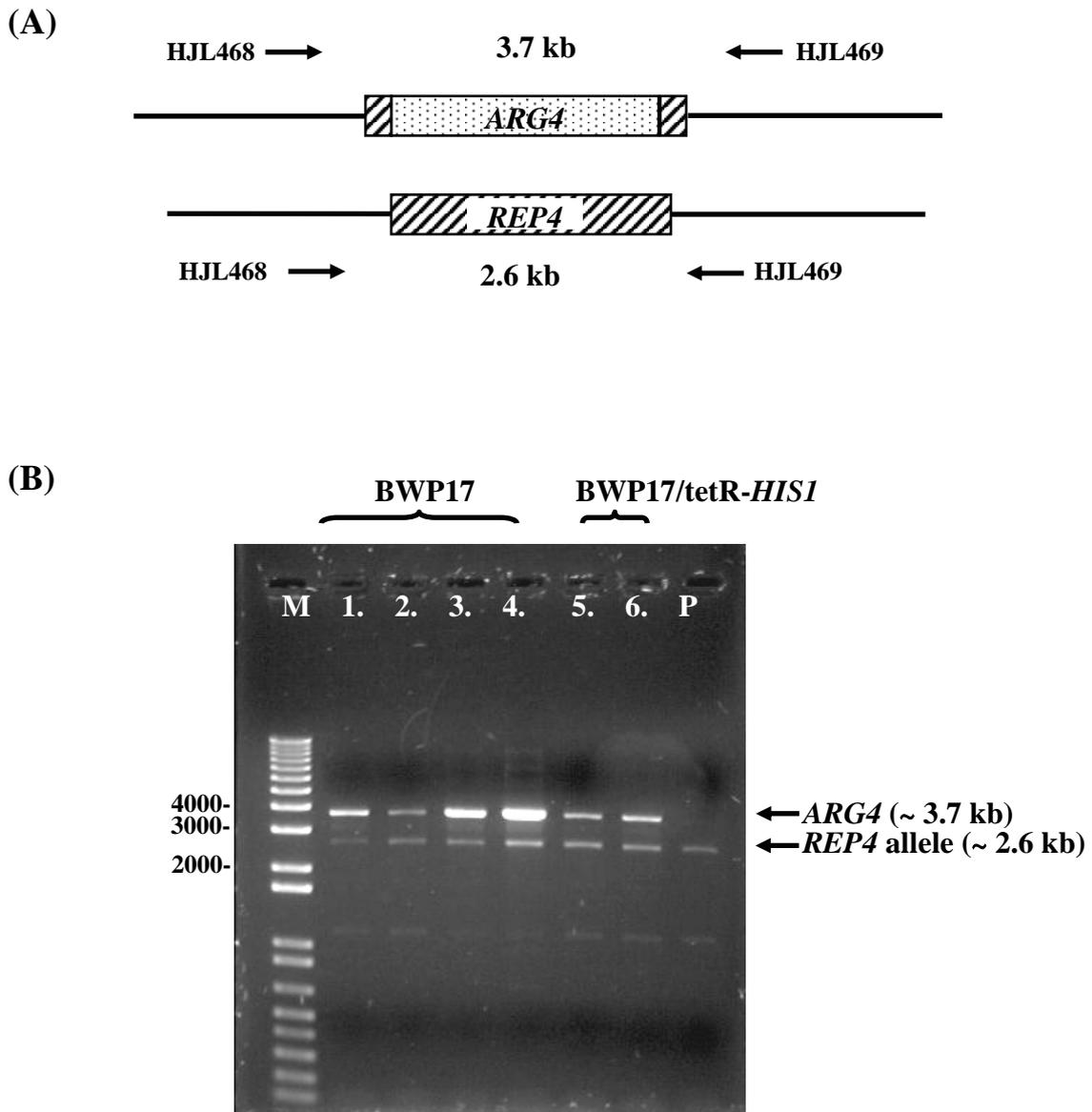


圖七.同源重組(homologous recombination)基因破壞示意圖。

Target ORF : *REP4* open reading frame 或 *REP5* open reading frame 。

■：帶有和目標基因同源的 70 個鹼基對序列，用以進行同源重組基因置換。

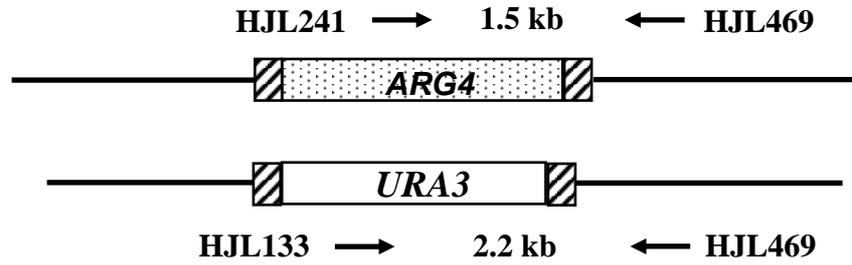


圖八. 聚合酶連鎖反應確認正確的 *REP4/rep4* 異型缺陷突變株。

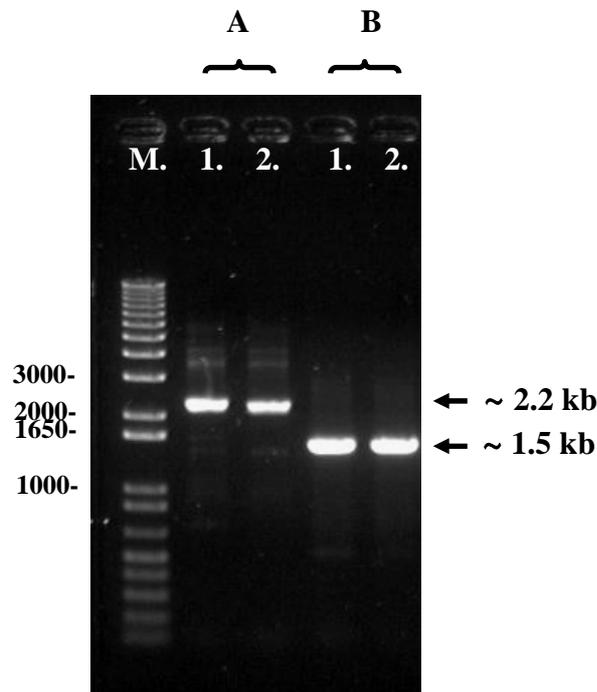
(A)利用引子 HJL468 及 HJL469 進行聚合酶連鎖反應示意圖。箭頭所指為引子於染色體 DNA 中的位置。

(B)聚合酶連鎖反應結果。M, 1 kb plus DNA ladder ;編號 1~4. 轉形至 BWP17 後所得到的轉形株; 編號 5~6.轉形至 BWP17 tetR-*HIS1* 後所得到的轉形株; P 為野生菌株 SC5314 染色體 DNA 以引子 HJL468 及 HJL469 進行聚合酶連鎖反應結果。圖右方箭頭所指為預期之聚合酶連鎖反應產物大小。

(A)



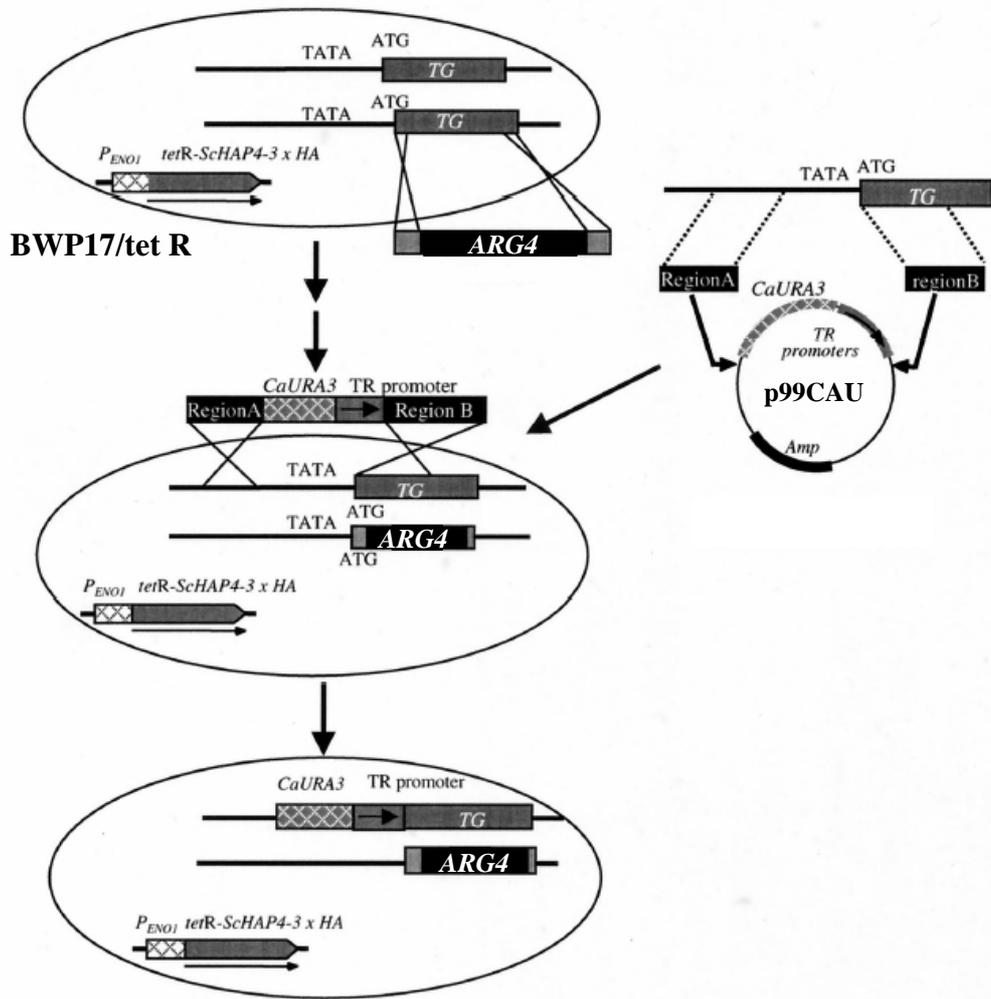
(B)



