

國立交通大學

分子醫學與生物工程研究所

碩士論文

探討剔除白色念珠菌 *ORF19.6586* 及 *RHD3* 之  
型態變化及藥物敏感性之影響

Studying the effect of null mutations on *ORF19.6586* and *RHD3*  
on morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*

研究生：劉佩柔

指導教授：楊昀良博士

中華民國一〇一年十月

探討剔除白色念珠菌 *ORF19.6586* 及 *RHD3* 之型態變化及  
藥物敏感性之影響

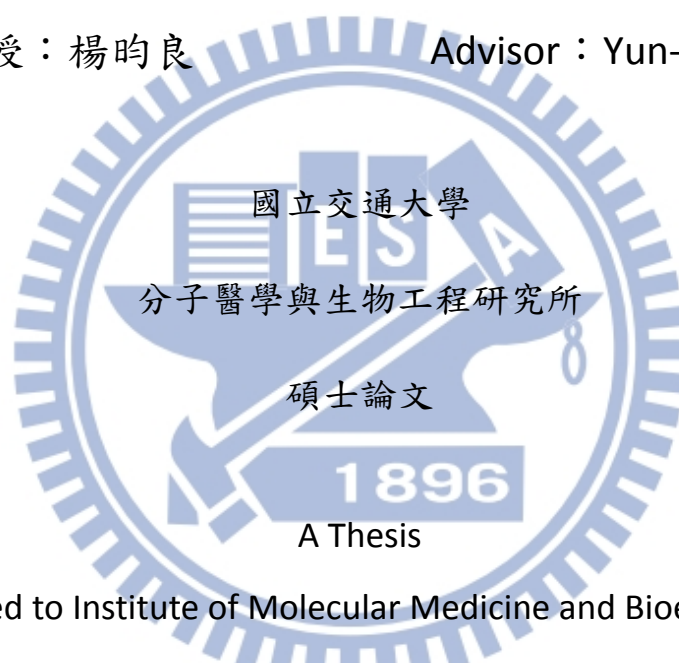
Studying the effect of null mutations on *ORF19.6586* and *RHD3*  
on morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*

研究生：劉佩柔

Student : Pei-Jou Liu

指導教授：楊昀良

Advisor : Yun-Liang Yang



Submitted to Institute of Molecular Medicine and Bioengineering  
National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

In

Molecular Medicine and Bioengineering

September 2012

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一〇一年十月

## 摘要

白色念珠菌為一種存在於人體中共生的伺機性病原菌。目前研究已知白色念珠菌的型態轉變的能力和致病力是有相關性，而在實驗室前人利用基因表現比對 (gene profiling) 篩選出受 transcription factor Cph1p 及 Efg1p 調控之下游基因 *CaORF19.6586* 及 *CaRHD3*，利用 *SAT1* flipper cassette 進行同源重組方式置換目標基因，並將單套基因重新置入雙套基因剔除株進行基因補救，接著跟前人構築之 *GRE2*、*ORF19.173*、*ORF19.7310* 的突變株一起分析其形態及藥物的感受性。結果顯示雖然各基因突變株在型態變化上與其 parental strain 沒有差異，但在藥物感受性與其 parental strain 相比皆是呈現較為不敏感的表现，因此這些基因的活性與藥物感受性相關。



## Abstract

The opportunistic fungus *Candida albicans* is commensal in human. The ability of *Candida albicans* to switch between yeast and hyphal forms is implicated in its pathogenicity. Previous study shows that *CaORF19.6586* and *CaRHD3*, selected by gene profiling are regulated by transcription factors Cph1p and Efg1p.

First, I used *SAT1* flipper cassette system to construct homologous recombination to displace target genes *CaORF19.6586* and *CaRHD3*, and then reinserted a single wild-type allele into the homozygous knock-out strain to construct rescued strains. Together with the constructed strains for *CaGRE2*, *CaORF19.173* and *CaORF19.7310*, I then analyzed the mutation effects on morphogenesis and drug susceptibilities. The results indicated that there were no difference on morphogenesis but the knockout mutants were less susceptible to drugs. So the activity of these genes is related to drug susceptibility.

## 致謝

首先感謝我的指導教授小楊老師，使我學習到符合邏輯性的判讀結果，並且清楚表達出來，同時自己也可以達到了解實驗目的為何，使我受益良多。感謝國衛院羅老師的細心教導，使我明白對於實驗操作上必須十分細心，才能妥善利用資源完成實驗。感謝口試委員：藍忠昱老師、林苕吟老師所提供的意見，引導我思考對於實驗結果判斷有更多的可能性以及方向，並且指正我有所缺失的部分，使得我的論文更臻完美。感謝國衛院助理德彬、思璇、志兆、琬立、盈之在我到國衛院六個多月的時間裡的照顧以及實驗上的幫助，真的很高興認識你們！感謝實驗室的大家，超帥的酷哥其實人很好，小倩有條理的安排實驗是我學習的對象，阿大好大隻蹦蹦跳跳的一起玩耍好開心，洪優永遠是小楊家的一姊無可取代，有甚麼不懂的問幸璇就對了，長得很像教授的重哥總是默默地去除霜，常常幫大家訂飲料的凱薩解夏天的渴，心思細膩的阿賢想太多小心你的頭，小善姊姊美食通是飛遜的指標，常常幫我很多的小氣其實很大方，實驗室的電腦救星~春榮，以及學弟妹們好好將 *Candida* 組好好發揚光大唷！還有大學部的女籃成員們，謝謝你們讓我有運動沒有變胖還一起出征比賽，讓我的碩士生活多采多姿！還有嘉大的學長姐、同學、學弟妹們給我的加油打氣，以及朱老師點醒我的每一盞明燈，我都珍惜著。最後感謝在天上來不及親眼看著我畢業的爺爺，感謝您的保佑讓我的實驗順利完成，以及我的家人總是默默地支持我，我愛你們！

# 目錄

一、緒論	1
1.1 白色念珠菌	1
1.2 型態轉變、致病機制與抗藥性之關聯	1
1.3 常用臨床真菌藥物種類及抗藥機制	4
1.4 篩選標記之介紹	5
1.5 本論文之研究目的	6
1.5.1 <i>CaORF19.6586</i> 基因之相關探討	6
1.5.2 <i>CaORF19.5305 (RHD3)</i> 基因之相關探討	7
1.5.3 <i>CaORF19.3150 (GRE2)</i> 基因之相關探討	8
1.5.4 <i>CaORF19.173</i> 基因之相關探討	8
1.5.5 <i>CaORF19.7310</i> 基因之相關探討	9
二、材料與儀器	10
2.1 菌株	10
2.2 質體	11
2.3 引子	11
2.4 化學藥品	14
2.5 緩衝溶液與試劑	16
2.6 酵素	18
2.7 培養基配置	18
2.8 儀器設備	19
三、方法與步驟	22
3.1 質體 DNA (plasmid DNA) 的萃取	22
3.2 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction)	22

3.2.1 一般 PCR 反應 .....	22
3.2.2 Rescued <i>CaORF19.6586</i> 及 <i>CaRHD3</i> PCR 反應 .....	23
3.3 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的製備 .....	23
3.4 大腸桿菌勝任細胞的轉型 (Transformation) .....	24
3.5 限制酶反應 (Enzyme digestion) .....	24
3.5.1 確定質體 DNA 片段大小之限制酶反應 .....	24
3.5.2 為 clone 所需之限制酶反應 .....	24
3.6 接合反應 (Ligation) .....	25
3.7 洋菜膠內之 DNA 萃取 (gel extraction).....	25
3.7.1 結晶紫洋菜膠之製備 .....	25
3.7.2 洋菜膠內之 DNA 片段萃取.....	25
3.8 白色念珠菌的轉型反應 (Transformation) .....	26
3.9 Maltose 誘發 <i>SAT1</i> flipper cassette 之剔除 (pop-out).....	27
3.10 複製平皿培養法 (Replica plating) .....	27
3.11 建構白色念珠菌單套基因剔除株 (Heterozygote) 及雙套基因剔 除株 (Homozygote).....	27
3.12 建構白色念珠菌單套基因回復株 (Rescued strain).....	28
3.13 白色念珠菌染色體 DNA 之萃取.....	28
3.14 南方點墨法 .....	29
3.14.1 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling) .....	29
3.14.2 轉漬 DNA (Transfer).....	30
3.14.3 雜交反應 (Hybridization).....	31
3.14.4 免疫偵測 (Detection).....	31
3.15 突變株之性狀分析 (Characterization) .....	32

3.15.1 生長曲線之測定 (Growth curve).....	32
3.15.2 芽管試驗 (Germ tube assay).....	33
3.15.3 誘發菌絲生長觀察型態變化 (Colony morphology).....	33
3.15.4 侵犯力測試 (Invasion assay).....	33
3.16 CLSI Broth Microdilution Method.....	33
3.16.1 藥盤配置 .....	33
3.16.2 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 偵測個突變珠相 較於 Parental strain 之藥物敏感性的變化 .....	34
四、結果.....	37
4.1 建構 <i>CaORF19.6586</i> 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復 株.....	37
4.1.1 建構含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaORF19.6586</i> 上 下游同源區域之質體.....	37
4.1.2 質體 p <i>SAT1-ORF19.6586-AB</i> 序列分析.....	37
4.1.3 建構 <i>CaORF19.6586</i> 單套、雙套基因剔除株.....	38
4.1.4 建構含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaORF19.6586</i> Open Reading Frame (ORF) 之質體 .....	39
4.1.5 質體 p <i>SAT1-ORF19.6586Res</i> 序列分析.....	40
4.1.6 建構 <i>CaORF19.6586</i> 單套基因回復株.....	40
4.1.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaORF19.6586</i> 各突變株 .....	41
4.2 建構 <i>CaRHD3</i> 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株 .....	42
4.2.1 建構含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaRHD3</i> 上下游 同源區域之質體.....	42



4.2.2 質體 pASATB 序列分析 .....	43
4.2.3 建構 <i>CaRHD3</i> 單套、雙套基因剔除株 .....	43
4.2.4 建構含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaRHD3</i> Open Reading Frame (ORF) 之質體 .....	44
4.2.5 質體 pRHD3r 序列分析 .....	45
4.2.6 建構 <i>CaRHD3</i> 單套基因回復株 .....	45
4.2.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaRHD3</i> 各突變株 .....	46
4.3 確認前人已建構之單套、雙套基因剔除株及單套基因回復株 ..	47
4.3.1 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaGRE2</i> 各突變株 .....	47
4.3.2 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaORF19.173</i> 各突變株 ..	48
4.3.3 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaORF19.7310</i> 各突變株 .....	49
4.4 白色念珠菌 <i>CaORF19.6586</i> 和 <i>CaRHD3</i> 各突變株之性狀分析 ..	50
4.4.1 於 YPD 培養液中觀測生長曲線之結果 .....	50
4.4.2 芽管試驗 (Germ tube assay) .....	51
4.4.3 誘發菌絲生長觀察型態變化 - 含 4 % FBS 之 YPD 培養基之性狀分析 .....	52
4.4.4 誘發菌絲生長觀察型態變化 - 含 4 % FBS 之 Bacto agar 培養基之性狀分析 .....	52
4.4.5 侵犯力測試 (Invasion assay) .....	52
4.4.6 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibilities test) .....	53
五、討論 .....	56
5.1 剔除 <i>CaORF19.6586</i> 的探討 .....	57

5.1.1	生長情形之探討.....	57
5.1.2	芽管試驗之探討.....	57
5.1.3	含 4 % FBS 之 YPD 培養基菌落型態之探討.....	58
5.1.4	含 4 % FBS 之 Bacto agar 培養基菌落型態之探討 .....	58
5.1.5	侵犯力測試之探討.....	58
5.1.6	利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibilities test) 的探討.....	58
5.2	剔除 <i>CaRHD3</i> 的探討 .....	59
5.2.1	生長情形之探討.....	59
5.2.2	芽管試驗之探討.....	59
5.2.3	含 4 % FBS 之 YPD 培養基菌落型態之探討.....	60
5.2.4	含 4 % FBS 之 Bacto agar 培養基菌落型態之探討 .....	60
5.2.5	侵犯力測試之探討.....	60
5.2.6	利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibilities test) 的探討.....	61
5.3	<i>CaGRE2</i> 的探討.....	61
5.3.1	以南方墨點法檢驗 <i>CaGRE2</i> 各突變株之建構.....	61
5.3.2	利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibilities test) 的探討.....	61
5.4	<i>CaORF19.173</i> 的探討.....	62
5.4.1	以南方墨點法檢驗 <i>CaORF19.173</i> 各突變株之建構 .....	62
5.4.2	利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibilities test) 的探討.....	62
5.5	<i>CaORF19.7310</i> 的探討.....	62

5.5.1 以南方墨點法檢驗 <i>CaORF19.7310</i> 各突變株之建構 .....	62
5.5.2 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibilities test) 的探討.....	63
5.6 結語.....	63
5.7 未來展望.....	64
六、參考文獻.....	65



## 圖表目錄

圖一：SAT1 flipper cassette 示意圖.....	73
圖二：CaOrf19.6586p 胺基酸與 <i>Candida dubliniensis</i> CD36 XP_002421346 胺基酸在 NCBI 資料庫中的比對結果.....	74
圖三：CaOrf19.6586p 胺基酸與啤酒酵母菌 <i>ScYjr115p</i> 胺基酸在 NCBI 資料庫中的比對結果.....	75
圖四：CaRHD3p 胺基酸與 <i>Candida dubliniensis</i> CD36 未知 Cell wall protein 胺基酸在 NCBI 資料庫中的比對結果.....	76
圖五：CaGRE2p 胺基酸與啤酒酵母菌 <i>ScGre2p/YOL151Wp</i> 胺基酸在 NCBI 資料庫中的比對結果.....	77
圖六：CaORF19.173p 胺基酸與啤酒酵母菌 <i>ScAzf1p</i> 胺基酸在 NCBI 資料庫中的比對結果.....	78
圖七：CaORF19.7310p 胺基酸與啤酒酵母菌 <i>ScMsc1p/YML128C</i> 胺基 酸在 NCBI 資料庫中的比對結果.....	79
圖八：建構白色念珠菌基因剔除株流程示意圖.....	80
圖九：以限制酶確認質體 pSAT1-ORF19.6586-B 和 pSAT1-ORF19.6586AB .....	82
圖十：質體 pSAT1-ORF19.6586AB 序列分析結果.....	84
圖十一：以 PCR 確認 <i>CaORF19.6586</i> 單套及雙套基因剔除株.....	86
圖十二：建構含篩選標記 SAT1 flipper cassette 及 <i>CaORF19.6586</i> Open Reading Frame (ORF) 之質體.....	88
圖十三：質體 pSAT1-ORF19.6586-resB 中 <i>CaORF19.6586</i> 序列分析結 果.....	90
圖十四：以 PCR 確認 <i>CaORF19.6586</i> 單套基因回復株.....	91

圖十五：南方點墨法檢驗 <i>CaORF19.6586</i> 各突變株.....	92
圖十六：南方點墨法二次檢驗 <i>CaORF19.6586</i> 各突變株 .....	93
圖十七：以限制酶 <i>Eco RI</i> 作用於質體 <i>pASATB</i> .....	94
圖十八：質體 <i>pASATB</i> 序列分析結果.....	97
圖十九：以 PCR 確認 <i>CaRHD3</i> 單套及雙套基因剔除株 .....	99
圖二十：建構含篩選標記 <i>SAT1 flipper cassette</i> 及 <i>CaRHD3</i> Open Reading Frame (ORF) 之質體.....	101
圖二十一：質體 <i>pRHD3r</i> 序列分析結果.....	103
圖二十二：以 PCR 確認 <i>CaRHD3</i> 單套基因回復株 .....	104
圖二十三：南方點墨法檢驗 <i>CaRHD3</i> 各突變株 .....	105
圖二十四：南方點墨法二次檢驗 <i>CaRHD3</i> 各突變株.....	106
圖二十五：南方點墨法檢驗 <i>CaGRE2</i> 各突變株.....	107
圖二十六：南方點二次墨法檢驗 <i>CaGRE2</i> 各突變株 .....	108
圖二十七：南方點墨法檢驗 <i>CaORF19.173</i> 各突變株.....	109
圖二十八：南方點墨法二次檢驗 <i>CaORF19.173</i> 各突變株 .....	110
圖二十九：南方點墨法檢驗 <i>CaORF19.7310</i> 各突變株 .....	111
圖三十：南方點墨法二次檢驗 <i>CaORF19.7310</i> 各突變株 .....	112
圖三十一： <i>CaORF19.6586</i> 各突變株在 YPD 培養液於 30°C 靜置培養 24 H 之生長情形 .....	114
圖三十二： <i>CaRHD3</i> 各突變株在 YPD 培養液於 30°C 靜置培養 24 H 之生長情形 .....	116
圖三十三：芽管試驗之結果.....	117
圖三十四：在含有 4% FBS 之 YPD 培養基於 37°C 培養三天之菌落型 態 .....	118

圖三十五：在含有 4 % FBS 之 Bacto agar 培養基於 37°C 培養七天之 菌落型態 .....	119
圖三十六：侵犯力測試之結果 .....	121
圖三十七：<A> 測試 <i>CaORF19.6586</i> 對 Fluconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	122
圖三十七：<B> 測試 <i>CaORF19.6586</i> 對 Amphotericin B 在十種濃度 於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	123
圖三十七：<C> 測試 <i>CaORF19.6586</i> 對 Voriconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	124
圖三十七：<D> 測試 <i>CaORF19.6586</i> 對 Miconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	125
圖三十七：<E> 測試 <i>CaORF19.6586</i> 對 Micafungin 在十種濃度於 35°C 培養 24 H 之結果 .....	126
圖三十八：<A> 測試 <i>CaRHD3</i> 對 Fluconazole 在十種濃度於 35°C 培 養 48 H 之結果 .....	127
圖三十八：<B> 測試 <i>CaRHD3</i> 對 Amphotericin B 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	128
圖三十八：<C> 測試 <i>CaRHD3</i> 對 Voriconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	129
圖三十八：<D> 測試 <i>CaRHD3</i> 對 Miconazole 在十種濃度於 35°C 培 養 48 H 之結果 .....	130
圖三十八：<E> 測試 <i>CaRHD3</i> 對 Micafungin 在十種濃度於 35°C 培 養 24 H 之結果 .....	131
圖三十九：<A> 測試 <i>CaGRE2</i> 對 Fluconazole 在十種濃度於 35°C 培	

養 48 H 之結果 .....	132
圖三十九：<B> 測試 <i>CaGRE2</i> 對 Amphotericin B 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	133
圖三十九：<C> 測試 <i>CaGRE2</i> 對 Voriconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	134
圖三十九：<D> 測試 <i>CaGRE2</i> 對 Miconazole 在十種濃度於 35°C 培 養 48 H 之結果 .....	135
圖三十九：<E> 測試 <i>CaGRE2</i> 對 Micafungin 在十種濃度於 35°C 培 養 24 H 之結果 .....	136
圖四十：<A> 測試 <i>CaORF19.173</i> 對 Fluconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	137
圖四十：<B> 測試 <i>CaORF19.173</i> 對 Amphotericin B 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	138
圖四十：<C> 測試 <i>CaORF19.173</i> 對 Voriconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	139
圖四十：<D> 測試 <i>CaORF19.173</i> 對 Miconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	140
圖四十：<E> 測試 <i>CaORF19.173</i> 對 Micafungin 在十種濃度於 35°C 培養 24 H 之結果 .....	141
圖四十一：<A> 測試 <i>CaORF19.7310</i> 對 Fluconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	142
圖四十一：<B> 測試 <i>CaORF19.7310</i> 對 Amphotericin B 在十種濃度 於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	143
圖四十一：<C> 測試 <i>CaORF19.7310</i> 對 Voriconazole 在十種濃度於	

35°C 培養 48 H 之結果 .....	144
圖四十一：<D> 測試 <i>CaORF19.7310</i> 對 Miconazole 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果 .....	145
圖四十一：<E> 測試 <i>CaORF19.7310</i> 對 Micafungin 在十種濃度於 35°C 培養 24 H 之結果 .....	146





## 附圖目錄

附圖一：抗真菌藥物的作用機制簡圖 .....	147
附圖二：Echinocandin 類藥物作用機制.....	148
附圖三：白色念珠菌麥角固醇合成途徑.....	149
附圖四：細胞倍增時間計算公式 .....	150



## 一、緒論

### 1.1 白色念珠菌 (*Candida albicans*)

白色念珠菌為雙倍體 (diploid) 且伺機性感染之病原真菌，共生於人體口腔、皮膚、消化道及生殖道黏膜。當受藥物作用影響而導致體內微生物菌相改變或人體免疫力低落時，白色念珠菌極有可能伺機侵犯宿主，輕則鵝口瘡、陰道炎或甲溝炎等局部感染；重則使全身器官造成系統性感染 (systemic infection) 威脅生命，尤其是對免疫功能不全的病患，例如 AIDS 患者、癌症治療患者、器官移植患者或長期服用抗生素之患者，所引發的念珠菌血症具有高達 35% 的死亡率 (Wenzel, 1995)。在台灣，目前院內感染的統計，真菌培養後分離出之菌種中白色念珠菌所佔比例至少約一半且可高達 60% (Hsueh, *et al.*, 2002)。然而，目前使用抗真菌的藥物並不多，且因受限於其活性範圍、對宿主造成毒性或副作用等而效用下降 (Groll *et al.*, 1998; Jack, 1998)，以及使用的頻率增加，無形中篩選出具抗藥性的菌株 (Pfaller *et al.*, 2000; Bossche *et al.*, 1994)。因此希望研究白色念珠菌中，與可能造成伺機性感染的致病因子 (virulence factor) 相關的基因，連結抗藥性相關的基因及其功能，以期作為日後研發專一性、低毒性以及低副作用抗真菌藥物標的 (drug target) 之基礎 (Ernst, 2000; Garaizar *et al.*, 2006)。

### 1.2 型態轉變、致病機制與抗藥性之關聯

由於白色念珠菌是共生於人體之常在菌叢，但當宿主免疫系統與病菌發生彼此之間失衡的情況時，病菌必須適應環境而產生相關致病基因的表現，進而使病菌具有感染宿主且造成疾病的能力，這些基因稱為毒力因子 (virulence factor)。文獻指出，當白色念珠菌受到外界

環境刺激時，能夠在酵母菌型態 (yeast form) 和絲狀型態 (filamentous form) 之間轉變，其中絲狀型態包含菌絲型 (hyphae form) 和假菌絲型 (pseudohyphae form)，而這樣的形態轉變已被視為是一個重要的毒力因子 (Braun and Johnson, 1997; Lo *et al.*, 1997)。已知誘發型態轉變的因素包括：營養源、CO<sub>2</sub>、細胞密度及黏附情形 (Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007)、N-acetylglucosamine (GlcNAc) (Mattia *et al.*, 1982)、pH 值、溫度、血清 (Gow and Gooday, 1982) 等。於實驗室培養在含有血清、pH 值中性和 37°C 的條件下，能夠有效誘發菌絲型態的生長 (Yang, 2003; Berman, 2006)。一般認為酵母菌型利於在體內散播，而菌絲型則利於入侵；在黏膜表面共生之白色念珠菌多呈酵母菌型，在人體免疫力下降時才會轉變為菌絲型入侵表面黏膜 (Brown *et al.*, 1999)。而調控型態轉變的訊息傳遞主要有 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway 及 cAMP-PKA pathway (Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007) 兩大路徑。在外界環境缺乏氮源 (Biswas and Morschhauser, 2005)、存在氧化壓力 (oxidative stress) (Román *et al.*, 2007) 和細胞的擁擠程度 (quorum sensing) (Sato *et al.*, 2004) 都會經由 MAPK pathway 來調控型態的轉變。其方式是經由一系列的磷酸化反應將訊息傳給 transcription factor Cph1p (Liu *et al.*, 1993) 來調控下游基因的表現。研究指出，剔除 pathway 中任一基因或是 *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)，但在血清的誘發下仍然有能力生長菌絲 (Román *et al.*, 2007)。而 cAMP-PKA pathway 已知在啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、白色念珠菌或其他種類的真菌中，在菌絲生長的調控上都扮演著重要的角色 (Lengeler *et al.*, 2000)。Pathway 主要包含了 cAMP-dependent protein kinase A (PKA) 和下游轉錄因子 Efg1p。cAMP 的表現增加或抑

制 cAMP phosphodiesterase 的活性，都能活化細胞由酵母菌型轉變為菌絲型。白色念珠菌中兩個正向調控菌絲生成之 PKA：Tpk1p 和 Tpk2p，分別負責不同培養基的菌絲表現型；*tpk1/tpk1* 剔除株使白色念珠菌喪失在固態培養菌絲生成的能力；*tpk2/tpk2* 剔除株則抑制白色念珠菌在液態培養基上生長菌絲的能力 (Sonneborn *et al.*, 2000; Bockmuhl and Ernst, 2001; Cloutier *et al.*, 2003)。活化的 PKA 藉由磷酸化調控 Efg1p 的活性，過量表現會刺激啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 形成假菌絲型；但在白色念珠菌誘發菌絲生成時，表現量是下降的；但過量表現又可促使白色念珠菌形成假菌絲，因此認為 *EFG1* 同時扮演著 transcription activator 和 repressor 的角色 (Stoldt, 1997)。而 *efg1/efg1* 剔除株會喪失於血清及 GlcNAc 誘發下形成芽管 (芽管為菌絲早期的型態) 和菌絲的能力，但仍然可觀察到假菌絲的型態 (Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007)。另外，*cph1/cph1 efg1/efg1* 雙剔除株會使白色念珠菌在大部分的培養條件下喪失菌絲和假菌絲生成的能力，且對實驗小鼠也喪失系統性感染的能力，使小鼠死亡率大幅降低 (Lo *et al.*, 1997)。因此，*CPH1* 和 *EFG1* 下游所調控的基因和白色念珠菌的型態轉變或是致病力有關。

另外，本實驗室先前利用抑制刪除雜交法 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 來篩選和型態變化相關的基因，找出長菌絲型 (SC5314) 與酵母菌型 (HLC54 基因型為 *efg1/efg1 cph1/cph1*) 兩者之間表現量不同的基因，若目標基因在兩種型態中有所差異，則此基因可能與致病力或促進菌絲生長有關。篩選結果中，包含了 *ERG3* 和 *ERG11* 這兩個麥角固醇合成基因 (附圖二) (蕭婷尹, 2006)，其功能之一是念珠菌對抗真菌藥物的感受性。因此，型態變化/致病性途徑與藥物感受性是相關的。

### 1.3 常用臨床抗真菌藥物種類及抗藥機制

大多數抗真菌的藥物設計基礎，於作用在真菌細胞膜固醇類的主要成分 - 麥角固醇之生合成路徑上，其成分和哺乳類細胞的膽固醇相似，扮演維持真菌細胞膜的流動性及完整性，及影響一些膜上酵素其蛋白質功能的穩定性；或是以非競爭型破壞細胞壁的主要成分 - (1,3)- $\beta$ -D-glucan 之生合成路徑，使得細胞壁失去穩定性並對細胞體造成壓力。以下就本實驗所使用三大類中的五種藥物做基本介紹：

- 一、 Polyene - 此類藥物主要作用於含麥角固醇的細胞膜上，代表性藥物為 amphotericin B (以下簡稱為 AMB)。其作用方式為嵌入細胞膜內，在細胞膜上形成通道，使得細胞膜的質子 (主要是鉀離子梯度) 被破壞達到殺菌效果。(附圖一)。但受限於其和劑量相關的腎毒性，所以此藥通常視為最後防禦線。
- 二、 Azole - 又可分成 Imidazole (代表藥物為 Fluconazole、Voriconazole) 及 Triazole (代表藥物為 Miconazole) 兩類。作用方式係經由抑制 cytochrome P450 系統的酵素 14- $\alpha$ demethylase，受質 lansterol 則會受到  $\Delta$ 5,6-desaturase (ERG3基因產物) 催化形成 3,6-diol 衍生物，此衍生物大量堆積於體內，達到抑制真菌細胞膜上的主要成分麥角固醇之合成並造成細胞毒性 (Sanglard and Odds, 2002)。(附圖一)
- 三、 Echinocandin - 破壞由 FKS1 轉錄的 (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase 活性，抑制 (1,3)- $\beta$ -D-glucan 的合成，使得細胞壁的結構支撐力變弱，無法維持滲透壓而導致菌體破裂、死亡。代表藥物為 Micafungin。(附圖二)

由於目前臨床上仍是大量使用 azole 類藥物，然而因其只能抑

菌而非殺菌，無形中篩選出具抗藥性的菌株。抗藥性真菌會利用以下一種或一種以上的機制來達到抗藥目的：一、減少藥物在體內的累積。包含了減低藥物的進入和增加藥物的排出，但藥物的進入體內機制未明，而藥物排出是臨床上真菌抗藥最重要的因素之一，目前已知 ABC transporter (*CDR1*、*CDR2*) 和 major facilitator proteins (*MDR1*) 控制此機制的膜蛋白輸出幫浦 (efflux pumps)，當其大量表現時，會促進藥物的排出 (Sanglard *et al.*, 2003a)。二、改變藥物標的酵素。包括藉由大量表現、突變、改走其他代替途徑取代因藥物作用所阻斷的反應，使真菌仍是可合成生長所需的物質。三、改變麥角固醇代謝途徑。四、使藥物失去活性。經由抑制某些特定酵素的功能，這些酵素可以將沒有活性的藥物轉化成有活性藥物，而達到使藥物失去活性的目的。或真菌體內分泌酵素至細胞基質外降解藥物 (degradation)，使藥物結構破壞而達到藥物失去活性的目的 (Ghannoum and Rice, 1999)。

#### 1.4 篩選標記之介紹

本實驗使用質體 pSFS2-SAT1 中的 *SAT1* flipper cassette 藥物篩選標記作為基因剔除系統 (圖一)，可直接在野生株 SC5314 中剔除目標基因，排除使用不同遺傳背景的菌株所造成的性狀影響 (Reuss *et al.*, 2004)。*SAT1* flipper cassette 包含了由 *ACT1* promoter 所調控表現白色念珠菌基因 *CaSAT1*，基因產物轉譯出酵素 streptothrin acetyltransferase 可使藥物 Nourseothricin 失活，在此為一藥物篩選標記；及由 *MAL2* promoter 調控的 *CaFLP*，當培養基添加 maltose 誘發 *MAL2* promoter 表現下游基因 *CaFLP*，產生酵素 site-specific recombinase，並結合到 cassette 兩端的 FRT (minimal FLP recombination target sequence)，進行 site specific recombination 將

cassette pop-out 出 genome 中，只留下一個 34 bp 的 FRT 序列，減少外來基因對白色念珠菌的影響 (Reuss *et al.*, 2004; Ding and Bulter, 2007)。因此可再重複使用此篩選標記，將目標基因另一股 allele 剔除；另外，在 cassette 上下游各包含一個 MCS (multiple cloning site) 利於 clone 的設計。

## 1.5 本論文之研究目的

先前本實驗室利用基因表現比對 (expression profiling) 比較白色念珠菌野生株 SC5314、*cph1/cph1* 剔除株和 *efg1/efg1* 剔除株之間下游基因的表現量，推測表現量不同的基因可能受轉錄因子 Cph1p 或 Efg1p 調控，也就是和菌絲生長相關。再利用 SAT1 flipper cassette 系統於野生株 SC5314 中將目標基因剔除，以觀察細胞生理型態是否因此改變，連結上述推測。因此，本論文在胺基酸序列與哺乳類無序列同源性、功能未知以及較少之文獻探討等的前提下，挑選出 *CaORF19.6586* 以及延續前人已於野生株 SC5314 中剔除之 *CaRHD3*、*CaGRE2*、*CaORF19.173*、*CaORF19.7310* 等基因作為研究的目標。

### 1.5.1 *CaORF19.6586* 基因之介紹

*CaORF19.6586* 有 942 bp 轉譯出 313 個胺基酸。由 NCBI Blast 資料庫中比對結果，顯示出最相似的蛋白為 *Candida dubliniensis* CD36 XP\_002421346 protein，如圖二所示，兩胺基酸相似度以 Query coverage 表示為 99%，其中 identity 為 61%，positive 為 72%。但在 *Candida dubliniensis* 中此相似蛋白功能未知。另外由 CGD (*Candida* genome database) 提供的文獻上得知此基因同源於酵母菌 *SCYJR115* (Karababa *et al.*, 2004)，有 510 bp 轉譯出 169 個胺基酸，在 NCBI Blast 資料庫中比對結果，顯示兩胺基酸相似度為 34%，其中 identity

為 41%，positive 為 59% (圖三)。但 *SCYJR115* 也是一個未知功能的蛋白。另外由相關文獻歸納出幾點特性：在抗 Azole 菌株中過表現 *MDR1* 或是在含有 Benomyl 的環境下，此基因的轉錄量會有增加的趨勢 (Karababa *et al.*, 2004)；也有文獻提到此基因會受到 nitric oxide 的誘導 (Hromatka *et al.*, 2005)；另外在轉錄比對 (transcription profiling) 中發現，剔除 *ssn6* 基因會有兩種 phenotype – 圓滑/皺褶，而 *CaORF19.6586* 會受到圓滑表現型 up-regulate 的調控 (García-Sánchez *et al.*, 2005)。

### 1.5.2 *CaORF19.5305 (RHD3)* 基因之介紹

*CaRHD3* 有 615 bp 轉譯出 204 個胺基酸。由 NCBI Blast 資料庫中比對結果，顯示出最相似的蛋白為 *Candida dubliniensis* CD36 中未知功能的 cell wall protein，如圖四所示，兩胺基酸相似度以 Query coverage 表示為 100%，其中 identity 為 88%，positive 為 93%。*CaRHD3* 是一個典型的 GPI-anchored protein，屬於細胞壁蛋白，藉由  $\beta$ -1,6-glucan 連結到細胞壁上 (de Boer *et al.*, 2010)，所以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.*, 2003)。*CaRHD3* 的表現量會受到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，*CaRHD3* 表現量下降 (de Boer *et al.*, 2010)；而在鐵離子濃度較高 (100  $\mu$ M) 的情況下反而有較高的表現量 (Lan *et al.*, 2004)。在本實驗室前人的研究中，比較 *CaRHD3* 剔除株和野生株之間，於型態轉變方面、測試影響細胞膜和細胞壁的化學物質反應 (ex: SDS、High concentration of NaCl、calcoflour white、 $\beta$ -1,6-glucanase、Zymolase) 和對上皮細胞的黏附力的實驗結果皆無差別，但在對小鼠毒性跟野生株比起來有下降的趨勢。由於 *CaRHD3* 在 HLC54 中表現量大增，認為可能是 transcriptional factor



Efg1p 下游所調控的基因之一 (林啟揚, 2001)，因此本實驗將會嘗試在 HLC54 中剔除 *CaRHD3*，探討 *CaRHD3* 對型態轉變的影響。

### 1.5.3 *CaORF19.3150 (GRE2)* 基因之介紹

*CaGRE2* 有 1038 bp 轉譯出 345 個胺基酸。由 NCBI Blast 資料庫中比對結果，與同源於酵母菌相似的蛋白為 SCGRE2p/YOL151Wp，如圖五所示，兩胺基酸相似度以 Query coverage 表示為 98%，其中 identity 為 39%，positive 為 62%。研究指出，*CaGRE2* 在低濃度的鐵離子環境中表現量大幅提高 (Lan et al., 2004)；在轉錄比對 (transcription profiling) 中顯示 *CaGRE2* 受 Nrg1p 及 Tup1p 所調控 (Murad et al., 2001; García-Sa´nchez et al., 2005)；在基因表現比對 (Gene expression profiling) 中顯示 *CaGRE2* 會受 benomyl up-regulated (Karababa et al., 2004)。而 SCGRE2 基因目前已知有三大功能：SCGRE2 會轉錄轉譯出具有 NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase) 的活性蛋白；在轉錄體學 (Transcriptome) 中分析，以 isoamyl alcohol 誘導菌絲生成的實驗中證明 SCGRE2 具有 isovaleraldehyde reductase 的活性；而在不同的壓力來源 (osmotic、ionic、oxidative、heat shock 及 heavy metals) 的測試下，會有不同程度上的基因表現 (Garay-Arroyo and Covarrubias, 1999; Vido et al., 2001)。

### 1.5.4 *CaORF19.173* 基因之介紹

*CaORF19.173* 有 3303 bp 轉譯出 1100 個胺基酸。由 NCBI Blast 資料庫中比對結果，與同源於酵母菌相似的蛋白為 ScAzf1p (Asparagine-rich Zinc-finger)，如圖六所示，兩胺基酸相似度以 Query coverage 表示為 39%，其中 identity 為 48%，positive 為 63%。*CaORF19.173* 在弱酸環境下會由 transcription factor Mnl1p 所調控

其表現 (Mark Ramsdale, *et al.*, 2008)；由於蛋白質結構中含有典型 zinc finger 之區域，推測基因功能可能為 transcription factor 調控基因表現。

#### 1.5.5 *CaORF19.7310* 基因之介紹

*CaORF19.7310* 有 2367 bp 轉譯出 788 個胺基酸。由 NCBI Blast 資料庫中比對結果，與同源於酵母菌相似的蛋白為 ScMsc1p/YML128C (Meiotic Sister-chromatid recombination)，如圖七所示，兩胺基酸相似度以 Query coverage 表示為 63%，其中 identity 為 29%，positive 為 51%。*Scmsc1* 剔除株影響減數分裂時期同源染色體的重組作用 (Thompson and Stahl, 1999)；不過白色念珠菌未有已知的有性世代，也無減數分裂期 (Bennett and Johnson, 2005)。但染色期同源重組會發生在有絲分裂期及細胞 DNA 修補作用時期 (Graser *et al.*, 1996; Sung and klen, 2006)，因此若重組作用發生在不適當的時間和位置，導致染色體發生異質性缺失 (Loss of heterozygosity) 和重新排列 (rearrangement)，都可能造成白色念珠菌型態變異或抗藥性的產生 (Rustchenkp-Bulgac *et al.*, 1990; Forche *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011)。

## 二、材料與儀器

### 2.1 菌株 (strain)

(1) *Escherichia coli* (strain : DH5 $\alpha$ ) :

其基因型為 *supE44* $\Delta$ *lacU169* ( $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* 。

(2) *Candida albicans* :

菌株 (Strain)	基因型 (Genotype)	來源 (Sources)
SC5314	Wild-type strain	Gillum <i>et al.</i> , 1984; 本實驗室
SC5314B	Wild-type strain	Gillum <i>et al.</i> , 1984
HLC54	<i>cph1/cph1 efg1/efg1</i>	Lo <i>et al.</i> , 1997
OHE1 OHE2	<i>CaORF19.6586/Caorf19.6586::FRT</i>	本實驗
OHO1 OHO2	<i>Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::FRT</i>	本實驗
ORE2 ORE3	<i>Caorf19.6586::FRT/ Caorf19.6586::CaORF19.6586</i>	本實驗
RHD3HE9 RHD3HE10	<i>CaORF19.5305/Caorf19.5305::FRT efg1/efg1 cph1/cph1</i>	本實驗
RHD3HO9D RHD3HO10D	<i>Caorf19.5305::FRT/Caorf19.5305::FRT efg1/efg1 cph1/cph1</i>	本實驗
RHD3R928-8 RHD3R109-10	<i>Caorf19.5305::FRT/ Caorf19.5305::CaORF19.5305 efg1/efg1 cph1/cph1</i>	本實驗

## 2.2 質體 (plasmid)

質體 (Plasmid)	描述 (Description)	來源 (Sources)
pSFS2	帶有 <i>SAT1</i> marker，可抗 nourseothricin。並含 <i>CaFLP</i> 及 <i>MAL2p</i> ，可經 maltose 誘使 marker 從 genome 中 pop-out。在 <i>E. coli</i> 中篩選標記為抗 ampicillin。	(Reuß <i>et al.</i> ,2004)
pSAT1-ORF19.6586-B	pSFS2 質體外接 <i>CaORF19.6586</i> 下游約 244 bp 的片段	本實驗
pSAT1-ORF19.6586-AB	pSAT1-ORF19.6586-B 質體外接 <i>CaORF19.6586</i> 上游約 238 bp 的片段	本實驗
pSAT1-ORF19.6586-Res	pSAT1-ORF19.6586B 質體外接 <i>CaORF19.6586</i> 上游至下游約 999 bp 之片段，經定序確認包含 <i>CaORF19.6586</i> open reading frame 正確之序列。	本實驗
pRHD3r	pSATB 質體外接 <i>CaRHD3</i> 上游至下游約 1524 bp 之片段，經定序確認包含 <i>CaRHD3</i> open reading frame 正確之序列	本實驗 (pSATB 為陳柏伶所建構) (陳柏伶,2009)

## 2.3 引子 (primer)

引子	序列 5'~3'	位置
----	----------	----

OAF	<b>TTT<u>GGGCC</u>CTATCACCACTTCTGCAATT</b> <i>Apa I</i>	<i>CaORF19.6586</i> gene: -20~-1
OAR	<b>TTT<u>CTCGAG</u>CTAGAACTCTTCTGGGTGTTGG</b> <i>Xho I</i>	<i>CaORF19.6586</i> gene: +223~+244
OBF	<b>AAAC<u>CGCGG</u>CAATTGTACGTTCTAATTCTACC</b> <i>Sac II</i>	<i>CaORF19.6586</i> gene: +743~+765
OBR	<b>AAAG<u>AGCTC</u>TATAAGCCTGTCCATATCGTG</b> <i>Sac I</i>	<i>CaORF19.6586</i> gene: +959~+980
O-preA	<b>TTT<u>GGGCC</u>CACTCACTCACTCACTTACTC</b> <i>Apa I</i>	<i>CaORF19.6586</i> gene: -300~-280
O-proB	TTCCCCAAAATCTTCTTGCTCTAACGTA	<i>CaORF19.6586</i> gene: +1332~+1360
O-resB	<b>TTT<u>CTCGAGT</u>CATAAGCCTGTCCATATCGT</b> <i>Xho I</i>	<i>CaORF19.6586</i> gene: +959~+980
OS1	TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGG	<i>CaORF19.6586</i> gene: -193~-164
OS2	GTACCTTAGTCCTGAATCTTCAATGG	<i>CaORF19.6586</i> gene: +228~+253
OS3	TATTGCCATAGAAGCTACTATTCCT	<i>CaORF19.6586</i> gene:

		+633~+657
OS4	AAAAGATTGACTGACACGATATGGAC	<i>CaORF19.6586</i> gene: +945~+970
PAS1	GGCCTTTTGCTGGCCTTTTG	pSFS2-SAT1 plasmid: +1782 ~+1800
PAS2	CAGCTATGACCATGATTACG	pSFS2-SAT1 plasmid: +2141 ~+2160
PBS1	AAGATTGAACTCAACTCAAC	pSFS2-SAT1 plasmid: +5897 ~+5916
PBS2	AAGGGTGGTAATTACTA	pSFS2-SAT1 plasmid: +6298 ~+6217
RS1	GCAGCTGGCACGACAGGTTT	pSFS2-SAT1 plasmid: +1981~ +2000
RS2	GTGACGTCCGTTATACATTG	<i>CaRHD3</i> gene: -180~ -161
RS3	GTTTCACTGGTGATGACAAA	<i>CaRHD3</i> gene: +323~ +342
HJL02559 (SAT1-MAL2)	GGAACTAACGATGCATACGACTACATCAATG	pSFS2-SAT1 plasmid: +2355~+2385
R-resB	<b>AAAGGGCCCTTGGAAAAAGAATATTAGGG</b>	<i>CaRHD3</i> gene: +1052~ +1071
HJL02557	GGTTGTGATAGTGGTGGTGGAGGAGAAC	<i>CaRHD3</i> gene:

(R-preA)		-708 ~ -735
LPCp-9R	<b>CGAACGAGCTC</b> TTGGAAAAAGAATATTAGGG <i>Sac I</i>	<i>CaRHD3</i> gene: +1052~ +1071
LPCp-12F	<b>CGGGGTACC</b> AATCTTTACTTTATACGCCA <i>Kpn I</i>	<i>CaRHD3</i> gene: -452~ -434
LPCp-12R	<b>AAAGGGCCCA</b> ACTAGAAAGTCGAAGAATGG <i>Apa I</i>	<i>CaRHD3</i> gene: -89~ -70
HJL02558 (R-proB)	GGCAACCTGAACAGACCATAGCTACCC	<i>CaRHD3</i> gene: +1287 ~+1313
HJL02564 (R-F)	ATCCTTGTCTAGCTCTGCTCTTGCTACC	<i>CaRHD3</i> gene: +21 ~ +48
HJL02565 (R-R)	ACATGACTAATCCAGCAACAACAGCAG	<i>CaRHD3</i> gene: +587 ~ +613
GRE2-preA	CTCTGGAATTTAACTTCGAAAGCCAAATTGCC	<i>CaGRE2</i> gene: -577 ~ -545
GRE2-AR	<b>CAGCCCTCGAG</b> TTTCAATTGTTACCTTT	<i>CaGRE2</i> gene: +115~ +132
HJL02560 (7-preA)	AACAAGGGTAGAAACTCTGTGGGATCCCTCC	<i>CaORF19.7310</i> gene: -219 ~ -188
HJL02561 (7-AR)	CCGCTCGAGAAATCATCTTTGGTATCCTTT	<i>CaORF19.7310</i> gene: +404 ~ +384
HJL02562 (1-SF)	ATCTTTATTCGTTTCATTGCTTACTACAG	<i>CaORF19.173</i> gene: +658 ~ +630
HJL02563 (1-SR)	ATCTCCTCCAAATCGTATTATGGAAATTC	<i>CaORF19.173</i> gene: -154 ~ -182

粗體為外加序列，底線為酵素切位

## 2.4 化學藥品

✧ Amphotericin B: Lot # 6G17073

- ✧ Alpha Biociences 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
- ✧ Biochain®: FastHyb-Hybridization solution (Cat # L1031250)
- ✧ Difco laboratories: Bacto agar (Cat. No. 143175), D-mannitol (Cat. No. 17217020), Nutrient broth (Cat. No. 149018), Yeast nitrogen base w/o amino acid (Cat. No. 145368), YPD broth (Cat. No. 235141XB), Sabouraud Dextrose Agar (Cat. No. 210950)
- ✧ Fermentas: DreamTag™ DNA polymerase (5 unit / $\mu$ l, Cat. No. EP0701)
- ✧ Fluka: Maleic acid (Cat. No. 63190-1KG )
- ✧ GIBCO™: RPMI Medium 1640 (Cat. No. 31800-014)
- ✧ 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), Sodium hydrogen carbonate (EC number 205-633-8), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Cat. No. S26740)
- ✧ CDP-STAR® Chemiluminescence reagent (LOT: 0706013)



- ◇ Panreac:  $K_2HPO_4$  (Cat. No. 141512)
- ◇ Protech: 100 bp DNA ladder (Cat. No. M1-100T)
- ◇ Pfizer Inc.: Fluconazole (PF-00345508-00), Voriconazole (Lot # 052301-008-09)
- ◇ 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. 12930025), Blocking reagent (Cat. No. 1096176), 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  $\mu\text{m}$ ) (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), MOPs (Lot# BCBH5347V), Miconazole nitrate salt (Cat. No. 22832-87-3)
- ◇ Subenzyme: 1kb DNA ladder (Cat. No. SEM11C001)
- ◇ Werner Bioagents: Nourseothricin (Cat. No. 5.1000)
- ◇ 景明化工: Ethanol

## 2.5 緩衝溶液與試劑

- ◇ 50 X TAE buffer: 48.4 g Tris base, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml, 11.42 ml acetic acid added dd  $H_2O$  to 200 ml
- ◇ 10 X SDS: 10g SDS dissolved in dd  $H_2O$  to 100 ml (pH 7.2)

- ✧ 20 X SSC buffer: 3 M NaCl, 300 mM sodium citrate (pH 7.0)
- ✧ Prehybridization/Hybridization solution: 0.5 M sodium phosphate (pH 7.2), 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 7.0)
- ✧ Maleic acid buffer: Maleic acid, 0.15 M NaCl (pH 7.5)
- ✧ Washing buffer: Maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3 % (v/v) Tween 20 (pH 7.5)
- ✧ 2 X Washing buffer: 10 X SSC, 0.1% (w/v) SDS
- ✧ 0.5 X Washing buffer: 5 X SSC, 0.1% (w/v) SDS
- ✧ 10 X Blocking solution: 1 % (w/v) blocking reagent (Roche) dissolved in maleic acid buffer
- ✧ Detection buffer: M Tris-Cl, 0.1 M NaCl (pH 9.5)
- ✧ Denaturation solution: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- ✧ Neutralization solution: 0.5 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl (pH 7.5)
- ✧ 1 M Lithium Acetate: 40.8 g Lithium Acetate added dd H<sub>2</sub>O to 400 ml (pH 7.5)
- ✧ 10 X Tris-EDTA buffer: 100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 7.5)
- ✧ 3 M Sodium acetate (NaOAc): 40.83 g NaOAc dissolved in dd H<sub>2</sub>O to 100 ml (pH 7.0)
- ✧ 1 M Dithiothreitol (DTT): 3.09 g DTT dissolved in 0.01 M NaOAc 20 ml, store at -20°C
- ✧ 1 M Sorbitol: 33.4 g sorbitol in dd H<sub>2</sub>O to 200 ml
- ✧ Lysis buffer: 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1% (w/v) SDS, 2 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA
- ✧ 20 mM MgCl<sub>2</sub>: 0.406 g MgCl<sub>2</sub> dissolved in ddH<sub>2</sub>O to 100 ml
- ✧ Freezer solution: 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % glycerol

- ◇ 0.85 % NaCl: 8.5 g Sodium Chloride dissolved in ddH<sub>2</sub>O to 1 L
- ◇ RPMI solution: 10.4 g RPMI medium 1640, 34.53 g MOPs, 2 g NaHCO<sub>3</sub> dissolved in ddH<sub>2</sub>O to 1 L (pH 7.0)

