

# 國立交通大學

理學院網路學習學程

碩士論文

構築及表現白色念珠菌 ORF19.2730 的重組 DNA  
及其功能性研究



The construction and functional study of ORF19.2730  
recombinant DNA of *Candida albicans*

研究生：戴勝賢

指導教授：楊昫良 博士

中華民國九十七年七月

構築白色念珠菌 ORF19.2730 的重組 DNA 及其功能性研究  
The construction and functional study of ORF19.2730  
recombinant DNA of *Candida albicans*


研 究 生：戴勝賢

Student：Sheng-Shyan Tai

指 導 教 授：楊昶良

Advisor：Yun-Liang Yang

國 立 交 通 大 學  
理 學 院 網 路 學 習 學 程  
碩 士 論 文



A Thesis  
Submitted to Degree Program of E-Learning  
College of Science  
National Chiao Tung University  
in partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
Master  
in  
Degree Program of E-Learning

July 2008

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十七年七月

# 構築及表現白色念珠菌 ORF19.2730 的重組 DNA 及其功能性研究

研究生：戴勝賢

指導教授：楊昫良 博士

## 摘要

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是人體重要的伺機性致病真菌之一，具有多形態的特性。當人體免疫力下降或受藥物副作用影響而改變體內菌落生態時，便會伺機感染黏膜組織；局部性臨床症狀如鵝口瘡、陰道炎等，嚴重者會造成全身性系統感染而死亡。近年來因為免疫不全患者增加及使用抗生素不當而產生抗藥性等因素，導致院內感染的病例不斷攀升。對白色念珠菌的基因研究將有助於感染的預防、治療、及解決抗藥性等問題。

Braun 等人 (2005) 綜合 Standford、CandidaDB、CGD 等主要的白色念珠菌基因資料庫，比對總數 11615 個推定的 ORF 片段，排除重複及錯誤的部份，確認出 6354 個基因片段，其中包括功能不明或未確定的部分基因。實驗室先前經抑制相減雜交之比對發現 orf19.2730 的序列可能涉及形態變化。orf19.2730 是位於第四對染色體上的 ORF 片段，屬於 Contig19-10158，和 orf19.10244 為對偶基因，計有 1821 個鹼基對。本研究以目前電腦資料庫推定而未經實驗確認的 orf19.2730 為標的，因其編碼蛋白質與啤酒酵母菌的 RPH1 有同源性，與 DNA 修補有關。以啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 為表現平台，藉著偵測其蛋白質表現來推測此 ORF 的功能性。首先以 PCR 的方式自白色念珠菌的 Genomic DNA 擷取此 ORF 片段及其上游的 promoter 共 2192 個鹼基對插入 YEP363 質體，構築成 YEP363-TA1 質體。在 *E. coli* 增殖後轉殖到啤酒酵母，以 Coomassie blue staining 檢測，未觀察到明顯的表現。另由實驗室已構築的 pETΔ5T 系列質體擷取 HAHis Tag 序列做為標籤，連接在去除 3' 端終止碼的 orf19.2730 下游，再以西方轉漬分析偵測，發現其確實是一個能產生蛋白質的 ORF。又將 orf19.2730 上游 371 個鹼基的序列分成三個片段進行  $\beta$ -galactosidase filter assay 觀察，發現在中段 -257 個鹼基到 -315 個鹼基的區域可能有未知的負向調控之調控子存在。

The construction and functional study of ORF19.2730  
recombinant DNA of *Candida albicans*

Student: Sheng-Shyan Tai

Adviser: Dr. Yun-Liang Yang

Degree Program of E-Learning  
College of Science  
National Chiao Tung University

ABSTRACT

*Candida albicans* is one of the important opportunistic fungal pathogens in human body. It has various morphologies. When body immunity deteriorates or microbial ecology in the body changes due to medical reasons, the fungus would have opportunity to infect mucous tissue; typical clinical symptoms include thrush and vaginitis. In the worst case, it would lead to general system infection and death. Recently, because of the increase of immune deficiency patients and drug resistance due to improper use of antibiotics, the cases of nosocomial infection keeps rising. Genetic and functional studies on *Candida albicans* may help in issues of infection prevention, treatment, and drug resistance.

Previously, the laboratory has conducted suppression subtractive hybridization and found the sequence of orf19.2730 might have involved in the morphogenesis of *Candida albicans*. Orf19.2730 is a hypothetical gene consisting 1821 nucleotides and is in Contig19-10158 on the fourth chromosome of *C. albicans*. The homologous allele is orf19.10244. The sequence of orf19.2730 and the upstream promoter, 2192 nucleotides in total, was amplified by PCR. The ORF was then cloned into 2 $\mu$  vector for expression in *Saccharomyces cerevisiae*. The promoter sequence was fused to *lacZ* gene and then was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* for the purpose of identifying cis-acting sequences regulating the promoter activity. Western blot analysis showed that the ORF indeed could manifest, able to produce protein.  $\beta$ -galactosidase filter assay also showed that there may have inhibitory sequence from -257 to -315 nucleotides.

## 誌謝

終於可以昭告諸親朋好友，我的論文完成了。這一篇拖遲不出橫亘數年的論文，今日能夠勉力完成，有賴太多貴人的加持與協助！

感謝志鴻指引交大理學院專班這一條明路並告誡我既入寶山就不要空手而歸！感謝林文彬校長獨排眾議並給予祝福讓我得以一圓而立之前未能完成的研究所之夢！感謝專班提供進修的機會及選擇研究主題的包容！

最要感謝指導教授楊昀良老師不惜跌股的接納、容忍、引領與提攜，給我最大的空間與時間，允許我能在專班廣泛探索了兩年知識的寶庫後，再進實驗室享受三年生命科學的淬鍊、思維邏輯的訓練及自我實現私慾的滿足！還要感謝羅秀容老師有關白色念珠菌的啟蒙與指導！論文的完成有幸承蒙彭慧玲老師、藍忠昱老師、謝家慶老師及徐琅老師悉心的審查及愷切的指正與建議，使本論文得以更為詳實與縝密。另外從各位老師身上所領略到博學鴻儒待人治學與處事的態度，更使我獲益匪淺！在此謹致最大的謝忱！

實驗室裡忙碌而喜樂的一千多個日子裡，感恩建孝、婷尹、志豪、怡瑾、宗翰、佳叡、育穎毫無保留的技術指導與協助，使我節省許多摸索的時間提早進入狀況。也要感謝欣彬、淑萍、旻秀、惠敏、敏書、淑貞、柏伶、瀨云及萍芳這群充滿陽光活力的年輕夥伴們一路同行！有幸與你們共渡這一段學習成長的歲月！

實驗室多少漫漫長夜，感謝生科系葉大哥的夜半關懷送暖！延宕多時的論文得以產出，感謝專班張小姐臨門一腳的催促！

一路走來，感恩菩薩加持維、汝平安長大沒有太多的顛顛。感激內子玉珍支持體諒包容與付出，讓我能無後顧之憂。感謝岳母的鼓勵與關懷。謝謝父母的支持與打氣。

感激您們及所有一路相伴的貴人們！

戴勝賢 謹誌  
于 2008 的生日

# 目錄

中文摘要 .....	i
英文摘要 .....	ii
誌謝 .....	iii
目錄 .....	iv
圖目錄 .....	vii
一、緒論 .....	1
1.1.前言 .....	1
1.2.白色念珠菌 .....	2
1.3. DNA 修補 (DNA Repair) 之探討 .....	2
1.3.1. 光恢復修補 (photoreactivation) .....	3
1.3.2. 切除修補(Excision repair).....	3
1.3.3. 錯配修復(Mismatch Repair, MMR) .....	4
1.3.4. 雙股螺旋斷裂修補 (double-strand break DNA repair).....	5
1.3.5. 錯誤傾向修復作用 (Error-prone repair) .....	6
1.3.6. 有關白色念珠菌的 DNA 修補之研究.....	7
1.4.本論文之研究目標 .....	8
二、材料 .....	9
2.1.菌株 .....	9
2.2.質體 .....	10
2.3.引子(primer) .....	11
2.4.藥品試劑 .....	11
2.5.緩衝溶液及溶液 .....	14
2.6.培養基配製 .....	16
2.7.儀器設備 .....	17
三、實驗方法 .....	19
3.1. Bust n' Grab Protocol 快速抽取 DNA (Harju et al., 2004) .....	19

3.2.以 Excel Pure Plasmid mini kit 抽取 E. coli 質體 .....	19
3.3.聚合酶連鎖反應 (PCR) .....	19
3.4. PCR 產物的 T-vector 檢驗 .....	20
3.5.限制酶反應 (Sambrook et al, 1989) .....	21
3.6.萃取洋菜膠內之 DNA 片段 .....	21
3.7. E. coli 的连接反應 (Ligation) 和轉殖作用 (Transformation) .....	22
3.8.真菌的轉殖作用 (Yeast transformation) .....	22
3.9.抽取啤酒酵母質體 .....	23
3.10.萃取真菌細胞萃取液 .....	23
3.11.SDS PAGE 進行 Coomassie blue stain 測試 .....	23
3.12.西方轉漬分析 (Western Blotting) .....	24
3.13.Yeast $\beta$ -galactosidase filter assay .....	25
3.14.侵犯力分析 (invasion) .....	25
四、結果 .....	27
4.1.白色念珠菌 Genomic DNA 的資料庫分析 .....	27
4.2.將 Candida albicans Genomic DNA 的 orf19.2730 及其上游序列 轉殖到 YEP363 和 pRs426 質體 .....	28
4.3.將 Ta2Y 質體轉殖到啤酒酵母菌建構 10560-2B-Ta2y .....	29
4.4. Coomassie blue staining .....	29
4.5.建構 Ta2HAS 質體 .....	29
4.6.將 Ta2HAS 質體轉殖到啤酒酵母建構 10560-2B-Ta2HAS .....	31
4.7. Western blotting .....	32
4.8.建構帶有 URA3 序列的 YEP363URA3 和 YEP363TA1URA3 質體 .....	32
4.9.建構酵母菌 SLO69Tu 和 SLO69Yu .....	33
4.10.侵犯力分析 .....	34
4.11.以 Yeast $\beta$ -galactosidase filter assay 對 orf19.2730 的 promoter 檢驗 .....	35
五、討論 .....	36
5.1. orf19.2730 資料庫分析之探討 .....	36
5.2.以啤酒酵母菌觀察 orf19.2730 表現 .....	37
5.3.西方墨點法檢驗 orf19.2730 之表現 .....	38
5.4.建構 SLO69TU 及 SLO69YU .....	39

5.5. orf19.2730 上游 promoter 的探討 .....	40
5.6. 侵犯力分析之探討 .....	41
5.7. 結語與未來展望 .....	42
六、參考文獻 .....	43
附錄 1：SB021 序列 .....	74
附錄 2：SB021 和 orf19.2730 比對結果 .....	75
附錄 3：SB021 和 orf19.2743 比對結果 .....	76
附錄 4：orf19.2730 序列 .....	77
附錄 5：orf19.2743 序列 .....	79
附錄 6：CGD 資料庫中和 DNA repair 相關的 ORF .....	81
附錄 7：RSA-Tools DNA pattern result of orf19.2730 .....	84





## 圖目錄

圖 1. SB021 序列和 orf19.2730 對應之相關位置 .....	49
圖 2. orf19.2730 及其對偶基因 orf19.10244 在 <i>Candida albicans</i> 第四對 染色體上的相對位置 .....	50
圖 3. orf19.2730 及其上游序列之限制酶切割部位分析 .....	51
圖 4. PCR 切取 orf19.2730 及其上游序列，長度為 2192 個鹼基 .....	52
圖 5. Ta2Y 質體的構築 .....	53
圖 6. Ta2R 質體的構築 .....	54
圖 7. Ta2Y 及 Ta2R 以限制酶 <i>XhoI</i> 切割後膠體電泳分析 .....	55
圖 8. Ta2Y 質體轉型到啤酒酵母菌 10560-2B，建構 10560-2B-Ta2Y .....	56
圖 9. Coomassie blue staining 比對試驗 .....	57
圖 10. 以 PCR 方式自 Ta2Y 切取 orf19.2730 $\Delta$ stop .....	58
圖 11. 以 <i>BamHI</i> 和 <i>HindIII</i> 切割 YEP363 質體及 orf19.2730 $\Delta$ stop .....	59
圖 12. Ta2Y $\Delta$ stop 質體 .....	60
圖 13. 以限制酶 <i>XhoI</i> 切割確認 Ta2Y $\Delta$ stop 質體 .....	61
圖 14. 以 PCR 方式在 pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體上擷取 HA3His6 及其 下游共 996 個鹼基的 pHas 片段 .....	62
圖 15. Ta2HAS 質體 .....	63
圖 16. 經限制酶 <i>XhoI</i> 處理確認建構 Ta2HAS 質體 .....	64
圖 17. 檢驗 10560-2B-Ta2HAS 轉型株 .....	65
圖 18. 啤酒酵母菌及 10560-2B-Ta2HAS 進行 Coomassie blue staining 及 Western blotting .....	66
圖 19. proURA3 .....	67
圖 20. 建構 YEP363URA3 質體及 YEP363TA1URA3 質體 .....	68
圖 21. 建構質體 YEP363URA3 和 YEP363TA1URA3 的確認 .....	69
圖 22. 對酵母菌 SLO69Yu 和 SLO69Tu 抽取質體後進行 PCR 檢驗 .....	70
圖 23. 侵犯力分析(Invasion assay)結果 .....	71
圖 24. 建構 YpL7、YpL5，及 YpL2 等三種質體的建構 .....	72
圖 25. 對 SCYpL7、SCYpL5 及 SCYpL2，進行 Yeast $\beta$ -galactosidase filter assay .....	73

# 一、緒論

## 1.1. 前言

白色念珠菌(*Candida albicans*)是人體重要的伺機性致病(opportunistic pathogen)真菌之一，具有多形態的特性。通常可以少量存在於一般人的口腔、喉部、皮膚、指甲溝、大腸、陰道等黏膜組織，與人體及其他體內菌種保持平衡。正常情形下健康而營養良好的成年人有著功能正常的免疫系統可以維持這種平衡。當這種平衡受到化學療法、使用抗生素、口服避孕藥、懷孕、衰弱的免疫系統、營養不良、過多的壓力和生病等因素衝擊而失調，或受藥物副作用影響而改變體內菌落生態時，便會伺機感染黏膜組織。局部性臨床症狀如鵝口瘡、陰道炎等，嚴重者會造成全身性系統感染而死亡(陳豪勇等, 2000)，其中白色念珠菌血症的死亡率甚至可高達40%(Barelle *et al*, 2003; Wenzel and Gennings, 2005)。

抗生素是對抗細菌感染的重要藥物，但它沒法區別體內菌落。因此抗生素在殺掉有害菌種的同時也殺掉有益菌種，而給白色念珠菌有機會增殖的空間。近年來因為免疫不全患者增加及使用抗生素不當等因素，導致院內感染的病例不斷攀升。在台灣醫院內真菌培養分離出白色念珠菌所佔的比例可高達60.4%(Hsueh *et al*, 2002)。一般真菌的代謝方式與哺乳動物的細胞相似，所以在開發抗真菌感染的藥物相當困難。而真菌侵入細胞內部後，其會轉變以脂質來取代醣類產生能量，這使得它們有更強的致病力，也可能成為藥物攻擊的目標(Lornenz & Fink, 2001)。目前抗真菌藥物主要有 Polyenes、Azole-base 與 5-Flucytosin 及 Caspofungin 等四類(Dupont, 2001; Yang and Lo, 2001; Ripeau *et al*, 2002)。但是這些藥物的使用有其細胞毒性及副作用等不良反應與限制。隨著後抗生素時代全球性抗藥性病菌的崛起肆虐，抗真菌藥物的使用量日增(Chen *et al*, 1997; 陳宜君, 2002)，目前甚至已有白色念珠菌抗藥性菌株產生(White *et al*, 1998; Schuetzer-Muehlbauer *et al*, 2003; Akins, 2005)，使得念珠菌感染成為不容忽視的醫學課題。以分子生物學方法對白色念珠菌的基因探討及其調控機制等研究將可協助尋找新的藥物標的，進而有助於感染的預防、治療、及解決抗藥性等問題。

## 1.2. 白色念珠菌

念珠菌屬約有 81 種，多數為人體正常菌群，少數對人有致病性。致病性念珠菌主要有白色念珠菌 (*C. albicans*)、*C. tropicalis*、*C. parapsilosis*、*C. krusei* 等，其中最為常見的是白色念珠菌。白色念珠菌的菌體成圓形或卵圓形(2×4μm)。出芽繁殖時若芽管延長不與母體脫離，則形成假菌絲。在 YPD 培養基無血清時生長良好。生長時需氧。室溫或 37°C 培養 3 天長出類酵母型菌落，表面光滑，呈灰白色或奶油色。隨培養時間稍延長，菌落增大，顏色變深並皺褶。用玉米培養基培養時則易形成厚膜孢子 (郭曉奎, 2007)。白色念珠菌可以酵母菌型 (yeast form)、假菌絲型 (pseudohyphal form)、菌絲型 (true hyphal form) 及厚膜孢子型 (chlamydozoospores) 等四種型態存在，型態之間的轉換主要受環境條件影響如溫度、酸鹼值、氮源或碳源是否充足、細胞密度等 (Ernst, 2000)。環境條件的訊息通常經由信號傳導途徑傳達給細胞，使得特定基因被誘導或被抑制，而啟動形態轉變的機制 (Brown, 2002; Soll, 2002)。其中酵母菌型和菌絲型之間的轉變決定著白念珠菌的致病能力 (Odds, 1994; Lo *et al.*, 1997)，酵母菌型有助於菌體的散佈到宿主其他位置，而菌絲型則可能有助於侵犯組織逃避巨噬細胞的攻擊，所以生成菌絲的能力為白色念珠菌產生致病性不可或缺的條件之一。

## 1.3. DNA 修補 (DNA Repair) 之探討

DNA 修補是細胞內維持 DNA 結構完整及修復 DNA 損害最重要的一個機制。當生物體 DNA 受到環境突變原 (environmental mutagens) 例如 x-ray，紫外線，以及有毒化學物質等刺激而導致 DNA 分子結構的破壞時，會改變細胞閱讀信息和基因編碼的方式，所以 DNA 修復必須經常運行以迅速改正 DNA 結構上的任何錯誤之處，維持整個基因庫在細胞複製時的正確性。遭受 DNA 損傷的細胞需經 DNA 修補後才能再繼續 DNA 複製及細胞分裂等過程 (Bao *et al.*, 2001)。目前已知細胞內的 DNA 修復機制中，由 DNA 損害斷裂的程度可以分為兩種類型，一種是單股損害的修復；當 DNA 兩股的其中一股發生損害時，就可以另一股為模版 (template) 作為修

正的依據。另一種則是 DNA 雙股斷裂；DNA 雙股斷裂是在缺乏另一股序列當模版的情況下，透過同源的染色體(homologous chromosome)序列或姊妹染色分體(sister chromatid)來尋求支援。DNA 雙股斷裂的修復有時候可能無須任何序列當模版，而逕行將斷裂部分直接接合，這種 DNA 修復方式則隱含錯誤的機率(error-prone) (Wikipedia, 2008)。

### 1.3.1. 光恢復修補 (photoreactivation)

光恢復修補是指紫外線使 DNA 產生嘧啶二聚體(purimidine dimer)造成的損傷，其中共價鍵的連接可直接被一種光依賴型的光分解酶(photolyase)所逆轉。光分解酶是細菌內的修復蛋白，當光分解酶結合到 DNA 的變形區域時，即具近紫外光及藍色的光譜區域的吸收帶。吸收光子造成激動態切割二聚體回到其原始鹼基，故可將紫外線所造成的雙嘧啶鍵結在可見光照射後恢復成完整無損的狀態。啤酒酵母菌 DNA 中的 PHR1 基因即可編碼光分解酶，是在轉錄層級上和光恢復修補有關的基因。PHR1 的主要調節者是一段含有 39 個鹼基，稱為 URS(PHR1) 的序列，這個序列是組成 damage-responsive repressor PRP 蛋白的 binding site。RPH1 是 PHR1 的抑制者之一。Rph1p 有兩個 zinc fingers 的構造，可辨識 URS(PHR1) 上的連結區域 AG(4) (C(4)T) 序列而加以連結，進行對 PHR1 的抑制調控。當 RPH1 基因被刪除後，PHR1 基因不再被抑制，其所表現的光恢復修補速率也因此加快 (Jang, Wang, and Sancar, 1999)。由於這一類的蛋白可以直接將遭受破壞的 DNA 或核苷酸還原，因此不需要另一股當作修復的模版，是單一蛋白所參與的直接修復機制 (Direct repair) 的一種方式。

### 1.3.2. 切除修補(Excision repair)

切除修補是細胞內 DNA 損傷的主要修補機制。其作用是由一種識別酶(Recognition enzyme)起始，此酶能發現損傷鹼基或 DNA 空間結構的變化。識別後把含有損傷鹼基的序列切除掉，然後合成一段新的 DNA 來代替切除掉的部分。這種修復系統很常見，有些能識別 DNA 的一般損傷，其他的則僅作用於鹼基損傷的特殊類型，如糖基化酶 (DNA glycosylase) 去除特異的鹼基改變；AP 內切核酸酶 (AP endonuclease) 則去除無嘌呤位置的殘基。在單細胞類型中通常存在多種切除修復系統，能夠處理發生的

大部分損傷。切除修復系統主要可分為鹼基切除修復(Base-excision repair)和核苷酸切除修復(Nucleotide-excision repair)。

完整的 DNA 的骨架中一個鹼基遺失所形成的缺口稱為 AP 位置 (apurinic-apyrimidinic site, AP site)。鹼基切除修復是指先用糖基化酶把單一個錯誤的含氮鹽基移除，再用 AP 內切核酸酶切在鹽基被移除後的空位以移除磷酸鍵形成 nick。接著 DNA polymerase I 從 nick 處的 free 3'OH 開始修復，拿掉部分壞損的 DNA，同時加上未損壞 DNA。DNA polymerase I 脫落後，DNA ligase 會把 nick 封好，完成修復(David-Cordonnier *et al.*, 2002)。核苷酸切除修復則先用 ABC excinuclease 在發生錯誤的部分 (DNA lesion) 左右各切下數個核苷，切下的數目因物種和損壞的鹼基數目而定。再經過 DNA helicase 作用後，將含有損壞鹼基的 DNA 去除，然後由 DNA polymerase I 把缺少的核苷補上，再經由 DNA ligase 把 nick 封補(Van Houten *et al.*, 1987)。

核苷酸切除修復和鹼基切除修復最大的不同是拿走一小段核苷酸而不是單獨一個鹼基。不同切除修復系統的專一性是不同的，但是它們每個系統都是去除 DNA 錯配或損傷的鹼基，然後用一段新合成的 DNA 序列代替。

### 1.3.3. 錯配修復(Mismatch Repair, MMR)

錯配修復主要是負責 DNA 在複製過程發生嘌呤—嘧啶錯誤配對的校對工作。舊有的 DNA strand 是被甲基化的，而剛合成出來的 DNA 則否。藉由辨識 DNA 是否被甲基化可以辨識出 DNA 的新舊。比對新舊之間的差異，當發現 DNA 不一樣時，就可進行除錯。因此，大部分的修復都要在複製完成後的很短時間內進行，才可根據是否有甲基化而分別。一但新股被 Dam methylase 甲基化之後，就無法校對兩股的對錯了。不正確配對的錯配鹼基可能是一個 C 與 A 錯誤配對，或者是 polymerase 跳過或重複一些鹼基，形成 1 至 5 個不成對的鹼基。

大腸桿菌 (*E. coli*) 參與錯配修復的酵素主要有 MutH、MutL、MutS 和 SSB 等。其中 MutH 會辨識 GATC 序列；MutL 用來連接 MutH 和 MutS 的蛋白，形成一個複合物 (MutH- MutS complex)；MutS 則辨識突變的核苷並與其相接。SSB 會保護 ss DNA(single strand DNA)。藉由 MutH- MutS complex 的形成，DNA 會被拉近形成了 DNA loop。MutH 帶有一個

site-specific endonuclease，要在遇到 hemimethylated GATC 序列時才會被活化。GATC endonuclease 會對未甲基化的新股上的 GATC 中 G 的 5'端作用 (nick)，標記出這個新股是要被修復的。再以 DNA helicase II 由 3'到 5'把 DNA 打開(unwind)，然後 exonuclease I 將出錯的這一股 DNA 從 GATC 的地方開始去除核苷，一直到突變的部位為止。如果突變的部分位於兩個 GATC 中間，上述 nick 和去除核苷的動作也可以從有 GATC 的兩端進行。由於 DNA 發生損傷，所以新的 DNA 會在相對原來發生損傷的部位出現缺口。從另一條未受損的姐妹股 (sister strand) 上可以切下相應的核苷酸部分填到這個缺口中，最後再用 DNA polymerase III 和 DNA ligase 把空缺部份補起來。(Li, 2008)

啤酒酵母的 Msh 修復系統與大腸桿菌的 Mut 系統同源。以 MSH2 為識別錯配裝置的主體，MSH3 和 MSH6 提供特異性的參數。MSH2-MSH3 複合物可結合 2 至 4 個核苷酸的錯配環，而 MSH2-MSH6 複合物則與單一鹼基錯配或插入或缺失部位結合。(Marsischky *et al*, 1999; Harrington & Kolodner, 2007)

#### 1.3.4. 雙股螺旋斷裂修補 (double-strand break DNA repair)

當 DNA 的傷害型式是雙股螺旋斷裂時，就無法利用互補的特性進行修復，所以雙股 DNA 的斷裂所造成的傷害對細胞來說是最嚴重也是最致命的 DNA 傷害。對於 DNA 的雙股螺旋斷裂，生物細胞發展出兩種主要機制進行修復：一種為同源重組修復系統 (homologous recombination, HR)，另一種為非同源的黏合系統 (non-homologous end-joining, NHEJ)。

HR 是利用細胞內的染色體兩兩對應的特性，若其中一條染色體上的 DNA 發生雙股斷裂，則另一條染色體上對應的 DNA 序列即可當作修復的模版來回復斷裂前的序列。HR 修復路徑與細胞週期有很高的依賴性。在 G1 期，染色體套數為 2 倍體，同源染色體是 HR 唯一可使用的模版。等到在 S 期及 G2 期時，有了姊妹染色分體(sister chromatid)的加入，染色體套數倍增為 4 倍體，這時候 HR 機制就有更多的修復模版可供選擇，因此一般認為 HR 修復的運作在 S 期/G2 期比較活躍 (Ciudad *et al.*, 2004)。此種修復所憑藉的是正確的模版，所以其修復的準確度極高，但是細胞內的染色體散佈在細胞核內，要將相對應的同源染色體與同源序列正確的並排在

一起來進行雙股螺旋斷裂的修復是十分耗時費事的工作。對於高等生物而言，因為基因體太複雜，要進行同源重組較困難，所以除非在細胞進行複製後又尚未將新複製序列與原本序列分離，同源序列容易取得的時期，一般是比較不會利用此一系統。

