

# 探討剔除 *RHD3* 對白色念珠菌型態變化之影響

## 摘要

白色念珠菌為伺機性感染之病源菌，在健康的人體中共生於皮膚、腸胃道和生殖道黏膜表面。對於免疫功能不全的個體，則可能會造成疾病。目前的研究已知白色念珠菌的型態轉變能力和致病力有相關性，先前本實驗室比對過非致病株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)和野生株 SC5314 的基因表現情形，發現 *RHD3* 的表現量在 HLC54 中遠大於野生株，因此想要探討 *RHD3* 和型態轉變以及致病力之間的關聯性。對於 *RHD3* 的研究目前已知其存在於細胞壁上，為 GPI-anchored protein，且大量出現在酵母菌型的細胞壁中。但對於 *RHD3* 在白色念珠菌的型態轉變中所扮演的角色和功能依舊不清楚。因此希望藉由剔除 *rhd3* 和提高 *RHD3* 的表現量，來觀察白色念珠菌的變化，藉以推測 *RHD3* 在白色念珠菌中可能的功能和角色。使用的策略有利用營養基因和 *SAT1 flipper cassette* 當作篩選標記，進行 *RHD3* 的剔除。以及使用 tetracycline-regulated promoter 和 *ACT1* promoter 進行 *RHD3* 的過量表現。結果在過量表現 *RHD3* 的部分，*RHD3* 的表現量約等同於野生株，並未提高接近 HLC54 中的表現量。而 *RHD3* 的剔除不影響白色念珠菌的型態轉變。

Functional Study of *RHD3* Null Mutation on Morphogenesis of  
*Candida albicans*

Abstract

*Candida albicans* is an opportunistic pathogen. It is commensal on human skin, gastrointestinal and genitourinary tract in healthy individuals. However, it can cause diseases in immunocompromised people. The pathogenicity of *C. albicans* is related to its ability of yeast-hyphae transition. Previous expression profiling study has showed that *RHD3* has higher expression in *cph1/cph1 efd1/efd1* avirulent mutant than in the wild-type, SC5314. Therefore, *RHD3* might be related to the ability of transition or virulence.

*RHD3* is a GPI-anchored protein located at cell surface, especially on cell wall. And it is abundant in yeast form *C. albicans* cell. However, the role of *RHD3* in *C. albicans* is not clear. Therefore, I try to delete *RHD3* with nutrient markers as well as *SAT1* flipper cassette, and to over-express *RHD3* by tetracycline-regulated promoter and *ACT1* promoter.

The results showed that the expression level in over-expression mutants remained similar to that of wild-type, and the null mutations did not affect the morphogenesis of the *C. albicans*.

## 致謝

感謝所有在碩士生涯中幫助過我的人。首先，感謝小楊老師，在我當專題生時就一直受到老師的指導，老師總是要求必須能將自己做的研究清楚的表達給其他人知道，對實驗的結果判讀必須要合乎理論及邏輯，以及要清楚的知道自己的研究目的為何，令我受益良多。感謝我的口試委員：羅秀容老師、藍忠昱老師和黃兆祺老師，感謝你們當我的口試委員，以及提供的意見。由其是藍老師所說的 negative result 也許是 positive research 的開端，令我非常感動。感謝謝家慶老師提供我質體，令我的實驗可以順利進行。感謝實驗室的大家，大胃王李淑萍，周末總會一起約去假日花市，兩手提滿大包小包的食物，一起吃喝回家。總是期待你唱歌破音的胡曼秀，個性溫和也很會鼓勵人，雖然結尾總是不經意的放出冷箭。憨厚傻氣的藍敏書，老是拿垃圾桶練習投藍，不過我沒練還是比你強啦。溫柔大方的許淑貞，你悄悄的來又悄悄的走，偶爾也陪我玩一下咩。我可愛的 sunny 蔣，會陪我一起聊新書，會陪我一起聊實驗，又像媽媽一樣的照顧我，在我想偷懶時盯緊我的進度。在國衛院看起很不好惹的佳真，不管說話或做事都很阿撒力，很有大姐頭的氣勢。比我要愛美的酷哥，感謝你的義氣相挺，我愛你~~。最近變得有點瘋狂的妍寧，總是永遠的開朗樂觀，並且跟我一起奮鬥到最後(感動)。超愛海綿寶寶的洪優優，對酒精抗性很弱，只要一點點就會發瘋。媚妹的老公蟲哥哥，IRES 的媽蔡阿錨，快帶他們給我玩，我要看打架的場面。新鮮魚之不我 pass，每次都報太久，真是 very terrible 捏。還有好~~~~~可愛的黃阿大，謝謝你老是被我拖著跑來跑去，雖然後來開始反抗我讓我覺得你很不乖。阿白、阿賢，*Candida* 組要好好發揚光大，打敗 *Dengus* 組，尤其是長的像郭鑫，身高 180 cm 的劉凱薩。還有在國衛院溫柔的惠菁學姐，以及小小隻的小善姐姐，謝謝你們常常幫我送定序。感謝阿

毛和咏馨，我最重要的朋友們。從大學就一直受你們的照顧，阿毛雖然有時會對我兇，但是你還是很愛我，因為我難過的時候，你都會聽我碎碎念。咏馨不大會對我兇，但是會賞我白眼，不過不管有什麼活動，都不會忘了把我一起帶走。所以我也好愛你們喔~~~(啾~~)。最後是我最愛的家人們，一直想要我找個好男人的奶奶，常常跟我唱日本演歌的爺爺，老是逼我去考公務員的姑姑們，很希望我出國的老爸，每次我回家就會煮好料的老媽，動漫供應站老弟，以及會陪我逛街的老妹。因為家中人多意見也多老是令我不堪負荷，但是沒有你們就沒有我，我還是最愛你們了。再次謝謝大家，我畢業了~~~~~＼(^o^)/



## 目錄

一、緒論 .....	1
1.1 前言 .....	1
1.2 白色念珠菌型態轉變(morphogenesis)對毒性的影響 .....	1
1.3 <i>RHD3(PGA29)</i> 介紹 .....	3
1.4 研究動機 .....	4
二、材料 .....	6
2.1 菌株 .....	6
2.2 質體 .....	8
2.3 引子 .....	12
2.3.1 針對使用營養基因缺陷篩選法將 <i>RHD3</i> 基因踢除所設計的引子 .....	12
2.3.2 針對使用四環黴素調控表現系統 TR system 所設計的引子 .....	12
2.3.4 針對使用 p6HF-ACT1 質體過量表現 <i>RHD3</i> 所設計的引子	13
2.3.5 針對使用 SAT1 system 踢除 <i>RHD3</i> 基因所設計的引子 .....	13
2.3.6 針對使用 SAT1 system 過量表現 <i>RHD3</i> 基因所設計的引子 .....	14
2.3.7 篩選用引子 .....	14
2.3.8 針對探針所設計的引子 .....	15
2.3.9 針對定序所設計的引子 .....	16
2.4 化學藥品 .....	16
2.5 酵素 .....	18
2.6 藥品配製 .....	18
2.6.1 緩衝溶液及溶劑 .....	18

2.6.2 培養基配置 .....	19
2.7 儀器設備 .....	21
<b>三、方法與步驟 .....</b>	<b>23</b>
3.1 大腸桿菌勝任細胞(Competent cell)的製備 .....	23
3.2 大腸桿菌勝任細胞的轉型(Transformation) .....	23
3.3 質體 DNA 的萃取 .....	23
3.3.1 使用 Permier ExcelPure™ Plasmid Mini Kit .....	23
3.3.2 使用 PROTECH Gene-Spin™-V <sup>2</sup> Miniprep Purification Kit ...	24
3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	25
3.4.1 Fermentas Taq DNA polymerase .....	25
3.4.2 NEB Tag DNA polymerase .....	25
3.4.3 TaKaRa EX Taq .....	25
3.4.4 PCR 溫度控制儀程式設定 .....	26
3.5 限制酶反應 .....	26
3.5.1 Cloning 片段製備 .....	26
3.5.2 質體 check .....	26
3.6 萃取洋菜膠中的 DNA 片段 (Gel extraction) .....	26
3.6.1 配製含有結晶紫的洋菜膠 .....	26
3.6.2 萃取洋菜膠中的 DNA 片段 .....	27
3.7 接合反應 (Ligation) .....	27
3.8 TA clone (使用 PROMEGA pGEM-T vector) .....	27
3.9 白色念珠菌的轉型 (Transformation) .....	28
3.9.1 熱休克法(Heat shock) .....	28
3.9.2 電穿孔法(electroporation) .....	28
3.10 Maltose 誘發 SAT1 cassette pop-out .....	29

3.11 Replica .....	29
3.12 Genomic DNA 純化 .....	30
3.12.1 冷熱法萃取 .....	30
3.12.2 傳統法萃取 .....	30
3.13 南方點墨法 .....	31
3.13.1 探針(probe)的合成 .....	31
3.13.2 南方點墨法 .....	32
3.14 RNA 萃取 .....	34
3.14.1 Doxycycline 誘發 .....	34
3.14.2 轉養 .....	34
3.14.3 RNA 萃取 .....	34
3.15 北方點墨法 .....	35
3.15.1 探針(probe)的合成 .....	35
3.15.2 北方點墨法 .....	35
3.16 突變株之性狀分析(Characterization) .....	37
3.16.1 誘發菌絲生長觀察型態轉變 .....	37
3.16.2 芽管試驗(germ tube assay) .....	38
3.16.3 侵犯力測試(invasion assay) .....	38
四、結果 .....	39
4.1 使用營養標記篩選建構 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株 .....	39
4.1.1 在質體 pBluescript II SK+ 上建構 <i>RHD3</i> 剔除片段 .....	39
4.1.2 建構 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除菌株 .....	40
4.1.3 南方點墨法確認 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株 .....	41
4.2 建構四環黴素調控表現 <i>RHD3</i> 的菌株 .....	42
4.2.1 在質體 p99CAU 上建構欲置入白色念珠菌中以調控表現	

<i>RHD3</i> 的片段.....	43
4.2.2 以 PCR 和南方點墨法進行調控表現 <i>RHD3</i> 菌株之確認 ...	43
4.2.3 以北方點墨法確認 <i>RHD3</i> 的表現.....	44
4.3 建構利用 p6HF-ACT1 表現 <i>RHD3</i> 的菌株.....	45
4.3.1 將 <i>RHD3</i> 接入質體 p6HF-ACT1.....	45
4.3.2 將 p6RHD3 送入白色念珠菌中 .....	46
4.3.3 將 p6HF-ACT1 送入白色念珠菌中 .....	46
4.3.4 以南方點墨法確認菌株 .....	46
4.3.5 以北方點墨法確認 <i>RHD3</i> 基因表現.....	48
4.4 使用 SAT1 flipper cassette 篩選建構 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株 ..	48
4.4.1 在質體 pSFS-SAT1 上建構 <i>RHD3</i> 剔除片段.....	49
4.4.2 建構 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株.....	49
4.5 建構以 SAT1 flipper cassette 為篩選標記使用 ACT1 promoter 表現 <i>RHD3</i> 的菌株 .....	51
4.5.1 建構片段：A region-ACT1 promoter-RHD3-SAT1 flipper cassette-B region .....	51
4.5.2 建構以 ACT1 promoter 表現 <i>RHD3</i> 的菌株 .....	52
4.5.3 以南方點墨法確認 <i>RHD3</i> 單套、雙套踢除株以及 ACT1 promoter 表現株 .....	53
4.5.4 以北方點墨法確認 <i>RHD3</i> 的表現量 .....	53
4.5.5 定序確認 ACT1 promoter 的序列 .....	54
4.6 使用不同區域的 ACT1 promoter 取代 78Sov 所用的 ACT1 promoter .....	54
4.6.1 以新的 ACT1 promoter 去取代 pBACT78 上原始的 promoter .....	55

4.6.2 將新的 <i>ACT1</i> promoter 表現之 <i>RHD3</i> 接上 <i>SAT1</i> flipper cassette .....	56
4.6.3 將新的 <i>ACT1</i> promoter 表現之 <i>RHD3</i> 送入白色念珠菌雙套剔除株中.....	57
4.6.4 進行南方點墨法確認菌株 78SovA、78SovB、78SovC、78SovD 和 78SovE .....	58
4.6.5 以北方點墨法確認 <i>RHD3</i> 的表現量 .....	59
4.7 性狀分析-以營養篩選之 <i>RHD3</i> 單套、雙套踢除株 .....	59
4.7.1 菌落型態-使用含有 4% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養基 .....	59
4.7.2 菌落型態-使用 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清、arginine、histidine 及 uridine).....	60
4.7.3 芽管生成 .....	60
4.7.4 侵犯力測試.....	60
4.8 性狀分析-以營養篩選之 <i>ACT1</i> promoter 表現株 .....	61
4.8.1 菌落型態-使用含有 4% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養基 .....	61
4.8.2 菌落型態-使用 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清、arginine、histidine 及 uridine).....	61
4.8.3 芽管生成 .....	62
4.8.4 侵犯力測試 .....	62
4.9 性狀分析-以 <i>SAT1</i> flipper cassette 篩選之 <i>RHD3</i> 單套、雙套踢除株 以及 <i>ACT1</i> promoter 表現株 78Sov .....	62
4.9.1 菌落型態-使用含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基 .....	62
4.9.2 菌落型態-使用 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清).63	63

4.9.3 芽管生成 .....	63
4.9.4 侵犯力測試 .....	63
4.10 性狀分析-以 SAT1 flipper cassette 篩選之 ACT1 promoter 表現株 78SovA、78SovB、78SovC、78SovD 和 78SovE .....	64
4.10.1 菌落型態-使用含有 4%山羊血清之 YPD 培養基 .....	64
4.10.2 菌落型態-使用 2% Bacto agar 培養基(含有 4%山羊血清) .....	64
4.10.3 芽管生成 .....	65
4.10.4 侵犯力測試 .....	65
五、討論 .....	66
5.1 探討使用 TR promoter 表現 RHD3 的表現情形 .....	66
5.2 探討使用 ACT1 promoter 表現 RHD3 的表現情形 .....	66
5.2.1 白色念珠菌 AHRHD-1 的 RHD3 表現情形 .....	66
5.2.2 白色念珠菌 78Sov 的 RHD3 表現情形 .....	67
5.2.3 白色念珠菌 78SovA、78SovB、78SovC、78SovD 和 78SovE 的 RHD3 表現情形 .....	67
5.3 性狀分析 .....	67
5.3.1 菌落型態-添加 4%山羊血清之 YPD 培養基.....	67
5.3.2 菌落型態-添加 4%山羊血清之 Bacto agar 培養基 .....	68
5.3.3 芽管生成-添加 10%山羊血清之 YPD 培養液 .....	68
5.3.4 侵犯力測試- Solid spider 培養基 .....	69
5.4 結語 .....	70
5.5 未來展望 .....	70
六、參考文獻 .....	72

## 圖目錄

圖一：Clone no. 78 定序結果於 Candida Genomic Database 中的比對結果。 .....	78
圖二：RHD3 單套、雙套剔除株建構示意圖 .....	80
圖三：以限制酶確認 pGEM12765-bf.....	81
圖四：以限制酶Aval 確認質體 pB78K-5' .....	82
圖五：以限制酶確認 pB78K-5' 3' .....	82
圖六：以限制酶確認 pB78K/ARG4 和 pB78K/HIS1 .....	83
圖七：以 PCR 確認 RHD3 單套剔除株 .....	84
圖八：以 PCR 確認 RHD3 雙套剔除株 .....	85
圖九：以南方點墨法確認 RHD3 單套、雙套剔除株 .....	86
圖十：四環黴素調控表現 RHD3 菌株建構示意圖 .....	87
圖十一：以限制酶HincII 確認 p9978.....	88
圖十二：p9978-14 上的 RHD3 定序 .....	89
圖十三：以限制酶Aval 確認質體 OV.....	89
圖十四：以 PCR 確認四環黴素調控表現之白色念珠菌 78BWOV .....	90
圖十五：以南方點墨法確認菌株 78BWOV .....	91
圖十六：以北方點墨法確認四環黴素調控表現之 RHD3 的表現量.....	91
圖十七：利用 p6HF-ACT1 表現 RHD3 示意圖.....	92
圖十八：以限制酶HincII 確認質體 p6RHD3.....	93
圖十九：p6RHD3 上的 RHD3 定序結果.....	95
圖二十：以 PCR 確認白色念珠菌 AHRHD.....	96
圖二十一：以 PCR 確認白色念珠菌 AH6HF.....	96
圖二十二：以南方點墨法檢驗白色念珠菌 AHRHD 和 AH6HF，探針 A region.....	97

圖二十三：以南方點墨法檢驗白色念珠菌 AHRHD 和 AH6HF，探針 <i>CaRP10</i> .....	98
圖二十四：以南方點墨法檢驗白色念珠菌 AHRHD 和 AH6HF，探針 <i>RHD3</i> .....	99
圖二十五：以北方點墨法觀察 <i>RHD3</i> 的表現量 .....	100
圖二十六：使用 <i>SAT1 flipper cassette</i> 進行 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株建構示意圖.....	101
圖二十七：以限制酶 <i>Aval</i> 確認質體 ASAT.....	102
圖二十八：以酵素 <i>Bsal</i> 確認質體 ASATB.....	103
圖二十九：以 PCR 確認 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株.....	105
圖三十：將以 <i>ACT1 promoter</i> 表現之 <i>RHD3</i> 接上 <i>SAT1 flipper cassette</i> 之流程圖.....	106
圖三十一：建構以 <i>ACT1 promoter</i> 表現 <i>RHD3</i> 之白色念珠菌之示意圖 .....	107
圖三十二：以限制酶確認質體 pBACT .....	108
圖三十三：以酵素 <i>HincII</i> 確認質體 pBACT78.....	109
圖三十四：質體 pBACT78 上的 <i>RHD3</i> 定序結果.....	110
圖三十五：以限制酶 <i>SaII</i> 確認質體 SATov .....	111
圖三十六：以 PCR 進行白色念珠菌 78Sov 的確認.....	113
圖三十七：以南方點墨法確認白色念珠菌單套、雙套剔除株 78K1、78K2，以及 <i>ACT1 promoter</i> 表現 <i>RHD3</i> 之菌株 78Sov .....	114
圖三十八：以北方點墨法確認 <i>RHD3</i> 表現量.....	114
圖三十九：質體 pBACT 上所帶的 <i>ACT1 promoter</i> 定序結果.....	117
圖四十.....	119
圖四十一：以限制酶 <i>AfI/II</i> 確認質體 pBACT78A 、pBACT78B.....	120

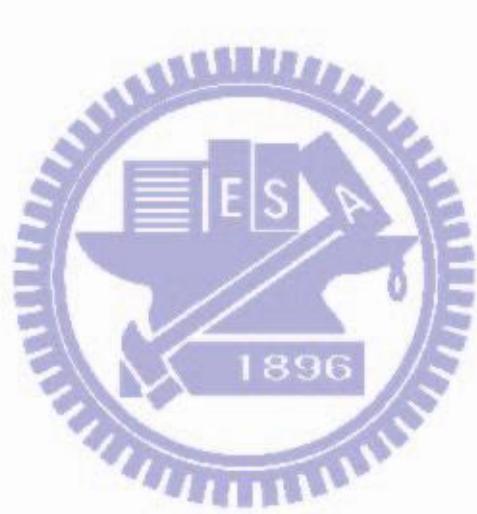
圖四十二：以限制酶 <i>Af</i> /III 確認質體 pBACT78C 、pBACT78D.....	121
圖四十三：pBACT78E 上的 <i>ACT1</i> promoter 定序結果.....	123
圖四十四：以限制酶 <i>Af</i> /III 確認質體 SATovA 、SATovB .....	124
圖四十五：以限制酶 <i>Af</i> /III 確認質體 SATovC 、SATovD .....	125
圖四十六：以限制酶 <i>Af</i> /III 確認質體 SATovE .....	126
圖四十七：以 PCR 確認白色念珠菌 78SovA 、78SovC 、78SovD 和 78SovE.....	128
圖四十八：以 PCR 確認白色念珠菌 78SovB.....	129
圖四十九：以南方點墨法確認白色念珠菌 78SovA 、78SovB 、78SovC 、 78SovD 和 78SovE.....	130
圖五十：以北方點墨法觀察 <i>RHD3</i> 之表現量.....	131
圖五十一：培養 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株在含有 4% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養基.....	132
圖五十二：培養 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株在 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清、 arginine 、 histidine 及 uridine).....	132
圖五十三：芽管測試.....	133
圖五十四：侵犯力測試.....	134
圖五十五：培養 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株以及 <i>ACT1</i> promoter 表現株在 含有 4% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養基.....	135
圖五十六：培養 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株以及 <i>ACT1</i> promoter 表現株在 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清、 arginine 、 histidine 及 uridine).....	136
圖五十七：芽管測試.....	136
圖五十八：侵犯力測試.....	137

圖五十九：培養 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株以及 <i>ACT1</i> promoter 表現株在含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基.....	138
圖六十：培養 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株以及 <i>ACT1</i> promoter 表現株在 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清).....	138
圖六十一：芽管測試.....	139
圖六十二：侵犯力測試.....	140
圖六十三：培養 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株以及 <i>ACT1</i> promoter 表現株在含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基.....	141
圖六十四：培養 <i>RHD3</i> 單套、雙套剔除株以及 <i>ACT1</i> promoter 表現株在 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清).....	142
圖六十五：芽管測試.....	143
圖六十六：侵犯力測試.....	145
圖六十七： <i>TR</i> promoter 在 NCBI 資料庫中的比對結果.....	146



## 附錄

附圖一：Clone no.78 在 SC5314 和 HLC54 中的表現量。.....	147
附圖二：Uridine 對 BWP17 的影響。.....	147
附圖三：質體 pNZ4 的檔案。.....	148





## 一、緒論

### 1.1 前言

白色念珠菌為伺機性感染之病原菌，在免疫健全的個體中，共生於皮膚、消化道及生殖道黏膜。當人體免疫力下降時會入侵黏膜表面，引起疾病。例如：鵝口瘡和陰道炎。約 70%婦女遭受過念珠菌造成的陰道感染，而約 20%會重複感染(Fidel *et al.*, 1999)。而對免疫功能不全的病患，例如後天免疫缺乏症候群(AIDS)患者、器官移植患者或是接受化療的病患，則可能會由輕微的黏膜表面感染發展成全身性系統感染，像是念珠菌血症，死亡率高達 35%(Wenzel, 1995)。白色念珠菌也是院內感染常見的病原菌之一(Chen *et al.*, 1997)。

目前治療真菌類感染的藥物，例如：amphotericin B、azoles、5-FC、terbinafine 以及 caspofungin (Vanden Bossche *et al.*, 1994；Vermes *et al.*, 2000；Georgopapadakou, 2001)。因其毒性和副作用在使用上有所限制(如：amphotericin B)。且因為抗真菌藥物使用的增加，抗藥性菌株也隨之增加。因此希望藉由研究白色念珠菌的致病機制，期望能找到更好的藥物標的。

### 1.2 白色念珠菌型態轉變(morphogenesis)對毒性的影響

白色念珠菌為雙倍體生物(Diploid)，具有多種細胞型態：酵母菌型(yeast form)、菌絲型(hyphae form)和假菌絲型(pseudohyphae form)。一般認為菌絲型有利於入侵，而酵母菌型則利於在體內散播。白色念珠菌在黏膜表面共生時多呈現酵母菌型，而在人體免疫力下降的情況下才會轉變為菌絲型，進而入侵表面黏膜(Brown *et al.*, 1999)。這種在不同型態之間轉變的能力，被認為和白色念珠菌的致病力有關(Mitchell, 1998)。誘發白色念珠菌型態轉變的因素包含：溫度、pH 值、血清(Gow and Gooday,

1982)、N-acetylglucosamine (Glc-NAc) (Mattia *et al.*, 1982)、碳源及氮源的缺乏、CO<sub>2</sub> 以及黏附情形(Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007)。在實驗室的培養中，以 37 °C 接近中性的 pH 值，或是添加血清皆可輕易誘發菌絲的生成。而調控型態轉變的訊息傳遞主要是 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway 和 cAMP-PKA pathway (Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007)。

MAPK pathway 包含 CST20 (MAPKKK)(Leberer *et al.*, 1996)、HST7 (MAPKK)(Clark *et al.*, 1995)和 CEK1 (MAPK)(Whiteway *et al.*, 1992)。當白色念珠菌接收到外來訊息例如：氮源缺乏(Biswas and Morschhauser, 2005)、氧化壓力(oxidative stress) (Román *et al.*, 2005)和細胞擁擠程度(quorum sensing)(Sato *et al.*, 2004)都會經由 MAPK pathway 來調控型態轉變 (Román *et al.*, 2007)。MAPK pathway 是藉由一系列的磷酸化反應，透過 Cst20p-Hst7p-Cek1p 將訊息傳給 transcriptional factor Cph1p(Liu *et al.*, 1993)以調控下游基因的表現。剔除 pathway 中任何一個基因或是 *cph1* 都會影響白色念珠菌在固態培養基中的菌絲生成(Köhler and Fink, 1996)，但在血清的誘發下，依然有菌絲生長的能力。(Román *et al.*, 2007)。MAPK pathway 的負向調控是經由 phosphatase Cpp1p 將 Cek1p 去磷酸化，使 Cek1p 無法活化 transcriptional factor Cph1p。研究指出剔除 *cpp1* 會活化菌絲生成，不論在何種培養條件下(Csank, 1996)。

cAMP-PKA pathway 在啤酒酵母(*S. cerevisiae*)、白色念珠菌或是其他種類的真菌中在菌絲生長的調控上都扮演著重要的角色(Lengeler *et al.*, 2000)。這個 pathway 主要包含 cAMP-dependent protein kinase A (PKA)和 EFG1。PKA 平時呈現 homodimer 不具有活性，當細胞中 cAMP 含量提高時，cAMP 便會和 PKA 結合，使 PKA 脫離 dimer 的型態，恢復活性(Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007)。白色念珠菌中有兩種 PKA : Tpk1p 和 Tpk2p。

*tpk1* 和 *tpk2* 的剔除皆會影響菌絲生成，但是是在不同的生長條件下。剔除 *tpk1* 會使白色念珠菌喪失在固態培養基上生長菌絲的能力，而剔除 *tpk2* 會使白色念珠菌喪失在液態培養基上生長菌絲的能力，這種差異在於兩者 N 端的不同(Cloutier *et al.*, 2003; Sonneborn *et al.*, 2000; Bockmühl *et al.*, 2001)。活化的 PKA 會藉由磷酸化調控 Efg1p 的活性，Efg1p 為 basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor，過量表現會刺激酵母菌(*S. cerevisiae*)形成假菌絲型。誘發白色念珠菌菌絲生成時，*EFG1* 表現量下降。但過量表現又可以促使白色念珠菌型成假菌絲，認為 *EFG1* 同時扮演著 transcription activator 和 repressor 的角色(Stoldt, 1997)。而剔除 *efg1* 會喪失在血清以及 GlcNAc 誘發的菌絲生成能力(Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007)。

另外也有研究指出若是同時剔除 *cph1* 和 *efg1* 會使白色念珠菌在大部分的培養條件下喪失菌絲生成的能力，且對小鼠喪失系統性感染的能力(Lo *et al.*, 1997)。因此 *CPH1* 和 *EFG1* 下游調控的基因很可能和白色念珠菌的型態轉變或是致病力有關。

### 1.3 *RHD3(PGA29)* 介紹

*RHD3* 有 615 bp 轉譯出 204 個胺基酸，N 端帶有 secretory signal peptide (a.a: 1~15)，C 端帶有 GPI-anchoring signal peptide (a.a: 183~204)，為典型的 GPI-anchored protein (De Groot *et al.*, 2003; De Boer *et al.*, 2010)。中間的部分有許多 serine 和 threonine，可被 O-glycosylation，而剔除 *pmt1* 會造成 *RHD3* 的蛋白質分子量下降，代表著 *RHD3* 的 glycosylation 是由 Pmt1p 所負責的(De Boer *et al.*, 2010)。*RHD3* 為細胞壁蛋白，藉由 β-1,6-glucan 連接到細胞壁上(De Boer *et al.*, 2010)，在對數期生長的酵母菌型白色念珠菌的細胞壁中 Rhd3p 的表現量很高(De Groot *et al.*, 2004)。

*RHD3* 的表現量會受型態轉變和鐵離子濃度的影響。在血清誘發菌絲生成的條件下，*RHD3* 表現量下降(De Boer *et al.*, 2010)。而在鐵離子濃度較高( $100 \mu\text{M}$ )的情況下，*RHD3* 有較高的表現量(Lan *et al.*, 2004)。但對於*RHD3* 的功能以及在白色念珠菌中所扮演的角色還有待研究。

#### 1.4 研究動機

本論文承襲先前實驗室林啟陽(2001)之實驗研究，在實驗室利用抑制刪除雜交法比對野生型白色念珠菌 SC5314 和不具有毒性及型態轉變能力的菌株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)之間，在有血清誘發下兩者基因表現情形。林將所篩到的 clone 進行定序和以北方點墨法做進一步的確認，其中 Clone no.78 在 HLC54 中的表現量遠大於 SC5314(附圖一)。將林定序的 Clone no.78 的序列送入 Candida Genomic Database 中進行比對，所比對到的基因以 *RHD3* 的 e-value 最小。*RHD3* 全長 615 bp，送入的序列和 *RHD3*: +313~+615 的相似度為 100%，認為 Clone no.78 應為基因 *RHD3*(圖一)。為了研究 *RHD3* 在白色念珠菌中所扮演的角色，將對 *RHD3* 進行剔除和嘗試將 *RHD3* 的表現量提高到接近在 HLC54 中的表現量，以觀察白色念珠菌的生理型態上是否有任何的改變。

在剔除方面使用了兩種篩選標記：營養基因和 *SAT1 flipper cassette*。使用營養基因篩選是剔除白色念珠菌基因常用的方法，在有營養缺陷的菌株 BWP17 中以營養基因 *ARG4*、*HIS1* 和 *URA3* 去取代目標基因，在培養時不添加 arginine、histidine 和 uridine，便可以篩選出所要的剔除株(Wilson *et al.*, 1999)。但近期有報導指出篩選標記 *URA3* 會隨著插入染色體中的位置的不同而有不同程度的表現量，而 *URA3* 的表現量會影響對宿主細胞的附著力以及毒性(Staab and Sundstrom, 2003)。而之前實驗室學生蔡馨儀(2009)的研究中也發現，BWP17 菌株在有無添加 Uridine 的

YPD 培養基中的菌落型態有所不同，在有添加 uridine 的培養基上，菌落成皺褶狀；而沒有添加 uridine 則是呈光滑表面(附圖二)。因為篩選標記可能影響性狀，而營養篩選所使用的菌株也會受到外加的營養素的影響，因此在實驗室引進了使用 *SAT1* flipper cassette 的剔除系統後，也使用了這個系統進行剔除菌株的建構。*SAT1* flipper cassette 是近年來發展出的篩選標記，可直接在野生株 SC5314 中剔除目標基因，這樣便可以排除使用不同菌株所造成的影响(Reuss *et al.*, 2004)。*SAT1* flipper cassette 包含 *CaSAT1* 可以抗 nourseothricin 為篩選標記，以及 *CaFLP* 可轉譯出 site-specific recombinase，會辨識 cassette 兩端的 FRT (minimal FLP recombination target sequence)，進行重組將 cassette 踢出 genome 中，留下一個 FRT。這種篩選方式也可以避免外加的基因對白色念珠菌造成影響(Reuss *et al.*, 2004)。

在提高表現量部分主要是使用 tetracycline regulated (TR) promoter 和 *ACT1* promoter。TR promoter 是利用額外添加 tetracycline 的衍生物來調控 promoter 的表現，在沒有 doxycycline 存在時，promoter 會被活化，表現後方基因；而在添加 doxycycline 之後，promoter 會被抑制(Nakayam *et al.*, 2000)。Doxycycline 為抗生素，作用於 30S ribosomal subunit，以阻止 tRNA 進入活化位，干擾蛋白質的合成(Rasmussen *et al.*, 1991)。但白色念珠菌並沒有 30S ribosomal subunit，所以並不會影響白色念珠菌。而 *ACT1* promoter 為 housekeeping gene promoter，不需要任何誘導物質便可以持續表現。使用這兩種 promoter 的原因是希望在提高表現量的過程中不會引發其他的訊息傳遞，以減少干擾。

## 二、材料

### 2.1 菌株

1. *Escherichia coli*: DH5 $\alpha$

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/tetR (YLO139)	<i>arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3xHA-CaHIS</i> 1	羅秀容實驗室，2003，國衛院臨床研究組，未發表
BWP17	<i>arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3</i>	Wilson et al., 1999
A21	<i>rhd3::ARG4/RHD3</i> (parental strain: BWP17)	本實驗
AH16	<i>rhd3::ARG4/rhd3::HIS1</i> (parental strain: A21)	本實驗
AH17	<i>rhd3::ARG4/rhd3::HIS1</i> (parental strain: A21)	本實驗
78BWOV-6	<i>RHD3/RHD3::TR-RHD3-URA3</i> (parental strain: BWP17/tetR)	本實驗
78BWOV-9	<i>RHD3/RHD3::TR-RHD3-URA3</i> (parental strain: BWP17/tetR)	本實驗
78K1-5A	<i>rhd3/RHD3</i> (parental strain: SC5314)	本實驗

78K1-10A	<i>rhd3/RHD3</i> (parental strain: SC5314)	本實驗
78K2-4A	<i>rhd3/rhd3</i> (parental strain: 78K1-5A)	本實驗
78K2-17A	<i>rhd3/rhd3</i> (parental strain: 78K1-10A)	本實驗
78Sov-7A	<i>rhd3/ACT1p-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78Sov-14B	<i>rhd3/ACT1p-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovA5	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -498~-1)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovA6	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -498~-1)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovB3	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -1022~+703)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovB4	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -1022~+703)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovC5	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -1022~-1)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovC6	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -1022~-1)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovD1	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -1022~-1)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovD2	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -1022~-1)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
78SovE9	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -498~+703)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗

78SovE15	<i>rhd3/ACT1p(ACT1: -498~+703)-RHD3</i> (parental strain: 78K2-4A)	本實驗
AH6HF-49	<i>rhd3::ARG4/rhd3::HIS1,</i> <i>RP10/rp10::ACT1p URA3</i> (parental strain: AH16)	本實驗
AHRHD-1	<i>rhd3::ARG4/rhd3::HIS1,</i> <i>RP10/rp10::ACT1p-RHD3 URA3</i> (parental strain: AH16)	本實驗

## 2.2 質體

質體	特性	Reference
pGEM-T	TA cloning vector，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	pGEM®-T vector system (Promega Cat. No. A3600)
pBluescript II SK+	Cloning and mapping vector，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	Alting-Mees et al., 1992
pRS-ARG4ΔSpel	在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin，並含 <i>ARG4</i> 基因。	Wilson et al., 1999
pGEM-HIS1	在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin，並含 <i>HIS1</i> 基因。	Wilson et al., 1999
p99CAU	在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin，並含 TR promoter 及 <i>URA3</i> 基因。	Nakayama et al., 2000
pSFS-SAT1	帶有 <i>SAT1</i> marker，可抗 Nourseothricin。並含有以 <i>MAL2p</i> 調	Reuss et al., 2004

	控表現的 <i>caFLP</i> ，可在含有 maltose 的培養條件下，誘發 marker 由 genome 中 pop-out。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	
p6HF-ACT1	帶有 <i>ACT1</i> promoter 和 <i>ACT1</i> terminator 以及營養篩選標記 <i>URA3</i> 和基因 <i>RP10</i> 。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	Kaneko <i>et al.</i> , 2004
pGEM12765-bf	將 <i>RHD3</i> 基因上游片段接在 pGEM-T 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pB78K-5'	將 <i>RHD3</i> 基因上游片段接在 pBluescript II SK+ 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pB78K-5'3'	將 <i>RHD3</i> 基因下游片段接在 pB78K-5' 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pB78K/ARG4	將 <i>ARG4</i> 基因接在 pB78K-5'3' 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pB78K/HIS1	將 <i>HIS1</i> 基因接在 pB78K-5'3' 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
p9978-14	將 <i>RHD3</i> 基因片段接在 p99CAU 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin，並含 TR promoter 及 <i>URA3</i>	本實驗

	基因。	
pOV	將 <i>RHD3</i> 基因上游片段接在 p9978-14 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin，並含 TR promoter 及 <i>URA3</i> 基因。	本實驗
pBACT	將 <i>ACT1</i> promoter 接 在 pBluescriptII SK+ 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pBACT78	將 <i>RHD3</i> 基因接在 pBACT 輽體上，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pBACT78A	將 pBACT78 中所帶的 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~+703) 換成 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~-1)，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pBACT78B	將 pBACT78 中所帶的 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~+703) 換成 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -1022~+703)，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pBACT78C	將 pBACT78 中所帶的 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~+703) 換成 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -1022~-1)，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pBACT78D	將 pBACT78 中所帶的 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~+703) 換成 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -1022~-1)，在 <i>E.coli</i>	本實驗

	中篩選標記為抗 Ampicillin。	
pBACT78E	將 pBACT78 中所帶的 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~+703) 換 成 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~+703)，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pASAT	將 <i>RHD3</i> 基因上游片段接入 pSFS-ACT1 質體中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pASATB	將 <i>RHD3</i> 基因下游片段接入 pASAT 質體中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSATov	將以 <i>ACT1</i> promoter 表現的 <i>RHD3</i> 基因送入 pASATB 質體中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為 Ampicillin。	本實驗
pSATovA	將以 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~-1) 表現的 <i>RHD3</i> 基因送入 pASATB 質體中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為 Ampicillin。	本實驗
pSATovB	將以 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -1022~+703) 表現的 <i>RHD3</i> 基因送入 pASATB 質體中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為 Ampicillin。	本實驗
pSATovC	將以 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -1022~-1) 表現的 <i>RHD3</i> 基因送入 pASATB 質體中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為 Ampicillin。	本實驗
pSATovD	將以 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -1022~-1)	本實驗

	表現的 <i>RHD3</i> 基因送入 pASATB 質體中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為 Ampicillin。	
pSATovE	將以 <i>ACT1</i> promoter ( <i>ACT1</i> : -498~+703) 表現的 <i>RHD3</i> 基因送入 pASATB 質體中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為 Ampicillin。	本實驗
p6RHD3	將 <i>RHD3</i> orf 接入 p6HF-ACT1 中，在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗

## 2.3 引子

### 2.3.1 針對使用營養基因缺陷篩選法將 *RHD3* 基因踢除所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
78K-3'F	TAT <u>GGTAC</u> CTCTGACGACAAGGCTGCTGA <i>KpnI</i>	<i>CaRHD3</i> gene: +454~+473
78K-3'R	TAT <u>GCGG</u> CTGACCGTTGTTGCCACTTC <i>NaeI</i>	<i>CaRHD3</i> gene: +998~+980
let-12765-1F	TAGAA(A/C) <u>CCGG</u> GACAAGAA <i>SmaI</i>	<i>CaRHD3</i> gene: -693~-675
let-12765-1R-2	CAATT <u>CCAT</u> (TA/ <u>GG</u> )GTAATAACACC <i>NcoI</i>	<i>CaRHD3</i> gene: -191~-213

粗體為外加序列，底線為酵素切位。

### 2.3.2 針對使用四環黴素調控表現系統 TR system 所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
LPCp-6 F	<b>GGACTAGT</b> ATGAAATTCCCTTGCTATTTATCC	<i>CaRHD3</i> gene:

	<i>SpeI</i>	+1~+24
LPCp-6 R-2	<b>TAT<u>CCGCGG</u>TTACATGACTAATCCA</b> <i>SacII</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> +615~+600

粗體為外加序列，底線為酵素切位。

#### 2.3.4 針對使用 p6HF-ACT1 質體過量表現 *RHD3* 所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
LPCp-18F	<b>CCC<u>CTCGAG</u>ATGAAATTCTTGCCTTATCC</b> <i>Xhol</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> +1~+24
LPCp-18R	<b>AAAG<u>GCATGCT</u>TTACATGACTAATCCAGCAACAAAC</b> <i>SphI</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> +615~+592

粗體為外加序列，底線為酵素切位。

#### 2.3.5 針對使用 SAT1 system 踏除 *RHD3* 基因所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
LPCp-9R	<b>CGAAC<u>GAGCT</u>TTGGAAAAAGAATATTAGGG</b> <i>SacI</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> +1071~+1052
LPCp-12F	<b>CGGG<u>GTACCA</u>ATCTTACTTTATA CGCCA</b> <i>KpnI</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> -453~-434
LPCp-12R	<b>AAAG<u>GGGCC</u>AACTAGAAGTCGAAGAATGG</b> <i>Apal</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> -70~-89
LPCp-13F	<b>TCCC<u>CCGCGG</u>CTACTAATTTATATCCCC</b> <i>SacII</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> +677~+696

粗體為外加序列，底線為酵素切位。

### 2.3.6 針對使用 SAT1 system 過量表現 *RHD3* 基因所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
LPCp-10F-2	<b>GGGAATTCCATATGAAATTCTTGCCTATTATCC</b> <i>NdeI</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> +1~+24
LPCp-10R-2	<b>CCGCTCGAGTTAATTAGAATTAAAAGTCCG</b> <i>Xhol</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> +671~+650
LPCp-11F	<b>AAAGGGCCCCGTCAAAACTAGAGAATAATAAA</b> <i>Apal</i>	<i>CaACT1 gene:</i> -498~-476
LPCp-11R	<b>CCCTTTCATATGAGAACCGTTATCGATAACTA</b> <i>NdeI</i>	<i>CaACT1 gene:</i> +703~+684
LPCp-11R-2	<b>CCGCTCGAGAAATTTCATATGAGAACCGTTAT</b> <i>Xhol</i> <i>NdeI</i>	<i>CaACT1 gene:</i> +703~+693
LPCp-17F	<b>AAAGGGCCCATCGATAGAGCTATTAAGATCA</b> <i>Apal</i>	<i>CaACT1 gene:</i> -1022~-1001
LPCp-17R	<b>CGGGCATATGTTGAATGATTATATTTTTAA</b> <i>NdeI</i>	<i>CaACT1 gene:</i> -1~-23

粗體為外加序列，底線為酵素切位。

### 2.3.7 篩選用引子

引子	序列 5'~3'	位置
HJL0607	CCCAGTTATACCCAAGTCAC	<i>CaHIS1 gene:</i> +231~+212
Let-12765-r3	CAACTTGC <u>(GT/TC)GAGACCAAG</u> <i>Xhol</i>	<i>CaRHD3 gene:</i> +955~+936
LPCp-1 F	CGACGATGACGATGATGACA	<i>CaRHD3 gene:</i>

		-1054~-1035
LPCp-3 R	GGAATGGAGTGGTTGAAGGAT	<i>CaURA3</i> gene: +383~+403
LPCp-14R	CCCAACTTGCCTGAGACC	<i>CaRHD3</i> gene: +957~+939
LPCp-15R	CGCATAAAACGGCAAACACC	<i>CaRHD3</i> gene: +1238~+1219
LPCp-19F	CGGACGTGTGGTTGTTAAGTCAGTA	<i>CaRP10</i> gene: -564~-540
LPCp-19R	ACGCTGAAATATTCCCTGTACTGTTG	<i>CaACT1</i> gene: -521~+496
LPCt-7 F	GGCGCACAAAATCTCCAACT	<i>CaRHD3</i> gene: -244~+225
LPCt-7 R	TCAGCAGCCTGTCGTCAGA	<i>CaRHD3</i> gene: +473~+454
YLO001	GTGCCACTGATCCATTGA	<i>CaARG4</i> gene: +62~+79

### 2.3.8 針對探針所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
LPCpro-2F	GCTACCATCTCATCCATTCA	<i>CaRHD3</i> gene: +43~+62
LPCpro-2R	AACAGCAGCCATACCAACAC	<i>CaRHD3</i> gene: +594~+575
LPCpro-6F	GGATTCTGGTGATGGTGTTACTC	<i>CaACT1</i> gene:

		+1120~1142
LPCpro-6R	GCAATACCTGGGAACATGGT	<i>CaACT1</i> gene: +1590~+1571
RP10 F	CGCTGATGGCTTGAAAGGTA	<i>CaRP10</i> gene: +171~+190
RP10 R	CACCGTGCAAAGCCAATAAT	<i>CaRP10</i> gene: +700~+681

### 2.3.9 針對定序所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
LPCs-pB R	GCGGATAACAATTTCACACAGGA	pBluescriptII SK+: 1358-1336
LPCs-ACT	TTCGGTCGCTGTTCTCACCA	<i>CaACT1</i> gene: -172~-153
LPCp-16R	AAGTTTCCCACCCCTACCCA	<i>CaACT1</i> gene: +97~+78

### 2.4 化學藥品

- ◆ Alpha Biosciences Inc.: LB agar (Cat. No. L12-111)
- ◆ Ameresco: Agarose (Cat. No. 0710-500G), EDTA (Cat. No. 0105-1KG), Glycerol (Cat. No. 0854-1L-PTM), Phenol (Cat. No. 0945-400ML), Sodium chloride (Cat. No. 0241-1KG), Tris base (Cat. No. 0826-1KG), Tris-hydrogen chloride (Cat. No. 0234-500G)
- ◆ AppliChem: Ampicillin
- ◆ Difco laboratories: Bacto agar (Cat. No. 143175), D-mannitol (Cat. No.

217020), Nutrient broth (Cat. No. 149018), Yeast nitrogen base w/o amino acid (Cat. No. 145368), YPD broth (Cat. No. 235141XB)

- ◆ Fluka: Maleic acid (Cat. No. )
- ◆ Invitrogen: Goat serum (Cat. No. 01-6201)
- ◆ J. T Baker: Formaldehyde (Cat. No. 15512),  
3-N-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) (Cat. No. 1132612),  
Sodium hydroxide (Cat. No. 3722-01), Triton X-100 (Cat. No. X198-07)
- ◆ Kodak: X-film (Cat. No. 1651454)
- ◆ Merck: Ethanol (Cat. No. K33534874), Sodium acetate (Cat. No. 1.06268.0250)
- ◆ Panreac: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Cat. No. 141512)
- ◆ Protech: 100 bp DNA ladder (Cat. No. M1-100T)
- ◆ Riedel-de Haën: Chloroform (Cat. No. 32211), Sodium citrate tribasic dehydrate (Cat. No. 25116), Sodium dodecyl sulfate (Cat. No. 62862),  
Sodium hydroxide
- ◆ Roche: Anti-DIG-AP (Cat. No. 1093274), Blocking reagent (Cat. No. 1096176), CSPD (Cat. No. 1655884), DIG DNA labeling mix (Cat. No. 1277065), DIG Easy Hyb (Cat. No. 11603558001)
- ◆ Scharlau: LB broth (Cat. No. 02-385)
- ◆ Sigma Chemical Co.: Arginine (Cat. No. A5131), Dithiothreitol (Cat. No. D9779) Formaldehyde (Cat. No. 33220), Glassbeads (425~600 µm) (Cat. No. G9268-50G), Histidine (Cat. No. H8125), Lithium acetate (Cat. No. L-6883), Sorbitol (Cat. No. S-0900), Tween 20 (Cat. No. p-1379), Uridine (Cat. No. U3750)
- ◆ Subenzyme: 1kb DNA ladder (Cat. No. SEM11C001)

- ◆ Werner Bioagents: Nourseothricin (Cat. No. 5.1000)
- ◆ 景明化工: Ethanol

## 2.5 酶素

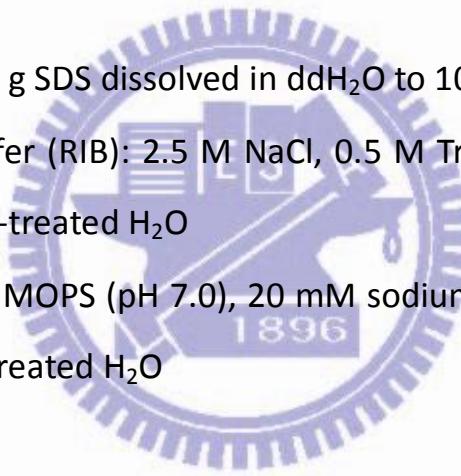
- ◆ Fermentas: *HincII* (ER0491)、*NdeI* (ER0581)、*NotI* (ER0591)、*SacI* (ER1131)、*SacII* (ER0201)、*SalI* (ER0641)、*XbaI* (ER0681)、*XhoI* (ER0691)、T4 DNA Ligase (EL0331)、*Taq* DNA Polymerase (EP0402)
- ◆ NEB: *AfIII* (R0541S)、*Apal* (R0114S)、*Aval* (R0152S)、*BamHI* (R0136S)、*BanII* (R0119S)、*BsaI* (R0535S)、*KpnI* (R0142S)、*NaeI* (R0190S)、*Ncol* (R0193S)、*NdeI* (R0111S)、*NotI* (R0189S)、*NruI* (R0192S)、*NsiI* (R0127S)、*SacI* (R0156S)、*SacII* (R0157S)、*SpeI* (R0133S)、*SphI* (R0182S)、*XbaI* (R0145S)、*XhoI* (R0146S)、*Taq* DNA Polymerase (M0267S)
- ◆ TAKARA: EX Tag (Cat. No. RR001A)

## 2.6 藥品配製

### 2.6.1 緩衝溶液及溶劑

- ◆ 0.1 M CaCl<sub>2</sub>: 1.47 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O dissolved in ddH<sub>2</sub>O to 100 ml
- ◆ Freezer solution: 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycerol
- ◆ 10X Tris-EDTA (TE): 100 mM Tris-Cl (pH 7.5), 10 mM EDTA (pH 8.0)
- ◆ 3 M Sodium acetate: 40.83 g sodium acetate dissolved in ddH<sub>2</sub>O to 100 ml
- ◆ 1 M Dithiothreitol (DTT): 3.09 g DTT dissolved in 20 ml 0.01 M Sodium acetate, store at -20 °C
- ◆ 1 M Lithium acetate: 10.2 g lithium acetate dissolved in ddH<sub>2</sub>O to 100 ml (pH7.5)

- ◆ 1 M sorbitol: 16.7 g sorbitol dissolved in ddH<sub>2</sub>O to 100 ml
- ◆ Breaking buffer: 2% Triton X-100, 1% SDS, 0.1 M NaCl, 1X TE
- ◆ Denature buffer: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- ◆ Neutralization buffer: 0.5 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl
- ◆ 20X SSC (pH 7.0): 3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate
- ◆ Detection buffer (pH 9.5): 0.1 M Tris-Cl, 0.1 M NaCl
- ◆ Maleic acid buffer (pH 7.5): 0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl
- ◆ Washing buffer: maleic acid buffer contained 0.3% Tween 20
- ◆ 10X blocking buffer: 10% (w/v) blocking reagent dissolved in maleic acid buffer
- ◆ 10% (w/v) SDS: 10 g SDS dissolved in ddH<sub>2</sub>O to 100 ml
- ◆ RNA isolation buffer (RIB): 2.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl, 0.25 M EDTA, 1% (w/v) SDS in DEPC-treated H<sub>2</sub>O
- ◆ 10X MOPS: 0.2 M MOPS (pH 7.0), 20 mM sodium acetate, 10 mM EDTA (pH 8.0) in DEPC-treated H<sub>2</sub>O



### 2.6.2 培養基配置

- ◆ LB (Luria-Bertni) 培養液: 1% trytone, 0.5% yeast extract, 1% Nacl
- ◆ LB 培養基 (含 Ampicillin): 1% trytone, 0.5% yeast extract, 1% Nacl, 1.5% agar, 50 µg/ml Ampicillin
- ◆ YPD 培養液: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose
- ◆ YPmaltose 培養液: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% maltose
- ◆ YPD 培養液 (含 10% goat serum): 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 10% goat serum
- ◆ YPD 培養基: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar

- ◆ YPD 培養基 (含 uridine): 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar, 80 µg/ml uridine
- ◆ YPD 培養基 (含 nourseothricin): 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar, 200 µg/ml nourseothricin
- ◆ YPD 培養基 (含 4% goat serum): 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar, 4% goat serum
- ◆ YPD 培養基 (含 uridine 及 4% goat serum): 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar, 80 µg/ml uridine, 4% goat serum
- ◆ Bacto agar 培養基 (含 4% goat serum): 2% agar, 4% goat serum
- ◆ Bacto agar 培養基 (含 4% goat serum, arginine, histidine 及 uridine): 2% agar, 4% goat serum, 20 µg/ml arginine, 20 µg/ml histidine, 80 µg/ml uridine
- ◆ Solid spider 培養基: 1% nutrient broth, 1% mannitol, 0.2 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.35% agar
- ◆ Solid spider 培養基 (含 arginine, histidine 及 uridine): 1% nutrient broth, 1% mannitol, 0.2 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.35% agar, 20 µg/ml arginine, 20 µg/ml histidine, 80 µg/ml uridine
- ◆ SD 培養液: 0.67% yeast nitrogen base, 2% dextrose
- ◆ SD 培養基: 0.67% yeast nitrogen base, 2% dextrose, 2% agar
- ◆ SD 培養基 (含 arginine): 0.67% yeast nitrogen base, 2% dextrose, 2% agar, 20 µg/ml arginine
- ◆ SD 培養基 (含 uridine): 0.67% yeast nitrogen base, 2% dextrose, 2% agar, 80 µg/ml uridine
- ◆ SD 培養基 (含 histidine 及 uridine): 0.67% yeast nitrogen base, 2% dextrose, 2% agar, 20 µg/ml histidine, 80 µg/ml uridine

## 2.7 儀器設備

電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)

超純水製造機 Simplicity (MILLIPORE)

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

試管震盪器 IKA-VIBRAX-VXR

水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)

乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

電子天平 PB153-S (METTLER TOLEDO)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

水浴槽 B-100 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

恆溫式震盪培養箱 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

迴轉式震盪培養箱 721SR (WISDOM APPARATUS MFG COMPANY)

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)

分光光度計 20GENES YS<sup>RT</sup> (SPECTRONIC INSTRUMENTS)

PCR 溫度控制儀 Gene CyclerRT (BIO-RAD)

梯度核酸增值儀 labcycler (SENSOQUEST)

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

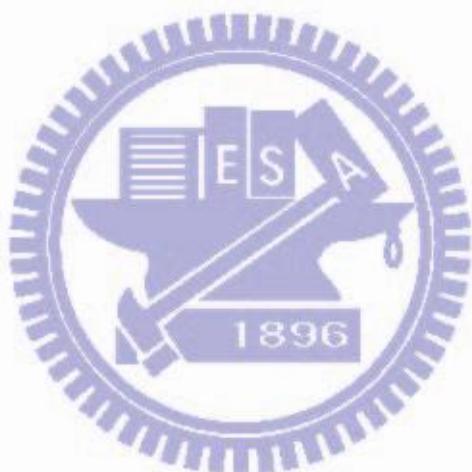
微量冷凍高速離心機 centrifuge 5415R (eppendorf)

