

一、緒論

1.1 前言

隨著現代醫療科技的發達以及治療方式的改變，或者是因手術、免疫系統疾病所造成的免疫系統功能低落，導致近年院內真菌感染的比率不斷的攀升。在美國所統計的院內感染中，真菌感染中念珠菌高居前四名，而在台灣也有相同趨勢，院內感染真菌培養後分離出之菌種中白色念珠菌 (*Candida albicans*) 所佔比例至少約一半且可高達60%(Hsueh et al. 2002; Wu et al. 2006)。白色念珠菌為一伺機性病原真菌 (opportunistic pathogen)，呈多型態，具有酵母菌 (Yeast Form)、假菌絲 (Pseudohyphae)、菌絲 (Hyphae) 等型態，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。當人體免疫力下降、真菌菌量數目增加或受藥物副作用的影響，導致體內菌落生態環境改變，便會伺機感染而造成臨床症狀，輕微症狀可能僅造成鵝口瘡、女性陰道炎或是甲溝炎等局部感染，嚴重則可造成全身性的菌血症感染，尤其是在進行器官移植、癌症化療或是患有免疫系統疾病以及長期服用抗生素之患者身上，白色念珠菌血症具有高達40%的死亡率(Wenzel and Gennings 2005)。愛滋病病患族群中，經常因為白色念珠菌感染而罹患口咽白色念珠菌症 (OPC, Oropharyngeal candidiasis)，且晚期愛滋病患中有33%能被分離出具有抗藥性的白色念珠菌(Law et al. 1994)，而念珠菌感染通常會造成病患住院時日延長並增加醫療費用、降低工作生產力，嚴重時造成死亡。

面對院內真菌感染以及全球抗藥性病菌興起，抗真菌藥物的使用量正逐年攀升(Chen et al. 1997)。目前抗真菌藥物主要有四類：Polyenes、Azole-base、5-Flucytosin以及Caspofungin (Dupont 2001;

Ripeau et al. 2002; Yang and Lo 2001)。但是這些藥物的使用有其細胞毒性、副作用等不良反應與限制，加上已有白色念珠菌抗藥性菌株的產生(Akins 2005; Schuetzer-Muehlbauer et al. 2003; White, Marr, and Bowden 1998)，使得念珠菌感染成為新興的醫學問題。一般而言，早期診斷並立即給予適當治療是對抗高死亡率的重要方式，現在隨著分子生物學的進步與快速發展，我們可以從白色念珠菌基因中找尋可能造成伺機性感染之致病因子（virulence factor）進而研究其調控機制，以白色念珠菌之致病因子作為尋找新藥物目標（drug target）的方向，進一步發展出有效用、低毒性以及低副作用的新藥物。

1.2 白色念珠菌之致病因子

白色念珠菌造成致病的相關因子，主要包括其對宿主細胞的黏附能力（Adhesin）、分泌水解酶（Hydrolytic enzymes）、菌絲生成（hyphal formation）之細胞型態變化及表現型的轉變（phenotypic switching）（Haynes 2001）。

1.2.1 黏附能力

黏附至宿主組織上，為一般病原菌入侵宿主的首要侵略步驟 (Calderone and Braun 1991)，白色念珠菌可以利用菌體表面生物分子（biomolecules）或接受器（receptor）進行黏附，藉由黏附於血管內襯的表皮細胞，進而入侵組織。這些由多醣類或醣蛋白所組成的生物分子，能與宿主的細胞外基質蛋白（extracellular matrix protein，ECM protein），例如：纖維蛋白原（fibrinogen）(Casanova et al. 1992)、補體（complement）(Calderone et al. 1994)、膠原蛋白（collagen）

(Klotz et al. 1993)、纖維黏連蛋白 (fibronectin) (Negre et al. 1994)等結合，而達到黏附的目的。當其散佈於寄主血液，此微生物會藉由黏附於血管內襯的表皮細胞，進而入侵組織(Filler et al. 1996)。

與黏附作用有關的基因已知的有*INT1*、*HWPI*、*ALS*等。其中Int1p為一種transmembrane protein，含有Arginine-glycine-aspartic acid (RGD) 序列供ligand辨識，能與補體組成成分C3之降解產物iC3b結合(Hostetter 2000)，若將*INT1*突變破壞 (*int1/int1*) 之突變株於小鼠體內進行致病力分析，發現其黏附能力下降，而小鼠的存活率明顯上升(Gale et al. 1998)。另外，Hwp1p是存在於菌絲細胞壁的蛋白質，此蛋白之NH2端可作為哺乳類transglutaminase的受質，而該酵素可在人類內皮、上皮細胞中發現，這可能是增加白色念珠菌與宿主間的黏附能力的有關因素(Staab et al. 1999)。在白色念珠菌上有找到類似*Saccharomyces.cerevisiae*細胞表面黏附糖蛋白的一段序列Agglutinin-like sequence (ALS) (Hoyer et al. 1995; Lipke, Wojciechowicz, and Kurjan 1989)，經證實白色念珠菌的Als蛋白質會造成黏附作用(Fu et al. 1998)。黏附能力雖然已知可提高感染機會，但是其造成致病的機制仍未清楚。此外白色念珠菌在臨床的醫療導管中常被發現，主要原因是念珠菌會黏附在導管的周圍形成生物膜 (biofilm)，造成導管插入處有過多的念珠菌，其中牽涉生物膜形成的基因已知有*NUP85*、*MDS3*、*KEMI*以及*SUV3*，將*NUP85*、*MDS3*、*SUV3*進行雙套基因剔除之後白色念珠菌失去了初期形成生物膜的能力，而剔除*KEMI*雙套基因則會造成中期形成生物膜能力被阻斷(Richard et al. 2005)。生物膜的形成也會增加病患對真菌藥物的抗藥性(Douglas 2003)。

1.2.2 水解作用

當病原菌成功附著到宿主細胞後，必需入侵宿主組織以進行致病，為了對抗宿主的表面障蔽及免疫系統的防禦，病原菌會分泌水解酵素 (hydrolase) 消化宿主之細胞膜及免疫系統所產生的蛋白質，減少阻礙以利病原菌之 colonization。白色念珠菌產生之水解酵素包括 secreted aspartic proteinase (SAP)、磷酸脂解酶 (phospholipases) 及脂解酶 (lipase) 等。SAP 至少有十個成員，在不同的環境下會表現不同的 SAP，對受質的作用範圍很廣，能分解許多宿主蛋白如：免疫球蛋白、膠原蛋白、白蛋白 (albumin)、血紅素 (hemoglobin)、角質 (keratin) 及其他細胞蛋白等 (Hube et al. 1997; Sanglard et al. 1997)。在白色念珠菌感染下可以在病患口腔檢體中偵測到 SAP 活性提高 (Hube and Naglik 2001)，SAP 基因在不同的感染部位以及感染時間表現有所不同，SAP2、4-6、9 在肝臟以及腎臟感染中可以偵測到表現，而其中 SAP5 表現量為最大；SAP2 則是在菌血症感染的後期表現量最大 (Felk et al. 2002)。

白色念珠菌中的磷酸脂解酶 phospholipases (PL) 在 1966 年首次發表 (Werner 1966)，現今已知分為 phospholipase A、B、C、D 以及 lysophospholipase、lysophospholipase-transacylase，能水解連接 glycerophospholipid 之脂鍵 (ester bond) (Niewerth and Korting 2001)，而在 1995 年 Ashrafs 等人研究就已經發現在被菌血症血液檢體中的白色念珠菌 PL 的表現量較未進行感染作用的白色念珠菌來得高，而具有較高 PL 的菌體在小鼠身上也造成較高的死亡率。白色念珠菌中的磷酸脂解酶 B (PLB1) 被發現與其致病力較為相關，PLB 是由 *PLB1-5* 所調控 (Hoover et al. 1998; Leidich et al. 1998)。其中 *PLB1* 在動

物實驗上發現是進行致病時所需要的基因：將*PLB1*突變破壞 (*plb1/plb1*) 的菌種，不僅降低phospholipases的產生，也降低對小鼠之毒性，在相較於野生菌種之致死率100%，此突變菌種的致死率只有40% (Ghannoum 2000)。而在臨床白色念珠菌感染之病患檢體中也可以發現，在口腔感染下，可以RT-PCR方式偵測到在*PLB1-2*中，*PLB1*有較高的表現 (Naglik et al. 2003)；在2006年最新研究也指出，將*PLB5*進行破壞之後，會影響白色念珠菌在小鼠肝臟細胞中的聚落情形並降低phospholipase A₂活性(Naglik et al. 2003)。

脂解酶lipase，能水解triacylglycerol之脂鍵 (ester bond)，在白色念珠菌中LIP至少有十個成員，主要是在insoluble triacylglycerol、soluble aqueous間介面作用(Anthonsen et al. 1995)。除了在生理作用上的重要角色，在一些病原菌中lipase被認為可能是致病因子。*Propionibacterium acnes* 的 lipase 可以藉由分解人體皮膚的 triacylglycerol所釋放的free fatty acid促進自身的colonization(Gribbon, Cunliffe, and Holland 1993)。在 *Staphylococcus aureus* 以及 *Pseudomonas aeruginosa* 感染的病患檢體中可以偵測到anti-lipase IgG，顯示在這些病原菌感染中lipase都是有表現的，此外，*S.aureus* lipase可能藉由破壞granulocyte 表面而阻止宿主細胞針對病原菌進行吞噬以及毒殺作用(Jaeger 1994; Rollof et al. 1988)；而*P.aureus* 則是在 *in vitro* 中被發現在感染宿主之後可以明顯抑制 monocyte chemotaxis 表現(Jaeger, Kharazmi, and Hoiby 1991; Jaeger et al. 1992)，其lipase與phospholipase也可以針對人類血小板以及嗜中性白血球進行分解，提高12-hydroxyeicosatetraenoic acid、leukotriene B₄濃度，以破壞宿主免疫系統的組織(Konig et al. 1996)。引起黑癬症的病

原真菌 *Horrea werneckii* 中 lipolytic activity 以及細胞表面的 hydrophobicity 皆為可能的致病因子(Gottlich et al. 1995)。兼性病原真菌 *Malassezia furfur* 的 secreted lipase 也是 viability 的必須因子(Ran, Yoshiike, and Ogawa 1993)。

在臨床以及小鼠實驗中可以發現，以定量之白色念珠菌對小鼠進行*i.p.*腹腔感染24小時後將肝臟細胞取出可以發現LIP5、6、8、9之mRNA皆有表現(Hube et al. 2000)。而將定量白色念珠菌對小鼠進行感染72小時之後則可以在肝臟以及腎臟偵測到LIP5、6、8之mRNA表現；在人工合成的皮膚組織RHE model中以定量白色念珠菌感染也可以在12、36、72小時偵測到不同的LIP基因表現，其中LIP2、4-9皆可以被偵測到mRNA表現；偵測患有白色念珠菌感染的病患口腔檢體也可以發現LIP4、5、8皆有表現(Stehr et al. 2004)。最後，在針對白色念珠菌所感染21-28天之病患之消化道以及腸胃道檢體進行LIP基因表現偵測，可以觀察到LIP4、5、6、7、8在每個部位皆有表現，而LIP9、10則是只在腸胃道檢體被偵測到表現(Schofield et al. 2005)。

因此我們可以推論lipase在病原細菌以及真菌致病過程中所扮演的角色可能為幫助黏附宿主細胞、破壞宿主免疫細胞或者是分解宿主細胞作為營養來源以供給病原菌本身在宿主細胞中存活。

1.2.3 菌絲生成 (hyphal formation) 之細胞型態變化及表現型的轉變 (phenotypic switching)

白色念珠菌對於環境具有很強的適應力，不僅是所有致病菌中相當獨特的，也是研究其致病機制的重要特點。白色念珠菌為多種型態之菌體，會隨著各種環境因素的改變，可以轉變於酵母菌型

(yeast form)、假菌絲型 (pseudohyphae)、真菌絲型 (hyphae)、孢子狀 (chlamydospores) 不同的型態之間。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宿主免疫系統之偵測以及巨噬細胞之攻擊，且菌絲生成 (hyphal formation) 之細胞型態變化與致病能力有關(Mitchell 1998)。

型態的轉變會受生長環境的不同所影響，例如：溫度、酸鹼值、氮源或碳源是否充足、細胞密度等。在溫度偏37°C時和pH大於6.5等情況下，會促使白色念珠菌以菌絲型態生長；此外血清亦為誘發菌絲生長之重要因素，在含有血清的培養基中進行培養，很容易誘發菌絲的生長。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，例如：cAMP-PKA (cyclic AMP-protein kinase A)、MAPK (mitogen-activated protein kinase) 等(Ernst 2000)。

cAMP-PKA途徑中包括了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，透過磷酸化的方式對Efg1進行活化(Sonneborn et al. 2000)，而Efg1p為basic helix-loop-helix (bHLH) 之轉錄因子 (transcription factor)，能調控菌絲專一性基因 (hyphal-specific gene, HSG) 表現，這些特定菌絲基因包括HYR1、HWP1、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*S. cerevisiae*假菌絲的訊息傳遞途徑中的轉錄因子Ste12功能相似(Liu, Kohler, and Fink 1994)。將EFG1過度表現，會增加菌絲生長；將EFG1突變破壞 (efg1/efg1)，則會減少菌絲的生長並降低致病性(Lo et al. 1997)，此結果可能是由於入侵表皮細胞的能力降低(Weide and Ernst

1999)。若將*CPHI*突變破壞 (*cph1/cph1*)，在Spider固態培養基中會降低菌絲侵犯培養基的能力，但仍可受血清誘發菌絲的生長(Kohler and Fink 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*CPHI*這兩個轉錄因子突變破壞 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)，則失去受血清誘發形成菌絲之能力，將此雙基因突變株於小鼠體內進行致病力分析，結果顯示呈酵母菌型之雙基因突變株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 對小鼠是不致病的(Lo et al. 1997)。然而，卻有研究指出*cph1/cph1 efg1/efg1* 突變株於*in vivo* 下仍可長出菌絲，造成輕微的鵝口瘡、眼睛表皮細胞損害、colonize 在免疫不全gnotobiotic piglet的舌頭上(Riggle et al. 1999)，這也讓我了解白色念珠菌的確是有其他調控菌絲生長或是型態變化的訊息途徑。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*)，則呈現持續性菌絲生長；將突變株於小鼠體內進行致病力分析，發現小鼠的死亡率並無差異 (Braun et al. 2000; Kadosh and Johnson 2001; Murad et al. 2001)，表示調控型態轉變的因子並非一定是致病因子，但是有可能為正相關。

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，雖然調控型態轉變的因子不一定是致病因子，但是這些因子可能會透過對型態的轉變進而影響致病力，也就是跟致病力有正相關性。因此我可以藉由研究白色念珠菌之相關基因在基因突變後是否對形態有所改變，來作為致病因子之初步鑑定，以期找到抗念珠菌藥物之目標及抗致病力有關的基因。

在白色念珠菌株 WO-1 中,則有平滑白色的 white (W) 和灰色扁

豆形的 opaque (O) 二種 phases 之 phenotypic switching，有研究指出此菌株在表現型態之間的轉換是與生物膜形成(Daniels et al. 2006) 以及特殊致病毒性有相關，而利用晶片偵測到牽涉在表現型態轉變的基因，結果發現包括了 *CDR3*、*EFG1* 以及 *LIP4* 等基因皆被偵測到表現(Lan et al. 2002)。此外白色念珠菌之菌落表現型 (colony phenotype) 會發生可逆性的轉變 (switching)，研究中指出，在白色念珠菌 3153A 菌株中的菌落表現型可以轉換成多種形式(Berman and Sudbery 2002)，外觀包括有一般的平滑形 (smooth)、星形 (star)、環狀 (ring)、不規則之皺折 (irregular wrinkle)、絨狀的 (fuzzy) 等等。

