

中文摘要

白色念珠菌為人體重要的伺機性致病菌，多變性為此微生物的重要特性。最常用以治療白色念珠菌感染的真菌類藥物為azoles類抗真菌藥物，但是由於此類藥物大量且重複性使用已經造成臨床上抗藥性菌株逐漸產生。大部分研究指出真菌最主要的抗藥機制之一就是將藥物排出，使其無法累積於菌體內。Azoles類抗藥性的產生通常和排藥幫浦CDRs(*CDR1*和*CDR2*)過量表現有關。CDRs為ATP-binding cassette(ABC)運輸家族。

先前實驗室於啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中利用*CDR1 promoter-lacZ*表現當作報導系統進行白色念珠菌library screening實驗，目的為篩選出白色念珠菌排藥幫浦*CDR1*的調控者。此次實驗共篩選出了六個可能的ORFs，之後將其命名為*REP1*，*REP2*，*REP3*，*REP4*，*REP5*和*REP6*。本研究是針對*REP3*、*REP4*和*REP5*基因做近一步的分析，探討這些蛋白質在白色念珠菌的抗藥性機制中所扮演的角色。已知*REP3*基因會譯解出鋅指狀蛋白，且*rep3/rep3*同型缺陷突變株對於azoles類藥物(fluconazole、voriconazole和itraconazole)的敏感性具有提高現象。將*REP3*單套基因重新置入*rep3/rep3*同型缺陷突變株後，於Etest和agar dilution assay中再次驗證*REP3*基因的確和白色念珠菌與azoles類藥物的敏感性有關，由實驗結果推測Rep3p可能是*CDR1*的活化子。到目前為止對於*REP4*基因所知不多。為了找出*REP4*基因的功能與和*CDR1*之間的關係，首先利用同源重組破壞*REP4*基因，之後將單套*REP4*基因重新放回*rep4/rep4*同型缺陷突變株進行基因補救，最後也利用大量表現*REP4*基因觀察其功能。於Etest中發現，大量表現*REP4*基因時對於fluconazole、voriconazole和itraconazole的敏感性降低，而在agar dilution assay中發現，大量表現*REP4*基因時對於miconazole的感受性提高。和野生菌株相比，*rep4/rep4*對於藥物感受性與芽管形成皆無明顯影響。由實驗結果得知，Rep4p可能和白色念珠菌的抗藥性有關。文獻報導*REP5*基因可以活化*MUC1/FLO11*的表現，雖然其自身功能尚不清楚，於白色念珠菌過量表現*REP5*基因時對於藥物感受性和芽管形成並沒有太大影響。

Abstract

Candida albicans is an important opportunistic pathogen of humans. A crucial feature of this microorganism is its versatility. The class of azole antifungals is commonly used to treat *C. albicans* infections and the extensive and repeated use has led to the development of resistance in clinical isolates. The majority of findings point to the increased levels of active efflux of drugs being a prime mechanism of resistance for azole drugs. Azole drug resistance is often associated with the upregulation of genes encoding efflux pumps such as *CDRs* (*CDR1* and *CDR2*), belonging to the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.

Previously, a *Candida* genomic DNA library screening has been performed in *Saccharomyces cerevisiae* for identifying the regulators of drug resistance of *C. albicans* using *CDR1* promoter-*lacZ* expression as the reporter. Six candidate open reading frames (ORFs), namely *REP1*, *REP2*, *REP3*, *REP4*, *REP5* and *REP6* were identified. This study focuses on the *REP3*, *REP4* and *REP5*. The *REP3* gene encoded a zinc finger protein and *rep3/rep3* homozygous mutants seemed to be more susceptible to azoles (fluconazole, itraconazole and voriconazole). After rescued the homozygous knockout strain with single copy of wild-type *REP3* gene, I found that in both Etest and agar dilution assay, *REP3* indeed influenced azoles drug susceptibility of *C. albicans*. According to these results, Rep3p may be an activator of *CDR1*. There was no direct report concerning *REP4* or its homolog. In order to understand the function of *REP4* with regard to *CDR1* in *C. albicans*, *REP4* homozygous knockout and overexpression strains were constructed by homology recombination and the homozygous knockout was also rescued with single copy of wild-type *REP4* gene. In Etest, overexpression of *REP4* seemed to be more resistance to fluconazole, voriconazole and itraconazole whereas in agar dilution, overexpression of *REP4* seemed to be more susceptible to miconazole. *rep4/rep4* strains showed no significant alteration on drug susceptibility and germ tube formation when compared to the wild type. According to these results, Rep4p may influence the drug susceptibility of *C. albicans*. Through database search, it was suggested that expression of *REP5* could activate the expression of *MUC1/FLO11*, although the function of *REP5* itself remained unclear. In this study, overexpression of *REP5* did not significantly affect the drug susceptibility and germ tube formation of *C. albicans*.

誌謝

轉眼間到了畢業的日子，還無法相信自己已經可以寫誌謝了。首先我想要感謝我的指導教授交大楊昀良老師以及國衛院羅秀容老師，謝謝老師們給我這個機會進入實驗室學習，不論是學業上的教導亦或是生活上的關懷都是我想要由衷感激老師們的地方。另一位我所要感謝的老師是交大彭慧玲老師，謝謝您給予我論文研究上的寶貴意見，使我獲益良多。再一次向上述三位老師表達感激之意。

要感謝的人非常多，首先要謝謝國衛院亦師亦友的佳君學姊，謝謝您對我實驗上的幫助與平時的加油打氣，您的好學不倦與對於實驗所懷抱的熱忱是我所要學習的地方。感謝Michael一家人的關懷，並且謝謝Michael犧牲自己成爲我平時鬥嘴的對象。感謝Scott學長對我的包容以及你所提供給我的一切幫助。感謝怡萱，妳讓我了解了真誠的可貴及適時安靜的必要(別罵我)。感謝萬事通家莉，一直很羨慕妳的獨立與勇敢，謝謝妳對於我的大方與幫助。謝謝謙虛的仁忠平時所給予我的加油與鼓勵。謝謝學長姐雅文、錦昇與詠怡的陪伴與不時的照顧與關懷。謝謝和我一起努力的同學們柏吟、婷尹、建孝與馥嘉與交大可愛的學弟妹平時的幫助。謝謝美智、依馨與杏枚妳們是我最佳的傾吐對象。還有思源，謝謝你的鼓勵與關懷呦。

最後我想要感謝我的家人，我最親愛及辛苦的爸爸媽媽，謝謝你們所給予我的一切以及無怨無悔的付出。堅強與好學不倦的妹妹，謝謝妳提供榜樣讓我學習。我的兩大精神支柱- 寶貝弟弟與男朋友儒韻，在我憂慮的時候是弟弟給予我向前衝的力量，當我感到徬徨與無助的時候是儒韻讓我走出所有的陰霾，謝謝你們讓我覺得自己好幸福。

感謝老天爺給我機會認識這些人，希望大家都能過得順順利利，且都能開開心心的度過每一天！

目錄

頁數

中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iii
目錄	iv
圖表目錄	vii
一、緒論	1
1.1 白色念珠菌之重要性	1
1.2 臨床用藥與抗藥性的產生	2
1.3 簡介 <i>CDR1</i> 基因	3
1.3.1 <i>CDR1</i> 的同位調控序列	4
1.3.2 <i>CDR1</i> 的異位調控因子	5
1.4 先前研究	6
1.5 論文研究目標	6
二、材料	8
2.1 質體	8
2.2 菌株	8
2.2.1 大腸桿菌	8
2.2.2 啤酒酵母	8
2.2.3 白色念珠菌	9
2.3 引子	10
2.3.1 針對 <i>REP3</i> 單套基因置入補救實驗所設計的引子	10
2.3.2 針對 <i>REP4</i> 基因破壞、基因置入及四環黴素調控表現系統所設計的引子	10
2.3.3 針對 <i>REP5</i> 基因以及四環黴素調控表現系統所設計的引子	11
2.4 藥品試劑	12
2.5 緩衝溶液	13
2.6 培養液和培養基製備	14
2.7 濾紙	15
2.8 儀器設備	15
三、方法	17
3.1 DNA 方法	17
3.1.1 DNA 的連接反應	17
3.1.2 聚合酶連鎖反應	17
3.2 利用電穿透法進行大腸桿菌的轉形	17
3.3 將質體 DNA 轉形至啤酒酵母中	18
3.4 於加藥狀況下測量 β -galactosidase 活性	19
3.5 建構含 C19 library clone 之主要兩個 ORFs 之一的質體	19
3.6 建構 <i>rep3/rep3::REP3</i> 單套基因置入補救株	19
3.7 白色念珠菌轉形	19
3.8 建構 <i>REP4/rep4</i> 異型缺陷突變株及 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株	20

3.9 建構 <i>rep4/rep4::REP4</i> 單套基因置入補救株.....	20
3.10 建構 <i>REP5/rep5</i> 異型缺陷突變株.....	21
3.11 建構四環黴素調控表現系統.....	21
3.11.1 將 TR 啟動子及 <i>URA3</i> 標記置入 <i>REP4</i> 和 <i>REP5</i> 之異型缺陷突變株.....	21
3.12 萃取染色體 DNA.....	22
3.13 突變株之性狀分析.....	23
3.13.1 芽管試驗.....	23
3.13.2 抗真菌類藥物敏感性試驗.....	23
3.13.2.1 Etest.....	23
3.13.2.2 Agar dilution assay.....	24
3.14 南方墨點法.....	24
四、結果.....	25
◆ <i>REP3</i> 基因相關研究.....	25
4.1 建構 <i>rep3/rep3::REP3</i> 單套基因置入補救株.....	25
4.2 將 <i>REP3</i> 單套基因置入 <i>rep3/rep3</i> 同型缺陷突變株後，對於抗真菌藥物之敏感性具有回復現象.....	25
4.3 <i>rep3/rep3</i> 同型缺陷株於 agar dilution assay 中對於 miconazole 之敏感性有提高之現象.....	26
4.4 <i>REP3</i> 基因突變株不會影響在 37 °C 及加入胎牛血清培養中芽管的生成.....	26
◆ <i>REP4</i> 基因相關研究.....	27
4.5 利用 β-galactosidase filter assay 確認活化 <i>CDR1</i> 啟動子的 ORF.....	27
4.6 建構 <i>REP4</i> 基因異型缺陷突變株與同型缺陷突變株.....	27
4.6.1 建構 <i>REP4</i> 基因異型缺陷突變株.....	28
4.6.2 建構 <i>REP4</i> 基因同型缺陷突變株.....	28
4.7 建構四環黴素調控表現系統過度表現 <i>REP4</i> 基因.....	29
4.8 建構 <i>rep4/rep4::REP4</i> 單套基因置入補救株.....	29
4.9 南方墨點法確認正確的 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株.....	30
4.10 性狀分析.....	31
4.10.1 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株與 <i>REP4</i> 基因過度表現株藥物敏感性試驗(Etest)結果.....	31
4.10.2 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株與 <i>REP4</i> 基因過度表現株於 agar dilution assay 之結果.....	31
4.10.3 <i>REP4</i> 基因破壞與過度表現時皆不會影響芽管生成.....	32
◆ <i>REP5</i> 基因相關研究.....	32
4.11 建構 <i>REP5</i> 基因異型缺陷突變株.....	32
4.12 利用四環黴素調控表現系統調控 <i>REP5</i> 基因表現.....	33
4.13 性狀分析.....	33
4.13.1 <i>REP5</i> 基因過度表現不會影響藥物敏感性試驗(Etest)結果.....	34
4.13.2 <i>REP5</i> 基因過度表現不會影響 agar dilution assay 結果.....	34
4.13.3 <i>REP5</i> 基因不會影響芽管生成.....	34
五、討論.....	35
5.1 <i>REP3</i> 基因影響白色念珠菌對於抗真菌藥物 azoles 類的藥物敏感性，但不影響其形態之轉變.....	35
5.2 <i>REP3</i> 基因對於抗真菌藥物 azoles 類的藥物敏感性結果.....	35
5.3 <i>REP3</i> 基因不會影響白色念珠菌之型態變化.....	36

5.4 <i>REP4</i> 基因功能探討	37
5.5 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株的藥物敏感性結果	37
5.6 南方墨點法確認正確的 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株	38
5.7 <i>rep4/rep4::REP4</i> 單套基因置入補救株之藥物敏感性結果	39
5.8 <i>rep4/TR::REP4</i> 基因過度表現株之藥物敏感性結果	40
5.9 <i>REP4</i> 基因不會影響白色念珠菌之型態轉換	40
5.10 <i>REP5</i> 基因不會影響白色念珠菌之型態轉換，且 <i>REP5</i> 基因過度表現株不會影響白色念珠菌之藥物敏感性。	41
六、未來展望	43
七、參考文獻	44



圖表目錄

	頁數
圖一. <i>rep3/rep3::REP3</i> 單套基因置入株建構示意圖.....	50
圖二. 聚合酶連鎖反應確認 <i>REP3</i> 單套基因是否正確地置入 <i>rep3/rep3</i> 同型缺陷突變株	51
圖三之一. <i>rep3/rep3</i> 同型缺陷突變株及 <i>rep3/rep3::REP3</i> 單套基因置入補救株之藥物敏 感性試驗(Etest)結果	52
圖三之二. 藥物敏感性試驗(Etest)局部放大示意圖.....	53
圖四. <i>rep3/rep3</i> 同型缺陷突變株於 agar dilution assay 中對於 miconazole 之敏感性有提 高之現象	54
圖五. 芽管試驗	55
圖六. 經由 β -galactosidase filter assay 確認於啤酒酵母 2B/348 <i>CDR1p-lacZ</i> 菌株內活化 <i>lacZ</i> 表現之 open reading frame(ORF)	56
圖七. 同源重組基因破壞示意圖	57
圖八. 聚合酶連鎖反應確認正確的 <i>REP4/rep4</i> 異型缺陷突變株.....	58
圖九. 聚合酶連鎖反應確認正確的 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株.....	59
圖十. 四環黴素調控表現系統建構示意圖	60
圖十一. 聚合酶連鎖反應確認 <i>REP4</i> 四環黴素調控表現系統之建立.....	61
圖十二. <i>rep4/rep4::REP4</i> 單套基因置入補救株建構示意圖.....	62
圖十三. 聚合酶連鎖反應確認 <i>REP4</i> 單套基因是否正確置入 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株	63
圖十四. <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株之藥物敏感性試驗(Etest)結果.....	64
圖十五. <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株的南方墨點法結果(之一).....	65
圖十六. <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株的南方墨點法結果(之二).....	66
圖十七. <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株與 <i>rep4/TR::REP4</i> (Tet R)調控株在基因過度表現下之 藥物敏感性試驗(Etest)結果	67
圖十八. <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株與 <i>REP4</i> 基因過度表現株 agar dilution assay 結果	68
圖十九. 芽管試驗	69
圖二十. 聚合酶連鎖反應確認正確的 <i>REP5/rep5</i> 異型缺陷突變株.....	70
圖二十一. 聚合酶連鎖反應確認 <i>REP5</i> 四環黴素調控表現系統之建立.....	71
圖二十二. <i>REP5</i> 基因過度表現時不會影響藥物敏感性試驗(Etest)結果	72
圖二十三. <i>REP5</i> Tet R 調控株基因過度表現之 agar dilution assay 結果.....	73
圖二十四. 抑制 <i>REP5</i> 基因表現不會影響芽管生成.....	74
圖二十五. <i>REP5</i> 基因與啤酒酵母 <i>YEL007w</i> 之胺基酸序列比對	75
圖二十六. <i>HIS1</i> 基因轉形至 <i>rep4/rep4</i> 同型缺陷突變株示意圖.....	76
附錄一. <i>Cdr1p</i> 結構示意圖.....	77

一、緒論

1.1 白色念珠菌(*Candida albicans*)之重要性

白色念珠菌為人類主要的伺機性共生菌。和醫學上其他重要真菌(如*Histoplasma capsulatum* , *Cryptococcus neoformans*, 和 *Aspergillus fumigatus*)的主要差別在於白色念珠菌極少於環境中(如土壤)被發現，且是藉由內生性途徑(endogeneous infection)感染宿主。當宿主免疫系統或體內微生物菌相改變時，原本位於黏膜表面或皮膚上無害之白色念珠菌便會轉為致病菌攻擊宿主(Calderone, 2001)。再者，白色念珠菌所造成的感染範圍非常廣泛，可由局部性感染(如口腔、生殖道感染)延伸至全身性感染(一但進入血液中便有能力侵入身體各部位和器官)，而此特性只有極少數致病性微生物與其雷同(Calderone & Fonzi, 2001; Odds, 1988)。

在美國，每年用於治療由白色念珠菌所造成的血液感染花費大約為10億至20億美金(Rentz et al., 1998; Wilson et al., 2002)。儘管具有某些有效的治療方法，但由白色念珠菌所造成的系統性感染其致死率(mortality)仍可達到百分之五十(Viudes et al., 2002; Garbino et al., 2002; Pappas., et al, 2003; Alonso-Valle et al., 2003)。此外，大約70 %的婦女有過由念珠菌屬(*Candida spp.*)所造成的陰道感染經驗，而其中的20 %身受復發性(recurrence)之苦(Fider et al., 1999)。在台灣，台大醫院的研究報告指出，於1994-2000年共有1095件院內感染所造成的念珠菌血症(candidaemia)案例，其中以白色念珠菌佔最大宗(50.4 %) (Chen et al., 2003)。而於2000年當中的188個院內感染所造成的念珠菌血症(白色念珠菌佔32.29 %)案例中發現，其致死率高達60.6 %，此結果近似於1994-1995年致死率(59.3 %)(Chen et al., 2003; Hung et al., 1996)。

由於白色念珠菌和其他致病性真菌皆為真核生物，故和人類某些生理過程具有相當程度之相似性。因此，大多數抗真菌藥物容易造成有害之副作用，且依據使用之劑量，通常為抑菌劑而非殺菌劑。故於白色念珠菌研究中重要的一環便是尋找適當的藥物攻擊目標，以期做為新抗真菌藥物開發之契機(Berman & Sudbery, 2002)。

1.2 臨床用藥與抗藥性的產生

現今臨床上用於治療真菌感染的抗真菌藥物可分為下列五大類：

(1) polyenes:如amphotericin B和nystatin。此類藥物被認為會嵌入白色念珠菌含ergosterol的細胞膜內，形成一個通道(channel)而使細胞內成分，尤其是鉀離子滲透出，因而破壞細胞膜內的質子濃度梯度(proton gradient)，使菌體死亡(Vanden et al., 1994)。此類藥物為殺菌劑(fungicidals)，由於具有細胞毒性之缺點，臨床上使用是以短期治療為主，而此可能和抗藥性的低發生率有關。和amphotericin B-susceptible的念珠菌(*Candida strains*)相比，長期使用amphotericin B後所產生的amphotericin B-resistant 菌株，其細胞膜內的ergosterol含量明顯降低(White et al., 1998)。

(2) allylamines:主要作用為抑制ergosterol生合成途徑酵素squalene epoxidase的作用。此類藥物為殺菌劑且其活體外作用(*in vitro*)範圍廣，但由於藥物動力學(pharmacokinetics)不佳，使得其臨床效用受到侷限。Terbinafine 為唯一於臨床上系統性使用的此類藥物(Georgopapadakou, 1998)。雖然在啤酒酵母(*S. cerevisiae*)和植物致病菌*Ustilago maydis*內已發現allylamine-resistant現象，但在臨床上重要菌株當中尚未發現抗藥性產生的相關報導(Vanden et al., 1994)。

(3) fluoropyrimidines:5-flucytosine(5-FC)。白色念珠菌的cytosine permease會幫助5-FC進入菌體，之後利用菌體內的cytosine deaminase將5-FC轉換成5-fluorouracil(5-FU)，而5-FU會破壞DNA和蛋白質的合成，使白色念珠菌無法存活(Yang & Lo, 2001)。於研究中的flucytosine-resistant白色念珠菌發現，這些菌株內和5-FC相關的酵素，包括cytosine deaminase, uracil phosphoribosyltransferase, 或 uridine monophosphatepyrophosphorylase都具有相當程度的突變現象產生(Fsoli et al., 1990)。

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

(5) azoles:產生的細胞毒性副作用較小，為最常使用的抗真菌藥物。包含治療黏膜或皮膚感染局部性使用的imidazoles(ketoconazole、miconazole)和以口服或注射方式治療侵入性

黏膜感染的triazoles (fluconazole、itraconazole、voriconazole)(Vermitsky & Edlind, 2004)。Azoles類藥物主要和ergosterol生合成途徑中的C14 α -demethylase(Erg11p)作用，使得ergosterol耗盡並大量累積中間產物14 α -methylsterols(例如lanosterol和14 α -methyl-3-6-diol)，如此一來干擾了細胞膜主要成分ergosterol的功能(Kelly et al., 1997)。由於azoles類藥物作用機制為抑制真菌生長而非殺死真菌，故在此類藥物治療下可能產生選擇性壓力使得抗藥性菌株逐漸佔優勢。White等人(White et al., 1998)首先在以ketoconazole治療罹患慢性黏膜皮膚念珠菌症(chronic mucocutaneous candidiasis)的病患中發現了azoles類藥物抗藥菌株(Horsburg & Kirkpatrick, 1983)，後於長期使用azoles藥物(如fluconazole)治療的後天免疫不全症候群(Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)病患中亦發現抗藥菌株，fluconazole-resistant的白色念珠菌已有逐漸增加的趨勢(Georgiev, 1998; White, 1997; Rex et al., 1995; Albertson et al., 1996; Perea et al., 2001)。