## 2.6 酵素

- ◇ Fermentas: T4 DNA Ligase (EL0331), *Taq* DNA Polymerase (EP0402)
- ◇ TAKARA: EX *Tag*<sup>TM</sup> (Cat. No. RR001A)
- ◇ NEB: *Apa* I (Cat. No. R0114S), *Ava* I (Cat. No. R0558S), *Kpn* I (Cat. No. R0142S), *Sac* I (Cat. No. R0156S), *Sac* II (Cat. No. R0157S), *Xho* I (Cat. No. R0146S), *Nsi* I (Cat. No. R0127S), *Nco* I (Cat. No. R0193S), *Eco* RV (Cat. No. R0195S), *Swa* I (Cat. No. R0604S), *Bsa* BI (Cat. No. R0537S), *Nru* I (Cat. No. R0192S), *Pst* I (Cat. No. R0140S), *Bam* HI (Cat. No. R0136S)

## 2.7 培養基配置

- ◇ LB (Luria-Bertni) 培養液: 1 % tryptone , 0.5 % yeast extract , 1 % NaCl
- ◇ LB (Luria-Bertni)/Ampicillin 培養基: 1 % tryptone , 0.5 % yeast extract , 1 % NaCl , 1.5 % agar , 50 µg/ml Ampicillin
- ◇ YPD 培養液: 1 % yeast extract , 2 % peptone , 2 % dextrose
- ◇ YPD/maltose 培養液: 1 % yeast extract , 2 % peptone , 2 % maltose
- ◇ YPD 培養基: 1 % yeast extract , 2 % peptone , 2 % dextrose , 2 % agar
- ◇ YPD/10% FBS 培養液: 1 % yeast extract , 2 % peptone , 2 % dextrose , 10 % FBS

- ◇ YPD/nourseothrcin 培養基: 1 % yeast extract , 2 % peptone , 2 % dextrose , 2 % agar , 200 µg/ml Nourseothricin
- ◇ YPD/1 ml FBS 培養基: 1 % yeast extract , 2 % peptone , 2 % dextrose , 2 % agar , 1 ml FBS
- ◇ Bacto agar/1 ml FBS 培養基: 2 % agar , 1 ml FBS
- ◇ Solid spider 培養基: 1 % nutrient broth , 1 % mannitol , 0.2 %  $K_2HPO_4$  , 1.35 % agar
- ◇ SDA 培養基: 0.5 % peptic digest of animal tissue , 0.5 % pancreatic digest of casein , 4 % Dextrose , 1.5 % agar

## 2.8 儀器設備

- 微量高速冷凍離心機 Centrifuge 5415R (Eppendorf)
- 雜交連結器 (UVITEC)
- 分光光度計 20GENESYS<sup>RT</sup> (SPECTRONIC INSTRUMENTS)
- 核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
- 梯度核酸增殖儀 labcycler (SENSQUEST)
- PCR 溫度控制儀 Gene Cyclor<sup>RT</sup> (BIO-RAD)
- 基因脈衝儀 (BIO-RAD)
- 脈衝控制器 (BIO-RAD)
- 程式溫度控制儀 PTC-200 Thermal Cycler (MJ RESEARCH)
- 震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRIES)
- 試管震盪器 IK1-VIBRAX-VXR
- 平面式震盪器 S-101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
- 加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
- 乾燥加熱板 DB102 (Violet BioSciences, Inc.)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)

往復式恆溫水槽 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)

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

電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)

恆溫式震盪培養箱 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

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

迴轉式震盪培養箱 OSI500 (KS)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)

電泳影像擷取分析系統 (Alphamager™)

微電腦多功能冷凍高速離心機 Centrifuge 5804R (Eppendorf)

桌上型高速離心機 5100 (KUBOTA CORPORATION)

桌上型冷凍離心機 GS-15R (BECKMAN)

24孔高速離心機 LEGEND MICRO17 (THERMO)

4°C三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)

-20°C冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)

-80°C冷凍櫃 925/926 (Forma Scientific)

倒立顯微鏡 CK40 (OLYMPUS)

超純水製造機 Simplicity (MILLIPORE)

水浴槽 B-100 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

脈衝器 MicroPulser™ (BIO-RAD)

電磁式奈米級偵測儀 ND-100 (NamoDrop)

數位相機 C-5050ZOOM (OLYMPUS)

數位相機 K200D (PENTAX)

數位相機 G11 (CANON)

雙光束紫外/可視光分光光譜儀 U-3010 (HITACHI)

無菌操作箱二級 SC4TXSB (BAKER)

落地形高速離心機 J2-MC (BECKMAN)

柯達全自動洗片機 X-OMAT 2000 PROCESSOR (KODAK)

倒立顯微鏡 IX70 (OLYMPUS)

微生物生長曲線快速分析系統 Bio screen C (Growth Curves)



### 三、方法與步驟

#### 3.1 質體 DNA (plasmid DNA) 的萃取

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

取單一菌落培養約 12~16 小時後，取 1.5ml 離心 15,700 × g、10 分鐘，去上清液。加入 200 μl Solution I，混合均勻。加入 200 μl Solution II，溫和反轉 5 次，靜置 5 分鐘。再加入 300 μl Solution III，混合均勻，溫和反轉 5 次，靜置 5 分鐘。離心 15,700 × g、5 分鐘，小心取上清液至 spin column。離心 15,700 × g、30 秒，倒掉濾液。加入 700 μl Washing Solution，離心 15,700 × g、1 分鐘，倒掉濾液。再加入 700 μl Washing Solution，離心 15,700 × g、1 分鐘，倒掉濾液。Spin column 15,700 × g 空轉 3 分鐘。將 spin column 移置新的 1.5 ml 離心管，於乾燥加熱板上 60°C、5~10 分鐘。以 50 μl 二次無菌水加入 spin column 中，靜置 2 分鐘。15,700 × g、1 分鐘收下質體 DNA，儲存於 -20°C。

#### 3.2 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction)

以設計好之一對 primer，配合 DNA template 及 taq polymerase，可將欲得到之 DNA 片段合成出來。將下列材料混合於 200 μl 微量離心管內：

##### 3.2.1 一般 PCR 反應

0.25 μl Taq Polymerase (1.25 U) (DreamTaq)、10 X PCR buffer 5 μl、50 μM 引子各 1 μl、2.5 mM dNTPs mixture 4 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 μl、1 μg template DNA，補二次無菌水至總體積 50 μl，置於 PCR 溫度控制儀進行聚合酶連鎖反應。以此方法反應預計得到 *CaOrf19.6586* 上游 A region 及下游 B region。

### 3.2.2 Rescued *CaORF19.6586* 及 *CaRHD3* PCR 反應

欲合成目標基因上游之 A region 包含 open reading frame 至下游 B region 之片段。以 Genomic DNA 為 template (300~500 ng)、10 X Taq buffer 5  $\mu$ l、25 mM dNTPs 4  $\mu$ l、一對 50  $\mu$ M 引子各 1  $\mu$ l、DreamTaq DNA polymerase 0.25  $\mu$ l (1.25 U)，補二次無菌水至總體積 50  $\mu$ l，再置於 PCR 溫度控制儀進行反應。

PCR 溫度控制儀的設定如下：

一般 PCR	Rescued <i>CaORF19.6586</i> PCR
	Rescued <i>CaRHD3</i> PCR
95°C 5 分鐘	95°C 5 分鐘
95°C 1 分鐘	95°C 1 分鐘
58°C 1 分鐘	56~60°C 1 分鐘
72°C 1 分鐘 (repeat 30 cycles)	72°C 2 分鐘(repeat 30 cycles)
72°C 10 分鐘	72°C 10 分鐘
20°C 停止反應	20°C 停止反應

反應完成後，利用 1% 洋菜膠電泳確認 PCR 產物片段大小是否正確，再利用 PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) 來純化 DNA 去除酵素及鹽類。

### 3.3 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、180 rpm 震盪培養 12~16 小時。取 2 ml 的菌液轉養於 100 ml LB (含 5% glucose 和 2 mM 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 0.5~0.7。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 ice-cold 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 µl，保存於 -80°C 中。(以上均為無菌操作)。

### 3.4 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 µl~2 µl) 和 50 µl 勝任細胞混和，靜置於冰上約 20~30 分鐘。以 42°C 熱休克 45 秒後立刻放回冰上，靜置 1 分鐘。加入 事先放置於 37°C 預熱之 500 µl LB 培養液，於 37°C、150~180 rpm 條件下培養一小時，之後取 100 µl 的菌液塗盤。塗完的盤子倒放於 37°C 隔夜培養。(以上均為無菌操作)。若菌落太少可將剩餘菌液以 900 xg 離心五分鐘，吸取掉 700 µl 上清液後，留下 100 µl 回溶菌液塗盤。塗完的盤子倒放於 37°C 隔夜培養。

### 3.5 限制酶反應 (Enzyme digestion)

#### 3.5.1 確定質體 DNA 片段大小之限制酶反應

取質體 DNA 1 µg、1 U/kb 限制酶、10 X buffer 1.5 µl、10 X BSA 1.5 µl，補充無菌二次水至總體積 15 µl，37°C 水浴培養 2~4 小時，再以 1.0% 洋菜膠電泳進行片段大小之分析。

#### 3.5.2 為 clone 所需之限制酶反應

取質體 DNA 10 µg、10 X buffer 5 µl、10 X BSA 5µl、限制酶 1 µl、

補二次無菌水至總體積為 50  $\mu$ l，37°C 反應 3 小時至 18 小時 (依酵素特性)。反應完成後，以 clean up kit (FAVORGEN) 去除限制酶、buffer 及鹽類等，所得到之 DNA 片段用以進行下一步接合反應。

### 3.6 接合反應 (Ligation)

將以酵素處理過並經過純化的質體 (vector DNA) 和欲插入之片段 (insert DNA)，以 vector DNA 50~400 ng 的量和 insert DNA 計算莫耳濃度比為 3:1 的比例在微量離心管中混合，接著加入 2  $\mu$ l 10X Ligase Buffer、0.5  $\mu$ l T4 Ligase (5 unit/ $\mu$ l)，並補無菌二次水至總體積為 20  $\mu$ l。22°C 培養 1 小時。

### 3.7 洋菜膠內之 DNA 萃取 (gel extraction)

#### 3.7.1 結晶紫洋菜膠之製備

將 0.4 g agarose 粉末加入 50 ml 1 X TAE buffer 中，微波爐加熱溶解 agarose，稍冷後加入 40  $\mu$ l 結晶紫溶液 (2.5 mg/ml)，混合均勻，倒入製膠台中，冷卻凝固即可使用。

#### 3.7.2 洋菜膠內之 DNA 片段萃取

將欲萃取之洋菜膠上的 DNA 片段以電泳方式分離，以刀片切下欲得到之 DNA 片段。將洋菜膠片段 (up to 300 mg) 放置微量離心管中，以 FevorPrep™ GEL Extraction kit (FAVORGEN)，加入 500  $\mu$ l FADF buffer，於 60°C 加熱板上加熱 10~15 分鐘，確定洋菜膠片段完全融化後，冷卻至室溫。將混合液移至 spin column，15,700  $\times$ g、30 秒、倒掉濾液。加入 750  $\mu$ l Wash buffer，15,700  $\times$ g、30 秒、倒掉濾液。再加入 750  $\mu$ l Wash buffer，15,700  $\times$ g、30 秒、倒掉濾液。column 空轉 15,700  $\times$ g、3 分鐘。將 spin column 移至新的 1.5 ml 微量離心管，

加入 40  $\mu$ l 無菌二次水於 spin column 正中央，靜置 2 分鐘，15,700  $\times$ g、2 分鐘離心後，即得欲萃取之 DNA，儲存於 -20°C。

### 3.8 白色念珠菌的轉型反應 (Transformation)

將白色念珠菌之單一菌落接種至 3 ml YPD broth 培養液中，30°C、300 rpm 震盪培養 18~24 小時。取 3  $\mu$ l 菌液轉養至 50 ml YPD 培養液 30°C，300 rpm，震盪培養 12~15 小時至 OD<sub>600</sub> 約 1.6~2.2 (由於分光光度計線性測量範圍為 O.D<sub>595nm</sub> = 0.1~1.0，故菌液需先稀釋再進行測量)。接著將菌液移至 50 ml 離心管中，離心 1,620  $\times$ g、5 分鐘，去上清液。加入 1 ml 1 M Lithium acetate 及 1 ml 10 X TE 和 8 ml 無菌二次水重新懸浮菌體。30°C、300 rpm 培養 1 小時。再加入 250  $\mu$ l 1 M DTT，30°C、300 rpm 培養半小時。之後加入 40 ml 無菌二次水，離心 1,620  $\times$ g、5 分鐘。以下開始冰上操作：加入 25 ml 預冷之無菌二次水懸浮菌體，4°C 低溫離心 1,620  $\times$ g、5 分鐘，去上清液。再加入 5 ml 預冷之 1 M sorbitol 懸浮菌體，4°C 低溫離心 1,620  $\times$ g、5 分鐘，去上清液。重複加入 5 ml 1 M sorbitol 懸浮菌體，4°C 低溫離心 1,620  $\times$ g、5 分鐘，去上清液。靜置於冰上，即為白色念珠菌之勝任細胞。接著在無菌的 1.5 ml 微量離心管中混合 40  $\mu$ l 勝任細胞和 1  $\mu$ g 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 1.8 kV 進行電穿孔，馬上在 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  $\times$ g、離心 5 分鐘，移除上清液。加入 1 ml YPD 培養液，30°C、300 rpm 震盪培養 1 小時。取 100  $\mu$ l 的菌液塗佈在合適的培養基 (nourseothricin: 200  $\mu$ g/ml) 上，30°C 培養 2 天。

### 3.9 Maltose 誘發 SAT1 flipper cassette 之剔除 (pop-out)

在白色念珠菌轉型後，將篩選得到的單一菌落先在 YPD/Nourseothricin (200 µg/ml) 培養基上劃開，之後挑選單一菌落培養在 3 ml YP/ Maltose 培養液中，以 30°C，300 rpm 震盪培養 24 小時後，取 100 µl 菌液轉養至新鮮的 3 ml YP/Maltose 中，30°C、300 rpm 再次震盪培養 24 小時後，取 500 µl 菌液抽取 Genome DNA，進行 PCR 確認是否有轉型成功。若無，則剩餘菌液取 100 µl 菌液轉養至新鮮的 3 ml YP/Maltose 中，30°C、300 rpm 再次震盪培養 24 小時，取 500 µl 菌液抽取 Genomic DNA，進行 PCR 確認是否有轉型成功。剩餘菌液暫存於 4°C 中。

### 3.10 複製平皿培養法 (Replica plating)

將 3.9 確認成功的菌株之保存菌液於 YPD 培養基上畫出單一菌落，此為 Master plate。培養於 30°C、1~2 天。接著將菌盤轉印在無菌的絨布上，再將無篩選性的培養基 (YPD) 和有篩選性的培養基 (YPD/Nourseothricin: 200 µg/ml) 依序蓋在絨布上，以沾取在絨布上的菌，於 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。

### 3.11 建構白色念珠菌單套剔除株 (Heterozygote) 及雙套剔除株 (Homozygote)

利用前端加上限制酶切位之引子，以 PCR 方式分別將目標基因上游片段 (稱為 A region) 及下游片段 (稱為 B region) 增幅，依序 cloning 接進 SAT1 flipper cassette 的前後兩端。如圖<一>所示，將帶有目標基因上下游片段的 SAT1 flipper cassette 由質體上切下，利用

電穿孔轉型至白色念珠菌野生株 SC5314B 中。送入的片段利用目標基因上下游同源的區域進行同源重組置換 (homologous recombination)，將目標基因以 SAT1 flipper cassette 取代，達到基因剔除的目的。接著藉由藥物 nourseothricin 篩選出帶有 SAT1 flipper cassette 的菌株。再將篩選到的菌株培養在 YP/maltose 培養液中進行 pop-out，二日後抽取菌株 genomic DNA，以 PCR 確認是否得到預期菌株後，藉由複製平皿培養法 (replica plating)，排除部分未將 SAT1 flipper cassette 剔除的菌株，再一次抽取菌株 genomic DNA，以 PCR 確認菌株。獲得目標基因其中一個 allele 被剔除並且不帶有 SAT1 flipper cassette 的單套基因剔除株 (heterozygous knock-out strain)後，便可重複使用 SAT1 flipper cassette 將另一個 allele 作剔除，得到雙套基因剔除株 (homozygous knock-out strain)。

### 3.12 建構白色念珠菌單套基因回復株 (rescued strain)

首先須建構一 SAT1 flipper cassette 上游帶有目標基因 ORF 完整序列，以及 cassette 下游帶有目標基因 B region 的片段。因此利用目標基因上游 A region 5' 的 primer 與下游 B region 3' primer，將整個基因片段 PCR 並 clone 進一個帶有 B region 的 SAT1 flipper cassette 前端，完成後將帶有整個 ORF 和 B region 的 SAT1 flipper cassette 由質體上切下，如圖<八>所示，轉型到雙套基因剔除株 (homozygote)，經過同源重組置換和 pop-out 的動作，得到單套基因回復株 (rescued strain)。

### 3.13 白色念珠菌染色體 DNA 之萃取

使用 EPICENTRE® Biotechnologies 的產品 MasterPure™ Yeast

DNA Purification kit (Cat. Nos. MPY80010 and MPY80200) 抽取 gDNA。

操作方法如下：

將隔夜培養之 3 ml 菌液以 15,700 x g 離心 10 分鐘。去上清液，加入 300  $\mu$ l Yeast Cell Lysis solution 回溶菌液，置於 65°C 加熱板 15 分鐘；冰上靜置 5 分鐘，加入 MPC protein precipitation reagent 150  $\mu$ l vortex 10 秒，以 15,700 x g 離心 10 分鐘。吸取上清液至新 1.5 ml tube 中，加入 Isopropanol 500  $\mu$ l 上下翻轉 tube 均勻混和，以 15,700 x g 離心 10 分鐘。倒掉上清液，加入 70 % Ethanol 500  $\mu$ l 清洗 pellet，以 15,700 x g 離心 5 分鐘。加入 TE buffer 100  $\mu$ l 及 Rnase A 1  $\mu$ l (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 於 37°C 加熱板作用 30 分鐘。加入 99.9 % Ethanol 200  $\mu$ l 及 3 M pH 5.2 NaOAc 12.5  $\mu$ l 上下翻轉 tube 均勻混和，置於 -20°C 冰箱 5 分鐘。以 15,700 x g 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 70 % Ethanol 500  $\mu$ l 清洗 pellet，以 15,700 x g 離心 5 分鐘。待 gDNA pellet 乾燥後加入 50~100  $\mu$ l 無菌二次水回溶。存放於 -20°C。

### 3.14 南方墨點法

#### 3.14.1 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling)

使用 Roche 廠商產品 DIG labeling dNTP mix 以及 DreamTaq 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 300~500 ng Template DNA、5  $\mu$ l 10 X DreamTaq DNA Polymerase Buffer、2.5  $\mu$ l DIG DNA labeling mix、2  $\mu$ l 2.5 mM dNTP mix、0.5  $\mu$ l 50 mM primer、0.25  $\mu$ l DreamTaq DNA Polymerase (2 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	5 分鐘	
58°C	1 分鐘	
72°C	1 分鐘	Repeat 30 cycles
72°C	10 分鐘	
20°C	終止反應	

### 3.14.2 轉漬 DNA (Transfer)

取 10 µg Genomic DNA 以適當的酵素作用 12~16 小時。先取大約 500 ng genomic DNA 以 0.8 % 洋菜膠進行電泳，確認酵素作用效果後，再將剩餘的 genomic DNA 以適當濃度洋菜膠進行電泳，電泳緩衝液為 1 X TAE，電場強度為 50 伏特。接著將膠以現配之 1 µg/ml EtBr 染色 20 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 再次平面震盪 15 分鐘，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 Neutralization Buffer 再次平面震盪 15 分鐘，移除 Buffer。以無菌二次水沖洗膠體，接著將膠泡入 20 X SSC 中，以 60 rpm 平面震盪 10 分鐘。分別準備比膠體大之四張乾燥的 Whatman 3 MM 濾紙 (Cat. No. 3030 917) 和四張以 2 X SSC 泡濕的 Whatman 3 MM 濾紙；裁切一大張符合轉漬槽 (Schleicher & Schuell 產品之 TurboBlotter™ and Blotting Stack) 寬度及長度的 Whatman 3 MM 濾紙並以 2 X SSC 泡濕；準備一張比膠大的 Nylon membrane (GENESCREEN PLUS™ HYBRIDIZATION TRANSFER MEMBRANE Lot Number: 668634) ，同樣以 2 X SSC 泡濕備用。依照轉漬槽說明片架設，首先在 STACK TRAY 中央堆疊擦手紙，依序往上平放四張乾燥的 3MM 濾紙、一張濕的 3MM

濾紙、Nylon Membrane、將膠體小心放置於 Nylon Membrane 上，排除氣泡，再覆蓋三張濕的 3MM 濾紙；將 BUFFER TRAY 組裝後，倒入 20 X SSC，將較大張之 3MM 濾紙橫跨於 BUFFER TRAY 兩端並沒入液面形成鹽橋，注意不要沾溼擦手紙，最後輕放上 WICK COVER，放置約 14~16 小時。

### 3.14.3 雜交反應 (Hybridization)

將轉漬完之 nylon membrane 進行 cross-linking: 先將 nylon membrane 及一張大於 nylon membrane 的 3 MM 濾紙置於 2 X SSC 潤濕，將 nylon membrane 置於 3 MM 濾紙之上，以 UV 254 nm 120 mJ 照射 nylon membrane (有 DNA 的那面) 兩次，將 DNA 固定於 Nylon Membrane 上。之後將 nylon membrane 泡入無菌二次水洗過，再泡入 DIG FastHyb 中，放置於 65 °C HYBRIDIZATION WATER BATH 震盪一小時。將 3.12.1 所製備的探針放置於 95°C 加熱板上加熱 5 分鐘，然後置於冰上 5 分鐘。將探針和 DIG Fast Hyb 以 1 µl 探針加 1 ml DIG FastHy 的比例混合均勻。將 nylon membrane 泡入含有探針的 DIG FastHy 中，放置於 65°C HYBRIDIZATION WATER BATH，震盪一個小時。之後將 nylon membrane 泡入 Low Stringency buffer (0.5 X SSC, 0.1 % SDS) 中，室溫下以 60 rpm 平面震盪 5 分鐘；再將 nylon membrane 泡入新的 Low Stringency buffer 中，室溫下以 60 rpm 平面震盪 5 分鐘。接著將 nylon membrane 泡入 High Stringency buffer (2 X SSC, 0.1 % SDS) 中，置於 65°C HYBRIDIZATION OVEN, 60 rpm 平面震盪 15 分鐘；再將 nylon membrane 泡入新的 High Stringency buffer 60 rpm 平面震盪 15 分鐘。

### 3.14.4 免疫偵測 (Detection)

將 nylon membrane 泡入 Wash buffer，室溫下 60 rpm 平面震



盪 5 分鐘。將 nylon membrane 泡入 1 X Blocking buffer (5 ml 10 X Blocking buffer 溶於 45 ml Maleic acid buffer) 中，室溫下 60 rpm 平面震盪 30 分鐘。將 nylon membrane 泡入 Antibody solution (1  $\mu$ l Antibody (Roche Anti-DIG-AP，以 4°C、15,700 xg 離心 5 分鐘) 加於 10 ml 1 X Blocking buffer) 中，室溫下 60 rpm 平面震盪 30 分鐘。將 nylon membrane 泡入 Wash buffer 中，室溫下 60 rpm 平面震盪 15 分鐘；再將 nylon membrane 泡入新的 Wash buffer 中，室溫下 60 rpm 平面震盪 15 分鐘。將 nylon membrane 泡入 Detection buffer 中，室溫下 60 rpm 平面震盪 5 分鐘。接著將 nylon membrane 放置在透明資料夾中 (帶有 DNA 的那面朝上)。於 Nylon membrane 上均勻加入 2 ml CDP-STAR<sup>®</sup> (Chemiluminescence Reagent Lot. 0706013)。小心覆蓋資料夾，室溫靜置 5 分鐘，放置於 37°C 培養箱中避光反應 15 分鐘，之後在暗房進行壓片。將底片隔著投影片放置於 nylon membrane 上，待感光適當時間之後，放入洗片機中，沖洗後的底片即可永久保存。

### **3.15 突變株之性狀分析 (Characterization)**

#### **3.15.1 生長曲線之測定 (Growth curve)**

從 -80°C 存菌管將待測菌株劃於 YPD plate 在 30°C 隔夜培養。刮取適量菌落加入含有 2 ml 0.85% NaCl 的玻璃試管，充分混合均勻後在 530 nm 波長下利用比色計測量其波長，調整到菌液濃度約為 0.5 McFarland。接著取 100  $\mu$ l 菌液至 900  $\mu$ l YPD 培養液中，重複上述稀釋，再取 500  $\mu$ l 菌液至 500  $\mu$ l YPD 對半稀釋，達到總稀釋 200 倍。接著取最後稀釋那管 200  $\mu$ l 菌液至生長曲線專用盤，每個菌株三重複，並取 200  $\mu$ l YPD 當作空白對照組 (Blank)。放入微生物生長

曲線快速分析系統中 (Bioscreen C)，設定一小時測量一次 O.D<sub>600</sub> 值，靜置連續 24 小時後收集數據並作圖分析。

### 3.15.2 芽管試驗 (Germ tube assay)

將含有 10% FBS 之 YPD 培養液，以每個 well 有 2 ml 加至 24-well plate 中，用無菌牙籤沾取新鮮的單一菌落於 well 裡，於 37°C 培養 3 小時，利用倒立式顯微鏡 40 倍觀察芽管生成情形。

### 3.15.3 誘發菌絲生長觀察型態變化 (Colony morphology)

- 將單一菌落接種在含 4% FBS YPD 培養基中，置於 37°C 培養三天，使用倒立式顯微鏡觀察菌落生長的型態。
- 將單一菌落接種在 4% FBS Bacto agar 培養基中，置於 37°C 培養七天，觀察單一菌落生長情形。

### 3.15.4 侵犯力測試 (invasion assay) (Navarro-Garcia *et al.*, 1998)

將單一菌落接種在 Solid Spider 培養基上，置於 37°C 培養 7 天，之後以定時定量流水沖洗菌落，先觀察菌落是否會因菌絲侵入培養基而殘留。再戴手套將培養基表面的菌落推除，觀察是否有菌絲埋入培養基。

## 3.16 CLSI Broth Microdilution Method

### 3.16.1 藥盤配製

首先將實驗所需的藥物 Amphotericin B、Miconazole、Fluconazole、Voriconazole 溶於有機溶劑 dimethyl sulfoxide (DMSO) 中，而 Micafungin 溶於無菌二次水並過 0.22 μm filter。使用 RPMI 1640 (無 bicarbonate 及含 glutamine 與酸鹼指示劑) 的培養基來稀釋藥物配成本實驗使用最高藥物濃度的二倍濃度：Fluconazole (128 mg/l)、Amphotericin B (32 mg/l)、Voriconazole (16 mg/l)、Miconazole (4 mg/l)、

Micafungin (2 mg/l)。接著將每一種藥物進行序列稀釋，最終配成十個濃度，藥物範圍分別是 Fluconazole (0.25~128 ug/ml)，Amphotericin B (0.0625~32 ug/ml)，Voriconazole (0.0313~16 ug/ml)，Miconazole (0.0078~4 ug/ml)，Micafungin (0.0039~2 ug/ml)。分別在 96 孔盤第一到第十一個孔盤加 100  $\mu$ l，第十二個孔盤加入 200  $\mu$ l RPMI 1640 作為控制組 blank (此孔盤不加菌液)。

### 3.16.2 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 偵測各突變株相較於 Parental strain 之藥物敏感性的變化

根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (Clinical and Laboratory Standards Institute) 所建議的 M27-A3 的修編版本進行實驗 (CLSI, 2008)。配製適量 RPMI 1640 broth、無菌 0.85 % NaCl，置於 1 liter 的血清瓶中，並裝上分注器置於 4°C 冰箱中備用。

DAY 1: 自 -80°C 冰箱取出本實驗中之 mutant construction (Heterozygote、Homozygote、Rescued strain)、parental strain (*CaRHD3* 為 HLC54，其餘為 SC5314)、negative control (*CaRHD3* 為 SC5314，其餘為 HLC54)，以及控制組 YLO6 (ATCC® 6258)，YLO7 (ATCC® 22019)，YLO12 (ATCC® 90028)。用竹棒挖取少許菌液，塗抹在 SDA 培養基，35°C、24 小時。準備所需數量之 12 × 75 mm 玻璃試管，以標示筆標示待測菌株編號，置於鐵架以鋁箔紙覆蓋後，利用高壓滅菌鍋滅菌。準備 15 ml 無菌離心管，標示待測菌株編號後，放置於鐵架上備用。

DAY 2: 至 -80°C 冰櫃中取出適量已配好的 2 倍濃度梯度之抗藥性試驗培養盤，置於室溫下回溫備用並將抗藥性試驗培養盤依序標示菌株編號。取出經 24 小時 35°C 培養的 SDA plate，已滅過菌之竹棒刮取適量菌液加入含有 2 ml 0.85% NaCl 的玻璃試管，充分混合均勻後在 530 nm 波長下利用比色計測量其波長，調整到菌液濃度約為

0.5 McFarland，過高或偏低可利用比色計調整，此時可以得到約  $1 \sim 5 \times 10^6$  cells/ml。將菌液震盪均勻後取 100  $\mu$ l 先稀釋 10 倍在裝有 1.8 ml 0.85% NaCl 玻璃試管中，再從上述菌液中取 100  $\mu$ l 稀釋 10 倍於含 1.8 ml RPMI 1640 培養液的離心管中，再一次從上述菌液中依待測菌盤數稀釋 10 倍於 RPMI 1640 培養液離心管中，總共稀釋 1000 倍。將離心管中之菌液混合均勻後，倒入無菌藥品槽，利用 12 爪 Pipet 裝上 11 支 tips，吸取 100  $\mu$ l 菌液，同時加入 96 孔盤 A 列 1~11 行的兩倍藥物濃度序列稀釋的藥盤中。第 12 行不加菌液，為無菌操作的對照組。(本實驗使用五種藥物，故須分別將菌液分別加至五種藥盤的 A 列)。更換 tips，接著依照同樣方式將所有菌株依序加入 每種藥盤的 B~H 列，此時藥盤濃度稀釋一倍，而菌液稀釋倍率為 2000 倍，最終接種數量約  $1 \sim 5 \times 10^3$  cells/ml。添加完畢後，蓋上抗藥性試驗培養盤蓋子，放入 35°C 培養箱中分別培養 24 和 48 小時後，測定吸光值。

Day 3: 讀取培養 24 小時菌液生長濃度。開啟 Biotrack II plate reader 電源，於主畫面中進入 select method 中選 YEAST 後，機器會進入 YEAST 模式。啟動電腦，在桌面上點選 Bio DC 程式捷徑，開啟視窗後，點選 run，再點選 new data 後讀取培養盤之數值。取出已 35°C 培養 24 小時的抗藥性試驗培養盤，放在具有 96 孔盤專用承載盤的震盪器上，調整震盪速度於 2~3 之間，震盪時間約 1 min。震盪均勻後，將培養盤蓋子移開，將培養盤放置於 Biotrack II plate reader 的讀取槽內，接著選點 run，則培養盤會進入機器內部進行 3 sec 的 pre-mix 後讀取吸光值。讀取完畢後培養盤會退出，且在電腦程式中顯示出 96 孔盤的 OD 數值。將培養盤取出，並將培養盤蓋子蓋上，於 Bio DC 點選 finish 將結果匯出到 Excel 並存檔，培養盤放

回 35°C 培養箱繼續再培養 24 小時。

Day 4: 讀取培養 48 小時菌液生長濃度。



## 四、結果

### 4.1 建構 *CaORF19.6586* 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株

#### 4.1.1 建構含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaORF19.6586*

##### 上下游同源區域之質體

以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板 (template)，依方法 3.2.1 利用 PCR 方式增幅 *CaORF19.6586* 上下游區域。如圖八<A>以分別帶有限制酶切位 *Sac* I 和 *Sac* II 的引子 OBF 及 OBR 得到 *CaORF19.6586* 下游約 244 bp DNA 片段，稱之為 B region。再以限制酶 *Sac* I 和 *Sac* II 分別作用 PCR 產物 B region 及質體 pSFS2-SAT1 後，進行接合反應，所得產物依方法 3.4 進行轉型選殖，得到帶有 B region 的質體。如圖九<A>所示，將質體以限制酶 *Ava* I、*Nae* I 作用，預計會得到片段 795 bp、2544 bp 和 3964 bp；以電泳圖結果所示，Lane 5 和 Lane 9 在 4 Kbp、2.5 Kbp 處各有一條片段和 750 bp 上方有一條片段，將所得質體命名為 pSAT1-ORF19.6586-B。同樣以 PCR 方式，利用分別帶有限制酶切位 *Apa* I 和 *Xho* I 的引子 OAF 及 OAR 得到 *CaORF19.6586* 上游約 238 bp DNA 片段，稱之為 A region。再以限制酶 *Apa* I、*Xho* I 分別作用 PCR 產物 A region 及質體 pSAT1-ORF19.6586-B 後，進行接合反應，經過轉型選殖得到帶有 A、B region 的質體。將質體以限制酶 *Spe* I 作用，預計會得到片段 1712 bp、2501 bp 及 3334 bp；如圖九<B>以電泳圖結果所示，Lane 1~Lane 5 在 4 Kbp 和 3 Kbp 之間有一條片段，在 2.5 kbp 有一條片段，以及在 1.5 Kbp 和 2 kbp 之間有一條片段，合乎預期。此質體命名為 pSAT1-ORF19.6586-AB。如圖八<B>預計將 *CaORF19.6586* 基因剔除約 45%。

#### 4.1.2 質體 pSAT1-ORF19.6586-AB 序列分析

如圖十<A>所示，利用引子 OAF 進行定序分析，確認 A region 有成功接合進 SAT1 flipper cassette 上游；以及利用引子 OBR 進行定序分析，確認 B region 有成功接合進 SAT1 flipper cassette 下游。如圖十<B>定序結果顯示，在 A region 終點有正確連結質體 pSFS2-SAT1 的預期序列；如圖十<C>定序結果顯示，在 B region 起始點上游有正確連結質體 pSFS2-SAT1 的預期序列。

#### 4.1.3 建構 *CaORF19.6586* 單套、雙套基因剔除株

將質體 pSAT1-ORF19.6586-AB 以限制酶 *Apa*I 和 *Sac*I 處理，將帶有 *CaORF19.6586* ORF 上下游 A、B 片段的 SAT1 flipper cassette 由質體上切下，並加以純化 (方法 3.7.2)，以電穿孔送入白色念珠菌野生株 SC5314 中 (方法 3.8)。以含有藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 SAT1 flipper cassette 之菌株。培養兩天後挑選較大顆菌落，培養在 YP maltose 培養液中，進行 pop-out，之後萃取 genomic DNA 以 PCR 確認。如圖十一<A>所示，利用引子 O-preA 和 OBR 進行 PCR，引子 O-preA 設計於 *CaORF19.6586* 上游是為了確保同源重組置換發生於白色念珠菌之 genome 正確的位置上。如果有成功將一套 *ORF19.6586* 置換掉以及 cassette 剔除，預計會得到片段 1280 bp、824 bp。因為在 YP maltose 的菌液中，部份菌株可能還帶有 SAT1 flipper cassette，因此藉由方法 3.10 將上述 PCR 結果合乎預期的菌株塗佈在 YPD 培養基進行 replica plating，以挑選出不帶 SAT1 flipper cassette 的菌株。選擇在不含藥物 nourseothricin 培養基上生長的菌落，進行存菌並萃取 genomic DNA。同樣使用引子 O-preA 和 O-BR 進行 PCR，以圖十一<B>電泳圖所示，Lane 1~5, 7~12 在 1.5 Kbp 和 1 Kbp 之間有一條片段，以及高於 750 bp 有一條片段，符合預期。將 Lane 1 和 Lane 2 獲得的菌株命名為 OHE1 和

OHE2。

重複之前的步驟，將質體 pSAT1-ORF19.6586-AB 以限制酶 *Apa* I 和 *Sac* I 處理並加以純化，以電穿孔送入 *CaORF19.6586* 單套基因剔除株 OHE1 中。以含有藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。再挑選其中較大顆菌落，培養在 YP maltose 培養液中，進行 pop-out，之後萃取 genomic DNA，如圖十一<A>所示，利用引子 O-preA 和 OBR 進行 PCR，在雙套基因剔除株中預期只會得到片段 1233 bp，將符合預期的菌株塗佈在 YPD 培養基進行 replica plating，選擇在不含藥物 nourseothricin 培養基上生長的菌落，進行存菌和萃取 genomic DNA。同樣利用引子 O-preA 和 OBR 進行 PCR，如果有成功將另一套 *ORF19.6586* 置換掉以及 cassette 剔除，預計只會得到片段 824 bp。以圖十一<C>電泳圖所示，Lane 3~5 在 1 kbp 及 750 bp 之間得到一條預期片段，命名為 OHO1~3。

#### 4.1.4 建構含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaORF19.6586* Open Reading Frame (ORF) 之質體

以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板，依方法 3.2.1 利用 PCR 方式增幅 *CaORF19.6586* 包含上游 A region 到下游 B region 整個 ORF 區域，如圖十二<A>所示，使用分別帶有限制酶 *Apa* I、*Xho* I 切位的引子 OAF 及 O-resB 預計得到約 1 kbp DNA 片段。將此 PCR 產物和質體 pSAT1-ORF19.6586-AB 以限制酶 *Apa* I、*Xho* I 作用後，進行接合反應，經過轉型選殖得到 *SAT1* flipper cassette 上游帶有 *ORF19.6586* 完整 ORF 以及下游帶有一個 *ORF19.6586* B region 的質體。如圖十二<B>所示，將質體以限制酶 *Ava* I、*Eco* O109I 作用，預計會得到片段 1005 bp、1551 bp、2413 bp 及 3334 bp。電



泳圖結果顯示，Lane 1、2、4、5、7、9 及 10 在 3 Kbp 和 4 Kbp 之間有一條片段；在 2 Kbp 和 2.5 Kbp 之間有一條片段；以及在 1.5 kbp 和 1 kbp 左右各有一條片段，合乎預期。將質體命名為 pSAT1-ORF19.6586-resB-1、2、4、5、7、9 及 10。

#### 4.1.5 質體 pSAT1-ORF19.6586Res 序列分析

在質體 pSAT1-ORF19.6586-resB 中，以 PCR 合成 *CaORF19.6586* 的 ORF，之後將送進 *ORF19.6586* 雙套剔除株，作單套基因回復的功能，故需定序確認合成的 *CaORF19.6586* 序列無誤。如圖十三<A>所示，設計定序引子 OS1、OS2、OS3 及 OS4。質體 pSAT1-ORF19.6586-resB-5 比對結果，以 Candida Genome Database (CGD) 上之序列 *CaORF19.6586* 作為比對樣本。比對結果從 DNA 起始碼 ATG 到終止碼 TAG 皆完全正確。

#### 4.1.6 建構 *CaORF19.6586* 單套基因回復株

目的是當基因剔除株對於白色念珠菌性狀有影響時，單套基因回復株可作為反證的對照組。將質體 pSAT1-ORF19.6586-resB 以限制酶 *ApaI* 和 *SacI* 處理並加以純化，以電穿孔送入 *CaORF19.6586* 雙套基因剔除株 OH01 中。以含有藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。再挑選較大顆菌落，培養在 YP maltose 培養液中進行 pop-out，之後萃取 genomic DNA，如圖十四<A>所示，利用引子 OAF 和 O-proB 進行 PCR，在單套基因回復株中預期會得到片段 1689 bp 和 896 bp，將符合預期的菌株塗佈在 YPD 培養基進行 replica plating，挑擇在不含藥物 nourseothricin 培養基上生長的菌落，進行存菌和萃取 genomic DNA；同樣利用引子 OAF 和 O-proB 進行 PCR，如果有成功將一套 *ORF19.6586* 置換進去以及 cassette 剔除 (最後 rescued allele 會比 wild-type allele 多一

個 B region 和 FRT 片段)，預計會得到片段 1689 bp 和 896 bp。以圖十四<B>電泳圖結果所示，Lane 2、3 及 5 在 1.5 Kbp 和 1 Kbp 處各有一條預期片段，並將菌株命名為 ORE2、ORE3 及 ORE5。

#### 4.1.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaORF19.6586* 各突變株

依方法 3.13 萃取各突變的 genomic DNA，再依方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 O-preA 和 OAR，以 PCR 合成南方點墨法所需要的探針，限制酶 *Hpa*I 作用於 genomic DAN，經轉漬、雜交和免疫偵測後，如圖十五<A>所示，預期 *CaORF19.6586* wild-type allele 會得到片段 3724 bp、*CaORF19.6586* knock-out allele 會得到片段 3283 bp 和 *CaORF19.6586* rescued allele 會得到片段 4047 bp。以圖十五<B>底片結果所示，Lane 3 野生株 SC5314 (wild-type) 在 4268 bp 和 3530 bp 之間有一條預期片段；Lane 4、5 為 *CaORF19.6586* 單套基因剔除株 (*CaORF19.6586/Caorf19.6586::FRT*) 在 4268 bp 和 3530 bp 之間有一條預期片段，以及低於 3530 bp 處有一條預期片段；Lane 6、7 為 *CaORF19.6586* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::FRT*) 在低於 3530 bp 處有一條預期片段；Lane 1、2 為 *CaORF19.6586* 單套基因回復株 (*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::CaORF19.6586*) 在 4268 bp 和 3530 bp 之間有一條高於野生株的預期片段，以及低於 3530 bp 處有一條預期片段。

如圖十六<A>所示，利用同樣引子 O-preA 和 OAR 合成探針，並且選擇限制酶 *Nsi*I 作用於 genomic DNA，再一次利用南方點墨法對之後預計進行性狀分析的 *CaORF19.6586* 各突變株作確認；預期 *CaORF19.5686* wild-type allele 會得到片段 1885 bp、*CaORF19.6586* knock-out allele 會得到片段 1446 bp 和 *CaORF19.6586* rescued allele

會得到片段 2208 bp。以圖十六<B>底片結果所示，Lane 3 野生株 SC5314 (wild-type) 在低於 1904 bp 有一條預期片段；Lane 4、5 為 *CaORF19.6586* 單套基因剔除株 (*CaORF19.6586/Caorf19.6586::FRT*) 在低於 1904 bp 有一條預期片段和 1584 bp 及 1375 bp 之間有一條預期片段；Lane 6、7 為 *CaORF19.6586* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::FRT*) 在 1584 bp 及 1375 bp 之間有一條預期片段；Lane 1、2 為 *CaORF19.6586* 單套基因回復株 (*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::CaORF19.6586*) 在高於2927 bp 處有一條預期片段，以及在 1584 bp 及 1375 bp 之間有一條預期片段。

#### 4.2 建構 *CaRHD3* 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株

##### 4.2.1 建構含篩選標記 *SAT1 flipper cassette* 及 *CaRHD3* 上下游同源區域之質體

實驗室前人以分別帶有限制酶切位 *Sac I* 和 *Sac II* 的引子得到 *CaRHD3* 下游約 394 bp DNA 片段，稱之為 B region。再同樣以限制酶 *Sac I* 和 *Sac II* 分別作用 PCR 產物 B region 及質體 pSFS2-SAT1 後，進行接合反應，得到帶有 B region 的質體，將所得質體命名為 pSATB。以 PCR 方式，利用分別帶有限制酶切位 *Kpn I* 和 *Xho I* 的引子得到 *CaRHD3* 上游約 384 bp DNA 片段，稱之為 A region。再以限制酶 *Kpn I*、*Xho I* 分別作用 PCR 產物 A region 及質體 pSATB 後，進行接合反應，經過轉型選殖得到帶有 A、B region 的質體。將質體以限制酶 *Eco RI* 作用，預計會得到片段 1434 bp 及 6412 bp；如圖十七以電泳圖結果所示，Lane 1~Lane 6 在 7 Kbp 和 6 Kbp 之間有一條片段，在 1650 bp 和 1 kbp 之間有一條片段，合乎預期。此質體命名為 pASATB。如圖八<C>預計將 *CaRHD3* 基因 100% 剔除。

#### 4.2.2 質體 pASATB 序列分析

如圖十八<A>所示，利用引子 PAS1 及 PAS2 進行定序分析，確認 A region 有成功接合進 SAT1 flipper cassette 上游；以及利用引子 PBS1 及 PBS2 進行定序分析，確認 B region 有成功接合進 SAT1 flipper cassette 下游。如圖十八<B>定序結果顯示，在 A region 終點有正確連結質體 pSFS2-SAT1 的預期序列；如圖十八<C>定序結果顯示，在 B region 起始點上游有正確連結質體 pSFS2-SAT1 的預期序列。

#### 4.2.3 建構 *CaRHD3* 單套、雙套基因剔除株

將質體 pASATB 以限制酶 *KpnI* 和 *SacI* 處理，將帶有 *CaRHD3* ORF 上下游 A、B 片段的 SAT1 flipper cassette 由質體上切下，並加以純化 (方法 3.7.2)，以電穿孔送入白色念珠菌 Parental strain *cph1/cph1 efg1/efg1* 雙套剔除株 HLC54 中 (方法 3.8)。以含有藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 SAT1 flipper cassette 之菌株。培養兩天後挑選較大顆菌落，培養在 YP maltose 培養液中，進行 pop-out，之後萃取 genomic DNA 以 PCR 確認。如圖十九<A>所示，利用引子 HJL02557 和 LPCp-9R 進行 PCR，引子 HJL02557 設計於 *CaRHD3* 上游是為了確保同源重組置換發生於白色念珠菌之 genome 正確的位置上。如果有成功將一套 *RHD3* 置換掉以及 cassette 剔除，預計會得到片段 1806 bp、1223 bp。因為在 YP maltose 的菌液中，部份菌株可能還帶有 SAT1 flipper cassette，因此藉由方法 3.10 將上述 PCR 結果合乎預期的菌株塗佈在 YPD 培養基進行 replica plating，以挑選出不帶 SAT1 flipper cassette 的菌株。選擇在不含藥物 nourseothricin 培養基上生長的菌落，進行存菌並萃取 genomic DNA。同樣使用引子 HJL02557 和 LPCp-9R 進行 PCR，以圖十九<B>電泳圖

所示，Lane 9~11 在 2 kbp 和 1650 bp 之間有一條片段，以及在 1650 bp 和 1 kbp 之間有一條片段，符合預期。將 Lane 9~11 獲得的菌株依序命名為 RHD3HE9、RHD3HE10 和 RHD3HE11。

重複之前的步驟，將質體 pASATB 以限制酶 *Kpn*I 和 *Sac*I 處理並加以純化，以電穿孔送入 *CaRHD3* 單套基因剔除株 RHD3HE9/RHD3HE10 中。以含有藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。再挑選其中較大顆菌落，培養在 YP maltose 培養液中，進行 pop-out，之後萃取 genomic DNA，如圖十九<C>所示，利用引子 LPCp-12F 和 LPCp-9R 進行 PCR，在雙套基因剔除株中預期只會得到片段 940 bp，將符合預期的菌株塗佈在 YPD 培養基進行 replica plating，選擇在不含藥物 nourseothricin 培養基上生長的菌落，進行存菌和萃取 genomic DNA。同樣利用引子 LPCp-12F 和 LPCp-9R 進行 PCR，如果有成功將另一套 *RHD3* 置換掉以及 cassette 剔除，預計只會得到片段 940 bp。以圖十九<D>電泳圖所示，Lane 9A~9E 和 Lane 10A~10D 在 1 kbp 及 500 bp 之間得到一條預期片段，依序命名為 RHD3HO9A~9E、RHD3HO10A~10D。

#### 4.2.4 建構含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaRHD3* Open Reading Frame (ORF) 之質體

以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板，依方法 3.2.1 利用 PCR 方式增幅 *CaRHD3* 包含上游 A region 到下游 B region 整個 ORF 區域，如圖二十<A>所示，使用分別帶有限制酶 *Kpn*I、*Xho*I 切位的引子 LPCp-12F 及 R-resB 預計得到約 1524 bp DNA 片段。將此 PCR 產物和質體 pASATB 以限制酶 *Kpn*I、*Xho*I 作用後，進行接合反應，經過轉型選殖得到 *SAT1* flipper cassette 上游帶有 *RHD3* 完整 ORF 以及下游帶有一個 *RHD3* B region 的質體。如圖

二十<B>所示，將質體以限制酶 *Bsp* HI 作用，預計會得到片段 1008 bp、3424 bp 和 4554 bp。電泳圖結果顯示，Lane 7 在 5 Kbp 和 4 Kbp 之間有一條片段；在 4 Kbp 和 3 Kbp 之間有一條片段；以及在接近 1 kbp 左右有一條片段，合乎預期。將質體命名為 pRHD3r。

#### 4.2.5 質體 pRHD3r 序列分析

如圖二十一<A>所示，利用引子 RS1、RS2 及 PAS3 進行定序分析，確認從 A region 開始有包含完整 open reading frame 到 B region 前端。如圖十八<B>定序結果顯示，在 A region 後有正確包含完整 open reading frame 序列。

#### 4.2.6 建構 *CaRHD3* 單套基因回復株

目的是當基因剔除株對於白色念珠菌性狀有影響時，單套基因回復株可作為反證的對照組。將質體 pRHD3r 以限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理並加以純化，以電穿孔送入 *CaRHD3* 雙套基因剔除株 RHD3HO9D/RHD3HO10D 中。以含有藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 SAT1 flipper cassette 之菌株。再挑選較大顆菌落，培養在 YP maltose 培養液中進行 pop-out，之後萃取 genomic DNA，如圖二十二<A>所示，利用引子 HJL02557 和 HJL02558 進行 PCR，在單套基因回復株中預期會得到片段 2.6 kbp 和 1.3 kbp，將符合預期的菌株塗佈在 YPD 培養基進行 replica plating，挑擇在不含藥物 nourseothricin 培養基上生長的菌落，進行存菌和萃取 genomic DNA；同樣利用引子 HJL02557 和 HJL02558 進行 PCR，如果有成功將一套 *RHD3* 置換進去以及 cassette 剔除 (最後 rescued allele 會比 Parental strain allele 多一個 B region 和 FRT 片段)，預計會得到片段 2.6 kbp 和 1.3 kbp。以圖二十二<B>電泳圖結果所示，Lane 2 及 8 在 2.5 Kbp 有一條預期片段，在 1.5 kbp 和 1 Kbp 之間有一條預期片段，