1.3 本論文之研究起源及目的

近十年以來，真菌感染在院內感染的比例不斷提高並且成為不可忽視的問題，目前所普遍使用的抗真菌藥物不但有其副作用，且已發現有抗藥性菌珠的產生，使得真菌感染治療更加困難。由於在包括小鼠模型不同器官中、臨床病患口腔檢體以及人造皮膚組織上的白色念珠菌感染中，可以看到 *LIP4*、5、6、8、9 在不同器官以及部位的感染中分別有較其他 *LIP* 基因高的 mRNA 表現量(Hube et al. 2000; Schofield et al. 2005; Stehr et al. 2004)，本實驗室針對 *LIP* genes family 中此五個基因進行突變分析，期望利用分析基因突變對可觀察型態之影響，研究其基因除了分解脂質以外的能力，進而研究其與白色念珠菌致病力相關程度，以期能進一步將與致病能力有正相關的基因應用於發展抗真菌新藥的設計。

針對文獻以及臨床感染白色念珠菌下各個 *LIP* 基因表現情形，我挑選出重複出現在各種感染情形下的 *LIP4*、5、6、8、9 作為實驗的

對象。

本篇論文之研究目的，是想探究水解酵素中的脂解酵素 (lipase) 是否和致病力或是型態有相關性，實驗策略是先以反轉錄聚合酶反應確認基因表現的分析、再利用以同源重組技術置換雙套基因以及置入可調控之 TR 啟動子以建構四環黴素調控表現系統 (Tetracycline-regulatable expression system, TR system)，然後分析基因突變後對型態變化的影響之研究。

首先利用反轉錄聚合酶反應分析 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 之基因表現量，確認基因在不同菌株的 mRNA 表現。本實驗採用 Invitrogen 之 Superscript RNaseH RT-PCR system 進行偵測。

在確認各個基因在野生株 SC5314 與 HLC54 (*cphl/cphl efgl/efgl*)、HLC52 (*CPHI/CPHI efgl/efgl*)、JKC19 (*cphl/cphl EFGI/EFGI*) 皆有所表現，將目標基因 (target genes) 利用同源重組方式以 *ARG4* 以及 *URA3* 置換雙套基因以建構剔除雙套基因之菌株 (homozygous strain)；同樣也利用同源重組方式置換基因 promoter 區域以建構四環黴素調控表現系統 (Tetracycline-regulatable expression system, TR system) 並作基因功能之研究。

利用含欲破壞基因相同序列之 DNA 片段與已被剔除 *ARG4*、*URA3* 以及 *HIS1* 之白色念珠菌 (BWP17) 染色體上基因發生同源重組置換 (homologous recombination)，達到基因之破壞 (gene disruption) (Wilson, Davis, and Mitchell 1999)，重複兩次轉形便可以利用不同的 marker (*ARG4*、*URA3*) 將雙套基因皆進行破壞剔除的動作，得到 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 之 homozygous strain。

四環黴素調控表現系統 (TR system) 是可以利用四環黴素對突

變株進行基因過度表現 (overexpression) 或是抑制基因表現 (inhibition of gene expression) 的實驗(Nakayama et al. 2000)。TR system 主要由 TR promoter 及 TR transactivator 所組成，TR promoter 是含有四環黴素操作子序列 (tetracycline operator sequence, *tet O*) 的啟動子，能與 TR transactivator 活化子 (Tet R) 結合；當四環黴素存在時，四環黴素會和 Tet R 結合，而抑制 Tet R 與 *tet O* 之結合，導致基因無法表現；但是缺乏四環黴素時，Tet R 會與 *tet O* 結合，使基因受到活化而過度表現。四環黴素調控表現系統 (TR system) 之建構首先要破壞 (knockout) 欲研究基因的單套基因，藉由含欲破壞基因相同序列之 DNA 片段與已含有驅動 *tet R* 表現之白色念珠菌 (*tetR/BWP17*) 染色體上基因發生同源重組置換 (homologous recombination)，達到基因之破壞 (gene disruption)(Wilson, Davis, and Mitchell 1999)。再將 TR promoter 同樣地利用基因重組置換的方式置入 (knockin) 所欲研究的基因之 promoter 區域，把欲研究基因原有的 promoter 區域置換成 TR promoter。經過二次轉形所得到的，即是可以利用四環黴素來調控其基因表現的突變菌株 (附圖二)。轉形後所得到之所有突變株，經含有不同胺基酸培養基作初步篩選後，利用 PCR 確認目標基因是否被破壞、被破壞之位置是否正確。

最後分析這些突變株之特性描述 (characterization)，觀察基因破壞前後之性狀差異，例如型態變化，推測其基因除了分解脂質以外是否也牽涉到其他功能，甚而了解其與形態變化之間的關聯，以供將來之致病力研究及應用於抗真菌藥物之設計上。

二、材料

2.1 菌株

1. *Escherichia coli* : DH5 α

2. *Candida albicans* :

菌株 (Strain)	基因型 (Genotype)	Reference
SC5314	<i>CPH1/CPH1 EFG1/EFG1</i>	(Gillum, Tsay, and Kirsch 1984)
HLC52	<i>CPH1/CPH1 efg1/efg1</i>	(Lo et al. 1997)
JKC19	<i>cph1/cph1 EFG1/EFG1</i>	(Liu, Kohler, and Fink 1994)
HLC54	<i>cph1/cph1 efg1/efg1</i>	(Lo et al. 1997)
BWP17/ tetR	<i>arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3 ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3\timesHA-CaHIS1</i>	羅秀容實驗室， 2003，國衛院臨床 研究組，未發表
BWP17	<i>arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3</i>	(Wilson, Davis, and Mitchell 1999)
ICW174A	<i>lip4::ARG4/LIP4</i>	本實驗
ICW174	<i>lip4::ARG4/lip4::URA3</i>	本實驗
ICW175A	<i>lip5::ARG4/LIP5</i>	本實驗
ICW175	<i>lip5::ARG4/lip5::URA3</i>	本實驗
ICW176A	<i>lip6::ARG4/LIP6</i>	本實驗
ICW176	<i>lip6::ARG4/lip6::URA3</i>	本實驗
ICW178A	<i>lip8::ARG4/LIP8</i>	本實驗
ICW178	<i>lip8::ARG4/lip8:: URA3</i>	本實驗
ICW181A-1	<i>lip9::ARG4/LIP9(tetR/BWP17)</i>	本實驗
ICW181A-2	<i>lip9::ARG4/LIP9(BWP17)</i>	本實驗
ICW179	<i>lip9::ARG4/lip9:: URA3</i>	本實驗
ICW181	<i>lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA</i>	本實驗

2.2 質體

質體	特性	Reference
pRS- <i>ARG4ΔspeI</i>	篩選標記為抗 Ampicillin，並含 <i>ARG4</i> 基因。	(Wilson, Davis, and Mitchell 1999)
pGEM- <i>URA3</i>	篩選標記為抗 Ampicillin，並含 <i>URA3</i> 基因。	(Wilson, Davis, and Mitchell 1999)
p99CAU	篩選標記為抗 Ampicillin，並含 TR promoter 及 <i>URA3</i> 基因。	(Nakayama et al. 2000)
p99CAUL9	將白色念珠菌之 <i>LIP9</i> 基因片段連接至 p99CAU 載體上，篩選標記為抗 Ampicillin，並含 TR promoter 及 <i>URA3</i> 基因。	本實驗

2.3 引子

2.3.1 針對反轉錄聚合酶反應設計的引子

引子	序列 5'-3'	位置
<i>LIP4-F</i>	TGATCAATTATATTGGTAAGCA	<i>LIP4</i> gene: +856~+878
<i>LIP4-R</i>	TCCTTTTTGGATGAGTATATTC	<i>LIP4</i> gene: +1310~+1289
<i>LIP5-F</i>	AATCGTCCCTATTGTCGATACC	<i>LIP5</i> gene: +1031~+1052
<i>LIP5-R</i>	AAGTCCGAGATGGAGAACAAC	<i>LIP5</i> gene: +1313~+1293
<i>LIP6-F</i>	TTAAACCTGGTGCCAAAGCTG	<i>LIP6</i> gene: +808~+828
<i>LIP6-R</i>	TCGATGCCCTGGTGGTGAAC	<i>LIP6</i> gene: +1248~+1229
<i>LIP8-F</i>	AGAGTGATACAGACAAAAAATCAG	<i>LIP8</i> gene +947~+970
<i>LIP8-R</i>	AAGACCATTTCAGCATCATGGTG	<i>LIP8</i> gene : +1467~+1446
<i>LIP9-F</i>	TTTATAAAGTATGTGGGAGCTAG	<i>LIP9</i> gene

		+878~+900
<i>LIP9-R</i>	TAGGACCAAGCCCTTGTTGTG	<i>LIP9</i> gene +1343~+1323
<i>ACT1-F</i>	CCCATCTCTTGTTGGTAG	<i>ACT1</i> gene: +93~+110
<i>ACT1-R</i>	TGGATGGACCAGATTCGT	<i>ACT1</i> gene: +1105~+1008

2.3.2 針對剔除雙套基因以及四環黴素調控表現系統 TR system 設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
<i>LIP4</i> fuAF	GTGCTTGTGGGGCAGTAGTA	<i>LIP4</i> gene: -899~-918
<i>LIP4</i> fuAR	<u>ACGTCGTGACTGGGAAA</u> ACTGAAGA CATTTCATCGCTGG	<i>LIP4</i> gene: -648~-628
<i>LIP4</i> fuBF1	<u>ATCCGCTCACAATTACACA</u> TCTCACA TATCGATGGGCC	<i>LIP4</i> gene: +2399~+2418
<i>LIP4</i> fuBR1	GGAAAAAGATTGTTGCCAAA	<i>LIP4</i> gene: +2513~+2493
<i>LIP4</i> fuBF2	<u>ATCCGCTCACAATTCCACA</u> CTCATCC AAAAAGGACTTGG	<i>LIP4</i> gene: +1615~+1634
<i>LIP4</i> fuBR2	GAGGGGTCTAACACTTCTGGTG	<i>LIP4</i> gene: +1968~+1947
<i>ARG4LIP4</i> AF	<u>CGAGCGATGAAATGTCTTCAG</u> TTTTCC CAGTCACGACGT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 1819~1838
<i>ARG4LIP4</i> BR1	<u>GGCCATCGATATGTTATGTGAGATG</u> TGGAATTGTGAGCGGAT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960
<i>ARG4LIP4</i> BR2	<u>CCAAGTCCTTTTTGGATGAGTGTGGA</u> ATTGTGAGCGGAT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960
<i>LIP5</i> fuAF	CTTGCGTTTAGATCCTGAACG	<i>LIP5</i> gene: -334~-354
<i>LIP5</i> fuAR	<u>ACGTCGTGACTGGGAAA</u> ACTTTTTGA TGACCTGACCCAA	<i>LIP5</i> gene: -20~-1
<i>LIP5</i> fuBF1	<u>ATCCGCTCACAATTCCACA</u> CCAACAG	<i>LIP5</i> gene:

	GTCAAATTACCCC	+2161~2180
<i>LIP5fuBR1</i>	ACACGACACAGTCATGTGCC	<i>LIP5</i> gene: +2339~+2320
<i>LIP5fuBF2</i>	<u>ATCCGCTCACAATTCCACAGCCCAGA</u> TGTCCAAAAAGAT	<i>LIP5</i> gene: +1615~+1634
<i>LIP5fuBR2</i>	TGATAGATTCGAGTCCCCATACA	<i>LIP5</i> gene: +2063~+2041
<i>ARG4LIP5AF</i>	<u>TTGGGTCAGGTCATCAAAAAGTTTTC</u> CCAGTCACGACGT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 1819~1838
<i>ARG4LIP5BR1</i>	<u>GGGGTAATTTGACCTGTTGGTGTGGA</u> ATTGTGAGCGGAT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960
<i>ARG4LIP5BR2</i>	<u>ATCTTTTTGGACATCTGGGCTGTGGA</u> ATTGTGAGCGGAT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960
<i>LIP6fuAF</i>	GACATAATGGGAAACTCCAGAA	<i>LIP6</i> gene: -329~-350
<i>LIP6fuAR</i>	<u>ACGTCGTGACTGGGAAAAC</u> CCTAGTT TAGTCACAGGTGA	<i>LIP6</i> gene: +4~-15
<i>LIP6fuBF1</i>	<u>ATCCGCTCACAATTCCACACAACCAG</u> AGGCTTGAACAAA	<i>LIP6</i> gene: +1877~+1896
<i>LIP6fuBR1</i>	CGAACTTCCAATATGGTAAACAG	<i>LIP6</i> gene: +2341~+2319
<i>LIP6fuBF2</i>	<u>ATCCGCTCACAATTCCACAGGACATT</u> GTTGAGCATGTGG	<i>LIP6</i> gene: +1615~+1634
<i>LIP6fuBR2</i>	GCATACATCAATTCAAACACCC	<i>LIP6</i> gene: +1874~+1853
<i>ARG4LIP6AF</i>	<u>TCACCTGTGACTAAACTAGGGT</u> TTTTC CCAGTCACGACGT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 1819~1838
<i>ARG4LIP6BR1</i>	<u>TTTGTTCAAGCCTCTGGTTG</u> TGTGGA ATTGTGAGCGGAT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960
<i>ARG4LIP6BR2</i>	<u>CCACATGCTCAACAATGTCCT</u> GTGGA ATTGAATTGTGAGCGGAT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960
<i>LIP8fuAF</i>	GGGTCGAGAAAGCGGAAAAG	<i>LIP8</i> gene : -514~-495
<i>LIP8fuAR</i>	<u>ACGTCGTGACTGGGAAAAC</u> ATTCCCT	<i>LIP8</i> gene :

	TGTTGACGCAGGT	-231~-250
<i>LIP8fuBF1</i>	<u>ATCCGCTCACAATTCCACA</u> TCGGTTA ATCCGAAACACCC	<i>LIP8gene</i> : +2337~+2356
<i>LIP8fuBR1</i>	GTGCCATTGTTTGCCCAAAC	<i>LIP8gene</i> : +2672~+2653
<i>LIP8fuBF2</i>	<u>ATCCGCTCACAATTCCACA</u> TGCTCCT GCTGCCTTGACTT	<i>LIP8gene</i> : +1615~+1634
<i>LIP8fuBR2</i>	TCTCTGTTGGAGTTTGCCCG	<i>LIP8gene</i> : +2213~+2194
<i>ARG4Lip8AF</i>	<u>ACCTGCGTCAACAAGGGAAT</u> GTTTTTC CCAGTCACGACGT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 1819~1838
<i>ARG4LIP8BR1</i>	<u>GGGTGTTTCGGATTAACCGAT</u> TGTGGA ATTGTGAGCGGAT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960
<i>ARG4LIP8BR2</i>	<u>AAGTCAAGGCAGCAGGAGCA</u> TGTGG AATTGTGAGCGGAT	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3979~3960
<i>LIP9KOF1</i>	CGTTGTCTTTGTTTACATCAACAAAGAG ATAGCCCCTTTCTGGAAAAACAATTC TGGTCGTCGTACAC <u>GTTTTCCCAG TC</u> <u>ACGACGTT</u>	<i>LIP9gene</i> : -255~-186
<i>LIP9KOF2</i>	CACATAGAATGCCTTATCATTATCTGAC TTGGAAGAGTATAAATCTAGCGCAAATG ACCTCCTTATTCT <u>GTTTTCCCAG TCAC</u> <u>GACGTT</u>	<i>LIP9gene</i> : -90~-21
<i>LIP9KOR</i>	TTAATTTCAAGTTGATCCTTTTGAATAT TAGGACCAAGCCCTTGTGTGCAACGA CATCC <u>TGTGGAATTGT GAGCGGATAA</u> <u>TTGCTGCC</u>	<i>LIP9gene</i> : +1372~+1303
<i>LIP9tetAF-KpnI</i>	<u>GGGTACCC</u> GGCAAACGTAACGAGGAG TAACTAT	<i>LIP9gene</i> : -930~-906
<i>LIP9tetAR-XhoI</i>	<u>CCCTCGAGGG</u> CGGAATGGATGGAGGT ACA	<i>LIP9gene</i> : -601~-624
<i>LIP9tetBF-NotI</i>	<u>AGGCGGCCGC</u> ATGTTTACTTATCCAAT CAAGAAAATGT	<i>LIP9gene</i> : +3793~3820