另一個進行 DNA 雙股螺旋斷裂修復的模式是 NHEJ。NHEJ 與 HR 最大的差異就在於不需要任何模版的幫助。NHEJ 的修復蛋白可以直接將雙股裂斷的末端彼此拉近，再藉由 DNA 黏合酶(ligase)的幫助，將斷裂的兩股重新接合。它的主要作用僅是將斷裂的 DNA 雙股螺旋重新加以黏合，並未對於斷裂的部份進行實質的比對與修復。NHEJ 的機制比 HR 簡單又不依靠模版，在基因體複雜、包含越多無用 DNA(junk DNA)的生物體，NHEJ 會比 HR 系統有效率。但是在基因體簡單的單細胞型態生物，NHEJ 則很可能破壞原本序列完整性。然而對細胞而言，DNA 雙股螺旋斷裂是一種致命的傷害形式，在這種緊迫的情況之下，NHEJ 修復的效率比 HR 修復的正確性更重要。（沈志陽，2006；黃憲達, 2005；Lewin, 2000）。

在啤酒酵母菌中的基因體十分複雜，雖然使用同源重組修復系統雖然修復結果不容易出錯，但在效率的考量之下，對於非同源的 NHEJ 依賴程度亦非常深。NHEJ 僅發生在缺乏 Rad52p 或大量的 DNA 損壞發生之後（Ciudad *et al.*, 2004）。

### 1.3.5. 錯誤傾向修復作用（Error-prone repair）

當細胞暴露在強的輻射線照射下，DNA 被破壞的程度遠超過之前的幾個修補系統所能修補的程度，DNA 就會整個四分五裂。為此細胞只好選擇一條極度不精確而且會造成高突變率的 SOS 反應(SOS response)，啟動錯誤傾向修復作用（Error-prone repair）。

SOS 反應是藉著 DNA 損傷釋放出誘發信號以啟動 RecA 蛋白酶的活性。RecA 啟動後可活化 LexA。LexA 在未經處理的細胞中相對穩定，可結合到與啟動子重疊的 SOS 框(SOS box)序列而抑制許多修復功能基因的操縱子表現。LexA 的蛋白酶活性被 RecA 啟動後，會因為發生自我切割而失效，使得所有與其關聯的操縱子開始作用而表現基因修復的功能。RecA 和 LexA 互為拮抗，RecA 可切割 LexA，而 LexA 又會抑制 RecA，所以 SOS 反應可使 RecA 蛋白和 LexA 的抑制物均被擴增。當 DNA 修補完成，

DNA 損傷的信號被去除後，RecA 蛋白質即失去活性。此時，LexA 蛋白質則不再自我切割，而以未切割的形式重新和相關的啟動子結合而終止 SOS 反應 (Maor-Shoshani *et al.*, 2000)。

### 1.3.6. 有關白色念珠菌的 DNA 修補之研究

真菌類 (Yeast) 的 DNA 修補機制可區成分基因相關 (Associated with gene) 和非基因相關 (not associated with gene) 兩類途徑。其中和基因相關的機制包括鹼基切除修復 (base excision repair)、核苷酸切除修復 (nucleotide excision repair)、錯配修復 (mismatch repair pathway) 及雙股斷裂修復 (double-strand break repair pathway) 等。

根據 CGD 資料庫的註解，目前經過電腦推定和白色念珠菌相關的基因或 ORF 有 53 個，但只有四種基因被證實 (附錄六)，其中 DPB2 (orf19.7564) 是從序列或結構相似性推斷而來 (Inferred from Sequence or structural Similarity, ISS)，目前僅初步證實和 DNA 修補有關，電腦推測可能和錯配修復或是和核苷酸切除修復有關的部份則尚未確認 (Backen *et al.*, 2000)。另外三種基因是從突變體表現型實驗推斷而來 (Inferred from Mutant Phenotype, IMP)，包括 MRE11 (orf19.6915)、RAD50 (orf19.1648) 及 RAD52 (orf19.4208)，三者都涉及 DNA 修補，同時也與白色念珠菌對藥物的敏感性或耐受性的轉變及對氧化壓力 (oxidative stress) 的反應有關 (Legrand *et al.*, 2007; Chibana *et al.*, 2005)。RAD50 (orf19.1648) 及 RAD52 (orf19.4208) 又都和雙股 DNA 斷裂的修補有關 (Legrand *et al.*, 2007; Uppuluri *et al.*, 2007; Ciudad *et al.*, 2004)。

以啤酒酵母做為研究 DNA 修復的模式生物，根據單突變和雙突變的敏感性及上位基因 (epistatic gene) 相互作用的資料可將酵母細胞對射線敏感的基因 (radiation sensitive, RAD) 分為三個上位顯性組 (epistasis group)，分別是 RAD3 組、RAD6 組和 RAD52 組 (Zawel *et al.*, 1995)。RAD3 組與核苷酸的切除修復有關，RAD3 蛋白是切割階段需要的一種解旋酶 (unwindase)，與 RNA 聚合酶有關的轉錄機制有關。RAD6 組與複製後的修復有關。RAD6 是染色體複製後的修復所必須，同時也涉及菌絲的形成。Rad6 蛋白除了對紫外線的傷害有保護功能之外，也可以透過未知的反應途徑抑制菌絲的成長；Rad6 蛋白的缺陷則會引起假菌絲的表現 (Leng *et*



*al.*, 2000)。RAD52 則與重組過程中 DNA 的修復有關。在啤酒酵母中，RAD52 更是唯一在所有 HR 修復過程都需要的基因 (Ciudad *et al.*, 2004)。

白色念珠菌其他的 49 種和 DNA 修復相關的基因或 ORF 則都是從電子註釋推斷而來 (Inferred from Electronic Annotation, IEA)，包括從資料庫紀錄轉移的註釋或是經由 DNA 序列比對的結果來推測，目前都尚未有經實驗證實的文獻記載。整體而言，目前對白色念珠菌的 DNA 修補機制相關基因的研究仍相當欠缺。

#### 1.4. 本論文之研究目標

DNA 修補是一種生物對環境耐受度的表現 (Sheedy *et al.*, 2005)，如果能對白色念珠菌有關 DNA 修補的基因加以確認，能了解 DNA 修補和白色念珠菌的型態改變的關聯性，或是能了解 DNA 修補和致病性或產生抗藥性有關的作用機制而與以中止，應該可以對白色念珠菌疾病的治療提供更多的選擇。

實驗室先前運用相減雜交技術 (suppression subtractive hybridization, SSH)，共得到 991 個選殖體，用限制酶圖析 (restriction mapping) 的方式，將有相同片段數量及大小的選殖體分組定序，接著將定序結果在 Stanford's Current Assembly of *Candida albicans* Sequence 及 NCBI 中做比對，把所得到的基因依照功能分類，共得到 52 個已知基因及 48 個未知基因 (郭大榮, 2002)。本研究將實驗室先前所得之 cDNA 序列 SB021 的 643 個核酸序列在 CandidaDB 比對結果，發現其和有 1821 個鹼基對，推定可能和 DNA 修補有關的 orf19.2730 相關度最高。故選擇以 orf19.2730 為標的，以啤酒酵母菌為表現平台，以 PCR 的方式自白色念珠菌的 Genomic DNA 擷取此 ORF 片段及其上游的 promoter 共 2192 個鹼基對，插入 YEP363 質體，轉殖到啤酒酵母。另將自實驗室已構築的 pETΔ5T 系列質體擷取 HA3His6 序列做為標籤，以西方轉漬分析偵測是否有 His 及 HA 標誌的蛋白表現，目標在於能藉此確認 orf19.2730 的表現，並進行功能性探討。

## 二、材料

### 2.1. 菌株

2.1.1. *Candida albicans* SC5314 : (Gillum et al., 1984)

為野生株白色念珠菌，染色體用於 PCR 模板以選殖特定基因。

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

作為質體增殖及保存之宿主。

2.1.3. *Saccharomyces cerevisiae* :

10560-2B : (Chen et al., 2004)

Mating type 為 *MATa*

基因型為 *ura3-52* ; *his3::hisG* ; *leu2::hisG* 。

將質體 YEP363 轉形至 10560-2B 中，命名為 SCY

將質體 Ta2Y 轉形至 10560-2B 中，命名為 10560-2B-Ta2Y

將質體 Ta2HAS 轉形至 10560-2B 中，命名為 10560-2B-Ta2HAS

將質體 YpL7 轉形至 10560-2B 中，命名為 SCYL7

將質體 YpL5 轉形至 10560-2B 中，命名為 SCYL5

將質體 YpL2 轉形至 10560-2B 中，命名為 SCYL2

SLO69 : (Chen et al., 2004)

Mating type 為 *MATa*

基因型為 *his3::hisG ura3-52* ; *leu2::hisG* ; *ade3::CDR1p-lacZ-LEU2*

將質體 Ta2YURA3 轉形至 SLO69 中，命名為 SLO69Tu

將質體 YEP363URA3 轉形至 SLO69 中，命名為 SLO69Yu

## 2.2. 質體

質體	特性	Reference
YEP363	在 <i>E. coli</i> 的篩選標記為抗 Ampicillin，在 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 的篩選標記為 <i>LEU2</i> ，在 yeast 中為高複製倍數的質體，MCS 後接 <i>lacZ</i> 為 Reporter gene。	Valenzuela <i>et al.</i> , 1998
pRS426	篩選標記為抗 Ampicillin，MCS 位於 <i>lacZ</i> 中，可用於藍白篩選，其上有 T7 promoter。	Nakanishi <i>et al.</i> , 2004
pETΔ5T-D24B-HAHis	篩選標記為抗 Kanamycin，含 T7 promoter 並帶有 HAHis-tag。	楊昶良實驗室
Ta2Y	將 orf19.2730 及其上游序列置入質體 YEP363 中，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
Ta2R	將 orf19.2730 及其上游序列置入質體 pRS426 中，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
Ta2YΔstop	將 orf19.2730 去除 3'端中止碼後，置入質體 YEP363 中，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
Ta2HAS	將 Ta2YΔstop 上 orf19.2730 的 3'端加入 HAHis-tag，破壞 <i>lacZ</i> ，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
Ta2YURA3	將 pRS426 的 URA3 置入 Ta2Y，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
YEP363URA3	將 pRS426 的 URA3 置入 YEP363，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
YpL7	將 orf19.2730 上游的 371 個鹼基在 3'端加入 AUG 啟動碼後置入到 YEP363 的 <i>lacZ</i> 前，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
YpL5	將 orf19.2730 上游的 315 個鹼基在 3'端加入 AUG 啟動碼後置入到 YEP363 的 <i>lacZ</i> 前，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
YpL2	將 orf19.2730 上游的 257 個鹼基在 3'端加入 AUG 啟動碼後置入到 YEP363 的 <i>lacZ</i> 前，篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗

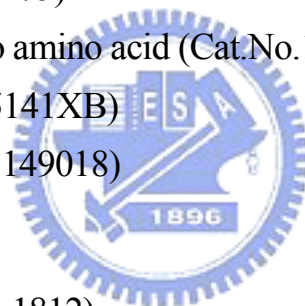
### 2.3. 引子(primer)

註：方框為限制酶切位，灰階為外加之核苷酸，非位置欄所標記。

名稱	序列 5'~3'	位置
R158Hd30	TTG <b>AAGCTT</b> ATACAACATTAATTATGCTTGTCG	orf19.2730 : +1821~+1796
F158Bm10	ATA <b>GGATCC</b> GTCAAATTTTCCAGTCTCA	orf19.2730 : -371 ~ -353
FYB20	ATA <b>GGATCC</b> ATGCAATCAGTGTATCC	orf19.2730 : +1 ~ +17
RYH20	CGG <b>AAGCTT</b> TACAACATTAATTATGCT	orf19.2730 : +1819 ~ +1801
FPH30	ATT <b>AAGCTT</b> TACCCATACGATGTTCCCT	pETΔ5T-D24B- HAHis : +5864 ~ +5881
RPB32	TTA <b>GCGCGC</b> ATATTTGAATGTATTTA	pETΔ5T-D24B- HAHis : +538 ~ +521
FPUR3	TGC <b>GGATCC</b> CTAAGAAACCATTATT	pRS426 : +5662 ~ +5677
RPUR3	ATT <b>GGATCC</b> TTAGTTTTGCTGGCC	pRS426 : +1220 ~ +1206
RH200	CGA <b>AAGCTT</b> TCATTGTGAATGTGTTGTTT	orf19.2730 : -16 ~ +3
FB371	TAA <b>GGATCC</b> GTCAAATTTTCCAGTCTCA	orf19.2730 : -371 ~ -353
FB315	ATA <b>GGATCC</b> GATGATGGCTCAACAAAC	orf19.2730 : -315 ~ -298
FB257	GCC <b>GGATCC</b> TCATTTACTAACAGAGTTGT	orf19.2730 : -257 ~ -238

### 2.4. 藥品試劑

- Amresco :
  - Acryl/Bis 37.5:1 solution (Cat.No.0254)
  - Glycerol (Cat.No.0854-1L-PTM)
  - Phenol saturated solution (Cat.No.0945)
  - Tris
- AppliChem :
  - Ampicillin (Cat.No.A2839)
- Bio-Rad :
  - APS (Cat.No.161-0700)
  - 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)
- Fermentas :
  - T4 DNA ligase (Cat.No.1812)
  - Restriction Enzyme : *HindIII, PvuI,*
- Fluka :
  - Acetic acid (Cat.No.33209)
  - PMSF (Cat.No.78830)
  - Urea (Cat.No.SK2644U)
- Gibco BRL :
  - Goat serum (Cat.No.16210-072)
- J.T.Baker :
  - Coomassie Brilliant Blue R-250 (Cat.No.F792-01)
  - Dextrost (Cat.No.1916-01)
  - 3-(N-Morpholino propanesulfonic acid)(MOPS) (Cat.No.1132612)



Triton® X-100 (Cat.No.X198-07)

● Mallinckrodt :

Methanol (Cat.No.3016-08)

● MDBio,Inc :

X-gal (Cat.No.613049)

● Merck :

Dodecyl Sulfate Sat ( SDS ) (Cat.No.1.12012.0500)

Ethanol (Cat.No.1.009833.2500)

Tris-HCl (Cat.No.1.01547.1000)

Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Cat.No.1.06346.0500)

Di-sodium hydrogen phosphate dehydrate (Cat.No.1.06580.0500)

Maleic acid (Cat.No.8.17058.1000)

$\beta$ -mercaptoethanol (Cat.No.1.1543.0100)

● Midwest Scientific :

X-film (Cat.No.LA7111)



● NEB :

Restriction Enzyme : *Bam*HI, *Hind*III, *Xho*I, *Bss*HII,

● Riedel-de Haën :

Chloroform (Cat.No.32211)

Sodium hydroxide (Cat.No.30620)

Sodium chloride (Cat.No.31434)

● Scharlau :

LB agar (Cat.No.01-385)

LB broth (Cat.No.02-385)

● Schleicher&Schuell

Nitrocellulose Transfer Membrane (Cat.No.10401396)

● SibEnzyme :

1kb DNA ladder (Cat.No.SEM11C001)

● Sigma :

Crystal Violet (Cat.No.C-3886)

EtBr (Cat.No.E-7637)

Glass Beads (Cat.No.G-9268)

Kanamycin (Cat.No.K4000)

Lithium acetate (Cat.No.L-6883)

Uridine (Cat.No.U-0750)

L-Histidine (Cat.No.H-8125)

Polyethylene Glyco<sub>3350</sub> (Cat.No.P-4338)

polyoxyethene-sorbitan monolaurate(Tween20) (Cat.No.p-1379)

Phenol (Cat.No.P-4682)

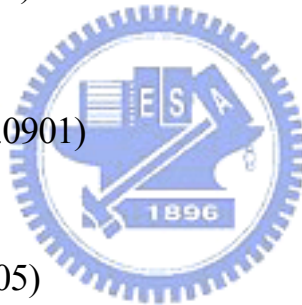
TEMED (Cat.No.T-9281)

● TBB :

Protein marker (Cat.No.0901)

● VEGONIA :

Agarose (Cat.No.9201-05)



## 2.5. 緩衝溶液及溶液

● 50X TAE buffer

48.4 g Tris base , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml , 11.42 ml acetic acid added ddH<sub>2</sub>O to 200 ml

● 5M EDTA stock solution

186.1 g EDTA added ddH<sub>2</sub>O to 800 ml (pH 8.0)

● TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 1 mM EDTA (pH 8.0)

● LATE buffer

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

- PLATE buffer

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

- 1M 10X LiOAC

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

- 50% PEG

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

- 40% dextrose

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

- Shearing buffer

100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, pH=8.0

- Breaking buffer

0.1 M Tris-HCl, 20% glycerol (v/v), 1 mM Dithiothreitol

- Z buffer

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 16.1 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 5.5 g, KCl 0.75 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.246 g, β-Mercaptoethanol 2.7 ml added ddH<sub>2</sub>O to 1000 ml pH 7.0

- Lysis buffer

2% Triton X-100 , 1% SDS , 100 mM NaCl , 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 , 1 mM EDTA, pH 8.0

- 10X SDS-PAGE running buffer

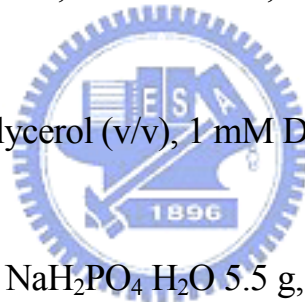
0.25 M Tris base , 1.92 M Glycine , 1% SDS

- 2X SDS-PAGE loading buffer

0.5% bromphenol blue , 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) , 10% SDS , 100% glycerol

- 0.25% Coomassive blue stain solution

2.5 g Coomassive brilliant blue , 50% methanol , 10% acetic acid added ddH<sub>2</sub>O to 1000 ml





- Destain solution  
30% methanol , 10% acetic acid
- 10X transfer buffer  
39 mM Glycine , 48 mM Tris base , 10% SDS , 20% methanol
- Blocking buffer  
2.5 g nonfat powdered milk dissolved in 50 ml 1X TBS buffer
- TBS buffer  
10 mM Tris (pH 8.0) , 150 mM NaCl
- TBST buffer  
10 mM Tris (pH 8.0) , 150 mM NaCl , 0.05% Tween 20

## 2.6. 培養基配製

- LB (Luria-Bertni) 培養液  
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl
- LB (Luria-Bertni) /Ampicillin 培養基  
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml Ampicillin
- LB (Luria-Bertni) /Kanamycin 培養基  
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml Kanamycin
- 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
- SD 培養液  
0.67% Baco-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% dextrose
- SD 培養基

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

● SD/Uridine/ Histidine 培養基

0.67% Baco-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% dextrose , 2% agar ,  
80 mg/l uridine , 20mg/l histidine

● SD/ Histidine 培養基

0.67% Baco-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% dextrose , 2% agar ,  
20 mg/l histidine

● Solid Spider 培養基

10 g of nutrient broth , 10 g of mannitol , 2 g of  $K_2HPO_4$  and 13.5 g of agar in  
1 liter  $H_2O$

## 2.7. 儀器設備

-20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)

4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGDOM)

-80°C 超低溫冷凍櫃 925/926 (FORMA SCIENCE)

水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)

震盪器 VORTEX-GENIE G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

水平式震盪器 S-101 (FIRSTEK)

試管震盪器 VXR S1 (IKA-VIERAX-VXR)

加熱攪拌器 PC-420 (CORNING)

直立式電泳槽 (BIO-RAD)

半乾式電泳轉印槽 TRANS-BLOT<sup>®</sup> SD CELL 221BR (BIO-RAD)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

恆溫式震盪培養箱 S300R (FIRSTEK SCIENTIFIC)

核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

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

桌上型高速離心機 5100 (KUBOTA CORPORATION)

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

桌上型微量離心機 Biofuge (KENDRO)

乾燥加熱板 VH-01 (VIOLET BIO SCIENCE)

程式溫度控制儀 PTC-100<sup>TM</sup> (MJ RESEARCH INC.)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RED)

酸鹼值檢測器 Φ360 (BECKMAN)

電子天平 PB153-S (METTLER TOLEDO)

電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)

倒立顯微鏡 CK40 (OLYMPUS)

數位相機 C-5050Z (OLYMPUS)

## 三、實驗方法

### 3.1. Bustin' Grab Protocol 快速抽取 DNA (Harju *et al.*, 2004)

取 *Candida albicans* 在 5ml YPD 培養液中以 37°C，200 轉培養 18 小時，取 1.5 ml 菌液加入 eppendorf 中，以 13000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液。加 200  $\mu$ l lysis buffer 沖起沉澱，震盪 1 分鐘，移入 -80°C 急凍 2 分鐘，再移入 95°C 乾熱，重複操作後震盪 30 秒。加 200  $\mu$ l Chloroform，震盪 2 分鐘，再 13000 rpm 離心 3 分鐘後，取出上清液。加 400  $\mu$ l ice-cold 100% ethanol，輕微震盪，移入 -20°C 靜置 5 分鐘。以 13000 rpm 在 4°C 離心 5 分鐘後移除上清液。再加入 500  $\mu$ l 70% ethanol，以 13000 rpm 在 4°C 離心 5 分鐘，移除上清液。以 60°C 乾熱 5 分鐘去除殘留 ethanol，以 25  $\mu$ l 1X TE 回溶，在 4°C 保存。

### 3.2. 以 Excel Pure Plasmid mini kit 抽取 *E. coli* 質體

YEP363 以加入 5  $\mu$ l Ampicillin 的 LB 培養液，pET $\Delta$ 5 以加入 25  $\mu$ l Kanamycin 的 LB 培養液，在 37°C，200 rpm 培養 17 小時。取 1.5 ml 菌液離心 1 分鐘，去除上清液。加 200  $\mu$ l Solution I 沖起沉澱，再依序加 200  $\mu$ l Solution II，輕微震盪；加 200  $\mu$ l Solution III，輕微震盪；以 13000 rpm 在 4°C 離心 5 分鐘取上清液。將 Spin Column 和 collection tube 組合，倒入上清液，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後倒掉濾液。加 700  $\mu$ l Washing Solution，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液，重複一次之後再以 13000 rpm 離心 3 分鐘，將 Spin column 移入 Eppendorf，於 60°C 加熱板乾熱 5 分鐘去除殘留 ethanol，加 50  $\mu$ l Elution Solution，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，保留濾液。

### 3.3. 聚合酶連鎖反應 (PCR)

進行一般 PCR 反應

在 0.5 ml 的微量離心管內加入 1 unit(U)的 Taq polymerase(5U/ $\mu$ l)、5  $\mu$ l 10X PCR buffer, 各 1  $\mu$ l primerd (50  $\mu$ M), 4  $\mu$ l dNTPs mixture (2.5mM), 0.1  $\mu$ g Template DNA, 再加入二次無菌水將體積調整到 50  $\mu$ l, 置於 PCR 溫度控制儀內進行聚合連鎖反應。待反應完成後, 以洋菜膠電泳確認 PCR 產物的大小。

設定 PCR 的溫度控制

1. 94°C, 3~5 分鐘
2. 94°C, Denaturation, 1 分鐘
3. 50~55°C, Annealing, 1~1.5 分鐘
4. 72°C, Extension, 1 分鐘
5. 重複 2~4 步驟, 循環 25~30 回
6. 72°C, 最後一回 Extension, 5 分鐘
7. 4°C, 停止反應。

PCR Clean Up (by Excel Band PCR)

將 PCR 產物移入 Eppendorf, 加 500  $\mu$ l Binding Solution, 震盪混合, 裝進組合好的 spin column, 以 13000 轉離心 1 分鐘, 移除濾液。再加 700  $\mu$ l Washing Solution, 以 13000 轉離心 1 分鐘, 移除濾液, 重複一次後, 再以 13000 轉離心 3 分鐘。將 Spin column 裝入新的 Eppendorf, 60°C 乾熱 5 分鐘。加 30  $\mu$ l Elution Solution, 以 13000 轉離心 1 分鐘後, 保存於-20°C。

### 3.4. PCR 產物的 T-vector 檢驗

Ligation

將 0.5 unit 的 T4 DNA ligase、1~2 unit 的 10X buffer、PCR 產生的 DNA 片段和 T-Vector(pGEM<sup>®</sup>-T)以莫爾濃度 3:1 混合於 1.5 ml 微量離心管內, 總反應體積為 10~20  $\mu$ l, 於 14°C 水浴 18 小時。

Transformation :

將 Ligation 產物移入 65°C 加熱板 10 分鐘以停止反應。將勝任細胞 (competence cell) 移入冰桶解凍 3 分鐘。取 3 管 50 µl 的勝任細胞分別加入 plus control 2.5 µl、Background Control 2.5 µl 及 PCR 產物 2.5 µl。冰浴 15 分鐘後移入 42°C 水浴槽 heat shock 45 秒。再冰浴 15 分鐘。分別滴在含 Ampicillin 之 LB 培養盤，以沾酒精加熱滅菌之玻棒冷卻後均勻塗到乾燥。在 37°C 培養 18 小時後，挑取菌落加入含 Ampicillin 之 LB 培養液，在 37°C，200 rpm 培養 18 小時，挑選質體大於 T-Vector (3KB) 者進行 Restriction Enzyme digestion，確認切割後的質體片段大小。

### 3.5. 限制酶反應 (Sambrook et al, 1989)

取適量 DNA (約 0.5~10 µg；適反應需要) 到適量反應體積 (30 µl) 以限制酵素切割。酵素的用量及反應溫度、時間都依照廠商所提供的條件資料進行。反應完後，利用洋菜膠體電泳分析。所需的 DNA 片段在經限制酵素切割後，以 Gel Extraction System 或 PCR Clean-up Kit 來純化 DNA 並去除限制酵素及鹽類。



### 3.6. 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

配製 0.8% 洋菜膠，稍微冷卻後，加 30 µl crystal violet 搖動錐型瓶充分混合，等待凝膠。樣品加入專用 6X dye，跑膠到 band 明顯分離。切取含有目標 band 的部份。以 Wizard® S. V. Gel & PCR Cleanup System 進行 Cleanup。先計算出洋菜膠重。以 10 µl solution : 10 mg gel 的比例加入 Membrane Binding Solution，在 60°C 加熱板加熱並震盪到膠完全融化。組裝 S. V. minicolumn 到 collection tube。將熔膠混合液置入 minicolumn，室溫下靜置 1 分鐘。以 13000 rpm 離心 1 分鐘，移除濾液。加 700 µl Membrane Wash Solution，以 13000 rpm 離心 1 分鐘去除濾液。再加 500 µl Membrane Wash Solution，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液。以 13000 rpm 離心 3 分鐘，將 Minicolumn 移到新的 Eppendorf，在 60°C 加熱板靜置 5 分鐘。加 50 µl Nuclease-Free Water，室溫靜置 1 分鐘，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，移去 Minicolumn，於 -20°C 儲存。

### 3.7. *E. coli* 的连接反應 (Ligation) 和轉殖作用 (Transformation)

Ligation:

DNA 片段 (Insert DNA) 和載體 (Vector) 在加入 0.5 unit 的 T4 DNA ligase 和適量緩衝液的作用下進行接合反應，反應體積 20  $\mu$ l。其中 DNA 片段和載體的莫爾濃度比為 3:1，於 14°C 水浴培養 18 小時。

Transformation:

