

國立交通大學

生化工程研究所

碩士論文

白色念珠菌之致病力/型態變化及抗藥性可經由  
麥角固醇生合成及醣解酵素基因進行協同調控

Linking morphology/virulence and drug resistance  
via ergosterol biosynthesis and glycolysis pathways  
in *Candida albicans*

研究生：蕭婷尹

指導教授：楊昀良 博士

中華民國九十五年七月

白色念珠菌之致病力/型態變化及抗藥性可經由  
麥角固醇生合成及醣解酵素基因進行協同調控

Linking morphology/virulence and drug resistance via  
ergosterol biosynthesis and glycolysis pathways  
in *Candida albicans*

研究生：蕭婷尹

Student : Ting-Yin Hsiao

指導教授：楊昫良

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang



碩士論文

A Thesis

Submitted to Institute of Biochemical Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Biochemical Engineering

July 2006

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

白色念珠菌之致病力/型態變化及抗藥性可經由麥角固醇生合成  
及醣解酵素基因進行協同調控

研究生：蕭婷尹

指導教授：楊昫良 博士

國立交通大學生化工程所 碩士班

摘要

白色念珠菌是一種伺機性病原菌。在探討致病力的實驗中發現，*EFG1* 及 *CPH1* 基因的雙突變株在 *in vitro* 實驗中會失去形成菌絲的能力，且對小鼠是不致病的，因而得知白色念珠菌的致病力與其在酵母菌型與菌絲型之間的型態轉變有關。先前本實驗室利用抑制刪除雜交法 (SSH) 篩選和致病力調控有關的基因時，得到麥角固醇生合成 *ERG3* 和 *ERG11* 基因。有趣的是，這兩個基因的已知功能是影響念珠菌對於藥物的敏感性。本篇論文之第一個研究目標：探究麥角固醇生合成基因是否和致病力及抗藥性途徑皆有關連。實驗策略以北方墨點法分析 *ERG3*、*ERG11* 基因表現量。結果顯示，*ERG3* 和 *ERG11* 在 *efg1/efg1 cph1/cph1* 突變株 (HLC54) 和 *efg1/efg1 CPH1/CPH1* (HLC52) 的 mRNA 表現量大於野生株 (SC5314)。同時也發現白色念珠菌之致病因子 Efg1 會經由負向調控 *ERG3* 基因而改變對真菌藥物的敏感性。再者實驗室曾針對醣解酵素所有生合成途徑進行研究，以北方墨點法檢驗基因之表現，發現其中五個基因 *ENO1*、*TPI1*、*GPM1*、*PYK1*、*PGK1* 其 mRNA 表現量於酵母菌型菌體 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中及長菌絲型菌體 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*) 中不同。因此，本篇論文之第二研究目標：經由北方墨點法瞭解此五個醣解酵素基因是否和致病力/型態變化及抗藥性途徑皆有關連。結果顯示，*TPI1*、*GPM1*、*PYK1*、*PGK1* 之表現皆可同時受血清及藥物所影響。為進一步探討其機制，並且選擇 *TPI1* 以同源重組的方式將四環黴素調控表現系統置入其啟動子區域作基因功能之研究，目前已知，*TPI1* 與型態變化、細胞生長有關，但和抗藥性途徑的關係仍有待探討。

Linking morphology/virulence and drug resistance via ergosterol biosynthesis and glycolysis pathways in *Candida albicans*

Student: Ting-Yin Hsaio

Adviser: Dr. Yun-Liang Yang

Institute of Biochemical Engineering

National Chiao Tung University

ABSTRACT

*Candida albicans* is an opportunistic fungal pathogen in humans. It has been reported that the *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant of *C. albicans* is defective in filamentous growth and is also avirulent in a mouse model. The ability of *C. albicans* to switch between a yeast form and a filamentous form has been implicated in its virulence. Previous comparative genomics studies have profiled the expression differences between the wide-type and the *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant strains by the method of Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and sequence analysis. Two ergosterol genes, *ERG3* and *ERG11*, were isolated. Mutations in *ERG3* or *ERG11* can alter the susceptibility of antifungal drugs in *Candida albicans*. Therefore, the first aim of this study was to investigate the coordination of morphogenesis/ virulence and drug resistance via ergosterol biosynthesis genes. The mRNA expression levels of these two genes were assessed by northern blot analysis. The results shown that the mRNA levels of *ERG3* and *ERG11* were higher in the *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant and *CPH1/CPH1 efg1/efg1* mutant than that in the wild-type cells, suggesting a negative regulation of *ERGs* by *EFG1*. And it has been proven that in addition to virulence, Efg1 was also involved in drug resistance by negatively regulating *ERG3* of the ergosterol biosynthesis pathway in *C. albicans*.

Furthermore a previous study has shown that *ENO1*、*TPII*、*GPM1*、*PYK1* and *PGK1* of glycolytic genes expressed differently in *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant and in wide-type strain. Thus, investigating the linkage of morphogenesis/virulence and drug resistance via glycolysis genes was the other purpose of this study. The results indicated that the expressions of *TPII*, *GPM1*, *PYK1* and *PGK1* could be affected by the presence of goat serum and antifungal drug. Besides, *TPII* gene was subjected to genetic study by introduction of tetracycline-regulated system. These results indicated that *TPII* gene was associated with morphogenesis and also involved in cell growth. Whether *TPII* gene is involved in drug resistance will require further studies.

## 誌謝

三年來的研究所生涯結束了，人生新的旅程緊接著展開。回首過去，從大學時期的專題到研究所碩士論文的完成，幫助我最大的莫過於指導教授楊昀良老師。由於老師一路上耐心指導與寬容接納我的不足，讓我明白如何精準地表達學術用語以及培養我組織化與解決問題的能力，甚至在最後一個階段仍細心地修改我的碩士論文，協助我釐清概念及邏輯。同時，也感謝口試委員林苕吟老師與藍忠昱老師在口試及論文修改上給予了諸多寶貴的意見，受益良多。在此，衷心地感謝老師們對我的用心栽培。

實驗室的生活，時而振奮人心，時而低落，每當遇到困難時，所幸周遭有著一群彼此加油打氣、互相切磋的好夥伴。早在還沒進研究所前，已接受到采瑜學姐、明浩學長、美惠學姐、雅文學姐等的溫暖關懷。碩一時，杏芳學姐帶著我學習北方墨點法的技術，雅文學姐更是我時常請益的對象。實驗室生活中，出現了四位好同學：我的好姊妹柏吟、細心且好脾氣的建峯、活潑的馥嘉、專業且認真的宛真。碩二時，實驗室來了學弟妹：口條清晰且做事俐落的怡瑾、聰明且洋派的歐陽、為人客氣的志豪、幽默風趣的杏枚。爾後，又有金蓉、育穎、欣彬加入研究所行列。當然，實驗室少不了一群年輕又有朝氣的專題生：逸修、政毅、虹綾、志轅、欣悟、曜禎、大馨、瀨云、佳叡、萍芳、伯伶、宗翰等。因為這一群人，使得實驗室充斥著一股陽光的氣氛。在此，我要感謝所有的人，因為你們讓我的研究所生活更加精彩！

最後，也要謝謝在初踏入生科研究領域的專題生時期，所接觸到的良師與益友們：國衛院羅秀蓉老師、逢叡、佳君學姐、大勳等的指導，啟蒙了我對生科的熱忱。還有一路走來，陪伴著我的社團老師、同學和親愛的家人，爸媽的支持，兄弟姐妹的關心與照顧。甚至是在我研究所階段離開人世間的爺爺、奶奶，我知道，不管你們在哪，依然會眷顧著我。

面對未來，我相信這三年所學的必定可學以致用，正因為有大家的支持與協助，它將成為我人生旅途中美麗的瑰章。

# 目錄

	頁次
中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	iv
圖表目錄.....	viii
附圖目錄.....	x
一、緒論.....	1
1.1 白色念珠菌.....	1
1.2 致病因子.....	2
1.3 真菌藥物種類及抗藥機制.....	6
1.4 研究緣起及目的.....	11
二、材料.....	13
2.1 菌株.....	13
2.2 質體.....	14
2.3 引子.....	14
2.4 藥品試劑.....	16
2.5 緩衝溶液及溶劑.....	18
2.6 培養基配製.....	20
2.7 儀器設備.....	21
三、方法.....	22
3.1 北方墨點法.....	22
3.1.1 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling) .....	22
3.1.1.1 Random-priming DIG labeling.....	22
3.1.1.2 PCR DIG labeling.....	22
3.1.2 真菌培養.....	23

3.1.2.1 加血清誘導培養.....	23
3.1.2.2 加抗真菌藥物誘導培養.....	23
3.1.3 萃取 RNA (RNA extraction) .....	24
3.1.4 轉漬 RNA (Transfer) .....	25
3.1.5 雜交反應 (Hybridization) .....	26
3.1.6 偵測 (Detection) .....	26
3.1.7 定量.....	26
3.2 檢查 <i>TPII</i> 單套基因(Heterozygous knockout)破壞株.....	27
3.2.1 抽取染色體 DNA.....	27
3.2.2 利用 PCR 檢查 <i>TPII</i> 單套基因(Heterozygous knockout)破壞株.....	27
3.3 於 <i>TPII</i> 置入四環黴素調控系統.....	28
3.3.1 限制酶切割反應.....	28
3.3.2 進行白色念珠菌轉形作用.....	28
3.3.3 抽取染色體 DNA.....	28
3.3.4 PCR 確認 TR 系統之突變株.....	29
3.4 性狀分析.....	29
3.4.1 觀察突變株生長曲線.....	29
3.4.2 菌落生長情形.....	30
3.4.3 觀察單一菌落生長情形.....	30
3.4.4 芽管試驗.....	30
3.4.5 觀察增長型菌絲實驗.....	30
3.4.6 觀察菌株於含 4%血清 Bacto-agar 培養皿的生長情形.....	30
3.4.7 侵犯力分析(Invasion assay).....	30
四、結果.....	32
4.1 北方墨點法分析抗藥性基因於誘導生長菌絲環境下的表現量.....	32
4.1.1 <i>ERG3</i> 之基因表現量.....	32
4.1.2 <i>ERG11</i> 之基因表現量.....	32

4.2 醣解酵素基因之北方墨點法.....	33
4.2.1 <i>ENO1</i> 之基因表現量.....	33
4.2.1.1 <i>ENO1</i> 於誘導菌絲生長環境中之北方墨點法結果.....	33
4.2.1.2 <i>ENO1</i> 於誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果.....	34
4.2.2 <i>TPII</i> 之基因表現量.....	34
4.2.2.1 <i>TPII</i> 於誘導菌絲生長環境中之北方墨點法結果.....	34
4.2.2.2 <i>TPII</i> 於誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果.....	34
4.2.3 <i>GPM1</i> 之基因表現量.....	35
4.2.3.1 <i>GPM1</i> 於誘導菌絲生長環境中之北方墨點法結果.....	35
4.2.3.2 <i>GPM1</i> 於誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果.....	35
4.2.4 <i>PYK1</i> 之基因表現量.....	35
4.2.4.1 <i>PYK1</i> 誘導菌絲生長環境中之北方墨點法結果.....	35
4.2.4.2 <i>PYK1</i> 誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果.....	35
4.2.5 <i>PGK1</i> 之基因表現量.....	36
4.2.5.1 <i>PGK1</i> 於誘導菌絲生長環境中之北方墨點法結果.....	36
4.2.5.2 <i>PGK1</i> 於誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果.....	36
4.3 目標基因 <i>TPII</i> 的突變.....	36
4.3.1 確認 <i>TPII</i> 單套突變株的正確性.....	36
4.3.2 <i>TPII</i> 四環黴素調控表現系統突變株之建構.....	37
4.3.2.1 限制酶反應製備帶有 <i>TPII</i> 同源序列、TR promoter 及 <i>URA3</i> 篩選標記.....	37
4.3.2.2 以 PCR 確認 TR promoter 及 <i>URA3</i> 標記是否置入 (knockin) <i>TPII</i> 基因.....	37
4.4 <i>TPI</i> 突變株的性狀分析.....	38
4.4.1 觀察生長曲線.....	38
4.4.2 觀察菌落生長情形.....	39
4.4.3 觀察單一菌落的型態.....	39

4.4.4 芽管試驗 ( Germ tube assay ) .....	39
4.4.5 觀察增長型菌絲實驗.....	39
4.4.6 觀察菌株於含 4%血清 Bacto-agar 培養皿上的生長情形.....	40
4.4.7 侵犯力分析(Invasion assay).....	40
五、討論.....	41
5.1 初步證實白色念珠菌中，抗藥性和致病性途徑的相關連.....	41
5.2 分析醣解酵素基因生理功能具有抗藥性改變和型態變化.....	42
5.2.1 北方墨點法分析 <i>ENO1</i> 基因表現量之探討.....	43
5.2.2 北方墨點法分析 <i>TPI1</i> 基因表現量之探討.....	45
5.2.3 北方墨點法分析 <i>GPM1</i> 基因表現量之探討.....	46
5.2.4 北方墨點法分析 <i>PYK1</i> 基因表現量之探討.....	47
5.2.5 北方墨點法分析 <i>PGK1</i> 基因表現量之探討.....	49
5.3 <i>TPI1</i> 基因性狀分析之探討.....	50
5.3.1 生長情形之探討.....	50
5.3.2 型態變化之探討.....	50
5.4 未來展望.....	52
六、參考文獻.....	53
圖表.....	65
附圖.....	96
簡歷.....	101

## 圖表目錄

	頁次
表一、白色念珠菌之麥角固醇生合成基因功能整理表.....	66
表二、醣解酵素基因分別於YPD + goat serum (+S)及YPD + Drug環境中的表現.....	69
表三、Efg1之consensus binding sequence和 <i>ERG3</i> 之promoter region比對的結果.....	70
表四、Efg1之consensus binding sequence和 <i>ERG11</i> 之promoter region比對的結果.....	72
圖一、 <i>ERG3</i> 的北方墨點法.....	74
圖二、 <i>ERG11</i> 的北方墨點法.....	75
圖三、 <i>ERG3</i> 、 <i>ERG11</i> 涉及抗藥性及型態變化的可能途徑.....	75
圖四、 <i>ENO1</i> 於血清誘導培養下之北方墨點法結果.....	76
圖五、 <i>ENO1</i> 於藥物誘導培養下之北方墨點法結果.....	76
圖六、 <i>TPI1</i> 於血清誘導培養下之北方墨點法結果.....	77
圖七、 <i>TPI1</i> 於藥物誘導培養下之北方墨點法結果.....	77
圖八、 <i>GPM1</i> 於血清誘導培養下之北方墨點法結果.....	78
圖九、 <i>GPM1</i> 於藥物誘導培養下之北方墨點法結果.....	78
圖十、 <i>PYK1</i> 於血清誘導培養下之北方墨點法結果.....	79
圖十一、 <i>PYK1</i> 於藥物誘導培養下之北方墨點法結果.....	79
圖十二、 <i>PGK1</i> 於血清誘導培養下之北方墨點法結果.....	80
圖十三、 <i>PGK1</i> 於藥物誘導培養下之北方墨點法結果.....	80
圖十四、 <i>ENO1</i> 、 <i>TPI1</i> 調控途徑示意圖.....	81
圖十五、 <i>GPM1</i> 、 <i>PYK1</i> 、 <i>PGK1</i> 調控途徑示意圖.....	82
圖十六、確認 <i>TPI1</i> 單套基因突變株正確性之PCR之引子設計圖.....	83
圖十七、PCR確認 <i>TPI1</i> 單套基因突變株之結果.....	83

圖十八、建構 <i>TPII</i> 四環黴素調控系統示意圖.....	84
圖十九、確認四環黴素調控之突變株之引子設計圖.....	85
圖二十、PCR 結果之電泳圖.....	85
圖二十一、進一步確認四環黴素調控系統正確性的 PCR 引子設計圖.....	86
圖二十二、PCR 結果之電泳圖.....	86
圖二十三、用於確認 BWP17/tetR 中的 <i>TPII</i> 之 TR construction 的 PCR 之引子設計圖.....	87
圖二十四、PCR 結果電泳圖.....	87
圖二十五、 <i>TPII</i> 突變株之生長情形.....	88
圖二十六、觀察 <i>tpi1/TPII::TR</i> 突變株於 YPD 固態培養皿上的生長情形...	89
圖二十七、觀察 <i>tpi1/TPII::TR</i> 突變株於 SD 固態培養皿上的生長情形.....	90
圖二十八、觀察 <i>tpi1/TPII::TR</i> 突變株單一菌落型態變化.....	91
圖二十九、Germ tube assay.....	92
圖三十、在含山羊血清中之 YPD 培養液中的生長.....	94
圖三十一、突變株於含 4% 血清 Bacto-agar 培養皿上的菌落型態.....	95
圖三十二、侵犯力實驗.....	96

## 附圖目錄

	頁次
附圖一、白色念珠菌麥角固醇合成途徑.....	97
附圖二、白色念珠菌醱解作用.....	98
附圖三、建構四環黴素調控表現系統之示意圖.....	99
附圖四、白色念珠菌之 <i>EFG1</i> 的 null mutation 會增加菌體對藥物的敏感性 .....	100



# 第一章、緒論

## 1.1 白色念珠菌

白色念珠菌，為具有多型態的真菌，可以酵母菌 (yeast form)、假菌絲 (pseudohyphae)、菌絲 (hyphae) 型態存在。從人類小嬰兒期，便存在人體的表面皮膚、腸道、陰道以及口腔內等黏膜組織。正常情況下，為人體內的正常菌叢，但當人體的抵抗力降低了，或是念珠菌的數量增加太多的時候，就會成為致病菌，造成各種疾病，即是所謂的『伺機性致病菌』。然而，念珠菌 (*Candida species*) 在 1960 年代以前是人類感染疾病中罕見的致病菌 (陳宜君, 2003)，但隨著醫療科技的發達，治療方式的改變，或者，因疾病造成免疫系統變弱，使得病例增加，例如：癌症治療、器官或骨髓移植或 AIDS 等 (Marr, et al., 1998)，促使院內真菌感染的比率在近年來不斷地升高。在台灣，目前院內感染的統計，真菌培養後分離出之菌種中白色念珠菌 (*Candida albicans*) 所佔比例至少約一半且可高達 60% (Hsueh, et al., 2002)。念珠菌感染的影響除了高死亡率外 ((Barelle, et al., 2003)，通常造成病患住院時間延長，增加醫療成本的負荷。

雖然白色念珠菌成為近年來院內感染的主要致病菌之一 (Chen, et al., 1997)，然而，目前可用以治療真菌的藥物不多，且有某些真菌治療效果不佳、抗藥性問題亦日漸增加及具有副作用等問題 (White, et al., 1998)，暴露出治療真菌感染的危機。所以，了解其致病因子 (virulence factor) 及抗藥機制，作為尋找新藥物目標 (drug target) 的契機，盼能發展出更有效、低副作用、藥效性長的藥物，是目前發展的方向之一。

## 1.2 致病因子

念珠菌感染的致病因子，目前所知，可略分為四類：第一、當環境改變時，念珠菌產生菌絲（hyphal formation）的細胞型態變化；第二、念珠菌於宿主細胞產生黏附；第三、分解蛋白酶的分泌(Haynes, 2001)；第四、念珠菌其平滑白色的 white phase(W)和 opaque phase (O)之間的 phenotypic switching(Lan, et al., 2002; Slutsky, et al., 1987)。以下簡介這些因素：

### 1. 菌絲生長

白色念珠菌為多種型態之菌體，隨著環境的改變，可以轉變於酵母菌型（yeast form）、真菌絲（hyphae）、假菌絲（pseudohyphae）之間，惟真菌絲和假菌絲之間的關係仍未清楚明瞭。但已經知道在細胞週期中，它們型態明顯不同；真菌絲是由酵母菌狀細胞以芽管(germ tube)的方式繼續往外生長，且隔膜緊跟著延伸而逐漸形成；而假菌絲的形狀相較於延展中的細胞來的小，比真菌絲多一層隔膜(Merson-Davies and Odds, 1989)，其隔膜未隨菌體延伸，在倒立式顯微鏡下觀察，看起來就像是一條條的臘腸相連在一起。

如上所述，在環境的轉變下，白色念珠菌可從單細胞的酵母菌型轉變為多細胞菌絲型。早先由於發現菌絲細胞藉由菌絲可以較快的速度黏附及入侵寄主細胞，由此推測白色念珠菌可能藉此促進其致病力(Leberer, et al., 1997)。近來，已發現白色念珠菌隨著不同環境做改變所產生的型態變化時，細胞體內有些轉錄訊號在此扮演重要角色，白色念珠菌中的 *CPH1*、*HST7*、*CST20* 基因產物同源(homologous)於 *S.cerevisiae* 中的 *STE12*、*STE7*、*STE20*，而進一步發現，在白色念珠菌中突變任何一個上述基因，都會明顯地影響菌絲的生長，也損害血清誘導所長出的 germ tube 及菌絲的形成(Liu, et al., 1994)。另外，研究發現白色念珠菌  $\Delta efg1/\Delta efg1$  突變株在小鼠中會降低致病力(Lo, et al., 1997)，可能是因為入侵表皮細胞的能力降低的結果

(Weide and Ernst, 1999)。 *EFG1* 為白色念珠菌 transcription factor，具有 helix-loop-helix motif，和 Myc 相似，其過度表現會誘導酵母菌(在 *S.cerevisiae* 中，此基因稱為 *PHD1*)和白色念珠菌假菌絲的生長，所以是正向調控型態變化(Stoldt, et al., 1997)。當 *EFG1* 和 *CPH1* 同時被剔除掉時，會破壞菌絲生長的能力，且無法在巨噬細胞的攻擊下生存(Lo, et al., 1997)，也使得念珠菌在小鼠模式中沒有致病力。然而，隨後之研究指出 *cph1/cph1 efg1/efg1* 突變株於 *in vivo* 下仍可長出菌絲，造成輕微的鵝口瘡、眼睛表皮細胞損害、colonize 在免疫不全 gnotobiotic piglet 的舌頭上(Riggall, et al., 1999)，所以 Cph1p 及 Efg1p 是白色念珠菌中促進菌絲生長的獨立途徑(Riggall, et al., 1999)，但並未包括所有途徑。例如：*TUP1* 則是個型態變化的負向調控子(Braun and Johnson, 1997)，其  $\Delta tup1/\Delta tup1$  突變株會促使菌株之菌絲生長，致病力變弱、小鼠致死率減低(Braun, et al., 2000)。由以上文獻回顧可知，在菌絲及酵母菌型態間轉換的能力是致病力的關鍵。

## 2、黏附作用

附著至宿主組織上，避免被宿主免疫防禦系統消滅，為一般病菌入侵宿主的首要侵略步驟，白色念珠菌也不例外，當其散佈於寄主血液中，會藉由黏附於血管內襯的表皮細胞，進而入侵組織(Filler, et al., 1996)，而此黏附作用主要受由專一性的黏著素 (adhesin) 和接受器 (receptor) 的交互作用所調控。於 1991 年，已知 *Candida albicans* 及 *Candida tropicalis* (Asakura, et al., 1991)，在活體外測試時，其黏附宿主細胞的能力遠大於非致病性微生物。研究報告指出，當白色念珠菌在活體外時，減低其黏附能力時，也會破壞其感染動物 (animal models) 的能力(Calderone and Fonzi, 2001)，且當此菌體具有較高黏附口腔黏膜細胞的能力，及可以產生更多的細胞外基質蛋白分解酶時，也會提升白色念珠菌在小老鼠體 (mouse model) 內的致死率(Ghannoum and Abu Elteen, 1986)。

至於在作用機制方面的瞭解，已知念珠菌會與含有 RGD (Arg—Gly—Asp) motif 的蛋白質有相互作用，例如：纖維黏連蛋白 (fibronectin) 及 iC3b (Hostetter, 2000)，白色念珠菌的 Int1p 便有這樣的功能。*INT1* 的基因產物為真菌細胞表面成分，為一種 iC3b-binding RGD 蛋白質，和哺乳類動物所具有的黏連蛋白 (integrins) 相似，*INT1* 在 *S. cerevisiae* 中表現時，可以誘導凝結作用的產生 (aggregation) (Gale, et al., 1996)，並且刺激類似 germ tube 的管狀物生成，這些結果，足以引導在一般狀態下不具有黏附力的酵母菌型細胞，產生黏附力，附著到人體的上皮細胞上 (Gale, et al., 1998)。而在白色念珠菌中，*INT1* 基因的剔除，則導致念珠菌在某些培養基中產生型態變化，抑制了菌絲的生成、減低黏附力及在小老鼠體內的致病力 (Gale, et al., 1998)。另外，在白色念珠菌上，有一群蛋白具有的特性類似 *S. cerevisiae* 的細胞表面黏附糖蛋白的 Agglutinin-like sequence (ALS) (Hoyer, et al., 1995; Lipke, et al., 1989)，這些蛋白後來被發現會造成黏附作用，而稱為 ALS 蛋白質 (Fu, et al., 1998)。的確，黏附作用會造成感染宿主的機會增加，但和致病過程之間的關連尚未明確。

當白色念珠菌要侵入寄主時，其細胞壁也發生重大改變，因為細胞壁的功能主要展現於保護細胞、生長作用所需及對抗滲透性外力有關，當細胞表面的配體 (ligands) 或菌體的表面分子 (biomolecules) 和受體 (receptors) 交互作用時，會促進其對於宿主細胞及組織的植入 (Braun and Johnson, 1997)，而這些生物分子多由多醣類 (polysaccharides) 或糖蛋白 (glycoprotein) 組成，能與宿主的內皮細胞或細胞外基質蛋白 (extracellular matrix protein; ECM protein) 結合，達到附著的目的。

### 3、 蛋白分解酶 (Secreted factors)

白色念珠菌中已知和致病力有關的水解酵素有：Secreted aspartic proteinase (SAPs)、phospholipases、lipase 等。SAPs 至少由九個 member 組

成(Hube, et al., 1994; Magee, et al., 1993; Monod, et al., 1998; Monod, et al., 1994)。它們在不同的環境之下可能會表現不同的 member，例如：*SAP2* 在酸性 pH 值下表現，*SAP4-6* 在中性 pH 值下表現(Hube, et al., 1994; Schaller, et al., 1999; Schaller, et al., 1998)。另外，SAPs 各個 member 結合起來的功能為促進念珠菌具有致病力的主要驅動力，如 *SAP2p* 是負責入侵步驟使菌體得以穿越內皮層的屏障(Ibrahim, et al., 1998)，也是造成念珠菌在小鼠陰道模式中具有致病力的主因(De Bernardis, et al., 1999)；而 *SAP4p-6p* 扮演逃避巨噬細胞的吞噬作用而使菌體得以生存(Borg-von Zepelin, et al., 1998)；當 *SAPI(PEPI)* 失去表現時，會導致菌體在新生的老鼠皮膚上開始聚集 (colonization)，影響念珠菌入侵寄主能力，導致致病力減低(Hube, et al., 1997)。SAPs 所扮演的酵素生化活性主要在於入侵寄主細胞及疾病的擴散，因為 SAPs 的受質範圍很廣，能分解許多宿主上的蛋白，如：免疫球蛋白、膠原蛋白、白蛋白、血紅素、角質及其他細胞蛋白等(Hube, et al., 1997)。這些受質被分解後，可提供菌體生長養分、避免免疫系統攻擊。

而 Phospholipase 為 *PLBI* 基因產物，研究指出菌體剔除掉 *PLBI* 基因後並不會造成黏附作用的改變，但會減低菌體的侵犯能力，對老鼠的毒性也降低，亦較少引發免疫反應(Leidich, et al., 1998)，但其對人類感染所扮演的角色和功能並未完全清楚。

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

白色念珠菌中，在人體最主要的致病機制為可自發、可逆性且高頻率的發生轉換型態，可分為三種主要的轉換系統，第一、白色念珠菌株 3153A 其型態變化的轉換，可分為七種不同型態間的互換(Soll, 2002; Soll, et al., 1987)。第二、白色念珠菌會從含有濃密的 myceliation 及沒有 mycelation 的菌體間轉換(Soll, et al., 1987)。第三、從病人分離出來的白色念珠菌株 WO-1，可從白色半球型，表面亮滑的菌落型 white(W)轉換成灰色扁平的菌

落型 opaque(O), W/O 的 phenotypic switching 影響到細胞的形狀和大小，而影響到菌絲的形成、細胞表面特性(例如：黏附力、滲透力等)、細胞膜的組成、抗藥物敏感性等性狀特徵(Lan, et al., 2002; Slutsky, et al., 1987)。

### 1.3 真菌藥物種類及抗藥機制

從 1980 年代開始，關於抗真菌藥物的抗藥性問題已大量地被研究，累積了從臨床上、生化、基因觀點的知識，但從分子層次解讀抗真菌藥物問題，在 90 年代才算真正開始，加上目前真菌治療方面的困難，這方面探討將成為被高度重視的研究領域(White, et al., 1998)。本實驗室也致力於此，探討真菌抗藥性問題。接下來，將從目前臨床常用抗真菌藥物的種類與抗藥機制兩方面作概述。

第一部分，就目前臨床真菌用藥可分為三類：Polyenes、ergosterol biosynthesis inhibitors、5-flucytosine。除了 5-flucytosine 之外，其他兩類藥物皆是直接作用在與麥角固醇相關的活性表現及目標上，而麥角固醇為真菌細胞膜上的主要固醇類，其成分和哺乳類細胞的膽固醇相似，扮演維持真菌細胞膜的流動性及完整性，及影響一些膜上酵素其蛋白質功能的穩定性，例如：基丁質合成酶 (chitin synthetase)，其功能為細胞分裂及細胞成長。此三類藥物其作用原理詳述於下：

- 1、 Polyenes：此類藥物主要作用於含麥角固醇的細胞膜上，其常見的藥物包含 amphotericin B (以下簡稱為 AMB)、nystatin，其結構上具有雙極性，一端為親水性、另一端為疏水性，會嵌入細胞膜內，在細胞膜上形成通道，使得細胞膜的質子 (主要是鉀離子梯度) 被破壞。AMB 為一種土壤中的放射線菌 (*Actinomycetes*)，*Streptomyces nodosus* 的醱酵產物，它可和細胞膜上麥角固醇結合，形成孔洞而造成細胞死亡，AMB 也可和哺乳類細胞膜上的膽固醇結合，惟親合力較低，但仍會造成毒性。它也可抑制膜上的酵素來達到作用，如黴菌的 proton APTase 及哺乳類的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

ATPase 等。在體外可在遠低於標準劑量在血或組織中達到的濃度下表現出殺菌性 (fungicidal) 的特性，是一種和濃度有關concentration-dependent 抗生素。(孔祥琪、陳宜君，90年)

2、 Ergosterol biosynthesis inhibitors：麥角固醇生合成途徑，從squalene 經由十種以上的酵素合成到最終產物麥角固醇，此類藥物常見的有 allyamines、thiocarbamates、morpholines、azoles等。這些藥物皆是直接作用在麥角固醇生合成上的酵素，藉由破壞酵素活性而達到抑菌功效。

Allyamines (例如：naftifine、terbinafine) 及thiocarbamates (例如：tolnaftate、tolciclate) 作用在催化squalene產生成2,3-oxidosqualene的酵素 (squalene epoxidase；*ERG1*基因產物) (附圖一) 上。

Morpholines(fenpropimorph、amorolfine)作用於此途徑上的兩個酵素：C-14 sterol reductase(*ERG24*基因產物) (附圖一) 及C-8 sterol isomerase(*ERG2*基因產物) (附圖一)。