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

桌上型高速離心機 KUBOTA 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)  
數位相機 C-5050ZOOM (OLYMPUS)  
光子成像系統 G:BOX (SYNGENE)  
脈衝器 Micro pulser<sup>TM</sup> 411BR 0897 (BIO-RAD)  
雜交連結器 (UVITEC)



### 三、方法與步驟

#### 3.1 大腸桿菌勝任細胞(Competent cell)的製備

挑選 DH5 $\alpha$  的單一菌落接種於 5 ml LB 培養液中，37 °C、170 rpm 震盪培養 12~16 小時。取 2 ml 的菌液轉養於 100 ml LB(含有 5% glucose 和 2mM MgCl<sub>2</sub>)培養液中，37 °C、200 rpm 震盪培養 90~120 分鐘，直到 OD<sub>600nm</sub> 約為 0.4~0.7。將菌液移入 50 ml 離心管中，靜置於冰上 20 分鐘。以 1620 xg、4 °C 離心 10 分鐘，移除上清液。每管加入 25 ml 冰的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 將菌體重新懸浮，放置於冰上 30 分鐘。以 720 xg、4 °C 離心 10 分鐘，移除上清液。每管加入 2.5 ml 冰的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 將菌體重新懸浮，放置於冰上約 20 小時，以 720 xg、4 °C 離心 5 分鐘，移除上清液。加入 2.5 ml Freezer solution 將菌體重新懸浮，分裝成每管 100  $\mu$ l，保存於-80 °C 中。

#### 3.2 大腸桿菌勝任細胞的轉型(Transformation)

將約 20 ng~500 ng 的質體(體積約 0.5  $\mu$ l~2  $\mu$ l)和 50  $\mu$ l 勝任細胞混和，靜置於冰上約 20~30 分鐘。以 42 °C 热休克 35~45 秒，之後立刻放回冰上。加入 500  $\mu$ l LB 培養液(已事先放置於 37 °C 預熱)，放 37 °C、150~180 rpm 培養一小時，之後取 100  $\mu$ l 的菌液塗盤。若轉型的質體為 ligation 之後的產物，則一小時培養完以後，以 1500 xg 離心 5 分鐘。移除大部分的上清液，然後以剩餘的液體將菌重新懸浮塗盤。塗完的盤子倒放於 37 °C 隔夜培養。

#### 3.3 質體 DNA 的萃取

##### 3.3.1 使用 Permier ExcelPure™ Plasmid Mini Kit

將帶有質體的 *E. coli* 單一菌落接種於 5 ml LB 培養液(視需要加入 Ampicillin，final concentration: 50  $\mu$ g/ml)，37 °C、180 rpm 過夜培養。離

心 720 xg、12 分鐘將菌收集下來，移除上清液。以無菌二次水沖洗菌體，並將菌移入 1.5 ml 微量離心管中。離心 15700 xg、1 分鐘，移除上清液。加入 200  $\mu$ l Solution I 懸浮菌體。加入 200  $\mu$ l Solution II 上下輕搖幾下，直到溶液澄清。加入 200  $\mu$ l Solution III 上下輕搖幾下，這時會出現白色蛋花狀懸浮物。離心 15700 xg、5 分鐘。將 spin column 和 collection tube 組合好，在 spin column 中加入剛離心完的上清液。離心 15700 xg、1 分鐘，移除濾液並再次組好 spin column 和 collection tube。在 spin column 中加入 700  $\mu$ l Washing Buffer，離心 15700 xg、1 分鐘，移除濾液並再次組好 spin column 和 collection tube。重複此步驟一次。再次組好 spin column 和 collection tube，離心 15700 xg、3 分鐘以移除殘留在 column 上的 buffer。將 spin column 移入新的 1.5 ml 微量離心管中，打開蓋子，放在 60 °C 乾浴板上 5 分鐘，以揮發殘留的酒精。在 spin column 中加入 50  $\mu$ l Elution Buffer，室溫靜置 3 分鐘。離心 15700 xg、1 分鐘，將濾液(含有所需的質體)保存於-20 °C。

### 3.3.2 使用 PROTECH Gene-Spin™-V<sup>2</sup> Miniprep Purification Kit

將帶有質體的 *E. coli* 單一菌落接種於 5 ml LB 培養液(視需要加入 Ampicillin，final concentration: 50  $\mu$ g/ml)，37 °C、180 rpm 過夜培養。離心 720 xg、12 分鐘將菌收集下來，移除上清液。以無菌二次水沖洗菌體，並將菌移入 1.5 ml 微量離心管中。離心 15700 xg、1 分鐘，移除上清液。加入 200  $\mu$ l Solution I 懸浮菌體。加入 200  $\mu$ l Solution II 上下輕搖幾下，直到溶液澄清，並室溫靜置 5 分鐘。加入 300  $\mu$ l Solution III 上下輕搖幾下，這時會出現白色蛋花狀懸浮物。離心 15700 xg、5 分鐘。將 spin column 和 collection tube 組合好，在 spin column 中加入剛離心完的上清液。離心 15700 xg、1 分鐘，移除濾液並再次組好 spin column 和 collection tube。

在 spin column 中加入 700  $\mu$ l Washing Buffer，離心 15700 xg、1 分鐘，移除濾液並再次組好 spin column 和 collection tube。重複此步驟一次。再次組好 spin column 和 collection tube，離心 15700 xg、3 分鐘以移除殘留在 column 上的 buffer。將 spin column 移入新的 1.5 ml 微量離心管中，打開蓋子，放在 60 °C 乾浴板上 5 分鐘，以揮發殘留的酒精。在 spin column 中加入 50  $\mu$ l Elution Buffer，室溫靜置 3 分鐘。離心 15700 xg、1 分鐘，將濾液(含有所需的質體)保存於-20 °C。

### 3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### 3.4.1 Fermentas Taq DNA polymerase (使用於產物 DNA 片段小於 2500 bp)

在 200  $\mu$ l 微量離心管內混和以下藥品: 0.5~1  $\mu$ g template DNA、1  $\mu$ l 50 uM primer、5  $\mu$ l 10X PCR buffer (-MgCl<sub>2</sub>)、4  $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>、4  $\mu$ l 2.5 mM dNTP、2.5 unit Tag DNA polymerase，補無菌二次水至 50  $\mu$ l。

#### 3.4.2 NEB Tag DNA polymerase (使用於產物 DNA 片段大於 3000 bp)

在 200  $\mu$ l 微量離心管內混和以下藥品: 0.5~1  $\mu$ g template DNA、1  $\mu$ l 50 uM primer、5  $\mu$ l 10X PCR buffer、4  $\mu$ l 2.5 mM dNTP、2.5 unit Tag DNA polymerase，補無菌二次水至 50  $\mu$ l。

#### 3.4.3 TaKaRa EX Taq (使用於產物 DNA 片段大於 3000 bp)

在 200  $\mu$ l 微量離心管內混和以下藥品: 0.5~1  $\mu$ g template DNA、0.5  $\mu$ l 50 uM primer、5  $\mu$ l 10X PCR buffer、4  $\mu$ l 2.5 mM dNTP、2.5 unit Tag DNA polymerase，補無菌二次水至 50  $\mu$ l。

### 3.4.4 PCR 溫度控制儀程式設定

Fermentas and NEB	TaKaRa EX Taq
95 °C 5 分鐘	95 °C 1 分鐘
95 °C 1 分鐘	95 °C 30 秒
50~58 °C 1 分鐘(重複 30 個循環)	53 °C 30 秒 (重複 30 個循環)
72 °C 1~3 分鐘	72 °C 3 分鐘
72 °C 5~10 分鐘	72 °C 2 分鐘
4 °C 終止反應	4 °C 終止反應

## 3.5 限制酶反應

### 3.5.1 Cloning 片段製備

將下列材料在微量離心管中混合: 3 µg DNA、3 µl 10X Buffer、3 µl 10X BSA (視酵素需求)、6~9 unit restriction enzyme，補無菌二次水至 30 µl，放在合適的反應溫度 2~4 小時。將反應完的產物以 PCR clean-up kit 加以純化。



### 3.5.2 質體確認

將下列材料在微量離心管中混合: 1.5 µg DNA、1.5 µl 10X Buffer、1.5 µl 10X BSA (視酵素需求)、3~5 unit restriction enzyme，補無菌二次水至 15 µl，放在合適的反應溫度 2~4 小時。以洋菜膠電泳確認產物的片段大小。

## 3.6 萃取洋菜膠中的 DNA 片段 (Gel extraction)

### 3.6.1 配製含有結晶紫的洋菜膠

取 0.24 g Agarose 加入 30 ml 1X TAE buffer 中，以微波加熱至 Agarose 粉末完全溶解，放在室溫中待融化的膠體稍微冷卻，加入 24 µl 結晶紫

溶液(2.5 mg/ml)混合均勻，倒入製膠器中冷卻凝固即可使用。

### 3.6.2 萃取洋菜膠中的 DNA 片段

先以電泳方式加以分離 DNA 片段，接著將所需之 DNA 片段由膠上切下，放入微量離心管中，接著利用 Premier Gel Extraction Kit 進行純化。首先在離心管中加入和切下的膠體等體積的 Binding buffer，接著將離心管放置於 60 °C 乾浴槽上 5~15 分鐘，確保膠體完全溶解。將融化的混合物加入 spin column 中，以 15700 xg 離心 1 分鐘，移除收集管中的濾液。在 column 中加入 700 µl washing buffer，以 15700xg 離心 1 分鐘，移除收集管中的濾液。再次加入 700 µl washing buffer，以 15700xg 離心 1 分鐘，移除收集管中的濾液。讓 column 空轉 3 分鐘，再將 column 移入新的微量離心管中，打開 column 的蓋子，放 60 °C 烘 5 分鐘，以確保剩餘的酒精揮發完全。在 column 中加入 30 µl Elution buffer，放室溫中靜置 3 分鐘，以 15700 xg 離心 1 分鐘，將濾液保存於-20 °C 中。

## 3.7 接合反應 (Ligation)

將酵素處理過並經過純化的質體和 insert 以合適的比例在微量離心管中混合，使質體和 insert 的莫耳數比約為 1:3，接著加入 2 µl 10X Ligase Buffer、0.5 µl T4 Ligase (5 unit/µl)，並補無菌二次水至總體積為 20 µl。整個反應的 DNA 濃度控制在 10 ng/µl 上下。放 22 °C 一小時，或是 16 °C 隔夜反應。

## 3.8 TA clone (使用 PROMEGA pGEM-T vector)

在微量離心管中混和以下材料: 5 µl 2X Rapid Ligation Buffer、1 µl pGEM-T vector (50 ng/µl)、適量的 PCR 產物使 vector 和 insert 的莫爾數比

約為 1:3、1  $\mu$ l Ligase (3 unit/ $\mu$ l)，補無菌二次水至總體積為 10  $\mu$ l。放室溫一小時，或是 4 °C 隔夜反應。

### 3.9 白色念珠菌的轉型 (Transformation)

#### 3.9.1 热休克法(Heat shock)

將白色念珠菌之單一菌落接種至 5 ml YPD 培養液中(視需要添加 Uridine)，30 °C、300 rpm 震盪培養約 16 小時。然後取 2 ml 的菌液轉養到 50 ml YPD 培養液中(視需要添加 Uridine)，30 °C、300 rpm 震盪培養至 OD<sub>600nm</sub> 約 0.6~0.8。將培養完的菌液移入 50 ml 離心管中，720 xg、10 分鐘離心，移除上清液。加入 10 ml 無菌二次水將菌體懸浮，720 xg、10 分鐘離心，移除上清液。加入 5 ml 1X TE 將菌體懸浮，720 xg、10 分鐘離心，移除上清液。加入 3 ml LATE buffer 將菌體懸浮，720 xg、10 分鐘離心，移除上清液。加入 300  $\mu$ l LATE buffer 將菌體懸浮，室溫靜置 20 分鐘，即完成白色念珠菌之勝任細胞。取約 1  $\mu$ g 的 DNA 片段和 10  $\mu$ l 的 10 mg/ml salmon sperm DNA 以及 200  $\mu$ l 白色念珠菌勝任細胞混均勻，放置於 30 °C、30 分鐘。加入 700  $\mu$ l PLATE buffer，30 °C、150 rpm 震盪培養 16 小時。以 44 °C 進行熱休克 15 分鐘，接著 400 xg、2 分鐘離心，移除上清液。加入 1 ml 1X TE 將菌體重新懸浮，以 400 xg、2 分鐘離心，移除上清液。加入 100  $\mu$ l 1X TE 將菌體重新懸浮，塗佈在適當的篩選培養基中，30 °C 培養 2~3 天。

#### 3.9.2 電穿孔法(electroporation)

將白色念珠菌的單一菌落接種於 5 ml YPD 培養液中(視需要添加 Uridine)，30 °C、300 rpm 震盪培養約 16 小時。取 5  $\mu$ l 菌液轉養到 50 ml YPD 培養液中(視需要添加 Uridine)，30 °C、300 rpm 震盪培養 16~24 小

時，直到 OD<sub>600nm</sub> 約 1.8~2.2。將菌液移入 50 ml 離心管中，以 1620 xg、5 分鐘離心，移除上清液。加入 10 ml LATE buffer 將菌體重新懸浮，30 °C、150 rpm 震盪培養 1 小時。加入 250 µl 1M DTT，30 °C、150 rpm 震盪培養 30 分鐘。以下冰上操作，加入 40 ml 冰的無菌二次水，以 1620 xg、4 °C、5 分鐘離心，移除上清液。加入 25 ml 冰的無菌二次水將菌體重新懸浮，以 1620 xg、4 °C、5 分鐘離心，移除上清液。加入 5 ml 冰的 1M sorbitol 將菌體重新懸浮，以 1620 xg、4 °C、5 分鐘離心，移除上清液。加入 50 µl 冰的 1M sorbitol 將菌體重新懸浮，靜置於冰上即完成勝任細胞的製作。接著在無菌的 1.5 ml 微量離心管中混合 40 µl 勝任細胞和 1 µg 的 DNA 片段。將混合好的勝任細胞加入電穿孔用的 cuvette 中，靜置於冰上 5 分鐘。以 1.8kV 進行電穿孔，之後在 cuvette 中加入 1 ml 冰的 sorbitol，混合後吸出菌液，移入新的 1.5 ml 微量離心管中，800 xg、離心 5 分鐘，移除上清液。加入 1 ml YPD 培養液(視需要添加 Uridine)，30 °C、150 rpm 震盪培養 1 小時。取 100 µl 的菌液塗佈在合適的培養基上，30 °C 培養 2~3 天。

### 3.10 Maltose 誘發 SAT1 cassette pop-out

在白色念珠菌轉型後，將篩選得到的單一菌落先在 YPD 培養基上畫開。之後挑選單一菌落培養在 5 ml YPmaltose 培養液中，以 30 °C、300 rpm 平面震盪培養 3~5 天。將培養完的菌液取 300~500 µl 抽取 Genomic DNA，進行 PCR 確認是否有轉型成功。剩下的菌液先暫存於 4 °C 中。

### 3.11 Replica

將 3.10 確認成功的菌株之保存菌液由 4 °C 中取出，以無菌 Tip 沾取

菌液，在新的培養基上畫開，以 30 °C 培養 1~2 天。將培養完的菌轉印在無菌的絨布上，再將無篩選性的培養基和有篩選性的培養基依序蓋在絨布上，以沾取在絨布上的菌，放 30 °C 培養 1~2 天。之後挑選在無篩選性的培養基會生長，但在具有篩選性的培養基上不會生長的菌落。

### 3.12 Genomic DNA 純化

#### 3.12.1 冷熱法萃取

挑選單一菌落培養在適當的培養液中，30 °C、300 rpm 震盪培養約 16 小時。以 720 xg、離心 12 分鐘將菌收集下來，移除上清液。加入 1 ml 無菌二次水將菌體重新懸浮，移入新的 1.5 ml 微量離心管中，15700 xg、1 分鐘離心，移除上清液。加入 200  $\mu$ l Lysis buffer 將菌體重新懸浮，在 -80 °C 中放 2 兩分鐘使菌液結凍，放 95 °C 1 分鐘使菌液溶解，再放 -80 °C 2 分鐘、95 °C 1 分鐘，接著 vortex 30 秒。加入 200  $\mu$ l Chloroform vortex 2 分鐘，以 15700 xg 離心 5 分鐘。取 200  $\mu$ l 上清液移入新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 500  $\mu$ l 100% 冰的 EtOH 混和均勻，靜置於 -20 °C 中 20 分鐘。以 15700 xg 離心 5 分鐘，移除上清液。加入 500  $\mu$ l 70% 冰的 EtOH 上下輕搖幾下，以 15700 xg 離心 1 分鐘，移除上清液。將離心管倒置以風乾 pellet，之後加入 50  $\mu$ l 無菌二次水和 0.5  $\mu$ l RNase A (10 mg/ml) 將 pellet 回溶，保存於 -20 °C 中。

#### 3.12.2 傳統法萃取

將單一菌落接種到合適的 5 ml 培養液中，30 °C、300 rpm 震盪培養 16~18 小時。以 720 xg 離心 12 分鐘，將菌收集下來，移除上清液。加入 1 ml 無菌二次水將菌體重新懸浮，移入新的 1.5 ml 微量離心管中。以 15700 xg 離心 1 分鐘，然後移除上清液。加入 300  $\mu$ l Lysis buffer 將菌體

重新懸浮，vortex 5 分鐘。加入 1/3 體積的玻璃珠，vortex 5 分鐘。加入 3  $\mu$ l 20 mg/ml proteinase K 以及 3  $\mu$ l 10 mg/ml RNase，放置於 37 °C 中反應 1 小時。加入 300  $\mu$ l phenol，vortex 5 分鐘。加入 300  $\mu$ l 1X TE，vortex 5 分鐘。以 15700 xg、4 °C 離心 10 分鐘，將上清液移入新的 1.5 ml 微量離心管中，加入等體積的 phenol，vortex 均勻。以 15700 xg、4 °C 離心 10 分鐘，將上清液移入新的 1.5 ml 微量離心管中，加入等體積的 phenol，vortex 均勻。以 15700 xg、4 °C 離心 10 分鐘，將上清液移入新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 2.5 倍體積冰的 100% EtOH 和 1/8 體積的 3M NaOAc，混和均勻，放置於 -20 °C 中 20 分鐘使 DNA 沉澱。以 15700 xg、4 °C 離心 10 分鐘，移除上清液。加入 1 ml 冰的 70% EtOH 上下輕搖幾下，以 15700 xg、4 °C 離心 1 分鐘，移除上清液。將離心管倒置風乾 pellet。加入 50  $\mu$ l 無菌二次水將 pellet 回溶，保存於 -20 °C 中。

### 3.13 南方點墨法

#### 3.13.1 探針(probe)的合成

使用 Roche 廠商產品 DIG labeling dNTP mix 以及 Fermentas Taq DNA polymerase system。做法是將一半的 dNTP 以 DIG labeling dNTP mix 取代。在 200  $\mu$ l 微量離心管中混合以下材料：約 1  $\mu$ g Template DNA、5  $\mu$ l 10X Taq DNA Polymerase Buffer (-MgCl<sub>2</sub>)、4  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5  $\mu$ l DIG DNA labeling mix、2.5  $\mu$ l 2.5 mM dNTP mix、1  $\mu$ l 50 mM primer、0.5  $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5 unit/ $\mu$ l)，補無菌二次水至總體積為 50  $\mu$ l。

PCR 溫度設定：

95 °C	5 分鐘
95 °C	1 分鐘
52~55 °C	1 分鐘 (重複 30 個循環)

72 °C	30 秒
72 °C	5 分鐘
4 °C	終止反應

### 3.13.2 南方點墨法

- ◆ 轉漬 DNA (Transfer)

取 15 µg Genomic DNA 以適當的酵素作用 3~5 小時，反應體積為 30 µl。將處理完的 DNA 以 0.8% 洋菜膠進行電泳，電泳緩衝液為 1X TAE，電場強度為 50 伏特，約跑 70 分鐘左右。接著將跑完的膠以 1 µg/ml EtBr 染色 15 分鐘，以影像處理系統拍照。接著將膠泡入 Denature Buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 15 分鐘。換新的 Denature Buffer 再搖 15 分鐘，然後移除 Buffer。以無菌二次水沖洗膠體，然後將膠泡入 Neutralization Buffer，以 60 rpm 平面震盪 15 分鐘。換新的 Neutralizaton Buffer 再搖 15 分鐘，然後移除 Buffer。以無菌二次水沖洗膠體，然後將膠泡入 10X SSC 中，以 60 rpm 平面震盪 10 分鐘。準備 3 張小張的 3M 濾紙和一張同寬度但長度較長的濾紙，以 10X SSC 泡濕備用。準備一張和膠同樣大小的 Nylon membrane，同樣以 10X SSC 泡濕備用。準備一張和濾紙同大小的投影片，中間挖出一個和膠一樣大小的空洞。準備一個盆子和一個堅固的平台，將平台放入盆子中，在盆內注入 10X SSC，液面不要高於平台。將較長的濾紙置於平台上，兩端沒入液面。鋪上一張小張的濾紙，小心排除接面的氣泡。將膠體置於濾紙中央，小心的排除接面的氣泡，並將投影片穿過膠體，置於濾紙之上。將 Nylon membrane 鋪在膠上，小心的排除氣泡。蓋上兩張小張的濾紙，同樣的排除接面的氣泡。放上約 5 公分厚的 paper tower，以保鮮膜覆蓋整個裝置，並在裝置上壓上約 0.5 kg 的重物，放置約 14~16 小時。

- ◆ 雜交反應 (Hybridization)

將轉漬完的 membrane 進行 cross-linking: 以 UV 254 nm 照射 membrane (有 DNA 的那面)兩次，每次 2 分鐘。之後將 membrane 泡入 DIG Eazy Hy 中，放置於 42 °C 恆溫培養箱，以 60 rpm 平面震盪 1~3 小時。將探針放置於 95 °C 加熱板上加熱 10 分鐘，然後置於冰上 10 分鐘。將探針和 DIG Eazy Hy 以 1 µl 探針加 1 ml DIG Eazy Hy 的比例混合均勻。將 membrane 泡入混有探針的 DIG Eazy Hy 中，放置於 42 °C 恆溫培養箱，以 60 rpm 平面震盪 16~20 個小時。配製 2X washing buffer: 2.5 ml 20X SSC、500 µl 10% SDS、22.25 ml DEPC-H<sub>2</sub>O。將 membrane 泡入 2X washing buffer 中，60 rpm 平面震盪 20 分鐘。配製 0.5 X washing buffer: 625 µl 20X SSC、500 µl 10% SDS、24.125 ml DEPC-H<sub>2</sub>O。將 membrane 泡入 0.5X washing buffer 中，放置於 58 °C 恆溫培養箱，以 60 rpm 平面震盪 20 分鐘。

- ◆ 免疫偵測 (Detection)

將 membrane 泡入 washing buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 15 分鐘，重複此步驟一次。配製 15 ml Blocking buffer: 13.5 ml Maleic acid buffer、1.5 ml 10X Blocking (Roche Blocking reagent)。將 membrane 放入 Blocking buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 30 分鐘。配製 15 ml Antibody buffer: 13.5 ml Maleic acid buffer、1.5 ml 10X Blocking、1.5 µl Antibody (Roche Anti-DIG-AP, 先 4 °C、15700 xg 離心 5 分鐘)。將 membrane 放入 Antibody buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 30 分鐘。將 membrane 泡入 washing buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 15 分鐘，重複此步驟一次。再將 membrane 泡入 Detection buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 10 分鐘。接著將 membrane 放置在投影片上(帶有 DNA 的那面朝上)。混和 10 µl CSPD 和 990 µl Detection buffer，加到 membrane 上。蓋上另一片投影片，推掉多餘的

buffer 和氣泡，以鋁鉑紙包好，放置於 37 °C 中反應 20 分鐘，之後在暗房進行壓片。將底片隔著投影片放置於 membrane 上，待感光適當時之之後，將底片置於 Develop buffer 中使影像顯現，再以 Fix buffer 固定影像，以清水沖洗掉 buffer 之後，將底片陰乾即可永久保存。

### 3.14 RNA 萃取

#### 3.14.1 Doxycycline 誘發

將白色念珠菌單一菌落接種到 5 ml YPD 培養液中(視需要添加 Uridine)，放 30 °C 以 300 rpm 平面震盪培養 16~18 小時。取 2 ml 隔夜培養的菌液加到 40 ml YPD 中(視需要添加 Uridine)，再加入 40 µl Doxycycline (20 mg/ml)，放 30 °C 以 300 rpm 平面震盪培養，直到 OD<sub>600</sub> 落在 0.6~0.8 之間。

#### 3.14.2 轉養

將白色念珠菌單一菌落接種到 5 ml YPD 培養液中(視需要添加 Uridine)，放 30 °C 以 300 rpm 平面震盪培養 16~18 小時。取 2 ml 隔夜培養的菌液加到 40 ml YPD 中(視需要添加 Uridine)，放 30 °C 以 300 rpm 平面震盪培養，直到 OD<sub>600</sub> 落在 0.6~0.8 之間。

#### 3.14.3 RNA 萃取

將菌移入 50 ml 離心管中，以 4 °C、720 xg 離心 10 分鐘，移除上清液。以 2~10 ml 的 DEPC-H<sub>2</sub>O 將菌重新懸浮，並移至 15 ml 離心管中。以 4 °C、720 xg 離心 5 分鐘，移除上清液。加入 300 µl RIB (RNA Isolution Buffer) 將菌懸浮，並加入 1/3 體積的玻璃珠，4 °震盪 5 分鐘。加入 300 µl phenol，4 °C 震盪 5 分鐘。加入 1/3 體積的玻璃珠，4 °C 震盪 5 分鐘。加入 500 µl

RIB，4 °C 震盪 5 分鐘。之後以 4 °C、720 xg 離心 5 分鐘。然後將上清液移入 1.5 ml 微量離心管中(大約 700  $\mu$ l 左右)，以 15700 xg、4 °C 離心 5 分鐘。將上清液移入新的微量離心管中，加入等體積的 phenol 混合均勻，以 15700 xg、4 °C 離心 5 分鐘，重複此步驟一次。將上清液移入新的微量離心管中，加入 2.5 倍體積的 100% 酒精(-20 °C)和 1/8 體積的 2.5 M 醋酸鈉溶液，混和均勻，放置在冰上 30 分鐘。以 15700 xg、4 °C 離心 5 分鐘，移除上清液。加入 1 ml 70% 酒精(-20 °C)上下輕搖幾下，以 15700 xg、4 °C 離心 5 分鐘，移除上清液之後倒置，風乾 pellet。加入 50~100  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O 將 pellet 回溶，之後保存於 -80 °C 中。

### 3.15 北方點墨法

#### 3.15.1 探針(probe)的合成

同 3.13.1



#### 3.15.2 北方點墨法

- ◆ 轉漬 RNA (Transfer)

配置 1.2% RNA 膠:將 0.6 g Agarose 加入 36 ml DEPC-H<sub>2</sub>O 中，以微波加熱溶化。待溶化的膠稍微冷卻之後，加入 5 ml 10X MOPS 和 9 ml formaldehyde 混合均勻，倒入製膠器中等凝。RNA 樣品處理:將約 12  $\mu$ g 的樣品和 3.5  $\mu$ l 10X MOPS、5  $\mu$ l formaldehyde、10  $\mu$ l formamide、3  $\mu$ l dye、1  $\mu$ l 10 mg/ml ethidium bromide 混合，以 65 °C 加熱 10 分鐘，放置於冰上 5 分鐘。將處理過的 RNA 樣品加入已配製好的洋菜膠的孔洞中，以 50 伏特的電壓進行電泳，電泳緩衝液為 1X MOPS，約跑 60~90 分鐘，電泳結束以後以影像處理系統拍照。接著將膠泡入 10X SSC 中，以 60 rpm 平面震盪 20 分鐘。準備 3 張小張的 3M 濾紙和一張同寬度但長度較長的

濾紙，以 10X SSC 泡濕備用。準備一張和膠同樣大小的 Nylon membrane，同樣以 10X SSC 泡濕備用。準備一張和濾紙同大小的投影片，中間挖出一個和膠一樣大小的空洞。準備一個盆子和一個堅固的平台，將平台放入盆子中，在盆內注入 10X SSC，液面不要高於平台。將較長的濾紙置於平台上，兩端沒入液面。鋪上一張小張的濾紙，小心排除接面的氣泡。將膠體置於濾紙中央，小心的排除接面的氣泡，並將投影片穿過膠體，置於濾紙之上。將 Nylon membrane 鋪在膠上，小心的排除氣泡。蓋上兩張小張的濾紙，同樣的排除接面的氣泡。放上約 5 公分厚的 paper tower，以保鮮膜覆蓋整個裝置，並在裝置上壓上約 0.5 kg 的重物，放置約 14~16 小時。

- ◆ 雜交反應 (Hybridization)



將轉漬完的 membrane 進行 cross-linking: 以 UV 254 nm 照射 membrane (有 RNA 的那面) 兩次，每次 2 分鐘。之後將 membrane 泡入 DIG Eazy Hy 中，放置於 42 °C 恒溫培養箱，以 60 rpm 平面震盪 1~3 小時。將探針放置於 95 °C 加熱板上加熱 10 分鐘，然後置於冰上 10 分鐘。將探針和 DIG Eazy Hy 以 1 μl 探針加 1 ml DIG Eazy Hy 的比例混合均勻。將 membrane 泡入混有探針的 DIG Eazy Hy 中，放置於 42 °C 恒溫培養箱，以 60 rpm 平面震盪 16~20 個小時。配製 2X washing buffer: 2.5 ml 20X SSC、500 μl 10% SDS、22.25 ml DEPC-H<sub>2</sub>O。將 membrane 泡入 2X washing buffer 中，60 rpm 平面震盪 20 分鐘。配製 0.5 X washing buffer: 625 μl 20X SSC、500 μl 10% SDS、24.125 ml DEPC-H<sub>2</sub>O。將 membrane 泡入 0.5X washing buffer 中，放置於 58 °C 恒溫培養箱，以 60 rpm 平面震盪 20 分鐘。

- ◆ 免疫偵測 (Detection)

將 membrane 泡入 washing buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 15 分鐘，重複此步驟一次。配製 15 ml Blocking buffer: 13.5 ml Maleic acid buffer、1.5 ml 10X Blocking (Roche Blocking reagent)。將 membrane 放入 Blocking buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 30 分鐘。配製 15 ml Antibody buffer: 13.5 ml Maleic acid buffer、1.5 ml 10X Blocking、1.5  $\mu$ l Antibody (Roche Anti-DIG-AP，先 4 °C、15700 xg 離心 5 分鐘)。將 membrane 放入 Antibody buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 30 分鐘。將 membrane 泡入 washing buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 15 分鐘，重複此步驟一次。再將 membrane 泡入 Detection buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 10 分鐘。接著將 membrane 放置在投影片上(帶有 RNA 的那面朝上)。混和 10  $\mu$ l CSPD 和 990  $\mu$ l Detection buffer，加到 membrane 上。蓋上另一片投影片，推掉多餘的 buffer 和氣泡，以鋁鉑紙包好，放置於 37 °C 中反應 20 分鐘，之後在暗房進行壓片。將底片隔著投影片放置於 membrane 上，待感光適當時間之後，將底片置於 Develop buffer 中使影像顯現，再以 Fix buffer 固定影像，以清水沖洗掉 buffer 之後，將底片陰乾即可永久保存。

### 3.16 突變株之性狀分析(Characterization)

#### 3.16.1 誘發菌絲生長觀察型態轉變

- ◆ 含山羊血清之固態培養基

將單一菌落接種在含 4% 山羊血清之 YPD 培養基中，且視需要在培養基中加入 Uridine，置於 37 °C 培養三天，觀察單一菌落之型態變化。

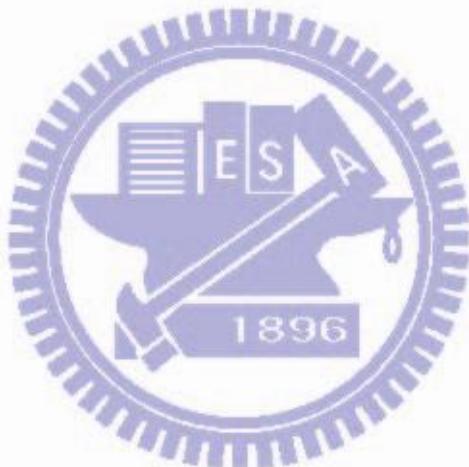
將單一菌落接種在含 4% 山羊血清之 Bacto agar 培養基中，且視需要在培養基中加入 Uridine, Arginine, Histidine，置於 37 °C 培養七天，於倒立式顯微鏡下觀察菌絲生長的型態 (Stabb JF et al, 2003) 。

### 3.16.2 芽管試驗(germ tube assay)

將單一菌落接種在含有 10% 山羊血清之 YPD 培養液中，且視需要添加 Uridine，於 37 °C 培養 3 小時，於倒立式顯微鏡下觀察是否有芽管生成。

### 3.16.3 侵犯力測試(invasion assay) (Navarro-García F et al., 1998)

將單一菌落接種在 Solid Spider 培養基上，並視需要於培養基中添加 Uridine, Arginine, Histidine，置於 37 °C 培養 7 天，觀察菌落型態，之後以水流沖洗菌落，觀察菌落是否會因菌絲侵入培養基而殘留。



## 四、結果

### 4.1 使用營養標記篩選建構 *RHD3* 單套、雙套剔除株

利用白色念珠菌 BWP17 進行 *RHD3* 單套、雙套剔除株的建構。BWP17 是一株經過改造，剔除營養基因 *ARG4*、*HIS1* 和 *URA3* 的菌株，因此便可以使用這三個營養基因當作篩選標記，用以剔除目標基因。做法便是將目標基因的上下游片段以 cloning 的方式接在營養篩選基因的兩端，接著將建構完成的片段送入白色念珠菌 BWP17 細胞中，送入的片段便會利用所帶的目標基因之上下游相似片段進行同源重組置換，以營養篩選基因去取代目標基因，達到目標基因的剔除。

#### 4.1.1 在質體 pBluescript II SK+ 上建構 *RHD3* 剔除片段 (圖二 A、B)

以 *Candida albicans* genomic DNA 為模板，使用引子 let-12765-1F 和 let-12765-1R-2 進行 PCR 反應，得到 *RHD3* 的上游片段，稱為 A region。使用 Promega pGEM-T vector 進行 TA cloning，將 A region 接到 T-vector 上，得到質體命名為 pGEM12765-bf。pGEM12765-bf 以酵素 *Nco*I 作用預期會得 506 bp 和 2996 bp 的片段(如圖三切位示意圖所示)，在電泳圖上看來 Lane 1、4 的結果合乎預期，片段在 3 Kbp 左右的位置和在 500 bp 左右的位置(圖三)；以酵素 *Ava*I 作用會得 312 bp 和 3190 bp 的片段(如圖三切位示意圖所示)，在電泳圖上 Lane 5 的結果是合乎預期的，片段在大約 3 Kbp 左右的位置和在約 300 bp 左右的位置(圖三)，因此 pGEM12765-bf-3 應是建構成功的質體。之後以酵素 *Sac*II 和 *Not*I 處理 pGEM12765-bf-3，將 A region 切下；以同樣的酵素處理 pBluescript II SK+，然後將 A region 接入 pBluescript II SK+，得到的質體命名為 pB78K-5'。pB78K-5' 以酵素 *Ava*I 作用會得到片段 45 bp、220 bp、312 bp 和 2896 bp，45 bp 的大小無法顯示在電泳圖上，所以以另外三個片段當作判斷依據。

以電泳結果看來在 200 bp 和 300 bp 附近皆有預期片段(圖四)。同樣的以 *C. albicans* genomic DNA 為模板，使用引子 78K-3'F 和 78K-3'R 進行 PCR 反應，得到 *RHD3* 的下游片段，稱為 B region。以酵素 *Kpn*I 和 *Nae*I 處理 B region 和 pB78K-5'，然後將 B region 接入 pB78K-5'中，得到質體命名為 pB78K-5'3'。pB78K-5'3'以酵素 *Ban*II 作用會得片段 587 bp、608 bp 和 2504 bp(圖五切位示意圖)，因無法以電泳來區分 587 bp 和 608 bp 片段，所以預期結果只會出現兩條片段。如(圖五)電泳圖所示，在 500 bp 和 750 bp 之間，以及在 2500 bp 的位置皆有預期片段出現。接著以酵素 *Kpn*I 和 *Xba*I 處理質體 pRS-ARG4，將 ARG4 切下；接著以同樣的酵素處理 pB78K-5'3'，然後將 ARG4 接入 pB78K-5'3'中，得到的質體命名為 pB78K/ARG4。如果 ARG4 有成功接入，質體 pB78K/ARG4 便可以酵素 *Nde*I 切開，預計片段會得 5583 bp(圖六 A)，如電泳圖所示在 5 Kbp~6 Kbp 之間有預期片段出現。然後以酵素 *Sal*I 和 *Bam*HI 處理質體 pGEM-HIS1，將 HIS1 切下；接著以同樣的酵素處理 pB78K-5'3'，然後將 HIS1 接入 pB78K-5'3'中，得到的質體命名為 pB78K/HIS1。如果 HIS1 有成功接入的話，質體 pB78K/HIS1 便可以酵素 *Nru*I 切開，預計會得片段 6039 bp(圖六 A)，如電泳圖所示在 6 Kbp 附近有預期的片段。

#### 4.1.2 建構 *RHD3* 單套、雙套剔除菌株

首先將質體 pB78K/ARG4 以酵素 *Nae*I 和 *Sac*I 處理，預計會得到片段 3051 bp 和 2532 bp，如電泳所示 Lane 1 在 2.5 Kbp 和 3 Kbp 皆有預期片段(圖六 B)。將片段 3051 bp 以膠體純化方式分離出來，此片段含有 *RHD3* 上下游片段和 ARG4，之後將純化的片段以熱休克法送入白色念珠菌 BWP17 中，期望得到 *RHD3* 單套剔除株。先以 SD 培養基(含有 Histidine 和 Uridine)做初步的篩選，成功剔除的菌株會因帶有 ARG4 而可以在培養

基上存活。將得到的菌落培養存菌，並以冷熱法抽取 genomic DNA，進行 PCR 篩選。使用引子 LPCp-4F 和 78K-3'R 進行 PCR 反應，如果成功的將其中一套 *RHD3* 置換成 *ARG4*，預期會得到片段 1790 bp 和 3131 bp。以電泳結果看來，Lane 3 (A15)和 Lane 4 (A21)在 1.5 Kbp~2 Kbp 之間，以及在約 3 Kbp 左右的位置有出現預期片段，應為成功的 *RHD3* 單套剔除株(圖七)。

接著將質體 pB78K/HIS1 以酵素 *Nael* 和 *SacI* 處理，預計會得到片段 3507 bp 和 2532 bp，如電泳所示 Lane 2 在 2.5 Kbp 附近，以及 3 Kbp~4 Kbp 之間有預期片段出現(圖六 B)。將片段 3507 bp 以膠體純化方式分離出來，此片段含有 *RHD3* 上下游片段和 *HIS1*，之後將純化的片段以熱休克法送入白色念珠菌 A21 (*RHD3* 單套剔除株)中，期望得到 *RHD3* 雙套剔除株。先以 SD 培養基(含有 Uridine)做初步的篩選，成功置換的菌株會因帶有 *ARG4* 和 *HIS1* 而可以在培養基上存活。將篩選得到的菌落培養存菌，以冷熱法抽取 genomic DNA，進行 PCR 篩選。使用引子 LPCp-1F 和 YLO001 進行 PCR 反應，若 *RHD3* 有被置換成 *ARG4* 則可以夾出 2323 bp，如電泳圖所示，在 2 Kbp~2.5 Kbp 之間有預期片段(圖八 B)。以引子 LPCp-1F 和 HJL0607 進行 PCR 反應，若 *RHD3* 有被置換成 *HIS1* 則可以夾出 1462 bp，如電泳圖所示，在 1.5 Kbp 附近有預期片段(圖八 C)。其中 AH16(圖八 Lane 2, 4)和 AH17(圖八 Lane 3, 5)以這兩組引子進行 PCR 反應，皆有夾出合乎預期的片段，故認為這兩株應為成功的 *RHD3* 雙套剔除株。

#### 4.1.3 南方點墨法確認 *RHD3* 單套、雙套剔除株

將 SC5314、BWP17、A21、AH16、AH17 這五株白色念珠菌以傳統法抽取 genomic DNA，進行南方點墨法的確認。使用酵素為 *HincII*，使用探針為 *RHD3* 上游片段(A region)。南方點墨法預期偵測到的片段大小(圖九

A)。對照組 SC5314 和 BWP17 預計大小為 3123 bp。單套剔除株 A21 預計偵測到片段 4039 bp 和 3123 bp。雙套剔除株 AH16 和 AH17 預計偵測到 4039 bp 和 5308 bp。南方點墨法結果(圖九 B)，對照組 SC5314 和 BWP17 在 3 Kbp 左右有偵測到預期片段。A21 在 3 Kbp 和 4 Kbp 皆有偵測到預期片段。AH16 和 AH17 在 4 Kbp 附近和 5 Kbp~6 Kbp 之間皆有偵測到預期片段。

#### 4.2 建構四環黴素調控表現 *RHD3* 的菌株

四環黴素調控表現之系統(Nakayama et al. 2000)包含兩個部分，TR transactivator 和 TR promoter。TR transactivator 為一個融合蛋白(Fusion protein)包含 *Escherichia coli* tetracycline repressor protein (tetR) 和 transcription activator 的 activation domain，而 TR promoter 則帶有 tetracycline operator sequence (*tetO*)。其運作方式為 TR transactivator 上的 tetR 會和 *tetO* 鍵結，使 promoter 之後所帶的基因開始轉錄。當 tetracycline 存在時，tetracycline 便會和 tetR 結合，使 tetR 不能跟 promoter 結合，因此 promoter 之後的基因便不會表現。於是便可以利用有無在培養條件中添加 tetracycline 來調控基因的表現。白色念珠菌 BWP17/tetR 是帶有 TR transactivator 的菌株，本身又具有營養缺陷(*arg4*、*ura3*)，便可以使用營養基因為篩選標記將 TR promoter 置入目標基因之前，然後以添加四環黴素的衍生物 Doxycycline 來調控目標基因的表現。作法是使用質體 p99CAU，這個質體上帶有篩選標記 *URA3* 以及 TR promoter。將目標基因的上游片段接到 p99CAU 上、*URA3* 之前，接著再將目標基因的 open reading frame (ORF)接在 TR promoter 之後，形成片段：上游序列 -*URA3*-TR promoter-目標基因 ORF。接著將此片段送入 BWP17/tetR 中，便會利用上游序列以及目標基因 ORF 進行同源重組置換，將 TR promoter

置於目標基因之前(圖十)。

#### 4.2.1 在質體 p99CAU 上建構欲置入白色念珠菌中以調控表現 *RHD3* 的片段

以白色念珠菌 SC5314 genomic DNA 當作模板，使用 LPCp-6F 和 LPCp-6R-2 這組引子進行 PCR 反應，會夾出 *RHD3* ORF 且兩端帶有酵素切位 *Spel* 和 *SacII*。以酵素 *Spel* 和 *SacII* 處理 *RHD3* ORF 和質體 p99CAU，然後進行純化及接合反應將 *RHD3* ORF 接入 p99CAU 中，得到新的質體命名為 p9978。因為沒有 p99CAU 的序列，所以以 *HincII* 進行質體篩選時和對照組 p99CAU 切出來的片段有差異的質體，皆送定序確認 *RHD3* 是否有接入正確的位置，以及 *RHD3* 序列是否正確。由電泳結果可以看出 Lane 2~4 (p9978) 皆有比 Lane 1 (p99CAU) 多出一條位於 500 bp~750 bp 之間的片段(圖十一箭號處)。而定序結果，其中 p9978-14 這株質體雖然在 *RHD3* +42 這個位置有一個胸線嘧啶(Thymine)突變成胞嘧啶(Cytosine)，但並不影響胺基酸的轉譯(圖十二)。之後用 *Apal* 和 *Sall* 處理質體 pGEM12765-bf，以切下 *RHD3* 之上游片段(A region)，以同樣的酵素處理 p9978-14，然後將 A region 接入 p9978-14 中，得到新質體命名為 pOV。將質體 pOV 以限制酶 *Aval* 進行篩選，預計會比對照組 p9978-14 多一條 312 bp 的片段，如電泳圖所示，Lane 2~6 (pOV) 在約 300 bp 的位置附近有一片段(箭頭處)，而 Lane 1 (p9978) 則沒有此片段(圖十三)。

#### 4.2.2 以 PCR 和南方點墨法進行調控表現 *RHD3* 菌株之確認

將質體 pOV 以酵素 *SacII* 處理，會得到兩條 3 Kbp 左右的片段，其中一條帶有 *RHD3* 上游片段、篩選標記 *URA3*、TR promoter 和 *RHD3* orf，另一條則是 pOV 質體的其他部分。將酵素處理完畢的質體進行純化，以

熱休克法送入白色念珠菌 BWP17/tetR 中。送入的片段便會利用 *RHD3* 上游片段以及 *RHD3* ORF 進行同源重組置換反應，將 *RHD3* promoter 置換成 TR promoter，片段上又帶有營養基因 *URA3*，因此可以利用含有 Arginine 的 SD 培養基進行初步篩選。將挑到的菌落培養存菌，以冷熱法抽取 genomic DNA 進行 PCR 確認。使用的引子為 LPCp-3R 和 let-12765-r3，預計會夾出約 2 kbp 大小的片段。由電泳結果看來，Lane 1, 4, 6, 8, 9 (78BWOV-1, 4, 6, 8, 9) 在 2 Kbp 附近有預期的片段(圖十四)。將白色念珠菌 78BWOV-1, 6, 9 以南方點墨法進行進一步的確認，使用酵素為 *Nsi*I，探針為 *RHD3* 的上游片段(A region)，BWP17/tetR 為對照組。南方點墨法預期結果(圖十五 A)，對照組 BWP17/tetR 預期會偵測到片段 3937 bp，而 78BWOV 預期會偵測到片段 3937 bp 和 5837 bp。以南方點墨法的結果看來(圖十五 B)，Lane 3 (78BWOV-6)和 Lane 4 (78BWOV-9)在 4 Kbp 附近和 6 Kbp 附近皆有偵測到合乎預期的片段。

#### 4.2.3 以北方點墨法確認 *RHD3* 的表現

將菌株 78BWOV-6 和 78BWOV-9 分別培養在含有 Doxycycline (方法 3.14.1) 以及不含 Doxycycline (方法 3.14.2) 的 YPD 培養液中，抽取 RNA 進行北方點墨法確認 *RHD3* 的表現量。預期是在不加 Doxycycline 時，因為 tetR 會和 TR promoter 結合，使後方的基因開始表現。而在加入 Doxycycline 時，會使 tetR 無法與 TR promoter 結合，使後方基因不表現。78BWOV-6 和 78BWOV-9 其中一個 allele 的 *RHD3* 前方接有 TR promoter，所以在培養液中存有 Doxycycline 的情形下，*RHD3* 的表現量應該會小於培養在不含有 Doxycycline 的情形。但是以結果看來，不論是否有添加 Doxycycline，在 78BWOV-6 和 78BWOV-9 中，*RHD3* 的表現量看似相差不大(圖十六)。

### 4.3 建構利用 p6HF-ACT1 表現 RHD3 的菌株

p6HF-ACT1 是一個用來表現蛋白的質體，上面帶有 ACT1 promoter 和 ACT1 terminator，在 promoter 和 terminator 中間有酵素切位，可以接入所要表現基因之 ORF。質體上還帶有 URA3 當作篩選標記，以及白色念珠菌 *CaRP10/RPS1* 基因以利質體插入白色念珠菌的 genome 中。*CaRP10* 被認為可能是 *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein, RP10 的同源基因，會引發宿主產生抗體。將所要研究的基因 RHD3 接入質體 p6HF-ACT1，送入白色念珠菌中，便會利用 *CaRP10* 當作 insertion 的目標，將質體插入 genome 中，然後便可以利用質體上所帶的 ACT1 promoter 表現 RHD3。為了排除破壞 *CaRP10* 所造成的影响，也將原始質體 p6HF-ACT1 送入白色念珠菌中當作對照組(圖十七)。

#### 4.3.1 將 RHD3 接入質體 p6HF-ACT1

以白色念珠菌 SC5314 genomic DNA 當作模板，使用 LPCp-18F 和 LPCp-18R 這組引子進行 PCR 反應，夾出 RHD3 ORF，且兩端帶有限制酶切位 *Xhol* 和 *SphI*。以限制酶處理 RHD3 ORF 以及 p6HF-ACT1，經過純化及接合反應將 RHD3 接入 p6HF-ACT1 中，得到新的質體命名為 p6RHD3。p6RHD3 以酵素 *HincII* 處理預計會得到片段 227 bp、1172 bp、1961 bp 和 3440 bp，而對照組 p6HF-ACT1 預計會得到片段 227 bp、2521 bp 和 3440 bp(圖十八酵素切位示意圖)，其中 227 bp 跑過頭在電泳圖上 250 bp 附近沒有看到預期片段。以電泳結果看來(圖十八)，Lane 1 (p6HF-ACT1) 在 2.5 Kbp 附近以及 3 Kbp~4 Kbp 之間有預期片段。而 Lane 2, 4, 5, 6, 7, 8 (p6RHD3-1, 3, 4, 5, 6, 7) 在 1 Kbp 附近、2 Kbp 附近以及 3 Kbp~4 Kbp 之間有預期片段。將 p6RHD3-1, 3 送定序確認 RHD3 ORF 的正確性，使用引子 LPCt-7R 和 LPCp-18R。以定序結果看來，並沒有突變產生 (圖十九)。

#### 4.3.2 將 p6RHD3 送入白色念珠菌中

使用酵素 *NcoI* 處理質體 p6RHD3-1，純化後以電穿孔法送入雙套剔除株 AH16 中，預期送入的片段會利用 *CaRP10* ORF 插入染色體中。以 SD 培養基進行初步的篩選，挑選存活的菌落進行培養存菌，並以冷熱法抽取 genomic DNA 進行 PCR 反應加以確認。使用的引子 LPCp-19F 和 LPCT-7R，預期會夾出 2914 bp 大小的片段。由電泳結果看來，Lane 2 (AHRHD-1) 和 Lane 7 (AHRHD-15) 在 2.5 Kbp~3 Kbp 之間有預期片段 (圖二十)。

#### 4.3.3 將 p6HF-ACT1 送入白色念珠菌中

使用酵素 *NcoI* 處理質體 p6HF-ACT1，純化後以電穿孔法送入 AH16 中，預期送入的片段會利用 *CaRP10* ORF 插入染色體中。以 SD 培養基進行初步的篩選，挑選存活的菌落進行培養存菌，並以冷熱法抽取 genomic DNA 進行 PCR 反應加以確認。在這裡所使用的引子為 LPCp-19F 和 LPCp-19R，預期會夾出 1932 bp 大小的片段。以電泳結果看來，對照組 Lane 1 (AHRHD-1) 在 2 Kbp 附近有預期的片段，而 Lane 9 (AH6HF-48) 和 Lane 10 (AH6HF-49) 在 2 Kbp 附近也有預期的片段(圖二十一)。

#### 4.3.4 以南方點墨法確認菌株

將菌株 SC5314, BWP17, A21, AH16, AHRHD-1, AHRHD-15, AH6HF-48 和 AH6HF-49 以傳統法抽取 genomic DNA 進行南方點墨法確認。使用酵素 *EcoRV*，探針分別為 *RHD3* ORF, *CaRP10* 以及 *RHD3* 之上游片段(A region)，預期結果如下：(單位 bp)

探針	SC5314	BWP17	A21	AH16	AHRHD	AH6HF
<i>RHD3</i> ORF	3361	3361	3361	4702	4702	4702
			4702	2297	2297	2297

					12199	
<i>CaRP10</i>	5399	5399	5399	5399	5399 12199	5399 11587
A region	3361	3361	3361 4702	4702 2363	4702 2363	4702 2363

以 A region 為探針的南方點墨法結果(圖二十二)，對照組 SC5314 和 BWP17 在 3 Kbp~4 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十二箭號 b 所示。單套剔除株 A21 則是在 3 Kbp~4 Kbp 之間以及 4 Kbp~5 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十二箭號 b、a 所示。而雙套剔除株 AH16、*ACT1 promoter* 表現株 AHRHD-1, 15 以及表現株之對照組 AH6HF-48, 49，在 4 Kbp~5 Kbp 之間以及 2 Kbp~2.5 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十二箭號 a、c 所示。

以 *CaRP10* 為探針的南方點墨法結果(圖二十三)，對照組 SC5314 和 BWP17、單套剔除株 A21 以及雙套剔除株 AH16 在 5 Kbp~6 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十三箭號 b 所示。而 *ACT1 promoter* 表現株 AHRHD-1 以及表現株之對照組 AH6HF-49，在大於 10 Kbp 附近以及 5 Kbp~6 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十三箭號 a、b 所示。

以 *RHD3* 為探針的南方點墨法結果(圖二十四)，對照組 SC5314 和 BWP17 在 3 Kbp~4 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十四箭號 c 所示。單套剔除株 A21 則是在 3 Kbp~4 Kbp 之間以及 4 Kbp~5 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十四箭號 c、b 所示。而雙套剔除株 AH16 以及表現株之對照組 AH6HF-48, 49，在 4 Kbp~5 Kbp 之間以及 2 Kbp~2.5 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十四箭號 b、d 所示。而 *ACT1 promoter* 表現株 AHRHD-1 在大於 10 Kbp 附近、4 Kbp~5 Kbp 之間以及 2 Kbp~2.5 Kbp 之間有預期的片段被偵測到，如圖二十四箭號 a、b、d 所示。

綜合以上三組結果，SC5314、BWP17、A21、AH16、AHRHD-1 和 AH6HF-49 的結果合乎預期。

#### 4.3.5 以北方點墨法確認 *RHD3* 基因表現

將 SC5314、BWP17、A21、AH16、AHRHD-1、AH6HF-49 和 HLC54 以 3.14.2 的方式培養，抽取 RNA 進行北方點墨法確認 *RHD3* 的表現量。Internal control 為 *ACT1*。由結果看來 SC5314 和 BWP17 的表現量差不多。單套剔除株 A21 的 *RHD3* 表現量很微弱，雙套剔除株 AH16 以及表現株之對照組 AH6HF-49 的 *RHD3* 皆已被剔除，所以偵測不到表現。至於 *ACT1* promoter 表現株 AHRHD-1 的 *RHD3* 的表現量和 SC5314 差不多，但還是遠小於 HLC54 (圖二十五)。