將連接反應的產物移入 65°C 乾熱 10 分鐘以停止反應。將勝任細胞移入冰桶解凍 3 分鐘。取 50  $\mu$ l 勝任細胞加 2.5  $\mu$ l 連接反應後的 DNA。冰浴 15 分鐘後移入 42°C 水浴槽 heat shock 45 秒後再冰浴 15 分鐘。菌液滴在含 Ampicilline 之 LB 培養盤，以沾酒精加熱滅菌之玻璃棒均勻塗布到乾燥，置於 37°C 恆溫箱中培養 18 小時。挑取菌落加入含 Ampicilline 之 LB 培養液，在 37°C，200 rpm 培養 18 小時後抽質體進行限制酶反應確認。



### 3.8. 真菌的轉殖作用 (Yeast transformation)

取啤酒酵母 在 5 ml YPD 培養液，30°C，150 rpm 培養 18 小時後轉養到 15 ml YPD 培養液，30°C，150 rpm 至 OD 600>0.9，移置 15 ml 離心管，室溫下以 2500 rpm，離心 5 min，倒去上清液後加 4 ml LATE buffer，室溫下 2500 rpm，離心 5 min，去除上清液後加 1ml LATE buffer 懸浮菌液，移入 eppendorf tube，室溫下靜置 10 分鐘即為勝任細胞。取 4  $\mu$ l 10mg/ml 的 Salmon Sperm DNA 在 95°C 乾熱 1 分鐘立即冰浴 1 分鐘，連同欲轉形的質體 DNA 2  $\mu$ l (約 0.5-1  $\mu$ g) 一併加入 100  $\mu$ l 的勝任細胞。混合均勻後加入 700  $\mu$ l PLATE buffer，在 30°C，150 rpm 振盪培養 30 分鐘後，置於 42°C 水浴槽 Heat shock 7 分鐘，再冰浴 2 分鐘。以 2500 rpm 離心 5 min 去除上清液，加入 200  $\mu$ l 1X TE buffer 懸浮菌體，將菌液塗抹到適當的 SD 培養基，在 30°C 恆溫培養 3 天，挑選適當之菌落。

### 3.9. 抽取啤酒酵母質體

取啤酒酵母在加入適當營養基的 10 ml SD 培養液以 30°C，150 rpm 培養 2 天後，以 3000 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液。加入 5 ml d.dH<sub>2</sub>O 重新懸浮菌液，以 3000 rpm 離心 5 分鐘後除去上清液，倒置吸乾。加入 200 µl Shearing buffer，再倒入經 acid-washed 過的玻璃珠至液面下。在 4°C 高速震盪 1 分鐘，接著靜置 1 分鐘，重複 4 次；加入 200 µl TE 震盪 10 秒鐘後以 3000 rpm 於 4°C 低溫離心 5 分鐘，取上清液至預冷之 Eppendorf，加入同體積 Phenol: Chloroform: isoamylalcohol=25: 24: 1 混合，在室溫下震盪 60 秒，再以 13000 rpm 離心 1 分鐘，取上清液。

### 3.10. 萃取真菌細胞萃取液

取啤酒酵母在加入適當營養基的 10 ml SD 培養液以 30°C，150 rpm 培養到 OD<sub>600</sub>= 1.5~1.6，取 1.5ml 菌液轉養至新鮮 15~30 ml 加入適當營養基的 SD 培養液，以 30°C，150 rpm 培養到 OD<sub>600</sub>=1.5~1.6，取全部菌液在 4°C，5000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液。加入 10 ml Z buffer 清洗細胞，轉入 15 ml 離心管，以 5000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液。加入 500 µl Breaking buffer 懸浮菌體，再加入 25 µl PMSF(40 mM)，倒入玻璃珠至液面下，於 4°C 高速震盪 15 秒，靜置 15 秒，重複 5 次，使細胞完全破裂。加入 250 µl Breaking buffer，於 4°C 高速震盪 10 秒後高速離心 15 分鐘，取上清液即為細胞萃取液，於-20°C 保存。

### 3.11. SDS PAGE 進行 Coomassie blue stain 測試

製膠：

組裝製膠組件，玻璃板先用 70%酒精噴洗擦乾淨，確認不留纖維屑後，組合在製膠架上，注意玻片要垂直壓於泡棉墊上以免發生漏液。先配製下層 14%膠，用塑膠滴管導入玻璃模版到固定夾上緣高度，上方以 Isopropanol 壓平，待 30 分鐘凝膠後，注水除去 Isopropanol，用注射筒以針頭抽出水，重複洗滌。再配製上層 4%膠，塑膠滴管導入注入到滿，插入 Comb，待凝



膠後用保鮮膜加水包裹備用。

**膠體電泳：**

先以 1：9 的比例混合 10X  $\beta$ -M. E. (  $\beta$ -mercaptoethanol )和 2X SDS loading dye，再加入等體積的蛋白質萃取液，室溫下靜置 30 分鐘等待變性 (denature) 後注入膠體準備電泳。先以 120 V 電泳 20 分鐘待 band 壓成一線，再以 100 V 電泳 2~5 小時，到目標區的 band 明顯分離。

**Coomassie blue stain：**

取下玻片，截去上層膠，在下層膠片上滴足量的水保持濕潤，剝下膠片移入 Coomassie blue stain。以 40rpm 搖動 20 分鐘染色。回收 Coomassie blue stain 後，膠片移入塑膠盒，加入 Destain 淹沒膠片到可搖動高度，退染到 band 清晰且膠片無色，以清水清洗數回。

**收膠：**

取玻璃紙充分浸濕，平鋪在厚玻片上，去除氣泡。將退染後的膠片平鋪在玻璃紙上，壓去氣泡，加水保持濕潤。取另一浸濕的玻璃紙平鋪在膠片上，壓去氣泡。以 4 個夾子在四周夾住固定，垂直放置待完全乾燥即可收存觀測。



### 3.12. 西方轉漬分析 (Western Blotting)

**Transfer：**

將濾紙及 Nitrocellulose membrane 在 1x transfer buffer 浸泡 10 分鐘。裝配 Bio-Rad Trans-Blot® SD CELL 221BR semidry。由下而上依序鋪二層濾紙、Nitrocellulose membrane、SDS-PAGE 電泳膠體、上層再鋪一層濾紙，充分淋澆 buffer；用試管滾壓驅除氣泡後再滴加 buffer。架上電極板，以 0.09 A 電泳 40 分鐘，使膠體上的 protein 轉漬到 Nitrocellulose membrane 上。

**Blocking：**

夾去上層濾紙及 SDS-PAGE 電泳膠體，將 Nitrocellulose membrane 移入 20 ml Blocking buffer，於室溫下，40 rpm 平面震盪 1 小時。

### Detection :

將 Nitrocellulose membrane 置入塑膠袋，加入含稀釋 2000 倍 Anti-His 抗體（一抗）的 2ml Blocking buffer，壓出氣泡後封口。用玻片包夾固定，平放在 Waver，35 rpm 平面震盪 1 小時。夾起 membrane 浸入 20 ml 的 TBST，以 55 rpm 平面震盪 5 分鐘，重複清洗 3 次。再夾起 membrane 置入塑膠袋，改加入含稀釋 8000 倍 Anti-His 抗體（二抗）的 2ml Blocking buffer，壓出氣泡後封口。用玻片包夾固定，平放在 Waver，35 rpm 平面震盪 1 小時。夾起 membrane 浸入 20 ml 的 TBST，以 55 rpm 平面震盪 5 分鐘，重複清洗 3 次。最後將 800  $\mu$ l 的 ECL substrate (Pierce) 均勻加到膜上，在暗房內以 X 光底片進行壓片 1 至 5 分鐘，取出底片浸入顯影液 (Develop) 搖晃約 30 秒，將底片換到清水中漂洗 30 秒，接著浸入定影液 (Fixer) 搖晃約 1 分鐘到底片變黑，以大量清水沖洗底片，將底片晾乾保存。



### 3.13. Yeast $\beta$ -galactosidase filter assay

將欲測的菌體畫在同一培養基上培養 3 天，取滅菌過的 colony filter 直接覆蓋於培養盤的菌體上 3 分鐘，將菌落轉印至濾紙，置入新的培養基中，擠出氣泡，於 30°C 培養一天。將帶有 colonies 的濾紙菌體面向上，放入液態氮 1~2 分鐘破壞菌體後取出，置於室溫下 1 分鐘使菌體完全破裂。另取 assay filter 置於乾淨培養皿，加入適量(約 1 ml) X-gal / Z buffer (Z buffer + 1 mg / ml X-gal) 充分浸潤，濾紙不可過於潮濕，以免菌體漂浮。將處理好之含菌濾紙菌體面朝上覆蓋在其上方，濾紙間避免氣泡出現，置於 30°C 呈色。

### 3.14. 侵犯力分析 (invasion)

將菌落接種於 solid Spider 培養基 (Federico et al, 1998)，並視需求於

培養液中添加 uridine，於 37°C 恆溫培養 7 天，觀察菌落型態後，以水流沖洗菌落，觀察菌落是否因形成菌絲侵入培養基而殘留。



## 四、結果

### 4.1. 白色念珠菌 Genomic DNA 的資料庫分析

將實驗室先前所得之 *Candida albicans* 的 cDNA 序列 SB021 的 643 個核酸序列 (附錄一) 在 CGD 資料庫 (<http://www.candidagenome.org>)，選擇 Assembly 20 資料，以 Washington University BLAST (WU BLAST) version 2.0 程式作比對，可推定得兩個可能，其一為 orf19.2730，積分為 1731 (Score = 265.8 bits)，E-value = 1.3e-74 (附錄二)。另一為 orf19.2743，積分為 1722 (Score = 264.4 bits)，E-value = 3.3e-74 (附錄三) 兩者都是由 1821 個鹼基所構成，且都位於第 4 對染色體上。其中 orf19.2730 共有 1821 個鹼基，可決定 607 個胺基酸，而 orf19.2743 同樣有 1821 個鹼基，也決定 607 個胺基酸。將兩者的鹼基序列作比較，共有 34 個分散的鹼基不同，而再將它們所編碼的胺基酸做比較，則可發現有 10 個胺基酸不同 (附錄二、三)。對兩者的功能做查詢，發現都是推測對應到啤酒酵母菌的 RPH1 基因 (YER169W)，和 DNA 修補有關，且兩者也都是未經實驗證實的電腦資料庫推定結果。將相同的序列在 BRI、CandidaDB 等資料庫比對，結果相似，兩者應是同源基因。由於兩者差異不大，故依資料庫比對積分最高而 E 值最低的原則評估，選擇以 orf19.2730 做為研究對象。

SB021 的核酸序列在 orf19.2730 有 2 個對應區域。其中一個區域可在 orf19.2730 的第 99 至 503 個鹼基的範圍對應到的 415 個鹼基，有 92% 的 identity，3% 的 gaps。另一個區域可在 orf19.2730 的第 1 個鹼基起始的範圍對應到 148 個鹼基，有 80.8% 的 identity，其中有 9.8% 的 gaps (圖 1)。將此序列貼到 CandidaDB 資料庫 (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>)，分別選擇以 NCBI Blast V2 和 WU BLAST version 2.0 程式進行比對，結果積分最高的都是指向 IPF15357，即 orf19.2730。兩個資料庫比對的結果一致，故推定此序列屬於 orf19.2730 的一部份。

依 CGD 資料庫比對的結果，orf19.2730 在 Assembly 19，位於 Contig19-10158 上第 139713 個鹼基到第 137893 個鹼基之間，其對偶基因 orf19.10244 則位於 Contig19-20158 上，起始於第 132773 個鹼基，終止於第 130953 個鹼基，共有 1821 個鹼基，可決定 607 個胺基酸。依 Assembly21 定義，orf19.2730 位於 *Candida albicans* 的第 4 對染色體上，起始於第 553936

個鹼基而終止於第 555756 個鹼基(圖 2)。對 orf19.2730 及其上游序列的限制酶切割部位分析，發現其中沒有 *HindIII* 及 *BamHI* 的切位(圖 3)，而這兩個限制酶在質體 YEP363 和質體 pRS426 上都恰有一個切位，故在 5'端引子加上 *BamHI* 序列 (GGATCC)，而在 3'端引子加上 *HindIII* 序列 (AAGCTT) 作為切位。引子分別位於 orf19.2730 上 5'端的 -371 至 -353 個鹼基及 3'端+1821 至 +1796 個鹼基的位置。

## 4.2. 將 *Candida albicans* Genomic DNA 的 orf19.2730 及其上游序列轉殖到 YEP363 和 pRs426 質體

以 R158Hd30 和 F158Bm10 為引子在 *Candida albicans* 的 Genomic DNA 上以 PCR 方式切取長度為 2192 個鹼基的 orf19.2730 及其上游序列，經膠體電泳顯示，切取的片段大小介於 2000 個鹼基到 2500 個鹼基之間，大小符合預期 (圖 4)，暫以 Ta1 表示。將 Ta1 連結在大小為 3000 個鹼基的 T-vector 上增殖後，以限制酶 *HindIII* 和 *BamHI* 切下。另外以 *HindIII* 和 *BamHI* 切取有 8588 個鹼基的質體 YEP363 和有 5726 個鹼基的質體 pRS426。將切割後的 YEP363 和 Ta1 連結建構大小為 10764 個鹼基的質體，暫以 Ta2Y 表示。因為 YEP363 質體本身沒有 *XhoI* 的切位，而 Ta1 上則有 2 個切位，若以 *XhoI* 對 Ta2Y 進行切割，應可得到大小為 1096 個鹼基和 9668 個鹼基的兩個片段 (圖 5)。將切割後的 pRS426 和 Ta1 連結後建構大小為 7892 個鹼基的質體，暫以 Ta2R 表示。其中 pRS426 質體本身有一個 *XhoI* 的切位，而 Ta1 片段上有 2 個切位。若以 *XhoI* 對 Ta2R 切割，應可得到大小為 282、1096 和 6514 個鹼基的三個片段 (圖 6)。將質體分別轉殖至勝任細胞中培養，抽取質體後以 *XhoI* 限制酶切割，經膠體電泳驗證的結果如圖 6。依電泳結果顯示，Ta2Y 經限制酶 *XhoI* 切割後產生兩個片段，其中 y1 片段介於 8000 到 10000 個鹼基之間偏向 10000 鹼基，y2 片段介於 1000 到 1500 個鹼基之間偏向 1000 鹼基，和預期的 9668 個鹼基及 1096 個鹼基兩片段應屬符合。Ta2R 經限制酶 *XhoI* 切割後產生三個片段，r1 片段介於 6000 到 8000 個鹼基之間，r2 片段介於 1000 到 1500 個鹼基之間略偏向 1000 鹼基，r3 則介於 200 到 500 個鹼基之間，和預期中的 6514、1097 及 281 個鹼基的三片段亦屬相當，應可確定 Ta1 已分別接合到 YEP363 質

體及 pRS426 質體上，建構成 Ta2Y 和 Ta2R 質體（如圖 7）。

### 4.3. 將 Ta2Y 質體轉殖到啤酒酵母菌建構 10560-2B-Ta2y

培養啤酒酵母菌 10560-2B，製作勝任細胞，並將先前抽取之 Ta2Y 質體轉殖到勝任細胞中。因 Ta2Y 質體上含有 *LEU2* 基因，可表現  $\beta$ -isopropyl malate dehydrogenase，此酵素與 pyruvate 轉化為 leucine 的過程相關。啤酒酵母菌若經轉殖成功，則帶有 Ta2Y 質體，可以生長在不含 leucine 的培養基中，故以不含 leucine 的 SD/Uridine/Histidine 培養基篩選，在 30°C 恆溫培養 3 天後，挑出能夠生長的菌落，轉養到 SD/Uridine/ Histidine 培養液中，以 30°C，150 轉震盪培養 17 小時後抽取真菌質體，經酒精沉澱後，以未經限制酶切割的圓形 Ta2Y 質體當參考指標，與從轉殖後的啤酒酵母菌質體中抽出的抽取液作比較，不經限制酶處理進行膠體電泳。結果如圖 8，可看到選植株的抽取液有明顯的 band 出現在和 Ta2Y 質體相當的區域，而未經轉殖的啤酒酵母菌抽出液則沒有，應可初步確認 Ta2Y 已成功轉殖到啤酒酵母菌中，建構 10560-2B-Ta2Y。



### 4.4. Coomassie blue staining

將啤酒酵母菌及 10560-2B-Ta2Y 細胞打破，分別萃取上清液，經 SDS-PAGE 電泳後，進行 Coomassie blue staining 比對試驗。orf19.2730 大小為 1821 個鹼基，如果能夠表現，其所合成的蛋白質應有 607 個胺基酸，大小約為 67 kDa，預期應在 55~72 kDa 的區域內出現目標。經比對結果如圖 9，在 55~72 kDa 的目標區域內隱約觀察到 10560-2B-Ta2Y 上清液有 band 出現，而啤酒酵母菌的上清液則沒有，大致符合預期，但表現量較低，需進一步以 Western blotting 佐證。

### 4.5. 建構 Ta2HAS 質體

以 RYH20 和 FYH20 為引子，用 PCR 的方法自 Ta2Y 質體夾出去除 3'

端終止碼的 orf19.2730 片段，暫名為 orf19.2730 $\Delta$ stop。設計引子時已在其 5'端加入 *Bam*HI 切位，而 3'端則在去除終止碼之後的位置加入 *Hind*III 切位，在兩個限制酶的切位之間可夾出大小為 1818 個鹼基的片段。經膠體電泳顯示，PCR 放大的產物在 1500 個鹼基到 2000 個鹼基的區間內出現 band，位置略偏上方，和預期 1818 個鹼基大小的區域符合（圖 10）。將 orf19.2730 $\Delta$ stop 連結在 T-vector 上增殖後，將質體抽出，再以 *Bam*HI 和 *Hind*III 切割質體，可以得到大小為 1818 個鹼基和 3000 個鹼基的兩條片段。同時也對 YEP363 質體用 *Bam*HI 和 *Hind*III 切割，可得 8568 個鹼基和 20 個鹼基的二個片段。以膠體電泳檢視，結果如圖 11，其中 O3、O4 為對 orf19.2730 $\Delta$ stop 切割的結果，可見到在 3000 個鹼基及 2000 個鹼基的附近有明顯的 band。而 Y1、Y2 為 YEP363 質體切割後的結果，在 8000 到 10000 個鹼基的區域內出現 band，兩者都符合預期。

接著以 gel extraction 取出 1818 個鹼基的 orf19.2730 $\Delta$ stop 片段和 YEP363 切割後所得的 8568 個鹼基片段，兩端分別含有 *Bam*HI 和 *Hind*III 的接合位置，將兩者進行接合，經過轉殖選殖後，在 YEP363 質體的基礎上加入去除終止碼的 orf19.2730，建構大小為 10392 個鹼基的質體，暫以 Ta2Y $\Delta$ stop 命名。Ta2Y $\Delta$ stop 保留原本 YEP363 質體所具有的 *lacZ*、*LEU2*、*2 $\mu$*  及 *Apr* 基因，也具有 orf19.2730 上限制酶 *Xho*I 的兩個切位，分別在第 480 個鹼基和第 1576 個鹼基的位置（圖 12）。YEP363 質體本身沒有 *Xho*I 的切位，而轉殖後的質體則有 2 個 *Xho*I 的切位，若以 *Xho*I 對 Ta2Y $\Delta$ stop 切割，應可得 1097 個鹼基和 9295 個鹼基的兩個片段，經膠體電泳結果如圖 13。圖中 Ye 為 YEP363 質體，Yx 為 YEP363 經限制酶 *Xho*I 處理後的結果，兩者沒有顯著差異，可確認限制酶 *Xho*I 不會對 YEP363 質體發生作用，所以 YEP363 質體沒有被切割。而 Xo1 和 Xo2 為限制酶 *Xho*I 對 Ta2Y $\Delta$ stop 質體作用後的結果，可觀察到有兩條 band 出現，其中一條約在 1000 個鹼基附近，另外一條則在 10000 個鹼基附近，兩條 band 分佈的位置恰好和預期的 1097 個鹼基和 9295 個鹼基的預期位置相當，應可確認成功建構 Ta2Y $\Delta$ stop 質體。

自實驗室取得含有 pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體(大小為 6310 個鹼基)之菌種，以加入 25 $\mu$ l Kanamycin 的 5ml LB broth 震盪培養 18 小時後抽取質體，再以 RPB32 和 FPH30 為引子，用 PCR 的方式自 pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體擷取 HA3His6 及其下游 872 個鹼基的片段。起自第 5864 個鹼基，終

止於第 538 個鹼基，中間跨越第 6310 個鹼基，大小共 985 個鹼基。加上先前設計引子時在此片段的 5'端加入限制酶 *Hind*III 的切位，而在 3'端加上限制酶 *Bss*HII 的切位，建構成大小為 996 個鹼基的片段，暫名為 pHas。將此 PCR 的產物以膠體電泳檢視，結果如圖 14。在 1000 個鹼基附近的區域可看到明顯的 band 出現，驗證 PCR 的產物大小符合預期。再以相同的引子對 pHas 進行 PCR 增殖，以限制酶 *Hind*III 和 *Bss*HII 進行切割，經 gel extraction 純化。另外再以限制酶 *Hind*III 和 *Bss*HII 切割 Ta2Y $\Delta$ stop，同時也會把 *Hind*III 之後 *lacZ* 基因的部份片段切除。經膠體電泳後以 gel extraction 擷取大小約為 8890 個鹼基的片段，將這個片段和處理過的 pHas 片段進行接合作用，經過轉殖選殖後，建構帶有 HA3His6，大小為 9880 個鹼基的質體，暫名為 Ta2HAS (圖 15)。其中 HA3His6 正好接續在去除終止碼的 orf19.2730 序列之後，兩者間恰有 6 個鹼基的 *Hind*III 切位，如果 orf19.2730 能夠表現，則 HA3His6 也將能夠表現而轉譯出胺基酸。而原來存在於 YEP363 質體上的 *lacZ* 基因則遭到破壞而被去除。

Ta2HAS 質體上有三個 *Xho*I 的切位，比 Ta2Y $\Delta$ stop 多一個。經限制酶 *Xho*I 處理後，應可切出大小為 551、1097 及 8232 個鹼基的三個片段。由圖 16 可見 Ta2HAS 質體經限制酶 *Xho*I 切割後再經膠體電泳，果然在 500~750、1000~1500 及 8000~10000 個鹼基之間確有三條 band 出現，其片段數及大小都和預期的結果相符，應可確認 pHas 已成功和 Ta2Y $\Delta$ stop 接合，建構帶有 HA3His6 的 Ta2HAS 質體。

#### 4.6. 將 Ta2HAS 質體轉殖到啤酒酵母建構 10560-2B-Ta2HAS

將啤酒酵母菌種菌到 5ml YPD 培養液中，以 30°C 培養 17 小時後再轉養 5 小時，製作勝任細胞。將先前抽取之 Ta2HAS 質體轉殖到勝任細胞中，建構啤酒酵母菌 10560-2B-Ta2HAS。其中所含的 Ta2HAS 質體已將原來存在於 YEP363 質體上的 *lacZ* 基因破壞，但仍含有  $2\mu$  及 *LEU2* 基因，故仍可以生長在缺少 Leucine 的 SD/Uridine/Histidine 培養基中。以 SD/Uridine/Histidine 培養基於 30°C 培養 3 天後進行選殖，挑出能夠生長的菌落，種菌到 SD/Uridine/ Histidine 培養液中，再經 30°C，150 轉震盪培養 17 小時，抽取真菌質體並經酒精沉澱。觀察圖 17 的結果，圖中 TH 是未經切割的圓



形 Ta2HAS 質體。#6 和 #7 則是從 10560-2B-Ta2HAS 中抽出的真菌質體。經過膠體電泳後，可以在 5000 到 6000 個鹼基的範圍內觀察到都有 band 出現。但因為 Ta2HAS 是環狀質體，電泳時移動的速率會比相同大小的線形鹼基片段還快，所以未經切割則無法明確認定其大小的落點位置。再以抽取的 #6 和 #7 真菌質體當做板模，對包含 HA3His6 及其下游序列共 996 個鹼基的 pHas 片段進行 PCR 增殖。純化後得到 #6P 和 #7P。經膠體電泳可觀察到在接近 1000 個鹼基的位置有明顯的 band 出現，大小和 996 個鹼基的 pHas 片段相仿，初步推測 pHas 片段已被成功的增殖。而 pHas 片段原來並不存在於啤酒酵母菌中，至此應可確認帶有 pHas 的 Ta2HAS 質體已被轉殖到啤酒酵母菌 10560-2B 中而成功建構了 10560-2B-Ta2HAS。

#### 4.7. Western blotting

培養啤酒酵母菌及 10560-2B-Ta2HAS 細胞，將細胞打破後萃取上清液進行 Coomassie blue staining 比對試驗及 Western blotting。因為 orf19.2730 $\Delta$ stop 本身大小為 1818 個鹼基，加上限制酶 *Hind*III 的 6 個鹼基及 HA3His6 的 114 個鹼基，共計 1938 個鹼基，可轉譯成有 646 個胺基酸。預估合成蛋白質大小約為 71 kDa ( $646 \times 0.11$  Kda)，經 SDS-PAGE 電泳後，預期應出現在 55~72 kDa 區域內出現 band。經進行 Coomassie blue stain 比對試驗後，仍未觀察到明顯的 band 出現。繼續將上清液以 anti His 抗體進行 Western blot，結果如圖 18。將 Western blotting 的結果和 Coomassie blue staining 的結果做對照，可見到 10560-2B-Ta2HAS 上清液約在 72 kDa 附近有明顯的 band 出現，但是啤酒酵母菌萃取上清液並未在相對的區域出現 band，表示這條 band 呈現之處有胺基酸 His 存在，所以可以和抗體結合而被顯影，而啤酒酵母菌上並沒有這個表現 His 的序列。此外，Band 出現的位置和原先推估約 71 kDa 的位置大致相符，應可確認這個區域出現的 His 序列是帶有 HA3His6 的 Ta2HAS 質體所表現。至此應可確認 orf19.2730 可以啟動胺基酸的合成，是一個能產生蛋白質的 ORF。

#### 4.8. 建構帶有 URA3 序列的 YEP363URA3 和 YEP363TA1URA3 質體

以 FPUR3 及 RPUR3 為引子，用 PCR 方式擷取 pRS426 質體上的 URA3 及其上游自第 5662 到第 1220 個鹼基（487 個鹼基）的片段共 1285 個鹼基的序列。其中 URA3 上游 487 個鹼基的片段是為了保留其中的限制酶切位備用，並未帶有任何 ORF。另於設計引子時在 5' 端都加入 *Bam*HI 的鑑識序列，形成兩端都有 *Bam*HI 切位，大小為 1297 個鹼基的片段，暫名為 proURA3(圖 19)。proURA3 片段經 PCR 放大並 clean up 後，先以 *Bam*HI 同時切割 5' 和 3' 端。另外也對 YEP363 和 Ta2Y 質體以 *Bam*HI 進行切割。在切割後隨即去除其 5' 端磷酸根(Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) 避免切割後的 YEP363 或 Ta2Y 在接合時發生自體連接。再與先前經 *Bam*HI 切割後的 proURA3 片段進行接合，建構 YEP363URA3 和 YEP363TA1URA3 質體。依圖 20 的分析，YEP363URA3 質體應有 9879 個鹼基，經 *Bam*HI 切割後應可得到 8588 及 1291 個鹼基的兩條片段。而 YEP363TA1URA3 質體應有 12055 個鹼基，經 *Bam*HI 切割後應可得到大小為 10764 及 1291 個鹼基的兩條片段。