Azole 類藥物包括 imidazoles (miconazole, ketoconazole) 和 triazoles (fluconazole, itraconazole)，作用機轉是經由抑制 cytochrome P450系統的酵素14- $\alpha$  demethylase (*ERG11*基因產物) (附圖一)，而抑制黴菌細胞膜上的主要成分麥角脂醇 (ergosterol) 的合成，作用過程主要是使得結合酵素輔酶 (heme) 無法活化氧分子而破壞酵素去甲基化的功能(White, et al., 1998)，當*ERG11*功能被抑制時，其受質lansterol則會受到 $\Delta^{5,6}$ -desaturase(*ERG3*基因產物) (附圖一) 催化行程3,6-diol衍生物，此衍生物大量堆積於體內，造成細胞毒性(Sanglard and Odds, 2002)。而針對azole類藥物產生的抗藥機制，則主要是 (一)、突變造成demethylase的結構型態變化，降低了azole類藥物對於demethylase的親和力。(二)、*ERG11* 基因(demethylase gene)及和藥物幫浦調控基因的過度表現也會造成抗藥性的結果產生。(三)、*ERG3*突變，因此無法進行3,6-diol衍生物之合成。

3、 5-Flucytosine(5-FC)：此類藥物作用機轉完全不同於azole物。Cytosine permease將5-FC帶入細胞內後，被cytosine deaminase作用後，變成5-fluorouracil(FU)，另外，5-FC可專一性作用於真菌，因為哺乳類細胞中只含微量的Cytosine permease，甚至是沒有此類滲透酶。FU再經由細胞內的代謝嘧啶的相關酵素作用後，產生5-fluoro-dUMP(FdUMP)及5-fluoro-UTP(FUTP)，然而，FdUMP可專一性抑制DNA合成中重要酵素(thymidylate synthetase)，FUTP可嵌入RNA分子，透由以上兩步驟達到干擾蛋白質生成。惟因抗藥性問題普遍，在臨床上治療的角色已變的非常輕微。

1950 年代以後，靜脈注射amphotericin B deoxycholate是過去四十年來對於威脅生命之真菌感染的全身性藥物治療的主流，但受限於其和劑量相關的腎毒性，所以此藥通常視為最後防禦線。相對於 AMB 的殺菌性 (fungicidal)，azoles 被認為是一種抑菌性(fungistatic) 的抗真菌藥物。不過利用真菌藥物治療疾病，其宿主的免疫系統必須是健康的，否則會一再復發。所以，並沒有適合的抗真菌藥物以治癒末期愛滋病病人的侵襲性隱球菌 (Cryptococcosis) 感染。目前臨床上仍是大量使用azole藥物，然而因其只能抑菌而非殺菌，造成抗藥性情形與日俱增。

第二部分，關於真菌抗藥性機制方面，抗藥性真菌會利用以下一種或一種以上的機制來達到抗藥目的。已熟知的機制有三個關鍵因素：

第一，減少藥物在體內的累積，這包含了減低藥物的進入和增加藥物的排出，但藥物的進入體內機制未明，而藥物排出是臨床上真菌抗藥最重要的因素之一，目前已知ABC transporter (*CDR1*、*CDR2*) 和major facilitator proteins (*MDR1*)為控制此機制的膜蛋白輸出幫浦 (efflux pumps)，當其大量表現時，會促進藥物的排出(Sanglard, et al., 2003a)。其細胞功能上的差異，ABC transporters包含四個domains，兩個domains貫穿細胞膜，另外兩個

domains為ATP-binding domains，可水解ATP使物質運送(Jenkinson, 1996)，藉此將藥物排出，且大部分的azole藥物均為其受質。在抗藥性方面，已確認與azole類藥物抗藥性有關，臨床上對azole藥物有抗藥性的菌株其*CDR1* mRNA表現量比藥物敏感性菌株來得高(White, 1997)，同時*CDR1*基因缺失會造成對azole藥物的高敏感性，且對terbinafine、amorolfine、一些代謝抑制劑也有相同現象(Sanglard, et al., 1996)。但是突變*CDR1*基因並不影響菌株對amphotericin B或5-flucytosine的敏感性。另外，針對*CDR2*基因，不論是高度表現或基因缺失，都不會對抗藥性有明顯的影響(White, et al., 1998)，*cdr2/cdr2*突變株沒有提高對azole藥物的敏感性，但臨床抗藥性菌株的*CDR2*基因有過量表現的情形且*cdr1/cdr1 cdr2/cdr2*雙基因突變株比*cdr1/cdr1*突變株對藥物有較高的敏感性 (Sanglard, et al., 1996)。目前由分子生物技術鑑定出超過8個*CDR*基因，但這些基因與抗藥性的關係還未完全了解。

Azole如何進入菌體內的機制目前還是未知，有研究報告推測，它是經由被動運輸的方式穿越細胞壁與細胞膜(Timpel, et al., 1998)，穿越此屏障後，會針對目標酵素—lansterol demethylase(*ERG11*基因的產物)，此酵素為麥角固醇合成途徑上其中一個步驟，爾後可觀察到*CDR1*和*MDR1*的基因表現會減低。而major facilitator protein (MDR)，於細胞功能上，利用質子流動( $H^+$  gradient)作為能量驅動，藉以運送物質，而針對azole藥物，只專一性運送fluconazole(Lupetti, et al., 2002; White, 1997)。

第二，改變藥物標的酵素，包括了大量表現、突變、改走其他代替途徑取代因藥物作用所阻斷的反應，使真菌仍是可合成生長所需的物質，因此，*ERG11*的大量表現或是產生胺基酸的定點突變，以降低酵素催化能力或減低標的酵素和藥物的親和力，而已知某些特定的突變如Y132H、G464S、R467k等和抗藥性的產生有關係(Franz, et al., 1998; Marr, et al., 1998; White, 1997)。

第三，改變麥角固醇代謝途徑，當 $\Delta^{5,6}$ -desaturase(*Erg3*)突變時，細胞無

法有效合成過多的毒性中間產物 $14\alpha$ -methyergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol，即使azole抑制Erg11，細胞仍是可以繼續生長，使*C.albicans*對azole敏感性降低。又因此時麥角固醇的含量很低，使得菌株對amphotericin B產生交錯抗性(cross-resistance)(Kelly, et al., 1996)。

第四，藥物失去活性。經由抑制某些特定酵素的功能，這些酵素可以將沒有活性的藥物轉化成有活性藥物，而達到使藥物失去活性的目的。或者，真菌體內會分泌一些酵素至細胞基質外，這些酵素會降解藥物(degradation)，使藥物結構破壞而達到藥物失去活性的目的(Ghannoum and Rice, 1999)。



#### 1.4 研究緣起及目的

在白色念珠菌之致病力研究方面，實驗室先前利用抑制刪除雜交法 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 來篩選和型態變化相關的基因，找出長菌絲型(SC5314)與酵母菌型(HLC54)兩者之間表現量不同的基因，若目標基因在酵母菌型(SC5314)中的表現量比長菌絲型(HLC54)有所差異，則此基因可能與致病力或促進菌絲生長有關。利用 SSH 技術得到 991 種可能與致病能力或菌絲生長有關的 cDNA 選殖株 (徐嘉瞳，2003)，接著以限制酶圖析 (restriction mapping) 的方式作選殖株之分類並定序之，然後將所得之定序資料於 Stanford 白色念珠菌基因資料庫 (<http://www-sequence.stanford.edu:8080/bncontigs19super.html>) 及 NCBI 資料庫中進行比對，所得到的基因依照功能分類，共得到 52 個已知基因 (郭大榮，2002)。

有趣的是，在此篩選結果中，包含了 *ERG3* 和 *ERG11* 這兩個麥角固醇合成基因 (附圖一)，而麥角固醇合成途徑是已被大量研究，其已知功能之一是念珠菌對抗真菌藥物的感受性。例如：*ERG11*、*ERG3*(Sanglard, et al., 2003b)、*ERG24*(Jia, et al., 2002)、*ERG6*(Jensen-Pergakes, et al., 1998) 等基因的 null mutation 會影響真菌對藥物的感受性 (表一)。所以，在 SSH 實驗中尋找致病性相關因子時，得到 *ERG3* 和 *ERG11* 的結果，可能的解釋是這些基因涉及了致病性途徑和抗藥性途徑。其它研究亦指出，*erg24* 突變株會些微影響抗藥性狀，卻可在小老鼠體內明顯觀察到其致病力大大減低。此外，在人體血清誘導培養下，不會形成菌絲(Jia, et al., 2002) (表一)，此結果和上述的推論不謀而合。

因此，本篇論文之第一研究目的：探究麥角固醇合成基因是否和致病力及抗藥性途徑皆有關連。實驗策略以北方墨點法針對 *ERG3*、*ERG11* 作基因表現分析，此方法可偵測基因在野生株、*cph1/cph1 efg1/efg1* 突變株、*CPH1/CPH1 efg1/efg1* 突變株、*cph1/cph1 EFG1/EFG1* 突變株中的 mRNA 表

現量差異，進而能得知 *ERG3* 及 *ERG11* 此二基因是否受到致病因子 *CPH1* 基因或 *EFG1* 基因所調控。

再者實驗室先前之 SSH 結果中，亦出現醣解酵素基因(郭大榮，2002；林啟陽，2002)，因此曾針對醣解酵素所有生合成途徑進行研究(陳杏芳，2004)(附圖二)，以北方墨點法作為第一步的實驗方法，發現在環境 37°C、pH6.5 及加血清的 YPD 培養液下培養，其中五個基因 *ENO1*、*TPI1*、*GPM1*、*PYK1*、*PGK1*(附圖一)其 mRNA 表現量於酵母菌型菌體(*cph1/cph1 efg1/efg1*)中和長菌絲型菌體(*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)中不同。並且建構了 *eno1::ARG4/ENO1::TR-ENO1-URA3* 突變株，以四環黴素調控表現系統 (TR-system) (Nakayama, et al., 2000) (附圖三) 調控 *ENO1* 之基因表現，也就是此修飾後的 *ENO1* 基因表現量，在不外加四環黴素藥物時，*ENO1* 基因呈過量表現，當加入四環黴素藥物後，基因表現量則被抑制。以此調控系統，觀察其性狀變化，醣解酵素基因 *ENO1* 確實會影響白色念珠球菌的型態變化並會影響細胞生長(Yang, et. al., 2006)。在此背景下，加以上述的抗藥性基因也有涉及致病力途徑的可能。因此，本論文之第二研究目的：經由北方墨點法瞭解此五個醣解酵素基因是否和致病力及抗藥性途徑皆有關連。實驗策略為先分析其 mRNA 在野生株、非致病菌株、藥物敏感性菌株中的表現量差異，再進一步找出目標基因分析其性狀變化，試圖勾勒出白色念珠菌中致病力/型態變化和抗藥機制之間的關連性為何。

## 第二章、材料

### 2.1 菌株

*Escherichia coli* DH5α：質體增值、保存宿主

*Candida albicans*：

菌株 (Strain)	基因型 (Genotype)	Reference
SC5314	<i>CPH1/CPH1 EFG1/EFG1</i>	(Gillum, et al., 1984)
HLC52	<i>CPH1/CPH1 efg1/efg1</i>	(Lo, et al., 1997)
JKC19	<i>cph1/cph1 EFG1/EFG1</i>	(Liu, et al., 1994)
HLC54	<i>cph1/cph1 efg1/efg1</i>	(Lo, et al., 1997)
BWP17/tetR	<i>arg4/arg4his1/his1ura3/ura3</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-SchHAP4AD-3×HA-CaH</i> <i>IS1</i>	羅秀容實驗室， 2003，國衛院臨床研 究組，未發表
YLO133	<i>Candt80::GFP-Arg/</i> <i>Candt80::URA3-dp1200</i>	(Chen, et al., 2004)
YLO136	<i>Candt80::GFP-Arg/</i> <i>Candt80::URA3-dp1200</i>	(Chen, et al., 2004)
MLC89	<i>tpi1::ARG4/TP11</i>	陳杏芳，楊昶良實驗 室，2004，交大碩士 論文
MLC92-3 MLC92-4 MLC92-10	<i>tpi1::ARG4/TP11::TR-TP11-URA3</i>	本實驗

## 2.2 質體

質體	特性	Reference
p99CDT2	將白色念珠菌之 <i>TPI1</i> 基因片段連接至 p99CAU 載體上，篩選標記為抗 Ampicillin，並含 TR promoter 及 <i>URA3</i> 基因。	陳杏芳，楊昶良實驗室，2004，交大碩士論文

## 2.3 引子

製備北方墨點法探針 (DNA probe) 之引子

引子	序列 5'~3'	位置
GPM1-F	CACGGTCAATCCGAATGG	<i>GPM1</i> gene : +24~+41
GPM1-R	TTGAGCAGCAACAGCAGC	<i>GPM1</i> gene : +731~+714
ENO1-F	AGATACGTCTACGACTCC	<i>ENO1</i> gene: +28~+45
ENO1-R	ACCAACTGACAAGTCAGC	<i>ENO1</i> gene: +1162~+1179
TPI1AF	TTTGGGCCCTGGTCAGTTGGTAAGACAAT	<i>TPI</i> gene : -383~-360
TPI1BR	GCTCTAGAATGGCTCGTCAATTTTTTC	<i>TPI</i> gene : +316~+298
Orf3651-F	GAAGTCACCAAGGCTGTT	<i>PGK1</i> gene : +304~+361

PGK1-R	AGTAGCAGTATCACCACC	<i>PGK1</i> gene : +1114~1131
CDC19-F	CCACCAAACCACGAAATG	<i>PYK1</i> gene : +322~339
CDC19-R	AACACAGTCAGCACCATC	<i>PYK1</i> gene : +982~+999
ERG3-F	CCCAGCAACTATTCCAAG	<i>ERG3</i> gene : + 210~ + 227
ERG3-R	CAACTGGGTCATTAGACC	<i>ERG3</i> gene : + 905~ + 922
ERG11-F	CCTTGGTTTGGTTCTGCA	<i>ERG11</i> gene : + 166~ + 183
ERG11-R	TCTATGTCTACCACCACC	<i>ERG11</i> gene : +1390~ + 1407
TEF3-F	TCAATTCAGACCATTAACCAG	<i>TEF3</i> gene : +2610~+2630
TEF3-R	TCTTCTTCTTCTTAGCAGCG	<i>TEF3</i> gene : +3036~+3055

製備突變株之引子

引子	序列 5'~3'	位置
TPI1AF	TTTGGGCCCT GGTCAGTTGGTAAGACAAT	<i>TPI1</i> gene : -383~-360

HJL241	TCAATGGATCAGTGGCAC	pRS-ARG4 $\Delta$ speI : +3339~+3357 of NCBI ACCESSION No.AF173956
HJL133	ACCAGTAGCACAGCGATT	pGEM-URA : 3459~3476
TPI1SR	AATGAAGCACCCCGAC	<i>TPII</i> gene : +706~+690
TPI1-CF	ACCGAGAGTTTCCATTAG	<i>TPII</i> gene : -486~-469
TPI1-CR	GACGTTGACAGAAGTTTC	<i>TPII</i> gene : +903~+886
YYL001	GTGCCACTGATCCATTGA	pRS-ARG4 $\Delta$ speI : +3356~+3339 of ACCESSION No.AF173956
YYL002	TGTTGTCCTAATCCATCACC	pGEM-URA3: +4048~+4067 of ACCESSION No. AF173954

## 2.4 藥品試劑

- Amresco : Glycerol (Cat.No.0854-1L-PTM) 、 Phenol saturated solution (Cat.No.0945)
- AppliChem : Ampicillin (Cat.No.A2839)

- Bio-Rad : Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)(Cat.No.161-0729)
- Difco : Bacto agar (Cat.No.143175) 、 Yeast nitrogen base w/o amino acid(Cat.No.145368) 、 YPD broth (Cat.No.135141XB) 、 Nutrient Broth (Cat.No.149018) 、 D-Mannitol
- GiBco BRL : Goat serum (Cat.No.16210-072)
- J.T.Baker : Dextrose (Cat.No.1916-01) 、 Formamide (Cat.No.33272) 、 Formaldehyde (Cat.No.15512) 、 3-(N-Morpholino propanesulfonic acid) (MOPS) (Cat.No.1132612) 、 Triton® X-100 (Cat.No.X198-07)
- Kodak : X-film (Cat.No.1651454)
- Merck : Dodecyl Sulfate Sodium Sat (SDS) (Cat.No.1.12012.0500) 、 Ethanol (Cat.No.1.00983.2500) 、 Tris-HCl (Cat.No.1.01547.1000) 、 Sodium Acetate (Cat.No.1.06267.0500) 、 Sodium Citrate (Cat.No.1.11037.1000) 、 Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Cat.No.1.06346.0500) 、 Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (Cat.No.1.06580.0500) 、 Maleic acid (Cat.No.8.17058.1000)
- NEB : Restriction Enzyme , *Apa*I 、 Sac II
- Promega : Taq polymerase (Cat.No.PTM1661) 、 10XPCR buffer 、 dNTPs Mixture (Cat.No.PTM8010)
- Riedel-deHaen : Sodium hydroxide (Cat.No.30620) 、 Sodium chloride (Cat.No.31434)
- Roche : DIG DNA Labeling mix (Cat.No.1277065) 、 Hexanucleotide mix(Cat.No.1277081) 、 Anti-DIG-AP (Cat.No.1093274) 、 CSPD (Cat.No.1655884) 、 Klenow enzyme (Cat.No.1008404) 、 Blocking reagent (Cat.No.1096176)
- Scharlau : LB agar (Cat.No.01-385) 、 LB broth (Cat.No.02-385)

- SibEnzyme : 1 kb DNA ladder (Cat.No.SEM11C001)
- Sigma : Glass Beads (Cat.No.G-9268) 、 Lithium Acetate(Cat.No.L-6883) 、 L-Arginine (Cat.No.A-5131) 、 Uridine (Cat.No.U-0750) 、 L-Histidine (Cat.No.H-8125) 、 Polyethylene Glycol<sub>3350</sub> (Cat.No.P-4338) 、 Potassium phosphate(Cat.No.P-9666) 、 polyoxyethene-sorbitan monolaurate (Tween20) (Cat.No.P-1379) 、 Phenol (Cat.No.P-4682)

## 2.5 緩衝溶液及溶劑

- 50X TAE buffer  
48.4 g Tris base , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml , 11.42 ml acetic acid added dd H<sub>2</sub>O to 200 ml
- 5 M EDTA stock solution  
186.1 g EDTA added dd H<sub>2</sub>O to 800 ml (pH 8.0)
- RNA isolation buffer  
2.5 M NaCl , 0.5 M Tris-Cl , 0.25 M EDTA , 1% (w/v) SDS
- 10X MOPS Electrophoresis buffer  
0.22 M MOPS (pH 7.0) , 20 mM sodium acetate , 10 mM EDTA (pH8.0)
- 20X SSC buffer  
3 M NaCl , 300 mM sodium citrate (pH 7.0)
- Prehybridization/Hybridization solution  
0.5 M sodium phosphate (pH 7.2) , 7% (w/v) SDS , 1 mM EDTA (pH 7.0)
- Maleic acid buffer  
0.1 M maleic acid , 0.15 M NaCl (pH 7.5)
- Washing buffer

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

- Blocking solution

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

- Detection buffer

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

- 1 M Lithium Acetate

40.8 g Lithium Acetate added dd H<sub>2</sub>O to 400 ml (pH 7.5)

- 10X TE buffer

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

- 50% PEG<sub>3350</sub>

75 g polyethylene glycol<sub>3350</sub> added dd H<sub>2</sub>O to 150 ml

- 40% Dextrose

40 g Dextrose added dd H<sub>2</sub>O to 100 ml

- LATE buffer

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

- PLATE buffer

40% polyethylene glycol<sub>3350</sub> in LATE buffer

- Lysis buffer

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

## 2.6 培养基配製

- LB (Luria-Bertni)培養液

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

- LB (Luria-Bertni)/Ampicillin 培养基

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

- YPD 培養液

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

- YPD 培養基

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

- YPD/Uridine 培養基

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

- YPD/Doxycycline 培養基

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 2% dextrose , 2% agar , 20µg/ml Doxycycline

- YPD/Goat Serum 培養基

2% Bacto-peptone , 1% yeast extract , 2% dextrose , 2% agar , 4% Goat Serum

- SD/Uridine 培養基

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

- SD 培養基

0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% dextrose , 2% agar

- Solid spider 培養基

10g of nutrient broth , 10g of mannitol , 2g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 13.5g agar

## 2.7 儀器設備

核酸快速固定儀 XL-1000UV CROSSLINKER(SPECTRONICS)

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

核酸計算儀 GeneQuant pro(AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH )

程式溫度控制儀 PTC-100<sup>RT</sup> (MJ RESEARCH INC.)  
PCR 溫度控制儀 Gene Cyclor<sup>RT</sup> (BIO-RAD)  
震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)  
試管震盪器 IKA-VIBRAX-VXR  
加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)  
乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)  
酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)  
電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)  
往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)  
水平式電泳槽 MJ-105(MEDCLUB)  
微量離心機 MICRO 240A (DINVILLE SCIENTIFIC INC.)  
電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)  
恆溫式震盪培養箱 B206(FIRSTEK SCIENTIFIC)  
電泳影像處理系統 GEL DOC 2000(BIO-RAD)  
桌上型低溫高速離心機 Centrifuge 5804R (eppendorf)  
桌上型高速離心機 5100(KUBOTA CORPORATION)  
4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)  
-20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)  
-80°C 超低溫冷凍櫃 925/926(FIRSTEK SCIENTIFIC)  
倒立顯微鏡 OLYMPUS CK40

## 第三章、實驗方法

### 3.1 北方墨點法 (Northern blot analysis)

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

##### 3.1.1.1 Random-priming DIG labeling

使用 Roche 廠商產品 DIG system (Cat.No.1 175 033)，以 digoxigenin-11-dUTP (DIG) 標記 DNA，取欲標記的 DNA 15  $\mu\text{l}$  (約 10-30 ng) 置於微量離心管中，於 95°C 加熱 10 分鐘後迅速置於冰上 5 分鐘，然後加入 2  $\mu\text{l}$  的 hexanucleotide、2  $\mu\text{l}$  的 10X dNTP labeling mixture 及 1  $\mu\text{l}$  的 Klenow enzyme (100 unit/ml)，在 37°C 水浴槽中反應 20 小時後，最後加入 2  $\mu\text{l}$  的 0.2 M EDTA 並於 65°C 加熱 10 分鐘作終止反應，製備完成之 DNA 探針儲存於 -20°C。

##### 3.1.1.2 PCR DIG labeling

使用 Roche DIG Labeling mixture (Cat.No.1 1636 090)，藉由聚合酶鏈反應直接將 digoxigenin-11-dUTP (DIG) 標定在 DNA 上，將以下成分加入已滅菌且置於冰上的微量離心管：

Reagent	DIG-labeling Probe	Unlabeled DNA control
Template(Genomic DNA)	1 $\mu\text{l}$ (300~1000 ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$ (300~1000 ng/ $\mu\text{l}$ )
PCR DIG Labeling Mix (Roche)	2.5 $\mu\text{l}$	—
dNTP stock solution (Takara)	2.5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
10 X PCR buffer (Takara)	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
Primer F 25 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$

Primer R 25 $\mu$ M	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Sterile double dist. water	37.3 $\mu$ l	37.3 $\mu$ l
Taq polymerase (Takara)	0.5 $\mu$ l (250 units/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l (250 units/ $\mu$ l)
<b>Total</b>	<b>50<math>\mu</math>l</b>	<b>50<math>\mu</math>l</b>

混合均勻後，稍微離心將所有樣品集合於 PCR 用的微量離心管底部，進行 PCR 反應。反應結束後，取 5 $\mu$ l 的 PCR 產物跑電泳膠確認，而有標定上 DIG 的 DNA 在膠體內移動的會比控制組 DNA 還要慢，所以帶有 DIG 標定的 DNA 在膠體上的片段大小會比預測中控制組 DNA 大小還要大，則分裝 (10 $\mu$ l/tube)，存放於  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

### 3.1.2 真菌培養

#### 3.1.2.1 加血清誘導培養

將單一菌落之真菌接種至 5 ml 的 YPD 培養液，於  $30^{\circ}\text{C}$  隔夜震盪培養 (200rpm)，再取其中 2 ml 的菌液轉養至 50 ml 的 YPD 培養液，並再加入適量的 YPD 培養液，調整菌液濃度吸光值  $\text{OD}_{600}$  至 0.1~0.2，再以體積比 1:5 (山羊血清: YPD 培養液)，加入適量的山羊血清 (GiBco BRL, Goat serum)， $37^{\circ}\text{C}$  震盪培養 (200rpm) 4 小時至  $\text{O.D}_{600\text{nm}}$  吸光值達到約 0.8~1.0，分裝至 15ml 無菌離心管，以桌上型低溫高速離心機於  $4^{\circ}\text{C}$ 、3000rpm  $\times$  10 min 離心，接著去除上清液，再加入 15ml 菌液於離心管中，重複一次離心及去上清液，再加入 5 ml 的 DEPC-treated  $\text{H}_2\text{O}$  懸浮菌體，以桌上型低溫高速離心機於  $4^{\circ}\text{C}$ 、3000rpm  $\times$  10 min 離心，去除上清液，之後的操作過程皆儘可能地置於冰上進行，儲放置  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 3.1.2.2 加抗真菌藥物誘導培養

將單一菌落之真菌接種至 5 ml 的 YPD 培養液，於 30°C 隔夜震盪培養 (200rpm)，再取其中 2 ml 的菌液轉養至 50 ml 的 YPD 培養液，並再加入適量的 YPD 培養液，調整菌液濃度，調至 OD<sub>600</sub> 至 0.1~0.2，37°C 震盪培養 (200rpm) 3 小時，再加入 miconazole/DMSO(儲存濃度 100mg/ml，終濃度等於 10 μg/ml)，37°C 震盪培養 (200rpm) 1 小時，調至吸光值 OD<sub>600</sub> 約 0.2，分裝至 15ml 無菌離心管，以桌上型低溫高速離心機於 4°C、3000rpm × 10 min 離心，去除上清液，再加入 15ml 菌液，同樣條件下離心及去上清液，加入 2 ml 的 DEPC-treated H<sub>2</sub>O 懸浮菌體，以桌上型低溫高速離心機於 4°C、3000rpm × 10 min 離心，去除上清液，之後的操作過程皆儘可能地置於冰上進行，儲放置於 -80°C 冰箱。

### 3.1.3 萃取 RNA (RNA extraction)

從 -80°C 冰箱取出收集菌體的 15ml 離心管，置於冰上，進冷房，在菌體尚未溶解之前，加入 0.5 ml 的 RNA isolation buffer 懸浮菌體，加入 1/3 倍體積的玻璃珠，vortex 5 分鐘，加入 0.5 ml 的 phenol，vortex 5 分鐘，加入 0.5 ml 的 RNA isolation buffer，vortex 5 分鐘，以桌上型低溫高速離心機於 4°C、3000rpm × 10 min 離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管中，以桌上型低溫高速離心機於 4°C、3000rpm × 10 min 離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，加入等體積 phenol 混合，以微量離心機 4°C、13,000rpm × 10 min 離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，加入等量 phenol 混合，以微量離心機離心機於 4°C、13,000rpm × 10 min 離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，加入 1/8 倍體積的 2.5 M 醋酸鈉及 2.5 倍體積的 100% -20°C 冰乙醇混合均勻，置於 -20°C，30 分鐘後，以微量離心機於 4°C、13,000rpm × 10 min 離心，將上清液倒掉，加入 1 ml 的 75% -20°C 冰乙醇清洗管壁沉澱物，以微量離心機於 4°C、13,000rpm × 10 min 離

心，用微量吸管吸掉上清液，並將微量離心管斜放在室溫下乾燥至微乾狀態，將 RNA 溶於 35 $\mu$ l 的 DEPC-treated H<sub>2</sub>O 中，儲存於-80 $^{\circ}$ C。

#### 3.1.4 轉漬 RNA (Transfer)

(以下依 Roche 廠商產品操作手冊進行)

首先進行 1% 洋菜膠配製，秤取 1 g 的 agarose 於 72 ml 的 DEPC-treated H<sub>2</sub>O 中，微波加熱溶解，待稍微冷卻後加入 10ml 的 10X MOPS 及 18 ml 的甲醛 (37% formaldehyde) 混合均勻並製成膠體。而 RNA 樣品進行電泳前之處理：5  $\mu$ l 的 37% formaldehyde、10  $\mu$ l 的 formamide、3  $\mu$ l 的 dye 以及 1  $\mu$ l 的 10 mg/liter ethidium bromide 及適量的 10X MOPS (最終濃度 1X MOPS) 分別加入微量離心管內並充分混合均勻，最後加入約 6  $\mu$ g 的 RNA，於 65 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘後置於冰上 5 分鐘。將處理好之 RNA 樣品以微量吸管置入洋菜膠之孔洞中，以 50 伏特之電壓進行 RNA 電泳 75~100 分鐘(若用來當定量的基因與所欲觀察的基因，兩者大小相近，則可以加長電泳時間)，電泳結束後，在電泳影像處理系統照相，之後將膠體浸泡於適量的 20X SSC 中 15~20 分鐘，接著進行轉漬。利用毛細現象之原理，引導 10X SSC 溶液向上流動，進而帶動膠體中的 RNA 脫離膠體，吸附於耐龍膜 (nylon membrane) 上進行轉漬。剪裁適當於膠體大小的 Whatman 3MM 濾紙、耐龍膜 (先於 10X SSC 溶液浸泡) 及投影片 (其孔洞大小合適於膠體大小)，依濾紙、挖空的投影片、洋菜膠、耐龍膜及 Whatman 3MM 濾紙之順序堆置，再堆上一疊衛生紙，促進毛細作用，並於最上層放置重物。經 12-16 小時後，取出耐龍膜，於核酸快速固定儀中，利用 UV 光 (254nm) 照射作兩次 cross-link 將 RNA 固定於耐龍膜上。另外，當耐龍膜於 UV 光下照射時，可觀察轉漬效果是否完全，或者將膠體透由電泳影像系統照相，觀察 RNA 在膠體上的殘留量，若轉漬約達七成，則可繼續進行雜交反應。

### 3.1.5 雜交反應 (Hybridization)

將耐龍膜放置在含 12 ml 的 prehybridization buffer 之培養皿，於 45°C 平面震盪 1~3 小時，之後將耐龍膜移至含標記探針的 12 ml 的 hybridization buffer 之培養皿中 (探針濃度 50 ng/ml)，於 45°C 平面震盪 12~18 小時後，將耐龍膜以 50 ml 的 2X Washing solution，於室溫下平面震盪 20 分鐘，再以 50 ml 的 0.5X Washing solution，於 58°C 平面震盪 20 分鐘，之後再以 25 ml Washing buffer，於室溫震盪 15 分鐘兩次。

### 3.1.6 偵測 (Detection)

耐龍膜以 50 ml 的 Washing buffer 於室溫下平面震盪 20 分鐘兩次後，以 20 ml 的 Blocking buffer (Roche Blocking reagent (Cat.No.1096176)) 平面震盪 30~40 分鐘後，以 15 ml 的 Antibody buffer (Roche Anti-DIG-AP (Cat.No.1093274)) 平面震盪 30 分鐘，之後以 50 ml 的 Washing buffer 於室溫下平面震盪 15 分鐘兩次，接下來，將耐龍膜過 DEPC-H<sub>2</sub>O 一兩次，最後將耐龍膜放置於投影片夾層，取 300  $\mu$ l 的 CSPD 溶液 (Roche Cat.No.1655884)，均勻地加到耐龍膜上，浸濕約一分鐘，再用微量吸管吸掉多餘的液體，37°C 避光反應 20 分鐘後，在暗房內以 X 光底片進行壓片，感光適當時間後，沖洗底片 (Develop buffer 中沖洗 1 分鐘，再置於 Fix buffer 沖洗 1 分鐘)。

