點法及北方墨點法確認，在利用 Wilson 等人所述方式進行基因破壞方面，得到單套基因破壞株(heterozygous knockout) MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*) 和 MUG33

(*Cagpm1::URA3/CaGPM1*)；再從二種單套基因破壞株，分別取得帶有同源區域的篩選標記 *ARG4*、*URA3* 的 DNA 片段，進行第二套基因破壞，取得雙套基因破壞株 (homozygous knockout) MAU23、MAU214、MUA55、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)；在利用具有 *CaGPM1* 單套基因和其啟動子與篩選標記 *HIS1* 的質體，已成功地被將其置入雙套基因破壞株 MAU214、MUA67 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)，得到可以恢復 *CaGPM1* 基因功能的 *CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212、RGP215、RGP673、RGP674 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*)；從上述的突變株，選出單套基因破壞株 (heterozygous knockout) MAG01 (*Cagpm1::ARG4/CaGPM1*)、雙套基因破壞株 (homozygous knockout) MAU214 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3*)、*CaGPM1* 單套基因置入補救株 RGP212 (*Cagpm1::ARG4/Cagpm1::URA3::CaGPM1-HIS1*) 進行藥物測試 (Etest)、型態分析，觀察在雙套基因被剔除以及單套基因置入恢復其功能後之型態變化，得到結論為 *Cagpm1/Cagpm1* 雙套基因破壞株會受 caspofungin、amphotericin B 影響更敏感；會影響菌絲形成，但又不像 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 這麼明顯不長；會造成細胞生長緩慢、型態改變，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。至於 *CaGPM1* 醣解酵素基因和致病力之間的關連，未來可以利用動物模式將突變株進行 in vivo 的試驗，探究突變株實際上對白色念珠菌致病能力的影響，此外會在進行 broth microdilution methode 與 agar dilution assay 以定量的方式，更確認與藥物抗藥性有相關。

六、參考文獻

- 孔祥琪、陳宜君 (90) 全身性抗黴菌藥物治療的最新進展 全身性抗黴菌藥物治療的最新進展
http://www.Sim.Org.Tw/journal/jour12-3/p12_132.Pdf.
- 吳宛真 (2005) 交大碩士論文。白色念珠菌抗藥基因 *cdr1* 之異位調控因子 *rep3*、*rep4* 與 *rep5* 之遺傳學研究.
- 李建雄, 端木梁., 翁郁嘉, 黃淑姿 (1998) 生物化學. 藝軒出版社, 263-273 頁.
- 林啟陽 (2001) 交大碩士論文。白色念珠菌抗毒性相關之研究.
- 郭大榮 (2002) 交大碩士論文。白色念珠菌之 *efg1* 和/或 *cph1* 下游基因的分類與確認.
- 陳杏芳 (2004) 交大碩士論文。以同源重組技術對白色念珠菌的醣解酵素基因 *tpi1* 及 *eno1* 置入可調控之 TR 啟動子作突變分析.
- 蕭婷尹 (2006) 交大碩士論文。白色念珠菌之致病力/型態變化及抗藥性可經由麥角固醇生合成及醣解酵素基因進行協同調控.
- Akins, R. A. (2005) An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 43(285-318).
- Albertson, G. D., Niimi, M., Cannon, R. D. & Jenkinson, H. F. (1996) Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(12), 2835-41.
- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J. R., Schaller, M., De Groot, P., Maccallum, D., Odds, F. C., Schafer, W., Klis, F., Monod, M. & Hube, B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem*, 281(2), 688-94.

- Angiolella, L., Micocci, M. M., D'alessio, S., Girolamo, A., Maras, B. & Cassone, A. (2002) Identification of major glucan-associated cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(6), 1688-94.
- Angiolella, L., Vitali, A., Stringaro, A., Mignogna, G., Maras, B., Bonito, M., Colone, M., Palamara, A. T. & Cassone, A. (2009) Localisation of bgl2p upon antifungal drug treatment in *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*, 33(2), 143-8.
- Anthonsen, H. W., Baptista, A., Drablos, F., Martel, P., Petersen, S. B., Sebastiao, M. & Vaz, L. (1995) Lipases and esterases: A review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnol Annu Rev*, 1(315-71).
- Berman, J. (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 9(6), 595-601.
- Berman, J. & Sudbery, P. E. (2002) *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*, 3(12), 918-30.
- Borg-Von Zepelin, M., Beggah, S., Boggian, K., Sanglard, D. & Monod, M. (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases sap4 to sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol*, 28(3), 543-54.
- Bruno, V. M. & Mitchell, A. P. (2005) Regulation of azole drug susceptibility by *Candida albicans* protein kinase ck2. *Mol Microbiol*, 56(2), 559-73.
- Burkhard, R. B., Head, W.S., Wang, M.X., and Johnson, A.D. (2000) Identification and characterization of tup1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*, 156(31-44).
- Buurman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J., Odds, F. C. & Gow, N.

