

白色念珠菌中脂解酵素 *LIP4*、5、6、8、9 與其型態變化之關聯

研究生：王怡瑾

指導教授：楊昀良 博士

摘要

目前院內真菌感染排名第一的白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是一種伺機性的病原真菌，通常造成輕微的黏膜感染，嚴重時卻可以引起全身性菌血症感染，在免疫不全病人身上尤其是危害生命之重大威脅。前人研究發現白色念珠菌的致病力與其在酵母菌型與菌絲型之間的型態轉變有關。在將 *EFG1* 及 *CPH1* 基因進行破壞之後，雙突變株不僅失去形成菌絲的能力，並且在小鼠模型中是不致病的。針對病原菌的脂解酵素基因研究，在病原細菌 *Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa* 以及真菌 *Hortea werneckii* 中，脂解酵素皆被認為與致病力相關，加以白色念珠菌感染之臨床病患檢體、小鼠模型以及人造皮膚組織中可以發現 *LIP4*、5、6、8、9 這五個脂解基因有較其他 *LIP* 基因高相當多的表現量，因此，本篇論文之研究目標是想探究脂解酵素與型態的相關性。首先利用反轉錄聚合酶鏈反應確認五個脂解酵素的基因存在，結果顯示五個基因皆在 *efg1* 及 *cph1* 雙基因突變株 (HLC54) 以及野生株 (SC5314)、*cph1* 突變株 (JKC19)、*efg1* 突變株 (HLC52) 皆有 mRNA 表現。為了進一步了解這些脂解酵素基因是否具有與型態或是和致病力相關的特殊作用，我以同源重組的方式將四環黴素調控表現系統 (Tetracycline-regulatable expression system, TR system) 置入其啟動子區域以及將雙套基因以 marker 置換 (homozygous knockout strain) 以研究這些基因的功能。所得到之突變菌株利用 PCR 加以確認，結果顯示 *LIP9* 原有的啟動子區域已成功地被 TR 啟動子所置換，而 *LIP4*、5、6、8、9 之雙套基因則是成功的被 marker 置換。接著進行對這些突變株進行特性分析，分析其與型態之間的關連，結果顯示脂解酵素基因 *LIP4*、5、6、8、9 與型態變化可能有所相關並且在某些情形下可以影響細胞生長。

Mutagenesis analysis of the Lipase genes, *LIP4, 5, 6, 8 and 9*, for their involvement in the morphogenesis of *Candida albicans*

Student: I-Chin Wang Adviser : Dr. Yun-Liang Yang

Institute of Biological science and Technology

National Chiao Tung University

ABSTRACT

As an opportunistic pathogen, *Candida albicans* commonly causes mucosal surface infections and is problematic for causing life-threatening systemic infections, particularly in immunocompromised patients. The ability of *C. albicans* to switch between yeast form and filamentous form has been implicated in its virulence. In fact, it has been reported that the *cph1/cph1 efg1/efg1* double mutant strain of *C. albicans* is defective in filamentous growth and also avirulent in a mouse model. Previous studies have shown *LIP* genes may play an important role in the virulence of certain bacteria and fungi, like *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Hortea werneckii*. In addition, the *LIP* family of *C. albicans* has been studied and *LIP4,5,6,8* and *9* have shown to have higher expression level during infection on certain tissues, including RHE models, mouse model, and patient oral samples. Therefore, this research is aimed to study the involvement of *LIP* family in with the morphological changes, known to associate with the virulence of *Candida albicans*. *LIP4,5,6,8* and *9* were subjected to mutagenesis by homologous recombination. *ARG4* and *URA3* were used as the selection markers to construct the TR system and obtain homozygous knockout strains. To confirm the constructions, the mutant strains were assessed by PCR. The phenotypes of these strains were characterized and analyzed for their association with cellular and colony morphology. The results shown that *LIP4,5,6,8* and *9* genes may associate with morphogenesis and involved in cell growth under certain conditions.

謝誌

敲打著鍵盤寫著謝誌，才驚覺在交大的兩年時間很快的要畫下句點。在交通大學生物科技所的時間裡，小楊老師教導我的不僅是科學的實驗方法以及對科學的熱情，從老師身上也學習到待人處世的道理。感謝老師耐心的教導這個總是不夠縝密又操之過急的學生，針對每個問題帶領我一一解決，使得這本論文能夠產出，老師，辛苦您也謝謝您了。

感謝口試委員藍忠昱老師以及彭慧玲老師，讓這本論文內容更加豐富與完整，與老師們討論科學的過程也讓我獲益良多，謝謝您們。

在實驗室的七百多個日子，實驗室夥伴的相互扶持一直是努力的動力之一，初進實驗室時對我照顧有加的阿貴姊、雅文學姊、柏吟學姊、婷尹學姊，謝謝妳們陪著總是很焦慮的我，帶我熟悉原本陌生的新竹；做事有條理的建孝學長在實驗上總是給我很多幫助；嘉嘉學姊、宛真學姊也都為實驗室添了許多歡笑；幽默的志豪、可愛的杏枚、不厭其煩跟我討論實驗的歐陽、總是跟我比大聲的金蓉、好脾氣的欣彬、高科技高手育穎、愛笑的淑萍以及認真整潔的旻秀；萍芳、柏伶、宗翰，謝謝你們一直都在。