將建構的質體轉殖到 *E. coli* 勝任細胞上，用加入 Ampicillin 的 LB 培養盤於 37°C 培養 18 小時。挑出數個菌落在 LB broth 培養 18 小時後抽取質體。經膠體電泳後，分別挑出比 YEP363（8588 個鹼基）及 Ta2Y（10764 個鹼基）大的質體，再以限制酶 *Bam*HI 來確認大小。電泳結果如圖 21，圖中 Ta1 是經 *Bam*HI 切割後形成線狀結構，大小為 10764 個鹼基的 Ta2Y 質體，可作為參考座標。Tu 為經 *Bam*HI 切割的 YEP363TA1URA3 質體，分別在 10764 附近及 1000 到 1500 個鹼基之間出現兩條片段。Yu 是 YEP363URA3 質體經 *Bam*HI 切割，也分別在 8000 到 10000 及及 1000 到 1500 個鹼基之間出現兩條片段。這些片段都出現在符合預期的範圍，應可確認質體中都已成功的加入了 proURA3，完成質體 YEP363URA3 和 YEP363TA1URA3 的建構。

#### 4.9. 建構酵母菌 SLO69Tu 和 SLO69Yu

將建構完成的 YEP363URA3 和 YEP363TA1URA3 質體轉殖到酵母菌 SLO69，因建構的質體中已有 URA3 基因，所以用只加入 Histidine 的 SD 培養液做篩選培養。抽取質體後，分別以 FB371 和 RH200 及 FPUR3 及

RPUR3 為引子做 PCR 放大來確認。其中 FB371 和 RH200 可夾取出的 TA1 上游大小為 371 個鹼基的片段，這片段是原來酵母菌 SLO69 所沒有的，用以確認 Ta2Y 質體是否已加到 SLO69 中而完成 SLO69Tu 的建構。而 FPUR3 及 RPUR3 則可夾取大小為 1291 個鹼基的 proURA3 片段，用來確認真菌質體的 URA3 是否和來自 pRS426 的 URA3 基因相符，完成 SLO69Yu 的建構。經膠體電泳的結果如圖 22。

在圖 22A 中，S 是 SLO69 的質體抽取液，以 FB371 和 RH200 為引子做 PCR，結果為 pT。用 FPUR3 及 RPUR3 為引子做 PCR 放大，結果為 pU；兩者都沒有產物生成，表示 SLO69 的質體抽取液既沒有和 Ta1 的 promoter 相符的序列，也沒有和 proURA3 相符的序列。在圖 22B 中，T 為 YEP363TA1URA 轉殖到酵母菌 SLO69 的質體抽取液，應帶有 Ta1 及其上游片段的鹼基序列，這段序列是 SLO69 所沒有的。經 FB371 和 RH200 為引子做 PCR 放大後，電泳結果如圖中 Tpt 所表現，可在 250 個鹼基到 500 個鹼基之間觀察到被放大的 band，和預期為 371 個鹼基的 TA1 上游 promoter 片段出現的區域相符合，應可確認 Ta2Y 已隨著 YEP363TA1URA 質體轉殖到 SLO69 而完成 SLO69Tu 的建構。圖中的 Y 則為 YEP363URA3 轉殖至 SLO69 之質體抽取液。Ypu 是以 FPUR3、RPUR3 為引子對 proURA3 片段做 PCR 檢驗，結果可觀察到在 1000 到 1500 個鹼基之間出現 band，出現的區域和預期 1291 個鹼基的 proURA3 片段相符合，應可確認其中所含有的來自 pRS426 的 URA3 基因，完成 SLO69Yu 的建構。

#### 4.10. 侵犯力分析

將 SLO69Tu 和 SLO69Yu 接種於 solid Spider 培養基，在 37°C 培養 7 天。若菌株有菌絲生成，則會侵入培養基內，經水流沖洗後，不會被洗去。以啤酒酵母菌 10560-2B 做對照。依圖 23 的結果顯示，SLO69Tu 和 SLO69Yu 經水流沖洗後都不會被洗去，兩者都有侵入培養基的能力，而且在程度上並無顯著的差異。SLO69Tu 和 SLO69Yu 的差別在於 SLO69Tu 上帶有 Ta1 序列，可以確認 Ta1 序列上 orf19.2730 的表現對啤酒酵母菌假菌絲的表現，關係並不顯著。

#### 4.11. 以 Yeast $\beta$ -galactosidase filter assay 對 orf19.2730 的 promoter 檢驗

分別用 RH200、FB371 當引子，以 PCR 方法在 TA1 切取 orf19.2730 上游的 371 個鹼基的片段(pro371)，另外以 RH200、FB315 及 RH200、FB257 為引子，切取 orf19.2730 上游的 315 個鹼基(pro315)及上游的 257 個鹼基(pro257)的片段，經限制酶 *HindIII* 和 *BamHI* 切割後，分別轉殖到 YEP363 質體上，建構帶有 pro371 的 YpL7，大小為 8949 個鹼基、帶有 pro315 的 YpL5，大小為 8893 個鹼基及帶有 pro257 的 YpL2，大小為 8835 個鹼基的三種質體，三者都保留 orf19.2730 上游-1 到-200 個鹼基可能存在有 promoter 的序列(圖 24)。其中 pro371、pro315、pro257 的 3'端都已加入 ATG 三個鹼基做為起始碼，其後方正好接在 YEP363 質體的 *lacZ* 前，因此可啟動 *lacZ* 基因，藉由 *lacZ* 的表現來做  $\beta$ -galactosidase assay。

將此三種質體分別轉殖到啤酒酵母菌上，建構 SCYpL7、SCYpL5 及 SCYpL2，繼而進行 Yeast  $\beta$ -galactosidase filter assay，結果如圖 25，在實驗開始 30 分鐘之後，SCYpL2 最早可以觀察到藍色隱約開始出現，而在 60 分鐘之後呈色逐漸明顯。其後變化不顯著，直到 12 小時後的呈色結果，可看出 SCYpL2 呈色較快且顏色明顯，SCYpL7 居次而 SCYpL5 呈色最慢。在圖 25A 中所示的 SCY 和 SCT 則是作為對照組。其中 SCY 是將 YEP363 質體轉殖到啤酒酵母菌 10560-2B 中，SCT 則是 10560-2B-Ta2Y，兩者都含有 *lacZ* 基因，但是在基因的 5'端都沒有起始碼而不會表現，所以在 Yeast  $\beta$ -galactosidase filter assay 都不會呈色。

## 五、討論

Braun 等人 (2005) 綜合 Standford、CandidaDB、CGD 等主要的白色念珠菌基因資料庫，比對總數 11615 個推定的 ORF 片段，排除重複及錯誤的部份，確認出 6354 個基因片段，其中包括功能不明或未確定的部分基因。本研究以其中的 orf19.2730 為標的，以 PCR 的方式自野生株白色念珠菌 (SC5314) 的 Genomic DNA 擷取此 ORF 片段及其上游的 promoter 共 2192 個鹼基對，插入 YEP363 質體，建構 YEP363-TA1 質體，再轉殖到啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)，藉著西方轉漬分析偵測其蛋白質表現來推測此 ORF 的功能性。結果確認此 orf19.2730 是能表現蛋白的片段。

### 5.1. orf19.2730 資料庫分析之探討

依 CGD 資料庫的紀錄，orf19.2730 原始的 CGDID 是 CAL0004209，是電腦依序列編碼而推定的基因 (Coding Sequence, CDS)，起始於 ATG 三個鹼基而終止於終止碼 TAA，共 1821 個鹼基，決定 607 個胺基酸，文獻上則尚未有相對應的 mRNA 被報告。其在 Assemblies 19、20 和 21 的推定都相同，是屬於 open reading frame (ORF)。對偶基因為 orf19.10244。其他的命名還有 IPF24597.1、IPF20076.1、Contig4-2458\_0008 (Berman J, 2005)、Contig4-2458\_0009 (Berman J, 2005)、orf6.2522 (CGD, 2005)、orf6.4699 (CGD, 2005)、orf6.885 (CGD, 2005)，在 CandidaDB 則命名為 CA1163，而在 NCBI 資料庫則命名為 CAO19.2730。

依 Assembly 21 的定義，基因位於第 4 對染色體上第 553936 到 555756 個鹼基之間 (Ca21chr4: 553936 to 555756)。依 Assembly 20 的定義，基因則位於第 4 對染色體上第 554158 到 555978 之間 (Ca20chr4: 554158 to 555978) 的 1821 個鹼基。而依 Assembly 19 的定義，基因則位於 Contig19-10158:139713 to 137893，其對偶基因 orf19.10244 則位於 Contig19-20158:132773 to 130953。雖然三個協定的基因位置不同，但推定的基因序列都沒有改變，功能可能和基因修補相關。依 BRI 資料庫的說明，推定 orf19.2730 和 DNA 受到環境中紫外線、輻射、化學誘變、真菌和細菌的毒素及自由基或烴化物等化學或物理因子的損害後進行修補的過程有

關。依 CandidaDB 資料庫的資訊，orf19.2730 所編碼的胺基酸分子量為 70317.305da，而基因命名則尚未建立。

由 MIT 的 BROAD 資料庫可知 orf19.2730 的產物假設為類似 RPH1 的蛋白質 (hypothetical protein similar to RPH1)，有 607 個胺基酸，其中在第 209 到 325 個胺基酸的區域為 jmjC domain，而在 23 到 70 個胺基酸的區域則有 jmjN domain。Jumonji 蛋白是涉及包括 DNA 修補等許多生長發育過程的轉錄因子 (Tronnarsjö *et al.*, 2006)。在類似 Jumonji 的蛋白靠近 N 端的部份有一段高度保守的區域，稱為 jmjN domain，而相對靠近 C 端的區域則有一段較長的胺基酸序列，稱為 JmjC domain。其中 JmjC domain 可能是和催化 Histone 修飾有關的蛋白質水解酶 (Balciunas & Ronne, 2000)，屬於 Cupin superfamily，經常和同屬於 Cupin superfamily 的 jmjN domain 共同作用 (Ayoub *et al.*, 2003)。

依據蛋白質資料庫 UniProt 的紀錄，orf19.2730 的蛋白質可能和 jumonji 類似，是 PHR1 的轉錄抑制者 (transcriptional repressor)，並命名為 RPH2。CGD 的注解則認為此蛋白質可能為 PHR1 的 zinc finger regulator。在 NCBI 資料庫則明確記載為來自白色念珠菌 SC5314 菌株，是類似 jumonji 的 PHR1 之轉錄抑制者，名為 RPH2，但註記為暫時狀態。

對應到啤酒酵母菌的 SGD 資料庫，相關性最高的對象為 RPH1，其系統命名為 YER169W。依 SGD 資料庫的說明，功能和 DNA 修補、Histone 去甲基及 RNA polymerase II promoter 轉錄的抑制者有關。但是將已知序列 SB021 在 SGD 資料庫做比對，結果卻是沒有相符的基因序列。綜合上述資料庫的查探，有關 orf19.2730 的論述仍停留在電腦分析的假定推論，orf19.2730 是否真的能夠表現及其功能性的探討則尚未有文獻記載。本實驗將 orf19.2730 轉殖到啤酒酵母菌上，經由西方墨點法觀察蛋白質之表現，初步確認其是一個可以表現的 ORF。而純化 orf19.2730 在白色念珠菌上表現的蛋白質做進一步探討，則可為計劃之下一期目標。

## 5.2. 以啤酒酵母菌觀察 orf19.2730 表現

白色念珠菌是以二倍體存在於自然界，其有性生殖世代的研究仍不清楚，又缺少能穩定存在細胞內或能自行大量複製的載體，且轉殖效率極低，

這些限制都增加分子生物操作上的困難。然而目前對啤酒酵母菌的研究則已相當成熟。本實驗以啤酒酵母菌替代白色念珠菌作為觀察 orf19.2730 表現的平台。啤酒酵母菌是目前在生物技術學上普遍使用的模式生物之一，常被運用在基因遺傳、細胞生理、細胞分化等學術研究。在基因工程領域中，選殖後的基因常殖入啤酒酵母菌中，以進行選殖基因產物的生產，是當前生物技術發展不可或缺的生產工具（李清福, 2007）。目前已有許多白色念珠菌的基因在啤酒酵母菌表現成功的例子，諸如與營養代謝合成、胜肽運輸、核酸代謝、細胞循環或訊息傳導等相關的基因（Pla et al., 1996）。和抗藥性相關的基因如 CDR1（Prasad et al., 1995）、CDR2（Sanglard et al., 1997）、MDR1（Fling et al., 1991）等都曾在啤酒酵母菌被選殖出來。

啤酒酵母菌有明顯的單倍體世代和雙倍體世代進行世代交替，其單倍體世代讓基因操作變的單純。篩選白色念珠菌的基因可以選擇利用啤酒酵母菌配合功能互補（complementary）的策略而方便進行，反之要在白色念珠菌上篩選啤酒酵母菌基因卻不一定可行（Kurtz et al., 1990）。目前許多運用在啤酒酵母菌的分生技術及工具都很成熟。啤酒酵母菌也有載體的存在，如 2 $\mu$ m 質體便是由真核細胞發現的質體。本實驗採用的 YEP363 質體即是源自 2 $\mu$ m 質體衍生的酵母菌附加型質體（yeast episomal plasmids, YEPs），其中保留 2 $\mu$ m 的複製起始點，故可直接以載體形式進行複製。此外還帶有可在啤酒酵母菌中作為篩選標記的 *LEU2* 基因及  $\beta$ -galactosidase reporter gene，所以可同時在啤酒酵母菌和 *E. coli* 中生長複製和進行篩選，是一種往返載體（shuttle vector）。利用此往返載體的特性，先在 *E. coli* 中純化重組的 DNA，當確定構築完成後，再將構築的質體轉殖到啤酒酵母菌進行篩選和觀察。

### 5.3. 西方墨點法檢驗 orf19.2730 之表現

將白色念珠菌 Genomic DNA 中的 orf19.2730 及其上游序列轉殖到 YEP363 建構 Ta2Y 質體，並轉殖到啤酒酵母菌建構 10560-2B-Ta2y 後進行 Coomassie blue staining，結果 0560-2B-Ta2y 和啤酒酵母菌之間沒有明顯的差異，無法明顯觀察到 orf19.2730 的表現（圖 9）。Coomassie blue staining 對蛋白質染色的敏感性不高，典型的 Coomassie blue staining 偵測蛋白質的

最低濃度須達 8-10 ng，若蛋白的產量低於此限度則不易被觀察到 (Patton, 2002)。

導致蛋白質產量不高使 Coomassie blue staining 呈現結果不明顯有幾種可能的原因。YEP 質體是帶有篩選標記的附加型質體(yeast episomal plasmid)，若附加型質體的篩選標記和染色體 DNA 上突變的基因相似，則可能會在進行複製時發生插入染色體的情形，而使整個質體嵌接入啤酒酵母菌的染色體中，降低了質體所攜帶外源基因在啤酒酵母菌中的拷貝數(鄭石通譯，2004；張平武、李育陽，1999)。也可能是此蛋白質本身有特別性，導致在啤酒酵母中產量不高而不易觀察。密碼偏好 (codon bias) 在酵母菌中是常見的現象 (葉開溫譯，2004)，轉譯密碼的使用在酵母菌及白色念珠菌中不一致可能導致表現量偏低。此外，啤酒酵母菌也可能無法正確使用白色念珠菌的 promoter，因而導致效率不佳。基於以上幾種可能的原因使 Coomassie blue staining 表現不夠明顯，所以改採西方墨點法 (western blotting) 檢驗。

將先前建構好的 Ta2Y 質體去除 3'端終止碼，再接上由實驗室建構的 pETΔ5T-D24B-HAHis 質體所擷取 HA3His6 及其下游片段，建構帶有 HA3His6 的 Ta2HAS 質體，轉殖到啤酒酵母菌，建構 10560-2B-Ta2HAS。如果 orf19.2730 是能夠表現的序列，則在合成蛋白質的同時將會有 His 生成而被 anti His 抗體偵測。結果在進行西方墨點法偵測後，確實觀察到明顯的 band 出現 (圖 18A)，表示這條 band 呈現之處有可以和抗體結合而的胺基酸 His 存在，而野生株啤酒酵母菌本身並沒有這個序列被表現，所以沒有 band 呈現。再將此顯影片和同時進行的 Coomassie blue staining 比對 (圖 18B)，發現 band 約在 72 kDa 附近出現 (圖 18C)，和 CandidaDB 資料庫所示 orf19.2730 編碼的胺基酸分子量為 70317.305 da 相近，應可確認這個區域出現的 His 序列是由帶有 HA3His6 的 Ta2HAS 質體所表現，而不是野生株啤酒酵母菌原來就會表現的基因片段。至此應可確認 orf19.2730 可以啟動胺基酸的合成而表現蛋白質。

#### 5.4. 建構 SLO69TU 及 SLO69YU

初步確認 orf19.2730 是有功能性的片段之後，本實驗再建構 SLO69Tu



和 SLO69Yu 進行活性分析。因為 SLO69 的 genomic DNA 本身有 CDR1 和 *lacZ* 基因，所以培養 SLO69 所需的選擇性培養基為 SD 中加入 Histidine 及 Uridine，正好和 YEP363 及 YEP363TA1 相同。因此擷取 pRS426 質體上的 URA3 及其上游序列的 proURA3 片段，建構帶有合成 Uridine 基因的 YEP363URA3 和 YEP363TA1URA3，再轉殖到 SLO69，以 SD 加 Histidine 篩選培養，建構 SLO69Yu 及 SLO69Tu。

在做 SLO69Yu 及 SLO69Tu 的確認時，所抽取的真菌質體品質不良，無法明顯觀察到轉殖的質體，因而改採 PCR 方式佐證。以可以夾出 orf19.2730 上游 promoter 的 FB371 和 RH200 為引子對 SLO69 抽出液做 PCR，結果沒有明顯的產物生成，表示轉殖前的 SLO69 沒有和 orf19.2730 的 promoter 相同的序列。另外以可以夾出 proURA3 序列的 FPUR3 及 RPUR3 為引子對 SLO69 抽出液做 PCR，結果也沒有明顯的產物生成，表示在轉殖前的 SLO69 也沒有和 proURA3 相似的序列存在。再以 FB371 和 RH200 為引子對 SLO69Tu 抽出液做 PCR，結果可以觀察到 250 到 500 個鹼基之間出現 band。另外以 FPUR3、RPUR3 為引子對 SLO69Yu 抽出液做 PCR 檢驗，結果可觀察到在 1000 到 1500 個鹼基之間出現 band。這些是先前 SLO69 經 PCR 的結果所沒有的，至此應可確認 SLO69Yu 及 SLO69Tu 建構完成。

## 5.5. orf19.2730 上游 promoter 的探討

本實驗在 TA1 中將 orf19.2730 上游可能包含 promoter 的 371 個鹼基區域約略分成三個區段，以 PCR 方法分別切取上游 371、315 及 257 個鹼基的片段，並在其 3'端都加入 ATG 序列作為起始碼，使緊接其後的 *lacZ* 基因可以被啟動表現。再將此三個片段分別轉殖到 YEP363 質體上，建構在 *lacZ* 基因上游帶有 371 個鹼基的 YpL7、帶有 315 個鹼基的 YpL5，及帶有 257 個鹼基的 YpL2 三種質體。分別轉殖到啤酒酵母菌上，建構 SCYpL7、SCYpL5 及 SCYpL2，繼而進行 Yeast  $\beta$ -galactosidase filter assay。

本實驗採用 x-gal/Z-buffer 為緩衝溶液，其中的 X-gal 可被分解為 galactose 和一種靛青染劑的前驅物，空氣中的氧會將此前驅物轉換成一種不能溶解的藍色染劑而沉澱在 *lacZ* 基因位置，使外觀呈現藍色。結果可觀

察到 SCYpL2 呈色較快且顏色明顯，SCYpL7 居次而 SCYpL5 呈色最慢。無論是 YEP363 質體或是 Ta2Y 質體轉殖到啤酒酵母菌之後，在 Yeast  $\beta$ -galactosidase filter assay 中都不會呈色，表示 SCYpL7、SCYpL5 及 SCYpL2 三者的呈色是由 YpL7、YpL5 及 YpL2 質體上完整的 *lacZ* 所表現，而呈色的快慢則受 *lacZ* 基因上游的序列所調控。

由結果初步推測 orf19.2730 上游 257 個鹼基的區間內可能有 promoter 的存在，會促使 *lacZ* 基因表現而呈色。而上游-257 個鹼基到-315 個鹼基的中段區域，則可能有抑制基因表現的序列存在，此序列的表現可能抑制其下游 promoter 的表現，而使 SCYpL5 呈色的速率減慢。觀察結果的 SCYpL7 呈色的速率比 SCYpL5 快，則可能是因為上游-371 到-315 個鹼基的序列中，含有調控中段-257 到-315 個鹼基抑制基因表現序列的序列存在，使中段區域的抑制功能受限，也可能是在分段擷取上游序列的取樣時，造成特定序列被切斷而影響基因調控的表現。

利用 RSA-tools 網頁(<http://rsat.ccb.sickkids.ca/>)的調節序列分析工具 (Thomas-Chollier *et al.*, 2008)對 orf19.2730 進行上游調節序列的 dna-pattern 分析，結果推算在上游 371 個鹼基的序列中有四個可能和基因調節有關的序列，分別位於-369 到-359、-237 到-227、-39 到-29 及-51 到-33 的位置(附錄 7)。其中三個序列位於上游-1 至-257 個序列的範圍(-237~ -227、-39~ -29、-51~ -33)，僅有這段序列的 YpL2 恰巧呈色最快。一個序列在呈色速率居次的 YpL7 所包含的上游-371 到-315 個鹼基的範圍之內(-369~ -359)，而中段-257 到-315 個鹼基的範圍內則沒有可能和基因調節有關的序列被推算出來。依電腦分析的結果和本實驗觀察呈色快慢的結果相對照，推測上游中段-257 到-315 個鹼基的範圍內可能存在有某種未知的負向調控之調控子。有關 orf19.2730 上游調節序列的作用機制值得進一步的探討。

## 5.6. 侵犯力分析之探討

單細胞的啤酒酵母菌沒有菌絲，但是二倍體啤酒酵母菌在缺氮的情況下會由單細胞型態轉變成有假菌絲 (pseudohyphal) 的型態(Gimeno *et al.*, 1992)，可以侵入培養基。將 SLO69Tu 和 SLO69Yu 接種於 solid Spider 培養基，在 37°C 進行培養。Solid Spider 培養基提供的營養源十分充足，其

中含有特定的因子如  $K_2HPO_4$  會改變 pH 值而誘導假菌絲的生成。依圖 23 的結果顯示，SLO69Tu 和 SLO69Yu 經水流沖洗前後差異不大，表示兩者都有生成假菌絲而侵入培養基的能力，而且在程度上並無顯著的差異。表示 SLO69Tu 上帶有的 Ta1 序列並未在水流沖洗前後表現出和 SLO69Yu 有明顯的差異，所以認為 orf19.2730 的表現無關啤酒酵母菌假菌絲的生成。

## 5.7. 結語與未來展望

本研究以目前只經電腦資料庫推定而未有實驗確認的 orf19.2730 為標的，以啤酒酵母菌為表現平台，藉著偵測其蛋白質表現來推測此 ORF 的功能性。經 Coomassie blue staining 檢測未觀察到明顯的表現。另由實驗室已構築的 pETΔ5T 系列質體擷取 HA3His6 片段做為標籤，連接在去除 3' 端 stop codon 的 orf19.2730 下游，再以西方轉漬分析偵測，發現其確實能夠表現。將 orf19.2730 上游 371 個鹼基的序列保留 200 個鹼基後約略分成三個片段，進行 Yeast filter  $\beta$ -galactosidase assay 觀察，發現在上游中段 257 到 315 個鹼基的區域內可能有某種序列存在會抑制其 promoter 的表現。至於侵犯力分析則未觀察到假菌絲的生成有明顯的影響。唯本實驗僅止於以啤酒酵母菌為平台之觀察，至於 orf19.2730 在白色念珠菌的表現則尚需進一步研究，例如可利用 gene targeting 的方法 (Nakayama *et al.* 2000; Wilson, Davis, and Mitchell 1999) 進行單套基因破壞 (gene disruption) 來進行突變研究；利用同源重組之方式將 TR system 置換其 promoter 區域進行基因功能之研究 (陳杏芳, 2004) 等。而資料庫推定的 DNA 修補、Histone 去甲基及 RNA polymerase II promoter 轉錄的抑制者等功能，都是有待進一步研究的方向。

## 六、參考文獻

- Gene VII 中文版** (南開大學譯) (2004)。2008年6月14日，取自：  
<http://www.bioon.com/book/biology/gene7/>第14章.pdf。(原著出版年：2000)
- 王佳文 (2006)。基因密碼與蛋白質合成。**基層醫學**，第二十一卷，第三期，52-57。
- 李清福 (2007)。生物技術的尖兵---酵母菌簡介。**數位台灣真菌知識館**。2008年3月12日，取自：  
[http://digiku.nmns.edu.tw/fungi\\_web/FungiUnit/2007-012.html](http://digiku.nmns.edu.tw/fungi_web/FungiUnit/2007-012.html)
- 沈志陽 (2006)。DNA 雙股螺旋斷裂修復的調控機制。**中央研究院學術諮詢總會通訊**，第十五卷，第一期，67-69。
- 郭大榮 (2002)。**白色念珠菌之 EFG1 和/或 CPH1 下游基因的分類與確認**。國立交通大學生物科技研究所碩士論文，未出版，新竹市。
- 真菌王國 (無日期)。**普通生物學**。新世紀生命科學課程改進計劃。2008年4月21日，取自：<http://www.dls.ym.edu.tw/lesson/fun.htm>
- 基因工程與生物技術概論-基因選殖及 DNA 分析** (何國傑、葉開溫、鄭石通、靳宗洛譯) (2004)。台北市：藝軒。(原著出版年：2001)
- 郭曉奎 (2007)。**病原生物學**。北京市：科學出版社。
- 張平武、李育陽 (1999)。新型酵母表達系統的研究。**生物技術通訊**，第10卷，第4期。2008年7月18日，取自：  
<http://www.wanfangdata.com.cn/qikan/periodical.articles/swjstx/swjs99/swjs9904/990417.htm>
- 陳杏芳 (2004)。**以同源重組技術對白色念珠菌的醣解酵素基因 TPI1 及 ENO1 置入可調控之 TR 啟動子作突變分析**。國立交通大學生物科技研究所碩士論文，未出版，新竹市。
- 陳宜君 (2002)。**念珠菌院內感染的臨床、分子流行病學研究**。國立台灣大學臨床醫學研究所博士論文，未出版，台北市。
- 陳豪勇、李麗俐、江蕙蘭、楊志元 (2000)。**MIMS 醫用微生物學**。台北市：藝軒。
- 黃憲達 (2005)。**分子生物學**。台聯大生命科學課程改進計畫。2008年6月24日，取自：<http://life.nctu.edu.tw/~mb/image/chapter3.pdf>
- Akins, R. A. (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 43(4):285-318.
- Ayoub, N., Noma, K., Isaac, S., Kahan, T., Grewal, S.I., & Cohen, A. (2003). A novel jmjC domain protein modulates heterochromatization in fission yeast. *Mol Cell Biol*, 23, 4356-4370.