- A. (1998) Molecular analysis of *camnt1p*, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7670-5.
- Calderone, R., Diamond, R., Senet, J.M., Warmington, J., Filler, S., and Edwards, J.E. (1994) Host cell-fungal cell interactions. *J Med Vet Mycol*, 32(151-168).
- Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9(7), 327-35.
- Casanova, M., Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Llombart-Bosch, A., Sentandreu, R., and Martinez, J.P (1992) Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: Comparison with other techniques. *Infect Immun*, 60(4221-4229).
- Chen, C. G., Yang, Y. L., Shih, H. I., Su, C. L. & Lo, H. J. (2004) *Candt80* is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating *cdr1*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12), 4505-12.
- Chen, Y. C., Chang, S.C., Sun, C.C., Yang, L.S., Hsieh, W.C., Luh, K.T (1997) Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in taiwan, 1981 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 18(369-375).
- Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhauser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille, J. & Sanglard, D. (2006) A mutation in *tac1p*, a transcription factor regulating *cdr1* and *cdr2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*, 172(4), 2139-56.

- Coste, A. T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J. & Sanglard, D. (2004) *Tac1*, transcriptional activator of *cdr* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* abc transporters *cdr1* and *cdr2*. *Eukaryot Cell*, 3(6), 1639-52.
- Crowe, J. D., Sievwright, I. K., Auld, G. C., Moore, N. R., Gow, N. A. & Booth, N. A. (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: Identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol*, 47(6), 1637-51.
- Daniels, K. J., Srikantha, T., Lockhart, S. R., Pujol, C. & Soll, D. R. (2006) Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *EMBO J*, 25(10), 2240-52.
- De Bernardis, F., Arancia, S., Morelli, L., Hube, B., Sanglard, D., Schafer, W. & And Cassone, A. (1999) Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular *sap2*, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis*, 179(201-8).
- De Bernardis, F., Cassone, A., Sturtevant, J. & Calderone, R. (1995) Expression of *candida albicans sap1* and *sap2* in experimental vaginitis. *Infect Immun*, 63(5), 1887-92.
- De Micheli, M., Bille, J., Schueller, C. & Sanglard, D. (2002) A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* abc transporters *cdr1* and *cdr2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol*, 43(5), 1197-214.
- Denning, D. W. (2003) Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 362(9390), 1142-51.
- Dickinson Jr and, W. A. (1986) A genetic and biochemical analysis of the role of gluconeogenesis in sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen*

Microbiol 132(9), 2605-10

Douglas, L. J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, 11(1), 30-6.

Enjalbert B, S. D., Cornell Mj, Alam I, Nicholls S, Brown Aj, Quinn J. (2006) Role of the *hog1* stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 17(2), 1018-32.

Ernst, J. F. (2000) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146 (Pt 8)(1763-74.

Fasoli, M. O., Kerridge, D., Morris, P. G. & Torosantucci, A. (1990) 19f nuclear magnetic resonance study of fluoropyrimidine metabolism in strains of *Candida glabrata* with specific defects in pyrimidine metabolism. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(10), 1996-2006.

Federico, N. G., Rebeca, A.M., Hortensia, R., Jesus, P., Rafael, S. And Cesar, N (1998) A role for the map kinsae gene *mkc1* in cell construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology*, 144(4)11-424.

Felk a, S. W., Hube B (2000) *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (*sap10*) gene accession number af146440.

Fernandez-Arenas, E., Molero, G., Nombela, C., Diez-Orejas, R. & Gil, C. (2004) Low virulent strains of *Candida albicans*: Unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics*, 4(10), 3007-20.

Filler, S. G., Pfunder, A. S., Spellberg, B. J., Spellberg, J. P. & Edwards, J. E., Jr. (1996) *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun*, 64(7),

2609-17.

- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W. A., Belanger, P. H., Edwards, J. E., Jr. & Filler, S. G. (1998) Expression of the *Candida albicans* gene *als1* in *saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun*, 66(4), 1783-6.
- Gacser, A., Stehr, F., Kroger, C., Kredics, L., Schafer, W. & Nosanchuk, J. D. (2007) Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 75(10), 4710-8.
- Gale, C. A., C. M. Bendel, M. McClellan, M. Hauser, J. M. Becker, J. Berman, and M. & Hostetter, K. (1998) Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *int1*. *Science*, 279(5355), 1355-8.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M. & D'enfert, C. (2004) *Candida albicans* biofilms: A developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell*, 3(2), 536-45.
- Garrett, R. H. A. G., C.M (2002) Principles of biochemistry, with a human focus. *Harcourt College Publishers*, 471-490.
- Gaur, N. A., Puri, N., Karnani, N., Mukhopadhyay, G., Goswami, S. K. & Prasad, R. (2004) Identification of a negative regulatory element which regulates basal transcription of a multidrug resistance gene *cdr1* of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 4(4-5), 389-99.
- Georgopapadakou, N. H. (1998) Antifungals: Mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol*, 1(5), 547-57.
- Georgopapadakou, N. H. (2001) Update on antifungals targeted to the cell wall:

- Focus on beta-1,3-glucan synthase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, 10(2), 269-80.
- Ghannoum, M. A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 13(1), 122-43, table of contents.
- Ghannoum, M. A. & Rice, L. B. (1999) Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 12(4), 501-17.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. & Kirsch, D. R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S cerevisiae ura3* and e. Coli pyr^r mutations. *Mol Gen Genet*, 198(1), 179-82.
- Haynes, K. (2001) Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*, 9(12), 591-6.
- Heinisch Jj, M. S., Schlüter E, Jacoby J, Rodicio R. (1998) Investigation of two yeast genes encoding putative isoenzymes of phosphoglycerate mutase. *Yeast*, 14(3), 203-13.
- Hitchcock, C. A. (1993) Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem Soc Trans*, 21(4), 1039-47.
- Hoover, C. I., Jantapour, M. J., Newport, G., Agabian, N. & Fisher, S. J. (1998) Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase b (plb1) gene. *FEMS Microbiol Lett*, 167(2), 163-9.
- Hostetter, M. K. (2000) Rgd-mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. *Curr Opin Microbiol*, 3(4), 344-8.
- Hoyer, L. L. (2001) The als gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9(4), 176-80.

- Hoyer, L. L., Scherer, S., Shatzman, A. R. & Livi, G. P. (1995) *Candida albicans als1*: Domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol*, 15(1), 39-54.
- Hsueh, P. R., Chen, M. L., Sun, C. C., Chen, W. H., Pan, H. J., Yang, L. S., Chang, S. C., Ho, S. W., Lee, C. Y., Hsieh, W. C., and Luh, K. T. (2002) Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in taiwan, 1981-1999. *Emerging Infectious Disease*, 8(1), 63-8.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. & Gow, N. A. (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 14(1), 87-99.
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A. J. & Gow, N. A. (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *sap1*, *sap2*, and *sap3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun*, 65(9), 3529-38.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. & Schafer, W. (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: Cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*, 174(5), 362-74.
- Hwang, C. S., Oh, J. H., Huh, W. K., Yim, H. S. & Kang, S. O. (2003) Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 47(4), 1029-43.
- Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Sanglard, D., Edwards, J. E., Jr. & Hube, B. (1998) Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. *Infect Immun*, 66(6), 3003-5.
- Kadosh, D. & Johnson, A. D. (2001) Rfg1, a protein related to the

- Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator rox1, controls filamentous growth and virulence in *candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 21(7), 2496-505.
- Kamai, Y., Kubota, M., Hosokawa, T., Fukuoka, T. & Filler, S. G. (2002) Contribution of *Candida albicans* als1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun*, 70(9), 5256-8.
- Kapteyn Jc, H. L., Hecht Je, Muller Wh, Andel a, Verkleij Aj, Makarow M, Van Den Ende H, Klis Fm (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol*, 35(601-611.
- Karnani, N., Gaur, N. A., Jha, S., Puri, N., Krishnamurthy, S., Goswami, S. K., Mukhopadhyay, G. & Prasad, R. (2004) Sre1 and sre2 are two specific steroid-responsive modules of candida drug resistance gene 1 (cdr1) promoter. *Yeast*, 21(3), 219-39.
- Klein, C. J., Olsson, L. & Nielsen, J. (1998) Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of mig1 in metabolic functions. *Microbiology*, 144 (Pt 1)(13-24.
- Klotz, S. A., Rutten, M. J., Smith, R. L., Babcock, S. R. & Cunningham, M. D. (1993) Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. *Microb Pathog*, 14(2), 133-47.
- Kohler, J. R. & Fink, G. R. (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 13223-8.