#### 4.4 使用 *SAT1* flipper cassette 篩選建構 *RHD3* 單套、雙套剔除株

*SAT1* flipper cassette 是近年來發展適用於白色念珠菌野生株 SC5314 的篩選標記(Reuss et al., 2004)。整個 cassette 存在於質體 pSFS-SAT1，包含由 *ACT1* promoter 調控表現之白色念珠菌基因 *CaSAT1*，可以抗藥物 Nourseothricin，在此用來當作篩選標記；由 *MAL2* promoter 調控的 *CaFLP*，當以 maltose 為碳源培養時，會誘發 *MAL2* promoter 轉錄 *CaFLP*，產生 site-specific recombinase；以及在 cassette 兩端帶有特定序列 FRT (minimal FLP recombination target sequence)。作法是將目標基因的上下游片段以 Cloning 接在 *SAT1* flipper cassette 的兩端，完成之後將帶有上下游片段的 *SAT1* flipper cassette 由質體上切下，轉型到白色念珠菌 SC5314 中。送入的片段便會利用上下游的相似區域進行同源重組置換，將目標基因以 *SAT1* flipper cassette 取代，達到基因剔除的目的。接著只要將轉型的菌株培養在含有 Nourseothricin 的培養基中，便可以篩選出帶有 *SAT1* flipper

cassette 的菌株。然後再將篩選到的菌株培養在 YPmaltose 培養液中，因為以 maltose 當作碳源，因此 *CaFLP* 便會轉譯出 site-specific recombinase。Site-specific recombinase 會辨認 cassette 兩端的 FPT 序列，進行重組將 *SAT1* flipper cassette 由 genome 中 pop-out，留下一個 FRT 序列。然後便可以重複使用 *SAT1* flipper cassette 將另一個 allele 的目標基因剔除。

#### 4.4.1 在質體 pSFS-SAT1 上建構 *RHD3* 刪除片段 (圖二十六 A)

以 SC5314 genomic DNA 為模板，使用引子 LPCp-12F 和 LPCp-12R 進行 PCR 反應，得到 *RHD3* 上游片段，稱為 A region。以酵素 *KpnI* 和 *Apal* 處理 A region 和 pSFS-SAT1，接著將 A region 接入 pSFS-ACT1 中，得到新質體命名為 pASAT。pASAT 以酵素 *Aval* 作用預期會得到片段 316 bp、3174 bp 和 3964 bp。而對照組 pSFS-SAT1 預計會得到片段 3106 bp 和 3964 bp。以電泳結果看來，Lane 1 (pSFS-SAT1) 在 3 Kbp 附近有兩條片段，而 Lane 2~4 (pASAT-1~3) 和 Lane 6~9 (pASAT-5, 6, 8, 9) 在 3 Kbp 附近有兩條片段，以及在 300 bp 附近有一條預期的片段(圖二十七)。同樣以 SC5314 genomic DNA 為模板，使用引子 LPCp-13F 和 LPCp-9R 進行 PCR 反應，得到 *RHD3* 的下游片段，稱為 B region。以酵素 *SacI* 和 *SacII* 處理 B region 和 pASAT，接著將 B region 接入 pASAT-1 中，得到新質體命名為 pASATB。pASATB 以酵素 *Bsal* 作用預期會得片段 1634 bp 和 6212 bp，而對照組 pASAT 預期會得片段 7475 bp。以電泳結果看來，Lane 5~9 (pASATB-4~8) 在 1.5 Kbp 附近有預期的片段(圖二十八箭頭處)。

#### 4.4.2 建構 *RHD3* 單套、雙套剔除株 (圖二十六 B)

將質體 pASATB 以酵素 *KpnI* 和 *SacI* 處理並加以純化，以電穿孔送入白色念珠菌 SC5314 中。以含有 Nourseothricin 的 YPD 培養基進行篩選。

將篩選得到的菌落培養在 YPmaltose 中，進行 pop-out。將培養完的菌取約 300~500  $\mu$ l，以冷熱法抽取 genomic DNA，並以 PCR 反應對菌株進行初步的篩選。使用的引子 LPCp-1F 和 LPCp-14R 進行 PCR 反應，如果有成功的將其中一套 *RHD3* 置換掉，並且成功的將 cassette 剔除，便會得到 2010 bp 和 1264 bp 這兩個片段(圖二十九 A)。以電泳結果看來 78K1-5 和 78K1-10，在 1 Kbp~1.5 Kbp 之間以及在 2 Kbp 左右的位置都有預期片段出現(圖二十九 B: Before replica)。將 78K1-5 和 78K1-10 進行 Replica plating，挑選只在不含有 nourseothricin 培養基上存活的菌落，進行存菌並以 PCR 再次確認。同樣使用 LPCp-1F 和 LPCp-14R 這組引子，由電泳圖中可以看到，78K1-5A、78K1-5B、78K1-5C、78K1-10A、78K1-10B 和 78K1-10C 在 1 Kbp~1.5 Kbp 之間以及在 2 Kbp 左右的位置都有預期片段出現(圖二十九 B: After replica)，應為成功的單套剔除株。

接著重複之前的步驟，將酵素處理過的質體 pASATB 送入 78K1-5A 和 78K1-10A 中，並以含有 Nourseothricin 的 YPD 培養基進行初步的篩選。同樣的將篩選到的菌株以 YPmaltose 培養液進行 pop-out 反應，並抽取 genomic DNA 進行 PCR 確認。同樣使用 LPCp-1F 和 LPCp-14R 這組引子，如果有成功將另一套 *RHD3* 置換成 *SAT1* cassette，並將 cassette 成功 pop-out，則只會得片段 1264 bp。在電泳圖上看到，78K2-4, 5, 8, 17 似乎只有在 1 Kbp~1.5 Kbp 之間有預期的片段(圖二十九 C: Before replica)。將 78K2-4, 5, 8, 17 進行 Replica plating，然後挑選只在不含有 nourseothricin 培養基上存活的菌落，進行存菌並再次以 PCR 確認。在電泳圖上看到，78K2-4A、78K2-4B、78K2-4C、78K2-17B 和 78K2-17C 只有在 1 Kbp~1.5 Kbp 之間有預期的片段，在 2 Kbp 附近並沒有片段出現(圖二十九 C: After replica)。

## 4.5 建構以 SAT1 flipper cassette 為篩選標記使用 ACT1 promoter 表現 RHD3 的菌株

作法是將接上 ACT1 promoter 的 RHD3 接到 pASATB 的 A region 後方，之後以酵素作用將片段：A region-ACT1 promoter-RHD3-SAT1 flipper cassette-B region 由質體上切下，送入 RHD3 雙套剔除株中。片段便可利用 A region 和 B region 進行同源重組置換，將接上 ACT1 promoter 的 RHD3 送入 genome 中。

### 4.5.1 建構片段：A region-ACT1 promoter-RHD3-SAT1 flipper cassette-B region (圖三十)

以質體 pSFS-SAT1 為模板，使用 LPCp-11F 和 LPCp-11R-2 這組引子進行 PCR。將 pSFS-SAT1 上所帶的 ACT1 promoter 夾出。接著以酵素 *Apal* 和 *Xhol* 處理，將 ACT1 promoter 接到質體 pBluescript II SK+ 上，得到的新質體命名為 pBACT。pBACT 以酵素 *Hinc* II 處理，預計會切出片段 591 bp 和 3577 bp。由電泳圖看來，Lane 5, 6 (pBACT) 在 3 Kbp~4 Kbp 之間以及 500 bp~750 bp 之間有預期片段(圖三十二)。以酵素 *Nde*I 處理預計會得到片段 4168 bp，在電泳圖中 Lane 2, 3 (pBACT) 在 4 Kbp 附近有預期片段(圖三十二)。接著以白色念珠菌 SC5314 genomic DNA 為模板，以 LPCp-10F-2 和 LPCp-10R-2 這組引子進行 PCR 反應夾出 RHD3 ORF。以酵素 *Nde*I 和 *Xhol* 處理，將 RHD3 ORF 接到質體 pBACT 上，ACT1 promoter 後方，得到的新質體命名為 pBACT78。pBACT78 以酵素 *Hinc* II 處理預計會得到片段 3577 bp、935 bp 以及 316 bp。由電泳結果看來，Lane 9, 11, 13, 14, 17(pBACT78-9, 11, 13, 14, 17) 在 250 bp~500 bp 之間、750 bp~1 Kbp 之間以及 3 Kbp~4 Kbp 之間有預期片段(圖三十三)。建構完成的質體以引子 LPCs-pB R 進行定序確認 RHD3 的正確性，以定序結果看來 pBACT78-11 上所帶的 RHD3 ORF

並沒有突變產生(圖三十四)。接著以酵素 *Apal* 和 *Xhol* 處理質體 pBACT78，將 *ACT1 promoter* 和 *RHD3* 切下，並接入質體 pASATB 中，A region 和 SAT1 flipper cassette 的中間，完成片段：A region-*ACT1 promoter-RHD3-SAT1 flipper cassette-B region* 的建構。建構完成的質體命名為 pSATov。pSATov 以酵素 *Sall* 作用預計會得到片段 2297 bp、1837 bp 和 5549 bp，而對照組 pASATB 預期片段為 2297 bp 和 5585 bp。由電泳結果看來，Lane 2~13 (pSATov-1~12) 在 1.5 Kbp~2 Kbp 之間皆有預期片段(圖三十五)。

#### 4.5.2 建構以 *ACT1 promoter* 表現 *RHD3* 的菌株 (圖三十一)

以酵素 *KpnI* 和 *SacI* 處理質體 pSATov，將片段：A region-*ACT1 promoter-RHD3-SAT1 flipper cassette-B region* 切下。以電穿孔法送入 *RHD3* 雙套剔除株 78K2-4A 中，接著片段便可以利用 A region 和 B region 進行同源重組置換，將接上 *ACT1 promoter* 的 *RHD3* 送入 genome 中。以含有 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選有成功置換的菌株，命名為 78Sov。將挑到的菌落培養在 YPmaltose 培養液中以誘發 cassette 的 pop-out。接著以冷熱法抽取 genomic DNA，以 PCR 進行初步的確認。使用引子 LPCp-1F 和 LPCp-14R 進行 PCR 反應，預計會夾出 1264 bp 和 3164 bp(圖三十六 A)。使用引子 LPCp-1F 和 LPCp-16R 進行 PCR 反應，預計會夾出 1586 bp(圖三十六 C)。將篩選成功的菌株進行 replica plating 並再次以 PCR 確認。由電泳結果看來(圖三十六 B)，對照組 SC5314 在 2 Kbp 的位置有預期片段出現，單套剔除株 78K1-5A、78K1-10A 在 2 Kbp 附近和 1 Kbp~1.5 Kbp 之間有預期片段，雙套剔除株 78K2-4A 和 78K2-17B 在 1 Kbp~1.5 Kbp 之間有預期片段。而 *ACT1 promoter* 表現株 78Sov-7A, 7B, 7C, 14A, 14B 在 1 Kbp~1.5 Kbp 之間和約 3 Kbp 的位置有預期片段。以(圖三十六 D)電泳結果看來，*ACT1 promoter* 表現株 78Sov-7A, 7B, 7C, 14A, 14B, 14C 在約 1.5

Kbp 的位置有預期片段。

#### 4.5.3 以南方點墨法確認 *RHD3* 單套、雙套剔除株以及 *ACT1* promoter 表現株

將 SC5314、78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B 和 78Sov-14A 以傳統法抽取 genomic DNA 進行南方點墨法確認。以酵素 *Nsil* 處理，*RHD3* 上游片段(A region)為探針。SC5314 預期會偵測到約 3.9 kbp 大小的片段。78K1-5A 和 78K1-10A 預計會偵測到 3.9 kbp 和 3.1 kbp 大小的片段。78K2-4A 和 78K2-17B 預計會偵測到 3.1 kbp 大小的片段。而 78Sov-7B 和 78Sov-14A 預計會偵測到 3.1 Kbp 和 5 Kbp 大小的片段(圖三十七 A)。以南方點墨法結果看來，對照組 SC5314 在約 4 Kbp 的位置有偵測到片段，單套剔除株 78K1-5A、78K1-10A 在 4 Kbp 附近和約 3 Kbp 附近有偵測到片段，雙套剔除株 78K2-4A 和 78K2-17B 在 3 Kbp 附近有偵測到片段。而 *ACT1* promoter 表現株 78Sov-7B 和 78Sov-14A 在在 3 Kbp 附近和約 5 Kbp 的位置有偵測到片段(圖三十七 B)。

#### 4.5.4 以北方點墨法確認 *RHD3* 的表現量

將菌株 SC5314、78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B、78Sov-14A 和 HLC54 以 3.14.2 的方式培養，抽取 RNA 進行北方點墨法，以 *ACT1* 當作 internal control。以結果看來若以 SC5314 的 *RHD3* 表現量當基準，單套剔除株 78K1-5A 的表現量少於 SC5314，而單套剔除株 78K1-10A 的表現量幾乎偵測不到。不過 78K1-10A 的 internal control 的亮度也小於 SC5314。雙套剔除株 78K2-4A 和 78K2-17B 的表現量也是偵測不到。*ACT1* promoter 表現株 78Sov-7B, 14A 的表現量小於 SC5314，而所有菌株的表現量皆遠小於 HLC54。(圖三十八)

#### 4.5.5 定序確認 *ACT1* promoter 的序列

將質體 pBACT 以引子 LPCs-PB R、LPCs-ACT 和 LPCp-16R 進行定序，以確認 *ACT1* promoter 表現株 78Sov 上所帶的 *ACT1* promoter 的正確性。結果在 *ACT1*-161 上 thymine 突變為 cytosine，在 *ACT1*-24 上 adenine 突變為 guanine，在 *ACT1*+256 上 adenine 突變為 guanine，在 *ACT1*+314~+333 有五組 TGAT 變成四組 TGAT，在 *ACT1*+517 上 adenine 突變為 guanine。（圖三十九）

#### 4.6 使用不同區域的 *ACT1* promoter 取代 78Sov 所用的 *ACT1* promoter（圖四十）

因為經過定序發現 78Sov 所使用的 *ACT1* promoter 和 SC5314 相比缺少四個核酸(TGAT)，因此希望修改原本使用的 promoter 以補全缺失的核酸。又因為質體 p6HF-ACT1 所使用的 *ACT1* promoter 的區域 (*ACT1*: -1022~-1) 和 質體 pSFS-SAT1 所使用的 *ACT1* promoter 的區域 (*ACT1*: -498~+703) 不同，所以用 LPCp-11F、LPCp-11R、LPCp-17F 和 LPCp-17R 這四條引子，以不同的組合進行 PCR 反應，來取得不同區域的 *ACT1* promoter(圖四十 A)。

	引子	模板	區域
ACT1 promoter A	LPCp-11F+LPCp-17R	SC5314 genomic DNA	<i>ACT1</i> : -498~-1
ACT1 promoter B	LPCp-17F+LPCp-11R	SC5314 genomic DNA	<i>ACT1</i> : -1022~+703
ACT1 promoter C	LPCp-17F+LPCp-17R	SC5314 genomic DNA	<i>ACT1</i> : -1022~-1
ACT1	LPCp-17F+LPCp-17R	p6HF-ACT1	<i>ACT1</i> : -1022~-1

promoter D			
ACT1	LPCp-11F+LPCp-11R	SC5314 genomic DNA	<i>ACT1</i> : -498~+703
promoter E			

#### 4.6.1 以新的 *ACT1* promoter 去取代 pBACT78 上原始的 promoter (圖四十 B)

將 PCR 所得到的新的 *ACT1* promoter 以酵素 *Apa*I 和 *Nde*I 處理以替換質體 pBACT78 上所帶的 *ACT1* promoter。所得到的新質體依替換的 promoter 區域的不同分別命名為 pBACT78A、pBACT78B、pBACT78C、pBACT78D 和 pBACT78E。以酵素 *Af*III 處理 pBACT78A 預期會得到片段 2746 bp 和 1383 bp。pBACT78B 預期會得到片段 634 bp、1452 bp 和 3270 bp。而控制組 pBACT78 則預期會得片段 630 bp、1452 bp 和 2746 bp (圖四十一切位示意圖)。由預測結果看來控制組會比 pBACT78A 多出片段 634 bp，在電泳圖上看來 Lane 2~6 (pBACT78A-25~29) 的確比控制組(Lane 1)少了一條位於 500 bp~750 bp 之間的片段。以預測結果來看 pBACT78B 有一片段 3270 bp 大於控制組 pBACT78 的片段 2746 bp，此一差距應該可以以電泳做個區分。在電泳圖上看來，Lane 9, 10, 12, 13, 14, 15 (pBACT78B-2, 3, 5, 6, 7, 8) 在 3 Kbp~4 Kbp 之間有一片段高於控制組(Lane 7)在 2.5 Kbp~3 Kbp 之間的片段(圖四十一)。

以酵素 *Af*III 處理 pBACT78C 預期會得到片段 1383 bp 和 3270 bp。pBACT78D 預期會得到片段 1383 bp 和 3272 bp。而控制組 pBACT78 則預期會得片段 630 bp、1452 bp 和 2746 bp (圖四十二切位示意圖)。以預期結果看來控制組會比 pBACT78C 和 pBACT78D 多出片段 634 bp，而 pBACT78C 和 pBACT78D 片段 3270 bp 會大於控制組 pBACT78 的片段 2746 bp。在電泳圖上可以看出，Lane 2~8 (pBACT78C-25~31)和 Lane 10~13

(pBACT78D-25~28)的確比控制組(Lane 1, 9)少了在 500 bp~750 bp 之間的片段。而且 Lane 2~8 (pBACT78C-25~31)和 Lane 10~13 (pBACT78D-25~28)在 3 Kbp~4 Kbp 之間有一片段高於控制組(Lane 1, 9)在 2.5 Kbp~3 Kbp 之間的片段(圖四十二)。

以酵素 *Af*/III 處理 pBACT78E 預期會得到片段 634 bp、1452 bp 和 2746 bp。而控制組 pBACT78 則是預期會得片段 630 bp、1452 bp 和 2746 bp。以預測結果看來唯一有差別的片段是 pBACT78E 的 634 bp 和 pBACT78 得 630 bp，兩者無法以電泳區分。所以將 pBACT78E 送定序以觀察是否置換成功。使用引子 LPCs-ACT 進行定序，若有成功置換掉原始的 ACT1 promoter，則會比控制組 pBACT78 多四個核酸(TGAT)。以定序結果看來 pBACT78E-1, 14 合乎預期(圖四十三)。

#### 4.6.2 將新的 ACT1 promoter 表現之 RHD3 接上 SAT1 flipper cassette (四十 B)

接著以酵素 *Apal* 和 *Xhol* 處理質體 pBACT78A、pBACT78B、pBACT78C、pBACT78D 和 pBACT78E，切下 ACT1 promoter 和 RHD3 ORF，並接到質體 pASATB 上，A region 的後方。將新質體以接入的 promoter 區域的不同，分別命名為 pSATovA、pSATovB、pSATovC、pSATovD 和 pSATovE。以酵素 *Af*/III 處理 pSATovA 預期會得到片段 630 bp、1067 bp、3435 bp 和 3882 bp。pSATovB 預期會得到片段 630 bp、634 bp、1591 bp、3504 bp 和 3882 bp。而控制組 pASATB 預期會得到片段 630 bp、3334 bp 和 3882 bp(圖四十四切位示意圖)。由預測結果看來 pSATovA 和控制組相比，多出一條 1067 bp 的片段。在電泳圖中 Lane 2, 3, 5, 6, 7 (pSATovA-1, 2, 4, 5, 6)的確比 Lane 1 (pASATB)多出一條位於 1 Kbp 左右的片段(圖四十四)。而 pSATovB 和控制組相比多出片段 634 bp 和 1519 bp，然而 634 bp 無法和 630 bp 在電泳上

有所區分，所以預期只會看到 1519 bp 造成的差別。以電泳圖看來 Lane 9~15 (pSATovB-1~7) 的確比 Lane 8 (pASATB) 多出一條位於 1.5 Kbp 左右的片段(圖四十四)。

以酵素 *Af*<sub>III</sub> 處理 pSATovC 預期會得片段 630 bp、1591 bp、3435 bp 和 3882 bp。pSATovD 預期會得片段 630 bp、1593 bp、3435 bp 和 3882 bp。而控制組 pASATB 預期會得到片段 630 bp、3334 bp 和 3882 bp (圖四十五切位示意圖)。由預測結果看來 pSATovC、pSATovD 和控制組相比，多出一條約 1.5 Kbp 的片段。由電泳圖看來 Lane 2~6 (pSATovC-1~5)和 Lane 8~12 (pSATovD-1~5)跟控制組(Lane 1, 7)比起來的確多了一條位於 1.5 Kbp 左右的片段(圖四十五)。

以酵素 *Af*<sub>III</sub> 處理 pSATovE 預期會得到片段 630 bp、634 bp、1067 bp、3504 bp 和 3882 bp。而控制組 pASATB 預期會得到片段 630 bp、3334 bp 和 3882 bp (圖四十六切位示意圖)。由預測結果看來 pSATovE 和控制組相比多出片段 634 bp 和 1067 bp，然而 634 bp 無法和 630 bp 在電泳上有所區分，所以預期只會看到 1067 bp 造成的差別。以電泳結果看來 Lane 2~6 (pSATovE-1~5) 跟控制組(Lane 1)比起來的確多了一條約 1 Kbp 左右的片段(圖四十六)。

#### 4.6.3 將新的 *ACT1* promoter 表現之 *RHD3* 送入白色念珠菌雙套剔除株中 (圖四十 C)

以酵素 *Kpn*I 和 *Sac*I 處理質體 pSATovA, B, C, D, E，將片段：A region-*ACT1* promoter(A, B, C, D, E)-*RHD3-SAT1* flipper cassette-B region 切下。以電穿孔法將片段送入 *RHD3* 雙套剔除株(78K2-4A)中，接著片段便可以利用 A region 和 B region 進行同源重組置換，將 *ACT1* promoter 和 *RHD3* 送入 genome 中。以含有 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選有成功置換的菌株，

依照 promoter 的不同分別命名為 78SovA、78SovB、78SovC、78SovD 和 78SovE。將挑到的菌落培養在 YPmaltose 培養液中以誘發 cassette 的 pop-out。接著以冷熱法抽取 genomic DNA，用 PCR 進行初步的確認。菌株 78SovA、78SovC、78SovD 和 78SovE 以引子 LP Ct-7F 和 LP Cp-15R 進行確認，78SovA 預計會得到 813 bp 和 1935 bp(圖四十七 A: 2+3)，78SovC 預計會得到 813 bp 和 2459 bp(圖四十七 A: 2+4)，78SovD 預計會得到 813 bp 和 2461 bp(圖四十七 A: 2+5)，78SovE 預計會得到 813 bp 和 2715 bp(圖四十七 A: 2+6)。由電泳結果看來(圖四十七 B)，Lane 5, 8, 9, 11 (78SovA-2, 5, 6, 8) 在 750 bp~1 Kbp 之間及在 1.5 Kbp~2 Kbp 有片段出現，應是合乎預期的菌株。由(圖四十七 C)的電泳結果看來，Lane 4, 8, 9 (78SovC-1, 5, 6) 在 750 bp~1 Kbp 之間及在 2 Kbp~2.5 Kbp 有片段出現，應是合乎預期的菌株。由(圖四十七 D)的電泳結果看來，Lane 12, 13, 15 (78SovD-1, 2, 4) 在 750 bp~1 Kbp 之間及在 2 Kbp~2.5 Kbp 有片段出現，應是合乎預期的菌株。由(圖四十七 E)的電泳結果看來，Lane 4, 7, 8, 10, 11 (78SovE-9, 12, 13, 15, 16) 在 750 bp~1 Kbp 之間及在 2.5 Kbp 附近有片段出現，應是合乎預期的菌株。菌株 78SovB 則以引子 LP Cp-1F 和 LP Ct-7R 進行確認，預期片段為 3192 bp(圖四十八 A)。由電泳結果看來(圖四十八 B)，Lane 6, 7 (78SovB-3, 4) 在約 3 Kbp 附近有片段出現，應是合乎預期的菌株。將合乎預期的菌株進行 Replica plating，並再次以 PCR 確認。

#### 4.6.4 進行南方點墨法確認菌株 78SovA、78SovB、78SovC、78SovD 和 78SovE

以 SC5314、78K1-5A 和 78K2-4A 當對照組，78SovA、78SovB、78SovC、78SovD 和 78SovE 各挑選兩株菌進行南方點墨法確認。以酵素 *Nsi*I 處理，A region 為探針。預計偵測到的片段，對照組 SC5314 為 3937 bp(圖四十

九 A: 1)，單套剔除株 78K1-5A 為 3937 bp 和 3191 bp(圖四十九 A: 1+2)，雙套踢除株 78K2-4A 為 3191 bp(圖四十九 A: 2)。而 *ACT1* promoter 表現株 78SovA 為 3191 bp 和 4390 bp(圖四十九 A: 2+3)，78SovB 為 3191 bp 和 5617 bp(圖四十九 A: 2+4)，78SovC 為 3191 bp 和 4914 bp(圖四十九 A: 2+5)，78SovD 為 3191 bp 和 4916 bp(圖四十九 A: 2+6)，78SovE 為 3191 bp 和 5093 bp(圖四十九 A: 2+7)。以南方點墨法看來(四十九 B)，SC5314 在 4 Kbp 附近有偵測到片段，78K1-5A 在 3 Kbp 和 4 Kbp 之間皆有偵測到片段，78K2-4A 在 3 Kbp 附近有偵測到片段，78SovA-5, 6 在 3 Kbp 附近和 4 Kbp~5 Kbp 之間有偵測到片段，78SovB-3, 4 在 3 Kbp 附近和 5 Kbp~6 Kbp 之間有偵測到片段，78SovC-5, 6 在 3 Kbp 和 5 Kbp 之間皆有偵測到片段，78SovD-1, 2 在 3 Kbp 和 5 Kbp 之間皆有偵測到片段，78SovE-9, 15 在 3 Kbp 和 5 Kbp 之間皆有偵測到片段，結果皆合乎預期。

#### 4.6.5 以北方點墨法確認 *RHD3* 的表現量

將菌株 SC5314、78K1-5A、78K2-4A、78SovA-5, 6、78SovB-3, 4、78SovC-5, 6、78SovD-1, 2、78SovE-9, 15 和 HLC54 以 3.14.2 的方式培養，抽取 RNA 進行北方點墨法，以 *ACT1* 當作 internal control。因 internal control 的一致度不夠，所以難以判別各 *ACT1* promoter 表現株 78Sov(A, B, C, D, E) 和野生株 SC5314 之間的 *RHD3* 表現量的差異。但可以確定的是所有表現株的 *RHD3* 表現量皆遠小於 HLC54。(圖五十)

### 4.7 性狀分析-以營養篩選之 *RHD3* 單套、雙套剔除株

#### 4.7.1 菌落型態-使用含有 4% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養基

將菌株 SC5314、HLC54、BWP17、A21、AH16 和 AH17 接種於含有 4% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養基，以 37 °C 培養三天，觀察菌落型

態。其中 SC5314、HLC54 和 BWP17 為對照組，A21 為單套剔除株，AH16 和 AH17 為雙套剔除株。SC5314 為野生株，具有菌絲生長能力，在這培養條件下菌落表面成皺褶狀。而 HLC54 為 *cph1* 和 *efg1* 剔除株，在這培養條件下不具菌絲生長能力，菌落表面光滑。BWP17 為這組菌株的 parental strain，菌落表面呈皺褶狀。A21、AH16 和 AH17 的菌落表面亦是成皺褶狀。(圖五十一)

#### 4.7.2 菌落型態-使用 2% Bacto agar 培養基(含有 4%山羊血清、arginine、histidine 及 uridine)

將菌株 SC5314、HLC54、BWP17、A21、AH16 和 AH17 接種於 2% Bacto agar 培養基(含有 4%山羊血清、arginine、histidine 及 uridine)，以 37 °C 培養七天，以倒立式顯微鏡觀察菌落型態。SC5314 在此培養條件下菌落邊緣菌絲呈輻射狀生長。HLC54 此培養條件下菌落邊緣平滑且大致呈圓型。BWP17、A21、AH16 和 AH17 的菌落邊緣菌絲亦呈輻射狀生長。(圖五十二)

#### 4.7.3 芽管生成

將菌株 SC5314、HLC54、BWP17、A21、AH16 和 AH17 接種於含有 10%山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養液，以 37 °C 培養三小時，以倒立式顯微鏡觀察芽管生成。SC5314 在此培養條件下會生成芽管，HLC54 在此培養條件下並不會生成芽管。BWP17、A21、AH16 和 AH17 皆會形成芽管。(圖五十三)

#### 4.7.4 侵犯力測試

將菌株 SC5314、HLC54、BWP17、A21、AH16 和 AH17 接種於 Solid spider

培養基(含有 arginine、histidine 及 uridine)，以 37 °C 培養七天，觀察菌落型態，接著以流水沖洗菌落，觀察菌落的附著情況。SC5314 在此培養條件下菌落表面呈現皺摺，以流水沖刷菌落皆附著在洋菜膠表面。HLC54 此培養條件下菌落表面光滑，且菌落可經由流水沖洗掉。BWP17、A21、AH16 和 AH17 菌落表面介於 SC5314 和 HLC54 之間，多數表面光滑少部分有皺摺，經流水沖洗菌落會殘留在洋菜膠表面。(圖五十四)

#### 4.8 性狀分析-以營養篩選之 *ACT1 promoter* 表現株

##### 4.8.1 菌落型態-使用含有 4% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養基

將菌株 SC5314、HLC54、BWP17、A21、AH16、AHRHD-1 和 AH6HF-49 接種於含有 4% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養基，以 37 °C 培養三天，觀察菌落型態。其中 SC5314、HLC54 和 BWP17 為對照組，A21 為單套剔除株，AH16 和 AH17 為雙套剔除株，AHRHD-1 為 *ACT1 promoter* 表現株，AH6HF-49 為 AHRHD-1 的對照組。SC5314 在此培養條件下菌落表面成皺褶狀。HLC54 在此培養條件下菌落表面光滑。BWP17、A21、AH16、AHRHD-1 和 AH6HF-49 的菌落表面皆是成皺褶狀。(圖五十五)

##### 4.8.2 菌落型態-使用 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清、arginine、histidine 及 uridine)

將菌株 SC5314、HLC54、BWP17、A21、AH16、AHRHD-1 和 AH6HF-49 接種於 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清、arginine、histidine 及 uridine)，以 37 °C 培養七天，以倒立式顯微鏡觀察菌落型態。SC5314 在此培養條件下菌落邊緣菌絲呈輻射狀生長。HLC54 此培養條件下菌落邊緣平滑且大致呈圓型。BWP17、A21、AH16、AHRHD-1 和 AH6HF-49 的菌落邊緣菌絲亦呈輻射狀生長。(圖五十六)

#### 4.8.3 芽管生成

將菌株 SC5314、HLC54、BWP17、A21、AH16、AHRHD-1 和 AH6HF-49 接種於含有 10% 山羊血清以及 uridine 之 YPD 培養液，以 37 °C 培養三小時，以倒立式顯微鏡觀察芽管生成。SC5314 在此培養條件下會有芽管的生成，HLC54 在此培養條件下並不會生成芽管。BWP17、A21、AH16、AHRHD-1 和 AH6HF-49 皆會形成芽管。(圖五十七)

#### 4.8.4 侵犯力測試

將菌株 SC5314、HLC54、BWP17、A21、AH16、AHRHD-1 和 AH6HF-49 接種於 Solid spider 培養基(含有 arginine、histidine 及 uridine)，以 37 °C 培養七天，觀察菌落型態，接著以流水沖洗菌落，觀察菌落的附著情況。SC5314 在此培養條件下菌落表面呈現皺摺，以流水沖刷菌落皆附著在洋菜膠表面。HLC54 此培養條件下菌落表面光滑，且菌落可經由流水沖洗掉。BWP17、A21 和 AH16 菌落表面介於 SC5314 和 HLC54 之間，多數表面光滑少部分有皺摺，經流水沖洗菌落會殘留在洋菜膠表面。AHRHD-1 和 AH6HF-49 菌落表面光滑，且菌落可經由流水沖洗掉，但會在洋菜膠表面留下明顯的痕跡。(圖五十八)

### 4.9 性狀分析-以 SAT1 flipper cassette 篩選之 RHD3 單套、雙套剔除株以及 ACT1 promoter 表現株 78Sov

#### 4.9.1 菌落型態-使用含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基

將菌株 SC5314、HLC54、78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B 和 78Sov-14A 接種於含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基，以 37 °C 培養三天，觀察菌落型態。其中 SC5314 和 HLC54 為對照組，78K1-5A 和 78K1-10A 為單套剔除株，78K2-4A 和 78K2-17B 為雙套剔除株，78Sov-7B

和 78Sov-14A 為 *ACT1* promoter 表現株。SC5314 在這培養條件下菌落表面成皺褶狀。HLC54 在這培養條件下菌落表面光滑。78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B 和 78Sov-14A 的菌落皆呈現皺摺狀。(圖五十九)

#### 4.9.2 菌落型態-使用 2% Bacto agar 培養基(含有 4%山羊血清)

將菌株 SC5314、HLC54、78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B 和 78Sov-14A 接種於 2% Bacto agar 培養基(含有 4%山羊血清)，以 37 °C 培養七天，以倒立式顯微鏡觀察菌落型態。SC5314 在此培養條件下菌落邊緣菌絲呈輻射狀生長。HLC54 在此培養條件下菌落邊緣平滑且大致呈圓型。78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B 78Sov-7B 和 78Sov-14A 菌落邊緣菌絲呈輻射狀生長，和 SC5314 相比無法分出差別。(圖六十)



#### 4.9.3 芽管生成

將菌株 SC5314、HLC54、78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B 和 78Sov-14A 接種於含有 10%山羊血清之 YPD 培養液，以 37 °C 培養三小時，以倒立式顯微鏡觀察芽管生成。SC5314 在此培養條件下會有芽管的生成，HLC54 在此培養條件下並不會生成芽管。78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B 和 78Sov-14A 皆會形成芽管。(圖六十一)

#### 4.9.4 侵犯力測試

將菌株 SC5314、HLC54、78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B 和 78Sov-14A 接種於 Solid spider 培養基，以 37 °C 培養七天，

觀察菌落型態，接著以流水沖洗菌落，觀察菌落的附著情況。SC5314 在此培養條件下菌落表面呈現皺摺，以流水沖刷菌落皆附著在洋菜膠表面。HLC54 此培養條件下菌落表面光滑，且菌落可經由流水沖洗掉。78K1-5A、78K1-10A、78K2-4A、78K2-17B、78Sov-7B 和 78Sov-14A 菌落表面皆呈現皺摺，且以流水沖刷菌落皆附著在洋菜膠表面。(圖六十二)

#### 4.10 性狀分析-以 SAT1 flipper cassette 篩選之 ACT1 promoter 表現株 78SovA、78SovB、78SovC、78SovD 和 78SovE

##### 4.10.1 菌落型態-使用含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基

將菌株 SC5314、HLC54、78K1-5A、78K2-4A、78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 接種於含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基，以 37 °C 培養三天，觀察菌落型態。其中 SC5314 和 HLC54 為對照組，78K1-5A 為單套剔除株，78K2-4A 為雙套剔除株，78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 為 ACT1 promoter 表現株。SC5314 在這培養條件下菌落表面成皺褶狀。HLC54 在這培養條件下菌落表面光滑。78K1-5A、78K2-4A、78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 的菌落皆呈現皺摺狀。(圖六十三)

##### 4.10.2 菌落型態-使用 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清)

將菌株 SC5314、HLC54、78K1-5A、78K2-4A、78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 接種於 2% Bacto agar 培養基(含有 4% 山羊血清)，以 37 °C 培養七天，以倒立式顯微鏡觀察菌落型態。SC5314 在此培養條件下菌落

邊緣菌絲呈輻射狀生長。HLC54 在此培養條件下菌落邊緣平滑且大致呈圓型。78K1-5A、78K2-4A、78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 菌落邊緣菌絲呈輻射狀生長，和 SC5314 相比無法分出差別。(圖六十四)

#### 4.10.3 芽管生成

將菌株 SC5314、HLC54、78K1-5A、78K2-4A、78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 接種於含有 10% 山羊血清之 YPD 培養液，以 37 °C 培養三小時，以倒立式顯微鏡觀察芽管生成。SC5314 在此培養條件下會有芽管的生成，HLC54 在此培養條件下並不會生成芽管。78K1-5A、78K2-4A、78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 皆會生成芽管。(圖六十五)

#### 4.10.4 侵犯力測試

將菌株 SC5314、HLC54、78K1-5A、78K2-4A、78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 接種於 Solid spider 培養基，以 37 °C 培養七天，觀察菌落型態，接著以流水沖洗菌落，觀察菌落的附著情況。SC5314 在此培養條件下菌落表面呈現皺摺，以流水沖刷菌落皆附著在洋菜膠表面。HLC54 此培養條件下菌落表面光滑，且菌落可經由流水沖洗掉。78K1-5A、78K2-4A、78SovA5、78SovA6、78SovB3、78SovB4、78SovC5、78SovC6、78SovD1、78SovD2、78SovE9 和 78SovE15 的菌落表面皆呈現皺摺，且以流水沖刷菌落皆附著在洋菜膠表面。(圖六十六)

## 五、討論

### 5.1 探討使用 *TR* promoter 表現 *RHD3* 的表現情形

78BWOV-6 和 78BWOV-9 的基因型為其中一套 *RHD3* 是經由 *TR* promoter 調控表現，另一套為保持野生株的型態。在培養條件中有外加 doxycycline 的情形下，*TR* promoter 便不會被激活，因此 *RHD3* 的表現下降。而在不添加 doxycycline 的培養下，*TR* promoter 會開始表現後方的基因 *RHD3*。因此預期在不添加 doxycycline 的情形下，*RHD3* 的表現量會大於 doxycycline 存在的情形，且有文獻指出 *TR* promoter 在這兩種情況下，表現量約可差 1000 倍左右(Eckert and Mühlischlegel, 2009)。但是由(圖十六)的結果看來，並沒有明顯的差異，認為 *TR* promoter 可能並沒有執行它應有的功能。*TR* promoter 沒有執行功能可能有以下兩種原因，第一：promoter 有錯誤，第二：tetR 沒有表現。首先先檢查 promoter 的部分，以 PCR 方式夾出 78BWOV-6 和 78BWOV-9 中的 *TR* promoter 送定序。然後將定序結果和 NCBI 的資料庫進行比對，發現 *TR* promoter 的序列和質體 pNZ4:1513~2070 序列相同(圖六十七)，且 pNZ4 這個區域正是 *TR* promoter(附圖三)。而 tetR 是否有表現，在這部分因為 BWP17/tetR 這株菌中的 tetR 是以 *HIS1* 當作篩選標記送入，且篩選過程中，將菌株培養於沒有添加 histidine 的環境下，依然可以存活，所以認為 tetR 是存在的，但是並沒有進一步去確認 tetR 的表現情形。

### 5.2 探討使用 *ACT1* promoter 表現 *RHD3* 的表現情形

#### 5.2.1 白色念珠菌 AHRHD-1 的 *RHD3* 表現情形

AHRHD-1 是將質體 p6RHD3 插入基因 *RP10* 中的菌株，使用 *ACT1* promoter 表現 *RHD3*。以北方點墨法的結果看來(圖二十五)，*ACT1* promoter 似乎可以將 *RHD3* 表現量提升到和野生株 SC5314 相同的等級，

但是和 HLC54 相比還是有很大的差距。

### 5.2.2 白色念珠菌 78Sov 的 *RHD3* 表現情形

78Sov 同樣的是以 *ACT1* promoter 表現 *RHD3* 的菌株，以北方點墨法的結果看來(圖三十八)，*ACT1* promoter 的確有表現 *RHD3*，但表現量並無法提升到如同 HLC54 的等級。

### 5.2.3 白色念珠菌 78SovA、78SovB、78SovC、78SovD 和 78SovE 的 *RHD3* 表現情形

這幾株白色念珠菌也是使用 *ACT1* promoter 表現 *RHD3* 的菌株，但是 promoter 所使用的區域不大相同(圖四十 A)，原本是希望藉由不同區域的 *ACT1* promoter，來取得一個比較好的表現量。但是以北方點墨法的結果看來(圖五十)，因為這組的 internal control 的不一致使得無法判斷使用哪一個區域的 *ACT1* promoter 會得到較好的表現量。不過不管是使用哪一個區段的 *ACT1* promoter 皆無法將表現量提升到如同 HLC54 的等級。

## 5.3 性狀分析

### 5.3.1 菌落型態-添加 4% 山羊血清之 YPD 培養基(並視需要添加 uridine)

對照組野生株 SC5314 和 HLC54 在所使用的兩種培養基(添加 uridine 或不添加 uridine)下，菌落型態皆符合已知。SC5314 的菌落型態為皺褶表面，而 HLC54 則是光滑表面。而實驗組 *RHD3* 單套、雙套剔除株，不論是使用營養標記剔除或是使用 *SAT1* flipper cassette 剔除，在菌落型態上皆呈皺褶表面。至於 *ACT1* promoter 表現株不論是使用 *RP10* 基因插入或是使用 *SAT1* flipper cassette 將 promoter 送入，在菌落型態上皆呈皺褶

表面。(圖五十一、五十五、五十九、六十三)

### 5.3.2 菌落型態-添加 4%山羊血清之 Bacto agar 培養基(視需要添加 uridine、arginine 以及 histidine)

野生株 SC5314 在有無添加 uridine、arginine 以及 histidine 的培養基中，型態有些許的不一樣。在沒有添加 uridine、arginine 以及 histidine 的情形下，菌絲均勻的朝四面八方生長(圖六十、六十四)。但是在有添加的情形下，菌絲似乎有集中的情形，在菌落邊緣會有顏色比較深的突出(圖五十二、五十六)。但是不論有無額外添加營養素，野生株 SC5314 皆可形成菌絲。而 HLC54 在兩種培養基中皆不具有菌絲生長能力，菌落邊緣平滑且大致呈圓形(圖五十二、五十六、六十、六十四)。BWP17 為營養篩選組的 parental strain，在添加 uridine、arginine 以及 histidine 的培養基中，同樣會生成菌絲，但是菌絲一樣有集中的情形，菌落邊緣會有較深且粗的突出(圖五十二、五十六)。在營養篩選組的剔除株或是 ACT1 promoter 表現株，其菌絲生長情形皆相似於 BWP17(圖五十二、五十六)。在使用 SAT1 flipper cassette 進行剔除 RHD3 和插入 ACT1 promoter 表現株的部分，所有菌株的菌落型態大多相似於野生株 SC5314，菌絲均勻向四周生長，除了 78Sov7B 有些集中的現象。但總體而言所有的剔除株和 ACT1 promoter 表現株，皆有生長菌絲的能力(圖六十、六十四)。

### 5.3.3 芽管生成-添加 10%山羊血清之 YPD 培養液(並視需要添加 uridine)

野生株 SC5314 不論在添加 uridine 的培養液中，或是在沒有添加 uridine 的培養液中，都會生成芽管。HLC54 則不具有芽管生成能力，不論在哪種培養液中。而所有的實驗菌株不論是剔除株或是 ACT1 promoter

表現株皆可以生成芽管。(圖五十三、五十七、六十一、六十五)

#### 5.3.4 侵犯力測試- Solid spider 培養基(視需要添加 arginine、histidine 及 uridine)

野生株 SC5314 不論培養基是否有額外添加營養素，其菌落表面皆呈現皺褶狀，以流水沖洗，菌落皆牢牢附著在洋菜膠表面。HLC54 也是不論培養基是否有額外添加營養素，其菌落表面皆呈平滑狀，以流水沖刷，可以輕易洗掉菌落(圖五十四、五十八、六十二、六十六)。BWP17 為營養篩選組的 parental strain，在有添加營養素的 Solid spider 培養基上，菌落型態介於 SC5314 和 HLC54 之間，以流水沖洗會有菌落殘留在洋菜膠上(圖五十四、五十八)。營養篩選組剔除株的菌落型態相似於 BWP17，以流水沖洗同樣的會有菌落的殘留(圖五十四、五十八)。而營養篩選組的 ACT1 promoter 表現株(AHRHD-1)，菌落表面平滑型態接近 HLC54。以流水沖洗菌落也可以輕易沖掉，但是會在洋菜膠表面留下明顯的痕跡(圖五十八)。在使用 SAT1 flipper cassette 進行剔除 RHD3 和插入 ACT1 promoter 表現株的部分，所有菌株的菌落型態皆和 SC5314 相同，表面呈皺褶狀，且以流水沖洗，菌落皆牢牢附著在洋菜膠表面(圖六十二、六十六)。AHRHD-1 的型態接近 HLC54 有三種可能，第一：所插入的 ACT1 promoter 表現的 RHD3 所造成的影響，第二：破壞基因 RP10 所造成的影響，第三：插入基因 URA3 所造成的影響。如果是插入 ACT1 promoter 表現的 RHD3 所造成的，那在使用 SAT1 flipper cassette 送入的 ACT1 promoter 表現株中應該會看到類似的結果，但是這部分的 ACT1 promoter 表現株其形態都相似於 SC5314。至於後二個可能性在設計實驗時已有考慮到，因此便建構了菌株 AH6HF-49，這株菌是將質體 p6HF-ACT1 插入基因 RP10 中所得到的。在侵犯力實驗中，AH6HF-49 的菌落表面也是呈平

滑狀，型態接近 HLC54，以流水沖洗菌落也可被輕易沖掉，並在洋菜膠表面留下明顯的痕跡(圖五十八)。因此對 AHRHD-1 的影響比較有可能是來自於破壞 *RP10* 或是插入 *URA3* 所造成的。

#### 5.4 結語

本實驗目的是希望藉由觀察剔除和提高 *RHD3* 表現量對於白色念珠菌所造成影響，來進一步探討 *RHD3* 在白色念珠菌中所扮演的角色。不過在型態轉變方面的測試 *RHD3* 的剔除株和野生株之間看不出差別。在 De Boer, 2010 年所發表的研究中也指出，剔除 *RHD3* 並不會影響菌絲生成。*RHD3* 位於細胞壁，因此這篇文章中也測試了剔除株對幾種會影響細胞膜和細胞壁的化學物質的反應，例如：SDS、高濃度 NaCl、calcofluor white、 $\beta$ -1,3-glucanase 以及 Zymolyase，以及剔除株對上皮細胞的黏附能力，但皆看不出剔除株和野生株在這些測試中的差別。不過剔除株對小鼠的毒性跟野生株比起來有下降的趨勢。因此 *RHD3* 可能跟毒性之間有相關聯性。且剔除 *RHD3* 的菌株在誘發小鼠體內 cytokine 的表現和野生株的情況不同，GM-CSF、TNF、IL-6 和 IL-8 的表現量下降。

而提高 *RHD3* 表現量的部分，所使用的 promoter 只能將 *RHD3* 的表現量提升到約等同於野生株的情形，但我們希望看到在 *RHD3* 的表現量提升到約等同於 HLC54 的情形時，白色念珠菌是否會有些型態上的改變。而在 *RHD3* 表現提升到野生株的程度時，其在形態轉變上和野生株並沒有差異。

#### 5.5 未來展望

因為 *RHD3* 在 HLC54 中表現量大增，認為是 transcriptional factor *EFG1* 下游所調控的基因之一(附圖一)。而 *EFG1* 的剔除會影響白色念珠菌在血清中的菌絲生成，因此測試 *RHD3* 對形態轉變的影響。但是 *EFG1* 所調控

基因並不只有跟形態轉變有關，*EFG1* 也參與了 chlamydospore 的形成、生物膜的形成、phenotype switch，也會影響黏附力、毒性和調控跟代謝有關的基因(Biswas *et al.*, 2007)。*RHD3* 為細胞壁蛋白，而細胞壁蛋白可能負責：細胞壁結構的維持、遮蓋  $\beta$ -glucan、黏附力、生物膜的形成或是參與鐵離子的獲取(Klis *et al.*, 2009)。因此綜合以上兩點，未來還可以測試 *RHD3* 對於黏附力以及生物膜生成的影響。又鐵離子濃度會影響 *RHD3* 表現，因此可以進行鐵離子相關的測試。

而在提升表現量的部分，測試 78BWOV-6 和 78BWOV-9 的 tetR 表現情形，看 *TR* promoter 沒有作用是否是因為 tetR 沒有表現。還有嘗試使用其他不同的 promoter 來達成過表現的目的。例如 *PCK1* promoter 在 succinate 的存在下，會被誘發表現後方的基因，表現量約可提升 100 倍。也有文章使用過 *PCK1* promoter 過量表現 *RAM2* 和 *EFG1* (Eckert and Mühlischlegel, 2009)。*MET3* promoter 會因為環境中缺乏 methionine 和 cysteine 而表現，可以提升表現量約 85 倍 (Eckert and Mühlischlegel, 2009)。而 *HWP1* promoter 是當血清誘發菌絲生成時會大量表現的 promoter (Eckert and Mühlischlegel, 2009)，而 *RHD3* 在血清誘發下，表現量會下降 (De Boer *et al.*, 2010)，因此如果使用 *HWP1* promoter 表現 *RHD3*，便可以在血清誘發的情況下提供過量表現 *RHD3* 情形。

此外，也可以嘗試在 *EFG1* 剔除株中剔除 *RHD3*。因為剔除 *EFG1* 會使 *RHD3* 的表現量提高很多，因此 *RHD3* 在 *EFG1* 剔除株中可能扮演著重要的角色。

## 六、參考文獻

- 林啟陽 (2001) 交大碩士論文。白色念珠菌抗毒性相關之研究
- 蔡馨儀 (2009) 交大碩士論文。探討剔除白色念珠菌 *ENG1* 之影響
- Alting-Mees MA, Sorge JA, Short JM. (1992) pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol.* 216, 483-495
- Biswas K and Morschhauser J. (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 56, 649-669
- Biswas S, Van Dijck P, Datta A. (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71, 348-376
- Bockmuhl DP and Ernst JF. (2001) A potential phosphorylation site for an A-type kinase in Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* 157, 1523-1530
- Bockmühl DP, Krishnamurthy S, Gerads M, Sonneborn A, Ernst JF. (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 42, 1243-1257
- Brown AJ, Gow NA. (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 7, 333-338
- Care RS, Trevethick J, Binley KM, Sudbery PE. (1999) The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol.* 34, 792-798
- Chen YC, Chang SC, Sun CC, Yang LS, Hsieh WC, Luh KT. (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

Clark KL, Feldmann PJ, Dignard D, Larocque R, Brown AJ, Lee MG, Thomas DY, Whiteway M. (1995) Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* mating response pathway by a MAP kinase kinase from *Candida albicans*. *Mol Gen Genet.* 249, 609-621

Cloutier M, Castilla R, Bolduc N, Zelada A, Martineau P, Bouillon M, Magee BB, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. (2003) The two isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit are involved in the control of dimorphism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 38, 133-141

Csank C, Makris C, Meloche S, Schröppel K, Röllinghoff M, Dignard D, Thomas DY, Whiteway M. (1996) Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 8, 2539-2551

De Groot PW, Hellingwerf KJ, Klis FM. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20, 781-796

Eckert SE and Mühlischlegel FA. (2009) Promoter regulation in *Candida albicans* and related species. *FEMS Yeast Res.* 9, 2-15

Fidel P et al. (1999) *Candida glabrata*: a review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 80-96

Georgopapadakou NH. (2001) Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on beta-1,3-glucan synthase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs.* 10, 269-280

Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene

for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol Gen Genet.* 198, 179-182

Gow NA, Gooday GW. (1982) Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 128, 2187-2194.

