

## 中文摘要

白色念珠菌為一種伺機性的二倍體真菌，為造成院內感染的主要真菌之一，生活史中沒有發現有性生殖，白色念珠菌能以酵母菌型 (yeast form)、假菌絲型 (pseudohyphal form)、菌絲型 (true hyphal form)及孢子 (chlamydospores)等四種型態存在，型態間的轉換受環境條件影響，研究上發現白色念珠菌的致病能力主要就是來自白色念珠菌能自由的在酵母菌型與菌絲型之間做轉換 (morphogenesis)。

實驗室稍早利用抑制刪除雜交法(Suppression Subtractive Hybridization)比較了白色念珠菌長菌絲型 (SC5314)與酵母菌型 (HLC54)兩者之間表現量不同的基因，藉此對有可能造成型態變化的基因做出初步的判斷，結果發現在 37 有加血清的情況下 *ENG1* 的表現量在 HLC54 中大於野生株 SC5314。*ENG1* 可轉譯出 endo-1,3- $\beta$ -glucanase，此水解酶和白色念珠菌的細胞分裂有關，我利用同源重組置換的方式將 *ENG1* 剔除，之後對 *ENG1* 突變株進行性狀分析，結果發現 *ENG1* 對白色念珠菌的生長並沒有造成顯著的影響，但細胞分裂時細胞間會出現聚集的現象，顯示出 *ENG1* 可能和細胞分裂有關；*ENG1* 突變株在有加血清的 Bacto agar 上出現了兩種不同的型態，且對某些培養基的侵犯力增加，但就芽管的生成與否則沒有太大的差異。此外文獻指出篩選標記 *URA3* 可能對白色念珠菌的型態造成影響，於是我利用篩選標記 *HIS1* 去取代 *URA3*，結果顯示篩選標記 *URA3* 在某些情況下看似會促進白色念珠菌菌絲的生長。

## Abstract

*Candida albicans* is an obligate diploid, apparently asexual fungus with a nuclear genome of 16 million base pairs. This is larger than that of *Saccharomyces cerevisiae*. *Candida albicans* can undergo morphological conversion between yeast and filamentous (including pseudohyphal and hyphal form) forms depending upon various environmental conditions. Studies indicate that this conversion between yeast and filamentous forms are important to virulence of *Candida albicans*.

Previously, research in the laboratory has used Suppression Subtractive Hybridization method to demonstrate that the RNA expression level of *ENG1* was different between the wild type strain and the double mutant strain(*cph1/cph1 efg1/efg1*) of *Candida albicans* in 37 with the presence of serum. The *ENG1* gene encodes an endo-1,3-beta-glucanase that is important to cell division of *Candida albicans*. I have knocked out the *ENG1* gene in *Candida albicans* by homologous recombination. Disruption of the *ENG1* gene in *Candida albicans* has no dramatic effects on the growth rate of the strain, but resulted in the formation of chains of cells, suggesting that the protein was involved in cell separation. Besides, while colony morphology on Bacto serum agar and invasion assay showed some distinction between the wild type strain and the *eng1/eng1* mutant strain, germ tube assay displayed only little distinction. The *URA3* marker (Ura-blaster methodology) had advanced understanding of the relationship between gene structure and function in *Candida albicans*. In order to verify the possibility that presence of *URA3* may affect the morphogenesis of *Candida albicans*, I have also replaced *URA3* marker with *HIS1* marker by homologous recombination, and attempted to observe differences. The results showed that *URA3* marker may associate with morphogenesis and enhancement of hypha growth.

## 誌謝

兩年的時光說長不長，說短也不短，說到底也就這麼過去了。首先很慶幸我遇到了一位好老師，他不僅在實驗方面悉心指導，他的直言不晦更是讓我了解到許多做人做事應有的態度，使我獲益良多，對即將進入職場我而言，這無疑是最好的一份大禮，他就是我的指導教授楊昀良老師，學生在此由衷的感謝。

