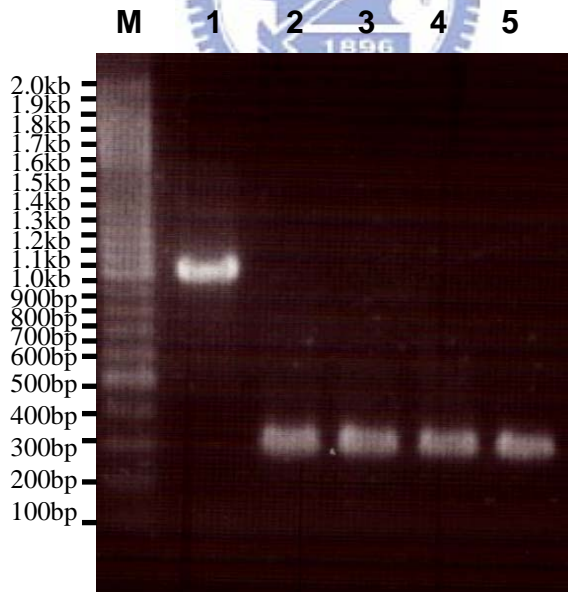


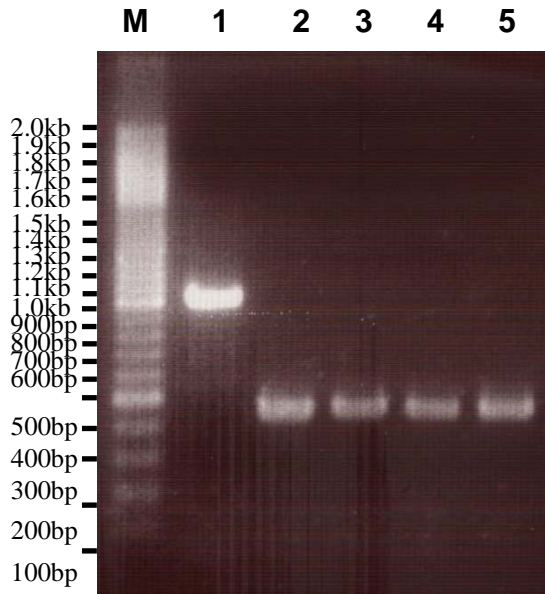
圖一、*LIP4*之反轉錄聚合酶鏈反應結果。

圖中M為100bp marker，1為reaction control *ACT1*，2-5表示WT(SC5314)、DM(HLC54)、*cph1/cph1*、*efg1/efg1*四種不同基因型之菌株。*LIP4*所設計的RT-PCR片段大小約為455 bp



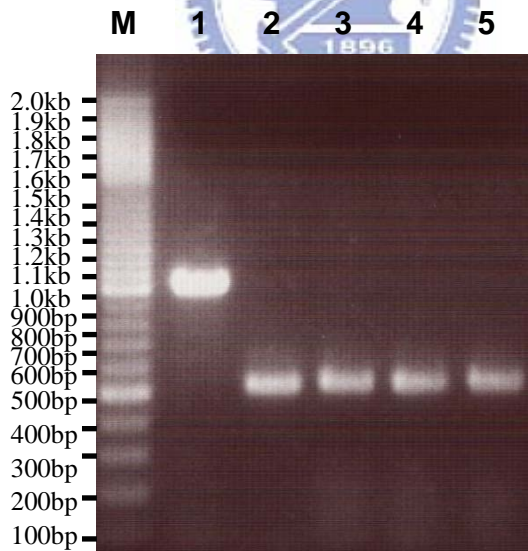
圖二、*LIP5*之反轉錄聚合酶鏈反應結果。

圖中M為100bp marker，1為reaction control *ACT1*，2-5表示WT(SC5314)、DM(HLC54)、*cph1/cph1*、*efg1/efg1*四種不同基因型之菌株。*LIP5*所設計的RT-PCR片段大小約為283bp



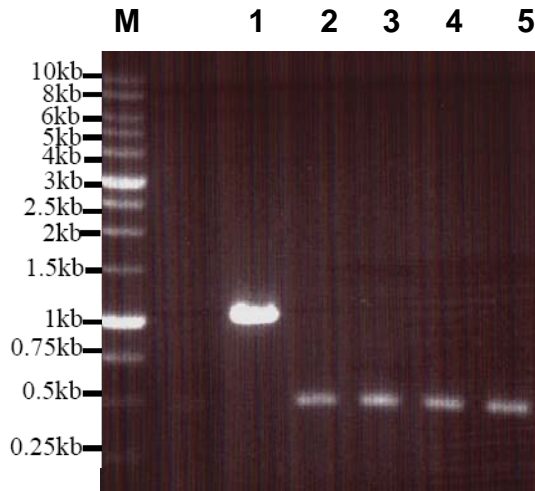
圖三、*LIP6*之反轉錄聚合酶鏈反應結果。

圖中M為100bp marker，1為reaction control *ACT1*，2-5表示WT(SC5314)、DM(HLC54)、*cph1/cphI*、*efg1/efgI*四種不同基因型之菌株。*LIP6*所設計的RT-PCR片段大小約為441bp



圖四、*LIP8*之反轉錄聚合酶鏈反應結果。

圖中M為100bp marker，1為reaction control *ACT1*，2-5表示WT(SC5314)、DM(HLC54)、*cph1/cphI*、*efg1/efgI*四種不同基因型之菌株。*LIP8*所設計的RT-PCR片段大小約為521bp

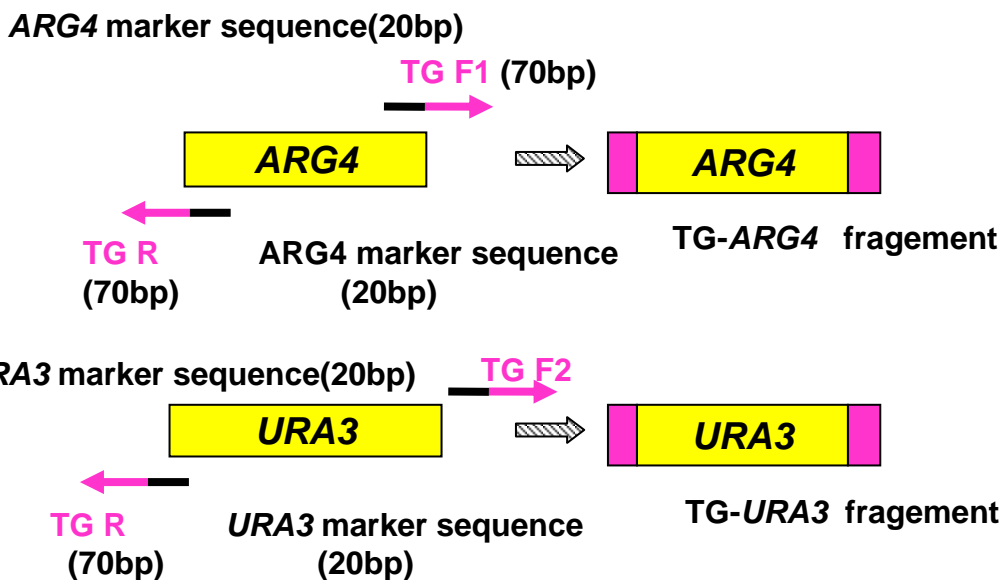


圖五、*LIP9*之反轉錄聚合酶鏈反應結果。

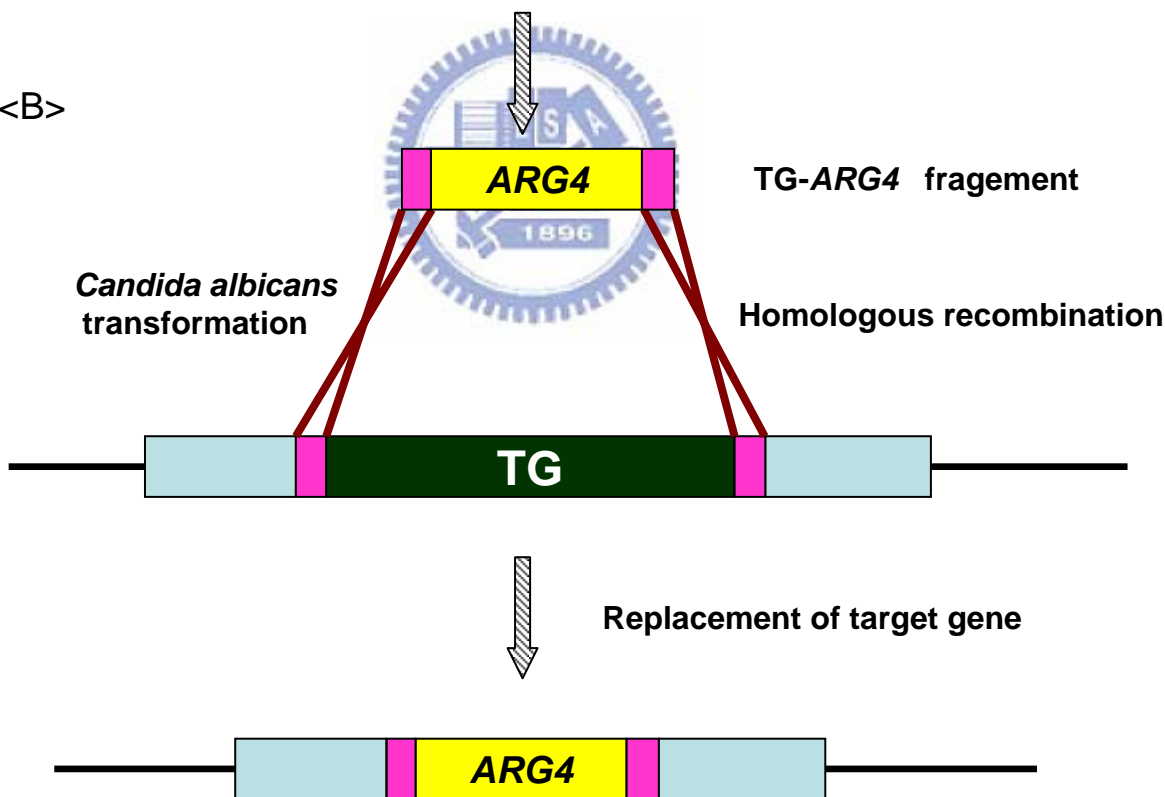
圖中M為100bp marker，1為reaction control *ACT1*，2-5表示WT(SC5314)、DM(HLC54)、*cph1/cph1*、*efg1/efg1*四種不同基因型之菌株。*LIP9*所設計的RT-PCR片段大小約為466bp