目前已知的 azoles 類抗藥機制可分為以下四點：

(a)Azoles類藥物目標基因*ERG11*突變(mutation)或過量表現(overexpression)。(b)Ergosterol生合成途徑中的其他酵素發生突變。(c)細胞膜內的固醇類組成改變，降低了細胞膜的通透性(permeability)。(d)排藥幫浦，如ATP-binding cassette transporter(*CDRs*)，或是major facilitator families(*MDR1*)過量表現，使得azoles類藥物大量排出菌體外，無法累積於菌體內行使藥物功效(Lamb et al., 1999; Sanglard et al., 1998)。已有實驗指出，在azoles-resistant的白色念珠菌中，*ERG11*、*MDR1*和*CDRs*基因(*CDR1*和*CDR2*)的mRNA表現量有上升趨勢(White, 1997; White et al., 2002; Sanglard et al., 1997 & 1995; Albertson et al., 1996; Lyons & White, 2000; Perea et al., 2001)。因此這些基因在抗藥機制的角色就成了受注目的焦點(St Georgiev, 2000; Yang & Lo, 2001; Lupetti et al., 2002)。到目前為止，大部分的研究指出排藥幫浦大量表現是造成抗藥性產生的主要機制(Lupetti et al., 2002)。

1.3 簡介 *CDR1* 基因(*Candida Drug Resistance 1*)

*CDR1*為由Prasad等人選殖出和多重藥物抗藥性(multi-drug resistance)有關的基因。*CDR1*屬於ABC(ATP-binding cassette)家族，利用ATP水解後得到的能量運送受質。已知將*CDR1*轉形至啤酒酵母*pdv5/pdv5*同型缺陷突變株內，對於cycloheximide、chloramphenicol、miconazole、oligomycin、nystatin和2,4-dinitrophenol會產生抗藥性現象(Prasad et al., 1995)。如同ABC家族蛋白質的典型結構，Cdr1p具有兩個高度疏水性的

跨膜區域(transmembrane domains, TMDs)和兩個位於細胞質內的核苷酸結合區域(nucleotide-binding domains, NBD)。每一個TMD主要由六個跨膜區段(transmembrane segments)構成，而此跨膜區段內陷於TMD中提供了Cdr1p的受質特異性(substrate specificity) (附錄一)。Cdr1p受質範圍極廣，包括了azoles類藥物、脂質與類固醇(Prasad et al., 2002 & 2004)。已知於azoles-resistant的臨床菌株中，*CDR1* mRNA表現量高於azoles-susceptible的臨床菌株(White, 1997; Sanglard et al., 1995)。

1.3.1 *CDR1* 的同位調控序列(*cis-regulatory sequences*)

近期的研究指出，*CDR1* 啟動子不只和多種藥物作用(如miconazole、fluconazole、nystatin與vinblastine)，也會被人類類固醇(β -oestradiol和progesterone)與其他環境(例如熱休克與重金屬CdCl₂)刺激(Krishnamurthy et al., 1998; de Micheli et al., 2002; Hernaez et al., 1998; Puri et al., 1999)。經由連續的*CDR1* 啟動子刪除實驗(deletion analyses)發現，啟動子近端區域(-345/+1)包含了多種藥物誘導的調控區(regulatory domains)，而miconazole主要和遠端啟動子區域內(-857/-1147)的AP-1(TGACCCA)序列作用(Puri et al., 1999)。Micheli等人利用 oestradiol 誘導 *CDR1-RLUC* 報導系統後於 *CDR1* 啟動子內發現 DRE(drug-responsive element)序列。DRE位於*CDR1* 啟動子-460 ~ -440處，其序列為 5'-ACGG(A/T)TATCGGATATTTTTT-3'。實驗證明在oestradiol誘導下，DRE為正向調控*CDR1*表現所必須，並發現凡是含有DRE的白色念珠菌基因在oestradiol作用下，都可提高其表現量(de Micheli et al., 2002)。Karnani等人於*CDR1* 啟動子中發現了可被類固醇 β -oestradiol和progesterone誘導的新steroid responsive region(SRR)，此區域位於*CDR1*轉錄起始點上游-696~ -521處。之後於刪除研究指出，此區域內包含可和progesterone反應的SRE1(-677 ~ -648)與對兩者皆有反應的SRE2(-628 ~ -598)序列。SRE1和SRE2專一性的與類固醇作用而不受其他藥物(如cycloheximide、miconazole和terbinafine)影響(Karnani et al., 2004)。Naseem等人於*CDR1* 啟動子轉錄起始點上游393個鹼基對區域內，鑑定出四個可能的*CDR1*同位調控序列(W1~W4)。實驗發現W1(-ccaactgattgaaact-)為*CDR1*表現時的負向調控因子(negative regulator)，後將此序列命名為NRE(negative regulatory element)。此次實驗同時純化出一個能和NRE結合，約55 kDa大小的核蛋白，此蛋白可能參與了調控*CDR1*基因的表現(Gaur et al., 2004)。

1.3.2 *CDR1* 的異位調控因子(*trans*-regulatory factors)

至目前為止，對於排藥幫浦 *CDR1* 的研究雖著重在於其調控機制，然而已知的 *CDR1* 異位調控因子研究仍不多，下面為已發現的 *CDR1* 異位調控子。

(i) Tac1p: 為具有981個胺基酸，內含Zn(2)-Cys(6)motif的鋅指狀蛋白(Zinc finger protein)。於實驗中發現，在藥物(fluphenazine)誘導下，*tac1/tac1*同型缺陷突變株無法正向調控 *CDR1* 表現，且 *tac1/tac1* 同型缺陷突變株對於 fluphenazine、fluconazole 和 tarbinafine 之藥物敏感性提高，此現象可於 *tac1/tac1::TAC1* 單套基因置入補救株中彌補回來。Tac1p-GST 融合蛋白(含有 Tac1p 的 N 端 DNA-binding domain) 可和含有已知的 *CDR1* 同位調控因子 (*cis*-acting regulatory element) drug-responsive element (DRE) 的 43 個鹼基對片段結合。將 azole-resistant 菌株中的 *TAC1* allele 放入實驗菌株 CAF4-2 內，會導致 *CDR1* 持續性過量表現。由以上實驗結果可知 Tac1p 為 *CDR1* 的正向活化子(positive activator)(Coste et al., 2004)

(ii) Candt80p: *CaNDT80* 其序列會譯解(encodes)含有 DNA-binding domain 的蛋白，為一假定的轉錄因子。此蛋白質共有 592 個胺基酸，經由序列比對發現 Candt80p 與啤酒酵母減數分裂階段專一性(meiosis-specific)的轉錄因子 Ndt80p 的 DNA-binding domain 具有高度相似性。Ndt80p 為啤酒酵母離開減數分裂 pachytene 階段時所需蛋白，已知 *NDT80* 基因只會在啤酒酵母進行減數分裂時的二倍體細胞(diploid cells)內表現(Chu & Herskowitz, 1998; Chu et al., 1998)。實驗發現於啤酒酵母內過量表現 *CaNDT80* 基因時，能夠增加 *CDR1p-lacZ* 的表現，且對於 fluconazole 和 itaconazole 的藥物敏感性降低。於白色念珠菌內破壞此基因時(*Candt80/Candt80*)，會提高對 azoles 類藥物 fluconazole、voriconazole 以及 miconazole 的藥物敏感性。之後於 Real-time PCR 實驗發現，在 miconazole 誘導下，*Candt80/Candt80* 同型缺陷突變株內的 *CDR1* 表現量有下降趨勢(約剩 15%)。綜合以上結果得知，Candt80p 為 *CDR1* 的正向調控子，且和白色念珠菌的抗藥性有關(Chen et al., 2004)。

(iii) Cka2p: *CKA2* 基因會譯解出具有 329 個胺基酸的蛋白質，已知此蛋白質和真核動物 serine/threonine 蛋白質激酶(protein kinase)CK2 具催化功能的 α -subunit 具有相當程度之相似性。啤酒酵母的 Cka2p 為其最接近的相似者，他們之間的相似性高達 65%。實驗指出 *cka2/cka2* 同型缺陷突變株對於 azoles 類抗真菌藥物中的 fluconazole 敏感性降低。其後之北

方墨點法(Northern blotting)研究發現，和野生菌株DAY185(*CKA2/CKA2*)相比，*cka2/cka2* 同型缺陷突變株內的*CDR1/CDR2* mRNA表現量提高3至5倍。由於在缺少Cka2p的情況下會提高*CDR1*和*CDR2*的表現量，故作者推論Cka2p可能為*CDR1*和*CDR2*表現時的負向調控因子(negative regulator)(Bruno & Mitchell, 2005)。

1.4 先前研究

到目前為止，已知的*CDR1*異位調控因子有 Tac1p、Candt80p 與 Cka2p。由於 *tac1/tac1* 與 *Candt80/Candt80* 同型缺陷突變株對於藥物敏感性皆有提高現象，且其 *CDR1* 的 mRNA 表現量具有下降趨勢，故 Tac1p 與 Candt80p 為 *CDR1* 表現時的正向調控因子。反觀 *cka2/cka2* 同型缺陷突變株對於藥物敏感性降低，且菌體內的 *CDR1* mRNA 表現量上升，由此得知 Cka2p 為 *CDR1* 的負向調控因子。目前對於 *CDR1* 異位調控因子所進行的研究仍不多，我們對此感到非常有興趣，希望能夠找出有別於先前文獻所知的異位調控因子，釐清這些調控子與 *CDR1* 的作用方式，希望能夠藉此逐步解開 *CDR1* 的抗藥性途徑。

爲了找出排藥幫浦 *CDR1* 之異位調控因子(*trans-regulatory factor*)，本實驗室先前(紀錦昇，交大碩士論文，2004)將構築於 2 micron (2 μ)質體上之白色念珠菌基因組(genomic DNA library) 轉形至含有臨床菌株 Ym990348 *CDR1* 啓動子(promoter) 與 *lacZ* 的轉譯區(open reading frame,ORF)建構成的重組基因之質體(pSHI16)的啤酒酵母內(YSHI6)，並在抗真菌藥物 miconazole 之誘導下進行篩選，挑選出能夠造成 β -galactosidase 活性改變之 library clones。經由此篩選過程共挑出了 5 個可於啤酒酵母中增加 β -galactosidase 活性之 library clones，並將 5 個和 *CDR1* 啓動子作用之 ORFs 分別命名爲 *REP2*(Regulator of Efflux Pump 2)、*REP3*、*REP4*、*REP5* 與 *REP6*。同時在白色念珠菌中藉由同源重組技術破壞 *REP3* 基因發現，與野生菌株 SC5314 相比，*rep3/rep3* 同型缺陷突變株(homozygous mutant) 對於 azoles 類抗真菌藥物之敏感性有提高之現象。由此可知，*REP3* 基因可能具有調控 *CDR1* 之能力，並且影響白色念珠菌之藥物感受性。

1.5 論文研究目標

(1) 以 *REP3* 單套基因補救(rescue) *rep3/rep3* 同型缺陷突變株，確認 *REP3* 基因在白色念珠菌中的功能

已知 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株對於 azoles 類抗真菌藥物之敏感性有提高現象，爲了進一步證實藥物敏感性之改變的確是由 *REP3* 基因缺陷所造成，而不是其他因素(如轉

形後所造成之染色體突變)，故利用基因置入補救(gene knockin rescue)實驗，將單一 copy 之 *REP3* 基因置入 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株內，之後利用藥物敏感性試驗 Etest 與 agar dilution assay 驗證 *REP3* 基因與藥物敏感性改變之相關性。

(2) 探討 *REP4*, *REP5* 基因之功能

經由 library screening 實驗共篩選出了五個在啤酒酵母內能夠增加 *CDR1p-lacZ* 所產生的 β -galactosidase 活性之相關基因，之後選定 *REP4* 基因與 *REP5* 基因進行更進一步的研究。藉由在白色念珠菌中進行基因重組破壞、基因過度表現與基因置入補救實驗，觀察基因破壞與過量表現前後對於藥物敏感性有無改變現象，藉此研究這些基因之功能，希望能找到和抗藥性生成相關之基因活性，了解其機制及基因調控，並期望能供做抗真菌藥物研究領域開發之用。



二、材料

2.1 質體

質體	特性	Reference
pRS- <i>ARG4</i> Δ <i>SpeI</i>	含有 <i>ARG4</i> 和 Ampicillin Resistance 基因	Wilson et al., 1999
pDDB57	含有 <i>dpl200-CaURA3-dpl200 cassette</i> ，於白色念珠菌基因破壞(knockout)實驗中可一直重複利用 <i>URA3</i> 基因達到多基因破壞目的。	Wilson et al., 1999
pGEM- <i>HIS1</i>	含有 <i>HIS1</i> 和 Ampicillin Resistance 基因。	Wilson et al., 1999
pT7tetR- <i>HIS1</i>	含有 <i>HIS1</i> 基因，以 <i>Acc I</i> 處理此質體後，轉形至 WJC24 及 WJC31，此質體會插入 <i>ENO1</i> 啟動子(promoter)處，產生 <i>HIS</i> ⁺ 轉形株。	羅秀容實驗室，國家衛生研究院臨床研究組，未發表
p99CAU	含有 TR 啟動子(TR promoter)及 <i>URA3</i> 、Ampicillin Resistance 基因。	Nakayama et al., 2000
pWJB24	將白色念珠菌全長之 <i>REP3</i> 基因連接至 pGEM- <i>HIS1</i> 載體上。	本實驗
pWJB30	將白色念珠菌 <i>REP4</i> 基因片段連接至 p99CAU 載體上。	本實驗
pWJB37	將白色念珠菌 <i>REP5</i> 基因片段連接至 p99CAU 載體上。	本實驗
pWJB43	將白色念珠菌全長之 <i>REP4</i> 基因連接至 pGEM- <i>HIS1</i> 載體上。	本實驗

2.2 菌株

2.2.1 大腸桿菌(*Escherichia coli*) : DH5α、JM109

2.2.2 啤酒酵母(*S. cerevisia*):

菌株 (Strains)	基因型(Genotype)	Reference
CSY9	<i>his3::hisG leu2::hisG ura3-52</i> [348(2) <i>CDR1p-LacZ/YEP363</i>]	紀錦昇交大碩士論文，楊昫良實驗室，2004
CSY29	<i>his3::hisG leu2::hisG ura3-52</i> [348(2) <i>CDR1p-LacZ/YEP363</i> , pRS426(1)]	紀錦昇交大碩士論文，楊昫良實驗室，2004
CSY34	<i>his3::hisG leu2::hisG ura3-52</i> [348(2) <i>CDR1p-LacZ/YEP363</i> , <i>REP2/pRS426(3)</i>]	紀錦昇碩士論文，楊昫良實驗室，2004

CSY369 CSY370 CSY371	<i>his3::hisG leu2::hisG ura3-52</i> 〔 348(2)CDR1p-LacZ/YEP363, REP4 & orf19.5019/B2205 〕	紀錦昇交大碩士 論文，楊昫良實 驗室，2004
WJY14 WJY15 WJY16	<i>his3::hisG leu2::hisG ura3-52</i> 〔 348(2)CDR1p-LacZ/YEP363, REP4/B2205 〕	本實驗
WJY17 WJY18 WJY19	<i>his3::hisG leu2::hisG ura3-52</i> 〔 348(2)CDR1p-LacZ/YEP363, orf19.5019/B2205 〕	本實驗

2.2.3 白色念珠菌(*C. albicans*):

菌株(Strains)	基因型(Genotype)	Reference
SC5314	Wild type	Gillum et al., 1984
BWP17	<i>arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3</i>	Wilson et al., 1999
BWP17/tetR-HIS1	<i>arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3xHA-CaHIS1</i>	羅秀容實驗室，國家衛生研 究院臨床研究 組，未發表
HLC54	<i>cph1/cph1 efg1/efg1</i>	Lo et al., 1997
CSC106 CSC111 CSC119	<i>rep3::ARG4/rep3::URA3</i> 〔 parental strain: BWP17/tetR-HIS1 〕	紀錦昇交大碩 士論文，楊昫良 實驗室，2004
CSC80 CSC81 CSC101	<i>rep3::ARG4/rep3::URA3</i> 〔 parental strain: BWP17 〕	紀錦昇交大碩 士論文，楊昫良 實驗室，2004
WJC52	<i>rep3/rep3::REP3-pGEM-HIS1</i> 〔 parental strain: CSC80 〕	本實驗
WJC53	<i>rep3/rep3::REP3-pGEM-HIS1</i> 〔 parental strain: CSC81 〕	本實驗
WJC56	<i>rep3/rep3::REP3-pGEM-HIS1</i> 〔 parental strain: CSC101 〕	本實驗
WJC18 WJC19 WJC21	<i>rep4::ARG4/REP4</i> 〔 parental strain: BWP17 〕	本實驗
WJC24 WJC31	<i>rep4::ARG4/rep4::URA3</i> 〔 parental strain: WJC18 〕	本實驗
WJC32	<i>rep4::ARG4/rep4::URA3</i> <i>ENO1/eno1::ENO1-tetR-ScHAP4-3xHA-HIS1</i> 〔 parental strain: WJC24 〕	本實驗
WJC41	<i>rep4::ARG4/rep4::URA3</i> <i>ENO1/eno1::ENO1-tetR-ScHAP4-3xHA-HIS1</i> 〔 parental strain: WJC31 〕	本實驗

WJC67	<i>rep4/rep4::REP4-pGEM-HIS1</i> 〔 parental strain: WJC24 〕	本實驗
WJC73	<i>rep4/rep4::REP4-pGEM-HIS1</i> 〔 parental strain: WJC31 〕	本實驗
WJC22 WJC23	<i>rep4::ARG4/REP4</i> 〔 parental strain: BWP17/tetR-HIS1 〕	本實驗
WJC44	<i>rep4::ARG4/ENO1::TR-ENO1-URA3</i> 〔 parental strain: WJC22 〕	本實驗
WJC48	<i>rep4::ARG4/ENO1::TR-ENO1-URA3</i> 〔 parental strain: WJC23 〕	本實驗
WJC5 WJC8	<i>rep5::ARG4/REP5</i> 〔 parental strain: BWP17/tetR-HIS1 〕	本實驗
WJC58	<i>rep5::ARG4/ENO1::TR-ENO1-URA3</i> 〔 parental strain: WJC5 〕	本實驗
WJC63	<i>rep5::ARG4/ENO1::TR-ENO1-URA3</i> 〔 parental strain: WJC8 〕	本實驗

2.3 引子

2.3.1 針對 *REP3* 單套基因置入補救(knockin)實驗所設計的引子

引子	序列(5' → 3')	位置
HJL504	CGGGATCC <u>CGTCACTGGATCTGGATCAAC</u>	<u>orf19.3926</u> :+1114~+1133
HJL505	CGGGATCC <u>ATAGTTCCATAGGCAGCCTC</u>	<u>orf19.3929</u> :+902 ~ +883
HJL508	CTGCACAGCATCACCTCG	<i>REP3</i> :+1098 ~ +1081
HJL509	GTTGATTTGGCAACTCGC	<i>REP3</i> : + 646 ~ + 629
HJL510	CAGTTTGGTAGCATCGTG	<i>REP3</i> : + 180 ~ +163
HJL511	TCTACCAATTGCAATCTGCA	<i>REP3</i> : -298 ~ -317
HJL512	ATCACTCCGCATGATCCA	orf19.3929: + 280 ~+297
HJL513	GGTGCTGTTGATGCTCCA	orf19.3929: + 718 ~+735

2.3.2 針對 *REP4* 基因破壞(knockout)、基因置入(knockin)以及四環黴素調控表現系統(Tet R regulatable system)所設計的引子

引子	序列(5' → 3')	位置
HJL494	TCGACCTCTTCTGTCTTTCTTCTTTAGT AATTCTTTCAACTCCGAGTCATTAATC CGTCTACTGTCCCT <u>GTTTTCCAGTCA</u>	<i>C. albicans REP4</i> : +936~ +867 and <u>ARG4</u>