將菌株命名為 RHD3RE928-8 及 RHD3RE109-10。

#### 4.2.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaRHD3* 各突變株

依方法 3.13 萃取各突變的 genomic DNA，再依方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 HJL02557 和 LPCp-12R，以 PCR 合成南方點墨法所需要的探針，限制酶 *EcoRV* 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交和免疫偵測後，如圖二十三<A>所示，預期 Parental strain allele 會得到片段 3367 bps、*CaRHD3* knock-out allele 會得到片段 2.9 kbp 和 *CaRHD3* rescued allele 會得到片段 3.9 kbp。以圖二十三<B>底片結果所示，Lane 3 Parental strain (HLC54 *efg1/efg1 cph1/cph1*) 在低於 3530 bp 之間有一條預期片段；Lane 4、5 為 *CaRHD3* 單套基因剔除株 (*CaRHD3/Carhd3::FRT efg1/efg1 cph1/cph1*) 在低於 3530 bp 之間有一條預期片段，以及在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段；Lane 6、7 為 *CaRHD3* 雙套基因剔除株 (*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT efg1/efg1 cph1/cph1*) 在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段；Lane 1、2 分別為圖二十二<B>之 Lane 2 及 8，*CaRHD3* 單套基因回復株 (*Carhd3::FRT/Carhd3::CaRHD3 efg1/efg1 cph1/cph1*)，在 4268 bp 和 3530 bp 之間有一條高於 Parental strain HLC54 的預期片段，以及在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段。

如圖二十四<A>所示，利用同樣引子 HJL02557 和 LPCp-12R 合成探針，並且選擇限制酶 *NcoI* 和 *NsiI* 作用於 genomic DNA，再一次利用南方點墨法對之後預計進行性狀分析的 *CaRHD3* 各突變株作確認；預期 Parental strain HLC54 會得到片段 3234 bps、*CaRHD3* knock-out allele 會得到片段 2.7 kbp 和 *CaRHD3* rescued allele 會得到片段 3.8 kbp。以圖二十四<B>底片結果所示，Lane 3 Parental strain (HLC54 *efg1/efg1 cph1/cph1*) 在低於 3530 bp 之間有一條預期片段；

Lane 4、5 為 *CaRHD3* 單套基因剔除株 (*CaRHD3/Carhd3::FRT efg1/efg1 cph1/cph1*) 在低於 3530 bp 之間有一條預期片段，以及在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段；Lane 6、7 為 *CaRHD3* 雙套基因剔除株 (*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT efg1/efg1 cph1/cph1*) 在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段；Lane 1、2 分別為圖二十二<B>之 Lane 2 及 8，*CaRHD3* 單套基因回復株 (*Carhd3::FRT/Carhd3::CaRHD3 efg1/efg1 cph1/cph1*) 在 4268 bp 和 3530 bp 之間有一條高於 Parental strain HLC54 的預期片段，以及在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段。

#### 4.3 確認前人已建構之單套、雙套基因剔除株及單套基因回復株

##### 4.3.1 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaGRE2* 各突變株

依方法 3.13 萃取各突變的 genomic DNA，再依方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 GRE2-preA 和 GRE2-AR，以 PCR 合成南方點墨法所需要的探針，限制酶 *Nru*I 和 *Pst*I 作用於 genomic DAN，經轉漬、雜交和免疫偵測後，如圖二十五<A>所示，預期 Wild-type allele 會得到片段 2045 bps、*CaGRE2* knock-out allele 會得到片段 1.4 kbp。以圖二十五<B>底片結果所示，Lane 1 Wild-type (SC5314) 在 2027 bp 左右有一條預期片段；Lane 2~4 為 *CaGRE2* 單套基因剔除株 (*CaGRE2/Cagre2::FRT*) 在 2027 bp 左右有一條預期片段，以及在 1584 bp 和 1375 bp 之間有一條預期片段；Lane 5~7 為 *CaGRE2* 雙套基因剔除株 (*Cagre2::FRT/Cagre2::FRT*) 在 1584 bp 和 1375 bp 之間有一條預期片段。

如圖二十六<A>所示，利用同樣引子 GRE2-preA 和 GRE2-AR 合成探針，並且選擇限制酶 *Hpa*I 和 *Nci*I 作用於 genomic DNA，再一



次利用南方點墨法對之後預計進行性狀分析的 *CaGRE2* 各突變株作確認；預期 Wild-type allele 會得到片段 3013 bps、*CaGRE2* knock-out allele 會得到片段 2.4 kbp。以圖二十六<B>底片結果所示，Lane 1 Wild-type (SC5314) 在低於 3530 bp 左右有一條預期片段；Lane 2~4 為 *CaGRE2* 單套基因剔除株 (*CaGRE2/Cagre2::FRT*) 在 3530 bp 左右有一條預期片段，以及在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條更低於 Wild-type allele 的預期片段；Lane 5~7 為 *CaGRE2* 雙套基因剔除株 (*Cagre2::FRT/Cagre2::FRT*) 在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條更低於 Wild-type allele 的預期片段。

#### 4.3.2 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaORF19.173* 各突變株

依方法 3.13 萃取各突變的 genomic DNA，再依方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 HJL02562 和 HJL02563，以 PCR 合成南方點墨法所需要的探針，限制酶 *Swa*I 作用於 genomic DAN，經轉漬、雜交和免疫偵測後，如圖二十七<A>所示，預期 Wild-type allele 會得到片段 4359 bps、*CaORF19.173* knock-out allele 會得到片段 1.5 kbp 和 *Ca ORF19.173* rescued allele 會得到片段 4.7 kbp。以圖二十七<B>底片結果所示，Lane 4 Wild-type (SC5314) 在 4973 bp 和 4268 bp 之間有一條預期片段；Lane 5、6 為 *CaORF19.173* 單套基因剔除株 (*CaORF19.173/Caorf19.173::FRT*) 在 4973 bp 和 4268 bp 之間有一條預期片段，以及在 1584 bp 和 1375 bp 之間有一條預期片段；Lane 7~9 為 *CaORF19.173* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.173::FRT/Caorf19.173::FRT*) 在 1584 bp 和 1375 bp 之間有一條預期片段；Lane 1~3 為 *CaRHD3* 單套基因回復株 (*Caorf19.173::FRT/Caorf19.173::CaORF19.173*) 在 4973 bp 和 4268 bp 之間有一條高於 Wild-type allele 的預期片段，以及在 1584 bp 和

1375 bp 之間有一條預期片段。

如圖二十八<A>所示，利用同樣引子 HJL02562 和 HJL02563 合成探針，並且選擇限制酶 *Bsa* BI 作用於 genomic DNA，再一次利用南方點墨法對之後預計進行性狀分析的 *CaORF19.173* 各突變株作確認；預期 Wild-type allele 會得到片段 4931 bps、*CaORF19.173* knock-out allele 會得到片段 2 kbp；*CaORF19.173* rescued allele 會得到片段 5.3 kbp。以圖二十八<B>底片結果所示，Lane 4 Wild-type (SC5314) 在4973 bp 附近有一條預期片段；Lane 5、6 為 *CaORF19.173* 單套基因剔除株 (*CaORF19.173/Caorf19.173::FRT*) 在 4973 bp 附近有一條預期片段，以及在 2027 bp 上方有一條預期片段；Lane 7~9 為 *CaORF19.173* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.173::FRT/Caorf19.173::FRT*) 在 2027 bp 上方有一條預期片段；Lane 1~3 為 *CaORF19.173* 單套基因回復株 (*Caorf19.173::FRT/Caorf19.173::CaORF19.173*) 在高於5148 bp 有一條預期片段，以及在 4973 bp 附近有一條預期片段。

#### 4.3.3 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaORF19.7310* 各突變株

依方法 3.13 萃取各突變的 genomic DNA，再依方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 7-preA 和 7-AR，以 PCR 合成南方點墨法所需要的探針，限制酶 *Bam* HI 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交和免疫偵測後，如圖二十九<A>所示，預期 Wild-type allele 會得到片段 2827 bp、*CaORF19.7310* knock-out allele 會得到片段 1469 bp 和 *CaORF19.7310* rescued allele 會得到片段 3431 bp。以圖二十九<B>底片結果所示，Lane 4 Wild-type strain (SC5314) 在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段；Lane 5、6 為 *CaORF19.7310* 單套基因剔除株 (*CaORF19.7310/Caorf19.7310::FRT*) 在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一

條預期片段，以及在 1584 bp 和 1375 bp 之間有一條預期片段；Lane 7~9 為 *CaORF19.7310* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.7310::FRT/Caorf19.7310::FRT*) 在 1584 bp 和 1375 bp 之間有一條預期片段；Lane 1~3 為 *CaORF19.7310* 單套基因回復株 (*Caorf19.7310::FRT/Caorf19.7310::CaORF19.7310*) 在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條高於 wild-type 的預期片段，以及在 1584 bp 和 1375 bp 之間有一條預期片段。

如圖三十<A>所示，利用同樣引子 7-preA 和 7-AR 合成探針，並且選擇限制酶 *Bsa* BI 作用於 genomic DNA，再一次利用南方點墨法對之後預計進行性狀分析的 *CaORF19.7310* 各突變株作確認；預期 Wild-type allele 會得到片段 4374 bps、*CaORF19.7310* knock-out allele 會得到片段 2.5 bp 和 *CaORF19.7310* rescued allele 會得到片段 ~5 kbp。以圖三十<B>底片結果所示，Lane 4 Wild-type strain (SC5314) 在 4973 bp 和 4268 bp 之間有一條預期片段；Lane 5、6 為 *CaORF19.7310* 單套基因剔除株 (*CaORF19.7310/Caorf19.7310::FRT*) 在 4973 bp 和 4268 bp 之間有一條預期片段，以及在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段；Lane 7~9 為 *CaORF19.7310* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.7310::FRT/Caorf19.7310::FRT*) 在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段；Lane 1~3 為 *CaORF19.7310* 單套基因回復株 (*Caorf19.7310::FRT/Caorf19.7310::CaORF19.7310*) 在 5148 bp 和 4973 bp 之間有一條預期片段，以及在 3530 bp 和 2027 bp 之間有一條預期片段。

#### 4.4 白色念珠菌 *CaORF19.6586* 和 *CaRHD3* 各突變株之性狀分析

##### 4.4.1 於 YPD 培養液中觀測生長曲線之結果

圖三十一<A>為 *CaORF19.6586* 各突變株 OD<sub>600nm</sub> 吸光值記錄三次數據取平均之後作圖的結果，SC5314 (wild-type)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作為對照組，比較 *CaORF19.6586* 單套基因突變株 HE1、HE2 (*CaORF19.6586/Caorf19.6586::FRT*)、雙套基因突變株 HO1、HO2 (*Caorf19.6586:FRT/Caorf19.6586::FRT*) 和單套基因回復株 RE2、RE3 (*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::CaORF19.6586*) 在 YPD 培養液於 30 °C 靜置培養 24 H 之生長情形；圖三十一<B>為 OD<sub>600nm</sub>吸光值之對數值所作生長曲線。結果顯示，單基因突變株 HE1、HE2 生長趨勢略緩慢於野生株 SC5314；而 HLC54 細胞數及生長速率明顯低於其他菌株；圖三十一<C>為取第八至十三個小時利用附圖四之公式算出的 doubling time。

圖三十二<A>為 *CaRHD3* 各突變株 OD<sub>600nm</sub> 吸光值記錄三次數據取平均之後作圖的結果，SC5314 (wild-type)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作為對照組，比較 *CaRHD3* 單套基因突變株 HE9、HE10 (*CaRHD3/Carhd3::FRT*)、雙套基因突變株 HO9D、HO10D (*Carhd3:FRT/Carhd3::FRT*) 和單套基因回復株 RE928-8、RE109-10 (*Carhd3::FRT/Carhd3::CaRHD3*) 在 YPD 培養液於 30 °C 靜置培養 24 H 之生長情形；圖三十二<B>為 OD<sub>600nm</sub> 吸光值之對數值所作生長曲線。結果顯示，單套基因回復株 RE109-10 略高於 HLC54；而野生株 SC5314 細胞數及生長速率則明顯高於其他菌株；圖三十二<C>為取第八至十四個小時利用附圖四之公式算出的 doubling time。

#### 4.4.2 芽管試驗 (Germ tube assay)

由圖三十三<A>所示，*CaORF19.6586* 各突變株在 YPD 含有 10% FBS的培養條件下，於 37 °C 培養三小時後觀察，結果顯示各突變株與 Parental strain (SC5314) 皆有看到芽管生成；HLC54 為 Negative

control。圖三十三<B>則是 *CaRHD3* 各突變株在 YPD 含有 10% FBS 的培養條件下，於 37 °C 培養三小時後觀察，結果顯示各突變株與 Parental strain (HLC54) 皆呈酵母菌型態 (yeast form) 且無芽管生成。

#### 4.4.3 誘發菌絲生長觀察型態變化 - 含 4% FBS 之 YPD 培養基之性狀分析

已知對照組 (SC5314 & HLC54) 在本實驗之菌落型態，野生株 SC5314 為皺褶表面，而 HLC54 為光滑表面。圖三十四<A>實驗組 *CaORF19.6586* 各突變株之菌落型態與其 Parental strain SC5314 皆呈皺褶表面；而圖三十四<B>實驗組 *CaRHD3* 各突變株之菌落型態與其 Parental strain HLC54 皆呈圓滑表面。

#### 4.4.4 誘發菌絲生長觀察型態變化 - 含 4% FBS 之 Bacto agar 培養基之性狀分析

已知對照組 (SC5314 & HLC54) 在本實驗之菌落型態，野生株 SC5314 為放射狀形成菌絲，而 HLC54 無菌絲生成且大致為圓形光滑表面。圖三十五<A>實驗組 *CaORF19.6586* 各突變株之菌落型態與其 Parental strain SC5314 皆有放射狀菌絲生成；而圖三十五<B>實驗組 *CaRHD3* 各突變株之菌落型態與其 Parental strain HLC54 皆呈圓形光滑表面。

#### 4.4.5 侵犯力測試 (Invasion assay)

對照組 SC5314 菌落表面呈皺褶狀，經流水沖洗並不會沖掉菌落，經戴手套推除表面菌落，僅有少部分被推除而大部分皆牢牢附著於洋菜膠表面，且可看到菌絲侵入洋菜膠內。另一對照組 HLC54 菌落表面呈圓形平滑狀，經流水沖刷可輕易洗掉菌落，且無菌絲侵入洋菜膠內。圖三十六<A>為實驗組 *CaORF19.6586* 各突變株之試驗結果，結

果顯示與其 Parental strain SC5314 一樣，可看到大部分的菌落皆殘留在洋菜膠表面，且有菌絲侵入膠內；圖三十六<B>為實驗組 *CaRHD3* 各突變株之試驗結果，與其 Parental strain HLC54 相同，在經流水沖洗以及推除菌落後，洋菜膠表面皆無菌落殘留，且無菌絲侵入膠內。

#### 4.4.6 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibilities test)

依據 CLSI M27-S3 描述控制組 YLO6、YLO7、YLO12 在各藥物之 MIC 範圍 (Miconazole 未有資料)，確保實驗操作。參考 CLSI M27-A3 配置十個梯度的藥物濃度：Fluconazole 為 0.125~64  $\mu\text{g/ml}$ 、Amphotericin B 為 0.0313~16  $\mu\text{g/ml}$ 、Voriconazole 為 0.0156~8  $\mu\text{g/ml}$ 、Miconazole 為 0.0078~4  $\mu\text{g/ml}$  (Robert M. Bannatyne *et al.*, 1978)、Micafungin 為 0.0039~4  $\mu\text{g/ml}$ 。

**CaORF19.6586** 如圖三十七<A>所示，各 mutant 菌株對於 Fluconazole 相較於野生株 SC5314 趨勢相同，而 HLC54 在濃度 0.125~0.5  $\mu\text{g/ml}$  時感受性明顯不同；圖三十七<B>所示，對於 Amphotericin B 各 mutant 菌株敏感性與野生株 SC5314 趨勢相同；圖三十七<C>所示，各 mutant 菌株對於 Voriconazole 相較於野生株 SC5314 趨勢相同；圖三十七<D>所示，對於 Miconazole 各 mutant 菌株在濃度 0.0078~0.0313  $\mu\text{g/ml}$  的感受性相較於野生株 SC5314 與 HLC54 不同，但之後趨勢相同；圖三十七<E>所示，對於 Micafungin 在濃度 0.0039~0.0078  $\mu\text{g/ml}$  時各 mutant 菌株對藥物的感受性有明顯差別，但之後趨勢相同。

**CaRHD3** 如圖三十八<A>所示，各 mutant 菌株對於 Fluconazole 的感受性在濃度 0.25~0.5  $\mu\text{g/ml}$  時與 HLC54 不同，但之後趨勢相同；圖三十八<B>所示，對於 Amphotericin B 各 mutant 菌株趨勢上

HLC54 相同；圖三十八<C>所示，對於 Voriconazole 各 mutant 菌株趨勢與 HLC54 相同；圖三十八<D>所示，對於 Miconazole 各 mutant 菌株趨勢與 HLC54 相同；圖三十八<E>所示，對於 Micafungin 各 mutant 菌株趨勢與 HLC54 相同。

**CaGRE2** 如圖三十九<A>所示，對於 Fluconazole 各 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同；圖三十九<B>所示，對於 Amphotericin B 各 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同；圖三十九<C>所示，對於 Voriconazole 各 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同；圖三十九<D>所示，對於 Miconazole 雙基因剔除株 *CaGRE2* HO6 在濃度 0.0078~0.0313  $\mu\text{g/ml}$  感受性明顯不同於野生株 SC5314，而後之趨勢與 SC5314 相同，其餘 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同；圖三十九<E>所示，對於 Micafungin 各 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同。

**CaORF19.173** 如圖四十<A>所示，對於 Fluconazole 各 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同；圖四十<B>所示，對於 Amphotericin B 各 mutant 菌株由於誤差值過大，因此判斷與野生株 SC5314 的敏感性是相同的；圖四十<C>所示，對於 Voriconazole 各 mutant 菌株與野生株 SC5314 相同；圖四十<D>所示，對於 Miconazole *CaORF19.173* RE1 在濃度 0.0078~0.0625  $\mu\text{g/ml}$  之間的感受性與野生株 SC5314 不同，在 0.0625~0.125  $\mu\text{g/ml}$  之後的趨勢與野生株 SC5314 較為一致，而 *CaORF19.173* HO1 在濃度 0.0078~0.00156  $\mu\text{g/ml}$  之間的感受性與野生株 SC5314 不同，在 0.00156  $\mu\text{g/ml}$  之後的趨勢與野生株 SC5314 較為一致，而其餘 mutant 菌株趨勢與野生株 SC5314 相同；圖四十<E>所示，對於 Micafungin 各 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同。

CaORF19.7310 如圖四十一<A>所示，對於 Fluconazole *CaORF19.7310* HO1 在濃度0.125~2 µg/ml 之間的感受性與野生株 SC5314 不同，之後趨勢相同，其餘 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同；圖四十一<B>所示，對於 Amphotericin B 由於誤差值的關係影響感受性趨勢，判斷與野生株 SC5314 趨勢相同；圖四十一<C>所示，對於 Voriconazole 各 mutant 菌株趨勢上與野生株 SC5314 相同；圖四十一<D>所示，對於 Miconazole 各 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同；圖四十一<E>所示，各 mutant 菌株與野生株 SC5314 趨勢相同。





## 五、討論

本論文的研究由三部分組成，第一部分為延續實驗室前人 (方睿賢, 2011) 利用基因表現比對 (expression profiling) 比較白色念珠菌野生株 SC5314、*cph1/cph1* 剔除株和 *efg1/efg1* 剔除株三者下游基因表現量，找出可能受轉錄因子 Cph1p 或者 Efg1p 調控，與菌絲生長調控相關而有表現量不同的基因：*CaORF19.173* 及 *CaORF19.7310* 進行基因剔除，並測試性狀相關特性分析，結果皆顯示與野生株 SC5314 相同。以及前實驗室助理所剔除之基因 *CaORF19.3150 (GRE2)* 所測試的性狀分析，也是顯示與野生株 SC5314 相同。由於轉錄因子 Efg1p 所調控的基因不僅與細胞型態轉變相關，也負向調控麥角固醇 (ergosterol) 生合成路徑基因 *ERG11* 的表現，進而影響白色念珠菌的抗藥性 (Lo *et al.*, 2005)；加上前人 (蕭婷尹, 2006；李淑萍, 2009) 利用實驗室所作抑制刪除雜交法 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 篩選到可能與致病力或調控菌絲生長相關的糖解酵素基因，研究結果推測致病力/型態變化及藥物感受性途徑有關聯。因此在本實驗中首先檢驗前人所留下之菌株 construction 是否正確後，進行藥物敏感性的測試，希望連結型態變化與藥物敏感性之間的關係。第二部分為實驗室前人陳柏伶 (2010) 承襲林啟陽 (2001) 之實驗研究：利用 SSH 比對野生株 SC5314 和不具毒性及型態轉變能力之菌株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 之間在有血清的誘發下兩者基因表現情形，篩選到 *CaORF19.5305 (RHD3)* 在 HLC54 中的表現量遠大於 SC5314，因此陳藉由剔除和提高 *CaRHD3* 表現量觀察對白色念珠菌所造成的影響以進一步探討基因功能。在型態轉變方面的測試結果和野生株 SC5314 無差別，而表現量也只能提高至與野生株的程度，且在型態轉變上和野生株 SC5314 並無差異。由於 *CaRHD3* 是在

HLC54 中表現量大增，因此在本實驗中於 HLC54 剔除 *CaRHD3*，並測試型態轉變相關試驗以及藥物的敏感性，進一步探討 *CaRHD3* 在白色念珠菌中所扮演的腳色。第三部分為我利用基因表現比對 (expression profiling) 挑選在 *cph1/cph1 efg1/efg1* 剔除株下游表現量不同的一個與抗藥性相關基因 *CaORF19.6586*，希望藉由 SAT1 cassette 系統剔除 *CaORF19.6586*，並進行性狀分析以及藥物敏感性的測試來研究此基因在白色念珠菌中的功能。以下就各基因做分別論述。

## 5.1 剔除 *CaORF19.6586* 的探討

### 5.1.1 生長情形之探討

由圖三十一<A>、<B>及<C>可知，*CaORF19.6586* 各突變株之生長速率的趨勢大致與野生株 SC5314 相同且倍增時間相差小於 0.2，不過單套基因剔除株 HE1、HE2 及野生株 SC5314 在第十二個小時開始生長相較於其他 mutant 株差了 0.7 O.D 值以上，反而雙套基因剔除株 HO1、HO2 及單套基因回復株 RE2、RE3 從第十二個小時後皆高於野生株 SC5314，顯示剔除 *CaORF19.6586* 對於生長速率還是有些微影響。

### 5.1.2 芽管試驗之探討

由圖三十三<A>所示，對照組野生株 SC5314 在培養三小時觀察，已可以看到芽管的生成；菌株 HLC54 則是在血清誘發情形下仍然沒有芽管生成而呈現 yeast form。實驗組 *CaORF19.6586* 各 mutant 株，同樣培養三小時後觀察，也是可以看到芽管的產生。因此在剔除 *CaORF19.6586* 並不影響白色念珠菌生成芽管的能力。

### 5.1.3 含 4% FBS 之 YPD 培養基菌落型態之探討

實驗目的在於觀察在含有碳源、氮源培養環境並且以血清和 37°C 誘發下菌絲生成的能力，若會形成菌絲，菌落表面會呈現皺褶狀 (Braun and Johnson, 2000; Berman and Sudbery, 2002)。如圖三十四<A>所示，野生株 SC5314 有菌絲生成的能力，菌落呈現不規則的皺摺狀；而菌株 HLC54 則無菌絲生成的能力，菌落呈現圓形且光滑。實驗組 *CaORF19.6586* 各 mutant 株之菌落表面皆呈現不規則的皺摺狀，顯示剔除 *CaORF19.6586*，並不影響在此培養條件下的菌落型態。

#### 5.1.4 含 4% FBS 之 Bacto agar 培養基菌落型態之探討

實驗目的在於觀察在低碳源和低氮源培養環境並且以血清和 37°C 誘發下，菌絲生成的能力。如圖三十五<A>所示，野生株 SC5314 菌落周圍可以看到呈放射狀的菌絲生成；而菌株 HLC54 則無菌絲生成的能力，菌落周圍平滑且大致呈圓形。在實驗組部分，*CaORF19.6586* 各 mutant 株可觀察到菌絲呈現與野生株相同的放射狀表現。顯示剔除 *CaORF19.6586* 並不影響在此培養條件下的菌落型態。

#### 5.1.5 侵犯力測試之探討

由圖三十六<A>的結果顯示，野生株 SC5314 經流水沖洗後菌落依然附著在洋菜膠表面，再戴手套試圖將推除菌落，僅有些微表面的菌落被推除，大部分為牢牢附著在洋菜膠表面且可看到膠體內有菌絲侵入；而菌株 HLC54 則無生長菌絲侵入洋菜膠的能力，菌落皆能夠被洗刷掉。實驗組 *CaORF19.6586* HO1 菌落經流水沖刷後比野生株 SC5314 較容易推除表面菌落，但仍然有部分菌落附著在洋菜膠表面，且推除的菌落處可觀察到依然有侵入膠體的能力，因此剔除 *CaORF19.6586*，會些微影響菌絲入侵洋菜膠的能力。

#### 5.1.6 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibility test) 的探討

實驗目的在於探討剔除 *CaORF19.6586* 後對藥物的敏感性是否有影響，進而連結與型態變化/致病力的相關性。由結果圖三十七<D>顯示，實驗中所使用的三種 azole 類藥物只有 miconazole 對剔除 *CaORF19.6586* 在低濃度 (0.0078~0.0313  $\mu\text{g/ml}$ ) 之間的感受性有所影響，推測可能是藥物結構專一性的結果所致；另外由圖三十七<E>顯示，對 micafungin 在低濃度 (0.0039~0.0078  $\mu\text{g/ml}$ ) 之間的感受性也是有所差異，由於此藥物是抑制細胞壁的合成，推測可能是由於實驗步驟是先將藥盤配置好才加菌，而濃度 0.0039  $\mu\text{g/ml}$  對於 *CaORF19.6586* 剔除株可能菌量大過於藥物量，也可能是剔除株確實敏感性較低所致，但 0.0078  $\mu\text{g/ml}$  之後菌幾乎皆已死亡，表示藥物確實抑制 *CaORF19.6586* 剔除株之細胞壁的合成。

## 5.2 剔除 *CaRHD3* 的探討

### 5.2.1 生長情形之探討

由圖三十二<A>、<B>及<C>可知，*CaRHD3* 各 mutant 株之生長速率的趨勢與菌株 HLC54 相同且倍增間相差小於 0.1，而野生株在第十二個小時開始生長相較於其他 mutant 株差了兩倍 O.D 值以上。顯示剔除 *CaRHD3* 對於生長速率無影響。

### 5.2.2 芽管試驗之探討

由圖三十三<B>所示，菌株 HLC54 在血清誘發情形下仍然沒有芽管生成而呈現 yeast form，而對照組野生株 SC5314 在培養三小時觀察，已可以看到芽管的生成；實驗組 *CaRHD3* 各 mutant 株，同樣培養三小時後觀察，並無看到芽管的產生，而和 HLC54 一樣呈現 Yeast form。因此剔除 *CaRHD3* 並不會使白色念珠菌生成芽管的能力。

### 5.2.3 含 4% FBS 之 YPD 培養基菌落型態之探討

如圖三十四<B>所示，菌株 HLC54 則無菌絲生成的能力，菌落呈現圓形且光滑；對照組野生株 SC5314 有菌絲生成的能力，菌落呈現不規則的皺摺狀。實驗組 *CaRHD3* 各 mutant 株之菌落表面皆呈現圓形且光滑，顯示剔除 *CaRHD3*，並不會在此培養條件下影響菌落型態。

### 5.2.4 含 4% FBS 之 Bacto agar 培養基菌落型態之探討

如圖三十五<B>所示，菌株 HLC54 則無菌絲生成的能力，菌落周圍平滑且大致呈圓形；而對照組野生株 SC5314 菌落周圍可以看到呈放射狀的菌絲生成。在實驗組部分，*CaRHD3* 各 mutant 株可觀察到菌絲呈現與 HLC54 相同的平滑且圓形表現。顯示剔除 *CaRHD3* 並不會在此培養條件下影響落型態。

### 5.2.5 侵犯力測試之探討

由圖三十六<B>的結果顯示，野生株 SC5314 經流水沖洗後菌落依然附著在洋菜膠表面，再戴手套試圖將推除菌落，僅有些微表面的菌落被推除，大部分為牢牢附著在洋菜膠表面且可看到膠體內有菌絲侵入；而菌株 HLC54 則無生長菌絲侵入洋菜膠的能力，菌落皆能夠被洗刷掉。實驗組 *CaRHD3* 各 mutant 株之結果與 HLC54 相同，菌落經流水沖刷後已可將大部分菌株洗掉，在推除剩餘表面菌落，所有菌落皆完全被移除，且無菌絲侵入膠內殘留的現象，因此，剔除 *CaRHD3*，並不會產生皺摺、生成菌絲並入侵洋菜膠的能力。

### 5.2.6 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibility test) 的探討

實驗目的在於探討在 HLC54 中剔除 *CaRHD3* 後對藥物的敏感性是否有影響，進而連結與型態變化/致病力的相關性。由結果圖三

十八<A>顯示，對 Fluconazole 在濃度 0.25~0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時各 mutant 菌株之感受性有所差異，而在之後的濃度趨勢上與其 Parental strain HLC54 一樣，雖然因操作上導致的誤差值或許影響判斷結果，但經過單獨以 HLC54 與雙基因剔除株比較時，可明顯看出差異，推測可能藥物結構專一性所致；而對於其他藥物的敏感性則與 HLC54 的趨勢相同沒有差異。

### 5.3 *CaGRE2* 的探討

#### 5.3.1 以南方點墨法檢驗 *CaGRE2* 各突變株建構之探討

*CaGRE2* 以酵素組合 (*Nru*I 及 *Pst*I) 作用於 Wild-type (SC5314) 預期偵測到 2 kbs 的片段，作用於 knock-out allele 且 pop-out 預期會偵測到約 1.4 kbs 的片段，如圖二十五<B>底片結果顯示各突變株皆符合預期。以酵素組合 (*Hpa*I 及 *Nci*I) 作用於 Wild-type (SC5314) 預期偵測到 3 kbs 的片段，作用於 knock-out allele 且 pop-out 預期會偵測到約 2.4 kbs 的片段，如圖二十六<B>底片結果顯示各突變株所產生的片段包含於 marker 標記 3530 bp 和 2027 bp 之間。

#### 5.3.2 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibility test) 的探討

實驗目的在於探討在野生株 SC5314 中剔除 *CaGRE2* 後對藥物的感受性是否有影響，進而連結與型態變化/致病力的相關性。由結果圖三十九<D>顯示，雙基因剔除株 *CaGRE2* HO6 對 miconazole 於濃度 0.0078~0.0625  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之間與野生株 SC5314 有明顯差異，推測可能是一開始菌量就比較多，或是藥物結構專一性所致。而其他藥物之敏感性結果與野生株 SC5314 相同。

### 5.4 *CaORF19.173* 的探討

#### 5.4.1 以南方點墨法檢驗 *CaORF19.173* 各突變株建構之探討

*CaORF19.173* 以酵素 (*Swa* I) 作用於 Wild-type (SC5314) 預期偵測到 4.3 kbs 的片段，作用於 knock-out allele 且 pop-out 預期會偵測到約 1.5 kbs 的片段，作用於完整單套基因回復株預期會偵測到約 4.7 kbs 的片段。如圖二十七<B>底片結果顯示各突變株皆符合預期。以酵素 (*Bsa* BI) 作用於 Wild-type (SC5314) 預期偵測到 4.9 kbs 的片段，作用於 knock-out allele 且 pop-out 預期會偵測到約 2 kbs 的片段，作用於完整單套基因回復株預期會偵測到約 5.3 kbs 的片段。如圖二十八<B>底片結果顯示各突變株皆符合預期。

#### 5.4.2 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibility test) 的探討

實驗目的在於探討在野生株 SC5314 中剔除 *CaORF19.173* 後對藥物的敏感性是否有影響，進而連結與型態變化/致病力的相關性。結果圖四十<D>顯示，雙基因剔除株 *CaORF19.173* HO1 對 miconazole 在濃度 0.0078~0.0156  $\mu\text{g/ml}$  之間與野生株 SC5314 有明顯差異；單套基因回復株 *CaORF19.173* RE1 在濃度 0.0078~0.0625  $\mu\text{g/ml}$  之間與野生株 SC5314 有明顯差異；由於 HO1 及 HO2 和 RE1 及 RE2 彼此皆有差異，推測可能是操作上的誤差造成，使得 HO1 及 RE1 相較於野生株 SC5314 確實有差別。而其餘藥物敏感性皆與野生株 SC5314 相同。

### 5.5 *CaORF19.7310* 的探討

#### 5.5.1 以南方點墨法檢驗 *CaORF19.7310* 各突變株建構之探討

*CaORF19.7310* 以酵素 (*Bam* HI) 作用於 Wild-type (SC5314) 預期偵測到 2821 bp 的片段，作用於 knock-out allele 且 pop-out 預期

會偵測到約 1469 bp 的片段，作用於完整單套基因回復株預期會偵測到約 3431 bp 的片段。如圖二十九<B>底片結果顯示各突變株皆符合預期，而野生株的片段有包含在 3530 bp 及 2027 bp 之間。以酵素 (*Bsa* BI) 作用於 Wild-type (SC5314) 預期偵測到 4.4 kbs 的片段，作用於 knock-out allele 且 pop-out 預期會偵測到約 2.5 kbs 的片段，作用於完整單套基因回復株預期會偵測到約 5 kbs 的片段。如圖三十<B>底片結果顯示各突變株皆符合預期，而 knock-out allele 且 pop-out 的片段包含於 3530 bp 和 2027 bp 之間。

### 5.5.2 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測試各突變株對藥物之敏感性 (Drug susceptibility test) 的探討

實驗目的在於探討在野生株 SC5314 中剔除 *CaORF19.7310* 後對藥物的敏感性是否有影響，進而連結與型態變化/致病力的相關性。結果圖四十一<A>顯示，雙基因剔除株 *CaORF19.7310* HO1 對 fluconazole 在濃度 0.125~2 µg/ml 之間與野生株 SC5314 不同，推測原因，由於另一雙基因剔除株 HO2 與野生株 SC5314 感受性並無差別，所以可能是操作上的誤差所致。而其他藥物的感受性與野生株 SC5314 相同。

## 5.6 結語

本實驗目的是因為藉由前人所篩選得到之基因以及我所選之基因，在利用 *SAT1* flipper cassette 系統剔除目標基因後，所做的相關性狀分析以及對於藥物敏感性的測試能夠做連結，以進一步了解目標基因在白色念珠菌中所扮演的角色。在型態轉變上的測試中，*CaORF19.6586* 雙基因剔除株 HO2 附著於洋菜膠表面的能力較弱於野生株 SC5314，但仍然具有入侵膠體的能力；加上在對藥物



miconazole 測試中，於低濃度 0.0078~0.0313 µg/ml 之間的敏感性相較於野生株 SC5314 有差異，對 micafungin 於 0.0039~0.0078 µg/ml 相較於野生株 SC5314 有差異。雖然剔除 *CaORF19.6586* 僅對 invasion ability 有差異，但對藥物敏感性確實是有關連性的。而 *CaRHD3* 在型態變化上接與其 Parental strain HLC54 皆無差別，但對 fluconazole 在 0.25~0.5 µg/ml 相較於野生株 SC5314 的敏感性是有差別的，所以剔除 *CaRHD3* 在型態變化與藥物敏感性沒有直接的相關性。另外，*CaGRE2*、*CaORF19.173* 及 *CaORF19.7310* 則是分別對 miconazole 及 fluconazole 相較於野生株 SC5314 有差異，因此在型態變化與藥物敏感性也是沒有直接的相關性。

## 5.7 未來展望

由於前人所挑選以及我挑選的基因，都是來自受 transcription factor Cph1p、Efg1p 所調控的下游基因，可能影響菌絲生長。但實驗結果皆與各基因之 parental strain 相同，可能是因為 *EFG1* 不僅與型態變化有關，也參與了 chlamyospore 的形成、biofilm 的形成、黏附力和調控代謝蛋白有關的基因 (Biswas *et al.*, 2007)，所以未來可以嘗試以上測試或是依據現有文獻推測相關環境影響因子，設計更深入研究的實驗。另外，由於藥物敏感性的結果，也可挑選在特定濃度有差別的藥物，測試在不同的時間點內觀察藥物作用效果。

## 六、參考文獻

- 方睿賢 (2011) 交大碩士論文。探討剔除白色念珠菌 *CaORF19.7310* 和 *CaORF19.173* 對白色念珠菌型態變化之影響
- 李啟陽 (2001) 交大碩士論文。白色念珠菌抗毒性相關之研究
- 李淑萍 (2009) 交大碩士論文。白色念珠菌 *CaGPM1* 醣解酵素基因對細胞型態及抗藥性之影響
- 吳佳真 (2009) 交大碩士論文。熱帶念珠菌失去異和子性導致 5-Flucytosine 抗藥性及鑑別 *CaNDT80* 活化區重要胺基酸之研究
- 陳柏伶 (2010) 交大碩士論文。探討剔除 *RHD3* 對白色念珠菌型態變化之影響
- 蔡馨儀 (2009) 交大碩士論文。探討剔除白色念珠菌 *ENG1* 之影響
- 蕭婷尹 (2006) 交大碩士論文。白色念珠菌之致病力/型態變化及抗藥性可經由麥角固醇生合成及醣解酵素基因進行協同調控
- 謝志豪 (2006) 交大碩士論文。白色念珠菌 *ENG1* 與細胞型態之關聯
- Adriana G. A. and Alejandra A. C. (1999) Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST* 15(10A):879-92.
- Bennett, R.J., and Johnson, A.D. (2005). Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* 59, 233-255.
- Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 9, 595-601.
- Bethann, S. H., Suzanne, M. N. and Alexander, D. J. (2005) Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence.

*Mol Biol Cell*16(10):4814-26

Biswas, K and Mprschhauser, 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 Rev.* 71, 348-376

Bocknühl, D.P. and Ernst, J.F. (2001) A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* 157, 1523-1530

Braun, B. R. and Johnson, A.D. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* 277:105–109.

Brown, A.J., Gow, N.A. (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 7, 333-338

Cloutier, M., Castilla, R., Bolduc, N., Zelada, A., Martineau, P., Bouillon, M., Magee, B.B., Passeron, S., Giasson, L., Cantore, M.L. (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

de Boer, A.D., de Groot, P.J., Günther, W., Martin, S., Dietmar, R., Rosalía Diez-Orejas, Frans, M. K., de Koster, C.G., Henk, L., Dekker, U. G., Oliver, B. and Michael, W. (2010) The *Candida albicans* cell wall protein Rhd3/Pga29 is abundant in the yeast form and

- contributes to virulence. *Yeast* 27(8):611-24
- de Groot, P.W., Hellingwerf, K.J. and Klis, F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20(9):781-96
- Ding, C. and Butler, G. (2007). Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* 6, 1310-1319.
- Ernst, J. F. (2000) Transcription factors in *Candida Albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146 (Pt 8) (1763-74)
- Forche, A., May, G., and Magee, P.T. (2005). Demonstration of loss of heterozygosity by single-nucleotide polymorphism microarray analysis and alterations in strain morphology in *Candida albicans* strains during infection. *Eukaryot Cell* 4, 156-165.
- Garaizar, J., Brena, S., Bikandi, J., Rementeria, A., and Ponton, J. (2006). Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 6, 987-998.
- García-Sánchez, S., Mavor, A.L., Russell, C.L., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, P. and Alistair J.P.B (2005) Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 16(6):2913-25
- Ghannoum, M. A. and Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12,

501-17.

- Gown, A., Gooday, G.W. (1982) Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 128, 2187-2194
- Groll, A.H., De Lucca, A.J., Walsh, T.J. (1998a) Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol.* 6(3):117-24.
- Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, T.G., and Vilgalys, R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 93, 12473-12477.
- Groll, A.H., Piscitelli, S.C., Walsh, T.J. (1998b) Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv Pharmacol.* 44.343-500.
- Hseuh, P.R., Chen, M.L., Sun, C.C., Chen, W.H., Pan, H.J., Yang, L.S., Chang, S.C., Ho, S.W., Lee, C.Y., Hsieh, W.C., and Luh, K.T. (2002) Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. *Emerging Infections Disease*, 8(1), 63-8
- Jack, D.B. (1998) The search for new antifungal drugs and strategies continues. *Drug News Perspect.* 11(5):306-9.

- Karin, V., Daniel, S., Gilles, L., Sébastien, L., Michel, B. T. and Jean, L. (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276(11):8469-74
- Köhler, J. and Fink, G.R. (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13223-13228
- Lan, C.Y., Gabriel, R., Murillo, L.A., Ted, J., Davis, R.W., Jan, D., George, N. and Nina, A. (2004) Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 53(5):1451-69
- Lengeler K.B., Davidson, R.C., D'souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., 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., Styles, C.A., Fink, G.R. (1993) Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science.* 262, 1741-1744
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Mahir, K., Coste, A.T., Béne'dicte, R., Jacques, B., and Dominique, S. (2004) Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 48(8):3064-79

- Mark, R., Laura, S., David, S., Jan, W., Zhikang, Y., Susan, M.N., Jonathan, C., Emma, M. S. and Alistair, J.P. B. (2008) MNL1 regulates weak acid-induced stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 19(10):4393-403
- Mattia, E., Carruba, G., Angiolella, L. and Cassone, A. (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
- Murad, A.M., Christophe d'Enfert, Claude, G., Tournu, H., Tekai, F., Talibi, D., Daniel, M., Ve´ronique, M., Jane, C. and Alistair, J.P.B. (2001) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* 42(4):981-93
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. (2000) Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(3):747-51
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhauser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341, 119-127.
- Rustchenko-Bulgac, E.P., Sherman, F., and Hicks, J.B. (1990). Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 172, 1276-1283.

- Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J. and Bille, J. (2003a). Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* 48, 959-76.
- Sanglard, D. and Odds, F. C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2, 73-85.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., Ernst, J.F. (2000) Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 35, 386-396
- Sato, T., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T. (2004) Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substrate in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 751-751
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E., Ernst, J.F. (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* 16, 1982-1991
- Sung, P. and Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 739-750.
- Thompson, D.A. and Stahl, F.W. (1999). Genetic control of recombination partner preference in yeast meiosis. Isolation and characterization



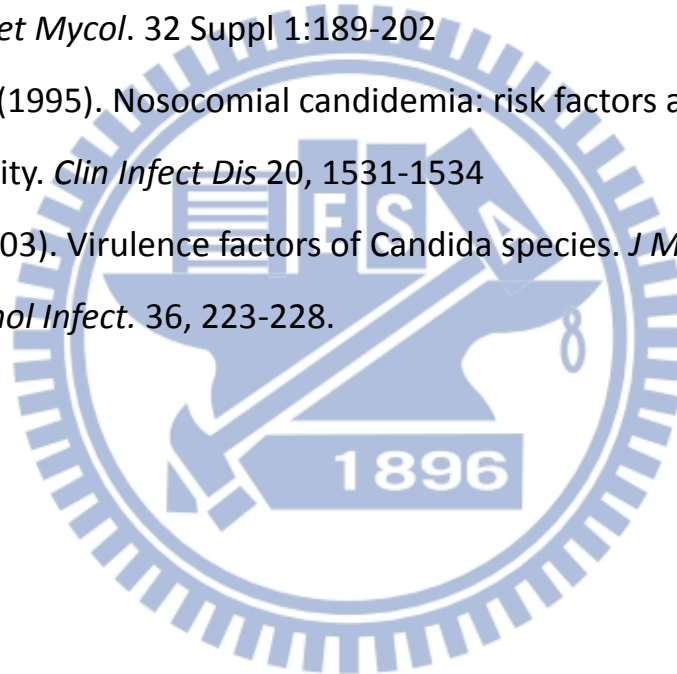
of mutants elevated for meiotic unequal sister-chromatid recombination. *Genetics* 153, 621-641.

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

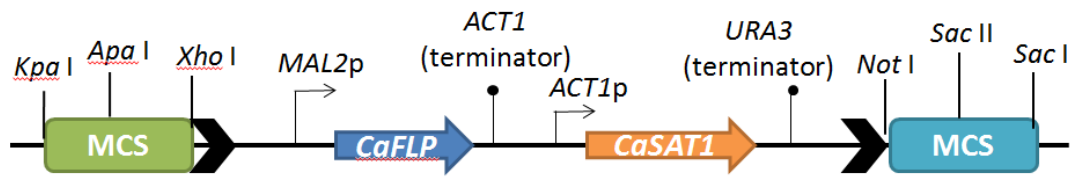
Vanden, B.H., Warnock, D.W., Dupont, B., Kerridge, D., Sen, G.S., Improvisi, L., Marichal, P., Odds, F.C., Provost, F., Ronin, O. (1994) Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol.* 32 Suppl 1:189-202

Wenzel, R.P. (1995). Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 20, 1531-1534

Yang, Y.L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.* 36, 223-228.



