

一、緒論

1940 年後真菌的研究為我們帶來了可以對抗細菌的抗生素，讓每次戰爭時令人聞之色變的「細菌感染」不再使人驚顛，也讓人類免於遭受細菌所帶來的種種災難，但真菌本身所引起的疾病依舊困擾著人類的的生活。而且近年來，真菌感染造成的疾病有逐漸增加的趨勢，念珠菌屬為常見的真菌病原菌之一，種類可分為八十幾種，其中以常造成人體感染而致病的白色念珠菌即為重要的念珠病原菌之一(Hsueh *et al.*, 2002)。白色念珠菌為一種伺機性病原菌，平時存在人體的表面皮膚、口腔、腸胃道、泌尿生殖道內。正常情況下，且可與人體其它各種正常微生物保持平衡，但是當人體的免疫系統機能降低，或是白色念珠菌大量增加時，則會造成疾病。高危險群包括接受化療、燒燙傷、愛滋病、因器官移植而使用免疫抑制劑等病患，以及抵抗力不佳的新生兒、老年人。由於高危險群之人數越來越多，使其研究日益受到重視。真菌感染上升的趨勢在台灣也不例外，自 90 年代以後，白色念珠菌及其他真菌成為院內感染的主要致病菌之一(Chen *et al.*, 1997)，目前可使用的藥物雖不少，但是由於白色念珠菌和人類皆屬於真核生物，使得針對抑制 DNA、RNA、蛋白質合成所設計的藥物也易對人體造成副作用(De Backer *et al.*, 2000)。由於其感染有日益普遍的趨勢，對白色念珠菌的研究也更加受到重視。

1.1 白色念珠菌

白色念珠菌為最常見的真菌致病菌，由於病例逐年增加，抗真菌藥物的使用日漸頻繁，抗藥菌株也因而出現(White *et al.*, 1998)。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(chlamydo-spores)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變(morphogenesis) (Odds, 1994; Lo *et al.*, 1997; Ernst, 2000)，故可知具有生成菌絲型的能力為白色念珠菌產生致病性不可或缺的條件之一。其它如：對宿主細胞的黏附能力、產生分解酵素、表現型的改變(phenotypic switch)也會影響致病能力。

1.2 酵母菌型與菌絲型之間的型態轉變 (morphogenesis)

白色念珠菌能以酵母菌型(yeast form)、假菌絲型(pseudohyphal form)、真菌絲型(true hyphal form)、孢子型(chlamydo-spores)四種型態存在，酵母菌型有助於將菌體散佈至宿主其他位置，菌絲型則可能有助於逃避巨噬細胞之攻擊、侵犯組織，且型態間轉變可能與致病能力有關(Mitchell, 1998)。而這樣的轉變會受生長條件不同影響如：溫度、酸鹼值、氮源或碳源是否充足、細胞密度等(Ernst, 2000)。在溫度約 37°C 或 pH 大於 6.5 等情況下(仿人體環境)，結合其它不同的因素，會促使白色念珠菌以菌絲型態生長；另外血清亦為誘發菌絲生長的因素之一，在含有血清的培養基中進行培養，能誘發菌絲的生長。這些生長條件影響型態間的轉變是透過多種不同的訊息傳遞途徑來調控，如：cAMP-PKA (cyclic AMP-protein kinase A)、MAPK (mitogen-activated protein kinase)等。

cAMP-PKA 途徑包括 Tpk2p 及 Efg1p, Tpk2p 為蛋白激酶(protein kinase A)，在訊息傳遞途徑中位於 Efg1 上游，透過磷酸化的進行活化 Efg1(Sonneborn *et al.*, 2000)，而 Efg1p 為 basic helix-loop-helix (bHLH)轉錄因子，能直接鍵結到菌絲基因促進子(promoter)上的 E-box (5'-CANNTG-3')，調控特定菌絲基因(hyphal-specific gene, HSG)表現，這

些特定菌絲基因包括 *HYR1*、*HWPI*、*ALS3*、*ALS8*、*ECE1* 等(Leng *et al.*, 2001; Stoldt *et al.*, 1997)。MAPK 途徑由 MAPK cascade 及 Cph1p 進行傳遞，MAPK cascade 包括 Cst20p-Hst7p-Cek1p，而 Cph1p 位於 MAPK 下游，和調控麵包酵母 *S. cerevisiae* 假菌絲的訊息傳遞途徑中的轉錄因子 Ste12 功能相似(Liu *et al.*, 1994)。

若將 cAMP-PKA 途徑中之 *EFG1* 過度表現，會增加菌絲生長；將 *EFG1* 突變破壞(*efg1/efg1*)，則會抑制菌絲的生長(Lo *et al.*, 1997)。若將 MAPK 途徑之 *CPH1* 突變破壞(*cph1/cph1*)，在 Spider 固態培養基中會降低菌絲生長，但仍受血清誘發菌絲生長(Kohler *et al.*, 1996)，這表示除 cAMP-PKA 及 MAPK 途徑外，尚有其他與菌絲調控有關的訊息路徑。若同時將 *EFG1* 及 *CPH1* 突變破壞(*cph1/cph1 efg1/efg1*)，則抑制 Spider 固態培養基及血清中之菌絲生長，而將此雙基因突變株於老鼠體內進行致病力分析，發現老鼠的死亡率大幅降低，表示雙基因突變株之致病力下降(Lo *et al.*, 1997)。而 *Tup1p*、*Nrg1p* 及 *Rfg1p* 對白色念珠菌之型態轉變扮演負向調控的角色，將 *TUP1*、*NRG1* 或 *RFG1* 作 homozygous 突變破壞(*tup1/tup1*、*nrg1/nrg1*、*rfg1/rfg1*)，則呈現菌絲狀生長的情況；若將這些基因突變株於老鼠體內進行致病力分析，發現老鼠的死亡率並無顯著的差別(Braun *et al.*, 1997; Kadosh *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001; kadosh *et al.*, 2005)，表示調控型態轉變的因子並非一定是致病因子。目前是否有其他因子受這些訊息傳遞途徑調控，或是有其他的訊息傳遞機制仍不清楚，而且調控型態轉變的因子不一定是致病因子，但是這些因子可能透過對型態的轉變而影響致病力，實驗室的目標即是在藉由研究白色念珠菌之相關基因在基因突變前後是否有形態(酵母菌型或菌絲型)變化，進一步研究其致病力，希望找到與抗致病力有關的基因。

1.3 白色念珠菌細胞壁之組成和相關研究

1.3.1 白色念珠菌細胞壁的功能及組成成份

白色念珠菌之細胞壁位在細胞結構的最外層，在其入侵宿主細胞產生交互作用時扮演著重要的角色，包括誘發及調節對抗念珠菌的宿主免疫反應 (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006)，並可使細胞在不同滲透壓下維持完整、避免外來物傷害、決定細胞週期中之細胞形態、黏附宿主等功能 (Cid *et al.*, 1995)。白色念珠菌細胞壁成份主要是由碳水化合物 (80~90%)，其它還有一些脂質 (2~14%) 和蛋白質 (5~15%) 所組成 (Calderone *et al.*, *Candida and Candidiasis*, p159)，醣類主要是以 1,3- β -glucan、1,6- β -glucan (合計約 30~60%) 及 chitin (1~2%) 等三種醣類為主 (附圖一之 B)，並沒有 α -glucan 的發現，mannosylated protein 也是重要成份之一 (25~50%)。白色念珠菌細胞壁的結構主要是以 1,3- β -glucan 做為白色念珠菌細胞壁的基底，其上支鏈鍵結 mannosylated protein、chitin 及 1,6- β -glucan 等，形成白色念珠菌複雜的三度空間細胞壁 (附圖一之 A)，研究指出白色念珠菌的細胞壁約有 4 到 8 層 (Poullain *et al.*, 1978)，可概分為外部層 (outer layer) 和內部層 (inner layer)，外層電子密度較內層密集，和宿主作用有關的 mannoprotein 也多集中在外部層 (附圖二)。和麵包酵母的細胞壁比較，白色念珠菌的細胞壁厚且鍵結較複雜，但就細胞壁組成的成份而言大致和麵包酵母細胞壁成份相似 (Prescott *et al.*, *Microbiology*, p552)。

1.3.2 真菌細胞壁相關基因之研究

現階段對真菌細胞壁的研究大致上分為兩個方向，依細胞壁的主要成份可分為 chitinases 和 glucanase 兩類，chitinases 方面，例如在麵包酵母中裂解主要隔壁和可抑制假菌絲生長的 *CTS1* (Kuranda *et al.*, 1991; King *et al.*,

1998), 研究中發現將麵包酵母內的轉錄因子 *ACE2* 剔除後, 會促使雙倍體的麵包酵母生成假菌絲, 且對培養基的侵犯力增加, 單倍體麵包酵母雖不長菌絲但對培養基的侵犯力也增加, 因 *CTS1* 的表現量只受 Ace2p 單獨調控 (Dohrmann *et al.*, 1996; Toyn *et al.*, 1997), 外加在假菌絲菌株中測得的幾丁質裂解酶含量均降低, 故推測 *CTS1* 這個幾丁質裂解酶和假菌絲的生長有關; 其它和細胞壁有關的基因研究尚有影響孢子和子實體生成的 *CTS2* (Giaver *et al.*, 2002)、在白色念珠菌細胞分裂時大量表現以分裂幾丁質的 *CHT1*、*CHT2*、*CHT3* (McCreath *et al.*, 1995; McCreath *et al.*, 1996) 等。glucanase 方面有(表一):影響真菌細胞分裂完全與否的 *ENGL1* (Baladron *et al.*, 2002; Martin-Cuadrado *et al.*, 2003)、可能會造成麵包酵母生長速率變慢的 *SCW* (Cappellaro *et al.*, 1998)、影響麵包酵母細胞分裂和假菌絲生長的 *DSE2* (Doolin *et al.*, 2001)、若遭刪除會造成型態缺陷和 1,3- β -glucan 鍵結不完全的 *GAS1* (Popolo *et al.*, 1999), 此基因也被證實和某些真菌的致病性有關, 在麵包酵母中同樣行 endo-1,3- β glucanase 功能的 *BGL2* (Goldman *et al.*, 1995)、在麵包酵母中行 exoglucanase 的 *EXG1/EXG2/SSG1* (Larriba *et al.*, 1995) 等。以上這些基因大致上的功能皆與細胞壁糖類的裂解有很大的關係, 不過分泌的時機和作用的位置不盡相同, 故個別基因的功能和造成的影響也有些差異, 主要是影響了細胞的分裂或生長。上述細胞壁基因多是在麵包酵母或裂殖酵母中進行, 重點多著重在細胞生長與分裂方面之研究, 對菌絲的生成或致病性的資訊相對較少。

1.3.3 白色念珠菌細胞壁和型態轉變或致病之關聯

白色念珠菌侵入宿主時, 細胞壁會促進菌體的表面分子和受體進行交互作用 (Braun *et al.*, 1997), 而與宿主的內皮細胞或胞外基質蛋白結合的分

子，多為一些多醣類和醣蛋白擔任，以達到黏附宿主的目的，和白色念珠菌細胞壁的主要成份相符。白色念珠菌的細胞壁的醣類成份中，主要是 chitin、1,3- β -glucan、1,6- β -glucan 和 mannan，在不同形態的細胞中比例各自不同，白色念珠菌在生成菌絲之前，胞體內的細胞質會先膨脹，在菌體外先生成芽形的管狀物，稱為芽管(germ tube)，glucan 會阻礙芽管的延伸，故芽管的增長通常伴隨著 glucan 的裂解，其後靠近母體出芽部份的細胞壁會逐漸向出芽頂端加厚，生成菌絲(hyphae)，其過程間牽涉了細胞壁成份的裂解與重組，雖然酵母態和菌絲態的細胞壁主要成份變動不大(附圖一之 B)，且就 glucan 來看，酵母態和菌絲態的細胞壁皆有約 30-39% 的 β -1,3 linkages 和 43-53% 的 β -1,6 linkages，但是在形成芽管時 β -1,3 linkages 的比例上升到 67%，而 β -1,6 linkages 則下降到 14% 左右(Ruiz-Herrera *et al.*, 2006)，所以生長菌絲的過程中細胞壁的成分確實處於持續的改變中。也有文獻指出(Torosantucci *et al.*, 2000)白色念珠菌形成菌絲態後，細胞壁內的 β -1,6 glucan 比例會有明顯的下降，在其他的真菌如皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)，菌絲生成前後細胞壁之組成也會有所變動，皮炎芽生菌酵母菌型的細胞壁大約有 95% 的 1,3- α -glucan 和 5% 的 1,3- β -glucan，但菌絲型的細胞壁則為 60% 的 1,3- β -glucan 和 40% 的 1,3- α -glucan。

白色念珠菌也藉由細胞壁上的 glucan 直接抑制了單核白血球(monocyte)功能和間接抑制 T 細胞(T-cell)的作用 (Nakagawa *et al.*, 2003)，一方面也直接和宿主的接受器(receptor)發生作用，刺激免疫反應的產生，dectin-1 即為辨認 β -glucan 的一個接受器，dectin-1 和 β -glucan 的結合使 β -glucan 更容易被巨噬細胞吞噬，一般而言白色念珠菌會藉由細胞壁上的其它成份保護 β -glucan，即便是在 β -glucan 容易外露的出芽分裂時期也不例外，因為菌絲態的白色念珠菌沒有出芽分裂的機制，相對降低了 β -glucan

被接受器 dectin-1 辨認的危險，使得菌絲態的白色念珠菌可以更效率的附著於宿主的組織上(Gantner *et al.*, 2005)，故由以上可知 glucan 非但是白色念珠菌細胞壁的主要成份，也和白色念珠菌的致病性有所關聯。

白色念珠菌的致病性亦和酵母態、芽管態和菌絲態細胞壁上的陰離子(anionic complexes)有關係(Horisberger *et al.*, 1988)，在菌絲態時，陰離子在細胞壁中會特別的豐富，尤其是靠近菌絲頂點處，陰離子可幫助在白色念珠菌在胞外形成絨毛狀(fuzzy coat)的菌絲，增加其對宿主的黏附性。此外，細胞壁的疏水性對細胞的致病能力和形成菌絲也十分重要，白色念珠菌疏水性主要來自於細胞壁外層的多醣類，白色念珠菌倚靠細胞壁的疏水特性去黏附並感染宿主(Cao *et al.*, 2005)，故有些和菌絲生長有關的酵素、幾丁質分解酶和某些蛋白等，都需要靠細胞壁的疏水特性來輔助其作用。

1.4 *ENGI* 之相關研究

白色念珠菌之 *ENGI* 基因為一對偶基因，分別位於 Contig19-20163 中的 Orf19.10584 (3441 bp, 1146 a.a.)和 Contig19-10163 中的 Orf19.3066 (3438 bp, 1145 a.a.)，主要可以轉譯出蛋白 endo-1,3- β glucanase，為一種 glucan 的水解酶，可以分解醣類 glucan 彼此之間的 1,3- β 共價鍵(非為 1,6 共價鍵)，沒有 intron。因為白色念珠菌為二倍體生物，且未發現有性世代，其有細胞壁厚、沒有已知質體、轉型效率低等缺點，故實驗相關操作上較為困難，除了 Pedro Felipe Esteban 於 2005 年 Current Microbiology 所發表的 *ENGI* 相關文獻是於白色念珠菌中操作外，其於文獻大部份對 *ENGI* 之研究多在麵包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中進行。就序列上來看，白色念珠菌和麵包酵母 (*S.cerevisiae*) 中的基因 *ENGI* 和 *ENG2*、裂殖酵母 (*S.pombe*) 中的 *ENGI* 有很高的同源性，雖然

白色念珠菌、麵包酵母和裂殖酵母三種生物間彼此的親緣關係並不接近，但就基因 *ENGI* 而言卻保留了大部份的核苷酸序列，且蛋白質序列的保留度相對也較高(附圖三)，蛋白質序列上主要的差別乃在於白色念珠菌的 Eng1p 其 Ser-Thr rich region 序列較長，且前端帶有一段特殊的 poly-Gln stretch (Esteban *et al.*, 2005)；白色念珠菌之 Eng1p 和麵包酵母的 Eng1p 約有近 54%的胺基酸相似度，和裂殖酵母的 Eng1p 也有近 31%的胺基酸相似度(Baladron *et al.*, 2002)。