	<u>CGACGTT</u>	
HJL495	CAATGAGATGGTAGCCACCACCATCAA ACTCAACAATCAAATCTCAGGGAATTA TCGTAGTTACTTATAT <u>TGTGGAATTGT GAGCGGATA</u>	<i>C. albicans</i> REP4: -302~-233and <u>ARG4</u>
HJL496	TGTCCCTGAAGAATTGAGTAATACACT CATATCATTAGTGACGTTGTTTCCATTA GACCTCACATCTTGG <u>GTTTCCCAGTC ACGACGTT</u>	<i>C. albicans</i> REP4: +873~+804 and <u>URA3</u>
HJL497	GACAAGGCTACCTGCAACAAGTGCCA ACACAAAACATCACTAACAATTCTTATT ATCCAAGAAACACATC <u>GCTCGGAATT AACCCCTCACT</u>	<i>C. albicans</i> REP4:+101 ~ +170 and <u>URA3</u>
HJL506	CTCGGGATCC <u>GGACTTGATTAACGG GTGC</u>	<u>orf19.5019</u> : +1860~+1879
HJL507	CACGGGATCC <u>GAGTACCAGTTGGTAA GCCA</u>	<u>orf19.5021</u> : + 272 ~+291
HJL514	CCGTCTCGAG <u>TGTTTATCAAGATGGG ATGG</u>	<u>REP4</u> : -423 ~ -404
HJL515	CGGTGGTACC <u>AGTGAGAACTAGACAG CAGT</u>	<u>REP4</u> : -121 ~ -140
HJL516	TGGCCCGCGG <u>ATGGTCATCTTGCTGA ATCG</u>	<u>REP4</u> : + 597 ~ + 578
HJL517	CTAGTCTAGA <u>AGAATGCATCCGTATC AAGC</u>	<u>REP4</u> : -3 ~ + 17
HJL596	CCTTCGCTGTCTTCTCC	pGEM-HIS1:3066 ~ 3049
HJL597	CCTTTCTGGTCTTTGTTCAAG	REP4 : + 1134 ~ + 1114
HJL598	GCAGGTAGCCTTGTCTCA	REP4 : + 115~ + 98
HJL599	CTTGTTGGCTGGAATTTGTGA	REP4: - 461 ~ - 481
HJL600	GATGGTTCTGCAAGCATTAT	orf19.5021: + 713~ +694

2.3.3 針對 *REP5* 基因破壞(knockout)以及四環黴素調控表現系統(Tet R regulatable system)所設計的引子

引子	序列(5' → 3')	位置
HJL479	AACAACCAGATTATATCCAATTTGAAGAC CATTTACGCCGCACAAACGTGGAACCAC CCCCAATTTGTG <u>GTTTCCCAGTCAC GACGTT</u>	<i>C. albicans</i> REP5: -272 ~ - 203 and <u>ARG4</u>
HJL480	CGGTGTAATACGACCCAGAAGAATTTCC AACTGCGTCATCTGTTCCAGCAGCAACC AATGTTCCATTAGT <u>TGTGGAATTGTGAG CGGATA</u>	<i>C. albicans</i> REP5:+2350 ~ + 2281 and <u>ARG4</u>

HJL481	TTGAACAACACTGTCGGGAATCAAAAGATG GACAGATGGTATTTTCATGGTCCCCATCAA GAATCCAAGGTTCG <u>GTTTTCCAGTCAC</u> <u>GACGTT</u>	<i>C. albicans</i> REP5: +170 ~ +239 and <u>URA3</u>
HJL482	ATATGTTGGATGAAGATACGGATGATTAT GAATGATATGTGGTGCTCCTACACCAGCC ACTTGCTGCTGC <u>GCTCGGAATTAACCC</u> <u>TCACT</u>	<i>C. albicans</i> REP5:+2121 ~ +2052 and <u>URA3</u>
HJL571	CGGTGGTACC <u>GCAGCAACAGATTCCA</u> <u>CAT</u>	<u>REP5</u> : -643~ -624
HJL572	CCGTCTCGAGT <u>GTTTGAGATGTCAGTG</u> <u>TAC</u>	<u>REP5</u> : -124 ~ -143
HJL573	CTAGTCTAGAG <u>GCAATGTCTAATTCAAGT</u> <u>ATAG</u>	<u>REP5</u> : -3 ~ + 19
HJL574	TGGCCCGCGG <u>GAAATCATTGATGCCGAT</u> <u>GAC</u>	<u>REP5</u> : + 511 ~+ 492

2.4 藥品試劑

- ◆ AB BIODISK : Etest drug strips, amphotericin B (Cat.No.51002683), fluconazole(Cat.No. 51001088), itraconazole (Cat.No.51002588), ketoconazole (Cat.No.51002598), voriconazole (Cat.No.51003288), flucytosine (Cat.No.51001098)
- ◆ Amersham Biosciences : rTaq DNA polymerase (Cat.No.27-0798-06)
- ◆ BDH: 20 x SSC (Cat.No.443527N)
- ◆ BIO-RAD: 50 x TAE (Cat.No.161-0773)
- ◆ Difco laboratories:
 - Bacto agar (Cat.No.214040), LB agar (Cat.No.244520), yeast nitrogen base w/o amino acid (Cat.No.291940), LB broth (Cat.No.244620), YPD broth (Cat.No.242820), BHI (Cat.No.0037-17)
- ◆ Invitrogen: Agarose (Cat.No.15510-027), 1Kb plus DNA ladder (Cat.No.12308-011)
- ◆ JRH BIOSCIENCES : Fetal bovine serum (Cat.No.12003-500M)
- ◆ NEB: Restriction Enzymes, *AccI*, *AflII*, *BamHI*, *BsrGI*, *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *PmlI*, *SpeI*, *SalI*, *SacII*, *XbaI*, *XhoI*, Alkaline phosphatase, Calf intestinal (CIP), Klenow, Vent DNA polymerase
- ◆ Promega : T4 DNA ligase (Cat.No.M-1801)
- ◆ Roche : PCR DIG Synthesis kit (Cat.No.1636090), DNA molecular – weight marker II DIG-labeled(Cat.No.1218590), Anti-DIG-AP(Cat.No.713023), CSPD(Cat.No.1655884), Blocking reagent (Cat.No.1096176), DIG Easy Hyb (Cat.No.1603558), Nylon Membranes, positively charged (Cat.No.1417240)

◆Sigma Chemical Co.:

Arginine(Cat.No.A-5131), Dithiothreitol(DTT)(Cat.No.D9779), Disodium ethylenediamine-tetraacetate(EDTA)(Cat.No.E-5134), Glassbeads(425 ~ 600 μ m)(Cat.No.G9268-500G), Histidine (Cat.No.H-8125), Lithium acetate (CH₃COOLi) (Cat. No.L-6883), L-leucine (Cat.No.L-8000), Miconazole (Cat.No.M-3512), Polyethylene Glycol₃₃₅₀ (PEG₃₃₅₀) (Cat.No.P4338), Uracil (Cat.No.U-0750), Uridine (Cat.No. U-3003)

◆ E Merck. Germany:

Dodecyl sulfate sodium salt (SDS) (Cat.No.113760.0100), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Cat.No.S26740), Ethanol (Cat.No.K33534874), Ethidium bromide (Cat.No. K27928515), Glucose (Cat.No.K33069537), N,N-dimethylformamide (Cat.No. K27226853), Isopropanol (Cat.No.K32632434), Potassium chloride (KCl) (Cat.No.K24252236), Sodium hydroxide (NaOH) (Cat.No.B886298), Sodium carbonate (Na₂CO₃) (Cat.No.A375692), Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrogen chloride (Tris-HCl) (Cat.No.8382T006), Sodium chloride (NaCl) (Cat.No.K29779304), Maleic acid (Cat.No.S27857), Tween 20 (Cat.No.P-1379), Triton X-100(Cat.No.K23841503)

◆USB: Glycerol (Cat.No.US16374)



2.5 緩衝溶液:

◆ 10 x TE buffer(pH 7.5 & pH 8.0):

100 mM Tris-HCl (pH 7.5& 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

◆ 50 % PEG₃₃₅₀:

200 g polyethyleneglycol₃₃₅₀ added ddH₂O to 400 ml

◆ 40 % Dextrose:

40g Dextrose added ddH₂O to 100 ml

◆ 1 M Lithium Acetate:

40.8 g Lithium Acetate added ddH₂O to 400 ml

◆ Breaking buffer:

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 %(w/v) SDS, 2 % (w/v) TritonX-100, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA

◆ Z buffer:

Na₂HPO₄ • 7 H₂O 16.1 g, NaH₂PO₄ H₂O 5.5 g, KCl 0.75 g, MgSO₄ 7H₂O 0.246 g, β -mercaptoethanol 2.7 ml added dd H₂O to 1000 ml pH 7.0

- ◆ Maleic acid buffer:
0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3 % Tween 20 (pH 7.5)
- ◆ Blocking solution:
1 % (W/V) blocking reagent dissolved in maleic acid buffer
- ◆ Detection buffer
0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl (pH 9.5)
- ◆ Denaturation Solution:
0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- ◆ Neutralization Solution:
1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)

2.6 培養液和培養基製備：

- ◆ BHI broth: (Difco, Cat.No. 0037-17)
33.7 % Calf brain infusion solids, 13.5 % Beef heart infusion solids, 27 % Proteose peptone,
5.4 % Glucose, 13.5 % Sodium chloride, 6.7 % Disodium phosphate
- ◆ LB(Lucia-Bertni) broth: (Difco, Cat.No. 244620)
1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1% NaCl
- ◆ LB/ ampicillin broth:
1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl, 50 µg/ml ampicillin
- ◆ SD broth: (Difco, Cat.No. 291940)
0.67 % Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid, 2 % dextrose
- ◆ YPD borth: (Difco, Cat.No. 242820)
2 % Bacto-peptone, 1 % yeast extract, 2 % dextrose
- ◆ LB/ ampicillin agar:
1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl, 1.5% agar , 50 µg/ml ampicillin
- ◆ SD(Synthetic Dextrose) agar: Non-selective agar
0.67 % Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid, 2 % dextrose, 2% agar

Amino acid	Concentration
L-Adenine (Sigma A-9126)	20 mg/L
L-Arginine-HCl (Sigma A-5131)	20 mg/L
L-Histidine-HCl (Sigma H-9511)	20 mg/L

L-Uracil	(Sigma U- 0750)	20 mg/L
Uridine	(Sigma U- 3003)	80 mg/L

配置含有營養缺陷菌株所需之 SD 培養基時，需外加上述濃度之胺基酸，以 SD/Histidine agar 為例：

0.67 % Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid, 2 % dextrose, 2 % agar, **20 mg/L Histidine-HCl**

其餘含有特定胺基酸之 SD agar 配置方法依此類推

◆ YPD/Uridine agar:

2 % Bacto-peptone, 1 % yeast extract, 2 % dextrose, 80 mg/L Uridine

2.7 濾紙：(β-gal colony-lift filter assay 實驗所需)

◆ S&S(Schleicher & Schuell) #576 filter (90mm)

REF. NO.: 311409

LOT.: BG0470-1

◆ S&S(Schleicher & Schuell) #593 filter (90mm)

REF. NO.: 10314509

LOT.: CJ1016-1



2.8 儀器設備：

程式溫度控制儀 PTC-200 (MJ Research)

迴轉式震盪培養箱 (TKS)

落地型高速離心機 J2-MC (Beckman)

桌上型高速冷凍離心機 (Heraeus)

桌上型低速冷凍離心機 (SORVALL RT7)

微量高速離心機 DENVILLE 260D (DENVILLE SCIENTIFIC INC)

電子天平 AT261 DeltaRange (METTLER TOLEDO)

GG4002-S (METTLER TOLEDO)

加熱攪拌器 (CORNING)

酸鹼度計微電腦自動溫度 (HANNA instruments)

單槽乾浴器 (Violet Bio Sciences, Inc.)

恆溫水浴器 (CHERNG HUEI Co.)

試管震盪器 Vortex-2 genie (Scientific Industry)

全光域多功能分析系統 (Molecular Devices)

倒立顯微鏡 (OLYMPUS)

數位相機 COOLPIX 990 (Nikon)

基因脈衝儀 GENE PULSER II (BIO-RAD)

往覆式細菌接種套組(Cathra)

電泳影像擷取分析系統 (Alpha Innotech Corporation)

TurboBlotter system (Schleicher & Schuell)

水平式電泳槽 SUB-CELL GT (BIO- RAD)

紫外光接合器 UV crosslinker (Stratagene)

玻璃雙門 4 °C 冷凍櫃(LEVEL)

-30 °C 直立式雙門冷凍櫃 (SANYO)

-80 °C 超低溫冷凍櫃 Ultima II (REVCO)



三、方法

3.1 DNA 方法

使用 Qiagen Inc 之產品 QIAprep spin miniprep kit (Cat.No. 27106)並依照其說明書，萃取出大腸桿菌內之質體 DNA。利用 Qiagen Inc 之產品 QIAprep gel extraction kit (Cat. No. 28706)並依照其說明書，萃取出洋菜膠內之 DNA 片段。

3.1.1 DNA 的連接反應(Ligation)

將載體 DNA (vector DNA)與欲連接的 DNA 片段 (insert DNA) 以適當的限制酵素處理後，取莫爾濃度比為 1:3 或 1:1 之載體 DNA 與欲連接的 DNA 片段，加入總反應體積 10 μ l，內含 1 unit 的 T4 DNA ligase 之反應液中，於 4 $^{\circ}$ C 進行連接反應至隔天。

3.1.2 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)

本實驗聚合酶連鎖反應主要之模板為質體 DNA 或白色念珠菌之染色體 DNA，利用所設計的引子夾出並放大所需之 DNA 片段。將下列物質混合於 0.5 ml 微量離心管內：總體積 50 μ l 的反應液中包含 5 μ l 的 10 x PCR buffer、1 unit *rTag* Polymerase(5 unit /1 μ l)、200 μ M dNTP、primer F 和 primer R 約 0.2 ~ 1.0 μ M、模板 DNA(白色念珠菌染色體 DNA 約 0.1 ~ 1 μ g，質體 DNA 約 1ng)，無菌二次水。反應步驟為：(1)94 $^{\circ}$ C，5 分鐘 (2)94 $^{\circ}$ C，40 秒 (3)50 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C，30 秒(依引子 T_m 值減 2 $^{\circ}$ C) (4)72 $^{\circ}$ C，1~3 分鐘 (5)重複(2)~(4)步驟 34 次反應 (6)72 $^{\circ}$ C，10 分鐘 (7)4 $^{\circ}$ C 停止反應。

3.2 利用電穿透法(Electroporation)進行大腸桿菌的轉形(Transformation)

勝任細胞的製備：

將 DH5 α 或 JM109 接種於 5 ml LB 培養液中，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中以 150 rpm 震盪隔夜培養。將隔夜培養之菌液加入 1 L 新鮮的 LB 培養液中，放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱中以 150 rpm 震盪培養至 OD₆₀₀ 至 0.4 ~ 0.7 左右。將菌液放置冰上 15 ~ 30 分鐘後轉移至 4 個欲先冷卻之 500 ml 離心瓶中，以 5K rpm，4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘。小心地去掉濾液，以 200 ml/each bottole 冰的無菌二次水沖洗細胞後，以 5K rpm，4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘。小心地去掉濾液，以 50 ml/each bottole 冰的無菌二次水沖洗細胞後，以 5K rpm，4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘。小心

地去掉濾液，以 10 ml/each bottle 冰的 10 % glycerol 懸浮細胞，將細胞轉移至 50 ml 離心管後以 5K rpm, 4 °C 離心 5 分鐘。小心地去掉濾液，以 2 ml/each tube 冰的 10 % glycerol 懸浮細胞。以每管 80 μ l 細胞量分裝至 1.5 ml 離心管後放入 -80 °C 冰箱保存。

大腸桿菌電穿透法:

於 -80 °C 冰箱取出勝任細胞(competent cells)(DH5 α 或 JM109)置於冰上解凍。在 80 μ l 的勝任細胞中加入 0.1 ~ 1 μ g 的質體 DNA，輕輕混合均勻後將此 cell/DNA 混合物加入預先冷卻的 0.2 ml electroporation cuvette 中，輕拍管壁使樣本集中於底部。將 BioRAD Gene Pulse 設定在 25 μ F 和 2.45 kV，並將 pulse controller 設定在 200 Ω 。以拭紙擦去 electroporation cuvette 管壁外的水氣，將 cuvette 放入 slide 中，並將 slide 推入 chamber 內直到 cuvette 確實緊密位於 chamber 中，同時按壓機器左側的兩個紅色 Pulse 按鈕直到聽到嗶嗶聲。取出 cuvette 後以回溫之 1 ml SOC 培養液懸浮細胞，將細胞轉移至先前 1.5 ml 離心管，放入 37 °C 培養箱內以 150 rpm 水平震盪一小時。一小時後取出離心管於桌上型離心機中以 3000 rpm 離心 5 分鐘，去掉大多數濾液，留下約 100 μ l 的培養液重新懸浮細胞。取 100 μ l 的細胞均勻塗抹至 LB amp 培養基上並於 37 °C 培養箱內培養 12 至 18 小時。



3.3 將質體 DNA 轉形至啤酒酵母中(LioAc method)

將啤酒酵母細胞培養在 3 ml 選擇性培養液中，於 30 °C，150 rpm 震盪培養隔夜後，轉養至 15 ml YPD 培養液，調整菌液濃度至 OD₆₀₀ 為 0.4 左右。於 30 °C，150 rpm 振盪數小時，直到菌液濃度約在 OD₆₀₀ 為 0.8 左右。以 3000 rpm 離心 5 分鐘，去掉濾液後以 15 ml 1x TE (pH7.5) 懸浮細胞，以 3000 rpm 離心 5 分鐘，去掉濾液後加入 4 ml 0.1M LioAc/TE (pH7.5) 懸浮細胞，以 3000 rpm 離心 5 分鐘，去掉濾液後以 1 ml 0.1 M LioAc/TE (pH7.5) 懸浮菌體，靜置室溫 10 分鐘。以 100 °C 加熱 10 mg/ml salmon sperm DNA 2 分鐘，後立即置於冰上。取 4 μ l salmon sperm DNA 當作載體 DNA，1 ~ 3 μ g 欲被轉形的質體 DNA 和 0.7 ml 50% PEG₃₃₅₀ /0.1 M of LioAc/TE 均勻混合後，於 30 °C 培養箱慢速旋轉 30 分鐘後，於 42 °C 水浴槽，進行熱休克(heat shock)反應 15 分鐘後，置於冰上 2 分鐘。以 3000 rpm 離心 5 分鐘，去除濾液後以 1 ml 1x TE (pH 7.5) 懸浮細胞。以 3000 rpm 離心 5 分鐘，去掉大部份濾液，留下約 100 μ l 的 buffer 重新懸浮菌體，將菌液均勻塗抹至適當的篩選培養基上，於 30 °C 培養 3 至 4 天。

3.4 於加藥狀況下測量 β -galactosidase 活性(Colony-Lift Filter Assay)

將啤酒酵母細胞培養在具選擇性的培養基上，於 30 °C 培養箱中培養 2 至 3 天後將啤酒酵母細胞複製到含有濾紙的新培養基上，放入 30 °C 培養箱中隔夜培養。配製藥品 miconazole (miconazole 溶於 DMSO 中)至濃度為 100 mg/ml，以 1:1000 倍稀釋加入選擇性的培養液中。將濾紙浸入含有 100 μ g/ml miconazole 培養液中，並將長有菌落之另一濾紙放於含有 miconazole 之濾紙上，將濾紙放入 30 °C 培養箱中 1 小時。一小時後取出長有菌落之濾紙，浸入液態氮內 1 分鐘，後置於室溫下回溫(此步驟可使細胞穿透)。於回溫間隔中以 Z buffer/2ME/X-gal stock(10 ml/14 μ l/84 μ l)之溶液浸潤新濾紙。將長有菌落的濾紙小心地放在已含 Z buffer/X-gal 之濾紙上，趕走濾紙間的氣泡，放入 30 °C 培養箱中反應，每隔 15 至 20 分鐘觀察呈色結果。

3.5 建構含C19 library clone之主要兩個open reading frames (ORFs)之一的質體(參見圖六(A))

C19染色體DNA片段上具有兩個主要的ORFs- orf19.5019和orf19.5020。將C19以限制酵素 *Bsr*G I 及 *Sal* I 切割，此步驟移除大部分的orf19.5020片段，破壞了orf19.5020，隨後以Klenow酵素將質體DNA尾端補齊，產生只包含完整orf19.5019之質體。利用相同策略，以限制酵素 *Xho* I 切除質體C19中之orf19.5019片段，當質體自我接合後得到了只具有完整orf19.5020的質體。

3.6 建構 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入(knockin)補救株

將包含 *REP3* 完整基因及上下游基因部分片段之 *Bam*H I DNA 片段接入質體 pGEM-*HIS1* 中，將此質體命名為 pWJB24。以限制酵素 *Afl* II 切割 pWJB24，切割位置位於 *REP3* 基因的下游基因中，此一步驟將質體切割成線型，之後將質體轉形至白色念珠菌 CSC80、CSC81 及 CSC101(*rep3/rep3* 同型缺陷突變株)中。萃取所得轉形株之染色體 DNA，利用引子 HJL458 及 HJL505 進行聚合酶連鎖反應，確認是否已將 *REP3* 單套基因正確地置入轉形株內後，將正確的轉形株分別命名為 WJC52、WJC53 以及 WJC56。

3.7 白色念珠菌轉形(*Candida* transformation)