<i>LIP9</i> tetBR- <i>Sac</i> II	<u>TCCCCGCGGGG</u>ACGCGAATGGAGTTC ACACA	<i>LIP9</i> gene : +537~+518
<i>cLIP4R</i>	CGGTTCCAAGTATGCCAGTT	<i>LIP4</i> gene : +2418~+2399
<i>cLIP5R</i>	TCTATGTGTTTCAGAATTGGTTGC	<i>LIP5</i> gene : +2916~+2895
<i>cLIP6R</i>	GGCGAAAGGGAAGAGGATAT	<i>LIP6</i> gene : +3015~+2994
<i>cLIP8F</i>	GGAACAATGCCAATTTGACAC	<i>LIP8</i> gene : -561~-581
<i>cLIP8R</i>	CTGATGTTCTTGTTAGGGCACG	<i>LIP8</i> gene : +2564~+2543
<i>cLIP9F</i>	GATTGTTTCGACGGGAAAATCA	<i>LIP9</i> gene : -441~-461
<i>cLIP9R</i>	CTCGCAACCACAATGAAACC	<i>LIP9</i> gene : +2491~+2472
HJL241	TCAATGGATCAGTGGCAC	pRS- <i>ARG4ΔspeI</i> : 3339~3357
HJL133	ACCAGTAGCACAGCGATT	pGEM- <i>URA3</i> : 3459~3476
HJL199	TGGA	<i>S. cerevisiae ADHI</i> 3' flanking (terminator) +917~+935 sense to tetracycline-regulta ble promoter

2.4 藥品試劑

- Amresco : Glycerol (Cat.No.0854-1L-PTM) 、 Phenol saturated solution (Cat.No.0945)
- AppliChem : Ampicillin (Cat.No.A2839)
- BD : Advantage™ 2 Polymerase Mix (Cat.No.639201)
- Bayou Biolabs : 100bp DNA ladder
- Bio-Rad : Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Cat.No.161-0729)
- Difco : Bacto agar (Cat.No.143175) 、 Yeast nitrogen base w/o amino acid (Cat.No.145368) 、 YPD broth (Cat.No.135141XB) 、 Nutrient Broth (Cat.No.149018) 、 D-Mannitol
- Gibco BRL : Goat serum (Cat.No.16210-072)
- Invitrogen : Superscript III RNaseH RT-PCR system (Cat. No. 118080-044)
- J.T.Baker : Dextrose (Cat.No.1916-01) 、 Formamide (Cat.No.33272) 、 Formaldehyde (Cat.No.15512) 、 3-(N-Morpholino propanesulfonic acid) (MOPS) (Cat.No.1132612) 、 Triton® X-100 (Cat.No.X198-07)
- Merck : Dodecyl Sulfate Sodium Salt (SDS) (Cat.No.1.12012.0500) 、 Ethanol (Cat.No.1.00983.2500) 、 Tris-HCl (Cat.No.1.01547.1000) 、 Sodium Acetate (Cat.No.1.06267.0500) 、 Sodium Citrate (Cat.No.1.11037.1000) 、 Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Cat.No.1.06346.0500) 、 Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (Cat.No.1.06580.0500) 、 Maleic acid (Cat.No.8.17058.1000)
- NEB : Restriction Enzyme : *Kpn* I 、 *Not* I 、 *Sac* II 、 *Xho*I Mixture (Cat.No.PTM8010)
- Riedel-deHaen : Sodium hydroxide (Cat.No.30620) 、 Sodium chloride (Cat.No.31434)
- Scharlau : LB agar (Cat.No.01-385) 、 LB broth (Cat.No.02-385)
- SibEnzyme : 1 kb DNA ladder (Cat.No.SEM11C001)

- Sigma : Glass Beads (Cat.No.G-9268) 、 Lithium Acetate (Cat.No.L-6883) 、 L-Arginine (Cat.No.A-5131) 、 Uridine (Cat.No.U-0750) 、 L-Histidine (Cat.No.H-8125) 、 Polyethylene Glycol3350 (Cat.No.P-4338) 、 Potassium phosphate (Cat.No.P-9666) 、 polyoxyethene-sorbitan monolaurate (Tween20) (Cat.No.P-1379) 、 Phenol (Cat.No.P-4682)
- TaKaRa: EX TaqTM (Cat.RR001A) 、 10X PCR buffer 、 dNTPs

2.5 緩衝溶液及溶劑

- 50X TAE buffer

48.4 g Tris base , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml , 11.42 ml acetic acid added dd H₂O 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

- 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

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

- YPD 培養液

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

- YPD/10% Goat serum 培養液

2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 10% Goat serum

- 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/4% Goat Serum 培養基

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

- SD/Uridine 培養基

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

80 mg/liter uridine

- SD 培養基

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

- solid Spider 培養基

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

2.7 儀器設備

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

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

核酸計算儀 GeneQuant pro(AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

程式溫度控制儀 PTC-100^{RT} (MJ RESEARCH INC.)

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)

電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

水平式電泳槽 MJ-105(MEDCLUB)

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

Biofuge.pico (Kendro)

電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)

恆溫式震盪培養箱 B206(FIRSTEK SCIENTIFIC)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000(BIO-RAD)

桌上型高速離心機 5100(KUBOTA CORPORATION)

落地型高速離心機 SORVALL RC 5C(DUFONT)

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 NIKON COOLPIX 2500

數位相機 OLYMPUS C-5050ZOOM



三、方法

3.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的轉形 (Transformation)

3.1.1 大腸桿菌勝任細胞的製備 (Sambrook et al. 1989)

接種大腸桿菌DH5 α 單一菌落於 5 ml 的LB培養液、37°C 震盪培養 (150rpm) 隔夜後，取 2 ml的菌液轉養於 100 ml的 LB培養液、37°C 震盪培養 (150 rpm) 至O.D_{600nm}約 0.6~0.8 時，靜置於冰上 20 分鐘，以 3,500 rpm \times 10 分鐘離心後去除上清液，以 50 ml預冷的 0.1 M CaCl₂懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘，以 3,500 rpm \times 10 分鐘離心後去除上清液，以 5 ml預冷的 0.1 M CaCl₂懸浮菌體，置於冰上 1 小時後，可直接進行細胞轉形，或是於 4°C 靜置 18 小時後，以 3,500 rpm \times 10 分鐘離心後去除上清液，以 5 ml的 0.05 M CaCl₂ (含 15% Glycerol) 懸浮菌體，以每個微量離心管 50 μ l為單位進行分裝，儲存於-80 °C。

3.1.2 勝任細胞的轉形 (Sambrook et al. 1989)

將儲存於-80 °C 的勝任細胞取出置於冰上解凍，然後加入質體 DNA 0.1~1 μ g，冰浴 30 分鐘，在 42 °C 水浴中進行熱休克(heat shock) 1 分鐘，後置於冰上 5 分鐘，加入 300 μ l 的 LB 培養液於 37°C 震盪培養 (150 rpm) 1 小時，取 100 μ l 的菌液塗抹於含 Ampicillin (50 μ g/ml) 之 LB 培養基上，置於 37 °C 溫箱中培養 12~18 小時。

3.2 質體 DNA 之萃取

使用ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit，萃取出大腸桿菌內之質體DNA。先將菌落接種於含Ampicillin (50 μ g/ml) 之 5ml 的LB培養液、於 37 °C 溫箱中震盪培養 (150 rpm) 12~16 小時，以室

溫 2500 rpm (Kubota 5100) × 12 分鐘離心，去除上清液，加入 200 μ l 的 Solution I Buffer 懸浮菌體並移置微量離心管中，取 200 μ l 的 Solution II Buffer 緩等地混合均勻後，加入 200 μ l 的 Solution III Buffer 緩等地混合均勻，以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 5 分鐘離下菌體，取上層液至 Mini-MTM column，以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 1 分鐘離心，倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml 的 Washing buffer，在室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 1 分鐘離心，倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml 的 Washing buffer，以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 1 分鐘離心，倒掉收集管內液體，再以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 3 分鐘離心，將 Mini-MTM Column 移至新微量離心管，以 50 μ l 的二次無菌水或 1X TE buffer 加入 Mini-MTM Column 中，靜置 1 分鐘後，以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 1 分鐘離心後，將製備好的質體 DNA 儲存於 -20°C。



3.3 限制酵素反應 (Sambrook et al, 1989)

為製備實驗所需的 DNA 片段，取適量 DNA (約 0.5~10 μ g；視反應需要) 到適量反應體積 (20~30 μ l) 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，視需要以 Gel Extraction System 或 PCR Clean-up Kit 來純化 DNA 並去除限制酵素及鹽類。

3.4 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

使用 PREMIER 之產品 Gel Extraction System，萃取出洋菜膠內之 DNA 片段。將切下之洋菜膠 (約 50~200 mg)，置於微量離心管內，

加入 0.5 ml 的 Binding Buffer，於 60 °C 加熱 10 分鐘至完全溶解，冷卻至室溫後，將混合液移至 Gel-M™ Column，以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 1 分鐘 離心，倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml 的 Washing buffer，以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 1 分鐘離心，倒掉收集管內液體，再加入 0.7 ml 的 Washing buffer，以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 1 分鐘離心，倒掉收集管內液體，再以室溫 13,000 rpm (Biofuge pico) × 3 分鐘離心，將 Gel-M™ Column 移置新微量離心管，置於 45-60 °C 烘箱中以去除多餘酒精，加入 30 µl 的二次無菌水或 TE buffer 於 Gel-M™ Column 中，以 13,000 rpm (Biofuge pico) × 1 分鐘離心，將萃取出之 DNA 儲存於 -20 °C。

3.5 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 °C 隔夜震盪培養 (150 rpm)，再取其中 2 ml 的菌液轉養至 50 ml 的 YPD 培養液，並加入 5 ml 的山羊血清 (GiBco BRL, Goat serum)，37 °C 震盪培養 (150 rpm) 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 3000 rpm (Eppendorf 5804R) × 10 分鐘離心，去除上清液，加入 5 ml 的 DEPC-treated H₂O 懸浮菌體，於 4 °C 以 3000 rpm (Eppendorf 5804R) × 10 分鐘離心，去除上清液，之後的操作過程皆於 4 °C 冷房進行。加入 0.5 ml 的 RNA isolation buffer 懸浮菌體，vortex 5 分鐘，加入 1/3 倍體積的玻璃珠，vortex 5 分鐘，加入 0.5 ml 的 phenol，vortex 5 分鐘，加入 0.5 ml 的 RNA isolation buffer，vortex 5 分鐘，於 4 °C 以 3000 rpm (Eppendorf 5804R) × 10 分鐘離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入等體積 phenol

混合，於 4 °C 以 13,000 rpm (MICRO 240A) × 5 分鐘離心，將上層液移至新的 1.5 ml 微量離心管，再加入等體積 phenol 混合，於 4 °C 以 13,000 rpm (MICRO 240A) × 10 分鐘離心，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，加入 1/8 倍體積的 3 M 醋酸鈉及 2.5 倍體積的 100% -20 °C ETOH 混合均勻，置於 -20 °C 30 分鐘，於 4 °C 以 13,000 rpm (MICRO 240A) × 10 分鐘離心，將上清液倒掉，加入 0.5 ml 的 75% -20 °C ETOH 清洗管壁沉澱物，於 4 °C 以 13,000 rpm (MICRO 240A) × 10 分鐘離心，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沉澱物呈微乾狀態，將 RNA 溶於 30 µl 的 DEPC-treated H₂O 中，儲存於 -80 °C。

3.6 mRNA 表現測定 (mRNA expression level) - 反轉錄聚合酶鏈反應

3.6.1 反轉錄 (RT)

白色念珠菌的 cDNA，是利用 Invitrogen Superscript RNaseH RT-PCR system (Cat. 118080-044) 合成。進行合成之前必須將萃取出之 total RNA 中的染色體 DNA 去除，使用 DNase I (2U) 與 total RNA (10 µg) 置於 37 °C 反應 30 分鐘，加入 1 µl 0.5M EDTA 後置於 75 °C 反應 10 分鐘以終止反應。將反應過後的 total RNA 回溶至 1 µl/µg，冰存 -80 °C。

反轉錄酶合成溫度依引子所計算出之 T_m 值約低 2 至 5 °C。實驗過程皆依照產品內附之說明書，將 9 µl RNA、1 µl 引子 (Reverse primer 20 pmole) 及 2 µl 的 dNTP，置於 65 °C 5 分鐘，隨即放在冰中；加入 4 µl 的 5x cDNA synthesis buffer、1 µl 的 RNase OUT (40U/µl)、1 µl 的 DEPC-treated H₂O、1 µl 的 SuperscriptTM RT (15U/µl)；置於合成溫度 60-90 分鐘，85 °C 五分鐘；加入 1 µl 的 RNase H (2U/µl)，置於 37 °C 20 分

鐘。所得產物儲存於-20 °C。

3.6.2 聚合酶鏈反應 (PCR)

合成白色念珠菌基因的cDNA片段的PCR過程是使用TaKaRa EX Taq™ (Cat.RR001A)。將 78.5 µl 的二次水、10 µl 的 10X PCR Buffer、8 µl 的 2.5 mM dNTP MIX、1 µl 的 10 pM 反向引子及 1 µl 的 20pM正向引子、0.5 µl 的Taq (5 U/µl)、1 µl的cDNA產物 (約 1µg RNA)，加入 0.5 ml的微量離心管內混合均勻，最終反應體積 100 µl，於聚合酶溫度循環機中進行反應。PCR反應完成後，利用 0.8%洋菜膠電泳觀察PCR產物之片段大小是否正確，作為初步的確認。

PCR 溫度設定如下：

1. 95 °C 5 分鐘
2. 94 °C 1 分鐘
3. 50 °C 1 分鐘
4. 72 °C 1.5 分鐘
5. 72 °C 10 分鐘



步驟 2 至步驟 4 重複 30 次循環。

3.7 四環黴素調控表現系統 (Tetracycline-regulatable expression system, TR system) 之建構以及破壞雙套基因 (homozygous knock out)

利用四環黴素調控表現系統 (TR system) 進行基因過度表現 (overexpression) 或是抑制基因表現 (inhibition of gene expression) 的實驗 (Nakayama et al, 2000)。首先要在已含有驅動 *tet R* 表現之白色念珠菌 (BWP17/ *tetR*) 中，將欲研究基因的單套基因利用序列同源基因重組置換的方式 (homologous recombination)，進行單套基因

的破壞 (knockout)。再將已建構含有 TR promoter 及 *URA3* 標記與欲研究基因之質體以限制酵素處理後，將含有 TR promoter 及 *URA3* 標記與欲研究基因之 DNA 片段轉形至前述基因破壞所得到之轉形株 (transformants)。經過二次轉形後所得的突變菌株，在沒有四環黴素之環境下，可以藉由 Tet R 與 TR promoter 上的 *tet O* 結合，促使欲研究基因大量表現；但是當生長環境中含有四環黴素時，四環黴素會和 Tet R 結合，抑制 Tet R 與 *tet O* 結合，而使基因不表現。

而破壞雙套基因方面則是在白色念珠菌 (BWP17) 中，將欲研究基因的雙套基因利用序列同源基因重組置換的方式 (homologous recombination) 以不同標記 (*ARG4*、*URA3*) 進行基因之破壞。經過二次轉形的突變菌株可進行一連串之定性分析。

3.7.1 單套、雙套基因破壞株之建立 (heterozygous knockout strain、homozygous knockout strain)