<A>

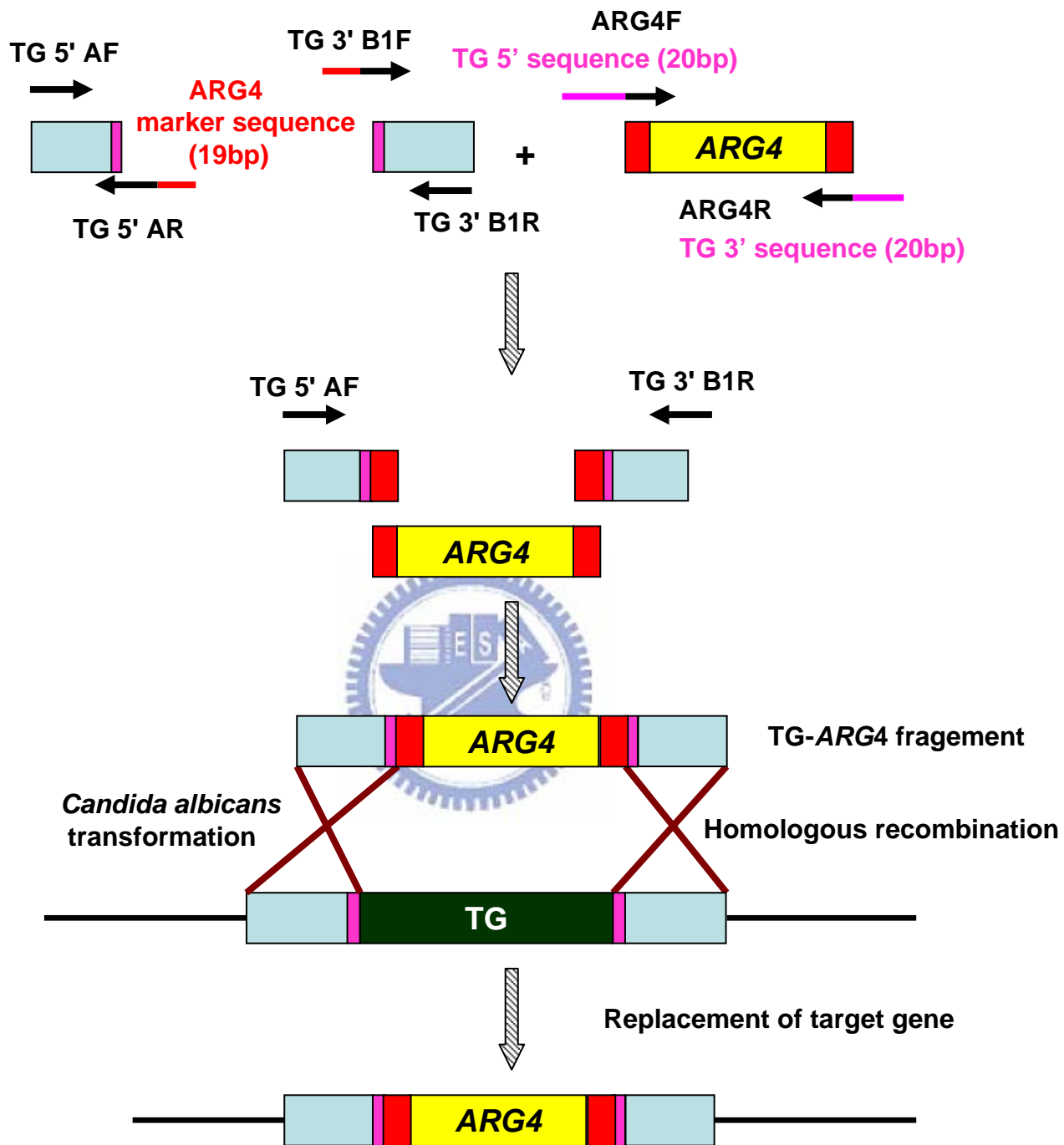


<B>



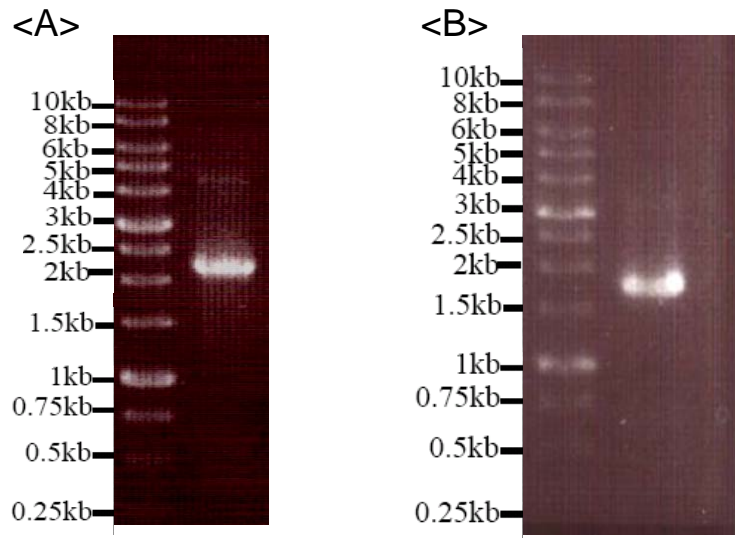
圖六、Long primer PCR 原理示意圖

利用PCR將篩選標誌3'以及5'以長片段引子加上同源重組區域成為一個片段以進行白色念珠菌轉形作用，將目標基因進行破壞，圖<A>中以篩選標誌ARG4、URA3為例  
圖<B>則是以篩選標誌ARG4為例的轉形作用中同源置換示意圖

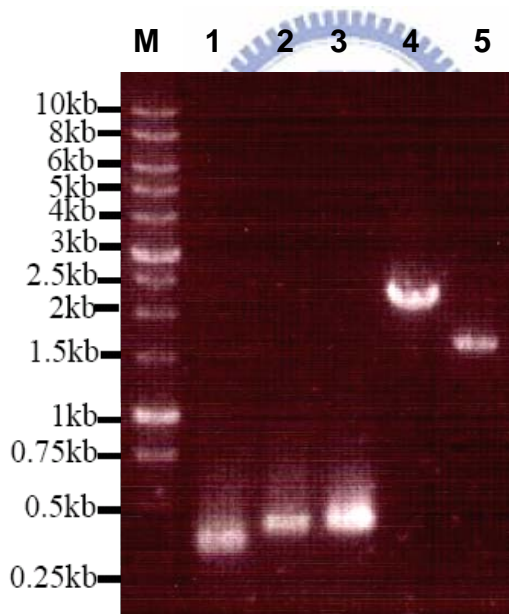


圖七、Fusion PCR 原理示意圖

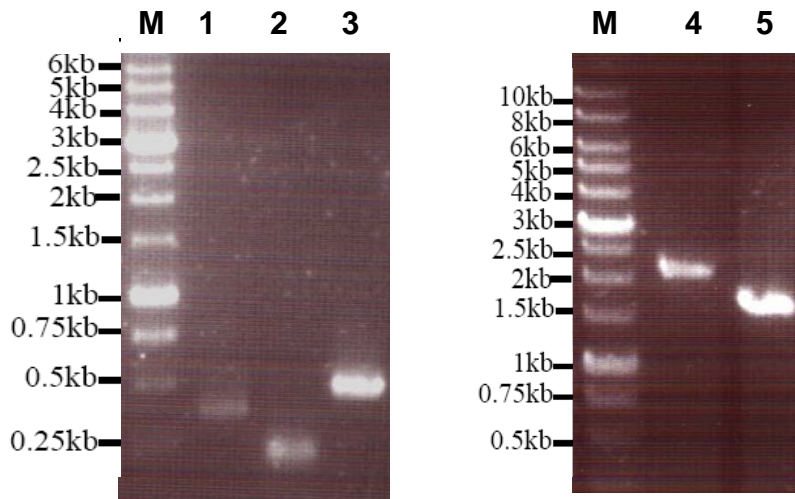
利用PCR將篩選標誌與同源重組區域融合成為一個片段以進行白色念珠菌轉形作用，將目標基因進行破壞，圖中以篩選標誌 ARG4為例