### 3.1.7 定量

Internal control 之表現量應為一致，以目標基因在 SC5314(*CPHI/CPHI EFGI/EFGI*) 中的呈色 (包含 band 的顏色深度及寬度) 為基準，比較目標基因於 SC5314 和其它菌株中的呈色。若洗片後 internal control 呈色結果的不一致，則目標基因在突變株中表現量的判讀，需加成以 internal control 於突變株和野生株中呈色的差異倍數。

### 3.2 檢查 *TPII* 單套基因(Heterozygous knockout)破壞株

#### 3.2.1 抽取染色體 DNA

挑取單一菌落(MLC89)，接種至 5ml YPD 培養液，30°C 隔夜震盪培養 (200rpm)，約 16~20 小時，取 1~1.5ml 菌液至 1.5ml 微量離心管，以微量離心機 13,000rpm × 5min 離心，去除上清液，加入 200ul 的 Lysis buffer，充份混合後，將整個微量離心管暴露於-80°C 冰箱兩分鐘，緊接著，95°C 乾浴中一分鐘，再反覆一次將微量離心管放置到-80°C 冰箱反應兩分鐘，95°C 乾浴一分鐘，vortex 30 秒鐘，加入 200  $\mu$ l chloroform，充份混合，vortex 兩分鐘，在 microfuge 中，以微量離心機 13,000rpm 最高速離心五分鐘，取上清液至新的微量離心管，加入 400  $\mu$ l 100% 冰乙醇，-20°C 五分鐘，以微量離心機 13,000rpm × 5min 離心，去除上清液，加入 500  $\mu$ l 70% 冰乙醇沖洗管壁沉澱物，以微量離心機 13,000rpm × 3min 離心，用微量吸管吸掉上清液並將微量離心管斜放乾燥，以 35  $\mu$ l 的無菌二次水溶解 DNA，-20°C 存放。

#### 3.2.2 利用 PCR 檢查 *TPII* 單套基因(Heterozygous knockout)破壞株

利用引子 TPI1AF 和 TPI1SR，TPI1AF 黏附至目標基因 *TPIIORF*-5'端(同源置換區的上游)，TPI1SR 位於 *TPIIORF*-3'端的同源置換區域上，以確認 *TPII* 單套基因是否被剔除及篩選標記 *ARG4* 基因是否置換到正確位置。爾後，再以洋菜電泳膠確定 DNA 產物大小。PCR program 如下：

Step1：95°C，5 mins

Step2：95°C，1 min

50°C，1 min

72°C，2 min 30 secs

Step3：Repeat step 2 for 30 cycles

Step4：72°C，8 mins

Step5 : 4°C

### 3.3 於 *TP11* 置入四環黴素調控系統(Nakayama, et al., 2000)

(Tetracycline-regulatable system)

3.3.1 限制酶切割反應得到含有 TR promoter 及 *URA3* 標記之 DNA 片段在 *TP11* promoter 區域設計引子，以白色念珠菌染色體 DNA 為模板進行 PCR 反應，得到 A 區域之 DNA 片段，依據同樣原理在 *TP11* 之 ORF 設計引子，以 PCR 的方式得到包含 start codon 之 DNA 為 B 區(B 區域)，將此 A、B 區 DNA 片段 construct 至已含有 TR promoter 及 *URA3* 標記之質體 p99CAU，最後架構而成的質體稱為 pCDT2(陳杏芳，2004)(附圖三)。將 pCDT2 以限制酵素 *Apa* I 反應 1.5 小時，再加 *Sac* II 反應 1.5 小時，停止反應，進行 clean-up。

#### 3.3.2 進行白色念珠菌轉形作用

將白色念珠菌 (MLC89；基因型：*TP11/tp11*) (陳杏芳，2004) 之單一菌落接種至 5 ml 的 YPD 培養液 (含 uridine) 中，於 30°C 震盪培養 (150rpm) 隔夜後，取其中 2 ml 的菌液轉養至 50 ml 的 YPD 培養液 (含 uridine)，於 30°C 震盪培養 (200rpm) 4~5 小時至 O.D<sub>600nm</sub> 約 0.6~0.8，分裝至 50 ml 無菌離心管，以桌上型高速離心機 2500rpm × 10 min 離心，去除上清液，加入 10 ml 的無菌二次水懸浮菌體，以桌上型高速離心機 2500rpm × 10 min 離心，去除上清液，加入 5 ml 的 1 × TE Buffer 懸浮菌體，以桌上型高速 2500rpm × 10 min 離心，去除上清液，加入 3 ml 的 LATE Buffer 懸浮菌體，以桌上型高速離心機 2500rpm × 10 min 離心，去除上清液，加入 300 μl 的 LATE buffer 懸浮菌體，於室溫下靜置 20 分鐘後，即為念珠菌之勝任細胞。取 3.1 製備之 DNA 片段 10 μl 及 10 μl 的 10 mg/ml salmon sperm DNA (預先以 95°C 加熱 10 分鐘再迅速置於冰上 10 分鐘處理

之) 於微量離心管，並加入 200  $\mu$ l 的勝任細胞，混合均勻於 30°C 靜置 30 分鐘後，加入 0.7 ml 的 PLATE Buffer 於 30°C 震盪培養 (180rpm) 16~20 小時後，於 44°C 水浴槽中進行熱休克作用 (heat shock) 15 分鐘，以微量離心機 5000rpm  $\times$  2 min 離心，去除上清液，加入 1 ml 的 1  $\times$  TE Buffer 懸浮菌體，以微量離心機 5000rpm  $\times$  2 min 離心，去除上清液，加入 0.1 ml 的 1  $\times$  TE Buffer 混合均勻後，取出菌液塗抹至適當的篩選培養基 (selective medium)，置於 30°C 培養 3~4 天。

### 3.3.3 抽取染色體 DNA

如 3.2.1 所述

### 3.3.4 PCR 確認 TR 系統之突變株

引子 TPI1CF 和 TPI1CR，位於 *TPI1* 同源置換區外；引子 HJL241 和 TPI1SR，確認篩選標記 *ARG4* 是否正確置換掉 *TPI1* 單套基因；引子 YYL001 和 TPI1CF，用來確認 *ARG4* 置換掉 *TPI1* 單套基因另一方向的正確性；引子 HJL133 和 TPI1SR，確認篩選標記 *URA3* 插入另一個 allele 位置的正確性；引子 YYL002 和 TPI1CF，用來確認 *URA3* 插入位置另一方向的正確性；引子 HJL199 和 TPI1SR，確認 TR promoter 是否插入正確位置。

## 3.4 性狀分析

### 3.4.1 觀察突變株生長曲線

以 Bwp17/tetR 作對照，觀察 MLC89 (*tpi1/TPI1*) 及 *tpi1::TR/ARG4* 於加 doxycycline 20  $\mu$ g/ml(+DOX) 誘導和不加藥 (-DOX) 情形下，以 YPD 為營養源，30°C 隔夜培養後，再將菌液轉養至 50ml 新鮮的 YPD 培養液中，調整其吸光值 OD<sub>600nm</sub> 至相當，放入 30°C 培養箱，量測 1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、9.5 小時其菌體吸光值 OD<sub>600nm</sub>。所進行的觀察四環黴素系統的轉形菌株生長曲線實驗，皆以圖二十、二十二的 TR 轉形菌株編號 10 為

觀察對象。

#### 3.4.2 菌落生長情形

將 SC5314、*tpi1::TR/AGR4* (所得到三顆的突變株) 分別接種於 5ml YPD 培養液中，30°C 隔夜培養。第二天，取少量菌液，用 YPD 將每個菌株調整至約相同的吸光值  $OD_{600nm}$ ，以棉花棒塗沾菌液於 YPD(或 SD) 培養皿及 YPD 外加四環黴素(或 SD+ DOX) 培養皿上，於 30°C 培養三天，觀察結果。

#### 3.4.3 觀察單一菌落生長情形

將新鮮的菌體塗至 YPD(含 4% 山羊血清) 培養皿上，畫出單一菌落，於 37°C 培養三天。

#### 3.4.4 芽管試驗

將 YPD 培養液加至 24-well mini-plate，每個 well 加 900  $\mu$ l YPD 及 100  $\mu$ l 山羊血清，再依需求加入 doxycycline (20  $\mu$ g/ml)。最後再將菌落接種於 YPD (+10% 山羊血清) 培養液中，37°C 培養三小時後，於倒立式顯微鏡觀察，以 400X 倍數觀察。

#### 3.4.5 觀察增長型菌絲實驗

挑新鮮菌落接種於含 10% 山羊血清之 5ml YPD 培養液中，培養於 37°C 的培養箱中，震動搖晃 180rpm，持續 18 小時。爾後，取 100  $\mu$ l 於 24 well plate 中，於倒立式顯微鏡下以 400X 倍數觀察。(觀察 *tpi1/TPI1::TR* 菌株其 knock down 的情形時，需於隔夜培養前加入 doxycycline(20  $\mu$ g/ml)。

#### 3.4.6 觀察菌株於含 4% 血清 Bacto-agar 培養皿的生長情形

挑新鮮菌落接種於含 4% 山羊血清的 Bacto-agar plate 中，於 37°C 培養七天，最後於倒立式顯微鏡下以 100X 倍數觀察。(觀察 *tpi1/TPI1::TR* 菌株其 knock down 的情形時，需於隔夜培養前加入 doxycycline(20  $\mu$ g/ml))

#### 3.4.7 侵犯力分析(Invasion assay)

挑新鮮菌落接種於 solid spider 培養基(Navarro-Garcia, et al., 1998)，置於 37°C 七天，觀察菌落型態時，先拍攝未沖洗前菌落生長情形，以 HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)的沖洗狀況為基準，將培養皿置於水龍頭底下，以水沖洗直至將培養皿上的菌落全沖洗掉離培養皿，以本研究為例，時間為一分鐘三十秒，之後，水龍頭不關，以此固定水量和固定時間，繼續沖洗其他培養皿，最後將沖洗過後的培養皿拍攝下來做紀錄。(觀察 *tpi1/TP11::TR* 菌株其 knock down 的情形時，需於培養基的配製中加入 doxycycline (20  $\mu$ g/ml)。



## 第四章、結果

### 4.1 北方墨點法分析抗藥性基因於誘導生長菌絲環境下的表現量

為試圖了解調控 azole 類藥物的抗藥性相關基因是否有可能和菌絲生長、型態變化、致病力等有所關聯，於是利用北方墨點法，分析麥角固醇合成途徑上的 *ERG3* 及 *ERG11*，其 mRNA 表現量於誘導菌絲生長環境，並作進一步分析。

#### 4.1.1 *ERG3* 之基因表現量

細胞培養條件為將隔夜菌體轉養至含有血清的 YPD 培養液、於 37°C 生長四小時。誘導菌絲生長的環境，比較其在不同突變株中的表現量差異。圖一為 *ERG3* 的北方墨點法結果，其判讀基準以 *EFB1* 作為 internal standard (大小約等於 0.7Kb)，*ERG3* 其 mRNA 大小至少約為 1.1Kb (ORF 有 386 amino acid)。結果顯示，在低於 18S 的 band 下方有一特定 band，略小於 1.9kb，應為 *ERG3* 之 band，因此，*ERG3* 在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*) 中的表現量一致，而在 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*) 此兩突變株中，表現量大於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)。

#### 4.1.2 *ERG11* 之基因表現量

細胞培養條件為將隔夜菌體轉養至含有血清的 YPD 培養液、於 37°C 生長四小時。圖二為 *ERG11* 的北方墨點法結果，其判讀基準以 *EFB1* (大小約等於 0.7Kb) 作為 internal standard，*ERG11* 其 ORF 有 528 amino acid，mRNA 大小至少為 1.7Kb。結果顯示，*ERG11* 在 JKC19 (*cph1/cph1*

*EFG1/EFG1*)、SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*) 中的表現量一致，而在 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*) 此兩突變株中，表現量大於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)。

## 4.2 醣解酵素基因之北方墨點法

先前實驗室(陳杏芳, 2004)已篩選出的五個:*ENO1*、*TPI1*、*GPM1*、*PYK1*、*PGK1* 等，其基因表現可能和致病力、型態變化有關係的醣解酵素基因，再此利用北方墨點法，於誘導菌絲生長環境(加血清)或誘導藥物感受性發生的環境中，進一步分析且比較此五個基因是否受抗藥性相關活性所調控，試圖尋找出同時會涉及致病力/型態變化及抗藥性的基因。

誘導菌絲生長的培養條件為將隔夜菌體轉養至含有血清(血清體積/YPD 體積比值為 1/5)的 YPD 培養液，於 37°C 生長四小時，轉速為 200 rpm，誘導菌絲生長的環境，比較其在不同突變株中之表現量差異。另外，為了解藥物誘發之表現，培養條件為將隔夜菌體轉養至 YPD 培養液，於 37°C 生長三小時，且在三小時結束後，加入藥物 miconazole 10  $\mu$ g/ml，再繼續培養一小時，比較其在不同突變株中之表現量差異。以下為各基因之北方墨點法結果：

### 4.2.1 *ENO1* 之基因表現量

#### 4.2.1.1 *ENO1* 於誘導菌絲生長環境中(加血清)之北方墨點法結果

*ENO1* 其 ORF mRNA 大小至少為 1.5Kb (440 amino acid)。判讀基準以 *TEF3* 作為 internal standard，ORF 3153nt，mRNA 位置大小約略低於 25S rRNA，結果顯示(圖四)，*ENO1* 在 HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136 (*Candt80/Candt80*) 中表現量小於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)，在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中表現量

大於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)。

#### 4.2.1.2 *ENO1* 於誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果

判讀基準以 *TEF3* 作為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，mRNA 位置大小約略低於 25S rRNA，結果顯示 (圖五)，*ENO1* 於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中表現量幾乎一致，但在 YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136 (*Candt80/Candt80*) 中表現量略減，但差異性不明顯。

#### 4.2.2 *TPII* 之基因表現量

##### 4.2.2.1 *TPII* 於誘導菌絲生長環境中(加血清)之北方墨點法結果

*TPII* 其 ORF 大小為 747nt (248 amino acid)。判讀基準以 *TEF3* 作為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，mRNA 位置大小約略低於 25S rRNA。結果顯示(圖六)，其 mRNA 表現在 JKC19(*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中小於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，在 HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136 (*Candt80/Candt80*) 約等於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)。

##### 4.2.2.2 *TPII* 於誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果

判讀基準以 *TEF3* 作為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，mRNA 位置大小約略低於 25S rRNA，結果顯示 (圖七)，在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*) 中的表現量和在 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) 相當，在 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、表現量約小於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，但差異性不到一倍。在 YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136 (*Candt80/Candt80*) 小於 SC5314

(*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，其差異性相差至少一倍之多。

#### 4.2.3 *GPM1* 之基因表現量

##### 4.2.3.1 *GPM1* 於誘導菌絲生長環境（加血清）中之北方墨點法結果

*GPM1* 其 ORF 為 747nt (248 amino acid)。判讀基準以 *TEF3* 作為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，mRNA 位置大小約略低於 25S rRNA。結果顯示（圖八），在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)、*Candt80* 突變株 YLO133、YLO136 其 mRNA 表現量皆明顯大於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)。

##### 4.2.3.2 *GPM1* 於誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果

判讀基準以 *TEF3* 作為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，mRNA 位置大小約略低於 25S rRNA。結果顯示（圖九），在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、*Candt80* 突變株 (YLO136) 其 mRNA 表現量皆大於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，但在 *Candt80* 突變株 YLO133 的表現是等於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)。

#### 4.2.4 *PYK1* 之基因表現量

##### 4.2.4.1 *PYK1* 誘導菌絲生長環境中之北方墨點法結果

*PYK1* 其 ORF 為 1515nt (504 amino acid)。判讀基準以 *EFB1* 作為 internal standard，ORF 大小為 642nt，mRNA 位置大小約略低於 18S rRNA。結果顯示（圖十），在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136(*Candt80/Candt80*)，其 mRNA 表現量皆約等於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，但在 HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)中的表現量大於 SC5314(*CPHI/CPHI*

*EFG1/EFG1*)。

#### 4.2.4.2 *PYK1* 誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果

判讀基準以 *TEF3* 作為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，mRNA 位置大小約略低於 25S rRNA。結果顯示 (圖十一)，在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、YLO133(*Candt80/Candt80*)、YLO136(*Candt80/Candt80*)，其 mRNA 表現量約等於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，但在 HLC52(*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、HLC52(*cph1/cph1 efg1/efg1*)中表現量皆小於 SC5314(*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)。

#### 4.2.5 *PGK1* 之基因表現量

##### 4.2.5.1 *PGK1* 於誘導菌絲生長環境 (加血清) 中之北方墨點法結果

*PGK1* 其 ORF 大小約為 1254nt (417 amino acid)。判讀基準以 *EFB1* 作為 internal standard，其 ORF 大小為 642nt，mRNA 位置大小約低於 18S rRNA。結果顯示 (圖十二)，在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、*Candt80* 突變株 YLO133、*Candt80* 突變株 YLO136 其 mRNA 表現量皆小於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)。

##### 4.2.5.2 *PGK1* 於誘導藥物感受性發生之北方墨點法結果

判讀基準以 *TEF3* 作為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，mRNA 位置大小約略低於 25S rRNA。結果顯示 (圖十三)，*PGK1* 基因其 mRNA 在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)突變株中的表現量和野生株 SC5314 並無太大差異。在 *Candt80* 突變株 YLO133、*Candt80* 突變株 YLO136 其 mRNA 表現量略大於於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)。

### 4.3 目標基因 *TPII* 的突變

#### 4.3.1 確認 *TPII* 單套突變株的正確性

*TPII* 單套突變菌株 (MLC89) 為先前實驗室(陳杏芳, 2004)所建構, 在此利用 PCR 的方法來確認, 如圖十六, 正向引子為 TPI1AF, 其位置位於 *TPII* 基因的 promoter 區域(非置換區域), 反向引子 TPI1SR 位於 TPI1ORF 的 3'端。實驗控制組, 控制變因為 DNA 模版, 取 BWP17/tetR 菌株的染色體 DNA 為控制組, 實驗組則為突變株的染色體 DNA。結果如圖十七所示, 控制組的結果為預期的 1 kb 片段出現, 而實驗組出現預期的 1 kb 及 2.2 kb 片段。

#### 4.3.2 *TPII* 四環黴素調控表現系統突變株之建構(Nakayama, et al., 2000)

此系統包含兩部分, 可利用四環黴素藥物的有無達到基因過度表現或抑制基因表現。用以進行單套基因突變的菌株為 BWP17/tetR, 此菌株已含有可驅動 tetracycline-regulatable (TR) promoter 的 transactivator 之 *tetR* 基因(圖十八)。

##### 4.3.2.1 以限制酶反應製備帶有 *TPII* 同源序列、TR promoter 及 *URA3* 篩選標記

先前實驗室(陳杏芳, 2004)已把 TR promoter 及 *URA3* 標記與目標基因 *TPII* 的同源序列建構至質體 p99CAU 上(附圖三)。在此, 將此質體送入大腸桿菌進行大量複製後, 利用限制酶 *Apa* I、*Sac* II, 將其片段切割下來, 經純化後, 則為下一步白色念珠菌轉形作用的 DNA 材料。

##### 4.3.2.2 以 PCR 確認 TR promoter 及 *URA3* 標記是否置入 (knockin)

##### *TPII* 基因

先進行白色念珠菌轉形作用, 將已含有 *TPII* 的同源序列 A、B 區域片段及篩選標記 *URA3* 及 TR promoter 的 DNA 片段送入白色念珠菌 MLC89 (*tpi1::/ARG4/TPII*), 結果得到 12 顆轉形菌株。以引子 TPI1CF 及 TPI1CR

進行 PCR，此對引子位置分別位於 *TPII* 基因 ORF 區域外上、下游之處(圖十九)。若置換成功，則可在電泳圖上看到兩條片段，一個片段應約為 2.6kb 片段(含 *ARG4* 的 allele) 及 3.1kb (含 *URA3* 及 TR promoter 的 allele)。另外此 PCR 反應，控制組為二，一為 BWP17/tetR 的染色體 DNA，其應該只會出現 1.3kb 的片段，另一為 MLC89 菌株的染色體 DNA，其產物應為 1.3kb 及 2.6kb 兩個片段(圖二十)。而進行 PCR 後的結果，控制組皆為預期中的結果，實驗組編號 5~9 及 11、12，皆出現了 1.3 kb 片段，表示仍帶有 wild-type alleles。而編號 3、4、10 則只出現 2.6 kb 片段 (圖二十)。

編號 3、4、10 菌株進一步用其他三對引子進行 PCR，HJL241 v.s TPI1SR，確認 *ARG4* 是否存在於菌體內，HJL199 v.s TPI1SR、HJL133 v.s TPI1SR，分別確認 TR promoter、*URA3* 是否置入成功 (圖二十一)，菌株編號 3、10 皆出現所預期片段 0.7kb、1.4kb、2kb，轉型菌株編號 4 也出現了 1.4kb 及 2kb 片段 (圖二十二)。

爾後，又進一步使用引子 TPI1CF v.s YYL001 和 TPI v.s YYL002 兩對引子分別確認 *ARG4* 和 *URA3* 篩選標記和 *TPII* promoter 區域間的相對位置正確與否 (圖二十三)。實驗控制組為 MLC89 的染色體 DNA，實驗組為上述的三顆轉形菌株染色體 DNA，實驗結果為轉形菌株三顆用 TPI1CF v.s YYL001 皆得到預期中約 1.7kb 的片段，而用 TPI1CF v.s YYL002 皆得到預期中的 1.5 kb 片段 (圖二十四)。

#### 4.4 *TPI* 突變株的性狀分析

##### 4.4.1 觀察生長曲線

以 BWP17/tetR 作對照，觀察 MLC89 (*tpiI/TPII*) 及 *tpiI/TPII::TR* 於加 doxycycline(20  $\mu$ g/ml) (+DOX) 誘導和不加藥 (-DOX) 情形下，以 YPD 為營養源，30°C 隔夜培養後，再將菌液轉養至新鮮的 YPD 培養液中，量測

其各個時間點的吸光值 OD<sub>600nm</sub>。在此，四環黴素系統的轉形菌株，取圖二十、二十二之編號 10 為觀察對象，其結果記錄為表三及圖二十五。

#### 4.4.2 觀察菌落生長情形

結果顯示，SC5314 及三株 *tpi1/TPH1::TR* 在 37°C YPD (-DOX) 培養皿上生長三天，其生長並無差異；但是，在 YPD+DOX 的培養皿上，此三株突變菌株生長變緩慢。(圖二十六)

而在 SD 培養皿上，於 37°C 培養三天，SC5314 及三株 *tpi1::TR/AGR4* 突變株皆無差異；在 SD+DOX 培養皿上，*tpi1/TPH1::TR* 突變株生長情形不明顯。(圖二十七)

#### 4.4.3 觀察單一菌落的型態

以野生株 SC5314 及雙突變株 (*cph1/cph1efg1/efg1*) 作為對照組 (圖二十八(A)部分)，觀察 *tpi1/TPH1::TR* 突變株於含有 doxycycline 的情形下(down regulation)及沒有藥物的情形下(up regulation)，其型態變化。結果顯示，在沒有加 doxycycline 的情形下，*tpi1::TR/AGR4* 三株突變株菌落皆很明顯，且單一菌落的面積約為 4cm<sup>2</sup>，而在加 doxycycline 情形下，三株 *tpi1::TR/AGR4* 突變株，菌落形狀變小許多，面積約為 0.11 cm<sup>2</sup>，和不加藥的情形相比約為 1: 36 (圖二十八(B)部分)。

#### 4.4.4 芽管試驗 (Germ tube assay)

以野生株 SC5314 及雙突變株(*cph1/cph1efg1/efg1*)為對照組，觀察三株 *tpi1::TR/AGR4* 突變株芽管有無生成。結果顯示，野生株 SC5314 及三株 *tpi1::TR/AGR4* 突變株，不管有無添加 doxycycline，皆有芽管生成(圖二十九之 B、C 部分)，對照組 *cph1/cph1efg1/efg1* 雙突變株則無 (圖二十九之 A 部分)。

#### 4.4.5 觀察增長型菌絲實驗

以野生株 SC5314 及雙突變株(*cph1/cph1efg1/efg1*)為對照組，觀察

*tpiI/TPiI::TR* 突變株 (編號 10) 增長型菌絲的生長情形。結果顯示，*tpiI/TPiI::TR* 突變株 (編號 10) 在不加藥 (-DOX) 情形下，和野生株相比，皆有增長型菌絲生成，而突變株在加藥 (+DOX) 情形下，沒有增長型菌絲生成(圖三十)。

#### 4.4.6 觀察菌株於含 4% 血清 Bacto-agar 培養皿上的生長情形

以野生株 SC5314 及雙突變株(*cphI/cphIefgI/efgI*)為對照組，觀察 *tpiI/TPiI::TR* 突變株 (編號 10) 觀察菌絲於培養皿上型態。野生株 SC5314 為正對照，有菌絲生成的菌落，在培養皿上的菌落外觀上會有明顯的毛茸茸放射性的形狀，雙突變株(*cphI/cphIefgI/efgI*)為負對照，單一菌落外觀上呈圓形，*tpiI/TPiI::TR* 突變株 (編號 10) 在不加藥 (-DOX) 情形下，仍是有毛茸茸放射性形狀，但中心部分的毛茸情形明顯沒野生株來的濃密，加藥 (+DOX) 情形下，沒有毛茸的放射狀，但不是圓形，而是輪廓明顯的斑駁聚集 (圖三十一)。

#### 4.4.7 侵犯力分析(Invasion assay)

野生株 SC5314 及雙突變株(*cphI/cphIefgI/efgI*)為對照組，觀察 *tpiI/TPiI::TR* 突變株 (編號 10) 侵入培養基的能力。雙突變株 (*cphI/cphIefgI/efgI*)在培養基上的菌落型態為光滑圓形，在固定水量的沖洗下，一分三十秒能將所有菌落沖離培養基，野生株 SC5314 於培養基上的菌落呈皺縮狀，在固定水量、一分三十秒內，無法將菌落沖離培養基。*tpiI/TPiI::TR* 突變株 (編號 10) 在不加藥 (-Dox) 情形培養下，菌落呈皺縮狀，在相同沖洗條件下，菌落無法被沖洗離培養基，而在加藥 (+DOX) 的培養下，菌落呈較小顆，當沖洗不到一分鐘，全部菌落脫落 (圖三十二)。

## 第五章、討論

### 5.1 初步證實白色念珠菌中，抗藥性和致病力途徑的相關連

利用北方墨點法初步分析，*ERG3* 和 *ERG11* 於血清誘導培養下，在致病性株和非致病性株的表現量差異，而結果顯示此兩基因在 HLC54(*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)及 HLC52(*cph1/cph1 efg1/efg1*)的表現量皆大於 SC5314(*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)及 JKC19(*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)，根據此結果，初步推論，*ERG3*、*ERG11* 此二基因受 *EFG1* 基因調控(圖三)。然而，就已知資料只知道 *EFG1* 基因所展現的生理功能有許多，例如：細胞黏附作用、細胞型態變化、菌絲生長、假菌絲形成、調控基因轉錄作用、生物膜的形成等，尚未有研究指出其調控抗藥性機制的可能性，但以北方墨點法結果(圖三)可初步推論，*EFG1* 可能同時影響抗藥性機制。根據這些結果，國家衛生研究院羅秀容老師實驗室進一步將 *efg1/efg1* 突變株進行抗真菌藥物敏感性測試(E-test)，結果發現，在 fluconazole 處理下，HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*) 的抑菌圈明顯大於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)，MIC 等於 4  $\mu$ g/ml (附圖四) (Lo, et al., 2005)。所以，白色念珠菌之致病因子 Efg1 可能經由負向調控 *ERG3* 基因而改變對真菌藥物的敏感性 (圖五)，也證實抗藥性及致病力在 *Candida albicans* 中是相互連接的。

另外，Efg1 為白色念珠菌之 transcription factor，具有 basic helix-loop-helix(bHLH) motif。研究也指出(Leng, et al., 2001)，Efg1 為 DNA-binding protein，可以專一性地對 E box (consensus sequence, 5'-CANNTG-3')作結合。為了更進一步的瞭解，Efg1p 是如何影響 *ERG3*、*ERG11*

之基因表現量。因此，將 E box 之 consensus sequence (5'-CANNTG-3')和 *EFG3*、*ERG11* 其 promoter region(-1000 ~ -1 of ORF)作比對。結果顯示，*ERG3* 及 *ERG11* 此二基因之 promoter 區域並沒有 E box consensus sequence(表三、表四)。所以，Efg1p 有可能不是直接經由 protein-DNA 的交互作用而達到調控功能; Efg1p 可能是透由其它調控子的作用而間接地影響 *ERG3*、*ERG11* 之基因表現量。

## 5.2 分析醣解酵素基因生理功能具有抗藥性改變和型態變化

承襲本實驗室以往利用 SSH 技術，得到許多可能與調控菌絲生長或是致病力的相關基因，分析比對發現其中有些是醣解酵素基因。因此，實驗室(陳杏芳，2004)將整個生合成途徑上的十一個基因(附圖二)，以北方墨點法分析該基因在野生株 (SC5314)、*efg1/efg1 cph1/cph1*(HLC54)、*CPH1/CPH1efg1/efg1*(HLC52)、*cph1/cph1EFG1/EFG1*(JKC19)等四菌株內的表現量差異為何，分析醣解酵素十一個基因的結果中，*TPI1*、*ENO1*、*GPM1*、*PGK1*、*PYK1* 等五個基因表現量差異較為明顯(附圖二)。因此推測此五個基因的確是有可能和菌絲生長或致病力有所關聯。有鑒於 *ERGs* 的結果，本研究也想知道，醣解酵素基因是否有可能同時和抗藥性改變有所關聯。至於為何選用 HLC54、HLC52、JKC19 此三突變株，因為，*EFG1* 為白色念珠菌 transcription factor，具有 helix-loop-helix motif，和 Myc 相似，其過度表現會誘導酵母菌(在酵母菌中，此基因稱為 *PHD1*)和白色念珠菌假菌絲的生長，所以是正向調控型態變化(Stoldt, et al., 1997);*CPH1* 基因產物同源(homologous)於 *S.cerevisiae* 中的 *STE12*，在白色念珠菌中突變此基因，會明顯地影響菌絲的生長，也損害血清誘導所長出的 germ tube 及菌絲的形成(Liu, et al., 1994);當 *EFG1* 和 *CPH1* 同時被剔除掉時，會破壞菌絲生長的能力，且無法在巨噬細胞的攻擊下生存(Lo, et al., 1997)，也使得念珠菌在小鼠

模式中沒有致病力，證實 *Cph1p* 及 *Efg1p* 是白色念珠菌中促進菌絲生長的獨立途徑(Riggle, et al., 1999)，所以偵測目標基因於此三菌株中的表現量和野生株中的差異，可知目標基因功能是否和致病力有關，甚至可推測其調控路徑可能為何。

就實驗方法設計上，採取實驗室常使用的北方墨點法，分析目標基因其 mRNA 於以上所述的四菌株中的表現量差異，更外加了 *Candt80/Candt80* 突變株的兩個 strain。其原因為已知過度表現藥物幫浦 *CDR1* 基因，是促進白色念珠菌抗藥性主要的機制之一，而在研究其調控因子時，發現 *Candt80/Candt80* 突變株，其抗真菌藥物敏感性大於野生株，也就是 *CaNDT80* 基因會抑制 *CDR1* 基因的表現(Chen, et al., 2004)，因此為了更能解讀型態變化和抗藥性途徑的關連為何，多加此突變株。