Kaneko A, Umeyama T, Hanaoka N, Monk BC, Uehara Y, Niimi M. (2004) Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast.* 21, 1025-1033

Klis FM, Sosinska GJ, de Groot PJ, and Brul S. (2009) Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Res.* 9, 1013-1028

Köhler J and Fink GR, (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, 13223-13228

Lan CY, Rodarte G, Murillo LA, Jones T, Davis RW, Dungan J, Newport G, Agabian N. (2004) Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 53, 1451-1469

Leberer E, Harcus D, Broadbent ID, Clark KL, Dignard D, Ziegelbauer K, Schmidt A, Gow NA, Brown AJ, Thomas DY. (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13217-13222

Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X,

- Waugh M, Heitman J. (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 746-785
- Liu H, Köhler J, Fink GR. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science.* 266, 1723-1726
- Liu H, Styles CA, Fink GR. (1993) Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science.* 262, 1741–1744.
- Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* 90, 939-949
- Mao Y, Kalb VF, Wong B. (1999) Overexpression of a dominant-negative allele of SEC4 inhibits growth and protein secretion in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 181, 7235-7242
- Mattia E et al. (1982) Induction of germ tube formation by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*: uptake of inducer and germinative response. *J. Bacteriol.* 152, 555-562
- Mitchell AP. (1998) Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 687-692
- Nakayama H, Mio T, Nagahashi S, Kokado M, Arisawa M, Aoki Y. (2000) Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun.* 68, 6712-6719
- Navarro-García F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R, Nombela C. (1998) A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology.* 144, 411-424

Rasmussen B, Noller HF, Daubresse G, Oliva B, Misulovin Z, Rothstein DM, Ellestad GA, Gluzman Y, Tally FP, Chopra I. (1991) Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 35, 2306-2311

Román E *et al.* (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10611-10627

Román E, Arana DM, Nombela C, Alonso-Monge R, Pla J. (2007) MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol.* 15, 181-190

Reuss O, Vik A, Kolter R, Morschhäuser J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene.* 341, 119-127

Sato T *et al.* (2004) Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substrate in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 751-751

Sonneborn A, Bockmühl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D, Ernst JF. (2000) Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 35, 386-396

Staab JF, Bahn YS, Sundstrom P. (2003) Integrative, multifunctional plasmids for hypha-specific or constitutive expression of green fluorescent protein in *Candida albicans*. *Microbiology.* 149, 2977-2986

Staab JF, Sundstrom P. (2003) URA3 as a selectable marker for disruption

and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol.* 211, 69-73

Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. (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, 1982-1991

Umeyama T, Nagai Y, Niimi M, Uehara Y. (2002) Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*. *Yeast.* 19, 611-618

Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC. (1994) Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.* 2, 393-400

Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. (2000) Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 46, 171-179

Wenzel RP (1995) Nosocomial candidiasis: risk factors and attributable mortality. *Clin. Infect. Dis.* 20 1531-1534

Whiteway M et al. (1992) Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9410-9414

Wilson RB, Davis D, Mitchell AP. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol.* 181, 1868-1874

A

Query Sequence: UserInputSequence

Database: ORF DNA, Genomic (Coding and Introns) Sequences of defined ORFs (DNA); (Assembly 21):

Sequences producing significant alignments:	(bits)	value
orf19.5305 RHD3 CGID:CAL0004247 Assembly 21, Ca21chr4:867793-...	1515	2.2e-64
orf19.4334 PGA58 CGID:CAL0000986 Assembly 21, Ca21chr5:676508...	206	0.025
orf19.6310 orf19.6310 CGID:CAL0001257 Assembly 21, Ca21chrR:1...	194	0.16
orf19.4275 RAD9 CGID:CAL0000322 Assembly 21, Ca21chr5:582669-...	191	0.22
orf19.35 orf19.35 CGID:CAL0000551 Assembly 21, Ca21chr2:13411...	190	0.24
orf19.4629 orf19.4629 CGID:CAL0003650 Assembly 21, Ca21chr4:3...	182	0.49
orf19.5239 orf19.5239 CGID:CAL0003544 Assembly 21, Ca21chr1:2...	178	0.60
orf19.6918 orf19.6918 CGID:CAL0000173 Assembly 21, Ca21chr7:2...	178	0.61

B

orf19.5305 RHD3 CGID:CAL0004247 Assembly 21, Ca21chr4:867793-868407C (615 nucleotides)  
Verified ORF

GPI-anchored cell wall protein; transcription decreased upon yeast-hyphal switch; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; clade-associated gene expression; not essential for cell wall integrity

Length = 615

[ Retrieve Sequence / Genome Browser / Locus page / Literature Guide ]

Score = 233.4 bits (1515), Expect = 2.2e-64, P = 2.2e-64

Identities = 303/303 (100%)

Frame = +1 / +1

Query: 18 GGTACTCTTAGTTCACTGGTATGACAAAGTTACGCTTCCAAGAATGTCAACGATCCA 77  
|||||||

Sbjct: 313 GGTACTCTTAGTTCACTGGTATGACAAAGTTACGCTTCCAAGAATGTCAACGATCCA 372

Query: 78 TACCGTTACTCTGAAAGCGAATACGCTGTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCA 137  
|||||||

Sbjct: 373 TACCGTTACTCTGAAAGCGAATACGCTGTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCA 432

Query: 138 ATCACCATTTGCCAATTTCTGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGTGGTGTGCACAA 197  
|||||||

Sbjct: 433 ATCACCATTTGCCAATTTCTGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGTGGTGTGCACAA 492

Query: 198 GCTGCTTCAAGCAGTGCTGGCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACGGTGTGCT 257

|||||||

Sbjct: 493 GCTGCTTCAAGCAGTGCTGGCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACGGTGTGCT 552

Query: 258 GGCCAAAACAAATTAGCTATGGTGTGGTATGGCTGCTGTTGCTGGATTAGTCATG 317

|||||||

Sbjct: 553 GGCCAAAACAAATTAGCTATGGTGTGGTATGGCTGCTGTTGCTGGATTAGTCATG 612

Query: 318 TAA 320

|||

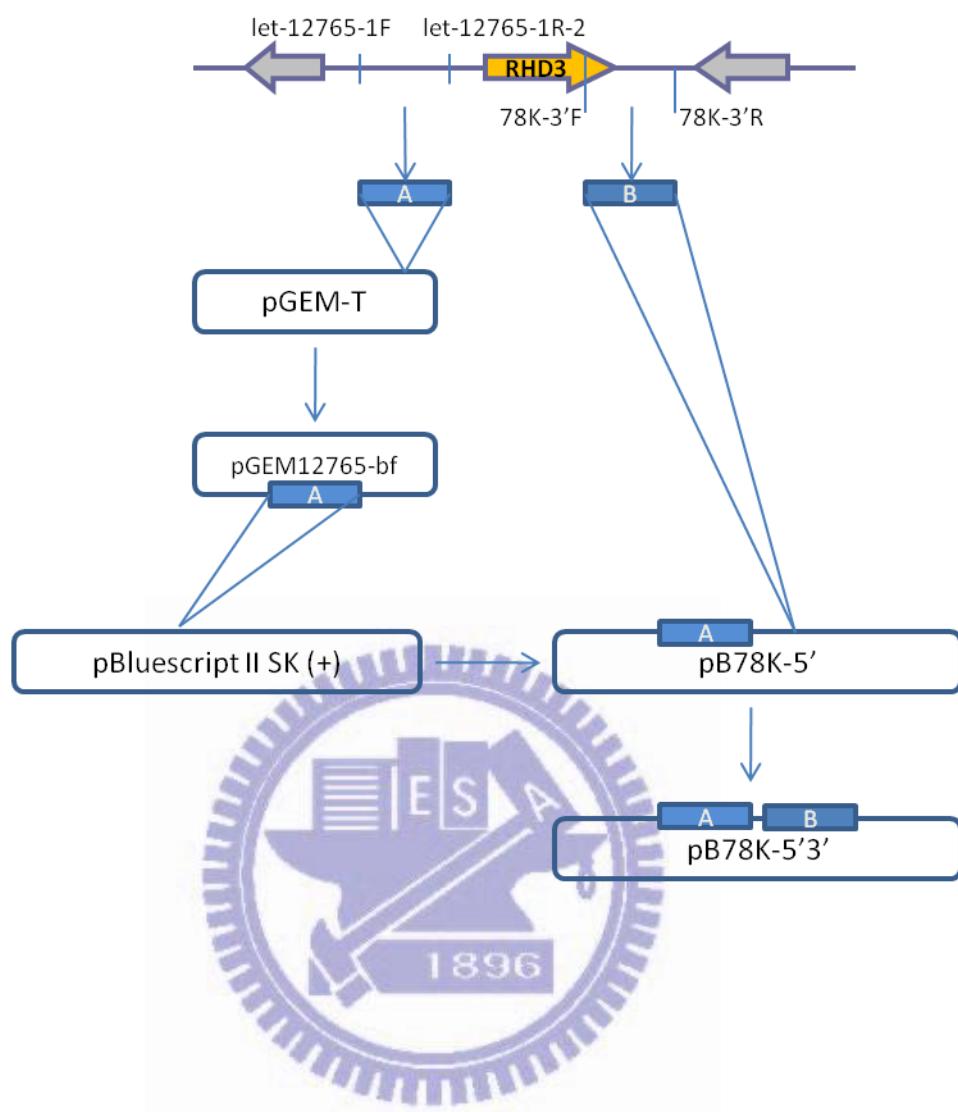
Sbjct: 613 TAA 615

圖一：Clone no. 78定序結果於Candida Genomic Database中的比對結果。

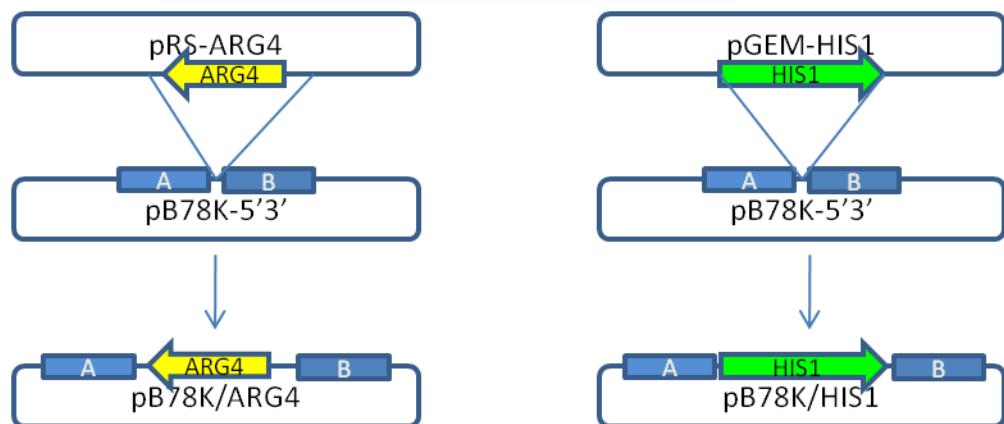
A : Clone no. 78所比對到的基因(部分)。

B : Clone no. 78和RHD3的比對結果。第一行為送入的Clone no. 78序列，第二行為database中RHD3的序列。

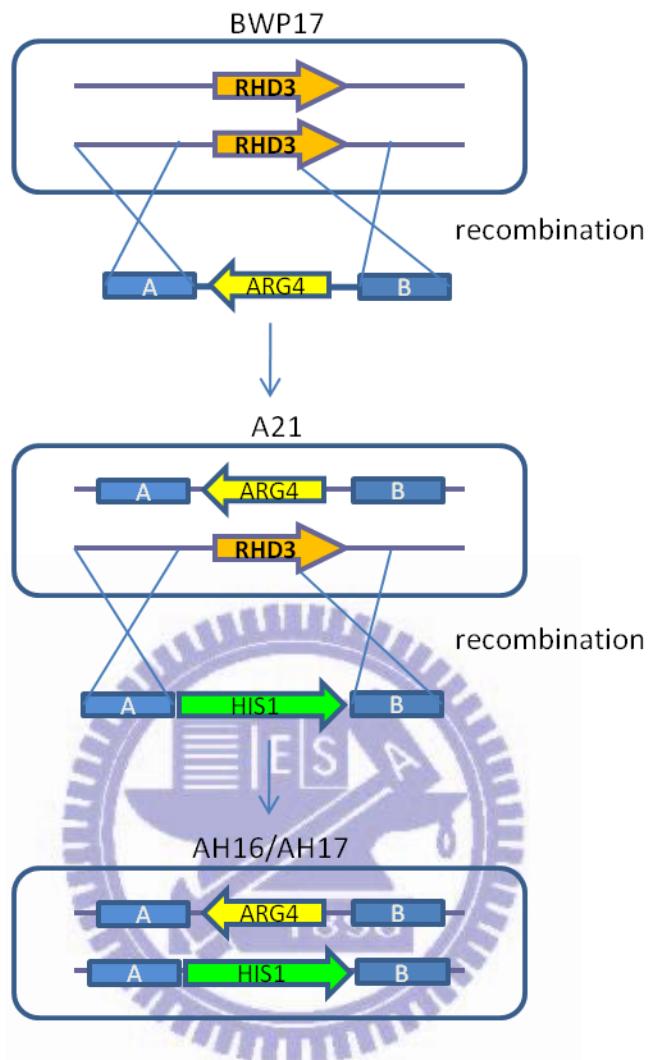
A



B

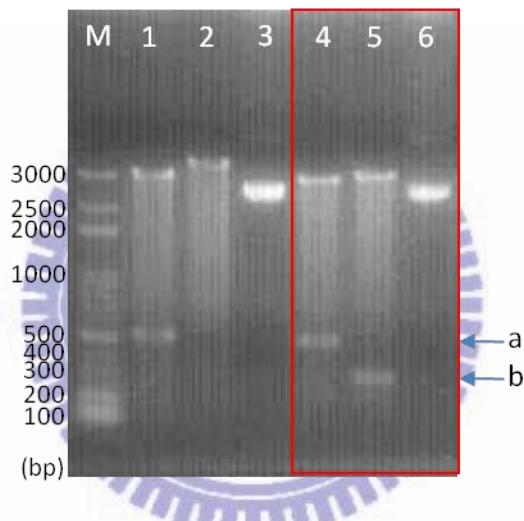
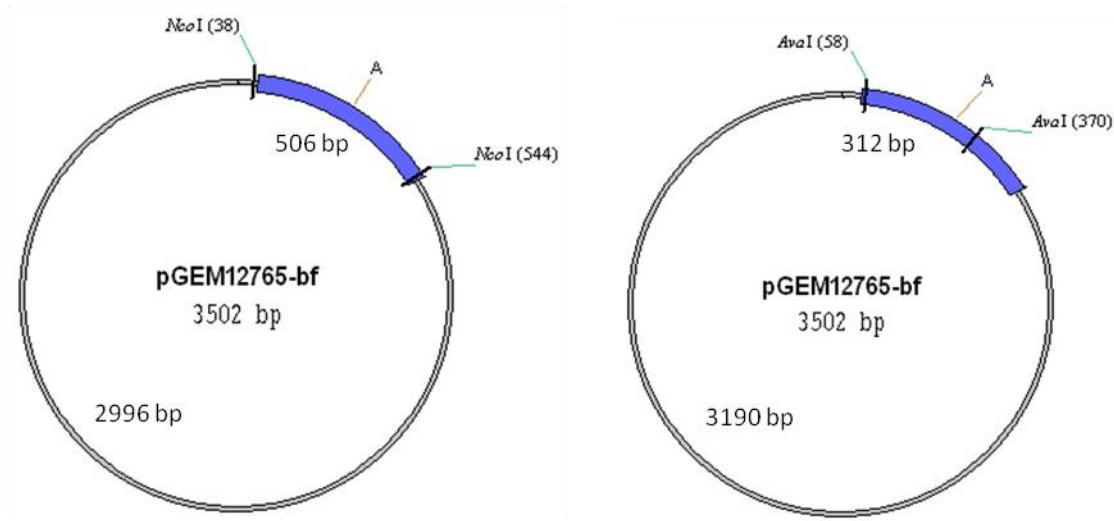


C



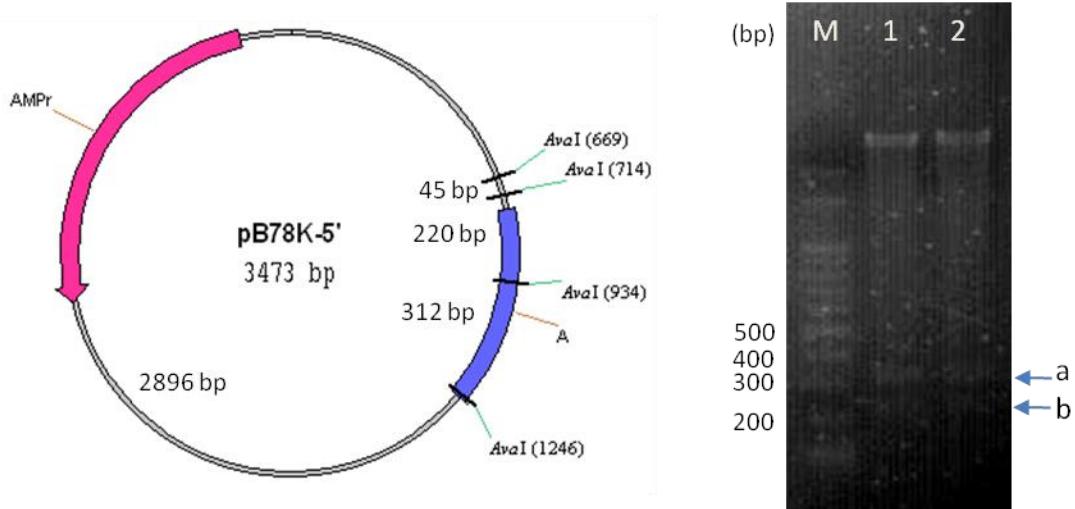
圖二：*RHD3*單套、雙套剔除株建構示意圖 (使用營養基因篩選)

- 將*RHD3*上下游序列接到質體pBluescript II SK +。以引子let-12765-1F和let-12765-1R-2夾出A(上游片段)，以引子78K'-3F和78K'-3R夾出B(下游片段)。以TA cloning方式將A接入T-vector中，再以Cloning方式將A轉接到pBluescript II SK +中，得質體pB78K-5'。再以Cloning方式將B接入pB78K-5'中，得質體pB78K-5'3'。
- 將營養基因接入上下游序列之間，完成剔除片段之建構。以Cloning將*ARG4*和*HIS1*接入pB78K-5'3'中。
- 將剔除片段送入白色念珠菌中完成*RHD3*單套、雙套剔除株的建構。以送入的剔除片段中的A、B進行同源重組置換。



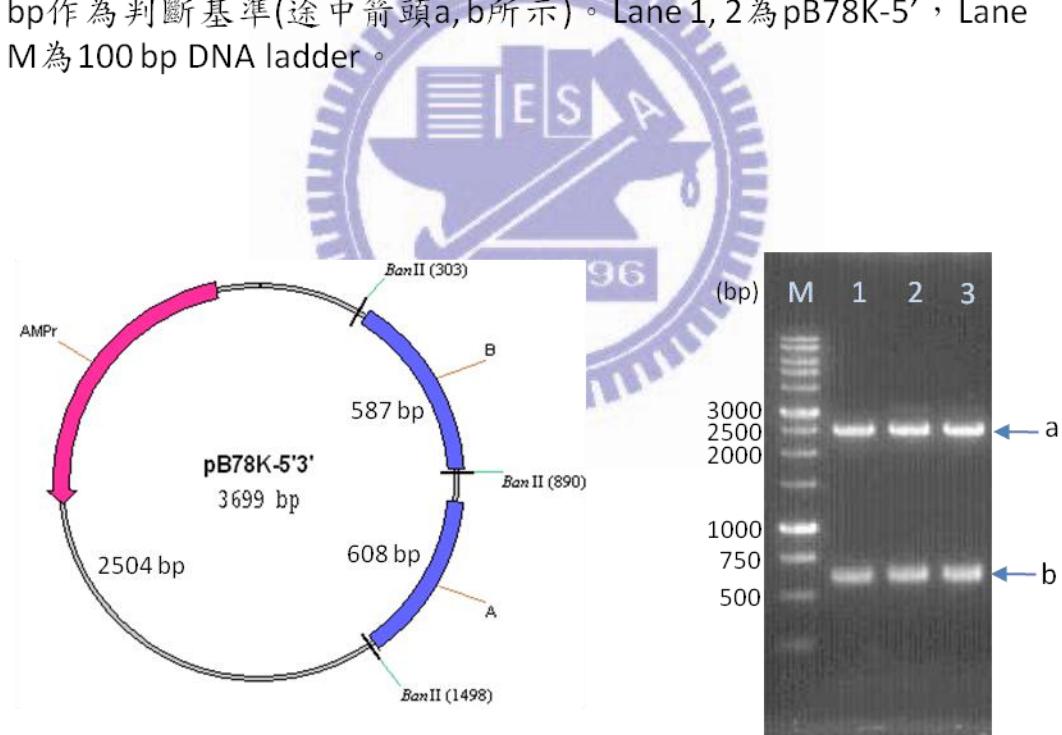
圖三：以限制酶確認pGEM12765-bf。

左方為切位示意圖，右方為電泳結果。質體以 *NcoI* 處理會得片段 506 bp (箭號 a) 和 2996 bp。以 *Aval* 處理會得片段 312 bp (箭號 b) 和 3190 bp。Lane 1~3 為質體 pGEM12765-bf-2，Lane 4~6 為質體 pGEM12765-bf-3。Lane 1, 4 以酵素 *NcoI* 處理，Lane 2, 5 以酵素 *Aval* 處理，Lane 3, 6 為未經過酵素處理的質體。Lane M 為 100 bp DNA ladder。



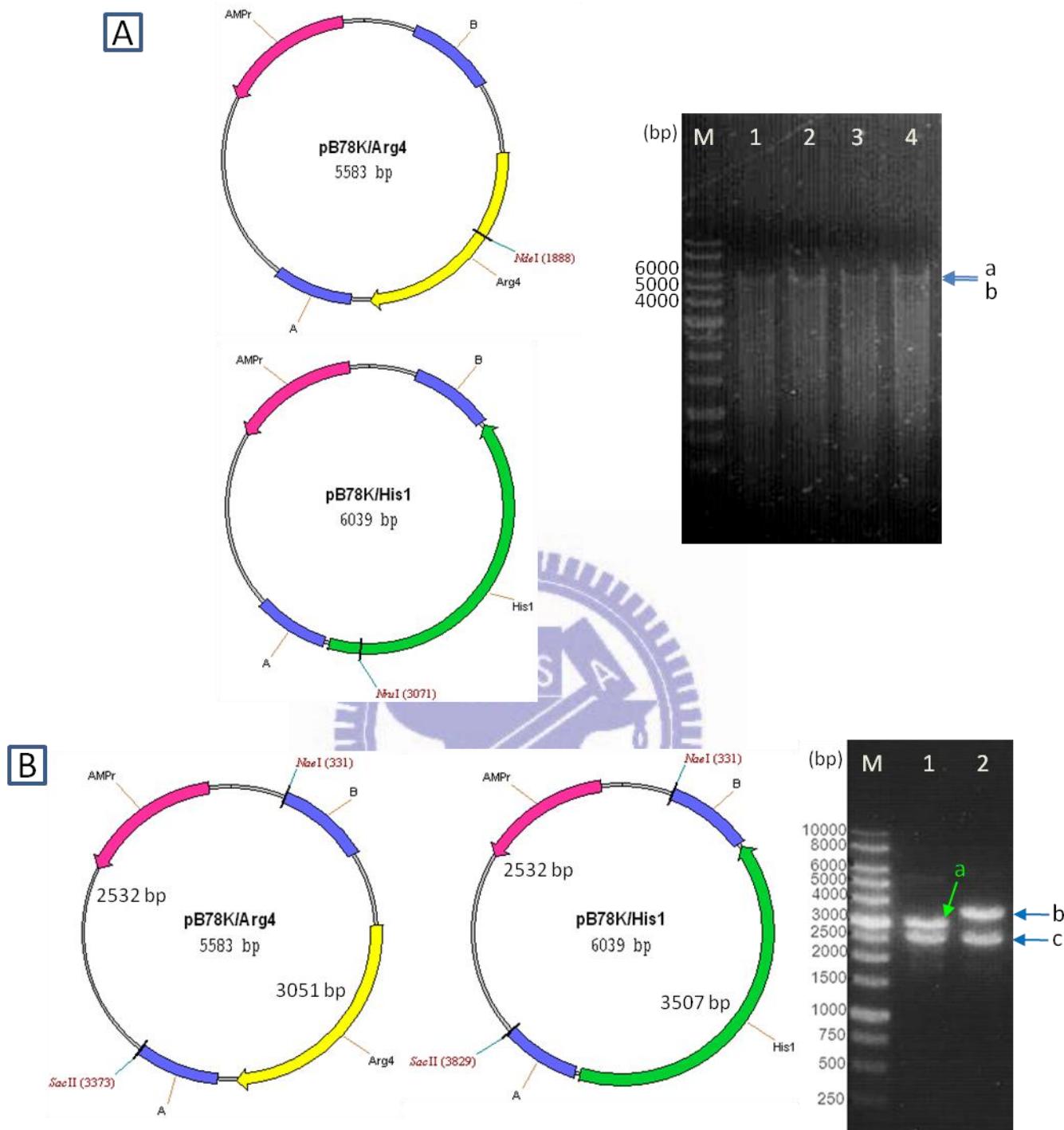
圖四：以限制酶Aval確認質體pB78K-5'。

以限制酶Aval作用預計會得片段45 bp、220 bp、312 bp和2896 bp。其中45 bp片段無法在電泳圖上顯示，因此以220 bp和312 bp作為判斷基準(途中箭頭a,b所示)。Lane 1, 2為pB78K-5'，Lane M為100 bp DNA ladder。



圖五：以限制酶確認pB78K-5'3'。

質體pB78K-5'3'以BanII處理預計會得片段587 bp、608 bp(箭號b)和2504 bp(箭號a)。Lane 1~3皆為BanII處理過的pB78K-5'3'。Lane M為1 Kb DNA ladder。

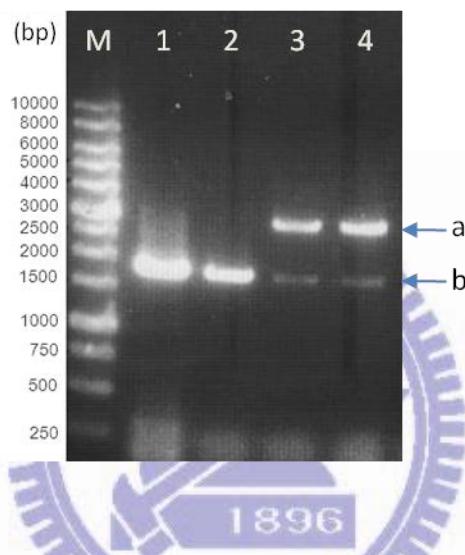
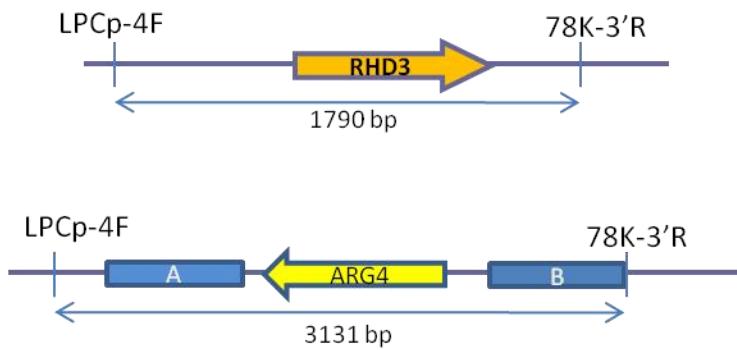


圖六：以限制酶確認pB78K/ARG4和pB78K/HIS1

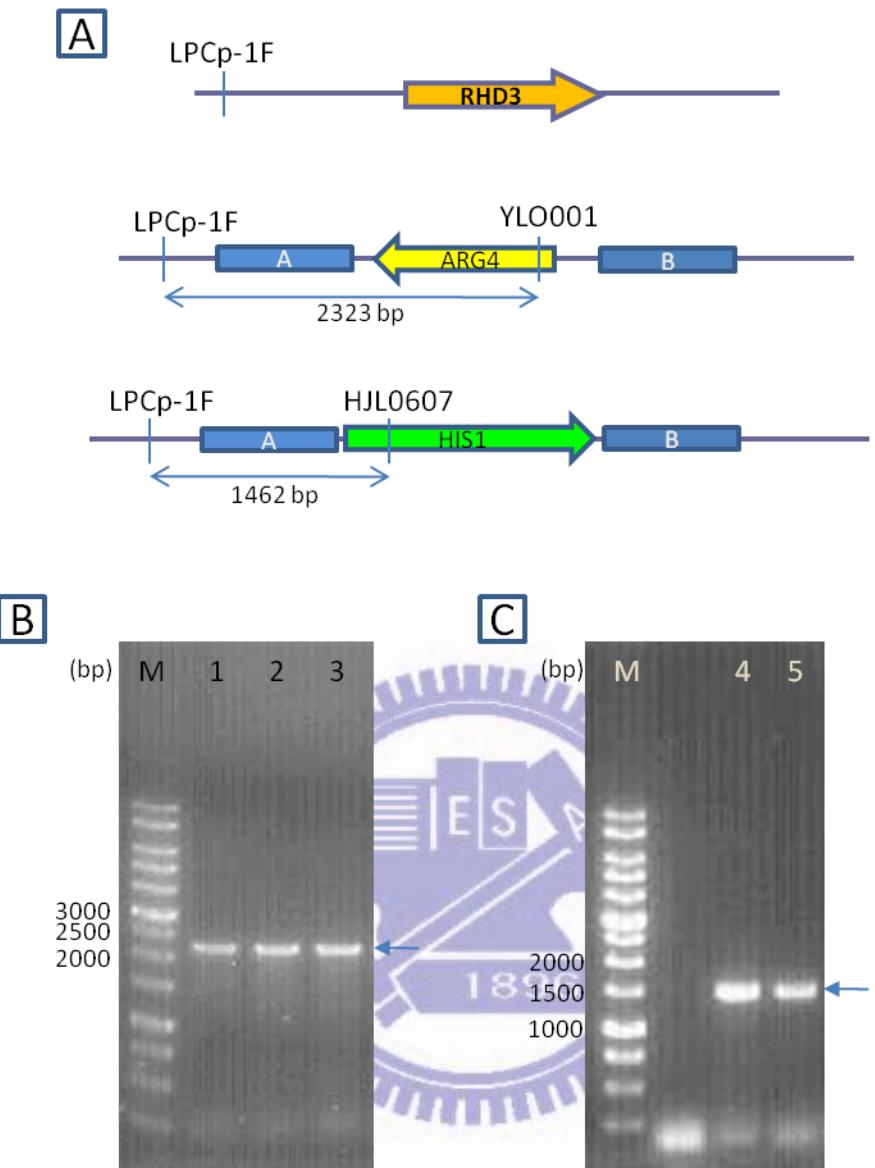
A : pB78K/ARG4以酵素 *NdeI*作用，會得片段 5583 bp (箭號 b)。

pB78K/HIS1以酵素 *NruI*作用，會得片段 6039 bp (箭號 a)。Lane 1, 2為 pB78K/ARG4，Lane 3, 4為 pB78K/HIS1，Lane M為 1 Kb DNA ladder。

B : 以酵素 *NaeI*和 *SacI*處理，pB78K/ARG4會得片段 2532 bp (箭號 c)和 3051 bp (箭號 a)。pB78K/HIS1會得片段 2532 bp (箭號 c)和 3507 bp (箭號 b)。Lane 1為 pB78K/ARG4，Lane 2為 pB78K/HIS1，Lane M為 1 Kb DNA ladder。



圖七：以PCR確認*RHD3*單套剔除株  
以引子LPCp-4F和78K-3'R進行PCR反應，預期會得片段1790 bp(箭號b)和3131 bp(箭號a)。  
Lane 1: SC5314 (*RHD3/RHD3*), Lane 2: A7 (*RHD3/rhd3::ARG4*), Lane 3: A15 (*RHD3/rhd3::ARG4*), Lane 4: A21 (*RHD3/rhd3::ARG4*), Lane M: 1 Kb DNA ladder。

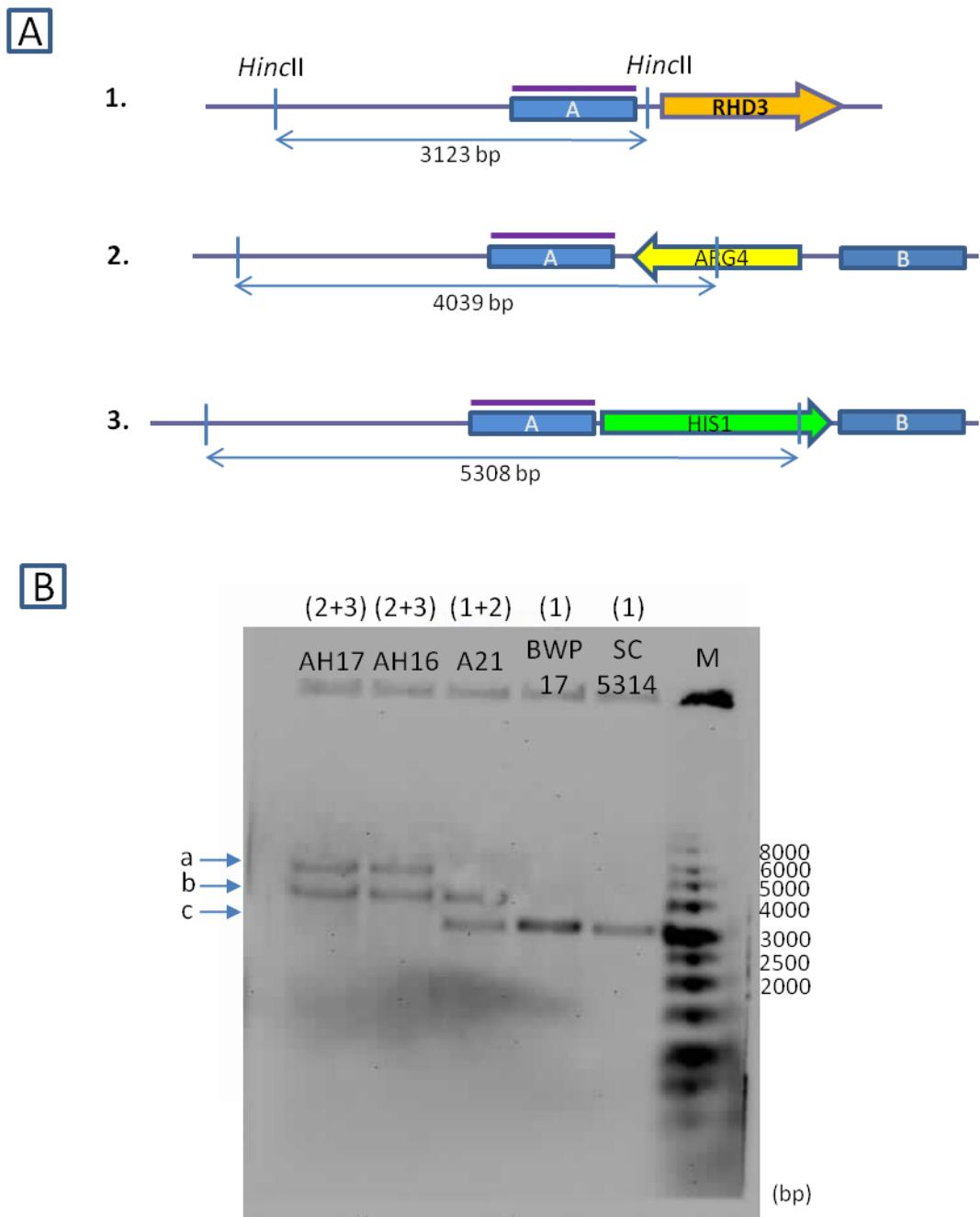


圖八：以PCR確認RHD3雙套剔除株

A：PCR預期結果示意圖。使用的引子為LPCp-1F、YLO001和HJL0607。

B：以引子LPCp-1F和YLO001進行PCR的電泳圖。Lane 1為控制組A21 (*RHD3/rhd3::ARG4*)，Lane 2為AH16 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*)，Lane 3為AH17 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*)，Lane M為1 Kb DNA ladder。

C：以引子LPCp-1F和HJL0607進行PCR的電泳圖。Lane 4為AH16 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*)，Lane 5為AH17 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*)，Lane M為1 Kb DNA ladder。

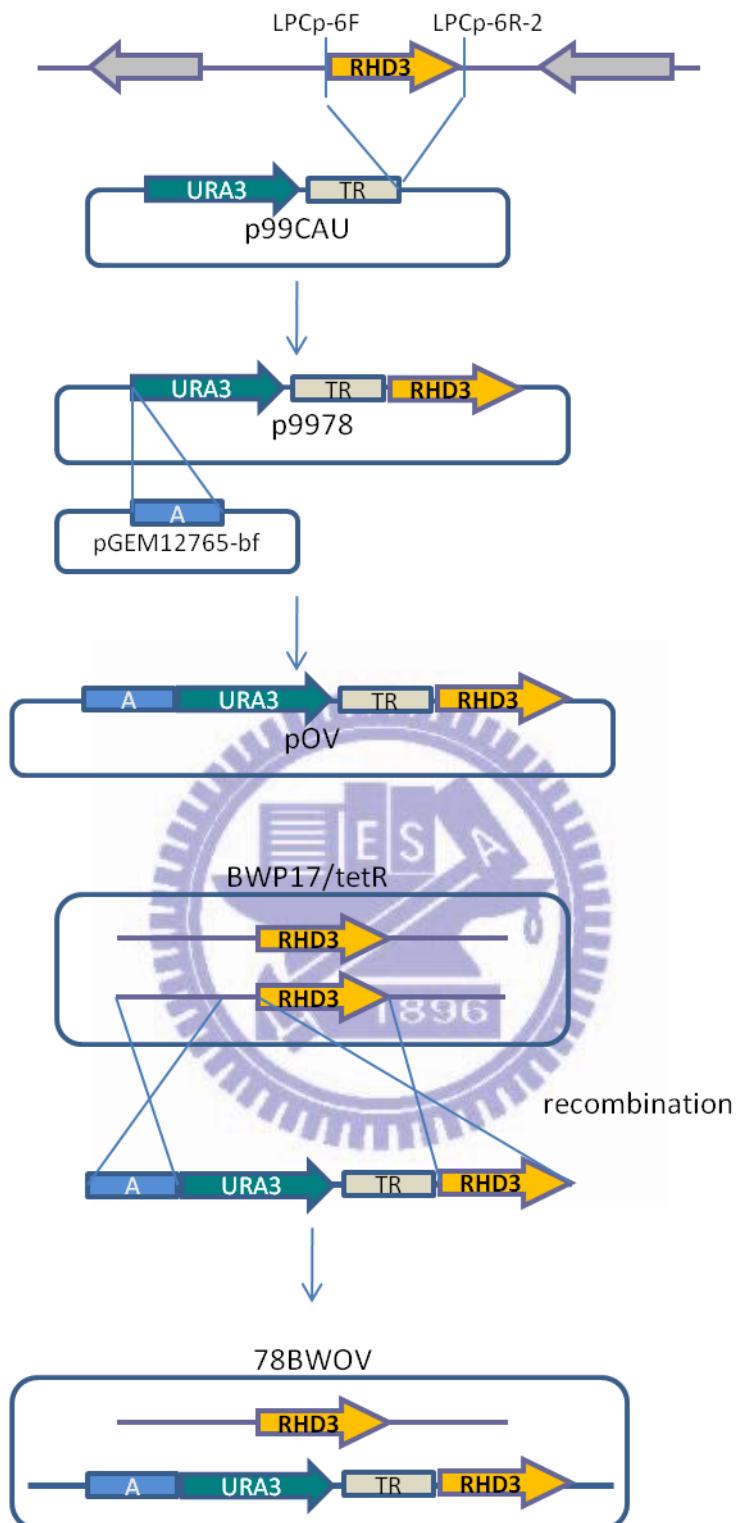


圖九：以南方點墨法確認*RHD3*單套、雙套剔除株

A：南方點墨法預期結果示意圖。使用酵素*HincII*(圖中短直線表切位)，探針A region(圖中橫線表探針位置)。

B：南方點墨法結果。a: 介於5 Kbp~6 Kbp之間，合乎圖A3之預期。b: 約4 Kbp，合乎圖A2之預期。c: 約3 Kbp，合乎圖A1之預期。

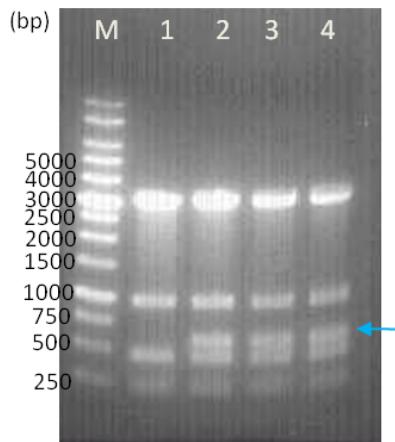
SC5314 (*RHD3/RHD3*), BWP17 (*RHD3/RHD3*), A21 (*RHD3/rhd3::ARG4*), AH16 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*), AH17 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*)



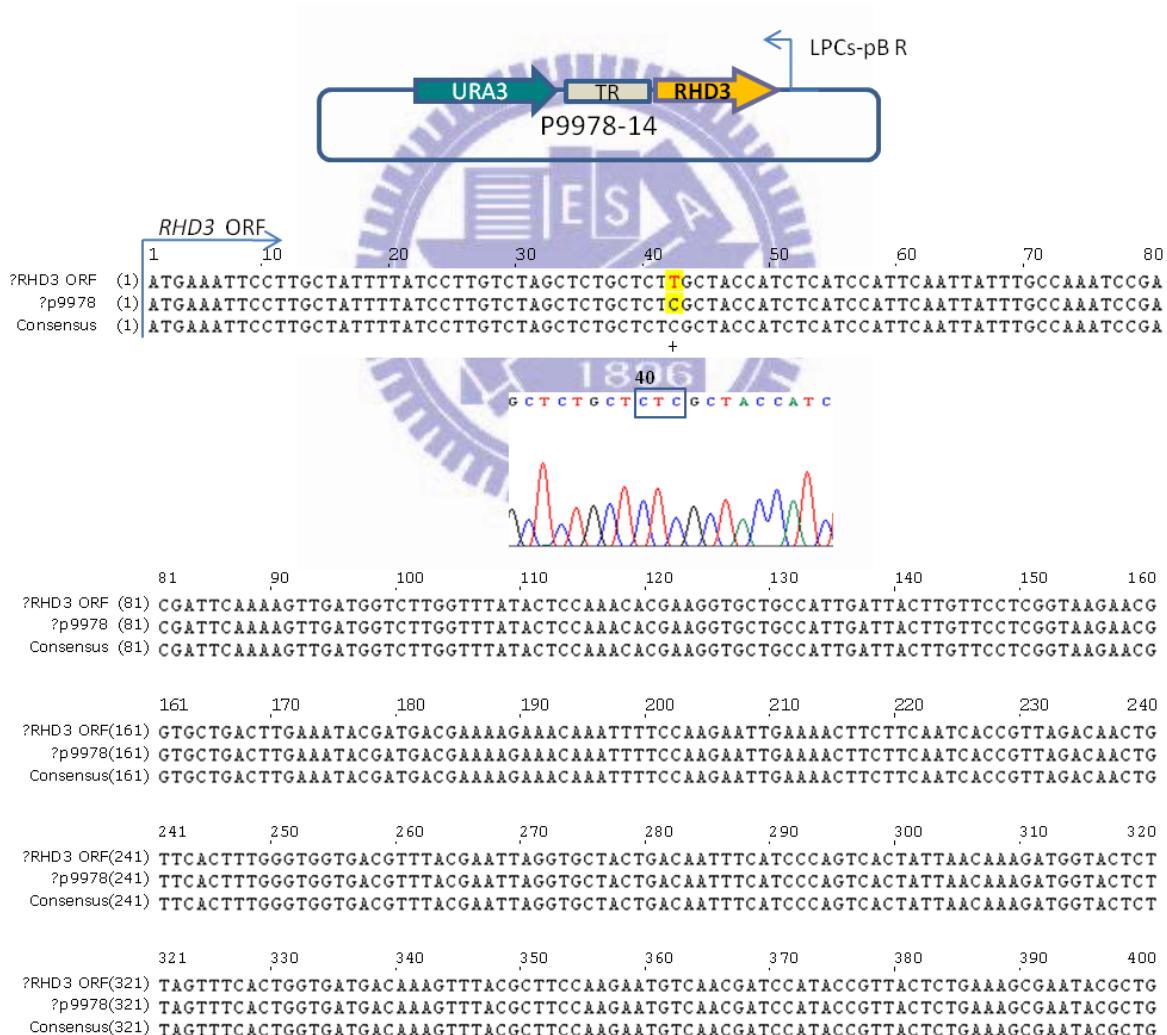
圖十：四環黴素調控表現*RHD3*菌株建構示意圖。

以引子LPCp-6F和LPCp-6R-2夾出*RHD3* ORF，以Cloning接到p99CAU中，得質體p9978。再將A接到p9978中，得質體pOV。

將在質體pOV建構完成的片段切下，送入BWP17/tetR，以A和*RHD3* ORF進行同源重組置換。



圖十一：以限制酶 *HincII* 確認 p9978  
Lane 1 為控制組 p99CAU，Lane 2~4 分別為 p9978-9, 14, 15。



```

401      410      420      430      440      450      460      470      480
?RHD3 ORF(401) TTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCAATCACCATGGTGCAAAATTTCTGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGT
?p9978(401) TTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCAATCACCATGGTGCAAAATTTCTGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGT
Consensus(401) TTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCAATCACCATGGTGCAAAATTTCTGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGT

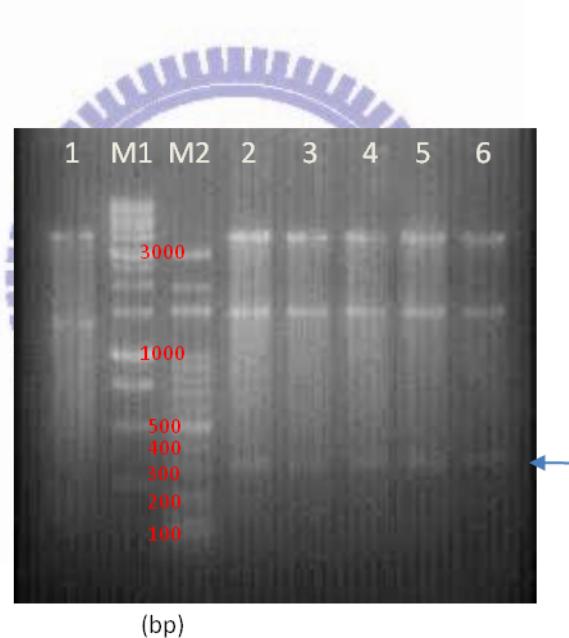
481      490      500      510      520      530      540      550      560
?RHD3 ORF(481) GGTGTTGCACAAGCTGCTTCAAGCAGTGCTGGCCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACTTGAAGGTGCTGCTGGCCAAAA
?p9978(481) GGTGTTGCACAAGCTGCTTCAAGCAGTGCTGGCCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACTTGAAGGTGCTGCTGGCCAAAA
Consensus(481) GGTGTTGCACAAGCTGCTTCAAGCAGTGCTGGCCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACTTGAAGGTGCTGCTGGCCAAAA

561      570      580      590      600      610      620      630      640
?RHD3 ORF(561) CAAATTAAAGCTATGGTGGTATGGCTGCTGTTGGATTAGTCATGTAA
?p9978(561) CAAATTAAAGCTATGGTGGTATGGCTGCTGTTGGATTAGTCATGTAACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTGTT
Consensus(561) CAAATTAAAGCTATGGTGGTATGGCTGCTGTTGGATTAGTCATGTAACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTGTT

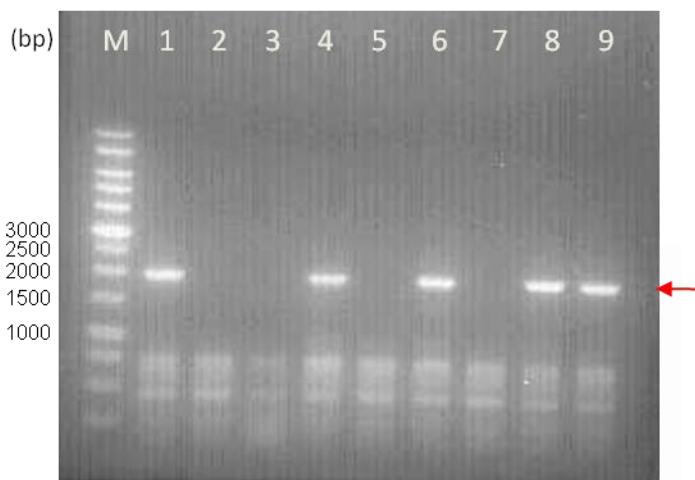
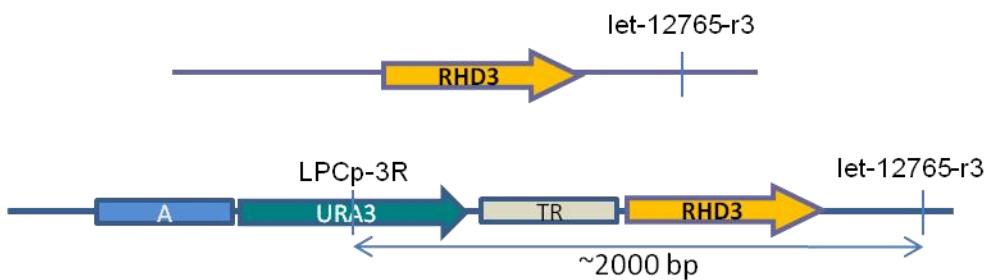
```

RHD3 orf end

圖十二：p9978-14上的RHD3定序  
 以引子LPCs-pBR定序。在RHD3+42這個位置有一個胸線嘧啶(Thymine)突變成胞嘧啶(Cytosine)，但並不影響胺基酸的轉譯。CTT和CTC皆轉譯為Leucine。



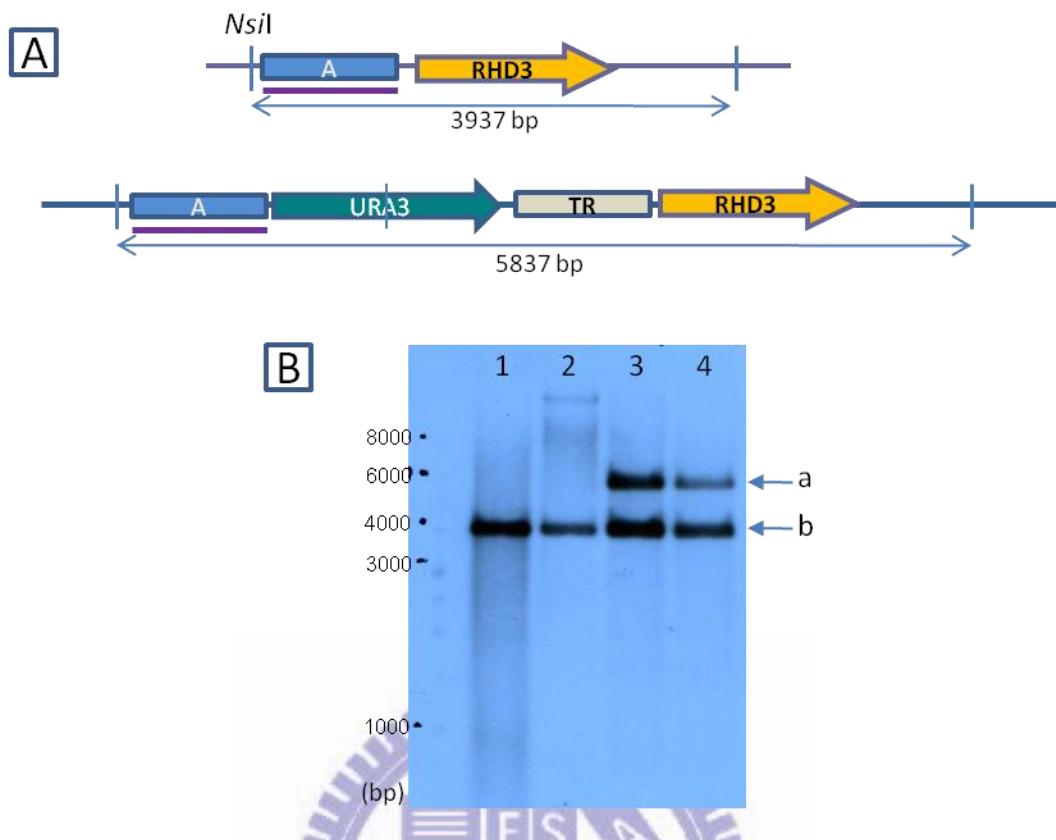
圖十三：以限制酶Aval確認質體pOV  
 Lane 1: p9978-14, Lane 2~6: pOV, Lane M1: 1 Kb ladder, Lane M2: 100 bp ladder。以酵素Aval作用，質體pOV會比p9978多一條312 bp的片段。



圖十四：以PCR確認四環黴素調控表現之白色念珠菌  
78BWOV

上方為PCR結果示意圖，引子為LPCp-3R和let-12765-r3，下方是電泳結果。

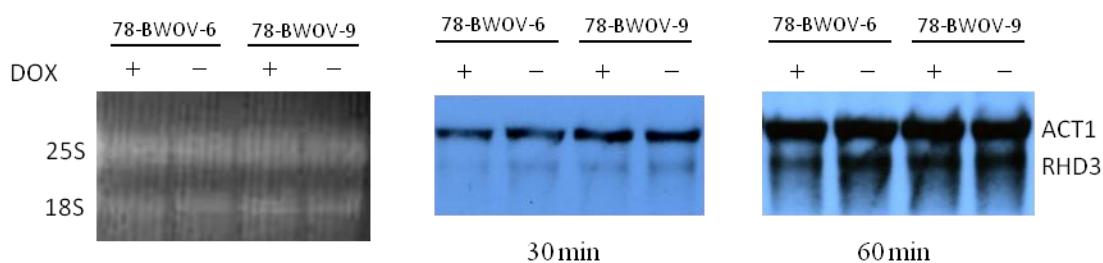
Lane 1~9為78BWOV-1~9 (*RHD3/rhd3::TR-RHD3*)，Lane M為1 Kb ladder。以引子LPCp-3R和let-12765-r3進行PCR，預計會得到約2 Kbp大小的片段。



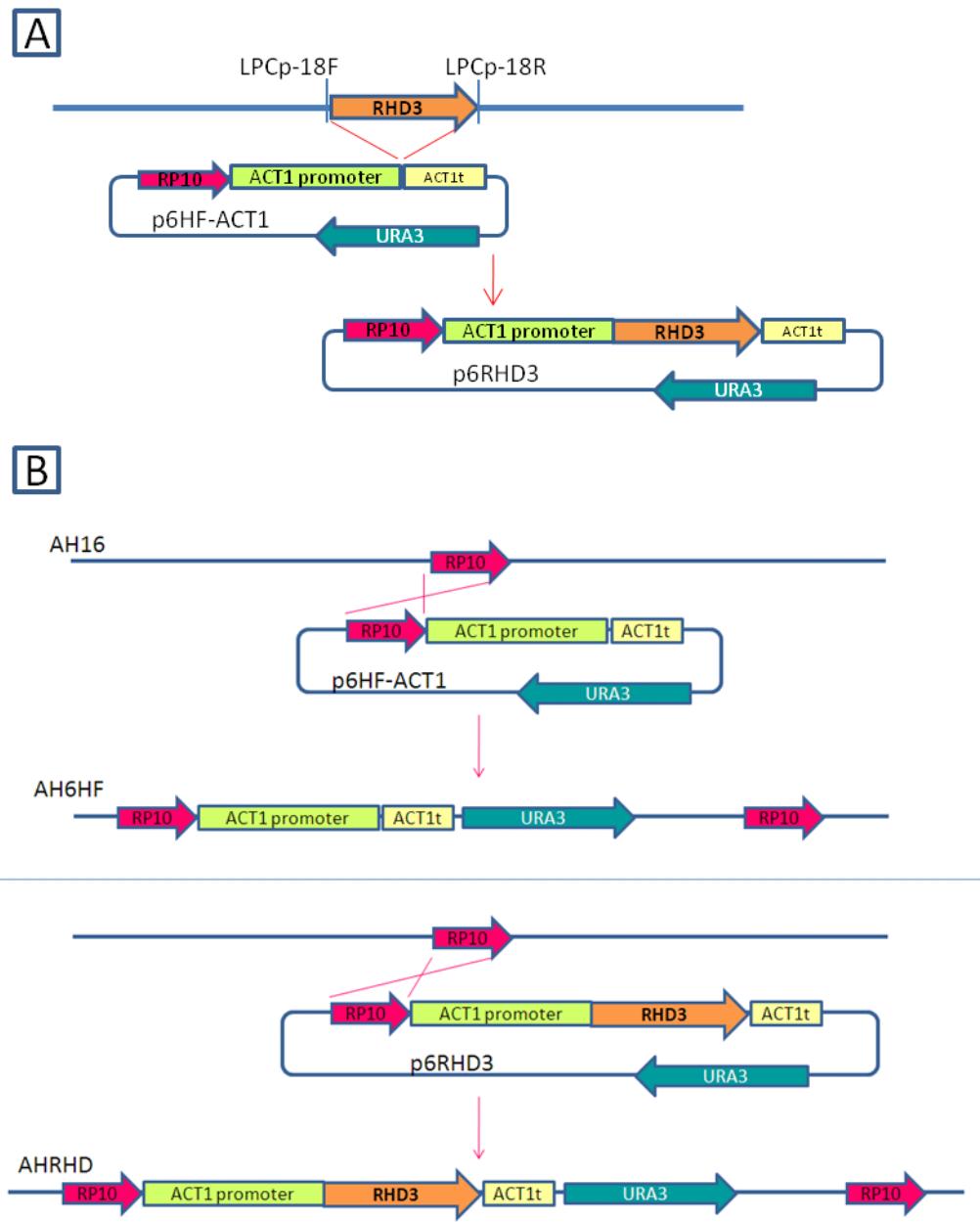
圖十五：以南方點墨法確認菌株78BWOV

A：南方點墨法結果示意圖，使用酵素為 *NsiI* (圖中短直線表切位)，探針為 A region (圖中橫線表探針位置)。

B：南方點墨法結果。Lane 1: 對照組 BWP17/tetR (*RHD3/RHD3*)，Lane 2: 78BWOV-1 (*RHD3/rhd3::TR-RHD3*)，Lane 3: 78BWOV-6 (*RHD3/rhd3::TR-RHD3*)，Lane 4: 78BWOV-9 (*RHD3/rhd3::TR-RHD3*)。