- Lam Keng-Bon and, M. J. (1977) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* glycolytic pathway mutants. *J Bacteriol*, 130(2), 746-9.
- Lamb, D., Kelly, D. & Kelly, S. (1999) Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. *Drug Resist Updat*, 2(6), 390-402.
- Lamping, E., Monk, B. C., Niimi, K., Holmes, A. R., Tsao, S., Tanabe, K., Niimi, M., Uehara, Y. & Cannon, R. D. (2007) Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 6(7), 1150-65.
- Lan, C. Y., Newport, G., Murillo, L. A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R. W. & Agabian, N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23), 14907-12.
- Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. & Ghannoum, M. A. (1998) Cloning and disruption of *cap1b1*, a phospholipase b gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 273(40), 26078-86.
- Leng, P., Lee, P. R., Wu, H. & Brown, A. J. (2001) *Efg1*, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol*, 183(13), 4090-3.
- Lipke, P. N., D. Wojciechowicz, and J. Kurjan. (1989) *Ag alpha 1* is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol Cell Biol*, 9(8), 3155-65.

- Liu, H., Kohler, J. & Fink, G. R. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *ste12* homolog. *Science*, 266(5191), 1723-6.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., Didomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G. R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), 939-49.
- Lo, H. J., Wang, J. S., Lin, C. Y., Chen, C. G., Hsiao, T. Y., Hsu, C. T., Su, C. L., Fann, M. J., Ching, Y. T. & Yang, Y. L. (2005) *Efg1* involved in drug resistance by regulating the expression of *erg3* in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(3), 1213-5.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. & Kelly, S. (2002) Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*, 8(2), 76-81.
- Lyons, C. N. & White, T. C. (2000) Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(9), 2296-303.
- Mazur, P. & Baginsky, W. (1996) In vitro activity of 1,3-beta-d-glucan synthase requires the gtp-binding protein rho1. *J Biol Chem*, 271(24), 14604-9.
- Mitchell, A. P. (1998) Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 1(6), 687-92.
- Mitchell, J. R. B. A. A. P. (2006) How to build a biofilm: A fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9(588-594).
- Monod, M., Hube, B., Hess, D. & Sanglard, D. (1998) Differential regulation of *sap8* and *sap9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology*, 144 (Pt 10)(2731-7.

- Motshwene P, B. W., Lindsey G. (2003) Significant quantities of the glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase are present in the cell wall of yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J*, 369(357-362).
- Mukherjee Pk, G. M. (2002) Secretory proteins in fungal virulence. In: Calderone ra, cihlar rl, eds. Fungal pathogenesis: Principles and clinical applications. *New York: Marcel Dekker*;, 51-79.
- Murad, A. M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., Maccallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaia, F., D'enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F. C. & Brown, A. J. (2001) Nrg1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J*, 20(17), 4742-52.
- Murillo La, N. G., Lan Cy, Habelitz S, Dungan J, Agabian Nm (2005) Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 4(1562-1573).
- Naglik, J. R., Newport, G., White, T. C., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, J. S., Greenspan, D., Sweet, S. P., Challacombe, S. J. & Agabian, N. (1999) In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun*, 67(5), 2482-90.
- Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Bouin, A. P., Sensen, C. W., Hogues, H., Van Het Hoog, M., Gordon, P., Rigby, T., Benoit, F., Tessier, D. C., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (2002) Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell*, 13(10), 3452-65.
- Negre, E., Vogel, T., Levanon, A., Guy, R., Walsh, T. J. & Roberts, D. D. (1994)