除此之外，針對致病性的瞭解，在培養菌體時，其培養條件為可誘導白色念珠菌產生菌絲的環境：37°C、YPD 培養液外加山羊血清，爾後萃取 RNA 進行北方墨點法，分析其 mRNA 在野生株 (SC5314)、*efg1/efg1* *cph1/cph1*(HLC54)、*CPH1/CPH1efg1/efg1*(HLC54)、*cph1/cph1 EFG1/EFG1*(JKC19)、*Candt80/Candt80*(YLO133)、*Candt80/Candt80*(YLO136)等六菌株中的表現量差異。為進一步瞭解目標基因和抗藥性的關連及其調控途徑可能為何，一樣偵測目標基因在上述六個菌株中 mRNA 表現量差異，把操控變因改為加入抗真菌藥物(miconazole)，再萃取 RNA 進行北方墨點法。

### 5.2.1 北方墨點法分析 *ENO1* 基因表現量之探討 (表二) (圖四、五)

*ENO1* 在加血清培養下，在 HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136 (*Candt80/Candt80*) 中表現量小於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)，在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中表現量大於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)。

由此可知，*ENO1* 可能經由 *CPH1* 和 *EFG1* 基因的共同調控而影響型態變化（圖四、圖十四）。

*Enolase* 為 *ENO1* 基因產物。研究指出，當白色念珠菌的 *enolase* 結合至 plasminogen 會增加人類腦部為血管上皮細胞的侵犯能力(Jong, et al., 2003)，另外，*enolase* 也會與細胞壁上的 glucan 結合，而出現在細胞壁內層，是引起宿主免疫反應的重要因子，常被用來鑑定白色念珠菌入侵深部組織之標的物，因此 *enolase* 是極有可能參與白色念珠菌的致病過程(Chaffin, et al., 1998)。承襲本節提及醣解酵素基因是否涉及型態致病力途徑，本實驗室針對 *ENO1* 基因利用北方墨點法、分析單基因突變株及四環黴素調控突變株，生長情形、芽管試驗、型態變化等，確認 *ENO1* 基因的表現量多寡會影響生長及型態變化(Yang, et al., 2006)。綜合以上前人研究及本實驗的確認，顯示白色念珠菌的 *ENO1* 基因涉及生長及形態途徑。至於致病性則有待進一步釐清。而 *ENO1* 基因在加血清情形下，於 *CaNDT80/Candt80* 突變株(YLO133、YLO136)中表現量較低，推測 *ENO1* 可能受 *CaNDT80* 基因的調控下影響其他未知性狀或白色念珠菌對藥物的敏感性，或者是 *CaNDT80* 基因其未知功能中，可能包含了對型態變化的影響(圖十四)。

為了進一步瞭解 *ENO1* 基因是否也涉及抗藥性途徑，於菌體培養時，加入抗真菌藥物(miconazole)培養，萃取 RNA，進行北方墨點法分析，結果顯示 *ENO1* mRNA 在每個菌株中的表現差異並不大(圖五)。然而有研究指出，當白色念珠菌的生物膜形成時，*ENO1* 基因的表現量也隨之增加(Garcia-Sanchez, et al., 2004)，而生物膜的產生將菌株和藥物隔絕，使之對 azoles 和 Amphoteric B 產生非常高的抗性(Ramage, et al., 2001)。另外，*enolase* 是一個念珠菌細胞壁上的主要 glucan-associated protein(GAPs)，研究發現，當藥物敏感性菌株，在 fluconazole 的處理下，會改變念珠菌上 GAPs 的組成改變，其組成比例變成和抗藥性菌株的組成相當，例如：主要的

GAPs, enolase 和 phosphoglycerate mutase(*GPM1* 基因產物)的成分減低,而被 exoglucanase 取 而代之。然而,這些 GAPs 具有高抗原性,所以當它在細胞壁上出現量減低,即減低了抗原性,使得念珠菌不但得以逃避宿主免疫系統的攻擊,也因改變了 GAPs 組成而導致抗藥性(Angiolella, et al., 2002)。由此看來,*ENO1* 雖然在 mRNA level 上無法明顯偵測到和抗藥性的關聯性,但並不代表,其最後展現的生理功能和抗藥性絕對沒有關聯,例如:有可能在 protein level 上有所調控。若有機會得到突變株功能缺失 (null mutant), 仍是進行性狀分析。

### 5.2.2 北方墨點法分析 *TPII* 基因表現量之探討 (表二) (圖六、七)

在加血清誘導培養下,其 mRNA 表現 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中小於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*), 在 HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、在 YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136 (*Candt80/Candt80*) 約等於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)。在野生株(SC5314)和雙突變株(HLC54)中的表現量差異,和實驗室先前(陳杏芳, 2004)所得到的結果,呈現逆向趨勢的解讀,可能是之前實驗室所得到的結果,在操作上並沒有加入 internal control, 而將 formaldehyde gel 上的 ribosomal RNA 視為定量標準,這樣的作法並非十分精準,仍得考量電泳圖曝光時間是否得當、雜交反應的一致性、每個菌株所抽取得到的 total RNA 的穩定性差異、、、等等操作誤差。

Triose-phosphate isomerase 為 *TPII* 基因產物, 研究指出當白色念珠菌在小鼠系統性感染, *Tpi1p* 具有引起宿主免疫反應的能力 (Pitarch, et al., 2001); 在極低溫度(-20°C)時, 其 *TPII* mRNA 會因此外在壓力而有大量表現的趨勢(Rodriguez-Vargas, et al., 2002), 而白色念珠菌的型態變化也受溫度所影響, 回顧以上所述文獻, 及結合本實驗之北方墨點法結果, 可知 *TPII* 基因可能受 *CPHI* 基因調控而影響型態變化/致病性。

針對 *TPII* 基因是否涉及抗藥性途徑，於菌體培養時，加抗真菌藥物誘導培養下，萃取 RNA，進行北方墨點法，結果顯示，*TPII*mRNA 表現在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*) 中的表現量和在 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) 相當，在 HJL54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 表現量小於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，但差異性不到一倍，可見 *TPII* 也有可能受致病力之調控。在 YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136 (*Candt80/Candt80*) 中則小於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，其差異性相差到一倍之多。由此可知，*TPII* 可能受 *CaNDT80* 基因的正向調控。因此，*CaNDT80* 在驅使 *CDRI* 的基因表現，而正向影響藥物幫浦的形成，產生抗藥性(Chen, et al., 2004)的時候，也正向影響 *TPII*；不過有文獻指出，白色念珠菌可形成 biofilm，使菌株細胞和藥物隔絕，減低菌體對藥物的敏感性，此時 *TPII* 的基因表現量隨之增加(Garcia-Sanchez, et al., 2004)，與本研究結果一致。以上這些訊息透露出，*TPII* 基因功能除了影響致病力之外，也有可能為抗藥性途徑之一。

統整以上所述，以 37°C、加血清、YPD 培養的情形下，*TPII* 有可能受 *CPHI* 正向調控而影響型態變化(圖六)；而操控變因不加血清去掉、改加抗真菌藥物(miconazole)的情形下，*TPII* 基因其 mRNA level 的表現量可能受 *CPHI* 和 *EFG1* 兩者基因共同正向調控(圖七)，及受 *CaNDT80* 正向基因調控而可能導致抗藥性的產生(圖七、圖十四)。

### 5.2.3 北方墨點法分析 *GPM1* 基因表現量之探討(表二)(圖八、九)

*GPM1* 在加山羊血清誘導下，分析其 mRNA 表現量的結果顯示，在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*)、HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)、*Candt80* 突變株 YLO133 及 YLO136，皆大於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，因此 *GPM1* 可能受 *EFG1*、*CPHI* 之

各別負向調控而影響致病性，同時 *GPM1* 也可能受 *CaNDT80* 基因的調控下影響其他未知性狀或白色念珠菌對藥物的敏感性，或者是 *CaNDT80* 基因其未知功能中，可能包含了對型態變化的影響（圖十五）。

在加抗真菌藥物誘導培養下，其 mRNA 在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)、HLC54(*cph1/cph1efg1/efg1*)、YLO136 (*Candt80/Candt80*) 等突變株中的表現量皆大於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)，兩隻 *Candt80/Candt80* 突變株為實驗的二重複，因 YLO133 在人為操作上定量不好，故以 YLO136 中的表現量為結果。可見 *GPM1* 在 miconazole 誘導下，也同時受 *CPH1*、*EFG1*、*CaNDT80* 之各別調控（圖十五）。

*GPM1* 的基因產物為 phosphoglycerate mutase，為白色念珠菌醱解反應的酵素之一，目前已知在小鼠全身感染系統中，此酵素會展現其抗原性 (Fernandez-Arenas, et al., 2004)，因此有可能涉及致病性的影響。另外，當白色念珠菌形成生物膜時、培養過程加入抗真菌藥物 fluconazole 時，或是當環境為氨基酸營養缺乏時(3-aminotriazole treatment)，*GPM1* 基因皆有過度表現的情形，已知此途徑之上游調控因子有 Efg1p 和 Gcn4p：Efg1p 已知可調控型態變化/致病性及抗藥性(Lo, et al., 2005)，Gcn4p 為正常生物膜生長所必須之調控因子(Garcia-Sanchez, et al., 2004)，又已知當菌體生物膜產生時，會隔絕菌體細胞和藥物的接觸，而使菌體對於藥物的感受性改變。所以由文獻可得知，*GPM1* 可透由 Efg1p 和 Gcn4p 而影響菌體對藥物的感受性。此推論和本實驗結果符合。因此，*GPM1* 同時涉及致病力及抗藥性之調控。

#### 5.2.4 北方墨點法分析 *PYK1* 基因表現量之探討（表二）（圖十、十一）

*PYK1* 其基因產物為 Pyruvate kinase，為催化醱解反應最後一個步驟 (Swoboda, et al., 1993)。*PYK1* 基因在白色念珠菌感染寄主過程，會引發寄

主的抗體反應(Pitarch, et al., 2001)。此外，M. Andrew Uhl 等人(Uhl, et al., 2003)利用轉位子(transposon)突變技術法，將 Tn7 轉位子插入白色念珠菌之基因體 DNA 片段上，大量複製此片段後，再利用同源置換的原理將此 DNA 片段轉形回白色念珠菌，進而取得共有 18,000 之單股基因突變菌株的 library，最後藉由改變環境因子來培養突變株，利用兩者有效的控制變因促使菌絲生長，觀察其突變株的型態變化，第一種為加入血清培養，第二種為營養匱乏(starvation)的調控—將菌體培養在 Spider medium 上。在此大量篩選下，146 個基因會影響型態變化，其中依其功能可分出七類，而營養新陳代謝為一類，*PYK1* 是其中之一之 candidate。文獻進一步指出 *PYK1* 單套基因突變株皺褶的情形比起野生株沒那麼明顯(Uhl, et al., 2003)，經由上述文獻回顧，得知 *PYK1* 基因可能涉及型態變化。

本實驗之北方墨點法結果，可知 *PYK1* 在加山羊血清誘導下，分析其 mRNA 表現量的結果顯示，在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)、YLO133 (*Candt80/Candt80*)、YLO136(*Candt80/Candt80*)，其 mRNA 表現量皆約等於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)，但在 HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)中的表現量大於 SC5314(*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*) (圖十)，所以由本實驗結果可進一步推論 *PYK1* 可能藉由 Cph1p 和 Efg1p 共同的調控而影響型態變化 (圖十五)。而且在加藥誘導培養下，於 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、YLO133(*Candt80/Candt80*)、YLO136(*Candt80/Candt80*)，其 mRNA 表現量約等於 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)，但在 HLC52(*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)、HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)中表現量皆小於 SC5314(*CPH1/CPH1 EFG1/EFFGI*)(圖十一)。所以，*PYK1* 可能經由 Efg1p 負向調控而協同影響菌體對藥物的感受性及型態變化 (圖十五)，符合本實驗論文所欲研究之目的，找出可協同影響菌體的藥物感受性及型態變化

的基因。

#### 4.2.5 北方墨點法分析 *PGK1* 基因表現量之探討 (表二)(圖十二、十三)

*PGK1* 之基因產物為 phosphoglycerate kinase，為醣解反應中其中之一的酵素，而關於此酵素和型態變化/致病性及抗藥性的關連，有以下說法：

白色念珠菌其產生致病力的主要特徵，一個是型態變化，可從 blastospores 轉變成菌絲型細胞(hyphae)。另一特徵為白色念珠菌可經由細胞壁上的成分對寄主細胞產生黏附作用 (adhesion) (Cutler, 1991; Odds, 1994)。而真菌細胞壁組成成分為彈性變化，其表現常和一些生理變化過程有關，包含維持細胞型態、膨壓保護細胞等(Cid, et al., 1995; Klis, 1994)，除了這些重要功能之外，真菌的致病菌其細胞壁亦是決定致病力的關鍵因素。例如：抗原性決定因子 (antigenic determinants) 和黏附作用的產生有關，會經由細胞壁成分在寄主細胞形成菌落和使得寄主產生免疫反應，更進一步導致致病

(pathogenesis) (Navarro-Garcia, et al., 2001)。所以，有些科學家認為一些只出現在菌絲型細胞壁上而不出現在酵母型細胞上的蛋白，有可能為導致白色念珠菌在寄主內產生致病力的因子，其中就有研究指出 Pgl1p 即是此種蛋白之一(Urban, et al., 2003)，因此推論 Pgl1p 的表現可能會影響型態變化。此推論和本實驗結果相似，當菌體加入血清、YPD 培養液、37°C 培養後，萃取 RNA 所進行的北方墨點法結果，其 mRNA 表現量於 JKC19

(*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、HLC52(*CPH1/CPH1 efg1/efg1*)、HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)、YLO133(*Candt80/Candt80*)、YLO136(*Candt80/Candt80*)中表現量明顯低於 SC5314(*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*) (圖十二)，由此結果可進一步推論得知，*PGK1* 基因可能經由 *CPH1*、*EFG1*、*CaNDT80* 等基因分別調控而可能影響型態變化/致病力或是

其它性狀的改變產生。

另外，關於 *PGK1* 是否有可能和藥物誘導的白色念珠菌抗藥性機制有所關連，實驗結果顯示，於加抗真菌藥物培養下，*PGK1* 基因在 mRNA 表現量中 mRNA 表現量在其他菌株中和長菌絲菌株 SC5314 並無太大差異，但在 YLO133(*Candt80/Candt80*)、YLO136(*Candt80/Candt80*)其 mRNA 表現量略大於 SC5314(*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) (圖十三)，因此，若 *PGK1* 涉及抗藥性調控，則較可能直接受 *CaNDT80* 產生作用 (圖十五)。

### 5.3 *TPII* 基因性狀分析之探討

由於先前實驗室已建構好了 *TPII* 單套突變株，加上北方墨點法之結果推測，*TPII* 可能和型態及抗藥性有關，進行 TR-system mutant 之建構。因此取 *TPII* 基因為第一優先之分析目標基因。

#### 5.3.1 生長情形之探討

將突變株培養於液態培養液及固態培養皿中，觀察其生長速度。將菌體在培養液中的生長情形，記錄成生長曲線 (圖二十五)，從生長曲線的觀察得知：當 *tpi1/TPII::TR* 突變株受 TetR 活化而 *TPII* 基因過度表現時，其生長速度大於對照組 BWP17/tetR，當 *tpi1/TPII::TR* 突變株其 TR promoter 被 doxycycline 抑制，*TPII* 基因表現被抑制(down-regulate)時，生長速度比對照組 Bwp17/tetR 慢。從 YPD 和 SD 固態培養皿上的結果(圖二十六、二十七)得知：當 *TPII* 基因被 down-regulate 時，其生長速度比起野生株減慢許多；但 *TPII* 基因過度表現時，其突變株在 YPD 培養液中，生長速度大於 BWP17/tetR，而其在 YPD 培養基中和野生株 SC5314 的生長情形相似，這不一致性的結果，可能是因培養時間天數所造成，培養液體中的觀察不到一天，較短期的現象，而固態培養基是比較長期的觀察，*TPII* 過度表現時，突變株和對照組的最終的生長速度可能是一樣的。

### 5.3.2 型態變化之探討

針對 *TPII* 過度表現和抑制表現時，利用 YPD 培養皿外加血清的誘導，發現其 *tpi1/TPII::TR* 突變株在不加藥(-DOX)，也就是 *TPII* 基因過度表現之下，其單一菌落的外觀與野生株 SC5314 相似，外觀皺摺，面積也相當(約  $4\text{cm}^2$ )。當 *tpi1/TPII::TR* 突變株在不加藥(-DOX)，也就是 *TPII* 基因表現被抑制時，其單一菌落的面積小於野生株 SC5314 或是 *tpi1/TPII::TR* 突變株在不加藥(-DOX)情形下的菌落，面積約為  $0.11\text{cm}^2$ ，只有其 1/36 的大小，明顯小許多(圖二十八)。

進一步，進行芽管實驗瞭解芽管是否生成，結果顯示 *TPII* 過度表現的情形和 *TPII* 表現被抑制下，芽管皆有生成(圖二十九)。為了在更一步瞭解，觀察到芽管生成是否是因觀察時間點較短，而看不出性狀差異，所以再一步將時間點增長為隔夜培養(18 hr)，結果顯示，當 *TPII* 基因過度表現，其生成的增長型菌絲和野生株 SC5314 差不多，但當 *TPII* 基因表現被抑制時，沒有增長型菌絲的生成(圖三十)。

另外，觀察突變株在單純只有血清提供營養的環境下，其單一菌落菌絲分佈情形，結果顯示，當 *TPII* 過度表現，其菌絲毛茸的放射性存在，但菌絲的濃密度比野生株 SC5314 低，當 *TPII* 基因表現被抑制時，其沒有毛茸的菌絲生成，但輪廓也不像 *cph1/cph1 efg1/efg1* 雙突變株為一個完整圓形，而是呈現斑駁塊狀(圖三十一)。這樣菌絲生長的情形，可與侵犯力實驗作連結(圖三十二)。當 *TPII* 基因被抑制時，雖有芽管生成，但菌體變小，沒有增長型菌絲生成，單一菌落也沒有毛茸的放射狀分佈，對於 solid spider 的侵犯力也相當低，在固定水量(水龍頭水不關)，沖刷 *tpi1/TPII::TR(+DOX)* 突變株離開培養基的時間不到一分鐘，全部菌落脫落，而對照組 *cph1/cph1efg1/efg1* 突變株的脫落時間為一分三十秒。所以，可推測 *TPII* 和型態變化的相關性極高，所造成的型態變化，有可能影響到真菌聚落能力

和入侵寄主細胞的能力，而影響致病力。

#### 5.4 未來展望

第一、由北方墨點法的分析，可知 *TPII*、*GPM1*、*PYK1*、*PGK1* 之表現皆可同時受血清及藥物之調控，因此可以針對這些基因進行突變分析，瞭解其在型態、入侵能力及抗藥性之影響。

第二、*TPII* 基因在本論文研究下，證實了其基因功能會影響型態變化，但這是在 TR-system 下所得到的結果，而此 gene targeting 之方法，進行單套基因之破壞及 TR-system 調控目標基因過度表現及抑制表現的機制，在研究上的穩定性，是否能夠完全抑制目標基因、是否會受其他的未知的調控子所影響等問題仍被探討中，所以如能得到 *TPII* null mutant，不僅可作為此系統的對照，也有利於將來進行藥物敏感性實驗(E-test)，為本研究最終的目的，瞭解 *TPII* 基因功能和型態變化及抗藥性的關連性。

## 第六章、參考文獻

孔祥琪、陳宜君，90 年。全身性抗黴菌藥物治療的最新進展 全身性抗黴菌藥物治療的最新進展

[http://www.sim.org.tw/journal/jour12-3/P12\\_132.PDF](http://www.sim.org.tw/journal/jour12-3/P12_132.PDF)

徐嘉瞳，2003，交大碩士論文。野生種白色念珠菌與 *cph1/cph1 efg1/efg1* 雙基因突變種於可誘發野生種形成菌絲環境下之基因表現比較(Marr, et al., 1998)

陳宜君，2003，台大博士論文。念珠菌院內感染的臨床、分子流行病學研究，及白色念珠菌致病因子，分泌性 aspartyl proteinase 的研究

陳杏芳，2004，交大碩士論文。以同源重組技術對白色念珠菌的醣解酵素基因 *TPII* 及 *ENO1* 置入可調控之 TR 啟動子作突變分析

郭大榮，2002，交大碩士論文。白色念株菌之 *EFG1* 和/或 *CPHI* 下游基因的分類與確認

林啟陽，2002，交大碩士論文。白色念珠菌抗毒性相關之研究

Aaron, K. E., Pierson, C. A., Lees, N. D. and Bard, M. (2001). The *Candida albicans* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) is essential for growth. *FEMS Yeast Res* **1**, 93-101.

Angiolella, L., Micocci, M. M., D'Alessio, S., Girolamo, A., Maras, B. and Cassone, A. (2002). Identification of major glucan-associated cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1688-94.

Asakura, K., Iwaguchi, S., Homma, M., Sukai, T., Higashide, K. and Tanaka, K.

- (1991). Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Gen Microbiol* **137**, 2531-8.
- Bard, M., Sturm, A. M., Pierson, C. A., Brown, S., Rogers, K. M., Nabinger, S., Eckstein, J., Barbuch, R., Lees, N. D., Howell, S. A. and Hazen, K. C. (2005). Sterol uptake in *Candida glabrata*: rescue of sterol auxotrophic strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* **52**, 285-93.
- Barelle, C. J., Bohula, E. A., Kron, S. J., Wessels, D., Soll, D. R., Schafer, A., Brown, A. J. and Gow, N. A. (2003). Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**, 398-410.
- Borg-von Zepelin, M., Beggah, S., Boggian, K., Sanglard, D. and Monod, M. (1998). The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* **28**, 543-54.
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X. and Johnson, A. D. (2000). Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**, 31-44.
- Braun, B. R. and Johnson, A. D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* **277**, 105-9.
- Calderone, R. A. and Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327-35.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 130-80.
- Chau, A. S., Gurnani, M., Hawkinson, R., Laverdiere, M., Cacciapuoti, A. and

- McNicholas, P. M. (2005). Inactivation of sterol Delta5,6-desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3646-51.
- Chen, C. G., Yang, Y. L., Shih, H. I., Su, C. L. and Lo, H. J. (2004). CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating CDR1. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4505-12.
- Chen, Y. C., Chang, S. C., Sun, C. C., Yang, L. S., Hsieh, W. C. and Luh, K. T. (1997). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol* **18**, 369-75.
- Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C. and Sanchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**, 345-86.
- Cutler, J. E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218.
- De Bernardis, F., Arancia, S., Morelli, L., Hube, B., Sanglard, D., Schafer, W. and Cassone, A. (1999). Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* **179**, 201-8.
- Favre, B. and Ryder, N. S. (1997). Cloning and expression of squalene epoxidase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Gene* **189**, 119-26.
- Fernandez-Arenas, E., Molero, G., Nombela, C., Diez-Orejas, R. and Gil, C. (2004). Low virulent strains of *Candida albicans*: unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics* **4**, 3007-20.
- Filler, S. G., Pfunder, A. S., Spellberg, B. J., Spellberg, J. P. and Edwards, J. E., Jr. (1996). *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte

- adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun* **64**, 2609-17.
- Franz, R., Michel, S. and Morschhauser, J. (1998). A fourth gene from the *Candida albicans* CDR family of ABC transporters. *Gene* **220**, 91-8.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W. A., Belanger, P. H., Edwards, J. E., Jr. and Filler, S. G. (1998). Expression of the *Candida albicans* gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* **66**, 1783-6.
- Gale, C., Finkel, D., Tao, N., Meinke, M., McClellan, M., Olson, J., Kendrick, K. and Hostetter, M. (1996). Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 357-61.
- Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J. and Hostetter, M. K. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* **279**, 1355-8.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M. and d'Enfert, C. (2004). *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* **3**, 536-45.
- Ghannoum, M. and Abu Elteen, K. (1986). Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **24**, 407-13.
- Ghannoum, M. A. and Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**, 501-17.

- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. and Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**, 179-82.
- Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species, *Trends Microbiol*, pp. 591-6.
- Hostetter, M. K. (2000). RGD-mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. *Curr Opin Microbiol* **3**, 344-8.
- Hoyer, L. L., Scherer, S., Shatzman, A. R. and Livi, G. P. (1995). *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol* **15**, 39-54.
- Hsueh, P. R., Chen, M. L., Sun, C. C., Chen, W. H., Pan, H. J., Yang, L. S., Chang, S. C., Ho, S. W., Lee, C. Y., Hsieh, W. C. and Luh, K. T. (2002). Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. *Emerg Infect Dis* **8**, 63-8.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. and Gow, N. A. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **14**, 87-99.
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A. J. and Gow, N. A. (1997). Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* **65**, 3529-38.
- Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Sanglard, D., Edwards, J. E., Jr. and Hube, B. (1998). Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. *Infect Immun* **66**, 3003-5.
- Jenkinson, H. F. (1996). Ins and outs of antimicrobial resistance: era of the drug pumps. *J Dent Res* **75**, 736-42.

- Jensen-Pergakes, K. L., Kennedy, M. A., Lees, N. D., Barbuch, R., Koegel, C. and Bard, M. (1998). Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1160-7.
- Jia, N., Arthington-Skaggs, B., Lee, W., Pierson, C. A., Lees, N. D., Eckstein, J., Barbuch, R. and Bard, M. (2002). *Candida albicans* sterol C-14 reductase, encoded by the ERG24 gene, as a potential antifungal target site. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 947-57.
- Jong, A. Y., Chen, S. H., Stins, M. F., Kim, K. S., Tuan, T. L. and Huang, S. H. (2003). Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **52**, 615-22.
- Kelly, R., Miller, S. M., Lai, M. H. and Kirsch, D. R. (1990). Cloning and characterization of the 2,3-oxidosqualene cyclase-coding gene of *Candida albicans*. *Gene* **87**, 177-83.
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Loeffler, J. and Einsele, H. (1996). Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* **348**, 1523-4.
- Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**, 851-69.
- Lamb, D. C., Maspahy, S., Kelly, D. E., Manning, N. J., Geber, A., Bennett, J. E. and Kelly, S. L. (1999). Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol delta<sup>22</sup>-desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1725-8.
- Lan, C. Y., Newport, G., Murillo, L. A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R. W. and Agabian, N. (2002). Metabolic specialization associated with phenotypic

- switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14907-12.
- Leberer, E., Thomas, D. Y. and Whiteway, M. (1997). Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 59-66.
- Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. and Ghannoum, M. A. (1998). Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**, 26078-86.
- Leng, P., Lee, P. R., Wu, H. and Brown, A. J. (2001). Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol* **183**, 4090-3.
- Lipke, P. N., Wojciechowicz, D. and Kurjan, J. (1989). AG alpha 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol Cell Biol* **9**, 3155-65.
- Liu, H., Kohler, J. and Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* **266**, 1723-6.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-49.
- Lo, H. J., Wang, J. S., Lin, C. Y., Chen, C. G., Hsiao, T. Y., Hsu, C. T., Su, C. L., Fann, M. J., Ching, Y. T. and Yang, Y. L. (2005). Efg1 involved in drug resistance by regulating the expression of ERG3 in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1213-5.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. and Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* **8**, 76-81.

- Magee, B. B., Hube, B., Wright, R. J., Sullivan, P. J. and Magee, P. T. (1993). The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect Immun* **61**, 3240-3.
- Marichal, P., Gorrens, J., Laurijssens, L., Vermuyten, K., Van Hove, C., Le Jeune, L., Verhasselt, P., Sanglard, D., Borgers, M., Ramaekers, F. C., Odds, F. and Vanden Bossche, H. (1999). Accumulation of 3-ketosteroids induced by itraconazole in azole-resistant clinical *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2663-70.
- Marr, K. A., Lyons, C. N., Rustad, T. R., Bowden, R. A. and White, T. C. (1998). Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2584-9.
- Merson-Davies, L. A. and Odds, F. C. (1989). A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **135**, 3143-52.
- Miyazaki, Y., Geber, A., Miyazaki, H., Falconer, D., Parkinson, T., Hitchcock, C., Grimberg, B., Nyswaner, K. and Bennett, J. E. (1999). Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of ERG3 (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* **236**, 43-51.
- Monod, M., Hube, B., Hess, D. and Sanglard, D. (1998). Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* **144** ( Pt 10), 2731-7.
- Monod, M., Togni, G., Hube, B. and Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13**, 357-68.

- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M. and Aoki, Y. (2000). Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**, 6712-9.
- Navarro-Garcia, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Pla, J., Sentandreu, R. and Nombela, C. (1998). A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* **144 ( Pt 2)**, 411-24.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. and Pla, J. (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 245-68.
- Nolte, F. S., Parkinson, T., Falconer, D. J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R. and Wingard, J. R. (1997). Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 196-9.
- Odds, F. C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* **31**, S2-5.
- Pasrija, R., Prasad, T. and Prasad, R. (2005). Membrane raft lipid constituents affect drug susceptibilities of *Candida albicans*. *Biochem Soc Trans* **33**, 1219-23.
- Pierson, C. A., Eckstein, J., Barbuch, R. and Bard, M. (2004a). Ergosterol gene expression in wild-type and ergosterol-deficient mutants of *Candida albicans*. *Med Mycol* **42**, 385-9.
- Pierson, C. A., Jia, N., Mo, C., Lees, N. D., Sturm, A. M., Eckstein, J., Barbuch, R. and Bard, M. (2004b). Isolation, characterization, and regulation of the *Candida albicans* ERG27 gene encoding the sterol 3-keto reductase. *Med Mycol* **42**, 461-73.

- Pitarch, A., Diez-Orejas, R., Molero, G., Pardo, M., Sanchez, M., Gil, C. and Nombela, C. (2001). Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics* **1**, 550-9.
- Ramage, G., Wickes, B. L. and Lopez-Ribot, J. L. (2001). Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab* **20**, 42-4.
- Riggle, P. J., Andrutis, K. A., Chen, X., Tzipori, S. R. and Kumamoto, C. A. (1999). Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun* **67**, 3649-52.
- Rodriguez-Vargas, S., Estruch, F. and Randez-Gil, F. (2002). Gene expression analysis of cold and freeze stress in Baker's yeast. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3024-30.
- Roessner, C. A., Min, C., Hardin, S. H., Harris-Haller, L. W., McCollum, J. C. and Scott, A. I. (1993). Sequence of the *Candida albicans* *erg7* gene. *Gene* **127**, 149-50.
- Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J. and Bille, J. (2003a). Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* **48**, 959-76.
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. and Bille, J. (1996). Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2300-5.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D. and Bille, J. (2003b). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **47**,

2404-12.