圖九. 聚合酶連鎖反應確認正確的 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株。

(A)利用引子 HJL241, HJL469 以及 HJL133, HJL469 分別進行聚合酶連鎖反應示意圖。箭頭所指為引子於染色體 DNA 中的位置。

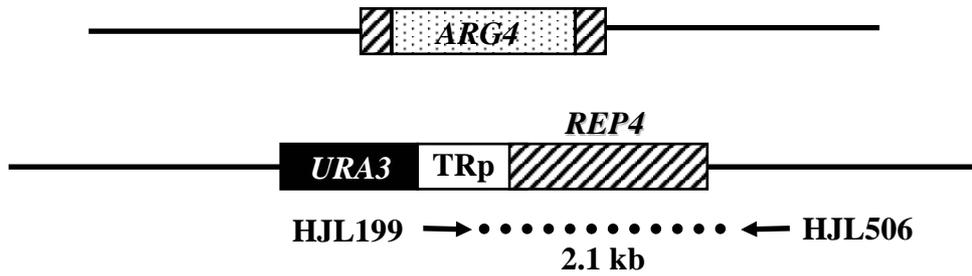
(B)聚合酶連鎖反應結果。M, 1 kb plus DNA ladder；編號 1, 2 為轉形至 BWP17 後所得到的轉形株。圖上方之 A 為以引子 HJL133, HJL469 進行聚合酶連鎖反應，圖上方之 B 為以引子 HJL241, HJL469 進行聚合酶連鎖反應。圖右方箭頭所指為預期之聚合酶連鎖反應產物大小。



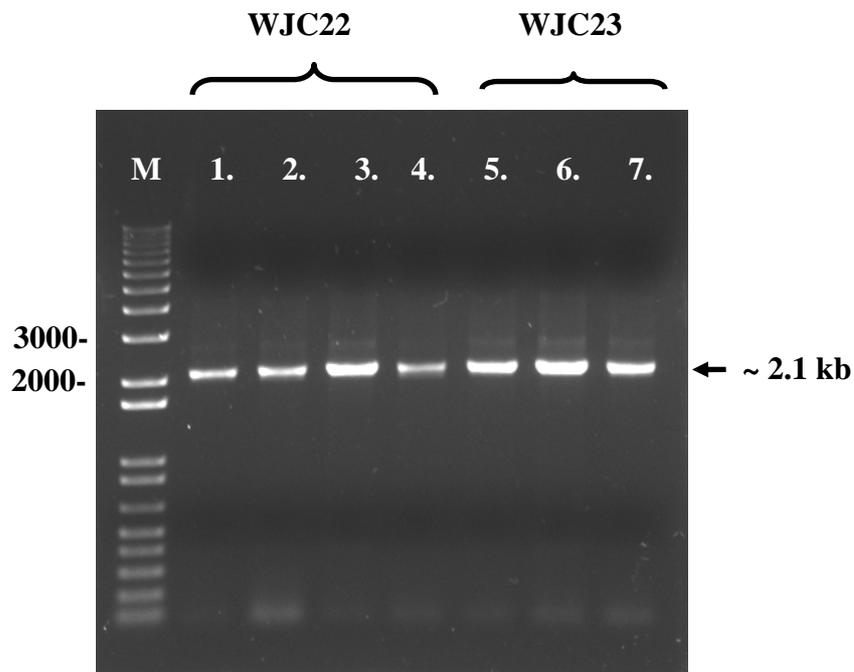
圖十. 四環黴素調控表現系統建構示意圖。

BWP17/tet R 為已含有驅動 $tet R$ 表現之白色念珠菌。TG 表示欲研究之目標基因(target gene)。p99CAU 為已含有 TR 啟動子(TR promoter)及 $URA3$ 標記之質體。

(A)



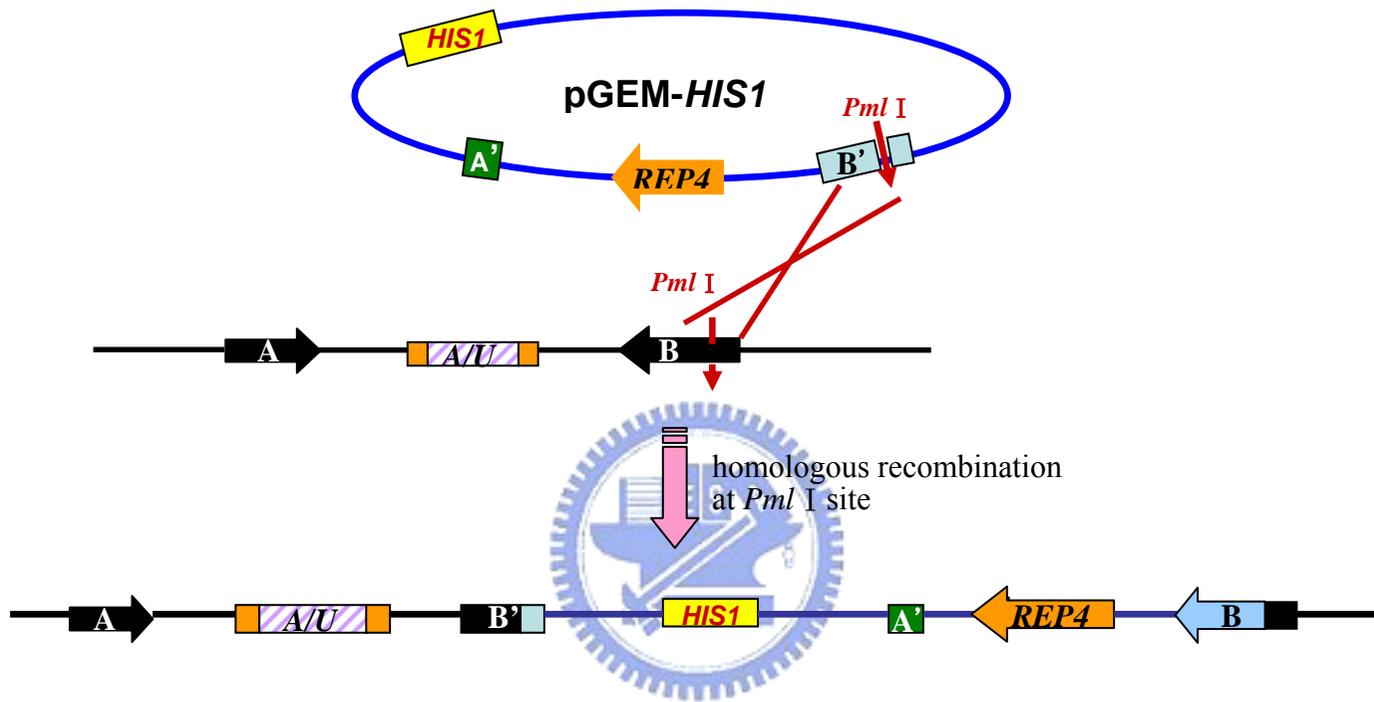
(B)



圖十一. 聚合酶連鎖反應確認 *REP4* 四環黴素調控表現系統之建立。

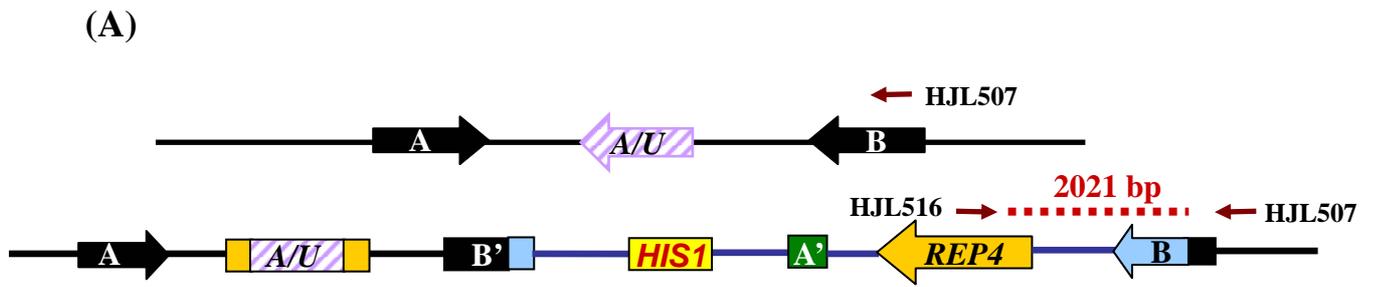
(A)利用引子 HJL199 及 HJL506 進行聚合酶連鎖反應示意圖。箭頭所指為引子於染色體 DNA 中的位置。