- Balciunas, D., & Ronne, H. (2000). Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors. *Trends Biochem Sci.* 25, 274-276.
- Bao, S., Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Fang, Y., Richardson, D. A., Ali, A., Chen, S. M., Abraham R. T., & Wang, X. F. (2001). ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature*, 411, 969-974.
- Barelle, C. J., Bohula, E. A., Kron, S. J., Wessels, D., Soll, D. R., Schafer, A., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. (2003). Asynchronous cell cycle and asymmetric vasuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell.* 2, 398-410.
- Braun, B. R., *et al.* (2005). A Human-Curated Annotation of the *Candida albicans* Genome. *PLoS Genet.* 1(1): 36-57.
- Brown, A. J. P. (2002). Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*. In *Candida and candidiasis*. Calderone, R.A. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 95–106.
- Calabrese, D., Bille, J., and Sanglard, D. (2000). A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans*(*FLUI*) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* 146, 2743-2754.
- Chen, Y. C., Chang, S. C., Sun, C. C., Yang, L. S., Hsieh, W. C., Luh, K. T. (1997). Seculartrends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 18, 369-375.
- Chen, C. G., Yang, Y. L., Shih, H. I., Su, C. L. & Lo, H. J. (2004). CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating CDR1. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 4505–4512.
- Chibana, H., Oka, N., Nakayama, H., Aoyama, T., Magee, B. B., Magee, P. T., & Mikami, Y. (2005). Sequence finishing and gene mapping for *Candida albicans* chromosome 7 and syntenic analysis against the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genetics*, 170(4): 1525-1537.
- Ciudad, T., Andaluz, E., Steinberg-Neifach, O., Lue, N. F., Gow, N. A., Calderone, R. A., & Larriba, G. (2004). Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol Microbiol*, 53(4): 1177-1194.
- David-Cordonnier, M-H., Cunniffe, S.M.T., Hickson, I.D., & O'Neill, P. (2002). Efficiency of incision of an AP site within clustered DNA damage by the major human AP endonuclease. *Biochemistry*, 41 (2), 634 -642.
- DeVasahayama, G., Chaturvedi, V., Steven, D. & Hanesa, S. D. (2002). The Ess1 Prolyl Isomerase Is Required for Growth and Morphogenetic Switching in *Candida albicans*. *Genetics*, Vol. 160, 37-48.

- DNA repair. (2008, June 22). In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 21:17, June 22, 2008, from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=DNA\\_repair&oldid=220919127](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=DNA_repair&oldid=220919127)
- Dupont, B. (2001). Choice and use of antifungal drugs. *Rev Prat*, 51, 752-757.
- Ernst, J. F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans* -environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146 (8): 1763-1774.
- Federico, N. G., Rebeca, A. M., Hortensia, R., Jesus, P., Rafael, S., & Cesar, N. (1998) A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell construction and morphological transition in *Candida albicans*. *Microbiology*. 144, 411-424.
- Fling, M. E, Kopf, J., Tamarkin, A., Gorman, J. A, Smith, H. A., & Koltin, Y. (1991). Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol Gen Genet*. 227(2): 318-329.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y., 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* mutation. *MOL Gen Genet*. 198, 179-182.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., & Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68, 1077-1090.
- Harju, S., Fedosyuk, H. & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*, 4:8. Retrived August 3, 2005 from the World Wide Web: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/4/8>
- Harrington, J. M. & Kolodner, R. D. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Msh2-Msh3 Acts in Repair of Base-Base Mismatches. *Mol. Cell Biol*, 27(18): 6546–6554.
- 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., & Luh, K. T. (2002). Antimicrobial drug resistance in pathogen causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. *Emerg Infect Dis*, 8 (1): 63-68.
- Jang, Y. K., Wang, L., & Sancar, G. B., (1999). RPH1 and GIS1 Are Damage-Responsive Repressors of PHR1. *Molecular And Cellular Biology*, 19(11), 7630-7638.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., & Kalman, S, et al. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 7329–7334.

- Kim, E. M., Jang, Y. K., & Park, S. D. (2002). Phosphorylation of Rph1, a damage-responsive repressor of PHR1 in *Saccharomyces cerevisiae*, is dependent upon Rad53 kinase. *Nucleic Acids Research*, Vol. 30,(3): 643–648.
- Kurtz, M. B., Kelly, R., & Kirsch, D. R. (1990). *Molecular biology of Candida albicans*. In: Kirsch, D. R., Kelly, R., & Kurtz, M. B., editors. *The genetics of Candida albicans*. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc. pp. 21-74.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007), ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
- Legrand, M., Chan, C. L., Jauert, P. A., & Kirkpatrick, D. T. (2007). Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 6(12): 2194-2205.
- Leng, P., Sudbery, P. E. & Brown, A. J. P. (2000). Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 35, 1264–1275.
- Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18, 85–98.
- Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* Mutants Are Avirulent. *Cell*, Vol. 90, 939-949.
- Lornenz, M. C. & Fink, G. R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 412, 83- 86.
- Maor-Shoshani, A., Reuven, N. B., Tomer, G., & Livneh, Z. (2000). Highly mutagenic replication by DNA polymerase V (UmuC) provides a mechanistic basis for SOS untargeted mutagenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 97, 565-570.
- Marsischky, F. T., Lee, S., Griffith, J. & Kolodner, R. D., (1999). *Saccharomyces cerevisiae* MSH2/6 Complex Interacts with Holliday Junctions and Facilitates Their Cleavage by Phage Resolution Enzymes. *J. Biol. Chem*, 274(11):7200-7206.
- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M., & Aoki, Y. (2000). Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun*, 68, 6712-6719.
- Odds, F. C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *Am Acad Dermatol*, 31: S2-S5.
- Patton, W. F. (2002). Detection technologies in proteome analysis. *Journal of*

*Chromatography B*, 771, 3-31.

- Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-Garcia, F. & Sanchez, M. *et al.*, (1996) Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast*, 12, 1677-1702.
- Prasad, R., De Wergifosse, P., Goffeau, A., & Balzi, E. (1995). Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet*, 27(4): 320-329.
- Ripeau, J. S., Aumont, F., Belhumeru, P., Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J. H., & de Repentigny, L. (2002). Effect of the echinocandin caspofungin on express of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases and phospholipase in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(9): 3096-3100.
- Sanglard, D., Ischer F., Monod, M., & Bille, J. (1997). Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology*, 143, 405-416.
- Schuetzler-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presterl, E., & Kuchler, K. (2003). The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette(ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol*, 48 (1): 225-235.
- Sheedy, D. M., Dimitrova, D., Rankin, J. K., Bass, K. L., Lee, K. M., Tapia-Alveal C., Harvey, S. H., Murray, J. M. & O'Connell, M. J. (2005). Brc1-Mediated DNA Repair and Damage Tolerance. *Genetics*, 171: 457-468.
- Sikorski, R. S. & Hieter, P. (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122: 19-27.
- Soll, D. R. (2002). *Phenotypic switching. In Candida and candidiasis.* Calderone, R.A. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 123-142.
- Thomas-Chollier, M., Sand, O., Turatsinze, J-V., Janky, R., Defrance, M., Vervisch, E., Brohe' e S., & van Helden, J., (2008). RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 36, W119–W127.
- Tronnorsjö, S., Hanefalk, C., Balciunas, D., Hu, G. Z., Nordberg, N., Murén, E., & Ronne, H. (2006). The jmjN and jmjC domains of the yeast zinc finger protein Gis1 interact with 19 proteins involved in transcription, sumoylation and DNA repair. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 57-70.
- Uhl, M. A. & Johnson, A. D. (2001). Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology*, 147, 1189-1195.



- Uppuluri, P., Perumal, P., & Chaffin, W. L. (2007). Analysis of RNA species of various sizes from stationary-phase planktonic yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 7(1): 110-117.
- Van Houten, B., Gamper, H., Sancar, A., & Hearst, J.E. (1987). DNase I footprint of ABC excinuclease. *J. Biol. Chem.*, 262(27): 13180-13187.
- Wenzel, R. P., & Gennings, C. (2005). Bloodstream infection due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 6: S389-393.
- White, T. C., Marr, K. A., & Bowden, R. A. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.*, 11, 382-402.
- Wilson, R. B., Davis, D., & Mitchell, A. P. (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *Bacteriol.* 181, 1868-1874.
- Yang, Y. L., & Lo, H. J. (2001). Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect*, 34, 79-86.
- Zawel, L., Kumar, K. P., & Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev*, 1995, 1479-1490.



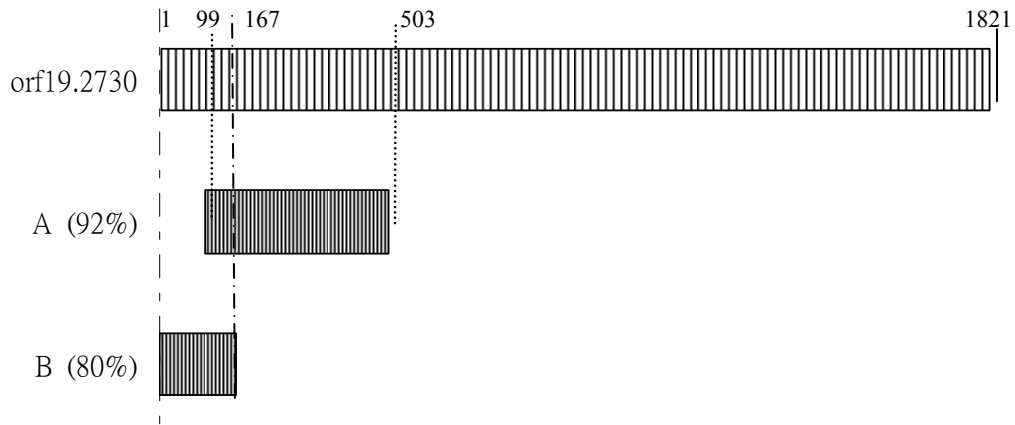


圖 1. SB021 序列和 orf19.2730 對應之相關位置

A：在 orf19.2730 的第 99 至 503 個鹼基的範圍對應到的 415 個鹼基，有 92% 的 identity，3% 的 gaps。

B：在 orf19.2730 的第 1 至 167 個鹼基的範圍對應到的 148 個鹼基，有 80.8% 的 identity，9.8% 的 gaps。

比對結果另見附錄二。

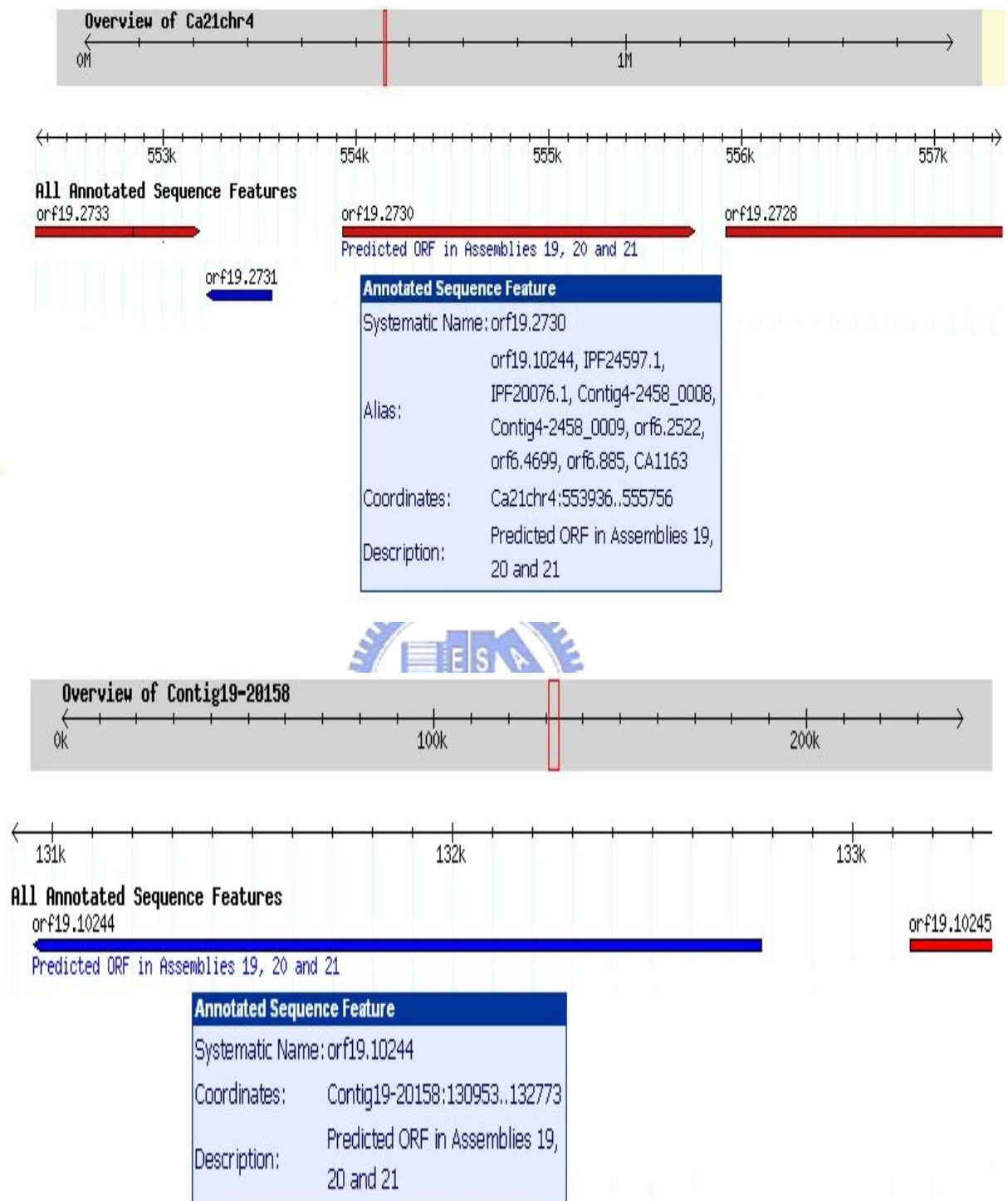


圖 2. orf19.2730 及其對偶基因 orf19.10244 在 *Candida albicans* 第四對染色體上的相對位置

圖仿自 CGD 資料庫(<http://www.candidagenome.org>)。

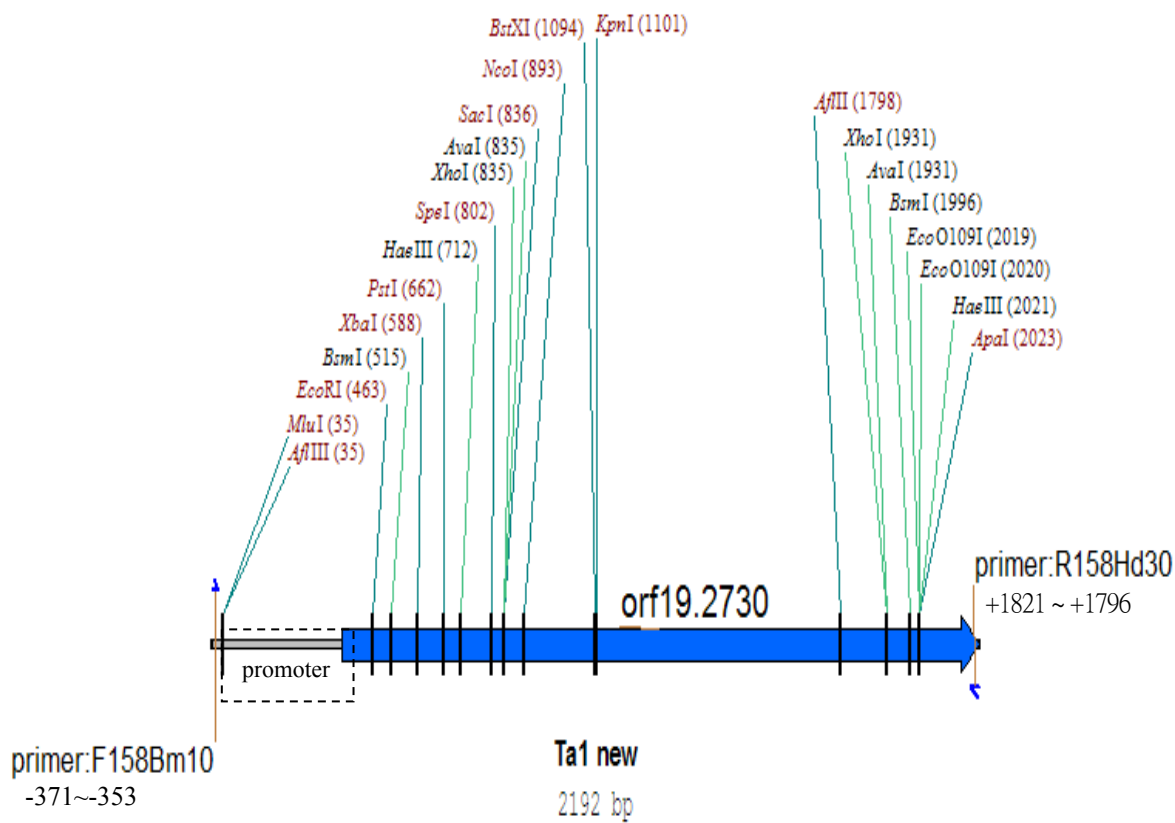


圖 3. *orf19.2730* 及其上游序列之限制酶切割部位分析

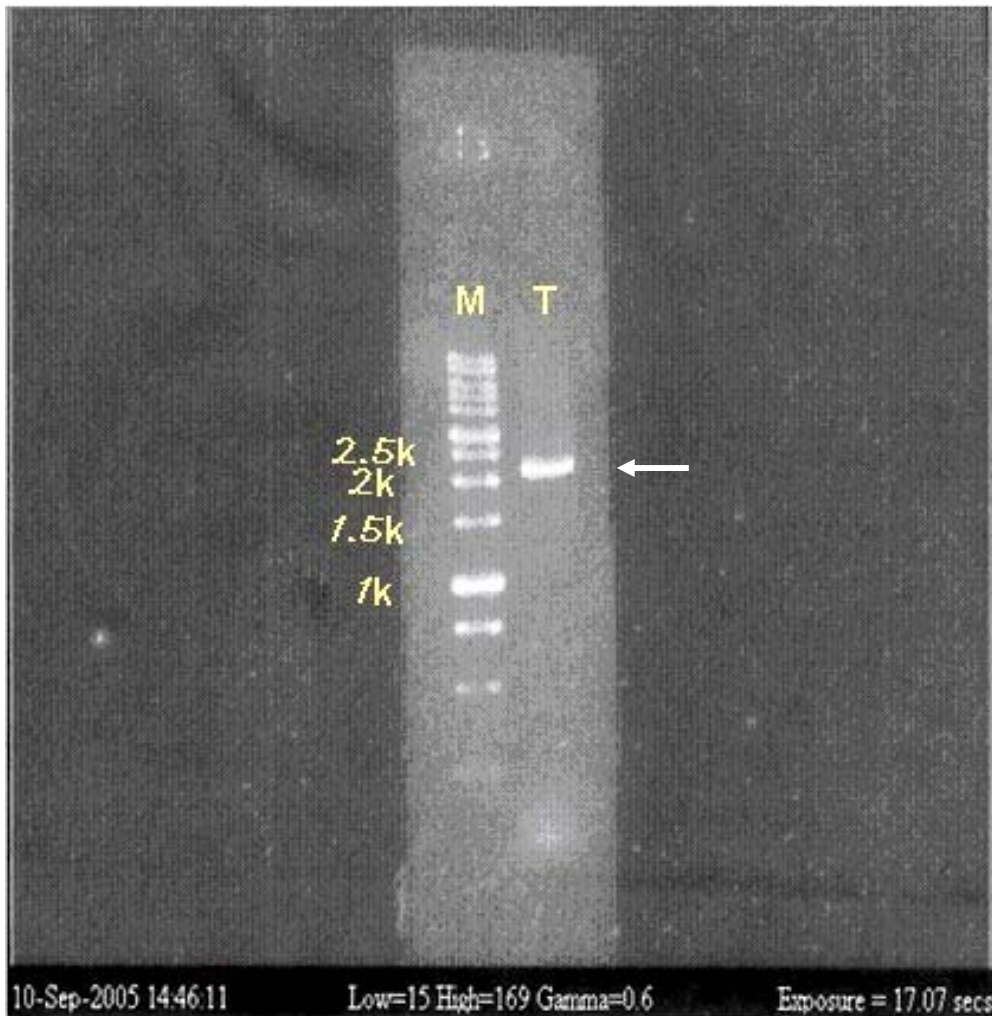


圖 4. PCR 切取 orf19.2730 及其上游序列，長度為 2192 個鹼基  
圖中所示 M 為 marker，  
T 為經限制酶切取之片段 Ta1。

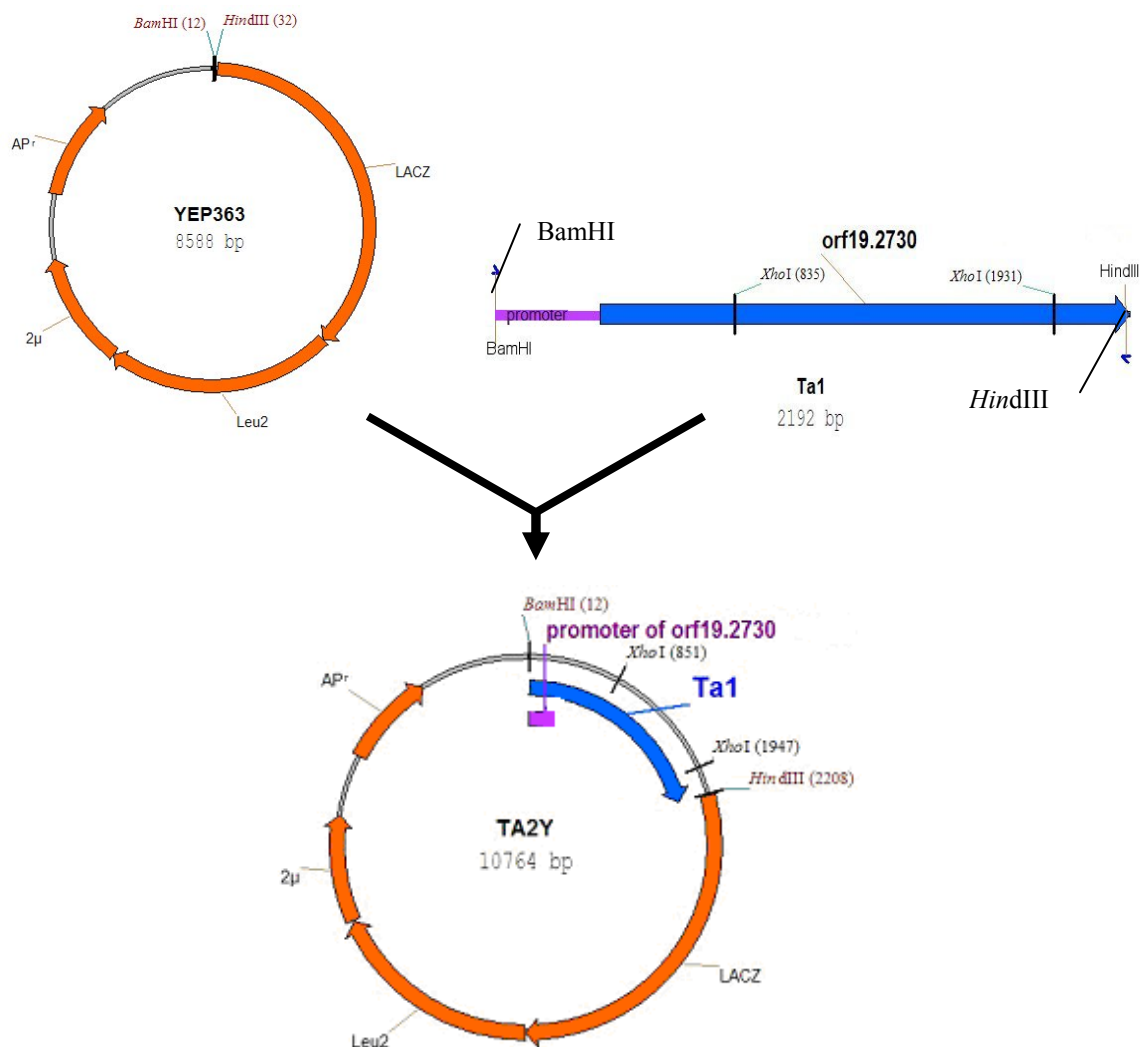


圖 5. Ta2Y 質體的構築

Ta2Y 是以 YEP363 為基礎，經限制酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 切割後，接上 Ta1 改建而成，大小為 10764 bp。以限制酶 *Xho*I 進行切割，可得大小為 1096 bp 和 9668 bp 兩片段，且切位都在 Ta1 片段上。