## SAT1 flipper cassette of plasmid pSFS-SAT1



➤ minimal FLP recombination target sequence (FRT)

圖一、SAT1 flipper cassette 示意圖。整個 cassette 存在於質體 pSFS-SAT1，具有一個 ACT1 promoter 調控表現的藥物篩選標記 CaSAT1，可抵抗藥物 Nourseothricin；而 MAL2 promoter 所調控的 CaFLP 在培養環境以 maltose 為碳源時，會誘發 MAL2 promoter 轉錄 CaFLP，進而產生 site-specific recombinase 並結合到 cassette 上下游所帶有的特定序列 FRT (minimal FLP recombination target sequence)，進行 site-specific recombination 將 cassette pop-out，只留下一個 FRT 序列及上下游兩端的 MCS (multiple cloning site)。

## Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XP_721422.1	hypothetical protein CaO19.6586 [Candida albicans SC5314] >ref XP	622	622	100%	0.0	100%	<a href="#">G</a>
XP_002421346.1	conserved hypothetical protein [Candida dubliniensis CD36] >emb C	219	219	99%	3e-65	61%	<a href="#">G</a>

## XP: Derived protein

> [ref|XP\\_002421346.1](#) [G](#) conserved hypothetical protein [Candida dubliniensis CD36]  
[emb|CAX40680.1](#) [G](#) conserved hypothetical protein [Candida dubliniensis CD36]  
 Length=351

GENE ID: 8049313 CD36\_71260 | hypothetical protein [Candida dubliniensis CD36]

Score = 219 bits (557), Expect = 3e-65, Method: Compositional matrix adjust.  
 Identities = 220/358 (61%), Positives = 257/358 (72%), Gaps = 55/358 (15%)

```

Query 3    SSQPQMSFAQTYILASKVRSKLTREAQSPKSSLRNLVVQANMLDNIMDYISDETKRRTSE 62
           SSQPQMSFAQTYILASKVRSKLTREAQSPKSSLRNLVVQANMLDNIMDYISDETK+RT+
Sbjct 2    SSQPQMSFAQTYILASKVRSKLTREAQSPKSSLRNLVVQANMLDNIMDYISDETKRRTT 61

Query 63    KLTSKNTIQKSSSGYLSPESSMVQFAPT+PVRQAYKTSITEYEIDSDDSSDDEEEEEEDHE 122
           ++ + S + S +VQFAPTP+RQAYKTSITEYEIDSDDSD++EEEEEE+ +
Sbjct 62    TTSTGKLSSSSYNKNSHESSVIVQFAPTPIRQAYKTSITEYEIDSDDSSDEEEEEEEEDD 121

Query 123   DDNEDDYFYEDGQNDYDDLDDYEDSVVMEQDELAAIKGVYY-----EEDQEEEEEDNLSE 177
           ED+ D +DL+DYEDS+VMEQDELAAIKGVYY +E+ +E E+DNLSE
Sbjct 122   YFYEDE-----DLEDLEDYEDSIVMEQDELAAIKGVYYEEDQEDEENQENEDDNLSE 173

Query 178   T---SSIYNSSDSDLDSDSDEYIYSDSDEIIEENNAIEATIPRNFKSLSI VPPPSST 234
           T S ++S S DSDS+YIYSDSDEIIEENNAIEATIPR+FKSLSI S++
Sbjct 174   TSSVYNSNSSSLSDDSDSDYIYSDSDEIIEENNAIEATIPRSFKSLSIKSTSSST 233

Query 235   TSSTTSTIQSP----LPS-IVRSNSTPITITSLHTIDEQQEIEEEKQPE----- 278
           +SS+ ++ +P PS IVR NSTPITITSLHTIDEQQE+EEK+ +
Sbjct 234   SSSSQTSESTPESLSSPSTIVRYNSTPITITSLHTIDEQQEVEEEKQPPPPPPQEE 293

Query 279   ----LLHENNQ-----TIDWK-----LKNHNHPQSLYKQNIQLDQFF 313
           LLLH+N Q TIDWK L + + QS YKQNIQLDQFF
Sbjct 294   EEELLLHKNQTNNNKLDQITIDWKKSNVNLVNLVNLVNLVNLVNLVNLVNLVNLVNLV 351

```

## 圖二、CaOrf19.6586p 胺基酸 (313 a.a) 與 Candida dubliniensis CD36

XP\_002421346 胺基酸 (351 a.a) 在 NCBI 資料庫中的比對結果。

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
36269	unnamed protein product	42.7	42.7	34%	9e-10	41%	

```
>lcl|36269 unnamed protein product
Length=313
```

```
Score = 42.7 bits (99), Expect = 9e-10, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 24/58 (41%), Positives = 34/58 (59%), Gaps = 4/58 (7%)
```

```
Query 70 LSSMSPYMTIPQQYLYISKIRSKLSQCALTRHHHRELDLRKMVGHANMLDRILDEIDE 127
+SS P M+ Q Y+ SK+RSKL++ A + LR +V ANMLD I+D I +
Sbjct 1 MSSSQPQMSFAQTYILASKVRSKLTREA----QSPKSSLRNLVVQANMLDNIMDYISD 54
```

圖三、CaOrf19.6586p 胺基酸 (313 a.a) 與啤酒酵母菌 ScYjr115p 胺基酸 (169 a.a) 在 NCBI 資料庫中的比對結果。



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">XP_717108.1</a>	hypothetical LDG family protein 7 [Candida albicans SC5314] >ref XP	<a href="#">404</a>	404	100%	1e-141	100%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XP_002420038.1</a>	uncharacterized cell wall protein, putative [Candida dubliniensis CD36]	<a href="#">333</a>	333	100%	1e-113	88%	<a href="#">G</a>

XP: Derived protein

```
> ref|XP\_002420038.1| G uncharacterized cell wall protein, putative [Candida dubliniensis CD36]
  emb|CAX42256.1| G uncharacterized cell wall protein, putative [Candida dubliniensis CD36]
  Length=203

  GENE ID: 8047874 CD36 43810 | uncharacterized cell wall protein, putative [Candida dubliniensis CD36]

  Score = 333 bits (855), Expect = 1e-113, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 180/204 (88%), Positives = 189/204 (93%), Gaps = 1/204 (0%)

  Query 1   MKFLAILSLSLSSALATISSIQLFAKSDDSKVDGLGLYSKHEGAAIDYFLGKNGADLKYD 60
  Sbjct 1   MKFLAILSLSLSSALATISSIQLFAKSDDSKVDGLGLYSKHEGAAIDYFLGKNGADLKYD 60

  Query 61  DEKKQIFQELKTSITVRQSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGTLSFTGDDKVYASKN 120
  Sbjct 61  DEKKQI+QELKT+S+TVRQSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINKDGTLSFTGDDKV+ASKN 120

  Query 121 VNDPYRYSESEYAVSNKTTDDSAPIITIVAKFSDDKAAETSGVAQAASSSAGPAQASVSNF 180
  Sbjct 121 VNDPY YS SEYAVSNK+TDDSAPIITIVAKF+D AA +S ASSSA QA+VSNF 179

  Query 181 EGAAGQNKLSYGVGMAAVVAGLVM 204
  Sbjct 180 EGAAGQNKLSYGVGMAAVVAGLVL 203
```

圖四、CaRHD3p 胺基酸 (204 a.a) 與 Candida dubliniensis CD36 未知 Cell wall protein 胺基酸 (203 a.a) 在 NCBI 資料庫中的比對結果



## Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">GAA26181.1</a>	K7_Gre2p [Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7]	256	256	98%	3e-79	39%	
<a href="#">EEU07090.1</a>	Gre2p [Saccharomyces cerevisiae JAY291]	256	256	98%	3e-79	39%	
<a href="#">EGV61575.1</a>	NAD(P)-binding protein [Candida tenuis ATCC 10573]	255	255	98%	3e-79	40%	
<a href="#">EDN63727.1</a>	conserved protein [Saccharomyces cerevisiae YJM789] >qb EDV104	256	256	98%	4e-79	39%	

> [gb|EEU07090.1|](#) Gre2p [Saccharomyces cerevisiae JAY291]  
Length=342

Score = 256 bits (654), Expect = 3e-79, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 135/344 (39%), Positives = 210/344 (61%), Gaps = 12/344 (3%)

```

Query 5   TVFVIGATGYIAQHIIKQLLSKGYSVIGSVRSQSKGEQLKELITAHHQDITGDAKFDYVI 64
          +VFV+GA G+IAQHI+ LL + Y VIGS RSQ K E L E + F I
Sbjct 2   SVFVSGANGFIAQHIVDLLKEDYKIVIGSARSQEKAENLTEAFG-----NNPNFSMEI 54

Query 65  VESLIEPGAFDSILQNH-KEVGVFIHSASPIPFATDSVEKDILQPAIDGTKNVLTSIKKY 123
          V + AFD + Q H KE+ + +H+ASP F E+D+L PA++G K +L SIKKY
Sbjct 55  VPDISRLDAFDHVFQKHGKEIKIVLHTASPFCDITDSDERDLLIPAVNGVKGILHSIKKY 114

Query 124 GNENIKKLVITSSIAAVEPLGTGQTEPKTISEKDWNPITFEQGLANPAVAYYASKTLAER 183
          ++++++V+TSS AAV + + T +E+ WNP T+E ++P AY SK AE+
Sbjct 115 AADSVERVVLTSYAAVFDMAKENDKSLTFNEESWNPATWESCQSDPVSAYCGSKKFAEK 174

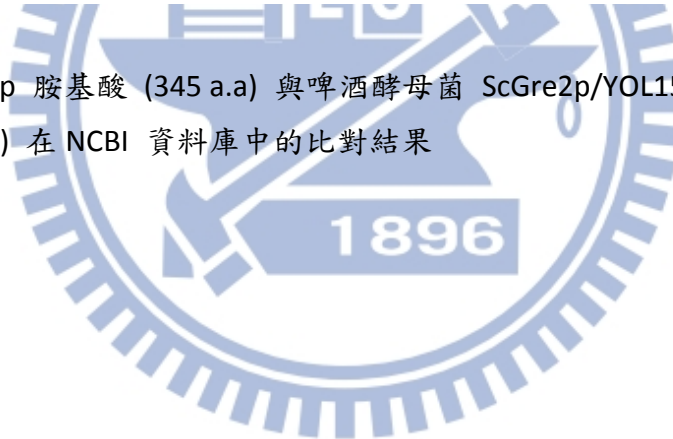
Query 184 EVWKFVDENKNQLNFDVAVINPSFVFGPQAFGIKDKSAALRSTGEIINSVLKLSNDPIP 243
          W+F++EN++ + F++ +NP +VFGPQ F KD L ++ E++NS++ L D IP
Sbjct 175 AAWEFLEENRDAVKFELTAVNPVYVFGPQMFD-KDVKKHLNTSCELVNSLMHLSPEDKIP 233

Query 244 SLVASFIDVRDVARAHIIAFEDDDAIGQRLILDNEIFTKELIAHLIKKNFPSL--DIPEG 301
          L +IDVRDVA+AH++AF+ + IGQRLI+ FT + + ++ ++FP L +IP G
Sbjct 234 ELFGGYIDVRDVAKAHLVAFQKRETIGQRLIVSEARFTMQDVLIDILNEDFPVLKGNIPVG 293

Query 302 DIVKSEEEIANYPWRVDSTKTEKILGFKYISLDKSVVDTVNQLI 345
          S +D+ K++K+LGFK+ +L +++ DT +Q++
Sbjct 294 K-PGSGATHNTLGATLDNKKSKLLGFKFRNLKETIDDTASQIL 336

```

圖五、CaGRE2p 胺基酸 (345 a.a) 與啤酒酵母菌 ScGre2p/YOL151Wp 胺基酸 (342 a.a) 在 NCBI 資料庫中的比對結果



## Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EGAS5684.1	Azfp1 [Saccharomyces cerevisiae FostersB]	300	300	29%	4e-83	48%	
NP_014756.3	Azfp1 [Saccharomyces cerevisiae S288c] >sp P41696.1 AZF1_YEAS	300	300	29%	5e-83	48%	<a href="#">G</a>

> [ref|NP\\_014756.3](#) [G](#) Azfp1 [Saccharomyces cerevisiae S288c]  
[sp|P41696.1|AZF1\\_YEAST](#) RecName: Full=Asparagine-rich zinc finger protein AZF1  
[emb|CAA81212.1](#) zinc finger protein of 101170 Da [Saccharomyces cerevisiae]  
[6 more sequence titles](#)  
 Length=914

GENE ID: 854280 AZF1 | Azfp1 [Saccharomyces cerevisiae S288c]  
 (Over 10 PubMed links)

Score = 300 bits (767), Expect = 5e-83, Method: Compositional matrix adjust.  
 Identities = 160/335 (48%), Positives = 211/335 (63%), Gaps = 53/335 (16%)

```

Query 754 KSTDQKKRKPVRRTTRTKKQNS----NSTPTTNM-MTTQNLSSPESRNLV-----P 801
          K D+ +P++ + R KKD ++ N P T+ M+ N +S E + P
Sbjct 456 KHIDESGMQPNIIKKR--KKDDSTVYVKNEMPRTPPMKSDNSTSAEGAAMANFSGKEPP 513

Query 802 AQQFAQ-SEDGRPLLGATKIDQLMLVIQARDKGITNPIEQGPDGSILASPDNFSLGRSKA 860
          + S+D L+GATK+DQLML+IQAR KG T + DG +L +
Sbjct 514 IPDISSVSDDATNLIGATKVDQLMLIIQARKKGFTEKVNNTTQDGDLLFN-----Q 563

Query 861 ELDSGILPRPVSLVGGVDKPKHRDEDEIEDSDDNGDGTNQNQHQQHQRKRKHKKNQQCPY 920
          +D ILP LVGGV+KP GT Q+ +KH +CPY
Sbjct 564 TMD--ILPPKSELVGGVEKPK-----GT-----QNTRAVKKH---ECPY 597

Query 921 CFKFFTQSTHLEVHIRSHIGYKPFECTYCHKKFTQGGNLRTHRLRLHTGEKPFCEICKRS 980
          C + F+Q+THLEVH+RSHIGYKPF C YC K+FTQGGNLRTH RLHTGEKPF++C+IC +
Sbjct 598 CHRLFSQATHLEVHVRSHIGYKPFVCDYCGKRFTQGGNLRTHRLHTGEKPYSCDICDKK 657

Query 981 FNRKGNLAAHKLTHDNLKPFECKLDNCDKSFQQLGNLQSHQNRFLDKLNLTHRLAELS 1040
          F+RKGNLAAH +TH LKPF CKL+NC+K+FTQLGN+K+HQNRFH + LN LT +LAE++
Sbjct 658 FSRKGNLAAHLVTHQKLKPFVCKLENCNKTFTQLGNMKAHQNRFHKETLNALTAKLAEMN 717

Query 1041 GPALNNLPNEEKELLYFKDLYKNSNKGIRGRGKA 1075
          P+ N+P EE++LL YF +YKNSN+GI+GRGK
Sbjct 718 -PS-ENIPLEERQLLEYFASIYKNSNRGIKGRGKG 750

```

圖六、CaORF19.173p 胺基酸 (1100 a.a) 與啤酒酵母菌 ScAzfp1 胺基酸 (914 a.a)  
 在 NCBI 資料庫中的比對結果

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">NP_013578.1</a>	Msc1p [Saccharomyces cerevisiae S288c] >sp Q03104.1 MSC1_YEA	157	206	51%	4e-38	29%	<a href="#">GM</a>
<a href="#">EGAG1118.1</a>	Msc1p [Saccharomyces cerevisiae FostersO] >dbj GAA25322.1 K7_	157	207	51%	5e-38	29%	
<a href="#">EEU05286.1</a>	Msc1p [Saccharomyces cerevisiae JAY291]	157	207	51%	5e-38	29%	
<a href="#">EHN05161.1</a>	Msc1p [Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces kudriavzevii VIN	157	206	51%	5e-38	29%	

```
> ref|NP\_013578.1| GM Msc1p [Saccharomyces cerevisiae S288c]
  sp|Q03104.1|MSC1\_YEAST G RecName: Full=Meiotic sister chromatid recombination protein
1
  emb|CAA90555.1| unknown [Saccharomyces cerevisiae]
  gb|AAT93065.1| YML128C [Saccharomyces cerevisiae]
  tpg|DRA09771.1| G TPA: Msc1p [Saccharomyces cerevisiae S288c]
  gb|EIW08564.1| Msc1p [Saccharomyces cerevisiae CEN.PK113-7D]
Length=513

  GENE ID: 854911 MSC1 | Msc1p [Saccharomyces cerevisiae S288c]
  (Over 10 PubMed links)
```

Sort alignments for this subject sequence by:  
 E value [Score](#) [Percent identity](#)  
[Query start position](#) [Subject start position](#)

Score = 157 bits (398), Expect = 4e-38, Method: Compositional matrix adjust.  
 Identities = 128/436 (29%), Positives = 222/436 (51%), Gaps = 43/436 (10%)

```
Query 10  YVSITFFVANYG--FDQWTNDDLKQFLKERKVAFA----NDALENPKLISLANEEAKKLEK 63
          +V I V+AN FD+WT +DL +L++ K + D++E+ K + + K
Sbjct 14  FVLIGLVLANSDSVFDKWTQEDLADYLRDNKKSLEKYATDSIEDLKEASQVWDKHAQPK 73

Query 64  GYKKVTEELNPNPPDDSLNDYLNFDYLFGRKRKENYSIKEWIFESWPVTSLQTFLLTQNN 123
          + +V +++++ + Y ++ + +W+F+W SL+ FL +N
Sbjct 74  PWWQVWSSDSSSVNSNPGWFGYTG-----SSDHPVSDWLFDTWSTDSLRLNFKKNG 125

Query 124 IQYS-ARDTRDDLINKVKDQFDSISKKNHGSSFYPCGNWLYESWSENLDKWLKSYGIEFN 182
          + AK +KD L+ K+ F+ ISK S +YP + ++SWS DL++NL GI+++
Sbjct 126 VDVDADAKASKDSLVTAKENFNKISKSLKSSGYPPSSSYFDSWSTKDLQNLNDNGIDYD 185

Query 183  PS-STKDQLVEKLEFSYQATHSIRDSKESLFDSDLDFDKTIFDKKQIEDEFFQOTWSYS 241
          + +KD+LV+K+KE Y+ + + L+SDDL + I D GQI+D F WS
Sbjct 186 KAVQSKDELVQVKVENIYRTSEKAEQRLGLLESLELDAHQQLDTSQGIKDTVFDKWSSD 245

Query 242  QLREWLVLHGFIDTKPGIYVEDLDKEKLVKIAQSYKKCLLSDIHTLANTEKKSQPWITK 301
          QL WL H K D LV++A+ L DI+ +L +++S P++TK
Sbjct 246 QLTNWLKSHKVNIDKNMAKKHDY----LVRMAKENSANLKDIIYWLDMKRESSPFLTK 301

Query 302  GEQ-----KSQKKGSNLINDTFFVGINNWSKDKLREFLDVRKVPYSI 344
          + K N+INDTF VG+++W KDKL+ FLD R + YS+
Sbjct 302 TPEYVGSVWDSKSNFLTNLYSKFRGKTDNVINDTFLVGLDSDPKDKLKMFLDARGIKYSM 361

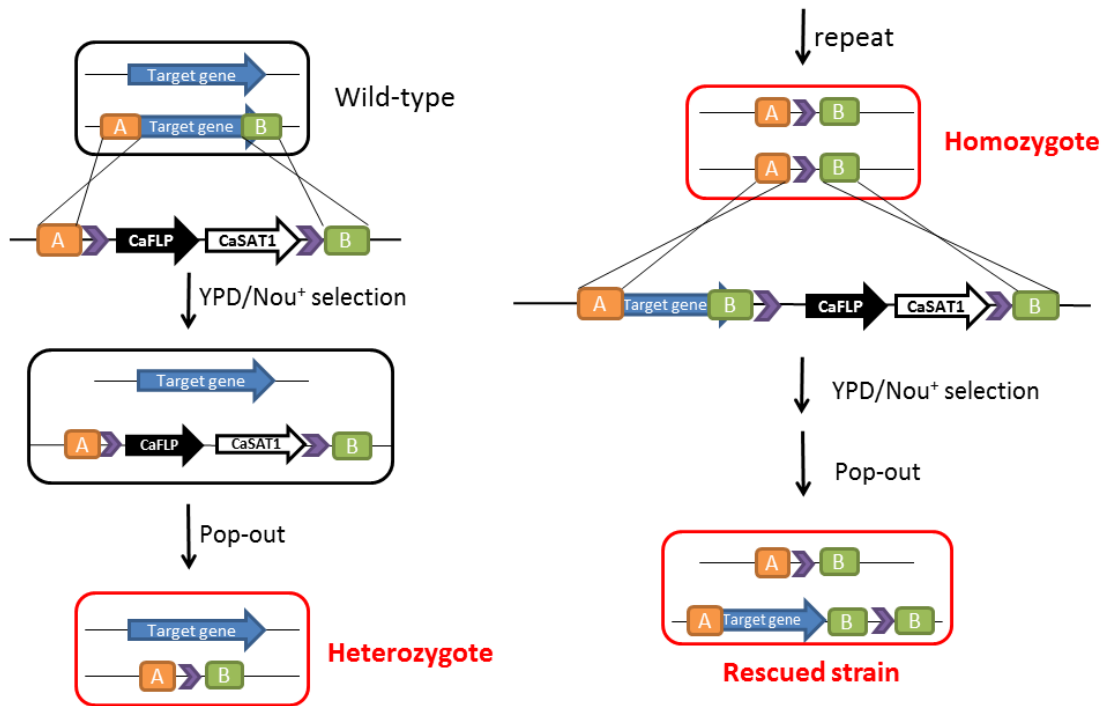
Query 345  FTTKHQLIKLVQKHKFDPVHV--ETYAWIVDDV--STDSIKQWLIEQGENVEGTRKDIVS 400
          +T+HQL +LV+K + + + + Y D+ S D IK W ++ ++ + ++
Sbjct 362 LSTEHLRELVLKKSREKILKILPKDYQKYFDNSNWSLDDIKGWFADKKDDQDSQ--TYS 419

Query 401  AFQKQFESLKKGFKDA 416
          + F+ + K DA
Sbjct 420 TIMQDFDKVSKNTNDA 435
```

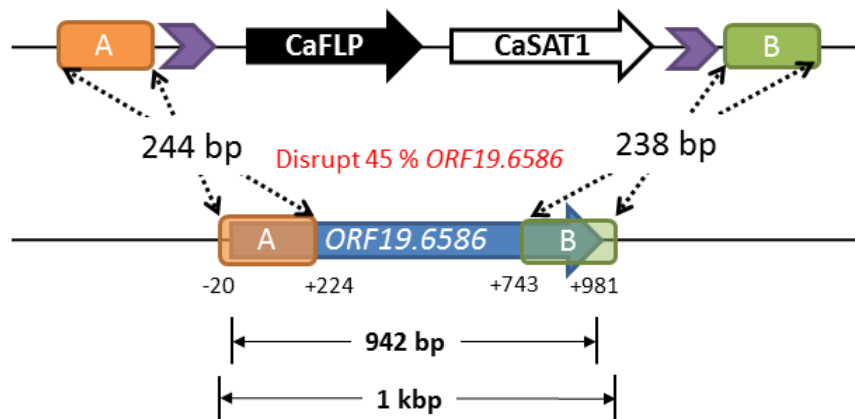
圖七、CaORF19.7310p 胺基酸 (788 a.a) 與啤酒酵母菌 ScMsc1p/YML128C 胺基酸 (513 a.a) 在 NCBI 資料庫中的比對結果



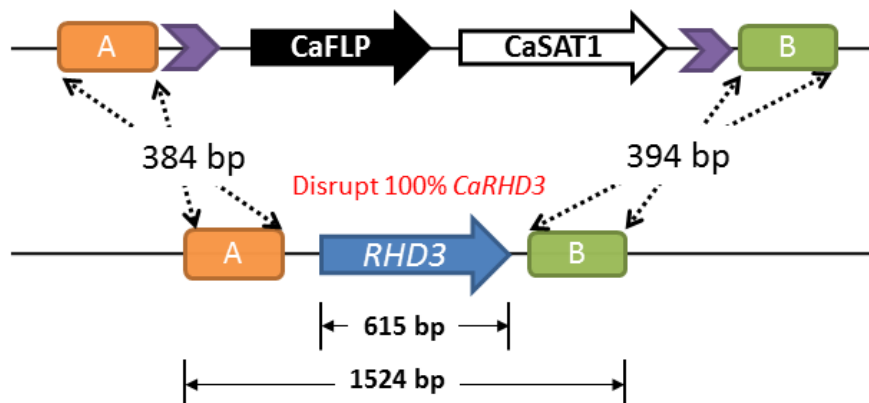
<A>



<B>



<C>

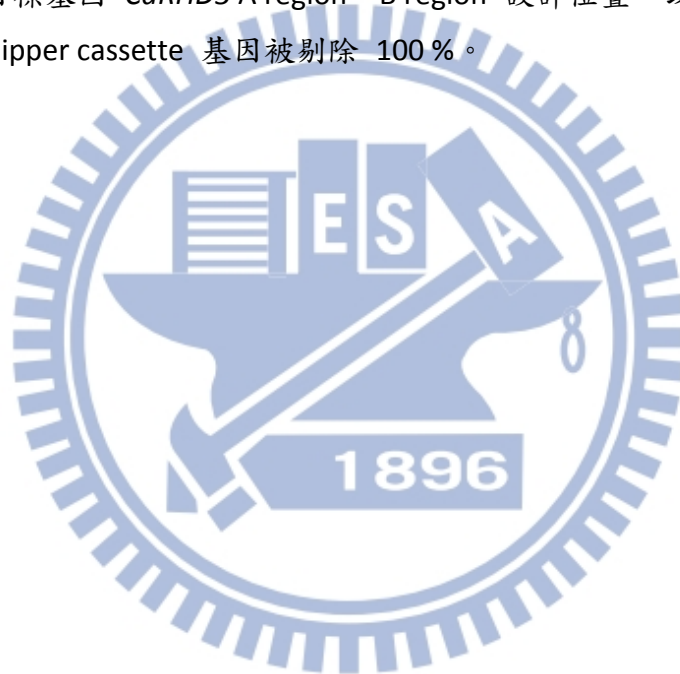


圖八、建構白色念珠菌基因剔除株流程示意圖。

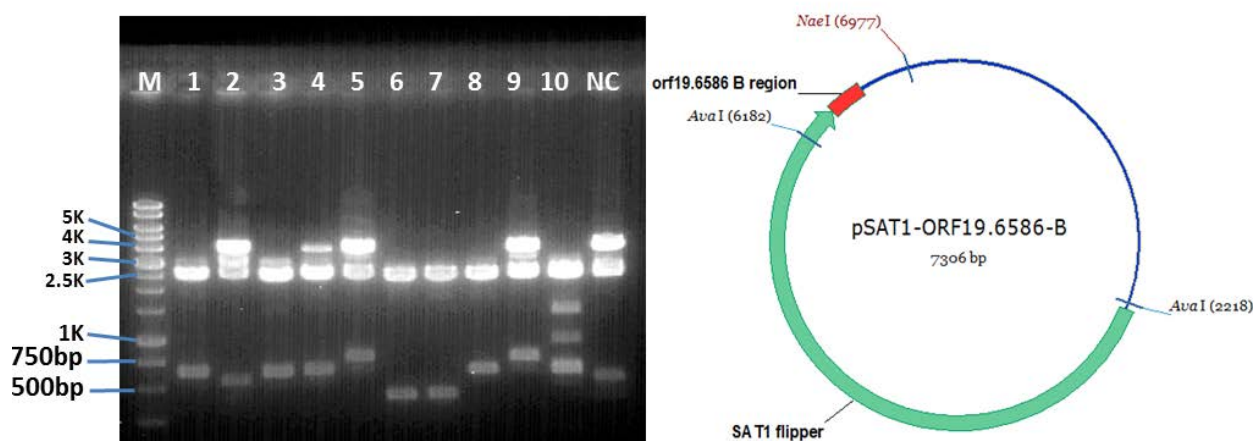
<A>：利用 *SAT1 flipper cassette* 前後兩端帶有目標基因的同源性區域，與目標基因進行同源重組置換，藉由藥物 nourseothricin 篩選出帶有 *SAT1 flipper cassette* 的菌株，再經由 maltose 誘使 *SAT1 flipper pop-out*，得到單套基因剔除株。同樣的流程重複進行一次，得到雙套基因剔除株。之後再利用帶有整個目標基因片段和 B region 的 *SAT1 flipper cassette* 送進雙套基因剔除株，經過藥物篩選和 *pop-out*，得到單套基因回復株。

<B>：目標基因 *CaORF19.6586* A region、B region 設計位置，以及利用 *SAT1 flipper cassette* 基因被剔除約 45 %。

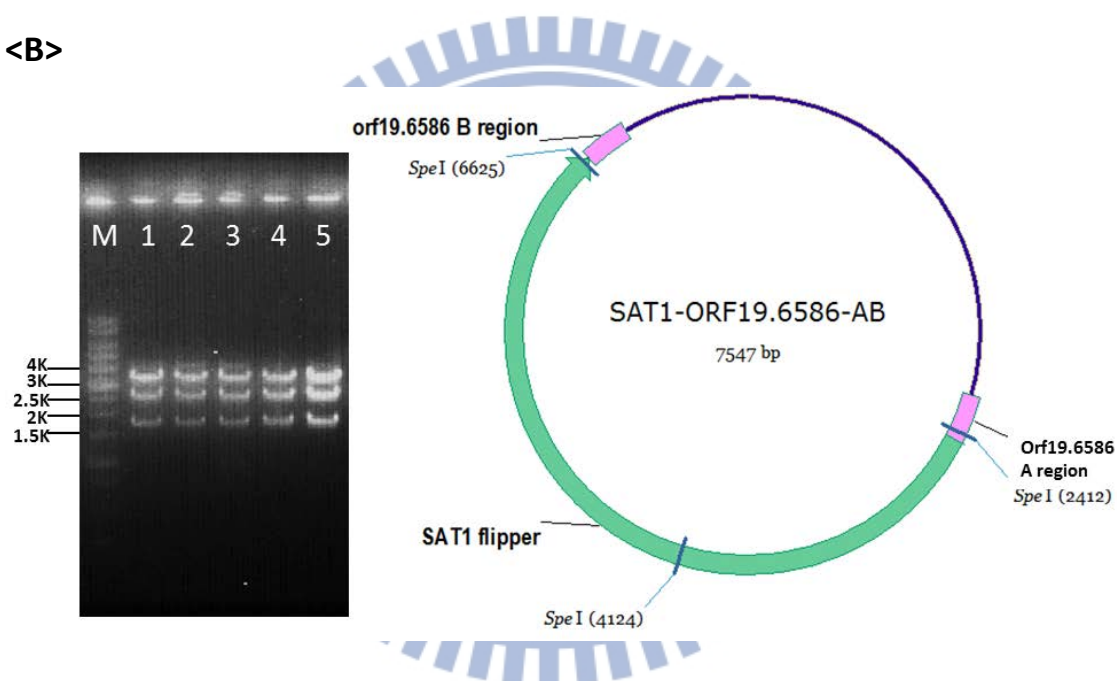
<C>：目標基因 *CaRHD3* A region、B region 設計位置，以及利用 *SAT1 flipper cassette* 基因被剔除 100 %。



<A>



<B>

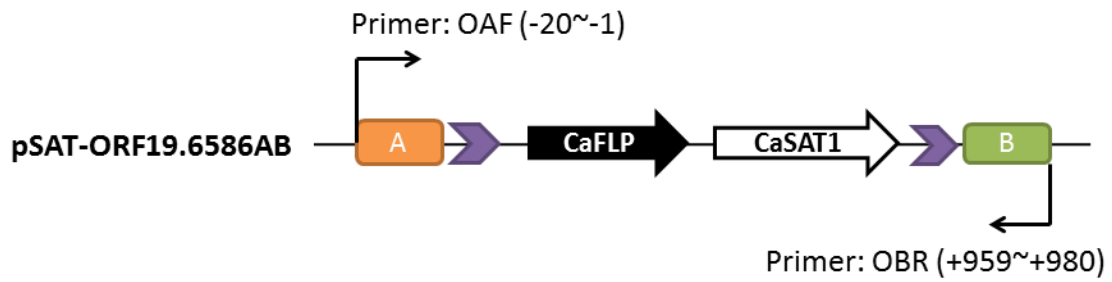


圖九、以限制酶確認質體 pSAT1-ORF19.6586-B 和 pSAT1-ORF19.6586AB

<A> 以限制酶 *Ava*I 和 *Nae*I 作用於質體 pSAT1-ORF19.6586-B。Lane 5 及 Lane 9 得到預期片段: 795 bp、2544 bp 及 3964 bp；Lane M 為 1 Kbp DNA marker；Lane NC 為未接外接序列之質體 pSFS2-SAT1。

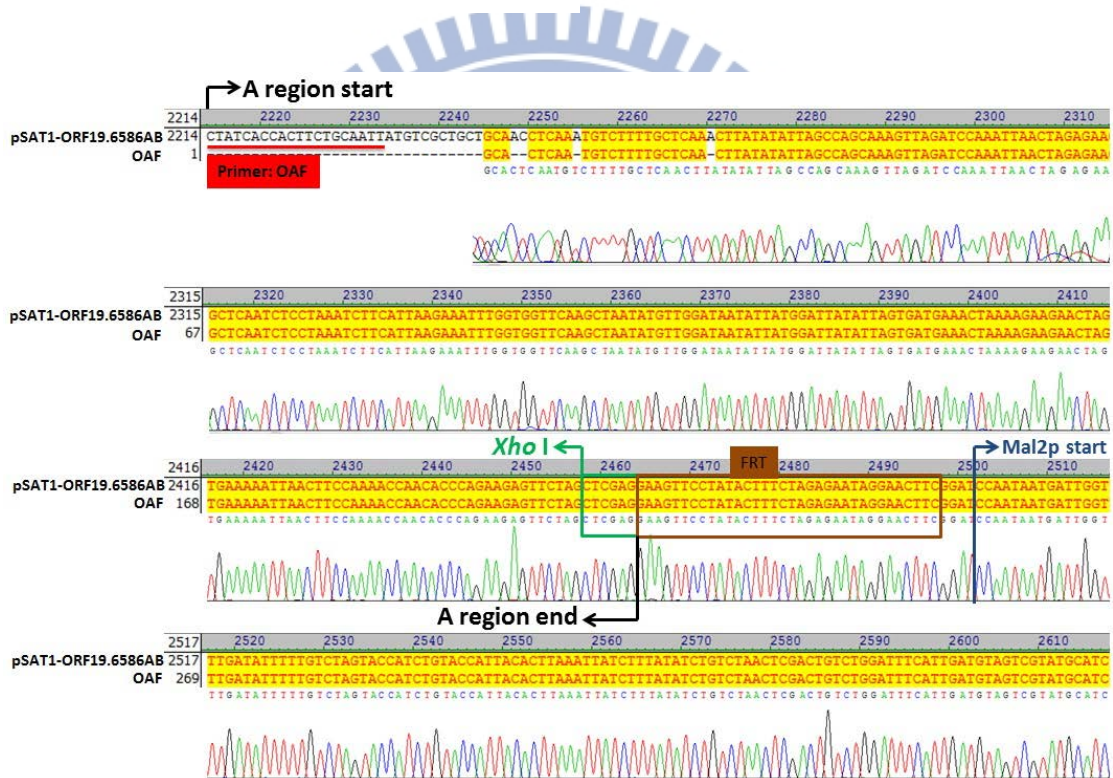
<B> 以限制酶 *Spe*I 作用於質體 pSAT1-ORF19.6586-AB。預期得到片段 1712bp、2501bp 及 3334bp；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

<A>

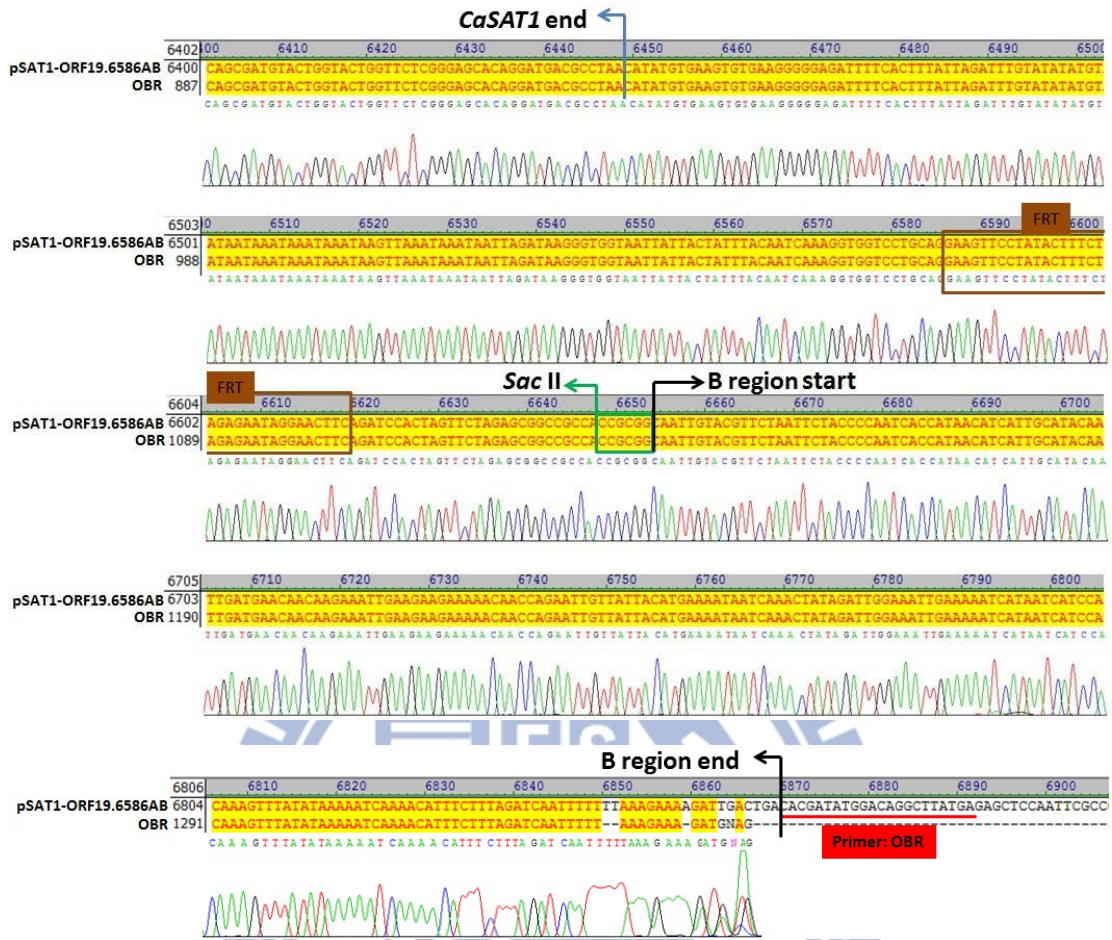


<B>

A region 位於質體 +2214 ~+2457  
B region 位於質體 +6652 ~+6889



<C>



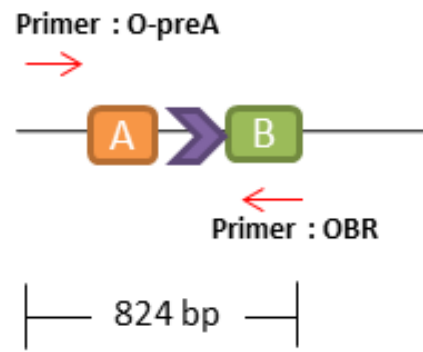
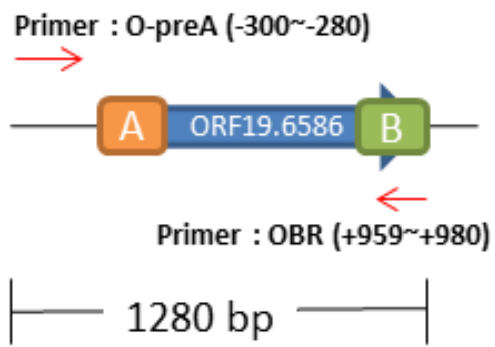
圖十、質體 pSAT1-ORF19.6586AB 序列分析結果。

圖<A>：利用引子 OAF 和 OBR 對質體 pSAT1-ORF19.6586AB 進行序列分析。

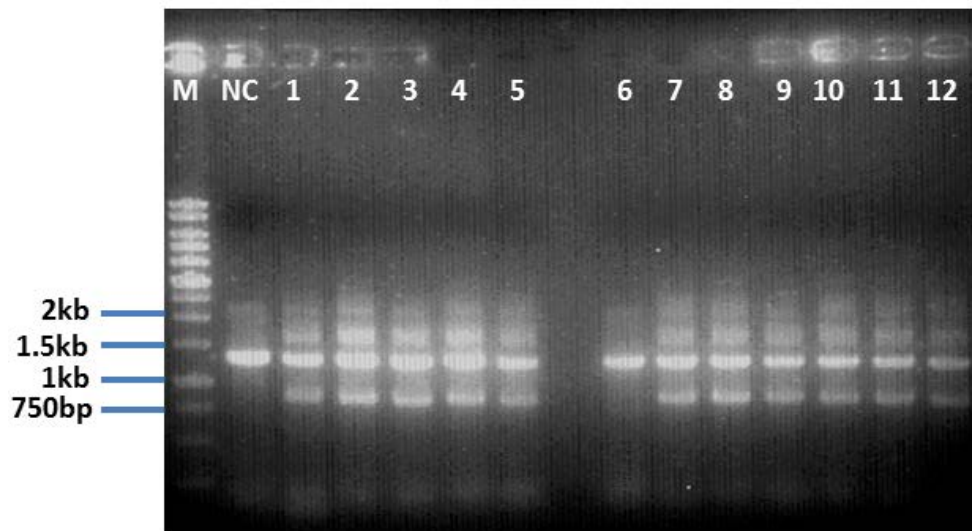
圖<B>：紅底線標示為引子 OAF 位置；黑色箭頭標示為 A region 起始位置與尾端；咖啡色框為 FRT 區域；藍色箭頭為 Mal2p 起始位置。由定序結果顯示，在 A region 終點端有成功連結質體 pSFS2-SAT1 序列。

圖<C>：紅底線標示為引子 OBR 位置，黑色箭頭標示為 B region 起始位置與尾端；咖啡色框為 FRT 區域；藍色箭頭為 CaSAT1 結束位置。由定序結果顯示，在 B region 起始點前端有成功連結質體 pSFS2-SAT1 序列。

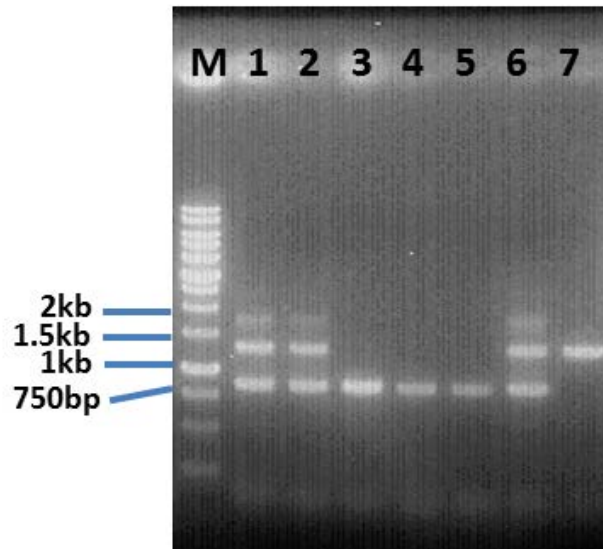
<A>



<B>



<C>



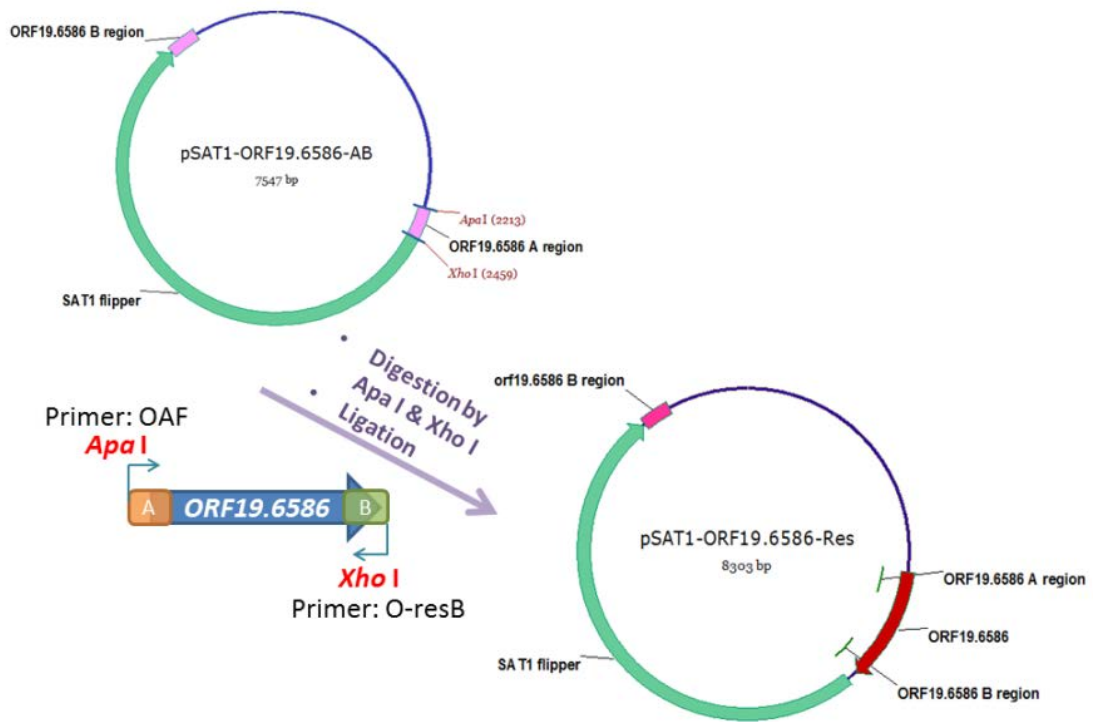
圖十一、以 PCR 確認 *CaORF19.6586* 單套及雙套基因剔除株。

圖<A> 以引子 O-preA 和 OBR 進行 PCR 結果示意圖。wild-type allele 預期得到片段 1280 bp；pop-out allele 預期得到片段 824 bp。

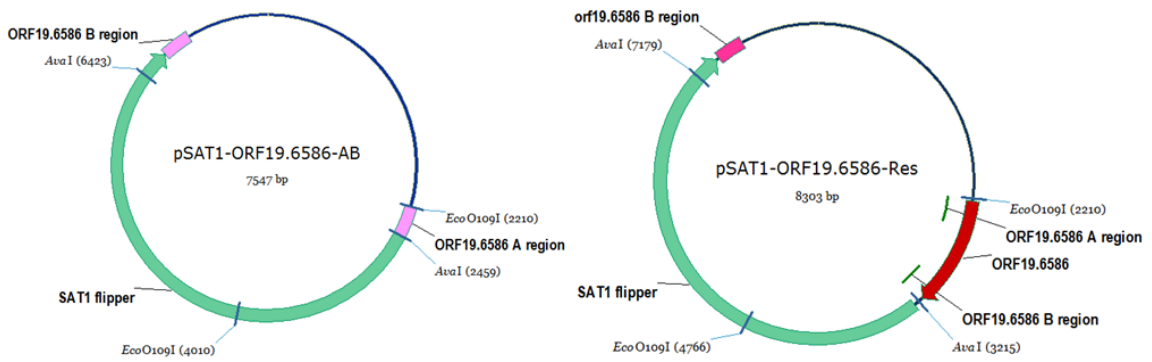
圖<B> 以引子 O-preA 和 OBR 確認 *CaORF19.6586* 單套基因剔除株 OHE 之 PCR 結果。Lane 1~5, 7~12 預期得到片段為 1280 bp 和 824 bp；Lane NC 為對照組野生株 SC5314；Lane M 為1 Kbp DNA marker。

圖<C> 以引子 O-preA 和 OBR 確認 *CaORF19.6586* 雙套基因剔除株 OHO 之 PCR 結果。Lane 3~5 預期得到片段為 824 bp；Lane 7 為對照組野生株 SC5314；Lane 1、2、6 為對照組單套基因剔除株；Lane M 為1 Kbp DNA marker。

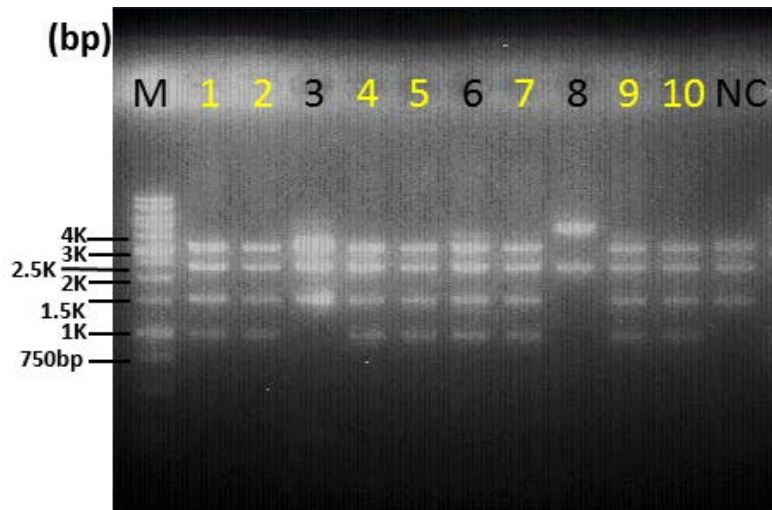
<A>



<B>





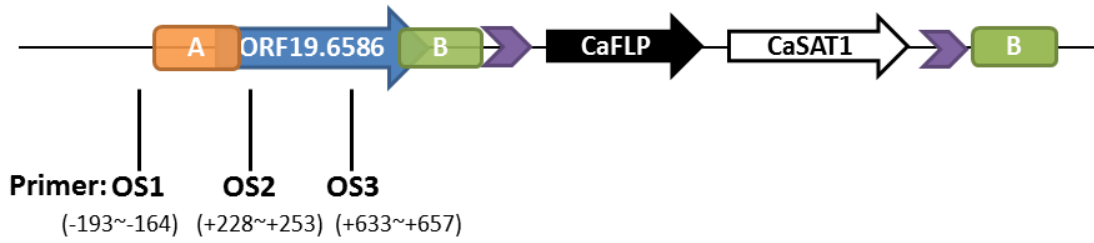


圖十二、建構含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaORF19.6586* Open Reading Frame (ORF) 之質體。

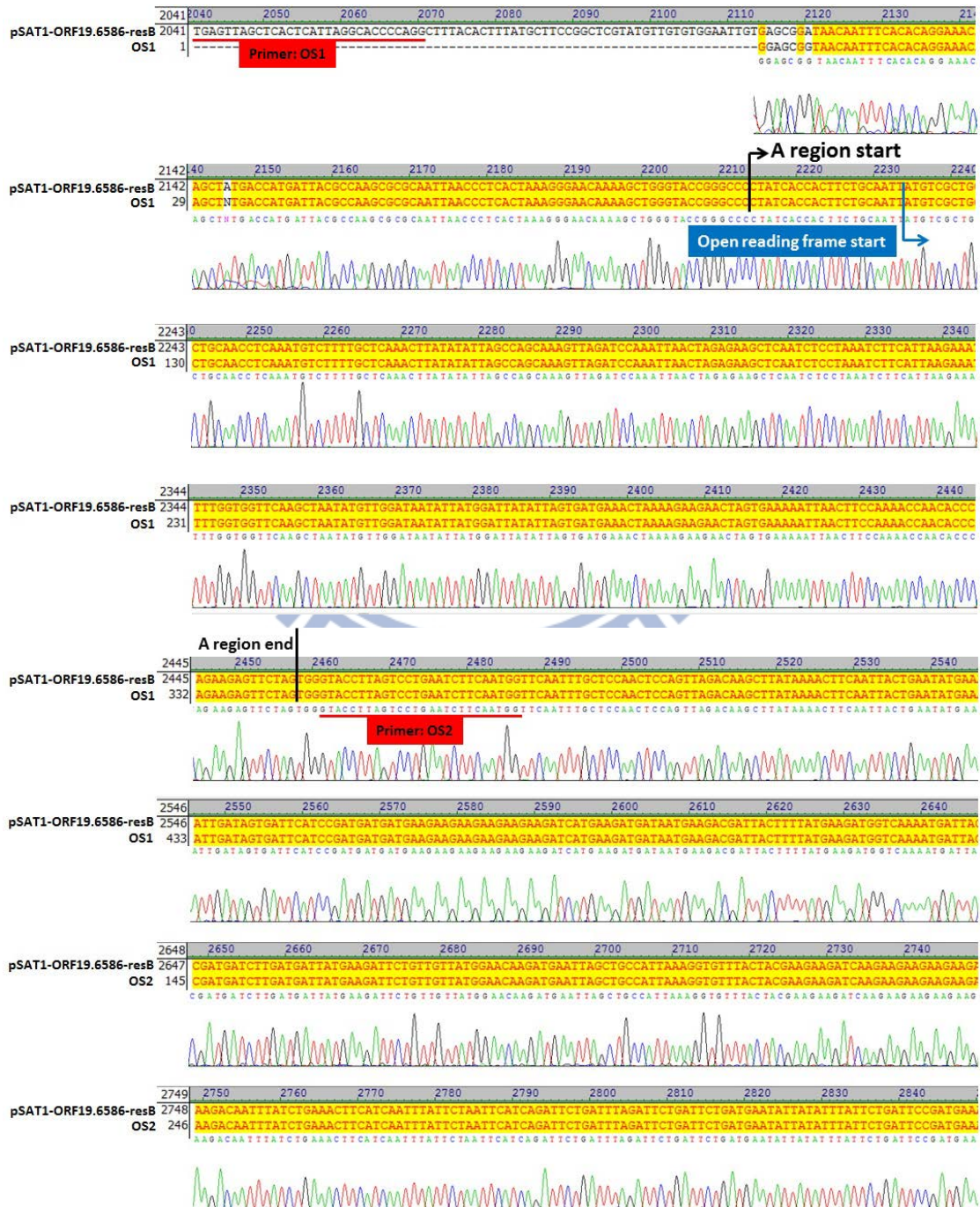
圖<A> 建構質體 pSAT1-ORF19.6586-resB 示意圖。

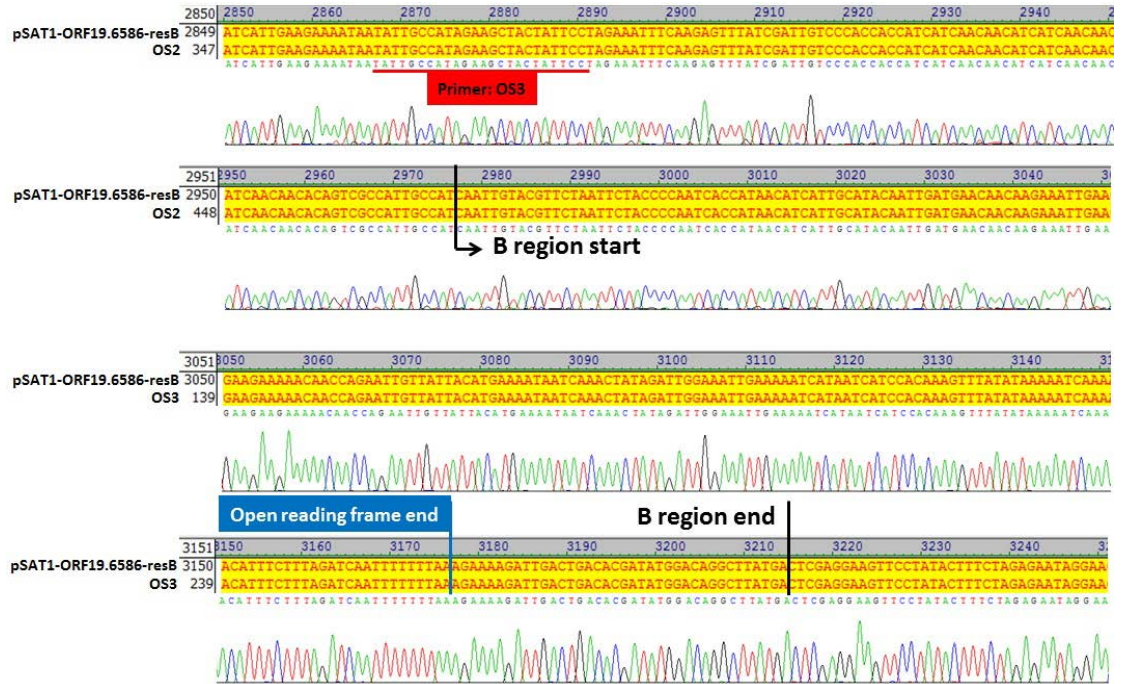
圖<B> 以限制酶 *Ava*I、*Eco*O109I 作用於質體 pSAT1-ORF19.6586-resB，Lane 1、2、4、5、7、9、10 預期得到片段 1005 bp、1551 bp、2413 bp 及 3334 bp；Lane NC 為對照組質體 pSAT1-ORF19.6586AB，預期得到片段 249 bp、1551 bp、2413 bp、3334 bp；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