實驗室的生活雖然忙碌，朋友的陪伴卻也為實驗室生涯增添了許多不同的色彩，雖然學長姐現在都已各分東西，但是建孝的獨立，柏吟的好脾氣，嘉嘉愛打屁，這些都依然映在我的腦海裡；寶裡寶氣的杏枚大美女，怡瑾大聲公的威力，昶文的幽默逗趣，秉博無盡的支持與鼓勵，還有戴老師所講述的官場現形記，這些都是陪伴我走過兩年歲月的最佳回憶；總機小姐欣彬十分善解人意，電腦高手育穎有十足霸氣，行蹤飄忽的金蓉愛裝神秘，冷面笑匠旻秀很淘氣，淑萍虧我是不遺餘力，外加阿毛老是笑嘻嘻，總讓我好奇他倆在玩啥把戲。此外還有惠敏、敏書、淑貞、晨圃、毓偉、小倩、萍芳、小頭、Link，有了你們大家，實驗室不僅只是科學研究的寶地，更展現出了一個大家庭的美麗。

兩年期間家人的支持也是完成研究所學業不可或缺的動力，是你們提供了我這樣無後顧之憂的幸福環境，讓我能一心面對課業。也十分感謝口試委員彭慧玲老師、藍忠昱老師和謝家慶老師對這篇論文所提出的建議與指正，還有林苔吟老師在大學專題時期的指導。這一路上受到許多人的照顧，一時半刻也說不清楚，得之於人者太多，出之於己者太少，套句陳之藩所說過的話：「要感謝的人太多了，不如就謝天吧。」

## 目錄

中文摘要 .....	i
英文摘要 .....	ii
誌謝 .....	iii
目錄 .....	iv
圖目錄 .....	ix
表目錄與附錄目錄.....	xi
一、緒論 .....	1
1.1 白色念珠菌 .....	1
1.2 酵母菌型與菌絲型之間的型態轉變 .....	2
1.3 白色念珠菌的細胞壁之組成和相關研究 .....	4
1.3.1 白色念珠菌細胞壁的功能及組成成份 .....	4
1.3.2 真菌細胞壁相關基因之研究 .....	4
1.3.3 白色念珠菌細胞壁和型態轉變或致病之關聯 .....	5
1.4 <i>ENG1</i> 之相關研究 .....	7
1.4.1 麵包酵母中 <i>ENG1</i> 之研究 .....	8
1.4.2 裂殖酵母中 <i>ENG1</i> 之研究 .....	9
1.5 本論文之源起與研究目標 .....	10
1.5.1 <i>ENG1</i> 功能之分析 .....	10
1.5.2 不同篩選標記之影響 .....	11
二、材料、藥品與儀器 .....	13
2.1 菌株 .....	13
2.2 質體 .....	14
2.3 引子 .....	15

2.4 化學藥品 .....	17
2.5 緩衝溶液及溶劑 .....	19
2.6 培養基配製 .....	20
2.7 儀器設備 .....	21
三、方法與步驟 .....	22
3.1 質體 DNA 的製備 .....	22
3.2 聚合酶連鎖反應 .....	22
3.2.1 一般 PCR 反應 .....	22
3.2.2 Fusion PCR .....	23
3.3 限制酶反應 .....	24
3.4 萃取洋菜膠內之 DNA 片段 .....	24
3.4.1 結晶紫洋菜膠的製備 .....	24
3.4.2 洋菜膠內之 DNA 片段之萃取 .....	24
3.5 DNA 連結反應 .....	25
3.6 大腸桿菌勝任細胞的轉形 .....	25
3.6.1 大腸桿菌勝任細胞的製備 .....	25
3.6.2 勝任細胞的轉形 .....	26
3.7 麵包酵母的轉形 .....	26
3.8 $\beta$ -galactosidase 活性分析 .....	27
3.8.1 Filter $\beta$ -galactosidase assay .....	27
3.8.2 蛋白質的製備 .....	27
3.8.3 酵素活性的測定 .....	27
3.9 真菌質體的取得 .....	28
3.10 萃取 RNA(RNA extraction) .....	28