(B)聚合酶連鎖反應結果。M: 1 kb plus DNA ladder。編號 1 ~ 4 為轉形至 WJC22(BWP17/tetR-*HIS1/REP4/rep4::ARG4*)所得到的轉形株。編號 5 ~ 7 為轉形至 WJC23 (BWP17/tetR-*HIS1/REP4/rep4::ARG4*)所得到的轉形株。圖右方箭頭所指為預期之聚合酶連鎖反應產物大小。

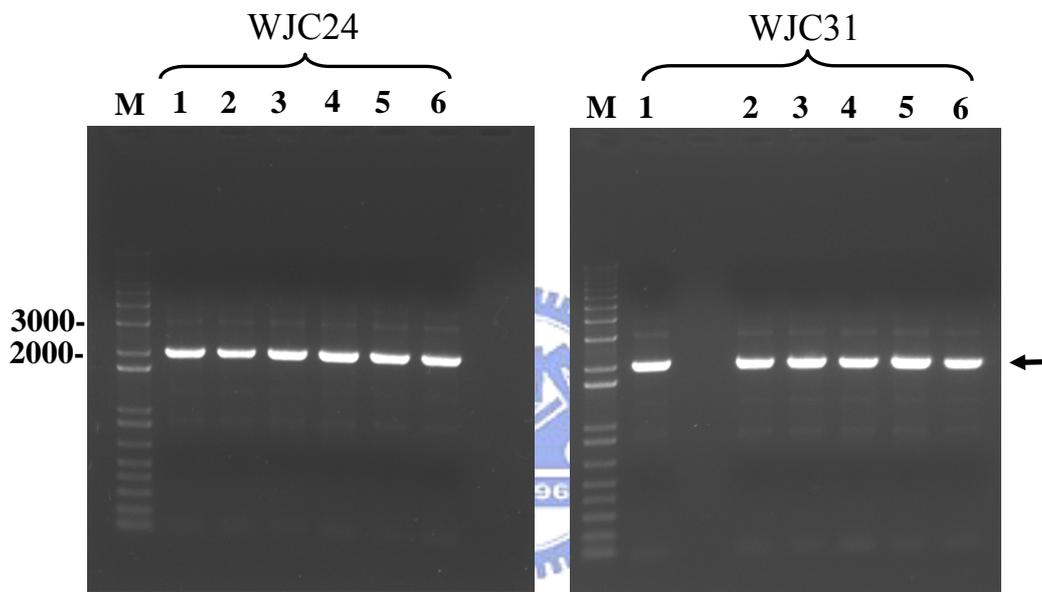


圖十二. *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株建構示意圖。

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。

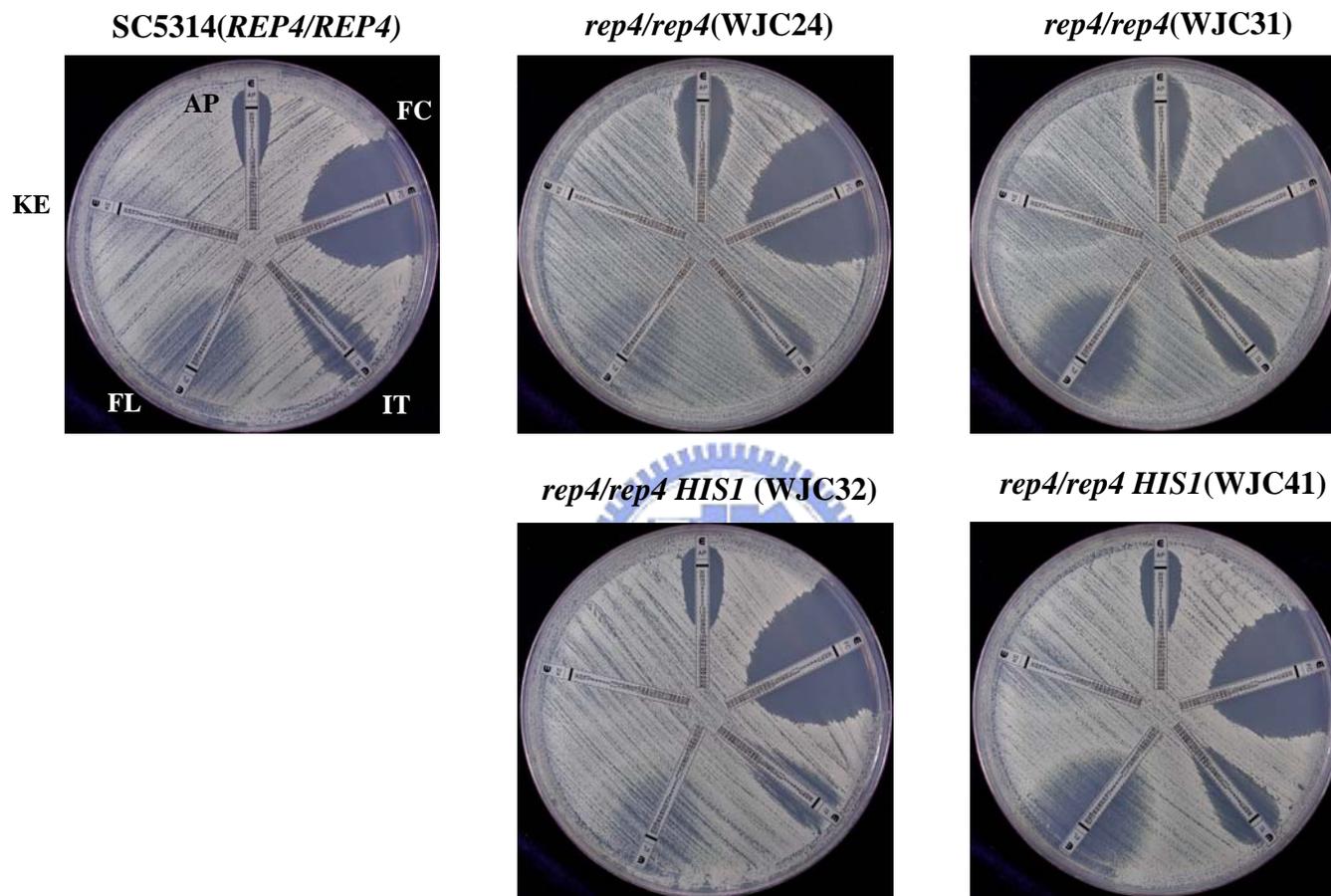


(B)



圖十三. 聚合酶連鎖反應確認 *REP4* 單套基因是否正確置入 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株內。
 (A) 確認 *REP4* 單套基因是否成功地置入 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株示意圖。箭頭所指為引子於染色體 DNA 上之相對位置；A/U: *ARG4* 或 *URA3*；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。

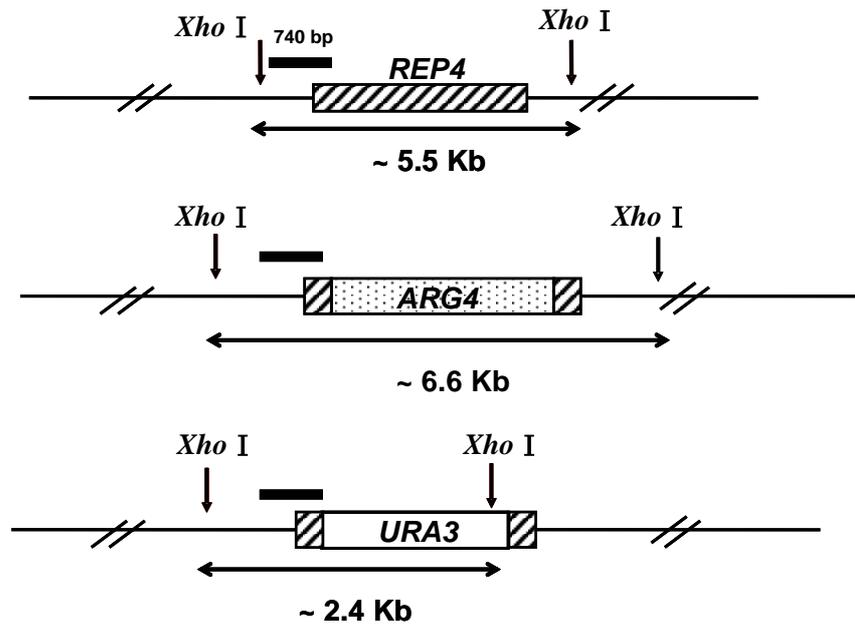
(B) 利用 1% 洋菜膠分析聚合酶連鎖反應所得產物。M: 為 1 kb plus DNA ladder，編號 1 ~ 6 為分別轉形至 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC24 與 WJC31 後所得到的轉形株；右方箭頭所指為聚合酶連鎖反應所得產物之位置，符合預期之 2021bp。