1.4.1 麵包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中 *ENGI* 之研究

據文獻指出麵包酵母的 *ENGI* 和 endo-1,3- β glucan 的裂解有關，由比較麵包酵母野生株和 *ACE2* 突變株內 *ENGI* 的 RNA 表現量，發現 *ACE2* 突變株中 *ENGI* 的表現量會大幅度的降低，故 *ENGI* 的表現量會受到轉錄因子(transcription factor) *ACE2* 的調控，其次將麵包酵母利用不同的培養液培養，將麵包酵母控制在生長期(vegetative process)和生孢期(sporulation process)，分別在這兩種時間點比較 *ENGI* 的 RNA 表現量，發現 *ENGI* 表現量在生長期為最高，在生孢期則沒有表現或是表現量較少。在生長期分別萃取出細胞上清液和菌體本身的蛋白質進行 HA 免疫分析，發現 Eng1p 在上清液中表現量較高，且上清液 1,3- β glucanase 的活性也較高，分析其蛋白質序列，顯示 Eng1p 在 N'端帶有一段疏水的區域，似一種分泌的訊號(secretion signal)，故推測其作用的位置很有可能在胞外(membrane or cell wall)，而非在胞內。在顯微鏡下觀察麵包酵母 *ENGI* 突變株和麵包酵母野生株細胞分裂的情況，發現麵包酵母的 *ENGI* 突變株細胞間會造成明顯的聚集現象(cluster)，類似細胞分裂時產生阻礙，導致分裂的不完全，故推測麵包酵母之 *ENGI* 可能和細胞分裂時隔壁的裂解有關(Mrsa *et al.*, 1993;

Mosch *et al.*, 1999; Baladron *et al.*, 2002)。

1.4.2. 裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中 *ENGI* 之研究

另一個對基因 *ENGI* 研究較透徹的則是在裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)中，裂殖酵母的 *ENGI* 基因也和醣類 1,3- β glucan 的裂解有關，有文獻利用裂殖酵母的 *cdc* 溫度敏感突變株控制其開始生長的時間，於不同時間點收細胞抽取 RNA，利用北方墨點法比較 *ENGI* 在不同時間的 RNA 表現量，測知 *ENGI* 在開始分裂後 50 分鐘左右表現量最高，已知裂殖酵母行細胞分裂時隔壁生成的時間約為 70~90 分鐘，故 *ENGI* 約在隔壁生成前大量表現。在電子顯微鏡下觀察裂殖酵母野生株和裂殖酵母 *ENGI* 突變株細胞分裂時的差異，發現裂殖酵母的主要隔壁 (primary septum) 在 *ENGI* 突變株中並無分解的現象，且因 1,3- β glucan 為在裂殖酵母主要隔壁的成份，故裂殖酵母之 *ENGI* 很有可能和主要隔壁的裂解有關。若將 *ENGI* 基因剔除，則裂殖酵母的分裂會受到阻礙，而形成分裂不完全的聚集現象 (cluster)，此外藉由綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein) 嵌入 *eng1p* 中，也可以測知 *eng1p* 分泌的位置為細胞間的隔壁區中 (septal region)。

除了基因 *ENGI* 外，裂殖酵母的基因 *AGNI* 也和 septum 的裂解有關，*AGNI* 在裂殖酵母中扮演著 endo-1,3- α glucanase 的角色，由電子顯微鏡下比較裂殖酵母 *AGNI* 突變株和野生株分裂時的差異，發現兩個子細胞間頂端的隔壁邊緣 (septum edging) 分裂受到了阻礙，而 1,3- α glucan 為隔壁邊緣 (septum edging) 的主要成份，故推測基因 *AGNI* 和隔壁邊緣的裂解有關。一般推測裂殖酵母細胞分裂時 endo-1,3- α glucanase 先行分解了隔壁邊緣後，*ENGI* 所管控的 endo-1,3- β glucanase 接著才可作用在 primary septum，使兩子細胞完成分裂，若缺少了 *ENGI* 或 *AGNI* 兩基因中的任一

個，皆會造成分裂的不完全。其它像某些 transcription factor 如 *SEPI*、*ACE2* 等，會影響 *ENG1* 和 *AGN1* 的表現量，其中以 *ACE2* 這個轉錄因子較為明顯，當 *ACE2* 遭到剔除，*Agn1p* 幾乎不會表現，而 *Eng1p* 表現量也下降，也間接對裂殖酵母的細胞壁分裂造成了影響 (Dekker *et al.*, 2004; Martin-Cuadrado *et al.*, 2003; Martin-Cuadrado *et al.*, 2005)。

總結以上的結論，上述真菌中 *ENG1* 的功能已被確定為 1,3- β glucan 的水解酵素，約是在細胞分裂時的胞外進行作用，突變掉上述這些 *ENG1* 相關的基因並不會造成母體的死亡或明顯生長的趨緩，而是在某些程度上增加了細胞分裂的阻礙，使細胞間的分裂變得不完全，因為麵包酵母和裂殖酵母的長菌絲態並不明顯(一般只出現假菌絲態)，故基因 *ENG1* 的突變對菌絲生長的影響並沒有被廣泛的研究。且由以上的資料顯示，*ENG1* 所執行的功能在麵包酵母或裂殖酵母中是可以被補償的，詳細的補償機制並不清楚，所以對細胞壁基因之間的相互影響亦在摸索之中。

1.5 本論文之源起與研究目標

1.5.1 *ENG1* 功能之分析

實驗室稍早利用抑制刪除雜交法(Suppression Subtractive Hybridization, 簡稱 SSH)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，這些有差異的基因可能與菌絲的生長有關。一共找出了 991 個可能與菌絲生長有關的 cDNA 選殖株(徐嘉瞳, 2004)，經資料庫比對分門別類後，約可分為 340 個基因，其中約有 70 個可找到同源基因之功能(functional)基因，依基因所轉錄之產物，大致上可分為蛋白質合成(protein synthesis)、細胞代謝(metabolism)、構成細胞結構(structure)有關之蛋白，其中有關於細

胞代謝的一類有若干基因和碳水化合物 glucan 的代謝有關，進而發現了和細胞壁 glucan 裂解有關的基因 *ENGI*，由先前所述，文獻和資料顯示白色念珠菌菌絲的生長和細胞壁的裂解與重組有關，而 *ENGI* 明顯參與了細胞壁裂解(Baladron *et al.*, 2002; Esteban *et al.*, 2005)，但並沒有明確證據指向 *ENGI* 對菌絲的生成是否有所關聯，故本論文研究的第一個目標旨在探討 *ENGI* 是否和菌絲的生長有關，首先利用北方墨點法確認 *ENGI* 在型態不同的白色念珠菌菌株中表現量確實是有差異的，再用同源重組技術，藉由篩選標記 (*URA3/ARG4/HIS1*)去取代目標基因 *ENGI*，看缺少了基因 *ENGI* 的作用，對白色念珠菌的型態是否有所影響。

1.5.2 不同篩選標記之影響

篩選標記 *URA3* 為一常用的置換基因，其功用在轉譯出 orotidine 5'-mono-phosphate (OMP) decarboxylase，將 OMP 催化成為 uridine 5'-monophosphate(UMP)，為 pyrimidine 生合成的最後一個步驟。但 1998 年的文獻指出(Lay *et al.*, 1998)，白色念珠菌在暢除了 *URA3* 這個基因後，致病力有下降的趨勢，故使用 *URA3* 做為篩選標記代換某個基因做性狀或是致病力分析時，可能會因為因為 *URA3* 對性狀或是致病力的回補作用，造成了分析結果時的偏差。於 2003 年的文獻也指出(Staab *et al.*, 2003)，*URA3* 的有無確實可能對致病性或是性狀產生改變，但其影響程度和 *URA3* 所在的位置有關，視各別實驗所置換的區域而定。有鑑於以上的紛擾，本論文第二個目的則試圖去比較篩選標記 *URA3* 對白色念珠菌型態所造成的影響，利用了較無爭議的篩選標記 *ARG4/HIS1* 來替換我的目標基因 *ENGI*，和用 *URA3/ARG4* 所置換的菌株做比較，觀察少了 *ENGI* 或是使用篩選標記 *URA3* 是否對白色念珠菌菌絲的生長造成了變化，或看性狀上是

否有所差異。

之後再將 *ENG1* 連同 *ENG1* 的啟動子重置入 *ENG1* 的 *ARG4/HIS1* 突變株中，也將篩選標記 *URA3*、*HIS1* 分別重置入 *ENG1* 的 *ARG4/HIS1* 和 *ARG4/URA3* 突變株中，看這些重置的菌株是否會對性狀造成改變或是回復，以便去判斷突變株型態上的改變真的是因為 *ENG1* 的有無或是篩選標記 *URA3* 的有無所造成，以提供對白色念珠菌性狀或是型態研究上的一些資訊與線索。



二、材料、藥品與儀器

2.1 菌株

a. *Escherichia coli* : (Strain : DH5 α)

其基因型為 *supE44* Δ *lacU169*(Φ 80*lacZ* Δ M15)*hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*。

b. *Saccharomyces cerevisiae* : (Strain : 10560-2B)

Mating type 為 *MATa*，其基因型為 *ura3-52* ; *his3::hisG* ; *leu2::hisG*。

將質體 pCHEO1 轉形至 10560-2B 中，命名為 SCHO。

c. *Candida albicans* :

| 菌株 (Strain) | 基因型 (Genotype) | Reference |
|----------------|-----------------------------------------|-----------------------------|
| SC5314 | <i>CPHI/CPHI EFG1/EFG1</i> | Gillum <i>et al.</i> , 1984 |
| HLC52 | <i>CPHI/CPHI efg1/efg1</i> | Lo <i>et al.</i> , 1997 |
| JKC19 | <i>cph1/cph1 EFG1/EFG1</i> | Liu <i>et al.</i> , 1994 |
| HLC54 | <i>cph1/cph1 efg1/efg1</i> | Lo <i>et al.</i> , 1997 |
| BWP17 | <i>arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3</i> | Wilson <i>et al.</i> , 1999 |
| BAE61 | <i>eng1::ARG4/ENG1</i> | 本實驗 |
| BAE62 | <i>eng1::ARG4/ENG1</i> | 本實驗 |
| BAE64 | <i>eng1::ARG4/ENG1</i> | 本實驗 |
| BAE66 | <i>eng1::ARG4/ENG1</i> | 本實驗 |
| BAU2 | <i>eng1::ARG4/eng1::URA3</i> | 本實驗 |
| BAU4 | <i>eng1::ARG4/eng1::URA3</i> | 本實驗 |
| BAH1-1 | <i>eng1::ARG4/eng1::HIS1</i> | 本實驗 |
| BAH1-4 | <i>eng1::ARG4/eng1::HIS1</i> | 本實驗 |
| BAUH3 | <i>eng1::ARG4/eng1::URA3+HIS1</i> | 本實驗 |
| BAHU5 | <i>eng1::ARG4/eng1:: HIS1+URA3</i> | 本實驗 |
| BAHU10 | <i>eng1::ARG4/eng1:: HIS1+URA3</i> | 本實驗 |
| BAHE9 | <i>eng1::ARG4/eng1:: HIS1+URA3+ENG1</i> | 本實驗 |
| BAHE10 | <i>eng1::ARG4/eng1:: HIS1+URA3+ENG1</i> | 本實驗 |

2.2 質體(plasmid)

| 質體 | 特性 | Reference |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| YEP363 | 在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin，在 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 中篩選標記為 <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 |
| pRS- <i>ARG4ΔSpeI</i> | 篩選標記為抗 Ampicillin，並含 <i>ARG4</i> 基因。 | Wilson, <i>et al.</i> , 1999 |
| pGEM-URA3 | 篩選標記為抗 Ampicillin，並含 <i>URA3</i> 基因。 | Wilson, <i>et al.</i> , 1999 |
| pGEM-HIS1 | 篩選標記為抗 Ampicillin，並含 <i>HIS1</i> 基因。 | Davis <i>et al.</i> , 2000 |
| p99CAU | 篩選標記為抗 Ampicillin，並含 TR promoter 及 <i>URA3</i> 基因。 | Nakayama <i>et al.</i> 2000 |
| pRS426 | 篩選標記為抗 Ampicillin，MCS 位於 <i>LecZ</i> 中，可用於做藍白篩選，其上有 T7 promoter。 | Nakanishi <i>et al.</i> , 2004 |
| pCHEO1 | 將 <i>ENG1</i> 啟動子置入質體 YEP363 中，大腸桿菌中的篩選標記為抗 Ampicillin | 本實驗 |
| pCHEO1U | 將 <i>ENG1</i> 啟動子和 <i>URA3</i> 基因置入質體 YEP363 中，篩選標記為抗 Ampicillin | 本實驗 |
| pCHEOE2 | 將 <i>ENG1</i> 啟動子和 <i>ENG1</i> 基因置入質體 YEP363 中，篩選標記為抗 Ampicillin | 本實驗 |
| pCHEOE2U | 將 <i>ENG1</i> 啟動子和 <i>ENG1</i> 基因連同篩選標記 <i>URA3</i> 置入質體 YEP363 中，篩選標記為抗 Ampicillin | 本實驗 |
| pCHEOH3 | 只帶有 <i>ENG1</i> 啟動子和 <i>HIS1</i> 基因，篩選標記為抗 Ampicillin | 本實驗 |

2.3 引子(primer)

註: 方框為外加之核苷酸，非「位置」欄所標記;灰階為限制酶切位

| 名稱 | 序列 5'~3' | 位置 |
|----------|------------------------------------------|-----------------------------------|
| ENG1-F | CCGCTCGAGATGCTTTTCAAATCCGTATTAC | <i>ENG1</i> gene : +1~+21 |
| ENG1-R | CCGAGCTCTAACTAGCATTGAGAGCACCA | <i>ENG1</i> gene : +3437~+3418 |
| GS-F | CGGGATCCATGAAGTATTACTGTCATTGATAGG | <i>GS</i> gene : +1~+26 |
| GS-R | CCGCTCGAGTCAATAGTTCTTGCTTTCTTTTCT | <i>GS</i> gene : +1479~+1456 |
| pENG1-F1 | CGGGATCCTGATATAAATTGGAGTTGTTGTTATC | <i>ENG1</i> gene : -1775~-1751 |
| pENG1-F2 | AACCCGGGTGATATAAATTGGAGTTGTTGTTATC | <i>ENG1</i> gene : -1775~-1751 |
| pENG1-R | CCCAAGCTTAGCGATATATTAATGTATAACTATGATCTAG | <i>ENG1</i> gene : -1~-31 |
| ENG1-SF | GTGTCGACAACAACGGTAAACCAATTGG | <i>ENG1</i> gene : +1358~+1376 |
| ENG1-SR | TGTCGACACCAGCAGGAATTGTAAAGG | <i>ENG1</i> gene : +1366~+1338 |
| pENG19 | CGAAGCTTGAAAAGCATAGCGATATATTAATG | <i>ENG1</i> gene : +9~-15 |
| CK3369 | CAGAACCATTGCTTGTCATC | <i>ENG1</i> gene : -812~-793 |
| CK6506 | AATGGCAGTAGTGTCACCTCT | <i>ENG1</i> gene : +3671~+3650 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|
| HJL241 | TCAATGGATCAGTGGCAC | pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3339~3357 |
| HJL133 | ACCAGTAGCACAGCGATT | pGEM- <i>URA3</i> : 3459~3476 |
| p99BSpeIA | GGACTAGTATGCTTTTCAAATCCGTATTAC | <i>ENG1</i> gene : -1~+23 |
| p99BSacI | TTGAGCTCGTGACAGTAATTTAGTATGAT | <i>ENG1</i> gene : +335~+330 |
| p99AXhoI | TTCTCGAGCTGGTACGGTCTATAGTAACTTA | <i>ENG1</i> gene : -785~-761 |
| p99ASalI | TTGTCGACCCAGTAAGTAAAGAAGAATGAA | <i>ENG1</i> gene : -492~-515 |
| p1238 | CGGGATCCTCACATTGATTTAGATAAATGATTAC | <i>ENG1</i> gene : -1236~-1208 |
| p945 | CGGGATCC TTCATATATAATAATATGGTGTCAAAT | <i>ENG1</i> gene : -945~-917 |
| p609 | CGGGATCC TGTGTCACAAAAATTATGTCTATAAT | <i>ENG1</i> gene : -609~-582 |
| ENG1-KOAF | AACCTTCCAAAAGGCATTGC | <i>ENG1</i> gene : -678~-658 |
| ENG1-KOAR | TATCCGCTCACAATTCCACAAACACGCTCAATCT GATGC | <i>ENG1</i> gene : -254~-273 |
| ENG1-KOBF | AACGTCGTGACTGGGAAAACACTGATAGTGGCTG GACTGGT | <i>ENG1</i> gene : +3272~+3291 |
| ENG1-KOBR | TAAC TAGCATTGAGAGCACC | <i>ENG1</i> gene : +3438~+3418 |
| MKER-KOF | GCATCAGATTGAGCGTGT TTTGTGGAATTGTGAG CGGATA | pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960 |
| MKER-KOR | ACCAGTCCAGCCACTATCAGTTTTCCAGTCAC GACGTT | pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 1819~1838 |

| | | |
|---------|-----------------------------|---------------------------------------|
| URA3-R | TTCCCGGGCTTTACACTTTATGCTTCC | pGEM-URA3 : 190~172 |
| URA3-F | TTCCCGGGCCAGTGAATTGTAATACG | pGEM-URA3 : 2926~2943 |
| HJL0607 | CCCAGTTATACCCAAGTCAC | pGEM-HIS1 : 3744~2725 |
| YLO001 | GTGCCACTGATCCATTGA | pRS-ARG4 Δ speI : 3356~3339 |
| YLO002 | TAATCGCTGTGCTACTGGT | pGEM-URA3 : 3477~3459 |