- The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 269(35), 22039-45.
- Perea, S., Lopez-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., Mcatee, R. K., Santillan, R. A., Martinez, M., Calabrese, D., Sanglard, D. & Patterson, T. F. (2001) Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(10), 2676-84.
- Peter Smits H, H. J., Müller S, Hobley Tj, Zimmermann Fk, Hahn-Hägerdal B, Nielsen J, Olsson L. (2000) Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16(14), 1325-34
- Poltermann, S., Kunert, A., Von Der Heide, M., Eck, R., Hartmann, A. & Zipfel, P. F. (2007) Gpm1p is a factor h-, fhl-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 282(52), 37537-44.
- Prasad, R., Gupta, N., Gaur, M. (2004) Molecular basis of antifungal resistance, in pathogenic fungi. Caister academic press, norfolk, u.K. Pp357-414. Caister academic press,norfolk, u.K.
- Prasad, R., Panwar, S. L. & Smriti (2002) Drug resistance in yeasts--an emerging scenario. *Adv Microb Physiol*, 46(155-201).
- Prasad R, D. W. P., Goffeau a, Balzi E (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *cdr1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet*, 27(4), 320-329.
- Prasad, R. A. K., K. (2005) Multidrug resistance in yeast *candida*. *International*

review of cytology 242(pp. 215-248.

- Price Nc, J. R. (1982) The quaternary structure of phosphoglycerate mutase from yeast: Evidence against dissociation of the tetrameric enzyme at low concentrations. *FEBS Lett* 143(2), 283-6
- Puri, N., Krishnamurthy, S., Habib, S., Hasnain, S. E., Goswami, S. K. & Prasad, R. (1999) Cdr1, a multidrug resistance gene from *Candida albicans*, contains multiple regulatory domains in its promoter and the distal ap-1 element mediates its induction by miconazole. *FEMS Microbiol Lett*, 180(2), 213-9.
- Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T. F., Wickes, B. L. & Lopez-Ribot, J. L. (2002) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 49(6), 973-80.
- Ramsey, H., Morrow, B. & Soll, D. R. (1994) An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153a. *Microbiology*, 140 (Pt 7)(1525-31.
- Richard Ml, N. C., Bruno Vm, Mitchell Ap (2005) *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell*, 4(1493-1502.
- Rodicio R, H. J., Hollenberg Cp. (1993) Transcriptional control of yeast phosphoglycerate mutase-encoding gene. *Gene* 125(2), 125-33
- Rodicio Rosaura and , H. J. (1987) Isolation of the yeast phosphoglyceromutase gene and construction of deletion mutants. *Mol Gen Genet* 206(1):133-40
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning : A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, cold spring

harbor, new york.

- Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F. C. & Gow, N. A. (1997) A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *sap4*, *sap5*, and *sap6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun*, 65(9), 3539-46.
- Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Micheli, M. & Bille, J. (1998) Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resist Updat*, 1(4), 255-65.
- Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J. & Bille, J. (2003) Calcineurin a of *Candida albicans*: Involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol*, 48(4), 959-76.
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. & Bille, J. (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(10), 2300-5.
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. & Bille, J. (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: Characterization of *cdr2*, a new multidrug abc transporter gene. *Microbiology*, 143 (Pt 2)(405-16.
- Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M. & Bille, J. (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from aids patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(11), 2378-86.
- Sanglard, D. & Odds, F. C. (2002) Resistance of *Candida species* to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect*

Dis, 2(2), 73-85.

Sanglard D, B. J. (2002) Current understanding of the modes of action of and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of candida infections. In: *Calderone racandida and Candidiasis*. Washington: Asm press. PP.349-383.

Sasaki, R., Utsumi, S., Sugimoto, E. & Chiba, H. (1976) Subunit structure and multifunctional properties of yeast phosphoglyceromutase. *Eur J Biochem*, 66(3), 523-33.

Saville Sp, T. D., López Ribot JI (2006) A role for efg1p in *Candida albicans* interactions with extracellular matrices. *FEMS Microbiol Lett*, 256(1), 151-8.

Schaller, M., Bein, M., Korting, H. C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., Beinhauer, S. & Hube, B. (2003) The secreted aspartyl proteinases sap1 and sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal *candidiasis* based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun*, 71(6), 3227-34.

Schofield, D. A., Westwater, C., Warner, T. & Balish, E. (2005) Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiol Lett*, 244(2), 359-65.

Slutsky, B., Buffo, J. & Soll, D. R. (1985) High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*, 230(4726), 666-9.

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. & Soll, D. R. (1987) "White-opaque transition": A second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 169(1), 189-97.

Smith, M. C. A. S., D.M. (1994) *Goat medicine*, (Lea & Febiger, PA. USA.).