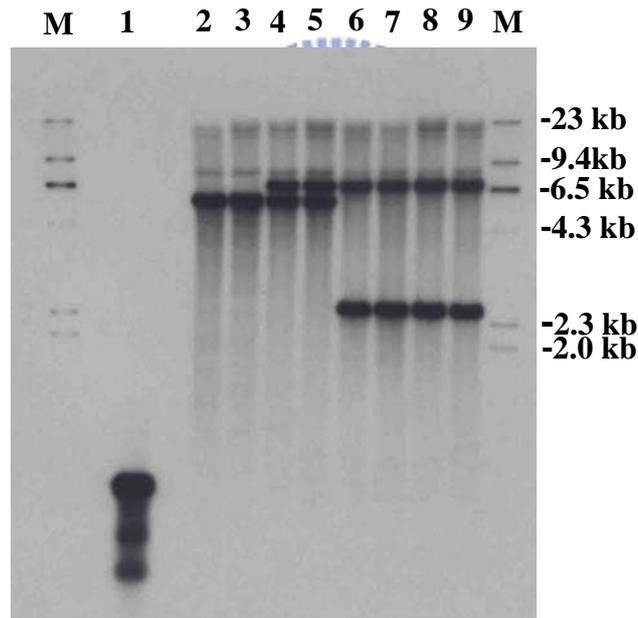
圖十四. *rep4/rep4* 同型缺陷突變株之藥物敏感性試驗(Etest)結果

此圖為培養於 SD(+*HIS*)培養基 35 °C，48 小時後之結果。菌株基因型標示於各圖上方，WJC32 為將 *HIS1* 基因轉形至 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株(WJC24)後所得到的轉形株；WJC41 為將 *HIS1* 基因轉形至 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株(WJC31)後所得到的轉形株。AP: amphotericin B(0.002 – 32 µg/ml)，KE: ketoconazole (0.002 – 32 µg/ml)，FC: flucytosin (0.002 – 32 µg/ml)，FL: fluconazole(0.016 – 256 µg/ml)，IT: itraconazole(0.002 – 32 µg/ml)。

(A)



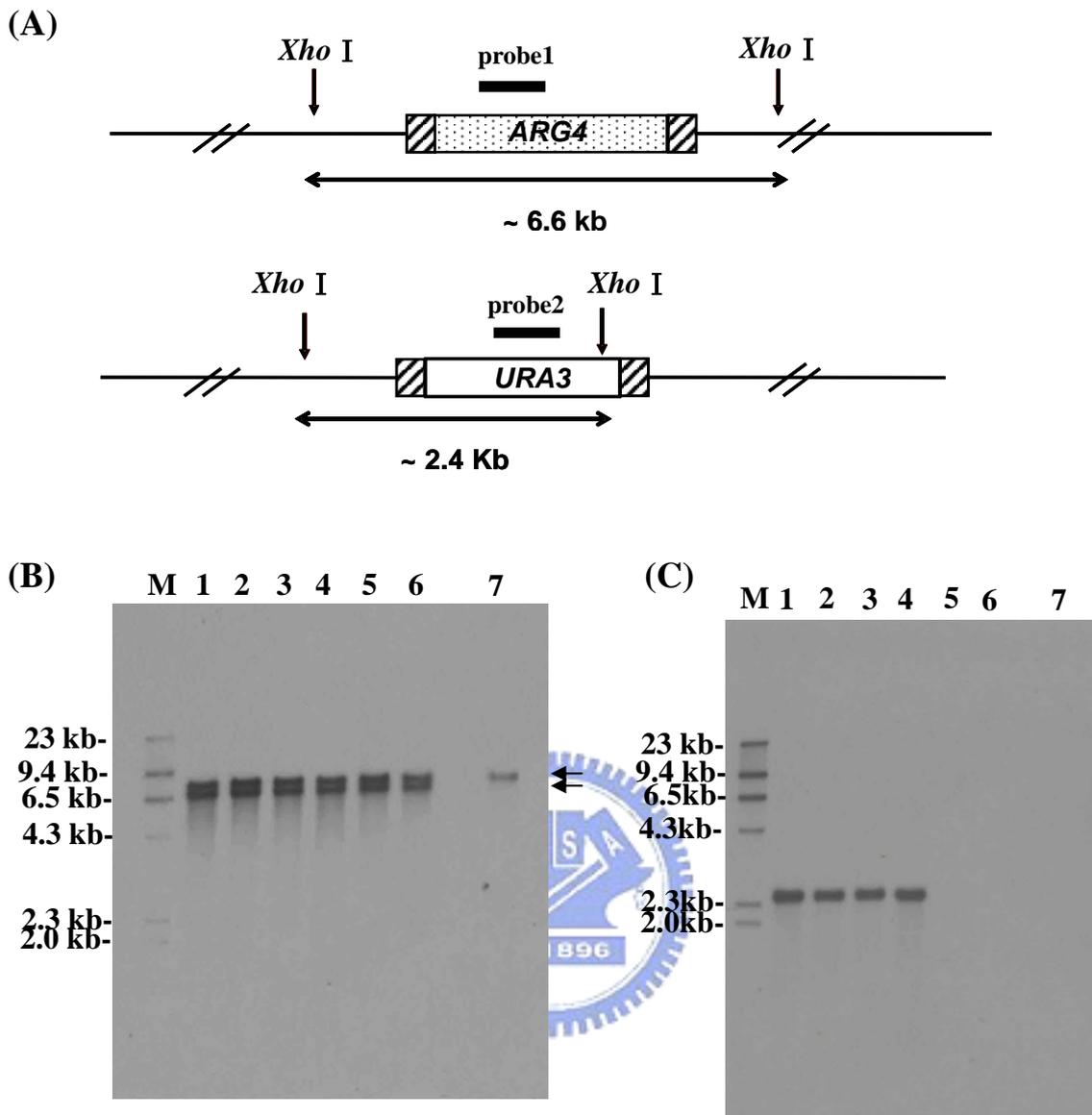
(B)



圖十五. *rep4/rep4* 同型缺陷突變株的南方墨點法結果(之一)。

(A)南方墨點法探針設計示意圖。■代表探針設計的位置，垂直箭頭代表限制酵素 *Xho* I 切割位置。

(B)南方墨點法結果。M: DIG-label DNA marker; 編號 1: 正對照組，經由聚合酶連鎖反應所合成的探針，約 740 bp; 編號 2: 野生型 SC5314; 編號 3: BWP17; 編號 4 ~ 5: 兩個 *REP4/rep4::ARG4* 異形缺陷突變株 (WJC18 與 WJC21); 編號 6 ~ 7: 兩個 *rep4::ARG4/rep4::URA3* 同型缺陷突變株 (WJC24 與 WJC31); 編號 8 (WJC32): 將篩選標誌 *HIS1* 轉形至編號 6 後所得到的轉形株; 編號 9 (WJC41): 將篩選標誌 *HIS1* 轉形至編號 7 後所得到的轉形株。圖片右方標記為 marker 的相對大小。