3.11 北方墨點法(Northern blot analysis)	30
3.11.1 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling)	30
3.11.2 轉漬 RNA (transfer)	30
3.11.3 雜交反應(hybridization)	31
3.11.4 免疫偵測 (detection)	31
3.12 萃取染色體 DNA	31
3.12.1 方法一	31
3.12.2 方法二	32
3.13 白色念珠菌轉形(transformation)	33
3.14 突變株之性狀分析(characterization)	34
3.14.1 生長曲線之測定	34
3.14.2 誘發菌絲生長環境觀察型態改變	34
3.14.3 芽管試驗(germ tube assay)	34
3.14.4 侵犯力分析 (invasion assay)	34
四、結果	35
4.0 源起	35
4.1 序列比對(BLAST)	35
4.2 利用北方墨點法分析基因表現量	36
4.3 建構 <i>ENG1</i> 雙套基因破壞株之結果	36
4.3.1 利用 fusion PCR 取得含有欲破壞基因相同序列之 DNA 片段	37
4.3.2 以 PCR 確認 <i>ENG1</i> 單套基因之破壞	38
4.3.3 以 PCR 確認 <i>ENG1</i> 雙套基因已被篩選標記 <i>ARG4</i> 與 <i>URA3</i> 破壞	38
4.3.4 以 PCR 確認 <i>ENG1</i> 雙套基因已被篩選標記 <i>ARG4</i> 與 <i>HIS1</i> 破壞	39

4.4	<i>ENG1</i> 雙套基因破壞株北方墨點法之結果.....	39
4.5	<i>ENG1</i> 雙套基因破壞株之性狀分析.....	40
4.5.1	YPD 培養液中各個不同突變株之生長曲線.....	40
4.5.2	芽管試驗(germ tube assay)之結果.....	41
4.5.3	觀察菌落在 YPD 培養基上之生長.....	41
4.5.4	觀察菌落在 solid spider 培養基上之生長.....	42
4.5.5	侵犯力分析(invasion assay)之結果.....	43
4.5.6	觀察菌落在有加山羊血清的 Bacto agar 培養基之生長.....	43
4.6	<i>ENG1</i> 基因、篩選標記 <i>URA3</i> 和 <i>HIS1</i> 的重置.....	44
4.7	各式重置質體的建構.....	45
4.7.1	建構帶有 <i>ENG1</i> 基因啟動子的質體.....	45
4.7.2	將篩選標記 <i>URA3</i> 殖入質體 pCHEO1 中.....	45
4.7.3	建構帶有 <i>ENG1</i> 基因啟動子和 <i>ENG1</i> 基因的質體.....	46
4.7.4	將篩選標記 <i>URA3</i> 殖入質體 pCHEOE2 中.....	46
4.7.5	建構帶有篩選標記 <i>HIS1</i> 和 <i>ENG1</i> 基因啟動子的質體.....	47
4.8	以 PCR 確認各質體在 <i>eng1/eng1</i> 突變株內之重置.....	47
4.8.1	以 PCR 確認篩選標記 <i>HIS1</i> 在 <i>eng1/eng1</i> 雙套基因突變株之重置.....	47
4.8.2	以 PCR 確認篩選標記 <i>URA3</i> 在 <i>eng1/eng1</i> 雙套基因突變株之重置.....	48
4.8.3	以 PCR 確認基因 <i>ENG1</i> 在 <i>eng1/eng1</i> 雙套基因突變株之重置.....	48
4.9	各重置菌株的性狀分析.....	48
4.9.1	芽管試驗(germ tube assay)之結果.....	48

4.9.2 觀察菌落在 YPD 培養基上之生長.....	49
4.9.3 觀察菌落在 solid spider 培養基上之生長.....	50
4.9.4 侵犯力分析(invasion assay)之結果.....	50
4.9.5 觀察菌落在有加山羊血清的 Bacto agar 培養基之生長.....	51
4.10 利用報導基因 <i>lacZ</i> 檢驗 <i>ENG1</i> 啟動子的作用.....	52
五、討論.....	53
5.1 北方墨點法確認白色念珠菌基因 <i>ENG1</i> 在型態不同菌株之表現量.....	53
5.2 以 fusion PCR 備製具有 <i>ENG1</i> 同源重組區和篩選標記之 DNA 片段 進行同源重組置換.....	54
5.3 以北方墨點法檢驗白色念珠菌 <i>ENG1</i> 雙套基因突變株 <i>ENG1</i> 之表 現.....	55
5.4 篩選標記的重置和 <i>ENG1</i> 的重置.....	56
5.5 <i>ENG1</i> 雙套基因破壞株性狀之探討.....	56
5.5.1 生長曲線.....	56
5.5.2 芽管測試結果之探討.....	57
5.5.3 菌落型態和侵犯力之探討.....	58
5.5.4 YPD 培養基菌落型態之探討.....	59
5.5.5 bacto agar 菌落型態之探討.....	60
5.6 結語與未來展望.....	61
六、參考文獻.....	62