本實驗室利用含有與欲研究基因相同序列及篩選標誌 (*ARG4*) 之 DNA 片段在白色念珠菌中進行重組置換而達到基因破壞的目的 (Wilson et al, 1999)，可破壞單套或是雙套基因。而實驗方法包括以 Long primer 方式以及 Fusion PCR 方式。

3.7.1.1 Long primer 原理

從 Stanford 資料庫 (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) 所獲得欲研究基因的序列資料中，設計一段含有與欲研究基因相同序列 70 mer 及篩選標誌質體 (pRS-*ARG4*Δ*SpeI*; pGEM-*URA3*) 序列 20 mer 之引子，並以篩選標誌質體為模板進行 PCR 反應，可得到包含欲研究基因及篩選標誌之 DNA 片段。(見圖六)

3.7.1.2 Fusion PCR 原理

利用欲研究基因序列的 5'(A region) 以及 3'(B region) 各約 300bp 作為轉形作用中置換區域，引子序列含有 20mer 與欲研究基因相同序列以及 19mer 篩選標誌之序列，利用 wild type genomic DNA 為模板進行 PCR 得到 A、B region；另設計引子序列含有 19mer 篩選標誌質體以及 20mer 欲研究基因之 3'及 5'置換區域，以篩選標誌質體為模板進行 PCR；最後利用 5'(A region) 之正向引子以及 3'(B region) 之反向引子，A region、B region 以及篩選標誌區域三者為模板，進行 PCR 反應。(見圖七)

在單套基因被破壞之後，我將同源重組區域往基因 5'方向移動約 200bp，由於單套破壞基因已經失去新的同源區域，可以避免在利用相同之同源區域下將原本已破壞之單套基因重新置換掉。

將 Longprimer 以及 Fusion PCR 所合成出的 DNA 片段與已含有驅動 *tet R* 表現之白色念珠菌 (BWP17/*tetR*) 以及不含 *tet R* 之白色念珠菌 (BWP17) 進行轉形 (transformation)，因相同的基因序列會與染色體 DNA 發生基因重組置換，可藉此方式將篩選標誌帶入以達到基因破壞的目的，利用適當的培養基作初步篩選。

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

3.7.1.3.1 利用 Long primer 方式

將 78.5 μ l 的二次水、10 μ l 的 10X PCR Buffer、8 μ l 的 2.5 mM NTP MIX、1 μ l 的 5 μ M *LIP9KOF1* 引子及 1 μ l 的 5 μ M *LIP9KOR* 引子、0.5 μ l 的 Taq (5 U/ μ l)、1 μ l 的 pRS-*ARG44SpeI*，pGEM-*URA3* 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 100 μ l，於聚合酶溫度循環機中進行反應。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 並去除酵素及鹽類。

PCR 溫度設定如下：

1. 94 °C 5 分鐘
2. 94 °C 30 秒
3. 50 °C 30 秒
4. 72 °C 1 分鐘

步驟 2 至步驟 4 重複 10 次循環。

5. 94 °C 1 分鐘
6. 60 °C 1 分鐘
7. 72 °C 3 分鐘

步驟 2 至步驟 4 重複 20 次循環。

8. 72 °C 8 分鐘

3.7.1.3.2 利用 Fusion PCR 方式

將 36 μ l 的二次水、5 μ l 的 10X BD SA Buffer、4 μ l 的 2.5 mM NTP MIX、1 μ l 的 50 μ M *LIP8fuAF* (*LIP6uAF*、*LIP5fuAF*、*LIP4fuAF*) 引子、1 μ l 的 50 μ M *LIP8fuAR* (*LIP6uAR*、*LIP5fuAR*、*LIP4fuAR*) 引子、1 μ l 的 BD Advantage 2 polymerase mix (5 U/ μ l)、1 μ l 的 wild type genomic DNA (pRS-*ARG4ΔSpeI*、pGEM-*URA3* 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。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。

PCR 溫度設定如下：

1. 95 °C 1 分鐘

2. 95 °C 30 秒
3. 50 °C 30 秒
4. 68 °C 3 分鐘

步驟 2 至步驟 4 重複 30 次循環。

5. 68 °C 3 分鐘

3.7.1.4 白色念珠菌轉形 (transformation)

將白色念珠菌 (BWP17/*tetR*; 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) 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 3500 rpm × 10 分鐘離心，去除上清液，加入 10 ml 的無菌二次水懸浮菌體，以 3500 rpm × 10 分鐘離心，去除上清液，加入 5 ml 的 1X TE Buffer 懸浮菌體，以 3500 rpm × 10 分鐘離心，去除上清液，加入 3 ml 的 LATE Buffer 懸浮菌體，以 3500 rpm × 10 分鐘離心，去除上清液，加入 300 μl 的 LATE buffer 懸浮菌體，於室溫下靜置 20 分鐘後，即為念珠菌之勝任細胞。取 3.6.1.1 製備之 DNA 片段 10-13 μl (約 10 μg) 及 10 μl 的 10 mg/ml salmon sperm DNA (預先以 95 °C 加熱 10 分鐘再迅速置於冰上 10 分鐘處理之) 於微量離心管，並加入 200 μl 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 3500 rpm × 2 分鐘離心，去除上清液，加入 1 ml 的 1X TE Buffer 懸浮菌體，以 3500 rpm × 2 分鐘離心，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。

3.7.1.5 萃取染色體 DNA (Susanna et.al, 2004)

挑取單一菌落，接種至 5 ml YPD 培養液，30 °C 隔夜震盪培養 (200 rpm)，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 (Biofuge pico) 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 200 µl 的 Lysis buffer，以 vortex 充份混合後，將微量離心管置於 -80 °C 冰箱 2 分鐘，隨即置於 95 °C 乾浴中 1 分鐘，重覆兩次，結束後 vortex 30 秒鐘，加入 200 µl chloroform，vortex 2 分鐘，13,000 rpm (Biofuge pico) 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 NaOAc，置於 -20 °C 沉降 10 分鐘至 2 小時，以 13,000 rpm (Biofuge pico) 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 200 µl 75% ETOH 沖洗管壁沉澱物，以 13,000 rpm 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 µl 的無菌二次水溶解 DNA，加入 1U RNase A 以分解 RNA，-20 °C 存放。

3.7.1.6 利用 PCR 方式確認單套、雙套基因之破壞 (knockout)

在篩選標誌及欲研究基因外設計引子，以染色體 DNA 為模板，利用 PCR 方式確認含篩選標誌及部分欲研究基因序列之 DNA 片段，是否成功地置換掉欲研究的基因。PCR 反應完成後，利用洋菜膠電泳觀察 PCR 產物之片段大小是否正確，作為置換成功與否的確認。

PCR 溫度設定如下：

1. 95 °C 5 分鐘
2. 94 °C 1 分鐘
3. 50 °C 1 分鐘

4. 72 °C 1.5 分鐘

5. 72 °C 10 分鐘

步驟 2 至步驟 4 重複 30 次循環。

3.7.2 將 TR promoter 及 *URA3* 標記置入 (knockin) 欲研究基因

首先必須建構含有 TR promoter 及 *URA3* 標記與研究基因之質體，以限制酵素處理後，得到包含 TR promoter 及 *URA3* 標記與研究基因 A、B 區之 DNA 片段，將此 DNA 片段以 3.6.1.2 的方法轉形至前述單套基因已被破壞之轉形株 (heterozygous knockout strain) 中，同樣是利用基因重組置換的原理，將 TR promoter 及 *URA3* 標記置入所欲研究之基因。

從 Stanford 資料庫中搜尋欲研究基因的序列資料，在欲研究基因之 promoter 區域設計引子，以白色念珠菌染色體 DNA 為模板進行 PCR 反應，得到 A 區 (A region) 之 DNA 片段。依同一原理在欲研究基因之 ORF 設計引子，以 PCR 的方式得到包含 start codon 之 DNA 片段是為 B 區 (B region)。將欲研究基因的 A、B 區 DNA 片段 construct 至已含有 TR promoter 及 *URA3* 標記之質體 p99CAU1 中。

利用 PCR 方式分別得到欲研究基因之 A、B 區 DNA 片段，以洋菜膠電泳確認 PCR 產物片段大小是否正確後，以 PCR Clean Up Kit 純化 PCR 產物。將 p99CAU 之質體 DNA (vector) 及純化之 A 區 PCR 產物 (insert) 以限制酵素切割後，經 PCR Clean Up Kit 去除限制酵素及鹽類，處理後之 DNA 依 vector : insert 為 1 : 3 於 14 °C，16 小時進行接合反應 (ligation)，所得之產物利用 3.1.2 方式進行轉形至大腸桿菌 DH5α 後，萃取質體 DNA 並以限制酵素進行確認。依照同樣的方式，將前述 A 區 DNA 片段已經 insert 至 p99CAU 之質體 DNA (vector)，與純化之 B 區 PCR 產物 (insert)，以限制酵素處理再用 PCR Clean Up Kit 純化，依

vector : insert 為 1 : 3 於 14 °C , 16 小時進行接合反應 (ligation) , 所得之產物利用 3.1.2 方式進行轉形後 , 萃取質體 DNA 並以限制酵素、定序進行確認。藉此建構了含有 TR promoter 及 *URA3* 標記與研究基因 A、B 區之質體。

將此質體以限制酵素 *Xho* I、*Sac* II 於 37 °C 反應 3 小時後 , 以洋菜膠電泳純化產物 , 得到了包含 TR promoter 及 *URA3* 標記與研究基因 A、B 區之 DNA 片段 , 接著利用 3.6.1.2 轉形至單套基因已被破壞之白色念珠菌轉形株 (heterozygous knockout BWP17/tetR strain) 中 , 將 TR promoter 及 *URA3* 標記置入 (knockin) 所欲研究之基因。

3.7.3 確認 TR system 突變株

利用 PCR 方式確認置入 TR promoter 及 *URA3* 標記之轉形株 , 是否成功地 recombine 並 integrate 至欲研究的基因。在篩選標誌及欲研究基因上或是外設計引子 , 以染色體 DNA 為模板 , 利用 PCR 方式確認含篩選標誌及部分欲研究基因序列之 DNA 片段 , 是否成功地置換掉欲研究的基因。PCR 反應完成後 , 利用洋菜膠電泳觀察 PCR 產物之片段大小是否正確 , 作為置換成功與否的確認。

PCR 溫度設定如下 :

1. 95 °C 5 分鐘
2. 94 °C 1 分鐘
3. 50 °C 50 秒
4. 72 °C 2 分鐘 30 秒
5. 72 °C 10 分鐘

步驟 2 至步驟 4 重複 30 次循環。

3.8 突變株之性狀分析 (characterization)

3.8.1 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、SD 培養液中，此時菌液之 O.D_{600nm} 吸光值約為 0.1~0.2，並視需要於培養液中添加 uridine 及 doxycycline，混合均勻後置於 30 °C 培養箱中震盪培養 (150 rpm)。每隔 2 小時，取 500 µl 的菌液稀釋 2 倍測量其 O.D_{600nm} 吸光值。

3.8.2 菌落生長情形之觀察

分別將菌落接種於 YPD 培養基、SD 培養基中，並且視需要於培養基中添加 uridine 以及 doxycycline，置於 30 °C 培養三~五天，觀察菌落之生長情形。

3.8.3 誘發菌絲生長環境觀察型態改變

3.8.3.1 在含山羊血清之固態培養基

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 以及 doxycycline，置於 37 °C 培養三天，觀察單一菌落之型態變化，並以無菌之牙籤挑取少許菌落細胞，將之懸浮於 YPD 培養液中，置於倒立式顯微鏡下觀察細胞型態。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 以及 doxycycline，置於 37 °C 中培養七天 (Staab, Bahn, and Sundstrom 2003)，於倒立式顯微鏡下觀察菌絲生長的型態。

3.8.3.2 在含山羊血清之培養液

將菌落接種於含 10% 山羊血清之 YPD 培養液中，且視需要添加 uridine 以及 doxycycline，於 37 °C 反應 18 小時，於倒立式顯微鏡下觀察菌絲之型態 (Hwang et al. 2003)。

3.8.4 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 及 doxycycline，於 37 °C 反應 3 小時，於倒立式顯微鏡下觀察是否有芽管形成。

3.8.5 侵犯力分析 (invasion assay)

將菌落接種於 solid Spider 培養基(Navarro-Garcia et al. 1998)，並視需要於培養液中添加 uridine 及 doxycycline，置於 37 °C 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

4.1 反轉錄聚合酶鏈反應觀察基因表現

利用反轉錄聚合酶鏈反應，觀察 *LIP4*、5、6、8、9 在不同菌株存在與否，藉由觀察其基因表現在長菌絲型 SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*) 與酵母菌型 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 之表現情形，進而研究這些基因產物除了參與分解 lipid 類的酵素反應外，是否還有其他的功能。

圖一至圖五為 *LIP4*、5、6、8、9 之反轉錄聚合酶鏈反應結果，由於 *LIP* family 的成員在基因序列上有 80% 以上的相似度，在整個引子設計上大多針對 variable region 進行設計，因此反應結果大小並非基因 mRNA 全長大小；而 reaction control 方面採用反轉錄聚合酶鏈反應產物大小約為 1.0 kb 之 *ACT1* (orf19.5007 +93~+1105bp)。每一反應中含有 1 μ g total RNA (以 DNase I 除去 genomic DNA)。

圖一為 *LIP4* 之反轉錄聚合酶鏈反應結果，*LIP4* 的 mRNA 大小約為 1.38 kb (其 ORF 有 459 amino acid)，所設計的 PCR 產物大小為 455bp。結果顯示 *LIP4* 之基因表現在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*) 這四種菌株之間皆可被觀察到。圖二為 *LIP5* 之反轉錄聚合酶鏈反應結果，*LIP5* 的 mRNA 大小約為 1.4 kb (其 ORF 有 463 amino acid)，所設計的 PCR 產物大小為 283bp。結果顯示 *LIP5* 之基因表現在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*) 這四種菌株之間皆可被觀察到。

圖三為 *LIP6* 之反轉錄聚合酶鏈反應結果，*LIP6* 的 mRNA 大小約為 1.4 kb（其 ORF 有 463 amino acid），所設計的 PCR 產物大小為 441bp。結果顯示 *LIP6* 之基因表現在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*) 這四種菌株之間皆可被觀察到。圖四為 *LIP8* 之反轉錄聚合酶鏈反應結果，*LIP8* 的 mRNA 大小約為 1.38 kb（其 ORF 有 460 amino acid），所設計的 PCR 產物大小為 521bp。結果顯示 *LIP8* 之基因表現在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*) 這四種菌株之間皆可被觀察到。圖五為 *LIP9* 之反轉錄聚合酶鏈反應結果，*LIP9* 的 mRNA 大小約為 1.4 kb（其 ORF 有 453 amino acid），在 PCR 設計之大小約 466 bp。結果顯示 *LIP9* 之基因表現在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、SC5314 (*CPH1/CPH1 EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*CPH1/CPH1 efg1/efg1*) 這四種菌株之間皆可被觀察到。

4.2 建構四環黴素調控表現系統 (Tetracycline-regulatable expression system, TR system) 以及剔除雙套基因 (homozygous knock out) 之結果

將這些脂解酵素基因作進一步的研究，利用四環黴素調控表現系統 (Tetracycline-regulatable expression system, TR system) 將 *LIP9* 作為欲研究之目標基因 (target gene)，進行可調控菌株之建構。

首先藉由含欲破壞基因相同序列之 DNA 片段與已含有驅動 *tetR* 表現之白色念珠菌 (BWP17/ *tetR*) 染色體上基因發生同源重組置

換 (homologous recombination)，達到單套基因之破壞。

再將 TR 啟動子同樣地利用基因重組置換的方式置入 (knockin) 所欲研究的基因之 promoter 區域，把欲研究基因原有的 promoter 區域置換成 TR promoter。經過二次轉形所得到的突變株，即是可以利用四環黴素來調控基因表現的菌株 (附圖一)。當環境中缺乏四環黴素時，Tet R 與 *tet O* 結合，促進基因的表現；但是當四環黴素存在時，則 Tet R 會和四環黴素結合，無法與 *tet O* 結合，進而抑制了基因的表現。