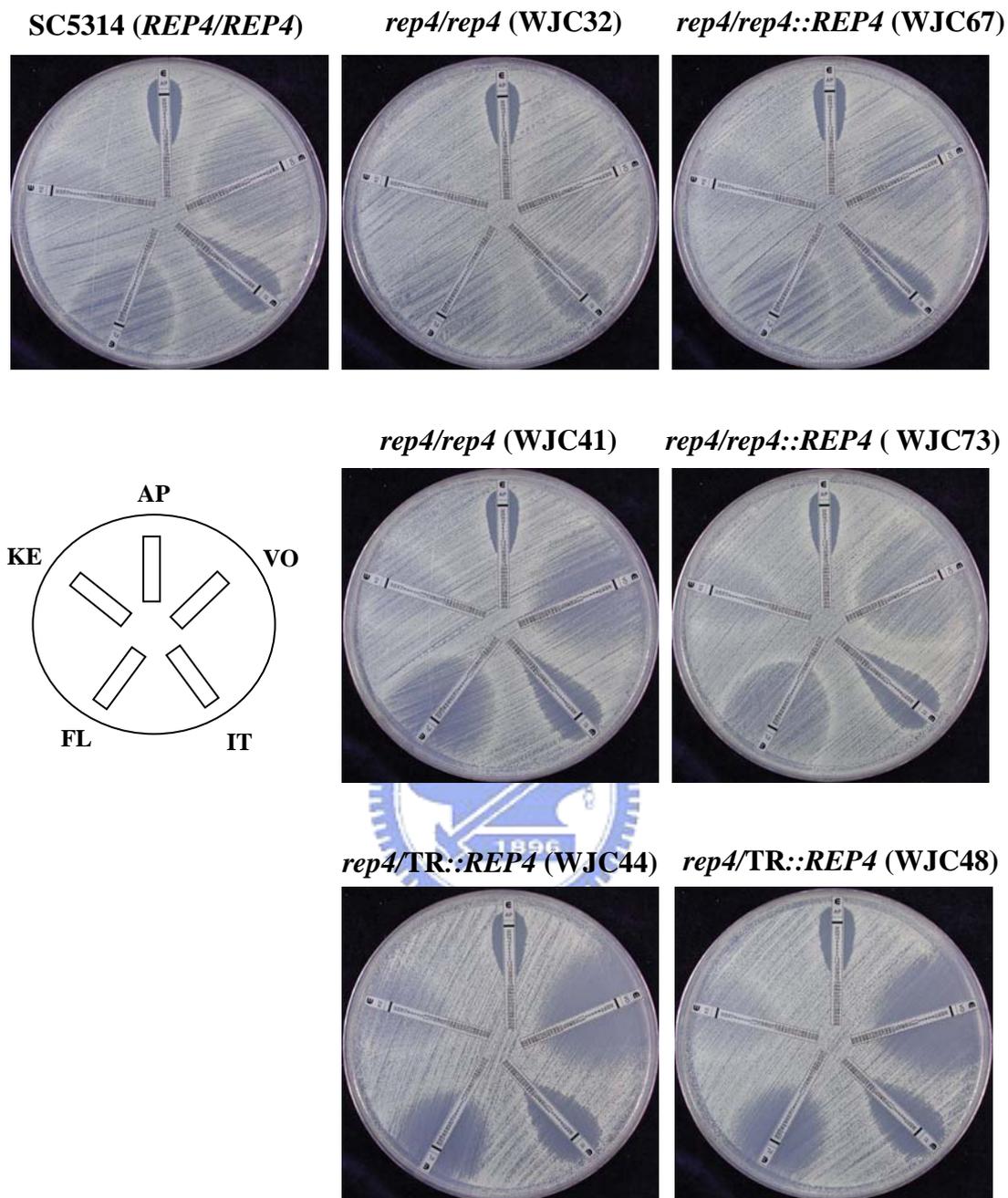


圖十六. *rep4/rep4* 同型缺陷突變株的南方墨點法結果(之二)。

(A)南方墨點法探針設計示意圖。■代表探針設計的位置，垂直箭頭代表限制酵素 *Xho* I 切割位置。

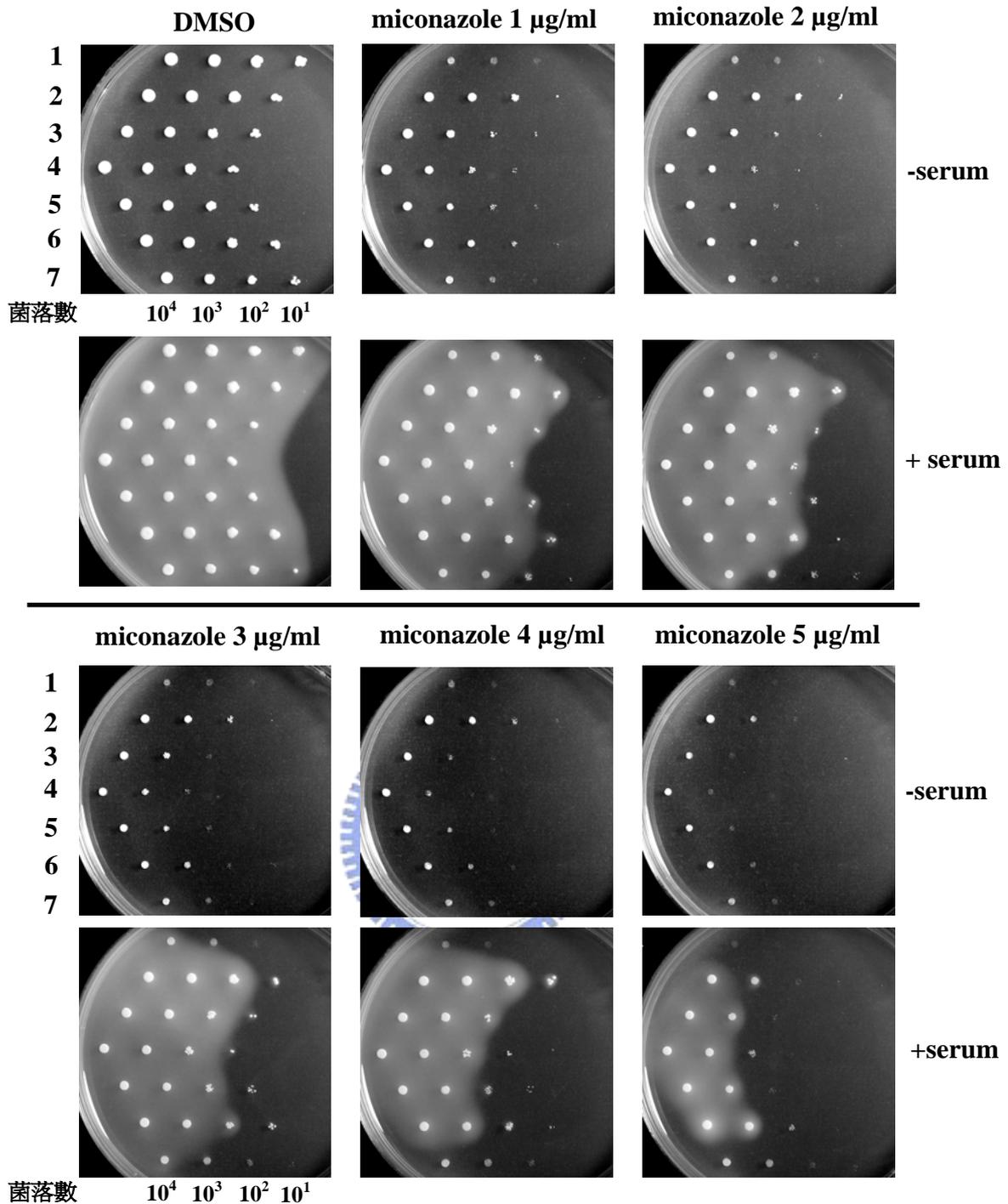
(B)經由探針 1(probe1)雜合後所得到的南方墨點法結果。M: DIG-label DNA marker；編號 1: 將篩選標誌 *HIS1* 轉形至編號 3 後所得到的轉形株；編號 2: 將篩選標誌 *HIS1* 轉形至編號 4 後所得到的轉形株；編號 3 ~ 4: 兩個 *rep4::ARG4/rep4::URA3* 同型缺陷突變株；編號 5 ~ 6: 兩個 *REP4/rep4::ARG4* 異形缺陷突變株；編號 7: BWP17。圖左方標記為 marker 的相對大小。圖右側下方箭頭為預期的 6.6 kb 片段，上方箭頭為非專一性結合。

(C)經由探針 2(probe2)雜合後所得到的南方墨點法結果。M: DIG-label DNA marker；編號 1: 將篩選標誌 *HIS1* 轉形至編號 3 後所得到的轉形株；編號 2: 將篩選標誌 *HIS1* 轉形至編號 4 後所得到的轉形株；編號 3 ~ 4: 兩個 *rep4::ARG4/rep4::URA3* 同型缺陷突變株；編號 5 ~ 6: 兩個 *REP4/rep4::ARG4* 異形缺陷突變株；編號 7: BWP17。圖片左方標記為 marker 的相對大小。