- Sanglard, D. and Odds, F. C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**, 73-85.
- Schaller, M., Hube, B., Ollert, M. W., Schafer, W., Borg-von Zepelin, M., Thoma-Greber, E. and Korting, H. C. (1999). In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* **112**, 383-6.
- Schaller, M., Schafer, W., Korting, H. C. and Hube, B. (1998). Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* **29**, 605-15.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. and Soll, D. R. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**, 189-97.
- Soll, D. R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* **81**, 101-10.
- Soll, D. R., Langtimm, C. J., McDowell, J., Hicks, J. and Galask, R. (1987). High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J Clin Microbiol* **25**, 1611-22.
- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E. and Ernst, J. F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J* **16**, 1982-91.
- Swoboda, R. K., Bertram, G., Hollander, H., Greenspan, D., Greenspan, J. S., Gow, N. A., Gooday, G. W. and Brown, A. J. (1993). Glycolytic enzymes

- of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. *Infect Immun* **61**, 4263-71.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. and Ernst, J. F. (1998). Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**, 20837-46.
- Uhl, M. A., Biery, M., Craig, N. and Johnson, A. D. (2003). Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*. *Embo J* **22**, 2668-78.
- Urban, C., Sohn, K., Lottspeich, F., Brunner, H. and Rupp, S. (2003). Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett* **544**, 228-35.
- Weide, M. R. and Ernst, J. F. (1999). Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mycoses* **42 Suppl 2**, 61-7.
- White, T. C. (1997). Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1482-7.
- White, T. C., Marr, K. A. and Bowden, R. A. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**, 382-402.
- Yang, Y. L., Chen, H. F., Kuo, T. J. and Lin, C. Y. (2006). Mutations on CaENO1 in *Candida albicans* inhibit cell growth in the presence of glucose. *J Biomed Sci*, 1-9.



Standard Name	Systemic Name	Molecular Function	Mutant phenotype			References
<i>ERG1</i>	<i>orf19.406</i>	<u>squalene monooxygenase activity</u>	Homozygous null	Heterozygous null	Conditional	(Favre and Ryder, 1997; Pasrija, et al., 2005)
			Inviabile Inviabile(Inferred)	Viable	1.Viable 2.Hyphal growth abnormal 3.Slow growth 4.Drug susceptibility altered 5.Protein localization abnormal	
<i>ERG2</i>	<i>orf19.6026</i>	<u>C-8 sterol isomerase activity</u>	Unknown/unspecified			(Pierson, et al., 2004a)
			1. Viable 2. Drug susceptibility altered 3. Plasma membrane abnormal			
<i>ERG3</i>	<i>orf19.767</i>	<u>C-5 sterol desaturase activity</u>	Homozygous null	Heterozygous null	Unknown/unspecified	(Chau, et al., 2005; Miyazaki, et al., 1999; Nolte, et al., 1997; Pierson, et al., 2004a; Sanglard, et al., 2003b)
			1.Viable 2. Drug susceptibility altered 3. Protein activity abnormal 4. Hyphal growth abnormal 5. Virulence defect	1.Viable 2. Wild-type drug sensitivity	1. Viable 2. Drug susceptibility altered 3. Plasma membrane abnormal	

<i>ERG4</i>	<i>orf19.5379</i>	similar to sterol C-24 reductase						(Lamb, et al., 1999; Uhl, et al., 2003)	
<i>ERG5</i>	<i>orf19.5178</i>	<u>C-22 sterol desaturase activity</u>	Unknown/unspecified						
			Filamentous growth abnormal						
<i>ERG6</i>	<i>orf19.1631</i>	<u>sterol 24-C-methyltransferase activity</u>	Homozygous null					(Jensen-Pergakes, et al., 1998)	
			1. Viable 2. Drug susceptibility altered 3. Plasma membrane abnormal						
<i>ERG7</i>	<i>orf19.1570</i>	<u>lanosterol synthase activity</u>						(Kelly, et al., 1990; Roessner, et al., 1993)	
<i>ERG11</i>	<i>orf19.922</i>	1. <u>drug binding</u>	Homozygous null	Heterozygous null	Unknown/unspecified	Multiple	Overexpression	Point	
		2. <u>sterol 14-demethylase activity</u>	1. Viable 2. Drug susceptibility altered	Viable	Drug susceptibility altered	1. Drug susceptibility altered 2. Viable	1. Drug susceptibility altered 2. Viable	1. Drug susceptibility altered 2. Viable	
<i>ERG24</i>	<i>orf19.1598</i>	<u>delta14-sterol reductase activity</u>	Homozygous null					(Jia, et al., 2002)	
			1. Viable 2. Virulence defect 3. Hyphal growth abnormal						

			4.Slow growth 5 Drug susceptibility altered				
<i>ERG25</i>	<i>orf19.3732</i>	<u>C-4 methylsterol oxidase activity</u>				(Marichal, et al., 1999)	
<i>ERG26</i>	<i>orf19.2909</i>	<u>C-3 sterol dehydrogenase (C-4 sterol decarboxylase) activity</u>	Homozygous null (inferred)	Depletion		(Aaron, et al., 2001)	
			Inviabile	Inviabile			
<i>ERG27</i>	<i>orf19.3240</i>	<u>3-keto sterol reductase activity</u>	Homozygous null (inferred)	Heterozygous null	Depletion		(Bard, et al., 2005; Pierson, et al., 2004b)
			Inviabile	Viable	1. Inviabile 2. Slow growth		

表一、白色念珠菌之麥角固醇合成基因功能整理表

(資料來源：<http://www.candidagenome.org/>)

Genotype	<i>ENO1</i>		<i>TPI1</i>		<i>GPM1</i>		<i>PYK1</i>		<i>PGK1</i>	
	+S	+D	+S	+D	+S	+D	+S	+D	+S	+D
<i>cph1/cph1</i> <i>EFG1/EFG1</i>	↑	=	↓	=	↑ ↑	↑	=	=	↓ ↓	=
<i>CPH1/CPH1</i> <i>efg1/efg1</i>	↓	=	=	=	↑ ↑	↑ ↑	=	↓ ↓	↓ ↓	=
<i>CPH1/CPH1</i> <i>EFG1/EFG1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
<i>cph1/cph1</i> <i>efg1/efg1</i>	↑	=	↓	↓	↑ ↑	↑ ↑	↑	↓ ↓	↓ ↓	=
<i>Candt80/Candt80</i> YLO133	↓	=	=	↓ ↓	↑ ↑	=	=	=	↓ ↓	↑
<i>Candt80/Candt80</i> YLO136	↓	=	=	↓ ↓	↑ ↑	↑ ↑	=	=	↓ ↓	↑

表二、醣解酵素基因分別於 YPD + goat serum (+S) 及 YPD + Drug 環境中的表現 (+D: miconazole)，於 37°C 培養下萃取所得 RNA 進行之北方墨點法結果

(符號 ↑ 表示 mRNA 偵測表現量大於 SC5314；↓ 表示小於 SC5314 內的表現量；= 表示等於 SC5314 內表現量；箭頭多寡表示差異量程度)

1 TGTC AATCTA CATAGAGGAG TAGAACGGAT GTAAAGGAAC GGAATATGGA  
-----  
51 ATATGTAATA GTAAA ACTCA AAACGTGTGA AACCCA ACTC CATAGGCTAA  
-----  
101 AAATAAACCG ATCTTCGGAT AGGATAGGGG ATGAGGTGGT GGTGGGGGAC  
-----  
151 AGAGGACGGG AAAAATTAAT GCGAGAAAGA AAAAAAGCAA AACCGTAAGG  
-----  
201 CGGCAAGAAA GAAAAAAGA AAAAAGAAAT TTAGACTTTT TTCTGTCGTC  
-----  
251 GTCGTTCCCA TCTGATATAA AACTTGTATT GTATTGTAAC ATCGTTCCCA  
-----  
301 TCGTACCTTT TACTTAAGTG AAATATAAAA AAAATCCGAT GTGCAGGAAT  
-----  
351 GCAATTGTTT TGC GATATTA TTATTTTCAG CATCCCTCTA ATCTAAGAAA  
-----  
401 TACTTTGTAG CCATAGGAAG ACTACGCGAG ACCACACTTG CATATACATA  
-----  
451 CAAACTTCTT CTGTTTTTTT TTGTATTAAA CTCCTTCAA AACTACTTGT  
-----  
501 TAAGCTTTTT TTTCTTCCAC CTATTTTGAT AGATTTTTTT CATTTCATT  
-----  
551 TTCATAGTAG TTGTTTTGAA ATTGGAAAAA AAAAAACAT TCAATAATAA  
-----  
601 ACATAGTGGA GTGGTGTTAC TTTCGTTTAA GTATTCCTTT GCATTTGCTA  
-----  
651 AAATCTGATT TATATATTTA TTCAAGTGTT TGGCTTTAAT CTTTGCTATT  
-----  
701 AATATAATTT CTGCTTTTTT CTTTTCTTTA ATAAACCATA GCAGATAATC  
-----  
751 CCTTTTTTTT CATTAAAATC AACTAAGGTC AACCTTCCCA TCACATTACT  
-----  
801 GCTTACTTTG AGAGGTTCTT TAACAGTTTC CCATTTTCCT TCCAATTGTT  
-----  
851 AATCCTTGCT CATTATCATA TCTTGACCTA AGATTCCTAC AATCTAGATA  
-----  
901 TCTTTGGACA TTCTATTCCC TTCCCATTTT TTTCCCTATT GTGCATATAA  
-----

```

951 GTTCAATCTT TTTTCTTTC TTTCGGATTC GGTTTAGCCA ATTTTACTAC
-----
1001 CATGGATATC GTACTAGAAA TTTGTGACTA TTATCTTTTT GATAAAGTTT
-----

└───┬ transcription start

1051 ATGCTGATGT TTTCCCTAAA GATGGTGCTG TTCATGAATT TTTGAAACCA
TACGACTACA AAAGGGATTT CTACCACGAC AAGTACTTAA AAACTTTGGT
1101 GCTATACAAT CATTTCACA AATAGATTTT CCAAGTCTCC CAAATTTGGA
CGATATGTTA GTAAAAGTGT TTATCTAAAG GGTTTCAGAGG GTTTAAACCT
1151 TTCATTTGAT ACAAATTCTA CTTTGATTTT TTCAAATAAT TTCAATATTA
AAGTAAACTA TGTTTAAGAT GAAACTAAAG AAGTTTATTA AAGTTATAAT
1201 GTAATGTAA CCCAGCAACT ATTCCAAGTT ATTTATTTTC TAAAATTGCT
CATTACAATT GGGTCGTTGA TAAGGTTCAA TAAATAAAAG ATTTTAACGA
1251 AGTTATCAAG ATAAATCAGA AATTTATGGA TTAGCTCCTA AATTTTTCCC
TCAATAGTTC TATTTAGTCT TTAAATACCT AATCGAGGAT TTAAAAAGGG

```

表三、 Efg1 之 consensus binding sequence ( 5'- CANNTG-3') 和 *ERG3* 之 promoter region(-1050~-1 of *ERG3* ORF )比對的結果。結果顯示：*ERG3* ORF 之上游約一千左右個核苷酸序列中沒有 5'- CANNTG-3'的序列。

註：表中標號 1 核苷酸至 1050 個核苷酸為 *ERG3* ORF 之上游區域。標號 1051~1053 核苷酸為 *ERG3* 基因轉錄之起始密碼；編號 1051~1300 核苷酸為 *ERG3* ORF 之一部分。

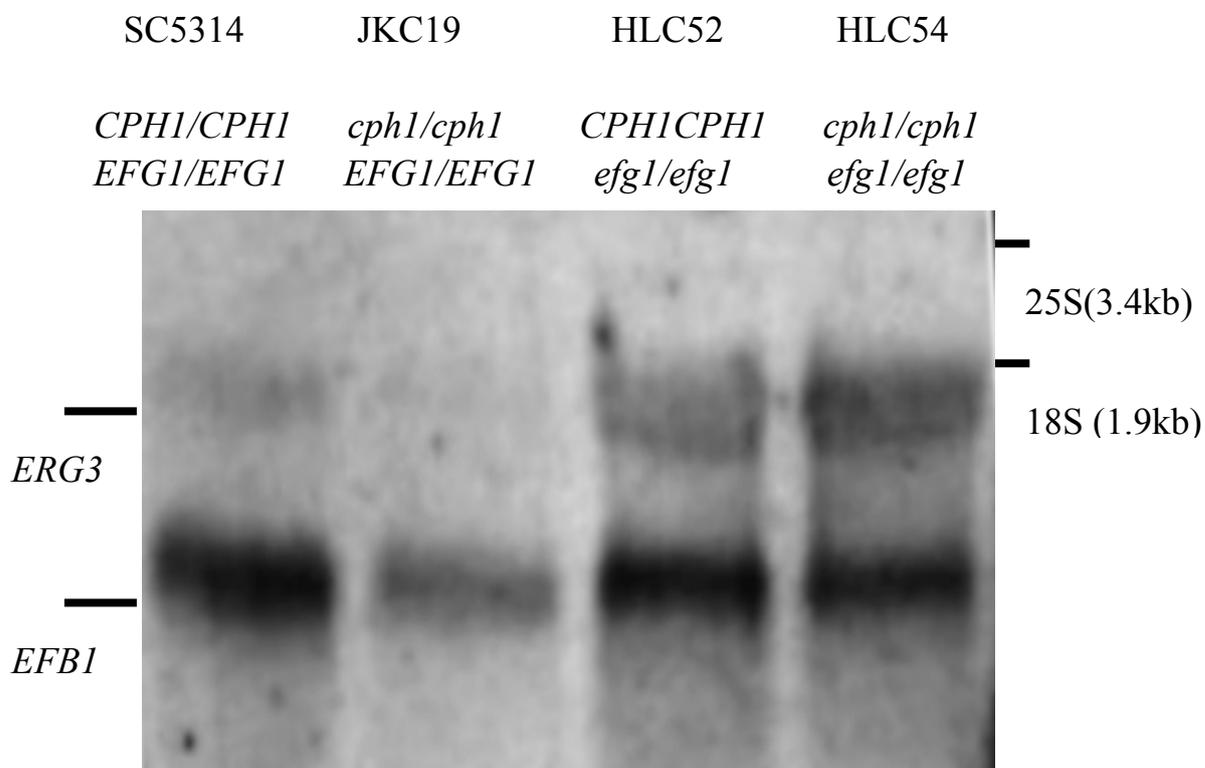
1 GGTAAGAATT GCCAACATAA CCTTACCTAT TTATATAGAT CAGATTCAAA  
-----  
51 ATGAAGTAAT GAAAACTGGT TATGTTAGTA GGTTTCTCCC CCATAAGACC  
-----  
101 AATAACTATC AGAACCTATG ATTTCAAATA AGCGAACGAT GGACAGTACA  
-----  
151 GAAAACGGTC AACAAAGTCC CCCTAATTCC CTTTTCTCTCC ACAATTTCCA  
-----  
201 TTCTGTTGTC TCGTATTGTA CATAGAACT TGATTCTTTT TACAGTTGTA  
-----  
251 AAGAATCCAC TGGATATAAA AACTAGCCGG GAATAACTGA GAAAAAAAAA  
-----  
301 GTGGCTGTTT TGTAAGTTGT AAGTTGTGAT TGTGCTATTT TCTGGAGTAA  
-----  
351 GTGAAGTTTC TATTCCCATC AGTTGATTAC AATTAATATG GTAGATTACA  
-----  
401 ATCAACTTGA ATATTACTGG ATGCAGAACA ACAACAATAA TAATGAAAAT  
-----  
451 GTCGTGGGGA GCATGGGATG AGGCGCGCGA TTGTACGTGG CGCGAGGTAC  
-----  
501 TAGAACTGC AATCTATACG ACGACATTTA ACTTTTTTTC TCTAAACGAG  
-----  
551 ATAACGACAT TATTAGGGTT ATTTGAGAAC AGCCACACGA CAACTTTCAA  
-----  
601 AGATTGAACA AACTTACACT CTATGGACAA CAAAACATA ATGAGATATT  
-----  
651 CATGATCTTA TAAGTGGTAA ACACAAGTAT AGTAAAAACT TATAATGTGT  
-----  
701 GTAGAATTTG ATAAAGAGAA AAAAGAAATA TTGGGTTTTG CTTGTATTCA  
-----  
751 ATATCGTACC CGATTATGTC GTATATTCTT TTTTCAATGT CAATTTGAGA  
-----  
801 ACGAGAACGA AAACAAAAAA ATAAAAAATA ATATCATAA ATAATTTTTTC  
-----  
851 TTCATCTTAC TTCTTTCTTT CAATCTTTAA TAAATCAATT TTTATATATA  
-----  
901 AATAGACAAA GAAAGGGAAT TCAATCGTTA TTCTTTCCAT ATTACTTGTC  
-----

951 TTCTTTTTAT TATATATATA AGTTTCTTTT CAAGAAGATC ATAACTCAAT  
 -----  
 └─ transcription start

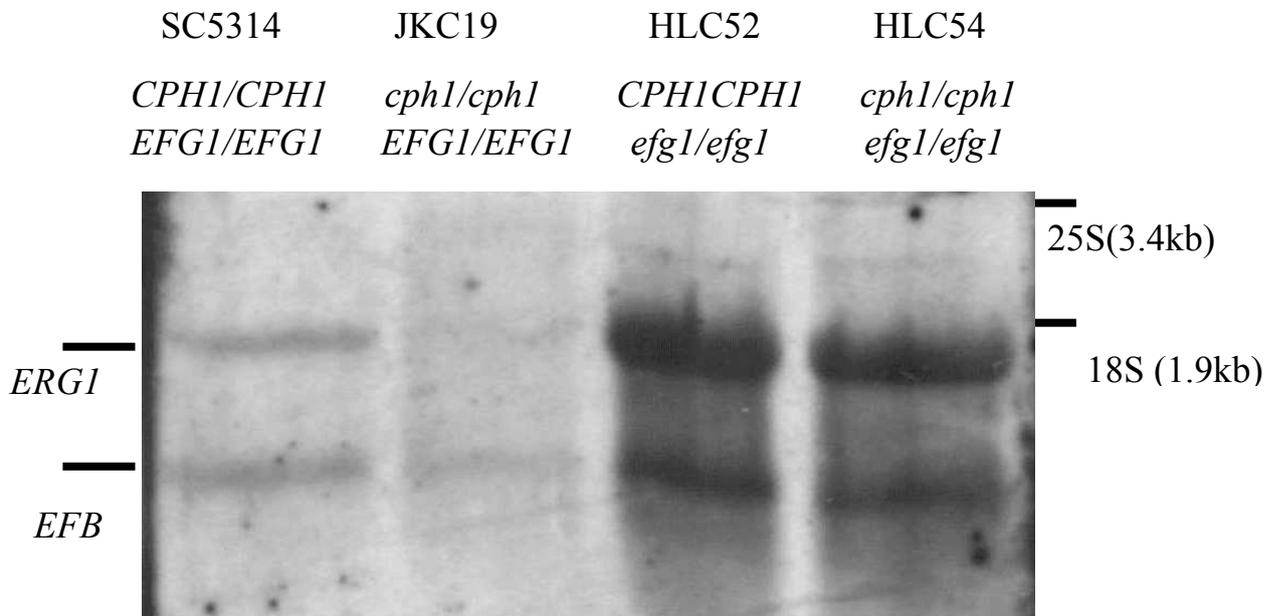
1001 **ATGGCTATTG** TTGAAACTGT CATTGATGGC ATTAATTATT TTTTGTCCCT  
**TACCGATAAC** AACTTTGACA GTAAC TACCG TAATTAATAA AAAACAGGGA  
 1051 TAGTGTTACA CAACAGATCA GTATATTATT AGGGGTTCCTA TTTGTTTACA  
 ATCACAATGT GTTGTCTAGT CATATAATAA TCCCCAAGGT AAACAAATGT  
 1101 ACTTAGTATG GCAATATTTA TATTCATTAA GAAAAGATAG AGCTCCATTA  
 TGAATCATAAC CGTTATAAAT ATAAGTAATT CTTTTCTATC TCGAGGTAAT  
 1151 GTGTTTTTATT GGATTCCTTG GTTTGGTTCT GCAGCTTCAT ATGGTCAACA  
 CACAAAATAA CCTAAGGAAC CAAACCAAGA CGTCGAAGTA TACCAGTTGT  
 1201 ACCTTATGAA TTTTTCGAAT CATGTCGTCA AAAGTATGGT GATGTATTTT  
 TGGAATACTT AAAAAGCTTA GTACAGCAGT TTTCATACCA CTACATAAAA  
 1251 CATTTATGTT ATTAGGGAAA ATTATGACGG TTTATTTAGG TCCAAAAGGT  
 GTAAATACAA TAATCCCTTT TAATACTGCC AAATAAATCC AGGTTTTTCCA  
 1301 CATGAATTTG TTTTAAATGC TAAATTATCT GATGTTTCTG CTGAAGATGC  
 G TACTTAAAC AAAAATTACG ATTTAATAGA CTACAAAGAC GACTTCTACG

表四、Efg1 之 consensus binding sequence (5'-CANNTG-3') 和 *ERG11* 之 promoter region(-1000~-1 of *ERG11* ORF) 比對的結果。結果顯示：*ERG11* ORF 之上游一千個核苷酸序列中沒有 5'-CANNTG-3' 的序列。

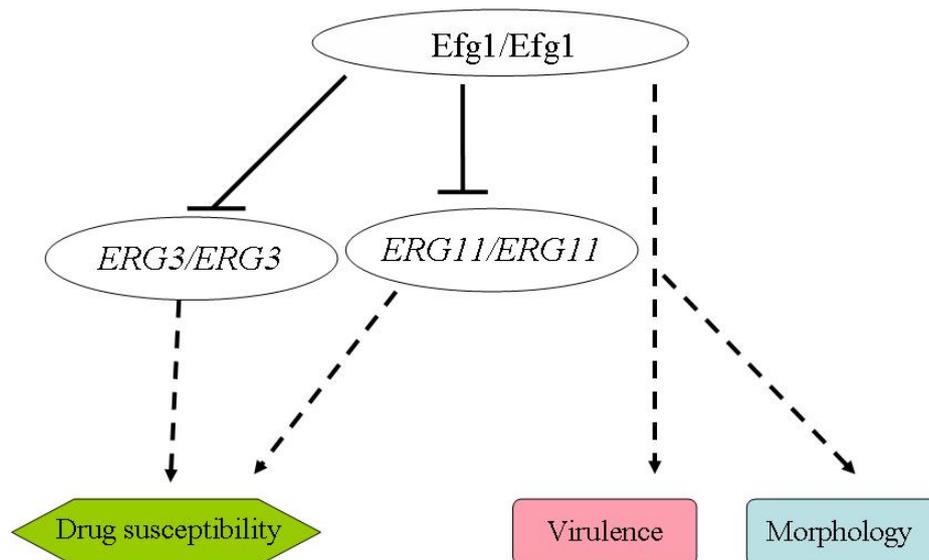
註：表中標號 1 核苷酸至 1050 個核苷酸為 *ERG3* ORF 之上游區域。標號 1001~1003 核苷酸為 *ERG11* 基因轉錄之起始密碼；編號 1001~1350 核苷酸為 *ERG11* ORF 之一部分。



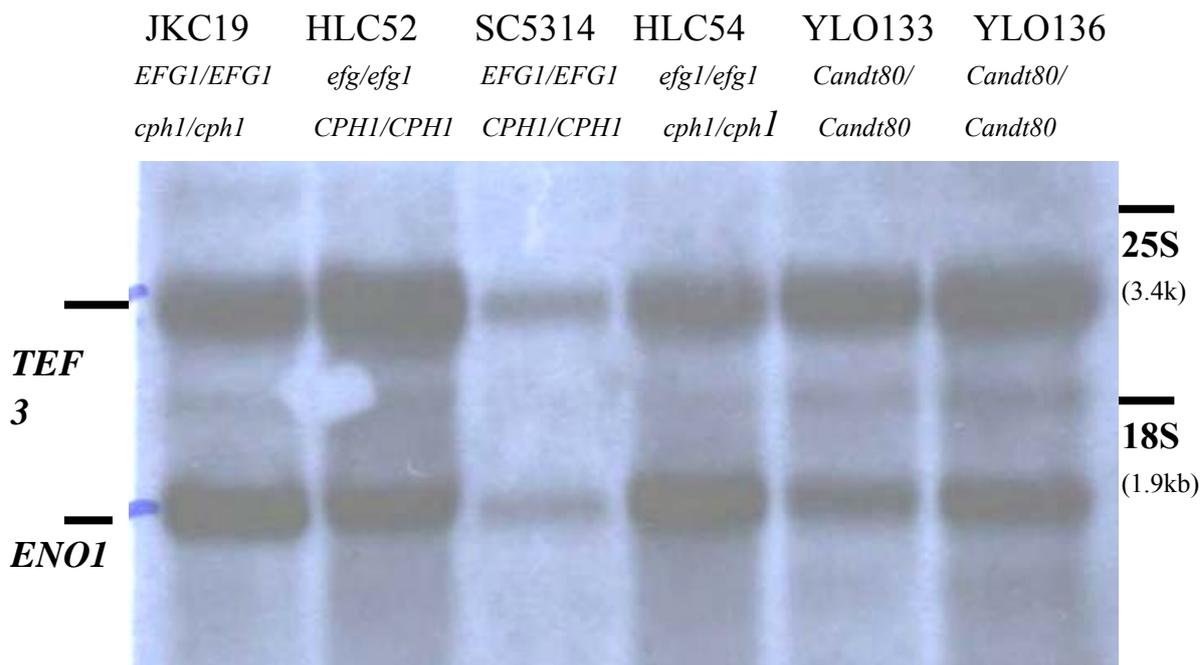
圖一、*ERG3* 於 37°C、血清誘導培養下之北方墨點法結果  
 圖上方表示四種不同基因型之菌株。*ERG3* 的 mRNA 至少  
 為 1.1Kb，位置約在 18S 下方。*EFB1* 為 internal standard，  
 大小約 0.7kb，位置低於 18S 之間。



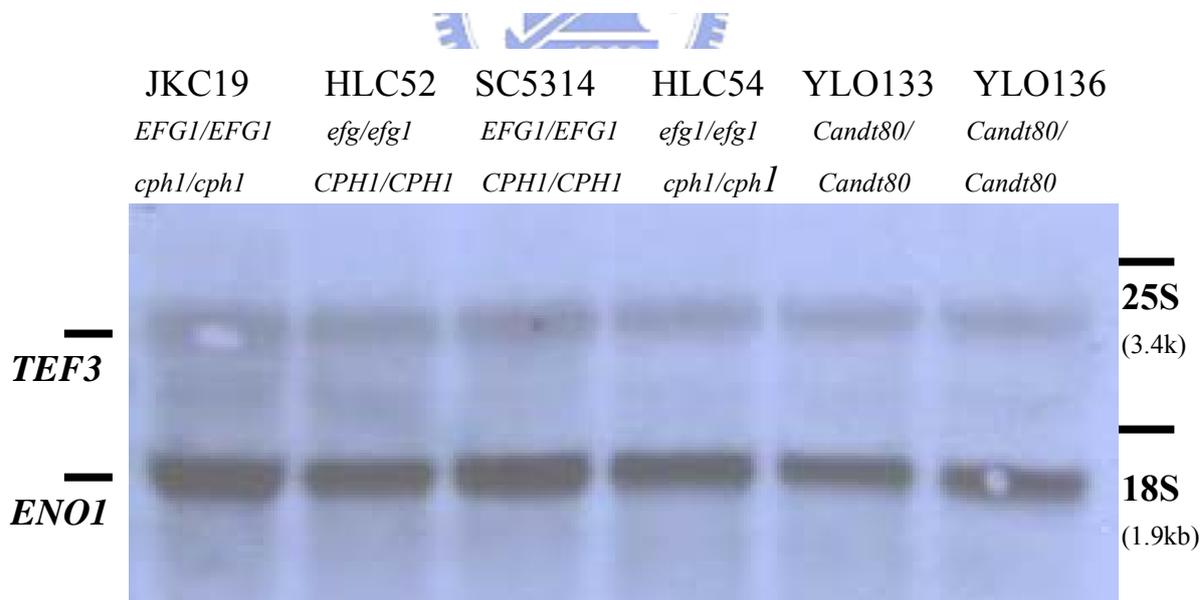
圖二、*ERG11* 於 37°C、血清誘導培養下之北方墨點法結果  
 圖上方表示四種不同基因型之菌株。*ERG11* 的 mRNA 至少為 1.7Kb，位置約在 18S 下方。*EFB1* 為 internal standard，大小約 0.7kb，位置低於 18S 之間。



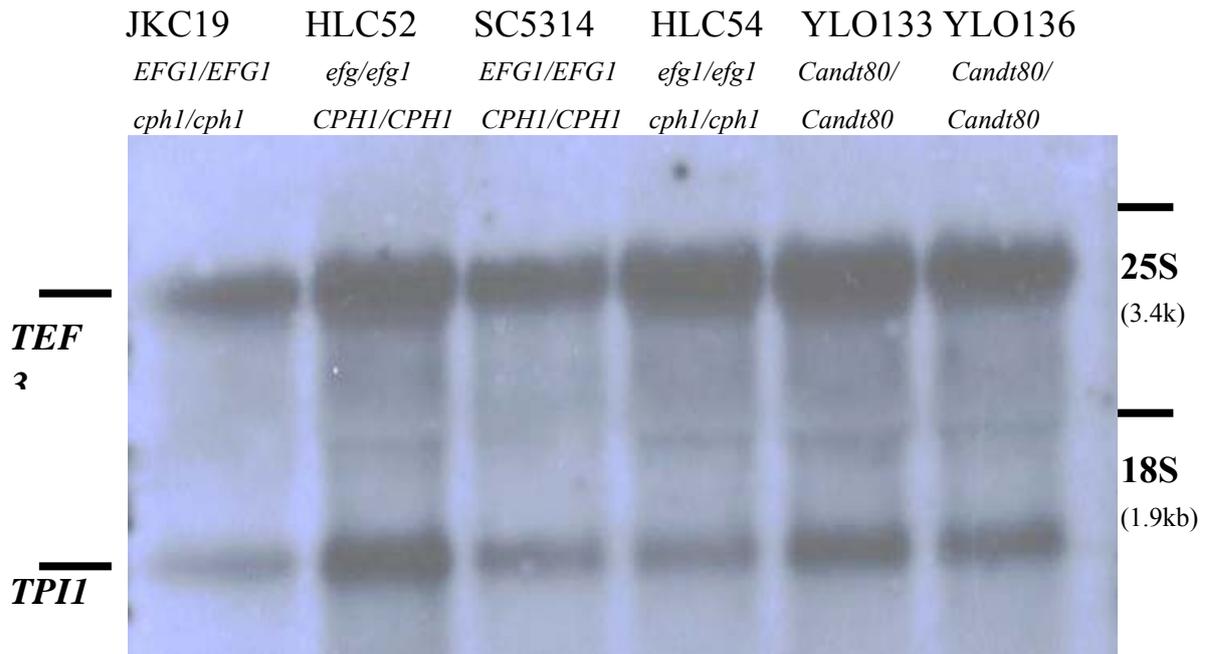
圖三、*ERG3*、*ERG11* 涉及抗藥性及型態變化的可能途徑



圖四、*ENO1* 於血清誘導培養下之北方墨點法結果  
圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右方為 *Candt80* 突變株的二重覆。*ENO1* 的 ORF 為 1323nt，mRNA 位置約在 18S 下方。*TEF3* 為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，位置介於 25S 和 18S 之間。