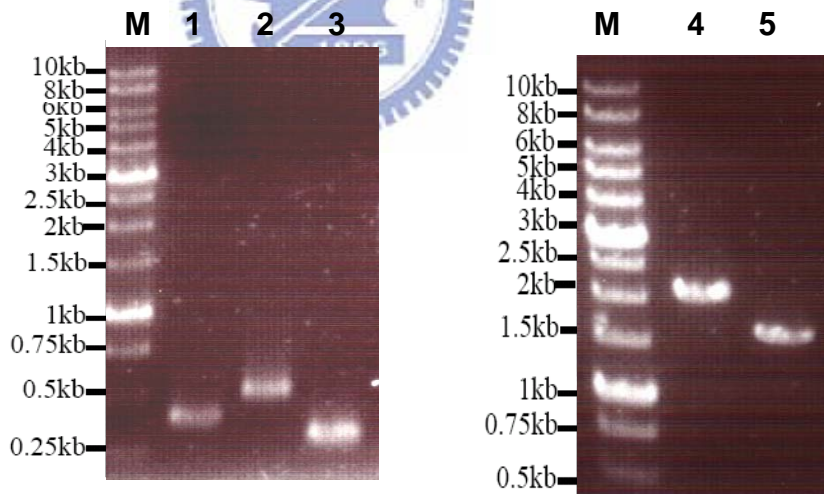
圖八、*LIP9*破壞雙套基因所製備之具有同源置換區域的篩選標誌  
圖<A>為*LIP9-ARG4*片段，大小約2.2kb; <B>則是*LIP9-URA3*  
片段，大小約1.7kb



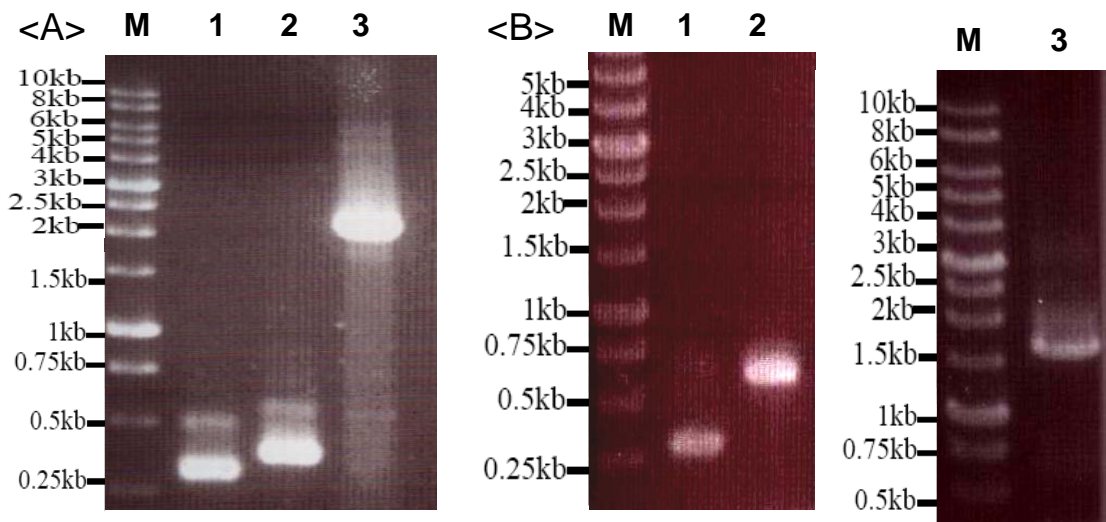
圖九、利用Fusion PCR製備*LIP4-ARG4*以及*LIP4-URA3*時所須之片段  
Lane 1-5分別為含有篩選標誌19mer之*LIP4* 5' A region大小約  
0.3kb，含有篩選標誌19mer之*LIP4* 3' B1 region大小約為0.35kb，  
含有篩選標誌19mer之*LIP4* 3' B2 region約0.4kb，含有*LIP4*  
40mer之篩選標誌*ARG4*片段約2.2kb，含有*LIP4* 40mer之篩選標  
誌*URA3*片段約1.7kb



圖十、利用Fusion PCR製備*LIP5-ARG4*以及*LIP5-URA3*時所須之片段  
 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* 40mer之篩選標誌*URA3*片段約1.7kb

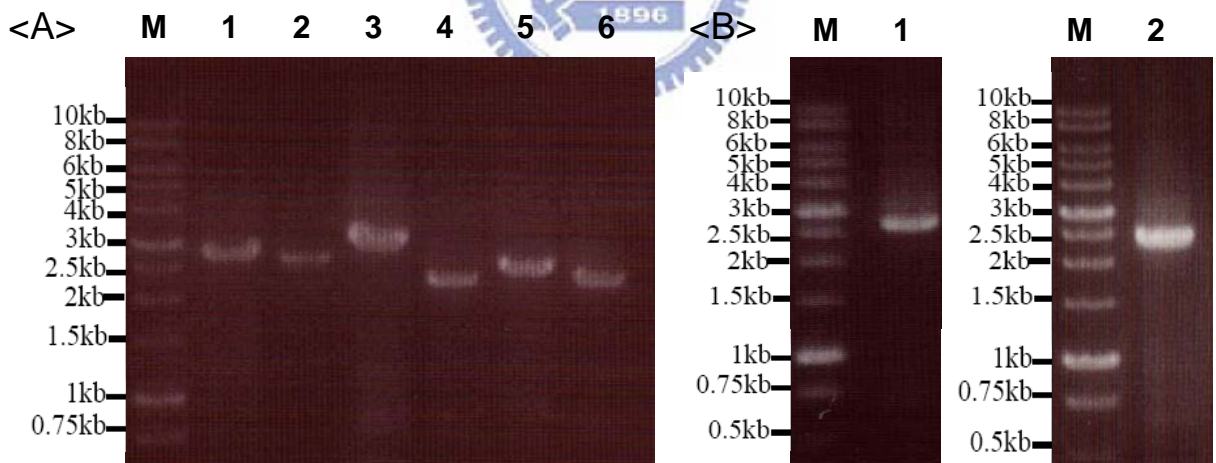


圖十一、利用Fusion PCR製備*LIP6-ARG4*以及*LIP6-URA3*時所須之片段  
 Lane 1-5分別為含有篩選標誌19mer之*LIP6* 5' A region大小約0.35kb，含有篩選標誌19mer之*LIP6* 3' B1 region約0.46kb，含有篩選標誌19mer之*LIP6* 3' B2 region大小約0.3kb，含有*LIP6* 40mer之篩選標誌*ARG4*片段約2.2kb，含有*LIP6* 40mer之篩選標誌*URA3*片段約1.7kb



圖十二、利用Fusion PCR製備LIP8-ARG4以及LIP8-URA3時所須之片段

<A> 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；  
 <B> 中Lane1-3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 40mer之篩選標誌URA3片段約1.7kb



圖十三、利用Fusion PCR製備LIP4,5,6,8-ARG4以及LIP4,5,6,8-URA3之片段

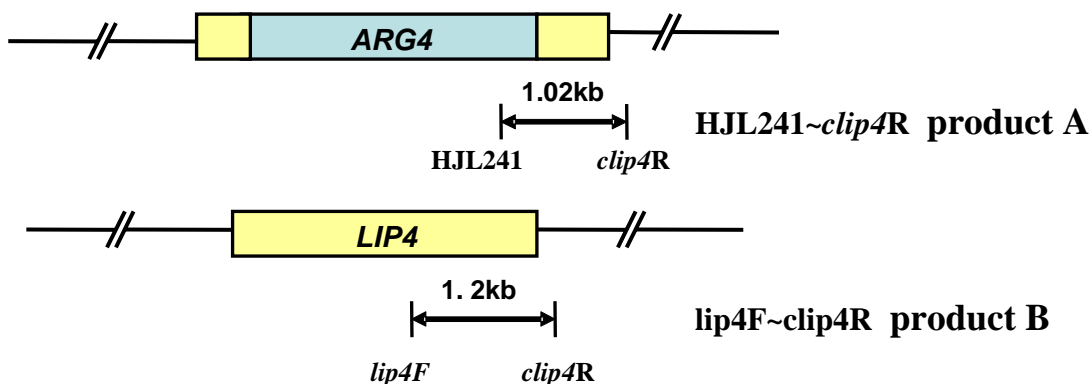
<A> 中Lane1-3為含有5' A region、篩選標誌ARG4、3' B1 region之LIP4fuARG4，約2.8kb，LIP5fuARG4約2.78kb，LI64fuARG4片段則約3kb；Lane4-6則是含有5' A region、篩選標誌URA3、3' B2 region之LIP4fuURA3，約2.2kb，LIP5fuURA3約2.3kb，LI64fuURA3片段則約2.2kb

<B> 中Lane1為含有5' A region、篩選標誌ARG4、3' B1 region之LIP8fuARG4，大小約2.8kb；Lane2為含有5' A region、篩選標誌ARG4、3' B2 region之LIP8fuURA3，大小約2.4kb

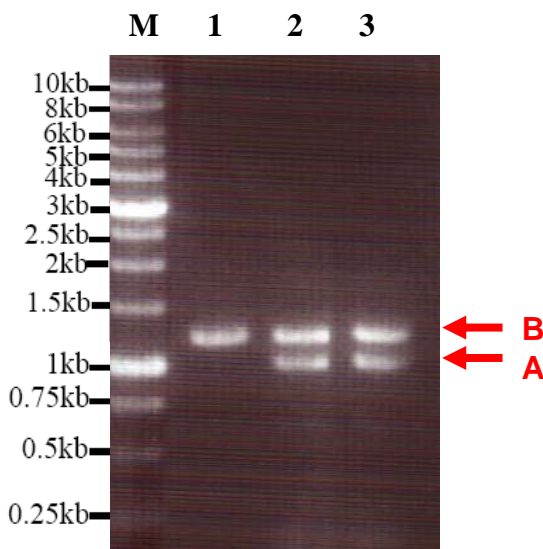


## PCR result of *LIP4* heterozygous knockout strain

<A>



<B>



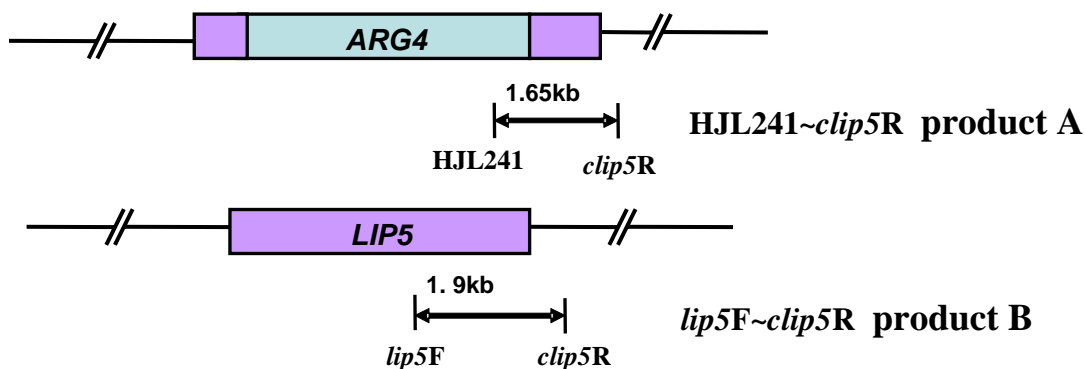
圖十四、PCR確認*LIP4*單套基因之破壞(knockout)。

<A>為確認*LIP4*破壞突變是否成功之示意圖。利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。反應中一次加入三條引子，即可反應出預期片段。