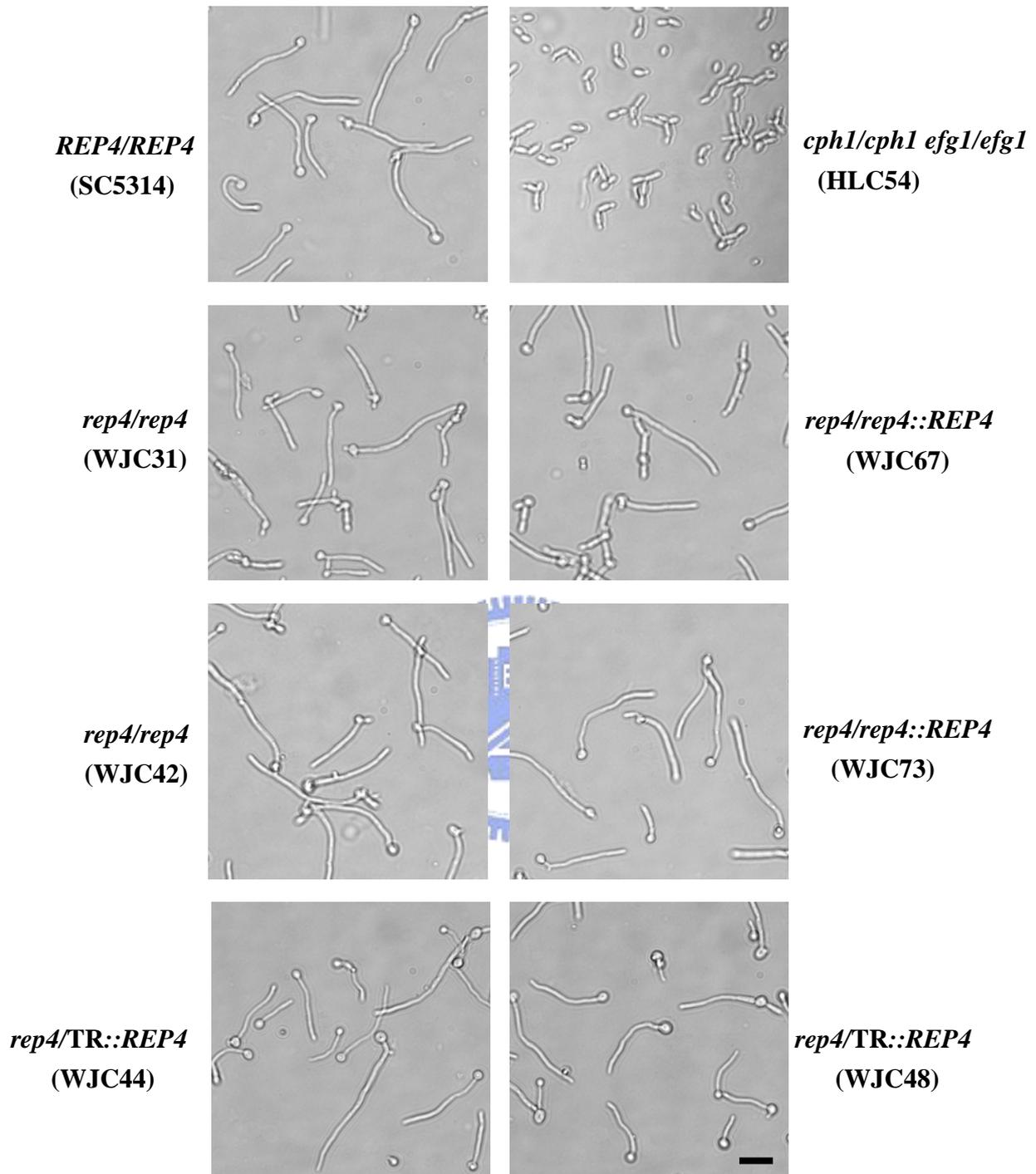


圖十七. *rep4/rep4* 同型缺陷突變株與 *rep4/TR::REP4* (Tet R) 調控株在基因過度表現下之藥物敏感性試驗(Etest)結果。

此圖為培養於 SD 培養基 35 °C，48 小時後之結果。Tet R 調控株培養在沒有 doxycycline 的環境下。各基因型皆標示於圖上方。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)。



圖十八. *rep4/rep4* 同型缺陷突變株與 *REP4* 基因過度表現株 agar dilution assay 結果。所有菌株皆培養於含特定濃度之 miconazole (如圖上方標示) 或不含藥物 (含 DMSO) 的 SD 培養基上。此圖為培養於 35 °C，48 小時後結果。圖下方標示為每點相對之菌落數。圖左方編號 1 為 *cdr1/cdr1* 同型缺陷突變株 (DSY448)；編號 2 為野生型 SC5314 (*REP4/REP4*)；編號 3 為 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC32；編號 4 為 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株 WJC67；編號 5 為 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC41；編號 6 為 *rep4/rep4::REP4* 單套基因置入補救株 WJC73；編號 7 為 *REP4* 基因過度表現株 WJC44 (*rep4/TR::REP4*)。+serum 表加入 4% 胎牛血清；-serum 表未加。

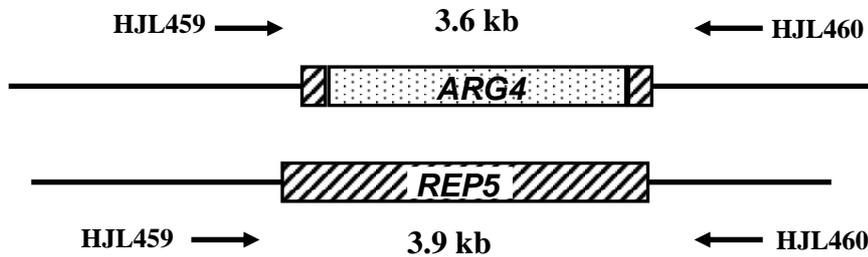


圖十九.芽管試驗(germ tube assay)。

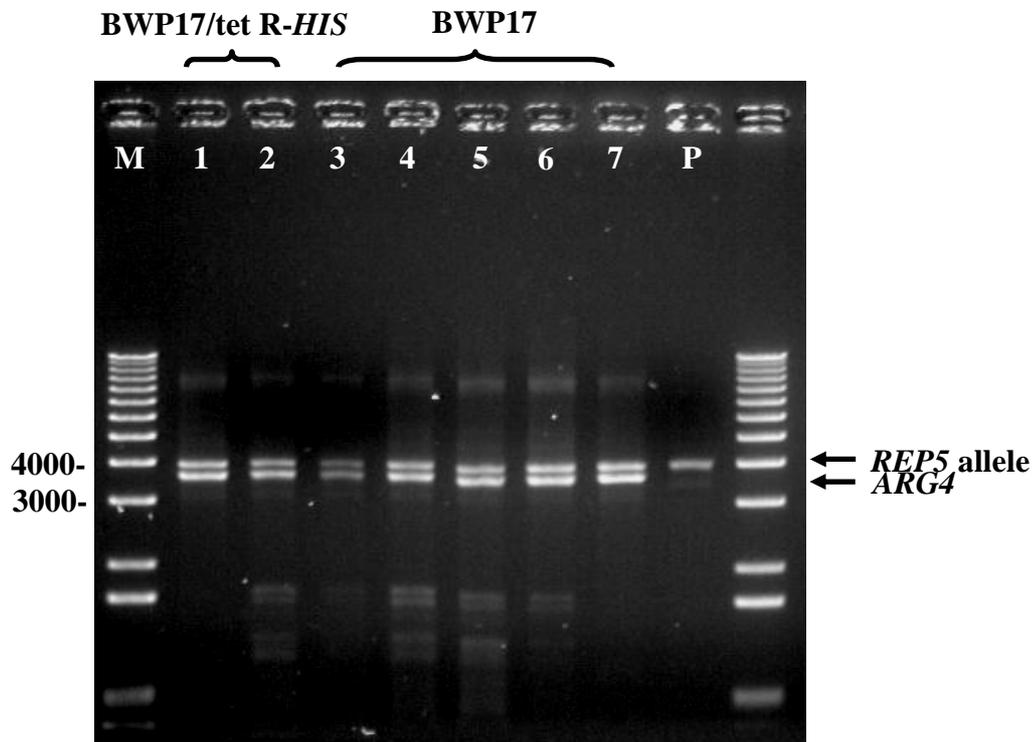
菌株之基因型列於各圖左方或右方。將不同菌株接種於BHI培養液，並加入10%胎牛血清誘發芽管型成，於37 °C反應3小時後以放大倍率400倍之倒立顯微鏡所觀察之結果。

— 相當於10 μm。

(A)



(B)

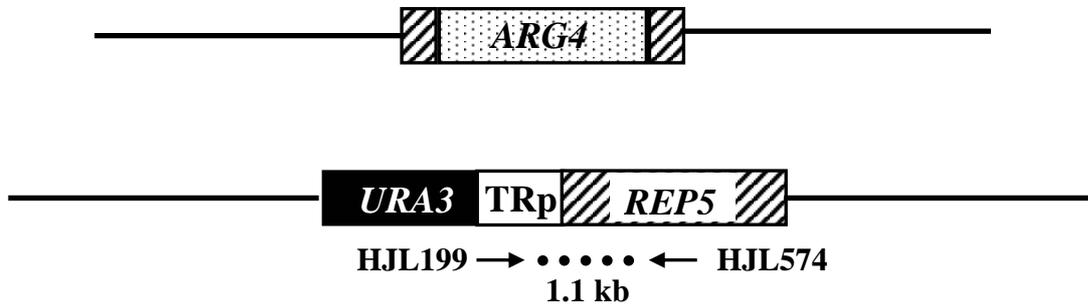


圖二十. 聚合酶連鎖反應確認正確的 *REP5/rep5* 異型缺陷突變株。

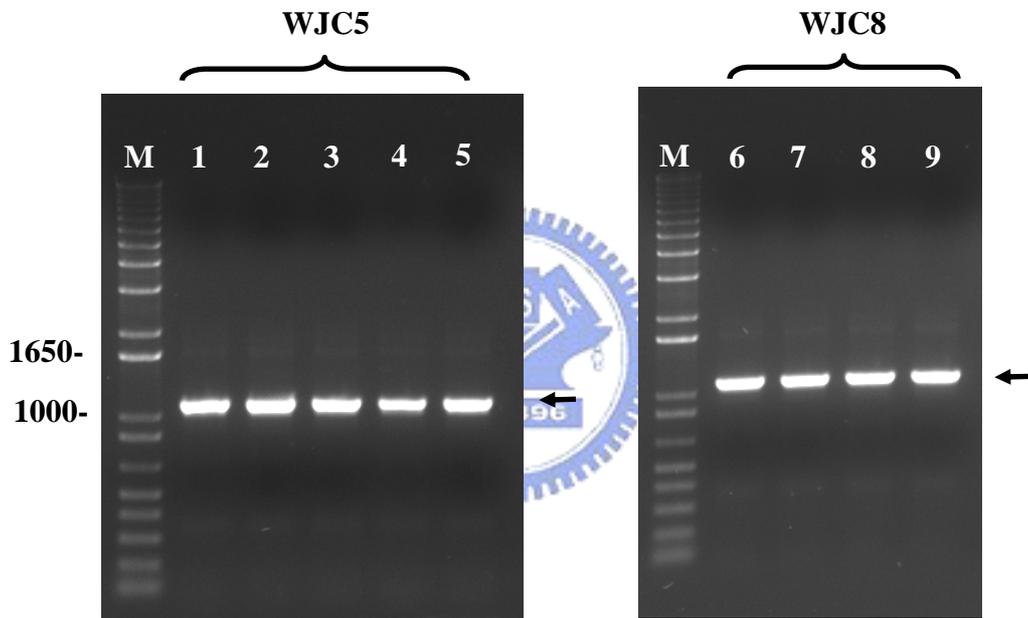
(A) 利用引子 HJL459 及 HJL460 進行聚合酶連鎖反應示意圖。箭頭所指為引子於染色體 DNA 中的位置。