將白色念珠菌接種至 3 ml YPD+Uridine 的培養液中，於 30 °C 培養箱，以 180 rpm 震盪培養隔夜後，取 270 μ l (1:100 稀釋)菌液轉養至 27 ml YPD+Uridine 培養液內(OD₆₀₀

約在 0.1 左右), 於 30 °C 培養箱中以 180 rpm 振盪培養 4 至 6 小時, 直到 OD₆₀₀ 約在 0.7 到 1.0 之間。將菌液轉移到 50 ml 離心管內, 室溫下以 3000 rpm 離心 10 分鐘, 之後以 10 ml 的無菌二次水, 5 ml sterile 1x TE buffer (pH 7.5), 2 ml sterile 0.1 M LioAc/TE buffer 順次沖洗細胞, 室溫下以 3000 rpm 離心 10 分鐘後, 以 250 µl 0.1 M LioAc/TE buffer 懸浮細胞, 於室溫下靜置 10 分鐘後即為念珠菌之勝任細胞。取 5 ~ 10 µg 欲轉形之 DNA 片段(溶於 1 x TE buffer; pH 8.0; 體積 ≤ 13 µl) 及 10 µl 的 10 mg/ml Salmon sperm DNA(預先以 100 °C 加熱 2 分鐘再迅速置於冰上 2 分鐘)和 100 µl 的勝任細胞混合均勻, 於 30 °C 靜置 30 分鐘後加入 700 µl 50 % PEG₃₃₅₀ /0.1 M of LioAc/TE, 於 30 °C 培養箱內慢速搖晃 16 小時後, 在 44 °C 水浴槽中進行熱休克作用(heat shock)15 分鐘後置冰上 2 分鐘。室溫下以 3000 rpm 離心 5 分鐘, 去除濾液, 加入 1 ml 1 x TE buffer (pH 7.5)懸浮菌體, 室溫下以 3000 rpm 離心 5 分鐘, 去除大部份濾液, 留下約 100 µl buffer 重新懸浮細胞, 將菌液均勻塗抹至適當的篩選培養基, 於 30 °C 培養 3 到 4 天。

3.8 建構 *REP4/rep4* 異型缺陷突變株及 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株

利用含有與欲研究基因相同序列及篩選標誌(*ARG4* 和 *URA3*)之 DNA 片段在白色念珠菌中進行重組置換而達到基因破壞的目的。以篩選標誌 *ARG4* 替代 *REP4* 單套基因之轉譯起始點上游 302 bp 至轉譯終止點上游 87 bp 區域。方法為利用含有 *REP4* 基因相同序列 70 mer 與篩選標誌 *ARG4* 序列 20 mer 之引子 HJL 494 及 HJL 495 及帶有 *ARG4* 基因之質體 pRS-*ARG4*Δ *Spe* I 當作模板進行聚合酶連鎖反應, 得到含有篩選標誌 *ARG4* 及部份 *REP4* 基因之 2.3 kb DNA 片段, 將此聚合酶連鎖反應片段轉形至白色念珠菌 BWP17 及 BWP17/tetR-*HIS1* 中, 建構 *REP4/rep4* 異型缺陷突變株。

接著以篩選標誌 *URA3-dpl200*-based cassette 替代 *REP4* 另一套基因之轉譯起始點下游 170 bp 至轉譯終止點上游 220 bp 區域。以含有 *REP4* 基因相同序列 70 mer 與篩選標誌 *URA3* 序列 20 mer 之引子 HJL496 及 HJL497 及質體 pDDB57-*URA3-dpl200*-based cassette 當作模板進行聚合酶連鎖反應, 得到含有篩選標誌 *URA3* 及部分 *REP4* 基因之 1.8 kb DNA 片段。將此片段轉形至 WJC18 建構 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株。

3.9 建構 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株

將包含 *REP4* 完整基因及上下游基因部分片段之 *Bam*H I DNA 片段接入質體 pGEM-*HIS1* 中, 將此質體命名為 pWJB43。以限制酵素 *Pml* I 切割 pWJB43, 切割位置

位於 *REP4* 基因的下游基因中，此一步驟將質體切割成線型，之後將質體轉形至白色念珠菌 WJC24 與 WJC31(*rep4/rep4* 同型缺陷突變株)中。萃取所得轉形株之染色體 DNA，利用引子 HJL516 及 HJL507 進行聚合酶連鎖反應，確認是否已將 *REP4* 單套基因正確地置入轉形株內後，將正確的轉形株分別命名為 WJC67 與 WJC73。

3.10 建構 *REP5/rep5* 異型缺陷突變株

利用含有與欲研究基因相同序列及篩選標誌 *ARG4* 之 DNA 片段在白色念珠菌中進行重組置換而達到基因破壞的目的。目標為以篩選標誌 *ARG4* 替代 *REP5* 單套基因轉譯起始點上游 202 bp 至轉譯終止點上游 79 bp 區域。方法為利用含有 *REP5* 基因相同序列 70 mer 與篩選標誌 *ARG4* 序列 20 mer 之引子 HJL 479 及 HJL 480 及含 *ARG4* 基因之質體 pRS-*ARG4*Δ *Spe* I 當作模板進行聚合酶連鎖反應，得到含有篩選標誌 *ARG4* 及部分 *REP5* 基因之 2.3 kb DNA 片段，將此聚合酶連鎖反應片段轉形至白色念珠菌 BWP17 及 BWP17/tet R-*HIS1* 中，建構 *REP5/rep5* 異型缺陷突變株。

3.11 建構四環黴素調控表現系統(Tetracycline-regulatable expression system, TR system)

本操作流程是利用四環黴素調控表現系統進行基因過度表現(overexpression)或是抑制基因表現(inhibition of gene expression)的實驗 (Nakayama et al., 2000)。首先要在已含驅動 tet R 表現之白色念珠菌(BWP17/tet R-*HIS1*)中，將欲研究基因的單套基因利用序列同源基因重組置換的方式(homologous recombination)，進行單套基因的破壞(knockout)。再將已建構含有 TR 啟動子(TR promoter)及 *URA3* 基因與欲研究基因之質體以限制酵素處理後，將含有 TR 啟動子及 *URA3* 基因與欲研究基因之 DNA 片段轉形至前述基因破壞所得之轉形株。經過二次轉形後所得之突變菌株，在沒有 doxycycline 之環境下，可以藉由 Tet R 與 TR 啟動子上的 *tet O* 結合，促使欲研究基因大量表現；但是當生長環境中含有 doxycycline 時，doxycycline 會和 Tet R 結合，抑制 Tet R 與 *tet O* 結合，而使基因不表現。

3.11.1 將 TR 啟動子及 *URA3* 標記置入 *REP4* 和 *REP5* 之異型缺陷突變株

以白色念珠菌之染色體 DNA 當作模板，利用引子 HJL514 和 HJL515 進行聚合酶連鎖反應，得到 *REP4* 啟動子區約 300 bp 之 DNA 片段(-121 ~ -423)，此 DNA 片段為 A 區

(A region)。以引子 HJL516 及 HJL517 再次進行聚合酶連鎖反應，得到包含轉譯起始點約 500 bp 之 DNA 片段(-3 ~ + 597)，此 DNA 片段為 B 區(B region)。將 A、B 兩片段分別連接至含有 TR 啟動子及 *URA3* 基因之質體 p99CAU 中，之後以限制酵素 *Kpn* I 及 *Sac* II 處理此質體，得到包含 TR 啟動子及 *URA3* 基因與 *REP4* A、B 區之 DNA 片段，將此片段轉形至含有 *REP4* 異型缺陷突變株 WJC22 及 WJC23 內，產生可以 doxycycline 調控表現之 *REP4* 轉形株。

依同原理利用引子 HJL571 和 HJL572 進行聚合酶連鎖反應，得到 *REP5* 啟動子區 520 bp 大小之 DNA 片段(-124 ~ -643)，此 DNA 片段為 A 區(A region)。以引子 HJL573 及 HJL574 再次進行聚合酶連鎖反應，得到包含轉譯起始點 514 bp 大小之 DNA 片段(-3 ~ +511)，此 DNA 片段為 B 區(B region)。將 A、B 兩片段分別連接至含有 TR 啟動子及 *URA3* 基因之質體 p99CAU 中，之後以限制酵素 *Kpn* I 及 *Sac* II 處理此質體，得到包含 TR 啟動子及 *URA3* 基因與 *REP5* A、B 區之 DNA 片段，將此片段轉形至含有 *REP5* 單套基因破壞轉形株 WJC5 及 WJC8 內，經重組置換改換 *REP5* 啟動子區域，產生可以 doxycycline 調控表現之 *REP5* 轉形株。



3.12 萃取染色體 DNA

挑選白色念珠菌菌落接種至 6 ml 的 YPD+ Uri 培養液中，於 30 °C 培養箱內以 180 rpm 振盪培養 24 ~ 48 小時。以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取 5 ml 無菌二次水懸浮菌體。以 3000 rpm 離心 10 分鐘，去除濾液後以 500 μ l breaking buffer 懸浮菌體，加入 4/5 體積用硝酸沖洗過的玻璃珠和 500 μ l phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)，在室溫下以最大速度震盪上述混合物 10 分鐘，後加入 500 μ l 1 x TE(pH 8.0)，震盪數秒後以 3000 rpm 離心 15 分鐘，將水層取至新的 15 ml 離心管，加入等體積的 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)，震盪 1 分鐘後以 3000 rpm 離心 15 分鐘，此 phenol 萃取步驟需重複 3 次，最後將水層取至新的 1.5 ml 離心管內(每管約裝 400 μ l 樣本)。

加入 1 ml(2.5 x 體積)100 %冰酒精，上下搖晃數十次後於 4 °C 離心機內以 13000 rpm 離心 10 分鐘，去除濾液後在室溫下風乾 10 ~15 分鐘。以含有 3 μ l 10 mg/ml RNase A 的 0.4 ml TE buffer(pH 8.0)懸浮 DNA pellet，靜置 37 °C 培養箱內 15 分鐘。加入 40 μ l 3 M ammonium acetate(pH 5.2) 和 1 ml 100 %冰酒精，上下搖晃數十次後於 4 °C 離心機內以 13000 rpm 離心 10 分鐘，小心地去除濾液，隨後加入 1 ml 70 %冰酒精沖洗 DNA pellet，於 4 °C 離心機內以 13000 rpm 離心 10 分鐘，去除濾液後在室溫下風乾 5 分鐘，最後以

100 ~ 200 μ l 的無菌二次水(或 pH 8.0 的 TE buffer)溶解 DNA，儲存於-20 $^{\circ}$ C。

3.13 突變株之性狀分析(characterization)

3.13.1. 芽管試驗(germ tube assay)

將菌落接種於含 10 %胎牛血清之 Brain Heart Infusion(BHI)培養液內，並視實驗目的決定是否添加四環黴素類藥物 doxycycline，於 37 $^{\circ}$ C 反應 3 小時，之後在倒立顯微鏡下觀察菌絲之型態。

3.13.2 抗真菌類藥物敏感性試驗

3.13.2.1 Etest

將培養於 SD 培養基上之隔夜菌落懸浮於 0.85 % NaCl，調整菌液濃度直到如同標準之 0.5 McFarland。於 150 mm 培養皿內製備總體積 60 ml，厚度約 4 ± 0.5 mm 之 SD 培養基。以無菌棉棒浸入菌液內，於管內旋轉數圈後以相異之 3 個方向均勻塗抹至 SD 培養基上。室溫下放置 5 ~ 10 分鐘，待多餘水氣消失後以乾淨之尖頭鑷子夾取藥物試片，試片以濃度高的靠近培養皿邊緣而濃度低的靠近培養基中心方向擺放。除去試片和培養基之間的大氣泡(由濃度低至高的方向去除)，由於小氣泡並不會影響判讀故可忽略不管。啤酒酵母需於 30 $^{\circ}$ C 培養 48 ~ 72 小時，白色念珠菌則於 35 $^{\circ}$ C 培養 24 ~ 48 小時。

◆ 藥品名稱與 MIC 濃度範圍

藥品名稱	簡寫	MIC 濃度範圍(μ g/ml)
amphotericin B	AP	0.002 - 32
flucytosine	FC	0.002 - 32
fluconazole	FL	0.016 - 256
itraconazole	IT	0.002 - 32
ketoconazole	KE	0.002 - 32
voriconazole	VO	0.002 - 32

Etest 中，MIC 讀法為抑菌圈邊緣和試片交接之最小濃度。當菌落沿著試片生長，也就是沒有抑制現象產生時，MIC 讀法為“ > ”最高之藥片 MIC 濃度。對於 flucytosine，MIC 為近乎完全抑制菌落生長(95 %)之數值，而 amphotericin B 則是完全抑制菌落生長(100 %)之數值為 MIC 值。Azoles 類藥物包括 fluconazole、ketocanazole、itraconazole 和 voriconazole 則是最先產生明顯抑制現象或菌落生長濃度明顯降低點，通常是以 80 %抑制現象為 MIC 值。

3.13.2.2 Agar dilution assay

於實驗前一天將所需菌種全部重新接種於同一個 SD 培養基上，使菌種在相同的狀況下生長一天後以 0.85 % NaCl 懸浮菌種，調整菌液濃度至 OD₆₀₀ 為 2.0，之後將菌液連續稀釋成 10 倍、100 倍、及 1000 倍。於不同稀釋倍數之菌液中各取 300 µl 菌液加入複製盤內，以複製盤將菌液點在含有特定濃度之藥物的培養基上(約 0.5 µl/ spot，每個點的菌數由 10⁴ 十倍遞減至 10¹ cells)，於 35 °C 培養箱中培養 24 ~ 48 小時。

◆ 藥品名稱與濃度

藥品名稱	濃度(µg/ml)
miconazole	1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml

3.14 南方墨點法(Southern blot analysis)

進行基因破壞所得之轉形株，可利用南方墨點法確認是否於正確位置破壞目標基因以及 copy numbers。

將所萃取之染色體 DNA(10 µg)以限制酵素 *Xho* I 於 37 °C 反應隔夜，之後依 Roche 廠商產品操作手冊進行。利用 1 % 洋菜膠以 100 伏特電壓進行電泳 160 分鐘分離 DNA 片段，電泳結束後，在電泳影像處理系統照相。將洋菜膠浸入 Denaturation Solution 中，室溫下平面震盪 15 分鐘兩次，以無菌二次水清洗後放入 Neutralization Solution 中，室溫下平面震盪 15 分鐘兩次。利用 TurboBlotter Rapid Downward Transfer system 將 DNA 轉移到 nylon membrane 上，之後以 UV crosslinker，於 120 mJ/pulse 之能量下處理兩次，將 DNA 固定在 nylon membrane 上。後將 nylon membrane 放置在含有預先加熱，42 °C 之 prehybridization buffer 之袋子內，於 42 °C 之水浴槽內水平震盪 30 分鐘後，加入含有標記探針之 hybridization buffer(探針濃度 10 ng/ml)，於 42 °C 之水浴槽內水平震盪至隔天。以 Low stringency buffer(2 x SSC, 0.1 % SDS)室溫下平面震盪 5 分鐘兩次，再以 65 °C 之 High stringency buffer (0.5 x SSC, 0.1 % SDS)室溫下平面震盪 15 分鐘兩次後，於 washing buffers 內漂洗 nylon membrane 1 分鐘，加入 Blocking solution 於室溫下水平震盪 30 分鐘，再以 Antibody solution 平面震盪 30 分鐘，後以 Washing buffer 漂洗 nylon membrane 兩次，每次 15 分鐘，最後以 Detection buffer 作用 5 分鐘。取 2 ml 之 CSPD solution 均勻加至 nylon membrane 上，於 37 °C 避光反應 15 分鐘後，於暗房內以 X 光底片進行壓片，感光 20 分鐘或適當長度後沖洗底片。

四、結果

◆ *REP3* 基因相關研究

4.1 建構 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株

將含有 *REP3* 單套基因和篩選標誌 *HIS1* 基因之質體 pWJB24 轉形至 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株 CSC80、CSC81 和 CSC101 內(參見三、方法，第 19 頁)，進行重組置換。接著萃取得菌落之染色體 DNA，進行聚合酶連鎖反應，確認 *REP3* 單套基因是否已成功置入菌株之染色體。圖二之(A)顯示，經轉形成功得到含 *REP3* 單套基因置入者，當以引子 HJL458 及 HJL505 進行聚合酶連鎖反應後，可在被成功置入含 *REP3* 單套基因的染色體上得到大約 2.6 kb 之 DNA 片段。圖二之(B)是以 1 % 洋菜膠分析聚合酶連鎖反應所得產物，結果顯示在編號 2~8 的轉形株中，均可得到符合預期之 2.6 kb 大小的 DNA 片段，和約 3.7 kb/3.4 kb 之 DNA 片段(編號 4 可見 3.7 kb 之 DNA 片段，其餘均為 3.4 kb 之 DNA 片段)。後將編號 3 號之 *REP3* 單套基因置入補救株(*rep3/rep3::REP3*)命名為 WJC52，將編號 4 號之 *REP3* 單套基因置入補救株(*rep3/rep3::REP3*)命名為 WJC53，將編號 7 號之 *REP3* 單套基因置入補救株(*rep3/rep3::REP3*)命名為 WJC63。

4.2 將 *REP3* 單套基因置入 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株後，對於抗真菌藥物之敏感性具有回復現象

由於 *REP3* 基因在啤酒酵母(*S. cerevisiae*)中過量表現時可增加 *CDR1p-lacZ* 活性大約四倍(紀錦昇，交大碩士論文，2004)，故推測 *REP3* 基因可能為排藥幫浦(drug efflux)*CDR1* 之活化子(activator)且和白色念珠菌之抗藥性有關。為了釐清 *REP3* 基因在白色念珠菌中所扮演的角色，故以同源重組置換方式(homologous recombination)破壞 *REP3* 基因，之後於抗真菌藥物試驗(Etest)中發現，和野生菌株 SC5314 相比，*rep3/rep3* 同型缺陷突變株對於三種 azoles 類藥物 fluconazole、itraconazole 及 voriconazole 具有較高之敏感性(紀錦昇，交大碩士論文，2004)。

為了證實此藥物敏感性之改變的確是由於 *REP3* 基因破壞後所造成而不是其他因素(例如因白色念珠菌轉形所造成之染色體突變)，故將 *REP3* 單套基因重新置入 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株內，後於抗真菌藥物試驗(Etest)中發現(圖三之一及三之二)，於 fluconazole 及 voriconazole 作用下，野生型 SC5314、*rep3/rep3* 同型缺陷突變株及

rep3/rep3::REP3 單套基因置入株的 MIC 值大致相同，沒有太大的差異，但觀察抑菌圈內菌落生長情形後發現：和野生型 SC5314 及 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株相比，*rep3/rep3* 同型缺陷突變株抑菌圈內菌數最少，圈內看起來較乾淨透明；而 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株圈內菌數較 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株多，抑菌圈內呈現模糊不透明狀，而野生型 SC5314 抑菌圈內菌數居冠，幾乎呈現完全不透明現象。故由此實驗結果可知，*REP3* 基因的確和白色念珠菌之抗藥性有關，且為對 azoles 類藥物之專一性影響。

4.3 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株於 agar dilution assay 中對於 miconazole 之敏感性有提高之現象

本研究先前所進行的 library screening 實驗中，在以 azoles 類藥物 miconazole 誘導下，篩選出五個能在啤酒酵母中增加 β -galactosidase 活性之基因(紀錦昇，交大碩士論文，2004)。為了瞭解 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株對於 miconazole 之敏感性是否具有差異現象，又因尚未具有 miconazole 這一類的藥物試片可供抗真菌藥物試驗(Etest)利用，故改採 agar dilution assay，並於不同濃度之 miconazole 誘導下觀察 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株之藥物敏感性。

由圖四結果可知，於 miconazole 1~3 $\mu\text{g/ml}$ 之作用濃度下，野生菌株 SC5314 可生長至第 4 點(千倍稀釋點； 10^1 cells)，但於第 4 點時已有明顯之抑制現象；*rep3/rep3* 同型缺陷突變株(CSC106)於第 2 點時(十倍稀釋點； 10^3 cells)便有明顯的抑制現象；而 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株(WJC52)約可生長至第 2、3 點間，但於第 3 點(百倍稀釋點； 10^2 cells)時已有明顯的抑制情況產生。而正對照組 *cdr1/cdr1* 同型缺陷突變株(DSY448)，在 miconazole 1~2 $\mu\text{g/ml}$ 之作用濃度下雖可長至第 2 點，但和 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株相比，其被 miconazole 抑制現象更為明顯。在 miconazole 3 $\mu\text{g/ml}$ 之作用濃度下，*cdr1/cdr1* 同型缺陷突變株(DSY448)於第一點(菌落數為 10^4 cells)已有明顯的抑制現象產生。

4.4 *REP3* 基因突變株不會影響在 37 °C 及加入胎牛血清培養中芽管的生成

為了要了解 *REP3* 基因突變後，在誘發菌絲生長之環境中(37 °C 高溫培養及加入胎牛血清)會不會影響芽管生成，故取 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株(CSC106)及 *REP3* 單套基因置入補救株(WJC52)進行芽管試驗。本實驗以野生菌株 SC5314 及雙基因突變破壞株