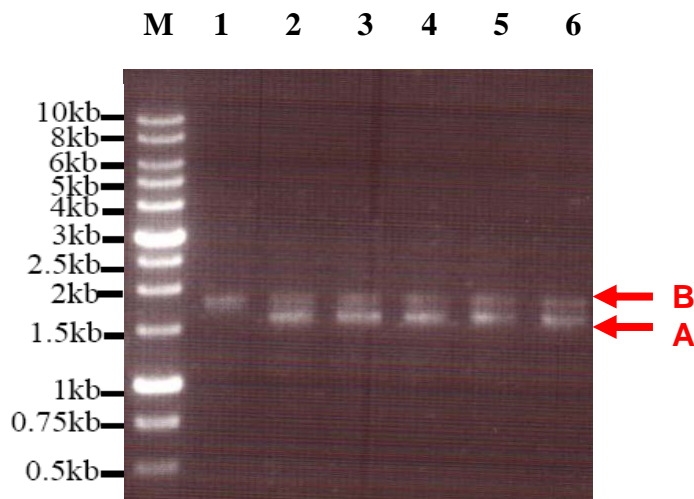
<B>利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~3為以*clip4R*、*lip4F*、HJL241為引子之PCR產物，其中1以BWP17 DNA為template，2~3則為轉形一次後挑取之菌落。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約1.02 kb之band，B：約1.2 kb之band

## PCR result of *LIP5* heterozygous knockout strain

<A>



<B>

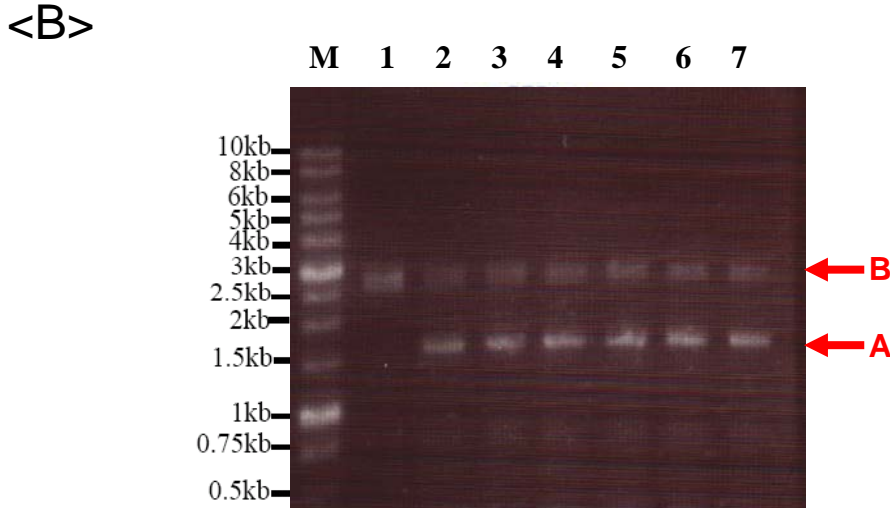
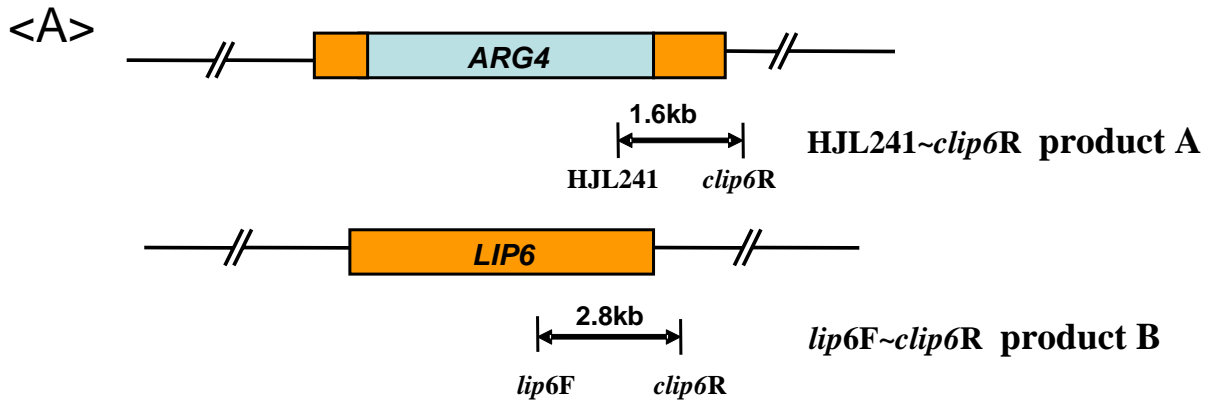


圖十五、PCR確認*LIP5*單套基因之破壞(knockout)。

<A>為確認*LIP5*破壞突變是否成功之示意圖。利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。反應中一次加入三條引子，即可反應出預期片段。

<B>利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~6為以*clip5R*、*lip5F*、HJL241為引子之PCR產物，其中1以BWP17 DNA為template，2~6則為轉形一次後挑取之菌落。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約1.65 kb 之band，B：約1.9 kb之band

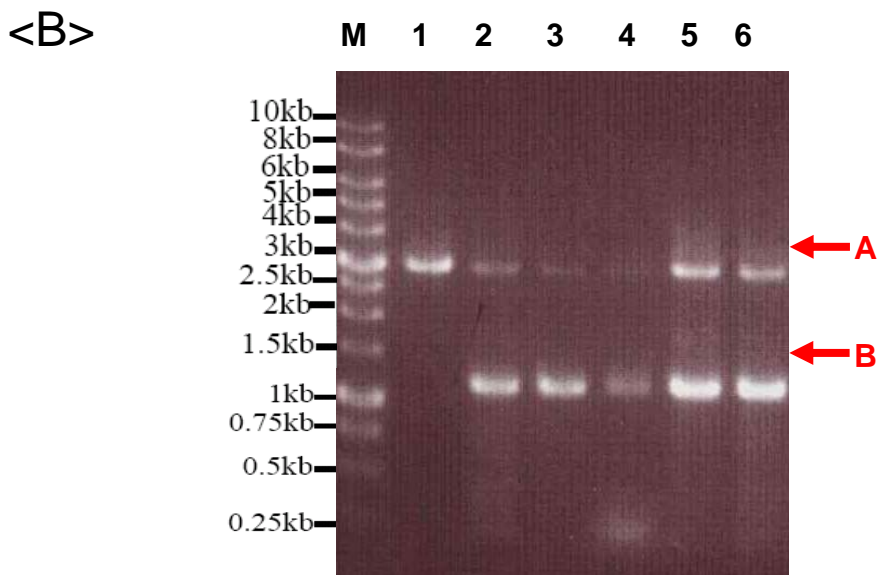
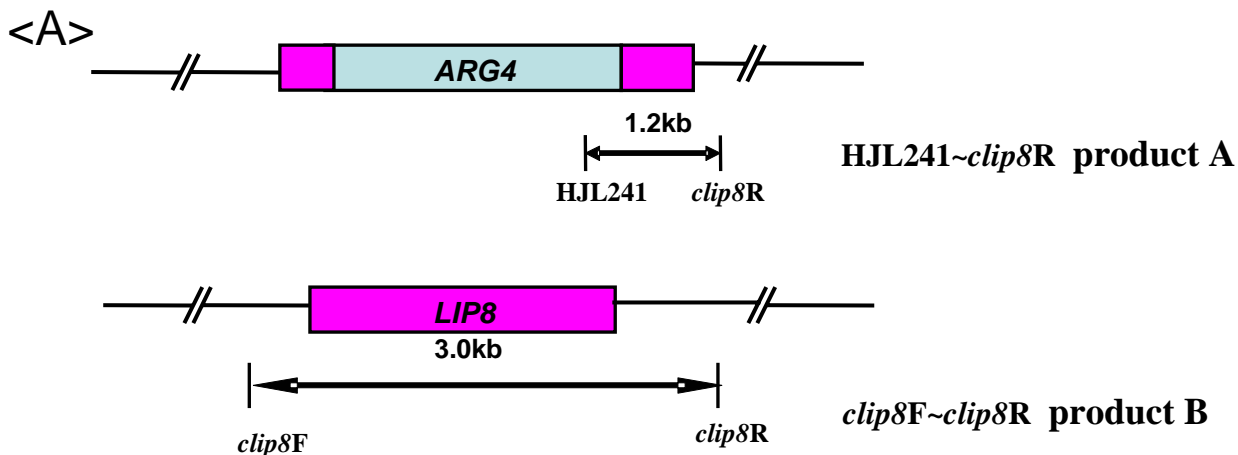
## PCR result of *LIP6* heterozygous knockout strain