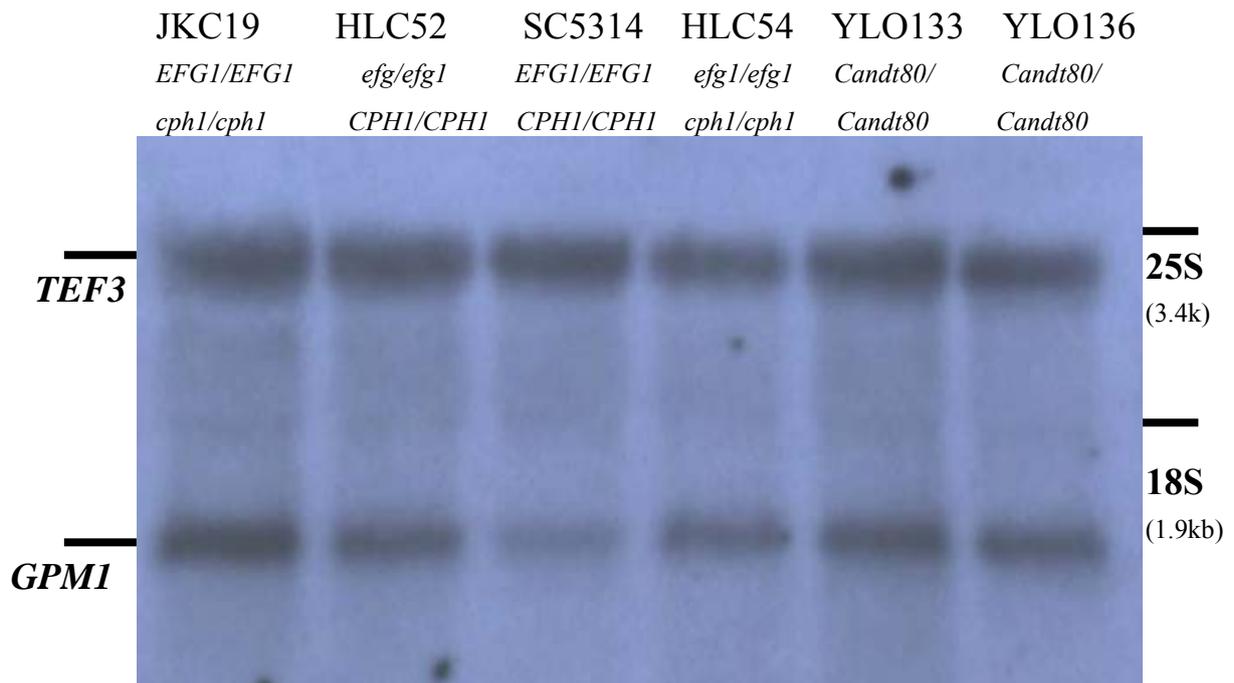
圖五、*ENO1* 於藥物 (miconazole 10  $\mu$ g/ml) 誘導培養下之北方墨點法結果。圖右方表示五種不同基因型之菌株，圖右上方為 *Candt80* 突變株的二重覆。*ENO1* 的 ORF 為 1323nt，mRNA 位置約在 18S 下方。*TEF3* 為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，位置介於 25S 和 18S 之間。



圖六、*TPII* 於血清誘導培養下之北方墨點法結果  
 圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右方為 *Candt80* 突變株的二重覆。*TPII* 的 ORF 為 747nt，mRNA 位置低於 18S 下方。*TEF3* 為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，位置介於 25S 和 18S 之間。

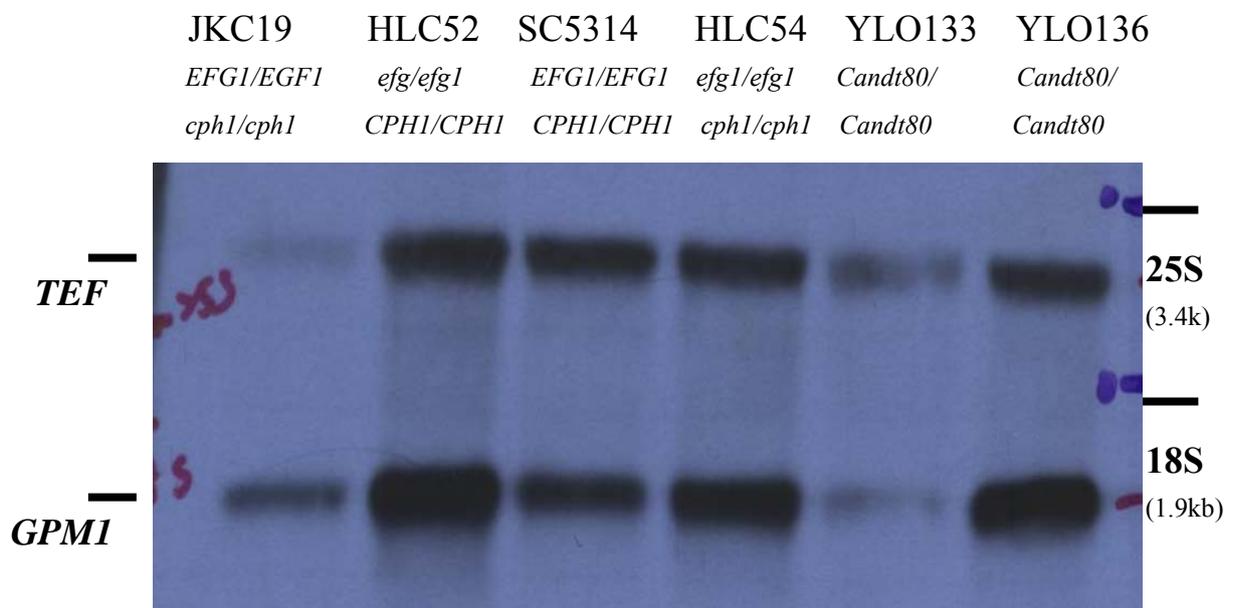


圖七、*TPII* 於藥物 (miconazole 10  $\mu$ g/ml) 誘導培養下之北方墨點法結果  
 圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右方為 *Candt80* 突變株的二重覆。*TPII* 的 ORF 為 747nt，mRNA 位置低於 18S 下方。*TEF3* 為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，位置介於 25S 和 18S 之間。



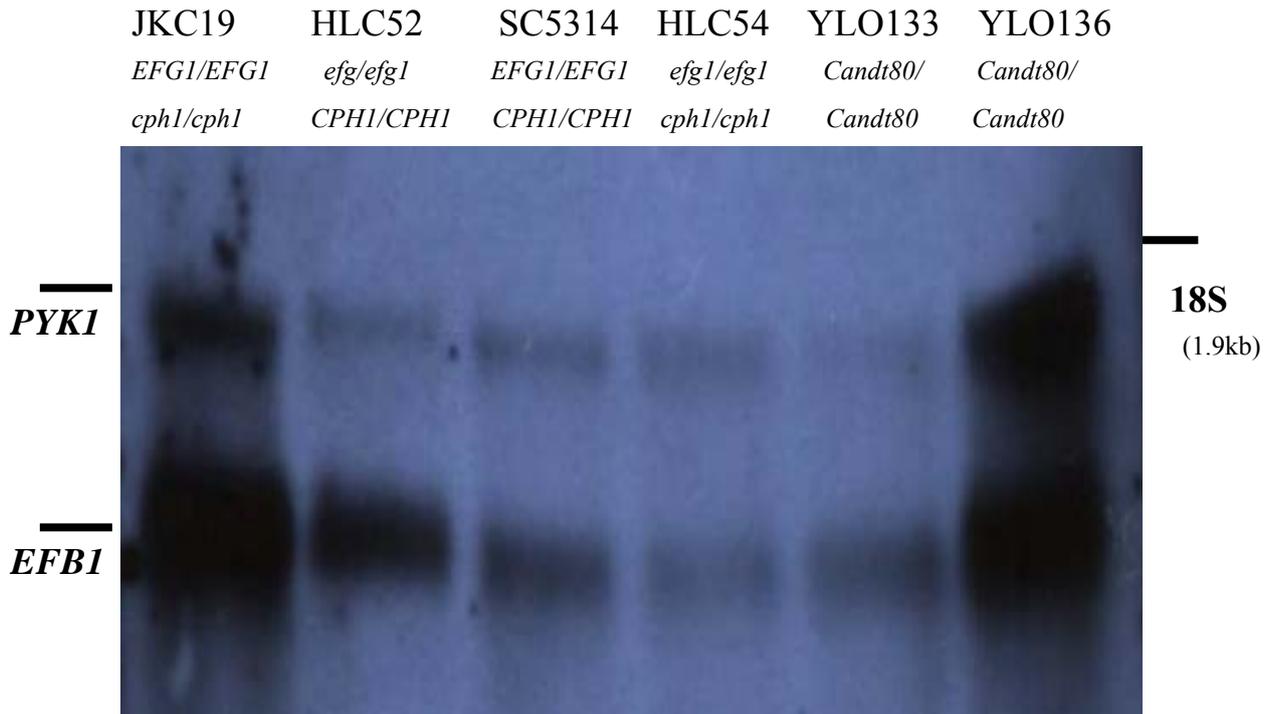
圖八、*GPM1* 於血清誘導培養下之北方墨點法結果

圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右方為 *Candt80* 突變株的二重覆。*GPM1* 的 ORF 為 747nt，mRNA 位置低於 18S 下方。*TEF3* 為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，位置介於 25S 和 18S 之間。



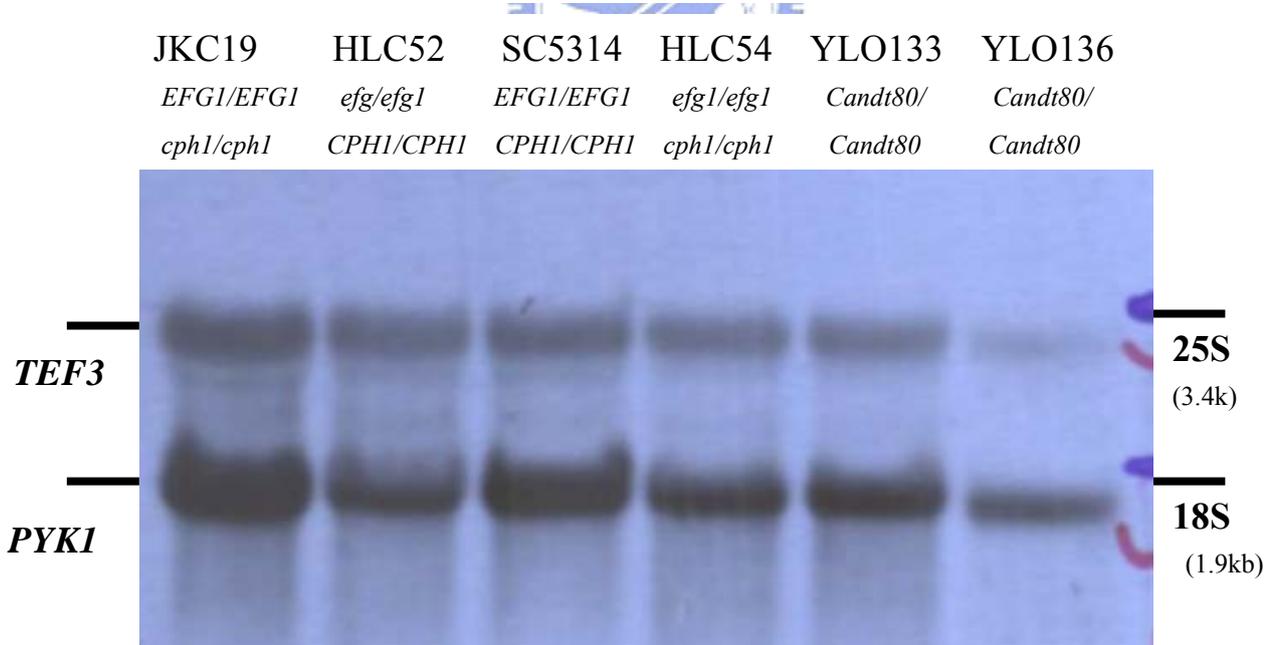
圖九、*GPM1* 藥物 (miconazole 10  $\mu$ g/ml) 誘導培養下之北方墨點法結果

圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右方為 *Candt80* 突變株的二重覆。*GPM1* 的 ORF 為 747nt，mRNA 位置低於 18S 下方。*TEF3* 為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，位置介於 25S 和 18S 之間。



圖十、*PYK1* 於血清誘導培養下之北方墨點法結果

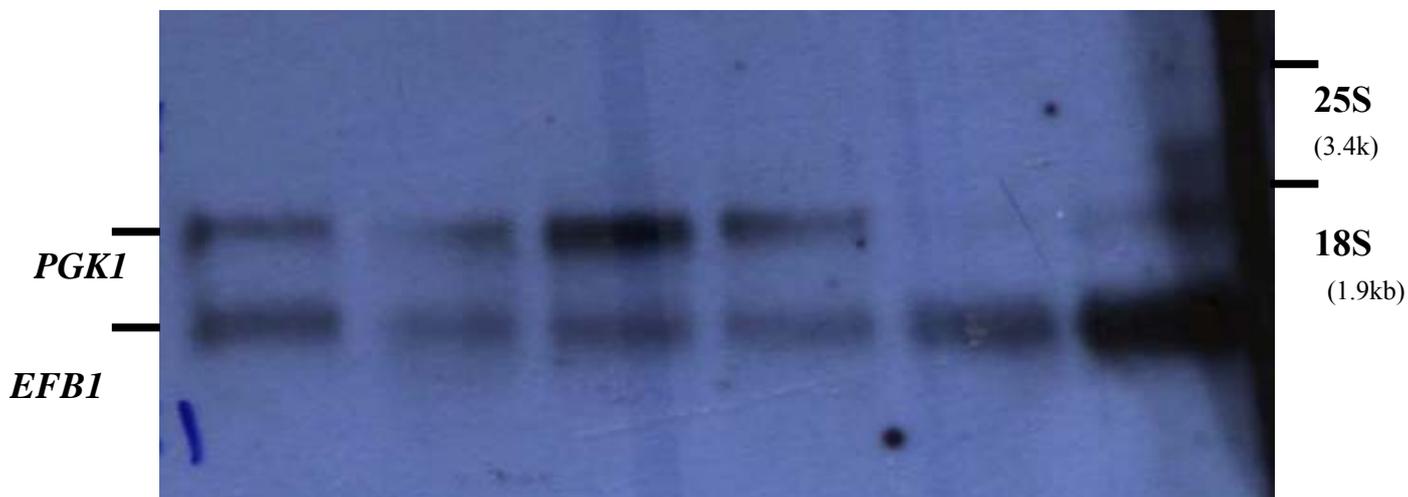
圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右方為 *Candt80* 突變株的二重覆。*PYK1* 的 ORF 為 1515nt，mRNA 位置約於 18S 下方。*EFB1* 為 internal standard，其 ORF 為 642nt，mRNA 位置低於 18S 下方。



圖十一、*PYK1* 於藥物誘導 (miconazole 10  $\mu$ g/ml) 培養下之北方墨點法結果

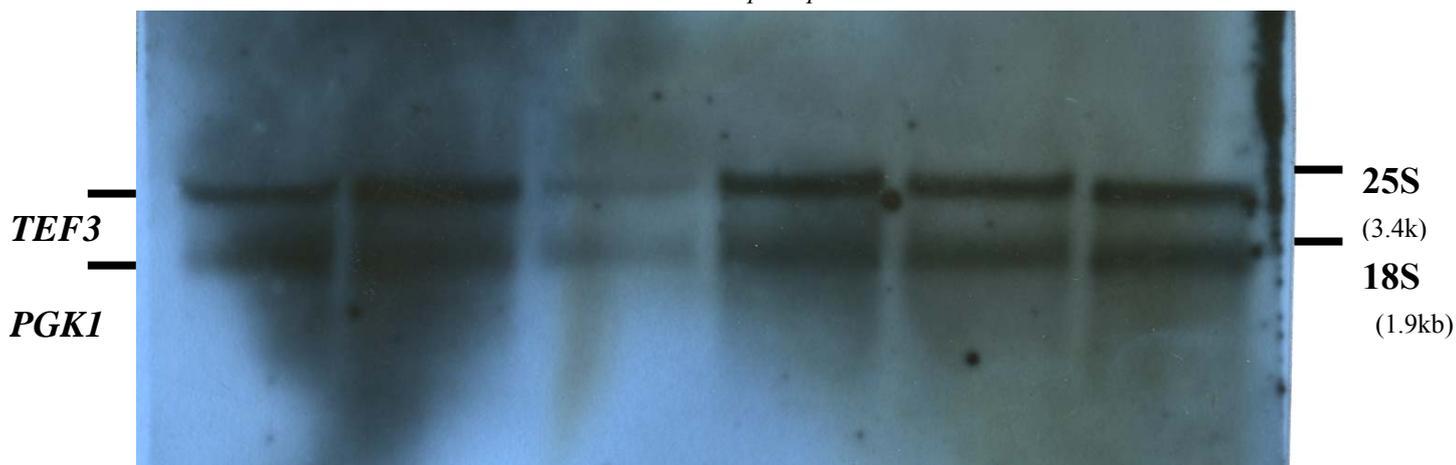
圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右方為 *Candt80* 突變株的二重覆。*PYK1* 的 ORF 為 1515nt，mRNA 位置約於 18S 下方。*TEF3* 為 internal standard，其 ORF 為 3153nt，位置介於 25S 和 18S 之間。

JKC19	HLC52	SC5314	HLC54	YLO133	YLO136
<i>EFG1/EFG1</i>	<i>efg1/efg1</i>	<i>EFG1/EFG1</i>	<i>efg1/efg1</i>	<i>Candt80/</i>	<i>Candt80/</i>
<i>cph1/cph1</i>	<i>CPH1/CPH1</i>	<i>CPH1/CPH1</i>	<i>cph1/cph1</i>	<i>Candt80</i>	<i>Candt80</i>



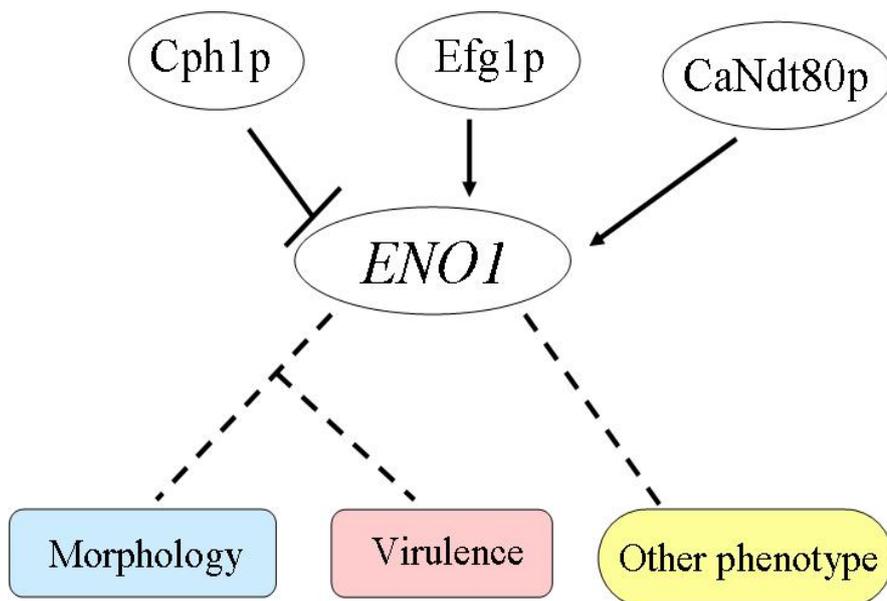
圖十二、*PGK1* 於血清誘導培養下之北方墨點法結果  
 圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右方為 *Candt80* 突變株的重覆。  
*PGK1* 的 ORF 為 1254nt，mRNA 位置位於 18SrRNA 下方，*EFB1* 為  
 internal standard，其 ORF 為 642nt，mRNA 位置低於 18SrRNA 下方。

JKC19	HLC52	SC5314	HLC54	YLO133	YLO136
<i>cph1/cph1</i>	<i>efg/efg1</i>	<i>EFG1/EFG1</i>	<i>efg1/efg1</i>	<i>Candt80/</i>	<i>Candt80/</i>
<i>EFG1/EFG1</i>	<i>CPH1/CPH1</i>	<i>CPH1/CPH1</i>	<i>cph1/cph1</i>	<i>Candt80</i>	<i>Candt80</i>

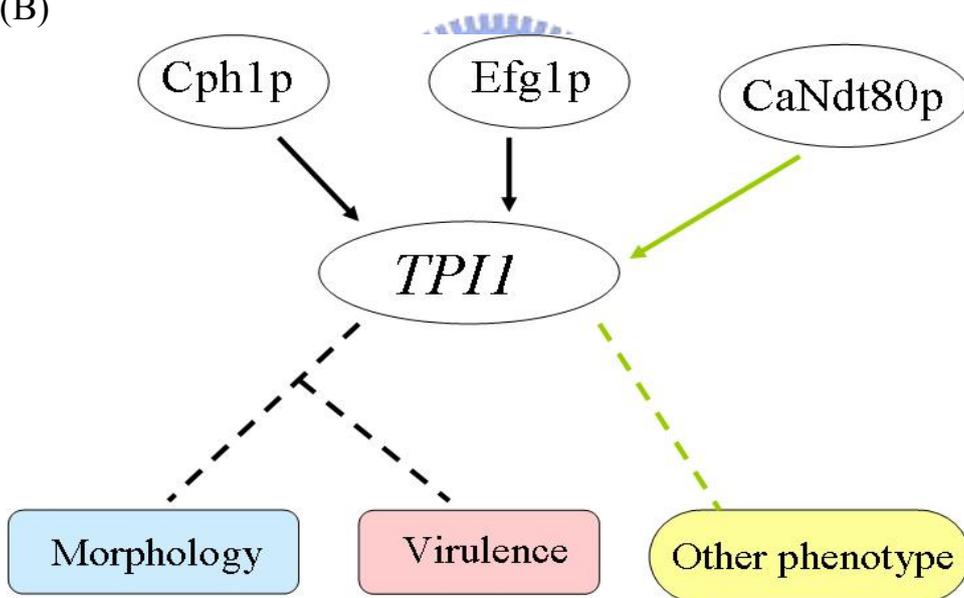


圖十三、*PGK1* 於藥物誘導培養下之北方墨點法結果  
 圖上方表示五種不同基因型之菌株，圖右上方為 *Candt80* 突變株的重覆。  
*PGK1* 的 ORF 為 1254nt，mRNA 位置位於 18SrRNA 下方，*TEF3* 為 internal  
 standard，其 ORF 為 3153nt，位置介於 25S 和 18S 之間。

(A)



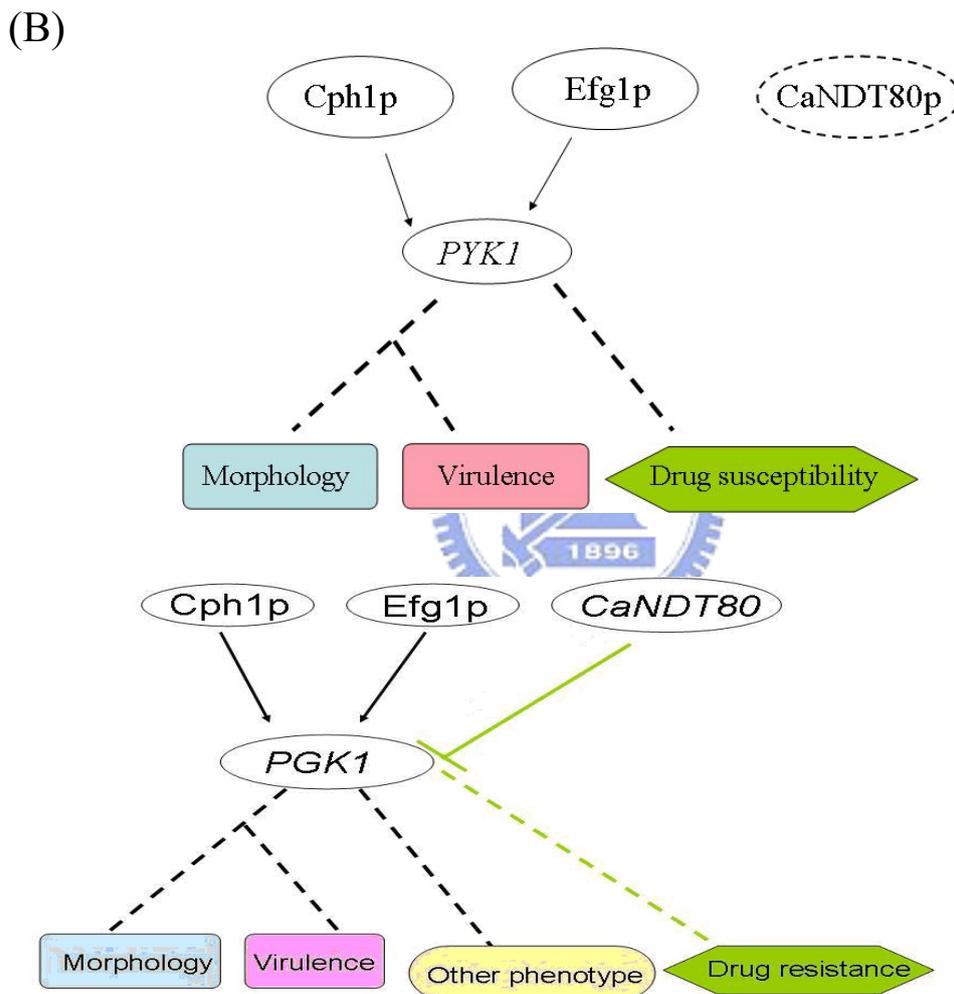
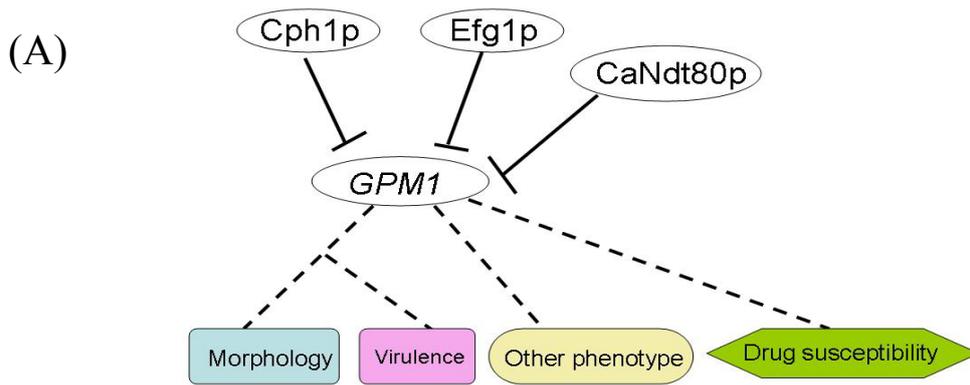
(B)



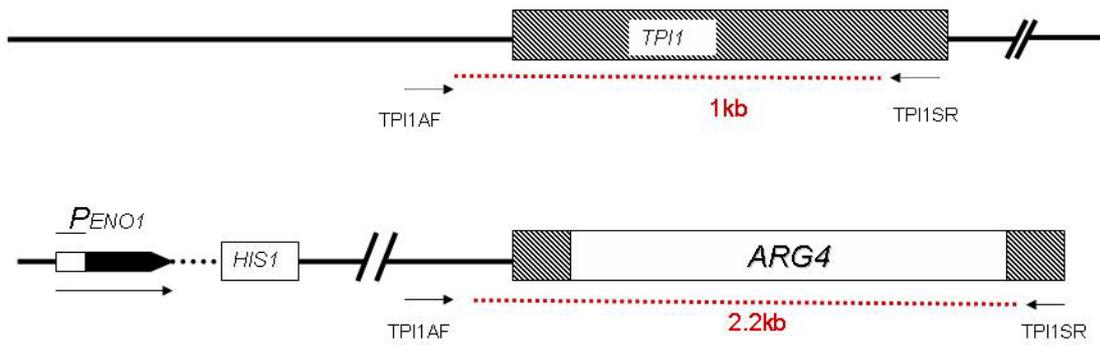
圖十四、(A)醣解酵素基因 *ENO1* 可能調控性狀改變之途徑示意圖

(B)醣解酵素基因 *TPII* 可能調控性狀改變之途徑示意圖

—| 表示 <down regulate> ; → 表示 <up regulate> ; 未標示 → 或 —| 者表不明 ; (---) 表示無影響 ; 虛線表示可能的影響性狀 ; 綠色線條表示 *CaNDT80* 所調控下影響抗藥性的獨立途徑。



圖十五、(A) 醣解酵素基因 *GPM1* 可能調控性狀改變之途徑示意圖  
 (B) 醣解酵素基因 *PYK1* 可能調控性狀改變之途徑示意圖  
 (C) 醣解酵素基因 *PGK1* 可能調控性狀改變之途徑示意圖  
 —| 表示 <down regulate>；—> 表示<up regulate>；未標示—> 或 —| 者表不明；(---) 表示無影響；虛線表示可能的影響性狀；綠色線條表示 *CaNDT80* 所調控下影響抗藥性的獨立途徑。

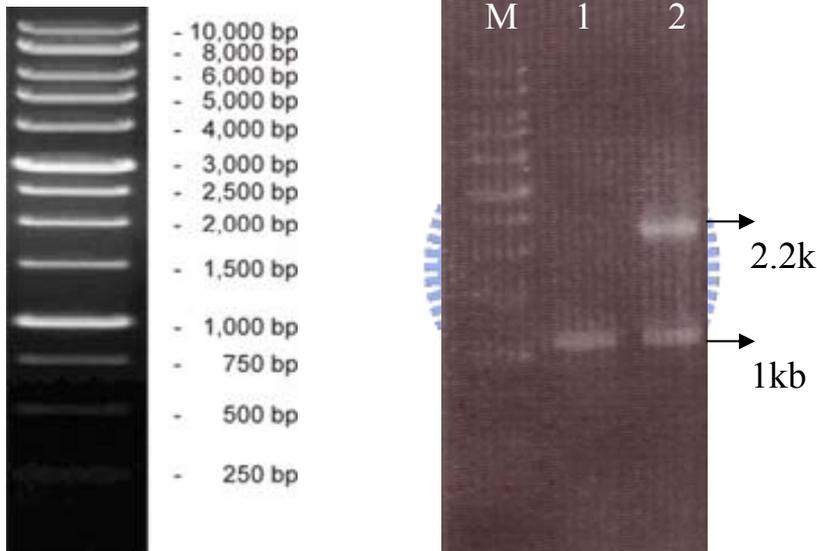


圖十六、確認 *TPI1* 單套基因突變株正確性之 PCR 之引子設計圖。

(A)

(B)