(*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54 作為正負對照。將菌落接種於含 10 % 胎牛血清之 Brain Heart Infusion 液態培養液中，於 37 °C 反應三小時進行芽管試驗。圖五的結果顯示在含有胎牛血清之狀況中，野生菌株 SC5314、CSC106 (*rep3::ARG4/rep3::URA3*)、WJC52 (*rep3/rep3::REP3*) 皆可發現芽管形成，而雙基因突變株 HLC54 則無芽管之形成。由此結果可知，在本實驗的條件下 *REP3* 基因並不會影響白色念珠菌之形態改變。

◆ *REP4* 基因相關研究

4.5 利用 β -galactosidase filter assay 確認活化 *CDR1* 啟動子的 open reading frame (ORF)

本研究先前在 azoles 類藥物 miconazole 的誘導下進行 library screening 實驗，篩選出五個能在啤酒酵母中增加 β -galactosidase 活性之基因 (紀錦昇, 交大碩士論文, 2004)。其中一個 library clone 為 C19。C19 具有兩個 ORFs - orf19.5019 和 orf19.5020，為了確認影響 *CDR1p-lacZ* 活性的為何者，遂利用限制酵素分別加以破壞，之後將所得的建構物(constructs)轉形至含有 348*CDR1p-lacZ* 質體之啤酒酵母內，後利用 β -galactosidase filter assay 確認影響 *CDR1* 啟動子之 open reading frame。

圖六為 β -galactosidase filter assay 的結果。圖六(A)為質體建構示意圖。編號 1 為正對照組，含 *CaNDT80*，為已知能活化 *CDR1p-lacZ* 之正向調控基因；編號 2 ~ 4 為 C19(內含 orf19.5019 和 orf19.5020)；編號 5 和 9 為負對照組，內含空的載體；編號 6 ~ 8 為 c19.5020，只含 orf19.5020 之載體；編號 10 ~ 12 為 orf19.5019，只含 orf19.5019 之載體。由圖六(B)得知，含有 orf19.5020 質體之轉形株其菌落顏色為藍色，此結果和經 C19 轉形後所得菌落類似。而 orf19.5019 質體轉形後所得菌落顏色為白色，此結果和負對照組之顏色類似。正對照組，含有 *CaNDT80* 之轉形株的藍色深度大於 orf19.5020。故，由此結果可知，orf19.5020 能夠和 *CDR1* 啟動子作用，活化 *lacZ* 基因的表現，因而造成菌落具有呈色反應；而 orf19.5019 無法和 *CDR1* 啟動子作用，故無法活化 *lacZ* 基因表現，使得菌落不具有呈色能力。綜合以上結果得知，orf19.5020 才是真正能夠和 *CDR1* 啟動子作用，活化其後報導基因 *lacZ* 表現之 ORF，故將此 ORF 命名為 *REP4*，用以代表 Regulator of Efflux Pump 4。

4.6 建構 *REP4* 基因異型缺陷突變株與同型缺陷突變株

由之前的研究得知，在啤酒酵母 2B/int5314*CDR1p-lacZ* 中，*REP4* 基因能夠提高

β -galactosidase 活性約 5.5 倍。後於啤酒酵母中發現，過量表現 *REP4* 基因時，對於抗真菌藥物 amphotericin B 和 ketoconazole 之敏感性有提高之現象(紀錦昇，交大碩士論文，2004)。上述研究都是在啤酒酵母中進行，由於 *REP4* 為白色念珠菌之基因，爲了瞭解其功能，故採用同源重組置換方式(圖七)，利用帶有 *REP4* 同源片段(5'端和 3'端各 70 個鹼基對)的特殊引子進行聚合酶連鎖反應，將此同源片段分別連接至篩選標誌 *ARG4* 和 *URA3* 兩側，之後將此建構好之聚合酶連鎖反應產物轉形至白色念珠菌 BWP17 以及 BWP17 /tetR-*HIS1* 中，得到 *REP4* 基因的異型缺陷突變株與同型缺陷突變株。

4.6.1 建構 *REP4* 基因異型缺陷突變株

利用引子 HJL495 與 HJL496 進行聚合酶連鎖反應，得到含有篩選標誌 *ARG4* 與 *REP4* 同源序列的聚合酶連鎖反應片段，將此片段轉形至白色念珠菌 BWP17 與 BWP17/tetR-*HIS1* 後分別得到 4 個與 2 個轉形株。接著萃取出轉形株之染色體 DNA，並利用引子 HJL468 及 HJL469 進行聚合酶連鎖反應，如圖八之(A)所示，如果 *ARG4* 已成功地置換掉第一個 *REP4* allele，經過聚合酶連鎖反應後可得兩片段，一爲含有篩選標誌 *ARG4* 之 3.7 kb DNA 片段，另一片段爲含有另一股 *REP4* allele 之 2.6 kb DNA 片段。由圖八之(B)可知，轉形至 BWP17 與 BWP17/tetR-*HIS1* 所得到的轉形株皆已成功地置換掉第一個 *REP4* allele，且由正對照組結果得知，所有的轉形株內尚存在著另一股 *REP4* allele。

4.6.2 建構 *REP4* 基因同型缺陷突變株

利用引子 HJL496 與 HJL497 進行聚合酶連鎖反應，得到含有篩選標誌 *URA3* 與 *REP4* 同源序列的聚合酶連鎖反應片段，將此片段轉形至白色念珠菌 BWP17 與 BWP17/tetR-*HIS1* 後分別得到 2 個與 0 個轉形株。之後再萃取出轉形株之染色體 DNA，並利用引子 HJL133、HJL241 及 HJL469 進行聚合酶連鎖反應。如圖九之(A)所示，如果 *URA3* 已成功地置換掉第二個 *REP4* allele，利用引子 HJL133 及 HJL469 進行聚合酶連鎖反應，可得一大約 2.2 kb 之 DNA 片段。另外，同時以引子 HJL241 及 HJL469 進行聚合酶連鎖反應，再次確認已置換成功的 *ARG4* 篩選標誌，可得一大約 1.5 kb 之 DNA 片段。由圖九之(B)可知，轉形至 BWP17 後所得到的 2 個轉形株皆已成功地置換掉第二個 *REP4* allele，且第一個 *REP4* allele 確實已成功地被置換成篩選標誌 *ARG4*。後將兩個 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株分別命名爲 WJC24 與 WJC31。

4.7 建構四環黴素調控表現系統(Tetracycline-regulatable expression system, TR system ; Nakayama et al., 2000)過度表現 *REP4* 基因

欲研究一特定基因之功能，除了直接將其破壞，觀察缺少此基因時有無表型之改變；也可予以過度表現，查看基因表現量是否會影響特定表型之變化。四環黴素調控表現系統主要是利用一可被doxycycline調控之TR啟動子達成基因調控之目的。此系統有兩個重要的元素：一為TR啟動子，內含*tet O*序列；另一則為TR transactivator(*tet R*)，此為doxycycline結合之主要部份。在沒有doxycycline之環境下，TR transactivator (*Tet R*)會與TR啟動子中的*tet O* 結合，促使欲研究基因大量表現；但是當生長環境中含有doxycycline時，doxycycline會和*Tet R*結合，抑制*Tet R*與 *tet O*結合，而使基因不表現，此系統即是利用此原理達成基因調控。

四環黴素調控表現系統建構法如圖十所示。將一含有目標基因同源序列與TR啟動子和篩選標誌*URA3*之DNA片段，轉形至含有目標基因異型缺陷突變株之白色念珠菌內，利用TR啟動子替換目標基因啟動子，達成調控目標基因之目的。利用上述方式，將含有TR啟動子之DNA片段轉形至WJC22和WJC23(BWP17/*tetR-HIS1/REP4/rep4::ARG4*)後，各得到11個與6個轉形株，隨後分別萃取數個轉形株之染色體DNA，並利用聚合酶連鎖反應確認是否已成功地置入TR啟動子。如圖十一之(A)所示，如果已成功地將TR啟動子置入*REP4/rep4*異型缺陷突變株內，利用引子HJL199及HJL506進行聚合酶連鎖反應後，可得到約2.1 kb的聚合酶連鎖反應產物。圖十一之(B)顯示，由WJC22及WJC23所得到的轉形株萃取出之染色體DNA，經過聚合酶連鎖反應後，皆可得到和預期大小相符合的2.1 kb DNA片段。

4.8 建構*rep4/rep4::REP4*單套基因置入補救株

由於*rep4/rep4*同型缺陷突變株 WJC24 與 WJC31 在藥物敏感性試驗(Etest)中的表型有些許改變(圖十四)，在 fluconazole 作用下，雖然 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC24 及 WJC31 和野生菌株 SC5314 相比 MIC 值不變，但是和野生型 SC5314 相比，WJC24 抑菌圈內菌數較多，看起來較模糊；而 WJC31 抑菌圈內菌數較少，顯得較乾淨。而在 itraconazole 作用下，野生型 SC5314 的 MIC 值約為 0.032 $\mu\text{g/ml}$ ，而 WJC24 的 MIC 值約為 0.125 $\mu\text{g/ml}$ ，WJC31 的 MIC 值約為 0.023 $\mu\text{g/ml}$ 。為了確定此現象之真實性，故將 *REP4* 單套基因重新置入 WJC24 與 WJC31 中(示意圖參見圖十二)，查看表型之變化能否回復。方法為將含有 *REP4* 單套基因和篩選標誌 *HIS1* 基因之質體 pWJB43 轉形至

rep4/rep4 同型缺陷突變株 WJC24 與 WJC31 內，利用同源重組置換產生單套基因置入補救株。萃取所得菌落之染色體 DNA，進行聚合酶連鎖反應，確認 *REP4* 單套基因是否已成功地置入。圖十三之(A)顯示，若經轉形成功得到含 *REP4* 單套基因置入，以引子 HJL516 及 HJL507 進行聚合酶連鎖反應後，可在被成功置入含 *REP4* 單套基因的染色體上得到大約 2 kb 之 DNA 片段。圖十三之(B)是以 1 % 洋菜膠分析聚合酶連鎖反應所得產物。結果顯示，不論 WJC24 或 WJC31 所得到的轉形株，均可得到約 2 kb 大小的 DNA 片段。後將由 WJC24 所得到的 6 株 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入株命名為 WJC67 至 WJC72，將從 WJC31 所得到的 6 株 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入株命名為 WJC73 至 WJC78。

4.9 南方墨點法(southern blot analysis)確認正確的*rep4/rep4*同型缺陷突變株

由於得到的兩個*rep4/rep4*同型缺陷突變株於藥物敏感性試驗(Etest)中得到的結果不一致(圖十四)。爲了要確定是否已在染色體正確的位置破壞*REP4*基因，且於同源重組置換*REP4*基因時有無其他基因遭受破壞，故採用南方墨點法並設計不同的探針驗證同型缺陷突變株的正確性。

此次實驗分爲兩部分，第一部分主要確認是否已於正確位置破壞*REP4*基因。探針設計如圖十五之(A)所示，取出已用限制酵素*Xho* I 處理之染色體DNA，和大小約740 bp 的探針進行雜合作用，如果探針和包含*REP4*基因之片段雜合後，可得到一大約5.5 kb 之訊號；如果探針和包含置換成功*ARG4*基因之片段雜合後，可得一大約6.6 kb之訊號；如果探針和包含置換成功*URA3*基因之片段雜合後，可得一大約2.4 kb之訊號。由圖十五之(B)結果可知，編號1爲以聚合酶連鎖反應合成之探針片段，故已用DIG- label 之探針會與其雜合，此爲正對照組。編號2與3分別爲野生型SC5314與BWP17，其內之*REP4* 基因未受破壞，由結果看出只有5.5 kb大小之訊號。編號4與5爲兩個*REP4/rep4::ARG4* 異型缺陷突變株WJC18及WJC21，經由探針雜合後得到兩個DNA片段，分別爲6.6 kb與5.5 kb。編號6與7爲兩個*rep4::ARG4/rep4::URA3*同型缺陷突變株WJC24與WJC31，經由探針雜合後得到兩個DNA片段，分別爲6.6 kb與2.4 kb。編號8與9爲將篩選標誌*HIS1*基因分別轉形至編號6與7後所得到的轉形株WJC32與WJC41，如同編號6與7之結果，同樣得到6.6 kb與2.4 kb之DNA片段。將篩選標誌*HIS1*基因分別轉形至編號6與7(示意圖見圖二十六)之目的在於補齊菌株內之營養缺陷(BWP17有3個營養缺陷分別爲*ARG4*⁻、*URA3*⁻與*HIS1*⁻，建構同型缺陷突變株時已補進了*ARG4*⁻與*URA3*⁻，故只剩下*HIS1*⁻缺陷)，使

所得菌株不具營養缺陷，便於之後性狀分析(characterization)之判讀與討論。

第二部份主要在於確認進行*REP4*基因破壞時，有無其他基因同時遭受破壞。此次於篩選標誌*ARG4*與*URA3*上分別設計探針，圖示於圖十六之(A)。取出已用限制酵素*Xho* I 處理之染色體DNA，分別和探針1(probe1)與探針2(probe2)進行雜合作用，如果探針1和包含置換成功*ARG4*基因之片段雜合後，可得一大約6.6 kb之訊號；如果探針2和包含置換成功*URA3*基因之片段雜合後，可得一大約2.4 kb之訊號。由圖十六之(B)結果可知，編號1至6皆可看到6.6 kb之訊號(圖右側下方箭頭所指處)，而編號1至7於6.6 kb片段上可見另一訊號形成(圖右側上方箭頭所指處)。圖十五之(C)結果得知，編號1至4皆可看到2.4 kb之訊號，而編號5至7偵測不到任何訊號，因此推論並無其他基因同時遭受破壞。

4.10 性狀分析(Phenotypic characterization)

4.10.1 *rep4/rep4*同型缺陷突變株與*REP4*基因過度表現株藥物敏感性試驗(Etest)結果

藥物敏感性試驗(Etest)為將特定菌株均勻塗布至特定培養基上(此實驗採用SD培養基)，後放上5個不同的藥物試片，本實驗採用4種 azoles 類藥物- fluconazole、ketoconazole、itraconazole和voriconazole與polyene類藥物amphotericin B，主要目的在於測試特定菌株對於不同藥物之敏感性。

如圖十七之結果可知，對於受試藥物amphotericin B而言，所有菌株(包含野生型SC5314)的MIC值皆為0.38 µg/ml。而所有菌株(包含野生型SC5314)對於ketoconazole的敏感性極低，沒有明顯的抑制現象。在抗真菌藥物fluconazole與voriconazole作用下，雖然*rep4/rep4*同型缺陷突變株WJC32與WJC41與*REP4*單套基因置入補救株WJC67與WJC73和野生型SC5314相比，其MIC值沒有改變(fluconazole MIC值約為0.75 ~ 1.0 µg/ml；voriconazole MIC值約為0.016 µg/ml)，但WJC32抑菌圈內菌數較野生型SC5314多而WJC41抑菌圈內菌數較野生型SC5314少；而WJC67抑菌圈內菌數看起來較WJC32少，WJC73抑菌圈內菌數較WJC41多。WJC44與WJC48在fluconazole的作用下，MIC值約為1.5 µg/ml；而在voriconazole的作用下MIC值約為0.023 µg/ml；在itraconazole作用下，野生型SC5314、WJC41、WJC67與WJC73的MIC值約為0.032 µg/ml；WJC32的MIC值約為0.125 µg/ml；在沒有doxycycline作用下，也就是*REP4*基因大量表現時，WJC44與WJC48的MIC值約為0.064 µg/ml。

4.10.2 *rep4/rep4*同型缺陷突變株與*REP4*基因過度表現株agar dilution assay之結果

本研究先前進行的 library screening 實驗，是於 azoles 類藥物 miconazole 的誘導下，篩選出五個能在啤酒酵母中增加 β -galactosidase 活性之基因(紀錦昇，交大碩士論文，2004)。爲了了解 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株與 *REP4* 基因過度表現株對於 miconazole 之敏感性是否具有差異現象，又因尚未具有 miconazole 這一類的藥物試片可供抗真菌藥物試驗(Etest)利用，故改採 agar dilution assay，並於不同濃度之 miconazole 作用下觀察菌株的藥物敏感性現象。

由圖十八之結果得知，在 miconazole 濃度爲 1 μ g/ml 到 5 μ g/ml 之狀況下，和野生菌株 SC5314 相比(編號2)，*rep4/rep4*(WJC32，編號3)、*rep4/rep4::REP4*(WJC67，編號4)、*rep4/rep4*(WJC41，編號5)以及 *rep4/rep4::REP4*(WJC73，編號6)的菌株對於 miconazole 的敏感性大致相同，都具有稍微提高之現象(菌落生長的較弱)，只是此現象並沒有很明顯；而在含有 4 % 胎牛血清之培養基中，此現象便消失了。在 miconazole 濃度爲 1 μ g/ml 到 5 μ g/ml 之狀況下，編號7的 *REP4* 基因過度表現株 WJC44 對於 miconazole 的敏感性比標號2的野生型 SC5314 高，且此種對 miconazole 敏感性提高之現象也較編號3~6的菌株明顯。而在含有 4 % 胎牛血清之培養基中仍可觀察到如同未加胎牛血清般相同的趨勢。

4.10.3 *REP4* 基因破壞與過度表現時皆不會影響芽管生成

爲了要了解 *REP4* 基因破壞以及過度表現後，在誘發菌絲生長之環境中(37 °C 高溫培養及加入胎牛血清)是否會影響芽管生成，故取 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC32、WJC41 與 *REP4* 單套基因置入補救株 WJC67 與 WJC73；*REP4* 基因過度表現株 WJC44 進行芽管試驗。本實驗以野生菌株 SC5314 及雙基因突變破壞株(*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54 作爲正負對照。將菌落接種於含 10 % 胎牛血清之 Brain Heart Infusion 液態培養液中，於 37 °C 反應三小時，進行芽管試驗。圖十九的結果顯示，在含有胎牛血清之狀況下，野生菌株 SC5314、WJC32、WJC41、*REP4* 單套基因置入株 WJC67 與 WJC73、*REP4* 基因過度表現株 WJC44 皆可發現芽管形成，而雙基因突變株 HLC54 則無芽管之形成。由此結果可知在本實驗的條件下，*REP4* 基因並不會影響白色念珠菌之形態改變。

◆ *REP5* 基因相關研究

4.11 建構 *REP5* 基因異型缺陷突變株

由之前的研究得知，在啤酒酵母 2B/int5314*CDR1p-lacZ* 中，*REP5* 基因能夠提高 β -galactosidase 活性約 7 倍。之後發現於啤酒酵母中過量表現 *REP5* 基因時，對於抗真

菌藥物 flucytosine 之敏感性有提高之現象(紀錦昇，交大碩士論文，2004)。上述研究都是在啤酒酵母中進行，由於 *REP5* 基因為白色念珠菌之基因，為了瞭解其功能，採用同源重組置換方式(圖七)，利用帶有 *REP5* 基因同源片段(5'端和 3'端各 70 個鹼基對)的特殊引子進行聚合酶連鎖反應，將此同源片段分別連接至篩選標誌 *ARG4* 和 *URA3* 兩側，之後將此建構好之聚合酶連鎖反應產物轉形至白色念珠菌 BWP17 及 BWP17/*tetR-HIS1* 中，得到 *REP5* 基因的異形缺陷突變株與同型缺陷突變株。

利用引子 HJL479 與 HJL480 進行聚合酶連鎖反應，得到含有篩選標誌 *ARG4* 與 *REP5* 基因同源序列的聚合酶連鎖反應片段，將此片段轉形至白色念珠菌 BWP17 與 BWP17/*tetR-HIS1* 後分別得到 9 個與 4 個轉形株。萃取出轉形株之染色體 DNA，利用引子 HJL459 及 HJL460 進行聚合酶連鎖反應，如圖二十之(A)所示，如果 *ARG4* 已成功地置換掉第一個 *REP5* allele，經過聚合酶連鎖反應後可得兩片段，一為含有篩選標誌 *ARG4* 之 3.6 kb DNA 片段，另一片段為含有另一股 *REP5* allele 之 3.9 kb DNA 片段。由圖二十之(B)可知，轉形至 BWP17 與 BWP17/*tetR-HIS1* 所得到的轉形株各有 5 個與 2 個已成功地置換掉第一個 *REP5* allele，且由正對照組結果得知，所有的轉形株內尚存在著另一股 *REP5* allele。