2.4 化學藥品

■ Merck :

β -Mercaptoethanol (Cat. No. 1.15433.0100), Chloroform (Cat. No. 1.02445.1000), Disodium hydrogen phosphate dihydrate (Cat. No. 1.06580.0500), Dodecyl sulfate sodium salt (SDS) (Cat. No. 1.12012.0500), Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) (Cat. No. 1.08418.0250), Ethidium bromide (EtBr) (Cat. No. 1.11608.0030), Glucose (Cat. No. 1.08342.1000), Magnesium chloride hexahydrate (Cat. No. 1.05833.1000), Magnesium sulfate heptahydrate (Cat. No. 1.05886.0500), Potassium chloride (Cat. No. 1.05001.0250), Sodium acetate trihydrate (Cat. No. 1.06267.0500), Sodium citrate dihydrate (Cat. No. 1.11037.1000), Sodium dihydrogen phosphate (Cat. No. 1.06346.0500), Sodium hydroxide (Cat. No. 1.06498.0500), Tris-HCl (Cat. No. 1.01547.1000)。

■ Sigma :

L-Leucine (Cat. No. L-8000)、L-Histidine (Cat. No. H-8125)、Lithium acetate (Cat. No. L-6883)、o-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside (ONPG) (Cat. No. N-1127)、Glass beads (0.45 mm diameter) (Cat. No. G-9268)、Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Cat. No. P-7626)、Polyethylene Glycol₃₃₅₀ (PEG₃₃₅₀) (Cat. No. P-4338)、Uracil (Cat. No.

U-0750) 、 Uridine (Cat.No.U-0750) ◦

■Promega :

T₄ DNA ligase (Cat. No. M1801), 10 X T₄ DNA ligase buffer (Cat. No. M1801), Taq polymerase (Cat. No. M1661), 10 X Taq PCR buffer (Cat. No. M1661), dNTPs mixture (Cat. No. M1661), pGEM[®]-T vector SystemI (Cat. No. A3600), RNase A (Cat. No. A7973) ◦

■Roche :

DIG DNA Labeling mix (Cat.No.1277065) 、 Hexanucleotide mix(Cat.No.1277081) 、 Anti-DIG-AP (Cat.No.1093274) 、 CSPD (Cat.No. 1655884) 、 Klenow enzyme (Cat.No.1008404) 、 Blocking reagent (Cat.No. 1096176)

■Difco :

Bacto agar (Cat.No.143175) 、 Yeast nitrogen base w/o amino acid(Cat.No. 145368) 、 YPD broth (Cat.No.135141XB) 、 Nutrient Broth (Cat.No. 149018) 、 D-Mannitol

■J. T. Baker :

Dextrose (Cat. No. 1916-01), Tris base (Cat. No. 4109-01), Triton X-100 (Cat.No.X198-07) 、 Formaldehyde(Cat.No.15512) 、 3-(N-Morpholino propanesulfonic acid) (MOPS) (Cat.No. 1132612) 、 Formamide (Cat.No.33272)

■Amresco : Glycerol (Cat. No. 0854-1L-PTM), Phenol (Cat. No. 0945-400 ML)

■NEB/Fermentas : Restriction Enzyme BamHI 、 ClaI 、 EcoRI 、 EcoRV 、 HindIII 、 SacI 、 SalI 、 ScaI 、 SmaI

■Scharlau : LB agar (Cat. No. 01-385), LB broth (Cat. No. 02-385)

■AppliChem : Ampicillin (Cat. No. A0839)

■Bio-Rad : Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)(Cat.No.161-0729)

■GiBco BRL: Goat serum (Cat.No.16210-072)

■Kodak : X-film (Cat.No.1651454)

■Subenzyme : 1 Kb DNA ladder (Cat.No.SEM11C001)

2.5 緩衝溶液及溶劑

- 50X TAE buffer
48.4 g Tris base, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml, 11.42 ml acetic acid added ddH₂O to 200 ml
- 5 M EDTA stock solution
186.1 g EDTA added dd H₂O to 800 ml (pH 8.0)
- RNA isolation buffer
2.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl, 0.25 M EDTA, 1% (w/v) SDS
- 10X MOPS Electrophoresis buffer
0.22 M MOPS (pH 7.0), 20 mM sodium acetate, 10 mM EDTA (pH 8.0)
- 20X SSC buffer
3 M NaCl, 300 mM sodium citrate (pH 7.0)
- Prehybridization/Hybridization solution
0.5 M sodium phosphate (pH 7.2), 7% (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 7.0)
- Maleic acid buffer
0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl (pH 7.5)
- Washing buffer
0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3% (v/v) Tween 20 (pH 7.5)
- Blocking solution
1% (w/v) blocking reagent dissolved in maleic acid buffer
- Detection buffer
0.1 M Tris-Cl, 0.1 M NaCl (pH 9.5)
- 1 M Lithium Acetate
40.8 g Lithium Acetate added dd H₂O to 400 ml (pH 7.5)
- 10X TE buffer
100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA
- 50% PEG₃₃₅₀
75 g polyethylene glycol₃₃₅₀ added dd H₂O to 150 ml
- 40% Dextrose

40 g Dextrose added dd H₂O to 100 ml

- LATE buffer
0.1 M Lithium acetate, 10 mM Tris HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA
- PLATE buffer
40% polyethylene glycol₃₃₅₀ in LATE buffer
- Breaking buffer
10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1% (w/v) SDS, 2% (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA
- Denaturation Solution
0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- Neutralization Solution
1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl (pH 7.5)
- Shearing buffer
100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 %SDS adjusted to pH 8.0。



2.6 培養基配製

- LB (Luria-Bertni)/Ampicillin 培養基
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar, 50 µg/ml Ampicillin
- YPD 培養基
2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 2% agar
- YPD/Uridine 培養基
2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 2% agar, 80 mg/liter uridine
- YPD/Doxycycline 培養基
2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 2% agar, 20µg/ml Doxycycline
- YPD/Goat Serum 培養基
2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 2% agar, 4% Goat Serum

- SD 培養基
0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% dextrose , 2% agar
- SD/Uridine 培養基
0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid , 2% dextrose , 2% agar , 80 mg/liter uridine
- Solid Spider 培養基
10 g of nutrient broth , 10 g of mannitol , 2 g of K₂HPO₄ and 13.5 g of agar in one liter H₂O

2.7 儀器設備

分光光度計 20 GENESYS^{RT} (SPECTRONIC INSTRUMENTS)

核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

PCR溫度控制儀 Gene Cyclor^{RT} (BIO-RAD)

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

試管震盪器 IKA-VIBRAX-VXR

加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

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

電子天秤 PB153-S(METTLER TOLEDO)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)

恆溫式震盪培養箱 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)

桌上型高速離心機 5100 (KUBOTA CORPORATION)

桌上型高速低溫離心機 5804R (CENTRIFUGE)

桌上型離心機 BIOFUGE PICO(HERAEUS)

4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)

-20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)

-80°C 超低溫冷凍櫃 925/926 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

倒立顯微鏡 OLYMPUS CK40

數位相機 OLYMPUS C-5050ZOOM

三、方法與步驟

3.1 質體DNA的製備

首先將菌液養至 late log phase 後(約 14~16 HR)，於室溫下分裝菌液至 1.5 ml 微量離心管中，用桌上離心機(BIOFUGE PICO HERAEUS)以 13000 rpm (約 14200 g)的轉速一分鐘將菌體離下，倒掉上層液，加入 200 μ l Mx1 Buffer 懸浮菌體換置入 1.5 ml 微量離心管，取 200 μ l Mx2 Buffer 緩等地混合均勻後，加入 200 μ l Mx3 Buffer 再次緩等地混合均勻，在室溫下以 13000 rpm 的轉速五分鐘離下菌體，取上層液加至 spin column 中，以室溫 13000 rpm 的轉速離心一分鐘，加入 0.7 ml Washing buffer，在室溫下以 13000 rpm 的轉速離心一分鐘，再加入 0.7 ml Washing buffer，再次以室溫 13000 rpm 的轉速離心三分鐘，將 spin column 至入 1.5 ml 微量離心管中，於乾燥加熱版上 45°C~60°C 加熱 5 分鐘，50 μ l 二次無菌水或 1XTE buffer 加入微量管柱靜置一分鐘後，在室溫 13000 rpm 的轉速離心一分鐘，將製備好的質體 DNA 儲存於 -20°C 以便使用。

3.2 聚合酶連鎖反應

3.2.1 一般 PCR 反應

利用 PCR 反應可以將欲得到的 DNA 片段合成出來，選用符合需求的 Taq 可得到特性不同的 DNA 片段，其實驗條件如下：將下列物質混合於 0.5 ml 微量離心管內，1 unit (U)的 Taq Polymerase (5U/ μ l)、5 μ l 的 10X PCR buffer、各 1 μ l 的引子(50 μ M)、4 μ l 的 dNTPs mixture (2.5 mM)、0.1 μ g 的 Template DNA，加二次無菌水將體積調至 50 μ l，置於 PCR 溫度控制儀進行聚合酶連鎖反應。反應完成後，利用洋菜膠電泳確認 PCR 產物片段大小

是否正確，再利用 PCR Clean-up Kit 來純化 DNA 並去除酵素及鹽類。

3.2.2 Fusion PCR

取 37 μ l 的二次去離子水、5 μ l 的 10X BD SA Buffer、4 μ l NTP MIX(2.5 mM)、1 μ l 的引子(50 μ M)、1 μ l 的 BD Advantage 2 polymerase mix(5U/ μ l)、1 μ l 的 wild type genomic DNA(或 pRS-ARG4 Δ SpeI、pGEM-URA3、pGEM-HIS1 等質體 DNA)，加入 0.5 ml 的微量離心管內混合均勻，最終反應體積 50 μ l，於聚合酶溫度循環機中進行反應，此法應可取得 Region A、Region B、Region ARG4、Region URA3 和 Region HIS1 等 DNA 片段，且 BD Advantage 2 polymerase 不會在 DNA 產物後加上 dATP，故選用此酵素進行反應。反應完成後，利用洋菜膠電泳確認 PCR 產物片段大小是否正確，再利用 PCR Clean-up Kit 來純化 DNA 去除酵素及鹽類。取 35 μ l 的二次水、5 μ l 的 10X BD SA Buffer、4 μ l/ 2.5 mM NTP MIX、引子 ENG1-KOAF 1 μ l(50 μ M)及引子 ENG1-KOBR 1 μ l(50 μ M)、1 μ l 的 BD Advantage 2 polymerase mix(5U/ μ l)、已純化的 1 μ l Region A、1 μ l Region B 和 1 μ l Region ARG4(或 Region URA3、Region HIS1)，加入 0.5 ml 的微量離心管內混合均勻，最終反應體積為 50 μ l，反應後應可將三 DNA 片段連結成一 DNA 片段，以供轉形至白色念珠菌進行同源重組置換之用。

PCR 溫度控制儀的設定

| | 一般 PCR:為取得特定 DNA 片 | | Fusion PCR:連結 DNA 片段 |
|--------|--------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------|
| 1X | 94°C，3~5 分鐘 | 1X | 95°C，1 分鐘 |
| 25~30X | 94°C，1 分鐘 50°C~55°C，1~1.5 分鐘 72°C/68°C，1 分鐘~3 分鐘 | 30X | 95°C，30 秒 55°C，1 分鐘 68°C，3 分鐘 |
| 1X | 72°C/68°C，10 分鐘 | 1X | 68°C，3 分鐘 |
| 1X | 4°C，停止反應 | 1X | 4°C，停止反應 |

3.3 限制酶反應

酵素的用量及作用溫度視個別而定，用於分析 DNA 使用量較少，用於 Cloning 或是其他實驗則需使用較多的 DNA。

- A. 分析用途上：加 0.1~1 μg DNA 到反應體積 20 μl (或 10 μl)以限制酶切割 2 小時。跑完電泳後，以 10 mg/l EtBr 染色 5 分鐘， H_2O 褪染 30 分鐘後，在電泳影像處理系統進行分析。
- B. 準實驗所需 DNA 用途上：加 5-10 μg DNA 到反應體積 40~50 μl 。反應進行完後，以膠體電泳分析，以去除限制酶切割反應的酵素及鹽類並純化所需的 DNA 片段。

3.4 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

3.4.1 結晶紫洋菜膠的製備

取 0.5 g 的 agarose 加入 50 ml 的 1X TAE buffer，利用微波爐加熱溶解後，於加熱板上加熱約 3 min，以去除可能的雜物，稍冷卻之後加入約 40~60 μl 的結晶紫溶液，倒入做膠皿中，冷卻約 1 hr 後在使用。跑膠時使用 50 V，時間視 DNA 片段大小而定，一般不超過 1 hr。

3.4.2 洋菜膠內之 DNA 片段之萃取

使用 PREMIER 之產品 Gel Extraction kit，萃取出結晶紫洋菜膠內之 DNA 片段。將切下之洋菜膠(約 50~200 mg)，置於 1.5 ml 微量離心管內，加入等量的 Binding Buffer(1 mg 加入 1 μl)，於 60 加熱 10 分鐘至完全溶解，冷卻至室溫後，將混合液移至 Spin Column，以室溫 13000 rpm(約 14200 g) \times 1 min 離心，倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml 的 Washing buffer，以室溫 13000 rpm \times 1 min 離心，倒掉收集管內液體，再加入 0.5 ml 的 Washing buffer，以室溫 13000 rpm \times 1 min 離心，倒掉收集管內液體，再以室溫 13000

× 3 min 離心，將 Spin Column 移置新 1.5 ml 微量離心管，於乾燥加熱板上 60°C 加熱 5 分鐘，以去除多餘的酒精，移入新的 1.5 ml 微量離心管中後，加入 30~50 μ l 的二次無菌水或 1X TE buffer 靜置 1 分鐘後，以室溫 13000 rpm × 1 min 離心，將萃取出之 DNA 儲存於 -20 °C。

3.5 DNA 連結反應

目的是用來連接 DNA 片段 (Insert DNA) 和載體 (vector)，其實驗條件：將 0.5 unit 的 T4 DNA ligase、1~2 μ l 的 10 × ligase buffer、DNA 片段和載體 DNA 以莫爾濃度比為 3:1 混合於 1.5 ml 微量離心管內，總反應體積為 10~20 μ l (視 DNA 片段和載體的濃度而定)，反應溫度為室溫下 5 小時或 14 °C/18 小時。

3.6 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的轉形

3.6.1 大腸桿菌勝任細胞的製備

活化欲轉形之細胞挑單一菌落 37°C、280 rpm 恆溫式震盪培養箱 (B206 FIRSTEK SCIENTIFIC) 隔夜培養。取 2 ml 菌液至 100 ml 新的 LB 培養液 (包含 5% glucose, 2 mM MgCl₂)，以 37°C、280 rpm 震盪培養，至 OD₆₀₀ 約 0.4~0.7 時，將培養的細胞置於 0°C 20 分鐘，以 3000 rpm (約 1628 g) 轉速於 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液後，將離心管倒置 3 分鐘，以 50 ml 預冷的 0.1M CaCl₂ 懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘，再以 1500 rpm (約 405 g) 於轉速 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液後以 5 ml 預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，置冰上 1 小時後，可直接進行細胞轉形，或置於冰上 12~20 小時後，以 1500 rpm 轉速於 4°C 離心 5 分鐘，去除上清液後，以 5 ml (50 mM CaCl₂, 15% glucose) 懸浮菌體，進行分裝，迅速儲存至 -80°C。