針對 *LIP4*、5、6、8、9 進行雙套基因之剔除。以含欲破壞基因相同序列之 DNA 片段與被剔除 *ARG4*、*URA3*、*HIS1* 之白色念珠菌 (BWP17) 染色體上基因發生同源重組置換 (homologous recombination)，達到雙套基因之破壞。

4.2.1 單套、雙套基因之破壞 (knockout)

4.2.1.1 製備具有同源重組區域的篩選標誌 DNA 片段

4.2.1.1.1 利用 Long primer 方式

在 *LIP9* 之單套、雙套基因破壞採用 Long primer 方式製備出 DNA 片段以進行白色念珠菌轉形作用，依 3.7.1.3.1 所列之步驟進行 PCR 後，以 0.8% 洋菜膠體確認所得片段大小是否與預期相同。圖八 <A> 為具有 *LIP9* 同源區域 A 以及篩選標誌序列之片段 *LIP9fuARG4*，大小約 2.3kb；圖八 則是具有 *LIP9* 同源區域 B 以及篩選標誌序列之片段，大小約 1.7kb。

4.2.1.1.2 利用 Fusion PCR 方式

在 *LIP4*、5、6、8 中單套、雙套基因破壞採用 Fusion PCR 方式製備出 DNA 片段以進行白色念珠菌轉形作用，依 3.7.1.3.2 所列之步

驟進行 PCR 後，以 0.8% 洋菜膠體確認所得片段大小是否與預期相同。圖九中可以看到 Lane 1-5 分別為含有篩選標誌 19mer 之 *LIP4* 5' A region 大小約 0.3kb，含有篩選標誌 19mer 之 *LIP4* 3' B1 region 大小約為 0.35kb，含有篩選標誌 19mer 之 *LIP4* 3' B2 region 約 0.4kb，含有 *LIP4* 40mer 之篩選標誌 *ARG4* 片段約 2.2kb，含有 *LIP4* 20mer 之篩選標誌 *URA3* 片段約 1.7kb。圖十中可以看到 Lane 1-5 分別為含有篩選標誌 19mer 之 *LIP5* 5' A region 大小約 0.35kb，含有篩選標誌 19mer 之 *LIP5* 3' B1 region 約 0.2kb，含有篩選標誌 19mer 之 *LIP5* 3' B2 region 約 0.45kb，含有 *LIP5* 40mer 之篩選標誌 *ARG4* 片段約 2.2kb，含有 *LIP5* 20mer 之篩選標誌 *URA3* 片段約 1.7kb。圖十一中可以看到 Lane 1-5 分別為含有篩選標誌 19mer 之 *LIP6* 5' A region 大小約 0.35kb，含有篩選標誌 19mer 之 *LIP6* 3' B1 region 約 0.46kb，含有篩選標誌 19mer 之 *LIP6* 3' B2 region 大小約 0.3kb，含有 *LIP6* 40mer 之篩選標誌 *ARG4* 片段約 2.2kb，含有 *LIP6* 20mer 之篩選標誌 *URA3* 片段約 1.7kb。圖十二<A>中可以看到 Lane 1-3 分別為含有篩選標誌 19mer 之 *LIP8* 5' A region 大小約 0.28kb，含有篩選標誌 19mer 之 *LIP8* 3' B1 region 約 0.35kb，含有 *LIP8* 40mer 之篩選標誌 *ARG4* 片段約 2.2kb；則是 Lane 1-3 為含有篩選標誌 19mer 之 *LIP8* 5' A region 約 0.28kb，含有篩選標誌 19mer 之 *LIP8* 3' B2 region 0.6kb，含有 *LIP8* 20mer 之篩選標誌 *URA3* 片段約 1.7kb。圖十三<A>中 Lane 1-3 為含有 5' A region、篩選標誌 *ARG4*、3' B1 region 之 *LIP4fuARG4*，大小約 2.8kb，*LIP5fuARG4* 約 2.78kb，*LIP6fuARG4* 片段則約 3kb；Lane 4-6 則是含有 5' A region、篩選標誌 *URA3*、3' B2 region 之 *LIP4fuURA3*，大小約 2.2kb，*LIP5fuURA3* 約 2.3kb，*LIP6fuURA3* 片段則約 2.2kb。中

Lane1-2 為含有 5' A region、篩選標誌 *ARG4*、3' B1 region 之 *LIP8fuARG4*，大小約 2.8kb，*LIP5fuARG4* 約 2.78kb。

4.2.1.2 以 PCR 確認 *LIP4*、5、6、8、9 單套基因之破壞菌株

將含有與 *LIP4*、5、6、8、9 相同序列及篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段在白色念珠菌 (BWP17) 中進行一次轉形作用 (*LIP9* 則是在 BWP17 以及 BWP17/tetR 中)，將所得之轉形株萃取出染色體 DNA，進行 PCR 以確認 *LIP4*、5、6、8、9 之雙套基因是否被破壞。

圖十四之 <A> 顯示，若含篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段經過一次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP4* 之單套基因，以引子 *lip4F* (位在 *LIP4* 上之正向引子)、*clip4R* (位在 *LIP4* 下游之反向引子)、HJL241 (位在 *ARG4* 上之正向引子) 三段引子進行 PCR，在被置換成功含 *ARG4* 的染色體上可以得到 *lip4F~clip4R*、HJL241~*clip4R* 之 PCR 產物為 1.2kb 以及 1.02kb，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *lip4F~clip4R* 之 1.2kb 產物。圖十四 是以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane1 為以 BWP17 DNA 為 template，得到 1.2 kb 的產物 (如箭頭 B 所示)。Lane 2-3 為轉形後挑取之轉形株 DNA，得到 1.2kb 以及 1.02kb 的產物 (如箭頭 B 所示)。將此 *LIP4* 之破壞菌株 (*lip4::ARG4/LIP4*) 命名為 ICW174A。

圖十五之 <A> 顯示，若含篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段經過一次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP5* 之單套基因，以引子 *lip5F* (位在 *LIP5* 上之正向引子)、*clip5R* (位在 *LIP5* 下游之反向引子)、HJL241 (位在 *ARG4* 上之正向引子) 進行 PCR，可在被置換成功含 *ARG4* 的染色體上得到 *lip5F~clip5R*、HJL241~*clip5R* 之 PCR 產物為 1.9kb 以及 1.65 kb 之 DNA 片段，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到

lip5F~clip5R 之 1.9kb 產物。圖十五是以 0.8%洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane1 為以 BWP17 染色體 DNA 為 template，得到 1.9 kb 的產物(如箭頭 B 所示)。Lane 2-6 為轉形後挑取之轉形株 DNA，得到 1.9kb 以及 1.65kb 的產物(如箭頭 A、B 所示)。將此 *LIP5* 之破壞菌株 (*lip5::ARG4/LIP5*) 命名為 ICW175A。

圖十六之<A>顯示，若含篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段經過一次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP6* 之單套基因，以引子 *lip6F* (位在 *LIP6* 上之正向引子)、*clip6R*(位在 *LIP6* 下游之反向引子)、HJL241 (位在 *ARG4* 上之正向引子) 進行 PCR，可在被置換成功含 *ARG4* 的染色體上得到 *lip6F~clip6R*、HJL241~*clip6R* 之 PCR 產物為 2.8kb 以及 1.62 kb 之 DNA 片段，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *lip6F~clip6R* 之 2.8kb 產物。圖十六是以 0.8%洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane1 為以 BWP17 染色體 DNA 為 template，得到 2.8 kb 的產物(如箭頭 B 所示)。Lane 2-7 為轉形後挑取之轉形株 DNA，得到 2.8kb 以及 1.62kb 的產物(如箭頭 A、B 所示)。將此 *LIP6* 之破壞菌株 (*lip6::ARG4/LIP6*) 命名為 ICW176A。

圖十七之<A>顯示，若含篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段經過一次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP8* 之單套基因，以引子 *clip8F* (位在 *LIP8* 上游之正向引子)、*clip8R* (位在 *LIP8* 下游之反向引子)、HJL241 (位在 *ARG4* 上之正向引子) 進行 PCR，可在被置換成功含 *ARG4* 的染色體上得到 *clip8F~clip8R*、HJL241~*clip8R* 之 3.0 kb 以及 1.2kb 之產物，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *clip8F~clip8R* 之 3.0kb 產物。圖十七是以 0.8%洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示 Lane1 為以 BWP17 染色體 DNA 為 template，得到 3.0 kb 的

產物（如箭頭 A 所示）。Lane 2-6 為轉形後挑取之轉形株 DNA，得到 3.0kb 以及 1.2kb 的產物（如箭頭 A、B 所示）。將 Lane 5 之 *LIP8* 破壞菌株 (*lip8::ARG4/LIP8*) 命名為 ICW178A。

圖十八之〈A〉顯示，若含篩選標記 *ARG4* 之 DNA 片段經第一次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP9* 之單套基因，以引子 *clip9F*（位在 *LIP9* 上游之正向引子）、*clip9R*（位在 *LIP9* 上游之反向引子）進行 PCR，可在被置換成功含 *ARG4* 的染色體上得到 *clip9F~clip9R* 之 2.7 kb、2.0kb 之產物，若是 BWP17/tetR 或是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *clip9F~clip9R* 之 2.0kb 產物。圖十八〈B〉為在 BWP17/tetR 中所得轉形株，以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane8 為以 BWP17/tetR DNA 為 template，得到 2.0 kb 的產物（如箭頭 B 所示）。Lane 1-7 為轉形後挑取之轉形株 DNA，可以看到 Lane1-2、3-7 可以得到 2.7kb 以及 2.0kb 的產物（如箭頭 A、B 所示）。將 Lane 7 之 *LIP9* 破壞菌株 (*lip9::ARG4/LIP9*) 命名為 ICW181A-1。圖十八〈C〉為在 BWP17 中所得轉形株，結果顯示，Lane1 為以 BWP17 DNA 為 template，得到 2.0 kb 的產物（如箭頭 B 所示）。Lane 2-4 為轉形後挑取之轉形株 DNA，可以得到 2.7kb 以及 2.0kb 的產物（如箭頭 A、B 所示）。將 Lane 3 之 *LIP9* 破壞菌株 (*lip9::ARG4/LIP9*) 命名為 ICW181A-2。

4.2.1.3 以 PCR 確認 *LIP4*、5、6、8、9 雙套基因之破壞菌株

將含有與 *LIP4*、5、6、8、9 相同序列及篩選標記 *URA3* 之 DNA 片段在已進行一次轉形的白色念珠菌（BWP17）中進行第二次轉形作用，將所得之轉形株萃取出染色體 DNA，進行 PCR 以確認 *LIP4*、5、6、8、9 之雙套基因是否被破壞。

圖十九之<A>顯示，若含篩選標記 *ARG4*、*URA3* 之 DNA 片段經過兩次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP4* 之雙套基因，以引子 *lip4F* (*LIP4* 上之正向引子)、*clip4R* (*LIP4* 下游之反向引子)、HJL241 (*ARG4* 上之正向引子)、HJL133 (*URA3* 上之正向引子) 進行 PCR，可在成功置換雙套基因之染色體上得到 HJL241~*clip4R*、HJL133~*clip4R* 之 1.02 kb 以及 1.85kb 產物，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *lip4F*~*clip4R* 之 1.2kb PCR 產物。圖十九是以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane 1-7 是以 *lip4F*、*clip4R*、HJL241 三段引子進行反應，Lane 8-14 則是以 *lip4F*、*clip4R*、HJL133 三段引子進行反應。Lane 1、8 為以 BWP17 染色體 DNA 為 template，得到了約 1.2 kb 的產物 (如箭頭 B 所示)。Lane 2-7 以及 Lane 9-14 以 6 個轉形後挑取之轉形株 DNA 為 template (Lane 2、9 為同一轉形株，以此類推)，可得到 1.02kb 的產物 (如箭頭 A 所示)。Lane 9-14 得到了 1.85 kb 的產物 (如箭頭 C 所示)。將 Lane 2、9 之 *LIP4* 破壞菌株 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*) 命名為 ICW174。

圖二十之<A>顯示，若含篩選標記 *ARG4*、*URA3* 之 DNA 片段經過兩次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP5* 之雙套基因，以引子 *lip5F* (*LIP5* 上之正向引子)、*clip5R* (*LIP5* 下游之反向引子)、HJL241 (*ARG4* 上之正向引子)、HJL133 (*URA3* 上之正向引子) 進行 PCR，可在成功置換雙套基因之染色體上得到 HJL241~*clip5R*、HJL133~*clip5R* 之 1.65 kb 以及 2.6 kb 產物，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *lip5F*~*clip5R* 之 1.9 kb 產物。圖二十是以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane 1 以 BWP17 DNA 為 template，以 *lip5F*、*clip5R*、HJL241 三段引子進行反應，得到了 1.9

kb 的產物 (如箭頭 B 所示)。Lane 2、3 以轉形後挑取之相同轉形株 DNA 為 template，Lane2 以 *lip5F*、*clip5R*、HJL241 三段引子進行反應，可得到約 1.65kb 的 DNA 片段 (如箭頭 A 所示)。Lane 3 則以 *lip5F*、*clip5R*、HJL133 三段引子進行反應，得到了 2.6 kb 的產物 (如箭頭 C 所示)。將此 *LIP5* 之破壞菌株 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*) 命名為 ICW175。

圖二十一之 <A> 顯示，若含篩選標記 *ARG4*、*URA3* 之 DNA 片段經過兩次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP6* 之雙套基因，以引子 *lip6F* (*LIP6* 上之正向引子)、*clip6R* (*LIP6* 下游之反向引子)、HJL241 (*ARG4* 上之正向引子)、HJL133 (*URA3* 上之正向引子) 進行 PCR，可在成功置換雙套基因之染色體上得到 HJL241~*clip6R*、HJL133~*clip6R* 之 1.62 kb 以及 2.4 kb 產物，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *lip6F*~*clip6R* 之 2.8 kb 產物。圖二十一 是以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane 1 以 BWP17 DNA 為 template，以 *lip6F*、*clip6R*、HJL241 三段引子進行反應，得到了 2.8 kb 產物 (如箭頭 B 所示)。Lane 2-5 以轉形後挑取之兩個轉形株 DNA 為 template (Lane2、4 為同一轉形株，以此類推)，Lane2-3 以 *lip6F*、*clip6R*、HJL241 三段引子進行反應，可得到 1.62kb 產物 (如箭頭 A 所示)。Lane 4-5 則以 *lip6F*、*clip6R*、HJL133 三段引子進行反應，得到了 2.4 kb 產物 (如箭頭 C 所示)。將 Lane2、4 之 *LIP6* 破壞菌株 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*) 命名為 ICW176。

圖二十二之 <A> 顯示，若含篩選標記 *ARG4*、*URA3* 之 DNA 片段經過兩次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP8* 之雙套基因，以引子 *lip8F* (*LIP8* 上之正向引子)、*clip8R* (*LIP8* 下游之反向引子)、HJL241

(*ARG4* 上之正向引子)、HJL133(*URA3* 上之正向引子)進行 PCR，可在成功置換雙套基因之染色體上得到 HJL241~*clip8R*、HJL133~*clip8R* 之 1.2 kb 以及 2.3 kb 產物，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *lip8F*~*clip8R* 之 1.6 kb 產物。圖二十二是以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane 1-8 以 *lip6F*、*clip6R*、HJL241 三段引子進行反應，Lane 9-16 以 *lip6F*、*clip6R*、HJL133 三段引子進行反應。Lane 1、9 以 BWP17 DNA 為 template，得到了 1.6 kb 產物（如箭頭 B 所示）。Lane 2-8、10-16 則以轉形後挑取之 7 個轉形株 DNA 為 template (Lane 2、10 為同一轉形株，以此類推)，Lane 2-8 可得到約 1.2kb 的產物（如箭頭 A 所示）。Lane 10-16 則得到了大約 2.3 kb 的 DNA 片段（如箭頭 C 所示）。將 Lane 2、10 之 *LIP8* 破壞菌株 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*) 命名為 ICW178。