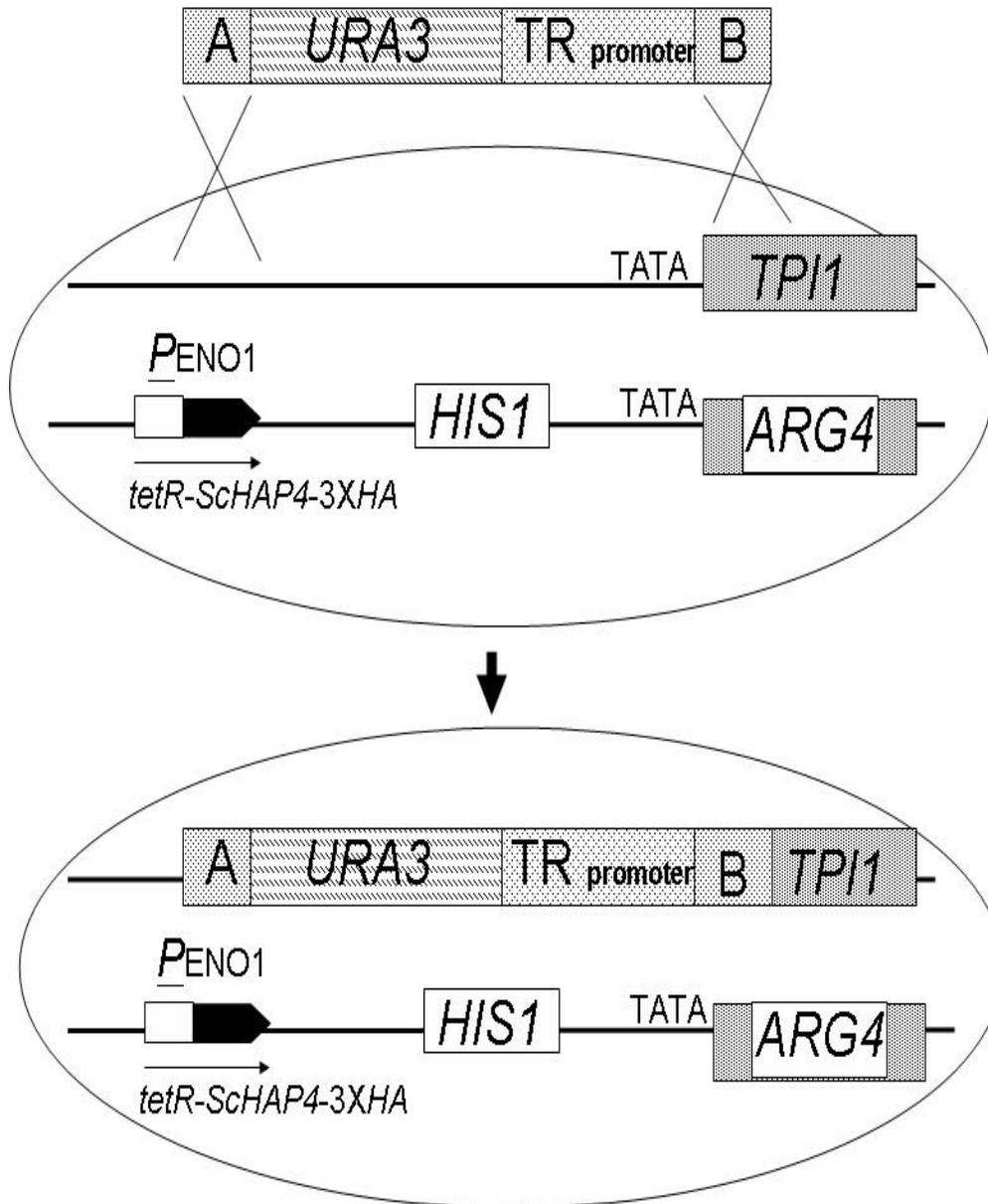
1kb marker



Template	Primer
1: Bwp17/tetR(control)	TPI1AF~TPI1SR
2: MLC89 ( <i>tpi1::ARG4/TPI1</i> )	TPI1AF~TPI1SR
M : Marker	

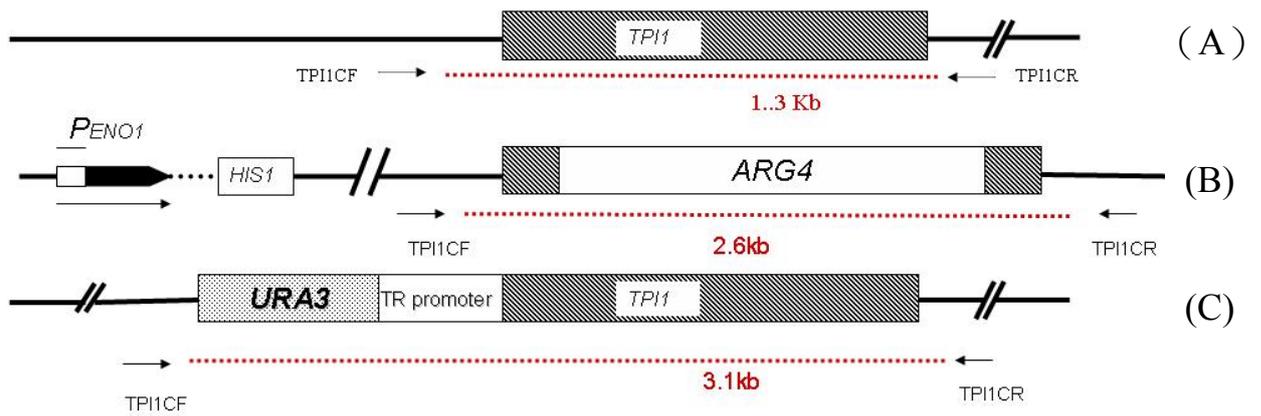
圖十七、PCR 確認 *TPI1* 單套基因突變株之結果

(A) 1 kb marker 電泳圖。(B) Lane(1)為控制組，Lane(2)為確認 *TPI1* 單套基因的破壞。



圖十八、建構 *TPI1* 四環黴素調控系統示意圖。

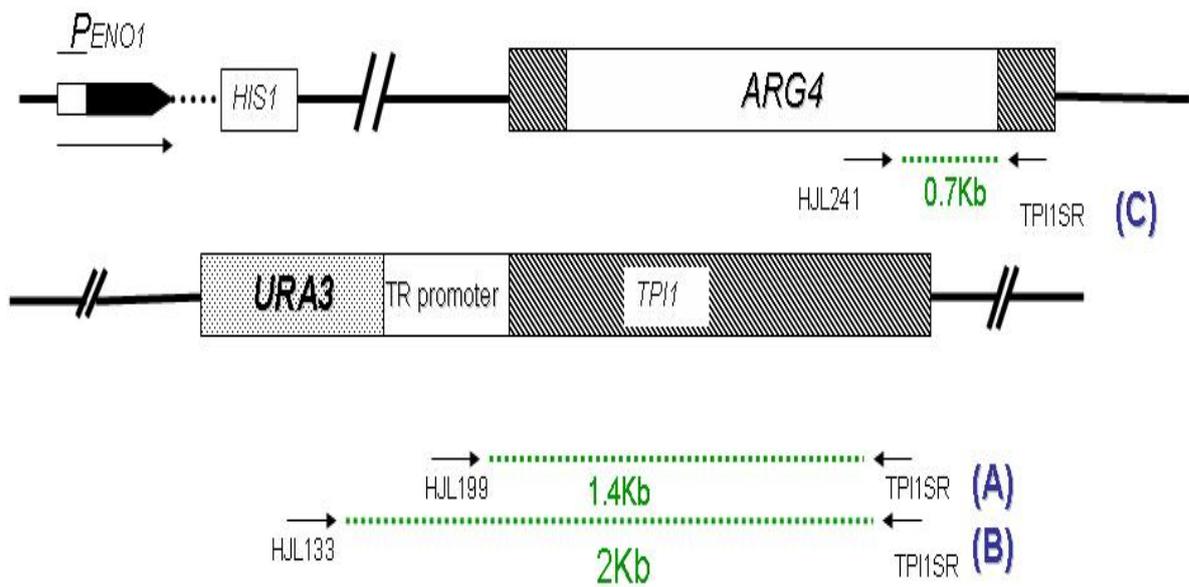
TR 表示 tetR promoter；X 表示同源置換



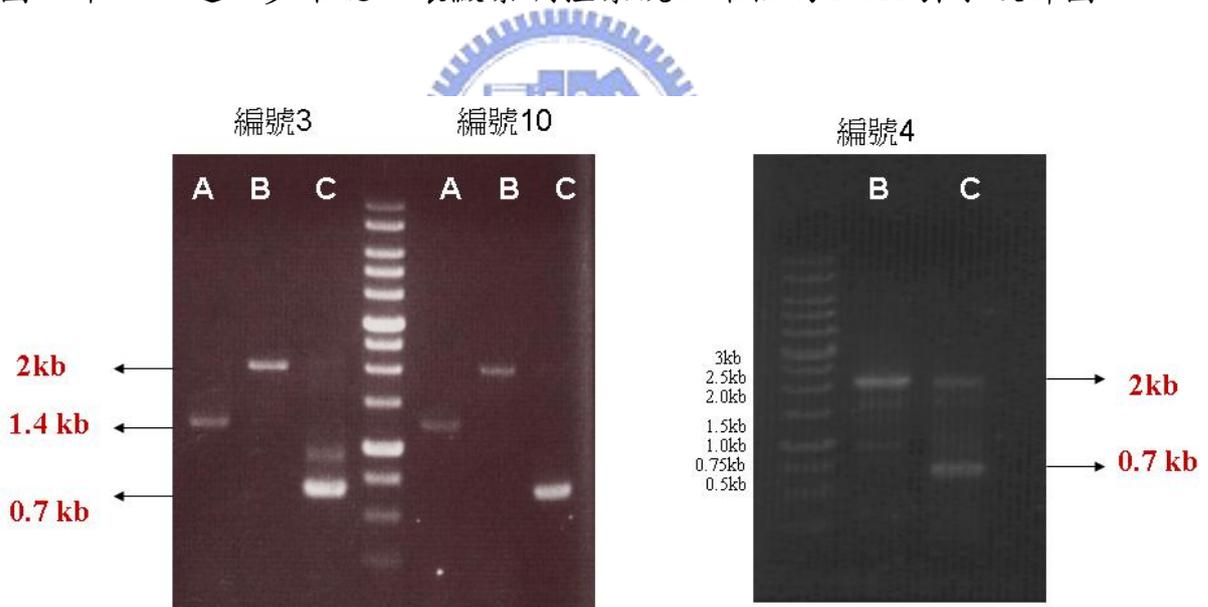
圖十九、確認四環黴素調控之突變株之引子設計圖。引子和基因的相對位置如上圖所示。四環黴素調控之突變株其基因型為(B)、(C)此二 allele 的組合。MLC89 (*tpi1::ARG4/TPI*) 突變株基因型為(A)、(B)此二 allele 的組合。



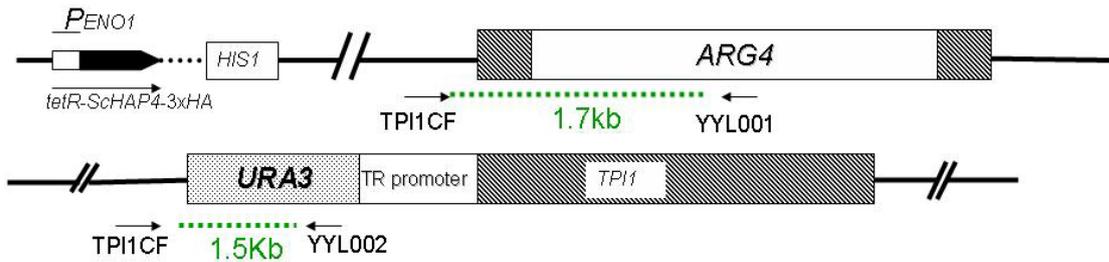
圖二十、PCR 結果之電泳圖。控制組，lane1 取 BWP17/tetR 染色體 DNA 為模版跑 PCR 的結果，出現預期 1.3 kb 的片段；控制組，lane2 為 *tpi1::ARG4/TPI1* 突變株之結果，出現了預期的 1.3 kb 及 2.6kb 的片段。實驗組結果；lane3~12 為 transformation 後得到 12 顆菌株(*tpi1/TPI1::TR*)進行 PCR 確認之結果。編號 5~9 及 11、12，出現不預期的 1.3 kb 片段(wild-type allele)，所以這幾株突變株為非預期的結果。編號 3、4、10 的結果，則只出現了 2.6 kb 的片段，有可能為預期的突變株，進行下一步 PCR 來確認正確性。



圖二十一、進一步確認四環黴素調控系統正確性的 PCR 引子設計圖。

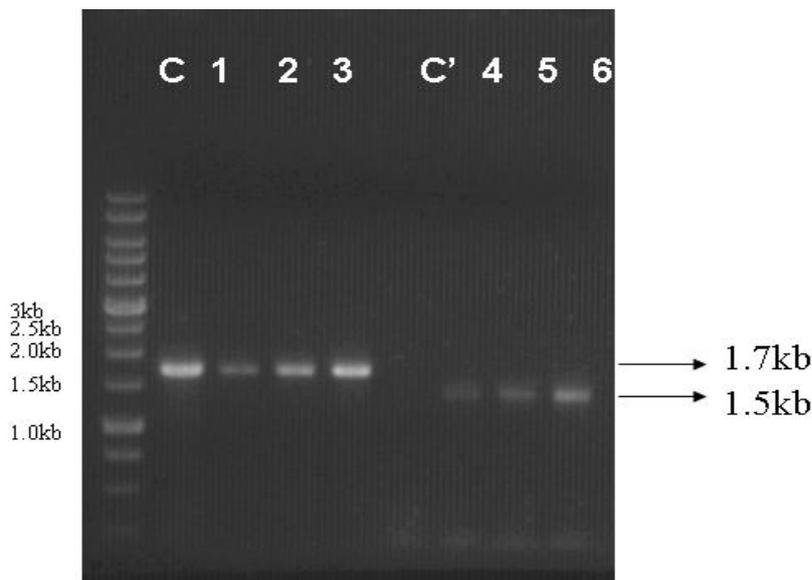


圖二十二、PCR 結果之電泳圖。為上圖設計之結果。TR 轉形菌株編號 3、4、10 為圖二十八所顯示挑到的菌株所做進一步確認之結果。laneA、B、C 所搭配的引子為圖二十一所示。



圖二十三、用於確認 BWP17/tetR 中的 *TPI1* 之 TR construction 的 PCR 之引子設計圖

(A)



(B) 各 PCR 反應的 template 及 primer 組合

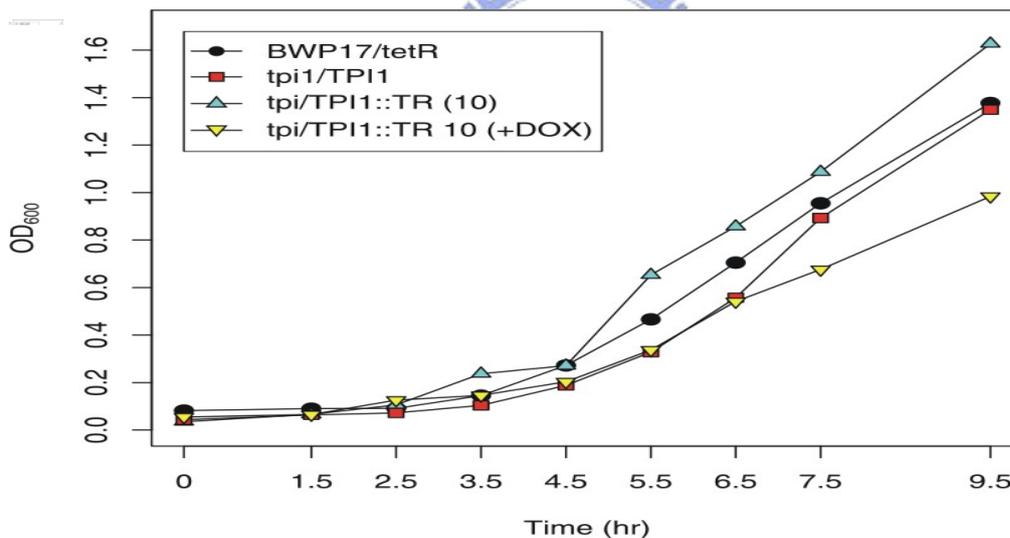
Template	Primer
C : MLC89( <i>tpi1::ARG4/TPI1</i> )	TP1CF~ YYL001
1 : Transformant (3)( <i>tpi1::ARG4/TPI1::TR-TPI1-URA3</i> )	TP1CF~ YYL001
2 : Transformant (4)( <i>tpi1::ARG4/TPI1::TR-TPI1-URA3</i> )	TP1CF~ YYL001
3 : Transformant (10)( <i>tpi1::ARG4/TPI1::TR-TPI1-URA3</i> )	TP1CF~ YYL001

圖二十四、(A)為圖二十三之 PCR 結果電泳圖 (B)各 PCR 反應內容物。

(A)

Time \ Strain	Bwp17/tetR	MLC89	編號 10	編號 10 (+DOX)
0hr	0.082	0.043	0.035	0.055
1.5hr	0.09	0.064	0.066	0.065
2.5hr	0.091	0.072	0.106	0.126
3.5hr	0.145	0.104	0.237	0.146
4.5hr	0.272	0.188	0.271	0.203
5.5hr	0.466	0.328	0.653	0.337
6.5hr	0.705	0.557	0.857	0.541
7.5hr	0.955	0.893	1.087	0.676
9.5hr	1.377	1.349	1.627	0.984

(B)



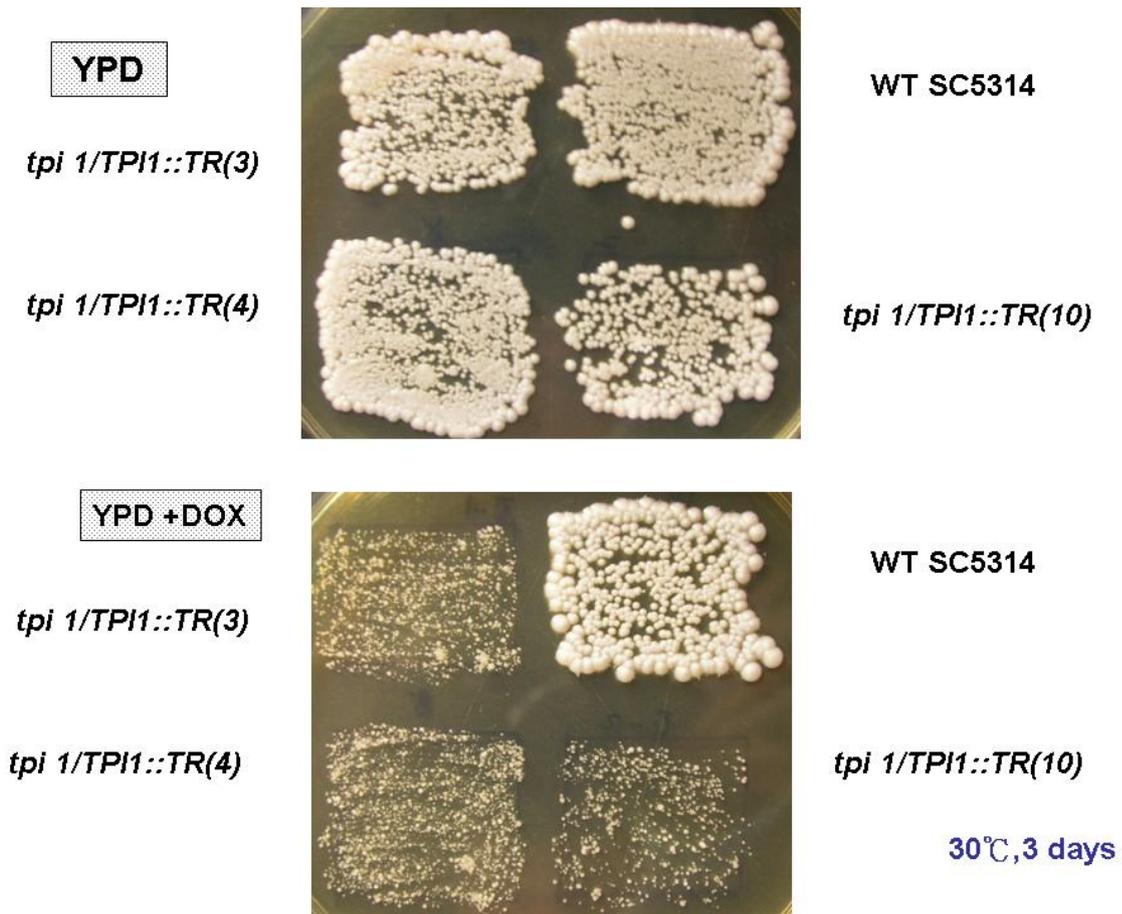
圖二十五、*TPII* 突變株之生長情形 (A) 生長曲線，各時間點及  $OD_{600nm}$  吸光值紀錄表 (B) 各突變株之生長曲線。橫軸為測量時間點，縱軸為  $OD_{600}$  吸光值。

註：Bwp17/tetR：Wild type；

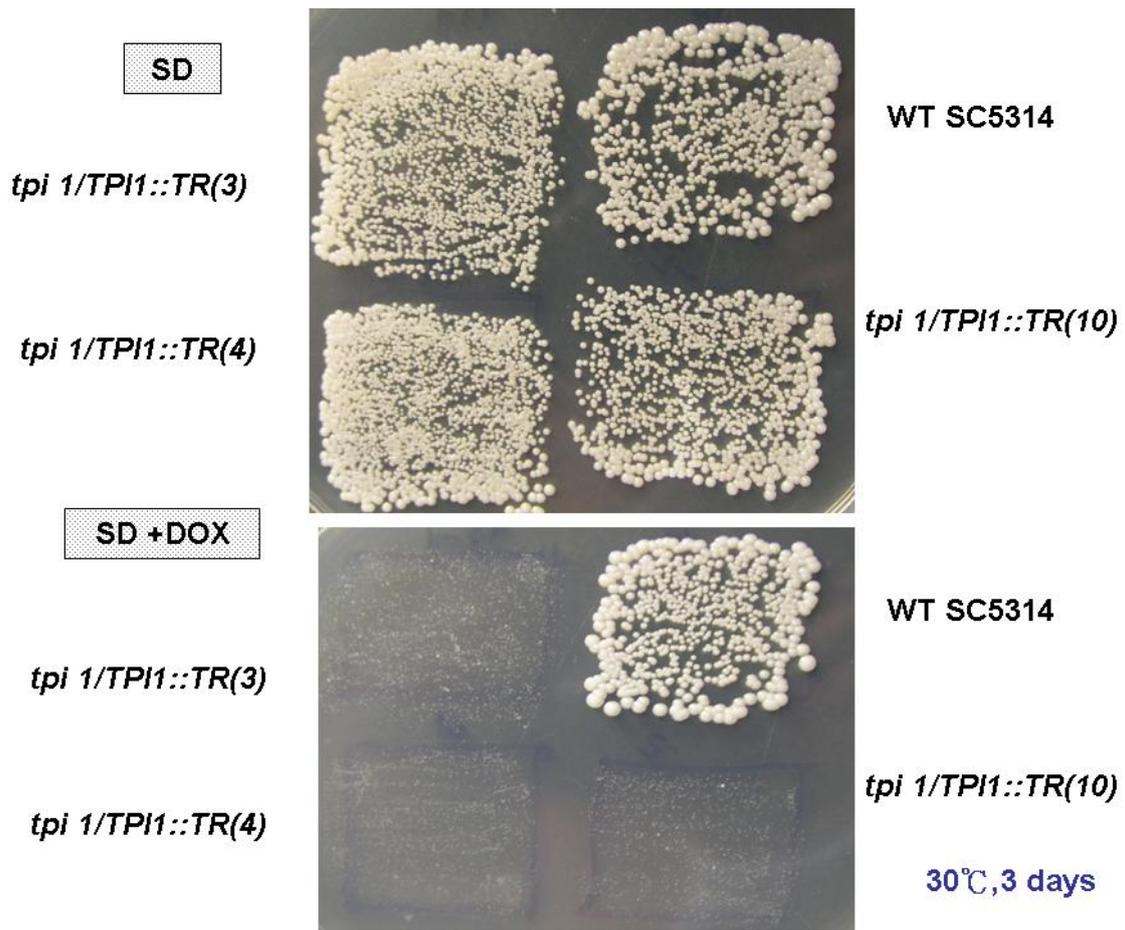
MLC89：*TPII::ARG4/TPII*；

編號 10：*tpi::ARG4/TPII::TR-TPII-URA3*；

+DOX：with doxycycline



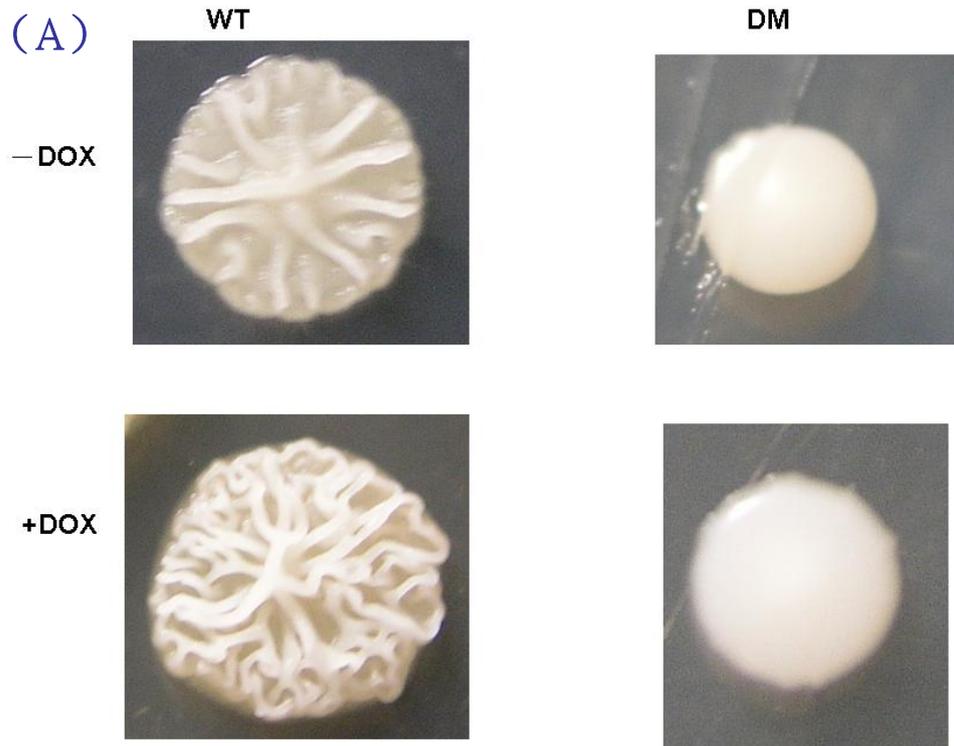
圖二十六、觀察 *tpi1/TPI1::TR* 突變株於 YPD 固態培養皿上的生長情形 (doxycycline 的濃度為 20  $\mu$ g/ml)



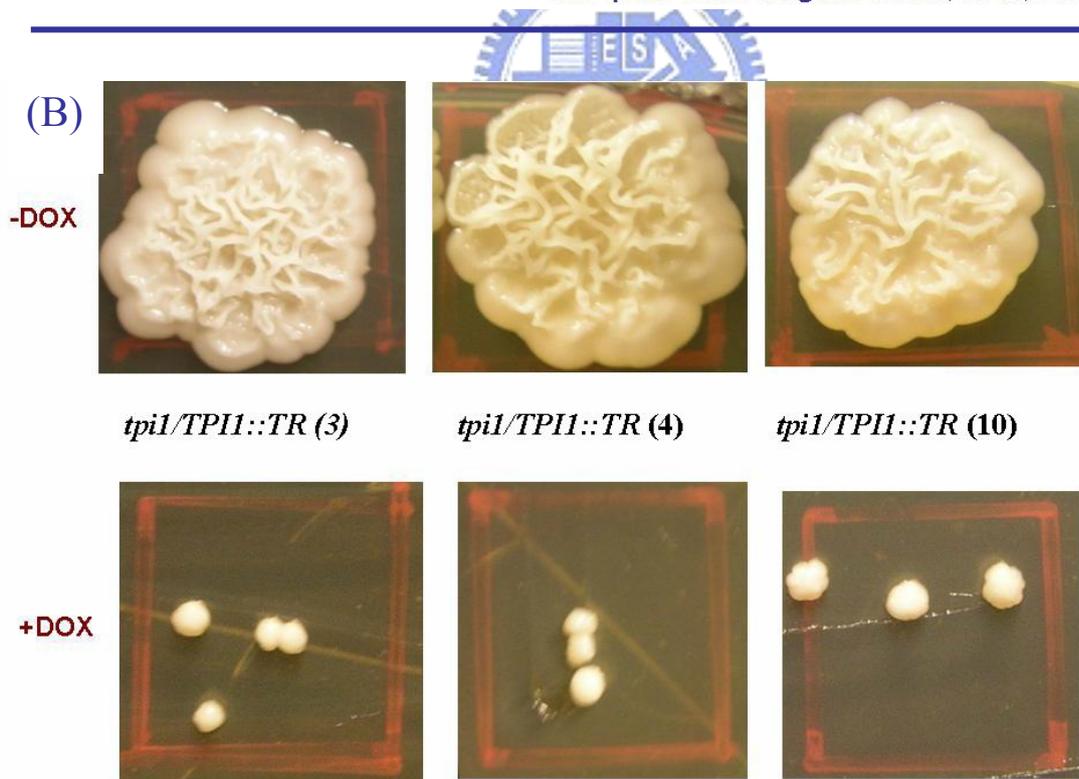
圖二十七、觀察 *tpi1/TPI1::TR* 突變株於 SD 固態培養皿上的生長情形

SD : Synthetic medium

+DOX : 含 20  $\mu$  g/ml doxycycline

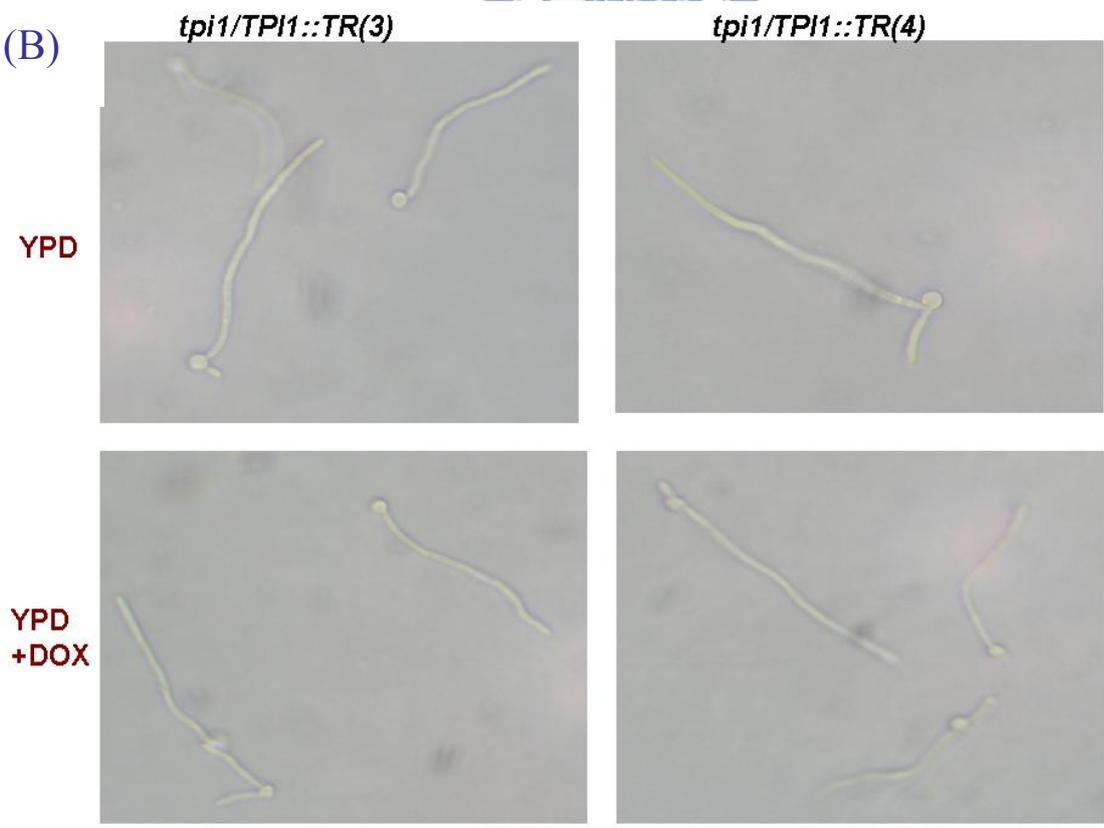
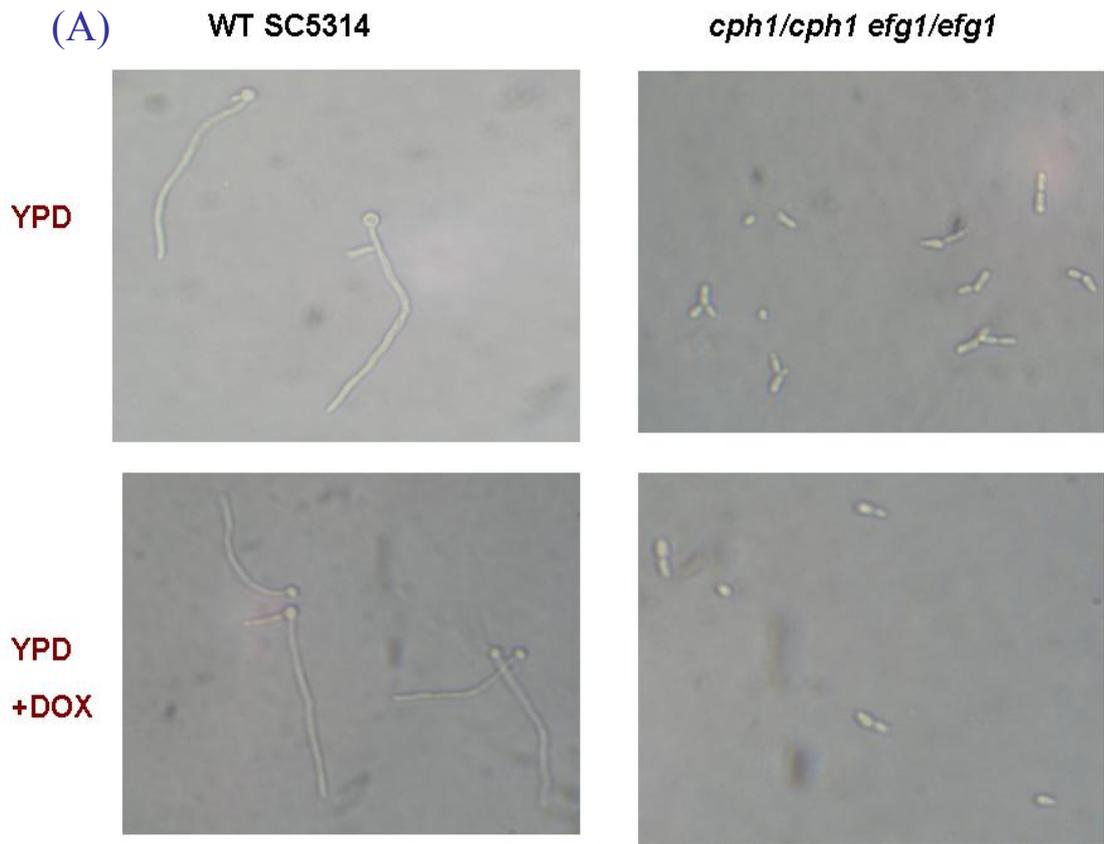