3.6.2 勝任細胞的轉形

自 -80°C 取出勝任細胞置於冰上溶解，待其溶解後加入質體 DNA $0.1\sim 1.0\ \mu\text{g}$ (過程中需要有對照組，除不加質體外其餘操作均相同)，冰浴 45 分鐘後，以 42°C 熱處理 3 分鐘，再置於冰上 3 分鐘後，加入 $200\ \mu\text{l}$ LB 培養液置於 37°C 、 280rpm 培養箱(B206 FIRSTEK SCIENTIFIC)培養 1 小時讓細菌恢復生長。最後將菌液塗抹在含 ampicillin($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$)的 LB 培養皿，培養 12~16 小時，再挑選適當之菌落。

3.7 麵包酵母的轉形

自培養皿上挑選單一菌落的麵包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 接種至 $10\ \text{ml}$ YPD 培養液，置於 30°C 、 $150\ \text{rpm}$ (培養箱 B206 FIRSTEK SCIENTIFIC)培養到 OD_{600} 約 1.6(約 20 小時)，取 $4\ \text{ml}$ 菌液再轉養到 $15\ \text{ml}$ 新鮮的 YPD 培養液， 30°C 、 $150\ \text{rpm}$ 培養到 OD_{600} 大於 1.0 時(約 4 小時)，於室溫下以 $2500\ \text{rpm}$ (約 $1250\ \text{g}$) 離心 5 分鐘，去除上清液後加入 $4\ \text{ml}$ $1\times\text{LioAC} / 1\times\text{TE buffer(LATE)}$ 的溶液懸浮菌體，於室溫下以 $2500\ \text{rpm}$ (約 $1250\ \text{g}$) 離心 5 分鐘，去除上清液後加入 $1\ \text{ml}$ $1\times\text{LioAC}/1\times\text{TE buffer (LATE)}$ 內的溶液懸浮菌體，於室溫下靜置 10 分鐘，此時即為勝任細胞 (competent cell)，取勝任細胞 $100\ \mu\text{l}$ 加入 $4\ \mu\text{l}$ carrier DNA (salmon sperm DNA, 預先加熱 $95^{\circ}\text{C}/10$ 分鐘，在冰浴 5 分鐘) 與 $2\ \mu\text{g}$ 欲轉形之質體 DNA，混合均勻後加入 $700\ \mu\text{l}$ 的 $1\times\text{LioAC}/40\%\text{PEG}/1\times\text{TE(PLATE)}$ ， 30°C 、 $40\ \text{rpm}$ 培養 30 分鐘後，置於 42°C 水浴槽 7 分鐘，處理完後冰浴 2 分鐘。以 $2500\ \text{rpm}$ (約 $1250\ \text{g}$) 的轉速離心 5 分鐘，再以 $0.2\ \text{ml}$ $1\times\text{TE buffer}$ 懸浮菌體，將菌液塗抹至適當的培養基， 30°C 培養三~四天，再挑選適當之菌落。

3.8 β -galactosidase活性分析

3.8.1 Filter β -galactosidase assay

將欲測的菌體(已帶有特殊質體之麵包酵母)畫在同一培養基上，培養約 2~3 天，將已滅過菌之 colony filter 覆蓋於菌體上 3 分鐘後，將已黏附有 colonies 之 filter 以菌體朝上的方位，置入一個新的培養基中，培養一天，上述過程中 filter 和培養基間儘量不要有氣泡產生。將帶有 colonies 的 filter 置入液態氮中兩分鐘破壞菌體，再冷卻一分鐘，放在已經混合了 5ml Z buffer / 42 μ l X-gal / 14 μ l 2-mercaptoethanol(2-ME)的 assay filter 上，filter 不可過於潮濕，以免菌體漂浮過烈，filter 和 filter 間也儘量不要有氣泡出現。

3.8.2 蛋白質的製備

自培養皿上挑選單一菌落的麵包酵母接種至 5 ml 之培養液，30°C、150 rpm 震盪培養(培養箱 B206 FIRSTEK SCIENTIFIC)，待 OD₆₀₀ 達 1.5-1.6，再轉養菌液至新鮮的培養液中(使得 OD₆₀₀ 約 0.2)，置於 30 °C、150 rpm 繼續震盪培養至 OD₆₀₀ 為 1.0 時(約 8~10 小時)，以 2500 rpm(約 1250 g)的轉速於室溫下離心 5 分鐘，並以 10 ml Z buffer 清洗菌體，再取 250 μ l 的 Breaking buffer 懸浮菌體後，加 12.5 μ l 的 PMSF (40 mM) 及 glass beads (glass beads 加至接近液面下即可)，於 4°C 高速震盪 60 秒(以 15 秒為一單位，分四次震盪)使菌體破裂完全，再加入 250 μ l Breaking buffer 高速震盪 10 秒後，於 4°C 以 13000 rpm(約 14200 g)的轉速離心 15 分鐘後取上層液(細胞萃取物)至事先預冷的 1.5 ml 微量離心管，進行蛋白質濃度及酵素活性的測定。

3.8.3 酵素活性的測定

於試管中，加入 20 μ l 的細胞萃取物 (cell extract) 及 980 μ l Z buffer，混合均勻後置於 28°C 水浴槽 5 分鐘後(酵素反應於 28°C 進行)，加入 200 μ l

ONPG後即開始反應。注意加入ONPG後需混合均勻，並記錄反應開始時間。當反應至淡黃色時，加入 500 μl / 1M的 Na_2CO_3 終止反應，並記錄反應終止時間，取 1 ml測 OD_{420} 。

3.9 真菌質體的取得

自培養皿上挑選單一菌落的麵包酵母接種至 10 ml 培養液中，於 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm 震盪(培養箱 B206 FIRSTEK SCIENTIFIC)培養至足夠的菌量(約 48 小時)，於室溫下以 3000 rpm(約 1628 g)的轉速離心 5 分鐘後，加入 5 ml 二次無菌水清洗菌塊，再於室溫以 3000 rpm(約 1628 g)轉速離心 5 分鐘後移去上清液，加入 20 μl 之 shearing buffer 懸浮菌體，加入 glass beads 直到液面，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速震盪 4 分鐘(以 1 分鐘為一單位，分四次震盪)，加入 200 μl 之 1 \times TE bufer 後再高速震盪 1 分鐘，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 3000 rpm(約 1628 g) 的轉速離心 5 分鐘後，將上清液移至新的 1.5ml 微量離心管，加入 200 μl 之 phenol : chloroform (1 : 1)震盪 1 分鐘，於室溫下以 3000 rpm(約 1628 g) 的轉速離心 3 分鐘後，將上清液移至新的微量離心管，並重複上一步驟(加入 200 μl 之 phenol : chloroform (1 : 1))震盪 1 分鐘，離心 3 分鐘後將上清液移至新的微量離心管，重複此步驟直到上層液呈現透明狀，取 5 μl 上層液和 80 μl 的大腸桿菌勝任細胞，進行轉行，再從大腸桿菌抽取質體進行分析。(利用電穿孔的方式效果為佳)

3.10 萃取RNA (RNA extraction)

將單一菌落之真菌接種至 5 ml 的YPD培養液，於 30 $^{\circ}\text{C}$ 隔夜震盪培養(150 rpm，培養箱B206 FIRSTEK SCIENTIFIC)，再取其中 2 ml 的菌液轉養至 50 ml 的YPD培養液，並加入 10 ml 的山羊血清 (GiBco BRL，Goat

serum), 37 °C 震盪培養 (150 rpm, 培養箱 B206 FIRSTEK SCIENTIFIC) 4 小時至 $O.D_{600nm}$ 吸光值達到約 0.6~0.8, 分裝至 50 ml 無菌離心管, 於 4 °C 以 3500 rpm (約 2205 g) × 10 min 離心, 去除上清液, 加入 2 ml 的 DEPC-treated H₂O 懸浮菌體, 於 4 °C 以 3500 rpm × 10 min 離心, 去除上清液, 之後的操作過程皆儘可能地置於冰上進行, 於 -80°C overnight。

將存於 -80°C 的菌體室溫下解凍, (以下皆在 4°C 進行, 建議在冷房中操作) 加入約 5 ml 的 DEPC-treated H₂O 清洗菌體, 加入 0.5 ml 的 RNA isolation buffer 懸浮菌體, 加入 1/3 倍體積的玻璃珠 (約液面下), vortex 5 分鐘, 加入 0.5 ml 的 phenol, vortex 5 分鐘, 加入 0.5 ml 的 RNA isolation buffer, vortex 5 分鐘, 於 4 °C 以 3000 rpm (約 1620 g) × 10 min 離心, 取上清液 550 μl 移至已裝有 550 μl phenol 之新的 1.5 ml 微量離心管中 (一管 sample 約可分離出 1.2 ml 上清液), 於 4 °C 以 13000 rpm (14200g) × 5 min 離心, 將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管, 加入等體積 phenol 混合, 於 4 °C 以 13000 rpm × 10 min 離心, 將上清液移至已裝有兩倍體積 100% 酒精和新的 1.5 ml 微量離心管, 加入等量 phenol 混合, 於 4 °C 以 13000 rpm × 10 min 離心, 將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管, 加入 1/8 倍體積的 2.5 M 醋酸鈉及 2.5 倍體積的 100% -20°C 冰乙醇混合均勻, 置於冰上 30 分鐘 (或是放入 -20°C 冰箱 30~90 min 增加產率) 後, 於 4 °C 以 13000 rpm × 10 min 離心, 將上清液倒掉, 加入 1 ml 的 75% / -20°C 冰乙醇清洗管壁沉澱物, 於 4 °C 以 13000 rpm × 10 min 離心, 用微量吸管吸掉上清液, 並將微量離心管斜放在室溫下乾燥至微乾狀態, 將 RNA 溶於 30~50 μl 的 DEPC-treated H₂O 中, 儲存於 -80 °C。

3.11 北方墨點法 (Northern blot analysis)

3.11.1 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling)

使用 Roche 廠商產品 DIG system (Cat.No.1175033)，以 digoxigenin-11-dUTP (DIG) 標記 DNA，取欲標記的 DNA 15 μ l (約 10-30 ng) 置於微量離心管中，於 95 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘後迅速置於冰上 5 分鐘，然後加入 2 μ l 的 hexanucleotide、2 μ l 的 10X dNTP labeling mixture 及 1 μ l 的 Klenow enzyme (100 unit / ml)，在 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中反應 18~20 小時後，最後加入 2 μ l 的 0.2 M EDTA 並於 65 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘作終止反應，製備完成之 DNA 探針儲存於 -20 $^{\circ}$ C。

3.11.2 轉漬 RNA (transfer)

首先進行 1% 洋菜膠配製，秤取 0.5 g 的 agarose 於 36 ml 的 DEPC-treated H₂O 中，微波加熱溶解，待稍微冷卻後加入 5 ml 的 10X MOPS 及 9 ml 的甲醛 (formaldehyde) 混合均勻並製成膠體。而 RNA 樣品進行電泳前之處理：將 12 μ g 的 RNA、3.5 μ l 的 10X MOPS、5 μ l 的 37% formaldehyde、10 μ l 的 formamide、3 μ l 的 dye 以及 1 μ l 的 10 mg/liter ethidium bromide 分別加入微量離心管內並充分混合均勻，於 65 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘後置於冰上 5 分鐘。將處理好之 RNA 樣品以微量吸管置入洋菜膠之孔洞中，以 50 伏特之電壓進行 RNA 電泳 70~80 分鐘，電泳結束後，在電泳影像處理系統照相，之後將膠體浸泡於 50 ml 的 10X SSC 中 20 分鐘，接著進行轉漬。利用毛細現象之原理，引導 10X SSC 溶液向上流動，進而帶動膠體中的 RNA 脫離膠體，吸附於耐龍膜 (nylon membrane) 上進行轉漬。剪裁適當於膠體大小的 Whatman 3MM 濾紙及耐龍膜 (先於 10X SSC 溶液浸泡)，依濾紙、洋菜膠、耐龍膜及 Whatman 3MM 濾紙之順序堆置，並於最上層放置厚重物。經 14-16 小時後，取出耐龍膜，於核酸快速固定儀中，利用 UV 光 (254 nm) 照射作 cross-link 將 RNA 固定於耐龍膜上，此步驟重覆兩次。

3.11.3 雜交反應 (hybridization)

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

3.11.4 免疫偵測 (detection)

耐龍膜以 50 ml 的 Washing buffer 於室溫下平面震盪 20 分鐘兩次後，以 25 ml 的 Blocking buffer (Roche Blocking reagent (Cat.No.1096176)) 平面震盪 30 分鐘後，以 25 ml 的 Antibody buffer (Roche Anti-DIG-AP (Cat.No.1093274)) 平面震盪 30 分鐘，之後以 50 ml 的 Washing buffer 於室溫下平面震盪 15 分鐘兩次，再以 30 ml 的 Detection buffer 於室溫下平面震盪 5 分鐘，最後將耐龍膜放置於投影片夾層，取 0.5~1 ml CDP-STAR 均勻地加到耐龍膜上，於 37 避光反應 20 分鐘後，在暗房內以 X 光底片進行壓片，感光適當時間後，沖洗底片 (Develop buffer 中沖洗 2 分鐘，再置於 Fix buffer 沖洗 2 分鐘)。

3.12 萃取染色體DNA

3.12.1 方法一 (Sambrook *et al.*, 1989)

將欲進行萃取染色體 DNA 之單一菌落接種至 5 ml 的 YPD 培養液中，30 隔夜震盪培養 (150 rpm，培養箱 B206 FIRSTEK SCIENTIFIC) 後，以 3800rpm (約 2600g) × 10 min 離心，去除上清液，加入 1 ml 的無菌二次水懸浮菌體，並將菌液吸至新的 1.5 ml 微量離心管中，以 13000 rpm (14200 g) × 10 min 離心，去除上清液，加入 0.3 ml 的 Breaking buffer，vortex 5 分

鐘，加入 1/3 倍體積的玻璃珠，vortex 5 分鐘，加入 3 μ l 的 20 mg/ml proteinase K 及 3 μ l 的 10 mg/ml RNase，於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中反應 1 小時，加入 0.3 ml 的 phenol，vortex 5 分鐘，加入 0.3 ml 的 1X TE Buffer，vortex 5 分鐘，以 13000 rpm \times 10 min 離心，小心吸取上清液 600 μ l 移至新的 1.5 ml 微量離心管，加入 600 μ l 的 phenol 混合，以 13000 rpm \times 5 min 於 4 $^{\circ}$ C 離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，加入等量 phenol 混合，以 13000 rpm \times 5 min 於 4 $^{\circ}$ C 離心，吸取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管加入 14 μ l 的 3 M 醋酸氨(醋酸鈉亦可)及 1 ml 的 100%冰乙醇輕輕混合內容物，以 13000 rpm \times 10 min 離心，將上清液倒掉，加入 1 ml 的 75% 冰乙醇清洗管壁沉澱物，以 13000 rpm \times 1 min 離心，用微量吸管吸掉上清液並將微量離心管斜放乾燥，以 50 μ l 的無菌二次水溶解 DNA，儲存於 -20

3.12.2 方法二 (Susanna *et.al.*, 2004)

挑取單一菌落，接種至 5 ml YPD 培養液中，30 $^{\circ}$ C 隔夜震盪培養 (200~250 rpm，培養箱 B206 FIRSTEK SCIENTIFIC)，約 18~20 小時，取 1 至 1.5 ml 菌液至 1.5 ml 微量離心管，以 13,000 rpm (14200 g)離心 5 分鐘，去除上清液，加入 200 μ l 的 Lysis buffer (or breaking buffer)，以 vortex 充份混合後，將微量離心管置於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱 2 分鐘，隨即置於 95 $^{\circ}$ C 乾浴中 1 分鐘，重覆兩次，結束後 vortex 30 秒鐘，加入 200 μ l chloroform，vortex 2 分鐘，13,000 rpm 最高速離心 10 分鐘，取上清液至新的微量離心管，加入兩倍體積 100% ETOH 以及八分之一體積 3 M 之 NaOAC，置於 -20 $^{\circ}$ C 沉降 10 分鐘至 2 小時，以 13,000rpm(14200 g)離心 5 分鐘，去除上清液，加入 200 μ l / 75% ETOH 沖洗管壁沉澱物，以 13,000 rpm(14200 g)離心 5 分鐘，用微量吸管吸掉上清液並將微量離心管斜放乾燥，以 30 μ l 的無菌二次水溶解 DNA，加入 1 U 的 RNase A 以分解 RNA，-20 $^{\circ}$ C 存放。