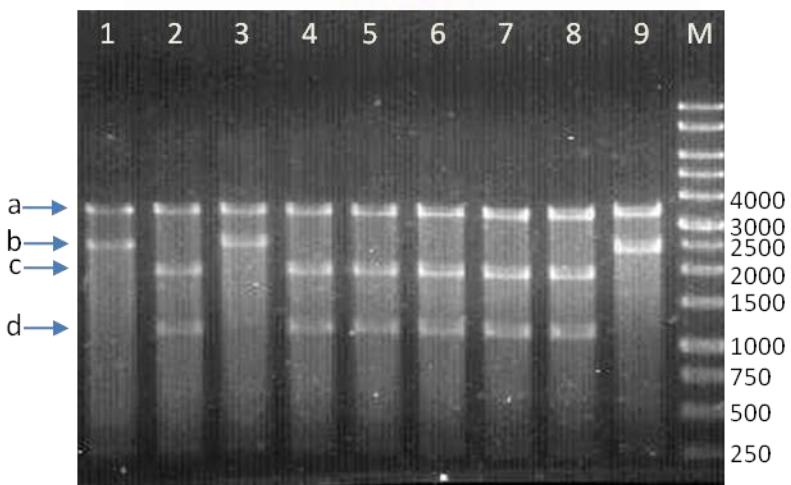
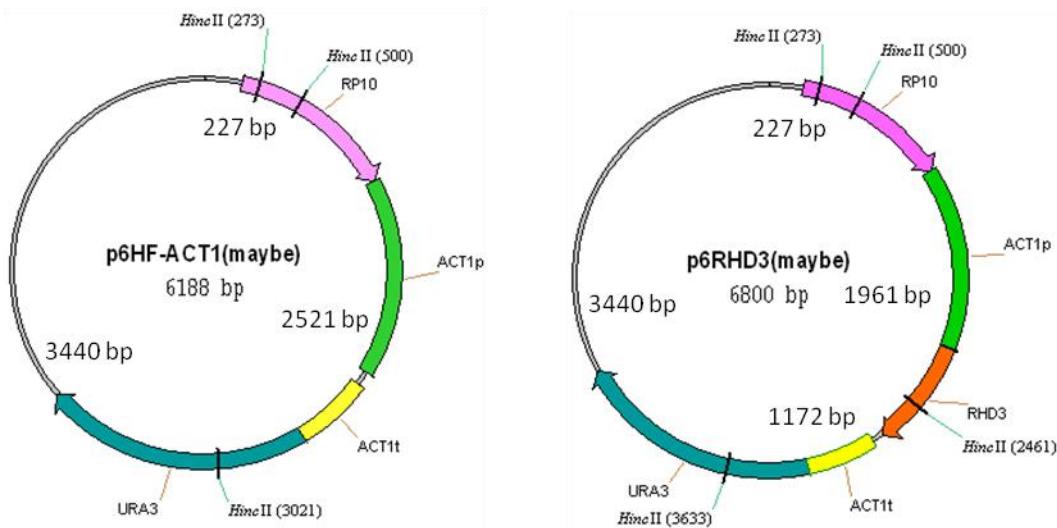
圖十六：以北方點墨法確認四環黴素調控表現之 *RHD3* 的表現量  
Internal control為 *ACT1*，Dox: doxycycline。



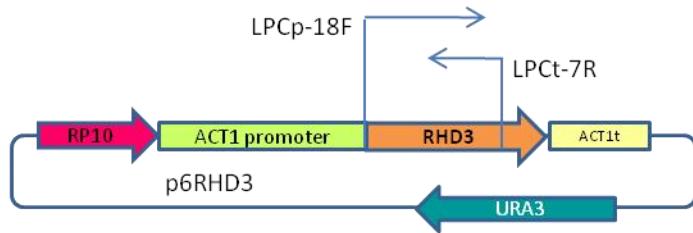
圖十七：利用 p6HF-ACT1 表現 RHD3 示意圖。(RP10 : CaRP10)

A：質體 p6RHD3 之建構。以引子 LPCp-18F 和 LPCp-18R 夾出 RHD3 ORF，並接入質體 p6HF-ACT1 中，得到 p6RHD3

B：將質體送入白色念珠菌 AH16 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*) 之示意圖。將 p6HF-ACT1 送入 AH16 中，利用 CaRP10 進行同源重組置換，得到菌株 AH6HF。將 p6RHD3 送入 AH16 中，利用 CaRP10 進行同源重組置換，得到菌株 AHRHD。AHRHD 為帶有 ACT1 promoter 表現的 RHD3 的菌株。AH6HF 為 AHRHD 之對照組



圖十八：以限制酶*Hinc*II確認質體p6RHD3。上方為切位示意圖，對照組p6HF-ACT1以*Hinc*II處理，預期得到的片段為227 bp, 2521 bp (箭號b)和3440 bp (箭號a)。而質體p6RHD3以*Hinc*II處理，預期得到的片段為227 bp, 1172 bp (箭號d)、1961 bp (箭號c)和3440 bp (箭號a)。下方為電泳圖，Lane 1為對照組p6HF-ACT1，Lane 2~9分別為p6RHD3-1~8，Lane M為1 Kb DNA ladder。



**ACT1 promoter**

2000	2010	2020	2030	2040	2050	2067
?p6RHD3(maybe)(2000)	TCCTTTCTAATTTCACTCCTGGTTCTTCTTAGAAACATTATCTCGATATTAATTTAAA					
?1-7R (234)	TCCTTTCTAATTTCACTCCTGGTTCTTCTTAGAAACATTATCTCGATATTAATTTAAA					
?1-18F (1)						
?3-7R (234)	TCCTTTCTAATTTCACTCCTGGTTCTTCTTAGAAACATTATCTCGATATTAATTTAAA					
?3-18F (1)						
Consensus(2000)	TCCTTTCTAATTTCACTCCTGGTTCTTCTTAGAAACATTATCTCGATATTAATTTAAA					

2068	2080	2090	2100	2110	2120	2135
?p6RHD3(maybe)(2068)	AAAAATAATAATCAT <b>TCAAAGGAT</b> TCC-----TCGAGATGAAATTCTCTGCTATTTATCCTGTCT					
?1-7R (302)	AAAAATAATAATCAT <b>GCAAAGGAT</b> CCC <b>TGCAGG</b> CTCGAGATGAAATTCTCTGCTATTTATCCTGTCT					
?1-18F (1)						
?3-7R (302)	AAAAATAATAATCAT <b>GCAAAGGAT</b> CCC <b>TGCAGG</b> CTCGAGATGAAATTCTCTGCTATTTATCCTGTCT					
?3-18F (1)						
Consensus(2068)	AAAAATAATAATCAT <b>GCAAAGGAT</b> CCC <b>TGCAGG</b> CTCGAGATGAAATTCTCTGCTATTTATCCTGTCT					
	+	+	++++++	XbaI		

2136	2150	2160	2170	2180	2190	2203
?p6RHD3(maybe)(2136)	AGCTCTGCTTGTACCATCTCATCATTCAATTATTGCCAATCCGACGATTCAAAAGTTGATGG'					
?1-7R (370)	AGCTCTGCTTGTACCATCTCATCATTCAATTATTGCCAATCCGACGATTCAAAAGTTGATGG'					
?1-18F (1)						
?3-7R (370)	AGCTCTGCTTGTACCATCTCATCATTCAATTATTGCCAATCCGACGATTCAAAAGTTGATGG'					
?3-18F (1)						
Consensus(2136)	AGCTCTGCTTGTACCATCTCATCATTCAATTATTGCCAATCCGACGATTCAAAAGTTGATGG'					

2204	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2271
?p6RHD3(maybe)(2204)	TCTTGGTTATACTCCAACACGAAGGTGCTGCCATTGATTACTTGTCTCGTAAGAACGGTCTG'						
?1-7R (438)	TCTTGGTTATACTCCAACACGAAGGTGCTGCCATTGATTACTTGTCTCGTAAGAACGGTCTG'						
?1-18F (14)	TCTTGGTTATACTCCAACACGAAGGTGCTGCCATTGATTACTTGTCTCGTAAGAACGGTCTG'						
?3-7R (438)	TCTTGGTTATACTCCAACACGAAGGTGCTGCCATTGATTACTTGTCTCGTAAGAACGGTCTG'						
?3-18F (5)	TCTTGGTTATACTCCAACACGAAGGTGCTGCCATTGATTACTTGTCTCGTAAGAACGGTCTG'						
Consensus(2204)	TCTTGGTTATACTCCAACACGAAGGTGCTGCCATTGATTACTTGTCTCGTAAGAACGGTCTG'						

2272	2280	2290	2300	2310	2320	2339
?p6RHD3(maybe)(2272)	ACTTGAAATACGATGACGAAAAAGAAAACAAATTTCAGAATTGAAAATTCTCTCAATCACCGTTAGA					
?1-7R (506)	ACTTGAAATACGATGACGAAAAAGAAAACAAATTTCAGAATTGAAAATTCTCTCAATCACCGTTAGA					
?1-18F (82)	ACTTGAAATACGATGACGAAAAAGAAAACAAATTTCAGAATTGAAAATTCTCTCAATCACCGTTAGA					
?3-7R (506)	ACTTGAAATACGATGACGAAAAAGAAAACAAATTTCAGAATTGAAAATTCTCTCAATCACCGTTAGA					
?3-18F (73)	ACTTGAAATACGATGACGAAAAAGAAAACAAATTTCAGAATTGAAAATTCTCTCAATCACCGTTAGA					
Consensus(2272)	ACTTGAAATACGATGACGAAAAAGAAAACAAATTTCAGAATTGAAAATTCTCTCAATCACCGTTAGA					

2340	2350	2360	2370	2380	2390	2407
?p6RHD3(maybe)(2340)	CAACTGTTCACTTGGTGGTGACGTTACGAATTAGGTGCTACTGACAATTTCATCCAGTCACTAT					
?1-7R (574)	CAACTGTTCACTTGGTGGTGACGTTACGAATTAGGTGCTACTGACAATTTCATCCAGTCACTAT					
?1-18F (150)	CAACTGTTCACTTGGTGGTGACGTTACGAATTAGGTGCTACTGACAATTTCATCCAGTCACTAT					
?3-7R (574)	CAACTGTTCACTTGGTGGTGACGTTACGAATTAGGTGCTACTGACAATTTCATCCAGTCACTAT					
?3-18F (141)	CAACTGTTCACTTGGTGGTGACGTTACGAATTAGGTGCTACTGACAATTTCATCCAGTCACTAT					
Consensus(2340)	CAACTGTTCACTTGGTGGTGACGTTACGAATTAGGTGCTACTGACAATTTCATCCAGTCACTAT					

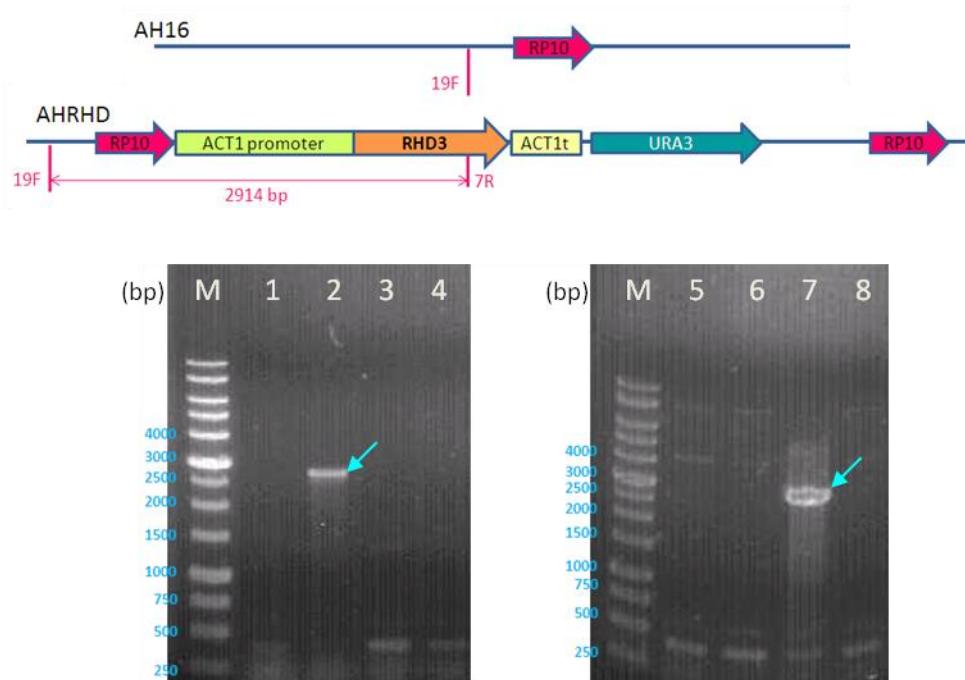
  

2408	2420	2430	2440	2450	2460	2475
?p6RHD3(maybe)(2408)	TAACAAAAGATGGTACTCTAGTTTCACTGGTGTGACAAAGTTACGCTTCAAGAATGTCAACGATC					
?1-7R (642)	TAACAAAAGATGGTACTCTAGTTTCACTGGTGTGACAAAGTTACGCTTCAAGAATGTCAACGATC					
?1-18F (218)	TAACAAAAGATGGTACTCTAGTTTCACTGGTGTGACAAAGTTACGCTTCAAGAATGTCAACGATC					
?3-7R (642)	TAACAAAAGATGGTACTCTAGTTTCACTGGTGTGACAAAGTTACGCTTCAAGAATGTCAACGATC					
?3-18F (209)	TAACAAAAGATGGTACTCTAGTTTCACTGGTGTGACAAAGTTACGCTTCAAGAATGTCAACGATC					
Consensus(2408)	TAACAAAAGATGGTACTCTAGTTTCACTGGTGTGACAAAGTTACGCTTCAAGAATGTCAACGATC					

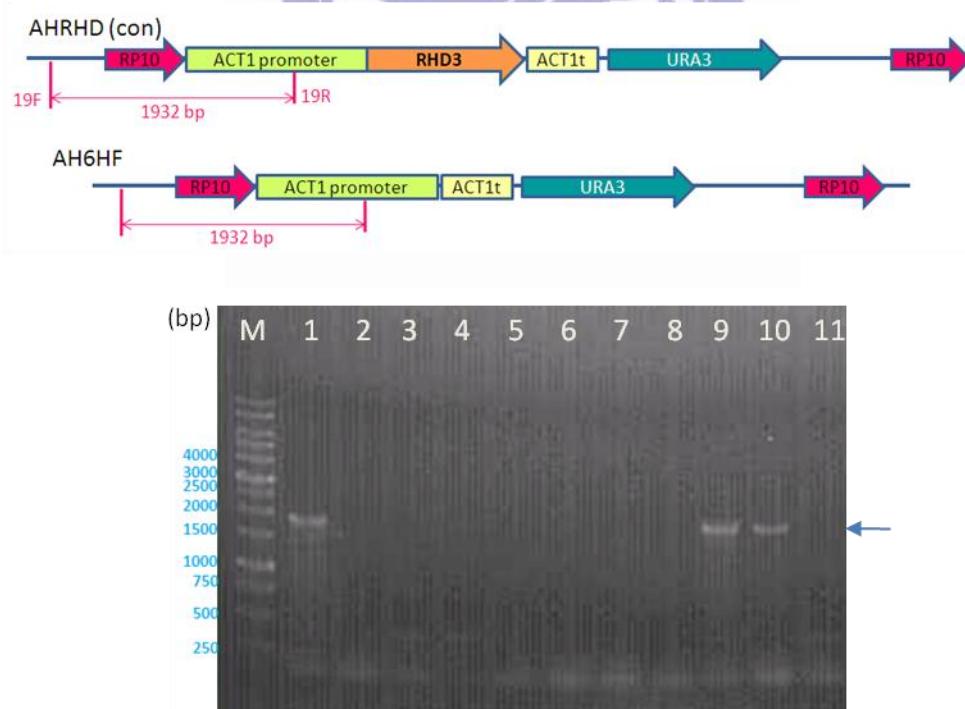
2476	2490	2500	2510	2520	2530	2543	
?p6RHD3(maybe)(2476) CATACCGTTACTCTGAAAGCGAATACGCTGTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCAATCACC							
?1-7R (P03)							
?1-18F (286) CATACCGTTACTCTGAAAGCGAATACGCTGTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCAATCACC							
?3-7R (710) CAT							
?3-18F (277) CATACCGTTACTCTGAAAGCGAATACGCTGTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCAATCACC							
Consensus(2476) CATACCGTTACTCTGAAAGCGAATACGCTGTTCTAACAAAAAAACCGATGACAGTGCCCCAATCACC							
2544	2550	2560	2570	2580	2590	2600	2611
?p6RHD3(maybe)(2544) ATTGTTGCCAAATTTCGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGTGGTGGTGCACAAGCTGCTTCAGCAG							
?1-7R (P03)							
?1-18F (354) ATTGTTGCCAAATTTCGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGTGGTGGTGCACAAGCTGCTTCAGCAG							
?3-7R (P11)							
?3-18F (345) ATTGTTGCCAAATTTCGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGTGGTGGTGCACAAGCTGCTTCAGCAG							
Consensus(2544) ATTGTTGCCAAATTTCGACGACAAGGCTGCTGAAACCAGTGGTGGTGCACAAGCTGCTTCAGCAG							
2612	2620	2630	2640	2650	2660	2679	
?p6RHD3(maybe)(2612) TGCTGGCCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACTTGAAGGTGCTGCTGGCCAAAACAAATTAAAGCTATG							
?1-7R (P03)							
?1-18F (422) TGCTGGCCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACTTGAAGGTGCTGCTGGCCAAAACAAATTAAAGCTATG							
?3-7R (P11)							
?3-18F (413) TGCTGGCCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACTTGAAGGTGCTGCTGGCCAAAACAAATTAAAGCTATG							
Consensus(2612) TGCTGGCCCAGCTCAAGCCTCTGTTCCAACTTGAAGGTGCTGCTGGCCAAAACAAATTAAAGCTATG							
2680	2690	2700	2710	2720	2730	2747	
?p6RHD3(maybe)(2680) GTGTTGGTATGGCTGCTGTTGGATTAGTCATGTAAGCATGCCACCAACCAACCAACGGT							
?1-7R (P03)							
?1-18F (490) GTGTTGGTATGGCTGCTGTTGGATTAGTCATGTAAGCATGCCACCAACCAACCAACGGT							
?3-7R (P11)							
?3-18F (481) GTGTTGGTATGGCTGCTGTTGGATTAGTCATGTAAGCATGCCACCAACCAACCAACGGT							
Consensus(2680) GTGTTGGTATGGCTGCTGTTGGATTAGTCATGTAAGCATGCCACCAACCAACCAACGGT							
2748	2760	2770	2780	2790	2800	2815	
SphI							
6x His							
?p6RHD3(maybe)(2748) GG <del>A</del> GATTATAAAAGATGATGATGATAAATAAACATGCGAGTGAATTCTGGAAATCTGGTT							
?1-7R (P03)							
?1-18F (558) GG <del>A</del> GATTATAAAAGATGATGATGATAAATAAACATGCGAGTGAATTCTGG							
?3-7R (P11)							
?3-18F (549) GG <del>A</del> GATTATAAAAGATGATGATGATAAATAAACATGCGAGTGAATTCTGG							
Consensus(2748) GGAGATTATAAAAGATGATGATGATAAATAAACATGCGAGTGAATTCTGGAAATCTGGAAATCTGGTT							
+	FLAG	ACT1 terminator					

圖十九：p6RHD3上的RHD3定序結果。

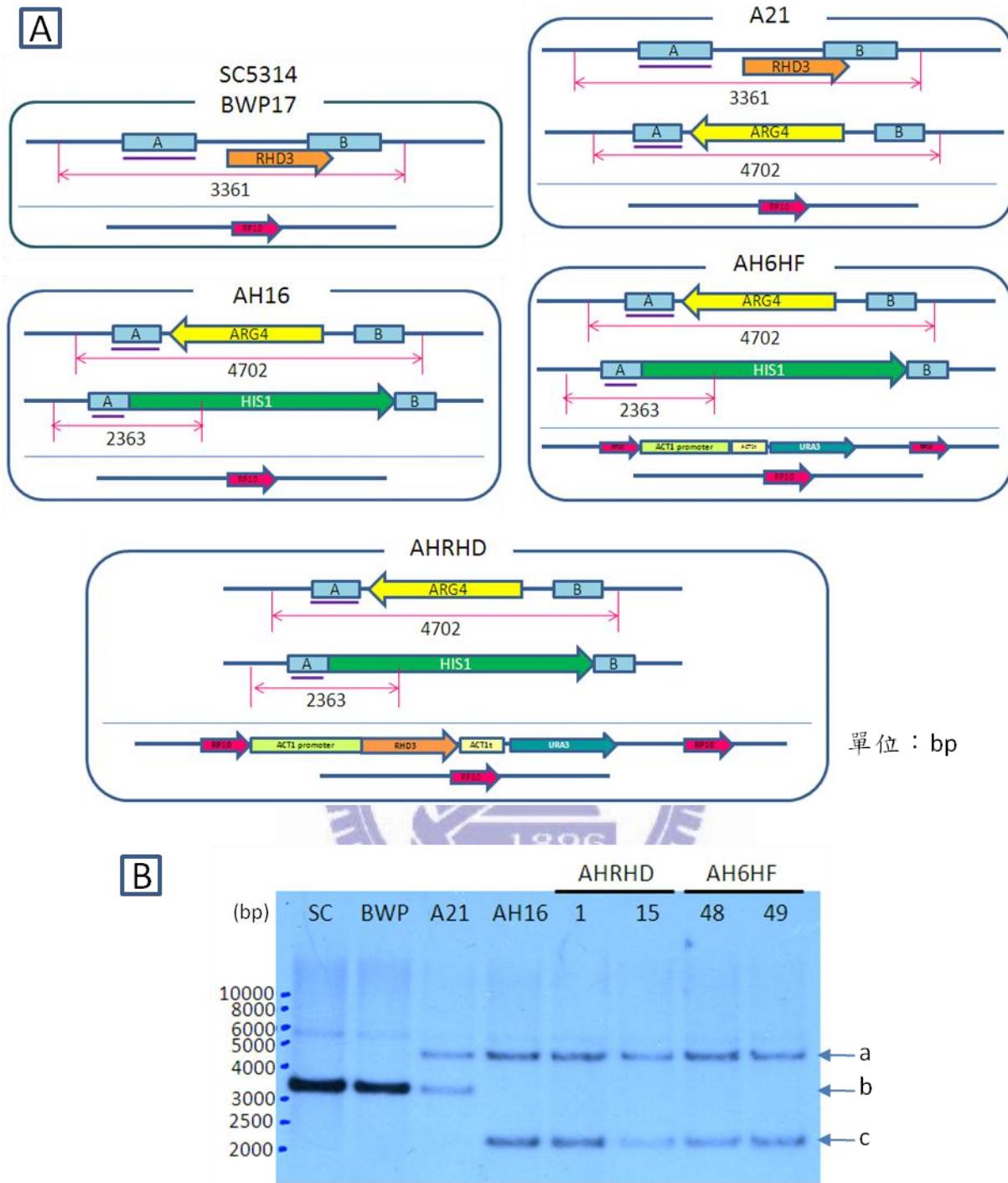
使用引子LPCp-18R和LPCT-7R進行定序。p6RHD3 (maybe)是預期的MAP序列，1-7R是p6RHD3-1以引子LPCT-7R定序的結果，1-18R為p6RHD3-1以引子LPCp-18R定序的結果。同樣的3-7R和3-18R為p6RHD3-3以LPCT-7R和LPCp-18R定序的結果。圖中Xhol到SphI之間的序列为RHD3 ORF



圖二十：以PCR確認白色念珠菌AHRHD  
以引子LPCp-19F和LPCt-7R進行PCR反應，預計會得到片段2914 bp(如箭頭所示)。Lane 1, 5為negative control: AH16 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*)，Lane 2~4分別為AHRHD-1~3，Lane 6~8分別為AHRHD-14~16。



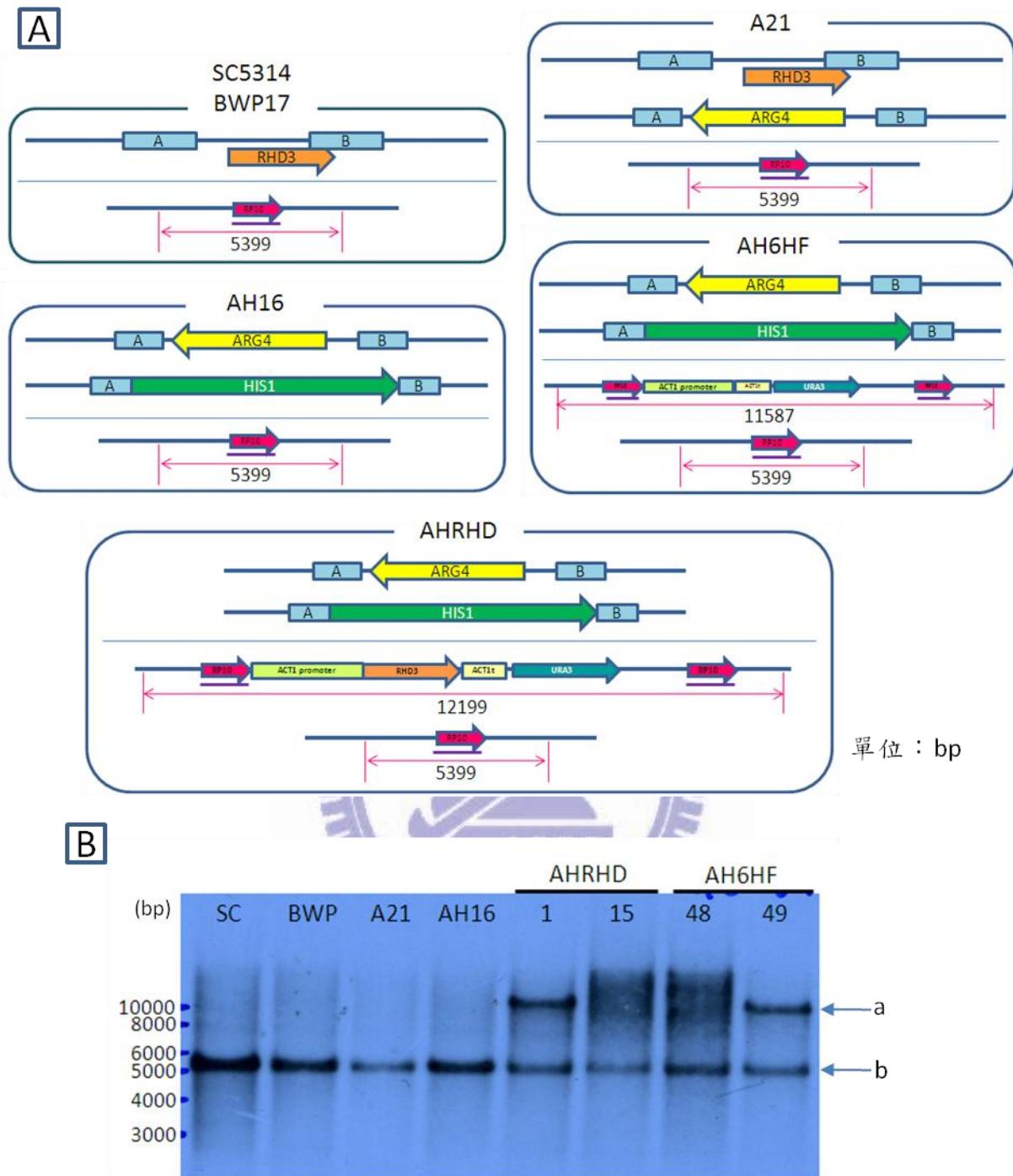
圖二十一：以PCR確認白色念珠菌AH6HF  
以引子LPCp-19F和LPCp-19R進行PCR反應，預計會得到片段1932 bp(如箭頭所示)。Lane 1為positive control: AHRHD-1，Lane 2~11分別為AH6HF-41~50。



圖二十二：以南方點墨法檢驗白色念珠菌AHRHD和AH6HF。

A：各菌株間預期結果之示意圖。使用酵素EcoRV(圖中短直線表切位)，探針為Aregion(圖中橫線表探針位置)。

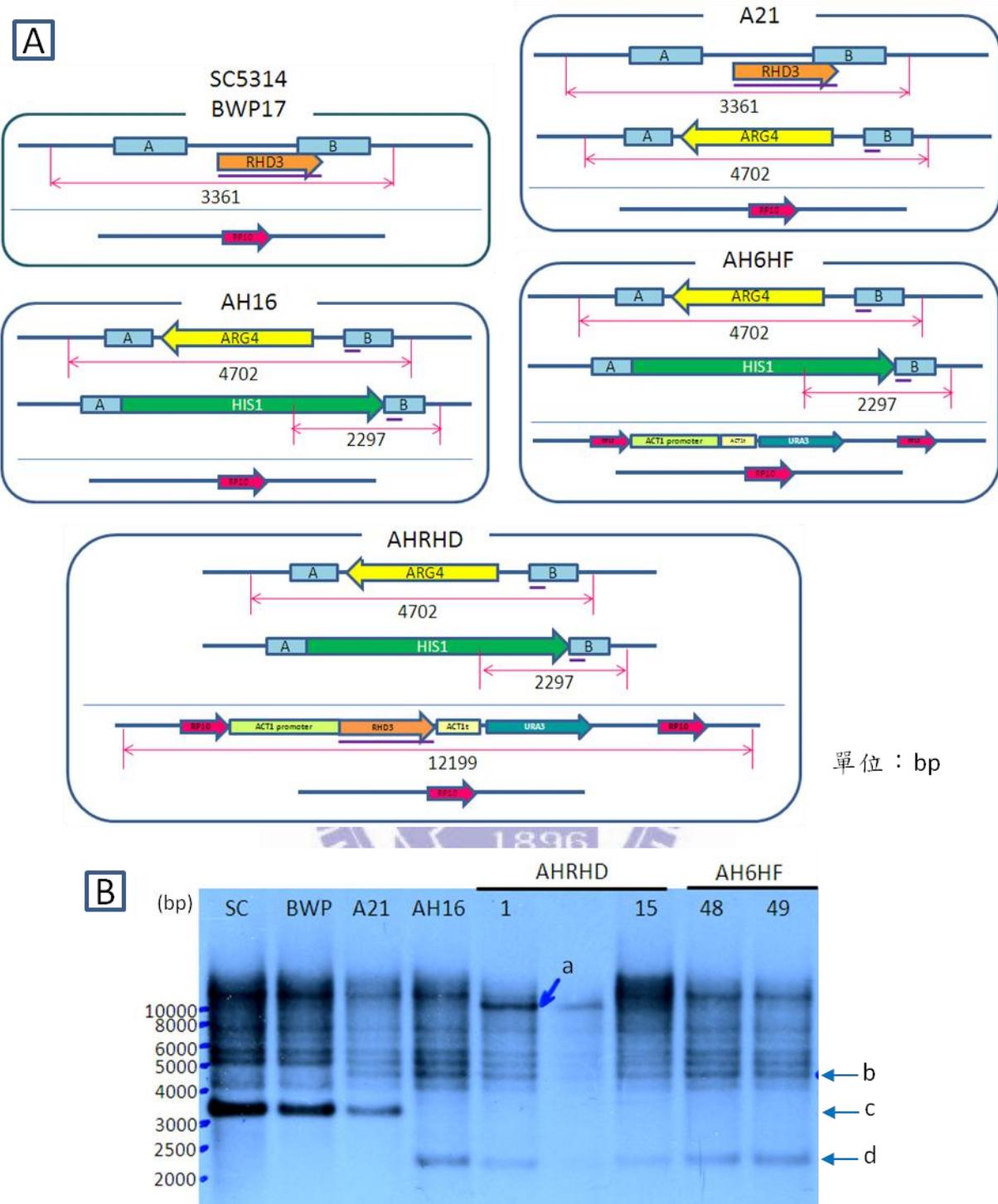
B：南方點墨法之結果。箭號a: 介於4 Kbp~5 Kbp之間，合乎*rhd3::ARG4*之預期片段。箭號b: 介於3 Kbp~4 Kbp之間，合乎*RHD3*之預期片段。箭號c: 介於2 Kbp~2.5 Kbp之間，合乎*rhd3::HIS1*之預期片段。



圖二十三：以南方點墨法檢驗白色念珠菌AHRHD和AH6HF。

A：各菌株間預期結果之示意圖。使用酵素EcoRV(圖中短直線表切位)，探針為*CaRP10*(圖中橫線表探針位置)。

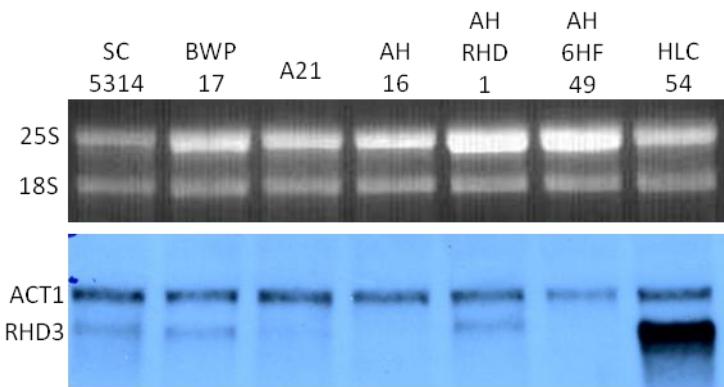
B：南方點墨法之結果。箭號a: 大於10 Kbp的片段，合乎AH6HF示意圖中的預期片段11587 bp，亦合乎AHRHD示意圖中的預期片段12199 bp。箭號b: 介於5 Kbp~6 Kbp，合乎*CaRP10*的預期片段。



圖二十四：以南方點墨法檢驗白色念珠菌AHRHD和AH6HF

A：各菌株間預期結果之示意圖。使用酵素EcoRV(圖中短直線表切位)，探針為RHD3(圖中橫線表探針位置)。

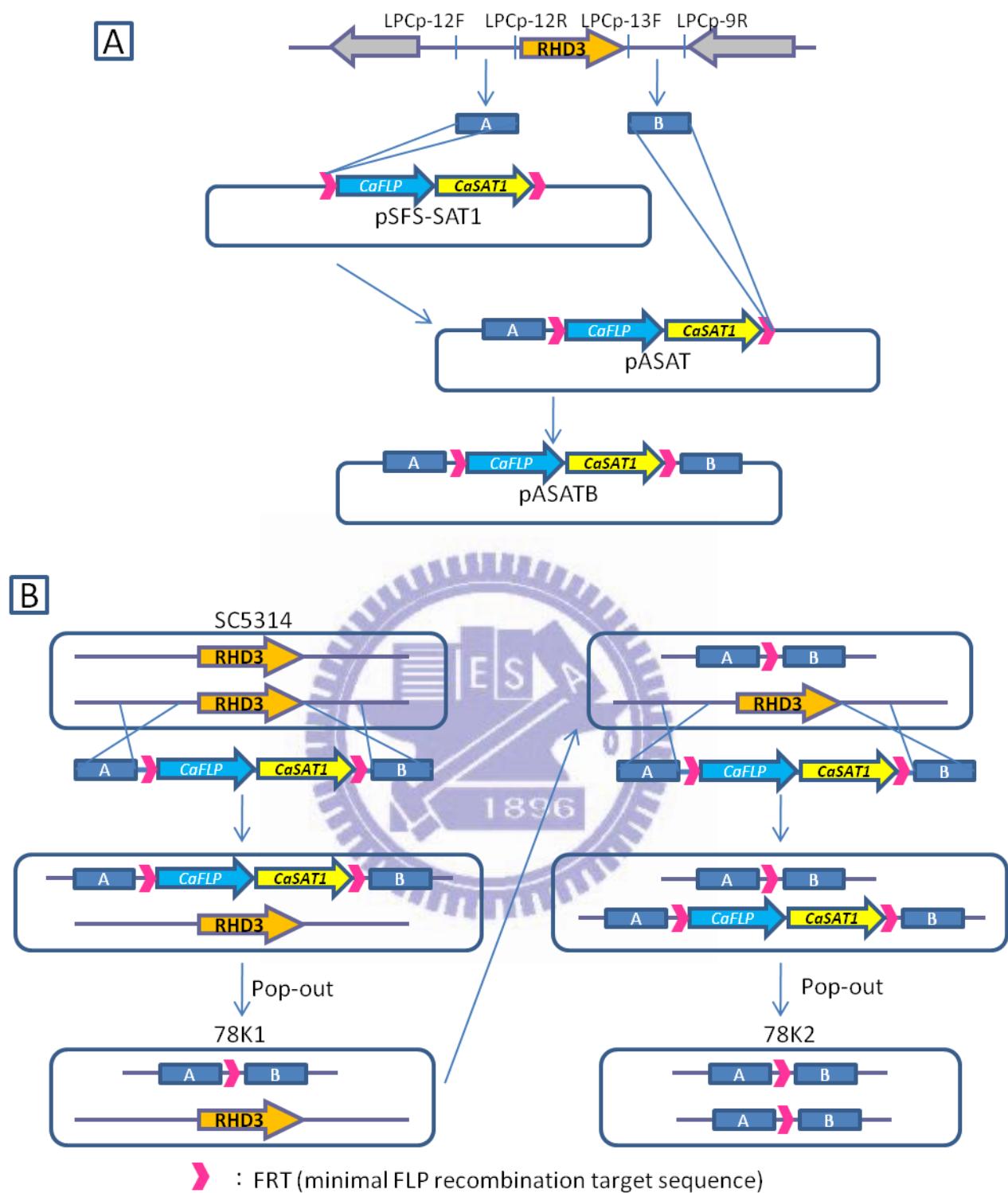
B：南方點墨法之結果。箭號a: 大於10 Kbp的片段，合乎AHRHD示意圖中12199 bp之預期片段。箭號b: 介於4 Kbp~5 Kbp之間，合乎rhd3::ARG4之預期片段。箭號c: 介於3 Kbp~4 Kbp之間，合乎RHD3之預期片段。箭號d: 介於2 Kbp~2.5 Kbp之間，合乎rhd3::HIS1之預期片段。



圖二十五：以北方點墨法觀察RHD3的表現量

SC5314 (*RHD3/RHD3*), BWP17 (*RHD3/RHD3*), A21 (*RHD3/rhd3::ARG4*),  
AH16 (*rhd3::HIS1/rhd3::ARG4*), AHRHD-1 (*rhd3::ARG4/rhd3::HIS1*  
*RP10/rp10::ACT1p-RHD3 URA3*), AH6HF-49 (*rhd3::ARG4/rhd3::HIS1*  
*RP10/rp10::ACT1p URA3*), HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)

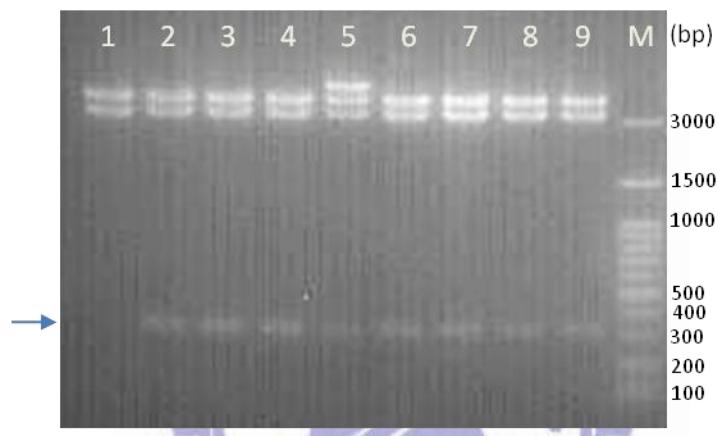
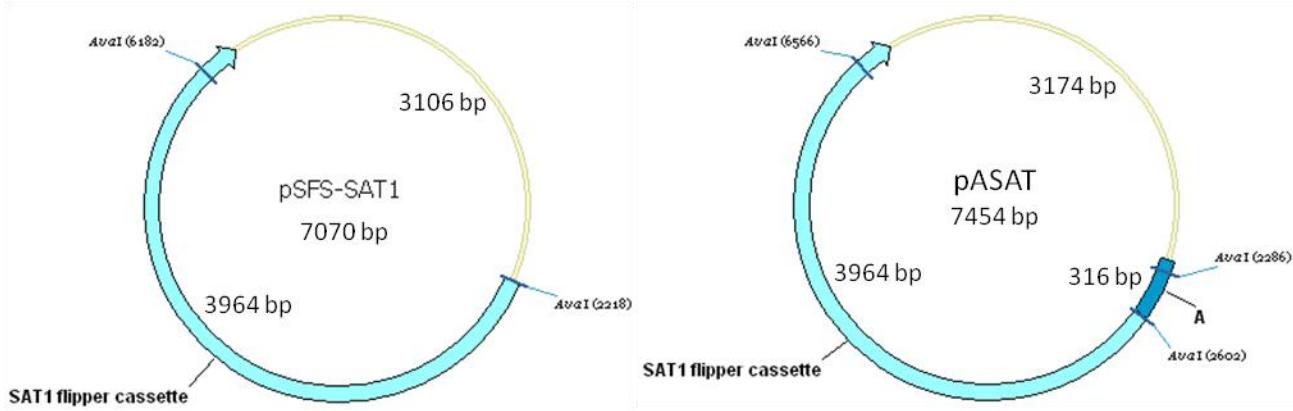




圖二十六：使用 SAT1 flipper cassette 進行 RHD3 單套、雙套剔除株建構示意圖。

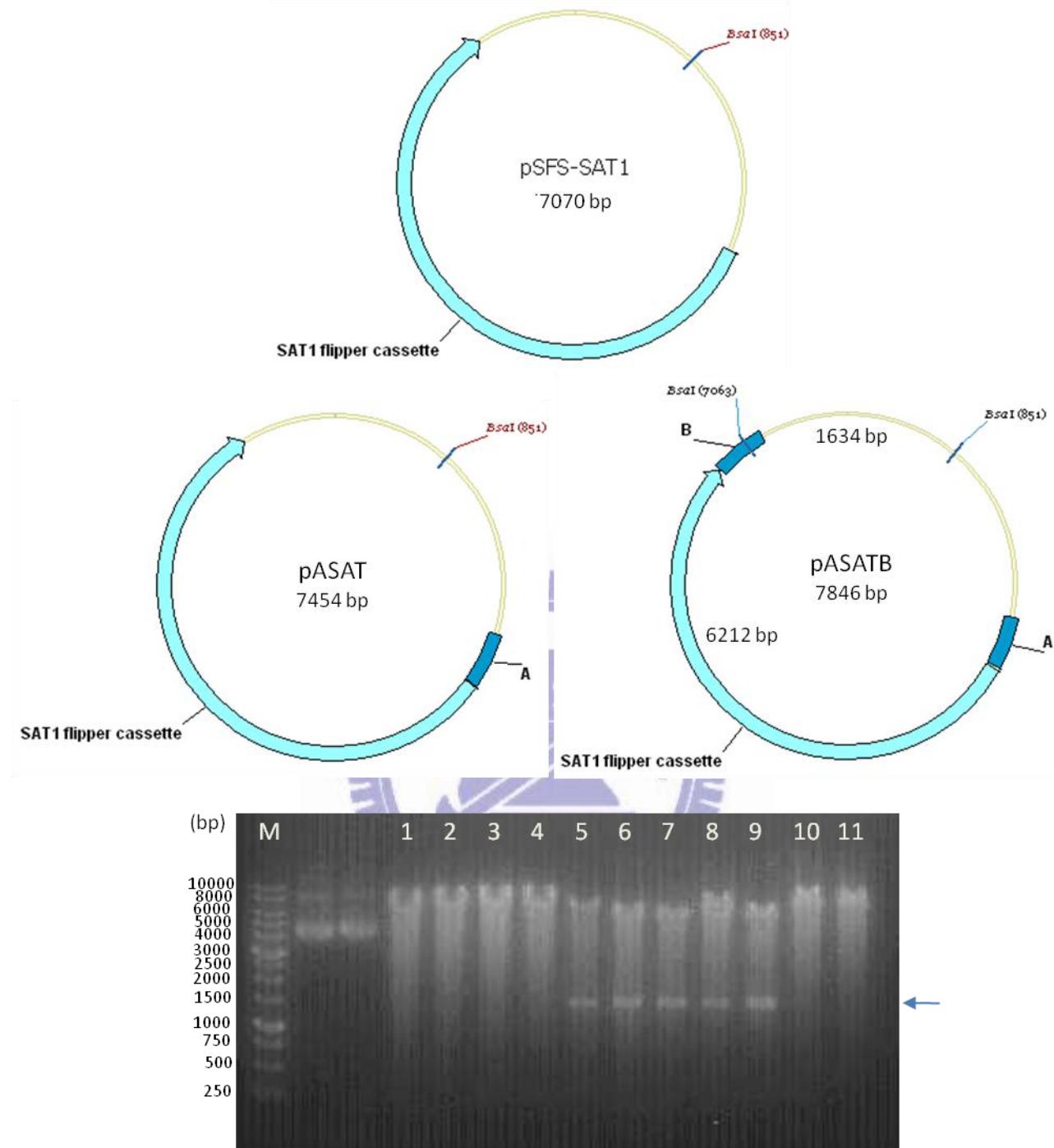
A：剔除片段建構之示意圖。使用引子LPCp-12F和LPCp-12R夾出上游片段(A)，以Cloning接入質體pSFS-ACT1中，得到pASAT。使用引子LPCp-13F和LPCp-9R夾出下游片段(B)，以Cloning接入質體pASAT中，得到pASATB。

B：RHD3單套、雙套剔除株建構示意圖。使用A、B進行同源重組置換。78K1為單套剔除株，78K2為雙套剔除株。



圖二十七：以限制酶*Ava*I確認質體pASAT

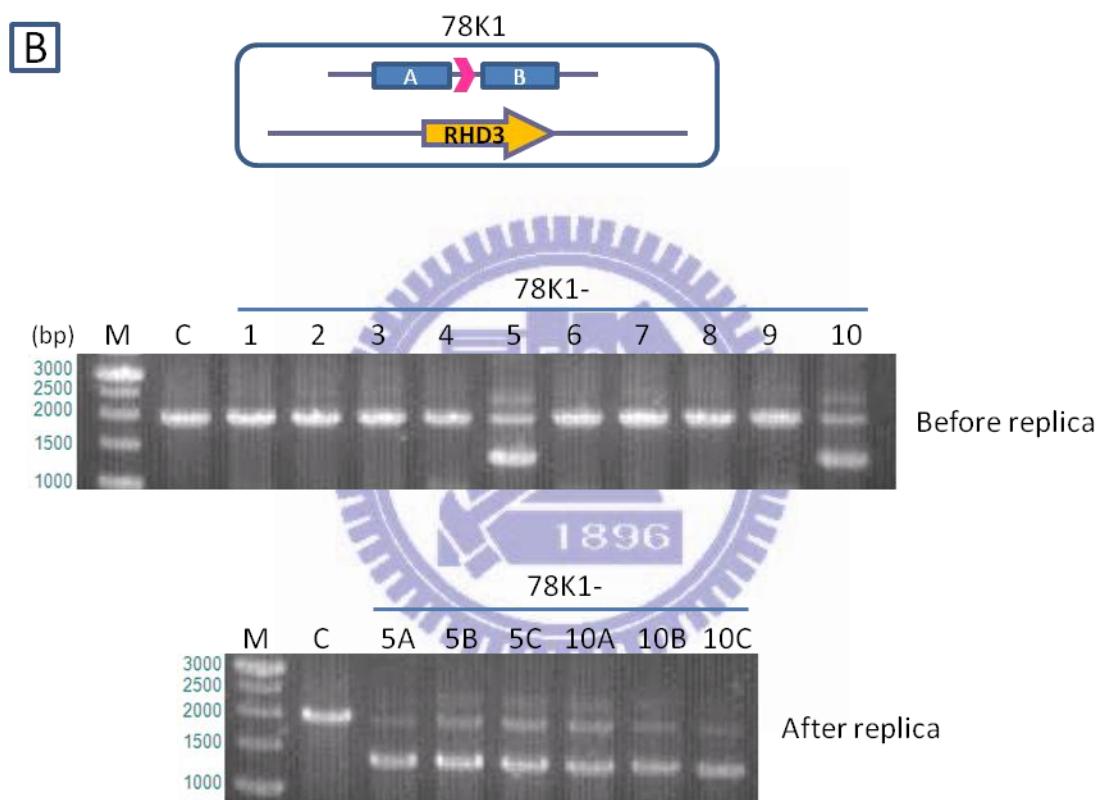
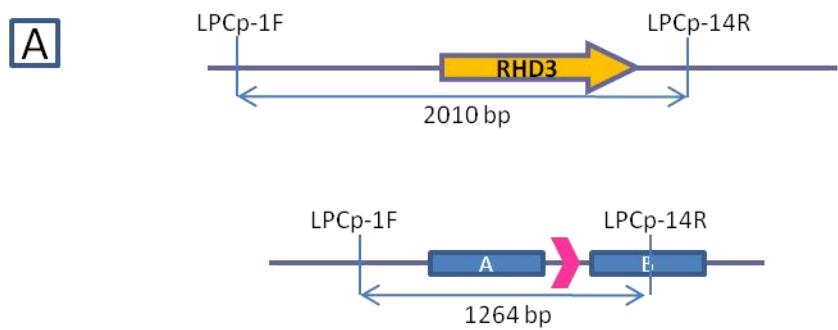
上方為酵素切位之示意圖，對照組pSFS-SAT1以酵素*Ava*I處理，預計得到片段大小為3964 bp和3106 bp。而質體pASAT以酵素*Ava*I處理，預計得到片段大小為3964 bp、3174 bp和316 bp (如箭頭所示)。下方為電泳結果，Lane 1：控制組pSFS-SAT1，Lane 2~9：pASAT-1~6, 8, 9，Lane M：100 bp DNA ladder。



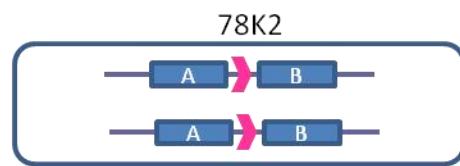
圖二十八：以酵素 *BsaI* 確認質體 pASATB

上方為酵素切位示意圖，對照組 pSFS-SAT1 以酵素 *BsaI* 處理，預計得到片段大小為 7070 bp。而質體 pASAT 以酵素 *BsaI* 處理，預計得到片段大小為 7454 bp。而質體 pASATB 以酵素 *BsaI* 處理，預計得到片段大小為 6212 bp 和 1634 bp (如箭頭所示)。

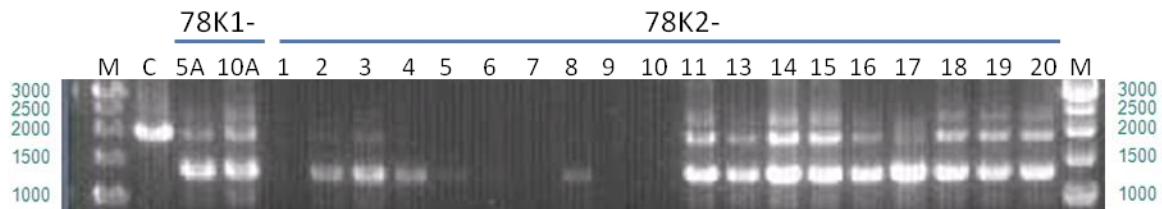
下方為電泳結果，Lane 1：pSFS-SAT1，Lane 2：pASAT，Lane 3~11：pASATB-1, 3~10，Lane M：1 Kb DNA ladder。