最後，一直在身後為我擔心的家人，爸、媽、哥、天上的爺爺奶奶，你們辛苦了；靜宜、佳叡、瀟云、依蓉、小豪、小緯、婕瑜，因為有你們的支持與打氣，我才能夠面對挫折，勇敢的走下去。有你們真的很好，感謝你們以及所有一路陪伴的人們。

目錄

	頁次
中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
謝誌.....	iii
目錄.....	iv
圖表目錄.....	ix
一、緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 白色念珠菌之致病因子.....	2
1.2.1 黏附能力.....	2
1.2.2 水解作用.....	3
1.2.3 菌絲生成之細胞型態變化及表現型的轉變.....	6
1.3 本論文之研究起源及目的.....	9
二、材料.....	12
2.1 菌株.....	12
2.2 質體.....	12
2.3 引子.....	13
2.3.1 針對反轉錄聚合酶反應設計的引子.....	13
2.3.2 針對四環黴素調控表現系統設計的引子.....	14
2.4 藥品試劑.....	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.....	23
3.1 大腸桿菌勝任細胞的轉形.....	23
3.1.1 大腸桿菌勝任細胞的製備.....	23
3.1.2 勝任細胞的轉形.....	23

3.2 質體 DNA 之萃取.....	23
3.3 限制酵素反應.....	24
3.4 萃取洋菜膠內之 DNA 片段.....	24
3.5 萃取 RNA.....	25
3.6 mRNA 表現測定- 反轉錄聚合酶鏈反應.....	26
3.6.1 反轉錄.....	26
3.6.2 聚合酶鏈反應.....	27
3.7 四環黴素調控系統之建構及破壞雙套基因.....	27
3.7.1 單套、雙套基因破壞株之建立.....	28
3.7.1.1 Long primer 原理.....	28
3.7.1.2 Fusion PCR 原理.....	28
3.7.1.3 製備含篩選標誌及部分欲研究基因序列之 DNA 片段.....	29
3.7.1.3.1 利用 Long primer 方式.....	29
3.7.1.3.2 利用 Fusion PCR 方式.....	30
3.7.1.4 白色念珠菌轉形.....	31
3.7.1.5 萃取染色體 DNA.....	32
3.7.1.6 利用 PCR 方式確認單套基因之破壞.....	32
3.7.2 將 TR promoter 及 <i>URA3</i> 標記置入欲研究基因.....	33
3.7.3 確認 TR promoter 及 <i>URA3</i> 標記之轉形株.....	34
3.8 突變株之性狀分析.....	34
3.8.1 生長曲線之測定.....	34
3.8.2 菌落生長情形之觀察.....	35
3.8.3 誘發菌絲生長環境觀察型態改變.....	35
3.8.3.1 在含山羊血清之固態培養基.....	35
3.8.3.2 在含山羊血清之培養液.....	35
3.8.4 芽管試驗.....	35
3.8.5 侵犯力分析.....	36
四、結果.....	37

4.1 反轉錄聚合酶鏈反應觀察基因表現.....	37
4.2 建構四環黴素調控表現系統以及剔除雙套基因之結果.....	38
4.2.1 單套、雙套基因之破壞.....	39
4.2.1.1 製備具有同源重組區域的篩選標誌 DNA 片段.....	39
4.2.1.1.1 利用 Long primer 方式.....	39
4.2.1.1.2 利用 Fusion PCR 方式.....	39
4.2.1.2 以 PCR 確認 <i>LIP4</i> 、5、6、8、9 單套基因之破壞菌株.....	41
4.2.1.3 以 PCR 確認 <i>LIP4</i> 、5、6、8、9 雙套基因之破壞菌株.....	43
4.2.2 將 TR promoter 及 <i>URA3</i> 標記置入欲研究基因.....	46
4.2.2.1 製備具有同源重組區域以及 TR promoter 的篩選標誌 DNA 片 段.....	46
4.2.2.2 以 PCR 確認 <i>LIP9</i> 突變株是否已置入 TR promoter.....	47
4.3 突變株之性狀分析.....	48
4.3.1 於 YPD、SD 培養液中觀測生長曲線之結果.....	48
4.3.1.1 <i>LIP4</i> 突變株之生長曲線.....	48
4.3.1.2 <i>LIP5</i> 突變株之生長曲線.....	49
4.3.1.3 <i>LIP6</i> 突變株之生長曲線.....	50
4.3.1.4 <i>LIP8</i> 突變株之生長曲線.....	50
4.3.1.5 <i>LIP9</i> 突變株之生長曲線.....	51
4.3.1.5.1 <i>LIP9</i> 雙套基因剔除突變株之生長曲線.....	51
4.3.1.5.2 <i>LIP9</i> TR promoter 置入突變株之生長曲線.....	52
4.3.2 觀察菌落生長情形之結果.....	53
4.3.2.1 菌落在 YPD 培養基之生長.....	53
4.3.2.2 菌落在 SD 培養基之生長.....	54
4.3.3 細胞及菌落型態改變之結果.....	54
4.3.3.1 在含山羊血清的 YPD 培養基之生長.....	54
4.3.3.2 在含山羊血清的 Bacto agar 培養基之生長.....	55
4.3.3.3 在含山羊血清的 YPD 培養液之生長.....	56