3.13 白色念珠菌轉形 (transformation)

將白色念珠菌 (BWP17) 之單一菌落接種至 5 ml 的 YPD 培養液 (含 uridine) 中, 於 30 °C 震盪培養 (150 rpm, 培養箱 B206 FIRSTEK SCIENTIFIC) 隔夜後, 取其中 2 ml 的菌液轉養至 50 ml 的 YPD 培養液 (含 uridine), 於 30 °C 震盪培養 (150 rpm) 4~6 小時至 $O.D_{600nm}$ 約 0.6~0.8, 分裝至 50 ml 無菌離心管, 以 3800 rpm (約 2600g) \times 10 min 離心, 去除上清液, 加入 10 ml 的無菌二次水懸浮菌體, 以 3800 rpm (約 2600 g) \times 10 min 離心, 去除上清液, 加入 5 ml 的 1X TE Buffer 懸浮菌體, 以 3800rpm (約 2600 g) \times 10 min 離心, 去除上清液, 加入 3 ml 的 LATE Buffer 懸浮菌體, 以 3800 rpm (約 2600 g) \times 10 min 離心, 去除上清液, 加入 300 μ l 的 LATE buffer 懸浮菌體, 於室溫下靜置 20 分鐘後, 即為念珠菌之勝任細胞。取欲轉形之 DNA 片段 10 μ l 及 10 μ l 的 10 mg/ml salmon sperm DNA (預先以 95 °C 加熱 10 分鐘再迅速置於冰上 10 分鐘處理之) 於 1.5ml 微量離心管, 並加入 200 μ l 的勝任細胞, 混合均勻於 30 °C 靜置 30 分鐘後, 加入 0.7 ml 的 PLATE Buffer 於 30 °C 震盪培養 (50 rpm) 16 小時後, 於 44 °C 水浴槽中進行熱休克作用 (heat shock) 15 分鐘, 以 3800 rpm (約 2600 g) \times 2 min 離心, 去除上清液, 加入 1 ml 的 1X TE Buffer 懸浮菌體, 以 3800rpm (約 2600 g) \times 2 min 離心, 去除上清液, 加入 0.1 ml 的 1X TE Buffer 混合均勻後, 取出菌液塗抹至適當的篩選培養基 (selective medium), 置於 30 °C 培養 3 天。

3.14 突變株之性狀分析 (characterization)

3.14.1 生長曲線之測定

取適量隔夜培養之菌液, 轉養至新鮮之 5 ml 的 YPD 培養液中, 此時菌

液之O.D_{600nm}吸光值約為0.2，並視需要於培養液中添加uridine及四環黴素類藥物doxycycline，混合均勻後置於30℃培養箱中震盪培養（150 rpm，培養箱B206 FIRSTEK SCIENTIFIC）。每隔2小時，取100 µl的菌液稀釋十倍測量其O.D_{600nm}吸光值。

3.14.2 誘發菌絲生長環境觀察型態改變

將菌落接種於含4%山羊血清之YPD培養基中，並且視需要於培養基中添加uridine，置於37℃培養三天，觀察單一菌落之型態變化。另外將菌落接種於含山羊血清4%的Bacto agar培養基，並且視需要於培養基中添加uridine，置於37℃中培養七天（Stabb *et al.*, 2003），於倒立式顯微鏡下觀察菌絲生長的型態。將菌落接種於solid Spider培養基（Federico *et al.*, 1998），並且視需要於培養基中添加uridine，置於37℃中培養七天（Stabb *et al.*, 2003），觀察菌落和菌絲生長的型態。

3.14.3 芽管試驗（germ tube assay）

將菌落接種於含10%山羊血清之YPD培養液中，並視需要於培養液中添加uridine，於37℃反應5小時，於倒立式顯微鏡下觀察是否有芽管形成。

3.14.4 侵犯力分析（invasion assay）

將菌落接種於solid Spider培養基（Federico *et al.*, 1998），並視需要於培養液中添加uridine，置於37℃培養七天，觀察菌落型態，之後以水流沖洗菌落，觀察菌落是否因菌絲侵入培養基而殘留。

四、結果

4.0 源起

先前實驗室利用 SSH 的實驗方法在 37°C，且有加血清的情況下，比較在長菌絲型 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) 與酵母菌型 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) mRNA 表現的差異，篩選出許多 mRNA 表現量不同類型的基因，其中有一類和白色念珠菌細胞壁的主要成份 glucan 有關，包含了 glucanase 和 glucan synthase，例如由 SSH 所篩選出來編號為 SB265 和 SB240 的兩段序列，本論文乃在探討這些基因除了參與白色念珠菌細胞壁的組成和裂解之外，是否還有更進一步的功能，影響了白色念珠菌型態的轉換。



4.1 序列比對(BLAST)

經由史丹佛白色念珠菌基因資料庫 (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>)和CGD (<http://www.candidagenome.org/>)資料庫所提供的比對系統進行序列比對，發現SB265 序列和白色念珠菌野生株SC5314 中的 Orf19.10584 (3441 bp, 1146 a.a.)、Orf19.3066(3438 bp, 1145 a.a.)序列相似(圖一A和圖一B)，在比對的 654 bp片段中，核苷酸相似度約 96%，分別位於 Contig19-20163 和Contig19-10163 中，ORF所代表的基因為*ENGI*，可以轉錄出蛋白質endo-1,3-beta glucanase，它屬於glucan水解酶中的一種。而SB240 則和Orf19.7304 (1479 bp, 492 a.a.)序列有很高的相似度(圖一C)，在比對的 723 bp片段中，核苷酸相似度約 96%，位於Contig19-2511 中，並沒有比對出對偶基因的存在，進一步分析發現屬於*FKS3* (1,3-beta-glucan synthase)中的一個次單元(subunit)，為glucan合成酶中的一種。

4.2 利用北方墨點法分析基因表現量

圖二為 ORF19.10584(以下稱之為 *ENGI*)和 ORF19.7304(以下稱之為 *GS*)北方墨點法的結果。以 internal control *PGII* 做為比較的標準，(*PGII*，phosphoglucose isomerase，為醱解作用中的一個基因，實驗室稍早之前在相同的環境條件下發現，*PGII* 在型態不同的菌株中表現量差異並不大)*ENGI* 的 mRNA 的表現量在野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) 和 JKC19(*EFG1/EFG1 cph1/cph1*) 中並不明顯，在 HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)中則略有表現，在 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中表現量則較前三種菌株有顯著的提升，大小比 25S (3.4 Kb)略大一點，約為 3.6 Kb 左右，除此之外，在 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 和 HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)上緣處尚有一明顯的 band，粗估其大小至少有 10 Kb 以上，推測應該是萃取 mRNA 時所抽出的染色體 DNA 也參與了雜交所造成，抑或是跑膠時 mRNA 未完全分離而殘留在 well 中所造成。以 internal control *EFBI* 作為比較的標準，*GS* 的表現量在 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、JKC19(*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)、HCL52(*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)及 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 四種菌株中表現量低，四種菌株相互比較後並無明顯的差異。

4.3 建構 *ENGI* 雙套基因破壞株之結果

從上述北方墨點法的結果，挑選出在 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) 和 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中 mRNA 表現量差異較大的基因 *ENGI* 進行雙套基因之破壞，本實驗是藉由含有欲破壞基因某段序列相同之 DNA 片段連同適當之篩選標記，與缺少 *ARG4*、*URA3*、*HIS1* 三

種篩選標記之白色念珠菌(BWP17)發生同源重組置換(homologous recombination)，在白色念珠菌中進行特定基因的破壞。

4.3.1 利用 fusion PCR 取得含有欲破壞基因相同序列之 DNA 片段

如圖三所示，首先利用帶有 20 個核苷酸序列和篩選標記(*ARG4*、*URA3*、*HIS1*)序列相同之引子(ENG1-KOAF/ENG1-KOAR)以 PCR 的方式在 *ENG1* 上游約 245 bp 的位置取得一段約 436 bp 的 DNA 序列(圖四 A-Lane A)，此段序列稱之為 A region。因為鄰近 *ENG1* 下游處的 ORF 序列和 *ENG1* 同向，故有可能為 *ENG1* 下游處 ORF 之 promoter，為避免影響其它 ORF 之正常功能，故儘量以不動到其它 ORF 為原則進行實驗之設計。同理，利用帶有 20 個核苷酸序列和 Marker 相同之引子(ENG1-KOBF/ENG1-KOBR)以 PCR 的方式在 *ENG1* 基因的 3'端(在基因 *ENG1* 內)取得一段約 166 bp 的 DNA 序列(圖四 A - Lane B)，此段序列稱之為 B region。如圖四所示，分別利用帶有 19 個核苷酸序列和 A、B region 相同之一對引子(MKER-KOF/MKER-KOR)，將質體 pRS-*ARG4*、pGEM-*URA3* 和 pGEM-*HIS1* 上的篩選序列 *ARG4*(圖四 A - Lane AR，約 2.1 Kb)、*URA3*(圖四 C - Lane UR，約 1.6 Kb)和 *HIS1*(圖四 E - Lane HS，約 2.9 Kb)利用 PCR 的方式產生。

將上述三段 DNA 片段藉由其中重疊的部份進行 fusion PCR，可得到一段帶有完整篩選標記(*ARG4/URA4/HIS1*)且前後分別有同源重組置換區域 A、B region 之 DNA 片段。如圖四 B - Lane fA 為帶有篩選標記 *ARG4* 之同源重組片段，大小約 2.7 Kb；圖四 D - Lane fU 為帶有篩選標記 *URA3* 之同源重組片段，大小約 2.2 Kb；圖四 F-Lane fH 為帶有篩選標記 *HIS1* 之同源重組片段，大小約 3.4 Kb。將此片段利用真菌內轉形送入白色念珠菌(BWP17)中進行同源重組置換。

4.3.2 以 PCR 確認 *ENG1* 單套基因之破壞

將含有與 *ENG1* 相同序列及篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段與白色念珠菌(BWP17)進行真菌內轉形，得到八個菌落，將所得之菌落萃取出染色體 DNA，與引子 CK3369/CK6506 進行 PCR 確認 *ENG1* 之單套基因是否被破壞。以 0.8 % 洋菜膠分析 PCR 之產物，若篩選標記 *ARG4* 已置換掉 *ENG1*，可得一大小約為 3.0 Kb 之片段，如圖五<A>，lane 6-6 的 band b；另一套未置換掉的染色體可得一段約 4.5 Kb 之片段，如圖五<A>，lane WT 的 band a。取有出現 3.0 kb 片段的菌株做第二次的確認，用另一組引子 CK3369、HJL241 進行 PCR 的確認，若篩選標記 *ARG4* 已置換掉 *ENG1*，可得一大小約為 1.2 Kb 之片段，另一套未置換的染色體則不會出現此片段，如圖五的 band c 所示，lane WT 則沒有出現 1.2 Kb 的片段，卻出現了近 3 Kb 的片段，經比對後因引子序列和白色念珠菌的染色體並沒有額外的同緣部份，推測可能是因為 PCR 反應的誤差所造成。編號為 6-1、6-2、6-4 和 6-6 四種菌株皆出現符合預期的 DNA 片段，將之分別命名為 BAE61、BAE62、BAE64 和 BAE66。

4.3.3 以 PCR 確認 *ENG1* 雙套基因已被篩選標記 *ARG4* 與 *URA3* 破壞

將含有與 *ENG1* 相同序列及篩選標記 *URA3* 之 DNA 片段與 *ENG1* 單套基因破壞株(BAE61)進行真菌內轉型，得到兩個菌落，萃取出染色體 DNA 後，利用引子 CK3369/HJL241、YLO002/CK6506、CK3369/HJL133 進行 PCR 確認。若 *ENG1* 已被篩選標記 *URA3* 置換，則會出現由引子 CK3369/HJL133 所 PCR 出約 1.6 Kb 的 DNA 片段，如圖六中的 band b；由引子 YLO002/CK6506 作用可得一長約 1.95 Kb 的 DNA 片段，如圖六 band c 所示。為再次確認篩選標記 *ARG4* 的存在，利用引子 CK3369/HJL241 進行 PCR 反應可得一 1.2 Kb 的 DNA 片段，如圖六<A>中的 band a 所示。

編號為 1-2 和 1-4 的菌株皆出現符合預期大小的 DNA 片段，將此兩者菌株命名為 BAU2 和 BAU4。

4.3.4 以 PCR 確認 *ENGI* 雙套基因已被篩選標記 *ARG4* 與 *HIS1* 破壞

因有鑑於篩選標記 *URA3* 可能對白色念株菌的型態上的影響(Staab *et al.*, 2003)，本實驗嘗試用篩選標記 *HIS1* 得到另一組 *ENGI* 雙套基因破壞株。同樣的，首先將含有與 *ENGI* 相同序列及篩選標記 *HIS1* 之 DNA 片段與 *ENGI* 單套基因破壞株(BAE61)進行真菌內轉型，得到六個菌落，萃取出染色體 DNA，利用引子 CK3369/CK6506、HJL0607/CK6506 和染色體 DNA 進行 PCR 反應，若 *ENGI* 分別被篩選標記 *ARG4* 和 *HIS1* 置換成功，則由引子 CK3369/CK6506 反應可得 3.1 Kb 與 3.7 Kb 的 DNA 片段，如圖七<A>之 band a 和 band b 所示；由引子 HJL0607/CK6506 反應可得一 1.2 Kb 的 DNA 片段，如圖七中 band c 所示。可知編號 1-1 與 1-4 的菌株符合預期。將此編號為 1-1 與 1-4 的 *ENGI* 雙套基因破壞菌株命名為 BAH1-1 和 BAH1-4。

4.4 *ENGI* 雙套基因破壞株北方墨點法之結果

如圖八之結果所示，比較 *ENGI* 雙套基因破壞株(BAU2、BAU4、BAH1-1、BAH1-4)和已知性狀之野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)、HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 在 37°C 有加血清(16%)的情況下 RNA 表現量的差異。結果發現在 *ENGI* 雙套基因破壞株(BAU2、BAU4、BAH1-1、BAH1-4)中並沒有表現的跡象，而在 HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*) 中表現量最為明顯，HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)次之，突變株 JKC19

(*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)和野生株 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*) 則看似沒有表現或是表現量很低，*ENG1* 大小比 25S(3.4Kb)略大一點，約為 3.6 Kb 左右，表現量的差異是以 internal control *PGII* 作為比較的標準。

4.5 *ENG1* 雙套基因破壞株之性狀分析

將所得到的 *ENG1* 雙套基因破壞株(BAU2、BAU4、BAH1-1、BAH1-4)和已知性狀之野生株 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)、HCL52 (*efg11/efg1 CPH1/CPH1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)，在不同的環境下(溫度、血清、營養源等)進行比較，觀察 *ENG1* 雙套基因突變株在生長或是型態上有無因缺乏 *ENG1* 作用而改變。

4.5.1 YPD 培養液中各個不同突變株之生長曲線

測量不同突變株和野生株在 YPD 培養液，30°C 生長環境下時，各時間點之 OD₅₉₅ 吸光值，紀錄並作圖比較。將隔夜培養的各種菌液轉養至新的 YPD 培養液中，並將初始的生長濃度調整到 OD₅₉₅ 約 0.2 左右，每隔兩個小時測一次吸光值，由圖九可看出，不論是野生株 SC5314 或是各突變株，在 30°C 的 YPD 培養液中，生長速率並沒有明顯的不同；就六和八小時計算細胞數的倍增時間，野生株 SC5314 倍增時間約為 7 小時，雙基因突變株 HCL54 約為 5.2 小時，*ENG1* 突變株約為 5.5 小時，各突變株彼此間的差異並不大，除野生株倍增時間為 7 小時外，其餘菌株倍增時間皆介於 5~6 小時。