圖二十三之<A>顯示，若含篩選標記 *ARG4*、*URA3* 之 DNA 片段經過兩次轉形成功地置換掉染色體上 *LIP9* 之雙套基因，以引子 *clip9F*、*clip9R* 進行 PCR，可在成功置換雙套基因之染色體上得到 *clip9F*~*clip9R* 之 2.7 kb 以及 2.3 kb 產物，若是 BWP17 之染色體 DNA 則只會得到 *clip9F*~*clip9R* 之 2.0 kb 產物。圖二十三是以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane 1 以 BWP17 DNA 為 template 可得到約 2.0 kb 的 PCR 產物（如箭頭 B 所示）。Lane 2-7 以轉形後挑取之轉形株 DNA 為 template 進行反應，Lane 2-3、6-7 可得到 2.7kb 以及 2.3kb 的 DNA 片段（如箭頭 A、C 所示）。將 Lane 3 之 *LIP9* 破壞菌株 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 命名為 ICW179。

4.2.2 將 TR promoter 及 *URA3* 標記置入 (knockin) 欲研究基因

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

將 *LIP9* 之同源互換 A、B 區 DNA 片段依 3.7.2 所列之方式分別置入含有 TR promoter 以及篩選標誌 *URA3* 之 p99CAU 質體，得到轉形株後以限制酵素確認是否為正確之轉形株。圖二十四 <A> Lane1-2 為 *LIP9*tetA，Lane3-4 則為 *LIP9*tetB 片段，大小分別約為 0.38kb 以及 0.5kb； 則為確認轉形株的限制酶酵素反應結果，Lane1-2 為無任何 insert 置入之 p99CAU 質體，Lane1 以 *KpnI* 反應下可以得到一個 5kb 大小的片段，Lane2 則是以 *KpnI* 以及 *SacII* 進行反應，可以得到 2kb、3kb 的片段；Lane3-4 則為大腸桿菌中得到的轉形株，Lane3 為以 *KpnI* 反應，可以得到一個約 5.9kb 大小的片段，Lane4 以 *KpnI* 以及 *SacII* 進行反應，可以得到約 2.7kb、3.2kb 的片段。因此可以確定此轉形株中之質體確實帶有 *LIP9* 之同源互換 A、B 區 DNA 片段，將質體命名為 p99CAUL9。而所製備含有 TR promoter 以及同源置換區域之篩選標誌 DNA (*LIP9*tetR-*URA3*) 在圖二十四 <C> 可以看到大小約為 2.8kb。

4.2.2.2 以 PCR 確認 *LIP9* 突變株是否已置入 TR promoter

將含 TR promoter 及 *URA3* 標記與 *LIP9* 基因提供同源互換 A、B 區之 DNA 片段，與已破壞 *LIP9* 基因 single copy 之菌株 (heterozygous knockout strain) ICW180 (*lip9::ARG4/LIP9*) 進行第二次轉形，將所得之轉形株萃取出染色體 DNA，進行 PCR 以確認 TR promoter 及 *URA3* 是否已置入 *LIP9*，圖二十五之 <A> 顯示，若含 TR promoter 的片段已經正確 recombine 及 integrate 至 *LIP9* 基因，使用引子 clip9F 以及 clip9R 進行 PCR，可以得到約 2.7 kb 之產物；以引子 HJL199 及 Lip9tetBR 進行 PCR，則得到約 1.1kb 之產物；與

引子 HJL133、Lip9tetBR 進行 PCR，結果將得到大約 2.0 kb 之產物；利用引子 Lip9tetAF 以及 Lip9tetBR 對轉形株 DNA 進行 PCR，得到的產物大小接近 2.2 kb；在 BWP17/tetR DNA 得到的 DNA 片段大小則接近 1.5kb。圖二十五是以 0.8% 洋菜膠分析 PCR 之產物，結果顯示，Lane1-3、5 以萃取之轉形株 DNA 進行 PCR，Lane4 則是以 BWP17/tetR DNA 為 template。Lane1 得到約 2.7 kb 的產物。Lane2 得到大約 1.1 kb 的產物。Lane3 得到了約 2.0 kb 大小的 DNA 片段。Lane4 則得到約 1.5kb 大小的產物。Lane5 則得到約 2.2kb 大小的產物。因此將此已置入 TR promoter 及 *URA3* 之 *LIP9* 突變株命名為 ICW181 (*lip9::ARG4 /LIP9::TR-LIP9-URA3*)。

4.3 突變株之性狀分析 (characterization)

將轉形後所得到之雙套基因破壞菌株 (homozygous knockout strain) 及已置入 TR promoter 之突變株，培養在不同的環境 (溫度、medium、加入血清以及四環黴素藥物) 中，觀察並比較這些轉形株的生長與型態是否因基因突變而有所變化。

4.3.1 於 YPD、SD 培養液中觀測生長曲線 (growth curve) 之結果

測量不同突變菌株在 YPD (Dox⁺、Dox⁻)、SD (Dox⁺、Dox⁻) 培養液 30°C 培養時，各個時間點之 O.D_{600nm} 吸光值，紀錄並作圖比較之 (圖二十六、二十七)。以 (Dox⁺) 代表加入 doxycycline 培養，(Dox⁻) 代表未加入 doxycycline 培養。由於 BWP17 白色念珠菌菌株為 Ura⁻, His⁻, Arg⁻，菌株在液態 SD 中培養雙套基因突變株時另加入 histidine。

4.3.1.1 *LIP4* 突變株之生長曲線

以 HLC54、野生株 SC5314 作為對照，比較 HLC54、SC5314 與 *LIP4* 突變株 ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*) 之生長。圖二十六之 <A> 為比較各菌株在 YPD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時與 8 小時的吸光值計算細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 1.64 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 1.28 小時，ICW174 的倍增時間則為 1.5 小時。而此三個菌株都可以在轉養 24 小時之後到達相似的吸光值。圖二十六之 為比較各菌株在 SD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時、8 小時與 10 小時的吸光值計算細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 3.54 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 3.37 小時，ICW174 的倍增時間則為 4.07 小時。而 HLC54、SC5314 可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值，ICW174 明顯成長速度較對照組都來得緩慢。

4.3.1.2 *LIP5* 突變株之生長曲線

以 HLC54、野生株 SC5314 作為對照，比較 HLC54、SC5314 與 *LIP5* 突變株 ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*) 之生長。圖二十六之 <A> 為比較各菌株在 YPD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時與 8 小時的吸光值計算細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 1.64 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 1.28 小時，ICW175 的倍增時間則為 1.31 小時。而此三個菌株都可以在轉養 24 小時之後到達相似的吸光值。圖二十六

之〈B〉為比較各菌株在 SD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時、8 小時與 10 小時的吸光值計算細胞倍增時間(doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 3.54 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 3.37 小時，ICW175 的倍增時間則為 3.24 小時。而 HLC54、SC5314 可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值，ICW175 明顯成長速度較對照組都來得緩慢。

4.3.1.3 LIP6 突變株之生長曲線

以 HLC54、野生株 SC5314 作為對照，比較 HLC54、SC5314 與 LIP6 突變株 ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*) 之生長。圖二十六之〈A〉為比較各菌株在 YPD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW174 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時與 8 小時的吸光值計算細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 1.64 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 1.28 小時，ICW176 的倍增時間則為 1.36 小時。而此三個菌株都可以在轉養 24 小時之後到達相似的吸光值。圖二十六之〈B〉為比較各菌株在 SD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時、8 小時與 10 小時的吸光值計算細胞倍增時間(doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 3.54 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 3.37 小時，ICW176 的倍增時間則為 3.58 小時。而 HLC54、SC5314 可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值，ICW176 明顯成長速度較對照組都來得緩慢。

4.3.1.4 LIP8 突變株之生長曲線

以 HLC54、野生株 SC5314 作為對照，比較 HLC54、SC5314 與 *LIP8* 突變株 ICW178 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*) 之生長。圖二十六之 <A> 為比較各菌株在 YPD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW174 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時與 8 小時的吸光值計算細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 1.64 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 1.28 小時，ICW178 的倍增時間則為 1.52 小時。而此三個菌株都可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值。圖二十六之 為比較各菌株在 SD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW178 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時、8 小時與 10 小時的吸光值計算細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 3.54 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 3.37 小時，ICW178 的倍增時間則為 3.22 小時。而 HLC54、SC5314 可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值，ICW178 明顯成長速度較對照組都來得緩慢。

4.3.1.5 *LIP9* 突變株之生長曲線

4.3.1.5.1 *LIP9* 雙套基因剔除突變株之生長曲線

以 HLC54、野生株 SC5314 作為對照，比較 HLC54、SC5314 與 *LIP8* 突變株 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 之生長。圖二十六之 <A> 為比較各菌株在 YPD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時與 8 小時的吸光值計算細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 1.64 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 1.28 小時，ICW179 的倍增時間則為 1.11 時。而此三

個菌株都可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值。圖二十六之〈B〉為比較各菌株在 SD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314 和 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 的生長呈現相同的趨勢。以 6 小時、8 小時與 10 小時的吸光值計算細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株的倍增時間為 3.54 小時，SC5314 菌株的倍增時間為 3.37 小時，ICW179 的倍增時間則為 3.58 小時。而 HLC54、SC5314 可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值，ICW179 明顯成長速度較對照組都來得緩慢，與 ICW174、175、176、178 比較之下也最為緩慢。

4.3.1.5.2 LIP9 TR promoter 置入突變株之生長曲線

以 HLC54、野生株 SC5314 作為對照，比較 HLC54、SC5314 和 LIP9 突變株 ICW181 (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 與 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 之生長，並且在 YPD 以及 SD 培養液中加入 doxycycline (濃度為：20 µg/ml)，觀察 doxycycline 對菌株之生長是否有影響。圖二十七之〈A〉為比較各菌株在 YPD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314、ICW181 (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 與 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 的生長呈現相同趨勢，而且在加入 doxycycline 與否的情況下對生長並無影響。以 6 小時與 8 小時的吸光值計算這些突變株之細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株在 (Dox-) 與 (Dox+) 時的倍增時間為 1.64 和 1.63 小時，SC5314 菌株在 (Dox-) 與 (Dox+) 時的倍增時間為 1.28 和 1.41 小時，ICW181 菌株在 (Dox-) 與 (Dox+) 時的倍增時間是 1.44 及 1.33 小時，ICW179 菌株的倍增時間為 1.11 小時，ICW181 (Dox-)、ICW181 (Dox+)、

ICW179 倍增時間與對照組比較之下，可見所有菌株皆無明顯差異，也都可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值。圖二十七之〈B〉為比較各菌株在 SD 中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，結果顯示菌株 HLC54、SC5314、ICW181 (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 與 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 的生長呈現相同趨勢。以 6、8 小時與 10 小時的吸光值計算這些突變株之細胞倍增時間 (doubling time)，HLC54 菌株在 (Dox-) 與 (Dox+) 時的倍增時間為 3.54 和 3.62 小時，SC5314 菌株在 (Dox-) 與 (Dox+) 時的倍增時間為 3.37 和 3.28 小時，ICW181 菌株在 (Dox-) 與 (Dox+) 時的倍增時間是 2.74 及 3.03 小時，ICW179 菌株的倍增時間為 3.58 小時。ICW179 的倍增時間較 ICW181 (Dox+)、ICW181 (Dox-) 長，與對照組則無異；ICW181 (Dox+)、ICW181 (Dox-) 的倍增時間則是皆較對照組為短，尤其是 ICW181 (Dox-) 約快了 0.7 小時。除了 ICW179 以外，其他菌株都可以在轉養 24 小時之後到達相似吸光值，ICW179 明顯成長速度較所有菌株來得緩慢。

4.3.2 觀察菌落生長情形之結果

4.3.2.1 菌落在 YPD 固態培養基之生長

將菌落接種於 YPD 培養基中，並且視需要添加 uridine 以及 doxycycline (濃度為：20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，在 30°C 培養，觀察菌落的生長情形。圖二十八的結果顯示菌株 SC5314、HLC54 和 ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 以及 ICW181 (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 在第四天的生長情形沒有差別，對 ICW181 來說，在培

養基中加入 doxycycline 與否對於其在固態 YPD 中的生長並無影響。

4.3.2.2 菌落在 SD 固態培養基之生長

將菌落接種於 SD 培養基中，並且視需要添加 histidine 以及 doxycycline (濃度為：20 µg / ml)，置於 30°C 培養四天，觀察菌落之生長。圖二十九的結果顯示菌株 SC5314、HLC54 和 ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175(*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178(*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 以及 ICW181 (*lip9::ARG4/ LIP9::TR-LIP9-URA3*) 的生長情形中所有的 homozygous strain 生長情形皆較 SC5314 以及 HLC54 為緩慢；而 ICW181 (*lip9::ARG4/ LIP9::TR-LIP9-URA3*) 在有無添加 doxycycline 時的生長情形都與 SC5314 以及 HLC54 沒有明顯的差別，也較 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 為良好。

4.3.3 細胞及菌落型態改變之結果

在 medium 中加入適當比例之山羊血清，並在 37°C 下培養，營造誘發菌絲生長之環境，觀察菌落與細胞的型態是否改變。

4.3.3.1 在含山羊血清的 YPD 固態培養基之生長

將菌株接種於含 4% 山羊血清之 YPD 培養基 37°C 培養三天，利用血清誘發菌絲之生長，觀察菌落其表現型 (phenotype)。以野生株 SC5314、*EFG1* 及 *CPH1* 雙突變破壞株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54 作為正負對照，圖三十之 <A> 的結果顯示 SC5314、HLC54、ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175(*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178(*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 以及 ICW181 (*lip9::ARG4/ LIP9::TR-*

LIP9-URA3) 在有無加入 doxycycline 的情況下，SC5314 單一菌落之外圍為不規則狀，細胞呈現皺摺狀，而 *EFG1* 及 *CPH1* 雙突變破壞株 HLC54 菌落外觀則呈現平滑狀，ICW174、ICW175、ICW176、ICW178 以及 ICW179 的單一菌落細胞呈現外圍較圓滑，而皺摺仍存在；ICW181 在有無加入 doxycycline 的情況下也都呈現外圍較圓滑且皺摺較少的情形。圖三十是將菌落細胞打散到液態 YPD 培養基中，置於倒立式顯微鏡下觀察細胞型態，可見到 SC5314、ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175(*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178(*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 以及 ICW181 (*lip9::ARG4/ LIP9::TR-LIP9-URA3*) 在有無加入 doxycycline 的情狀下細胞型態均有被誘發之芽管 (germ tube) 呈現 (圖三十)，至於 HLC54 之細胞型態呈酵母菌型 (yeast form)。

4.3.3.2 在含山羊血清的 Bacto agar 固態培養基之生長

將菌落接種於含 4% 山羊血清的 Bacto agar 培養基，於 37°C 中培養七天，於倒立式顯微鏡下觀察菌絲在培養基上的型態。以 SC5314、HLC54 作為正負對照，有菌絲生長的菌落外觀會呈現毛茸的放射狀，圖三十一之<A>的結果顯示 SC5314、在有無加入 doxycycline 的情況下單一菌落之外觀均呈現毛茸的放射狀，而 ICW174

(*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175(*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*) 以及 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 在無加入 doxycycline 的情形下呈

現體積較小的單一菌落，菌落外觀之毛茸菌絲也呈現較短小並且較粗。ICW181 (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 在加入 doxycycline 與否下，菌落外觀也呈現體積明顯較小且外觀呈現較短之毛茸狀，比較 ICW181 (Dox⁻)、ICW181 (Dox⁺) (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 以及 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 之菌落型態，可見 ICW181 (Dox⁻)、ICW181 (Dox⁺) 所形成的毛茸菌絲長度還是較 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 為長。以上差異皆可以從菌絲的局部放大圖 (圖三十一) 觀察得知。