## 圖目錄

圖一 A、序列 SB265 比對結果.....	66
圖一 B、序列 SB265 比對結果.....	67
圖一 C、序列 SB240 比對結果.....	68
圖二、 <i>ENG1</i> 和 <i>GS</i> 北方墨點法之結果.....	69
圖三、Fusion PCR 流程示意圖.....	70
圖四、Fusion PCR 產物.....	71
圖五、PCR 確認 <i>ENG1</i> 單套基因之破壞.....	72
圖六、PCR 確認 <i>ENG1</i> 雙套基因以被篩選標記 <i>ARG4</i> 、 <i>URA3</i> 破壞.....	73
圖七、PCR 確認 <i>ENG1</i> 雙套基因以被篩選標記 <i>ARG4</i> 、 <i>HIS1</i> 破壞.....	74
圖八、 <i>ENG1</i> 雙套突變株北方墨點法之結果.....	75
圖九、各種突變株在 YPD 培養液中的生長型態.....	76
圖十 A、芽管試驗(germ tube assay) in 37 °C with serum.....	77
圖十 B、芽管試驗(germ tube assay) in 30 °C with serum.....	78
圖十 C、芽管試驗(germ tube assay) in 37 °C no serum.....	79
圖十 D、芽管試驗(germ tube assay) in 30 °C no serum.....	80
圖十一 A、各種突變株在 YPD 培養基上的生長型態.....	81
圖十一 B、各種突變株在 YPD 培養基上的生長型態.....	82
圖十二、菌株在 solid spider 培養基上形成的菌落型態.....	83
圖十三、侵犯力試驗(invasion assay) .....	84
圖十四、各種突變株在 Bacto agar 培養基上的生長型態.....	85
圖十五、Construction of pCHEO1.....	86
圖十六、以限制酶檢驗質體 pCHEO1.....	87

圖十七、Construction of pCHEO1U.....	88
圖十八、以限制酶檢驗質體 pCHEO1U.....	89
圖十九、Construction of pCHEOE2.....	90
圖二十、以限制酶檢驗質體 pCHEOE2.....	91
圖二十一、Construction of pCHEOE2U.....	92
圖二十二、以限制酶檢驗質體 pCHEOE2U.....	93
圖二十三、Construction of pCHEOH3.....	94
圖二十四、以限制酶檢驗質體 pCHEOH3.....	95
圖二十五 A、以質體重置 <i>ENG1</i> 啟動子和篩選標記於 <i>eng1/eng1</i> 突變株流 程圖.....	96
圖二十五 B、以質體重置含啟動子之 <i>ENG1</i> 於 <i>eng1/eng1</i> 突變株流程圖...97	97
圖二十六、PCR 確認 <i>eng1/eng1</i> 基因突變株(BAU)已經篩選標記 <i>HIS1</i> 重 置.....	98
圖二十七、PCR 確認 <i>eng1/eng1</i> 基因突變株(BAH)已經篩選標記 <i>URA3</i> 重 置.....	99
圖二十八、PCR 確認 <i>eng1/eng1</i> 基因突變株(BAH)已經 <i>ENG1</i> 和篩選標記 <i>URA3</i> 重置.....	100
圖二十九 A、芽管試驗(germ tube assay) in 30 .....	101
圖二十九 B、芽管試驗(germ tube assay) in 37 .....	102
圖三十、各突變株在 YPD 培養基上的生長型態.....	103
圖三十一、各突變株在 solid spider 培養基上之型態與分佈.....	104
圖三十二、各種突變株之侵犯力分析.....	105
圖三十三、各種突變株在 bacto agar 培養基上的生長型態.....	106
圖三十四、利用報導基因 LACZ 檢驗 <i>ENG1</i> 啟動子的作用.....	107

## 表目錄與附圖目錄

表一、Glucanase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> or <i>Candida albicans</i> .....	108
表二、Germ tube assay 結果整理.....	109
表三、 <i>ENG1</i> 相關突變株之建構流程.....	110
附圖一、 <i>Candida albicans</i> 細胞壁之組成成份.....	111
附圖二、白色念珠菌之細胞壁結構.....	112
附圖三、 <i>ENG1</i> 在各物種之蛋白質序列比對結果.....	113
附圖四、倍增時間計算公式.....	114