- Soll, D. R. (2002) *Candida* commensalism and virulence: The evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop*, 81(2), 101-10.
- Soll, D. R., Langtimm, C. J., McDowell, J., Hicks, J. & Galask, R. (1987) High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J Clin Microbiol*, 25(9), 1611-22.
- Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, M. Gerads, K. Kurpanek, D. Sanglard, and J. F. Ernst. (2000) Protein kinase a encoded by *tpk2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 35(2), 386-96.
- St Georgiev, V. (2000) Membrane transporters and antifungal drug resistance. *Curr Drug Targets*, 1(3), 261-84.
- Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L. & Sundstrom, P. (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* hwp1. *Science*, 283(5407), 1535-8.
- Stehr, F., Felk, A., Gacser, A., Kretschmar, M., Mahnss, B., Neuber, K., Hube, B. & Schafer, W. (2004) Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res*, 4(4-5), 401-8.
- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E. & Ernst, J. F. (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bhlh proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J*, 16(8), 1982-91.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. & Ernst, J. F. (1998) Multiple functions of *pmt1p*-mediated protein o-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 273(33), 20837-46.
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schroppel, K. & Ernst, J. (2000)

- Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 182(11), 3063-71.
- Tkacz Js, D. B. (2001) Antifungals: What's in the pipeline. *Curr Opin Microbiology*, 4(5), 540-45. Review.
- Tripathi, G., Wiltshire, C., Macaskill, S., Tournu, H., Budge, S. & Brown, A. J. (2002) Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J*, 21(20), 5448-56.
- Umeyama, T., Kaneko, A., Nagai, Y., Hanaoka, N., Tanabe, K., Takano, Y., Niimi, M., & And Uehara, Y. (2005) *Candida albicans* protein kinase cahs11p regulates cell elongation and virulence. *Mol Microbiol* 55(381-395.
- Vanden Bossche, H., Dromer, F., Improvisi, I., Lozano-Chiu, M., Rex, J. H. & Sanglard, D. (1998) Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol*, 36 Suppl 1(119-28.
- Vanden Bossche H, M. P., Odds Fc (1994) Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol*, 2(10), 393-400.
- Vermitsky, J. P. & Edlind, T. D. (2004) Azole resistance in *Candida glabrata*: Coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10), 3773-81.
- Wenzel, R. P., and C. Gennings. (2005) Bloodstream infections due to candida species in the intensive care unit: Identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl(6), S389-93.

- White Mf and , F.-G. L. (1990) Mutase versus synthase: The phosphoglycerate mutase family studied by protein engineering. . *Biochem Soc Trans* 18(2), 257
- White Mf and, F.-G. L. (1992) Development of a mutagenesis, expression and purification system for yeast phosphoglycerate mutase. Investigation of the role of active-site his181. *Eur J Biochem* 207(2), 709-14
- White, T. C. (1997) Increased mrna levels of erg16, cdr, and mdr1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(7), 1482-7.
- White, T. C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L. F. & Stevens, D. A. (2002) Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(6), 1704-13.
- White, T. C., Marr, K. A. & Bowden, R. A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 11(2), 382-402.
- Wilson, R. B., Davis, D. & Mitchell, A. P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol*, 181(6), 1868-74.
- Wu, C. J., Lee, H. C., Lee, N. Y., Shih, H. I., Ko, N. Y., Wang, L. R. & Ko, W. C. (2006) Predominance of gram-negative bacilli and increasing antimicrobial resistance in nosocomial bloodstream infections at a university hospital in southern taiwan, 1996-2003. *J Microbiol Immunol Infect*, 39(2), 135-43.
- Yang, Y.-L. (2003) Virulence factors of *Cnadida species*. *J.Microbiol Immunol*

Infect, 36(223-228).

Yang, Y. L. & Lo, H. J. (2001) Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect*, 34(2), 79-86.

Zhao, X., Oh, S. H., Cheng, G., Green, C. B., Nuessen, J. A., Yeater, K., Leng, R. P., Brown, A. J. & Hoyer, L. L. (2004) Als3 and als8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between als3p and als1p. *Microbiology*, 150(Pt 7), 2415-28.

Zhao, X., Oh, S. H., Yeater, K. M. & Hoyer, L. L. (2005) Analysis of the *Candida albicans* als2p and als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the als family. *Microbiology*, 151(Pt 5), 1619-30.