(B) 聚合酶連鎖反應結果。M, 1 kb plus DNA ladder ; 1 ~ 2 , 將 *ARG4* cassette 轉形至 BWP17/tet R-*HIS1* 後所得到的轉形株; 3 ~ 7 轉形至 BWP17 後所得到的轉形株; P 為野生菌株 SC5314 染色體 DNA 以引子 HJL459 及 HJL460 進行聚合酶連鎖反應結果。圖右方箭頭所指為聚合酶連鎖反應產物位置，大小和預期相符合。

(A)



(B)

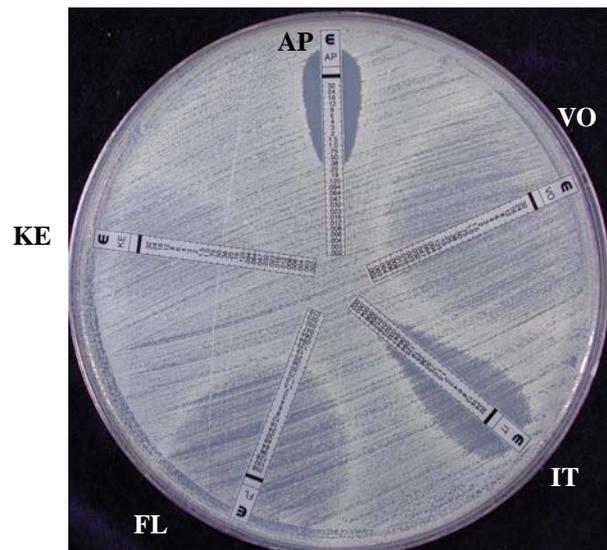


圖二十一.聚合酶連鎖反應確認 *REP5* 四環黴素調控表現系統之建立。

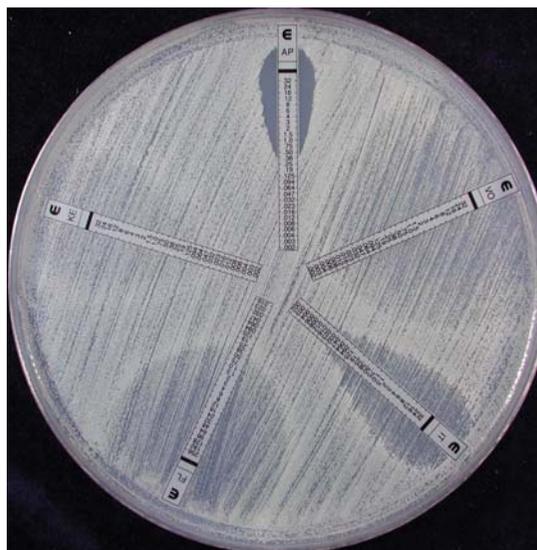
(A) 利用引子 HJL199 及 HJL574 進行聚合酶連鎖反應示意圖。箭頭所指為引子於染色體 DNA 中的位置。

(B) 聚合酶連鎖反應結果。M: 1 kb plus DNA ladder。1 ~ 5 為將 TR 啟動子轉形至 WJC5(BWP17/tet R-*HIS1*/*REP5*/*rep5*::*ARG4*)所得到的轉形株。6 ~ 9 為轉形至 WJC8(BWP17/tet R-*HIS1*/*REP5*/*rep5*::*ARG4*)所得到的轉形株。圖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 1.1 kb。

SC5314 (*REP5/REP5*)