2 $\mu$  : yeast ARS

*lacZ* : *lacZ* reporter gene

Leu2 : *LEU2* gene

Ap<sup>r</sup> : ampicillin resistance

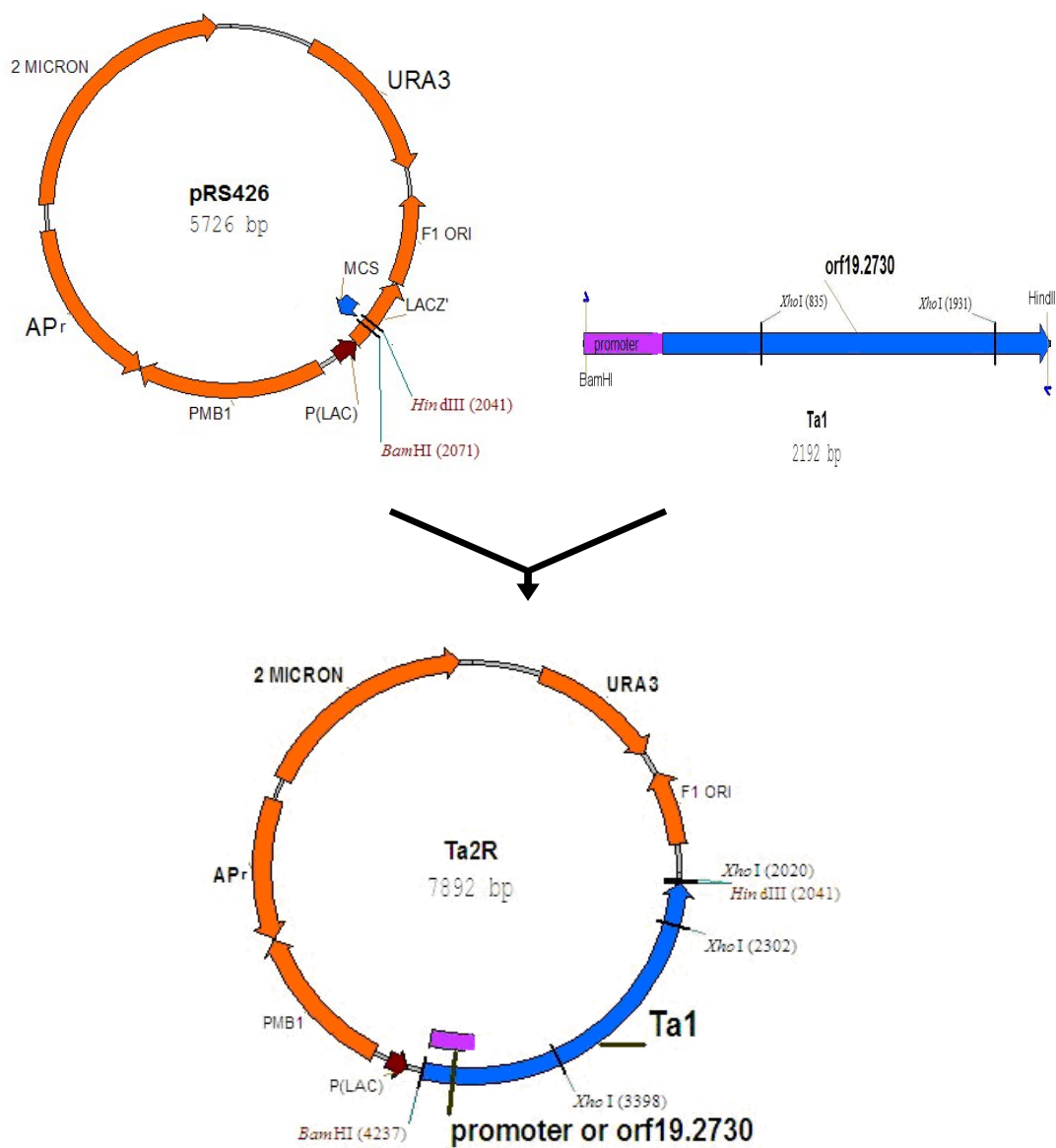


圖 6. Ta2R 質體的構築

Ta2R 是以 pRS426 為基礎，經限制酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 切割後，接上 Ta1 改建而成，大小為 7892 bp。pRS426 上原有的 *lacZ* 則被破壞。以限制酶 *Xho*I 進行切割，可切出 281 bp、1097 bp 及 6514 bp 三個片段。其中 pRS426 質體本身有一個切位，而 Ta1 片段上有 2 個切位。

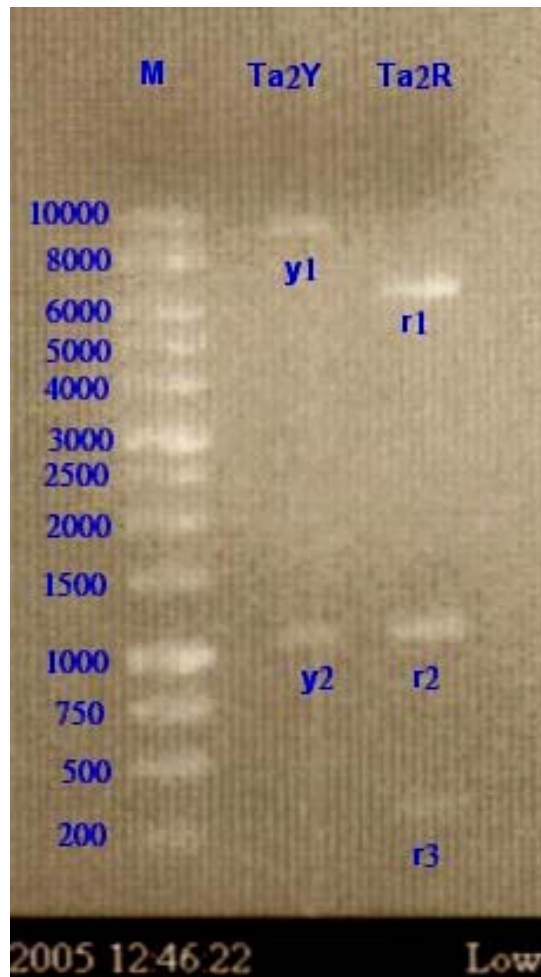


圖 7. Ta2Y 及 Ta2R 以限制酶 *Xho*I 切割後膠體電泳分析

圖中所示 M 為 marker。

Ta2Y 經限制酶切割後產生兩個片段，y1 片段介於 8000 到 10000 個鹼基之間偏向 10000 鹼基，y2 片段介於 1000 到 1500 個鹼基之間偏向 1000 鹼基。

Ta2R 經限制酶切割後產生三個片段，r1 片段介於 6000 到 8000 個鹼基之間，r2 片段介於 1000 到 1500 個鹼基之間略偏向 1000 鹼基，r3 則介於 200 到 500 個鹼基之間。



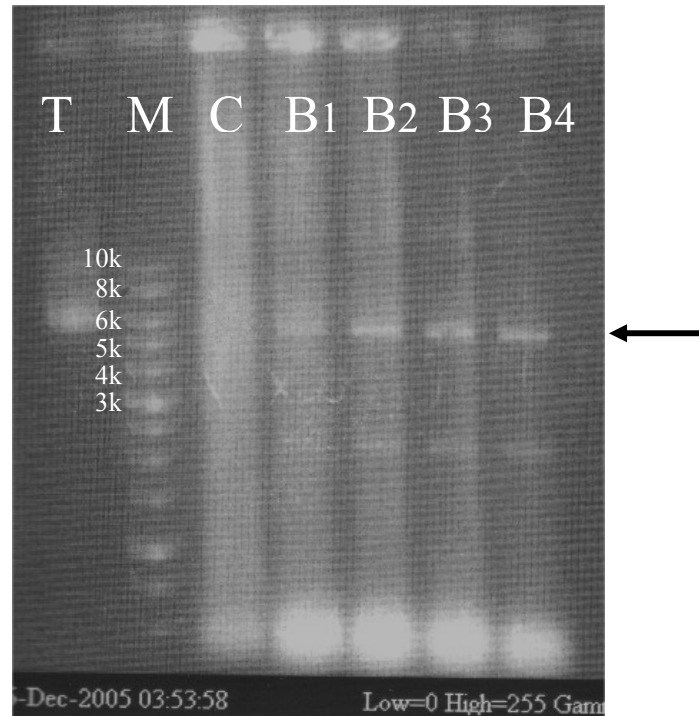


圖 8. Ta2Y 質體轉型到啤酒酵母菌 10560-2B，建構 10560-2B-Ta2Y  
 圖中 T 為未經切割的 Ta2Y 質體，  
 C 為 10560-2B。  
 B1、B2、B3、B4 為 10560-2B-Ta2Y 轉殖之後以 SD/Uridine/  
 Histidine 培養基篩選的質體抽出液。在箭頭所指之處明顯出現  
 和 Ta2Y 質體相當的 band。

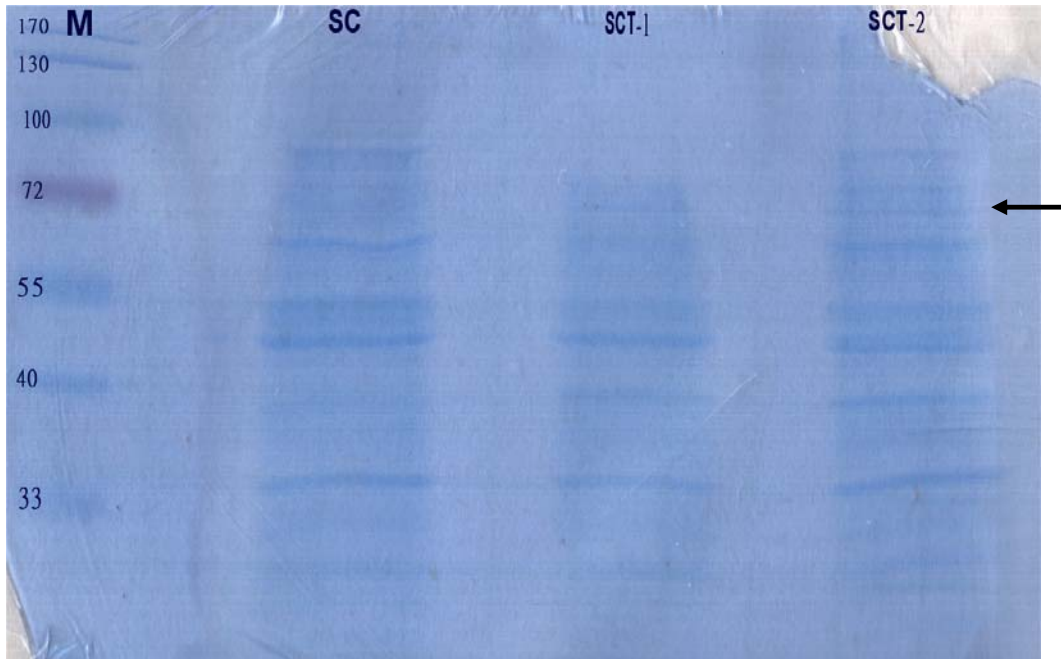


圖 9. Coomassie blue staining 比對試驗

orf19.2730 大小為 1821 bp，預期目標應出現在 55~72 kDa 區域內。箭頭所指之處隱約出現的 band，大小和預期相近，但表現量低，需進一步佐證。

M 為 Marker，

SC 為啤酒酵母菌上清液，

SCT-1，SCT-2 為 10560-2B-Ta2Y 上清液。

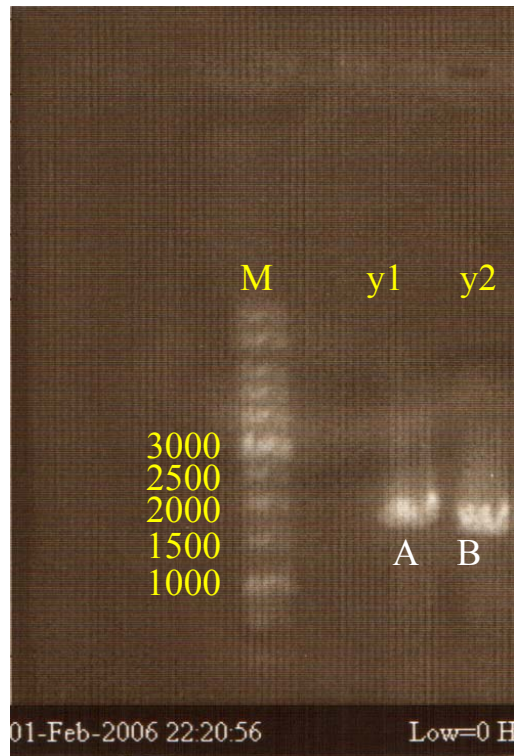


圖 10. 以 PCR 方式自 Ta2Y 切取 orf19.2730 $\Delta$ stop  
利用 RYH20 和 FYH20 為引子，以 PCR 方式自 Ta2Y  
切取大小為 1818 個鹼基的 orf19.2730 $\Delta$ stop (A、B)  
M 為 marker；  
y1、y2 為 2 個 PCR 反應之產物。

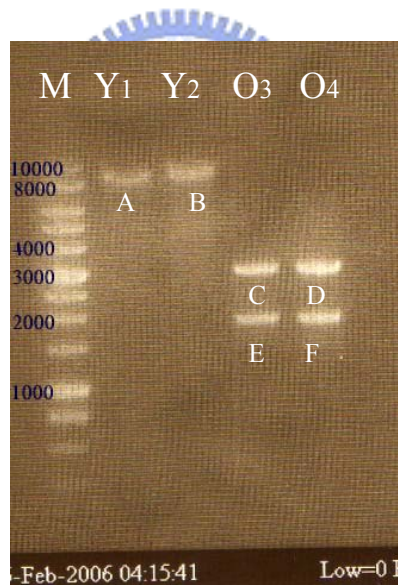
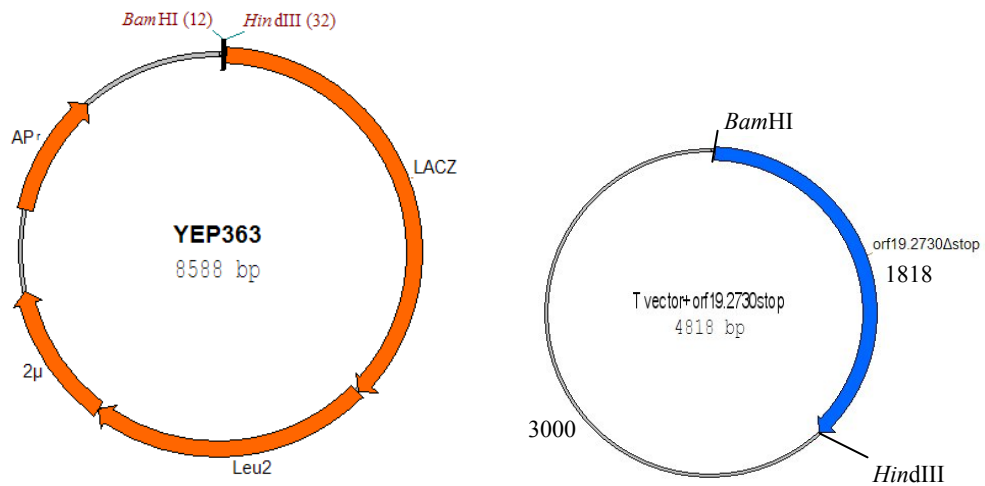


圖 11. 以 *Bam*HI 和 *Hind*III 切割 YEP363 質體及切取 orf19.2730 $\Delta$ stop  
 Y1、Y2 為對 YEP363 質體切割，可得 8568 個鹼基 (A、B) 和 20  
 個鹼基的二個片段。  
 O3、O4 是對 orf19.2730 $\Delta$ stop 連結 T-Vector 增殖後再切割的結果，  
 可以得到 1818 個鹼基 (E、F) 和 3000 個鹼基 (C、D) 的兩條片  
 段。

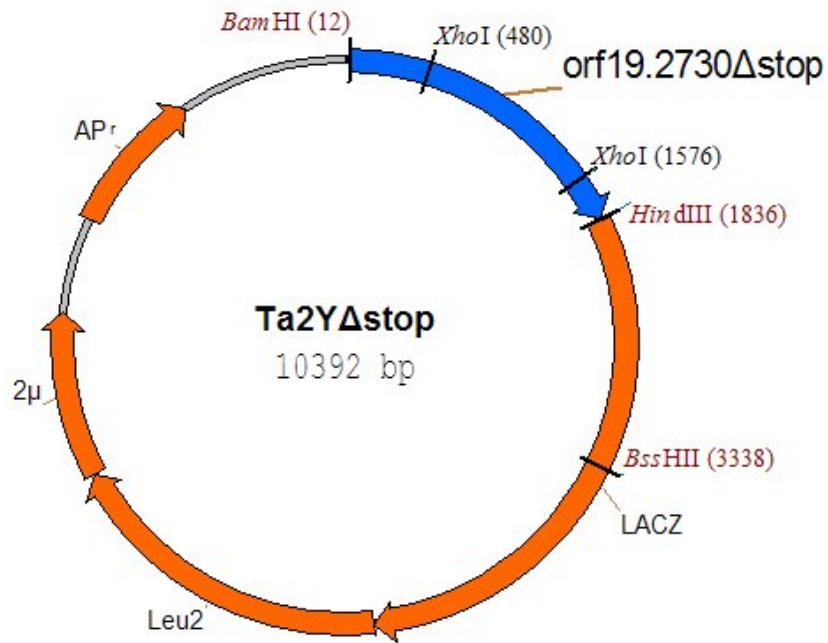


圖 12. Ta2YΔstop 質體

在 YEP363 質體的基礎上加入去除終止碼的 orf19.2730，建構大小為 10392 個鹼基的質體，保留原本 YEP363 質體所具有的 *lacZ*、*LEU2*、*2μ* 及 *Ap<sup>r</sup>* 基因，而且在第 480 個鹼基和第 1576 個鹼基的位置具有 orf19.2730 上的兩個限制酶 *XhoI* 的切位。

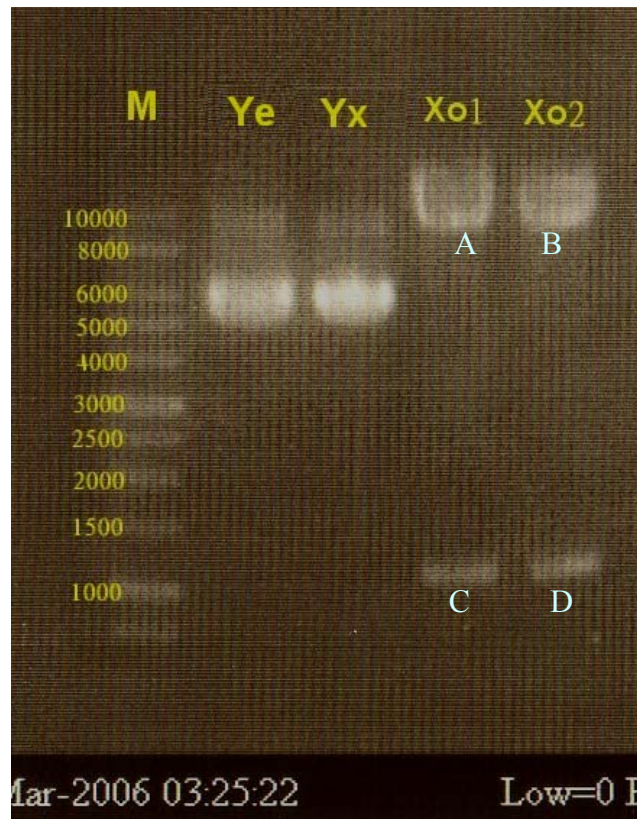


圖 13. 以限制酶 *Xho*I 切割確認 Ta2Y $\Delta$ stop 質體

Ye 為 YEP363 質體，Yx 為 YEP363 經限制酶 *Xho*I 處理後的結果，兩者沒有顯著差異，確認限制酶 *Xho*I 不會對 YEP363 質體發生作用。

Xo1 和 Xo2 為限制酶 *Xho*I 對 Ta2Y $\Delta$ stop 質體作用後的結果，可看見都出現兩條 band，其中一條約在 10000 個鹼基附近 (A、B)，另外一條則在 1000 個鹼基附近 (C、D)，兩條鹼基分佈的位置恰好和預期的 1097 個鹼基和 9295 個鹼基相當，符合預期的結果。

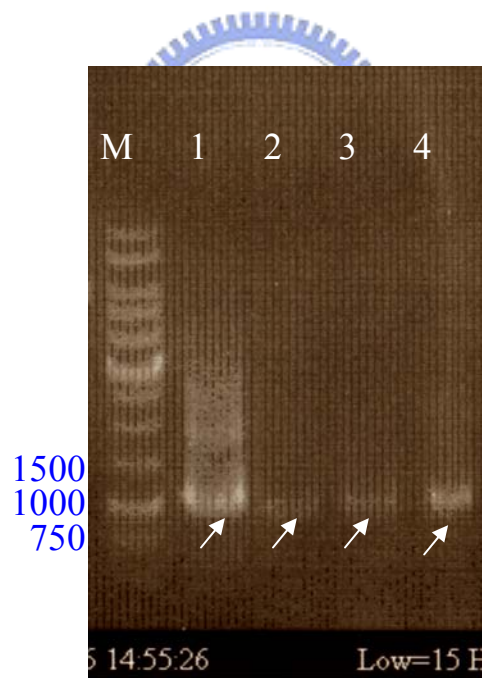
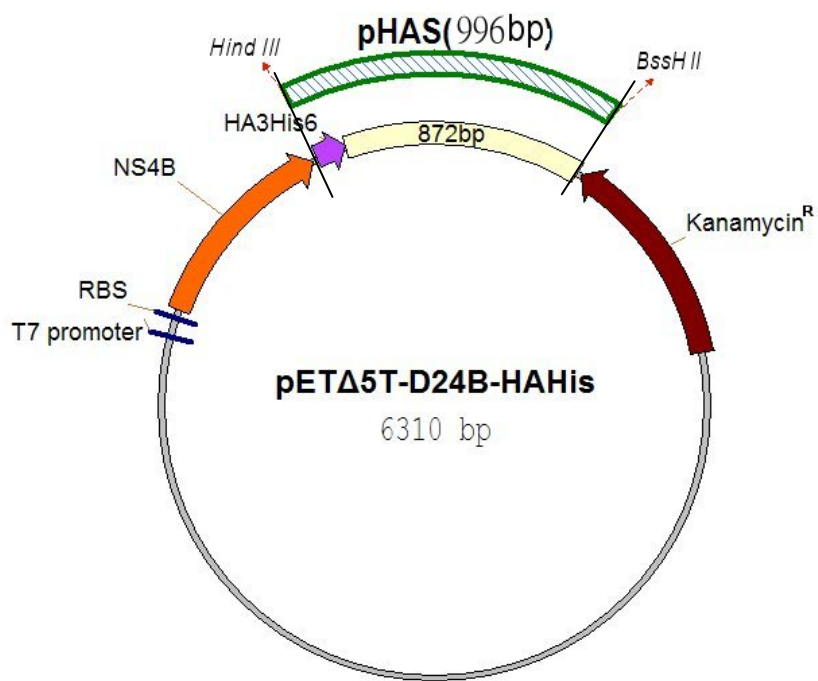


圖 14. 以 PCR 方式在 pETΔ5T-D24B-HAHis 質體上擷取 HA3His6 及其下游共 996 個鹼基的 pHas 片段  
 圖中 1、2、3、4 皆為 pHas 片段，箭頭所指處顯示大小在 1000 個鹼基附近，和預期相符。

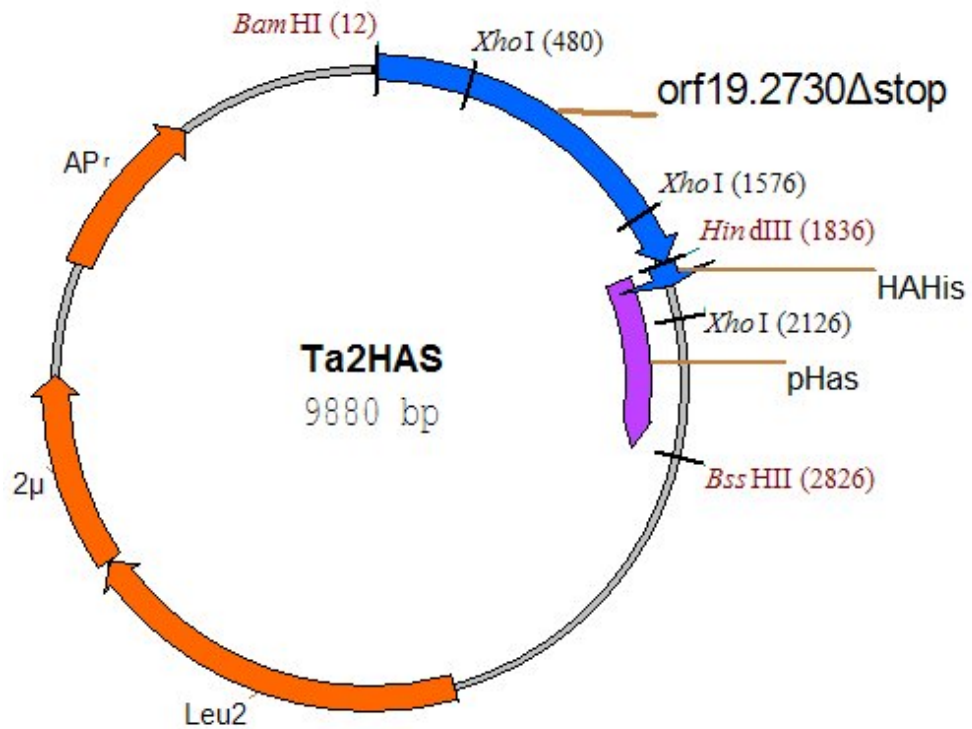


圖 15. Ta2HAS 質體

對 Ta2Y $\Delta$ stop 以限制酶 *Hind*III 和 *Bss*HIII 處理，切除 *Hind*III 之後 *lacZ* 的部份片段。再以限制酶 *Hind*III 和 *Bss*HIII 處理 pHas。將兩者進行接合，經過轉形選殖後，可得到帶有 HAHis 的 Ta2HAS 質體，大小為 9880 bp。若以限制酶 *Xho*I 處理，應可切出大小為 551 bp、1097 bp 及 8232 bp 的三個片段。





圖 16. 經限制酶 *Xho*I 處理確認建構 Ta2HAS 質體

Ta2HAS 質體經限制酶 *Xho*I 處理，應可切出大小為 8232、1097 及 551 個鹼基的三個片段。

M 為 Marker；

TH 為未經切割的 Ta2HAS 圓形質體。

THX 則為經限制酶 *Xho*I 切割後的結果，可以看到在 8000~10000 (A)、1000~1500 (B) 及 500~750 (C) 個鹼基之間出現三條 band，和預期相符。