4.5.2 芽管試驗(germ tube assay)之結果

以野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)、HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作正負對照，連同 *ENG1* 雙基因破壞株 BAU2、BAU4、BAH1-1、BAH1-4，將此八株菌落分別接種於含有 10% 山羊血清的 YPD 培養液和不含血清的 YPD 培養液中，在 30°C 和 37°C 生長，於反應 5 小時後，進行芽管試驗。如圖十 A，由結果觀測發現，在 37°C 有加血清的生長環境下，可觀測到 *ENG1* 雙套基因破壞株和野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*) 相似，芽管皆有生長，而突變株 HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 芽管的生長則較不明顯，就芽管的生長而言，*ENG1* 雙套基因破壞株和野生株 SC5314 的差異並不大。圖十 B 所示為在 30°C 同樣有加入血清的情況下，此八株菌株的芽管生長情況，由圖可知，此八株菌株在此條件下皆無芽管明顯生成，但 *ENG1* 雙套基因破壞株細胞間出現聚集的現象，有如葡萄串般的串連(cluster)，看似分裂不完整所導致，特別是在 BAU2、BAU4 兩株菌此現象最為顯著(如圖十 A 箭頭所示)，突變株 BAH1-4 也略有此現象。上述八株菌株在不同生長環境下芽管生長有無和串連的程度整理如表二。

4.5.3 觀察菌落在 YPD 培養基上之生長

將各式菌落接種至有加血清的 YPD 培養基(視需要加入 uridine)上，37°C 培養三天，觀察菌落的型態。以野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)、HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作正負對照。如圖十一 A 和圖十一 B，野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19

(*EFG1/EFG1 cph1/cph1*) 菌落皆有明顯皺摺，但野生株 SC5314 除菌落有明顯皺摺外，菌落邊緣亦呈現不規則之變化，突變株 JKC19 則邊緣較為平整。突變株 HCL52 (*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 則菌落平滑無皺摺，邊緣亦十分平整；圖十一 A 和圖十一 B 為各種 *ENG1* 破壞株的觀測，結果發現 BAU2、BAU4 狀似突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)，表面有皺摺但菌落邊緣平滑；*ENG1* 破壞株 BAH1-1、BAH1-4 在有無加入 Uridine 的 YPD 培養基(皆含有 4% 山羊血清)則出現兩種型態：

<1>在無 Uridine 之培養基上，菌落表面和邊緣皆呈現完全平滑，似突變株 HCL52 (*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)，且菌落大小較同時間之各菌株為小。

<2>在有加入 Uridine 之培養基上則出現兩種不同型態之菌落，一為表面有皺摺但菌落周圍平整的菌落(狀似突變株 JKC19)，二為表面和邊緣完全光滑的菌落，和突變株 HCL52 (*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*) 型態相近，兩者在培養基中所佔的比例皆非少數。

4.5.4 觀察菌落在 solid spider 培養基上之生長

將各式菌株接種至 solid spider 培養基上，於 37°C 培養七天，觀察菌落的型態，如圖十二。可發現野生株 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*) 有菌絲生成，且會入侵培養基內，故可看到野生株 SC5314 以菌落為中心，菌絲呈毛絨線放射狀入侵到培養基內，且菌落表面多有皺摺，突變株 HCL52 (*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 則呈現較平滑的酵母菌型態，沒有菌絲生成，突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*) 則介於兩種型態之間，菌落表面略有皺摺但無明顯菌絲生成入侵培養基。*ENG1* 雙套基因破壞株(BAU2、BAU4、BAH1-1、BAH1-4)則包含了以上

的兩種型態，可觀察到表面平滑、狀似酵母菌形的菌落，也有菌絲生成且入侵培養基、表面呈現皺摺的菌落，但皺摺的形式為圓盤凹狀(突變株 BAH1-1 除外，突變株 BAH1-1 菌落周圍有較短菌絲生成，但菌落表面無皺摺)，有些像紅血球的外觀，和野生株 SC5314 的皺折不盡相同，BAU2、BAU4 以這圓盤凹狀的型態為多數，而 BAH1-1、BAH1-4 則以平滑未長菌絲的酵母菌型為主，兩種型態就 *ENGI* 雙套基因突變株而言皆非少數特例。各菌株不同型態之比例如圖十二所示。

4.5.5 侵犯力分析(invasion assay)之結果

將各式菌株接種至 solid spider 培養基上，於 37°C 培養七天，若有菌絲生成則會入侵培養基內，經固定流速水流沖洗後，並不會被沖去。同樣以野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)、HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作正負對照。圖十三結果顯示，*ENGI* 雙套基因破壞株(BAU2、BAU4、BAH1-1、BAH1-4)皆有入侵培養基的能力，故經固定水流後被沖去的跡像並不明顯，但相較野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) 而言，侵犯力較弱，較相似於突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)，雙基因破壞株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 和突變株 HCL52 (*efg1/efg1 CPHI/CPHI*) 則無入侵培養基的能力。

4.5.6 觀察菌落在有加山羊血清的 Bacto agar 培養基之生長

將各式菌落接種至含有 4% 山羊血清的 Bacto agar 培養基上，於 37°C 培養七天，用倒立式顯微鏡下觀察菌絲在培養基上的型態。以野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1*)

cph1/cph1)、HCL52 (*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作正負對照。有菌絲生成的菌落外觀會呈現毛茸茸放射狀的形態，若無菌絲生成，則會呈現單一菌落平滑的外觀，如圖十四。野生株 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、突變株 JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*) 外觀皆呈現毛茸茸放射狀，*ENG1* 雙套基因破壞株部份菌落亦有此外觀，且放射狀的菌絲會出現明顯的蕨葉狀散射，以 *ENG1* 雙套基因破壞株 BAU2、BAU4 此現象較明顯；除此之外，*eng1/eng1* 雙套基因突變株也可發現和突變株 HCL52 (*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 相似的平滑無菌絲的菌落，但形狀較不規則，不似 HCL52、HLC54 菌落邊緣平整。

4.6 *ENG1* 基因、篩選標記 *URA3* 和 *HIS1* 的重置

為探討 *ENG1* 基因和篩選標記 *URA3*、*HIS1* 對白色念珠菌型態上的影響，於是試圖將 *ENG1* 基因利用篩選標記 *URA3* 送回 *eng1/eng1* 雙套基因突變株 BAH1-1 和 BAH1-4 中，且為一窺篩選標記對白色念珠菌型態的影響，於是單獨將篩選標記 *URA3* 送回 *ENG1* 雙套基因破壞株 BAH1-1 或 BAH1-4 染色體內，為了與上述新突變株尋對照組，也將篩選標記 *HIS1* 單獨送回 *ENG1* 雙套基因突變株 BAU2 或 BAU4 中。我所選擇的同緣重組置換區域為 *ENG1* 的啟動子，在 *ENG1* 啟動子上利用限制酶 *PAC1* 切一刀後，將質體轉型至菌株中進行同源重組置換(圖二十五 A、圖二十五 B)，故若是有置換成功，則所得之新菌株皆會帶有原使菌株 BWP17 所缺少的三種篩選標記 *ARG4*、*URA3* 和 *HIS1*，但此方法無法確知質體重置回哪一股之染色體上。觀察這幾株基因重置的菌株型態，並和 *ENG1* 雙套基因破壞株

比較型態上的差異，以試圖進一步去探討 *ENG1* 或篩選標記 *URA* 的有無所造成的影響。

4.7 各式重置質體的建構

4.7.1 建構帶有 *ENG1* 基因啟動子的質體

如圖十五所示，設計引子利用 PCR 的方式得到 *ENG1* 基因(+9) 位置至上游 ORF 尾端約 1742 bp 的 DNA 片段，引子(pENG1-F1/pENG1-R)兩端分別帶有限制酶 *BamHI*、*HindIII* 切位，和質體 YEP363 分別經過限制酶 *BamHI*、*HindIII* 作用後，進行接合作用。經過轉形選殖後，可得到帶有 *ENG1* 基因啟動子的質體，全長約為 10.3 Kb。見圖十六，利用限制酶 *ClaI* 作用後可得 2356 bp、3766 bp、4228 bp 的 DNA 片段；經限制酶 *EcoRI* 作用後可得 4451 bp、5900 bp 的 DNA 片段；經限制酶 *EcoRV* 作用後可得 7.4 Kp、2.9 Kb 的 DNA 片段，進行確認無誤後，將此質體命名為 pCHEO1。

4.7.2 將篩選標記 *URA3* 殖入質體 pCHEO1 中

如圖十七所示，設計引子(URA3-R/URA3-F) 利用 PCR 的方式從質體 pGEM-URA3 上獲得一段帶有篩選標記 *URA3* 的 DNA 片段，引子兩端帶有限制酶 *SmaI* 切位，和質體 pCHEO1 分別經過 *SmaI* 限制酶的作用，純化後將質體 pCHEO1 除去 5' 端磷酸根 (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP)，以防質體 pCHEO1 在接合時自體連接。將經過處理過的質體 pCHEO1 和帶有篩選標記 *URA3* 的 DNA 片段進行接合反應。經過轉形選殖後，可得帶有篩選標記 *URA3* 的質體，全長約為 1.2 Kb。見圖十八，利用限制酶做新質體の確認，經限制酶 *SmaI* 作用後應可得 1.7 Kp、10.2 Kb 的 DNA 片段；

經限制酶 *ClaI* 作用應後可得 2.3 Kb、3.8 Kb 和 5.9 Kb 的 DNA 片段，確認無誤後，將此質體命名為 pCHEO1U。

4.7.3 建構帶有 *ENG1* 基因啟動子和 *ENG1* 基因的質體

同樣以質體 YEP363 為載體進行新質體建構，如圖十九利用兩對不同的引子(pENG1-F2/ENG1-SR 和 ENG1-SF/pENG1-R) 分別從染色體 DNA 上分兩段得到 *ENG1* 基因啟動子連同 *ENG1* 基因，其中以在 *ENG1* 基因上的限制酶切位 *Sall* 為分界，將限制酶切位 *Sall* 上游至上一個鄰近的 ORF 的 DNA 片段稱為 FRONT region；限制酶切位 *Sall* 下游至 *ENG1* 基因尾端的 DNA 片段稱為 BACK region。將此兩段 DNA 片段分別殖入質體 YEP363 中，因為 FRONT region 上有一個 *SacI* 限制酶切位，而 *SacI* 限制酶為 BACK region 尾端所選用的切位，故在接合反應的順序上只能先殖入 BACK region。首先將 BACK region 和質體 YEP363 分別經由限制酶 *Sall*、*SacI* 作用，純化後進行接合反應。經過轉形選殖後可得一全長約為 8.3 Kb 的質體，將此質體名為 pYEP363/ENG1_BACK。

同樣的，接著將 DNA 片段 FRONT region 和質體 pYEP363/ENG1_BACK 分別利用限制酶 *Sall*、*SmaI* 作用，純化後進行接合反應。經過轉形選殖後可得一全長近 12 Kb 的質體，接著利用限制酶進行質體確認。見圖二十，新質體在限制酶 *SacI* 的作用後應可得 2.8 Kb 和 9 Kb 的 DNA 片段；在限制酶 *HindIII* 作用後應可得 3.2 Kb 和 8.6 Kb 的 DNA 片段，確認無誤後，將此質體命名為 pCHEOE2。

4.7.4 將篩選標記 *URA3* 殖入質體 pCHEOE2 中

如圖二十一所示，設計引子(URA3-R/URA3-F) 利用 PCR 的方式從質體 pGEM-URA3 上獲得一段帶有篩選標記 *URA3* 的 DNA 片段，引子兩端帶有限制酶 *SmaI* 切位，和質體 pCHEOE2 分別經過 *SmaI* 限制酶的作用，

純化後將質體 pCHEOE2 除去 5' 端磷酸根 (SAP)，以防質體 pCHEOE2 在接合時自體連接。將經過處理過的質體 pCHEOE2 和帶有篩選標記 *URA3* 的 DNA 片段進行接合反應。經過轉形選殖後，可得帶有篩選標記 *URA3* 的新質體，全長約為 13.5 Kb。見圖二十二，利用限制酶做新質體的確證，經限制酶 *Clal* 作用後應可得 3.1 Kb、4.5 Kb、5.9 Kb 的 DNA 片段；經限制酶 *SmaI* 作用後應可得 1.6 Kb、11.8 Kb 的 DNA 片段；經限制酶 *Sall* 作用後應可得 3.3 Kb、10.1 Kb 的 DNA 片段，確認無誤後，將此質體命名為 pCHEOE2U。

4.7.5 建構帶有篩選標記 *HIS1* 和 *ENG1* 基因啟動子的質體

將先前所得到的質體 pCHEO1 和質體 pGEM-HIS1 經限制酶 *SacI*、*ScaI* 作用後，純化後分別將帶有篩選標記 *HIS1* 和 *ENG1* 基因啟動子的片段進行接合反應。經過轉形選殖後，新質體將只帶有篩選標記 *HIS1* 和 *ENG1* 基因啟動子和篩選標記 AMP，大小約為 9 Kb (如圖二十三)。見圖二十四，利用限制酶做新質體的確證，經限制酶 *Clal* 作用後應可得 2.3 Kb、6.7 Kb 的 DNA 片段；經限制酶 *BamHI* 作用後應可得 2.7 Kb、6.3 Kb 的 DNA 片段，確認無誤後，將此質體命名為 pCHEOH3。

4.8 以 PCR 確認各質體在 *eng1/eng1* 突變株內之重置

4.8.1 以 PCR 確認篩選標記 *HIS1* 在 *eng1/eng1* 雙套基因突變株之重置

如圖二十五 A 所示，若質體 pCHEOH3 已置換入 *eng1/eng1* 雙套基因突變株內，應有一段完整的 *ENG1* 基因啟動子(可能位於篩選標記 *ARG4* 或 *URA3* 之任一股)，故利用 PCR 方式檢驗之，在引子 pENG1-F 和引子 pENG19 作用後，可得一段長約 1.7 Kb 的 DNA 片段(圖二十六 band b)；在引子 p1742

和引子 pENG19 作用後，可得一段長約 0.9 Kb 的 DNA 片段(圖二十六 band a)，由結果可知其中編號為 1-3 的菌株符合預期，將此菌株命名為 BAUH3。

4.8.2 以 PCR 確認篩選標記 *URA3* 在 *eng1/eng1* 雙套基因突變株之重置

如圖二十五 A 所示，若已將質體 pCHEO1U 置換入 *eng1/eng1* 雙套基因突變株(BAH)內，應有一段完整的 *ENG1* 基因啟動子(可能位於篩選標記 *ARG4* 或 *HIS1* 之任一股)，故利用 PCR 方式檢驗之，在引子 pENG1-F 和引子 pENG19 作用後，可得一段長約 1.7 Kb 的 DNA 片段(圖二十七 band b)；在引子 p1742 和引子 pENG19 作用後，可得一段長約 0.9 Kb 的 DNA 片段(圖二十七 band a)，由結果可知其中編號為 1-5 和 1-10 的菌株符合預期，將此菌株分別命名為 BAHU5 和 BAHU10。

4.8.3 以 PCR 確認基因 *ENG1* 在 *eng1/eng1* 雙套基因突變株之重置

如圖二十五 B 所示，將帶有基因 *ENG1* 之質體 pCHEOE2U 利用篩選標記 *URA3* 置換入 *eng1/eng1* 雙套基因突變株(BAH)內，應有一段完整的 *ENG1* 基因啟動子加基因 *ENG1* (可能位於篩選標記 *ARG4* 或 *HIS1* 之任一股)，故利用 PCR 方式檢驗之，在引子 p609 和引子 pENG19 作用後，可得一段長約 0.6 Kb 的 DNA 片段(圖二十八 band b)；在引子 p1742 和引子 pENG19 作用後，可得一段長約 0.9 Kb 的 DNA 片段(圖二十八 band a)，由結果可知其中編號為 3-9 和 3-10 的菌株符合預期，將此菌株分別命名為 BAHE9 和 BAHE10。