<A>



<B>



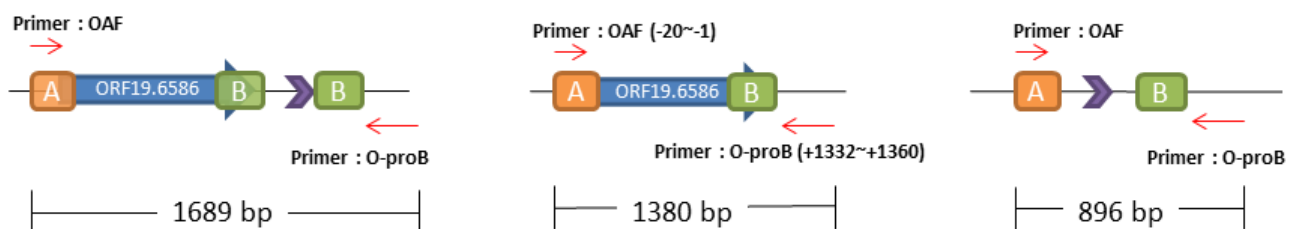


圖十三、質體 pSAT1-ORF19.6586-resB 中 *CaORF19.6586* 序列分析結果。

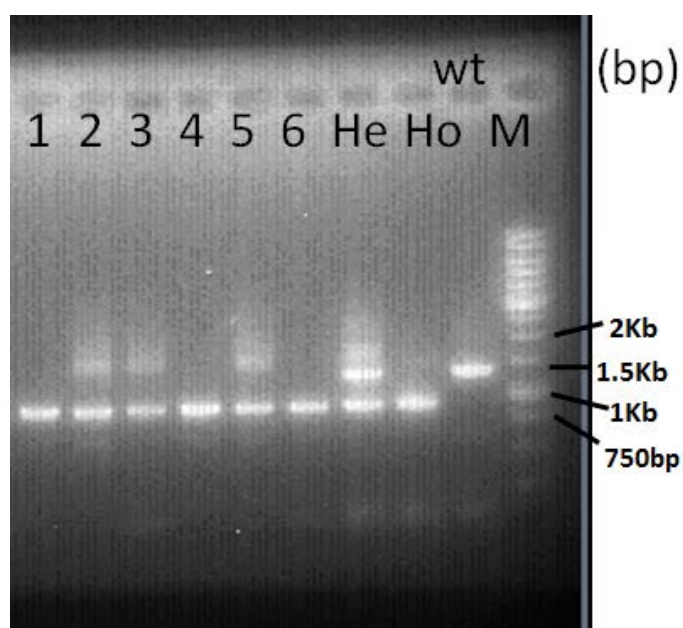
圖<A> 利用引子 OS1、OS2 和 OS3 對 *CaORF19.6586* 進行序列分析。

圖<B> 紅底線標示分別為引子 OS1、OS2 和 OS3 位置；黑色箭頭分別標示為 A region 起始位置與尾端以及 B region 起始位置與尾端；藍色箭頭標示為 *CaORF19.6586* 起始點 ATG 位置。由定序結果顯示，*CaORF19.6586* Open reading frame 序列完整無誤。

<A>



<B>

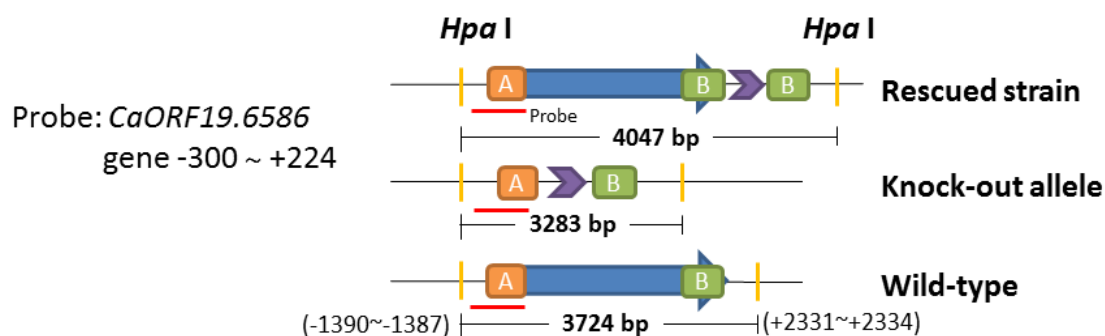


圖十四、以 PCR 確認 *CaORF19.6586* 單套基因回復株。

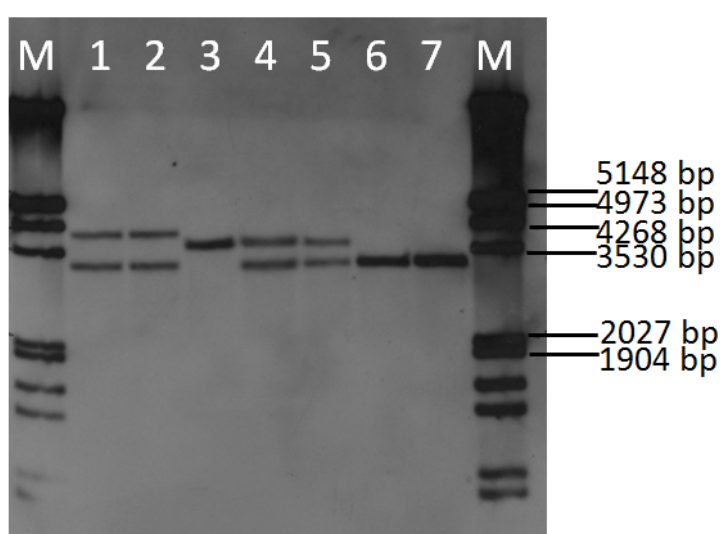
圖<A>：以引子 OAF 和 O-proB 進行 PCR 結果示意圖。rescued allele 預期得到片段 1689 bp；pop-out allele 預期得到片段 896 bp；wild-type allele 預期得到片段 1380 bp。

圖<B>：以引子 OAF 和 O-proB 確認 *CaORF19.6586* 單套基因回復株 ORE 之 PCR 結果。預期得到片段為 1689 bp 和 896 bp。Lane wt 為對照組野生株 SC5314，預期得到片段為 1380 bp；Lane He 為對照組 *CaORF19.6586* 單套基因剔除株，預期得到片段為 1380 bp 和 896 bp；Lane Ho 為對照組 *CaORF19.6586* 雙套基因剔除株，預期得到片段為 896 bp；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

<A>



<B>

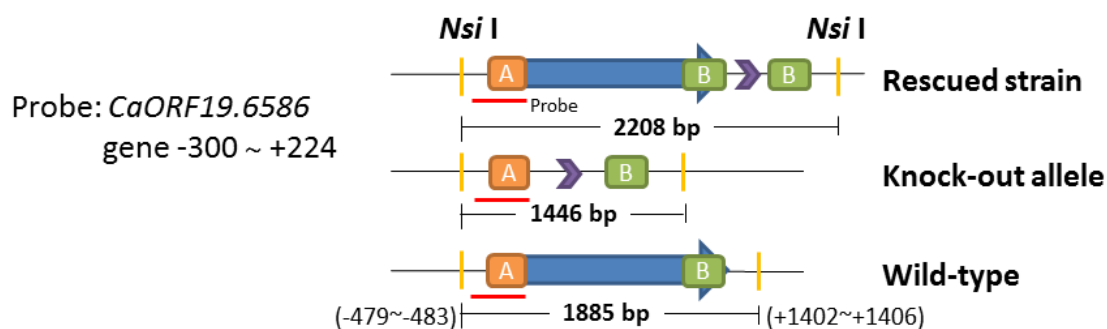


圖十五、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaORF19.6586* 各突變株。

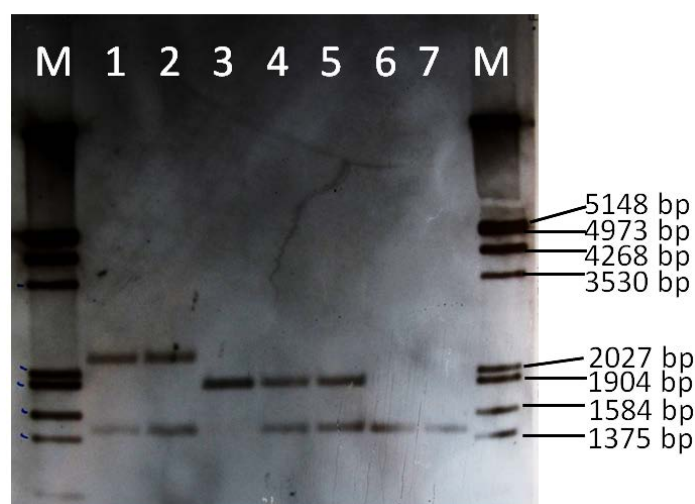
圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色直線代表限制酶 *Hpa*I 作用位置；紅色底線代表探針位置。*CaORF19.6586* wild-type allele 預期可得片段 3724 bp；*CaORF19.6586* knock-out allele 預期可得片段 3283 bp；*CaORF19.6586* rescued allele 預期可得片段 4047 bp。

圖<B>：南方點墨法結果。Lane 3 為野生株 (wild-type) (*CaORF19.6586*/*CaORF19.6586*)；Lane 4、5 為 *CaORF19.6586* 單套基因剔除株 (*CaORF19.6586*/*Caorf19.6586::FRT*)；Lane 6、7 為 *CaORF19.6586* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.6586::FRT*/*Caorf19.6586::FRT*)；Lane 1、2 為 *CaORF19.6586* 單套基因回復株 (*Caorf19.6586::FRT*/*Caorf19.6586::CaORF19.6586*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled

<A>



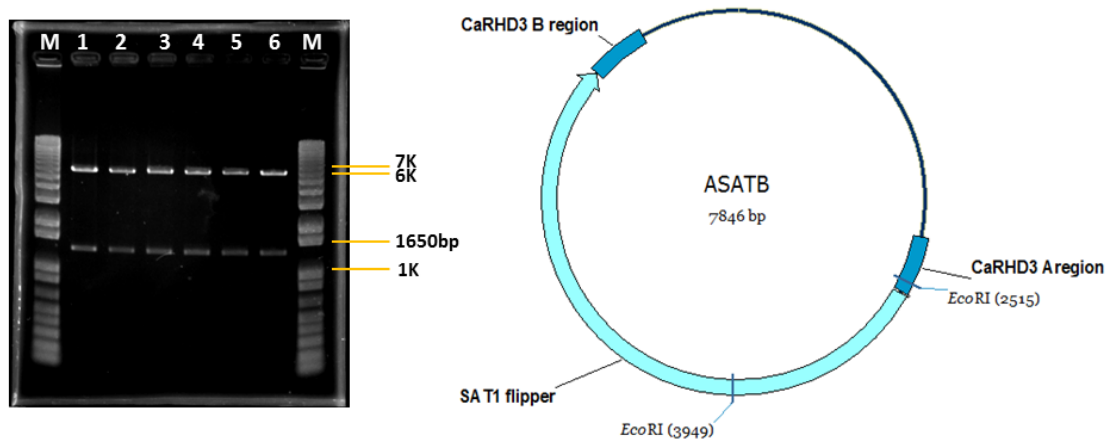
<B>



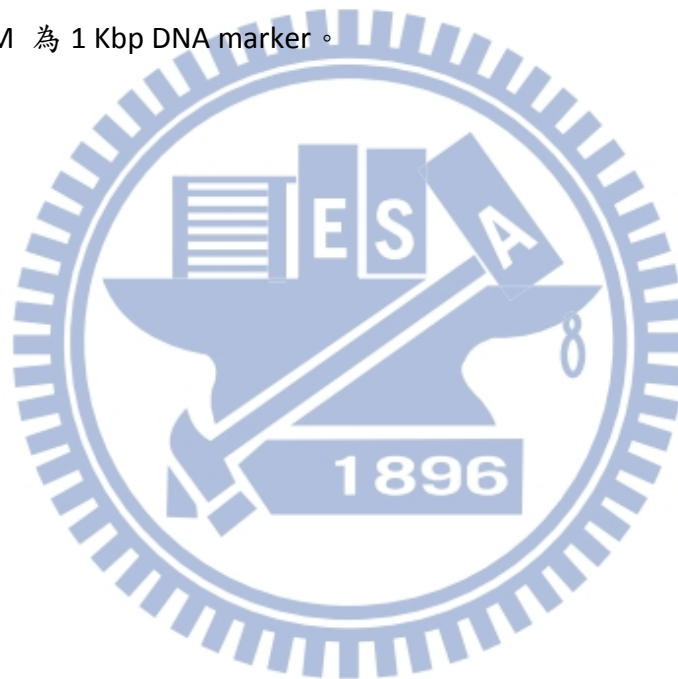
圖十六、南方點墨法 (Southern blot) 二次檢驗 *CaORF19.6586* 各突變株。

圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色直線代表限制酶 *Nci*I 作用位置；紅色底線代表探針位置。*CaORF19.6586* wild-type allele 預期可得片段 1885 bp；*CaORF19.6586* knock-out allele 預期可得片段 1446 bp；*CaORF19.6586* rescued allele 預期可得片段 2208 bp。

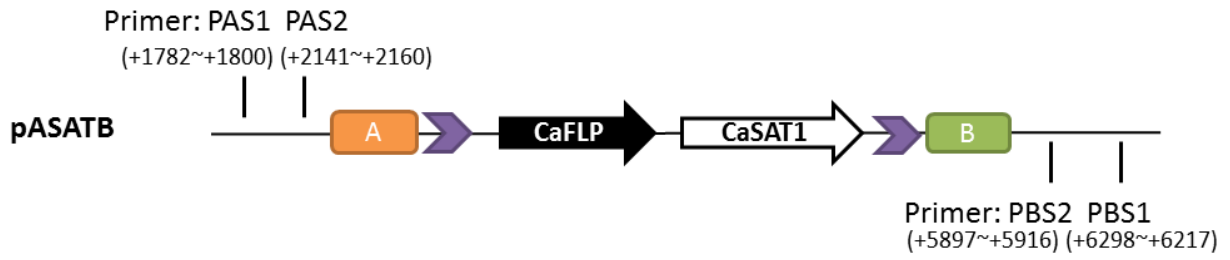
圖<B>：南方點墨法結果。Lane 3 為野生株 (wild-type) (*CaORF19.6586*/*CaORF19.6586*)；Lane 4、5 為 *CaORF19.6586* 單套基因剔除株 (*CaORF19.6586*/*Caorf19.6586::FRT*)；Lane 6、7 為 *CaORF19.6586* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.6586::FRT*/*Caorf19.6586::FRT*)；Lane 1、2 為 *CaORF19.6586* 單套基因回復株 (*Caorf19.6586::FRT*/*Caorf19.6586::CaORF19.6586*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled



圖十七、以限制酶 *Eco* RI 作用於質體 pASATB。預期得到片段 6412 bp 和 1434 bp；  
Lane M 為 1 Kbp DNA marker。



<A>

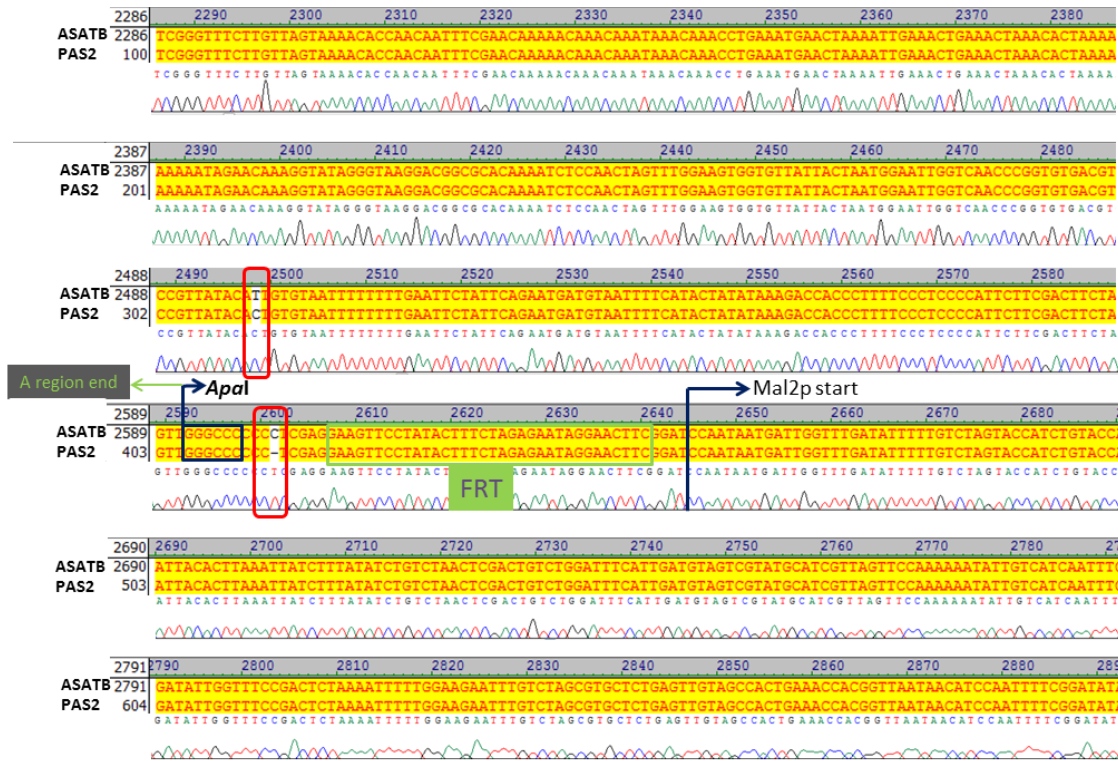


<B>

A region 位於質體 +2208 ~+2591  
 B region 位於質體 +6795 ~+7188







<C>





圖十八、質體 pASATB 序列分析結果。

圖<A>：利用引子 PAS1、PAS2 和 PBS1、PBS2 對質體 pASATB 進行序列分析。

圖<B>：紅底線標示為引子 PAS1 及 PAS2 位置，綠色箭頭標示為 A region 起始位置與尾端。由定序結果顯示，在 A region 終點，成功連結質體 pSFS2-SAT1 序列。紅色框框分別代表在質體 pSFS2 核苷酸 +1843 位置有 A (adenine) 缺失和核苷酸 +2087 位置有 T→C 突變 (Thymine, Cytosine) 和核苷酸 +2217 位置有 C 缺失；以及 A region 在相對於 *CaRHD3* 核苷酸 -163 位置有 T→C 突變。

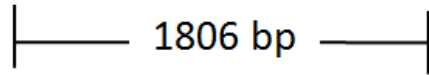
圖<C>：紅底線標示為引子 PBS1 及 PBS2 位置，綠色箭頭標示為 B region 起始位置與尾端。由定序結果顯示，在 B region 起始點前端，成功連結質體 pSFS2-SAT1 序列。紅色框框代表 B region 在相對於 *CaRHD3* 核苷酸 +1049 位置有 G→C 突變。

<A>

Primer : HJL02557 (-708~-735)



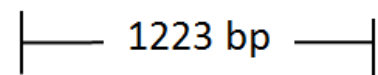
Primer: LPCp-9R (+1052~+1071)



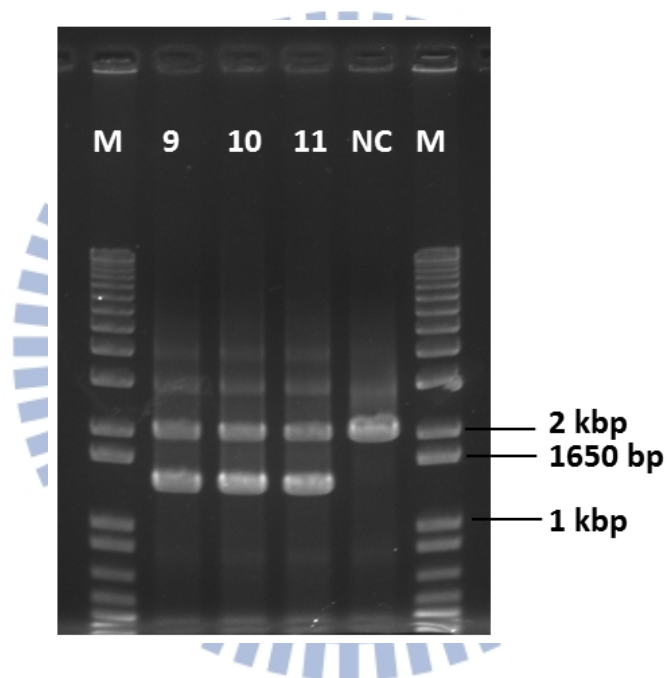
Primer : HJL02557



Primer: LPCp-9R



<B>

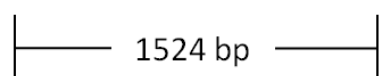


<C>

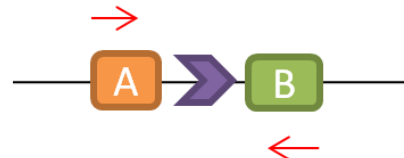
Primer : LPCp-12F (-452~-434)



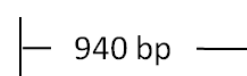
Primer: LPCp-9R (+1052~+1071)



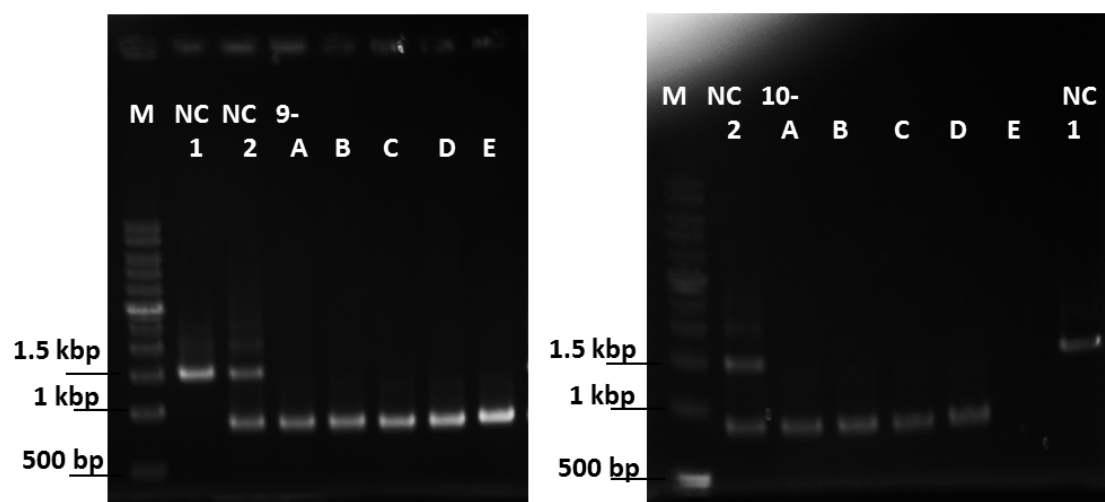
Primer : LPCp-12F



Primer: LPCp-9R



<D>



圖十九、以 PCR 確認 *CaRHD3* 單套及雙套基因剔除株。

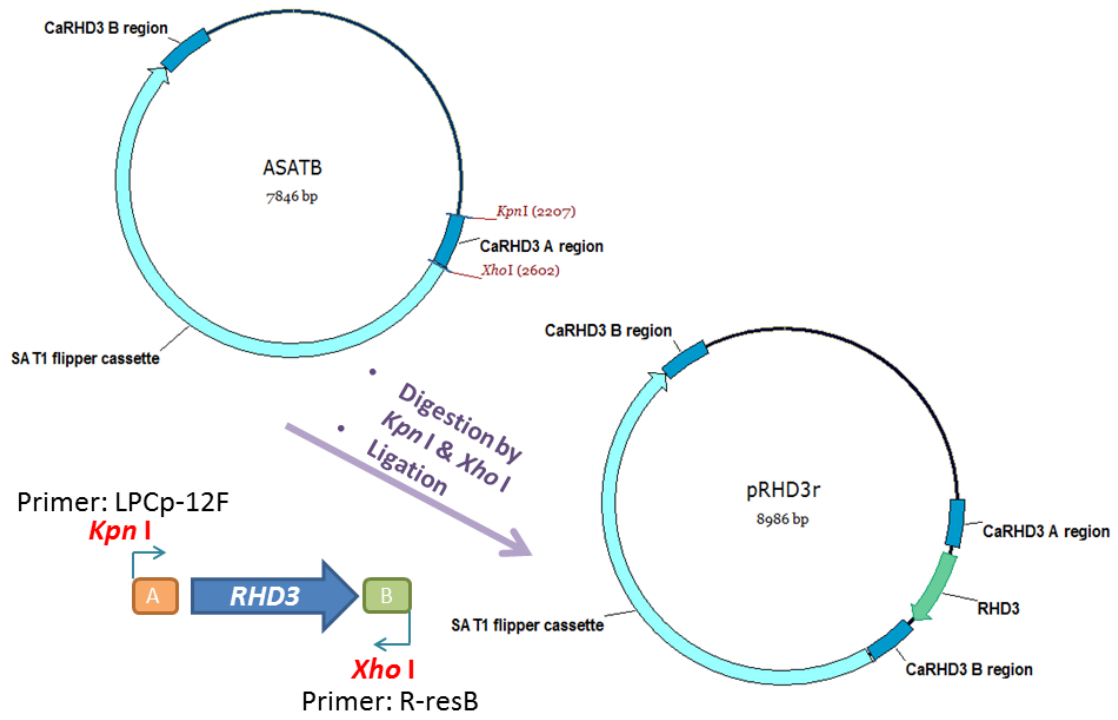
圖<A> 以引子 HJL02557 和 LPCp-9R 進行 PCR 結果示意圖。Parental strain allele 預期得到片段 1806 bp；pop-out allele 預期得到片段 1223 bp。

圖<B> 以引子 HJL02557 和 LPCp-9R 確認 *CaRHD3* 單套基因剔除株 RHD3HE 之 PCR 結果。Lane 9~11 預期得到片段為 1806 bp 和 1223 bp；Lane NC 為對照組 Parental strain HLC54；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

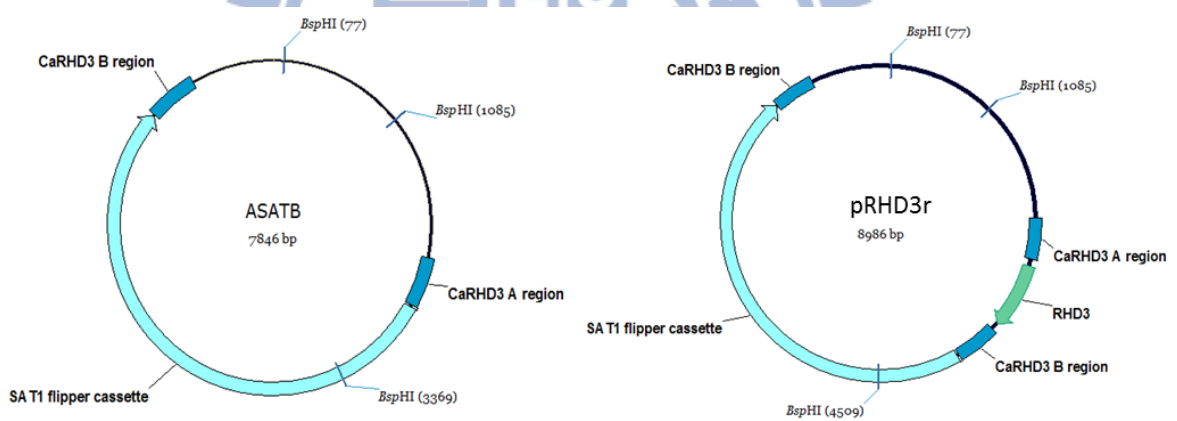
圖<C> 以引子 LPCp-12F 和 LPCp-9R 進行 PCR 結果示意圖。Parental strain allele 預期得到片段 1524 bp；pop-out allele 預期得到片段 940 bp。

圖<D> 以引子 LPCp-12F 和 LPCp-9R 確認 *CaRHD3* 雙套基因剔除株 RHD3HO 之 PCR 結果。Lane 9A~9E 以及 Lane 10A~10D 預期得到片段為 940 bp；Lane NC1 為對照組 Parental strain HLC54；Lane NC2 為對照組單套基因剔除株；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

<A>



<B>



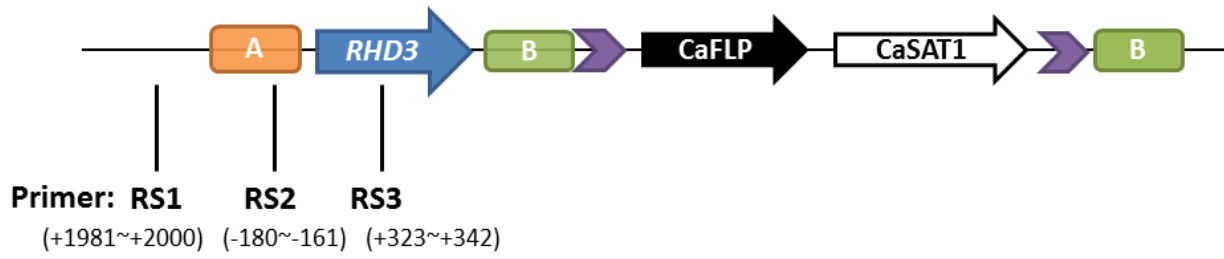
圖二十、建構含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaRHD3* Open Reading Frame (ORF) 之質體。

圖<A>：建構質體 pRHD3r 示意圖。

圖<B>：以限制酶 *Bsp* HI 作用於質體 pRHD3r，Lane 7 得到預期片段 1008 bp、3424 bp 和 4554 bp；Lane 8 為對照組質體 pASATB，預期得到片段 1008 bp、2284 bp 和 4554 bp；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

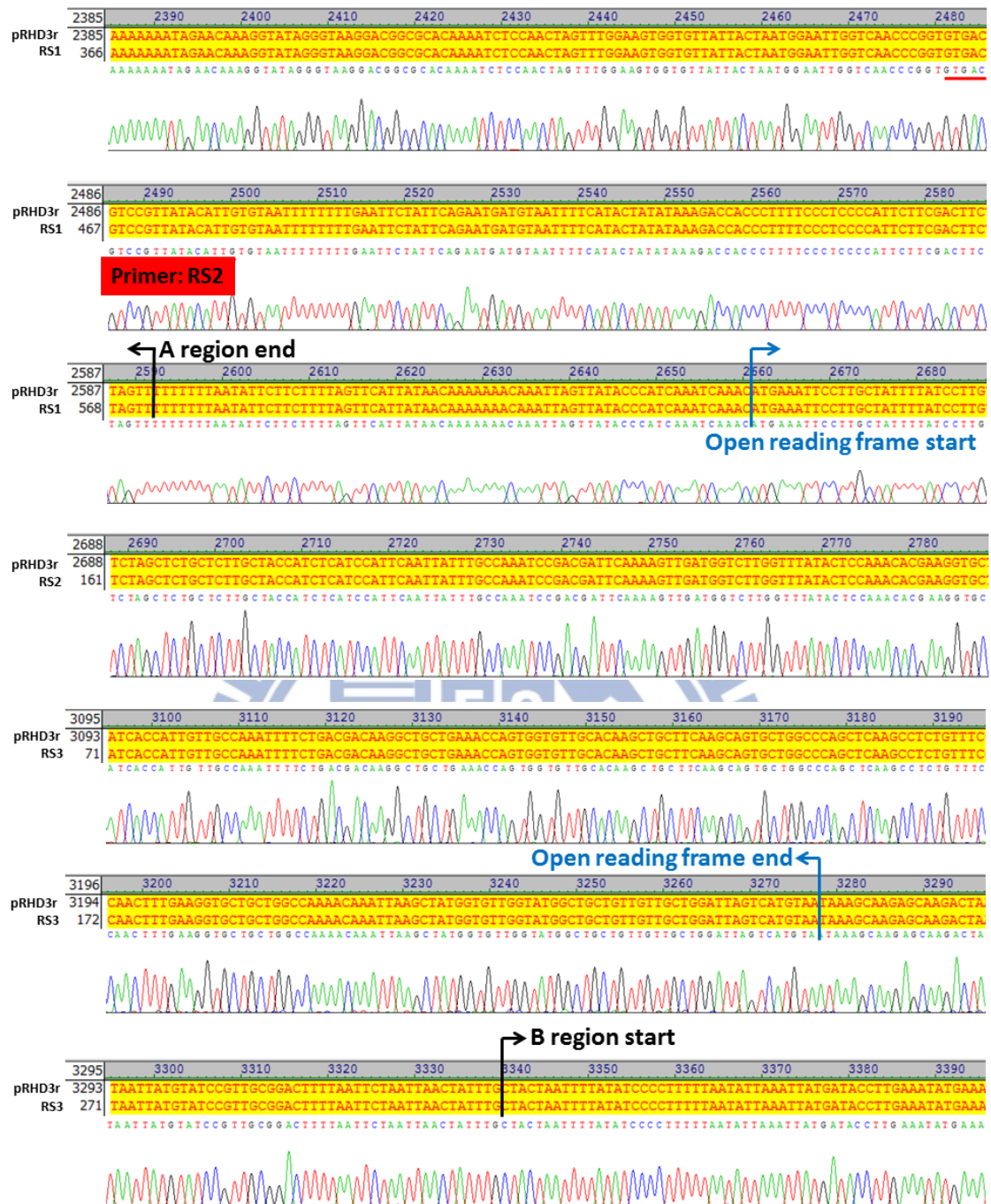


<A>



<B>





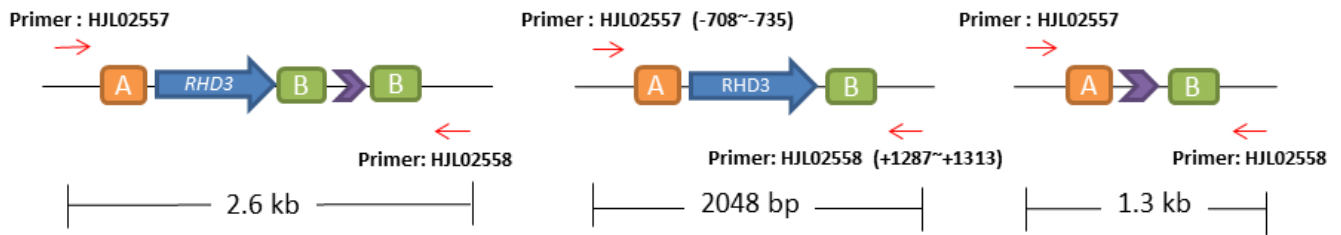
圖二十一、質體 pRHD3r 序列分析結果。

圖<A>：利用引子 RS1、RS2 和 RS3 對質體 pRHD3r 進行序列分析。

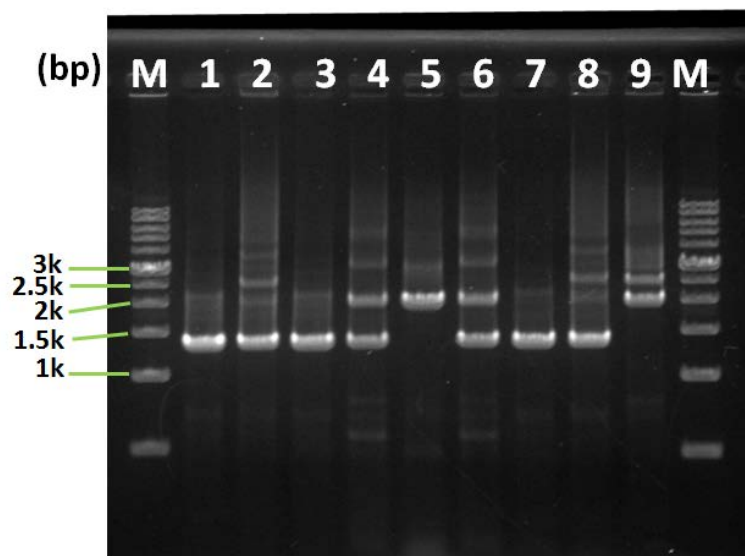
圖<B>：紅底線標示為引子 RS1、RS2 和 RS3 位置，黑色箭頭標示分別為 A region 起始位置與尾端以及 B region 起始位置。由定序結果顯示，*CaRHD3* open reading frame 序列完整無缺失。



<A>



<B>

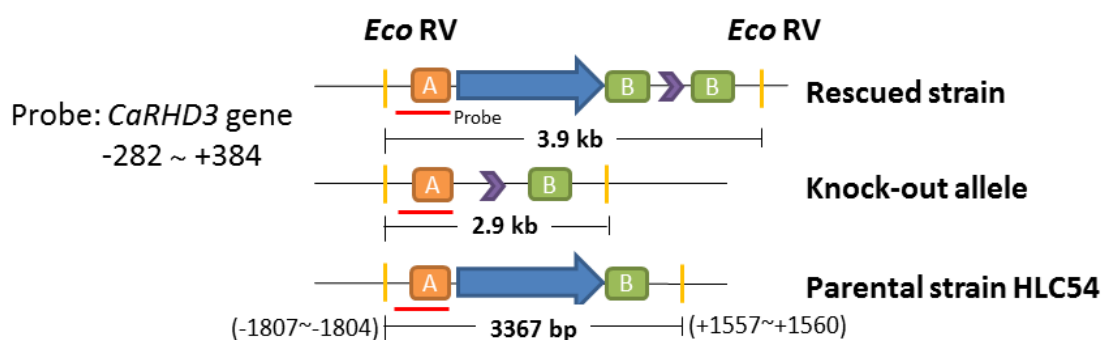


圖二十二、以 PCR 確認 *CaRHD3* 單套基因回復株。

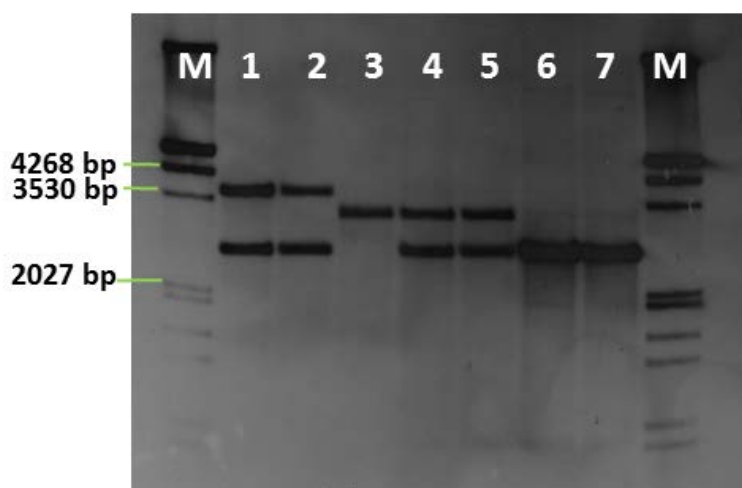
圖<A>: 以引子 HJL02557 和 HJL02558 進行 PCR 結果示意圖。rescued allele 預期得到片段 2.6 kbp；pop-out allele 預期得到片段 1.3 kbp；parental strain allele 預期得到片段 2048 bp。

圖<B>: *CaRHD3* 單套基因回復株 RHD3RE 之 PCR 確認結果。Lane 2、8 得到預期片段為 2.6 kbp 和 1.3 kbp。Lane 5 為 parental strain HLC54，預期得到片段為 2048 bp；Lane 4、6 為對照組 *CaRHD3* 單套基因剔除株，預期得到片段為 2048 bp 和 1.3 kbp；Lane 3、7 為對照組 *CaRHD3* 雙套基因剔除株，預期得到片段為 1.3 kbp；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

<A>



<B>

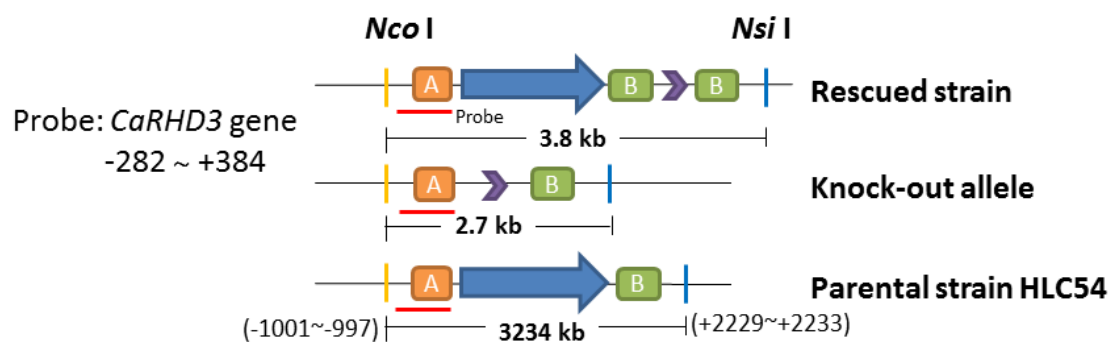


圖二十三、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaRHD3* 各突變株。

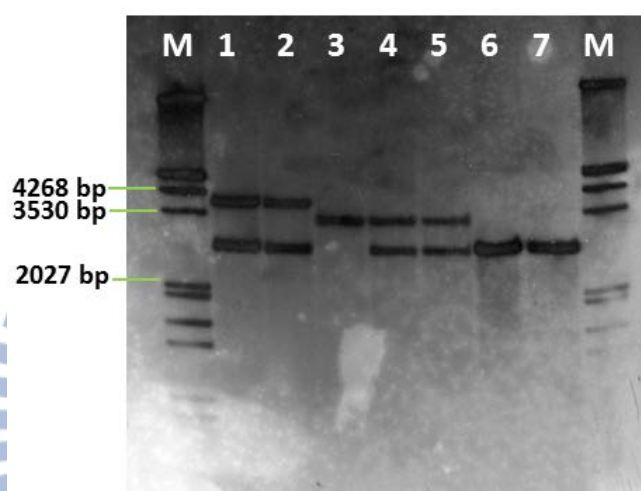
圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色直線代表限制酶 *Eco RV* 作用位置；紅色底線代表探針位置。Parental strain allele 預期可得片段 3367 bps；*CaRHD3* knock-out allele 預期可得片段 2.9 kbp；*CaRHD3* rescued allele 預期可得片段 3.9 kbp。

圖<B>：南方點墨法結果。Lane 3 為 Parental strain (HLC54) (*CaRHD3/CaRHD3 efg1/efg1 cph1/cph1*)；Lane 4、5 為 *CaRHD3* 單套基因剔除株 (*CaRHD3/Carhd3::FRT efg1/efg1 cph1/cph1*)；Lane 6、7 為 *CaRHD3* 雙套基因剔除株 (*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT efg1/efg1 cph1/cph1*)；Lane 1、2 分別為圖二十二<B>之 Lane 2 & 8，*CaRHD3* 單套基因回復株 (*Carhd3::FRT/Carhd3::CaRHD3 efg1/efg1 cph1/cph1*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III，DIG-labeled。

<A>



<B>

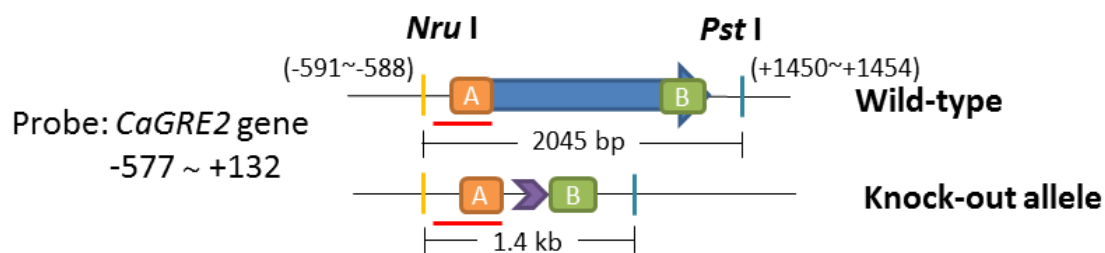


圖二十四、南方點墨法 (Southern blot) 二次檢驗 *CaRHD3* 各突變株。

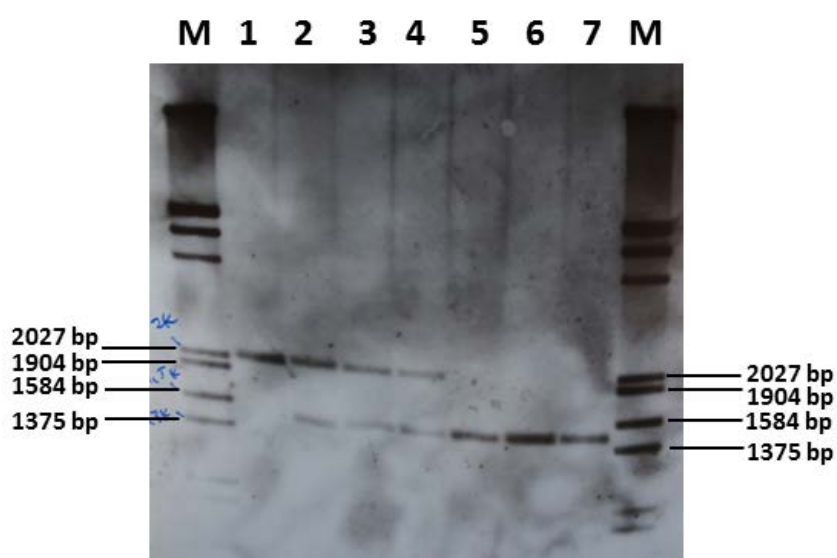
圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色及藍色直線分別代表限制酶 *Nco* I 和 *Nsi* I 作用位置；紅色底線代表探針位置。Parental strain allele 預期可得片段 3234 bps；*CaRHD3* knock-out allele 預期可得片段 2.7 kbp；*CaRHD3* rescued allele 預期可得片段 3.8 kbp。

圖<B>：南方點墨法結果。Lane 3 為 Parental strain (HLC54) (*CaRHD3/CaRHD3 efg1/efg1 cph1/cph1*)；Lane 4、5 為 *CaRHD3* 單套基因剔除株 (*CaRHD3/Carhd3::FRT efg1/efg1 cph1/cph1*)；Lane 6、7 為 *CaRHD3* 雙套基因剔除株 (*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT efg1/efg1 cph1/cph1*)；Lane 1、2 分別為圖二十二<B>之 Lane 2 & 8，*CaRHD3* 單套基因回復株 (*Carhd3::FRT/Carhd3::CaRHD3 efg1/efg1 cph1/cph1*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled

<A>



<B>

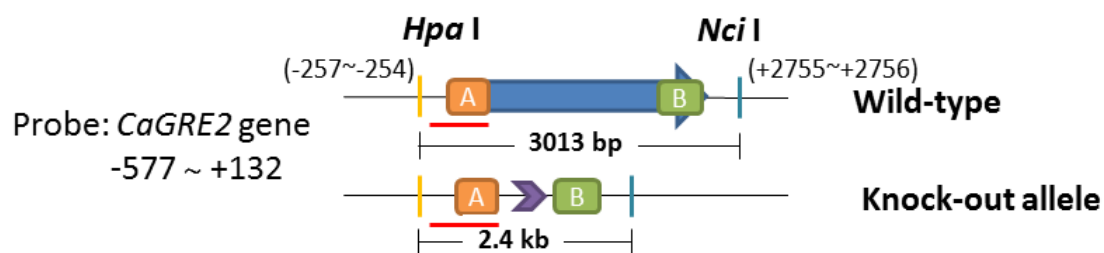


圖二十五、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaGRE2* 各突變株。

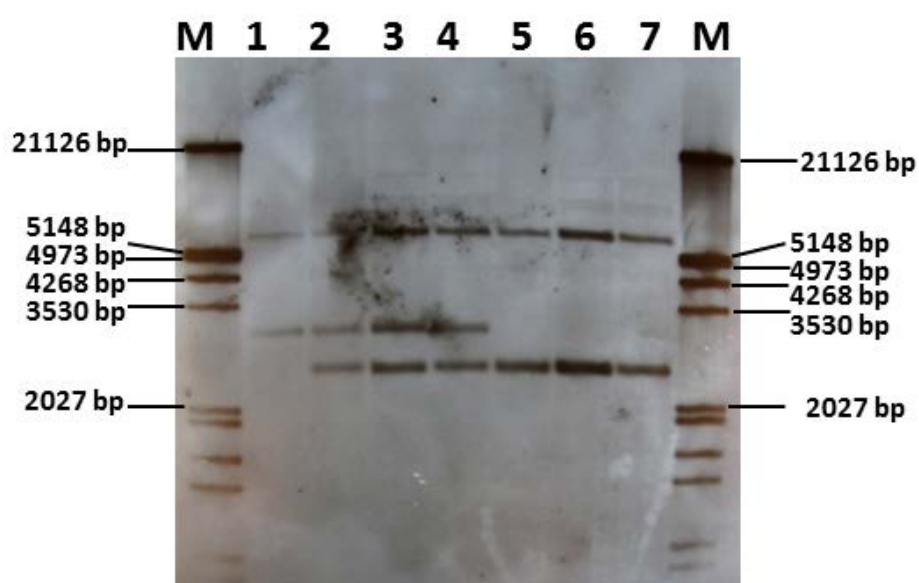
圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色及藍色直線分別代表限制酶 *Nru* I 和 *Pst* I 作用位置；紅色底線代表探針位置。Wild-type allele 預期可得片段 2045 bps；*CaGRE2* knock-out allele 預期可得片段 1.4 kbp。

圖<B>：南方點墨法結果。Lane 1 為 Wild-type allele (SC5314)；Lane 2~4 為 *CaGRE2* 單套基因剔除株 (*CaGRE2/Cagre2::FRT*)；Lane 5~7 為 *CaGRE2* 雙套基因剔除株 (*Cagre2::FRT/Cagre2::FRT*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled

<A>



<B>

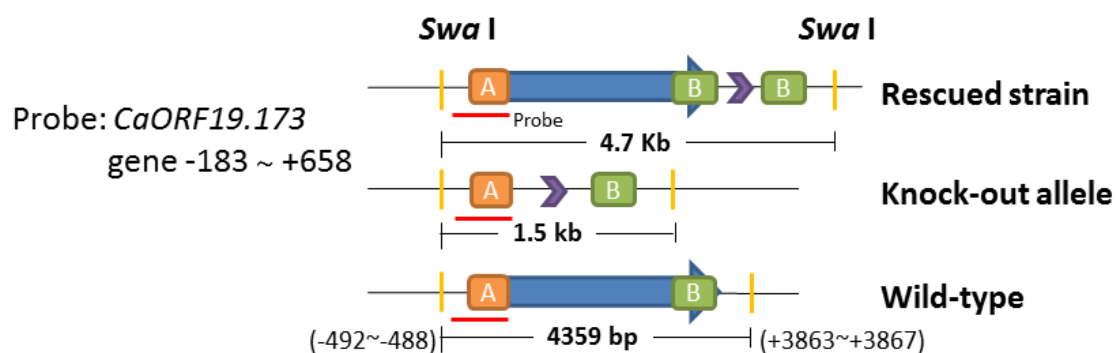


圖二十六、南方點墨法 (Southern blot) 二次檢驗 *CaGRE2* 各突變株。

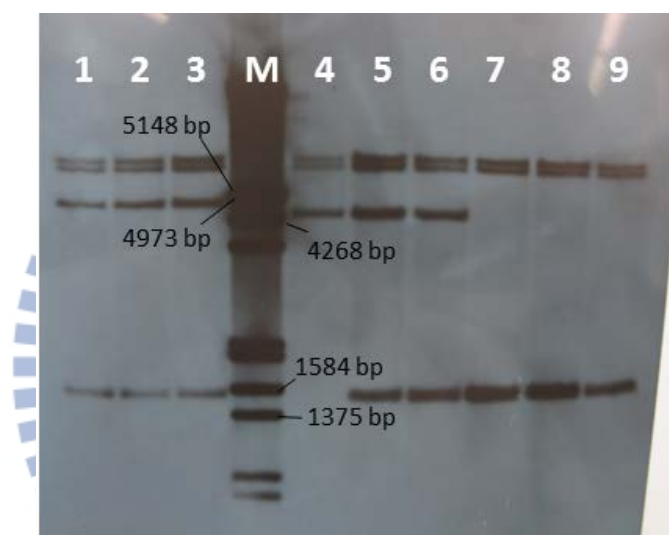
圖<A>: 南方點墨法結果示意圖。黃色及藍色直線分別代表限制酶 *Hpa*I 和 *Nci*I 作用位置; 紅色底線代表探針位置。Wild-type allele 預期可得片段 3013 bps; *CaGRE2* knock-out allele 預期可得片段 2.4 kbp。

圖<B>: 南方點墨法結果。Lane 1 為 Wild-type allele (SC5314); Lane 2~4 為 *CaGRE2* 單套基因剔除株 (*CaGRE2/Cagre2::FRT*); Lane 5~7 為 *CaGRE2* 雙套基因剔除株 (*Cagre2::FRT/Cagre2::FRT*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled

<A>



<B>

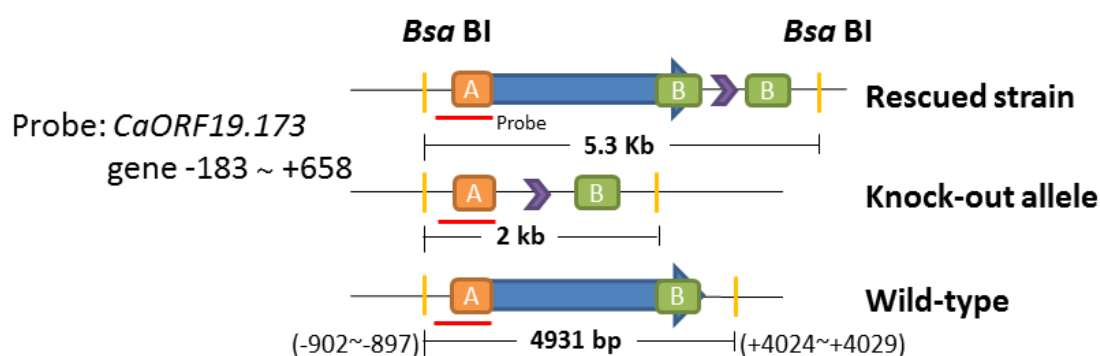


圖二十七、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaORF19.173* 各突變株。

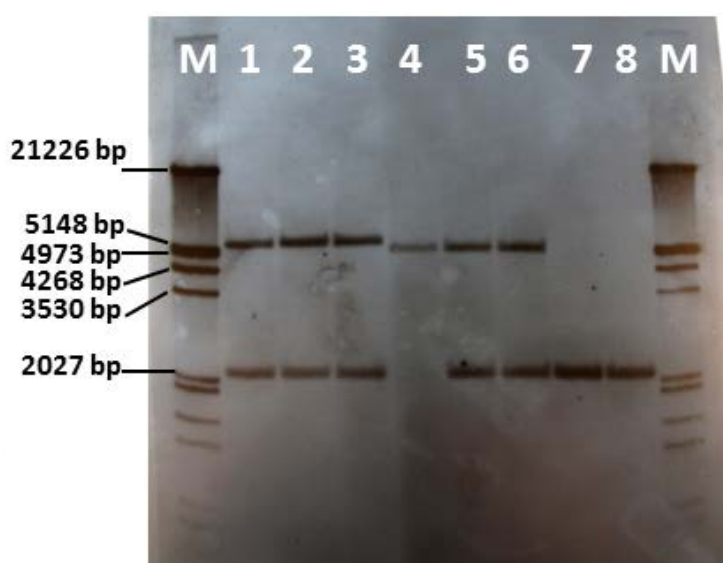
圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色直線代表限制酶 *Swa* I 作用位置；紅色底線代表探針位置。Wild-type allele 預期可得片段 4359 bps；*CaORF19.173* knock-out allele 預期可得片段 1.5 kbp；*CaORF19.173* rescued allele 預期可得片段 4.7 kbp。

圖<B>：南方點墨法結果。Lane 4 為 Wild-type strain (SC5314)；Lane 5、6 為 *CaORF19.173* 單套基因剔除株 (*CaORF19.173*/*Caorf19.173*::FRT)；Lane 7~9 為 *CaORF19.173* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.173*::FRT/*Caorf19.173*::FRT)；Lane 1~3 為 *CaORF19.173* 單套基因回復株 (*Caorf19.173*::FRT/*Caorf19.173*::*CaORF19.173*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled

<A>



<B>

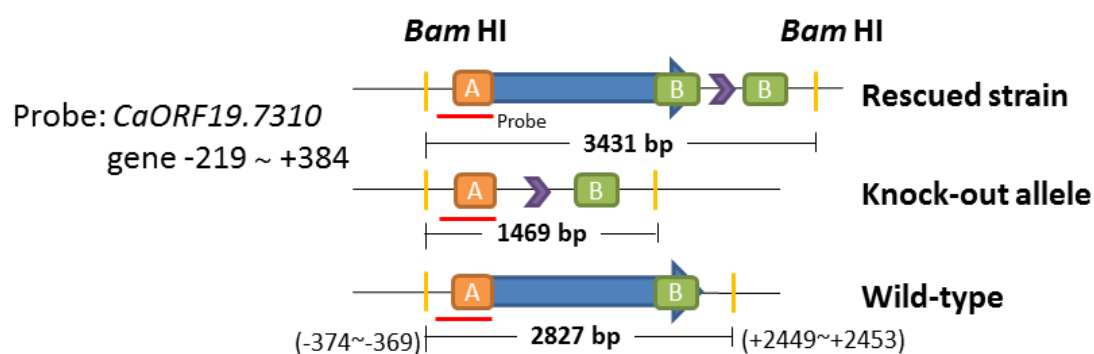


圖二十八、南方點墨法 (Southern blot) 二次檢驗 *CaORF19.173* 各突變株。

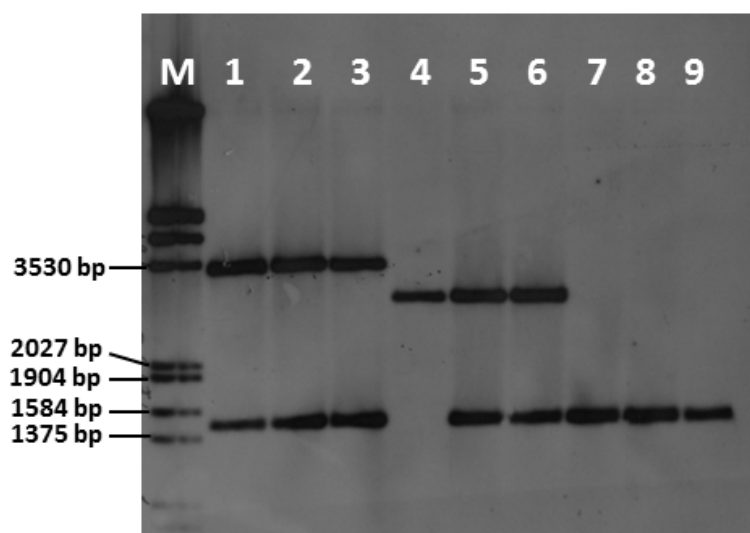
圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色直線代表限制酶 *Bsa* BI 作用位置；紅色底線代表探針位置。Wild-type allele 預期可得片段 4931 bps；*CaORF19.173* knock-out allele 預期可得片段 2 kbp；*CaORF19.173* rescued allele 預期可得片段 5.3 kbp。

圖<B>：南方點墨法結果。Lane 4 為 Wild-type strain (SC5314)；Lane 5、6 為 *CaORF19.173* 單套基因剔除株 (*CaORF19.173*/*Caorf19.173*::FRT)；Lane 7~9 為 *CaORF19.173* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.173*::FRT/*Caorf19.173*::FRT)；Lane 1~3 為 *CaORF19.173* 單套基因回復株 (*Caorf19.173*::FRT/*Caorf19.173*::*CaORF19.173*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled

<A>



<B>



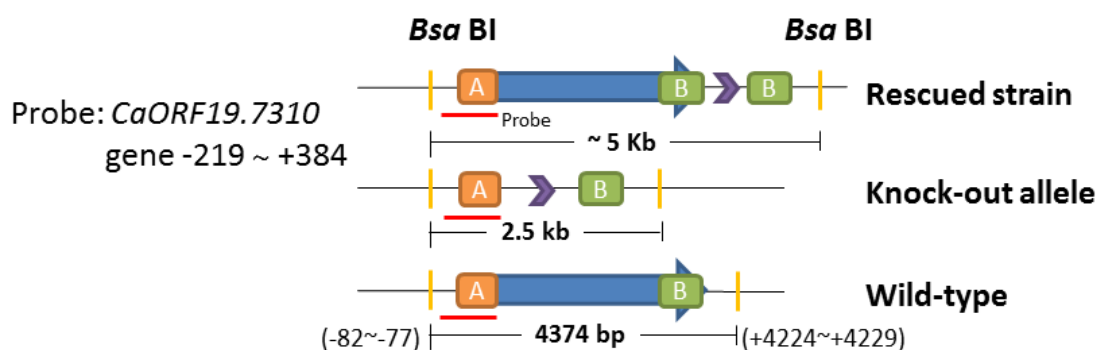
圖二十九、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaORF19.7310* 各突變株。

圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色直線代表限制酶 *Bam* HI 作用位置；紅色底線代表探針位置。Wild-type allele 預期可得片段 2827 bp；*CaORF19.7310* knock-out allele 預期可得片段 1469 bp；*CaORF19.7310* rescued allele 預期可得片段 3431 bp。

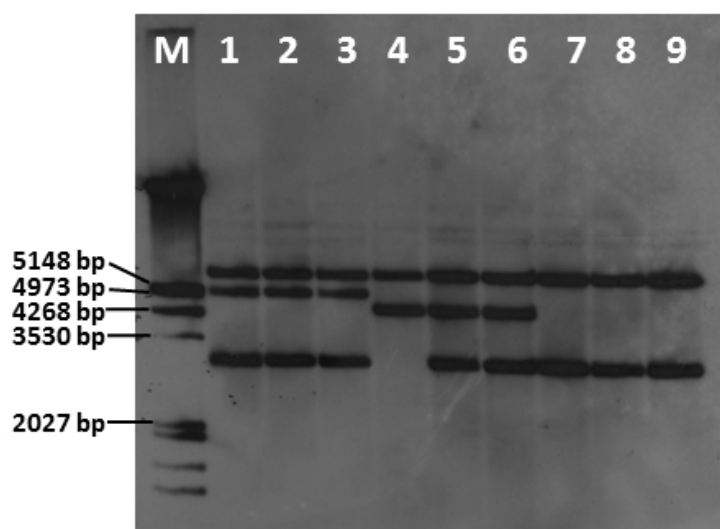
圖<B>：南方點墨法結果。Lane 4 為 Wild-type strain (SC5314)；Lane 5、6 為 *CaORF19.7310* 單套基因剔除株 (*CaORF19.7310/Caorf19.7310::FRT*)；Lane 7~9 為 *CaORF19.7310* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.7310::FRT/Caorf19.7310::FRT*)；Lane 1~3 為 *CaORF19.7310* 單套基因回復株 (*Caorf19.7310::FRT/Caorf19.7310::CaORF19.7310*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled



<A>



<B>

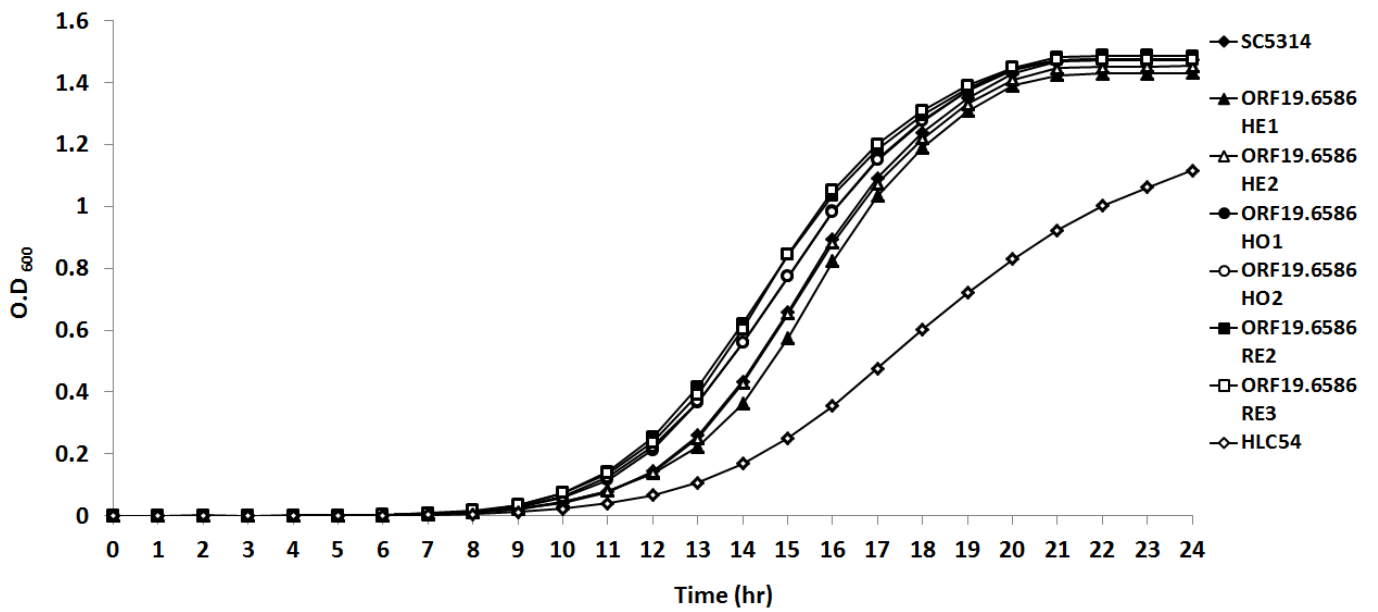


圖三十、南方點墨法 (Southern blot) 二次檢驗 *CaORF19.7310* 各突變株。

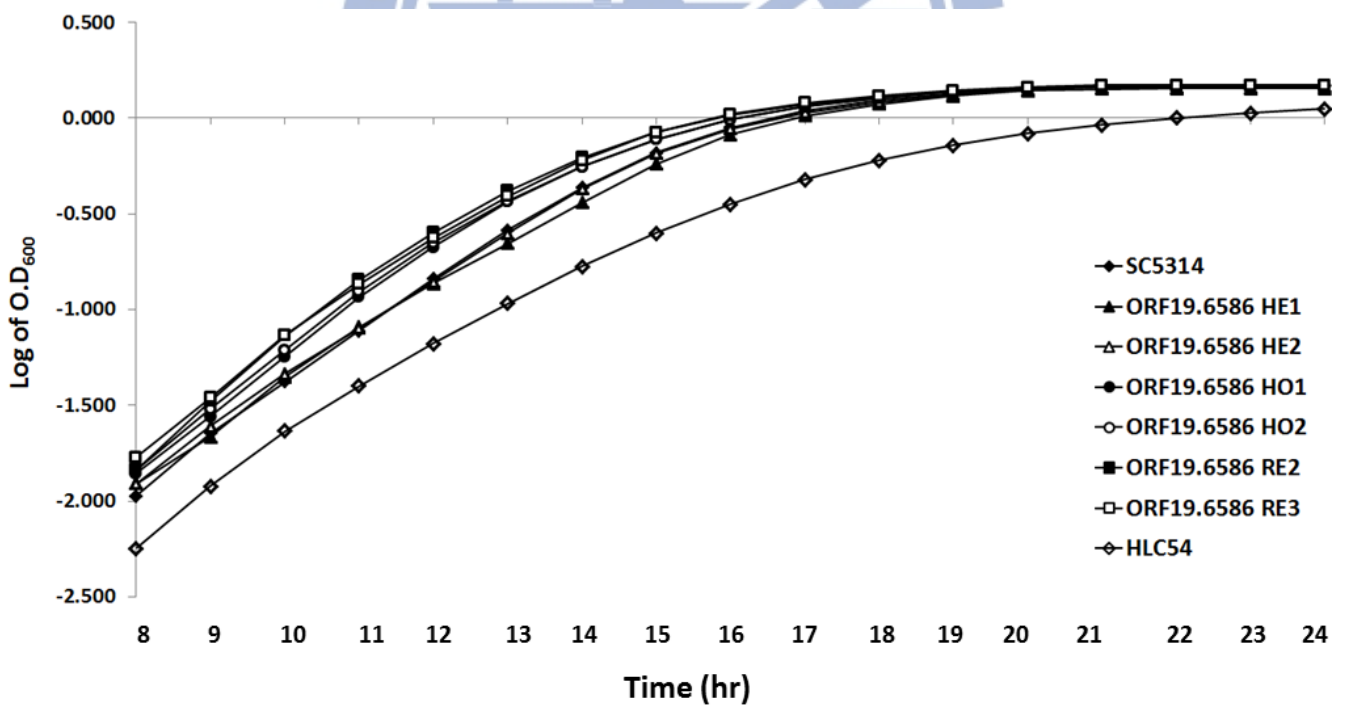
圖<A>：南方點墨法結果示意圖。黃色直線代表限制酶 *Bam* HI 作用位置；紅色底線代表探針位置。Wild-type allele 預期可得片段 4374 bps；*CaORF19.7310* knock-out allele 預期可得片段 2.5 kbp；*CaORF19.7310* rescued allele 預期可得片段約 5 kbp。

圖<B>：南方點墨法結果。Lane 4 為 Wild-type strain (SC5314)；Lane 5、6 為 *CaORF19.7310* 單套基因剔除株 (*CaORF19.7310*/*Caorf19.7310::FRT*)；Lane 7~9 為 *CaORF19.7310* 雙套基因剔除株 (*Caorf19.7310::FRT*/*Caorf19.7310::FRT*)；Lane 1~3 為 *CaORF19.7310* 單套基因回復株 (*Caorf19.7310::FRT*/*Caorf19.7310::CaORF19.7310*)。Lane M 為 DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled

<A>



<B>



<C>

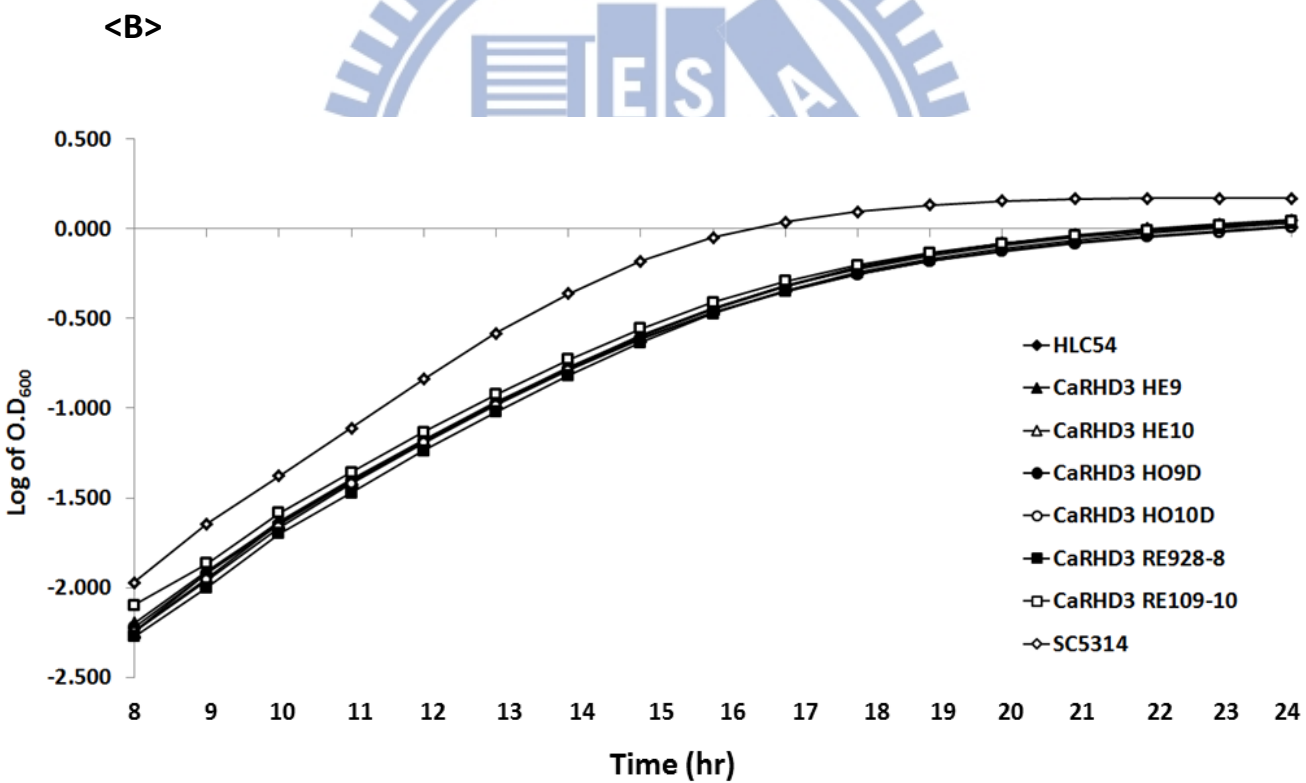
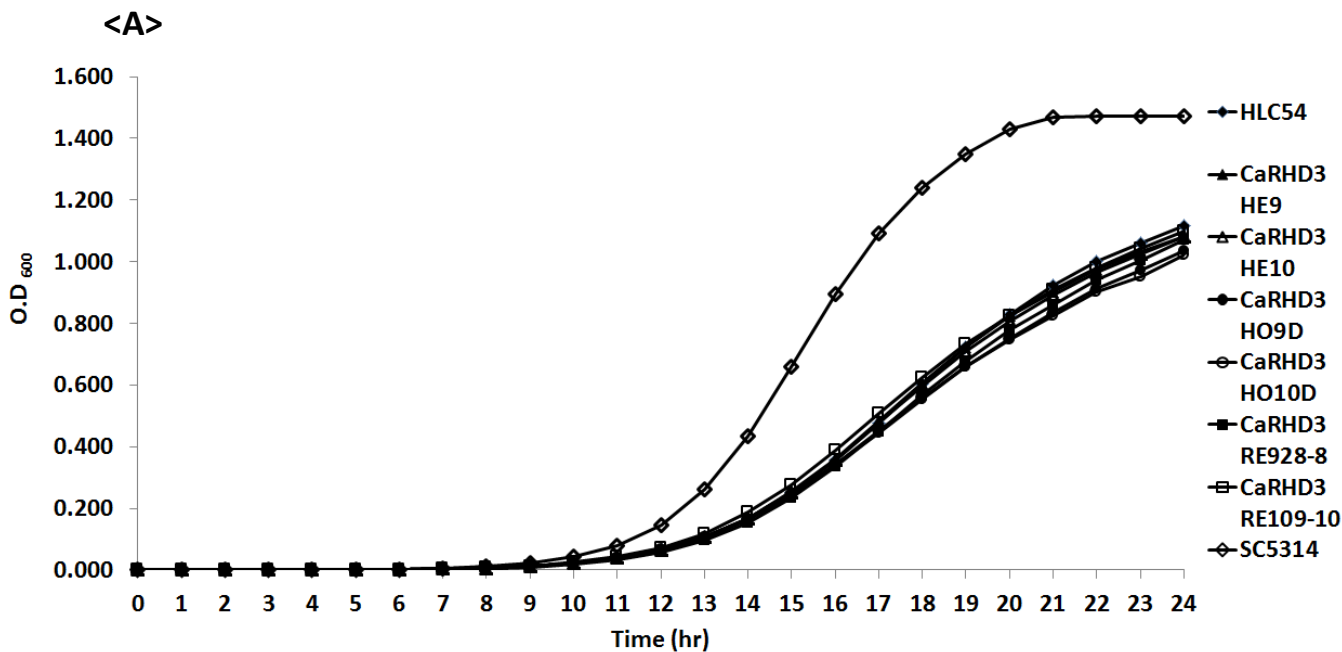
Strains	Doubling time
SC5314	<b>1.084</b>
CaORF19.6586 HE1	<b>1.198</b>
CaORF19.6586 HE2	<b>1.151</b>
CaORF19.6586 HO1	<b>1.060</b>
CaORF19.6586 H02	<b>1.074</b>
CaORF19.6586 RE2	<b>1.036</b>
CaORF19.6586 RE3	<b>1.105</b>
HLC54	<b>1.177</b>

圖三十一、CaORF19.6586 各突變株在 YPD 培養液於 30 °C 靜置培養 24 H 之生長情形。

圖<A> 各突變株之生長曲線，橫軸為測量時間點，縱軸為 OD<sub>600nm</sub> 吸光值。

圖<B> 各突變株 OD<sub>600nm</sub> 吸光值之對數所作生長曲線，橫軸為測量時間點，縱軸為 OD<sub>600nm</sub> 吸光值之對數值。

圖<C> 取八到十三小時計算 Doubling time (附圖四為計算公式)。



<C>

Strains	Doubling time
HLC54	<b>0.598</b>
CaRHD3 HE9	<b>0.598</b>
CaRHD3 HE10	<b>0.608</b>
CaRHD3 HO9D	<b>0.601</b>
CaRHD3 HO10D	<b>0.595</b>
CaRHD3 RE928-8	<b>0.584</b>
CaRHD3 RE109-10	<b>0.639</b>
SC5314	<b>0.773</b>

圖三十二、CaRHD3 各突變株在 YPD 培養液於 30 °C 靜置培養 24 H 之生長情形。

圖<A> 各突變株之生長曲線，橫軸為測量時間點，縱軸為 OD<sub>600nm</sub> 吸光值。

圖<B> 各突變株 OD<sub>600nm</sub> 吸光值之對數所作生長曲線，橫軸為測量時間點，縱軸為 OD<sub>600nm</sub> 吸光值之對數值。

圖<C> 取八到十四小時計算 Doubling time (附圖四為計算公式)。

<A>

50  $\mu$ m



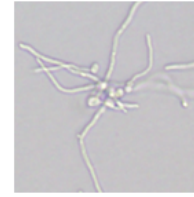
**HLC54**  
(*cph1/cph1*  
*efg1/efg1*)



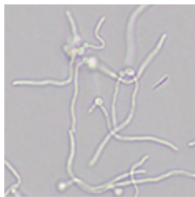
**Heterozygote 1**  
(*CaORF19.6586/*  
*Caorf19.6586::FRT*)



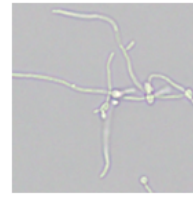
**Homozygote 1**  
(*Caorf19.6586::FRT/*  
*Caorf19.6586::FRT*)



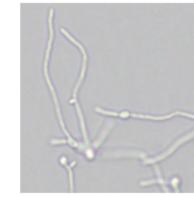
**Rescued strain 2**  
(*Caorf19.6586::FRT/*  
*Caorf19.6586::CaORF19.6586*)



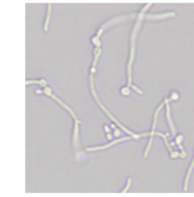
**SC5314**  
(Wild-type)



**Heterozygote 2**  
(*CaORF19.6586/*  
*Caorf19.6586::FRT*)



**Homozygote 2**  
(*Caorf19.6586::FRT/*  
*Caorf19.6586::FRT*)



**Rescued strain 3**  
(*Caorf19.6586::FRT/*  
*Caorf19.6586::CaORF19.6586*)

<B>

50  $\mu$ m



**HLC54**  
(*cph1/cph1*  
*efg1/efg1*)



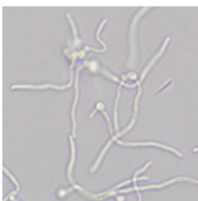
**Heterozygote 9**  
(*CaRHD3/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Homozygote 9D**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Rescued strain 928-8**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::*  
*CaRHD3 cph1/cph1*  
*efg1/efg1*)



**SC5314**  
(Wild-type)



**Heterozygote 10**  
(*CaRHD3/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



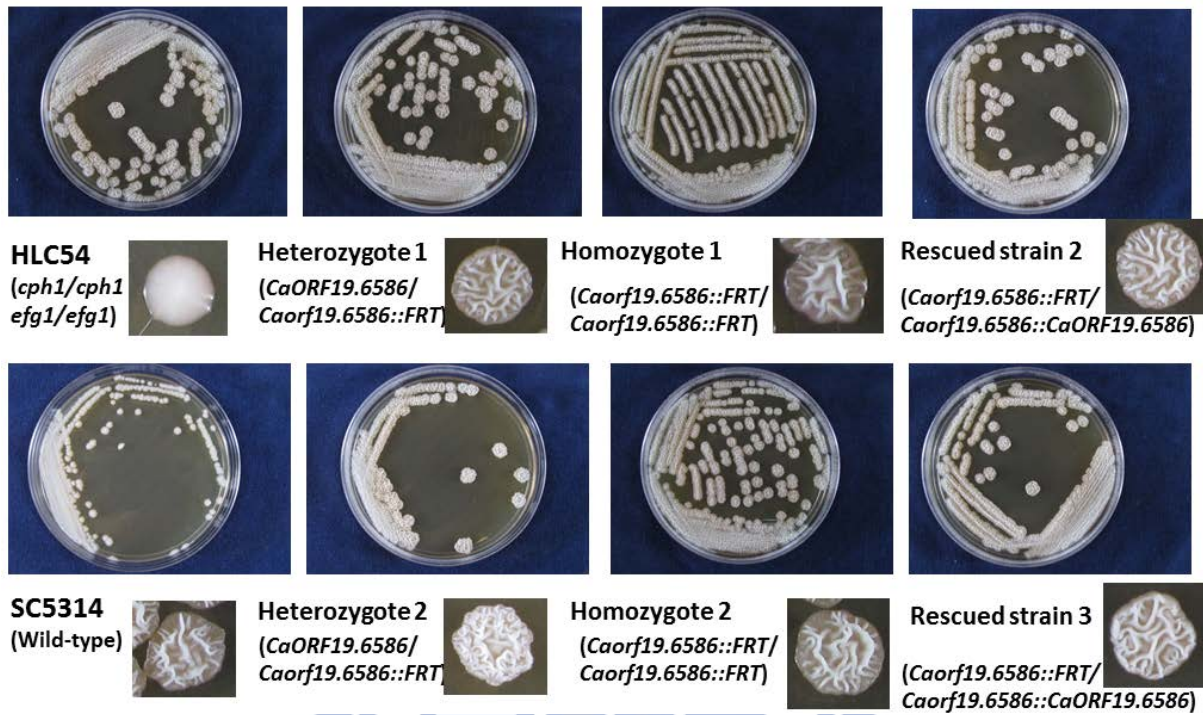
**Homozygote 10D**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::FR*  
*T cph1/cph1 efg1/efg1*)



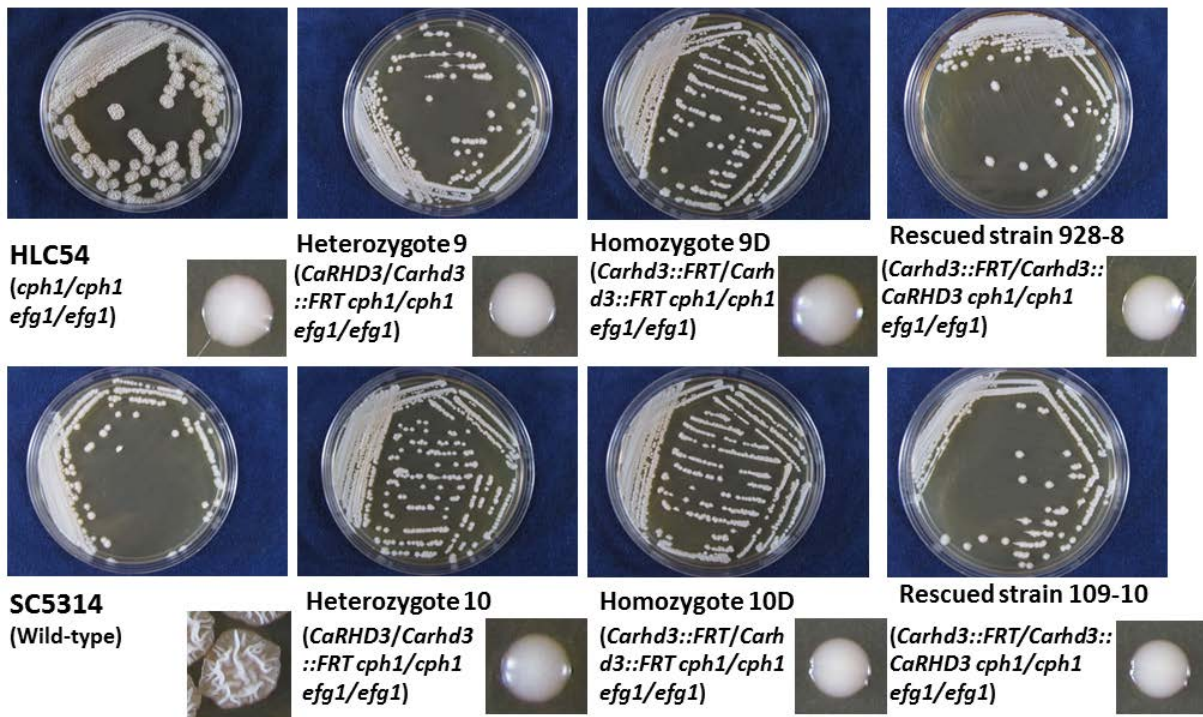
**Rescued strain 109-10**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::Ca*  
*RHD3 cph1/cph1*  
*efg1/efg1*)

圖三十三、芽管試驗之結果。接種 *CaORF19.6586* 和 *CaRHD3* 各突變株在含有 10% FBS 之 YPD 培養液，以 37°C 培養 3 小時，利用倒立式顯微鏡 400 倍觀察芽管生成情形。菌株 SC5314 和 HLC54 作為對照組。

<A>



<B>



圖三十四、在含有 4% FBS 之 YPD 培養基於 37°C 培養三天之菌落型態。菌株 SC5314 和 HLC54 作為對照組。

圖<A>：CaORF19.6586 各突變株菌落型態。

圖<B>：CaRHD3 各突變株菌落型態。

<A>



**HLC54**  
(*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Heterozygote 1**  
(*CaORF19.6586/*  
*Caorf19.6586::FRT*)



**Homozygote 1**  
(*Caorf19.6586::FRT/*  
*Caorf19.6586::FRT*)



**Rescued strain 2**  
(*Caorf19.6586::FRT/*  
*Caorf19.6586::CaORF19.6586*)



**SC5314**  
(Wild-type)



**Heterozygote 2**  
(*CaORF19.6586/*  
*Caorf19.6586::FRT*)

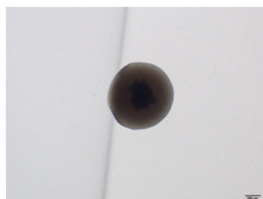


**Homozygote 2**  
(*Caorf19.6586::FRT/*  
*Caorf19.6586::FRT*)

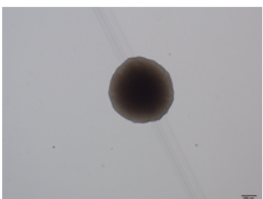


**Rescued strain 3**  
(*Caorf19.6586::FRT/*  
*Caorf19.6586::CaORF19.6586*)

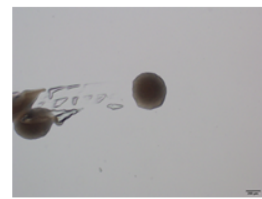
<B>



**HLC54**  
(*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Heterozygote 9**  
(*CaRHD3/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Homozygote 9D**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 ffg1/efg1*)



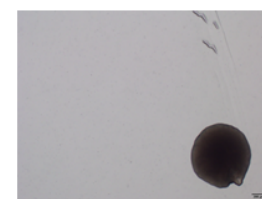
**Rescued strain 928-8**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::*  
*CaRHD3 cph1/cph1*  
*efg1/efg1*)



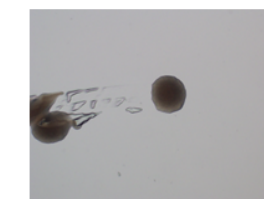
**SC5314**  
(Wild-type)



**Heterozygote 10**  
(*CaRHD3/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Homozygote 10D**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Rescued strain 109-10**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::*  
*CaRHD3 cph1/cph1*  
*efg1/efg1*)

圖三十五、在含有 4% FBS 之 Bacto agar 培養基於 37°C 培養七天之菌落型態。利用倒立式顯微鏡 200 倍觀察。菌株 SC5314 和 HLC54 作為對照組。

圖<A>：CaORF19.6586 各突變株菌落型態。

圖<B>：CaRHD3 各突變株菌落型態。



<A>

**HLC54**  
(*cph1/cph1 efg1/efg1*)



Before washing



After washing

**SC5314**  
(Wild-type)



**Heterozygote 1**  
(*CaORF19.6586/Caorf19.6586::FRT*)



**Heterozygote 2**  
(*CaORF19.6586/Caorf19.6586::FRT*)



**Homozygote 1**  
(*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::FRT*)



Before washing



After washing

**Homozygote 2**  
(*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::FRT*)



**Rescued strain 2**  
(*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::CaORF19.6586*)



**Rescued strain 3**  
(*Caorf19.6586::FRT/Caorf19.6586::CaORF19.6586*)

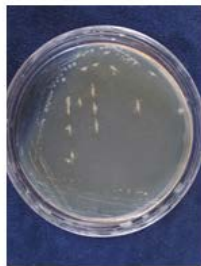


<B>

**HLC54**  
(*cph1/cph1 efg1/efg1*)



Before washing



After washing

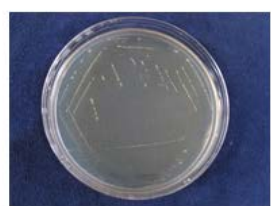
**SC5314**  
(Wild-type)



**Heterozygote 9**  
(*CaRHD3/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Heterozygote 10**  
(*CaRHD3/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Homozygote 9D**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



Before washing



After washing

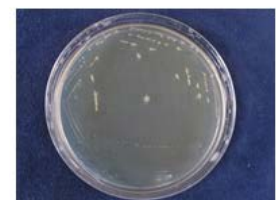
**Homozygote 10D**  
(*Carhd3::FRT/Carhd3::FRT*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



**Rescued strain 928-8**  
(*Carhd3::FRT/*  
*Carhd3::CaRHD3*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



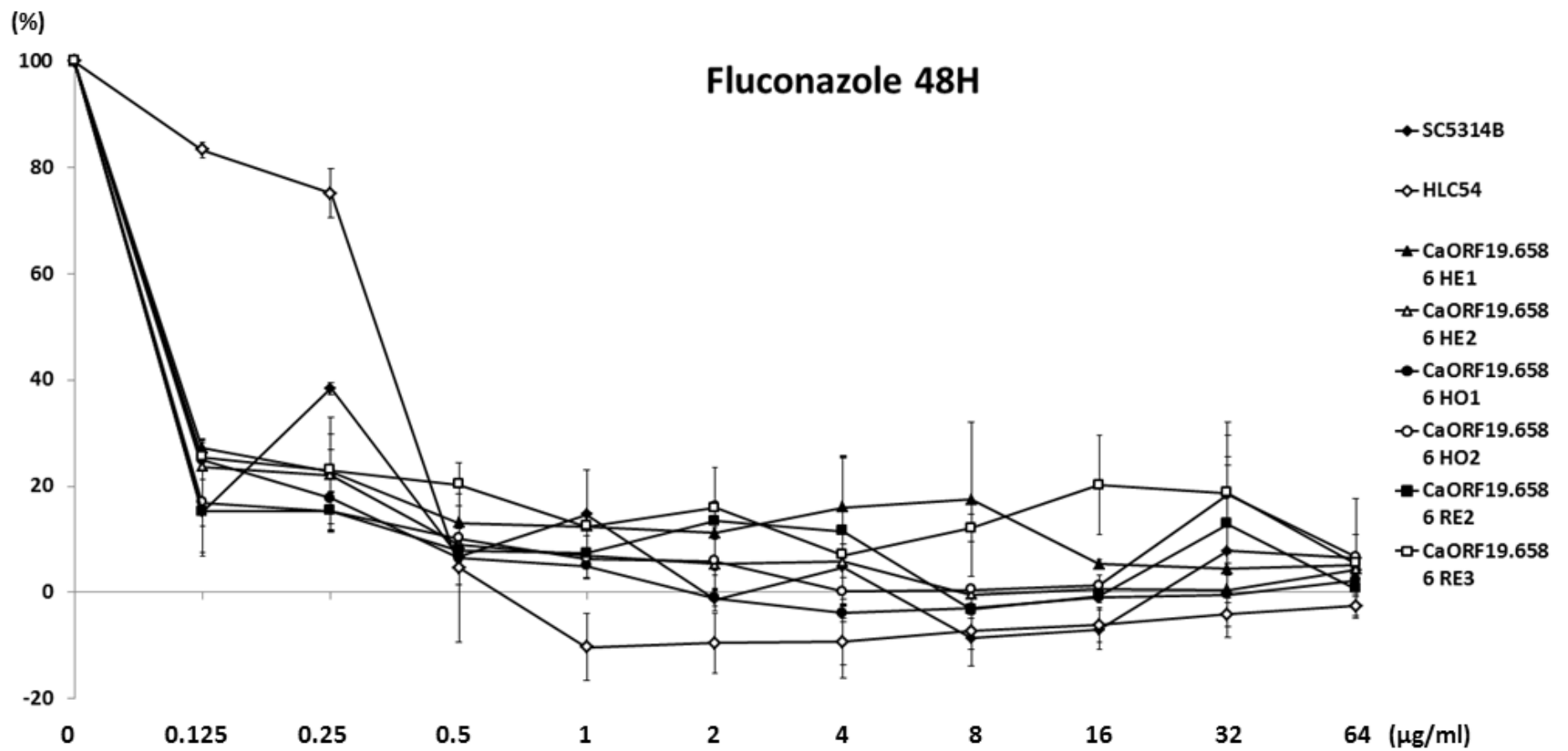
**Rescued strain 109-10**  
(*Carhd3::FRT/*  
*Carhd3::CaRHD3*  
*cph1/cph1 efg1/efg1*)



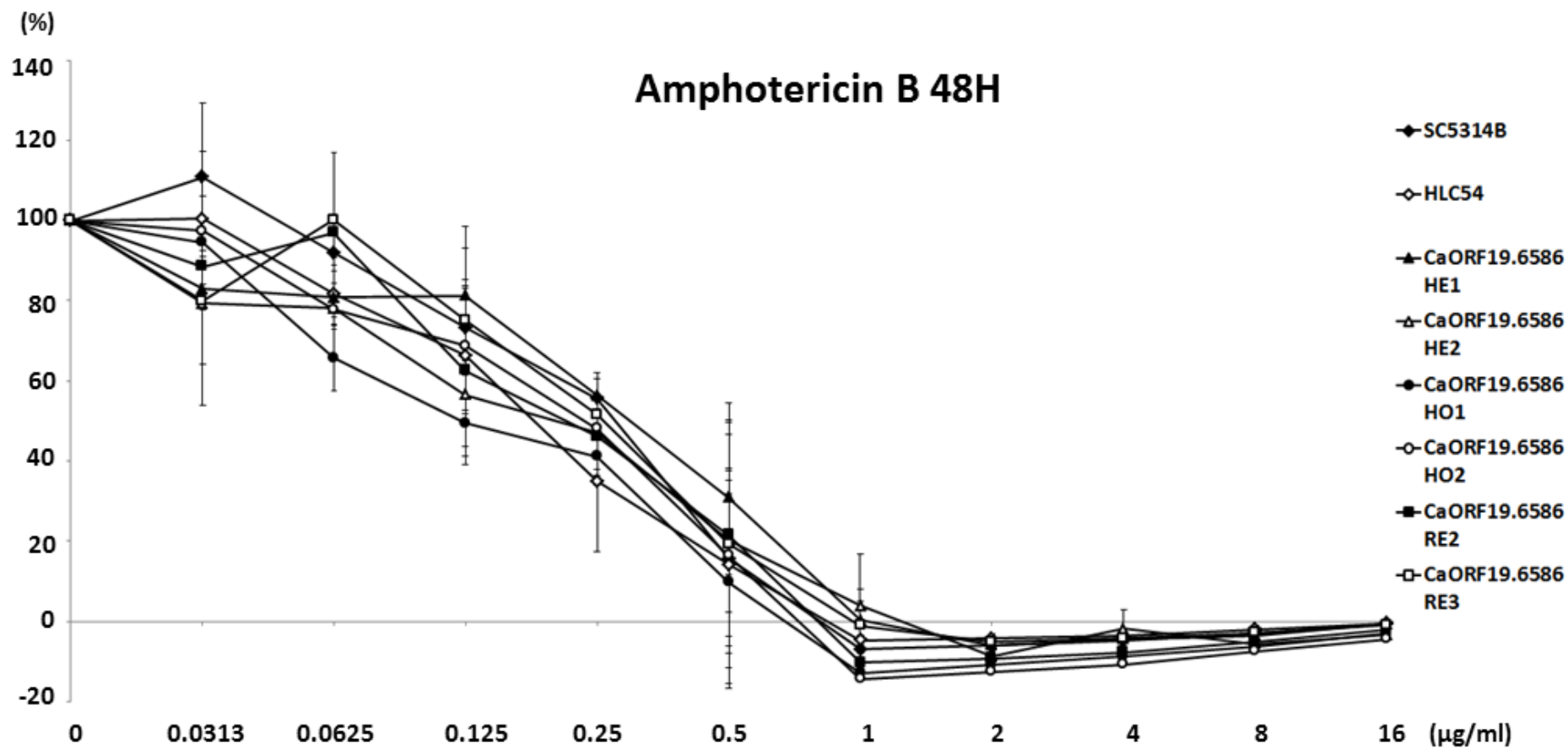
圖三十六、侵犯力測試之結果。菌株接種於 Solid spider 培養基，37 °C 培養七天，之後以定時定量流水沖洗菌落並刮除表面菌落，觀察菌落附著於培養基的程度。菌株 SC5314 和 HLC54 作為對照組。