4.12 利用四環黴素調控表現系統調控 *REP5* 基因表現

由於以同源重組置換方式無法順利得到 *rep5/rep5* 同型缺陷突變株，為了研究 *REP5* 基因之功能，故改採四環黴素調控表現系統，利用 doxycycline 調控 *REP5* 基因的表現模式。將含有 TR 啟動子之 DNA 片段轉形至 WJC5 和 WJC8(皆為 BWP17/*tetR-HIS1/REP5/rep5::ARG4*)後，各得 10 個及 8 個轉形株，隨後分別萃取出數個轉形株之染色體 DNA，並利用聚合酶連鎖反應確認是否已成功地置入 TR 啟動子。如圖二十一之(A)所示，如果已成功地將 TR 啟動子置入 *REP5/rep5* 異型缺陷突變株內，利用引子 HJL199 及 HJL574 進行聚合酶連鎖反應後，可得到約 1.1 kb 的聚合酶連鎖反應產物。圖二十一之(B)顯示，由 WJC5 及 WJC8 所得到的轉形株萃取出之染色體 DNA，經過聚合酶連鎖反應，皆可得到和預期大小相符合的 1.1 kb DNA 片段。後將由 WJC5 所得到的轉形株命名為 WJC58 至 WJC62，由 WJC8 所得到的轉形株命名為 WJC63 至 WJC66。

4.13 性狀分析(Phenotypic characterization)

4.13.1 *REP5*基因過度表現不會影響藥物敏感性試驗(Etest)結果

在不加入doxycycline的狀況下，由TR啟動子所驅動的基因具有過度表現之現象。本實驗取WJC58與WJC63(*rep5::ARG4/TR::REP5*)，在不加doxycycline之條件下進行藥物敏感性試驗，目的在於觀察*REP5*基因過度表現時，對於抗真菌藥物敏感性有無變化。由圖二十二結果得知，WJC58與WJC63對於5種測試藥片的MIC值皆和野生型SC5314相同，沒有變異現象發生。

4.13.2 *REP5*基因過度表現不會影響agar dilution assay結果

本實驗以不同濃度之 miconazole 誘導 *REP5* 基因過度表現株，目的在於探討 *REP5* 基因過度表現株對於 library screening 所用藥物 miconazole 之藥物敏感性，並以 *cdr1/cdr1* 同型缺陷突變株(DSY448)做為正對照組。

由圖二十三之結果得知，在沒有加入胎牛血清之狀況下，隨著miconazole濃度由1 $\mu\text{g/ml}$ 逐漸升高至5 $\mu\text{g/ml}$ ，正對照組*cdr1/cdr1*(DSY448)同型缺陷突變株的敏感性也隨之提高，此現象可由菌落點數逐漸變少窺知。而在胎牛血清作用下，仍可得到相同的結果。而不論有無胎牛血清存在，實驗組*REP5*基因過度表現株WJC58和WJC63的菌落點數大致都和野生型SC5314相同；但在加血清，miconazole濃度為5 $\mu\text{g/ml}$ 之實驗條件中，野生型SC5314可生長至第四點(千倍稀釋點，菌落數為 10^1 cells)，但*REP5*基因過度表現株只可生長至第三點(百倍稀釋點，菌落數為 10^2 cells)。

4.13.3 *REP5*基因不會影響芽管生成

為了得知 *REP5* 基因是否與白色念珠菌型態轉換有關，故於誘發菌絲生長之環境中(37 °C 高溫培養及加入胎牛血清)觀察其芽管生成狀況。本實驗以構築好已含 TR 啟動子之 *REP5* 菌株 WJC58 及 WJC63 進行芽管試驗，並選用野生菌株 SC5314 及雙基因突變破壞株(*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54 作為正負對照。將菌落接種於含 10 %胎牛血清之 Brain Heart Infusion 液態培養液中，並以 doxycycline(20 $\mu\text{g/ml}$) 抑制 *REP5* 基因在 Tet R 調控株 WJC58 和 WJC63 的表現模式，於 37 °C 反應三小時後觀察芽管形成現象。圖二十四的結果顯示，不論有無 doxycycline 作用，野生菌株 SC5314、WJC58 與 WJC63(Tet R 調控株)皆可發現芽管形成，而雙基因突變株 HLC54 則無芽管之形成。由此結果可知，在本實驗的條件下，*REP5* 基因並不會影響白色念珠菌之形態變化。

五、討論

5.1 *REP3* 基因會影響白色念珠菌對於抗真菌藥物 azoles 類的藥物敏感性，但不影響其形態之轉變

*REP3*基因位於白色念珠菌的contig19-10194中，ORF號碼為19.3928。*Rep3p*具有380個胺基酸，大小約41.8 kDa的蛋白質。*Rep3p*含有六個C2H2形式的鋅指狀區域(zinc finger domain)，和人類的鋅指狀蛋白2 (zinc finger protein2, human *ZNF2*)具有微弱之相似性，*Znf2p*的功能為轉錄抑制者(transcription repressor)。在許多高等和低等真核生物中，C2H2鋅指狀蛋白組成了含量豐富的核酸結合蛋白(nucleic acid-binding proteins)。C2H2鋅指狀結構於生物體扮演的功能非常廣泛，可從和DNA或RNA結合到牽涉蛋白質與蛋白質間的交互作用。已知C2H2鋅指狀區域為轉錄因子(transcriptional factor)之特性，利用2個具有保留性的胺基酸cysteine和histidine與鋅離子(zinc ion)作用，達成基因調控之目的。在已知的相關白色念珠菌基因中，*CaNrg1p*，為含有2個C2H2型式之鋅指狀蛋白，已知會和含有 *Nrg1* response element(NRE) 序列(A/C)(A/C/G)₃T之啟動子的基因結合(如 *CaHWP1*)。於白色念珠菌中，*CaNrg1p*主要功能為轉錄抑制者，抑制yeast-hypha型態(morphogenesis)轉換和hypha專一性(hypha-specific)基因的表現(Murad et al., 2001)。另一個基因則為*Tac1p*，為含有Zn(2)-Cys(6) motif 的轉錄因子，實驗證明*TAC1*基因會影響白色念珠菌的藥物感受性且為*CDR1*的異位調控因子(Coste et al., 2004)。

5.2 *REP3* 基因對於抗真菌藥物 azoles 類的藥物敏感性結果

以同源重組置換方式將白色念珠菌 *REP3* 基因破壞後，於藥物敏感性試驗(Etest)中發現，和野生型 SC5314(*REP3/REP3*)相比，*rep3/rep3* 同型缺陷突變株(CSC106、109、111)對於 azoles 類藥物 - fluconazole、itraconazole 和 voriconazole 的敏感性具有提高現象(雖然 MIC 值沒有明顯的改變，但是抑菌圈內菌落較少，顯得較透明乾淨)(紀錦昇，交大碩士論文，2004)；而將 *REP3* 單套基因重新置入 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株後發現，*rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株(WJC52、53、56)，對於 fluconazole 和 voriconazole 的敏感性有回復現象(本論文圖三之一與三之二)(和 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株相比，MIC 值不變，但抑菌圈內菌數較多，呈現模糊不透明狀)，但仍不及野生型 SC5314。而在 itraconazole 的作用下，無法清楚於 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株中觀察到敏感

性回復。又，以 library screening 時所選用的篩選藥物 miconazole 進行 agar dilution assay 時發現(圖四)，*rep3/rep3* 同型缺陷突變株(CSC106)在菌落數為 10^3 cells 時，已有明顯的被抑制現象；而 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株(WJC52)在菌落數為 10^3 cells 時，尚未出現明顯的抑制現象，但在菌落數為 10^2 cells 時，便可觀察到抑制現象。反觀野生型 SC5314，直到菌落數為 10^1 cells 時才有抑制現象的產生(圖四)。

綜合上述結果發現，*rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株對於 fluconazole、voriconazole 以及 miconazole 的敏感性回復現象介於野生型 SC5314 和 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株間，推論可能的原因有：(1) dosage effect 現象(Kohler & Fink, 1996)， $REP3/REP3 > rep3/rep3::REP3 > rep3/rep3$ ，隨著野生型 *REP3* copy 數增加，藥物敏感性回復現象也隨之明顯。(2) 由於 *REP3* 單套基因置入補救實驗(見圖一)是將一含有篩選標誌 *HIS1* 基因與 *REP3* 基因的質體放回 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株內，雖然基因放回正確的位置(與上下游基因的相對位置不變)，但是多插入了一段外來質體 DNA 序列，此多餘序列可能造成 *REP3* 基因表現受到妨礙，故無法具有和野生型 SC5314(*REP3/REP3*)一致的藥物敏感性結果。(3) Heterozygosity Effect: 白色念珠菌中的兩個 *REP3* allele 可能具有不同的表現程度。因此，如果我們以表現程度較弱的 *REP3* allele 補救表現程度較強的 *REP3* allele 時，所得到的 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株中的 *REP3* 基因表現量自然會有減弱趨勢發生。

Azoles 類藥物主要和 ergosterol 生合成途徑中的 C14 α -demethylase 作用，導致 14 α -methylsterols(例如 lanosterol 和 14 α -methyl-3-6-diol)大量累積，干擾細胞膜主要成分 ergosterol 合成與其功能，藉此達成抑制白色念珠菌之目的(Kelly et al., 1997)。已知 Cdr1p 與 fluconazole、ketoconazole、itraconazole 和 miconazole 之輸出有關(Nakamura et al., 2001)，又 *cdr1/cdr1* 同型缺陷突變株(DSY448)對於 fluconazole、ketoconazole 和 itraconazole 具有較高之敏感性(hypersensitivity)(Sanglard et al., 1996)。此外，*REP3* 基因在啤酒酵母中過量表現時，可增加 *CDR1p-lacZ* 活性大約四倍(紀錦昇，交大碩士論文，2004)。綜合以上結果推論，*rep3/rep3* 同型缺陷突變株，可能是藉由降低排藥幫浦 *CDR1* 之表現量，而提高白色念珠菌對於 azoles 類藥物之敏感性。

5.3 *REP3* 基因不會影響白色念珠菌之型態變化

本實驗室於 2005 年文獻：Efg1 Involved in Drug Resistance by Regulating the Expression of *ERG3* in *Candida albicans* (Lo et al., 2005) 公佈發現致病性(virulence)和抗藥

性(drug resistance)途徑彼此相連的論點。在此研究中明白指出和致病性相關的 *EFG1* 基因可藉由負向調控白色念珠菌 ergosterol 生合成途徑 *ERG3* 基因，同時參與藥物抵抗性之途徑。由於此概念之影響(致病性和抗藥性途徑是可以連結的)，使得我們在研究 *REP3* 基因和抗藥性之間的關係時，也想同時觀察 *REP3* 基因是否會影響白色念珠菌型態之改變。由圖五的結果可知，野生型 SC5314(*REP3/REP3*)和 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株 (CSC106)在 37 °C，10 %胎牛血清誘導下皆有芽管形成，故可推論 *REP3* 基因和白色念珠菌的型態改變沒有直接關係。綜合所有結論可知：***REP3* 基因會影響白色念珠菌對於 azoles 類抗真菌藥物的敏感性，但在此實驗條件下，不影響其形態之轉變。**

5.4 *REP4* 基因功能探討

REP4 基因位於白色念珠菌的 contig19-10216，ORF 號碼為 19.5020。Rep4p 可產生具有 340 個胺基酸，大小約 37.4 kDa 的蛋白質。於已知的資料庫(database)中無法找出和 *REP4* 基因具有明顯相似性的相似者(homologues)。此蛋白質具有 2 個 AT-hook motif，而 AT-hook motif 會利用 9 個具保留性的胺基酸與 DNA 的 minor groove 結合(Reeves & Nissen, 1990; Aravind & Landsman, 1998)。在許多含有此 motif 的蛋白質當中發現，他們藉由扮演附屬因子(accessory factors)的角色，而影響轉錄因子和 chromatin 的結合，進而達到調控轉錄過程的目的(Thanos & Maniatis, 1992; Strick & Laemmli, 1995)。已有實驗證實，含有 AT-hook motif 的蛋白質 HMG-I(Y)，對於穩定 chromatin 結構扮演非常重要的角色，且其作用為轉錄因子之共同輔因子(transcription factor cofactors)(Onate et al., 1994; Falvo et al., 1995; Girard et al., 1998)。而同樣具有 2 個 AT-hook motif 的 *REP4* 基因，於白色念珠菌中所扮演的角色為何，我們仍不清楚。

5.5 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株的藥物敏感性結果

以所得到的 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株(WJC24與WJC31)進行藥物敏感性試驗(Etest)後發現(圖十四)，在 fluconazole 和 itraconazole 的作用下，和野生型 SC5314(*REP4/REP4*)相比，雖然 MIC 值沒有明顯的改變，但是 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC24 抑菌圈內菌數較多，也因而顯得較模糊不透明；而和野生型 SC5314(*REP4/REP4*)相比，*rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC31 抑菌圈內菌數較少，顯得較乾淨透明。後於 amphotericin B 作用下發現，雖然 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC24 與 WJC31 與野生型 SC5314 的 MIC 值相同(0.38 µg/ml)，但是在 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC24 與 WJC31 的抑菌圈外發現多了一圈型態

較小的菌落產生，而此為野生型SC5314所沒有的。先前實驗室發現，造成此現象的原因可能是由於菌株缺少了*HIS1*基因(WJC24與WJC31均有*HIS1*缺陷)，故將*HIS1*基因重新轉形至*rep4/rep4*同型缺陷突變株WJC24與WJC31內，後將得到的*HIS⁺ rep4/rep4*同型缺陷突變株分別命名為WJC32(由WJC24而來)與WJC41(由WJC31而來)。

以WJC32與WJC41再次進行藥物敏感性試驗(Etest)後發現(圖十四)，先前得到的amphotericin B敏感性差異具有回復現象，野生型SC5314、WJC32與WJC41的MIC值仍為0.38 µg/ml，但在WJC32與WJC41的抑菌圈外並無一圈型態較小的菌落產生。由於*HIS⁺*轉形株對於其他藥物的敏感性並沒有明顯差異，故可推論*HIS1*基因可能與amphotericin B的敏感性有關，缺少此基因時會影響amphotericin B的判讀，故進行特定基因的藥物敏感性試驗(Etest)前，必須先確定試驗菌株是否有*HIS1*缺陷，才不會誤判結果。

由於*rep4/rep4*同型缺陷突變株WJC24與WJC31於藥物敏感性(Etest)試驗中的結果不一致，為了確定哪一株為正確的*rep4/rep4*同型缺陷突變株，遂進行了南方墨點法實驗。又，想確認此敏感性的改變的確是由於*REP4*基因所造成，而不是其他因素，故以*REP4*單套基因補救實驗來驗證結果。

5.6 南方墨點法確認正確的*rep4/rep4*同型缺陷突變株

由於得到的兩株*rep4/rep4*同型缺陷突變株WJC24與WJC31於藥物敏感性試驗(Etest)結果不一致(圖十四)，為了確認何者為正確的*rep4/rep4*同型缺陷突變株，遂以南方墨點法並利用兩組不同的探針驗證結果。圖十五之結果可知，以設計於*REP4*基因ORF外的探針進行雜合反應後，皆可得到預期的片段產生：SC5314、BWP17(含有*REP4/REP4*)，得到5.5 kb的片段；*REP4/rep4::ARG4*異型缺陷突變株WJC18與WJC21，得到兩個片段分別為5.5 kb與6.6 kb；*rep4::ARG4/rep4::URA3*同型缺陷突變株WJC24與WJC31，和將*HIS1*基因補回同型缺陷突變株後所得到的*HIS⁺*同型缺陷突變株WJC32與WJC41，皆得到符合預期之2.4 kb與6.6 kb片段。但在6.6 kb片段以上有其他的訊號產生，推測可能是以限制酵素*XhoI*切割實驗所需之染色體DNA時(圖十五編號2~9)，沒有完全切割乾淨(incomplete digestion)所造成的背景值。從此次實驗結果得知，已於正確位置的染色體DNA上置換*REP4*基因。

為了想確認進行*REP4*基因同源重組置換時，有無其他基因遭到破壞(即進行同源重組置換所用的DNA片段是否插入到染色體DNA的其他位置)，故將探針分別設計於篩選標誌*ARG4*(probe1)與*URA3*(probe2)上，希望藉此釐清問題所在。由圖十六之(B)結果可

知，以探針1(probe1)進行南方墨點法後，於菌株BWP17、*REP4/rep4::ARG4*異型缺陷突變株WJC18與WJC21、*rep4::ARG4/rep4::URA3*同型缺陷突變株WJC24與WJC31，和將*HIS1*基因補回同型缺陷突變株所得到的*HIS*⁺同型缺陷突變株WJC32與WJC41，皆可得到預期的6.6 kb片段。但是在圖右側上方箭頭所指處，多了一個非預期的訊號產生，推測可能是於染色體DNA中，存在著與探針1序列相似的DNA片段，造成此背景值出現。圖十六之(C)，以探針2(probe2)進行南方墨點法所得到的結果顯示，只有*rep4::ARG4/rep4::URA3*同型缺陷突變株WJC24與WJC31，和將*HIS1*基因補回同型缺陷突變株所得到的*HIS*⁺同型缺陷突變株WJC32與WJC41有預期的2.4 kb訊號產生，而BWP17與*REP4/rep4::ARG4*異型缺陷突變株WJC18與WJC21因為不含*URA3*基因，所以無訊號產生，此和預期結果相符合。綜合上述結果可知：所得到的兩株*rep4/rep4*同型缺陷突變株WJC24與WJC31皆已於正確位置的染色體DNA上置換*REP4*基因，且於同源重組置換實驗進行時，沒有其他基因遭到破壞。推測藥物敏感性試驗(Etest)結果不一致的可能原因為：至少其中之一在進行白色念珠菌轉形實驗時，造成染色體DNA的突變。

5.7 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株之藥物敏感性結果

WJC67 與 WJC73 為將 *REP4* 單套基因重新置入 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC24 與 WJC31 後，所得到的 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株。於圖十七的藥物敏感性試驗(Etest)發現，和 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC32 相比，*rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株 WJC67 對於 itraconazole 的藥物敏感性有回復現象(MIC 值由 0.125 µg/ml 回復至 0.032 µg/ml)，但對於 fluconazole 和 voriconazole 的回復現象較不明顯；而和 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC41 相比，*rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株 WJC73 對於 fluconazole 和 voriconazole 的藥物敏感性同樣具有回復現象(MIC 值不變，但抑菌圈內菌數變多，使得圈內較模糊不透明)。而於 agar dilution assay 中發現(圖十八)，在 miconazole 作用下，與野生型 SC5314(*REP4/REP4*)相比，不論 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC32 與 WJC41，或 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株 WJC67 與 WJC73 對於 miconazole 的敏感性皆有稍微提高之現象，但不是很明顯，且這些菌株趨勢大致相同，無法看出補救回復現象。推測無法看出補救回復的可能原因為 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株(不論 WJC32 或 WJC41)於藥物敏感性試驗(Etest)中和野生型 SC5314(*REP4/REP4*)之間的差異性本來就不大，又因 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入株 WJC67 與 WJC73 可能因前述所說的原因(1)dosage effect 現象(Kohler et al., 1996)，*REP4/REP4* > *rep4/rep4::REP4* > *rep4/rep4*。

(2)受所插入的多餘外來質體 DNA 序列影響，造成 *REP4* 基因表現受到妨礙。(3) Heterozygosity Effect:白色念珠菌中的兩個 *REP4* allele 可能具有不同的表現程度。因此，如果我們以表現程度較弱的 *REP4* allele 補救表現程度較強的 *REP4* allele 時，所得到的 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株中的 *REP4* 表現量自然會有減弱趨勢發生，使得補救回復現象難以察覺。

5.8 *rep4/TR::REP4* 基因過度表現株之藥物敏感性結果

於圖十七發現，*rep4/TR::REP4* 基因過度表現株 WJC44 與 WJC48 對於 azoles 類藥物中之 triazole – fluconazole、voriconazole、itraconazole 的藥物敏感性降低，變的比較具有抵抗性(resistance)。和野生型 SC5314(*REP4/REP4*)相比，fluconazole 的 MIC 值由 0.75 ~1.0 µg/ml 提高至 1.5 µg/ml；而 voriconazole 的 MIC 值由 0.016 µg/ml 提高至 0.023 µg/ml；而 itraconazole 的 MIC 值由 0.032 µg/ml 提高至 0.064 µg/ml。從 agar dilution assay 中發現(圖十八)，*rep4/TR::REP4* 基因過度表現株 WJC44 與 WJC48 對於 azoles 類藥物中之 imidazole- miconazole 的敏感性提高，變的比較敏感(sensitive)，是否因為 azoles 類藥物之 subtype 不同(triazole 或 imidazole)而造成不同的藥物敏感性現象，有待更進一步釐清。由 *rep4/TR::REP4* 基因過度表現株 WJC44 與 WJC48 對 imidazole- miconazole 的敏感性提高，變的比較敏感(sensitive)可見 *REP4* 基因的功能的確與抗藥性有關。

破壞 *REP4* 基因時對於藥物敏感性沒有明顯的變異現象發生，但是過量表現 *REP4* 基因時會影響白色念珠菌的藥物敏感性，猜測可能的原因有：(1)過量表現的 Rep4p 除了會與 *CDR1* 作用外，可能還會和其他與藥物敏感性相關的基因作用，因而造成白色念珠菌的抗藥性發生改變。(2)Rep4p 本身可能不是直接造成藥物敏感性改變的主要原因，而是當 Rep4p 與 *CDR1* 結合後，吸引了其他蛋白質靠近 *CDR1*，彼此間形成了一個蛋白質複合物(protein complex)，進而影響了白色念珠菌的藥物敏感性變化。