4.9 各重置菌株的性狀分析

4.9.1 芽管試驗(germ tube assay)之結果

以野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作正負對照，連同 *ENG1* 雙基因破壞株 BAU2、BAU4、BAH1-1、BAH1-4 和重置菌株 BAUH3、BAHU5、BAHU10、BAHUE9、BAHUE10，將此 11 種菌落分別接種於含有 10% 山羊血清的 YPD 培養液中，在 30°C 和 37°C 生長，反應 5 小時後，進行芽管試驗。由圖二十九 A 可看出，在 30°C 的溫度下有加 10% 山羊血清所有的菌株都未有芽管生成，先前所提到的細胞聚集現象在各 *ENG1* 雙套基因破壞株中依然看得到，其中以 BAU2 最顯著(如圖二十九箭頭所指)；重置菌株則以 BAUH3 和 BAHU5 較為明顯，細胞聚集的程度上比原本的 *ENG1* 突變株 BAH1-1、BAH1-4 更高(如圖二十九箭頭所指)，*ENG1* 雙套基因破壞株普遍皆可觀察到此現象，程度上略有差異，以 BAU2、BAHU3 和 BAHU5 較為顯著，而 *ENG1* 重置菌株 BAHUE9 和 BAHUE10 細胞間聚集現象則較不明顯，程度較類似野生株。圖二十九 B 則是在 37°C 有加 10% 山羊血清所進行所有分析，除菌株突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 外都有芽管生成，不過 BAH1-1 和 BAH1-4 的芽管生長較為緩慢，芽管長度和有生成芽管的比率皆較低，而各個重置菌株和 BAU2、BAU4 則相去不遠，但比野生株 SC5314 的芽管短一些，但差異並不大。

4.9.2 觀察菌落在 YPD 培養基上之生長

將各式菌落接種至有加血清的 YPD 培養基(視需要加入 uridine)上，37°C 培養三天，觀察菌落的型態。以野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作正負對照。如圖三十所示，野生株 SC5314 和突變株 BAU2、BAU4 菌落表面皺折明顯，菌落邊緣亦不平整，和圖十一 B 的 BAU2、BAH4 的結果不盡相同，此次的結果就型態

上更趨近野生株，生成酵母菌型的比例減少；而 BAH1-1、BAH1-4 則依舊可觀察到兩種型態之菌落，一為狀似野生株，菌體和菌體邊緣皺折明顯，另一為狀似 HLC54，菌體表面和邊緣皆光滑的型態；而重置菌株 BAUH3、BAHU5、BAHU10 則型態都類似 BAU2、BAU4，菌落表面皺折且菌落邊緣不平整，並沒有發現類似 BAH1-1、BAH1-4 有光滑的菌落存在；BAHUE9 和 BAHUE10 則回復到類似野生株 SC5314 的型態，皺折程度較其他重置菌株或是 *ENG1* 突變株明顯。

4.9.3 觀察菌落在 solid spider 培養基上之生長

將各式菌株接種至 solid spider 培養基上，於 37°C 培養七天，觀察菌落的型態，如圖三十一。可發現野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) 有菌絲生成，菌絲呈放射狀侵入培養基中，而 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 則不會生長菌絲，也沒有入侵培養基的跡象；四株 *ENG1* 突變株依然會有入侵培養基的現象，但所生成的菌絲明顯較短，且生成菌絲的菌落數也明顯較野生株來的少，尤其是 BAH1-1 和 BAH1-4，大部份的菌株皆呈現平滑狀似 HLC54 的菌落，只有少部份有生成短菌絲；至於重置菌株方面，重置菌株 BAUH3、BAHU5、BAHU10 和突變株 BAU2、BAU4 的型態差異不大，而 BAHUE9、BAHUE10 則又回復為類似野生株的型態，入侵培養基的能力增強，菌絲也較明顯，但菌絲生長的程度上不及野生株 SC5314。

4.9.4 侵犯力分析(invasion assay)之結果

將各式菌株接種至 solid spider 培養基上，於 37°C 培養七天，有生成菌絲者會入侵培養基內，對培養基的附著力會增加，經固定流速水流沖洗後，並不會被沖去。同樣以野生株 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、突變

株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作正負對照。圖三十二結果顯示，野生株菌落幾乎不會被固定水流沖洗掉，而突變株 HLC54 則幾乎被沖洗殆盡，而 *ENG1* 雙套基因突變株方面，以 BAH1-1、BAH1-4 菌落被沖刷的程度較 BAU2、BAU4 明顯，特別是在 BAH1-1、BAH1-4 菌落生長較密集處，受沖刷的痕跡最為明顯，程度類似突變株 HLC54，單一菌落則未達突變株 HLC54 的脫落程度。重置菌株方面，BAUH3、BAHU5，BAHU10 的結果皆類似 BAU2、BAU4，大部份菌落皆無法被沖刷掉，而 *ENG1* 重置菌株 BAHUE9、BAHUE10 則看似回復到野生株的程度，幾乎不會被水沖掉，但尚不及野生株 SC5314。

4.9.5 觀察菌落在有加山羊血清的 Bacto agar 培養基之生長

將各式菌落接種至含有 4% 山羊血清的 Bacto agar 培養基上，於 37°C 培養七天，用倒立式顯微鏡下觀察菌絲在培養基上的型態。以野生株 SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作正負對照。由圖三十三中結果所示，野生株在營養缺乏的 bacto agar 培養基中依然有菌絲呈現複雜的放射狀，菌體本身較小；反觀突變株 HLC54 則沒有菌絲出現，而呈現平滑的酵母菌型態。突變株 BAU2、BAU4 則依然有菌絲產生，但菌絲型態較不規則，且有類似蕨葉一般的外觀；BAH1-1、BAH1-4 長菌絲的能力相對變弱，菌絲較不明顯，且菌體本身呈現放射狀，兼有觀測到平滑的酵母菌型態。用重置菌株 BAUH3、BAHU5、BAHU10 則型態類似 BAU2、BAU4，有菌絲生成但末端有蕨葉狀的小突起，菌體本身較野生株來的大；*ENG1* 重置菌株 BAHUE9、BAHUE10 則回復到類似野生株的型態，菌體較小且有放射狀菌絲生成，但也可觀察到菌體較不規則且較小、菌絲較少的白色念株菌型態出現。

4.10 利用報導基因 *lacZ* 檢驗 *ENGI* 啟動子的作用

為檢驗基因 *ENGI* 啟動子是否可以順利運作，利用報導基因 *lacZ* 檢驗之。利用 PCR 的方式取得 *ENGI* 上游的 *ENGI* 啟動子(約 1.7 Kb)，殖入質體 YEP363 報導基因 *lacZ* 上游處，將質體轉形至酵母菌 10560-2B 中，若啟動子有作用，則可以表現出蛋白 β galactosidase，因為 YEP363 的報導基因 *lacZ* 並沒有 ATG，故 PCR 所得之啟動子尾端處需帶有 ATG，並和報導基因 *lacZ* 形成 in frame。由圖三十四所示，所得的八個帶有 *ENGI* 啟動子的質體在轉形至酵母菌後，不論是在 37^o 有加血清或是 30^o 沒有加血清的情況下，編號 2、3、4、5、8 的菌株皆可發現到有 β galactosidase 生成，和 X-gal 作用後會出現藍色，證實 *ENGI* 啟動子確實是可以順利運作。其中未帶有 *ENGI* 啟動子的 YEP363 為 negative control，而帶有 *MDR1* 啟動子的質體為 positive control (*MDR1* 啟動子已被證實可以順利運作；交通大學羅瀚倫, 2002)。



五、討論

本實驗的目的在探討 *ENGI* 對白色念珠菌型態變化的影響，承襲實驗室先前利用 SSH 技術比較在 37°C 有加血清時，菌絲型之野生株 SC5314 (*EFG1/EFG1 CPH1/CPH1*) 和呈現酵母菌型的突變株 HLC54 (*efg1/efg1 cph1/cph1*) RNA 表現差異所得到之結果，篩選到可能和型態變化有關的基因片段，雖經由序列比對確定為 *ENGI* 無誤(圖一 A、B)，但 *ENGI* 是否真的和型態有關?其相關的程度為何?這些都須要進一步去探討。要回答第一個問題，須先確定不同型態(菌絲型和酵母菌型)之白色念珠菌 *ENGI* 基因表現量確實是有差異的，確認之後，進一步利用同源重組技術取代目標基因 *ENGI*，藉由觀察 *ENGI* 突變株在各種環境下的生長情況，去判斷 *ENGI* 對白色念珠菌型態影響的程度。雖然罕有文獻明確記載真菌之 *ENGI* 和型態變化或致病力有關，但因 β -glucan 對宿主來說是會引發免疫反應的抗原 (Ishibashi *et al.*, 2005)，生成菌絲的過程也需要有 glucan 水解酶的作用 (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006)，且也有醣類水解酶和菌絲生長有關的例證 (King & Butler, 1998)，而 Ca*ENGI* 更被報導與細胞分裂有關 (Esteban *et al.*, 2005)，故推測 *ENGI* 和白色念珠菌的型態轉變不無關係。

5.1 北方墨點法確認白色念珠菌基因 *ENGI* 在型態不同菌株之表現量

首先利用北方墨點法比較白色念珠菌野生株 SC5314 (*EFG1/EFG1 CPH1/CPH1*)、HLC52 (*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、JKC19 (*EFG1/EFG1 cph1/cph1*) 和 HLC54 (*efg1/efg1 cph1/cph1*) 在 37°C 有加山羊血清的環境下 *ENGI* 表現量的差異，如圖二，以 *PGII* 為 internal control，結果發現 *ENGI* 的表現量在 HLC54 (*efg1/efg1 cph1/cph1*) 最為明顯，HLC52 (*efg1/efg1*

CPHI/CPHI)略有表現，野生株 *SC5314(EFG1/EFG1 CPH1 /CPHI)*和 *JKC19(EFG1/EFG1 cph1/cph1)*則看似沒有表現或是表現量很低，由此可得知在本實驗的條件下，*ENGI* 在不同菌株之表現量並不相同，推測 *ENGI* 能將 *glucan* 裂解的主要功能可能和型態轉變有關，或者是 *ENGI* 尚有其它功能牽涉型態轉變。由先前的實驗已確知在 37°C 有加山羊血清的情況下其型態變化較傾向於酵母菌型，而 *SC5314(EFG1/EFG1 CPH1/CPHI)*和 *JKC19(EFG1/EFG1 cph1/ cph1)*則較傾向菌絲態，故由結果來看，*ENGI* 的表現量在酵母菌型的白色念珠菌中是較菌絲型來的多。文獻所記載 (Baladron *et al.*, 2002)，在其它真菌如麵包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中，*ENGI* 的表現量於生長分裂期最為明顯，進入生孢期則幾乎不表現，意味麵包酵母 *ENGI* 的表現可能位於和細胞分裂有關的路徑上。白色念珠菌看似也有相同的傾向，是否位於細胞分裂路徑上的基因和菌絲的生長路徑上的基因有相互關聯則需進一步去探討，目前尚無法證實兩者之間的詳細關係。

5.2 以 fusion PCR 備製具有 *ENGI* 同源重組區和篩選標記之 DNA 片段進行同源重組置換

本實驗在進行同源重組置換時是利用 fusion PCR 的原理來取得帶有篩選標記的 DNA 片段，所運用的三個篩選標記分別為 *ARG4*、*URA3* 和 *HIS1*，此三個篩選標記皆從麵包酵母而來，以同樣的方式連同篩選標記之啟動子被置入質體當中，故可設計一組引子利用同一個 PCR 反應，得到三個帶有篩選標記的片段(圖四 A : lane AR、圖四 C : lane UR、圖四 E : lane HS)，而位於染色體上的兩個同源重組區 A 和 B 也可利用兩組引子藉由同一個 PCR 反應得到，再以 fusion PCR 的分式將三個 DNA 片段合成一段後進行同源

重組置換(圖三)，因為兩同源重組區 A 和 B 固定，所以三個篩選標記在進行同源重組置換時可能遇到的問題是：已先被篩選標記 *ARG4* 換過的一套，經第二次同源重組置換時，藉由同樣的方式被篩選標記 *URA3* 或 *HIS1* 取代，而沒有達到兩套皆被篩選標記置換掉的目地。由結果來判斷此問題對實驗的進行並沒有造成太大的困擾，因白色念珠菌的轉型效率本就比其它真菌低很多，故所得的菌落皆較少，但依然可挑選到 *ENG1* 雙套基因破壞株(BAU2、BAU4、BAH1-1、BAH1-4)，經由適當的 PCR 確認無誤(圖五~圖七)，證明此方法是可行的，一方面也節省了重新設計同源重組區所多花的金錢和時間。

5.3 以北方墨點法檢驗白色念珠菌 *ENG1* 雙套基因突變株 *ENG1* 之表現

在 37°C 有加山羊血清的環境下，以白色念珠菌野生株 SC5314 (*EFG1/EFG1 CPH1/CPH1*)、HLC52(*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、JKC19(*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)和 HLC54(*efg1/efg1 cph1/cph1*)為對照組，連同挑選到的 *ENG1* 雙套基因突變株 BAU2(*eng1::ARG4/eng1::URA3*)、BAU4(*eng1::ARG4/eng1::URA3*)、BAH1-1(*eng1::ARG4/eng1::HIS1*)、BAH1-4(*eng1::ARG4/eng1::HIS1*)進行北方墨點法，以 *PGII* 為 internal control，觀察 *ENG1* 的表現量。由圖八可看出，在 *ENG1* 雙套基因突變株 BAU2、BAU4、BAH1-1 和 BAH1-4 中並沒有觀察到 *ENG1* 的表現，但其中 BAU2 的 control *PGII* 表現量較低，可能是 RNA 量過少所導致，其它對照組大致上和之前的結果相同，*ENG1* 在 HLC54 中依然維持較高的表現量，而在 HLC52 中則略有表現，但並不明顯，在 SC5314 和 JKC19 中則幾乎不表現。由以上結果進一步確定各個 *ENG1* 突變株確實已被篩選標記置換成功，故無法順利轉錄出 *ENG1* 之 RNA。

5.4 篩選標記的重置和 *ENG1* 的重置

篩選標記 *URA3* 的存在與否和其所在的位置對白色念珠菌型態是有影響的(Lay *et al.*, 1998 ; Staab *et al.*, 2003), 這極有可能是為何在剔除 *ARG4*、*URA3* 和 *HIS1* 三個篩選標記後的菌株 BWP17, 和野生株 SC5314 型態有所差異的原因。有鑑於此, 本實驗試圖利用同源重組技術將篩選標記 *URA3*、*HIS1* 重置, 比較篩選標記對白色念珠菌型態所造成的影響; 同時也將已置換掉的 *ENG1* 重新回復到白色念珠菌的染色體中, 看其結果為何。如圖十五到圖二十四所示, 先將各所需的質體建構出, 每個質體皆帶有一段約 1.7Kb 的 *ENG1* 啟動子, 做為同源重組置換區, 在此區以限制酶切開後轉型至白色念珠菌 *ENG1* 雙套基因突變株中(圖二十五 A、B), 此方法無法掌控重置的質體會換進哪一套, 為其缺點, 但因同源重組區相同(皆為 *ENG1* 的啟動子區), 故換進任一套的位置都應相同。因文獻記載有可能影響白色念珠菌型態的篩選標記為 *URA3*, 故將篩選標記 *URA3* 置入突變株 BAH 中, 得到突變株 BAHU5 和 BAHU10; 也將篩選標記 *HIS1* 置入突變株 BAU 中, 得到突變株 BAUH3, 此菌株目的是做為一對照組, 避免篩選標記 *URA3* 置入 BAH 後可能造成的型態變化是導因於同時出現多個篩選標記, 而非單純由 *URA3* 所造成; 另一方面, *ENG1* 連同 *ENG1* 啟動子則利用篩選標記 *URA3* 置入突變株 BAH 中, 觀察將 *ENG1* 重置後性狀是否改變。

5.5 *ENG1* 雙套基因破壞株性狀之探討

5.5.1 生長曲線

試比較 *ENG1* 雙套基因突變株在 YPD 培養液中的生長速率(見圖九), 以白色念珠菌野生株 SC5314 (*EFG1/EFG1 CPH1/CPH1*)、HLC52(*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、JKC19(*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)和 HLC54(*efg1/efg1 cph1/cph1*)

為對照組，結果發現 *ENGI* 雙套基因突變株生長速率並沒有明顯的不同，在取對數比較後(圖九 B)，各菌株生長速率更趨一致，即便是在菌絲生長方面大不相同的野生株 SC5314 和突變株 HLC52 也無明顯差別。分析其結果，在 30°C 沒有加血清的情況下，野生株 SC5314 和雙突變株 HLC52 並不會顯示出型態上的差異，兩種菌株在此條件下皆呈現酵母菌型，意謂著菌絲生長能力的有無並不會影響到白色念珠菌酵母菌型的生長速率，因為文獻中提及在麵包酵母和裂殖酵母中置換掉 *ENGI* 對細胞的生長分裂是有影響的(Baladron *et al.*, 2002; Martin-Cuadrado *et al.*, 2003)，故本實驗的目的不在於去判斷 *ENGI* 對菌絲生長的影響，而是單純觀察 *ENGI* 對白色念珠菌酵母菌型生長速率的關係。由結果可知，*ENGI* 雙套基因突變株對白色念珠菌酵母菌型的生長並沒有造成太大的影響，並不會造成白色念珠菌的死亡或是生長方面的衰退，此現象也和文獻的結論相符(Esteban *et al.*, 2005)。