圖十六、PCR確認*LIP6*單套基因之破壞(knockout)。

- <A>為確認*LIP6*破壞突變是否成功之示意圖。利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。反應中一次加入三條引子，即可反應出預期片段。
- <B>利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~7為以*clip6R*、*lip6F*、HJL241為引子之PCR產物，其中1以BWP17 DNA為template，2~7則為轉形一次後挑取之菌落。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約1.62 kb之band，B：約2.8 kb之band

## PCR result of *LIP8* heterozygous knockout strain

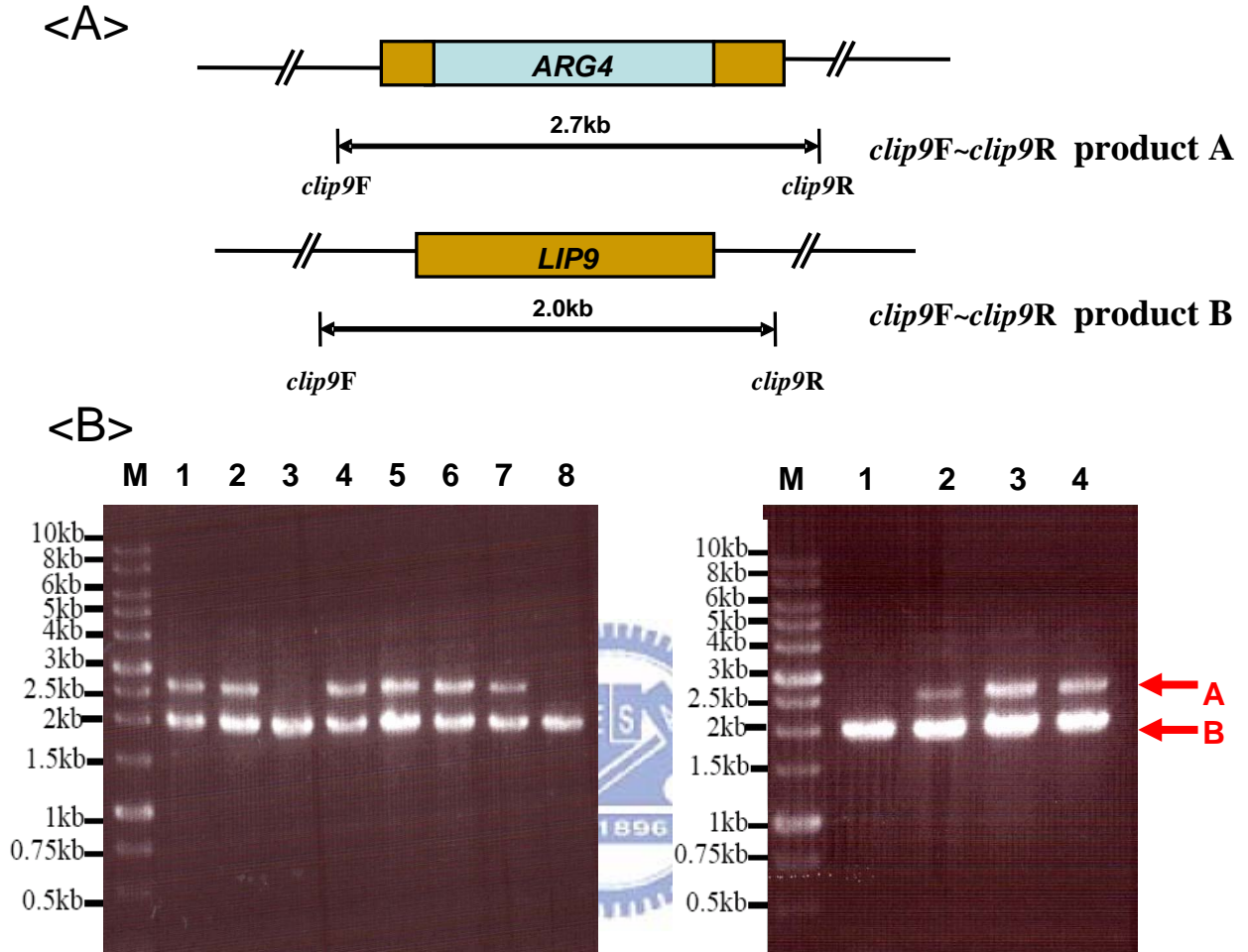


圖十七、PCR確認*LIP8*單套基因之破壞(knockout)。

<A>為確認*LIP8*破壞突變是否成功之示意圖。利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。反應中一次加入三條引子，即可反應出預期片段。

<B>利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~6為以*clip8R*、*clip8F*、HJL241為引子之PCR產物，其中1以BWP17 DNA為template，2~6則為轉形一次後挑取之菌落。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約1.2 kb之band，B：約3.0 kb之band，C：約3.1 kb之band

## PCR result of *LIP9* heterozygous knockout strain



圖十八、PCR確認*LIP9*單套基因之破壞(knockout)。

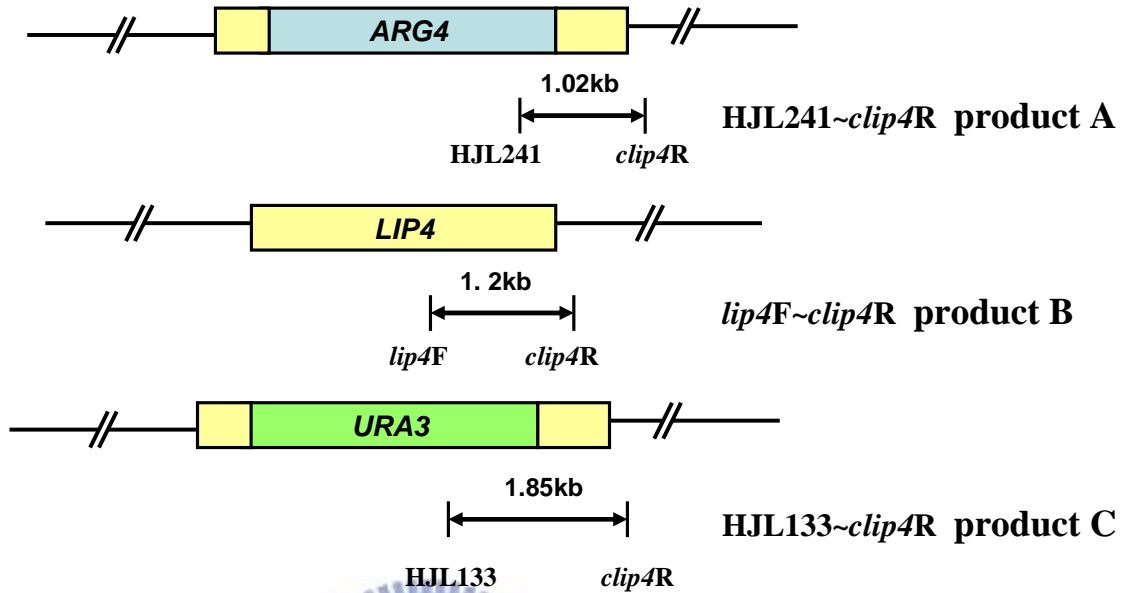
<A> 為確認*LIP9*破壞突變是否成功之示意圖。利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。反應中一次加入兩條引子，即可反應出預期片段。

<B> 在tetR/BWP17中利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~8 為以*clip9R*、*clip9F*為引子之PCR產物，其中8以BWP17/tetR DNA為template，1~7則為轉形一次後挑取之菌落。

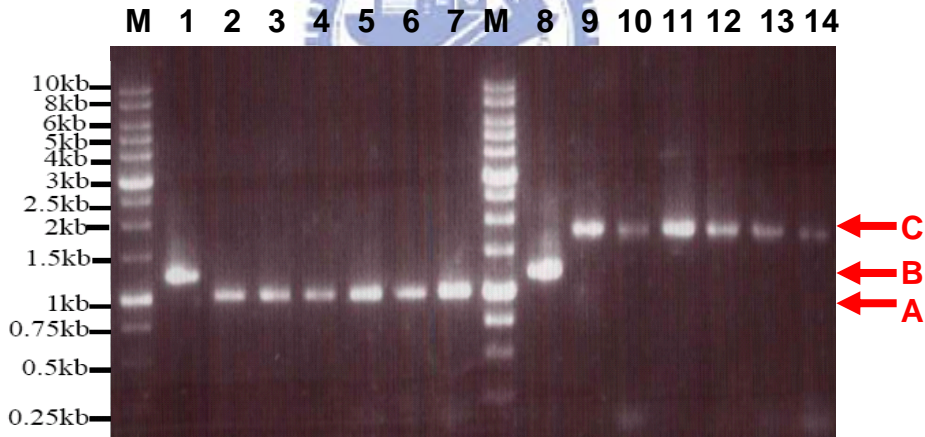
<C> 在BWP17中利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~8 為以*clip9R*、*clip9F*為引子之PCR產物，其中1以BWP17 DNA為template，2~4則為轉形一次後挑取之菌落。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約2.0 kb 之band，B：約2.7 kb之band