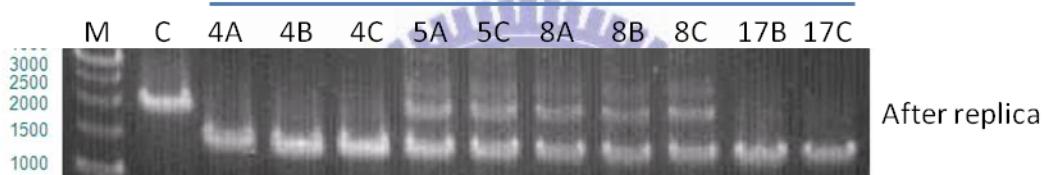
C



Before replica



78K2-



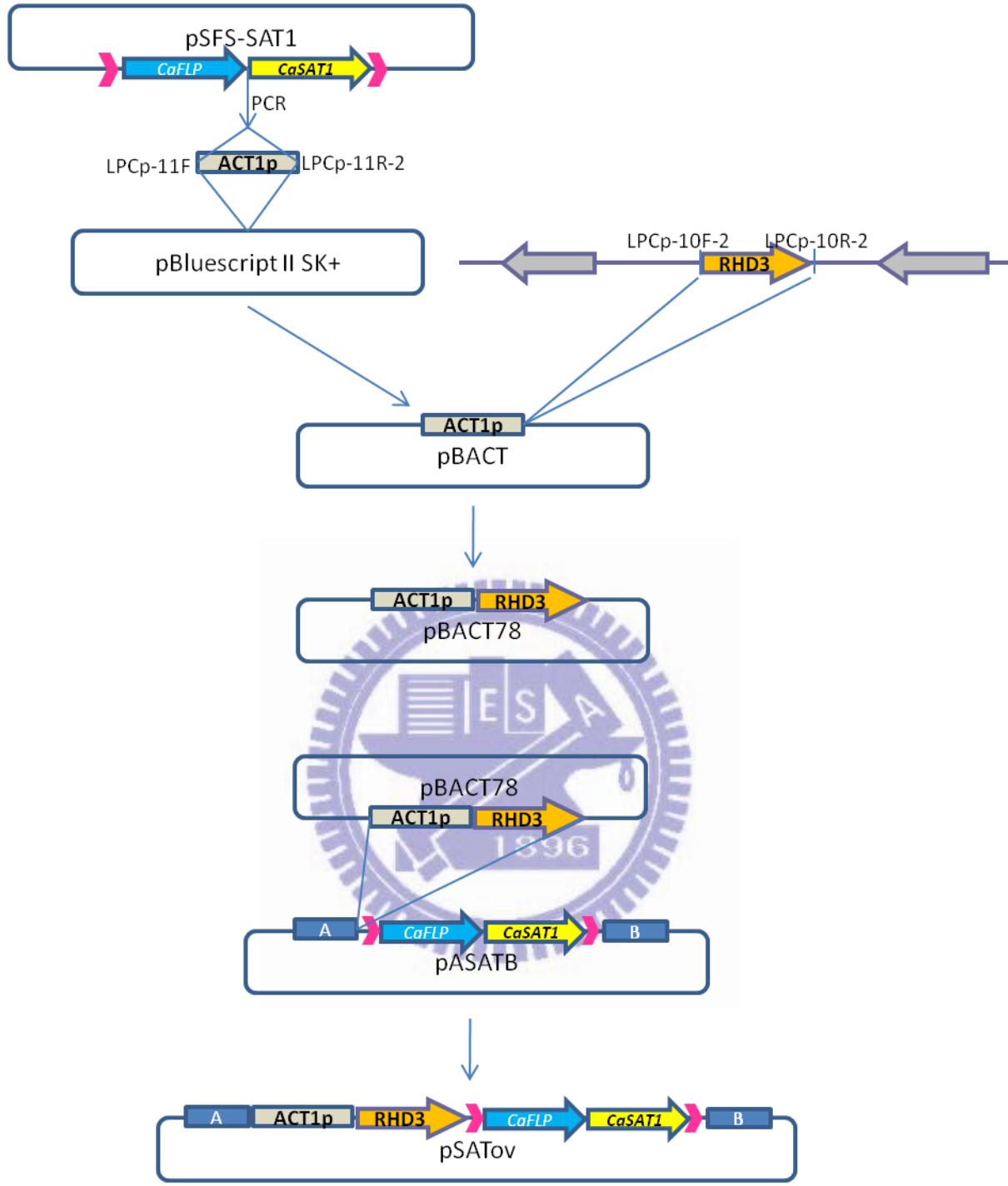
圖二十九：以PCR確認RHD3單套、雙套剔除株。

Lane M : 1 Kb DNA ladder , Lane C : 控制組SC5314。

A : 以引子LPCp-1F和LPCp-14R進行PCR之結果示意圖。

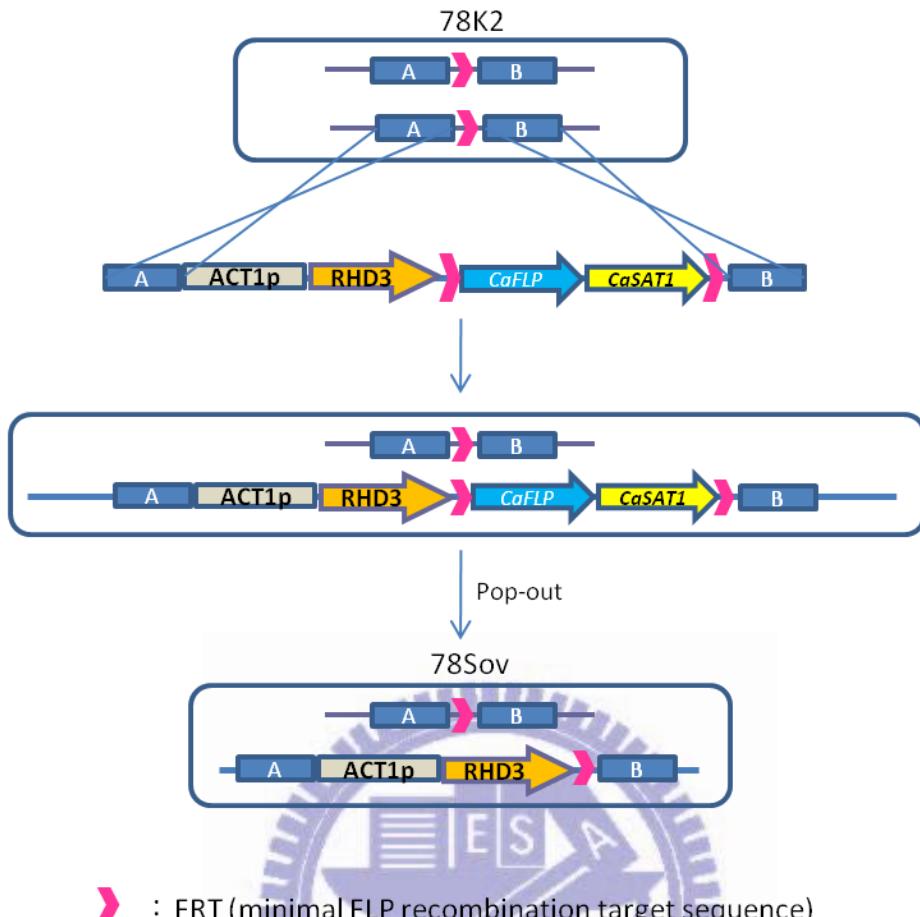
B : 為單套剔除株PCR確認結果。

C : 為雙套剔除株PCR確認結果。

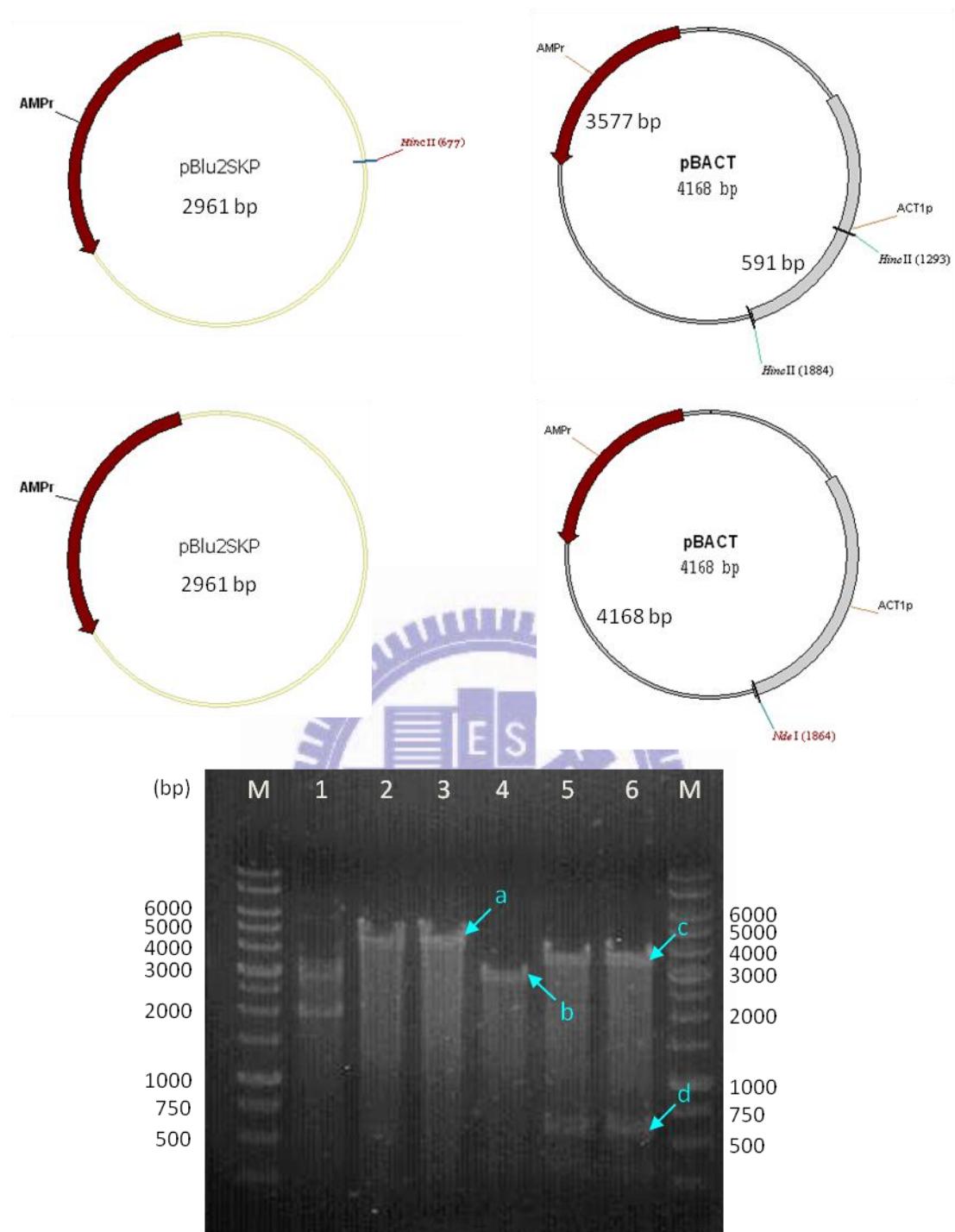


▶ : FRT (minimal FLP recombination target sequence)

圖三十：將以 *ACT1* promoter 表現之 *RHD3* 接上 *SAT1* flipper cassette 之流程圖。以引子 *LPCp-11F* 和 *LPCp-11R-2* 進行 PCR，模板為 *pSFS-SAT1*。夾出 *ACT1* promoter，以 Cloning 接入 *pBluescript II SK+*，得質體 *pBACT*。再以引子 *LPCp-10F-2* 和 *LPCp-10R-2* 夾出 *RHD3* ORF，接入 *pBACT* 中，得質體 *pBACT78*。再將 *ACT1p-RHD3* 接入 *pASATB* 中，得質體 *pSATov*，完成片段之建構。

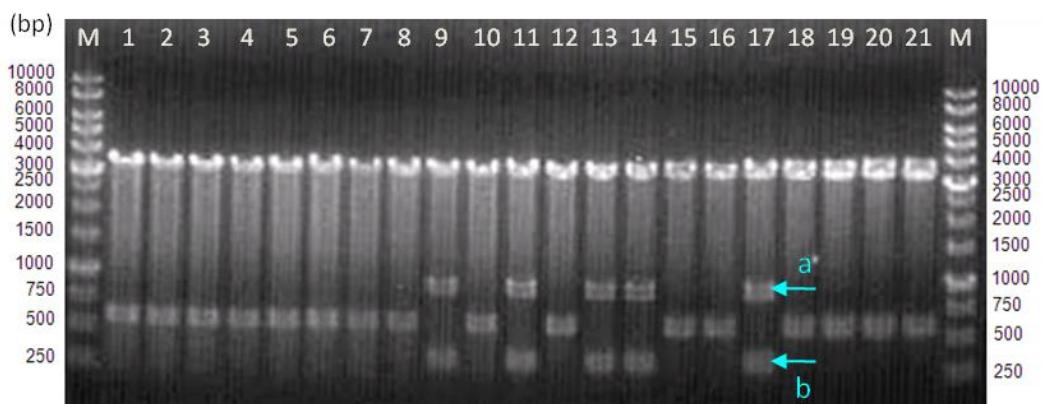
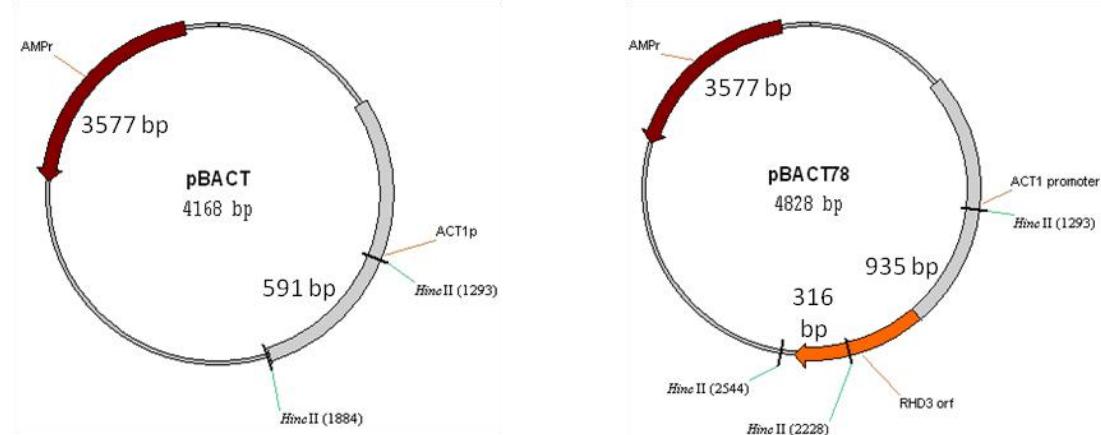


圖三十一：建構以*ACT1* promoter表現*RHD3*之白色念珠菌之示意圖。將圖三十建構完的片段送入白色念珠菌雙套剔除株78K2中，以A、B進行同源重組置換，將*ACT1* promoter表現之*RHD3*送入genome中。

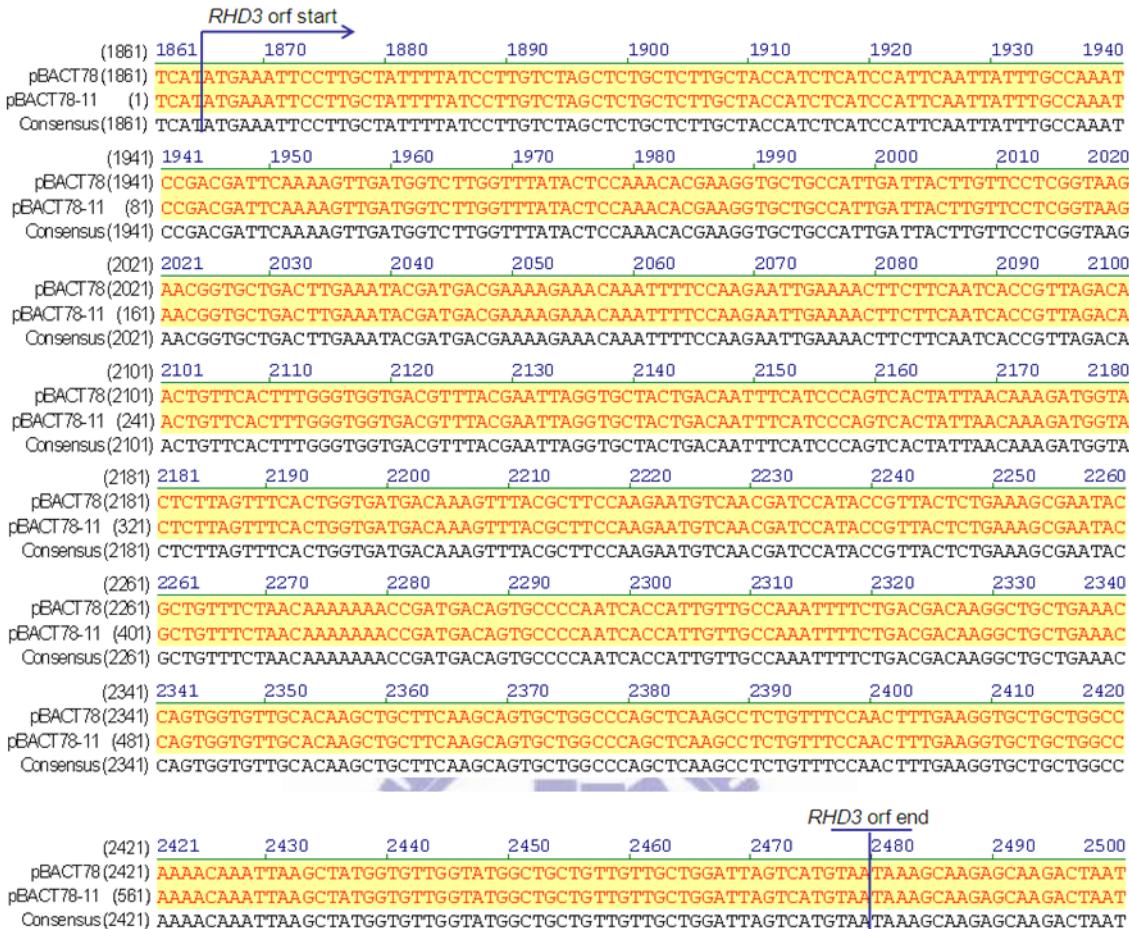


圖三十二：以限制酶確認質體pBACT

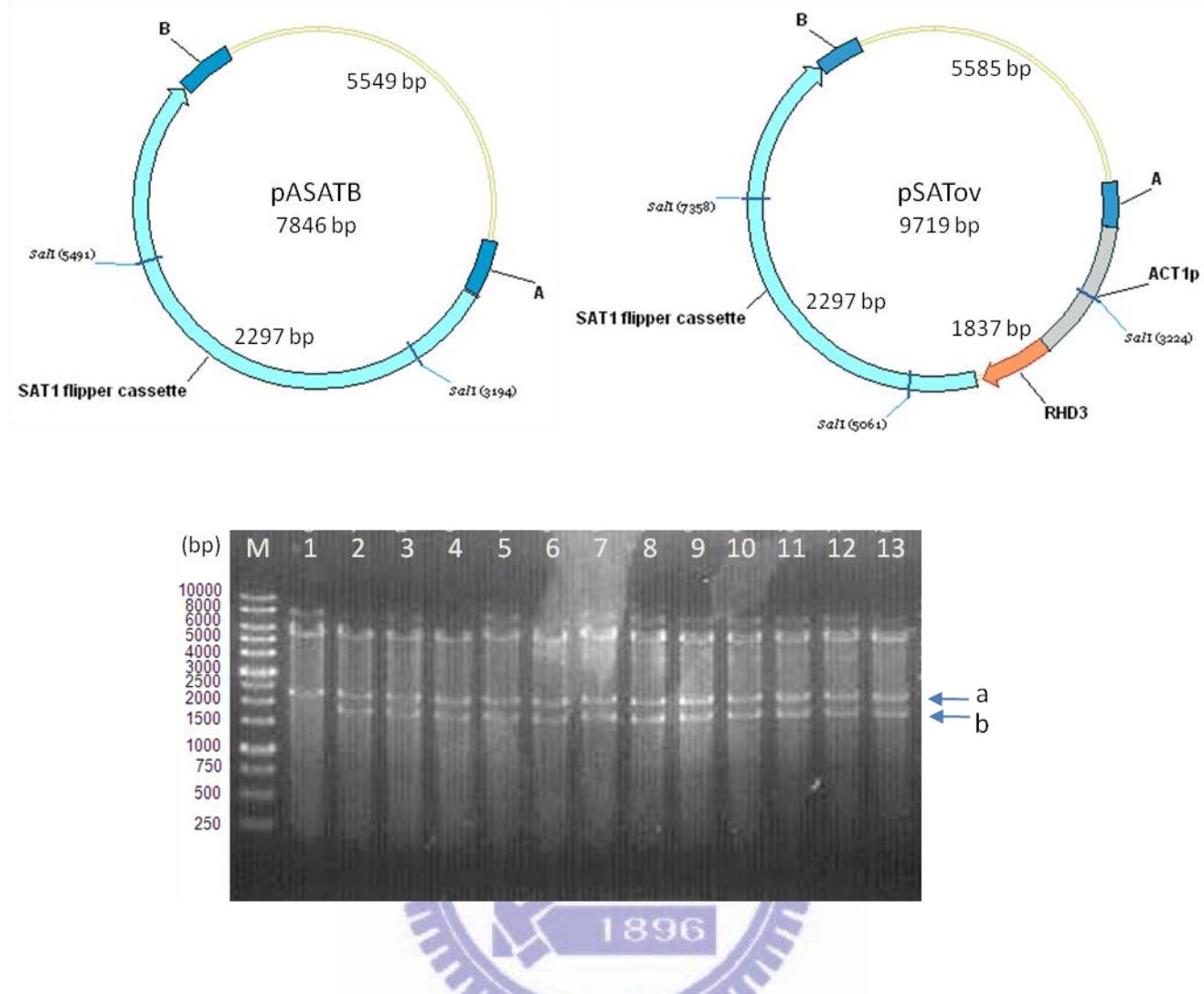
上方為酵素切位示意圖，pBluescript II SK+為控制組。下方為電泳結果。對照組pBluescript II SK+以酵素 *Nde*I處理，無法被切開；以酵素 *Hinc*II處理，預期片段為2961 bp (箭號b)。而質體pBACT以*Nde*I處理，預期片段為4168 bp (箭號a)；以*Hinc*II處理，預期片段為3577 bp (箭號c)和591 bp (箭號d)。Lane 1, 4為質體pBluescript II SK+，Lane 2, 3, 5, 6為質體pBACT。Lane 1~3以酵素*Nde*I處理，Lane 4~6以酵素*Hinc*II處理。Lane M為1 Kb DNA ladder。



圖三十三：以酵素 *Hinc*<sub>II</sub> 確認質體 pBACT78  
上方為酵素切位示意圖，對照組 pBACT 酵素 *Hinc*<sub>II</sub> 處理，預期片段為 3577 bp 和 591 bp。而質體 pBACT78 預期片段為 3577 bp、953 bp (箭號 a) 和 316 bp (箭號 b)。  
下方為電泳結果，Lane 1~20 分別為 pBACT78-1~20，Lane 21 為控制組 pBACT，Lane M 為 1 Kb DNA ladder。



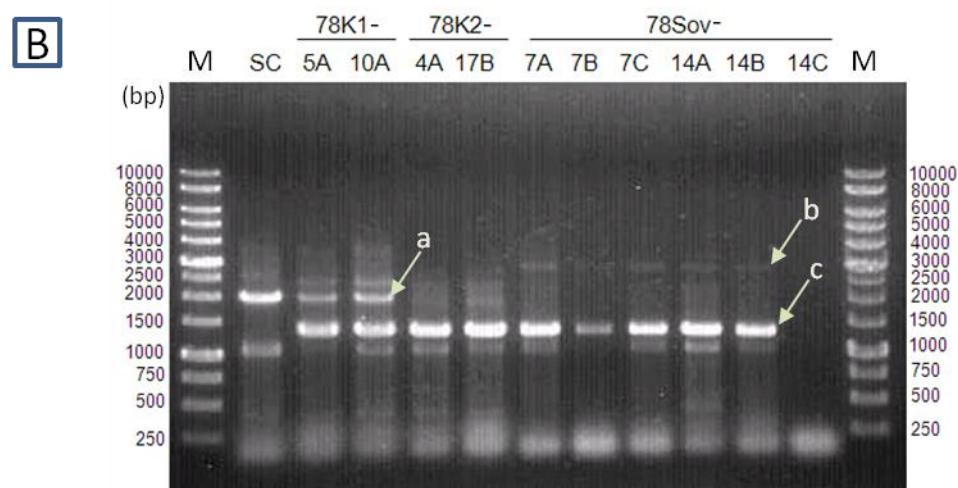
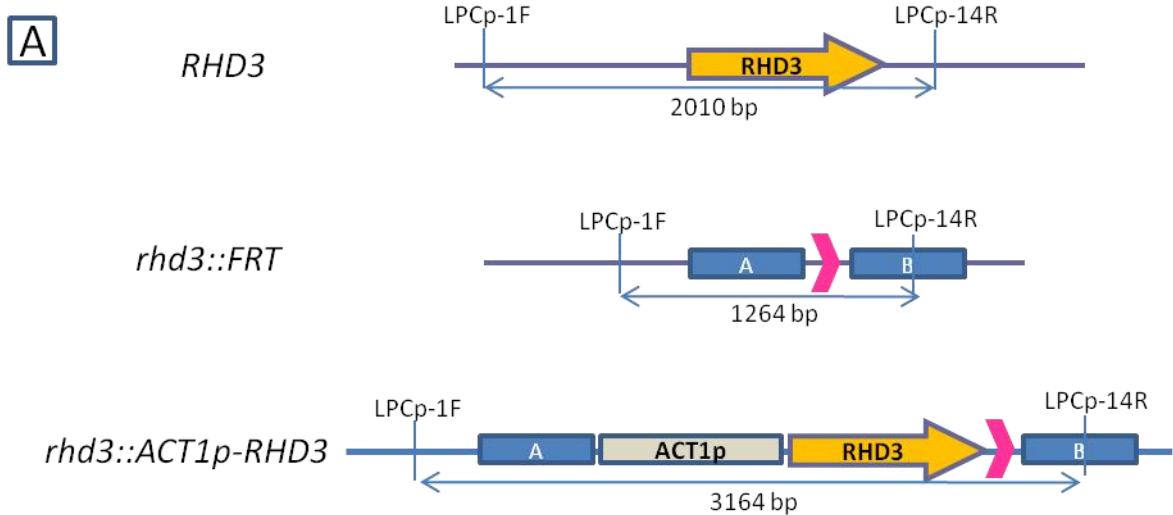
圖三十四：質體pBACT78-11上的RHD3定序結果  
序列第一行為MAP的序列，第二行為pBACT78-11之定序結果。經由比對兩者發現pBACT78-11上的RHD3並沒有突變產生。



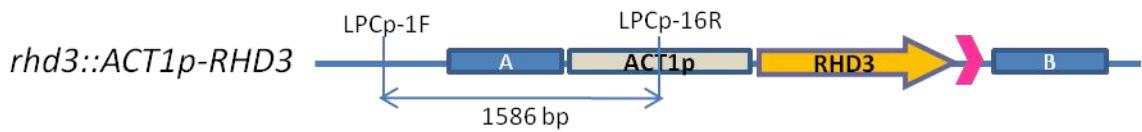
圖三十五：以限制酶SalI確認質體pSATov

上方為酵素切位示意圖，對照組pASATB以SalI處理預計片段為2297 bp (箭號a)和5549 bp。而質體pSATov預計片段為1837 bp (箭號b)、2297 bp (箭號a)和5585 bp。

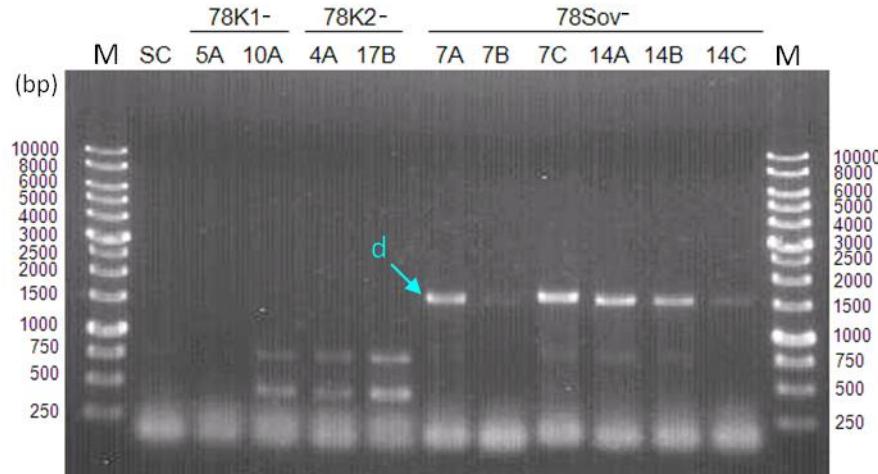
下方為電泳結果，Lane 1為對照組pASATB，Lane 2~13分別為pSATov-1~12。Lane M為1 Kb DNA ladder。



C



D



圖三十六：以PCR進行白色念珠菌78Sov的確認

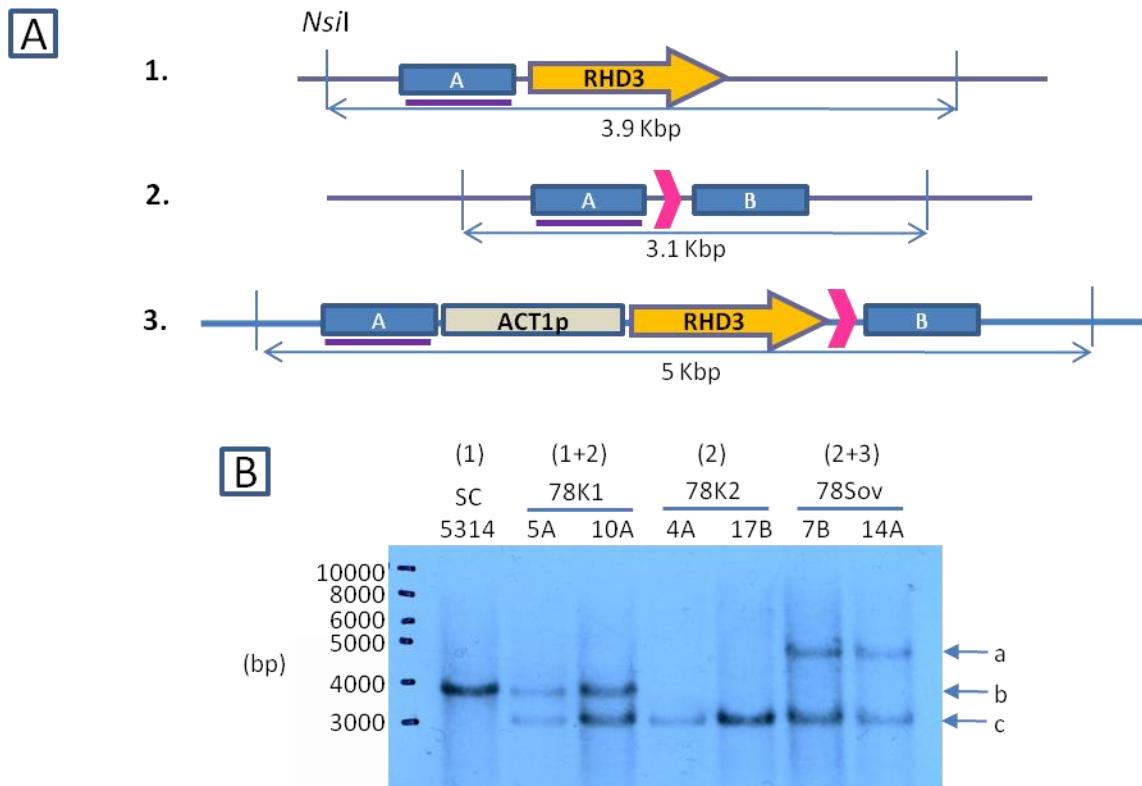
A：以引子LPCp-1F和LPCp-14R進行PCR反應結果示意圖。*RHD3*預期結果為2010 bp (箭號a)、*rhd3::FRT*預期結果為1264 bp (箭號c)，而*rhd3::ACT1p-RHD3*預期結果為3164 bp (箭號b)。

B：以引子LPCp-1F和LPCp-14R進行PCR反應之電泳結果。箭號a：位於2 Kbp附近，箭號b：位於3 Kbp附近，箭號c：位於1 Kbp~1.5 Kbp之間。

C：以引子LPCp-1F和LPCp-16R進行PCR反應結果示意圖。  
*rhd3::ACT1p-RHD3*預期結果為1586 bp (箭號d)。

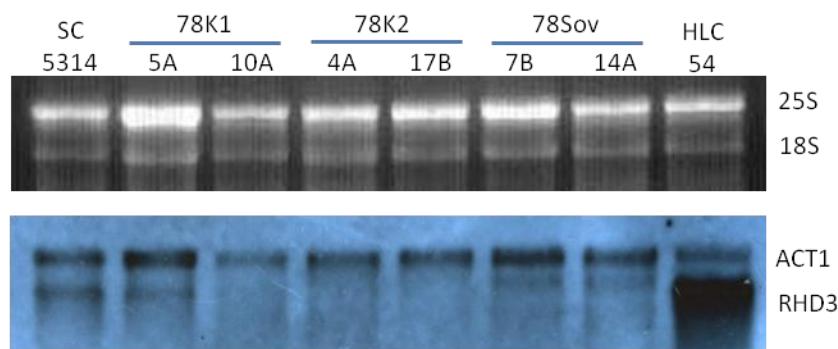
D：以引子LPCp-1F和LPCp-16R進行PCR反應之電泳結果。箭號d：位於1.5 Kbp附近。

SC5314 (*RHD3/RHD3*)，78K1 (*RHD3/rhd3::FRT*)，78K2 (*rhd3::FRT/rhd3::FRT*)，78Sov (*rhd3::FRT/rhd3::ACT1p-RHD3*)。Lane M為1 Kb DNA ladder。



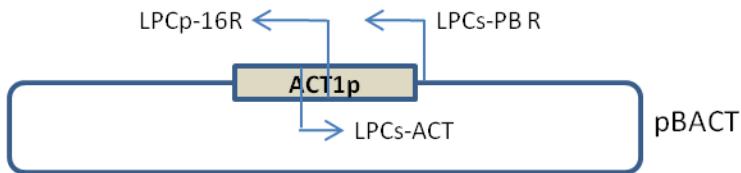
圖三十七：以南方點墨法確認白色念珠菌單套、雙套剔除株78K1、78K2，以及 $ACT1$  promoter表現 $RHD3$ 之菌株78Sov。

- A：為南方點墨法結果示意圖。使用酵素*Nsi*I(圖中短直線表切位)，探針為A region(圖中橫線表探針位置)。
- B：為南方點墨法結果。箭號a: 接近5 Kbp，合乎圖A3之預期。箭號b: 約4 Kbp，合乎圖A1之預期。箭號c: 約3 Kbp，合乎圖A2之預期。



圖三十八：以北方點墨法確認 $RHD3$ 表現量。

以 $ACT1$ 為internal control。SC5314 ( $RHD3/RHD3$ )，78K1 ( $RHD3/rhd3::FRT$ )，78K2 ( $rhd3::FRT/rhd3::FRT$ )，78Sov ( $rhd3::FRT/rhd3::ACT1p-RHD3$ )，HLC54 ( $cph1/cph1 efg1/efg1$ )。



The figure displays a sequence alignment of ACT1p across various strains and a chromatogram of sequencing data.

**Sequence Alignment:**

- ACT1p start:** Indicated by a blue arrow pointing to position 4470.
- Strains:** PACT1(4470), ?LPCs-PB R, ?LPCs-?ACT, ?LPCp-16R, Consensus(4470).
- Positions:** 4470(-531) to 4549(-52).
- Sequence:** TACAAATTGCAACAGTACAACGAATATTCAGCGTCAAAACTAGAGAATAATAAGAAAAACGATCTTTCAAAAAGAAA.

**Second Block:**

- Strains:** PACT1(4550), ?LPCs-PB R, ?LPCs-?ACT, ?LPCp-16R, Consensus(4550).
- Positions:** 4550(-451) to 4629(-372).
- Sequence:** AACCTTTAGTTCTTGTGTTGGGTGTGCTATTATATTATAGTTACTCATAATACCATAAAAATA.

**Third Block:**

- Strains:** PACT1(4630), ?LPCs-PB R, ?LPCs-?ACT, ?LPCp-16R, Consensus(4630).
- Positions:** 4630(-371) to 4709(-292).
- Sequence:** TCGGGTTGATTAGTTAATAAGCTAATTGTTCTAACCGTGTAAATTATGCTGTATATTAAGTAGTGTGTG.

**Fourth Block:**

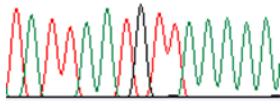
- Strains:** PACT1(4710), ?LPCs-PB R, ?LPCs-?ACT, ?LPCp-16R, Consensus(4710).
- Positions:** 4710(-291) to 4789(-212).
- Sequence:** CACTGCCCAAAATGTTGTTATAGTCGGTAAAGAGAAAAAGATCCATACACACAGTTAATTAGT.

**Fifth Block:**

- Strains:** PACT1(4790), ?LPCs-PB R, ?LPCs-?ACT, ?LPCp-16R, Consensus(4790).
- Positions:** 4790(-211) to 4869(-132).
- Sequence:** TGTTAACGTAATACACTCATTTGTTCTATTGCTTCGGTCGCTGCTCACCAAGATTATTGCCAACGAAACA.

**Chromatogram:**

Below the sequence alignment is a chromatogram showing four colored traces (red, blue, green, black) corresponding to the bases G, G, T, C, G, T, C, T, C, A, C, C, A, A. The x-axis shows positions 4870(-131) to 4949(-52). The chromatogram shows peaks for each base at their respective positions, with a prominent peak for 'G' at position 4930(-71).

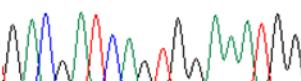


5030(+30) 5040(+40) 5050(+50) 5060(+60) 5070(+70) 5080(+80) 5090(+90) 5109(+109)  
?ACT1(5030) CAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAAATGGTAGGGTGGGAAACTTCATTTCAATT  
?LPCs-PB R (1)  
?LPCs-ACT (159) CAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAAATGGTAGGGTGGGAAACTTCATTTCAATT  
?LPCp-16R (57)  
Consensus(5030) CAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAAATGGTAGGGTGGGAAACTTCATTTCAATT

5110(+110) 5120(+120) 5130(+130) 5140(+140) 5150(+150) 5160(+160) 5170(+170) 5189(+189)  
?ACT1(5110) AGATCAAACCTTTTGTGCGACATAATATTCTCGTTGGGATGTTACTGTCACTTAAATATAACACACATCAGCT  
?LPCs-PB R (1)  
?LPCs-ACT (239) AGATCAAACCTTTTGTGCGACATAATATTCTCGTTGGGATGTTACTGTCACTTAAATATAACACACATCAGCT  
?LPCp-16R (57)  
Consensus(5110) AGATCAAACCTTTTGTGCGACATAATATTCTCGTTGGGATGTTACTGTCACTTAAATATAACACACATCAGCT

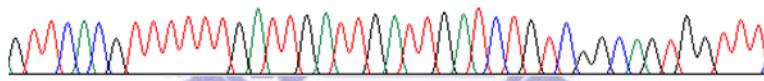
5190(+190) 5200(+200) 5210(+210) 5220(+220) 5230(+230) 5240(+240) 5250(+250) 5269(+269)  
?ACT1(5190) TATAATTTGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCA **A**TGGAAATGGCTAACTTCATGTATCTGTTCTTCCCT  
?LPCs-PB R (41) TATAATTTGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCA **G**TGGAAATGGCTAACTTCATGTATCTGTTCTTCCCT  
?LPCs-ACT (319) TATAATTTGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCA **G**TGGAAATGGCTAACTTCATGTATCTGTTCTTCCCT  
?LPCp-16R (57)  
Consensus(5190) TATAATTTGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCA **G**TGGAAATGGCTAACTTCATGTATCTGTTCTTCCCT

G A C G A T C A G T G G A A A T G G



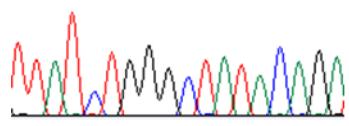
5270(+270) 5280(+280) 5290(+290) 5300(+300) 5310(+310) 5320(+320) 5330(+330) 5349(+349)  
?ACT1(5270) TTTTCAAAGTTCACGTTTTGATTGATTGAT **TGAT** CTGTCGGCAGTGGTTCAAAACCATTGGTGAAGTAATCCT  
?LPCs-PB R (121) TTTTCAAAGTTCACGTTTTGATTGATTGAT **---** CTGTCGGCAGTGGTTCAAAACCATTGGTGAAGTAATCCT  
?LPCs-ACT (399) TTTTCAAAGTTCACGTTTTGATTGATTGAT **---** CTGTCGGCAGTGGTTCAAAACCATTGGTGAAGTAATCCT  
?LPCp-16R (57)  
Consensus(5270) TTTTCAAAGTTCACGTTTTGATTGATTGAT **---** CTGTCGGCAGTGGTTCAAAACCATTGGTGAAGTAATCCT  
+++++

G T T C A C G T T T T T G A T T G A T T G A T C T G T C G G C A G T G G T T T



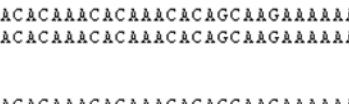
5350(+350) 5360(+360) 5370(+370) 5380(+380) 5390(+390) 5400(+400) 5410(+410) 5429(+429)  
?ACT1(5350) ATCAATCAATGTTACGACAAAAGGCTCAATTCTCAAATTGCAATGTTTATGTTTCTACGTGTAACGTGCAAGGCA  
?LPCs-PB R (201) ATCAATCAATGTTACGACAAAAGGCTCAATTCTCAAATTGCAATGTTTATGTTTCTACGTGTAACGTGCAAGGCA  
?LPCs-ACT (479) ATCAATCAATGTTACGACAAAAGGCTCAATTCTCAAATTGCAATGTTTATGTTTCTACGTGTAACGTGCAAGGCA  
?LPCp-16R (57)  
Consensus(5350) ATCAATCAATGTTACGACAAAAGGCTCAATTCTCAAATTGCAATGTTTATGTTTCTACGTGTAACGTGCAAGGCA

T T A T C T G G G C T A T A C A G A



5430(+430) 5440(+440) 5450(+450) 5460(+460) 5470(+470) 5480(+480) 5490(+490) 5509(+509)  
?ACT1(5430) ATTGATTCAACATTGTTGGTGTGTTGACGAGTTCTAGTTGGACTTGTGTTTATCTGG **A**CTATACAGATTCCCG  
?LPCs-PB R (281) ATTGATTCAACATTGTTGGTGTGTTGACGAGTTCTAGTTGGACTTGTGTTTATCTGG**G**CTATACAGATTCCCG  
?LPCs-ACT (559) ATTGATTCAACATTGTTGGTGTGTTGACGAGTTCTAGTTGGACTTGTGTTTATCTGG**G**CTATACAGATTCCCG  
?LPCp-16R (57)  
Consensus(5430) ATTGATTCAACATTGTTGGTGTGTTGACGAGTTCTAGTTGGACTTGTGTTTATCTGG**G**CTATACAGATTCCCG

T T A T C T G G G C T A T A C A G A

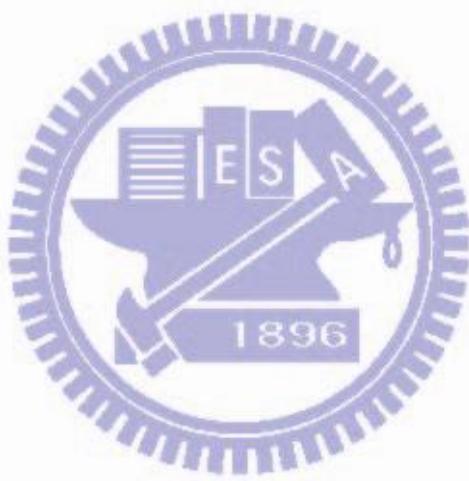


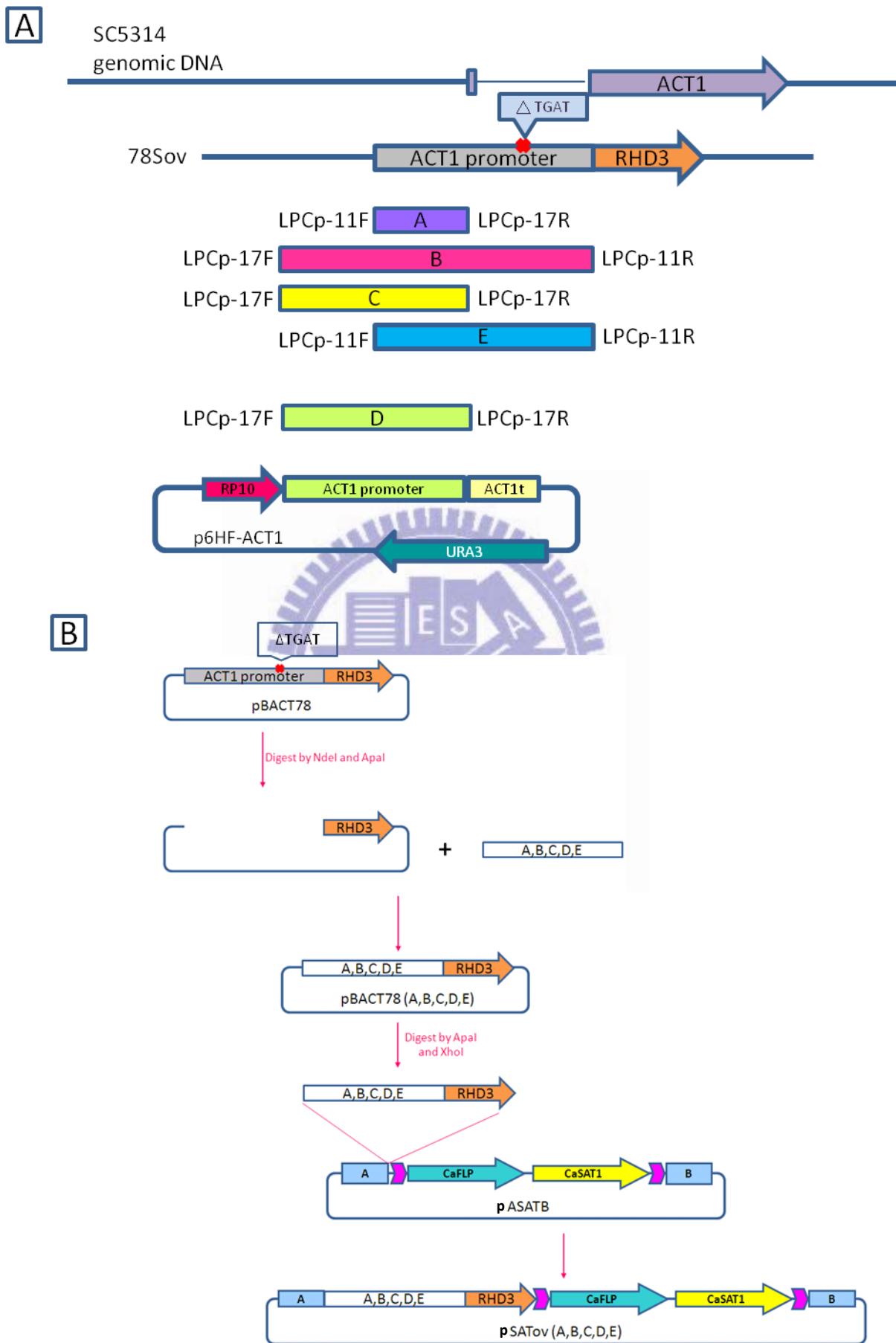
5510(+510) 5520(+520) 5530(+530) 5540(+540) 5550(+550) 5560(+560) 5570(+570) 5589(+589)  
?ACT1(5510) GCTCACTATGAATTCTGGTGTGTTGACGCTCAGTGCACACAACATAAAACAAACACAAACACAGCAAGAAAAAAA  
?LPCs-PB R (361) GCTCACTATGAATTCTGGTGTGTTGACGCTCAGTGCACACAACATAAAACAAACACAAACACAGCAAGAAAAAAA  
?LPCs-ACT (639) GCTCACTATGAATTCTGGTGTGTTGACGCTCAGTGCACAC  
?LPCp-16R (57)  
Consensus(5510) GCTCACTATGAATTCTGGTGTGTTGACGCTCAGTGCACACAACATAAAACAAACACAAACACAGCAAGAAAAAAA

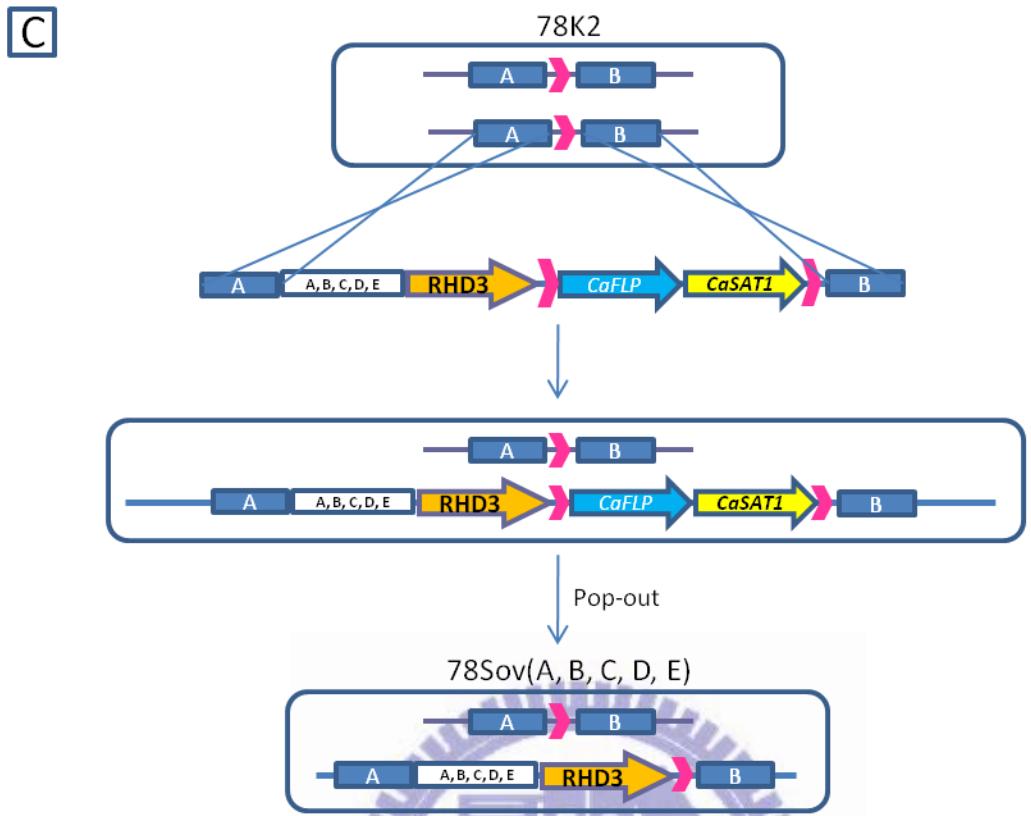
5590(+590)	5600(+600)	5610(+610)	5620(+620)	5630(+630)	5640(+640)	5650(+650)	5669(+669)
?ACT1(5590) AAAACGAACATTGAATTGAAACCAAGCCAACTGAAAAATTCCCTTATTTAAATGACTGTCACTAACCCATTNTTATAGA							
?LPCs-PB R (441) AAAACGAACATTGAATTGAAACCAAGCCAACTGAAAAATTCCCTTATTTAAATGACTGTCACTAACCCATTNTTATAGA							
?LPCs-ACT (776)							
?LPCp-16R (57)							
Consensus(5590) AAAACGAACATTGAATTGAAACCAAGCCAACTGAAAAATTCCCTTATTTAAATGACTGTCACTAACCCATTNTTATAGA							
5670(+670)	5680(+680)	5690(+690)	5700(+700)	5710	5720	5730	5749
?ACT1(5670) AGAAGTTGCTGCTTAGTTATCGATAACGGTTCTGGTATGTGTAAAGCCGGTTGCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCTG							
?LPCs-PB R (521) AGAAGTTGCTGCTTAGTTATCGATAACGGTTCTGGTATGTGTAAAGCCGGTTGCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCTG							
?LPCs-ACT (776)							
?LPCp-16R (57)							
Consensus(5670) AGAAGTTGCTGCTTAGTTATCGATAACGGTTCTGGTATGTGTAAAGCCGGTTGCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCTG							
ACT1p end							

圖三十九：質體pBACT上所帶的*ACT1* promoter定序結果

第一行為Candida Genomic Database所提供的序列，第二行為引子LPCs-PB R所定出來序列，第三行為引子LPCs-ACT所定出來的序列，第四行為引子LPCp-16R所定出來的序列。

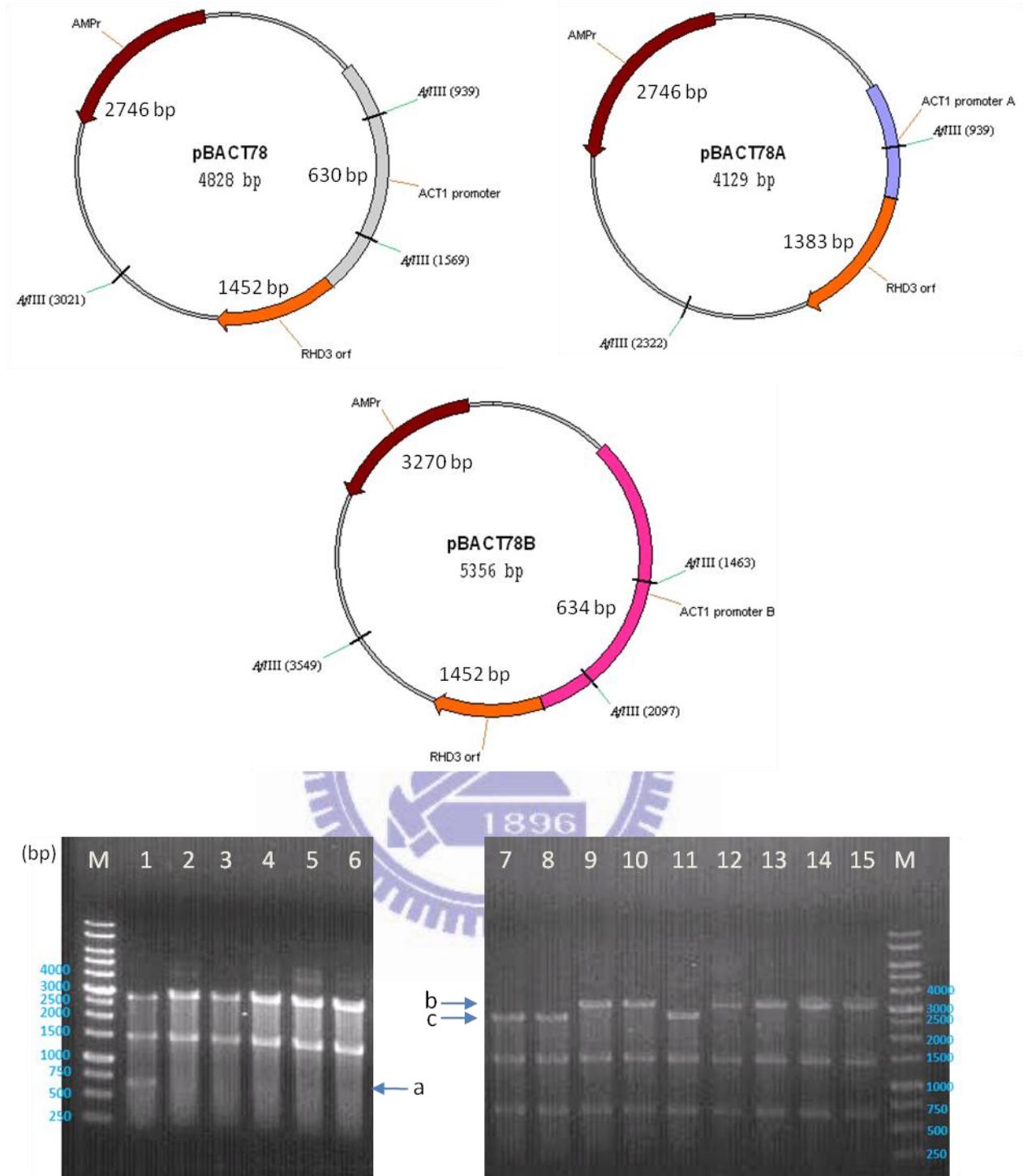






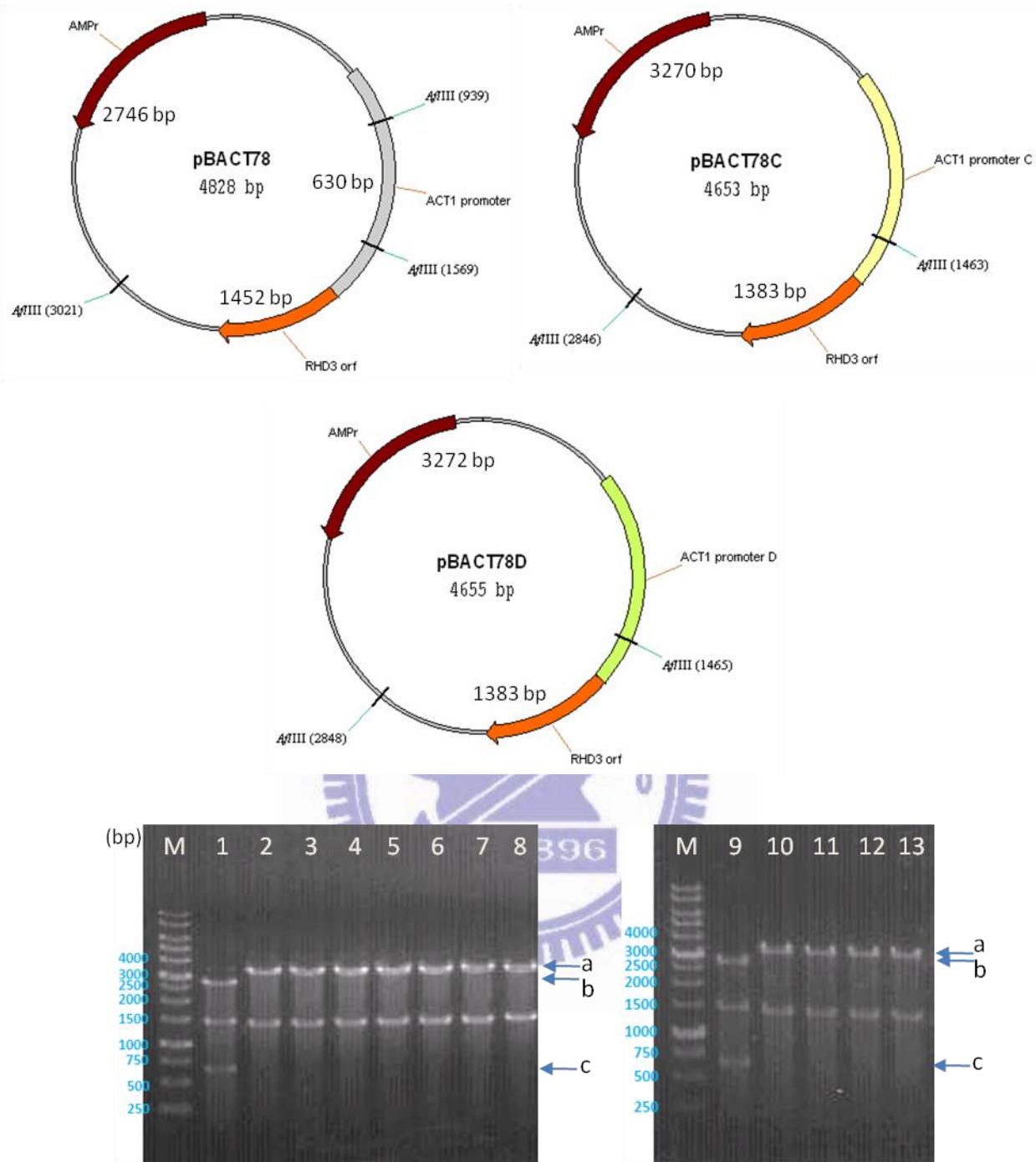
圖四十：

- A：圖中的A,B,C,D,E代表不同區域的 $ACT1$ 上游序列，兩端為PCR反應所使用的引子。其中A,B,C,E以SC5314 genomic DNA為模板，D則以質體p6HF- $ACT1$ 為模板。
- B：將不同區域之 $ACT1$ 上游片段所表現的 $RHD3$ 基因接上 $SAT1$  flipper cassette之流程示意圖。先將pBACT78上舊的promoter切下，接上新的promoter。再將promoter、 $RHD3$ 接到質體ASATB上，完成片段之建構。
- C：以不同區域之 $ACT1$ 上游片段表現 $RHD3$ 基因之白色念珠菌之建構示意圖。將圖B建構完的片段送入雙套剔除株(78K2)中，利用A、B進行同源重組置換，將promoter和 $RHD3$ 送入genome中。

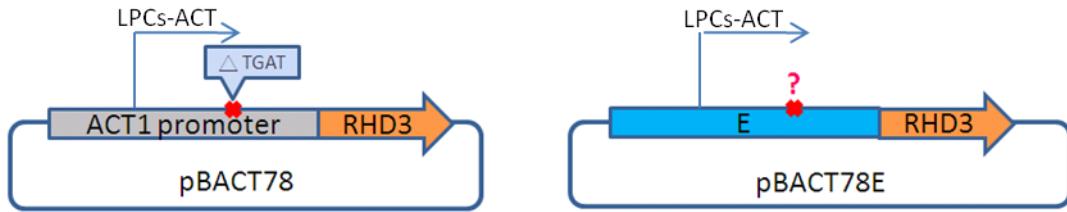


圖四十一：以限制酶Af/III確認質體pBACT78A、pBACT78B。

上方為酵素切位示意圖，控制組pBACT78以限制酶Af/III處理，預計片段為630 bp (箭號a)、1452 bp和2746 bp (箭號c)。pBACT78A預期會得到片段2746 bp和1383 bp。pBACT78B預期會得到片段634 bp、1452 bp和3270 bp (箭號b)。下方為電泳結果，Lane 1, 7為控制組pBACT78，Lane 2~6分別為pBACT78A-25~29，Lane 8~15分別為pBACT78B-1~8，Lane M為1 Kb DNA ladder。



圖四十二：以限制酶*Af*III確認質體pBACT78C、pBACT78D。  
上方為酵素切位示意圖，控制組pBACT78以限制酶*Af*III處理，預計  
片段為630 bp (箭號c)、1452 bp和2746 bp (箭號a)。pBACT78C預期會  
得到片段3270 bp (箭號b)和1383 bp。pBACT78D預期會得到片段  
3272 bp (箭號b)和1383 bp。  
下方為電泳結果，Lane 1, 9為控制組pBACT78，Lane 2~8分別為  
pBACT78C-25~31，Lane 10~13分別為pBACT78D-25~28，Lane M為1  
Kb DNA ladder。



LPCs-ACT

TGAT

ACT1 promoter RHD3

pBACT78

E ?