5.5.2 芽管測試結果之探討

圖十 A、B 中分別顯示在 30°C 和 37°C 有加血清的環境下，芽管生長的情形，以野生株 SC5314(*EFG1/EFG1 CPH1/CPH1*)、HLC52(*efg1/efg1 CPH1/CPH1*)、JKC19(*EFG1/EFG1 cph1/cph1*)和 HLC54(*efg1/efg1 cph1/cph1*) 為對照組，和 *ENGI* 雙套基因突變株做比較，發現在 37°C 有加血清的環境下所有菌株皆會長菌絲，突變株 BAU2 和 BAU4 和野生株 SC5314 的差異不大，突變株 BAH1-1 和 BAH1-4 的芽管生長較野生株 SC5314 為短，長芽管的細胞數量相對也較少，但並不會像 HLC54 般明顯抑制了芽管的生長，突變株 BAU2/BAU4 和 BAH1-1/BAH1-4 之間的差異推測可能是因篩選標記 *URA3* 某些程度上可促進菌絲生長(Staab *et al.*, 2003)所造成，也有

可能單純只是個別的生長環境略有差異所導致；重置菌株方面(圖二十九 B)，BAUH3、BAHU5 和 BAHU10 皆帶有三個篩選標記，雖然三個篩選標記的位置略有不同，但對結果並沒有產生大變化，在 37°C 各重置菌株也都有芽管生長，情況和野生株 SC5314、突變株 BAU2、BAU4 相差無幾。故缺少了 *ENGI* 對芽管的生長看似沒有太大的影響。因菌絲的生長是一種較長期的現象，芽管是生成菌絲所必須的過渡時期，其後會生成菌絲或是假菌絲並不能由芽管來確定，故以短時間生長的芽管來推論菌絲是否生成難免有失客觀。

而在 30°C 有加血清的環境下，各菌株皆不會長菌絲，皆為酵母菌型，但 *ENGI* 雙套基因突變株則和對照組則略有差別，在 BAU2 和 BAU4 兩個 *ENGI* 突變株中可明顯看到細胞間彼此聚集(cluster)，狀如葡萄串，而突變株 BAH1-1 和 BAH1-4 此現象則較不明顯；重置菌株方面(圖二十九 A)，BAUH3、BAHU5 和 BAHU10 細胞聚集的情形類似於 BAU2 和 BAU4，細胞間有較明顯的聚集，*ENGI* 重置菌株 BAHUE9 和 BAHUE10 則狀似回復到野生株的性狀，聚集的情形較不明顯。細胞間會彼此聚集的情況和文獻結果相仿(Baladron *et al.*, 2002；Dekker *et al.*, 2004；Esteban *et al.*, 2005)，也透漏出白色念珠菌 *ENGI* 和細胞分裂有關的訊息，缺少了 *ENGI* 細胞雖不會致死，生長也可持續進行，但分裂方面卻受到了明顯的阻礙。

5.5.3 菌落型態和侵犯力之探討

將各個菌株接種於 Solid Spider 培養基上 37°C 進行培養，此生長環境營養源十分充足，Solid Spider 培養基尚可誘導白色念珠菌生成菌絲，入侵培養基。一般白色念珠菌之菌落型態會發生可逆的轉變，意即可在多種不同的菌落型之間做轉變，白色念珠菌外觀包括有一般的平滑形(smooth)、

星形 (star)、環狀 (ring)、不規則之皺摺 (irregular wrinkle)、絨狀的 (fuzzy) 等等 (Calderone *et al.*, 2002)。圖十二和圖三十一顯示各菌株在 Solid Spider 培養基上的菌落型態，可發現野生株菌絲生長最為明顯，且菌落表面呈不規則的皺摺；HLC52 則為十分平滑的菌落，並沒有菌絲生成；突變株 BAU2、BAU4 則出現了大量會生成菌絲的環狀菌落，但菌絲並沒有野生株來的繁茂；突變株 BAH1-1、BAH1-4 則大多出現平滑的菌落型態，兼有長菌絲的菌落出現，但為數不多；重置菌株 BAUH3、BAHU5、BAHU10、BAHUE9 和 BAHUE10 則大部份皆會生成菌絲，但沒有環狀的菌落發現，少部份呈現平滑。

由以上觀察可推論，*ENGI* 突變掉後使得白色念珠菌在 Solid Spider 培養基上菌絲的生長能力下降，有些甚至不長菌絲而呈現平滑狀。環狀的菌落看似只出現在利用篩選標記 *URA3* 所置換的菌株中，但將篩選標記 *URA3* 重置後(菌株 BAHU5、BAHU10)並沒有發現環狀菌落的出現，說明篩選標記 *URA3* 和菌落環狀特徵可能無關，不過菌株 BAHU5、BAHU10 因為帶有 *URA3*，促進了菌絲的生長，生成菌絲的能力加強。菌絲入侵培養基的程度可藉由抵抗水流衝刷的能力來做一簡單的判斷，圖十三和圖三十二可看出野生株對培養基的黏附力很強，沖洗前後差異不大，重置菌株 BAHUE9、BAHUE10 次之；而 *ENGI* 突變株中以 BAH1-4 被沖洗掉的比率很高，僅次於 HLC52；其它菌株則大致上介於野生株和突變株 BAH1-4 之間，此結果和先前菌落呈現菌絲態或是平滑態的觀察相符，越傾向平滑態的酵母菌型菌落對培養基的黏附力則越差，也越容易被水沖洗掉。

5.5.4 YPD 培養基菌落型態之探討

將各個菌落在 YPD 培養基(加 4%山羊血清)37°C 下培養三天，如圖十

一和圖三十，發現長菌絲傾向高者如(野生株 SC5314)其菌落皺摺最為明顯，而 HLC52 則皆出現表面平滑的菌落，BAU2、BAU4 和五株重置菌株菌落表面皺摺皆十分清晰，只有 BAH1-1 和 BAH1-4 兼具了平滑和皺摺的菌落，此結果和在 Solid spider 培養基所得結果呼應。但由圖十一 B 中未加入營養源 uridine 明顯發現所有菌落皆呈現平滑狀，故推測外在的環境條件影響菌落型態甚劇，培養基的水份多寡、鹽類濃度、營養源有無等皆有可能對菌落的型態造成變化，也有文獻指出環境因子對白色念珠菌的型態有關鍵的影響(Braun & Johnson, 1997)，Tup1p 為白色念珠菌和麵包酵母中抑制菌絲生長的轉錄因子，將其去除後菌絲會大量生長，但隨著環境因素不同菌絲因 Tup1p 被移除而出現的增生情況也大異其趣。此說明了環境因子對白色念珠菌決定其生長路徑扮演著關鍵的角色，故在進行此類培養基的操作時，培養基的置備和畫菌的時間皆須相同，務求使環境條件一致。

5.5.5 bacto agar 菌落型態之探討

同樣的將各個菌落接種在 bacto agar(4%山羊血清)上 37°C 培養七天後於倒立式顯微鏡觀察其型態，因 bacto agar 上營養缺乏，故對 *ENG1* 突變株的環境條件較為一致，BAU2、BAU4 培養基缺少 Histidine，對 BAH1-1、BAH1-4 培養基缺少 Uridine，重置菌株 BAUH3、BAHU5 和 BAHU10 則三種篩選標記皆有。由圖十四和圖三十三可看出野生株 SC5314 依然有大量菌絲呈放射狀生成，而 BAU2、BAU4 菌絲生成能力則明顯下降了許多；BAH1-1、BAH1-4 更是顯著，有些菌落甚至出現和 HLC52 類似的平滑菌落，這可能代表篩選標記 *URA3* 在某些程度上確實促進了菌絲的生成；重置菌株 BAUH3、BAHU5 和 BAHU10 比 BAU2、BAU4 菌絲生長又略繁茂，和野生株相差無幾，意謂著營養源充足的環境較可支援菌絲生長所需；而

重置菌株 BAHUE9 和 BAHUE10 則三種篩選標記和 *ENGI* 皆有之，型態上則以趨近於野生株。

5.6 結語與未來展望

本論文旨在探究細胞壁裂解基因 *ENGI* 和篩選標記 *URA3* 對白色念珠菌型態的影響，結果發現 *ENGI* 和 *URA3* 對白色念珠菌菌絲的生成能力是有影響的：失去 *ENGI* 降低了同環境下細胞菌絲的生長；篩選標記 *URA3* 增加了同環境下細胞菌絲的生長，但所造成的差異並沒有十分的明顯。已確知外在環境因子對白色念珠菌的生長型態是有影響的(Braun *et al.*, 1997)，如生長環境之濕度、鹽份多寡和營養源濃度等皆會影響白色念珠菌型態的轉變，且因 *ENGI* 和 *URA3* 兩者間對菌絲生長出現相反的誘因，此些因素皆使資料的判斷上更顯困難，這也是為何本實驗要針對同一基因設計出多個突變株的原因。且由文獻可知調控細胞壁裂解的基因並不只有 *ENGI*，和 *ENGI* 行類似功能者亦有之(Adams, 2004)，是否因為相似功能的基因彼此之間的交互作用幫助了 *ENGI* 雙套基因突變株菌絲的生長，這都尚需進一步的實驗去驗證，細胞壁相關基因雙剔除、三剔除或是將突變株進行 *in vivo* 的試驗皆為可進行的方向。

六、參考文獻

- Adams, D. J. (2004). "Fungal cell wall chitinases and glucanases." *Microbiology* 150(Pt 7): 2029-35.
- Alonso-Nunez, M. L., H. An, *et al.* (2005). "Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*." *Mol Biol Cell* 16(4): 2003-17.
- Baladron, V., S. Ufano, *et al.* (2002). "Eng1p, an endo-1,3-beta-glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot Cell* 1(5): 774-86.
- Braun, B. R., W. S. Head, *et al.* (2000). "Identification and characterization of *TUPI*-regulated genes in *Candida albicans*." *Genetics* 156(1): 31-44.
- Braun, B. R. and A. D. Johnson (1997). "Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUPI*." *Science* 277(5322): 105-9.
- Cao, Y. Y., Y. B. Cao, *et al.* (2005). "cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol." *Antimicrob Agents Chemother* 49(2): 584-9.
- Cappellaro, C., V. Morsa, *et al.* (1998). "New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating." *J Bacteriol* 180(19): 5030-7.
- Chen, Y. C., S. C. Chang, *et al.* (1997). "Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993." *Infect Control Hosp Epidemiol* 18(5): 369-75.
- Cid, V. J., A. Duran, *et al.* (1995). "Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Rev* 59(3): 345-86.
- Cole, G. T. and C. Y. Hung (2001). "The parasitic cell wall of *Coccidioides immitis*." *Med Mycol* 39 Suppl 1: 31-40.
- De Backer, M. D., P. T. Magee, *et al.* (2000). "Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*." *Annu Rev Microbiol* 54: 463-98.
- Dekker, N., D. Speijer, *et al.* (2004). "Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation." *Mol Biol Cell* 15(8): 3903-14.
- Doolin, M. T., A. L. Johnson, *et al.* (2001). "Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p." *Mol Microbiol* 40(2): 422-32.
- Ernst, J. F. (2000). "Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis." *Microbiology* 146 (Pt 8): 1763-74.
- Esteban, P. F., I. Rios, (2005). "Characterization of the *CaENG1* gene encoding an

- endo-1,3-beta-glucanase involved in cell separation in *Candida albicans*." *Curr Microbiol* 51(6): 385-92.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, *et al.* (2005). "Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments." *Embo J* 24(6): 1277-86.
- Giaever, G., A. M. Chu, *et al.* (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Nature* 418(6896): 387-91.
- Goldman, R. C., P. A. Sullivan, *et al.* (1995). "Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene." *Eur J Biochem* 227(1-2): 372-8.
- Horisberger, M. and M. F. Clerc (1988). "Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*." *Eur J Cell Biol* 46(3): 444-52.
- Hsueh, P. R., M. L. Chen, *et al.* (2002). "Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999." *Emerg Infect Dis* 8(1): 63-8.
- Jiang, B., A. F. Ram, *et al.* (1995). "Regulation of cell wall beta-glucan assembly: *PTCI* negatively affects *PBS2* action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription." *Mol Gen Genet* 248(3): 260-9.
- Kadosh, D. and A. D. Johnson (2001). "Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*." *Mol Cell Biol* 21(7): 2496-505.
- King, L. and G. Butler (1998). "Ace2p, a regulator of *CTS1* (chitinase) expression, affects pseudohyphal production in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* 34(3): 183-91.
- Kohler, J. R. and G. R. Fink (1996). "*Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 13223-8.
- Kuranda, M. J. and P. W. Robbins (1991). "Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 266(29): 19758-67.
- Larriba, G., E. Andaluz, *et al.* (1995). "Molecular biology of yeast exoglucanases." *FEMS Microbiol Lett* 125(2-3): 121-6.
- Lay, J., L. K. Henry, *et al.* (1998). "Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies." *Infect Immun* 66(11): 5301-6.
- Leng, P., P. R. Lee, *et al.* (2001). "Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida*

- albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein." J Bacteriol 183(13): 4090-3.
- Liu, H., J. Kohler, *et al.* (1994). "Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog." Science 266(5191): 1723-6.
- Lo, H. J., J. R. Kohler, *et al.* (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." Cell 90(5): 939-49.
- Martin-Cuadrado, A. B., E. Duenas, *et al.* (2003). "The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*." J Cell Sci 116(Pt 9): 1689-98.
- Martin-Cuadrado, A. B., J. L. Morrell, *et al.* (2005). "Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation." Mol Biol Cell 16(10): 4867-81.
- McCreath, K. J., C. A. Specht, *et al.* (1996). "Molecular cloning of a third chitinase gene (*CHT1*) from *Candida albicans*." Yeast 12(5): 501-4.
- McCreath, K. J., C. A. Specht, *et al.* (1995). "Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*." Proc Natl Acad Sci U S A 92(7): 2544-8.
- Mitchell, A. P. (1998). "Dimorphism and virulence in *Candida albicans*." Curr Opin Microbiol 1(6): 687-92.
- Moreno, I., Y. Pedreno, *et al.* (2003). "Characterization of a *Candida albicans* gene encoding a putative transcriptional factor required for cell wall integrity." FEMS Microbiol Lett 226(1): 159-67.
- Mosch, H. U., E. Kubler, *et al.* (1999). "Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell 10(5): 1325-35.
- Mrsa, V., F. Klebl, *et al.* (1993). "Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo-beta-1,3-glucanase." J Bacteriol 175(7): 2102-6.
- Murad, A. M., P. Leng, *et al.* (2001). "*NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*." Embo J 20(17): 4742-52.
- Nakagawa, Y., N. Ohno, *et al.* (2003). "Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes." J Infect Dis 187(4): 710-3.
- Odds, F. C. (1994). "Pathogenesis of *Candida* infections." J Am Acad Dermatol 31(3 Pt 2): S2-5.
- Popolo, L. and M. Vai (1999). "The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker." Biochim Biophys Acta 1426(2): 385-400.

- Poulain, D., G. Tronchin, *et al.* (1978). "Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides." *Ann Microbiol (Paris)* 129(2): 141-53.
- Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, *et al.* (2006). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity." *FEMS Yeast Res* 6(1): 14-29.
- Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, *et al.* (2000). "Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*." *Mol Microbiol* 35(2): 386-96.
- Staab, J. F. and P. Sundstrom (2003). "*URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes." *Trends Microbiol* 11(2): 69-73.
- Stoldt, V. R., A. Sonneborn, *et al.* (1997). "Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi." *Embo J* 16(8): 1982-91.
- Torosantucci, A., P. Chiani, *et al.* (2000). "Differential chemokine response of human monocytes to yeast and hyphal forms of *Candida albicans* and its relation to the beta-1,6 glucan of the fungal cell wall." *J Leukoc Biol* 68(6): 923-32.
- Ufano, S., M. E. Pablo, *et al.* (2004). "Swm1p subunit of the APC/cyclosome is required for activation of the daughter-specific gene expression program mediated by Ace2p during growth at high temperature in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* 117(Pt 4): 545-57.
- White, T. C., K. A. Marr, *et al.* (1998). "Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance." *Clin Microbiol Rev* 11(2): 382-402.