4.3.3.3 在含山羊血清的 YPD 培養液之生長

將菌落接種於含 10% 山羊血清之 YPD 培養液中，在 37°C 反應 18 小時，於倒立式顯微鏡下觀察菌絲之形態。以野生株 SC5314、*EFG1* 及 *CPH1* 雙突變破壞株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54 作為正負對照，圖三十二的結果顯示 SC5314 在有無加入 doxycycline 的時候皆呈現有加長型的菌絲 (elongated true hyphae)，在 ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 以及 ICW181 (Dox⁺) (Dox⁻) 菌株中仍皆可生成顯著的加長型菌絲，HLC54 則是呈現酵母菌型 (yeast form) 細胞型態。

4.3.4 芽管試驗 (germ tube assay) 之結果

以野生株 SC5314、*EFG1* 及 *CPH1* 雙突變破壞株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54 作為正負對照，將菌落分別接種於含 10% 山羊血清之 YPD 培

養液中以及不含血清之 YPD 培養液，兩組分別於 37°C、30°C 反應 2.5 小時，進行芽管試驗。圖三十三〈A〉為不加血清者，〈B〉為加入血清者，圖三十三〈B〉的結果顯示不論 medium 中是否加入 doxycycline，在野生株 SC5314 的菌株中，可見到所有細胞皆有芽管形成。而雙突變破壞株 HLC54 則無芽管之形成。在 ICW174

(*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW176(*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178

(*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW181 (Dox⁻)、ICW181 (Dox⁺)

(*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 中形成芽管能力與 SC5314 無明

顯差異；ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW179

(*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 中所形成芽管的能力則較 SC5314 低，其

中 ICW175 之能力又較 ICW179 為高；比較 ICW181(Dox⁻)、ICW181

(Dox⁺) (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 以及 ICW179

(*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 之芽管生成情形，可見 ICW181 (Dox⁻)、

ICW181 (Dox⁺) 形成芽管的能力皆較 ICW179

(*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 為高。在芽管生成測試中可以觀察到在相

同條件培養下，ICW179 生成芽管的能力最弱。圖三十三〈A〉中則

可以見到所有菌株皆呈現無芽管的 yeast form 細胞。

4.3.5 侵犯力分析 (invasion assay) 之結果

將菌株接種於 Solid Spider 培養基，37 °C 培養七天，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。以野生株 SC5314、*EFG1* 及 *CPH1* 雙突變破壞株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54 作為正負對照，圖三十四的結果顯示不論是否加入 doxycycline，菌株 SC5314、ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176(*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 以及 ICW181 (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 皆具有侵入培養基之能力，經由近照觀察突變株的菌落脫落程度可以發現所有的突變株侵犯培養基的能力皆有降低的情形，其中 ICW181 (Dox+)、ICW181 (Dox-) 侵犯培養基的能力降低較多，沖洗前後情形可以由近照觀察 (圖三十四) 得知。至於雙突變破壞株 HLC54 無侵入培養基之能力。

五、討論

由於院內真菌感染在近十年內攀升速度驚人，身為院內感染的大宗，白色念珠菌的致病機制是目前學者主要研究的方向。白色念珠菌的致病因子中的水解酵素，包括 SAP、Phospholipase 以及 Lipase，其中 SAP 已被廣泛的研究其與念珠菌致病相關性，而研究資料中最少的便是 Lipase，目前主要的研究主要有基本的特性以及一些觀察臨床感染或是小鼠模型感染的表現。本論文的研究期望將近年白色念珠菌脂解酵素研究中，在臨床或是小鼠感染中表現量較高的數個 *LIP* 基因進行突變分析，主要目的是欲了解這幾個脂解酵素基因和致病力或型態的關連性。實驗方法為利用同源重組技術進行雙套基因破壞以及置入可調控之 TR 啟動子作基因功能的研究，所得到之 homozygous knock out 突變株以及 TR system 突變菌株經由 PCR (圖十四至圖二十五) 確認無誤。接著對這些突變株進行性狀分析，觀察基因突變前後對生長及型態變化之影響(圖二十六至圖三十四)，綜合結果之結論推測脂解酵素基因 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 與型態變化及細胞生長是有相關的。

5.1 反轉錄聚合酶反應分析基因表現情形之探討

首先我以及反轉錄酶聚合鏈反應分析在不同菌株中基因之表現情形(圖一至五)，結果顯示脂解酵素基因 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 在不同菌株的 mRNA 表現狀況，發現在 JKC19 (*cph1/cph1 EFG1/EFG1*)、SC5314 (*CPHI/CPHI EFG1/EFG1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*CPHI/CPHI efg1/efg1*) 菌株中，以 RT-PCR 皆可以觀察到 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 預期的產物，也就是說這五個 *LIP* 基因在 *CPHI*、*EFG1* 此兩個已被研究證實與致病以及型態相關的基因被破壞的情況下仍可以存在，這兩個基因雖然是主要的調控途徑，但是研究也指出可能尚有其他調控菌絲

生長或是型態變化的訊息途徑(Riggle et al. 1999)，加以臨床以及實驗小鼠的白色念珠菌感染中，此五個 *LIP* 基因都可以被偵測到較其他 *LIP* 基因高的表現(Hube et al. 2000; Schofield et al. 2005; Stehr et al. 2004)，所以在本實驗中仍將 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 選定為目標基因，進行突變分析。

5.2 以 Long primer PCR 以及 Fusion PCR 製備具有基因同源重組區域之篩選標誌 DNA 片段

本論文在破壞雙套基因時所製備的篩選標誌 DNA 片段，包括 *ARG4* 以及 *URA3*，而在篩選標誌的 3' 以及 5' 我加上了基因的同源區域以利在白色念珠菌之轉形作用下可以與目標基因進行同源重組作用。在 *LIP9* 基因中，製備此篩選標誌 DNA 片段所利用的是 Long primer PCR 方式，合成出一條正向以及一條反向的 90mer 之引子（含有 70mer 之 *LIP9* 之同源區域以及 20mer 的篩選標誌 DNA 片段），在圖八可以看到以 PCR 確認之產物；在 *LIP4*、*5*、*6*、*8* 此四個目標基因中，製備此篩選標誌 DNA 片段所利用的是 Fusion PCR 方式，在圖九至十三可以看到以 PCR 確認的各個片段大小正確。

我所利用的兩個方式都是以同源重組為設計之出發點，經由 Long primer PCR 所製備的 DNA 片段只需要一次 PCR 反應就可以得到，但同時，合成出 90mer 之引子花費相當昂貴，因此本論文嘗試以 Fusion PCR 之方式，利用含有 20mer 與欲研究基因相同序列以及 19mer 篩選標誌之引子一一製備出基因本身 A、B1、B2 region；另設計引子序列含有 19mer 篩選標誌質體以及 20mer 欲研究基因之 3' 及 5' 置換區域，以製備出篩選標誌 DNA 片段，最後便可以利用 5'（A region）之正向引子以及 3'（B region）之反向引子，A region、B region 以及篩選標誌區域三者為模板，

進行 PCR 反應而得到一個融合的片段，雖然 Fusion PCR 方式較為 Long primer 複雜，但是也只需要三次 PCR 反應過程，花費則約為 Long primer 方式之五分之一，在接續的 PCR 確認單套、雙套基因破壞（圖十四到二十三）中可以得知以此兩種方法所製備的 DNA 片段都可以成功的破壞目標基因。

5.3 性狀分析之探討

5.3.1 生長情形之探討

白色念珠菌具有多種型態，隨著環境因素的改變，會產生型態上的變化。由於本實驗目的為觀察脂解基因 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 之突變株在不同的環境下之生長與型態變化，以期了解基因功能與生長型態間的關係，所以將轉形後所得到之突變菌株在不同的環境中，觀察並比較這些突變株的生長與形態之變化。在圖二十六及圖二十七 YPD、SD 培養液之生長曲線試驗與圖二十八及二十九在 YPD、SD 培養基中觀察菌落之生長，兩者實驗的差別在於固液態培養基以及 YPD 培養基較 SD 培養基為營養。先就雙套基因破壞株 (homozygous knockout strain) ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 在液態以及固態 YPD 培養基中生長而言，在液態 YPD 中其與野生株 SC5314、HLC54 的生長趨勢相同，倍增時間方面，所有突變株與對照組差異不超過 0.3 小時，也都可以在轉養 24 小時後達到相似吸光值 (圖二十六 <A>)，而在固態培養基中則是在培養範圍內的菌株生長情形無差異 (圖二十八)，顯示在以 YPD 液態或是固態培養突變菌株下，突變株倍增情形無明顯差異，在長時間培養後也可以

到達相似的狀態，也就是這五個 *LIP* 基因在以 YPD 為營養源時對於菌株本身的生長情形並無明顯影響。再比較雙套基因破壞株 ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*) 及 ICW181 (Dox⁻) (Dox⁺) (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 在液態以及固態 YPD 培養基中的生長，不論在固液態 YPD 培養基中，ICW181 (Dox⁻) (Dox⁺)、ICW179 與野生株 SC5314 生長情形並無差異 (圖二十七 <A>)，由於 ICW181 (Dox⁺) 中 *LIP9* 被 doxycycline 抑制基因表現，而 ICW181 (Dox⁻) 中則是 *LIP9* 被過度表現。這顯示不論 *LIP9* 的抑制表現或是過度表現皆不會在 YPD 培養基中對白色念珠菌的生長造成明顯影響。

在 SD 液態以及固態培養基方面，在液態 SD 中所有突變株與野生株 SC5314、HLC54 的生長趨勢相同，倍增時間方面，只有 ICW174 較 SC5314 緩慢約 0.6 小時，其餘菌株則皆與 SC5314 倍增時間差異不超過 0.2 小時，在轉養 24 小時後發現所有突變株的測定的生長情形皆不若 SC5314，尤其是 ICW179 最為緩慢 (圖二十六)。而在固態 SD 培養基中則是在生長範圍內的 ICW174、175、176、178、179 生長都不若對照組 (圖二十九)，這顯示在以 SD 液態培養突變菌株下僅 ICW174 倍增稍緩，但是在長時間培養後所有突變株無法到達與野生株 SC5314 相同的生長情形，其中又以 ICW179 最為緩慢，這與固態培養基上所有菌株生長情形相同可以互相呼應，也就是以 SD 為營養源時，*LIP4* 會對菌株生長倍增的時間造成影響，而 *LIP4*、5、6、8、9 在被破壞之後則是造成菌株長時間培養後生長較緩。最後再看雙套基因破壞株 ICW179 以及 ICW181 (Dox⁻) (Dox⁺) (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*) 在液態以及固態 SD 培養基中的生長比較，在液態 SD 培養基中 ICW181 (Dox⁺) 倍增時間與 SC5314 無異，但較 ICW179 快約 0.5 小時；而

ICW181 (Dox-) 則是較 SC5314 之倍增時間快了 0.6 小時，24 小時後 ICW181 (Dox-)、ICW181 (Dox+)、SC5314 皆可以到達相同濃度的生長值，ICW179 則無法達到 (圖二十七)。在固態 SD 培養基中可以看到在長時間的培養下 ICW181 (Dox-) (Dox+) 與 SC5314 生長情形無異，但是 ICW179 則是較為緩慢 (圖二十九)，這顯示 ICW181 之 TR system 有可能並無完全抑制掉基因表現，所以在不如 YPD 培養基豐富的 SD 培養基中，才會觀察到 ICW179 與 ICW181 (Dox+) 生長情形之不相同。ICW181 (Dox-) 則是倍增較 SC5314 迅速，長時間培養後情形無異，也就是說抑制 *LIP9* 對於在 SD 培養基中的短時間以及長時間生長都會造成影響，使得菌株生長緩慢；而過度表現 *LIP9* 對於在 SD 培養基中的短時間生長可以造成生長情形較佳的情形，但是對於長期的培養則是無明顯影響。

5.3.2 以血清誘導細胞型態及菌絲實驗之探討

在加入血清誘發菌絲生長觀察細胞型態改變之實驗中，均以長菌絲型的野生株 SC5314、酵母菌型的雙突變破壞株 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) HLC54 作為正負對照，將菌株接種於含血清之 YPD 培養基 (圖三十 <A>) 中，可以看到正對照組野生株 SC5314 之菌落型態為預期的外圍不規則、布滿皺摺，負對照組 HLC54 則是完全圓滑的型態，而 ICW174、175、176、178、179、181 (Dox+) (Dox-) 則皆較正對照組 SC5314 外圍更加圓滑，皺摺也較淺、數量較少，各個突變株之間所觀察到的型態僅有微小的差異。影響到菌落型態的原因很多，不僅與細胞本身基因的變化有關，水分以及鹽離子濃度也佔有影響的能力，在此主要比較對照組與突變株之間的差異，而不著重在突變株之間的差異。在固態 YPD 培養基上經由血清誘導的突變株之菌落型態之結果顯示出 *LIP4*、5、6、

8、9 在被破壞之後的確對白色念珠菌之菌落型態形成影響，使得型態從原本的正對照組型態轉為介在正對照組野生株 SC5314 以及負對照組間，而 *LIP9* 的過度表現下菌落型態也呈現介於正對照組以及負對照組間，這也就是說，在沒有 *LIP4*、5、6、8、9 或是過度表現 *LIP9* 下，調控白色念珠菌型態的因子可能被影響造成菌落型態改變成較為較偏向負對照組。將這些選定觀察之菌落置於顯微鏡下觀察則可以發現所有的突變株生成的芽管皆不若野生株 SC5314 之數量。這樣的結果與圖三十一在含血清的 Bacto agar 培養基之生長是一致的，ICW174、175、176、178、179 受血清誘導下在 Bacto agar 中生長菌絲情形較為短少，形狀也較粗，而 ICW181(Dox+)(Dox-)則是除了菌絲長度上 ICW181(Dox+)(Dox-)較 ICW179 長以外，細胞形狀則是相似的。綜合圖三十、三十一可以發現在固態培養基中以血清誘導下，*LIP4*、5、6、8、9 被破壞以及 *LIP9* 過度表現下之後菌落型態會有改變、生成菌絲的能力有下降的情形，然而 ICW181(Dox+)(Dox-)之表現與 ICW179 相較之下則是菌落型態相同但是 ICW181(Dox+)(Dox-)菌絲長度較長，可能是因為 ICW181 之 TR system 並無完全抑制掉基因表現，導致 ICW181(Dox+)之菌落型態雖然與 ICW179 皆較偏向負對照組但是菌絲長度中 ICW181(Dox+)則是較接近正對照組。

5.3.3 以血清誘導芽管生成實驗之探討

圖三十二在含血清之 YPD 培養液 18 小時之生長中，所有突變株都可以生成加長型的菌絲。而圖三十三的芽管試驗中，我觀察到以血清誘導短時間下 ICW175 以及 ICW179 芽管生成數量明顯較野生株 SC5314 為少，顯示了 *LIP5*、9 可能在細胞形成芽管初期有影響的能力，在臨床的小鼠肝臟感染的 RT-PCR 中可以發現，感染四小時下 *LIP5*、9 的表現

量不僅較其他 *LIP* 基因表現量高，*LIP9* 在短時間感染下的表現量也較其本身長時間感染時高相當多；*LIP5* 在小鼠肝臟以及腎臟感染的 RT-PCR 也可以被觀察到大量的表現 (Stehr et al. 2004)，此與短時間血清誘導下 ICW175、179 生成芽管的能力降低是可以互相符合的，而前人研究中也推測，在初期感染中表現較高量的 *LIP* 基因，往往是可以幫助白色念珠菌針對宿主細胞進行黏附作用以及後續的侵入作用；後期表現量較高的 *LIP* 基因則是幫助白色念珠菌能夠提供 fatty acids、glycerol 作為碳源，使其可以在宿主體內存活並複製 (Stehr et al. 2004)。這樣的結果與圖三十二的長時間誘導相比可以知道，*LIP* 基因對於增長型菌絲生成能力是不會有明顯影響，但是 *LIP5*、*9* 則是能夠影響初期形成芽管的能力。ICW181 (Dox+)(Dox-) 在圖三十三中可見生成芽管數量與野生株 SC5314 無異，也較 ICW179 多，此差異則是顯示 ICW181 之 TR system 有可能並無完全抑制掉基因表現。