5.9 *REP4* 基因不會影響白色念珠菌之型態轉換

於圖十九之結果指出，在誘導菌絲形成之狀況下(37 °C 高溫培養及加入 10 %胎牛血清)，不論是 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC31 與 WJC42 或是 *rep4/TR::REP4* 基因過度表現株 WJC44 與 WJC48，皆不會影響芽管形成，也就是不會影響白色念珠菌之型態轉變。故在此實驗條件下，*REP4* 基因和白色念珠菌之型態變化無關。

5.10 *REP5*基因不會影響白色念珠菌之型態轉換，且*REP5*基因過度表現株不會影響白色念珠菌之藥物敏感性。

*REP5*基因位於白色念珠菌contig19-10215中，ORF號碼為19.4884。Rep5p具有785個胺基酸，大小約86.35 kDa。經過序列比對分析後發現，*REP5*基因和啤酒酵母的ORF *YEL007w*具有相似性。*YEL007w*為具有666個胺基酸的蛋白質，於啤酒酵母中的功能未知。Rep5p的6 ~ 792個胺基酸與*YEL007w*的3 ~ 660個胺基酸之間的相同性(identity)達27%，相似性(similarity)達40% (Evalue= $5e^{-27}$) (圖二十五)。又*REP5*基因和*YEL007w*皆與 *Schizosaccharomyces pombe* 中與gluconate transport induction有關的Gti1p具有微弱之相似性(但N端前80幾個胺基酸相同性高達40%以上，且此範圍內包含了一個可能的Pka1 phosphorylation site KRWTDG)(圖二十五)(Caspari, 1997)。先前研究發現，白色念珠菌的a和 α 細胞必須先經過表型轉換(phenotypic switch)，從white階段轉變成opaque階段才有交配(mating)能力(Miller & Johnson, 2002)。研究發現，在白色念珠菌中，*REP5*(*YEL007w*)基因會在a和 α 細胞內表現，但不會在a/ α 細胞表現，故*REP5*(*YEL007w*)基因的表現會受a1/ α 2調控(被抑制)(Tsong et al., 2003)。又，Micheal等人的研究發現，在*HBR1/hbr1*(*HBR1*為白色念珠菌white-opaque轉換的抑制者)異型缺陷突變株內與*MTLa1*與*MTLa1,2*的缺陷株內，*REP5*(*YEL007w*)基因的mRNA含量有提高現象(約提高2 ~ 3倍)(Pendrak et al., 2004)。先前研究得知，在啤酒酵母2B/int5314*CDR1p-lacZ*中，*REP5*基因能夠提高 β -galactosidase 活性約7倍(紀錦昇，交大碩士論文，2004)。又，實驗發現*REP5*基因能夠活化*FLO11::lacZ*的表現(Rottmann et al., 2003)，而Flo11p/Muc1p已知為啤酒酵母中和pseudohyphal以及invasive growth有關的蛋白質(Lambrechts et al., 1996; Lo & Dranginis, 1998)。綜合上述結果，為了想知道*REP5*基因是否牽涉到抗藥性和型態(morphology)變化，便開始著手研究*REP5*基因。

由於一直無法順利得到*rep5/rep5*同型缺陷突變株，故採用四環黴素調控系統(Nakayama, et al., 2000)並在有無添加doxycycline的情況下，調控*REP5*基因的表現形式。添加doxycycline時，*REP5*基因會受到抑制而不表現；不加doxycycline時，*REP5*基因會過度表現。由於doxycycline會影響野生型SC5314生長狀況，使SC5314菌株生長受到抑制，菌落變得較衰弱。為了避免結果難以判讀與解釋，故於之後的藥物敏感性實驗，都不添加doxycycline(不觀察*REP5*基因抑制現象)，只觀察*REP5*基因過度表現之影響。由圖二十二及二十三之結果得知，不論於藥物敏感性試驗(Etest)或是agar dilution assay中，在不添加doxycycline的狀況下(*REP5*基因過度表現)和野生型SC5314(*REP5/REP5*)相比，

*REP5*基因過度表現株WJC58與WJC63，對於azoles類藥物- fluconazole、 ketoconazole、 itraconazole、voriconazole以及miconazole和polyenes類藥物-amphotericin B 的藥物敏感性皆無顯著變化。而在型態研究方面得知，在誘導菌絲形成之狀況中(37 °C高溫培養及加入10 %胎牛血清)，加入doxycycline抑制*REP5*基因表現時，仍然會有芽管生成(圖二十四)。綜合所有實驗結果發現：*REP5*基因不會影響白色念珠菌之型態轉換，且*REP5*基因過度表現株WJC58與WJC63不會影響白色念珠菌之藥物敏感性。爲了更清楚得知*REP5*基因是否和藥物敏感性有關，我們必須再次利用同源重組置換方式完整破壞*REP5*基因，希望能夠得到*rep5/rep5*同型缺陷突變株，以供進一步研究*REP5*基因和抗藥性之間的關係。



六、未來展望

1. 已知 $rep3/rep3$ 同型缺陷突變株對於azoles類藥物fluconazole、voriconazole和miconazole的敏感性提高，變得較敏感。此現象可於 $rep3/rep3::REP3$ 單套基因置入補救株中驗證。由於本論文之agar dilution assay研究只有觀察菌株對於miconazole的敏感性現象，故之後可以fluconazole及voriconazole進行agar dilution assay，觀察是否同樣具有和藥物敏感性試驗(Etest)相同之結果。
2. 探討野生型SC5314($REP3/REP3$)、 $rep3/rep3$ 同型缺陷突變株與 $rep3/rep3::REP3$ 單套基因置入補救株中排藥幫浦 $CDR1$ mRNA含量。如果 $REP3$ 基因藉由直接和 $CDR1$ 作用而造成白色念珠菌之抗藥性生成，那麼我們應該可在 $rep3/rep3$ 同型缺陷突變株內觀察到 $CDR1$ mRNA表現量下降，而於 $rep3/rep3::REP3$ 單套基因置入補救株中， $CDR1$ mRNA表現量會回升。
3. 以四環黴素調控系統過量表現 $REP3$ 基因，觀察 $REP3$ 基因過量表現時的藥物敏感性現象是否會與 $rep3/rep3$ 同型缺陷突變株相反。
4. 再次利用同源重組置換實驗破壞 $REP4$ 基因，並以所得到的 $rep4/rep4$ 同型缺陷突變株驗證藥物敏感性實驗(Etest)中的正確表型，之後可於實驗中觀察 $rep4/rep4$ 同型缺陷突變株、 $rep4/rep4::REP4$ 單套基因置入補救株與 $rep4/TR::REP4$ 基因過度表現株中的排藥幫浦 $CDR1$ mRNA表現量，藉此研究 $REP4$ 基因和 $CDR1$ 之間的作用。
5. 利用同源重組置換實驗完整破壞 $REP5$ 基因，並以所得到的 $rep5/rep5$ 同型缺陷突變株進行藥物敏感性實驗(Etest)，試著找出 $REP5$ 基因和 $CDR1$ 之間的相關性。

七、參考文獻

Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF. (1996). Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **40(12)**:2835-2841.

Alonso-Valle H, Acha O, Garcia-Palomo JD, Farinas-Alvarez C, Fernandez-Mazarrasa C, Farinas MC. (2003). Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **22(4)**:254-257.

Aravind L, Landsman D. (1998). AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **26(19)**:4413-21.

Bermam J, Sudbery PE. (2002). *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* **3(12)**:918-930. Review.

Bruno VM, Mitchell AP. (2005). Regulation of azole drug susceptibility by *Candida albicans* protein kinase CK2. *Molecular Microbiology.* **56(2)**:559-573.

Calderone RA. (2001). In Fungal pathogenesis: principles and clinical applications. Edited by Calderone RA: Marcel Dekker Inc.; p 3-13.

Calderone RA, Fonzi WA. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9(7)**:327-335. Review

Caspari T. (1997). Onset of gluconate-H⁺ symport in *Schizosaccharomyces pombe* is regulated by the kinases Wis1 and Pka1, and requires the *gti1+* gene product. *J Cell Sci.* **110(Pt 20)**:2599-2608.

Chen CG, Yang YL, Shih HI, Su CL, Lo HJ. (2004). CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating *CDR1*. *Antimicrob Agents Chemother.* **48(12)**:4505-4512

Chen YC, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC. (2003). Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother.* **52(1)**: 71-77.

Chi Chin-Sheng (2004). 交大碩士論文.

Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, Herskowitz I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science.* **282(5389)**:699-705.

Chu S, Herskowitz I. (1998). Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Mol Cell.* **1(5)**:685-696.

Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. (2004). *TAC1*, Transcriptional activator of *CDR* Genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida*

albicans ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell*. **3(6)**:163-1652.

de Micheli M, Bille J, Schueller C, Sanglard D. (2002). A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol*. **43(5)**: 1197-1214.

Denning DW. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*. **362(9390)**:1142-1151. Review

Falvo JV, Thanos D, Maniatis T. (1995). Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell*. **83(7)**:1101-1111

Fasoli MO, Kerridge D, Morris PG, Torosantucci A. (1990) 19F nuclear magnetic resonance study of fluoropyrimidine metabolism in strains of *Candida glabrata* with specific defects in pyrimidine metabolism. *Antimicrob Agents Chemother*. **34(10)**:1996-2006.

Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. **12(1)**:80-96. Review

Garbino J, Kolarova L, Rohner P, Lew D, Pichna P, Pittet D. (2002). Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore)*. **81(6)**:425-433.

Gaur NA, Puri N, Karnani N, Mukhopadhyay G, Goswami SK, Prasad R. (2004). Identification of a negative regulatory element which regulates basal transcription of a multidrug resistance gene *CDR1* of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. **4(4-5)**:389-399.

Georgiev, V.St. (1998). *Infectious Diseases in Immunocompromised Hosts*, CRC Press, Boca Raton, New York.

Georgopapadakou NH. (1998). Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr. Opin. Microbiol*. **1(5)**:547-57. Review

Georgopapadakou NH. (2001). Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on beta-1,3-glucan synthase inhibitors. *Expert Opin Invest Drugs* **10(2)**:269-80. Review

Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*. **198(1)**:179-82.

Girard F, Bello B, Laemmli UK, Gehring WJ. (1998). In vivo analysis of scaffold-associated regions in *Drosophila*: a synthetic high-affinity SAR binding protein suppresses position effect variegation. *EMBO J*. **17(7)**:2079-2085.

Hernaiz ML, Gil C, Pla J, Nombela C. (1998). Induced expression of the *Candida albicans* multidrug resistance gene *CDR1* in response to fluconazole and other antifungals. *Yeast*. **14(6)**:517-526.

Horsburgh CR Jr, Kirkpatrick CH. (1983). Long-term therapy of chronic mucocutaneous

candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. *Am J Med.* **74** (1B):23-29.

Hung CC, Chen YC, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC. (1996). Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. *Journal of Formosan Medical Association* **95**(1):19-28.

Karnani N, Gaur NA, Jha S, Puri N, Krishnamurthy S, Goswami SK, Mukhopadhyay G, Prasad R.(2004). SRE1 and SRE2 are two specific steroid-responsive modules of *Candida* drug resistance gene 1 (*CDR1*) promoter. *Yeast.* **21**(3):219-239.

Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Einsele H. (1997) Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta 5,6-desaturation. *FEBS Lett.* **400**(1): 80-82.

Kohler JR, Fink GR. (1996). *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**(23):13223-13228.

Krishnamurthy S, Gupta V, Prasad R, Panwar SL, Prasad R. (1998). Expression of *CDR1*, a multidrug resistance gene of *Candida albicans*: *in vitro* transcriptional activation by heat shock, drugs and human steroid hormones. *FEMS Microbiol Lett.* **160**(2):191-197.

Lamb D, Kelly D, Kelly S. (1999). Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. *Drug Resist Updates.* **2**(6):390-402.

Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS. (1996). Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**(16): 8419-8424

Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR.(1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* **90**(5):939-949.

Lo HJ, Wang JS, Lin CY, Chen CG, Hsiao TY, Hsu CT, Su CL, Fann MJ, Ching YT, Yang YL. (2005). Efg1 involved in drug resistance by regulating the expression of *ERG3* in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**(3):1213-1215.

Lo WS, Dranginis AM. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **9**(1): 161-171.

Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med.* **8**(2):76-81. Review

Lyons CN, White TC. (2000). Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(9):2296-303.

Mazur P, Baginsky W. (1996). In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J Biol Chem.* **271**(24):14604-14609.

Miller MG, Johnson AD. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*. **110(3)**:293-302.

Murad AM, d'Enfert C, Gaillardin C, Tourneau H, Tekaiia F, Talibi D, Marechal D, Marchais V, Cottin J, Brown AJ. (2001). Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol*. **42(4)**:981-993.

Nakamura, K., Niimi, M., Niimi, K., Holmes, A. R., Yates, J. E., Decottignies, A., Monk, B. C., Goffeau, A., Cannon, R. D. (2001). Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **45(12)**: 3366-3374.

Nakayama H, Mio T, Nagahashi S, Kokado M, Arisawa M, Aoki Y. (2000). Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun*. **68(12)**:6712-6719.

Odds FC. (1988). *Candida and Candidiasis* edn 2. London: Bailliere Tindal

Onate SA, Prendergast P, Wagner JP, Nissen M, Reeves R, Pettijohn DE, Edwards DP. The DNA-bending protein HMG-1 enhances progesterone receptor binding to its target DNA sequences. (1994). *Mol Cell Biol*. **14(5)**:3376-3391.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE; NIAID Mycoses Study Group. (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*. **37(5)**:634-643.

Pendrak ML, Yan SS, Roberts DD. (2004). Hemoglobin regulates expression of an activator of mating-type locus alpha genes in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. **3(3)**:764-775.

Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF. (2001). Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. **45(10)**:2676-84.

Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A, Balzi E. (1995). Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet*. **27(4)**: 320-329.

Prasad, R., Gupta, N., Gaur, M. (2004). Molecular basis of antifungal resistance, in *Pathogenic Fungi*. Caister Academic Press, Norfolk, U.K. pp357-414. Caister Academic Press, Norfolk, U.K.

Prasad R, Panwar SL, Smriti. (2002). Drug resistance in yeasts--an emerging scenario. *Adv Microb Physiol*. **46**:155-201. Review

Puri N, Krishnamurthy S, Habib S, Hasnain SE, Goswami SK, Prasad R. (1999). *CDR1*, a multidrug resistance gene from *Candida albicans*, contains multipleregulatory domains in its promoter and the distal AP-1 element mediates its induction by miconazole. *FEMS Microbiol Lett.* **180(2)**: 213-219.

Reeves R, Nissen MS. (1990). The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J. Biol. Chem.* **265(15)**:8537-8582.

Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. (1998). The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis.* **27(4)**:781-788.

Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. (1995). Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* **39(1)**:1-8. Review

Rottmann M, Dieter S, Brunner H, Rupp S. (2003). A screen in *Saccharomyces cerevisiae* identified *CaMCM1*, an essential gene in *Candida albicans* crucial for morphogenesis. *Molecular Microbiology.* **47(4)**:943-959.

Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, de Micheli M, Bille J. (1998). Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast. *Drug Resist Updates.* **1**:255-65.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. (1996). Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* **40(10)**:2300-2305.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. (1997). Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology,* **143(Pt2)**: 405-416.

Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* **39(11)**:2378-2386.

St Georgiev V. (2000). Membrane Transporters and Antifungal Drug Resistance. *Current Drug Targets* **1(3)**:261-284. Review

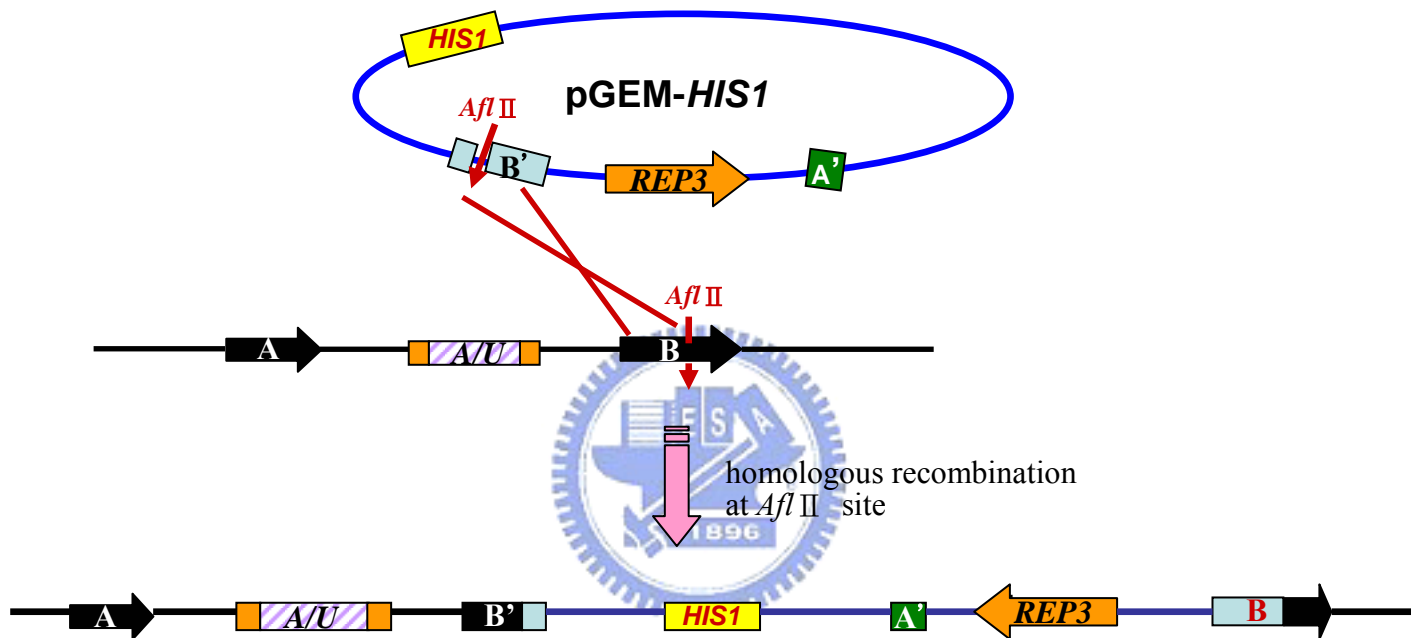
Strick R, Laemmli UK. (1995). SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell.* **83(7)**:1137-1148.

Thanos D, Maniatis T. (1992). The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell.* **71(5)**:777-789.

Tkacz JS, DiDomenico B. (2001). Antifungals: What's in the pipeline. *Curr Opin Microbiol.* **4(5)**:540-45. Review

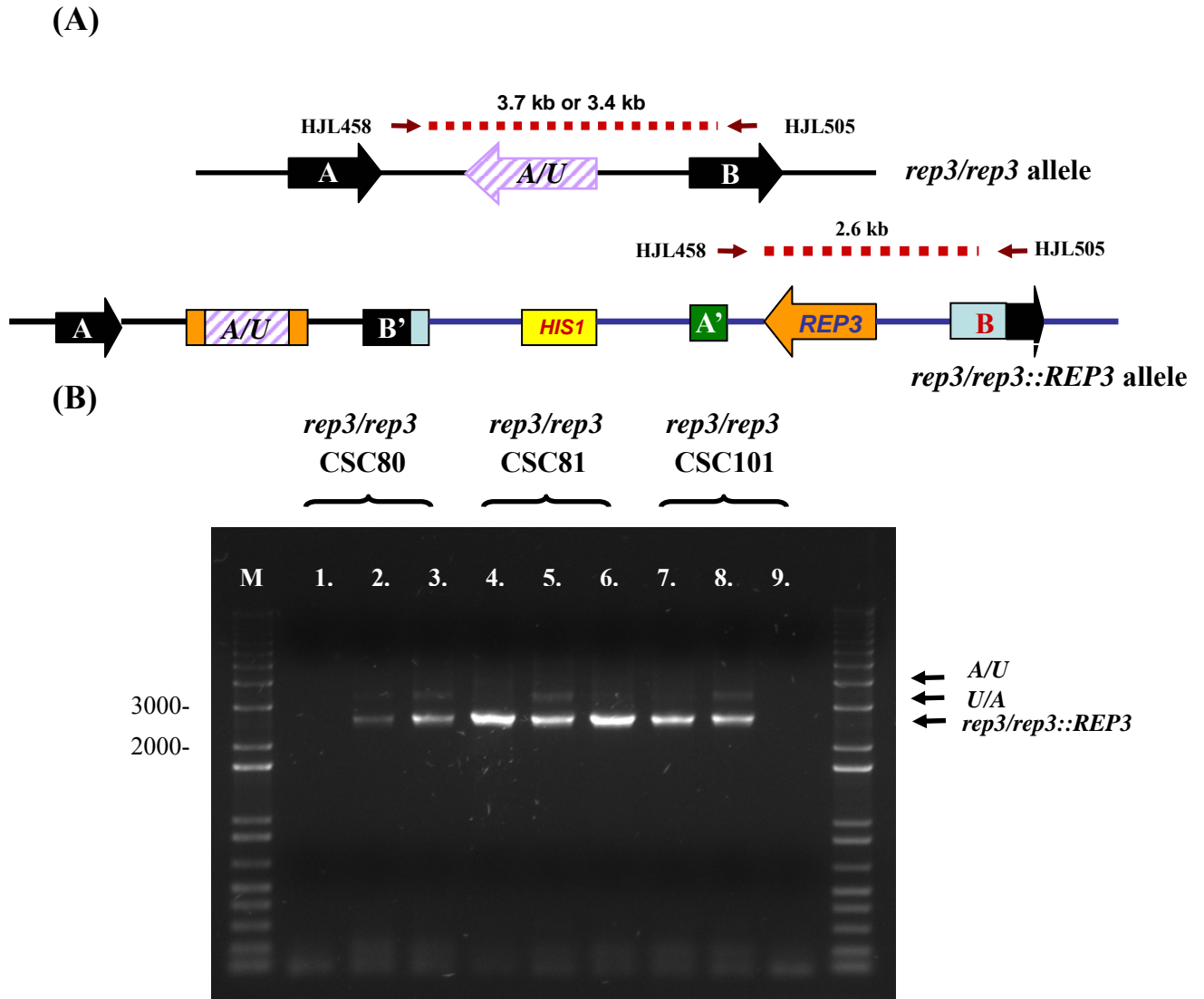
Tsong AE, Miller MG, Raisner RM, Johnson AD. (2003). Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell.* **115(4)**:389-399.

- Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC.** (1994). Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.* **2(10)**:393-400. Review
- Vermitsky JP, Edlind TD.** (2004). Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother.* **48(10)**:3773-81.
- Viudes A, Peman J, Canton E, Ubeda P, Lopez-Ribot JL, Gobernado M.** (2002). Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **21(11)**:767-774.
- White, TC.** (1997). Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother.* **41(7)**:1482-1487.
- White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA.** (2002). Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(6)**:1704-1713.
- White TC, Marr KA, Bowden RA.** (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* **11(2)**:382-402. Review
- Wilson LS, Reyes CM, Stolpman M, Speckman J, Allen K, Beney J.** (2002). The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health* **5(1)**:26-34.
- Wilson RB, Davis D, Mitchell AP.** (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol.* **181(6)**:1868-1874.
- Yang YL, Lo HJ.** (2001). Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect.* **34(2)**:79-86. Review

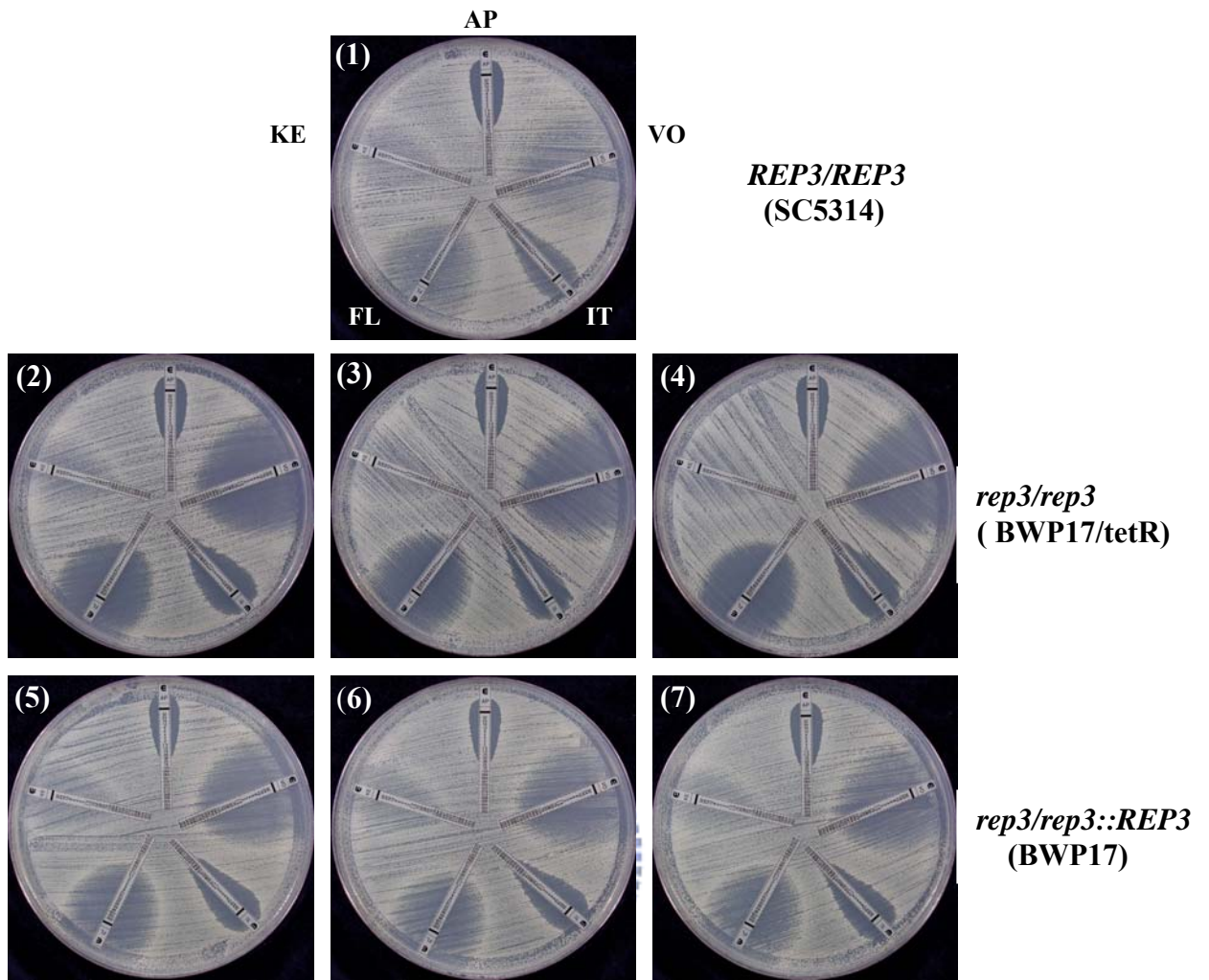


圖一. *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入株建構示意圖。

A/U: 表示 *ARG4* 或 *URA3* 篩選標誌。A' 表示 open reading frame 不完整的 A 基因; B' 表示 open reading frame 不完整的 B 基因。



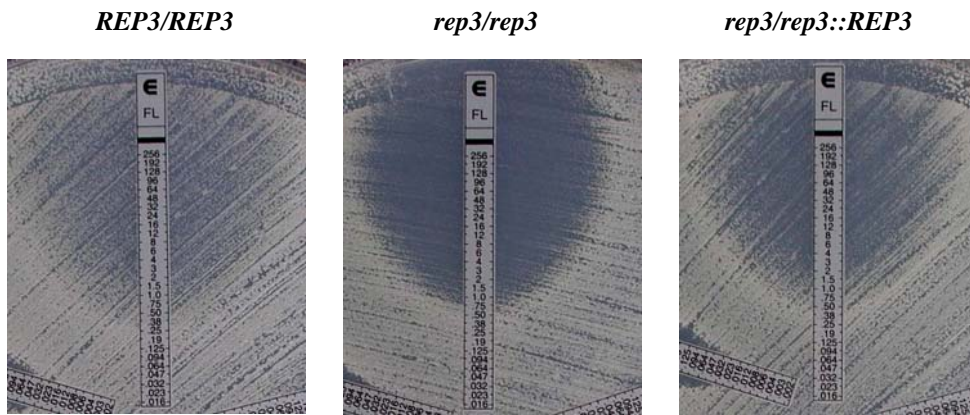
圖二. 聚合酶連鎖反應確認 *REP3* 單套基因是否正確置入 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株內。
 (A) *REP3* 單套基因置入 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株示意圖。A/U:表示 *ARG4* 或 *URA3* 篩選標誌。A 及 B 代表相鄰 ORFs。
 (B)利用 1% 洋菜膠分析聚合酶連鎖反應所得產物。M 為 1 Kb plus DNA ladder, 1 ~ 3 為轉形至 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株 CSC80 所得之轉形株, 4 ~ 6 為轉形至 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株 CSC81 所得之轉形株, 7 ~ 9 為轉形至 *rep3/rep3* 同型缺陷突變株 CSC101 所得之轉形株。右方箭頭所指為聚合酶連鎖反應所得產物之位置, 符合預期之 2686 bp 及 3.4/3.7 kb (U/A 或 A/U)。



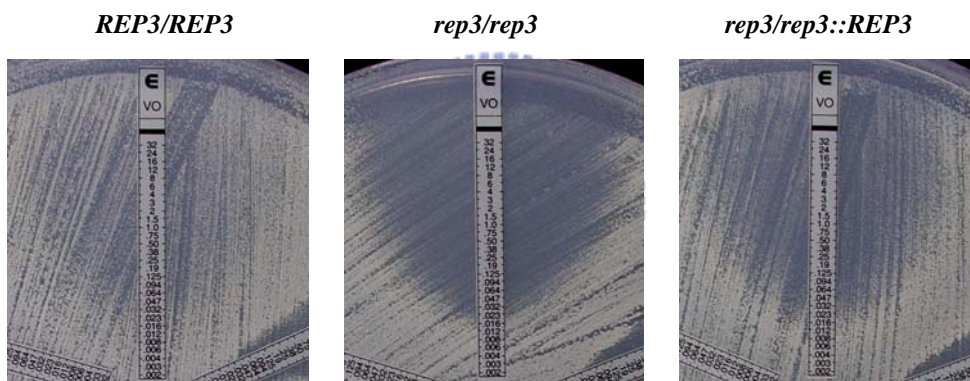
圖三之一. *rep3/rep3* 同型缺陷突變株及 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株之藥物敏感性試驗(Etest)結果。

此圖為培養於 SD 培養基 35 °C，48 小時後之結果。(1)野生株 SC5314 (*REP3/REP3*)。 (2) ~ (4)為 3 個不同的 BWP17 tetR-*HIS1*/*rep3/rep3* 同型缺陷突變株(CSC106、111、119)。 (5) ~ (7)為 3 個不同的 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株(WJC52、53、56)。
 AP:amphotericin B(0.002-32 μg/ml), KE:ketoconazole(0.002-32 μg/ml), FL:fluconazole(0.016-256 μg/ml), IT:itraconazole(0.002-32 μg/ml), VO:voriconazole(0.002-32 μg/ml)。

fluconazole

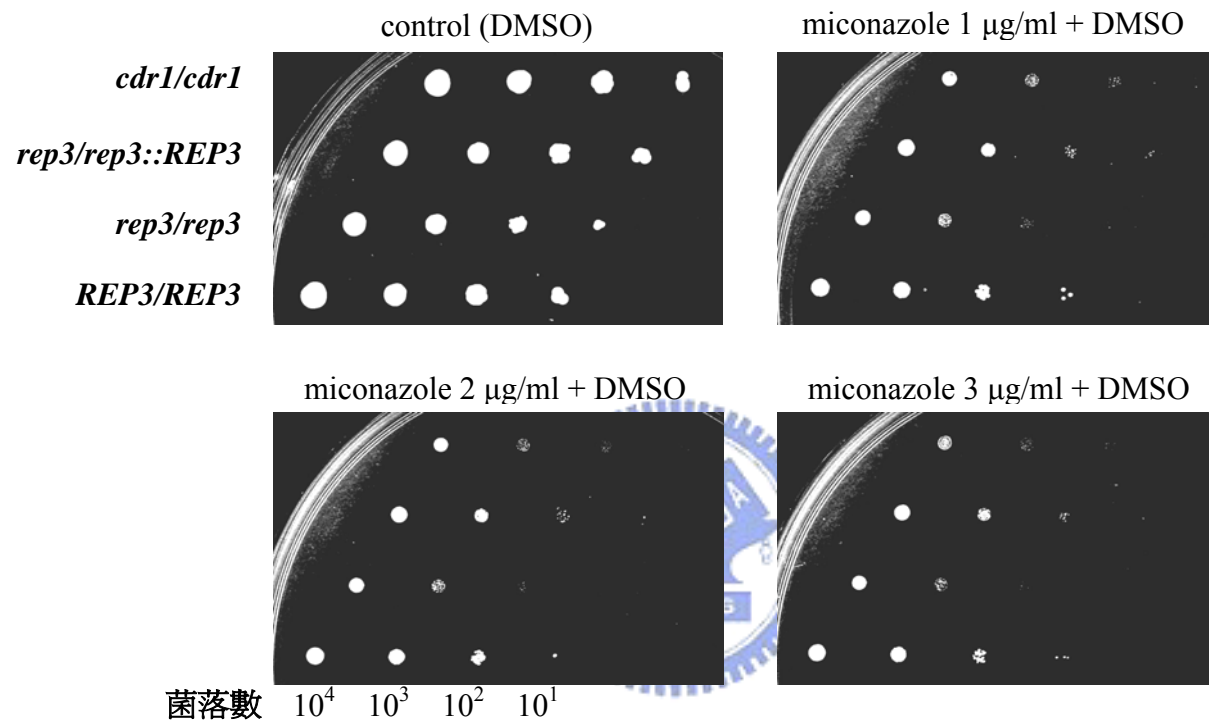


voriconazole

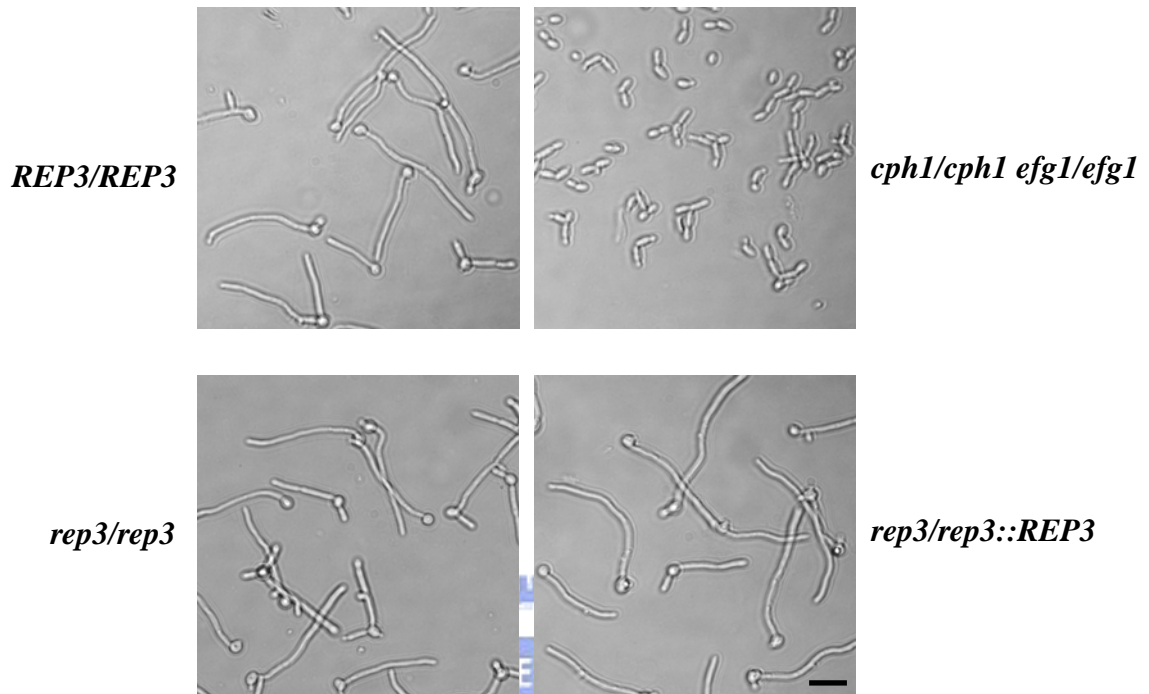


圖三之二. 藥物敏感性試驗(Etest)局部放大示意圖。

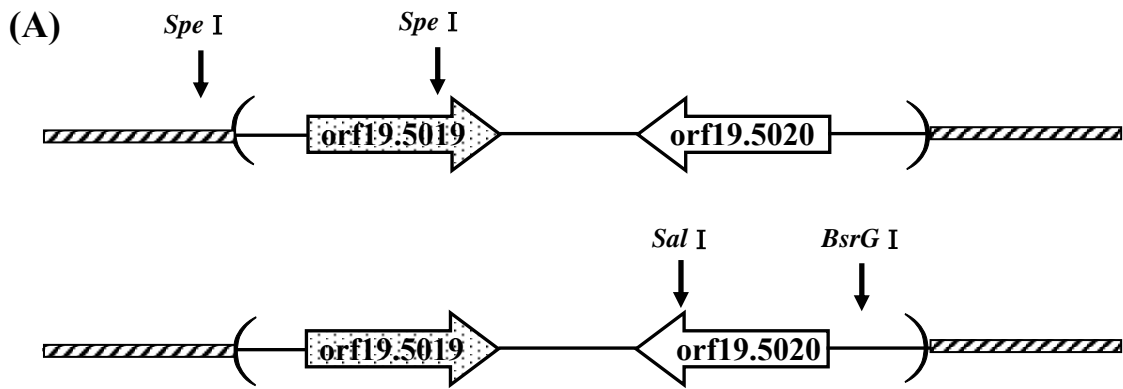
此圖為培養於 SD 培養基 35 °C，48 小時後之結果。局部放大並比較野生株 SC5314(*REP3/REP3*)，*rep3/rep3*(CSC119)同型缺陷突變株以及 *rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株(WJC56)對於抗真菌藥物 fluconazole(0.016-256 µg/ml)和 voriconazole (0.002-32 µg/ml)之敏感性差異。



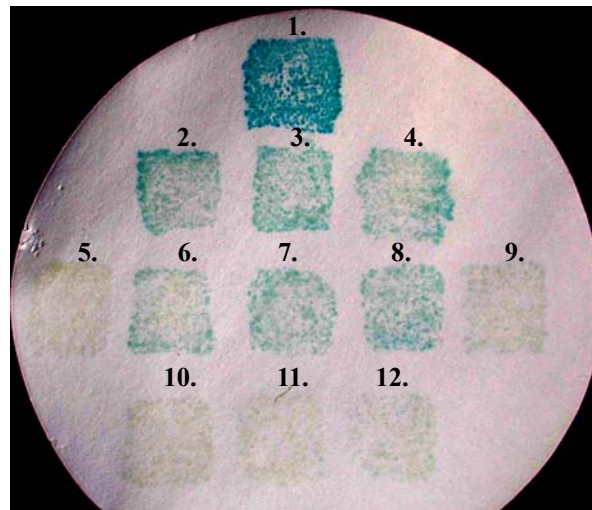
圖四. *rep3/rep3* 同型缺陷突變株於 agar dilution assay 中對於 miconazole 之敏感性有提高之現象。圖左方表示不同基因型之菌株，圖下方表示相對之菌落數。所有菌株均培養於含有 1~3 µg/ml 之 miconazole 或不含藥物(含 DMSO)之SD培養基上。此圖為培養於35 °C，48小時後之結果。菌株種類有野生型SC5314(*REP3/REP3*)，*rep3/rep3*同型缺陷突變株(CSC106)，*rep3/rep3::REP3*單套基因置入補救株(WJC52)，*cdr1/cdr1* 同型缺陷突變株(DSY448)。



圖五. 芽管試驗(germ tube assay)。將不同菌株接種於 BHI 培養液並加入 10% 胎牛血清，於 37°C 反應 3 小時後以倒立顯微鏡所觀察之結果。菌株之基因型列於圖左方即右方；— 相當於 10 μm。菌株種類有野生型 SC5314(*REP3/REP3*)，*rep3/rep3* 同型缺陷突變株(CSC106)，*rep3/rep3::REP3* 單套基因置入補救株(WJC52)，*cph1/cph1 efg1/efg1* 雙基因突變株(HLC54)。



(B)



圖六. β -galactosidase filter assay 確認於啤酒酵母 2B/348 *CDR1p-lacZ* 菌株內活化 *lacZ* 表現之 open reading frame(ORF)。

(A)建構含C19 library clone之主要兩個open reading frames (ORFs)之一的質體。垂直箭頭代表各限制酵素切割位置，▨代表質體序列，左右括號內為library clone序列。

(B)編號 1:正對照組，將含有 *CaNDT80* 建構之質體轉形至啤酒酵母 2B/348*CDR1p-lacZ* 菌株內。編號 2 ~ 4:將含有 C19(*orf19.5019* 和 *orf19.5020*)建構之質體轉形至啤酒酵母 2B/348*CDR1p-lacZ* 菌株內。編號 5, 9:負對照組，將空的質體轉形至啤酒酵母 2B/348*CDR1p-lacZ* 菌株內。編號 6 ~ 8:將含有 *orf19.5020* 建構之質體轉形至啤酒酵母 2B/348*CDR1p-lacZ* 菌株內。編號 10 ~ 12:將含有 *orf19.5019* 建構之質體轉形至啤酒酵母 2B/348*CDR1p-lacZ* 菌株內。