4.3.4 芽管試驗之結果.....	56
4.3.5 侵犯力分析之結果.....	57
五、討論.....	59
5.1 反轉錄聚合酶反應分析基因表現情形之探討.....	59
5.2 以 Long primer PCR 以及 Fusion PCR 製備具有基因因同源重組區域之 篩選標誌 DNA 片段.....	60
5.3 性狀分析之探討.....	61
5.3.1 生長情形之探討.....	61
5.3.2 以血清誘導細胞型態及菌絲實驗之探討.....	63
5.3.3 以血清誘導芽管生成實驗之探討.....	64
5.3.4 侵犯力測試實驗之探討.....	65
5.4 未來展望.....	67
六、參考文獻.....	69



圖表目錄

	頁次
圖一、 <i>LIP4</i> 之反轉錄聚合酶鏈反應結果.....	75
圖二、 <i>LIP5</i> 之反轉錄聚合酶鏈反應結果.....	75
圖三、 <i>LIP6</i> 之反轉錄聚合酶鏈反應結果.....	76
圖四、 <i>LIP8</i> 之反轉錄聚合酶鏈反應結果.....	76
圖五、 <i>LIP9</i> 之反轉錄聚合酶鏈反應結果.....	77
圖六、Long primer PCR 原理示意圖.....	78
圖七、Fusion PCR 原理示意圖.....	79
圖八、 <i>LIP9</i> 破壞雙套基因所製備之篩選標誌.....	80
圖九、利用 Fusion PCR 製備 <i>LIP4-ARG4</i> 、 <i>LIP4-URA3</i> 時所須之片段.....	80
圖十、利用 Fusion PCR 製備 <i>LIP5-ARG4</i> 、 <i>LIP5-URA3</i> 時所須之片段.....	81
圖十一、利用 Fusion PCR 製備 <i>LIP6-ARG4</i> 、 <i>LIP6-URA3</i> 時所須之片段.....	81
圖十二、利用 Fusion PCR 製備 <i>LIP8-ARG4</i> 、 <i>LIP8-URA3</i> 時所須之片段.....	82
圖十三、利用 Fusion PCR 製備 <i>LIP4,5,6,8-ARG4</i> 、 <i>LIP4,5,6,8-URA3</i> 片段....	82
圖十四、PCR 確認 <i>LIP4</i> 單套基因之破壞.....	83
圖十五、PCR 確認 <i>LIP5</i> 單套基因之破壞.....	84
圖十六、PCR 確認 <i>LIP6</i> 單套基因之破壞.....	85
圖十七、PCR 確認 <i>LIP8</i> 單套基因之破壞.....	86
圖十八、PCR 確認 <i>LIP9</i> 單套基因之破壞.....	87

圖十九、PCR 確認 <i>LIP4</i> 雙套基因之破壞.....	88
圖二十、PCR 確認 <i>LIP5</i> 雙套基因之破壞.....	89
圖二十一、PCR 確認 <i>LIP6</i> 雙套基因之破壞.....	90
圖二十二、PCR 確認 <i>LIP8</i> 雙套基因之破壞.....	91
圖二十三、PCR 確認 <i>LIP9</i> 雙套基因之破壞.....	92
圖二十四、製備含有 <i>LIP9</i> 同源區域以及 TR promoter 之篩選標誌 DNA 片 段.....	93
圖二十五、PCR 確認 TR promoter 及 <i>URA3</i> 是否正確 recombine 及 integrate 至 <i>LIP9</i>	94
圖二十六、 <i>LIP4</i> 、5、6、8、9 突變株在 YPD 以及 SD 培養液之生長曲線.....	95
圖二十七、 <i>LIP9</i> 突變株在 YPD 以及 SD 培養液之生長曲線.....	97
圖二十八、菌株在 YPD 固態培養基培養三天之生長情形.....	99
圖二十九、菌株在 SD 固態培養基培養三天之生長情形.....	90
圖三十、在含山羊血清之 YPD 固態培養基之生長.....	101
圖三十一、在含山羊血清之 Bacto agar 培養基之菌落型態.....	102
圖三十二、在含山羊血清之 YPD 培養液之生長.....	104
圖三十三、芽管試驗.....	106
圖三十四、在 Solid Spider 培養基上進行侵犯力試驗.....	107
附圖一、p99CAU 質體示意圖.....	111

附圖二、建構四環黴素調控表現系統示意圖.....112