YPD plate with 4% goat serum, 37°C, 3 days



YPD plate with 4% goat serum, 37°C, 3 days

圖二十八、觀察 *tpi1/TPI1::TR* 突變株單一菌落型態變化。每一個紅色方格面積為  $4\text{cm}^2$ 。



YPD broth with 10% goat serum, 37°C ,3 hr  
 Doxycycline concentration: 20  $\mu$  g/ml

(C)

*tpi1/TPI1::TR(10)*

YPD



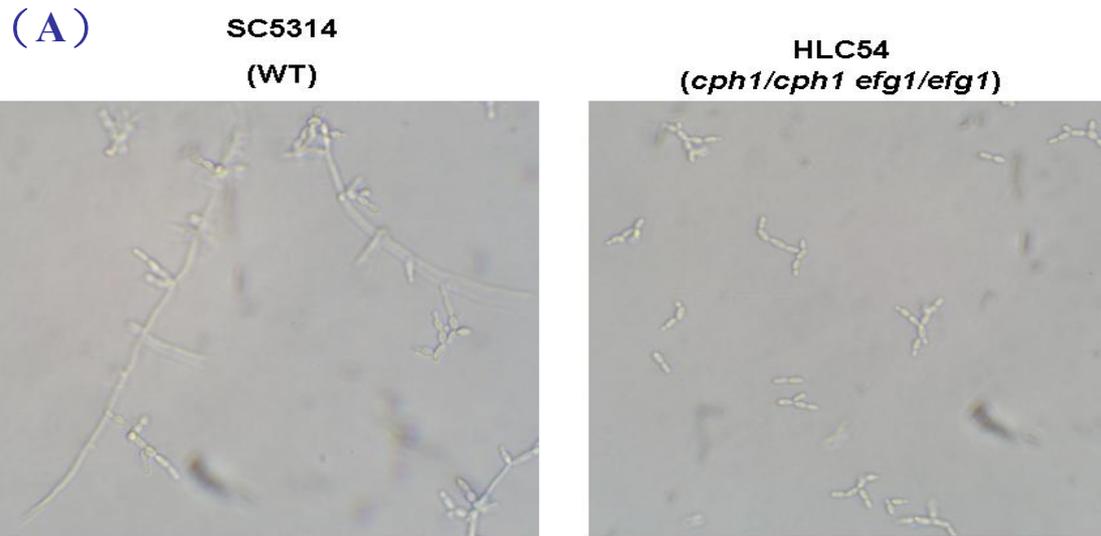
YPD  
+DOX



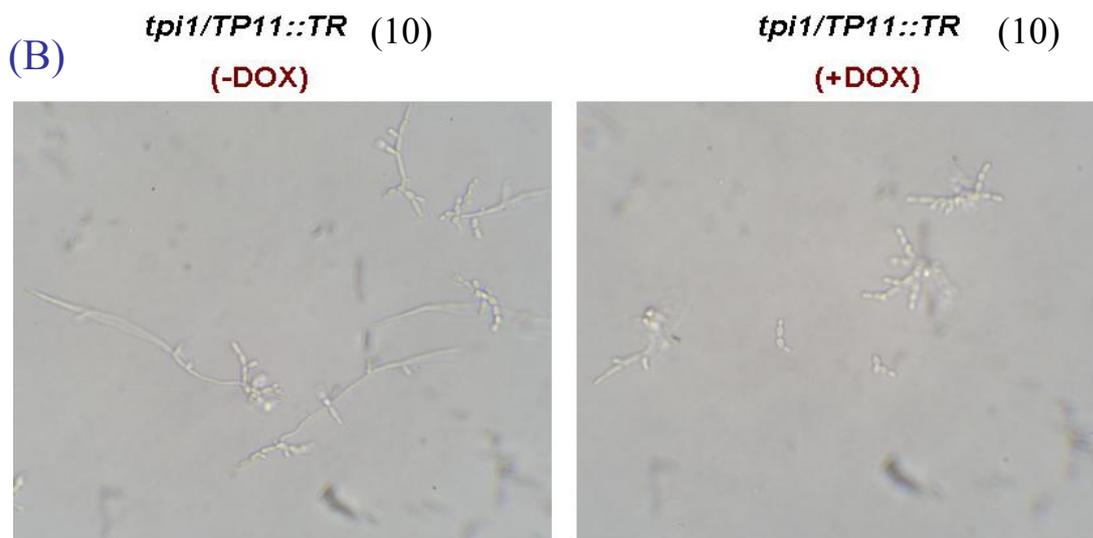
YPD broth with 10% goat serum, 37°C, 3 hr  
Doxycycline concentration: 20  $\mu$ g/ml



圖二十九、Germ tube assay。於倒立顯微鏡下(400X)觀察 *tpi1/TPI1::TR* 突變株芽管生長與否(A)WT SC5314 及 HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)為對照組。(B)、(C)部分為實驗組。

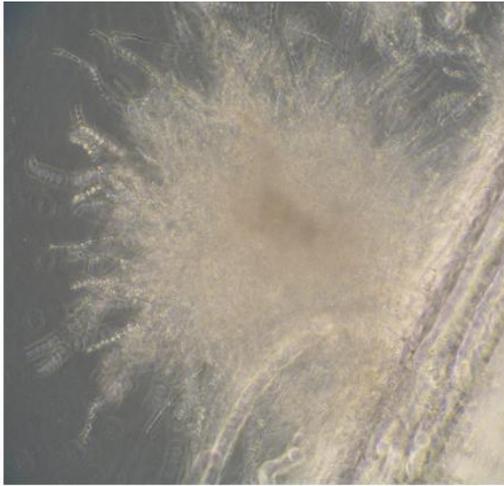


YPD broth with 10% goat serum, 37°C ,18 hr

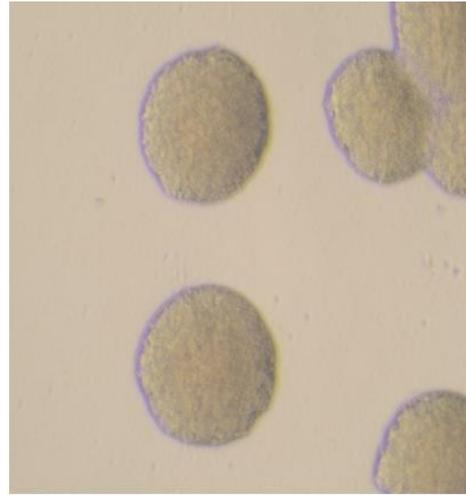


YPD broth with 10% goat serum, 37°C ,18 hr  
Doxycycline concentration: 20  $\mu$ g/ml

圖三十、在含山羊血清中之 YPD 培養液中的生長，以觀察 *tpi1/TP11::TR* 突變株增長型芽管生長狀況。(A) 部分為控制組，(B) 部分為實驗組，最後於倒立式顯微鏡 400 倍數下觀察。



WT



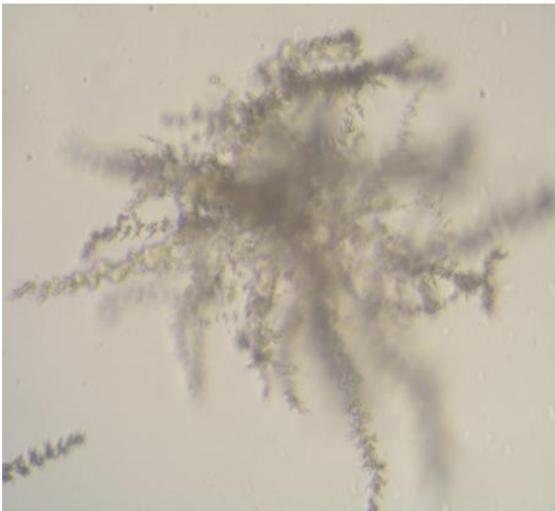
DM

倒立式顯微鏡 / 100X觀察

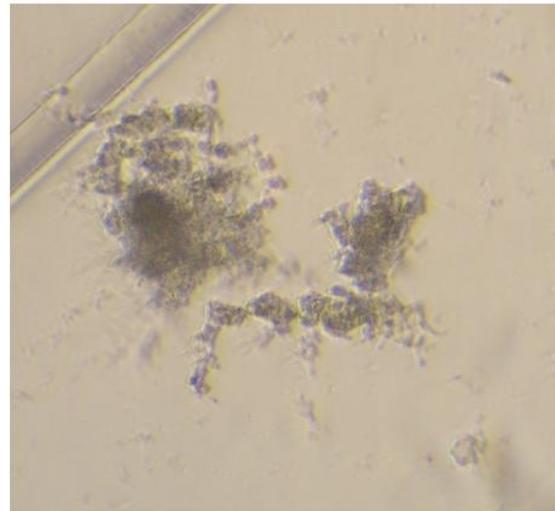
Bacto-agar with 4% goat serum, 37°C, 7 days

-DOX

+DOX



*tpi1/TPI1::TR* (10)

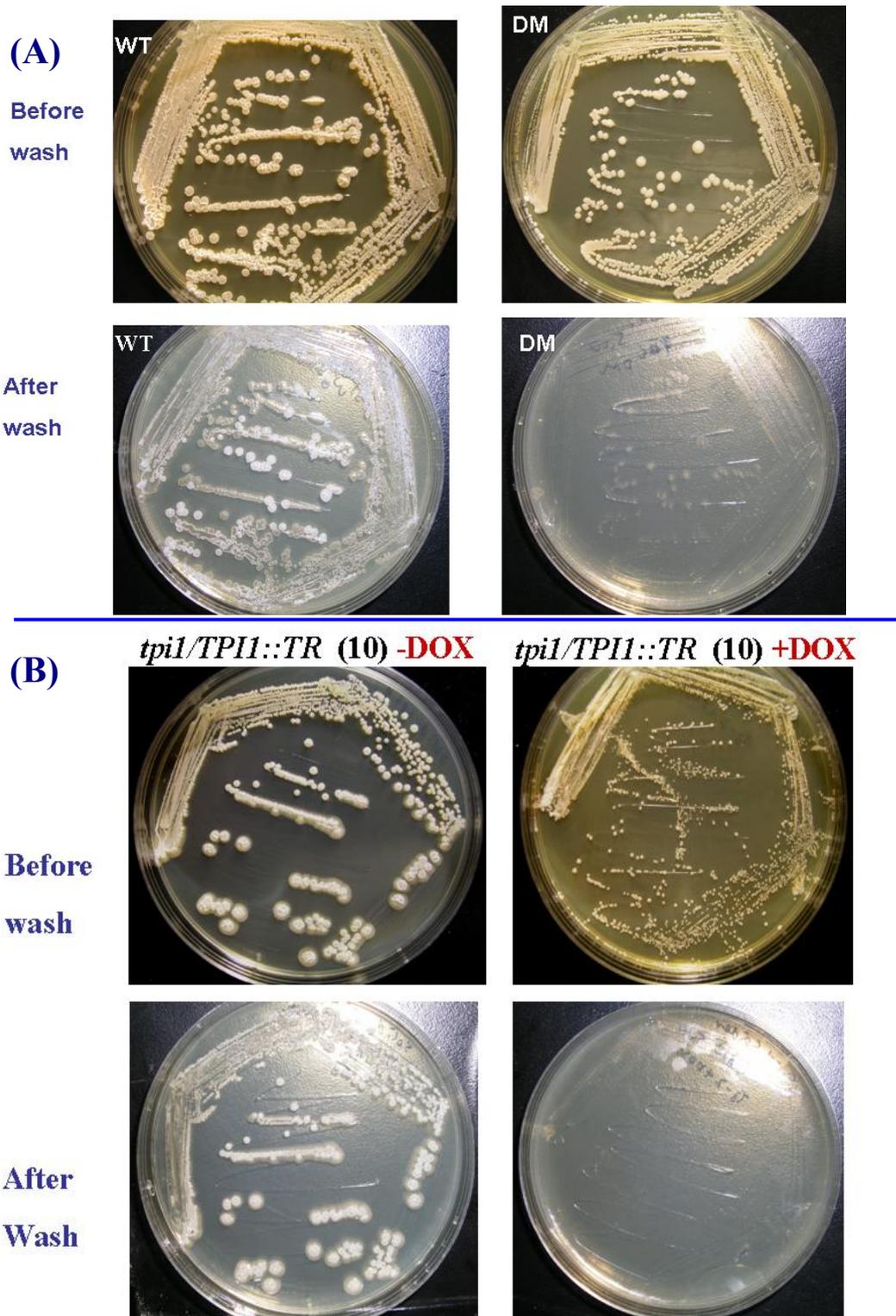


*tpi1/TPI1::TR* (10)

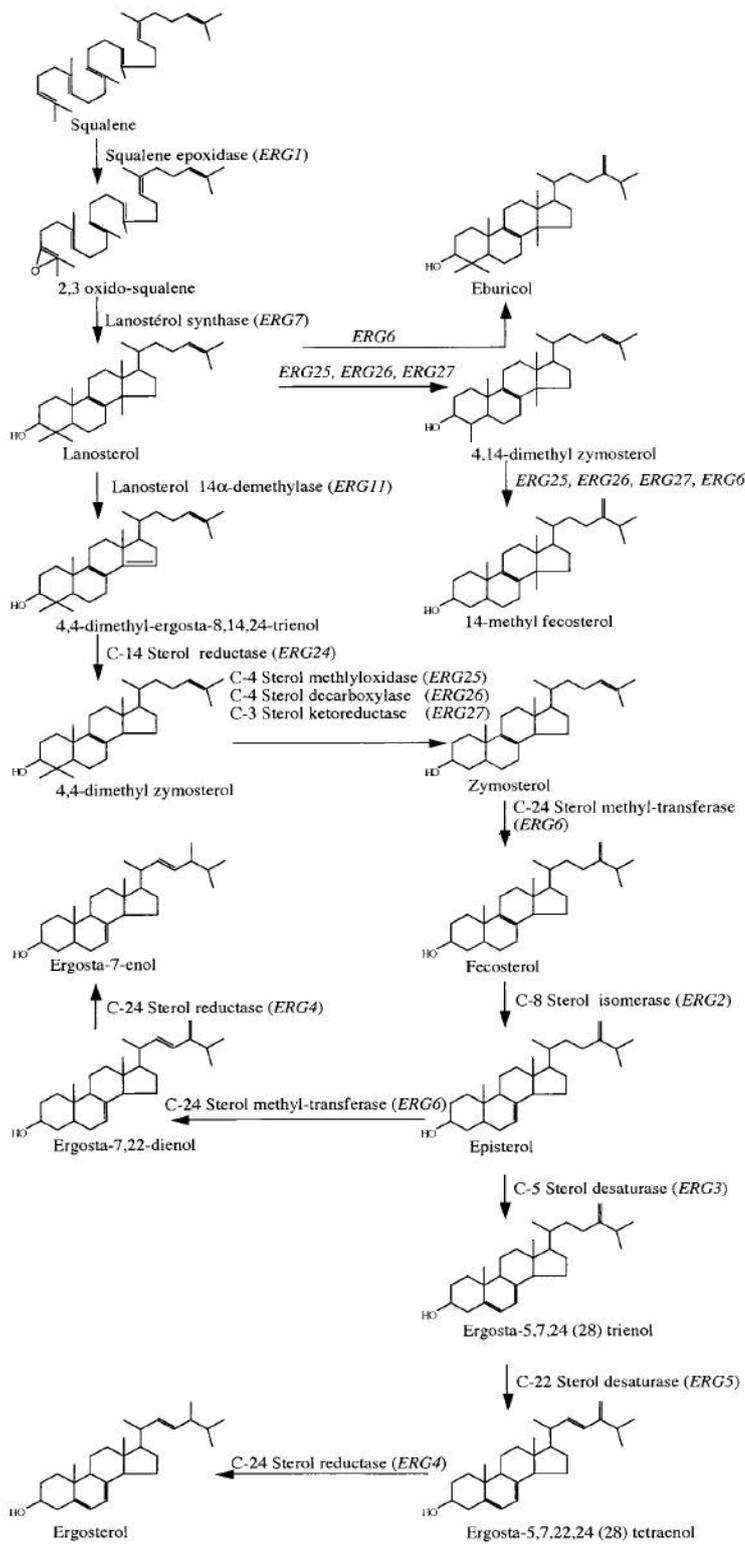
倒立式顯微鏡 / 100X觀察

Bacto-agar with 4% goat serum, 37°C, 7 days

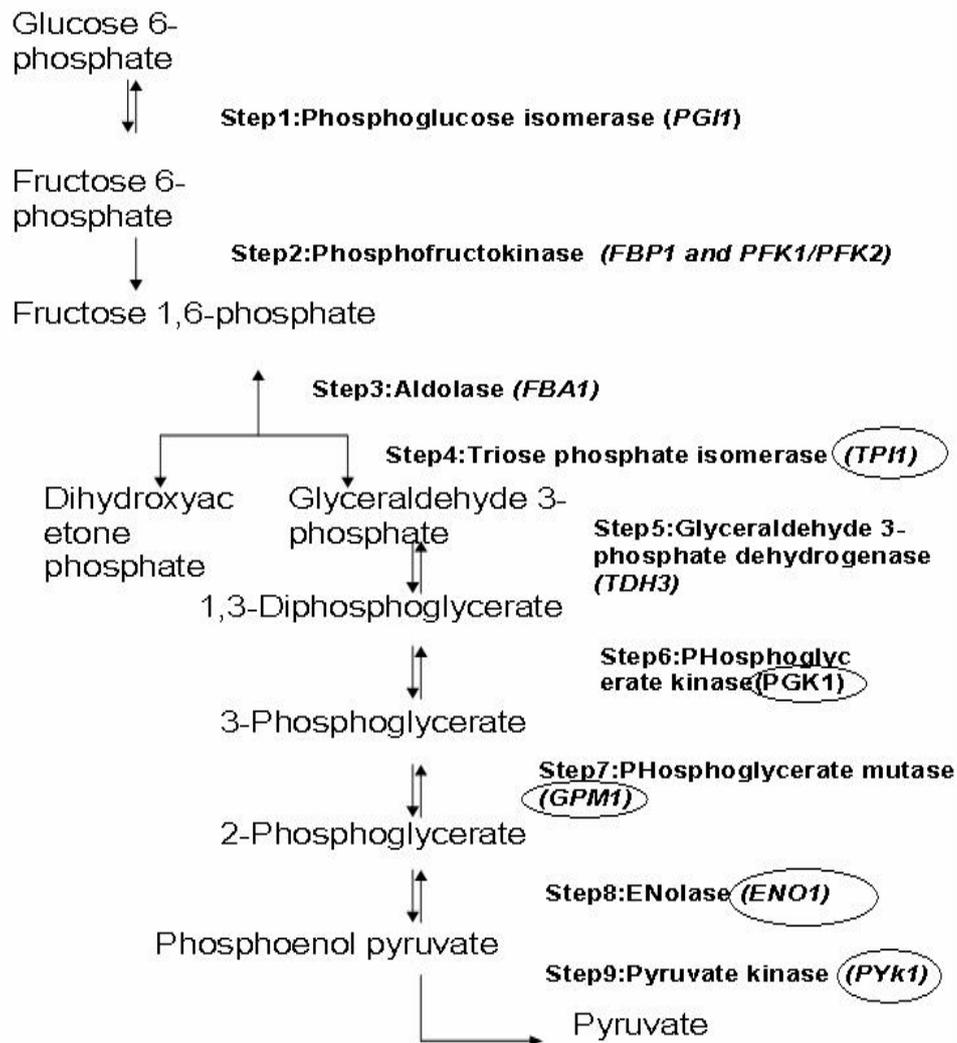
圖三十一、突變株於含 4% 血清 Bacto-agar 培養皿上的菌落型態。以野生株 SC5314、*cph1/cph1 efg1/efg1* 為對照組。最後於倒立式顯微鏡 100X 觀察 *tpi1/TPI1::TR* 突變株單一菌落菌絲分佈情形。



圖三十二、侵犯力實驗 (Invasion assay), *tpi1/TPI1::TR* 突變株培養接種於 solid spider 培養皿, 37°C 培養 7 天後觀察之結果。(A)以野生株 SC5314、*cph1/cph1 efg1/efg1* 雙突變株為對照組。(B)圖左: *tpi1/TPI1::TR* 突變株在不加藥(-DOX)的 solid spider 培養皿上的菌落型態。圖右: *tpi1/TPI1::TR* 突變株在加藥(+DOX)的 solid spider 培養皿上的菌落型態。

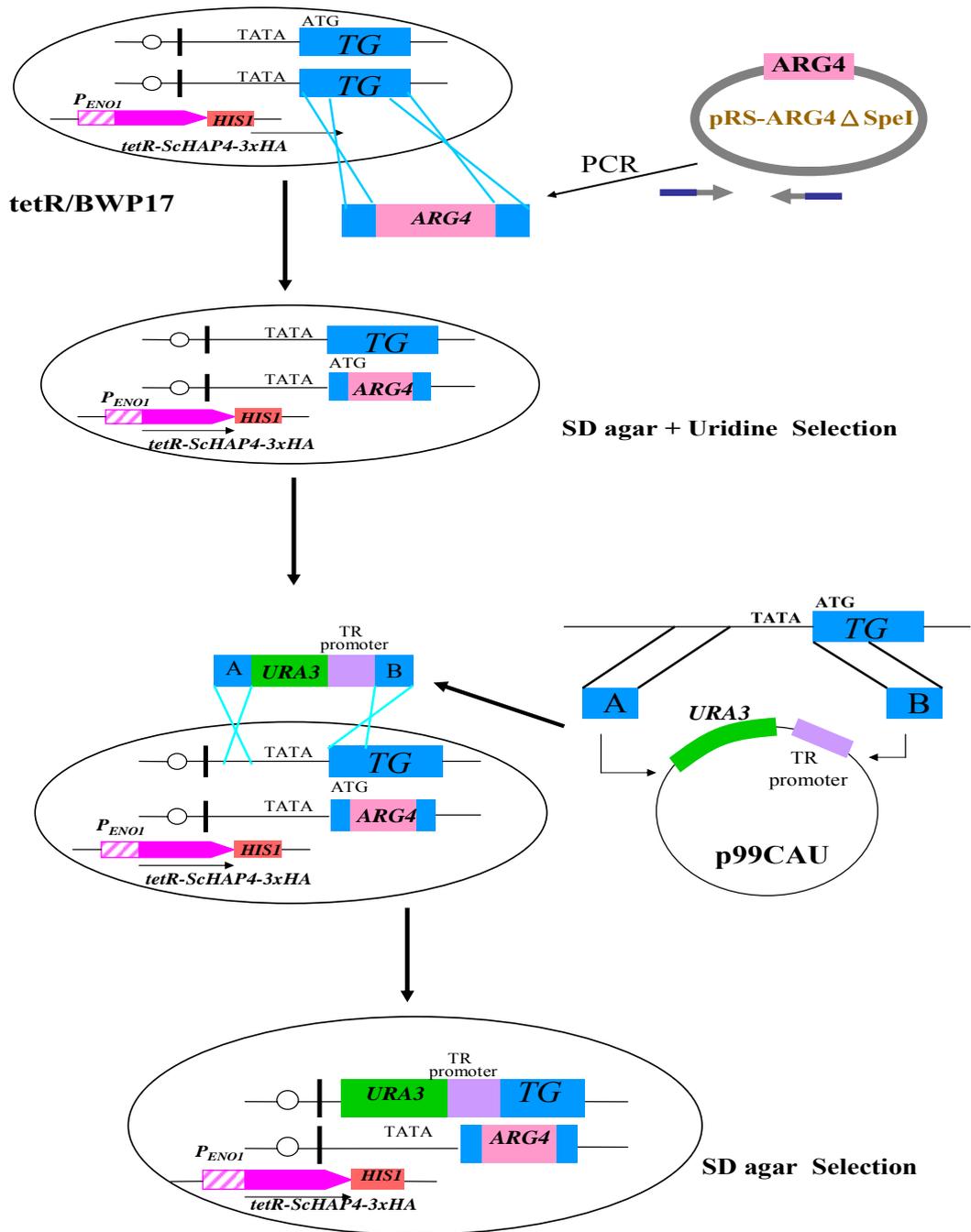


附圖一、白色念珠菌麥角固醇合成途徑。(Sanglard, et al., 2003b)

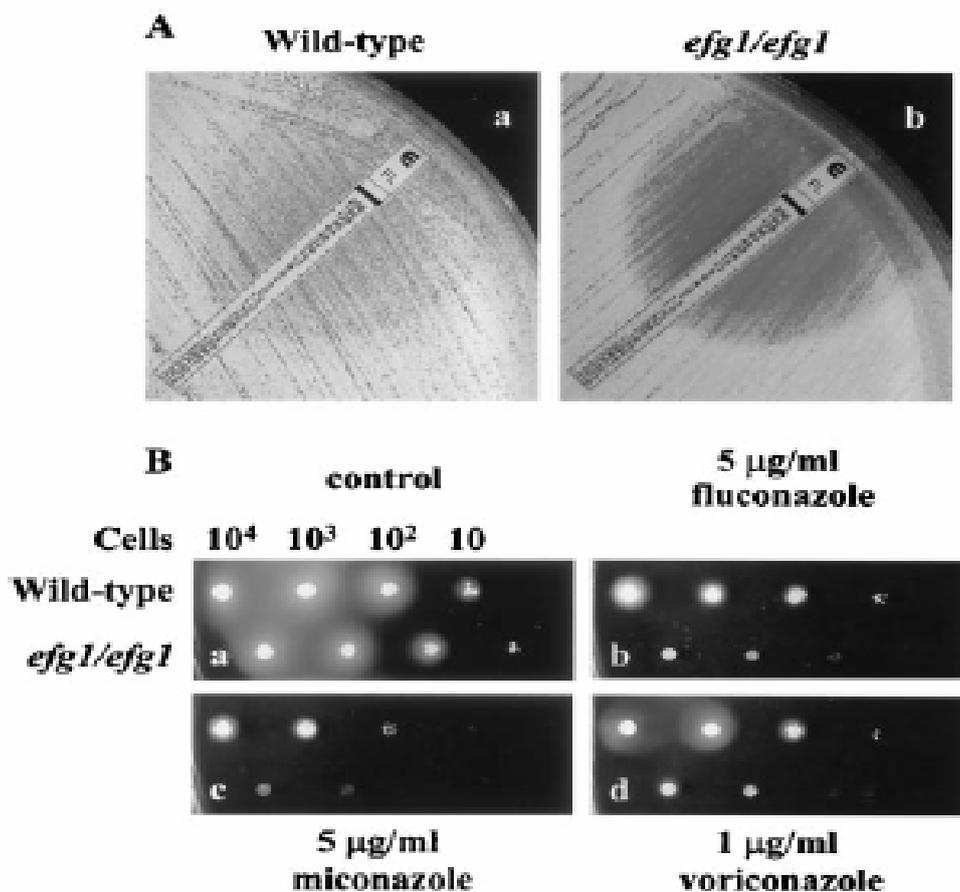


附圖二、白色念珠菌醱解作用。(陳杏芳，2004)

## Tetracycline - Regulatable (TR) System



附圖三、建構四環黴素調控表現系統 (Tetracycline-regulatable expression system, TR system) 之示意圖。tetR/BWP17 為已含有驅動 *tet R* 表現之白色念珠菌株。TG 表示欲研究之目標基因 (target gene)。pRS-ARG4 $\Delta$ SpeI 為含篩選標誌 *ARG4* 之質體。p99CAU 為已含有 TR promoter 及 *URA3* 標記之質體。(陳杏芳, 2004)



附圖四、白色念珠菌之 *EFG1* 的 null mutation 會增加菌體對藥物的敏感性。

(A)E-test. 在 fluconazole 處理下，HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*) 的抑菌圈明顯大於 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)，MIC 等於 4µg/ml。(B) Agar dilution assay. 培養細胞於含 4% 血清，不加藥物(a)，或是加入 5µg/ml 的 fluconazole (b) 或是 5µg/ml 的 miconazole (c)，或是 5µg/ml 的 voriconazole (d)，30°C、隔夜培養後的照相結果。每個圖的上列為 SC5314，下列為 *efg1/efg1* 突變株。(Lo, et al., 2005)

## 簡 歷

蕭 婷 尹

Ting Yin Hsiao

主要學經歷：

- 2003-2006 國立交通大學
  - 生化工程研究所 碩士
- 1999- 2003 國立交通大學
  - 生物科技學系 學士
- 1993-1999 私立正心中學

期刊論文：

Lo, H.-J., Wang, J.-S., Lin, C.-Y., Chen, C.-G., **Hsiao, T.-Y.**, Hsu, C.-T., Su, C.-L., Fann, M.-J., Ching, Y.-T., and Yang, Y.-L.\* (2005). Efg1 Involved in Drug Resistance through Regulating the Expression of *ERG3* in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemo.* 49: 1213-1215.