***rep5/ TR::REP5* (WJC58)**

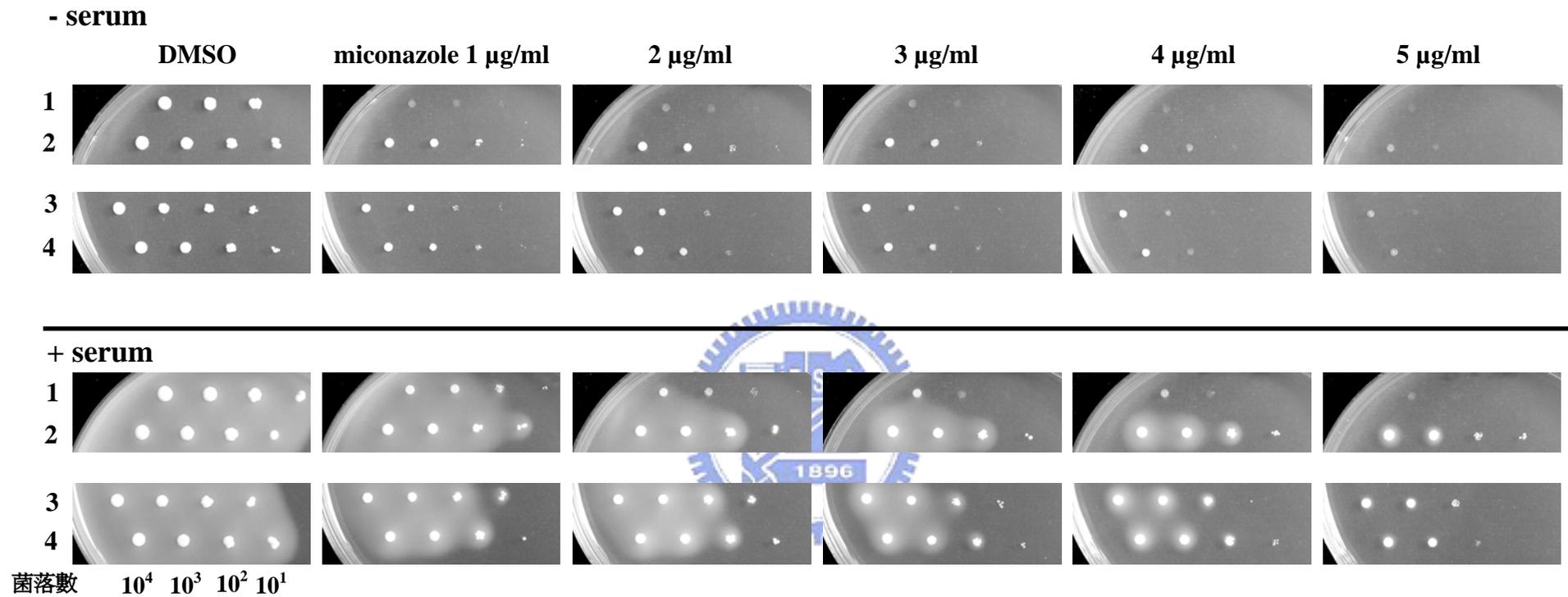


***rep5/ TR::REP5*(WJC63)**



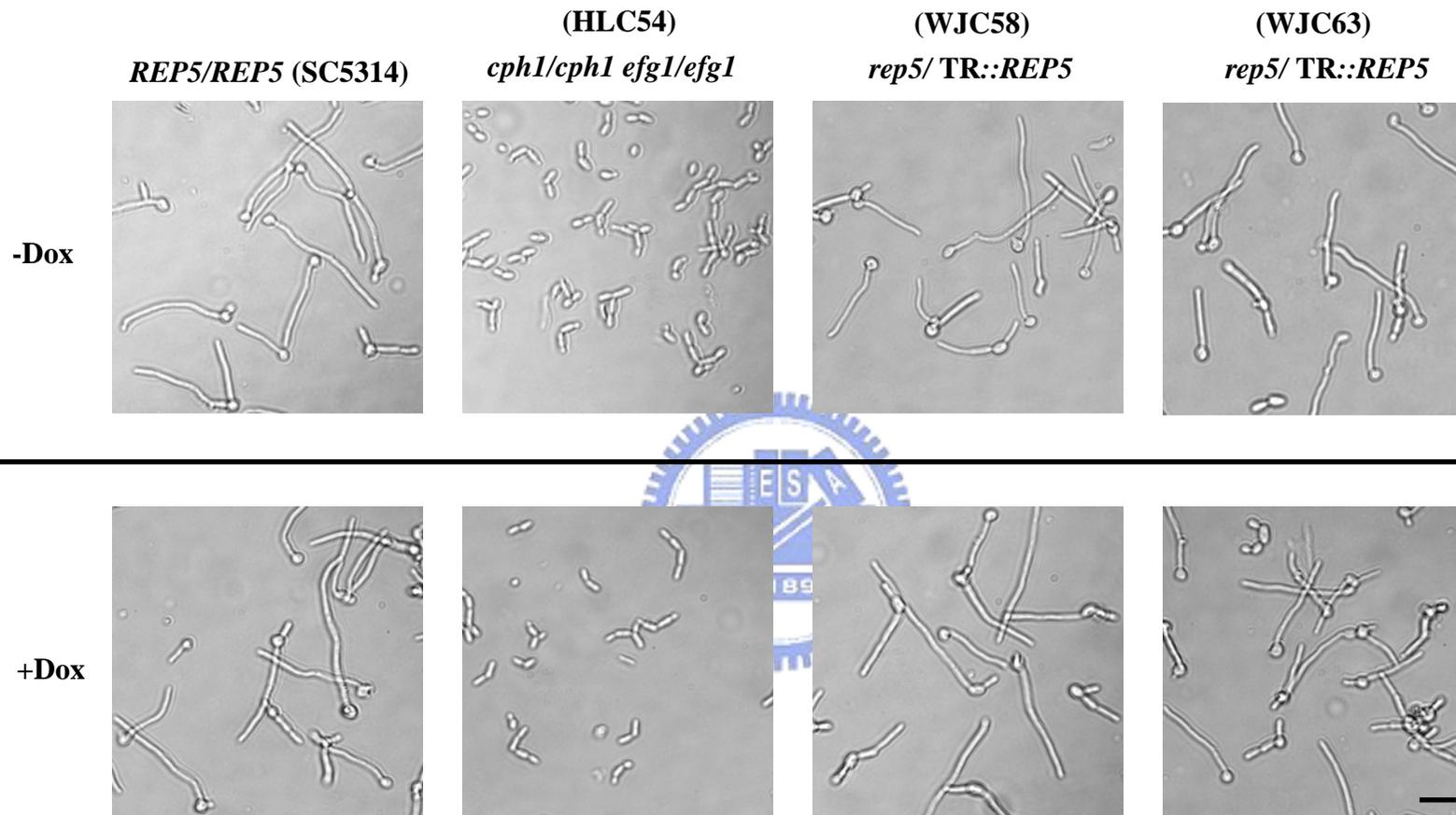
圖二十二.*REP5* 基因過度表現不會影響藥物敏感性試驗(Etest)結果。

此圖為培養於 SD 培養基 35 °C，48 小時後之結果。各基因型皆標示於圖上方。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)。



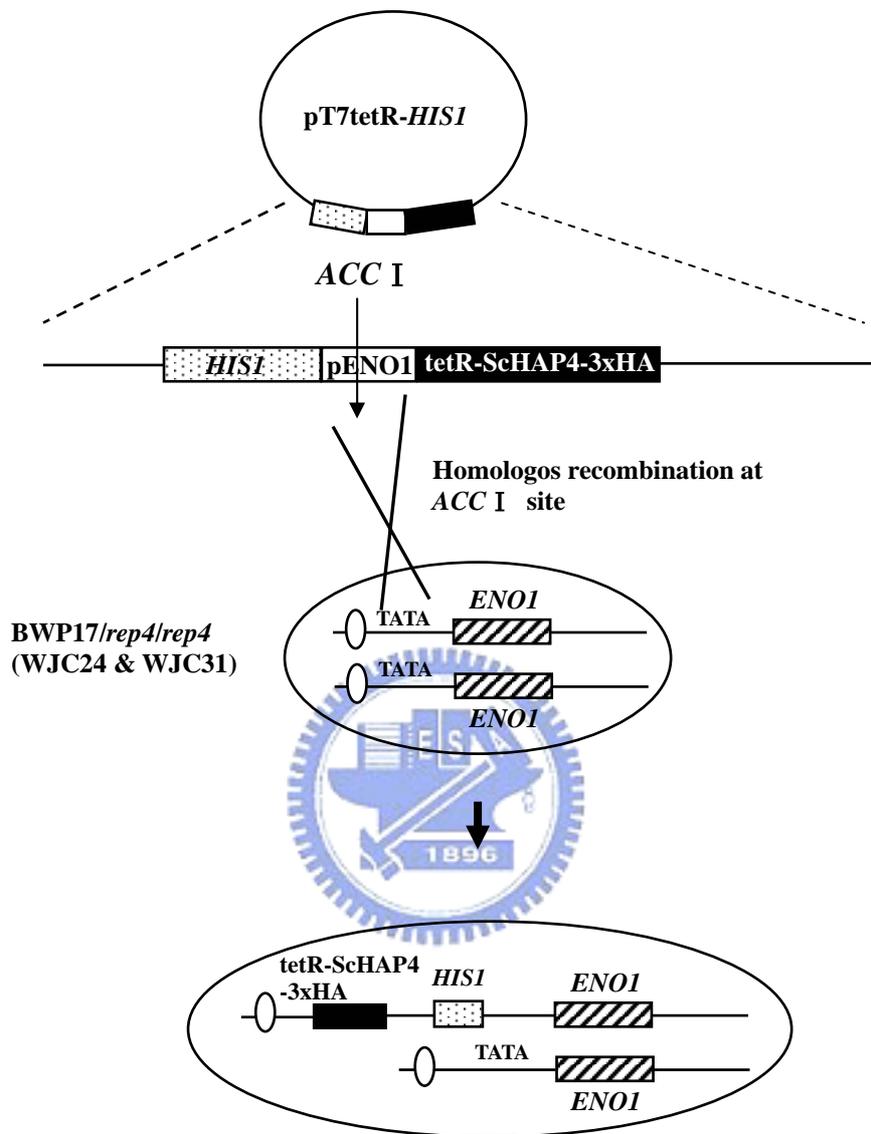
圖二十三. *REP5* TetR 調控株在不加 doxycycline 下(基因過度表現)之 agar dilution assay 結果。

所有菌株皆培養於含特定濃度之 miconazole(如各圖上方標示)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。圖下方標示為每點相對之菌落數。圖左方編號 1 為 *cdr1/cdr1* 同型缺陷突變株(DSY448)；編號 2 為野生型 SC5314(*REP5/REP5*)；編號 3 為 *REP5* 基因過度表現株 WJC58；編號 4 為 *REP5* 基因過度表現株 WJC63。+serum 表示加入 4 % 胎牛血清；-serum 表示未加。



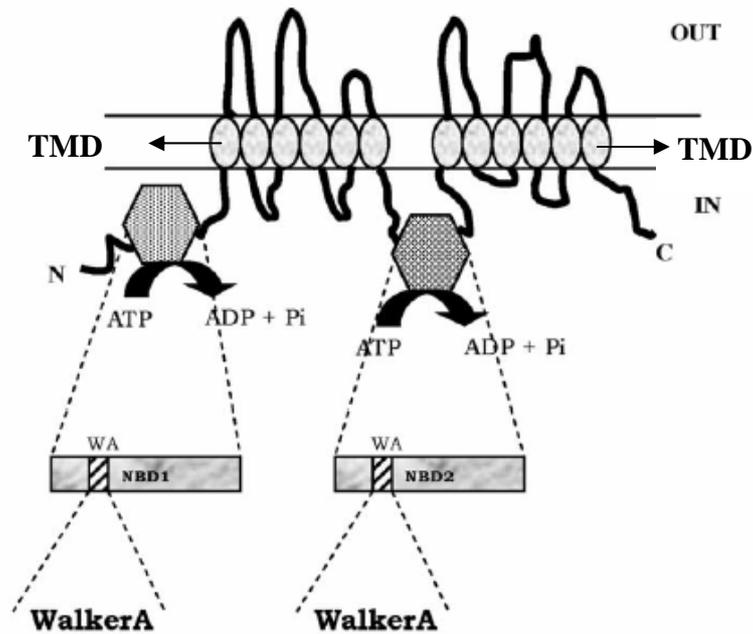
圖二十四. 抑制 *REP5* 基因表現不會影響芽管生成

菌株之基因型列於圖上方。將不同菌株接種於BHI培養液，於37 °C反應3小時後以400倍倒立顯微鏡所觀察之結果。+Dox表示加入20 μg/ml的doxycycline；-Dox表未加。—：相當於10 μm。



圖二十六. *HIS1* 基因轉形至 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC24 和 WJC31 示意圖。
 pT7tetR-*HIS1* 為帶有欲轉形之 *HIS1* 標誌的質體。利用 ACC I 將 pT7tetR-*HIS1* 切割成直線狀(linear form)後轉形至 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株 WJC24 及 WJC31 內，產生 *HIS*⁺ 的 *rep4/rep4* 同型缺陷突變株。

附錄一



附錄一. Cdr1p 結構示意圖(topological model)。 (Sudhakar et al., 2004)

Cdr1p 主要由兩個跨膜區域(transmembrane domain, TMD)與兩個核苷酸結合區域(nucleotide-binding domains, NBD)所構成。每一個 TMD 包含 6 個 α 螺旋(α -helices)跨膜區段(transmembrane segment)(圖上所示的 \bigcirc)。WA, WalkerA 為 NBD 當中的特殊 motif，研究指出 WalkerA motif 和 ATP 水解(ATP hydrolysis)功能有關。