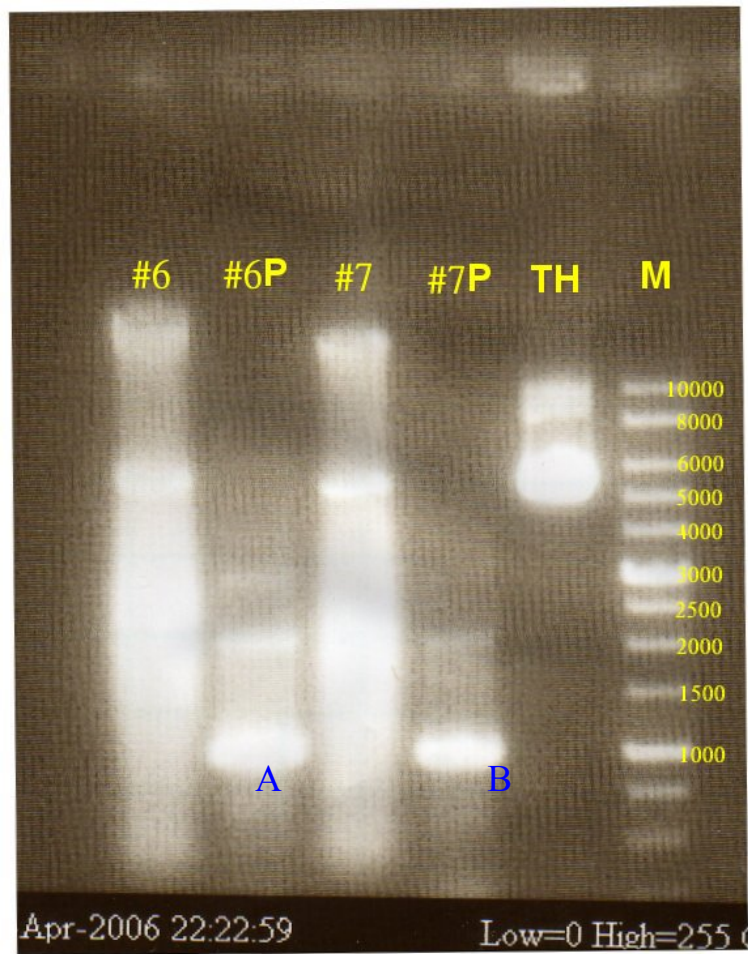


圖 17. 檢驗 10560-2B-Ta2HAS 轉型株

圖中 M 為 Marker。

TH 為 Ta2HAS 質體。

#6、#7 為 10560-2B-Ta2HAS 抽出之真菌質體。

#6P、#7P 是以#6、#7 為板模經 PCR 增殖 HA3His6 及其下游共 996 個鹼基的 pHas 片段後的產物 (A、B)。

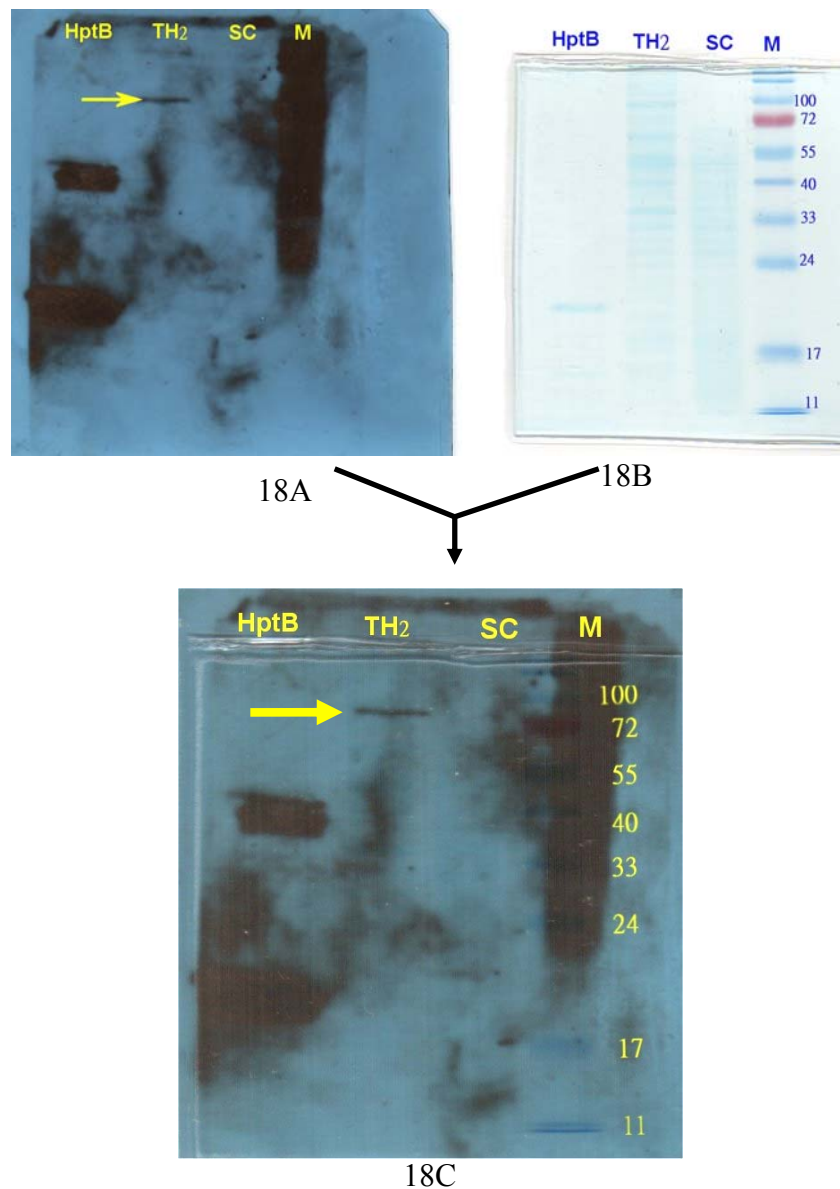


圖 18. 啤酒酵母菌及 10560-2B-Ta2HAS 進行 Coomassie blue staining 及 Western blotting

上左圖 (18A) 為以 anti His 抗體進行 Western blotting 的結果。  
 上右圖 (18B) Coomassie blue staining 的結果。將兩個結果重疊如下圖(18C), 可見到箭頭所指之處有明顯的 band 出現, 約在 72 kDa 附近, 和預期的結果相符, 而酵母菌上清液則沒有相對的 band。  
 M 為 marker, SC 是啤酒酵母菌細胞萃取液, TH2 是 10560-2B- Ta2HAS 細胞萃取液, HptB 為控制組。

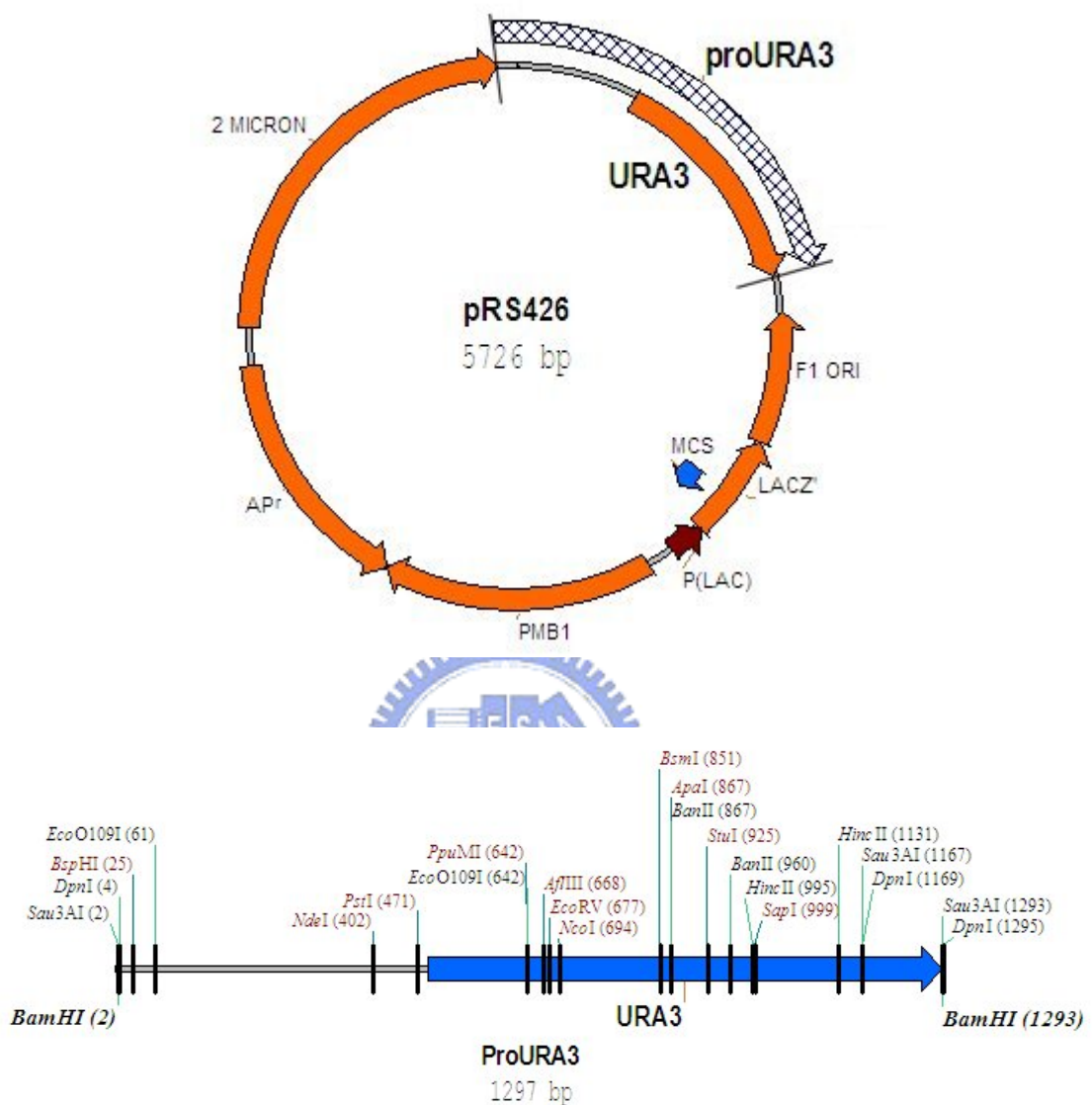
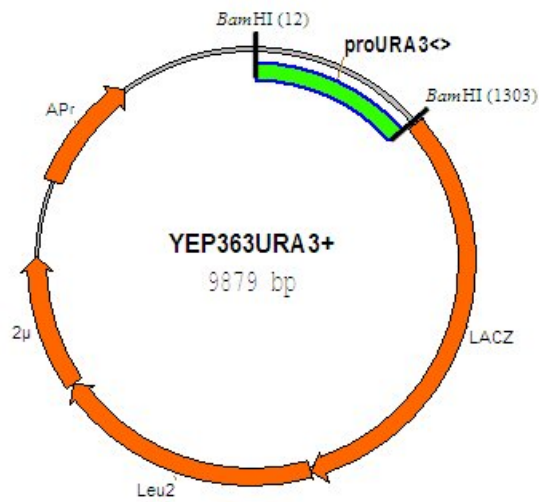
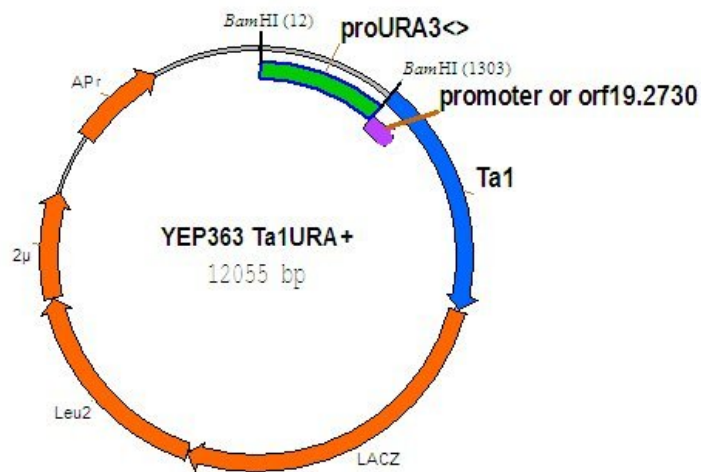


圖 19. proURA3

以 FPUR3 及 RPUR3 為引子，用 PCR 方式擷取 pRS426 質體上的 URA3 及其上游序列共 1285 個鹼基的序列，經 PCR 放大後的 proURA3 片段已在 5'端和 3'端都加入限制酶 *Bam*HI 的切位，形成大小為 1297 個鹼基的片段。



A



B

圖 20. 建構 YEP363URA3 質體及 YEP363TA1URA3 質體

圖 A 顯示 YEP363 質體加入 proURA3 建構的 YEP363URA3 質體，應有 9879 個鹼基，經 *Bam*HI 切割後應可得到 8588 及 1291 個鹼基的兩條片段。圖 B 為 Ta2Y 質體加入 proURA3 建構的 YEP363TA1URA3 質體，應有 12055 個鹼基，經 *Bam*HI 切割後應可得到大小為 10764 及 1291 個鹼基的兩條片段。

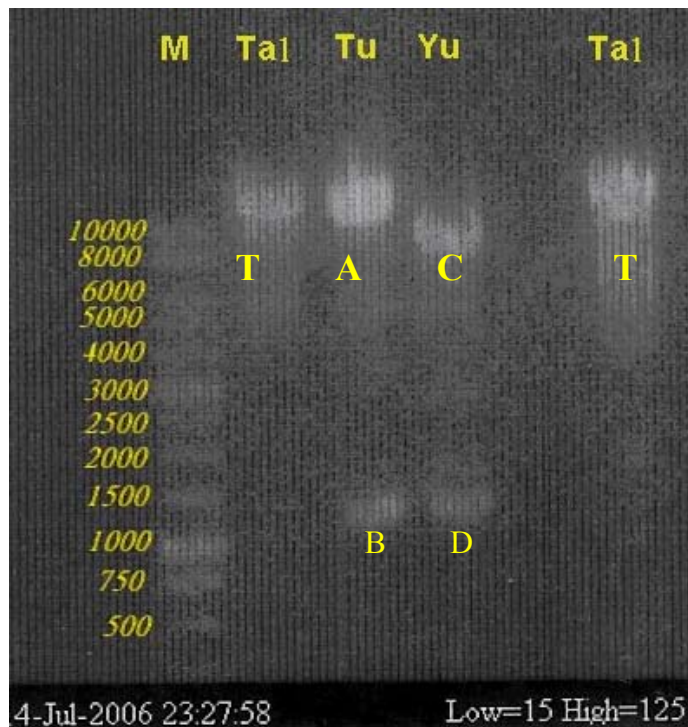


圖 21. 建構質體 YEP363URA3 和 YEP363TA1URA3 的確認

Ta1 為 YEP363TA1 質體經 *Bam*HI 切割後大小為 10764 個鹼基的線狀結構 (T)，作為參考座標。

Tu 為 YEP363TA1URA3 質體經 *Bam*HI 切割後應得到大小為 10764 (A) 和 1291 (B) 兩條片段。

Yu 是 YEP363URA3 質體經 *Bam*HI 切割後應得到 8588 (C) 和 1291 (D) 個鹼基的兩條片段。

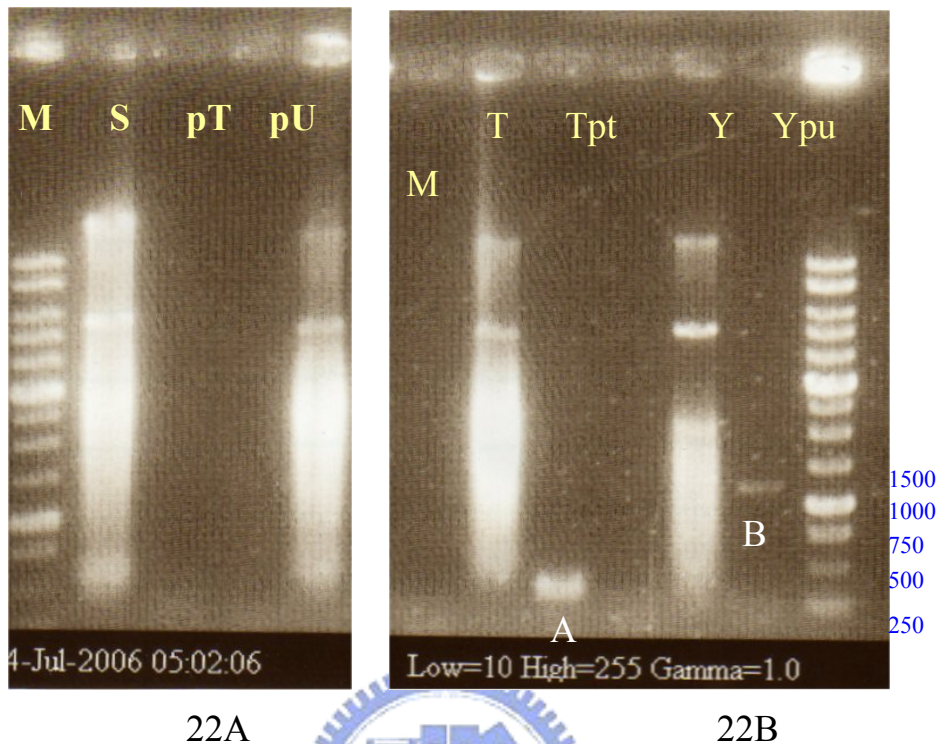


圖 22. 對酵母菌 SLO69Yu 和 SLO69Tu 抽取質體後進行 PCR 檢驗

左圖 22A 中，S 為 SLO69 之質體抽取液。pT 為對 Ta1 的 promoter 做 PCR。pU 是對 proURA3 片段做 PCR 放大，都沒有觀察到 PCR 的產物。

右圖 22B 中，T 為 SLO69Tu 之質體抽取液。經 PCR 對 Ta1 的 promoter 放大的結果在 Tpt，可觀察到 250 到 500 bp 之間出現 band (A)。Y 為 SLO69Yu 之質體抽取液，Ypu 是對 proURA3 片段放大，結果可觀察到 1000 到 1500 個鹼基的區間有 band (B) 出現，符合對 proURA3 片段 1291 個鹼基的預期。

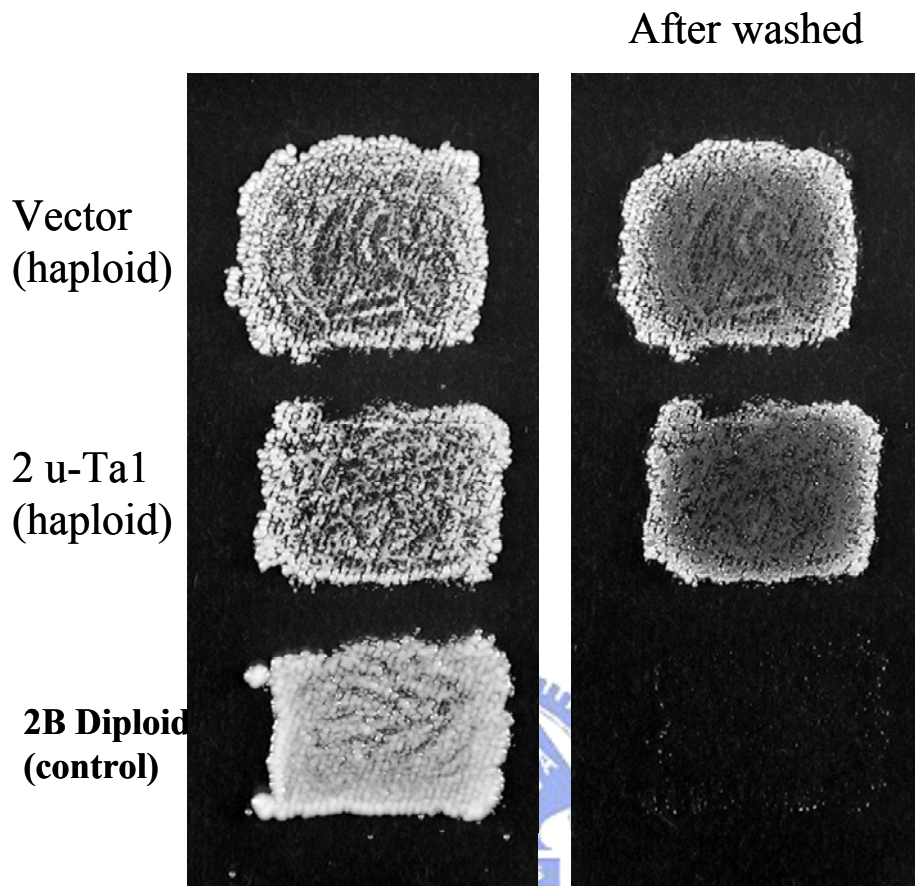
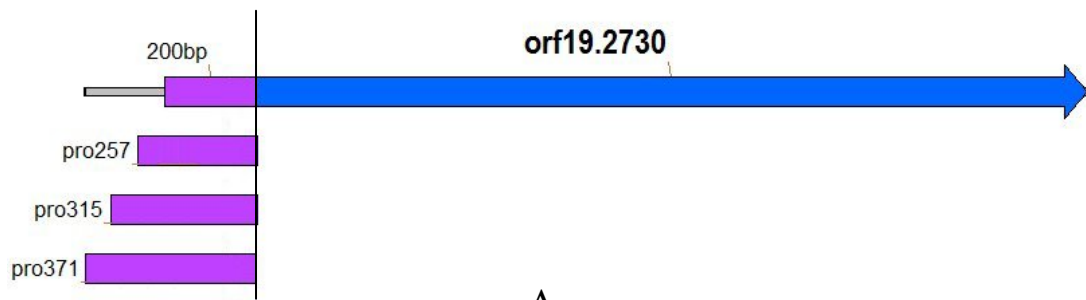


圖 23. 侵犯力分析(Invasion assay)結果

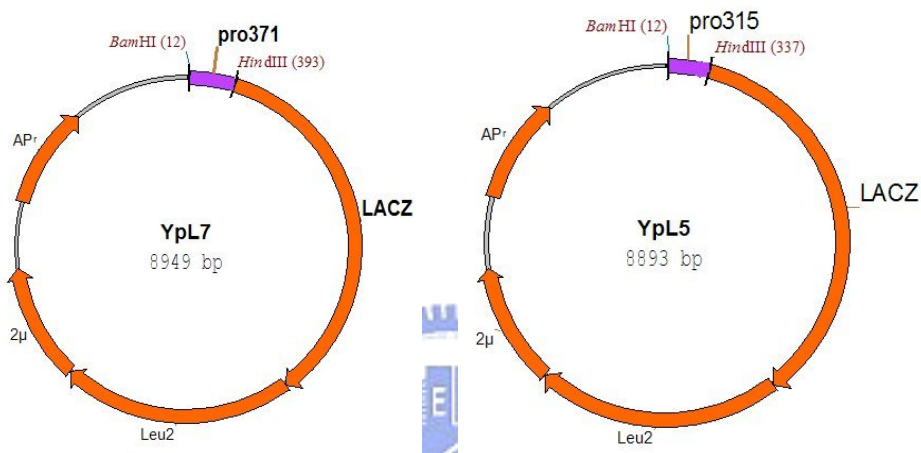
SLO69Tu 和 SLO69Yu 經水流沖洗後都不會被洗去，表示兩者都有侵入培養基的能力，而且在程度上並無顯著的差異。圖中 vector 為 SLO69Yu，2u-Ta1 為 SLO69Tu，兩者都是單倍體。二倍體酵母菌 2B 則作為對照組。



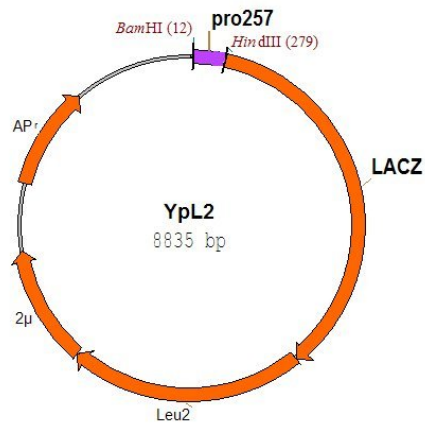


A

Ta1 promoter



B



D

圖 24. 建構 YpL7、YpL5，及 YpL2 等三種質體的建構

其中 pro371、pro315、pro257 的 3'端都已加入 AUG 三個鹼基做為起始碼，其後方正好緊接在 YEP363 質體的 *lacZ* 基因前，可藉由 *lacZ* 的表現來做  $\beta$ -galactosidase assay 的觀察。

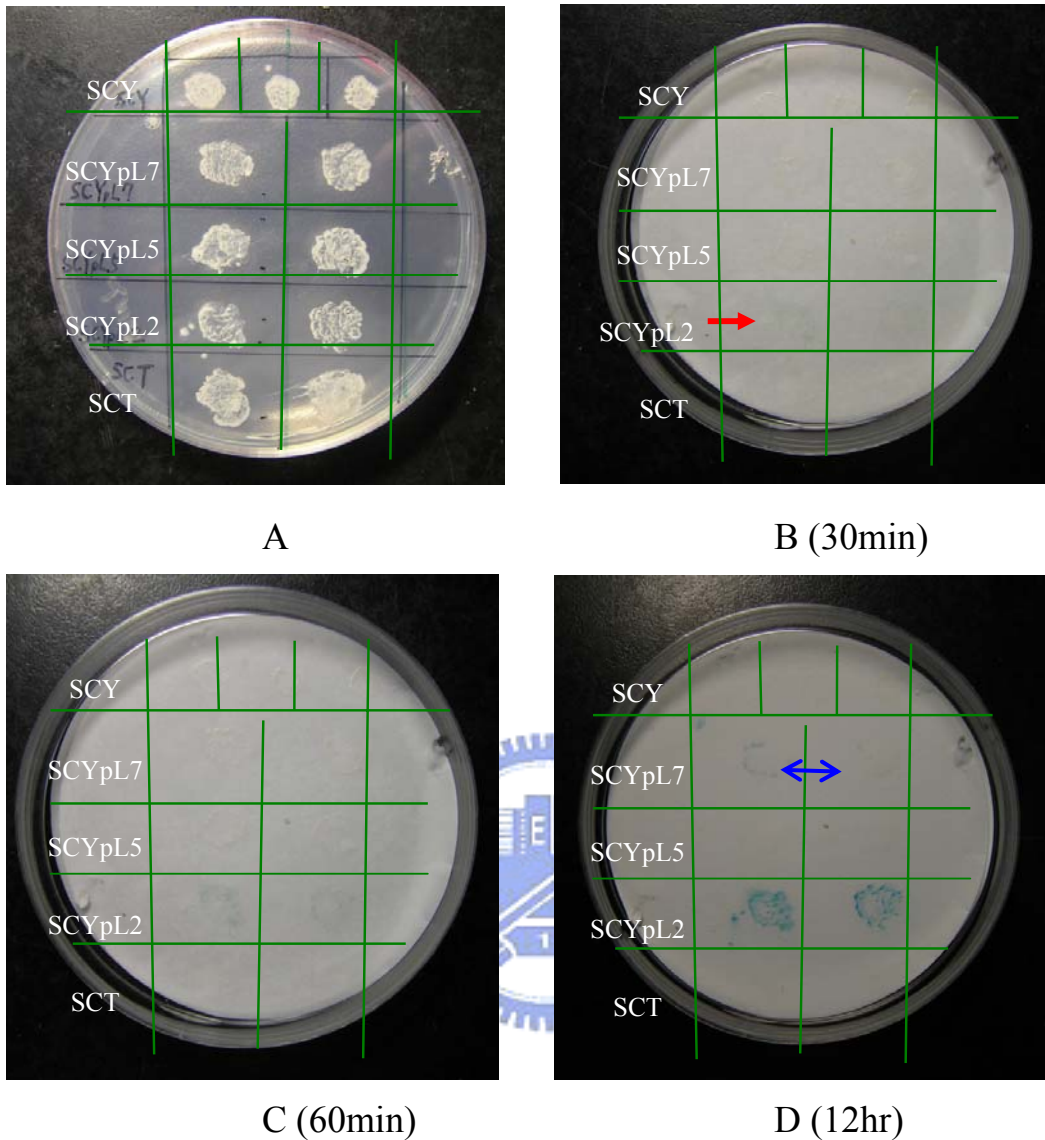


圖 25.對 SCYpL7、SCYpL5 及 SCYpL2，進行 Yeast filter  $\beta$ -galactosidase assay 其中 A 圖展示各樣品的相對位置。B 圖顯示 SCYpL2 在 30 分鐘後於箭頭標示處已可觀察到開始出現藍色。C 圖為 60 分鐘後的呈色結果。D 圖則為 12 小時後的呈色結果。可看出 SCYpL2 呈色較快且顏色明顯，SCYpL7 居次（雙箭頭標示處），而 SCYpL5 呈色最慢。圖中 SCY 是將 YEP363 質體轉殖到酵母菌 10560-2B，而 SCT 是 10560-2B-Ta2Y，兩者在 Yeast filter  $\beta$ -galactosidase assay 都不會呈色，在此做為對照組。