圖<A>：CaORF19.6586 各突變株菌落流水沖洗前和沖洗後型態。

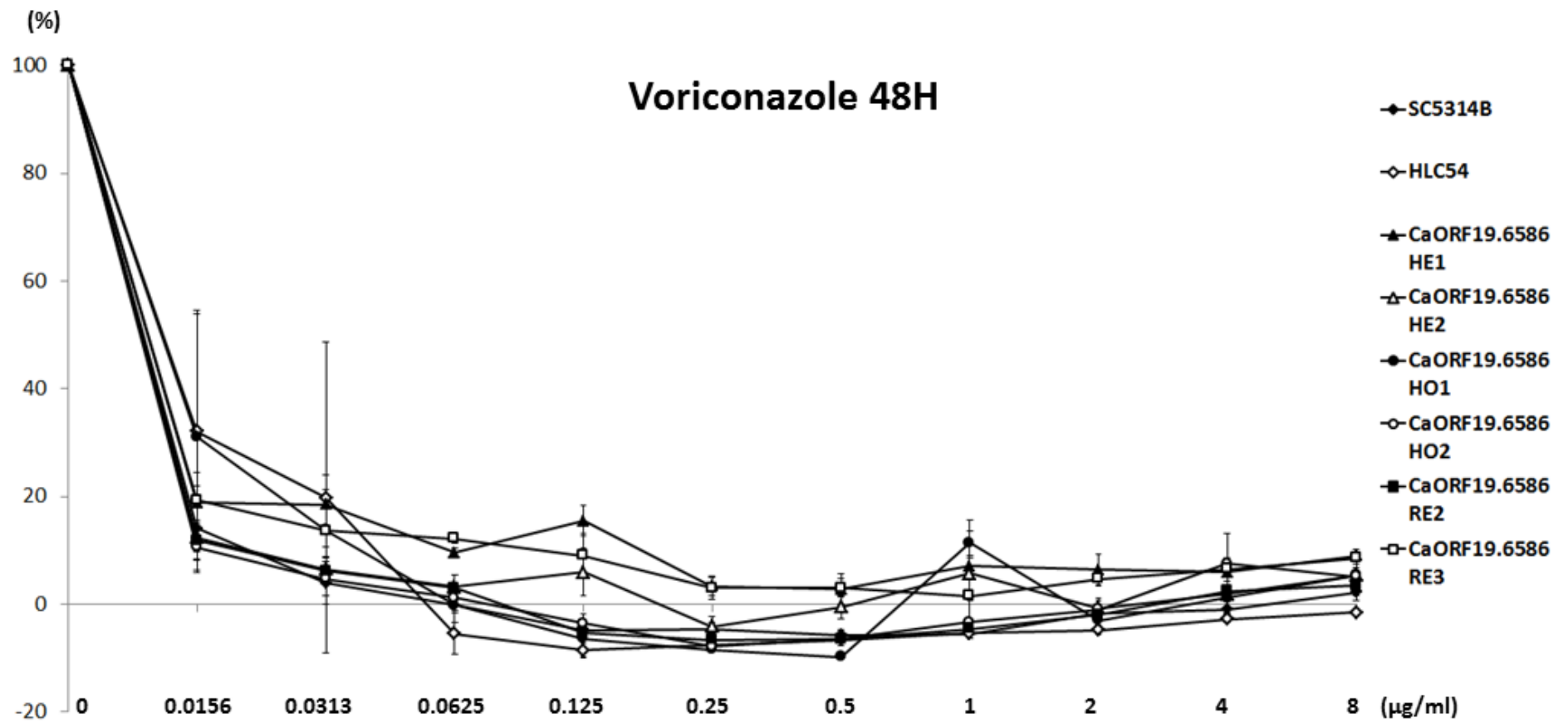
圖<B>：CaRHD3 各突變株菌落流水沖洗前和沖洗後型態。



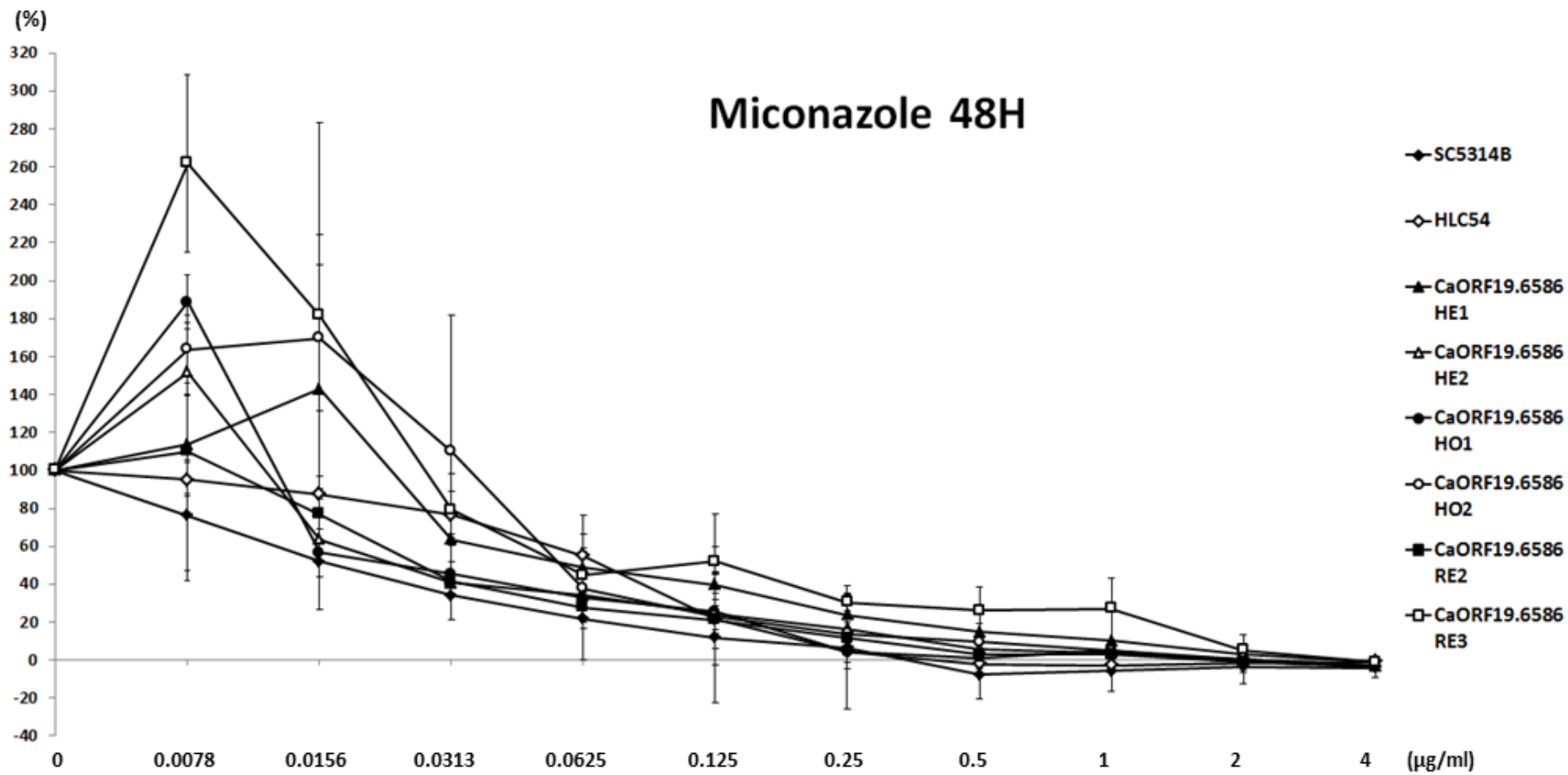
圖三十七、<A> 測試 *CaORF19.6586* 對 Fluconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



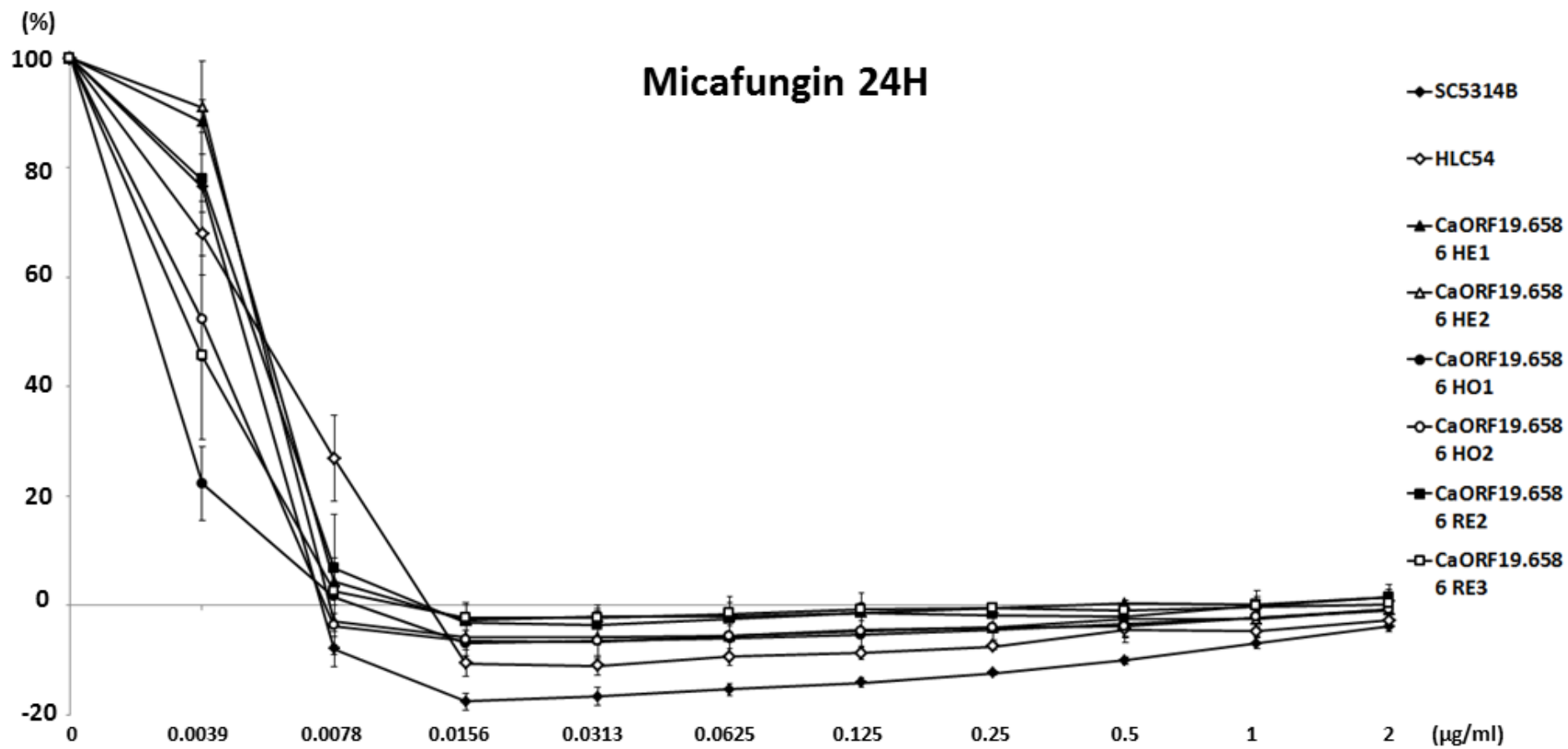
圖三十七、<B> 測試 *CaORF19.6586* 對 Amphotericin B 在十種濃度於 35°C 培養 48 H 之結果。



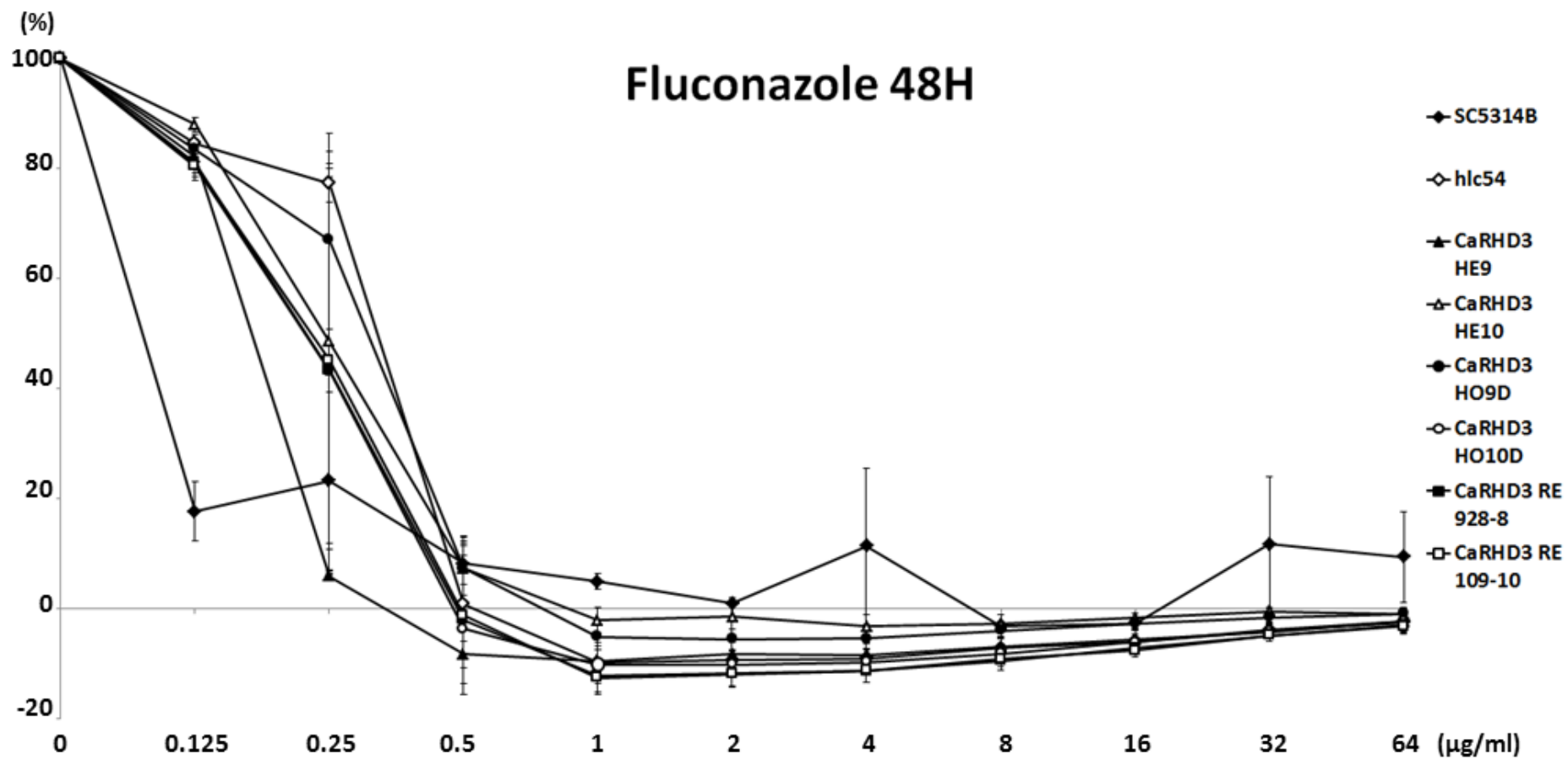
圖三十七、<C> 測試 *CaORF19.6586* 對 Voriconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



圖三十七、<D> 測試 *CaORF19.6586* 對 Miconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。

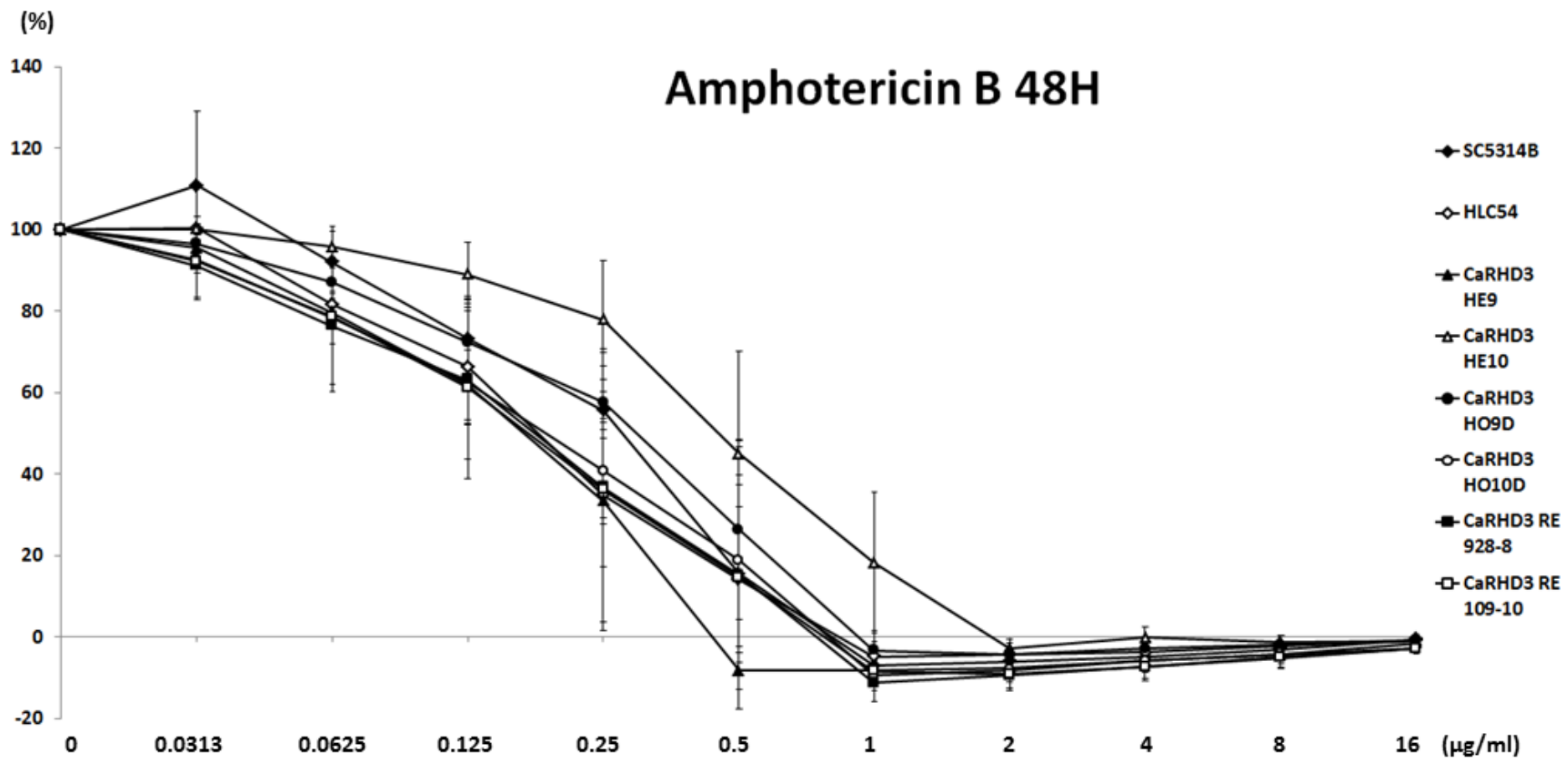


圖三十七、<E> 測試 *CaORF19.6586* 對 Micafungin 在十種濃度於 35 °C 培養 24 H 之結果。

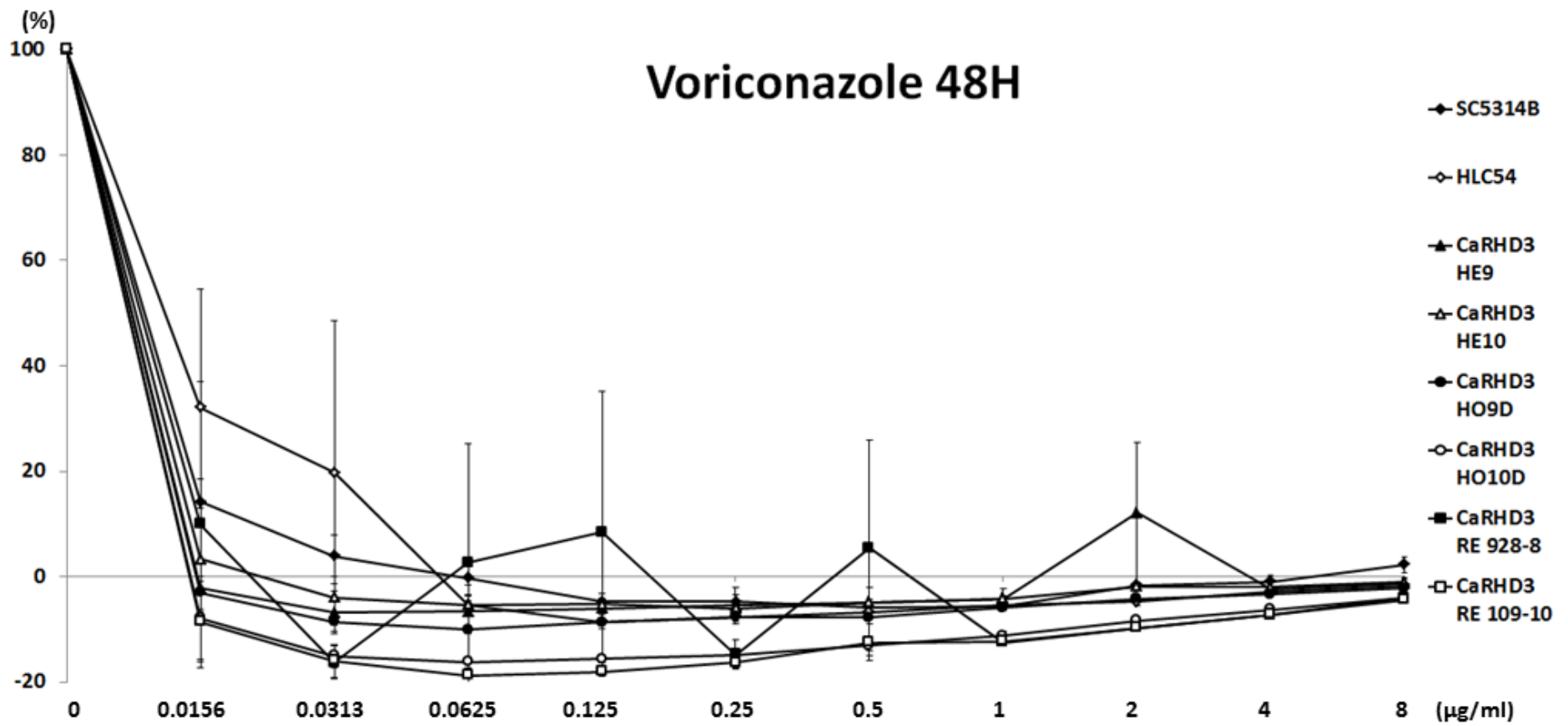


圖三十八、<A> 測試 *CaRHD3* 對 Fluconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。

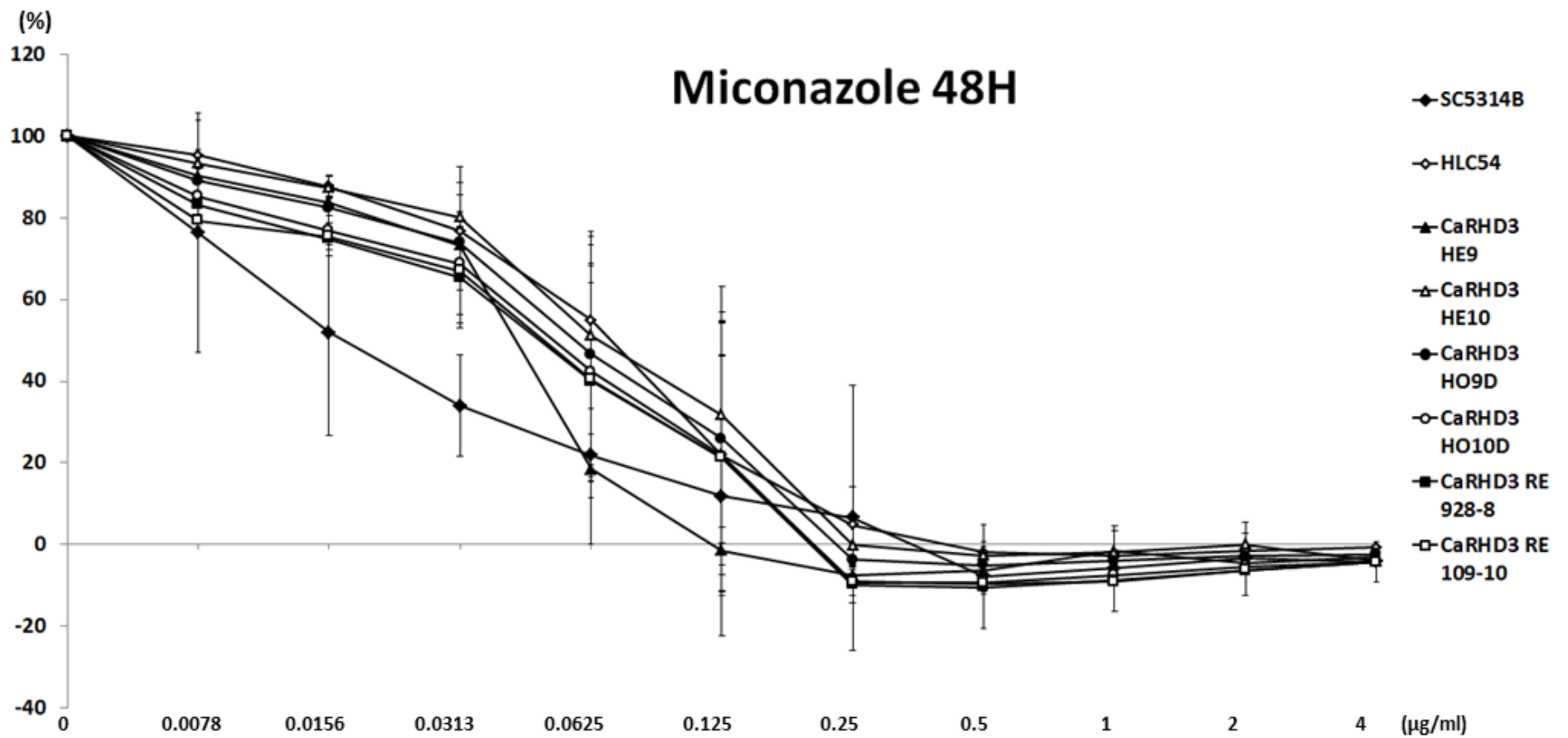




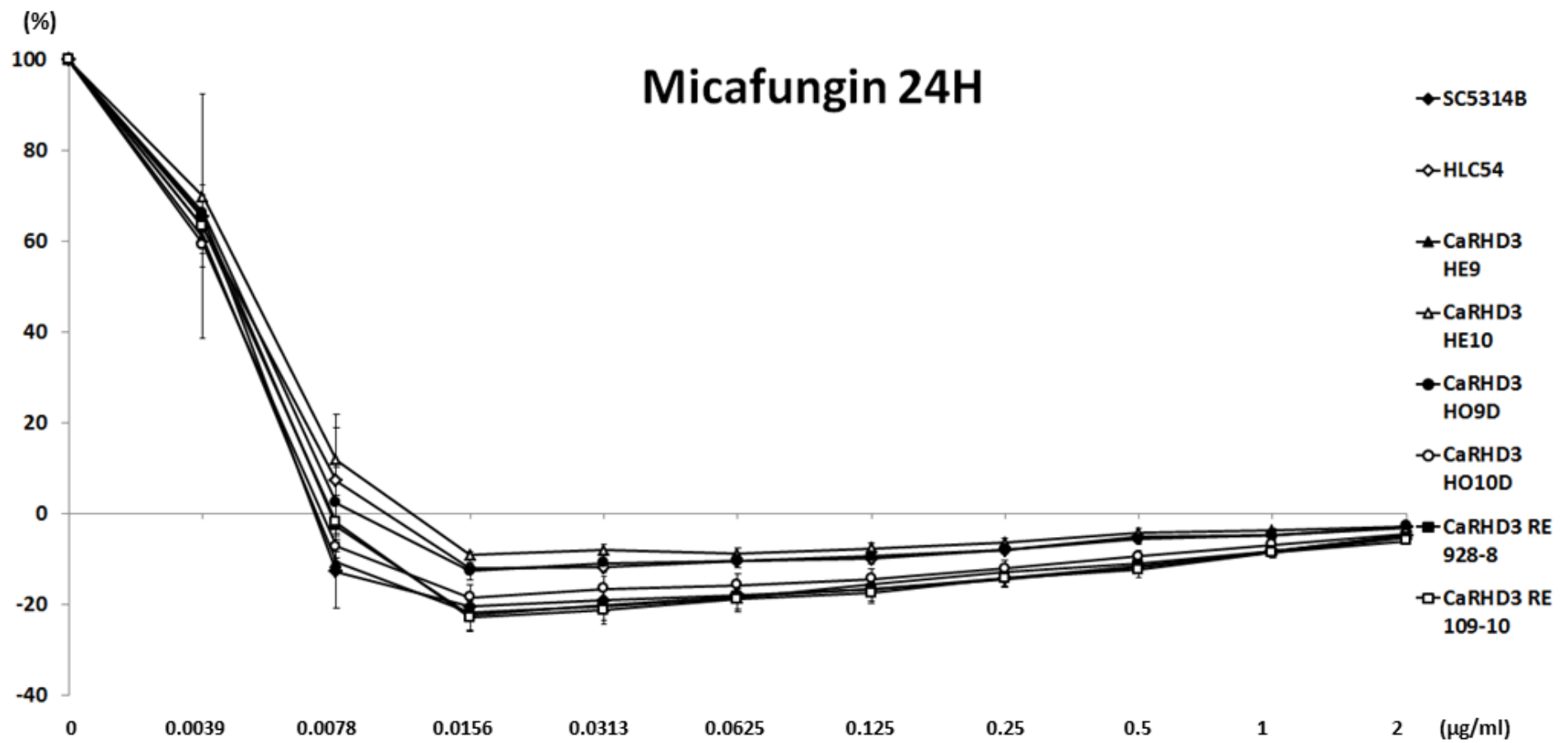
圖三十八、<B> 測試 *CaRHD3* 對 Amphotericin B 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



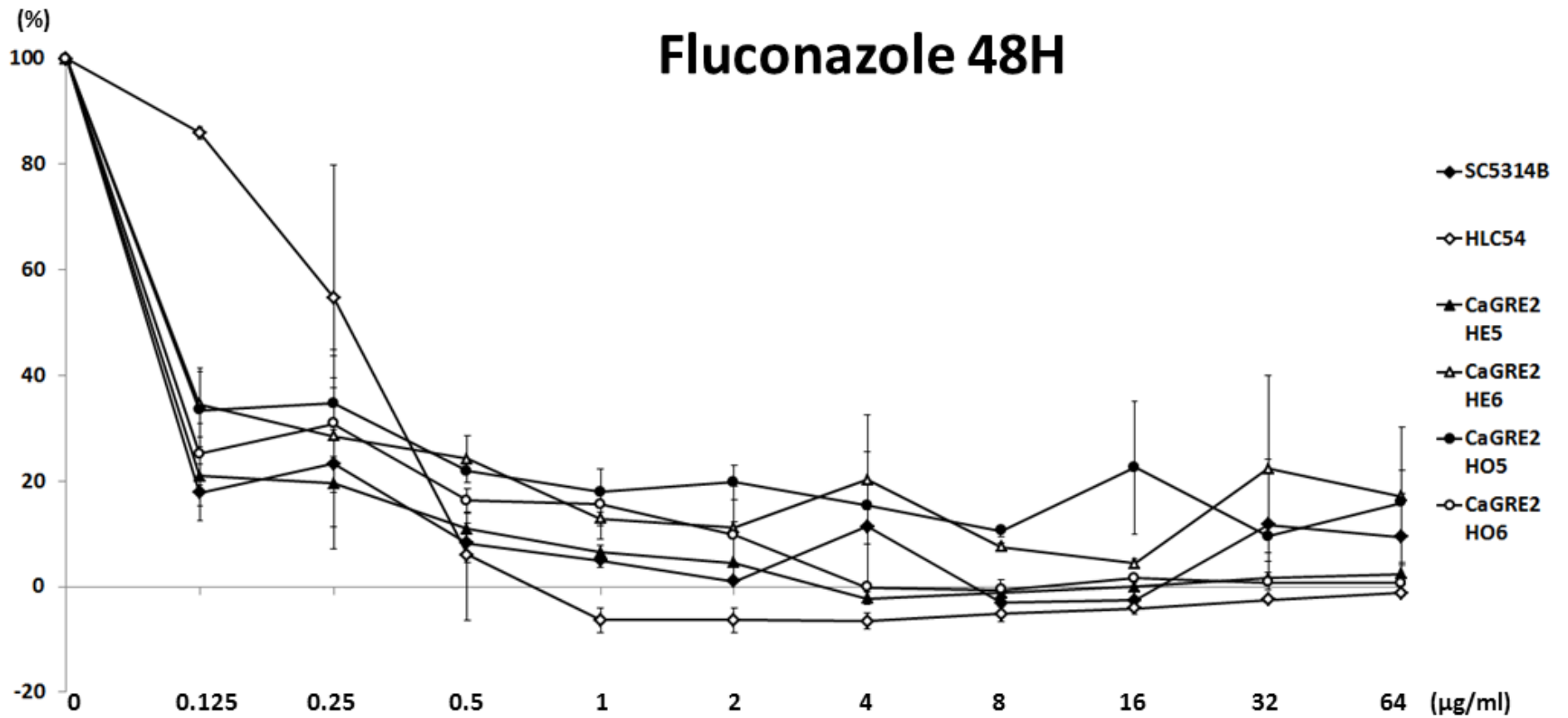
圖三十八、<C> 測試 *CaRHD3* 對 Voriconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



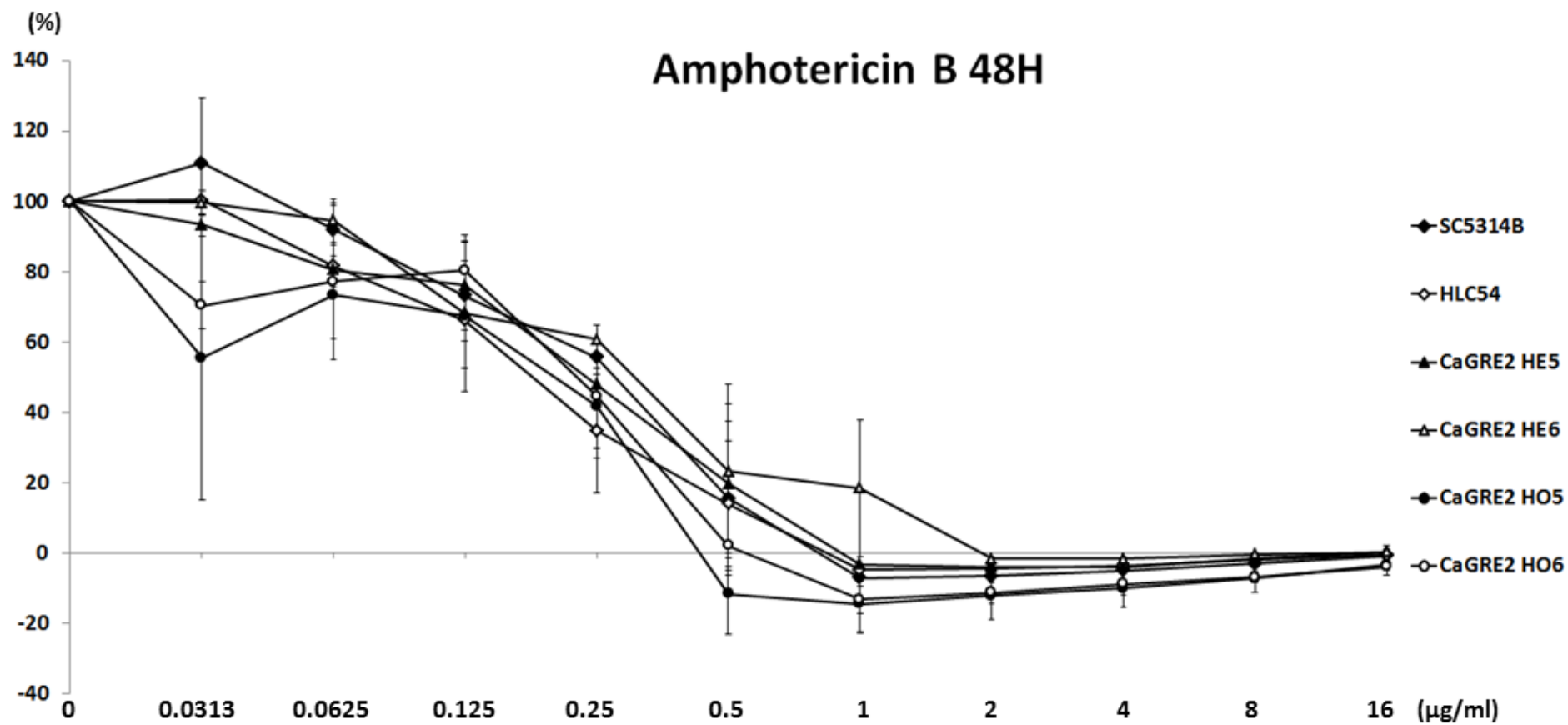
圖三十八、<D> 測試 *CaRHD3* 對 Miconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



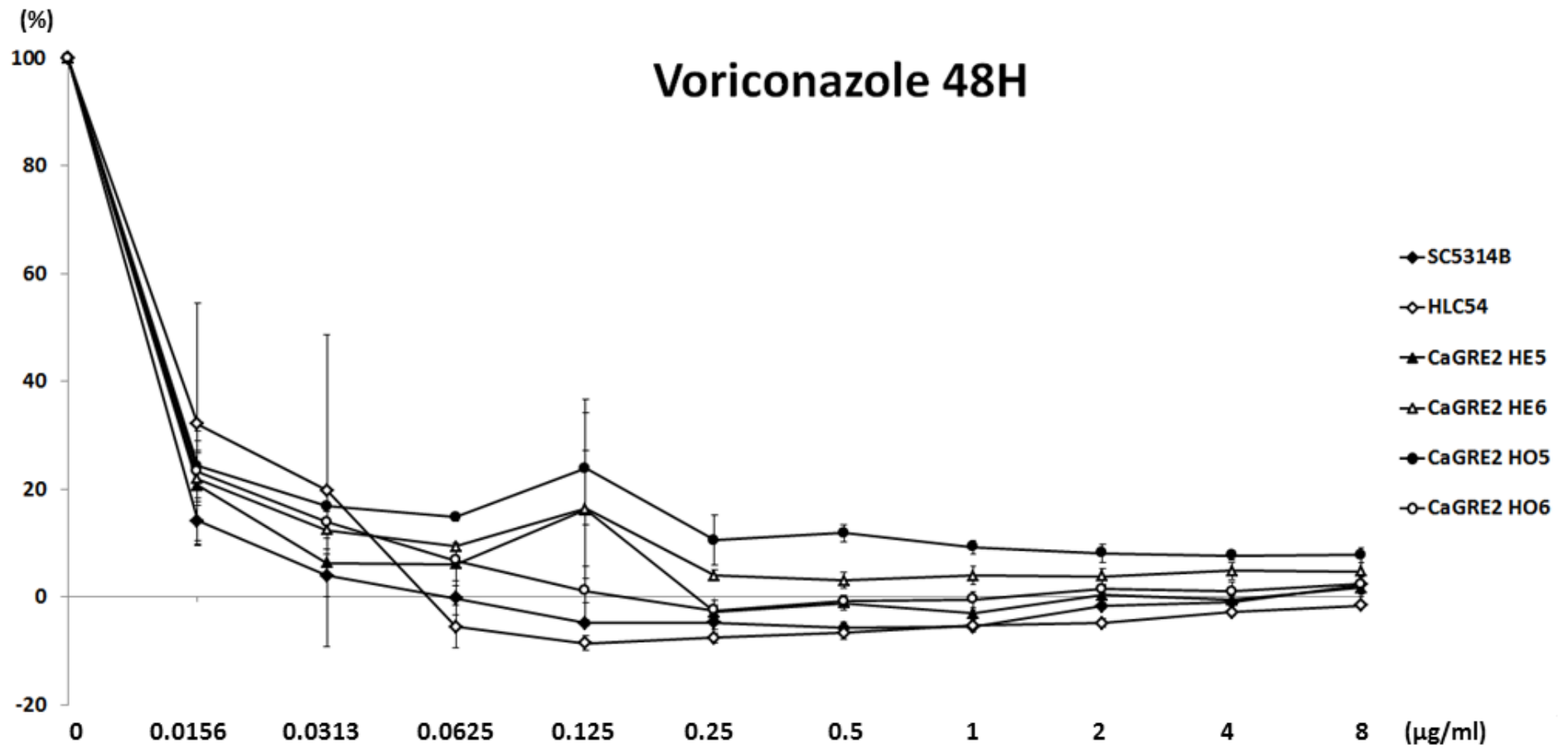
圖三十八、<E> 測試 *CaRHD3* 對 Micafungin 在十種濃度於 35 °C 培養 24 H 之結果。



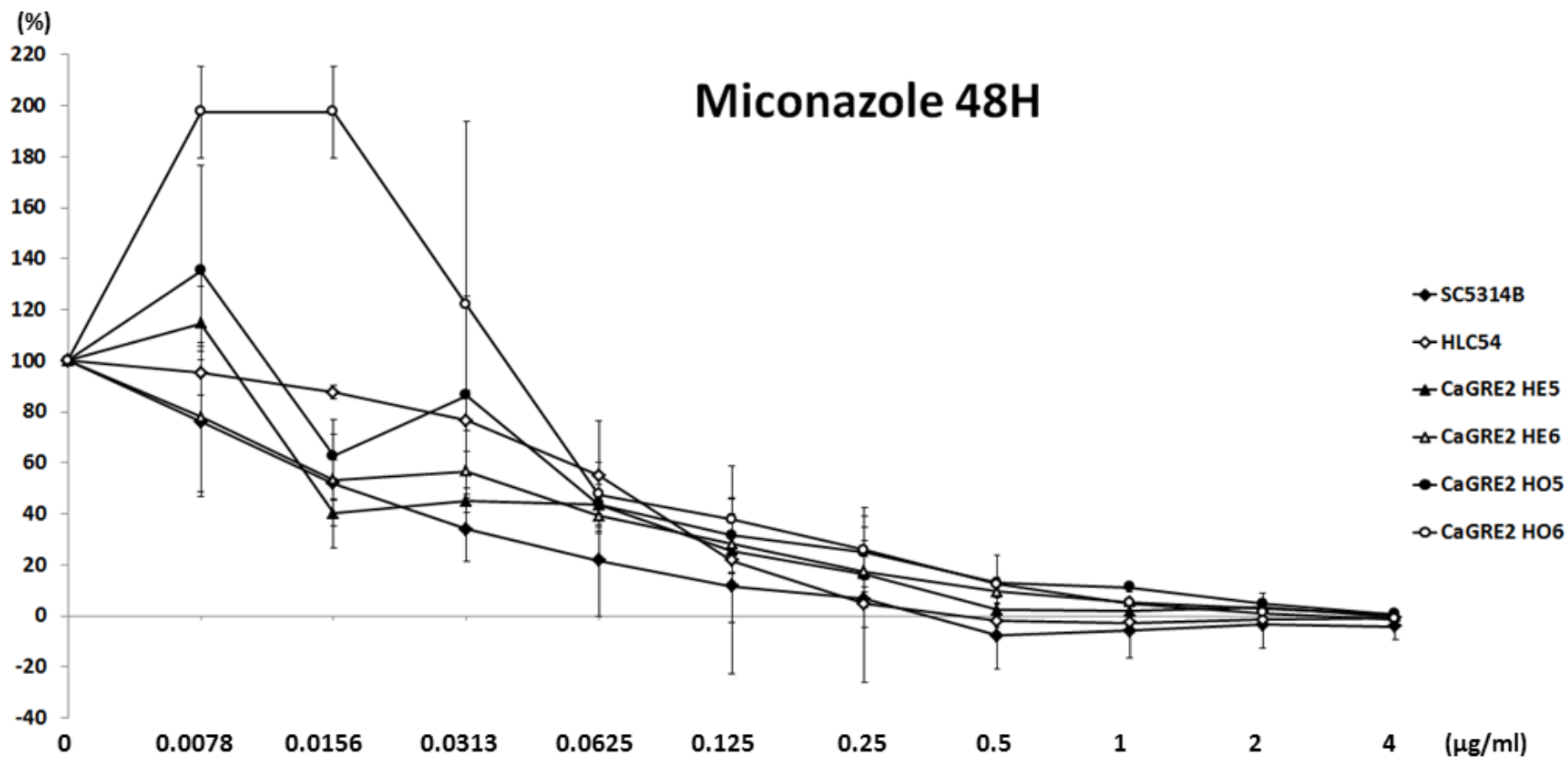
圖三十九、<A> 測試 *CaGRE2* 對 Fluconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



圖三十九、<B> 測試 *CaGRE2* 對 Amphotericin B 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。

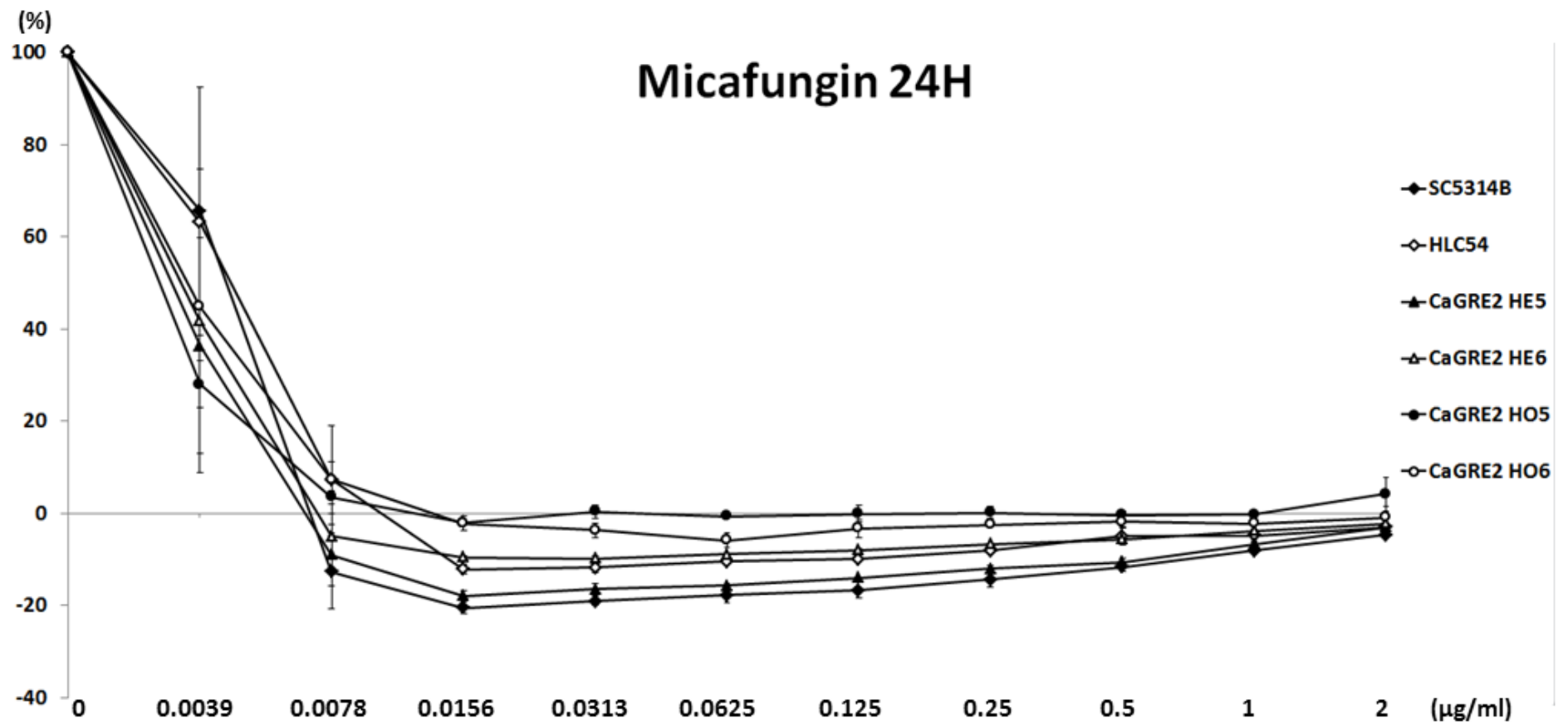


圖三十九、<C> 測試 *CaGRE2* 對 Voriconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。