RHD3

pBACT78E

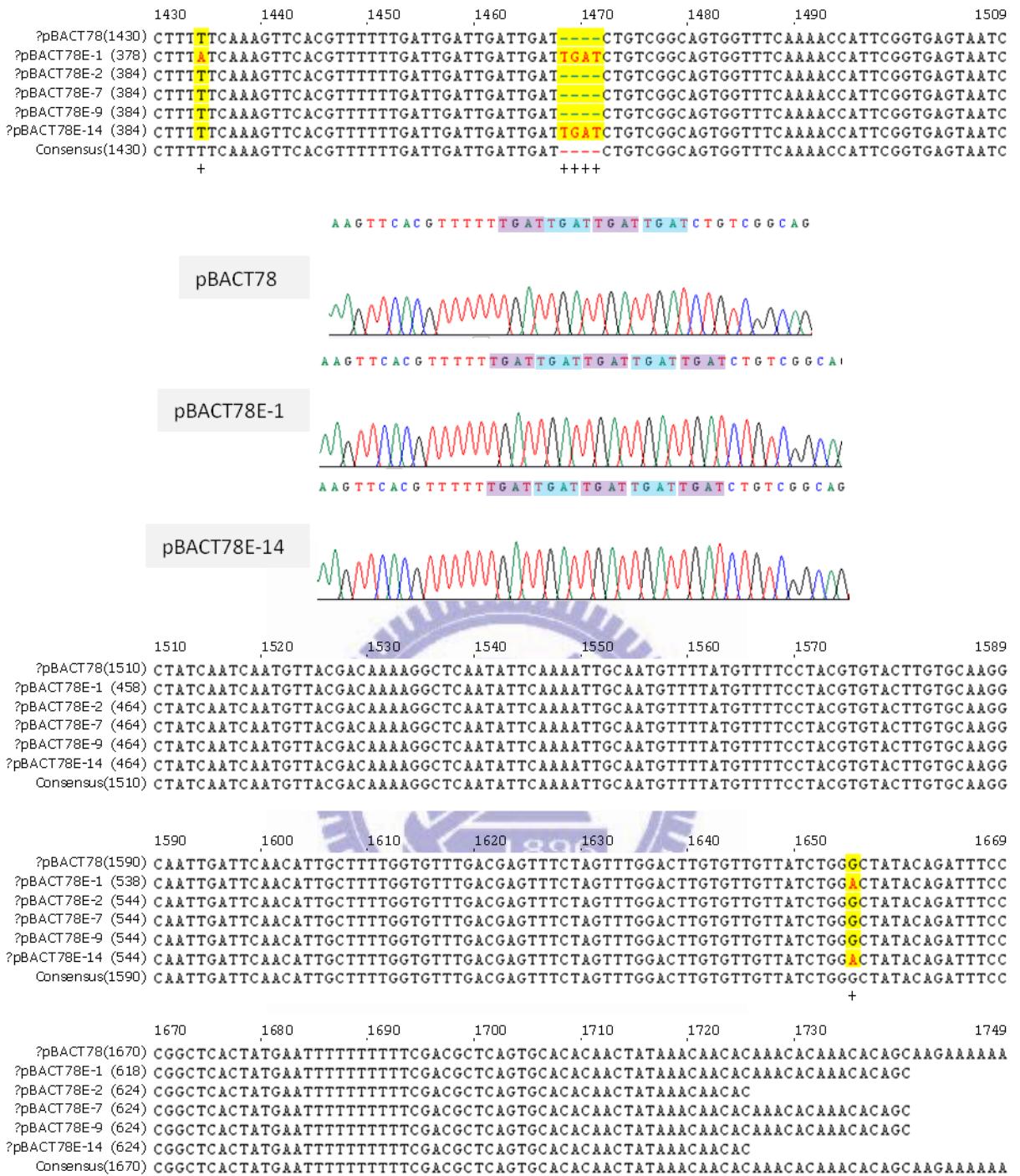
1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1109  
?pBACT78(1030) CAATTTTTTTATATTTAGATTTCTTTCTTTCTAATTTCACCTCTGGTTTCTTC  
?pBACT78E-1 (1) GATTTTCTTTCTTTCTAATTTCACCTCTGGTTTCTTC  
?pBACT78E-2 (1) TTTTCAGATTTCTTTCTTTCTAATTTCACCTCTGGTTTCTTC  
?pBACT78E-7 (1) TTTTCAGATTTCTTTCTTTCTAATTTCACCTCTGGTTTCTTC  
?pBACT78E-9 (1) TTTTCAGATTTCTTTCTTTCTAATTTCACCTCTGGTTTCTTC  
?pBACT78E-14 (1) TTTTCAGATTTCTTTCTTTCTAATTTCACCTCTGGTTTCTTC  
Consensus(1030) CAATTTTTTTATATTTAGATTTCTTTCTTTCTAATTTCACCTCTGGTTTCTTC  
+

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1189  
?pBACT78(1110) TTTCTTAGAAAACATTATCTCGATATAATTTAAAAAAATATAATCATTCAAAATGGACGGTGGTATGTTTAGTTAGC  
?pBACT78E-1 (58) TTTCTTAGAAAACATTATCTCGATATAATTTAAAAAAATATAATCATTCAAAATGGACGGTGGTATGTTTAGTTAGC  
?pBACT78E-2 (64) TTTCTTAGAAAACATTATCTCGATATAATGTTAAAAAAATATAATCATTCAAAATGGACGGTGGTATGTTTAGTTAGC  
?pBACT78E-7 (64) TTTCTTAGAAAACATTATCTCGATATAATGTTAAAAAAATATAATCATTCAAAATGGACGGTGGTATGTTTAGTTAGC  
?pBACT78E-9 (64) TTTCTTAGAAAACATTATCTCGATATAATGTTAAAAAAATATAATCATTCAAAATGGACGGTGGTATGTTTAGTTAGC  
?pBACT78E-14 (64) TTTCTTAGAAAACATTATCTCGATATAATGTTAAAAAAATATAATCATTCAAAATGGACGGTGGTATGTTTAGTTAGC  
Consensus(1110) TTTCTTAGAAAACATTATCTCGATATAATTTAAAAAAATATAATCATTCAAAATGGACGGTGGTATGTTTAGTTAGTTAGC  
+

1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1269  
?pBACT78(1190) TTCAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAATGGTAGGGGGAAACTTCATTTCAAT  
?pBACT78E-1 (138) TTCAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAATGGTAGGGGGAAACTTCATTTCAAT  
?pBACT78E-2 (144) TTCAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAATGGTAGGGGGAAACTTCATTTCAAT  
?pBACT78E-7 (144) TTCAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAATGGTAGGGGGAAACTTCATTTCAAT  
?pBACT78E-9 (144) TTCAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAATGGTAGGGGGAAACTTCATTTCAAT  
?pBACT78E-14 (144) TTCAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAATGGTAGGGGGAAACTTCATTTCAAT  
Consensus(1190) TTCAATTCTAATTGATTGATTAATCAGTTGATTGGTTCAATATGACAATGGTAGGGGGAAACTTCATTTCAAT  
+

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1349  
?pBACT78(1270) TCAGATCAAACCTTTGGTTGTCGACATAATATTCTCGTTGGATGTTACTGTCACATTAATAACACACACATCAG  
?pBACT78E-1 (218) TCAGATCAAACCTTTGGTTGTCGACATAATATTCTCGTTGGATGTTACTGTCACATTAATAACACACACATCAG  
?pBACT78E-2 (224) TCAGATCAAACCTTTGGTTGTCGACATAATATTCTCGTTGGATGTTACTGTCACATTAATAACACACACATCAG  
?pBACT78E-7 (224) TCAGATCAAACCTTTGGTTGTCGACATAATATTCTCGTTGGATGTTACTGTCACATTAATAACACACACATCAG  
?pBACT78E-9 (224) TCAGATCAAACCTTTGGTTGTCGACATAATATTCTCGTTGGATGTTACTGTCACATTAATAACACACACATCAG  
?pBACT78E-14 (224) TCAGATCAAACCTTTGGTTGTCGACATAATATTCTCGTTGGATGTTACTGTCACATTAATAACACACACATCAG  
Consensus(1270) TCAGATCAAACCTTTGGTTGTCGACATAATATTCTCGTTGGATGTTACTGTCACATTAATAACACACACATCAG

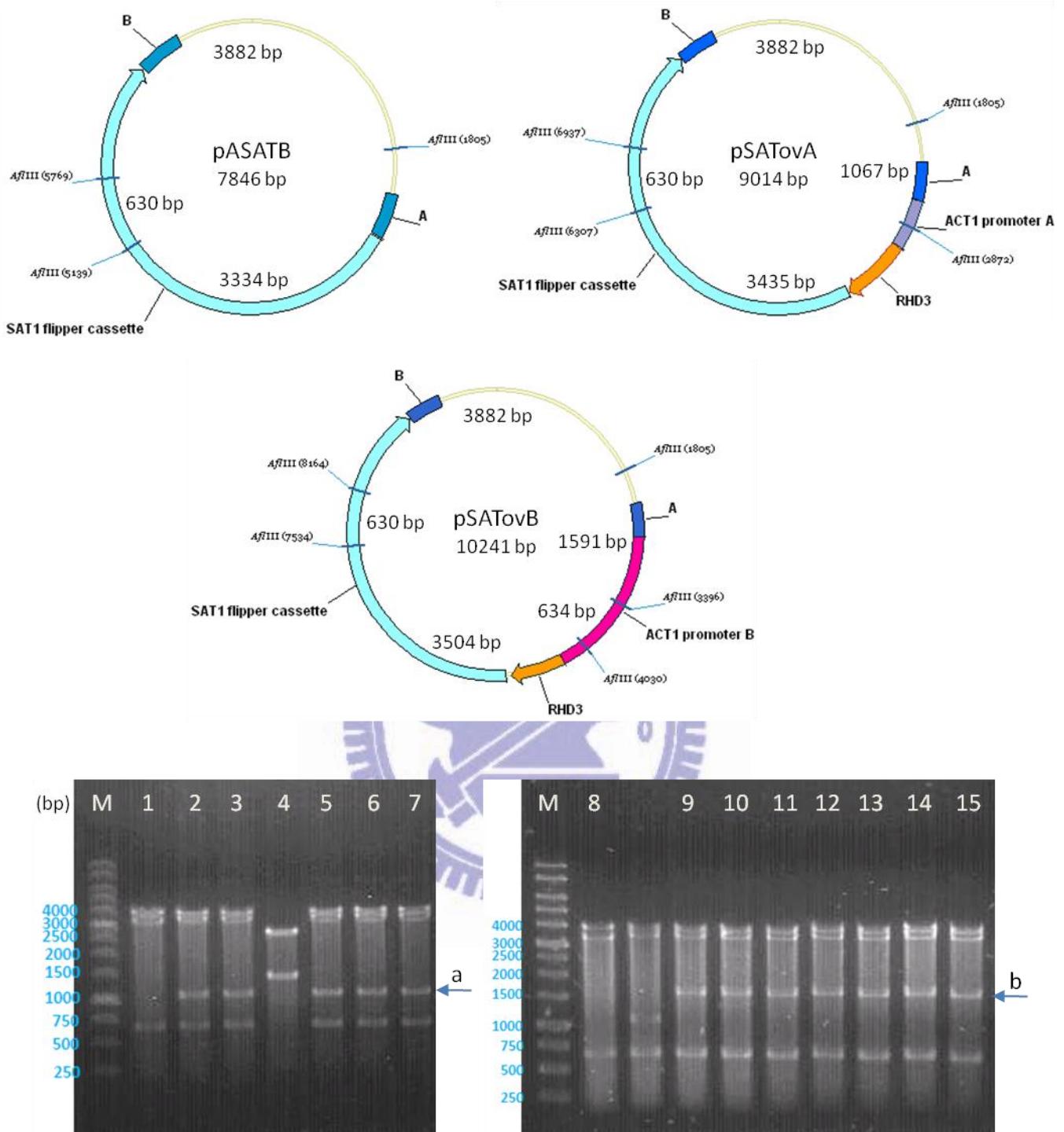
1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1429  
?pBACT78(1350) CTTATAATTGGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCAATGGAAATGGCTAACCTCAATGTATCTGTTCTTCCC  
?pBACT78E-1 (298) CTTATAATTGGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCAATGGAAATGGCTAACCTCAATGTATCTGTTCTTCCC  
?pBACT78E-2 (304) CTTATAATTGGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCAATGGAAATGGCTAACCTCAATGTATCTGTTCTTCCC  
?pBACT78E-7 (304) CTTATAATTGGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCAATGGAAATGGCTAACCTCAATGTATCTGTTCTTCCC  
?pBACT78E-9 (304) CTTATAATTGGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCAATGGAAATGGCTAACCTCAATGTATCTGTTCTTCCC  
?pBACT78E-14 (304) CTTATAATTGGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCAATGGAAATGGCTAACCTCAATGTATCTGTTCTTCCC  
Consensus(1350) CTTATAATTGGAAAGTAATTATCAGATATGTTGACGATCAATGGAAATGGCTAACCTCAATGTATCTGTTCTTCCC  
+



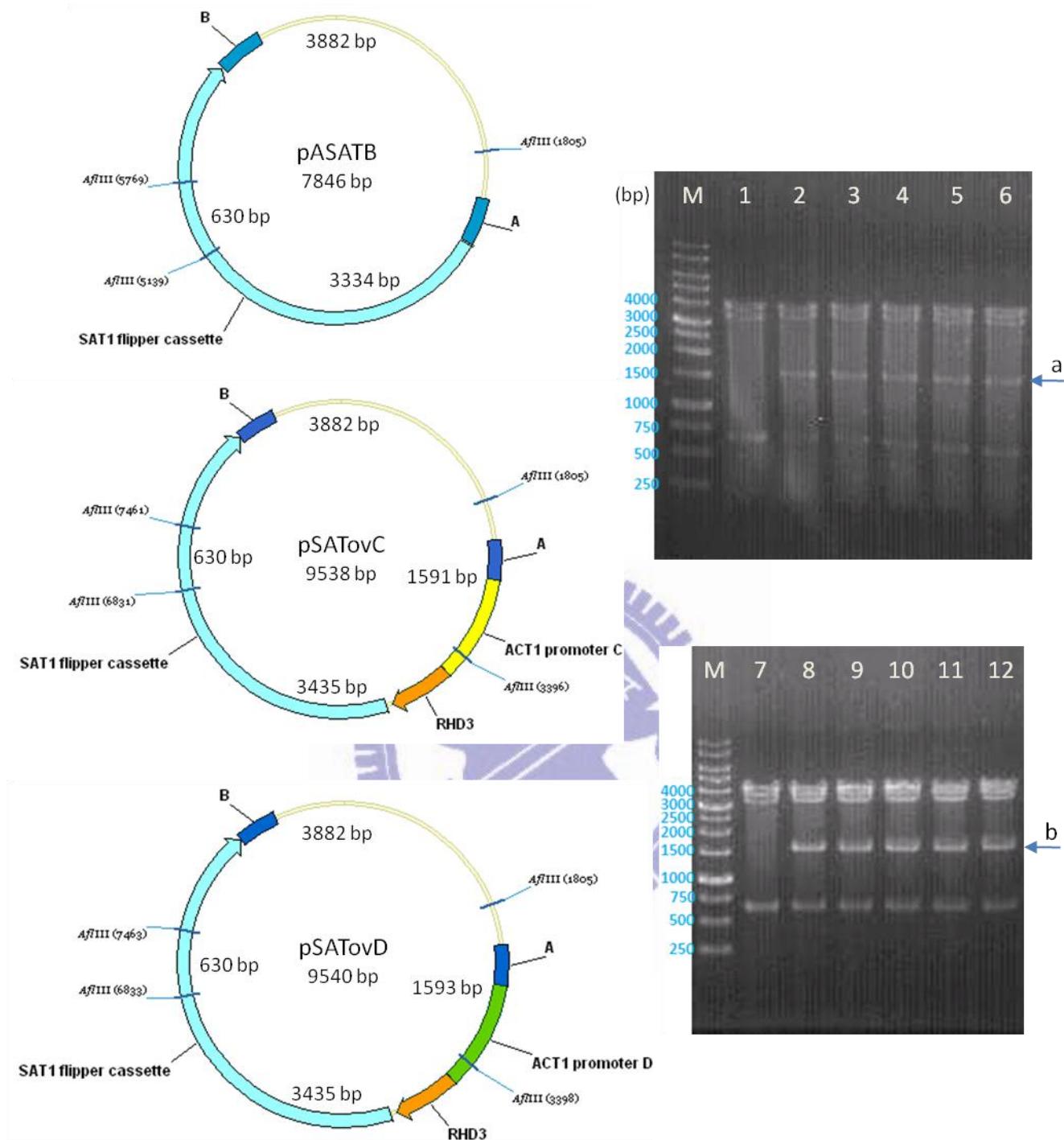
圖四十三：pBACT78E上的 $ACT1$  promoter定序結果。

因為pBACT78所帶的 $ACT1$  promoter缺少四個核酸，因此想看pBACT78E相同位置上的核酸是否有缺少。

第一行為pBACT78 MAP的序列，第二~六行為pBACT78E的定序結果。定序用引子為LPCs-ACT。

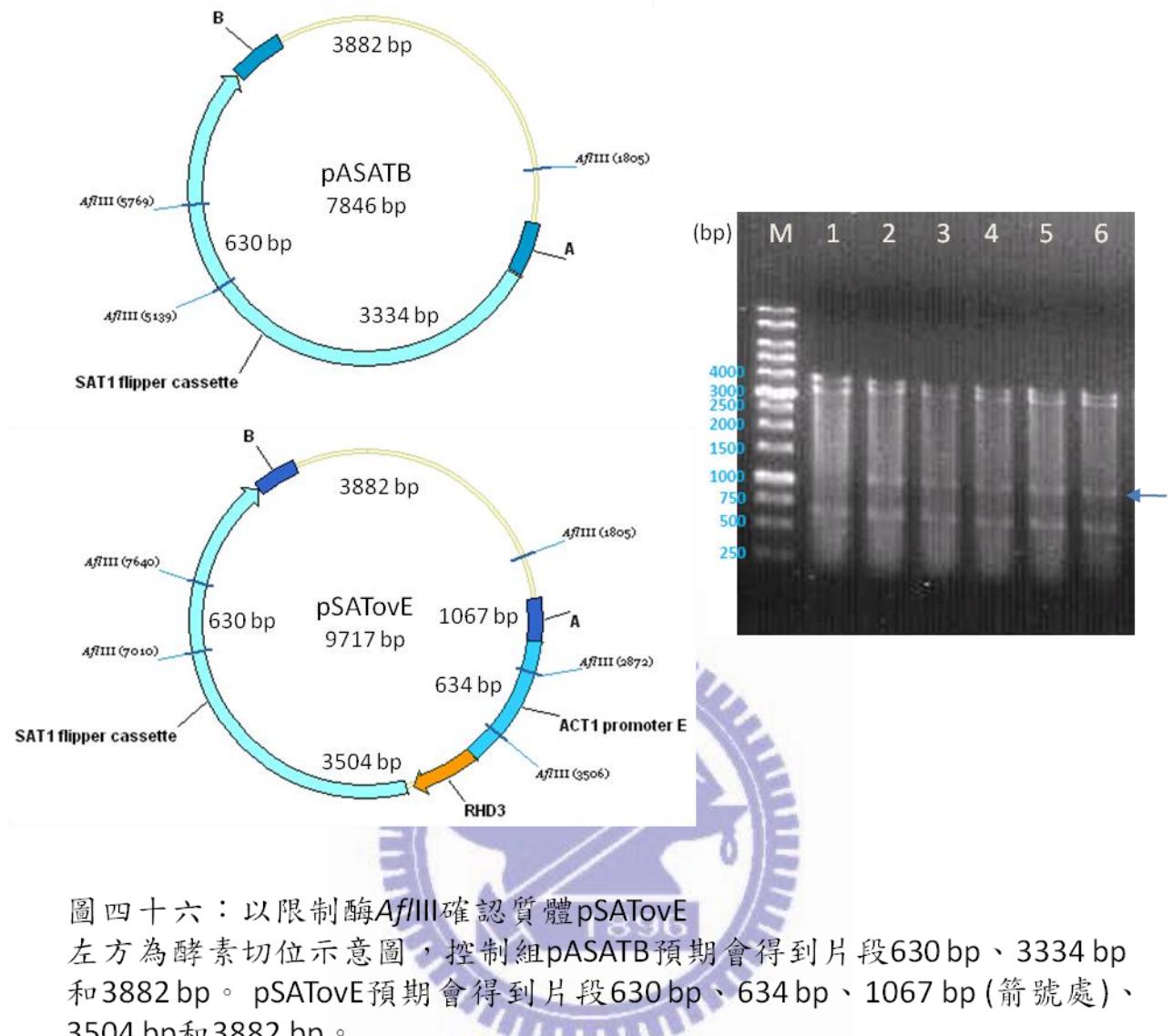


圖四十四：以限制酶*Af*III確認質體pSATovA、pSATovB  
上方為酵素切位示意圖，控制組pASATB預期會得到片段630 bp、  
3334 bp和3882 bp。pSATovA預期會得到片段630 bp、1067 bp (箭號a)、  
3435 bp和3882 bp。pSATovB預期會得到片段630 bp、634 bp、1591  
bp (箭號b)、3504 bp和3882 bp。  
下方為電泳結果，Lane 1, 8為控制組pASATB，Lane 2~7分別為  
pSATovA-1~6，Lane 9~15分別為pSATovB-1~7，Lane M為1 Kb DNA  
ladder。



圖四十五：以限制酶 *Af*/III 確認質體 pSATovC、pSATovD  
 左方為酵素切位示意圖，控制組 pASATB 預期會得到片段 630 bp、  
 3334 bp 和 3882 bp。pSATovC 預期會得到片段 630 bp、1591 bp (箭號 a)、  
 3435 bp 和 3882 bp。pSATovD 預期會得到片段 630 bp、1593 bp (箭號 b)、  
 3435 bp 和 3882 bp。

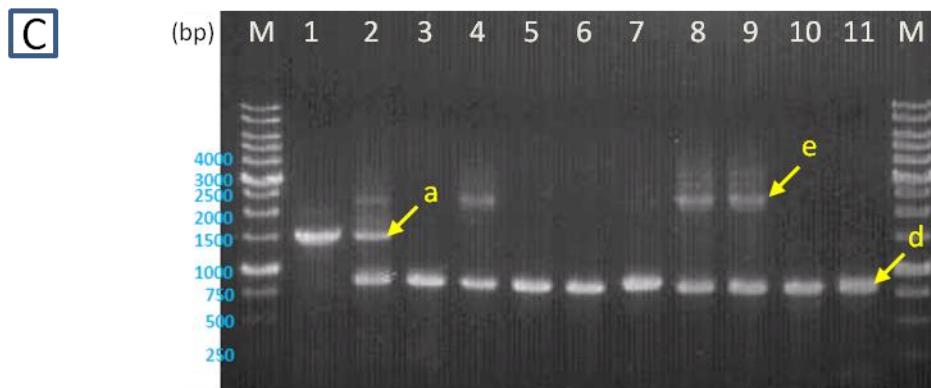
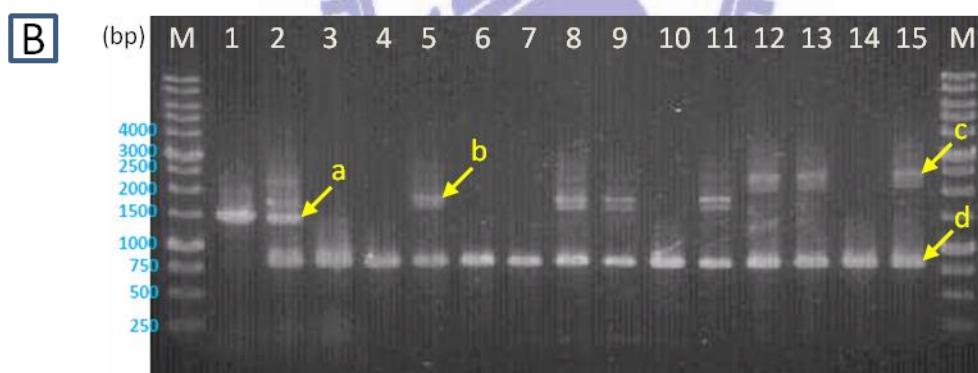
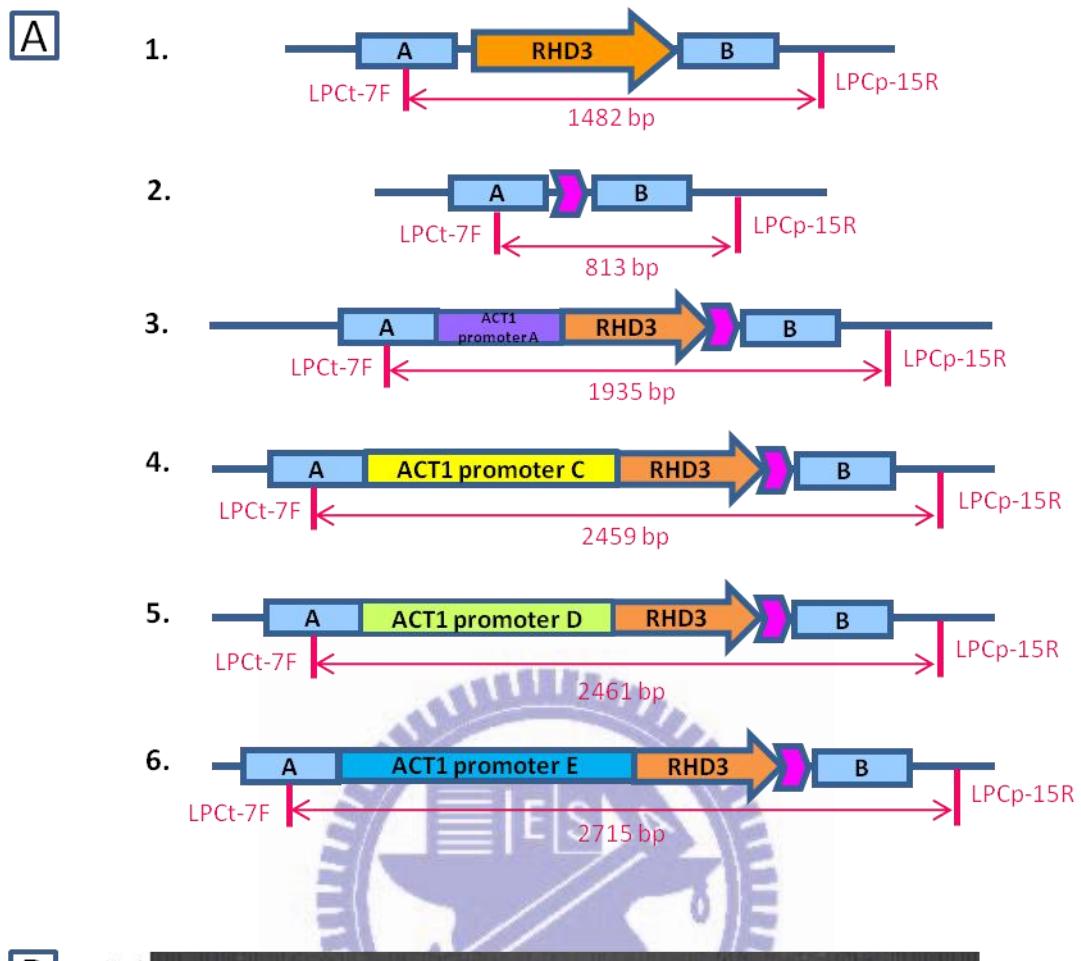
右方為電泳結果，Lane 1, 7 為控制組 pASATB，Lane 2~6 分別為  
 pSATovC-1~5，Lane 8~12 分別為 pSATovD-1~5，Lane M 為 1 Kb DNA  
 ladder。

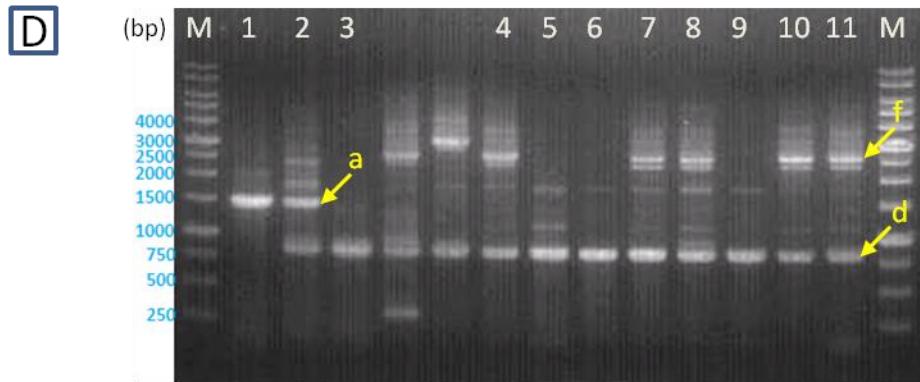


圖四十六：以限制酶*Af*III確認質體pSATovE

左方為酵素切位示意圖，控制組pASATB預期會得到片段630 bp、3334 bp和3882 bp。pSATovE預期會得到片段630 bp、634 bp、1067 bp(箭號處)、3504 bp和3882 bp。

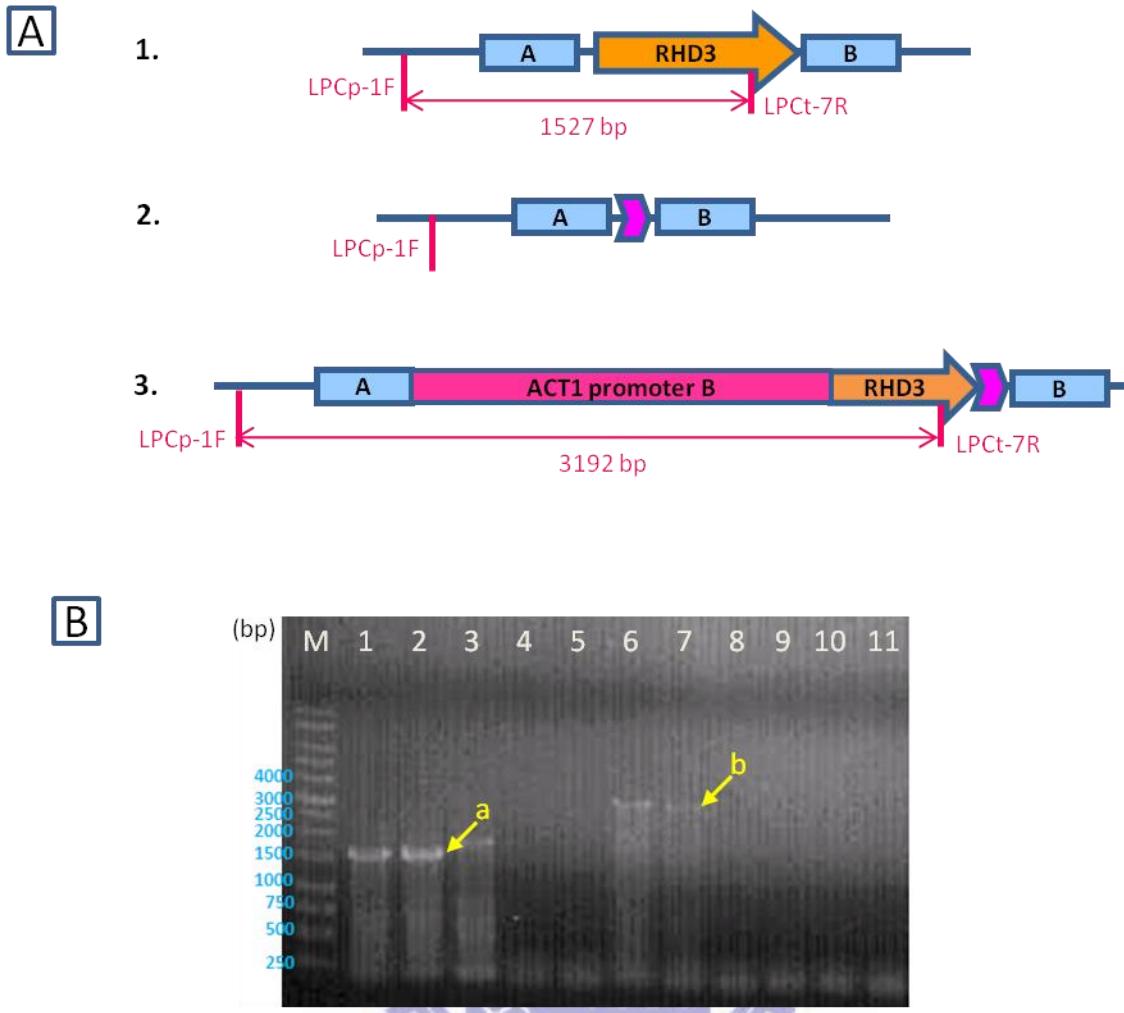
右方為電泳結果，Lane 1為控制組pASATB，Lane 2~6分別為pSATovE-1~5，Lane M為1 Kb DNA ladder。





圖四十七：以PCR確認白色念珠菌78SovA、78SovC、78SovD和78SovE

- A：使用引子LPCt-7F和LCPp-15R進行PCR反應預期片段示意圖。1：箭號a，約1.5 Kbp、2：箭號d，位在750 bp~1 Kbp之間、3：箭號b，接近2 Kbp、4：箭號e，接近2.5 Kbp、5：箭號c，接近2.5 Kbp、6：箭號f，接近2.5 Kbp。
- B：78SovA和78SovD之電泳結果。Lane 1為SC5314 (圖A: 1)，Lane 2為78K15A (圖A: 1+2)，Lane 3為78K24A (圖A: 2)，Lane 4~11分別為78SovA-1~8 (圖A: 2+3)，Lane 12~15分別為78SovD-1~4 (圖A: 2+5)，Lane M為1 Kb DNA ladder。
- C：78SovC之電泳結果。Lane 1為SC5314 (圖A: 1)，Lane 2為78K15A (圖A: 1+2)，Lane 3為78K24A (圖A: 2)，Lane 4~11分別為78SovC-1~8 (圖A: 2+4)，Lane M為1 Kb DNA ladder。
- D：78SovE之電泳結果。Lane 1為SC5314 (圖A: 1)，Lane 2為78K15A (圖A: 1+2)，Lane 3為78K24A (圖A: 2)，Lane 4~11分別為78SovE-9~16 (圖A: 2+6)，Lane M為1 Kb DNA ladder。



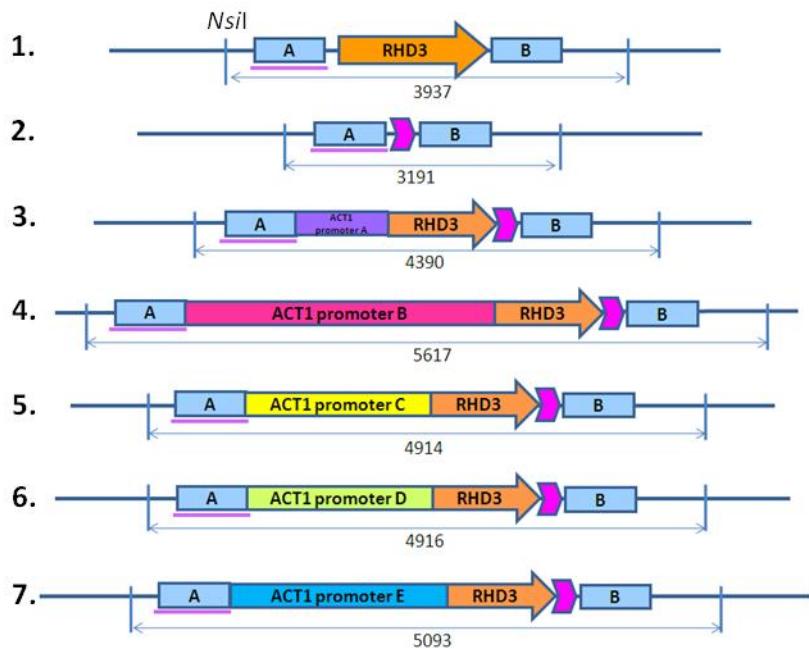
圖四十八：以PCR確認白色念珠菌78SovB

A：使用引子LPCp-1F和LP Ct-7R進行PCR反應預期片段示意圖。

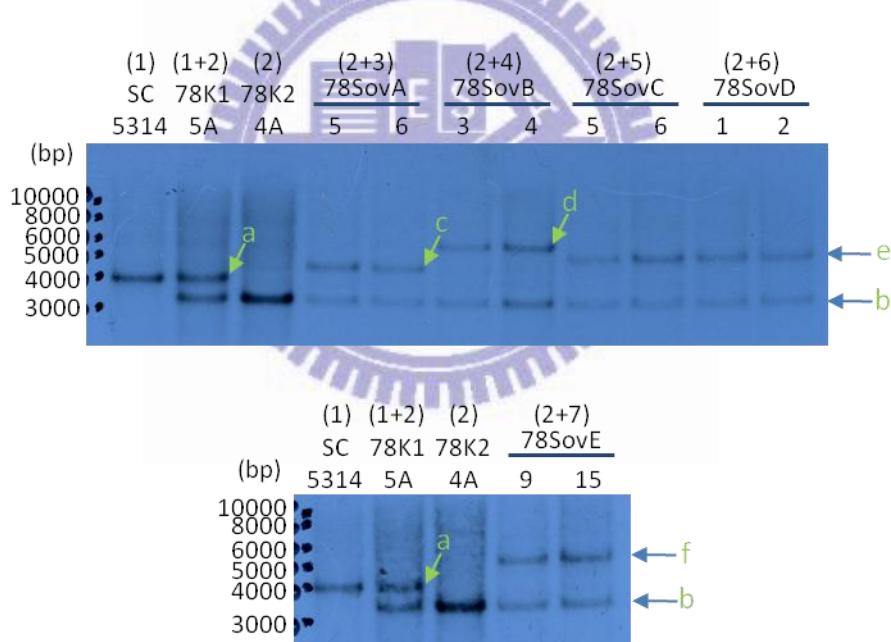
1：箭號a，約1.5 Kbp、3：箭號b，約3 Kbp。

B：78SovB電泳結果。Lane 1為SC5314(圖A: 1)，Lane 2為78K15A(圖A: 1+2)，Lane 3為78K24A(圖A: 2)，Lane 4~11分別為78SovB-1~8(圖A: 2+3)，Lane M為1 Kb DNA ladder。

A

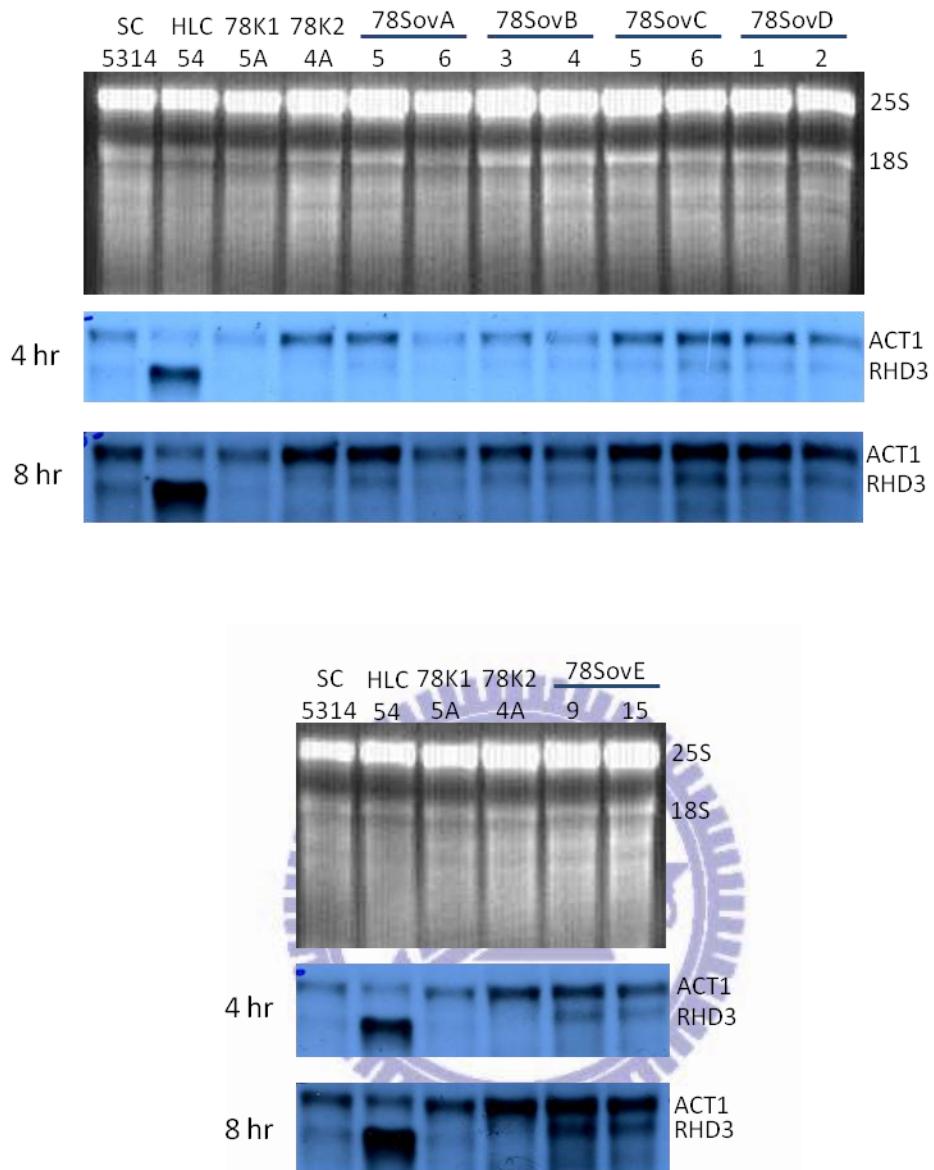


B



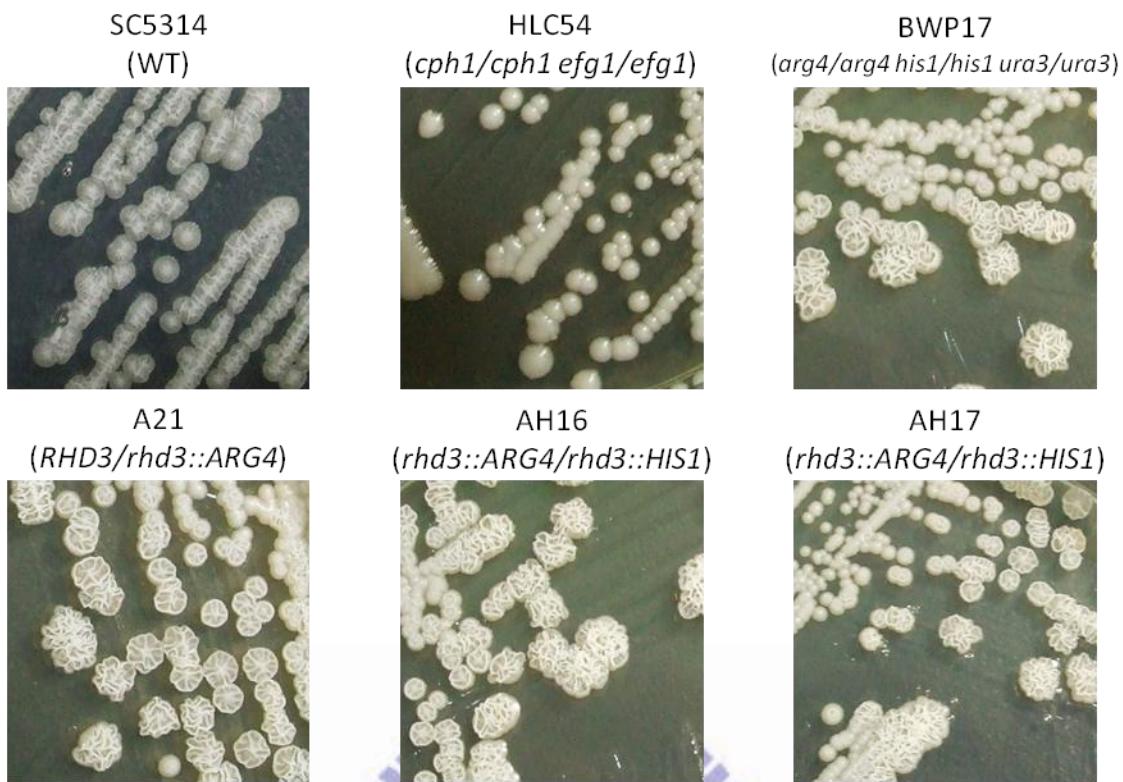
圖四十九：以南方點墨法確認白色念珠菌 78SovA、78SovB、78SovC、78SovD和78SovE。

- A：為南方點墨法結果預測示意圖，使用酵素 *Nsil* (圖中短直線表切位)，以 A region 當探針(圖中橫線表探針位置)。
- B：南方點墨法結果。箭號 a: 約 4 Kbp，合乎圖 A1 之預期。箭號 b: 接近 3 Kbp，合乎圖 A2 之預期。箭號 c: 介於 4 Kbp~5 Kbp 之間，合乎圖 A3 之預期。箭號 d: 介於 5 Kbp~6 Kbp 之間，合乎圖 A4 之預期。箭號 e: 接近 5 Kbp，合乎圖 A5、圖 A6 之預期。箭號 f: 接近 5 Kbp，合乎圖 A7 之預期。

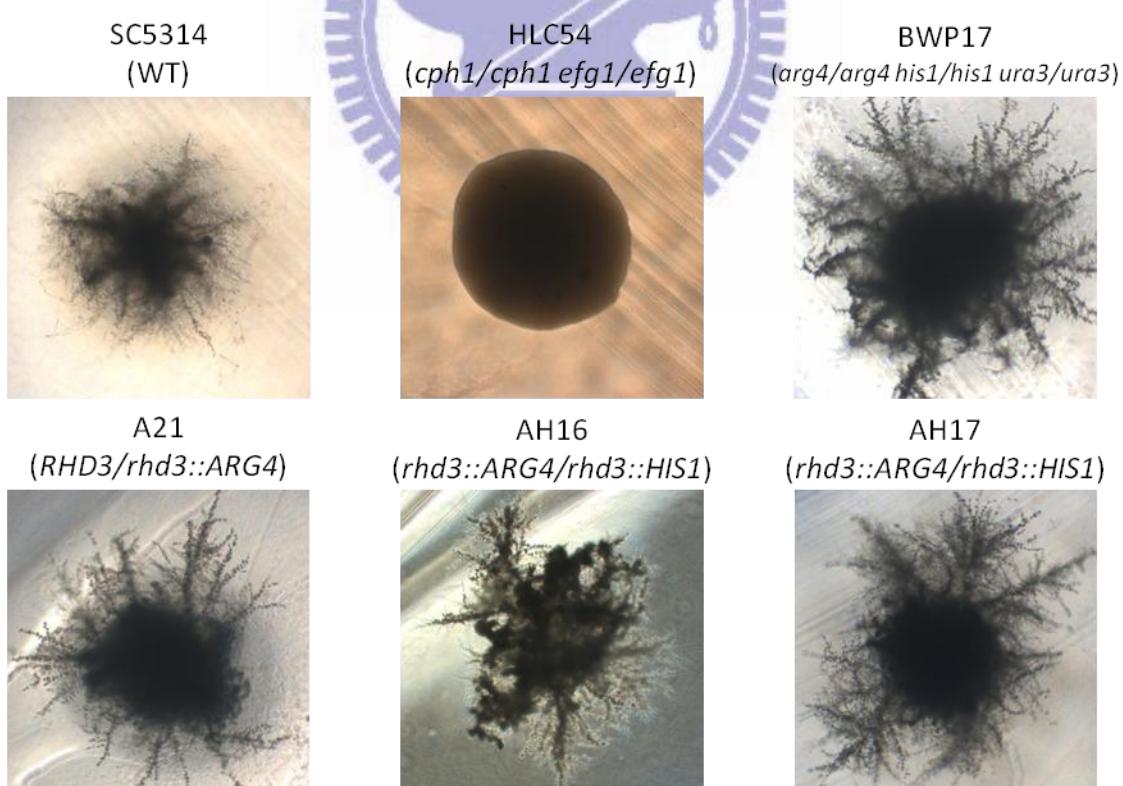


圖五十：以北方點墨法觀察RHD3之表現量。

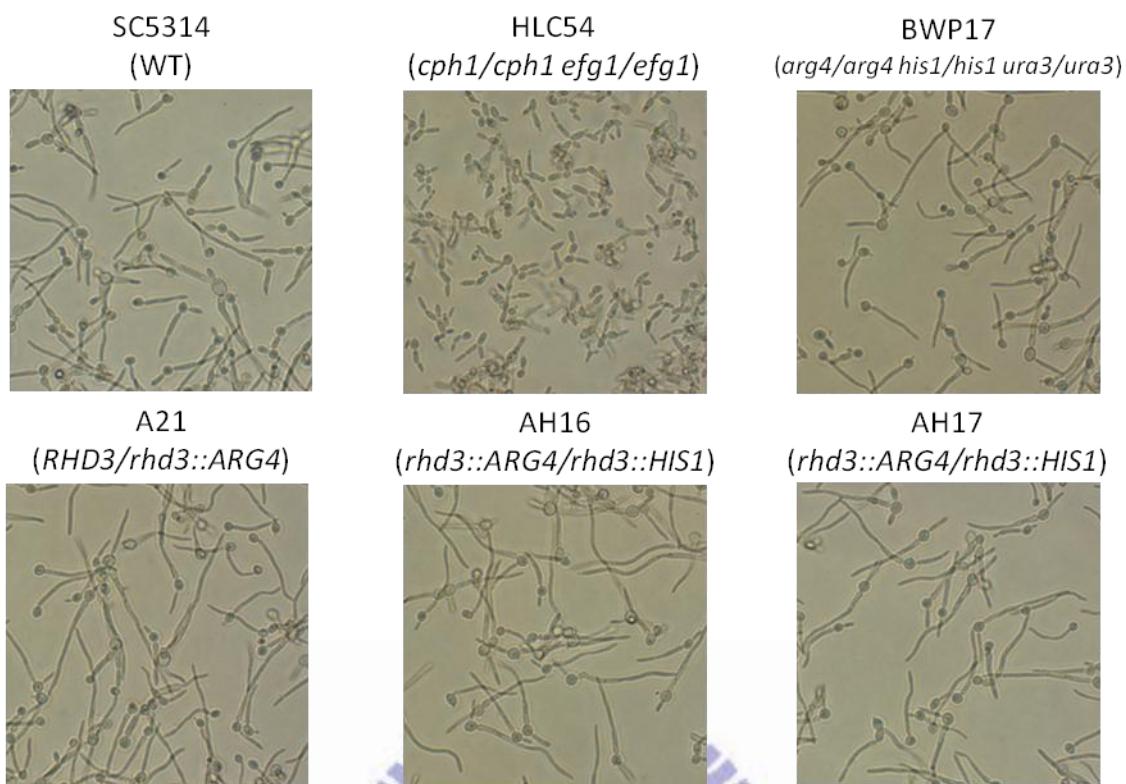
以ACT1為internal control。SC5314 (*RHD3/RHD3*)，78K1 (*RHD3/rhd3::FRT*)，78K2 (*rhd3::FRT/rhd3::FRT*)，78Sova (*rhd3::FRT/rhd3::ACT1p(ACT1: -498~-1)-RHD3*)，78SovB (*rhd3::FRT/rhd3::ACT1p(ACT1: -1022~+703)-RHD3*)，78SovC (*rhd3::FRT/rhd3::ACT1p(ACT1: -1022~-1)-RHD3*)，78SovD (*rhd3::FRT/rhd3::ACT1p(ACT1: -1022~-1)-RHD3*)，78SovE (*rhd3::FRT/rhd3::ACT1p(ACT1: -498~+703)-RHD3*)，HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)。