# PCR result of *LIP4* homozygous knockout strain

<A>



<B>



圖十九、PCR確認*LIP4*雙套基因之破壞(knockout)。

<A>為確認*LIP4*破壞突變是否成功之示意圖。

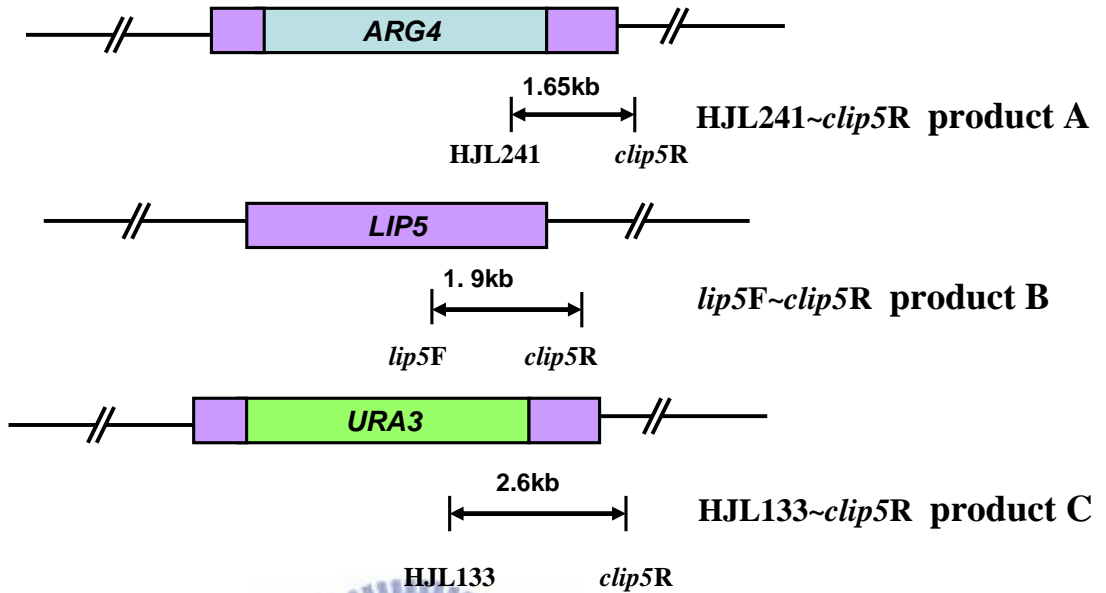
利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。

反應中一次加入三條引子，即可反應出預期片段。

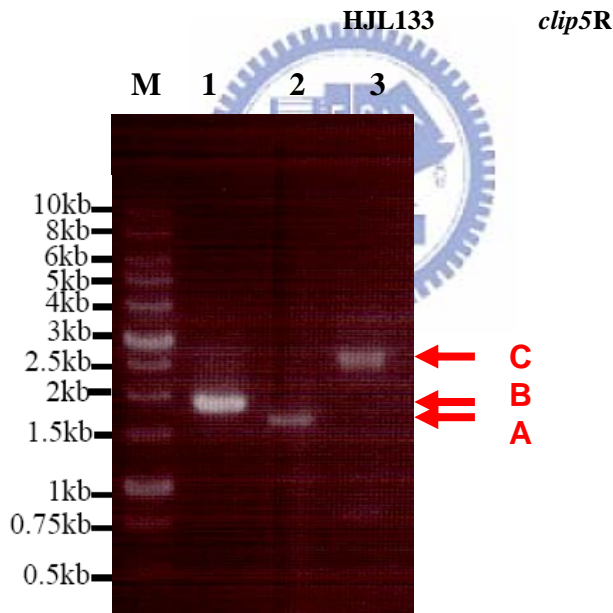
<B>利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~7為以*clip4R*、*lip4F*、HJL241為引子之PCR產物，8~14為以*clip4R*、*lip4F*、HJL133為引子之PCR產物，其中1、8以BWP17 DNA為template，2~7以及9~14則為轉形一次後挑取之菌落(2、9為同一菌落，以此類推)。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約1.02 kb之band，B：約1.2 kb之band，C：約1.85kb之band

# PCR result of *LIP5* homozygous knockout strain

<A>



<B>



圖二十、PCR確認*LIP5*雙套基因之破壞(knockout)。

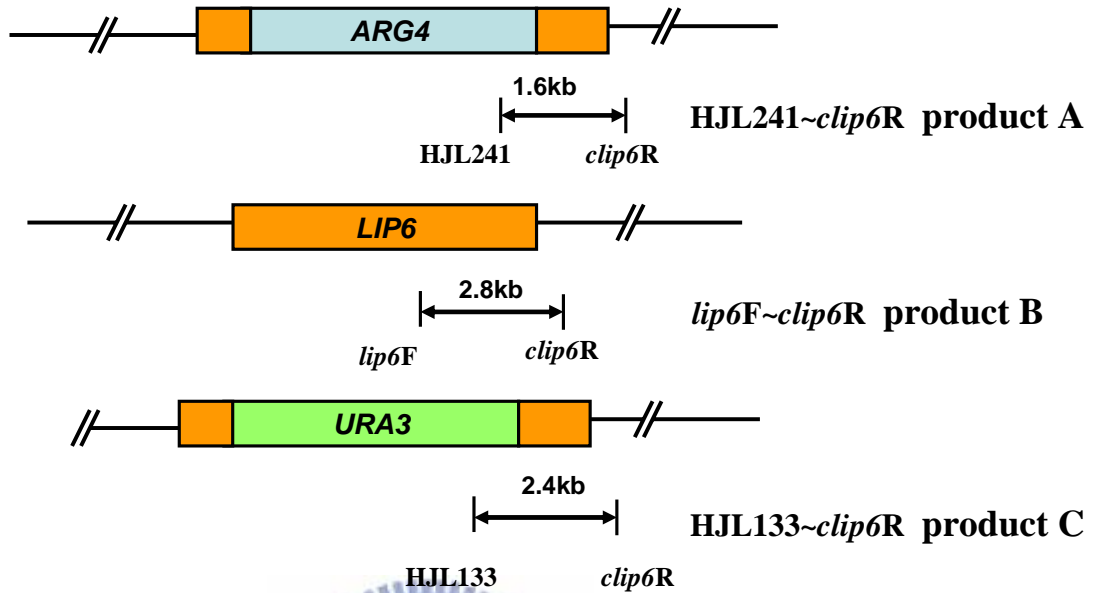
<A> 為確認*LIP5*破壞突變是否成功之示意圖。

利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。反應中一次加入三條引子，即可反應出預期片段。

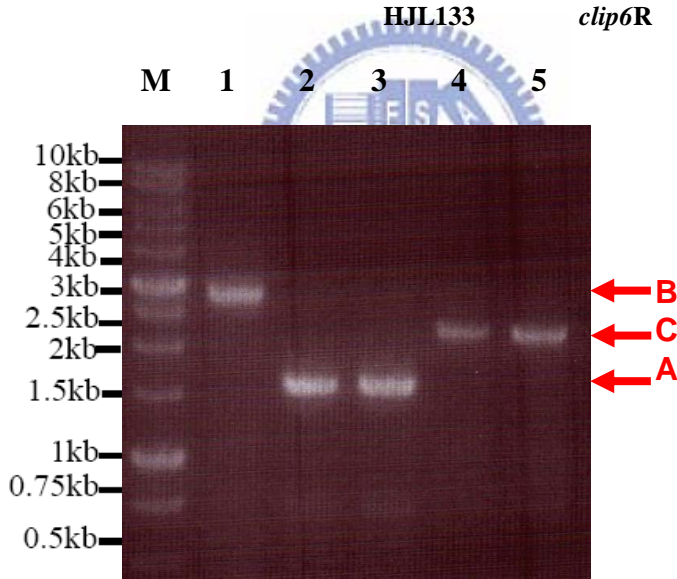
<B> 利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~2為以clip5R、lip5F、HJL241為引子之PCR產物，3為以clip5R、lip5F、HJL133為引子之PCR產物，其中1以BWP17 DNA為template，2~3為轉形兩次後挑取之同一菌落。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約1.65 kb 之band，B：約1.9 kb 之band，C：約2.6kb之band。

# PCR result of *LIP6* homozygous knockout strain

<A>



<B>



圖二十一、PCR確認*LIP6*雙套基因之破壞(knockout)。

<A> 為確認*LIP6*破壞突變是否成功之示意圖。

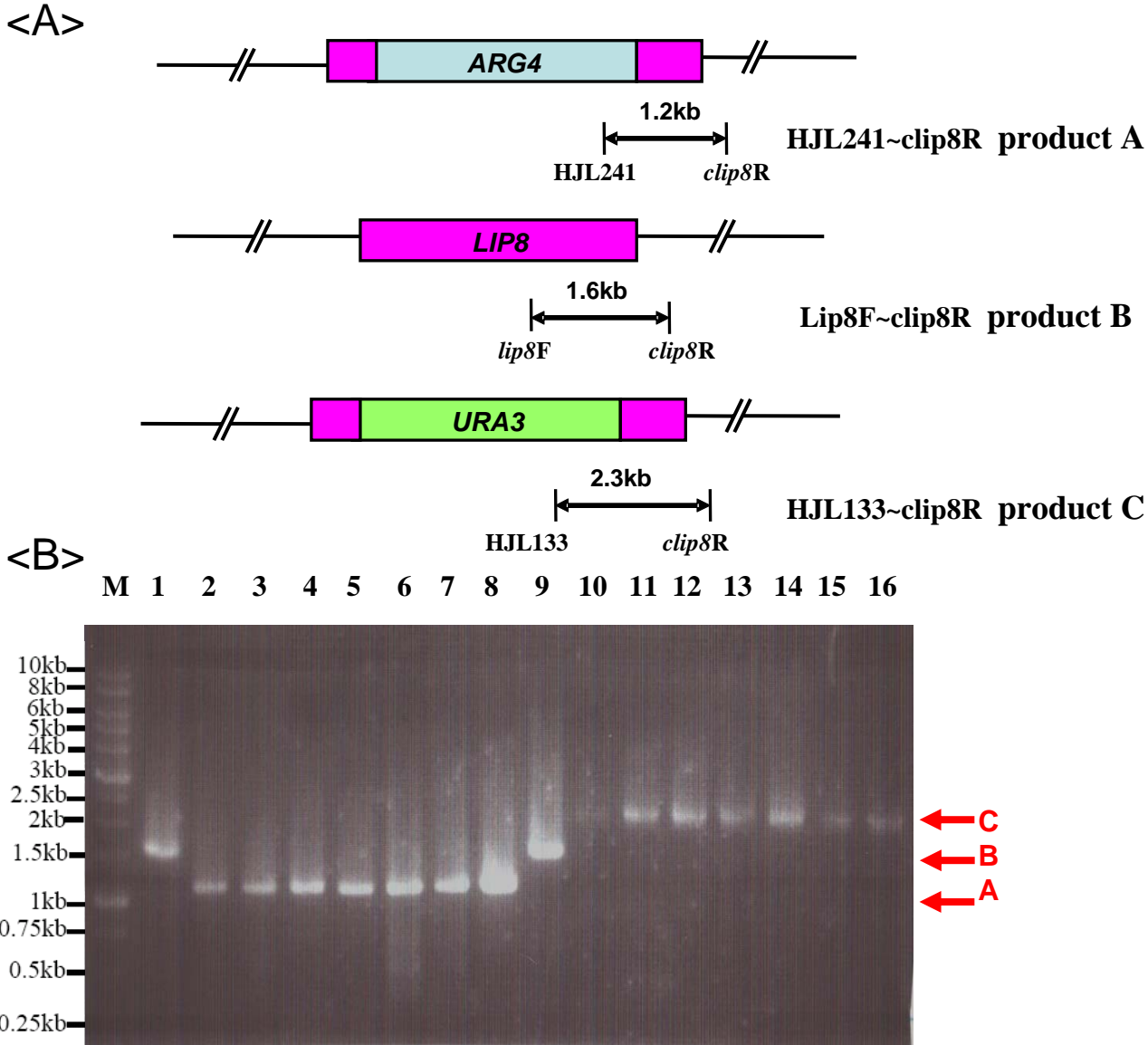
利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。