5.3.4 侵犯力測試實驗之探討

在圖三十四侵犯力分析試驗中可見雖然所有突變株與野生株均有菌絲形成並侵入培養基，但是由圖三十四 的近照可知，突變株侵入培養基能力較野生株 SC5314 低，而 HLC54 則沒有侵入培養基之能力，也就是說 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 可以降低白色念珠菌的侵犯力，而且不論過度表現 *LIP9* 或是抑制 *LIP9* 皆會降低白色念珠菌的侵犯力。前人研究中指出在小鼠感染中，包括 *LIP4-8* 等基因會在消化道中以及在腸胃道黏膜組織中有高量的表現，而 *LIP9* 則是在腸胃道黏膜組織有高量的表現，在本實驗中所得到的 *LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 破壞株在侵犯力上的改變可能影響白色念珠菌在宿主細胞組織形成聚落並侵入宿主細胞之能力 (Schofield et al. 2005)，而 *LIP4-8* 在小鼠感染中 colonization 時也有高

量的表現，這可能與前人研究 *Propionibacterium acnes* 的 lipase 可以藉由分解人體皮膚的 triacylglycerol 所釋放的 free fatty acid 促進自身的 colonization 有相同的機制作用 (Gibbon, Cunliffe, and Holland 1993)。

在前人的研究中，*LIP4*、*5*、*6*、*8*、*9* 在遭受白色念珠菌感染的病患檢體以及小鼠模型、人造皮膚組織上都有高量的 mRNA 表現(Hube et al. 2000; Schofield et al. 2005; Stehr et al. 2004)，經由本實驗將此五個 *LIP* 基因進行突變分析，發現將此五個基因進行破壞之後生長狀況以及菌落型態皆有遭受影響，但是短時間誘導芽管生成則僅有 *LIP5*、*9* 有所改變，其餘基因則是沒有可觀察到的差異；增長型菌絲方面則是此五個突變株與正對照組野生株 SC5314 皆無異。將 *LIP9* 利用 TR system 進行過度表現時則是生長狀況無明顯差異，菌落型態也有所改變，但是芽管以及增長型菌絲方面則是無異。雖然並不是五個 *LIP* 基因之芽管生成以及增長型菌絲都有顯著變化，但是我可以從圖三十一的 Bactoagar 實驗中看到，所有的突變株菌落外圍所生成的菌絲數量以及分布情形都是與正對照組野生株 SC5314 有顯著不同，這顯示即使突變株皆可以被誘導出增長型菌絲，菌絲在細胞的分布以及數量還是有所改變，菌絲的型態以及數量往往是與念珠菌本身與宿主細胞進行黏附、侵入的能力有正相關性。而我也在前人的研究中發現，不論是在小鼠模型或是人造皮膚組織、病患口腔檢體中，被發現有高表現量的 *LIP* 基因皆不只一個基因(Hube et al. 2000; Schofield et al. 2005; Stehr et al. 2004)，也就是說可能有幾個基因同時或是分工進行某個功能，那麼就有基因之間互相幫助功能的可能性，假使 *LIP4* 被破壞掉之後功能可以由擔任同一功能的其他基因幫助，結果便不會對念珠菌形成過大影響，本實驗結果中 *LIP5*、*9* 在突變之後對於各個方面都有較顯著的差異，可以推測或許在白色念珠菌致病過程中

此兩個基因分別擔任僅一個基因負責的功能，白色念珠菌的蛋白水解酶 SAP family 在進行基因破壞並加以感染小鼠模型後也發現相同情形，失去單一 SAP1-6 基因的白色念珠菌致病力雖下降但仍可以感染宿主細胞，文獻也推測可能是因為六個基因可以互相幫助功能(Schaller et al. 2005)。本實驗中的破壞突變株皆針對一個 *LIP* 基因進行雙套基因破壞，在未來的實驗中或許可以針對兩個 *LIP* 基因一起進行突變的實驗。

5.4 未來展望

本論文主要利用 gene targeting 之實驗方法(Nakayama et al. 2000; Wilson, Davis, and Mitchell 1999)針對基因進行突變研究，包括進行雙套基因之破壞 (gene disruption) 及四環黴素調控表現系統 (TR system) 之建構，以脂解酵素基因中之 *LIP4*、5、6、8、9 為目標基因，利用同源重組之方式將雙套基因進行破壞以及將 TR system 置換其啟動子區域並作基因功能之研究。所得到之突變菌株以 PCR 確認後，得到雙套基因破壞株 (homozygous knockout) ICW174 (*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、ICW175 (*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、ICW176 (*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、ICW178 (*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*)；利用四環黴素調控系統，成功地被將 TR promoter 置入 *LIP9* 基因，得到 ICW181 (*lip9::ARG4/LIP9::TR-LIP9-URA3*)，並在不添加 doxycycline 之環境下對 ICW174、175、176、178、179 進行型態分析，在添加、不添加 doxycycline 之環境下對 ICW181 進行型態分析，觀察在基因被抑制表現或是過度表現後之型態變化，得到結論為 *LIP4*、5、6、8、9 可影響菌絲形成，尤以 *LIP5*、9 較為顯著。至於這些脂解酵素基因和致病力之間的關連，未來可以利用動物模式將突變株進行 *in vivo* 的試

驗，探究突變株實際上對白色念珠菌致病能力的影響。



六、參考文獻

- 陳豪勇, 李麗俐, 江蕙蘭, 楊志元, (2000). MIMS 醫用微生物學, 藝軒出版社, 240 頁.
- 陳宜君, (2002). 念珠菌院內感染的臨床、分子流行病學研究, 台大臨床醫學研究所博士論文.
- 戴秀琴, (2003). 早產兒白色念珠菌血症案例報告, 藥學雜誌, 74, 11.
- Akins, R. A. 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 43 (4):285-318.
- Anthonsen, H. W., A. Baptista, F. Drablos, P. Martel, S. B. Petersen, M. Sebastiao, and L. Vaz. 1995. Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnol Annu Rev* 1:315-71.
- Berman, J., and P. E. Sudbery. 2002. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3 (12):918-30.
- Braun, B. R., W. S. Head, M. X. Wang, and A. D. Johnson. 2000. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* 156 (1):31-44.
- Calderone, R., R. Diamond, J. M. Senet, J. Warmington, S. Filler, and J. E. Edwards. 1994. Host cell-fungal cell interactions. *J Med Vet Mycol* 32 Suppl 1:151-68.
- Calderone, R. A., and P. C. Braun. 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 55 (1):1-20.
- Casanova, M., J. L. Lopez-Ribot, J. P. Martinez, and R. Sentandreu. 1992. Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. *Infect Immun* 60 (11):4898-906.
- Chen, Y. C., S. C. Chang, C. C. Sun, L. S. Yang, W. C. Hsieh, and K. T. Luh. 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.
- Daniels, K. J., T. Srikantha, S. R. Lockhart, C. Pujol, and D. R. Soll. 2006. Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *Embo J* 25 (10):2240-52.
- Douglas, L. J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11 (1):30-6.

- Dupont, B. 2001. [Choice and use of antifungal drugs]. *Rev Prat* 51 (7):752-7.
- Ernst, J. F. 2000. Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146 (Pt 8):1763-74.
- Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H. C. Korting, W. Schafer, and B. Hube. 2002. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* 70 (7):3689-700.
- Filler, S. G., A. S. Pfunder, B. J. Spellberg, J. P. Spellberg, and J. E. Edwards, Jr. 1996. *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun* 64 (7):2609-17.
- Fu, Y., G. Rieg, W. A. Fonzi, P. H. Belanger, J. E. Edwards, Jr., and S. G. Filler. 1998. Expression of the *Candida albicans* gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* 66 (4):1783-6.
- Gale, C. A., C. M. Bendel, M. McClellan, M. Hauser, J. M. Becker, J. Berman, and M. K. Hostetter. 1998. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* 279 (5355):1355-8.
- Ghannoum, M. A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13 (1):122-43, table of contents.
- Gillum, A. M., E. Y. Tsay, and D. R. Kirsch. 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198 (1):179-82.
- Gottlich, E., G. S. de Hoog, S. Yoshida, K. Takeo, K. Nishimura, and M. Miyaji. 1995. Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human *tinea nigra*. *Mycoses* 38 (11-12):489-94.
- Gribbon, E. M., W. J. Cunliffe, and K. T. Holland. 1993. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *J Gen Microbiol* 139 (8):1745-51.
- Haynes, K. 2001. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 9 (12):591-6.
- Hoover, C. I., M. J. Jantapour, G. Newport, N. Agabian, and S. J. Fisher. 1998. Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) gene. *FEMS Microbiol Lett* 167 (2):163-9.
- Hostetter, M. K. 2000. RGD-mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. *Curr Opin Microbiol* 3 (4):344-8.
- Hoyer, L. L., S. Scherer, A. R. Shatzman, and G. P. Livi. 1995. *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol* 15 (1):39-54.

- Hsueh, P. R., M. L. Chen, C. C. Sun, W. H. Chen, H. J. Pan, L. S. Yang, S. C. Chang, S. W. Ho, C. Y. Lee, W. C. Hsieh, and K. T. Luh. 2002. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. *Emerg Infect Dis* 8 (1):63-8.
- Hube, B., and J. Naglik. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147 (Pt 8):1997-2005.
- Hube, B., F. Stehr, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar, and W. Schafer. 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* 174 (5):362-74.
- Hube, B., D. Sanglard, F. C. Odds, D. Hess, M. Monod, W. Schafer, A. J. Brown, and N. A. Gow. 1997. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 65 (9):3529-38.
- Hwang, C. S., J. H. Oh, W. K. Huh, H. S. Yim, and S. O. Kang. 2003. Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 47 (4):1029-43.
- Jaeger, K. E. 1994. [Extracellular enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* as virulence factors]. *Immun Infekt* 22 (5):177-80.
- Jaeger, K. E., A. Kharazmi, and N. Hoiby. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function in vitro. *Microb Pathog* 10 (3):173-82.
- Jaeger, K. E., F. J. Adrian, H. E. Meyer, R. E. Hancock, and U. K. Winkler. 1992. Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochim Biophys Acta* 1120 (3):315-21.
- 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.
- Klotz, S. A., M. J. Rutten, R. L. Smith, S. R. Babcock, and M. D. Cunningham. 1993. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. *Microb Pathog* 14 (2):133-47.
- 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.
- Konig, B., K. E. Jaeger, A. E. Sage, M. L. Vasil, and W. Konig. 1996. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human

- inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes. *Infect Immun* 64 (8):3252-8.
- Lan, C. Y., G. Newport, L. A. Murillo, T. Jones, S. Scherer, R. W. Davis, and N. Agabian. 2002. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (23):14907-12.
- Law, D., C. B. Moore, H. M. Wardle, L. A. Ganguli, M. G. Keaney, and D. W. Denning. 1994. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. *J Antimicrob Chemother* 34 (5):659-68.
- Leidich, S. D., A. S. Ibrahim, Y. Fu, A. Koul, C. Jessup, J. Vitullo, W. Fonzi, F. Mirbod, S. Nakashima, Y. Nozawa, and M. A. Ghannoum. 1998. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 273 (40):26078-86.
- Leng, P., P. R. Lee, H. Wu, and A. J. Brown. 2001. Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol* 183 (13):4090-3.
- Lipke, P. N., D. Wojciechowicz, and J. Kurjan. 1989. AG alpha 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol Cell Biol* 9 (8):3155-65.
- Liu, H., J. Kohler, and G. R. Fink. 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, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G. R. Fink. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90 (5):939-49.
- Mitchell, A. P. 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 1 (6):687-92.
- Murad, A. M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, D. MacCallum, N. Schnell, D. Talibi, D. Marechal, F. Tekaia, C. d'Enfert, C. Gaillardin, F. C. Odds, and A. J. Brown. 2001. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J* 20 (17):4742-52.
- Naglik, J. R., C. A. Rodgers, P. J. Shirlaw, J. L. Dobbie, L. L. Fernandes-Naglik, D. Greenspan, N. Agabian, and S. J. Challacombe. 2003. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* 188 (3):469-79.
- Nakayama, H., T. Mio, S. Nagahashi, M. Kokado, M. Arisawa, and Y. Aoki. 2000. Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* 68 (12):6712-9.

- Navarro-Garcia, F., R. Alonso-Monge, H. Rico, J. Pla, R. Sentandreu, and C. Nombela. 1998. A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* 144 (Pt 2):411-24.
- Negre, E., T. Vogel, A. Levanon, R. Guy, T. J. Walsh, and D. D. Roberts. 1994. The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*. *J Biol Chem* 269 (35):22039-45.
- Niewerth, M., and H. C. Korting. 2001. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 44 (9-10):361-7.
- Ran, Y., T. Yoshiike, and H. Ogawa. 1993. Lipase of *Malassezia furfur*: some properties and their relationship to cell growth. *J Med Vet Mycol* 31 (1):77-85.
- Richard, M. L., C. J. Nobile, V. M. Bruno, and A. P. Mitchell. 2005. *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell* 4 (8):1493-502.
- Riggle, P. J., K. A. Andrutis, X. Chen, S. R. Tzipori, and C. A. Kumamoto. 1999. Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun* 67 (7):3649-52.
- Ripeau, J. S., F. Aumont, P. Belhumeur, L. Ostrosky-Zeichner, J. H. Rex, and L. de Repentigny. 2002. Effect of the echinocandin caspofungin on expression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases and phospholipase in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (9):3096-100.
- Rollof, J., J. H. Braconier, C. Soderstrom, and P. Nilsson-Ehle. 1988. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7 (4):505-10.
- Sanglard, D., B. Hube, M. Monod, F. C. Odds, and N. A. Gow. 1997. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* 65 (9):3539-46.
- Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48 (6):365-77.
- Schofield, D. A., C. Westwater, T. Warner, and E. Balish. 2005. Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiol Lett* 244 (2):359-65.
- Schuetzer-Muehlbauer, M., B. Willinger, G. Krapf, S. Enzinger, E. Presterl, and K. Kuchler. 2003. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol* 48 (1):225-35.
- Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, M. Gerads, K. Kurpanek, D. Sanglard, and J. F. Ernst. 2000. Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 35 (2):386-96.

- Staab, J. F., Y. S. Bahn, and P. Sundstrom. 2003. Integrative, multifunctional plasmids for hypha-specific or constitutive expression of green fluorescent protein in *Candida albicans*. *Microbiology* 149 (Pt 10):2977-86.
- Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283 (5407):1535-8.
- Stehr, F., A. Felk, A. Gacser, M. Kretschmar, B. Mahnss, K. Neuber, B. Hube, and W. Schafer. 2004. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* 4 (4-5):401-8.
- Stoldt, V. R., A. Sonneborn, C. E. Leuker, and J. F. Ernst. 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.
- Weide, M. R., and J. F. Ernst. 1999. Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mycoses* 42 Suppl 2:61-7.
- Wenzel, R. P., and C. Gennings. 2005. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 6:S389-93.
- Werner, H. 1966. [Studies on the lipase activity in yeasts and yeast-like fungi]. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* 200 (1):113-24.
- White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11 (2):382-402.
- Wilson, R. B., D. Davis, and A. P. Mitchell. 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* 181 (6):1868-74.
- Wu, C. J., H. C. Lee, N. Y. Lee, H. I. Shih, N. Y. Ko, L. R. Wang, and W. C. Ko. 2006. Predominance of Gram-negative bacilli and increasing antimicrobial resistance in nosocomial bloodstream infections at a university hospital in southern Taiwan, 1996-2003. *J Microbiol Immunol Infect* 39 (2):135-43.
- Yang, Y. L., and H. J. Lo. 2001. Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 34 (2):79-86.