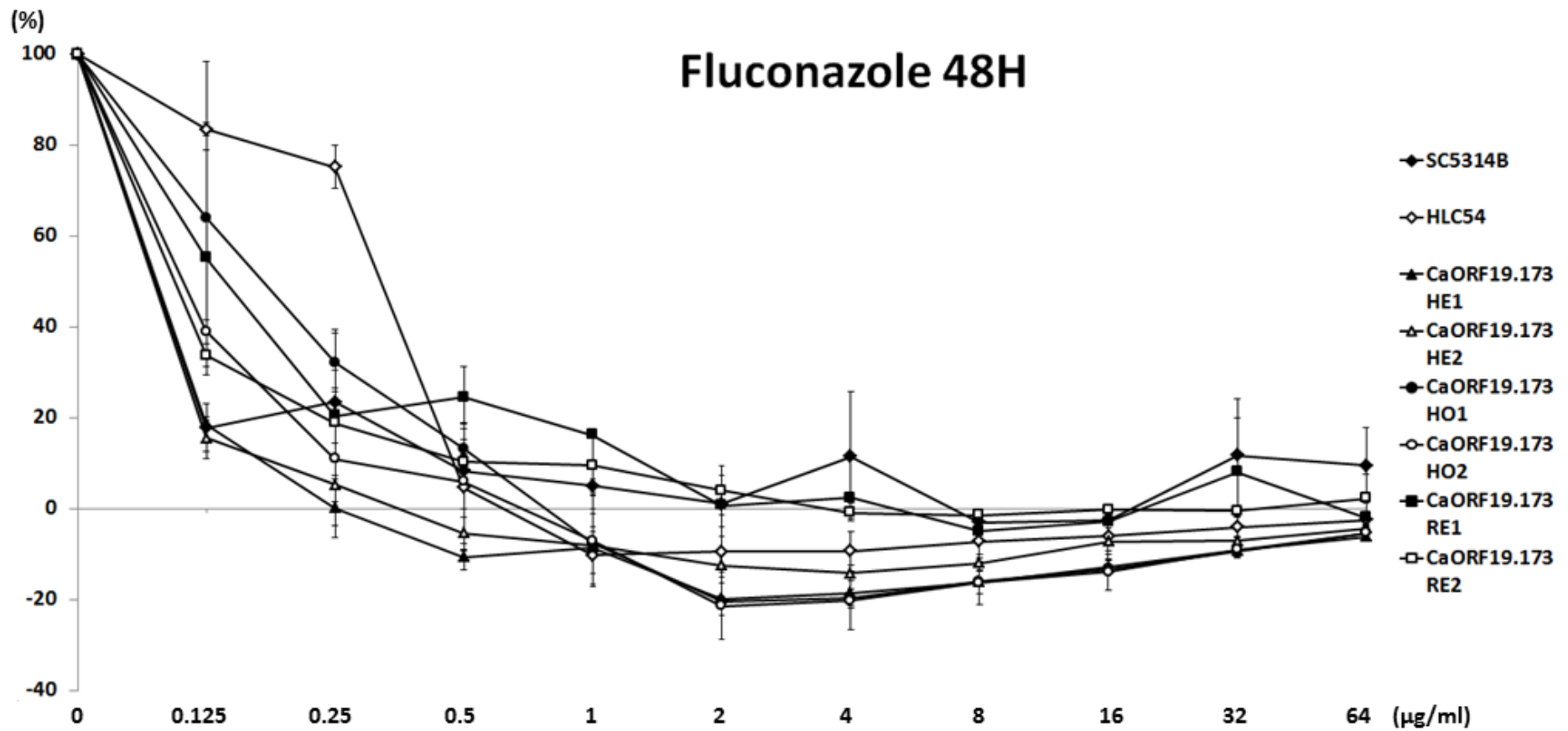


圖三十九、<D> 測試 *CaGRE2* 對 Miconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。

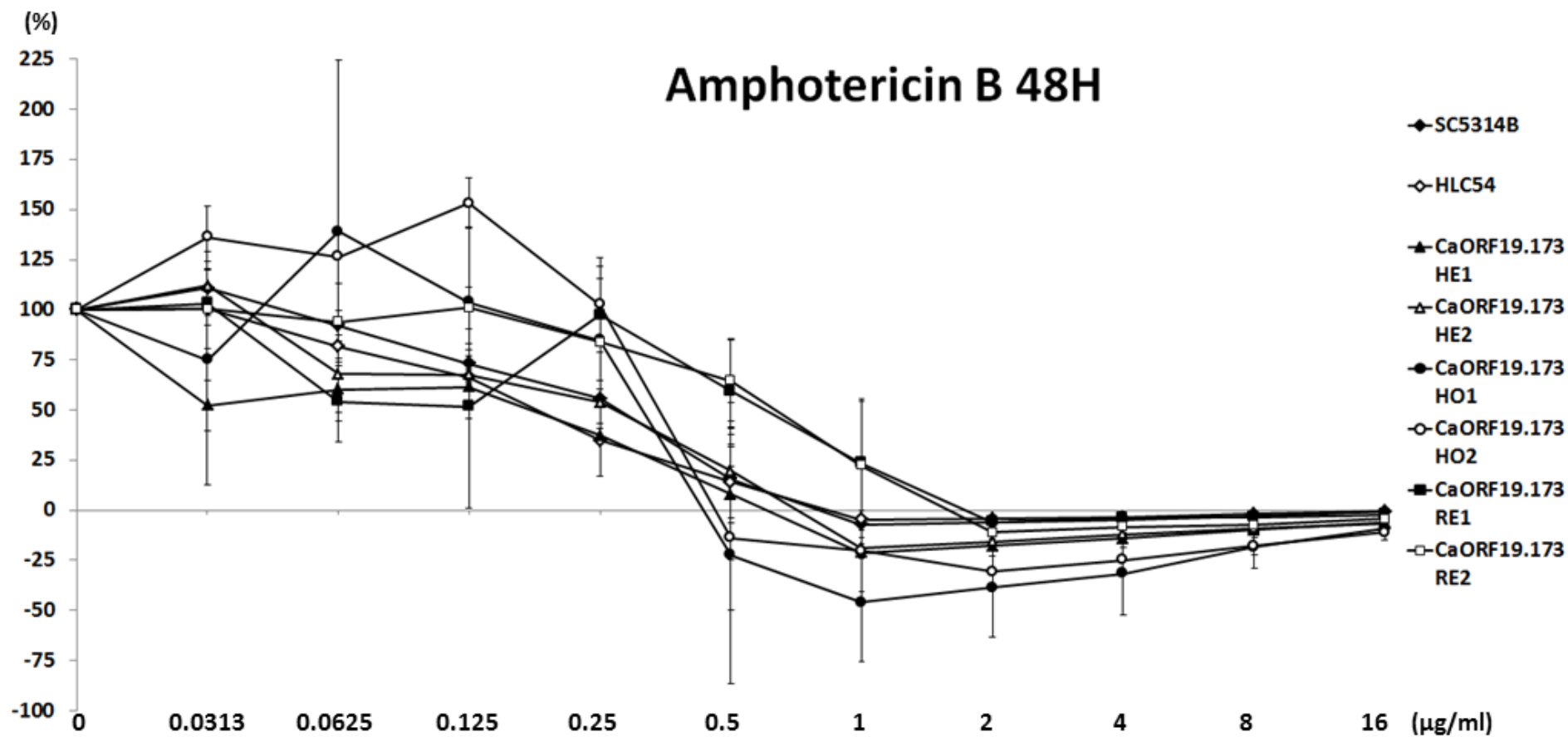




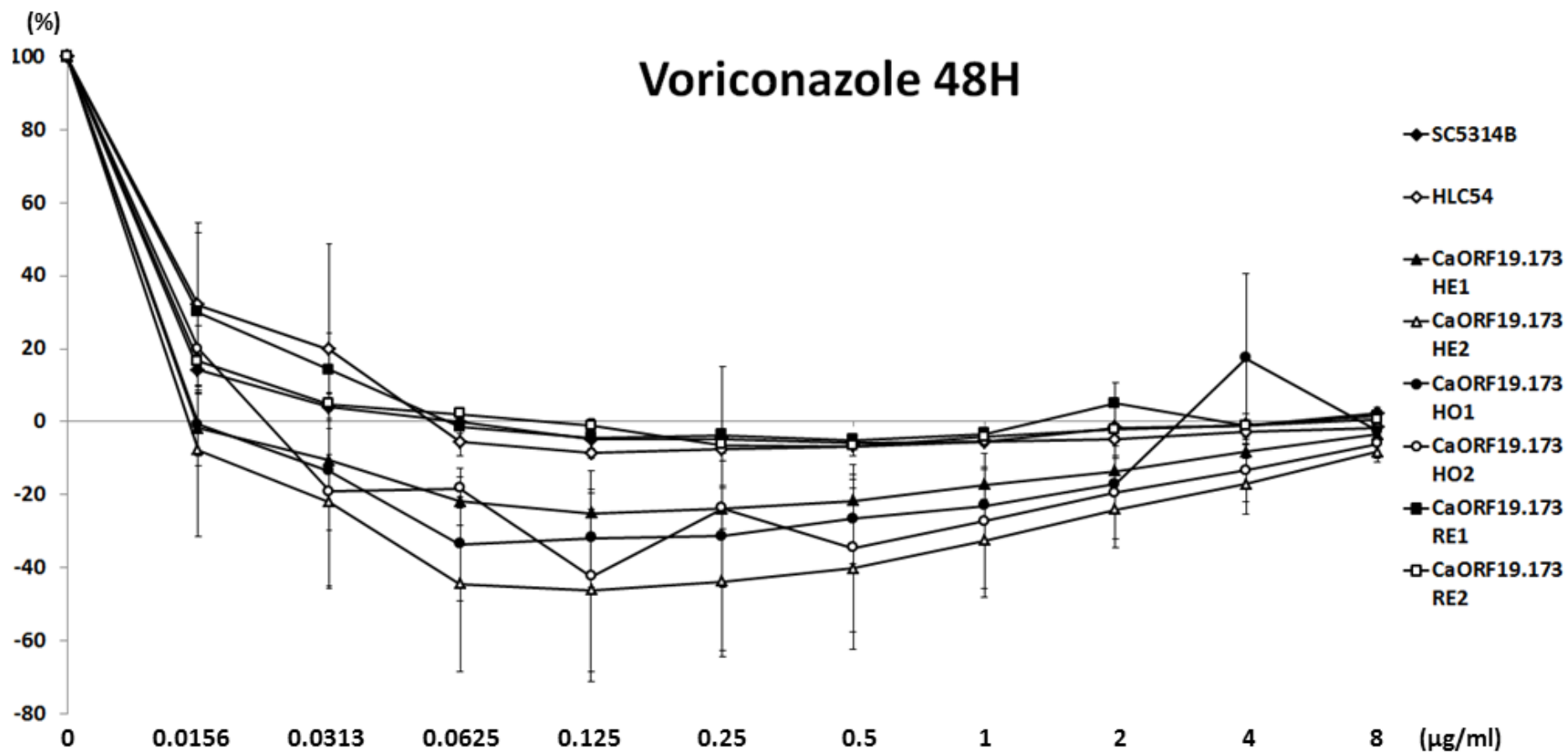
圖三十九、<E> 測試 *CaGRE2* 對 Micafungin 在十種濃度於 35 °C 培養 24 H 之結果。



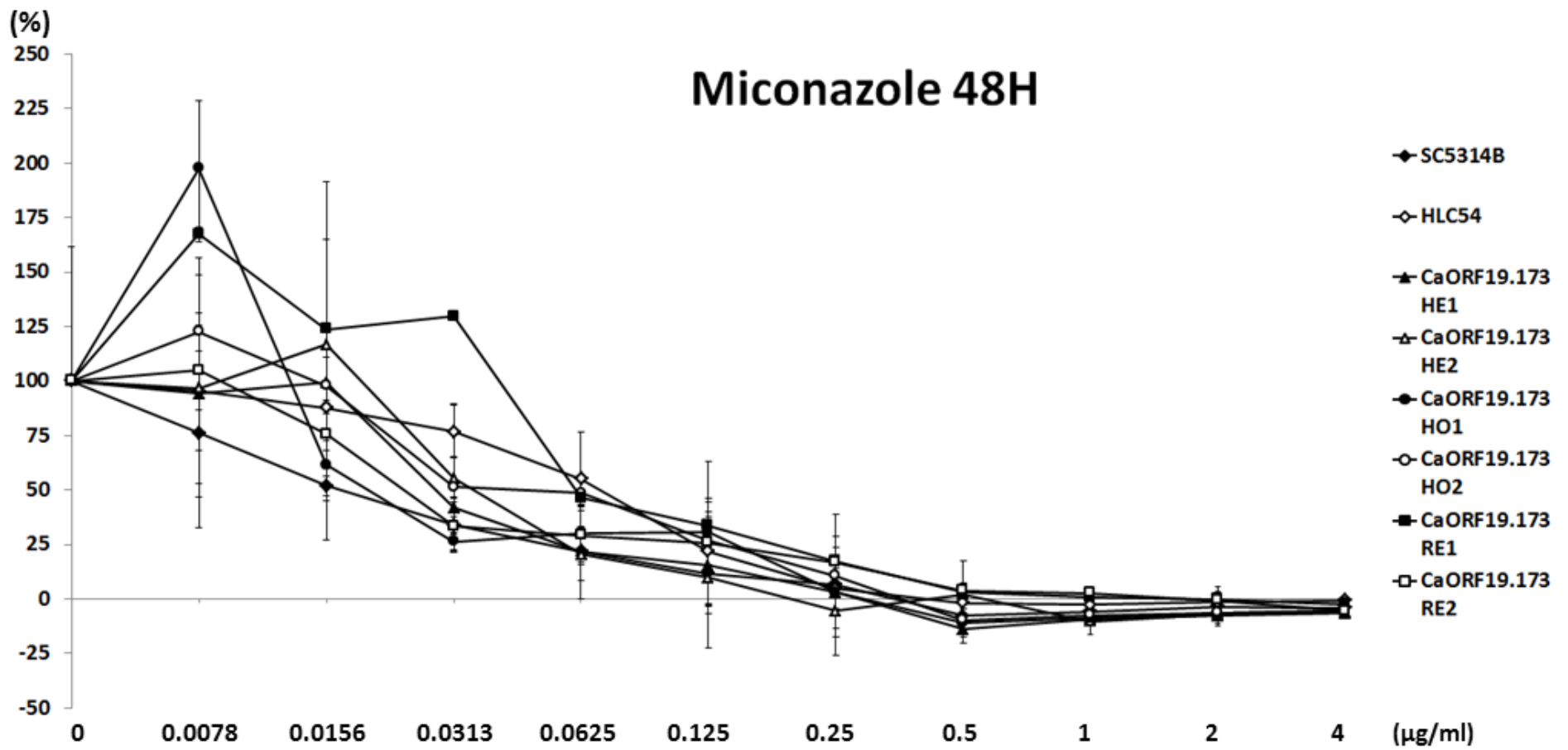
圖四十、<A> 測試 *CaORF19.173* 對 Fluconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



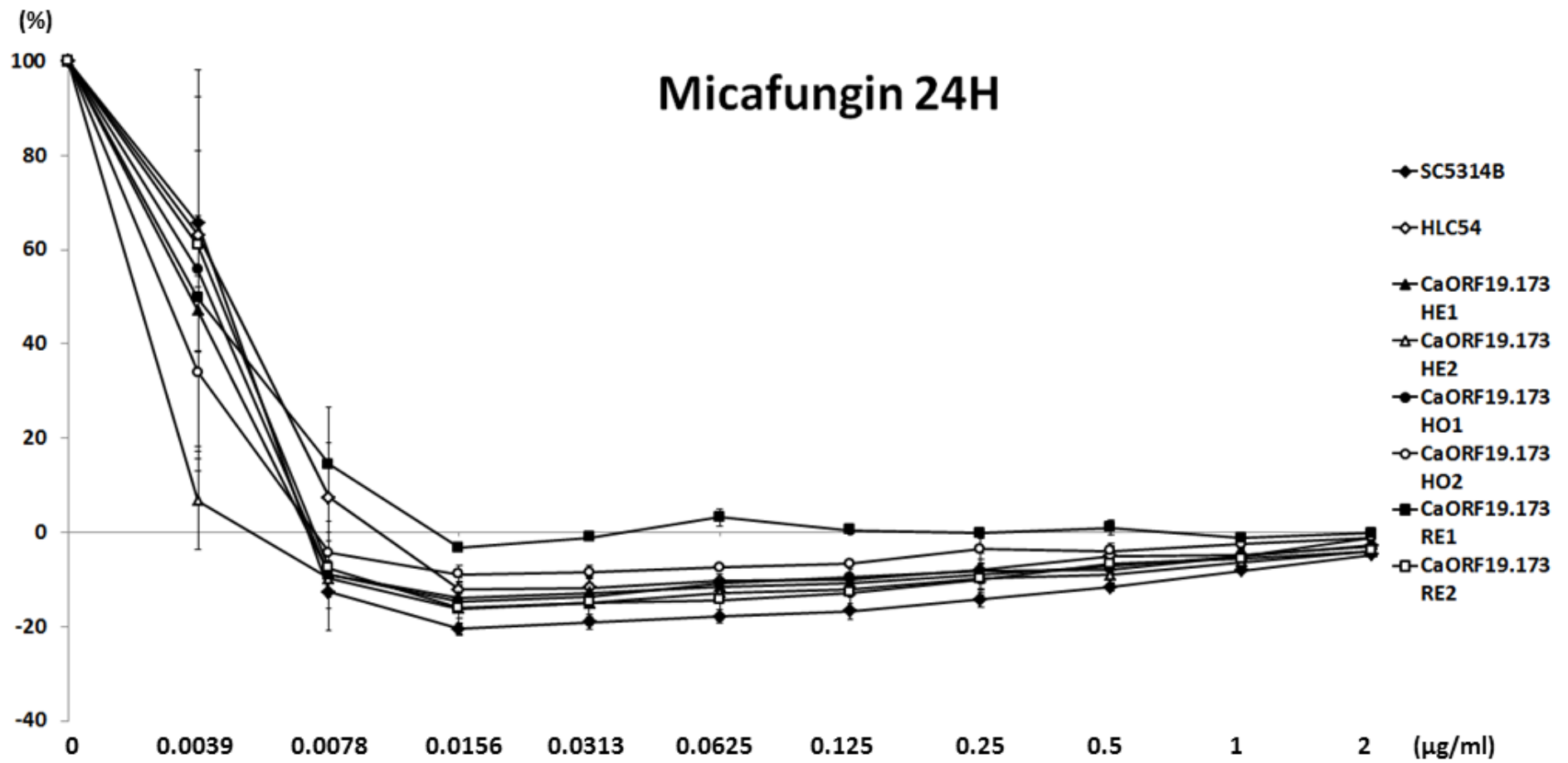
圖四十、<B> 測試 *CaORF19.173* 對 Amphotericin B 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



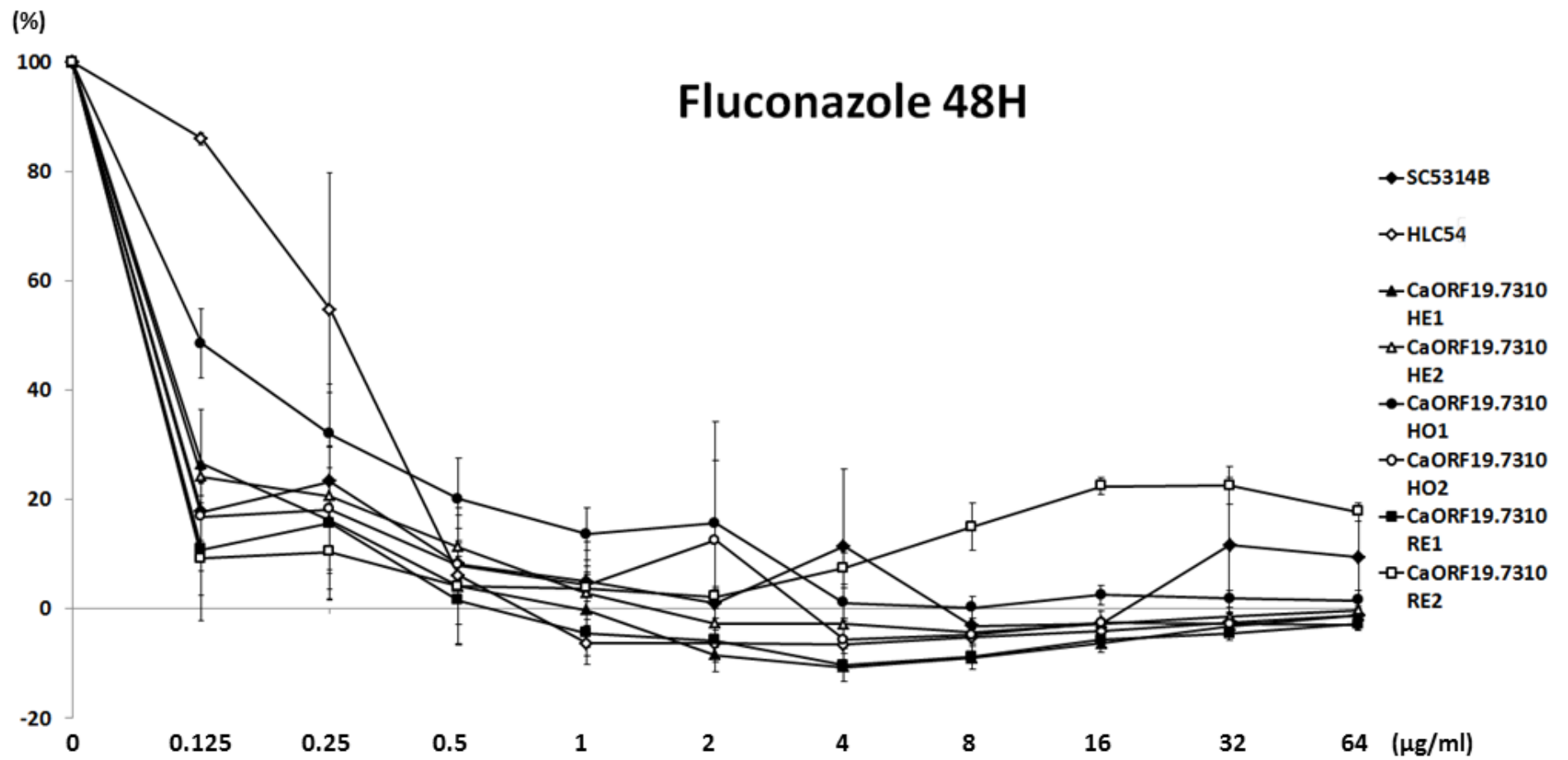
圖四十、<C> 測試 *CaORF19.173* 對 Voriconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



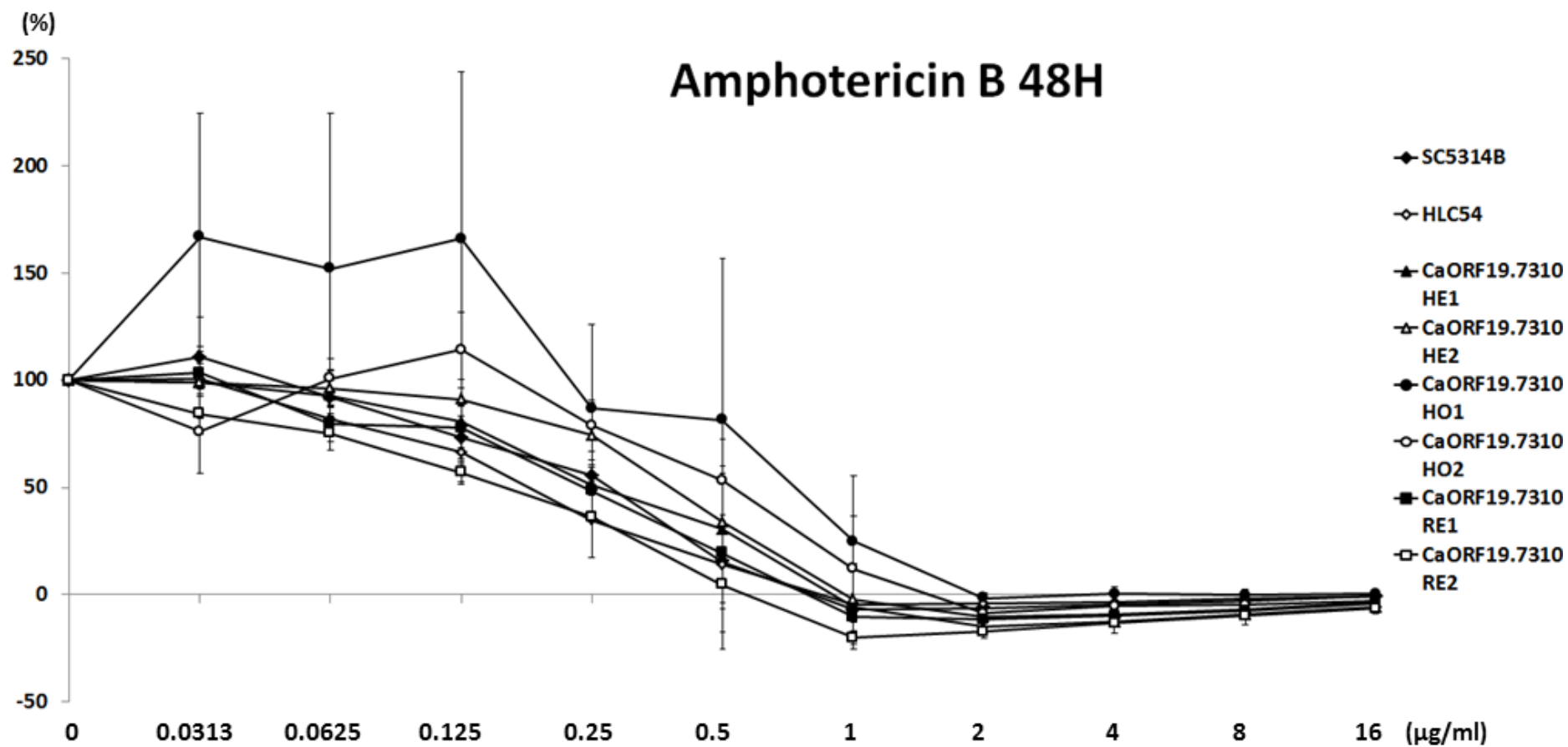
圖四十、<D> 測試 *CaORF19.173* 對 Miconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



圖四十、<E> 測試 *CaORF19.173* 對 Micafungin 在十種濃度於 35 °C 培養 24 H 之結果。

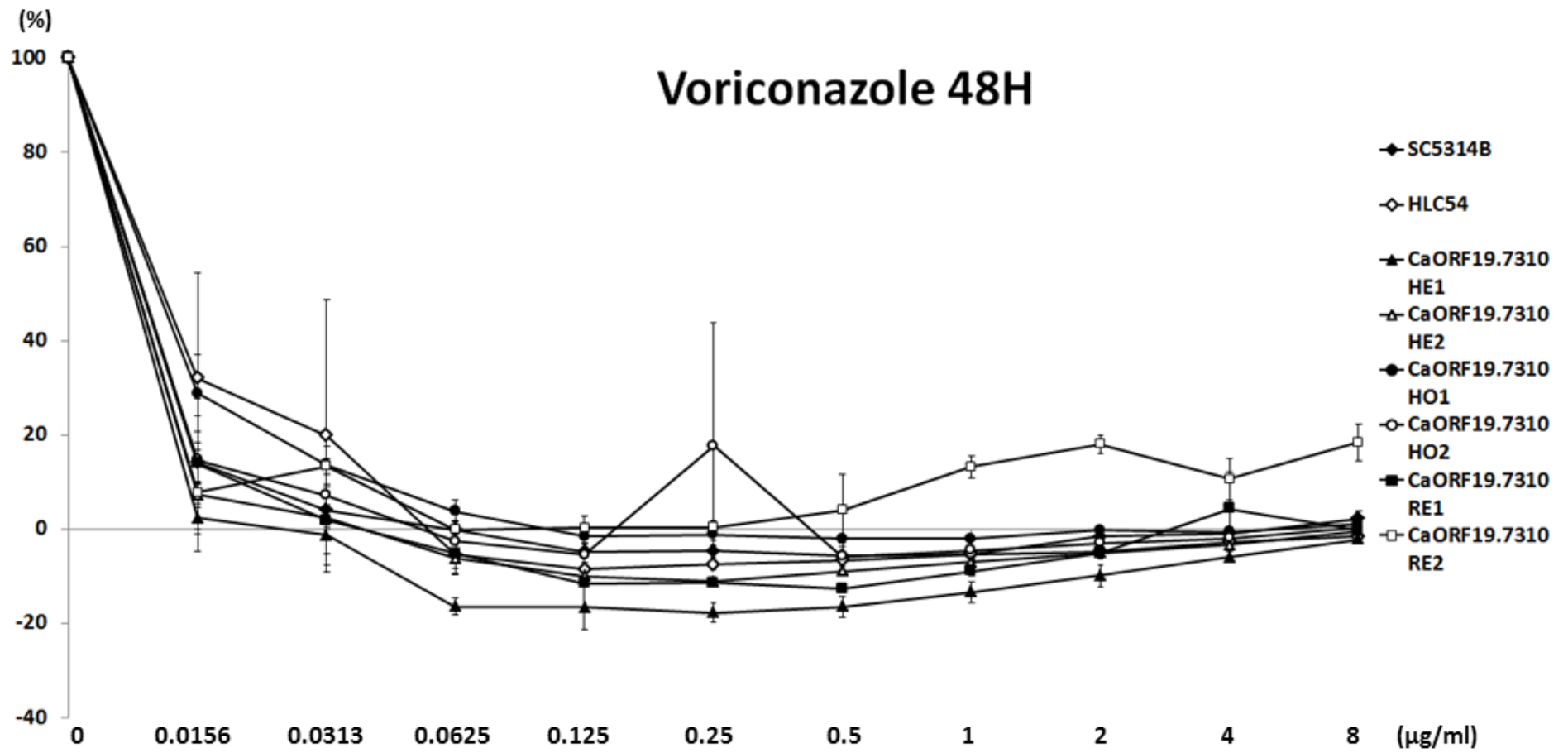


圖四十一、<A> 測試 *CaORF19.7310* 對 Fluconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。

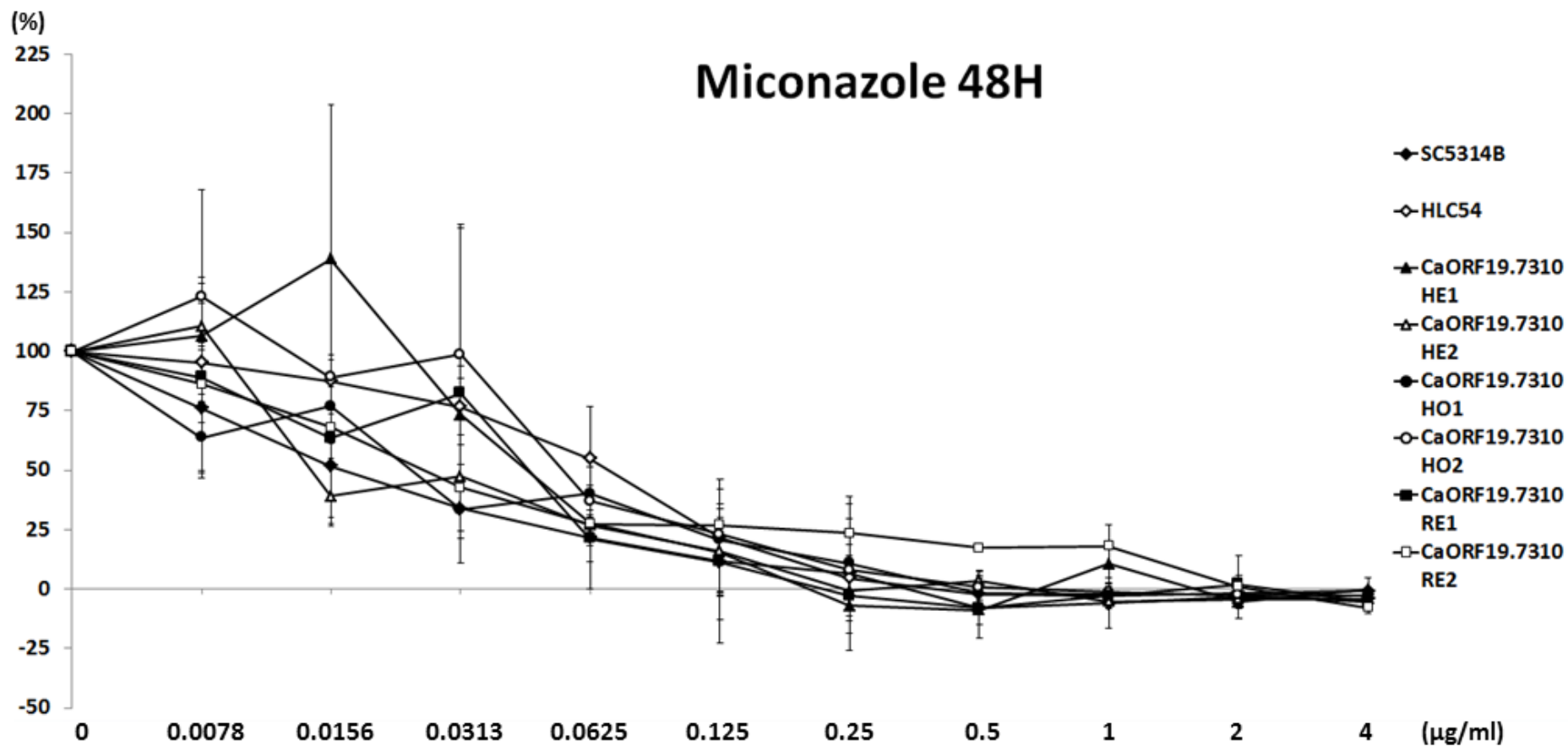


圖四十一、<B> 測試 *CaORF19.7310* 對 Amphotericin B 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。

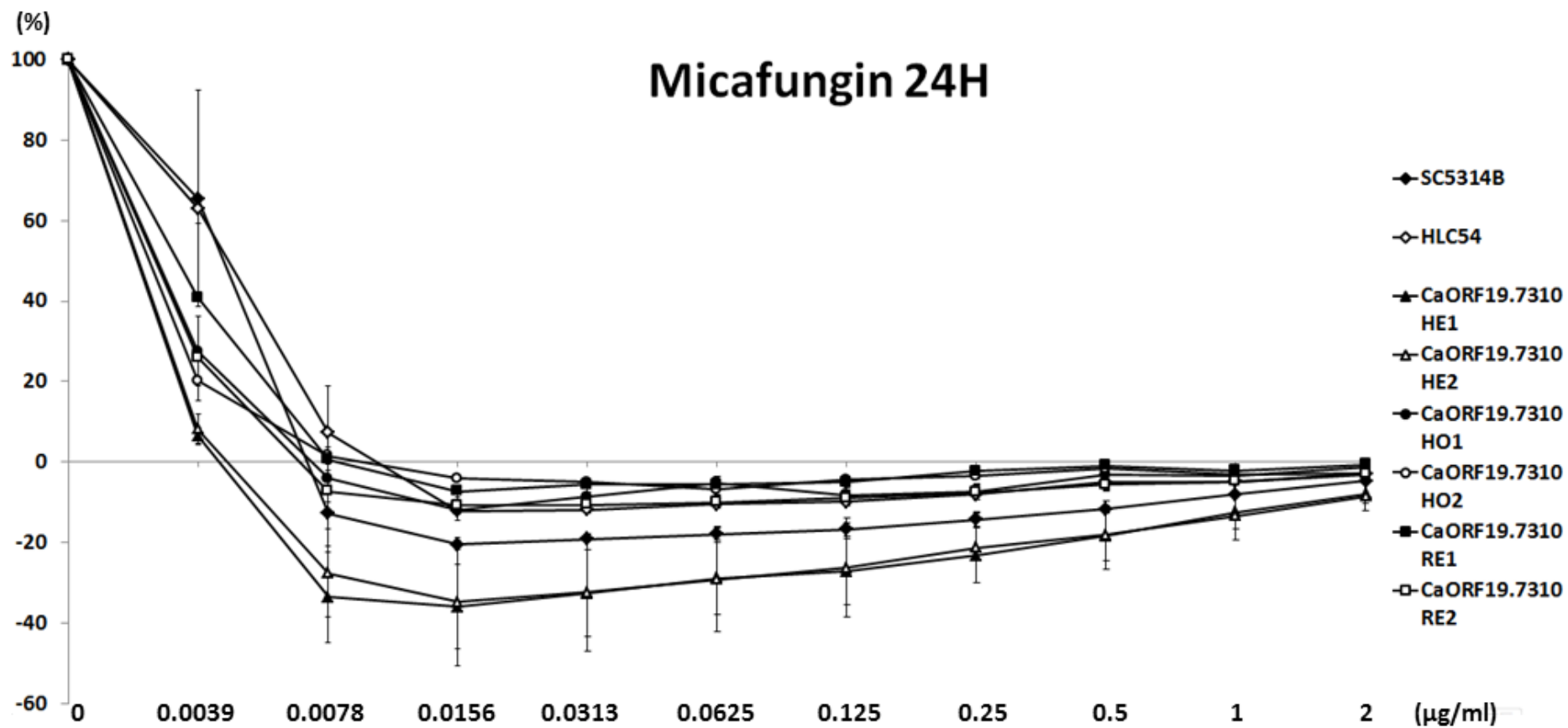




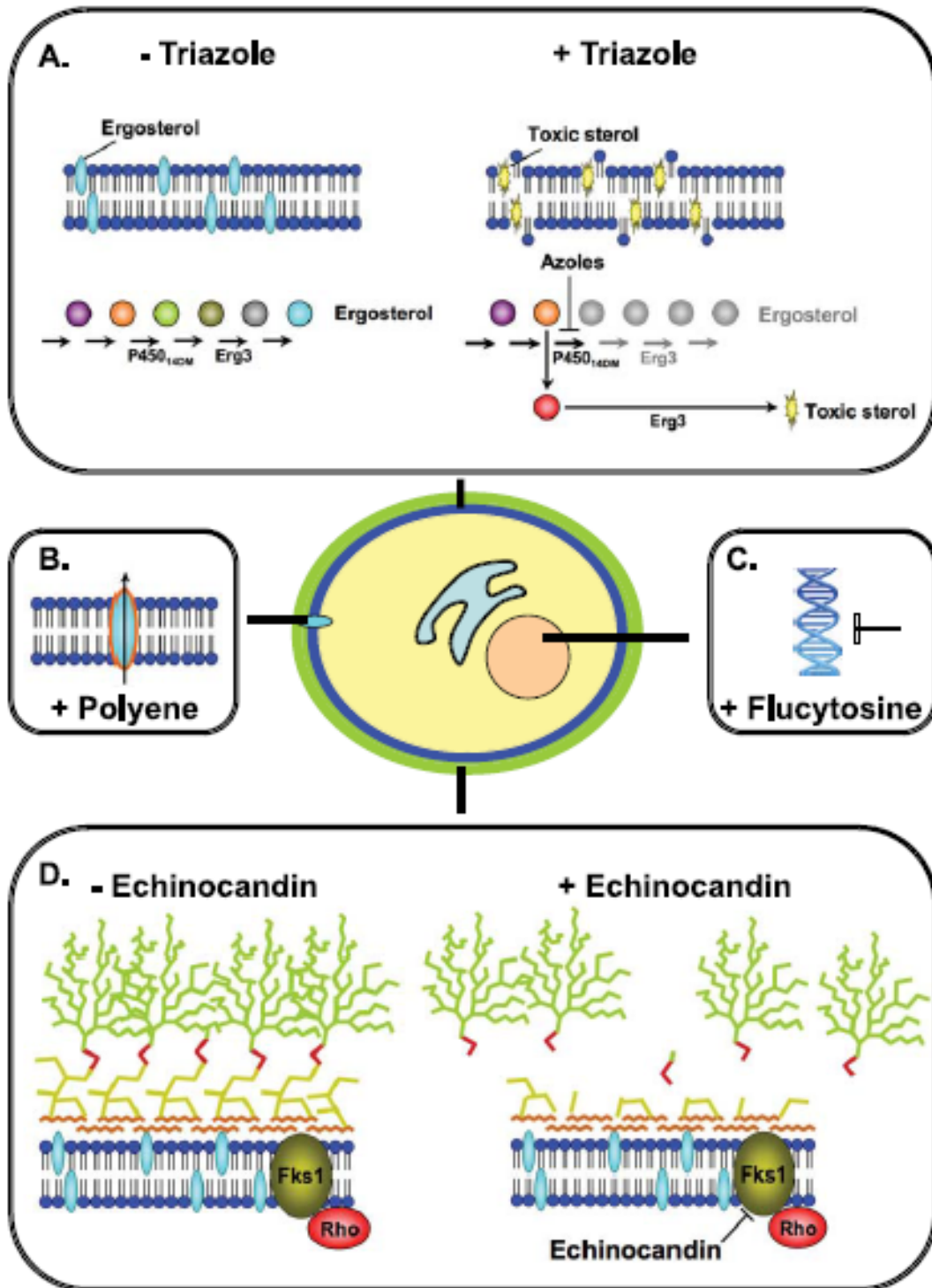
圖四十一、<C> 測試 *CaORF19.7310* 對 Voriconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



圖四十一、<D> 測試 *CaORF19.7310* 對 Miconazole 在十種濃度於 35 °C 培養 48 H 之結果。



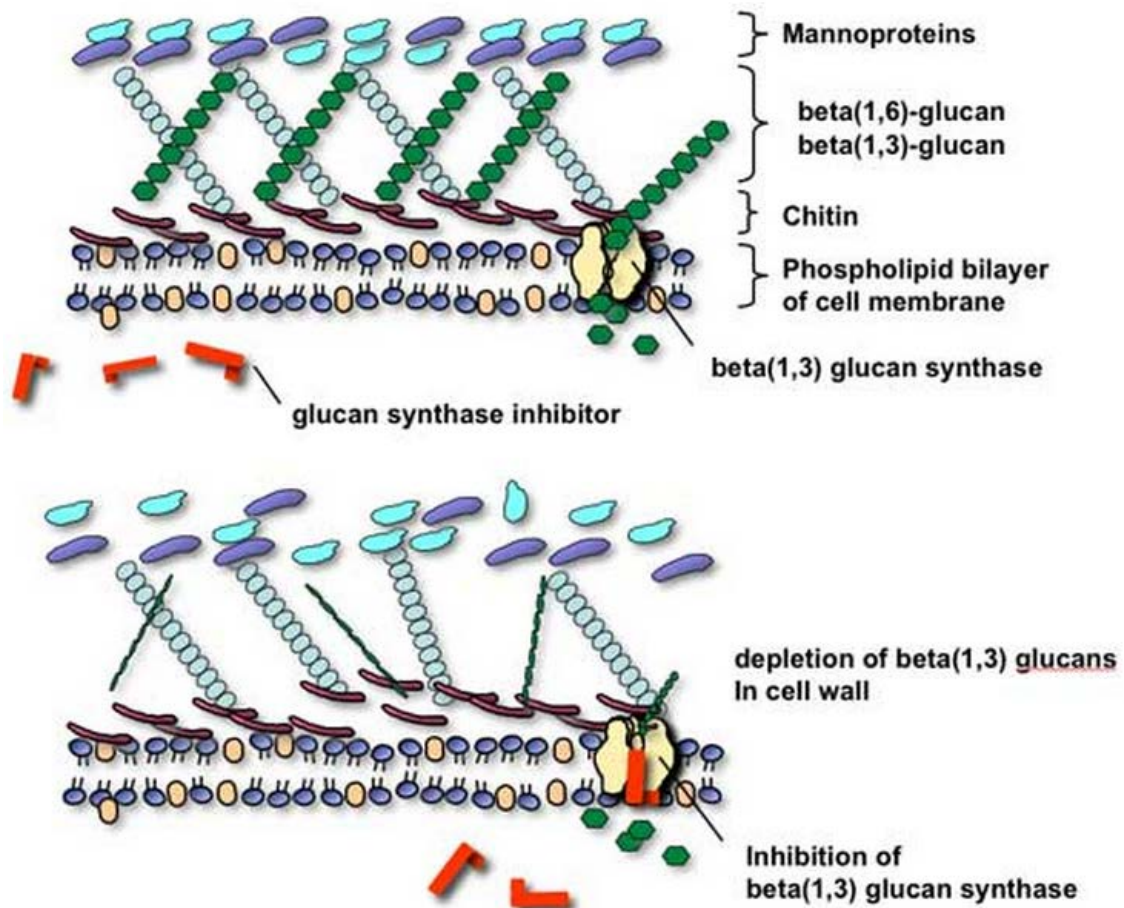
圖四十一、<E> 測試 *CaORF19.7310* 對 Micafungin 在十種濃度於 35 °C 培養 24 H 之結果。



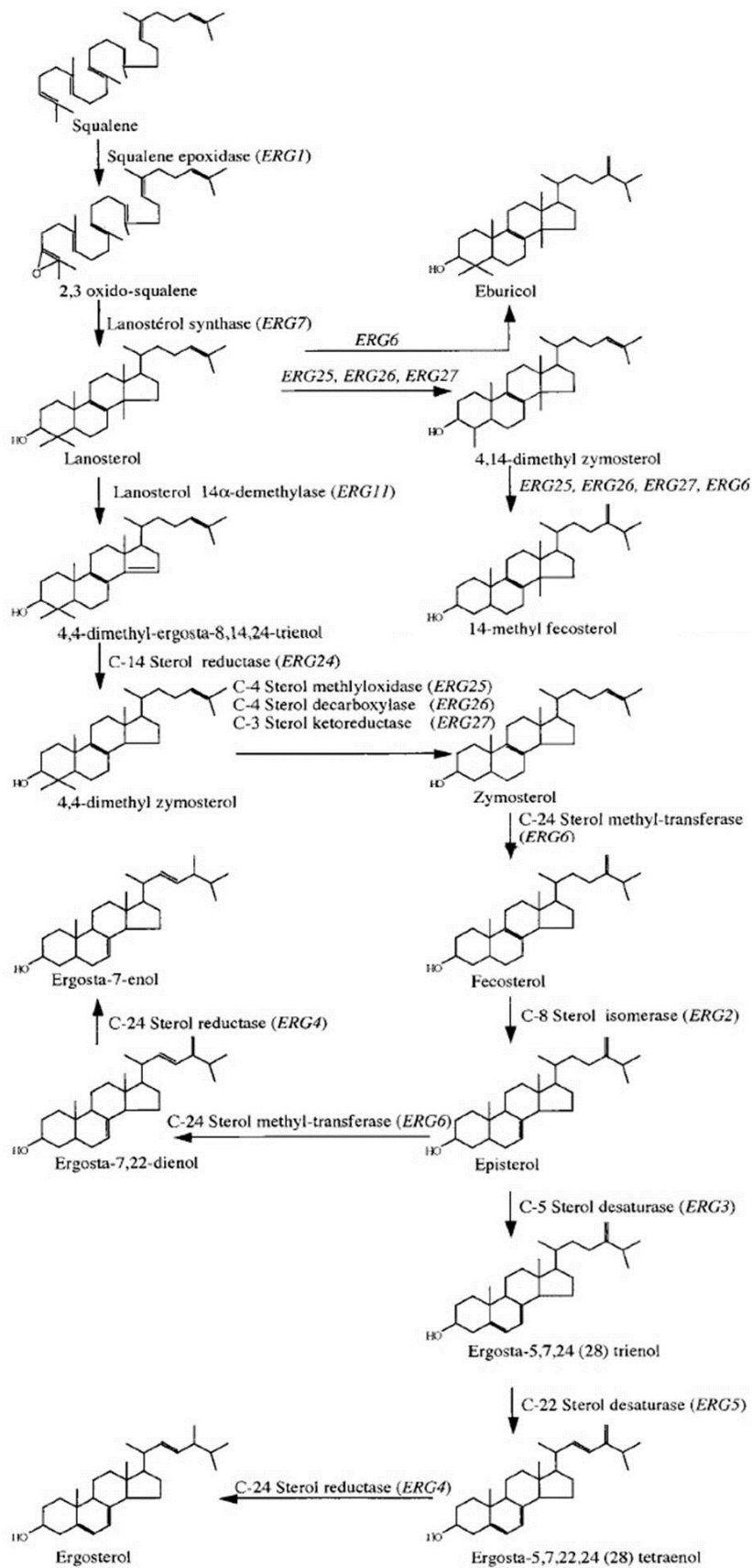
附圖一、抗真菌藥物的作用機制簡圖。

(Leah E. Cowen and William J. Steinbach, 2008)

+：藥物存在的情況下；-：藥物不存在的情況下



附圖二、Echinocandin 類藥物作用機制。



附圖三、白色念珠菌麥角固醇合成途徑。(Sanglard, *et al.*, 2003b)

Generation time (G) is defined as the time (t) per generation (n = number of generations). Hence,  $G=t/n$  is the equation from which calculations of generation time derive.

$G$  (generation time) =  $t$  (time, in minutes or hours) /  $n$  (number of generations)

$$G = t/n$$

$t$  = time interval in hours or minutes

$B$  = number of cells at the beginning of a time interval

$b$  = number of cells at the end of the time interval

$n$  = number of generations (number of times the cell population doubles during the time interval)

$b = B \times 2^n$  (This equation is an expression of growth by binary fission)

Solve for  $n$ :

$$\log b = \log B + n \log 2$$

$$n = \frac{\log b - \log B}{\log 2}$$

$$n = \frac{\log b - \log B}{0.301}$$

$$n = 3.3 \log b/B$$

$$\therefore G = t/n$$

Solve for  $G$

$$G = \frac{t}{3.3 \log b/B}$$

附圖四：細胞倍增時間 (generation time) 計算公式。(謝志豪，2006)