反應中一次加入三條引子，即可反應出預期片段。

<B> 利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~3為以*clip6R*、*lip6F*、HJL241為引子之PCR產物，4~5為以*clip6R*、*lip6F*、HJL133為引子之PCR產物，其中1以BWP17 DNA為template，2~3、4~5為轉形兩次後挑取之菌落(2、4為同一菌落，以此類推)。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約1.62 kb之band，B：約2.8 kb之band，C：約2.4kb之band



## PCR result of *LIP8* homozygous knockout strain



圖二十二、PCR確認*LIP8*雙套基因之破壞(knockout)。

<A>為確認*LIP8*破壞突變是否成功之示意圖。

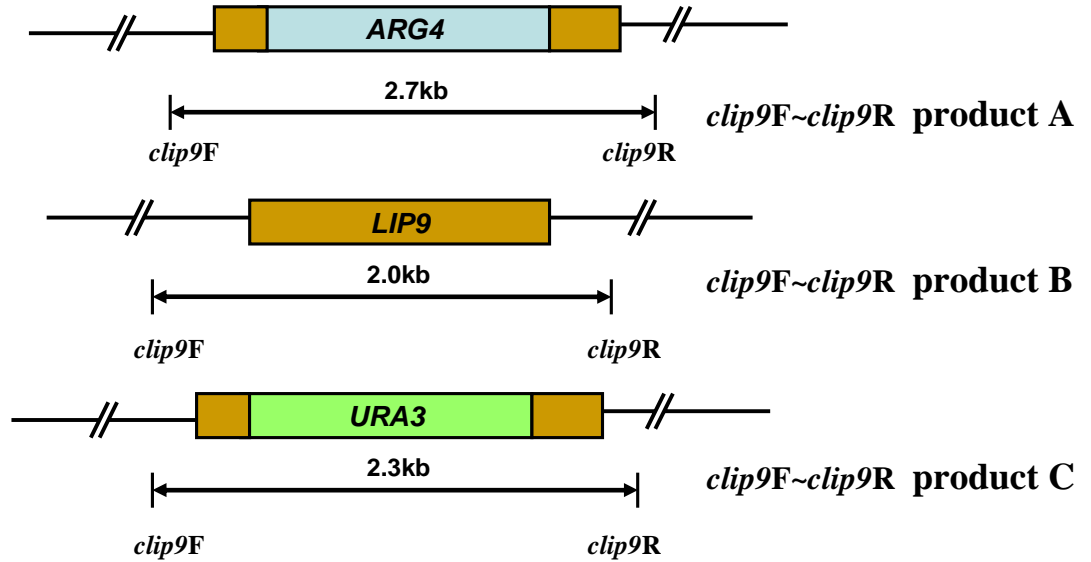
利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。

反應中一次加入三條引子，即可反應出預期片段。

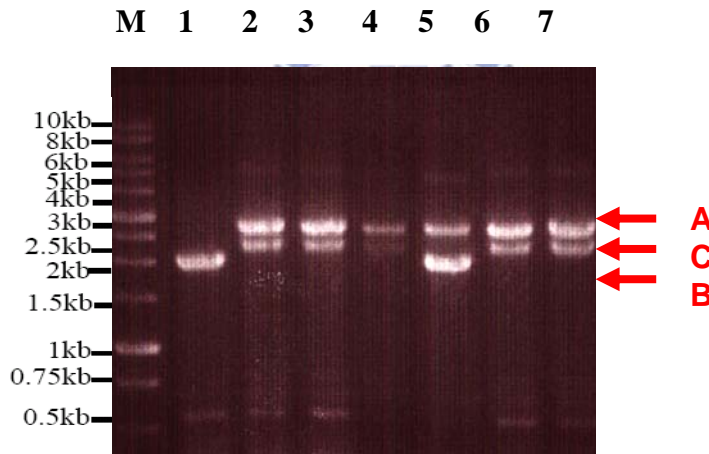
<B>利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~8為以*clip8R*、*lip8F*、HJL241為引子之PCR產物，9~16為以*clip8R*、*lip8F*、HJL133為引子之PCR產物，其中1、9以BWP17 DNA為template，2~8、10~16為轉形兩次後挑取之菌落(2、10為同一菌落，以此類推)。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約1.2 kb之band，B：約1.6 kb之band，C：約2.3kb之band

## PCR result of *LIP9* homozygous knockout strain

<A>



<B>

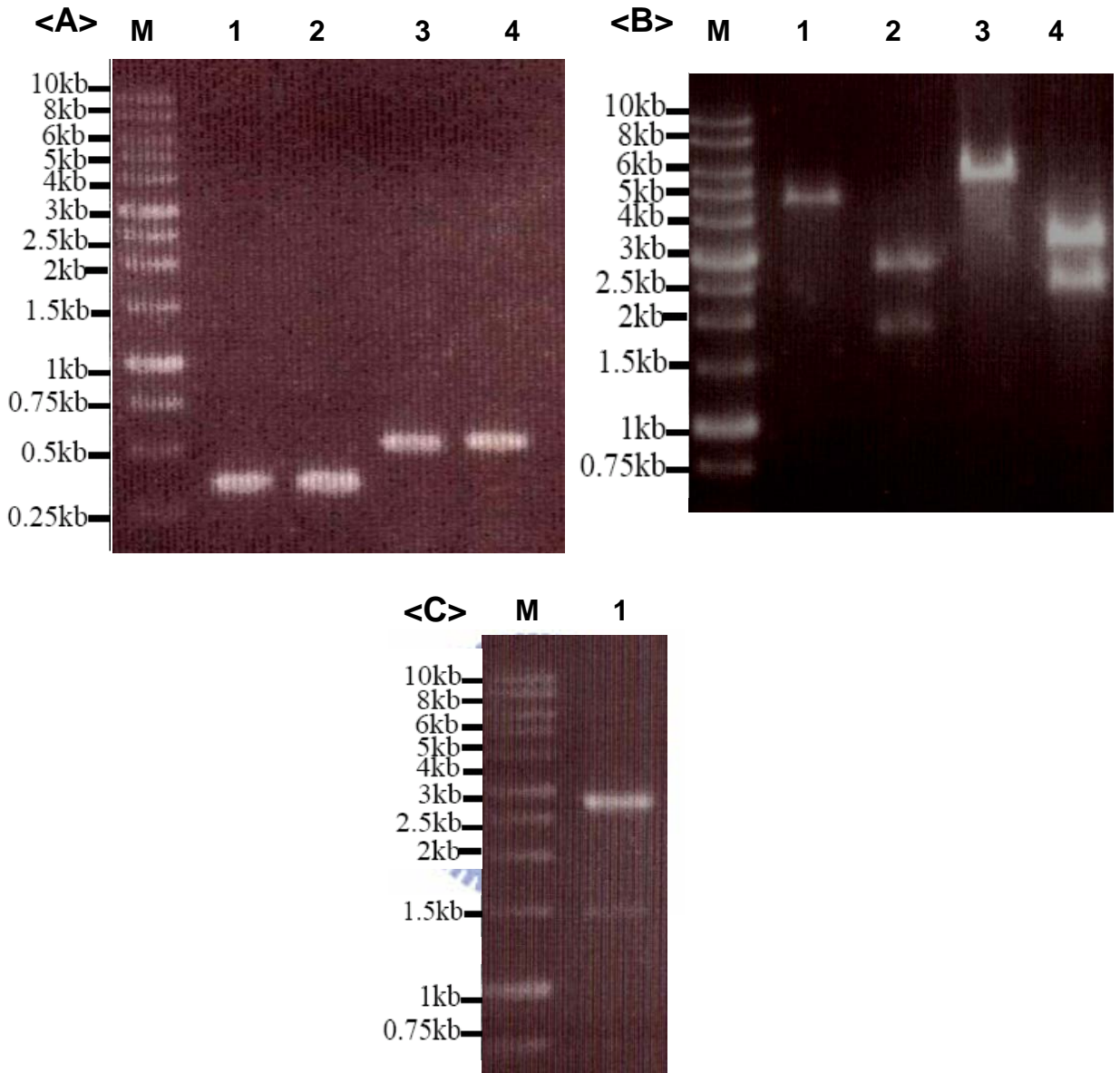


圖二十三、PCR確認*LIP9*雙套基因之破壞(knockout)。

<A>為確認*LIP9*破壞突變是否成功之示意圖。

利用右方斜體標示引子進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。反應中一次加入兩條引子，即可反應出預期片段。