## 附錄

### 附錄 1 : SB021 序列

1 AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACGAGAGCGA  
31 CCTCCAATAGTTGGTCTCGAGCTCTTTGCA  
61 CCGATCGTCGGTATACTGACTAGTGTTAAT  
91 GTTGTAGAATGGAATATCTTTTGAGTGGGT  
121 CTCTGTTTCTGATTTACCTCTCTGTTTCCG  
151 CGTGGTGGCTTGCGTGTCTTGGCCATCTCC  
181 TTCCATTGGAATATCGAATACTTTTTATAT  
211 CGTCCGATGTTCTGCAGTTGGTATATCCCT  
241 GGTGCATTTTGTGTTTGATGCTCTGCACTA  
271 TGGGGGTTCTGGATAGACACTTGTTCTAGA  
301 TTACTCTCNGGTGTAGCATTTCTGCACTCG  
331 CAGAACCCTTTGAGTAAGGTGGGAATCACC  
361 TTTACTATGCCCCGACTGATTTCCGTATTT  
391 GGNTGATTGCCTNTTGAAAGTTGTNAAAAG  
421 TCTTCGGAAATTCGTGCATTGGNAAGGTTT  
451 GGAACACTGGAACGCCATTGTCGTATAACT  
481 GGGGCTCTNATAGANNAAGNTGGNCTTTG  
511 NGGGGGAATACACTGANTGCATTGGNGNAA  
541 TGGNGNNNGGTTTTGNCCAGNNAAGGGGGG  
571 ACTGGNTTNGGGTTGCAANNGGGNCGTATT  
601 AACNAAGGGGNTCCNNAAAAAGGNTTATN  
631 A A G G G G N C N C A A T

## 附錄 2：SB021 和 orf19.2730 比對結果

**orf19.2730** orf19.2730 CGDID:CAL0004209 Assembly 21, Ca21chr4:553936-555756W (1821 nucleotides)

Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21 Length = 1821

Score = 265.8 bits (1731), Expect = 1.3e-74, P = 1.3e-74

Identities = 385/415 (92%), Gaps = 13/415 (3%) Frame = -1/+1

Query: 423 AGACTTTTNAACAACCTTTCAANA-GGCAATCANCCAAATACGGAAATCAGTCGGGGCATAG 365

Sbjct: 99 AGACTTTT-ACAACCTT-CAACAAGGCAATCAAC-AACTACGGAATGCAGTCGGG-CATAG 154

Query: 364 TAAAGGTGATTCCACCTTACTCAAAGGGTCTGCGAGTGCAGAAATGCTACACCNAGA 305

Sbjct: 155 TAAAGGTGATTCC-ACCT-ACTCAATGGGTCTGCGAGTGCAGAAATGCTACACC-GAGA 211

Query: 304 GTAATCTAGAACAAGTGTCTATCCAGAACCCCATAGTGCAGAGCATCAAACACAAAATG 245

Sbjct: 212 GTAATCTAGAACAAGTGTCTATCCACAACCC-ATAGTGCAGAGCATCAA-CACAAA-TG 268

Query: 244 CACCAGGGATATACCAACTGCAGAACATCGGACGATATAAAAAGTATTTCGATATCCAAT 185

Sbjct: 269 CACCAGGGATATACCAACTGCAGAACATCGAGCGATACAAAAGTATTTCGATATCCAAT 328

Query: 184 GGAAGGAGATGGCCAAGACACGCAAGCCACCACG-CGGAAACAGAGAGGTAAATCAGAAA 126

Sbjct: 329 GGAAGGAGATGGCCAAGACACGCAAGCCACCACGACGGAAACAGAGAGGTAAATCAGAAA 388

Query: 125 CAGAGACCCACTCAAAGATATTCCATTCTACAACATTAACACTAGTACGTATACCGACG 66

Sbjct: 389 CAGAGACCCACTCAAAGATATTCCATTCTACAATATTAACACTAGTACTACTGATG 448

Query: 65 ATCGGTGCAAAGAGCTCGAGACCAACTATTGGAGGTCGCTCTCGTACTCG-GCC 12

Sbjct: 449 ATCGGTGCAAAGAGCTCGAGTCCAACACTATTGGAGGTCGCTCTCGTACTCGAGCC 503

Score = 82.6 bits (510), Expect = 2.6e-18, P = 2.6e-18

Identities = 148/183 (80%), Gaps = 18/183 (9%)

Frame = -1 / +1

Query: 532 ATGCANTCAGTGTATTCCCCNCAAAGNCCANCTTNNCTATNAGAGCCCGATTA-TA 474

Sbjct: 1 ATGCAATCAGTGTAT--CCCCACAA-GAC-AACTCTACA-TAT-AGAGCCC-AGCTACTT 53

Query: 473 CGACAATGGCGTTCCAGTGTTCCAAACCTTNC AATGCACGAATTTCCGAAGACTTTTNA 414

Sbjct: 54 TGACAATGGCGTTCCAGTGTTCCAA-CCT-AC-AATGCACGAATT-CCGA-GACTTTT-A 107

Query: 413 CAACTTTCAANA-GGCAATCANCCAAATACGGAAATCAGTCGGGGCATAGTAAAGGTGAT 355

Sbjct: 108 CAACTT-CAACAAGGCAATCAAC-AACTACGGAATGCAGTCGGG-CATAGTAAAGGTGAT 164

Query: 354 TCC 352

Sbjct: 165 TCC 167

### 附錄 3：SB021 和 orf19.2743 比對結果

**orf19.2743** orf19.2743 CGDID:CAL0004229 Assembly 21, Ca21chr4:531819-533639C (1821 nucleotides)

Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21 Length = 1821

Score = 264.4 bits (1722), Expect = 3.3e-74, P = 3.3e-74  
Identities = 384/415 (92%), Gaps = 13/415 (3%) Frame = -1 / +1

```
Query: 423 AGACTTTTACAACCTTTCAANA-GGCAATCANCCAAATACGGAAATCAGTCGGGGCATAG 365
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 99  AGACTTTT-ACAACCTT-CAACAAGGCAATCAAC-AAATACGGAAATGCAGTCGGG-CATAG 154

Query: 364 TAAAGGTGATTCCACCTTACTCAAAGGGTCTGCGAGTGCAGAAATGCTACACCNAGA 305
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 155 TAAAGGTGATTCC-ACCT-ACTCAATGGGTCTGCGAGTGCAGAAATGCTACACC-GAGA 211

Query: 304 GTAATCTAGAACAAGTGTCTATCCAGAACCCCATAGTGCAGAGCATCAAACACAAAATG 245
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 212 GTAATCTAGAACAAGTGTCTATCCACAACCCA-ATAGTGCAGAGCATCAA-CACGAA-TG 268

Query: 244 CACCAGGGATATACCAACTGCAGAACATCGGACGATATAAAAAGTATTTCGATATTCCAAT 185
          | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 269 CGCCAGGGATATACCAACTGCAGAACATCGAGCGATACAAAAAGTATTTCGATATTCCAAT 328

Query: 184 GGAAGGAGATGGCCAAGACACGCAAGCCACCACG-CGAAACAGAGAGGTAAATCAGAAA 126
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 329 GGAAGGAGATGGCCAAGACACGCAAGCCACCACGACGAAACAGAGAGGTAAATCAGAAA 388

Query: 125 CAGAGACCCACTCAAAAGATATTCCATTCTACAACATTAACACTAGTCAGTATAACCGACG 66
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 389 CAGAGACCCACTCAAAAGATATTCCATTCTACAACATTAACACGAGTGTAGTATACTGATG 448

Query: 65  ATCGGTGCAAAGAGCTCGAGACCAACTATTGGAGGTCGCTCTCGTAC-CTCGGCC 12
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 449 ATCGGTGCAAAGAGCTCGAGACCAACTATTGGAGGTCGCTCTCGTACTCTGAGCC 503
```

Score = 85.3 bits (528), Expect = 3.9e-19, P = 3.9e-19  
Identities = 150/183 (81%), Gaps = 18/183 (9%)  
Frame = -1 / +1

```
Query: 532 ATGCANTCAGTGTATTCCCCNCAAAGNCCANCTTTNNICTATNAGAGCCCAGTTA-TA 474
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1   ATGCAATCAGTGTAT--CCCCACAA-GAC-AACTCTACA-TAT-AGAGCCC-AGCTACTA 53

Query: 473 CGACAATGGCGTTCCAGTGTTCAAACCTTNCCAATGCACGAATTTCCGAAGACTTTTNA 414
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 54  CGACAATGGGGTTCAGTGTTCAA-CCT-AC-AATGCACGAATT-CCGA-GACTTTT-A 107

Query: 413 CAACTTTCAANA-GGCAATCANCCAAATACGGAAATCAGTCGGGGCATAGTAAAGGTGAT 355
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 108 CAACTT-CAACAAGGCAATCAAC-AAATACGGAAATGCAGTCGGG-CATAGTAAAGGTGAT 164

Query: 354 TCC 352
          |||
Sbjct: 165 TCC 167
```

#### 附錄 4 : orf19.2730 序列

orf19.2730 on Ca21chr4 from coordinates 553936 to 555756.

Assembly 21, Ca21chr4:553936-555756W (1821 nucleotides)

orf19.2730 Length: 1821 Thu May 29 12:37:35 2008 Type: N Check: 1479 ..

1 ATGCAATCAG TGTATCCCCA CAAGACAACCT CTACATATAG AGCCCAGCTA  
51 CTTTGACAAT GGCGTTCCAG TGTCCAACC TACAATGCAC GAATCCGAG  
101 ACTTTTACAA CTTCAACAAG GCAATCAACA ACTACGGAAT GCAGTCGGGC  
151 ATAGTAAAGG TGATTCCACC TACTCAATGG GTTCTGCGAG TGCAGAAATG  
201 CTACACCGAG AGTAATCTAG AACAAAGTGC TATCCACAAC CCCATAGTGC  
251 AGAGCATCAA CACAAATGCA CCAGGGATAT ACCAACTGCA GAACATCGAG  
301 CGATACAAAA AGTATTTCGAT ATTCCAATGG AAGGAGATGG CCAAGACACG  
351 CAAGCCACCA CGACGAAAAC AGAGAGGTAA ATCAGAAACA GAGACCCACT  
401 CAAAAGATAT TCCATTCTAC AATATTAACA CTAGTGAGTA TACTGATGAT  
451 CGGTGCAAAG AGCTCGAGTC CAACTATTGG AGGTCGCTCT CGTACTCCGA  
501 GCCAATGTAC GGAGCAGACA CCATGGGGTTC TGTGTTTGAC AAGTCGATAA  
551 CGGCGTGGAA TGTGGCACAC CTACCGAACT TGCTCGATCT AATGGAGGAG  
601 AAATAACCAG GGGTGAACCA GGCATATTTG TACGCGGGGT TGTGGAAGGC  
651 ATTGTTTGA TGGCATTGG AAGACCAGGA CTTGTATCTG ATAAATTACT  
701 TGCACTTTGG AGCACAAAA CAATGGTACC TGATACCACA GAGCCAGCAC  
751 GAAGAGTTCT ACGCATTGAT GGTTGATTTA TTCCACGATG AGTTCAAACA  
801 GTGTAGTGAG TTTCTCCGAC ACAAGACGTT TATGGTGTCG CCCGCGTACC  
851 TTGAAAAACA CGGCATTAGA GTGAACCACA CGATACACCG AGAGGGTGAG  
901 TTTATTATCA CATACCCATA CGGATACCAT GCGGGGTTCA ACTACGACTA  
951 CAACTTGGCA GAGTCGGTGA ACTTTGCGTT GGACGACTGG TTTGAGTTTG  
1001 GGAAACGCAC CAAAAAGTGT GAGTGCATTA GTGATTCTGT TGGGATCAAT  
1051 ATTAAGCATT TATGGGAAAA GTATTACGGT ACGAAGTACG AGGCAGTGAA  
1101 AGAGGAAGAT GGTCGGGATG GCGGACTTGA AGCTGACTCG GATGGCTCAA  
1151 TAGAAGTGGT CAAGGTAGAG AAGATCCAAC GCAAGTGTCG CAAGAGAAAA  
1201 CAAGACAATG TCCACACTAC AAATACACAT GAGAGGGTGT CCACAAAGAG  
1251 ACCACACAAA GAACCAGACA TCTCTCGTGA ATGTGCTCTT TGCCCCAACA  
1301 CACTTCAACA AACAAAATAC TCCCATTCCG CTTTATTCGA GTTGCTACAA

1351 GCTGATACGT ATGGCACAAC ACCTGAGAGA CCCCCTCGAG TGCACAAGAT  
 1401 ATGTGCTAGT ATGTTCCCTC ATCAACTTAA GTGCGACTTC AAAACCAACA  
 1451 CAGTACACGG GCTAGACGAT ATTACCAAGA ACCAGAAGAA ACTACGCTGT  
 1501 GGTGTTTTGTC GTCAGAGTGA GATGGGAGCA TGTTCCTCAAT GCAGTTATAA  
 1551 GAAATGCACT CGAGCATTTT ATGGAAGTTG TGGGTTGGTT GATGGAGTTC  
 1601 AGTATGATTT TGATTCTGGA GAAGCATTCT GTAAATTCCA CCGCCAGGGC  
 1651 CCCACATCAG CAGAGTTCAA AGTTGGAATG TATGTGCAGT TTTTGTTCAA  
 1701 CCACGGAGTA TATTTTGGAC AATTAGTCAA TTTGGGAGAT GGGGATGTTG  
 1751 AGGTTGAGGT GTATCCTTCT GCTCAAGATG TCATTGAAAT ACCAACGACA  
 1801 AGCATAATTA ATGTTGTATA A

Protein translation of the coding sequence.

Assembly 21, Ca21chr4:553936-555756W, translated using codon table 12 (606 residues)  
 orf19.2730 Length: 607 Thu May 29 12:52:51 2008 Type: P Check: 3633 ..

1 MQSVYPHKTT LHI<sup>E</sup>PSY<sup>F</sup>DN GVPV<sup>F</sup>QPTMH EFRDFYNFNK AIN<sup>N</sup>YGMQSG  
 51 IVKVIPPTQW VSRVQKCYTE SNLEQVSIHN PIVQSINTNA PG<sup>I</sup>YQSQNIE  
 101 RYKKYSIFQW KEMAKTRKPP R<sup>R</sup>KQRGKSET ETHSKDIPFY NINTSEYTD  
 151 RCKELE<sup>S</sup>NYW RSLSYSEPMY GADTMGSVFD KSITAWNVAH LPNLLDL<sup>M</sup>E  
 201 KLPGVNQAYL YAGLWKA<sup>L</sup>FA WHLEDQDLYS INYLHFGAPK QWYSIPQS<sup>Q</sup>H  
 251 EEFYALMVDL FHDEFKQCSE FLRHKTFMVS PAYLEKHGIR VNHTIHREGE  
 301 FIITYPYGYH AGFN<sup>D</sup>YNLA ESVNFALDDW FEFGKR<sup>T</sup>KKC ECISDSVGIN  
 351 IKHLWEKYYG TKYEAVKEED GRDGGLEADS DGSIEVVKVE KIQRKCRK<sup>R</sup>K  
 401 QDNVHTTNTH ERVSTK<sup>R</sup>PHK <sup>E</sup>PD<sup>I</sup><sup>S</sup>R<sup>E</sup>CAL CPNTLQ<sup>Q</sup>TKY SHSALFELLQ  
 451 ADTYGTTPER PRRVHKICAS MFPHQLKCDF KTNTVHGLDD ITKN<sup>Q</sup>KKLRC  
 501 GVC<sup>R</sup>QSEMGA CFQCSYK<sup>K</sup>CT RAFH<sup>G</sup><sup>S</sup>CGLV DGVQYDFDSG EAFCKFHR<sup>Q</sup>Q  
 551 PTSAEFKVGM YVQFLFNHGV YFGQLVNLGD GDVEVEVYPS <sup>A</sup>QDVIEIPTT  
 601 SIINVV\*

註：加註方框者是和 orf19.2743 不同之胺基酸。

## 附錄 5 : orf19.2743 序列

orf19.2743 on Ca21chr4 from coordinates 533639 to 531819.

Assembly 21, Ca21chr4:531819-533639C (1821 nucleotides)

orf19.2743 Length: 1821 Thu May 29 12:45:15 2008 Type: N Check: 9079 ..

```
1  ATGCAATCAG TGTATCCCCA CAAGACAACCT CTACATATAG AGCCCAGCTA
51  CTACGACAAT GGGGTTCCAG TGTTCCAACC TACAATGCAC GAATTCGGAG
101 ACTTTTACAA CTTCAACAAG GCAATCAACA AATACGGAAT GCAGTCGGGC
151 ATAGTAAAGG TGATTCCACC TACTCAATGG GTTCTGCGAG TGCAGAAATG
201 CTACACCGAG AGTAATCTAG AACAAAGTGC TATCCACAAC CCAATAGTGC
251 AGAGCATCAA CACGAATGCG CCAGGGATAT ACCAACTGCA GAACATCGAG
301 CGATACAAAA AGTATTCGAT ATTCCAATGG AAGGAGATGG CCAAGACACG
351 CAAGCCACCA CGACGGAAAC AGAGAGGTAA ATCAGAAACA GAGACCCACT
401 CAAAAGATAT TCCATTCTAC AACATTAACA CGAGTGAGTA TACTGATGAT
451 CGGTGCAAAG AGCTCGAGAC CAACTATTGG AGGTCGCTCT CGTACTCTGA
501 GCCAATGTAC GGAGCAGACA CCATGGGTTT TGTGTTTGAC AAGTCGATAA
551 CGGCGTGGAA TGTGGCACAC CTACCGAACT TGCTCGATCT AATGGAGGAG
601 AAACTACCAG GGGTGAACCA GGCATATTG TACGCGGGGT TGTGGAAGGC
651 ATCATTTGCA TGGCATTGGA AAGACCAGGA CTTGTATCTG ATAAATTACT
701 TGCACTTTGG AGCACCGAAA CAATGGTACC TGATACCACA GAGCCAGCAC
751 GAAGAGTTCT ACGCATTGAT GGTTGATTTA TTCCACGATG AGTTCAAACA
801 GTGTAGTGAG TTTCTCCGAC ACAAGACGTT TATGGTGTCG CCCGCGTACC
851 TTGAAAAACA CGGCATTAGA GTGAACCACA CGATACACCG AGAGGGTGAG
901 TTTATTATCA CATACCCATA CGGATACCAT GCGGGGTTCA ACTACGACTA
951 CAACTTGGCA GAGTCGGTGA ACTTTGCGTT GGACGACTGG TTTGAGTTTG
1001 GGAAACGCAC CAAAAGTGT GAGTGCATTA GTGATTCTGT TGGGATCAAT
1051 ATTAAGCATT TATGGGAAAA GTATTACGGT ACGAAGTACG AGGCAGTGAA
1101 AGAGGAAGAT GGTCGGGATG GCGGACTTGA AGCTGACTCG GATGGCTCAA
1151 TAGAAGTGGT CAAGGTAGAG AAGATCCAAC GCAAGTGTCG CAAGAGAAAA
1201 CAAGACAATG TCCACACTAC AAATACACAT GAGAGGGTGT CCACAAAGAG
1251 ACCACACAAA CAACCAGACA TCCCTCATGA ATGTGCTCTT TGTCCCAACA
1301 CACTTCAACA CACTAAATAC TCCCATTCCG CTTTATTTGA GTTGCTACAA
```



1351 GCTGATACGT ATGGCACAAC ACCTGAGAGA CCCCCTCGAG TGCACAAGAT  
 1401 ATGTGCCAGT ATGTTCCCTC ATCAACTTAA ATGCGACTTT AAAACTAACA  
 1451 CAGTACACGG ACTAGATGAT ATTACCAAGA ACCAAAAGAA ACTACGCTGT  
 1501 GGTGTTTTGTC GTCAGAGTGA GATGGGAGCA TGTTTCCAAT GCAGTTATAA  
 1551 GAAATGCACT CGAGCATTCC ATGGCACTTG CGGGTTGGTT GATGGAGTTC  
 1601 AGTATGATTT TGATTCTGGA GAAGCATTCT GTAAATTCCA CCGCCAGGGC  
 1651 CCCACCTCAG CAGAGTTCAA AGTTGGAATG TATGTGCAGT TTTTGTTCAA  
 1701 CCACGGAGTA TATTTTGGAC AATTAGTCAA TTTGGGAGAT GGGGATGTTG  
 1751 AGGTTGAGGT GTATCCTTCT ACTCAAGATG TCATTGAAAT ACCAACGACA  
 1801 AGCATAATTA ATGTTGTATA A

Protein translation of the coding sequence.

Assembly 21, Ca21chr4:533639-531819C, translated using codon table 12 (606 residues)

orf19.2743 Length: 607 Thu May 29 12:49:44 2008 Type: P Check: 4201 ..

1 MQSVYPHKTT LHI<sup>Y</sup>EPSY<sup>Y</sup>DN GVPVFQPTMH EFRDFYNFNK AIN<sup>K</sup>YGMQSG  
 51 IVKVIPPTQW VSRVQKCYTE SNLEQVSIHN PIVQSINTNA PGIYQSQNIE  
 101 RYKKYSIFQW KEMAKTRKPP RRRQRGKSET ETHSKDIPFY NINTSEYTD  
 151 RCKELE<sup>T</sup>NYW RLSYSEPMY GADTMGSVFD KSITAWNVAH LPNLLDLMEE  
 201 KLPGVNQAYL YAGLWKA<sup>S</sup>FA WHLEDQDLYS INYLHFGAPK QWYSIPQSQH  
 251 EEFYALMVDL FHDEFKQCSE FLRHKTFMVS PAYLEKHGIR VNHTIHREGE  
 301 FIITYPYGYH AGFNVDYNLA ESVNFALDDW FEFGRKTKKC ECISDSVGIN  
 351 IKHLWEKYYG TKYEAVKEED GRDGGLEADS DGSIEVVKVE KIQKCRKRK  
 401 QDNVHTTNTH ERVSTKRPHK <sup>Q</sup>PD<sup>I</sup><sup>P</sup>HECAL CPNTLQ<sup>H</sup>TKY SHSALFELLO  
 451 ADTYGTTPER PRRVHKICAS MFPHQLKCDF KTNTVHGLDD ITKNQKLR  
 501 GVCQRSEMGA CFQCSYKCT RAFHG<sup>T</sup>CGLV DGVQYDFDSG EAFCKFHRQ  
 551 PTSAEFKVGM YVQFLFNHGV YFQQLVNLGD GDVEVEVYPS <sup>T</sup>QDVIEIPTT  
 601 SIINVV\*

註：加註方框者是和 orf19.2730 不同之胺基酸。

## 附錄 6：CGD 資料庫中和 DNA repair 相關的 ORF

### DNA repair

4 genes have been directly annotated to this term in the Manually Curated set

	Locus	Reference(s)	Evidence
DPB2	orf19.7564	<b>Backen AC, et al. (2000)</b> Evaluation of the CaMAL2 promoter for regulated expression of genes in <i>Candida albicans</i> . <i>Yeast</i> 16(12):1121-9	ISS
MRE11	orf19.6915	<b>Legrand M, et al. (2007)</b> Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in <i>Candida albicans</i> . <i>Eukaryot Cell</i> 6(12):2194-205	IMP
RAD50	orf19.1648	<b>Legrand M, et al. (2007)</b> Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in <i>Candida albicans</i> . <i>Eukaryot Cell</i> 6(12):2194-205	IMP
RAD52	orf19.4208	<b>Legrand M, et al. (2007)</b> Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in <i>Candida albicans</i> . <i>Eukaryot Cell</i> 6(12):2194-205	IMP

49 genes have been directly annotated to this term using computational analysis

	Locus	Reference(s)	Evidence
ACT1	orf19.5007	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
BDF1	orf19.978	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
CAC2	orf19.6670	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
DNA2	orf19.1192	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
DUN1	orf19.4002	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. <i>PLoS Genet</i> 1(1):e1	IEA
HTA1	orf19.6924	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
MGM101	orf19.2956	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
MPH1	orf19.2919	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
NBN1	orf19.878	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
RAD53	orf19.6936	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
REV3	orf19.7389	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. <i>PLoS Genet</i> 1(1):e1	IEA
RFC1	orf19.6891	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
RRD1	orf19.6792	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
SIT4	orf19.5200	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
THI4	orf19.5986	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. <i>PLoS Genet</i> 1(1):e1	IEA

VID21	orf19.3077	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
YAF9	orf19.5501	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
YKU80	orf19.2383	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. PLoS Genet 1(1):e1	IEA
	orf19.1137	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.139	CGD (2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.1429	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.1547	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.1734	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.2361	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.2417	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.2660	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.268	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. PLoS Genet 1(1):e1	IEA
	orf19.2713	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. PLoS Genet 1(1):e1	IEA
	orf19.2730	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. PLoS Genet 1(1):e1	IEA
	orf19.2743	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. PLoS Genet 1(1):e1	IEA
	orf19.2926	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.3083	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.3136	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.3476	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.3581	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.3648	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.4206	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.4412	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.5053	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.5416	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> gene products.	IEA
	orf19.5439	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the <i>Candida albicans</i> Genome. PLoS Genet 1(1):e1	IEA
	orf19.5623	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between <i>S. cerevisiae</i> and	IEA

	C. albicans gene products.	
orf19.6247	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between S. cerevisiae and C. albicans gene products.	IEA
orf19.6568	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between S. cerevisiae and C. albicans gene products.	IEA
orf19.7413	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the Candida albicans Genome. PLoS Genet 1(1):e1	IEA
orf19.7425	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between S. cerevisiae and C. albicans gene products.	IEA
orf19.7492	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between S. cerevisiae and C. albicans gene products.	IEA
orf19.7529	CGD(2008) Transfer of GO annotations based on orthology between S. cerevisiae and C. albicans gene products.	IEA
orf19.972	Braun BR, et al. (2005) A Human-Curated Annotation of the Candida albicans Genome. PLoS Genet 1(1):e1	IEA

---

ISS: Inferred from Sequence or structural Similarity

IMP: Inferred from Mutant Phenotype

IEA: Inferred from Electronic Annotation



## 附錄 7: RSA-Tools DNA pattern result of orf19.2730

### Patterns

seq	id	score
caan{5}cca	caan{5}cca tggn{5}ttg	0.14
cgcn{13}cag	cgcn{13}cag ctgn{13}gcg	0.09

### Matching positions

PatID	Strand	Pattern	SeqID	Start	End	matching_seq	Score
SEQ_START	DR	-	orf19.2730	-371	-371	-	0.00
SEQ_END	DR	-	orf19.2730	-1	-1	-	0.00
caan{5}cca tggn{5}ttg	D	caan{5}cca	orf19.2730	-369	-359	gtCAAATTTTCCAgctct	0.14
caan{5}cca tggn{5}ttg	D	caan{5}cca	orf19.2730	-237	-227	ttgtCAATATTGCCAtcaa	0.14
caan{5}cca tggn{5}ttg	D	caan{5}cca	orf19.2730	-39	-29	caacCAAACAGTCCAcctt	0.14
cgcn{13}cag ctgn{13}gcg	D	cgcn{13}cag	orf19.2730	-51	-33	tataCGCCATTGCACCCAAACAGtcca	0.09