圖五十一：培養RHD3單套、雙套剔除株在含有4%山羊血清以及uridine之YPD培養基上觀察菌落型態。SC5314、HLC54和BWP17為對照組。

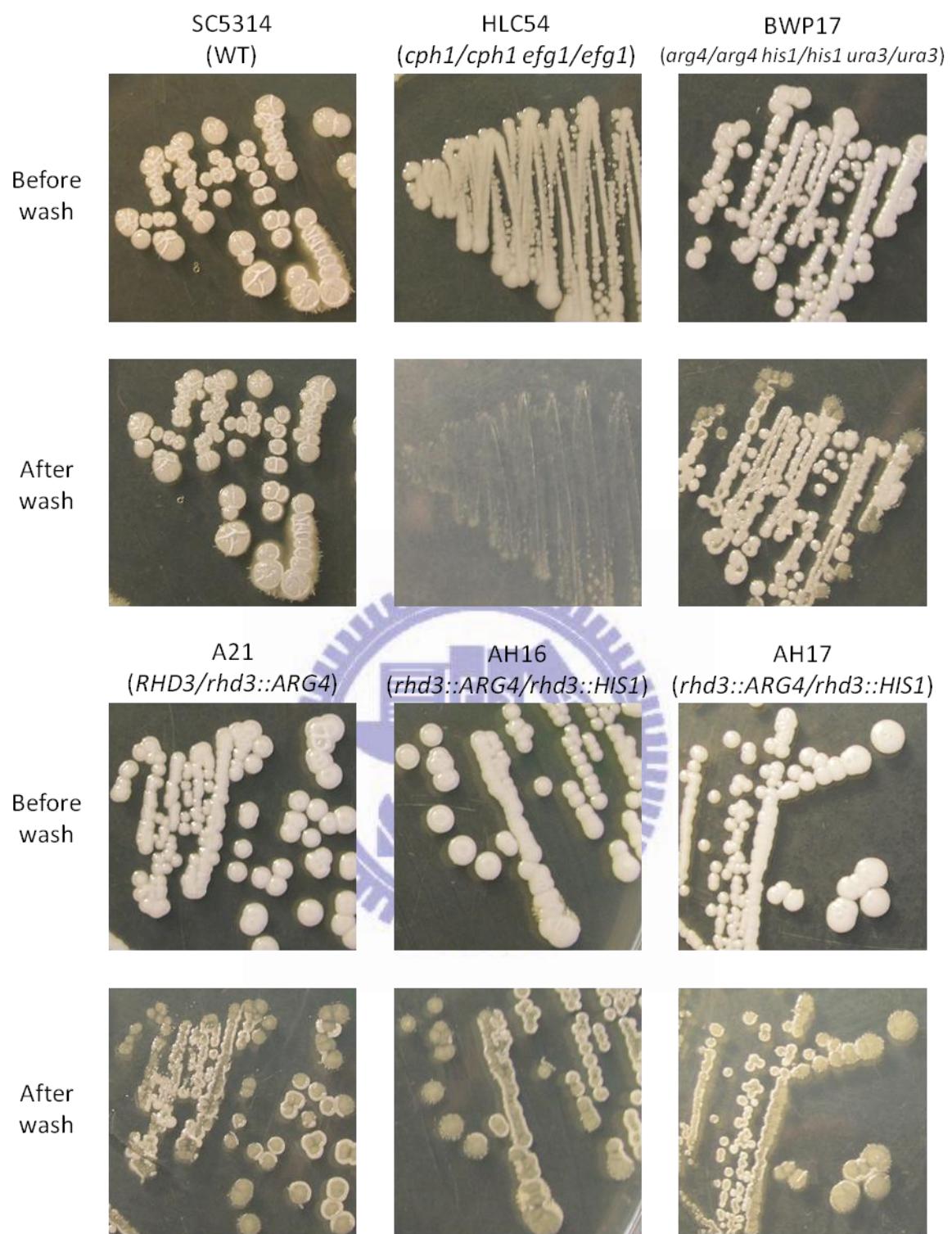


圖五十二：培養RHD3單套、雙套剔除株在2% Bacto agar培養基(含有4%山羊血清、arginine、histidine及uridine)七天，之後以倒立式顯微鏡觀察菌落型態。SC5314、HLC54和BWP17為對照組。

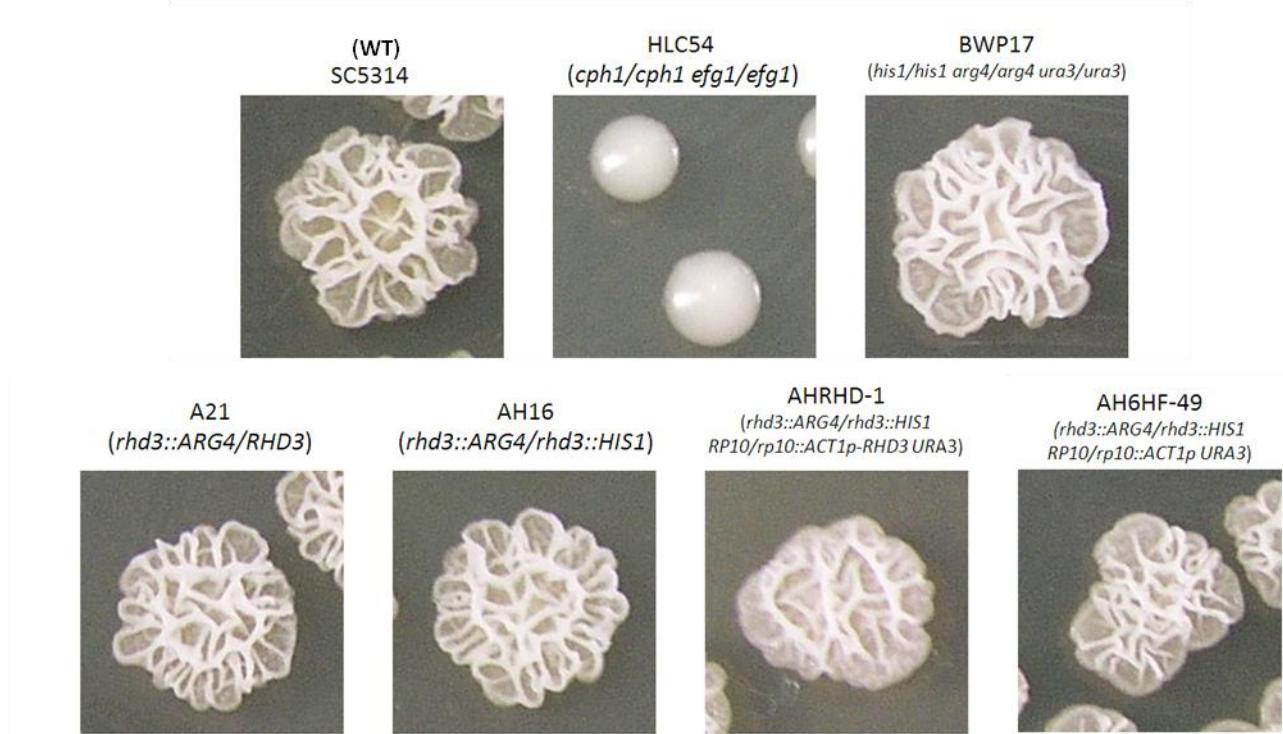


圖五十三：芽管測試。培養*RHD3*單套、雙套剔除株在含有10%山羊血清以及uridine之YPD培養液中三小時，以倒立式顯微鏡觀察。SC5314、HLC54和BWP17為對照組。



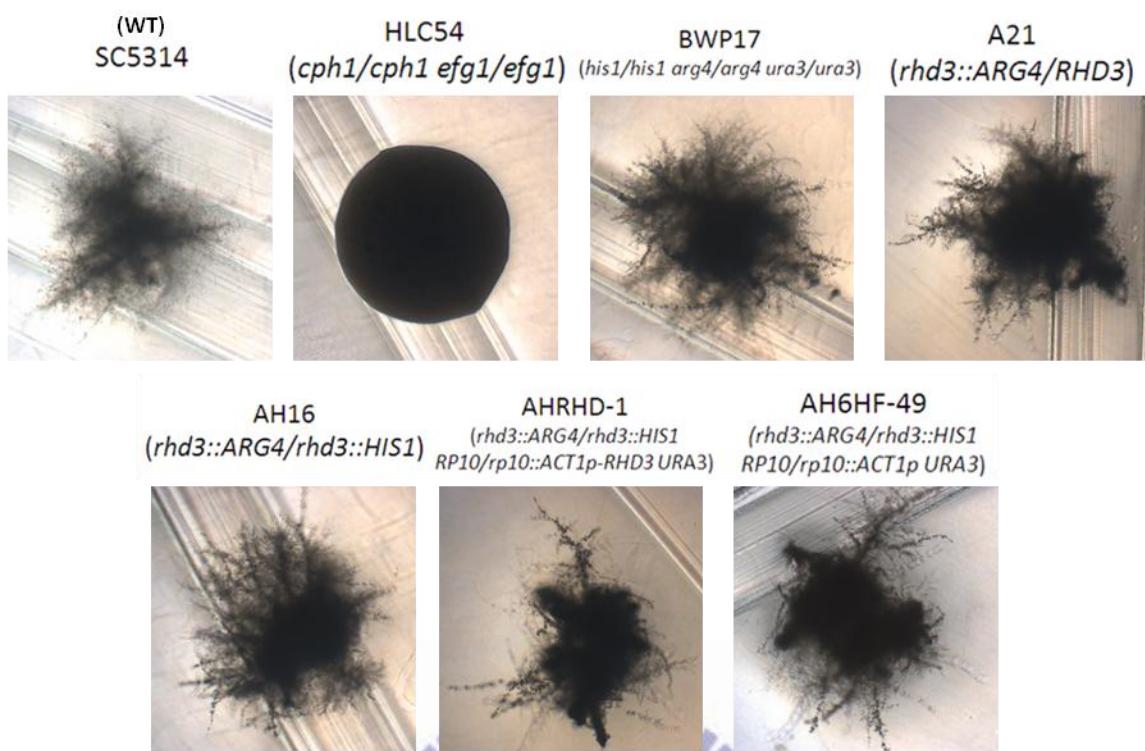


圖五十四：侵犯力測試。培養*RHD3*單套、雙套剔除株在Solid spider培養基(含有arginine、histidine及uridine)七天，之後以流水沖洗菌落，觀察菌落之附著程度。SC5314、HLC54和BWP17為對照組。

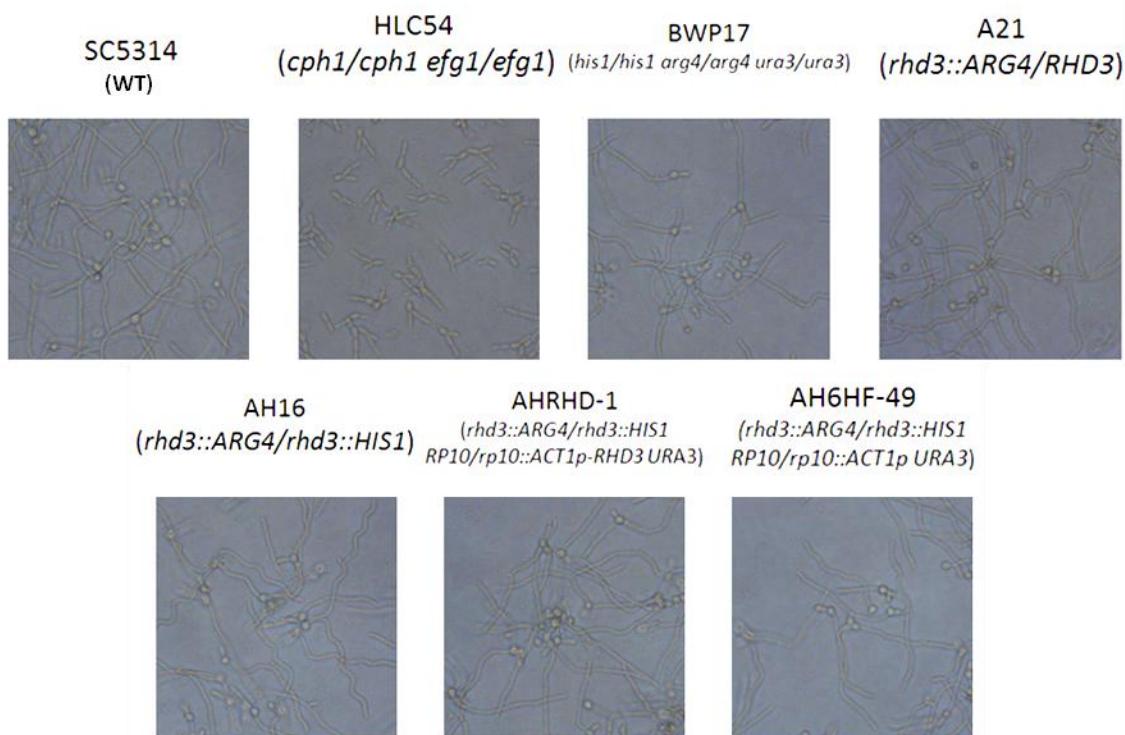


圖五十五：培養RHD3單套、雙套剔除株以及ACT1 promoter表現株在含有4%山羊血清以及uridine之YPD培養基上觀察菌落型態。SC5314、HLC54和BWP17為對照組。

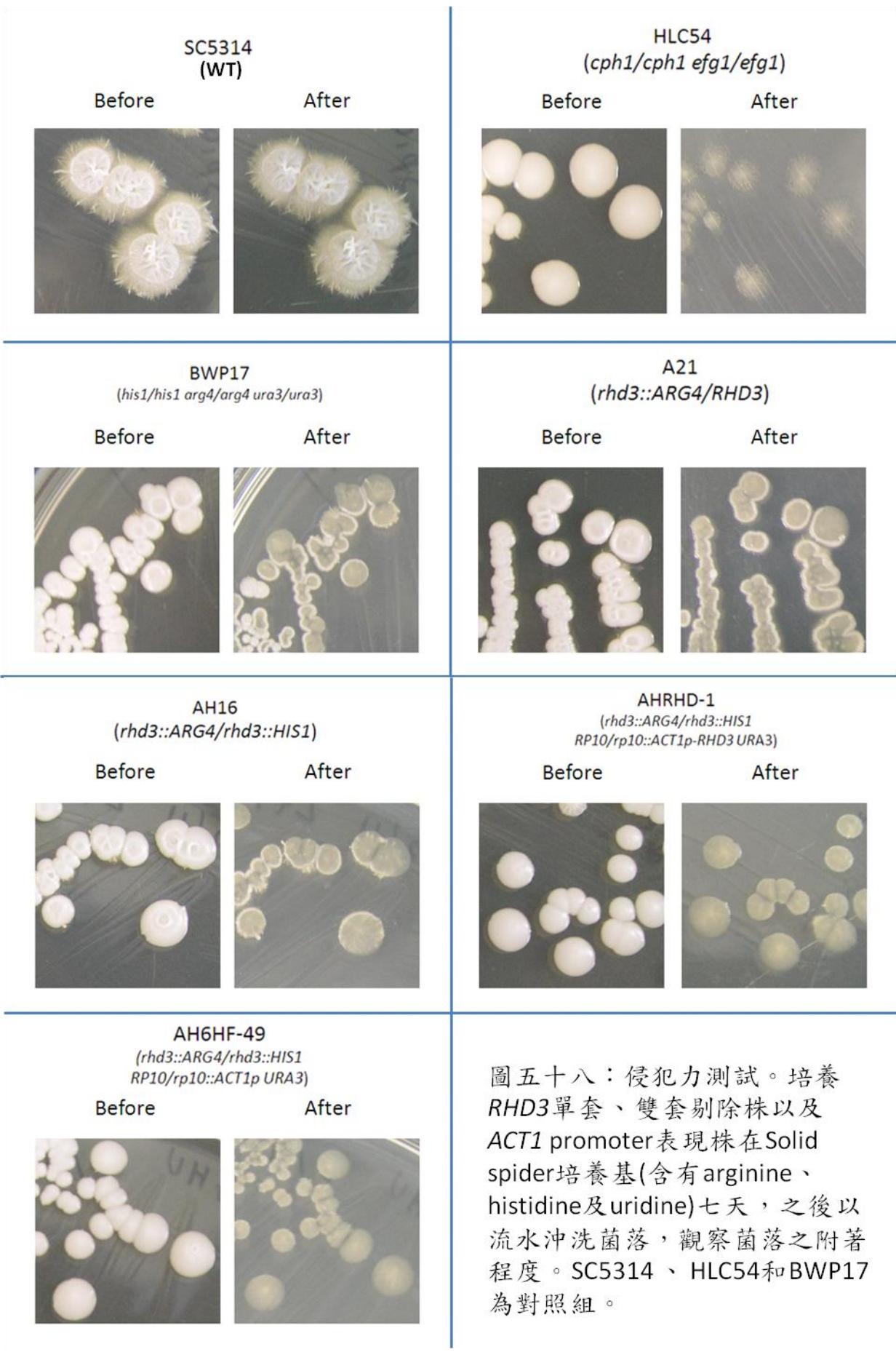


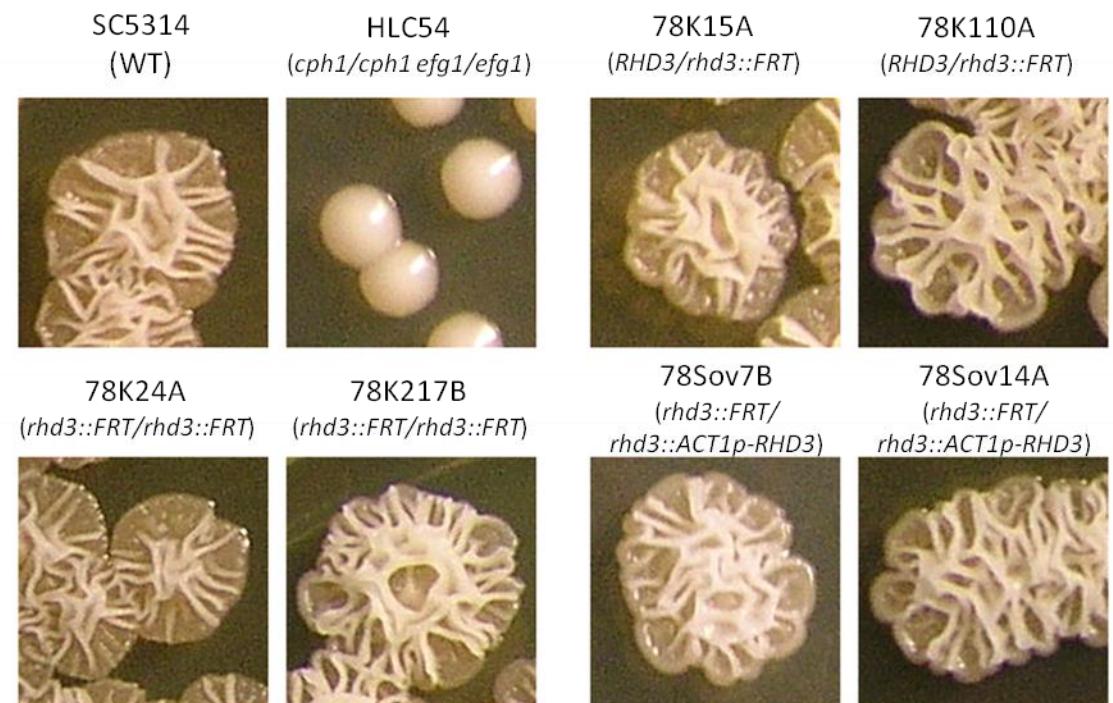


圖五十六：培養RHD3單套、雙套剔除株以及ACT1 promoter表現株在2% Bacto agar培養基(含有4%山羊血清、arginine、histidine及uridine)七天，之後以倒立式顯微鏡觀察菌落型態。SC5314、HLC54和BWP17為對照組。

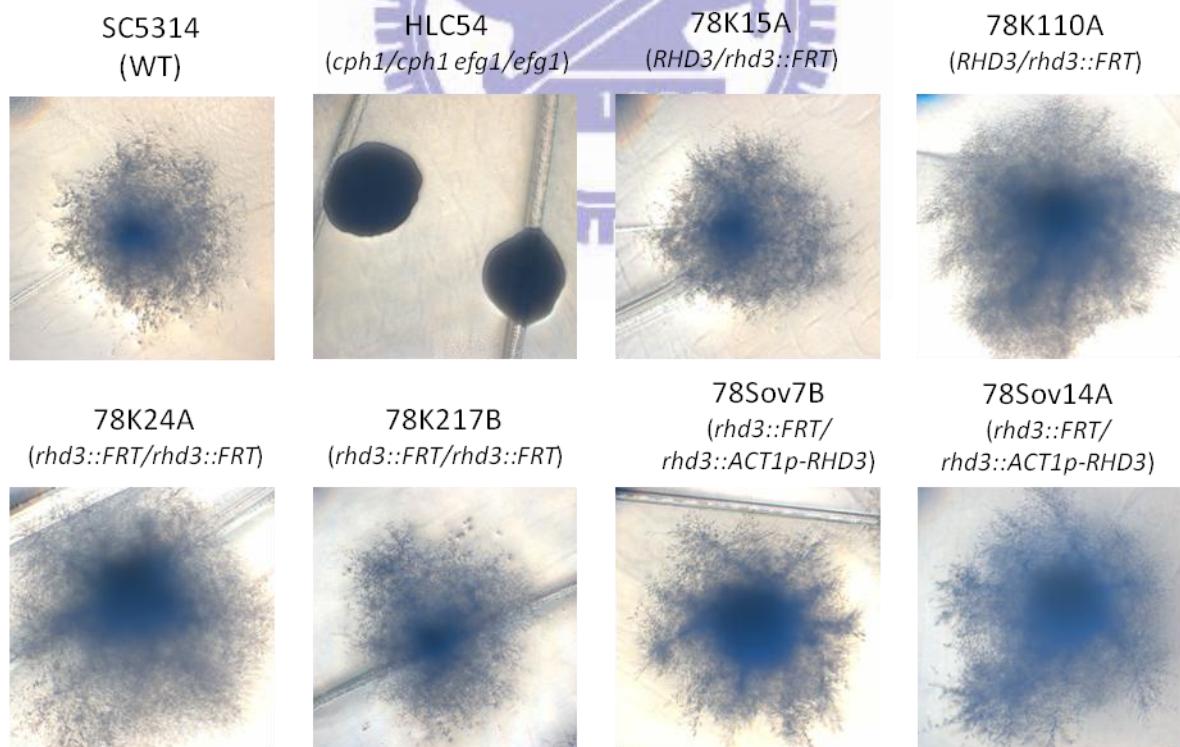


圖五十七：芽管測試。培養RHD3單套、雙套剔除株以及ACT1 promoter表現株在含有10%山羊血清以及uridine之YPD培養液中三小時，以倒立式顯微鏡觀察。SC5314、HLC54和BWP17為對照組。

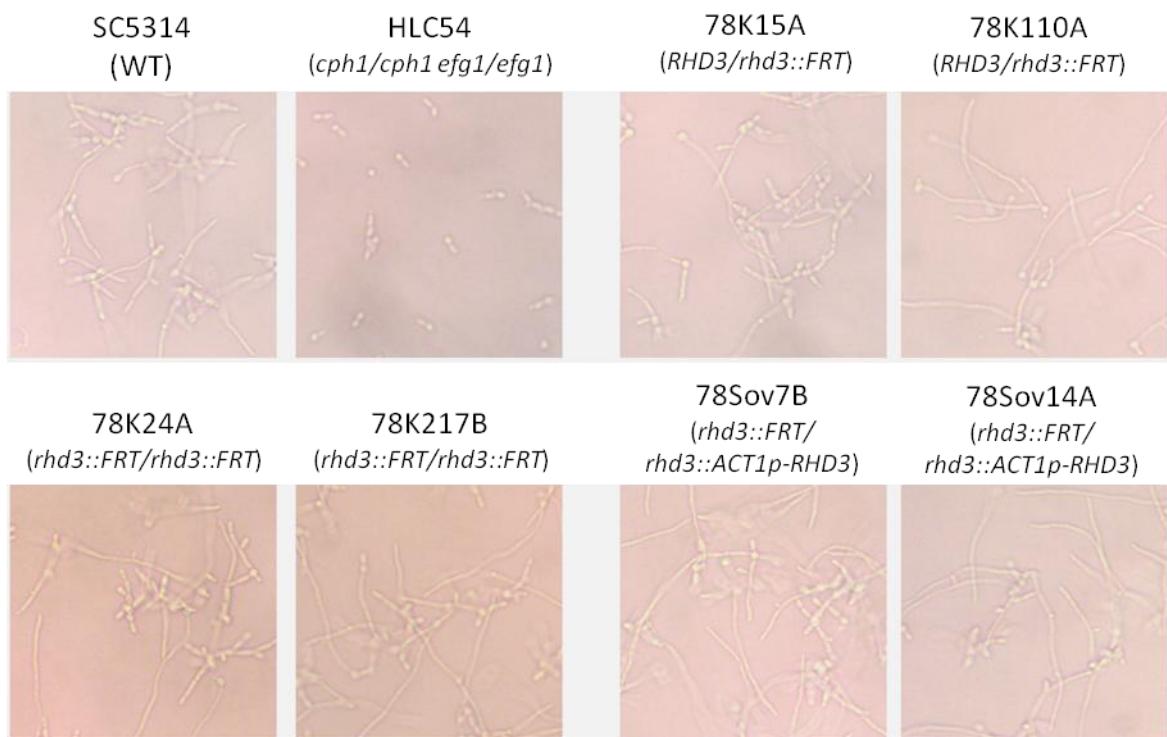




圖五十九：培養*RHD3*單套、雙套剔除株以及*ACT1* promoter表現株在含有4%山羊血清之YPD培養基上觀察菌落型態。SC5314和HLC54為對照組。

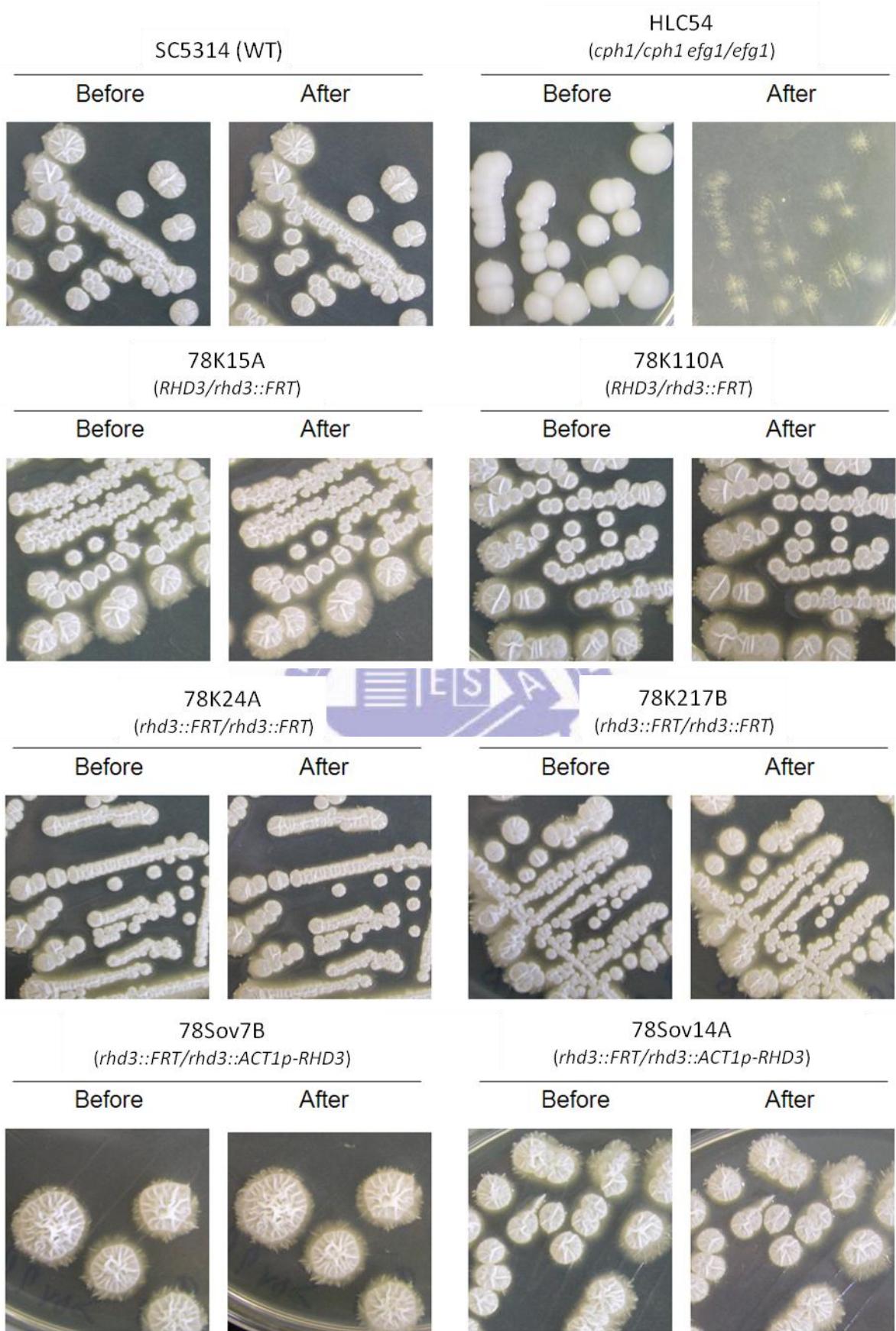


圖六十：培養*RHD3*單套、雙套剔除株以及*ACT1* promoter表現株在2% Bacto agar培養基(含有4%山羊血清)七天，之後以倒立式顯微鏡觀察菌落型態。SC5314和HLC54為對照組。

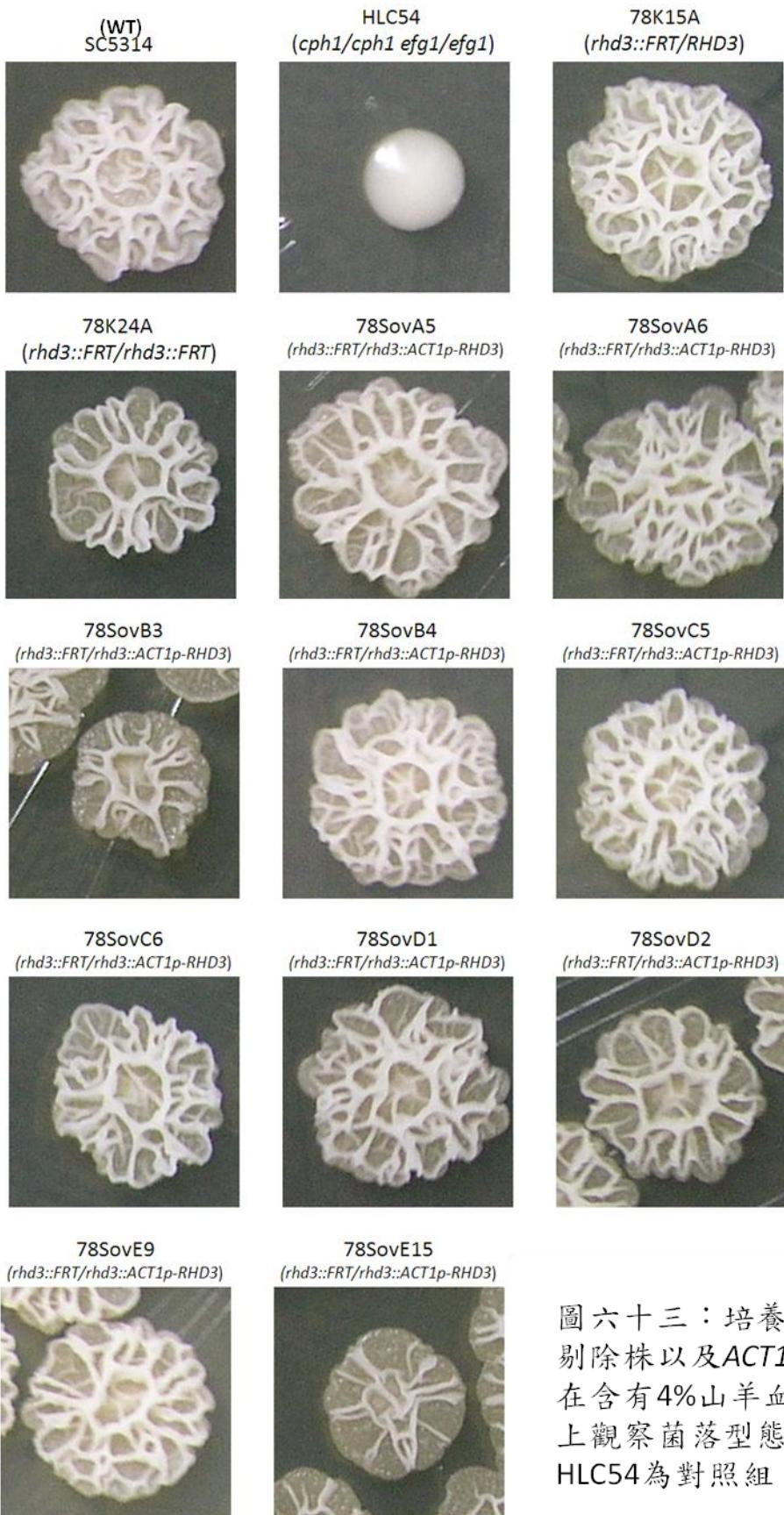


圖六十一：芽管測試。培養 *RHD3* 單套、雙套剔除株以及 *ACT1* promoter 表現株在含有 10% 山羊血清之YPD 培養液中三小時，以倒立式顯微鏡觀察。SC5314 和 HLC54 為對照組。

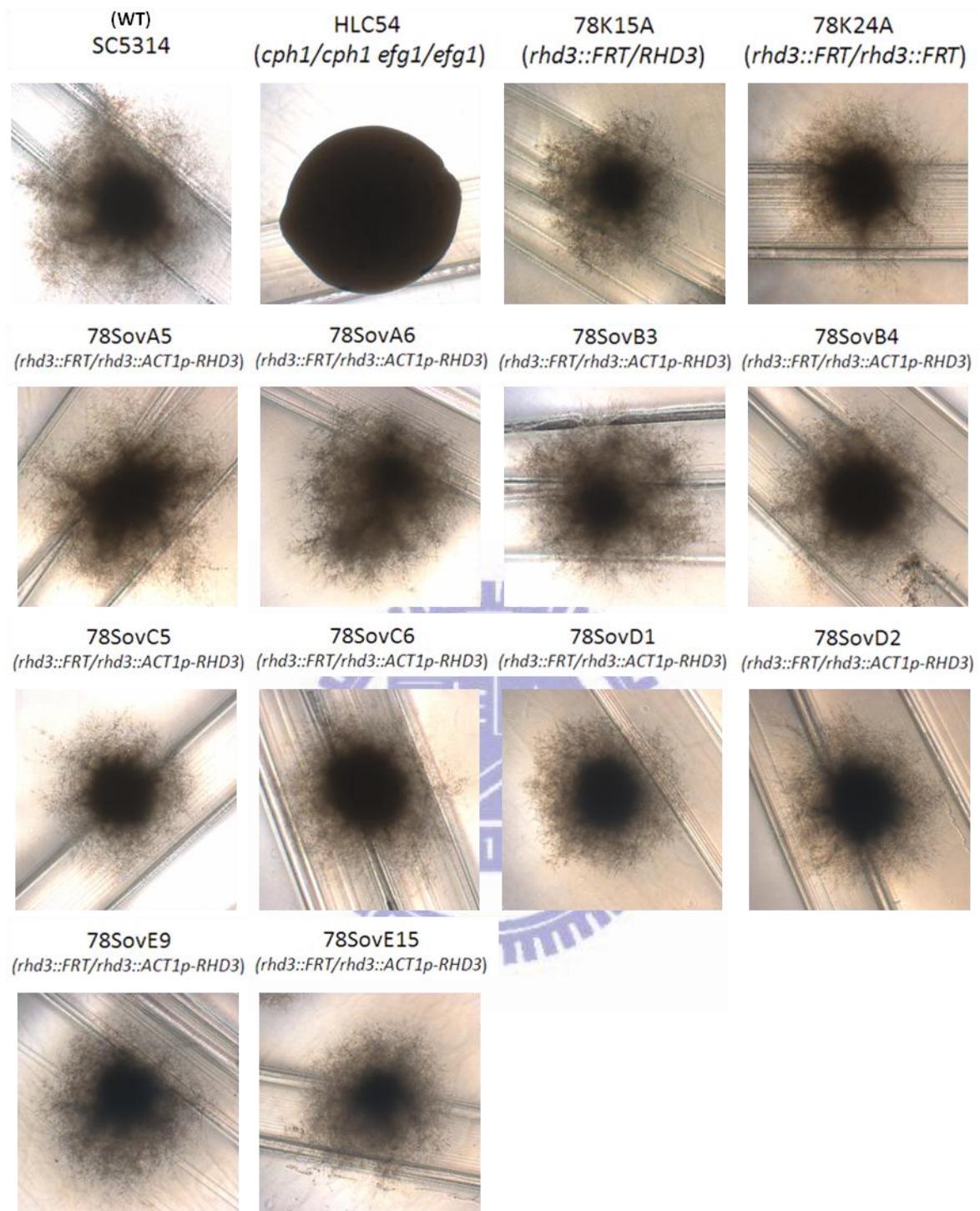




圖六十二：侵犯力測試。培養RHD3單套、雙套剔除株以及ACT1 promoter表現株在Solid spider培養基七天，之後以流水沖洗菌落，觀察菌落之附著程度。SC5314和HLC54為對照組。



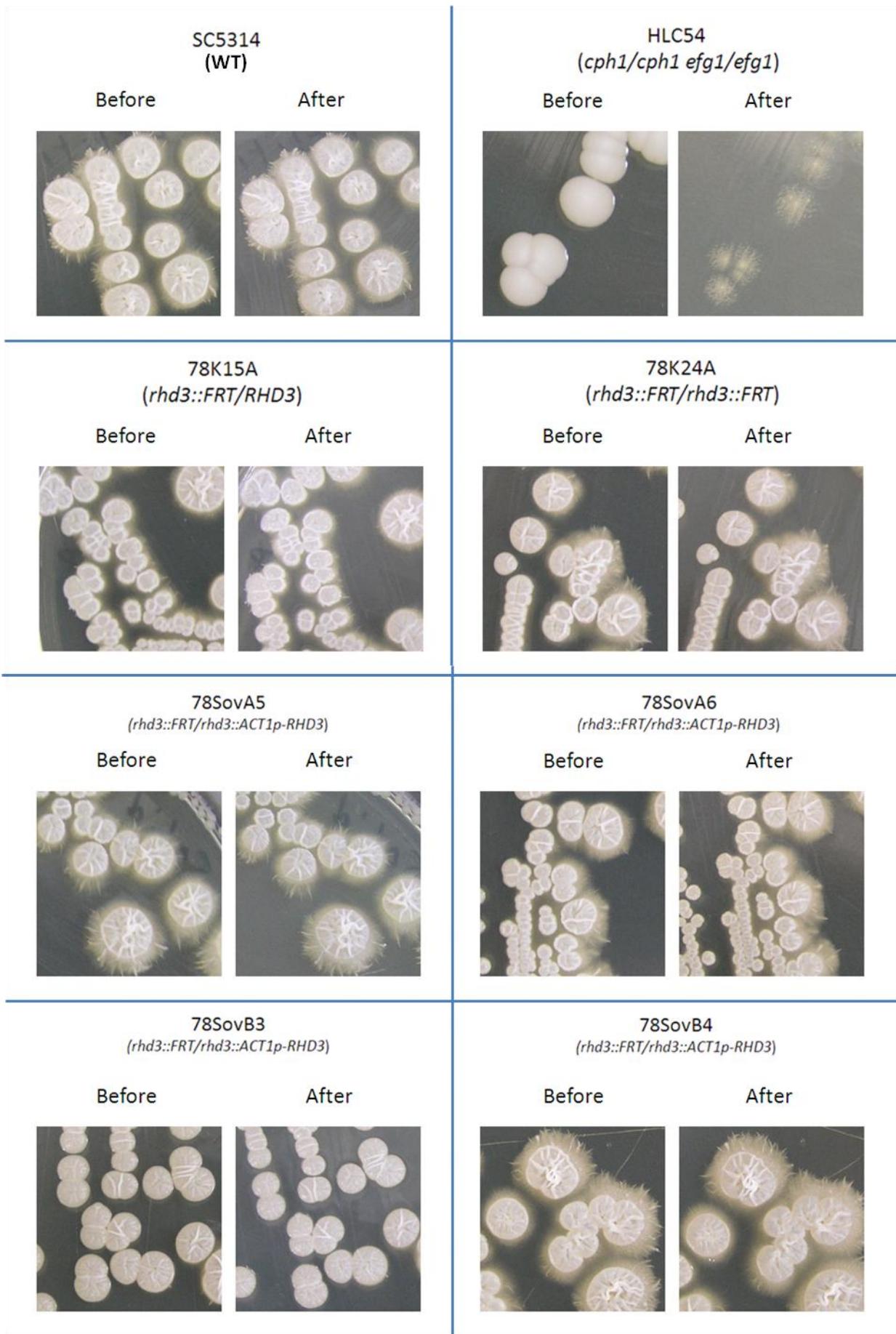
圖六十三：培養RHD3單套、雙套剔除株以及ACT1 promoter表現株在含有4%山羊血清之YPD培養基上觀察菌落型態。SC5314和HLC54為對照組。

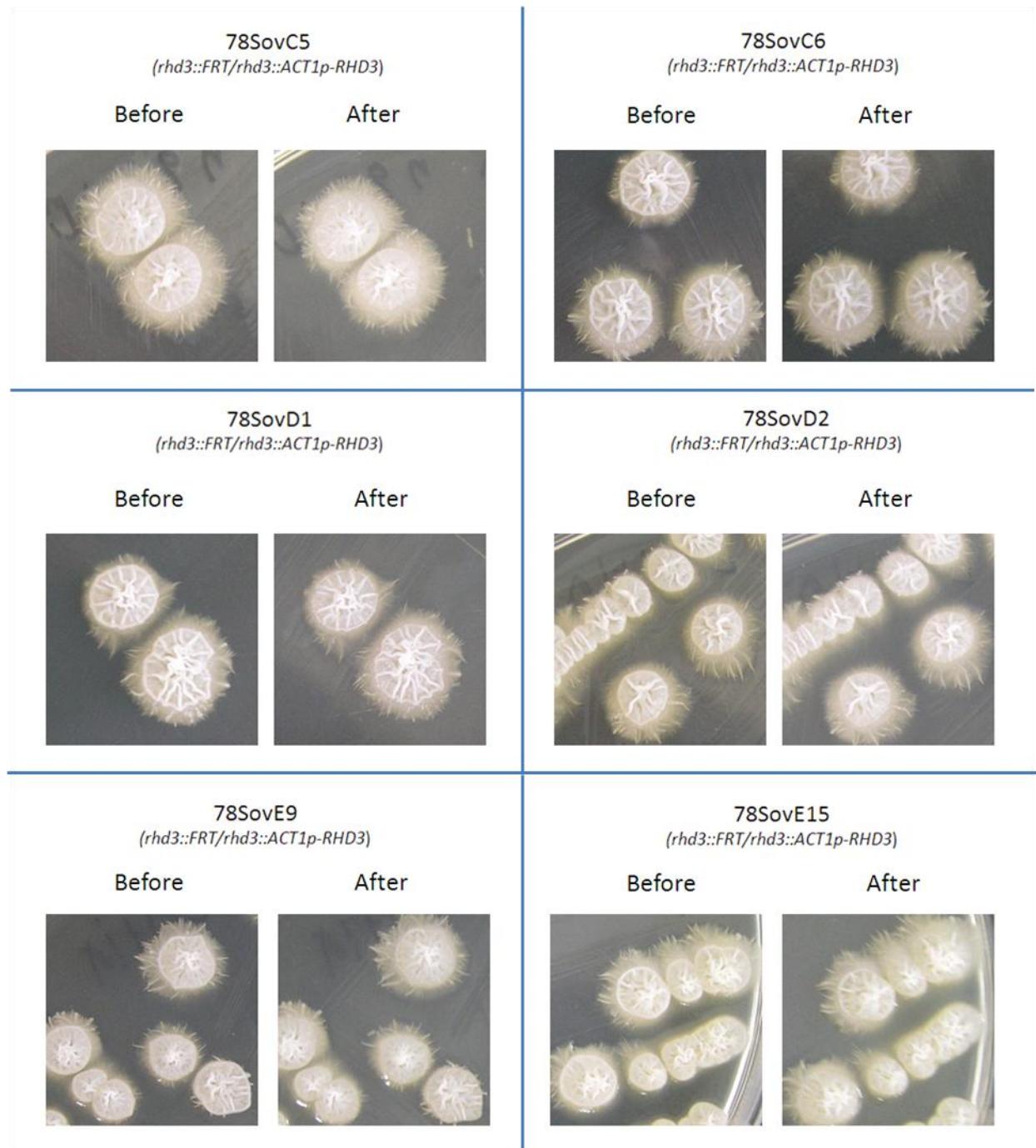


圖六十四：培養RHD3單套、雙套剔除株以及ACT1 promoter表現株在2% Bacto agar培養基(含有4%山羊血清)七天，之後以倒立式顯微鏡觀察菌落型態。SC5314和HLC54為對照組。



圖六十五：芽管測試。培養 *RHD3* 單套、雙套剔除株以及 *ACT1* promoter 表現株在含有 10% 山羊血清之 YPD 培養液中三小時，以倒立式顯微鏡觀察。SC5314 和 HLC54 為對照組。





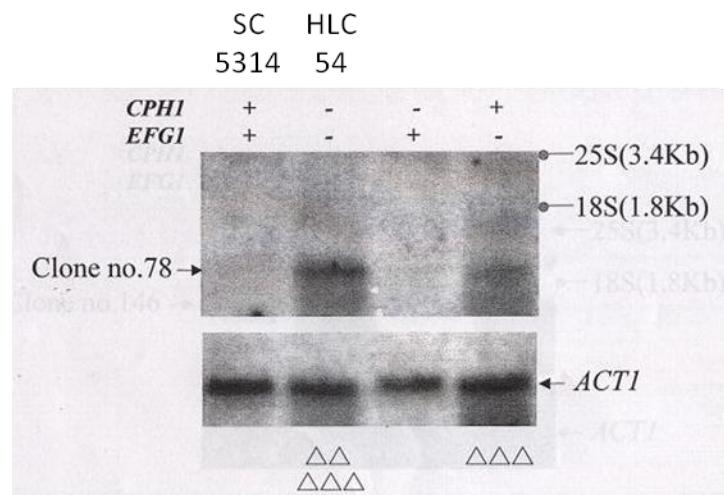
圖六十六：侵犯力測試。培養RHD3單套、雙套剔除株以及ACT1 promoter表現株在Solid spider培養基七天，之後以流水沖洗菌落，觀察菌落之附著程度。SC5314和HLC54為對照組。

>gb|FJ804172.1| Cloning vector pNZ4, complete sequence  
Length=9809

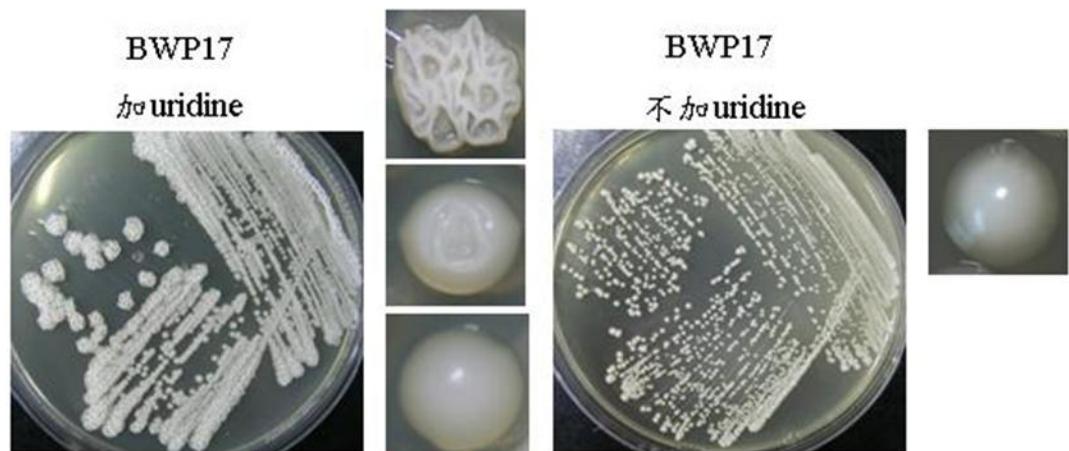
Score = 1026 bits (555), Expect = 0.0  
Identities = 557/558 (99%), Gaps = 0/558 (0%)  
Strand=Plus/Plus

Query	Subject	Sequence	Length
1	1513	TGGACTTCTCGCCAGAGGTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCTACCT 	60
61	1573	TGCCAGAAATTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACTGTTGACA 	120
121	1633	CTTCTAAATAAGCGAATTCTTATGATTATGATTTTATTATTAAATAAGTTATAaaaaa 	180
181	1693	aaaTAAGTGTATACAAATTAAAAGTGACTCTTAGGTTAAAACGAAAATTCTTATTCT 	240
241	1753	TGAGTAACTCTTCCTGTAGGTCAAGGTTGCTTCAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTA 	300
301	1813	TTGACCACACCTCTACCGGCATGCGAGCTCCTAATTTTGGTACACTCTATCATTGATA 	360
361	1873	GAGTTATTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGGATCCAATTGTACTTATAT 	420
421	1933	ATAGTTGAAACAACAGGGAAAGGGCAGGATGAAGAAAGAAATTGACTGCAGTTCCATG 	480
481	1993	ATCATATTCATTTGTAAATTACAATATAATATAACACTTATAAACGGTTAAAAAA 	540
541	2053	CAGCTTATCTCAGAAAAA 558 	2052
		CAGCTTATCTCAGAAAAA 2070 	

圖六十七：*TR promoter*在NCBI資料庫中的比對結果。第一行為實驗室*TR promoter*的定序結果，第二行為比對結果，pNZ4的序列。



附圖一：Clone no.78在SC5314和HLC54中的表現量。(林啟陽, 2001)



附圖二：Uridine對BWP17的影響。(蔡馨儀, 2009)

SOURCE Cloning vector pNZ4  
 ORGANISM Cloning vector pNZ4  
 other sequences; artificial sequences; vectors.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 9809)  
 AUTHORS Zhang,N., Magee,B.B., Magee,P.T., Cannon,R. and Schmid,J.  
 TITLE A method for mating clinical *Candida albicans* isolates  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 9809)  
 AUTHORS Zhang,N., Magee,B.B., Magee,P.T., Cannon,R. and Schmid,J.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-MAR-2009) IMBS, Massey University, Riddet Road,  
 Palmerston North 4410, New Zealand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..9809  
 /organism="Cloning vector pNZ4"  
 /mol\_type="other DNA"  
 /db\_xref="taxon:[691219](#)"  
misc feature join(7573..9809,1..668)  
 /note="plasmid backbone pBSKS (+)"  
repeat region 683..1491  
 /note="from *Candida albicans* chromosome 7"  
 /mobile\_element="insertion sequence:TS1"  
promoter 1511..2082  
 /note="PTR from plasmid p99RLU"  
misc feature 2083..4189  
 /note="IMH3r ORF plus terminator from plasmid p3408"  
CDS join(2083..2533,2781..3895)  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=[11](#)  
 /product="IMH3r"

附圖三：質體pNZ4的檔案。