<B>利用0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，1~7為以*clip9R*、*clip9F*為引子之PCR產物，其中1以BWP17 DNA為template，2~7為轉形兩次後挑取之菌落。右方箭頭所指為PCR產物之位置，A：約2.7 kb 之band，B：約2.0 kb之band，C：約2.3kb之band

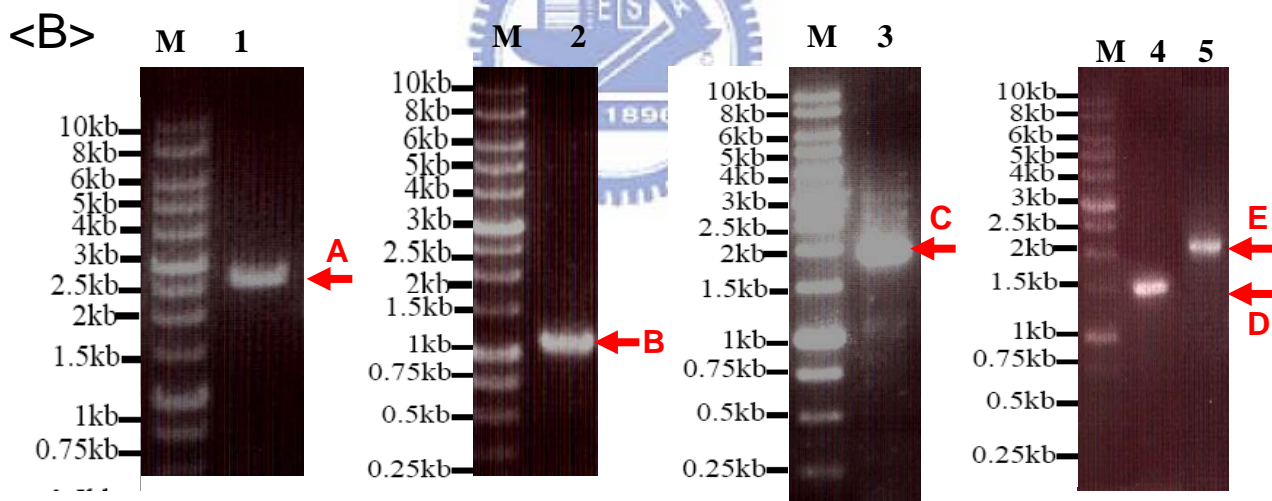
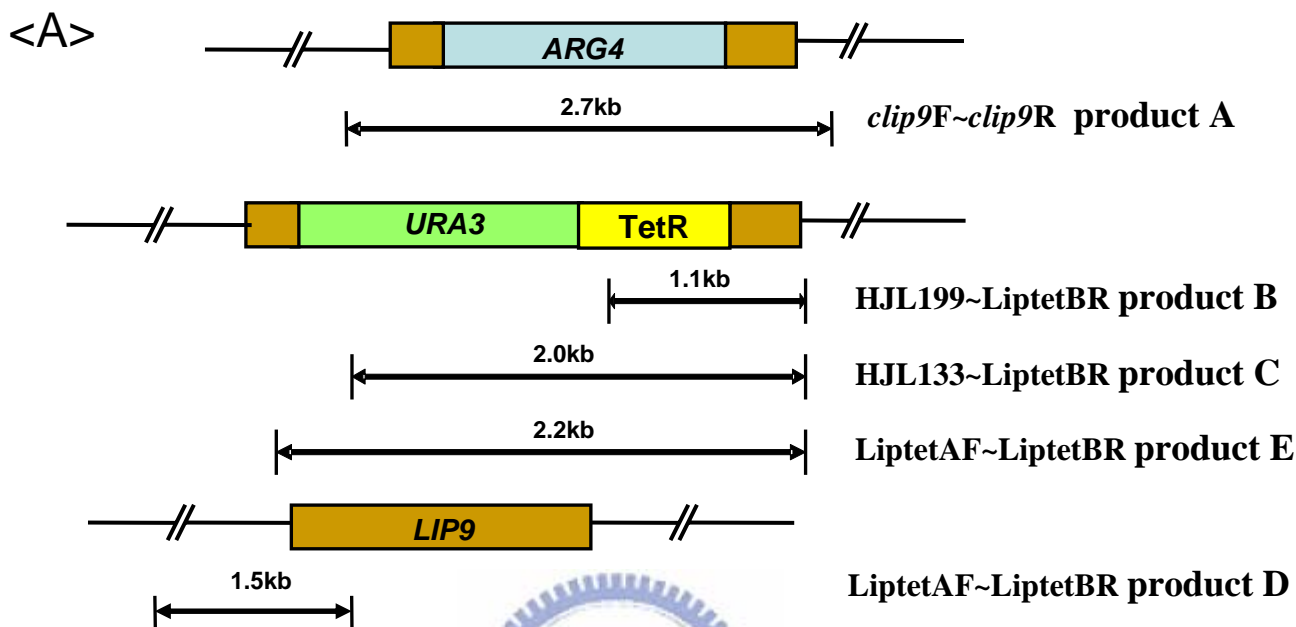


圖二十四、製備含有 *LIP9* 同源區域以及 TR promoter 之篩選標誌 DNA 片段  
 <A> 設計 *LIP9* 的同源區域 A、B 作為置入 p99CAU 之 insert  
 ， lane 1-2 為 *LIP9tetA*，大小約 0.38kb；lane 3-4 則是 *LIP9tetB*，  
 約 0.5kb

<B> 以限制酶酵素確認大腸桿菌轉形株中是否已置入 *LIP9*  
 之同源區域，Lane 1-2 為無 insert 之 p99CAU 質體，其中 Lane 1  
 使用 *KpnI* 進行反應得 5kb 片段，Lane 2 則以 *KpnI*+*SacII* 進行反應  
 得 2+3kb；Lane 3-4 為從大腸桿菌中挑取之轉形株，其中 Lane 3 使用  
*KpnI* 進行反應得約 5.9kb 片段，Lane 4 則以 *KpnI*+*SacII* 進行反  
 應得約 2.7+3.2kb

<C> 製備完成的 *LIP9tetR-URA3* 片段，大小約 2.8kb

## PCR check of *LIP9* TR strain



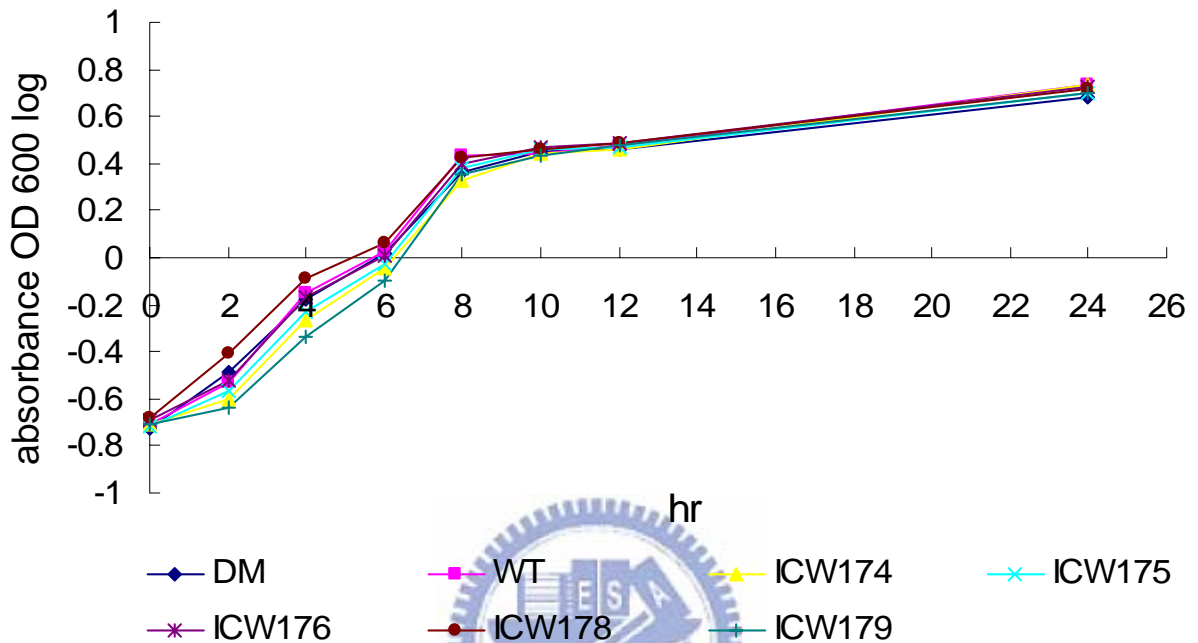
圖二十五、PCR確認TR promoter及*URA3*是否正確recombine及integrate至*LIP9*

<A> 為確認TR promoter及*URA3*是否正確recombine及integrate至*LIP9*之示意圖。利用右方標示之引子，進行PCR可得如圖箭頭所指的片段。

<B> 以0.8%洋菜膠分析PCR產物。M為1kb Marker，Lane1~5以挑取菌落之DNA為template，利用標示的引子進行PCR，右方箭頭所指為PCR產物之位置。A：約2.7 kb之band，B：約1.1 kb之band，C：約2.0 kb之band，D：約1.5 kb之band，E：約2.2kb之band

## Growth curve of *LIP4,5,6,8,9* homozygous knock out strains

<A> YPD broth

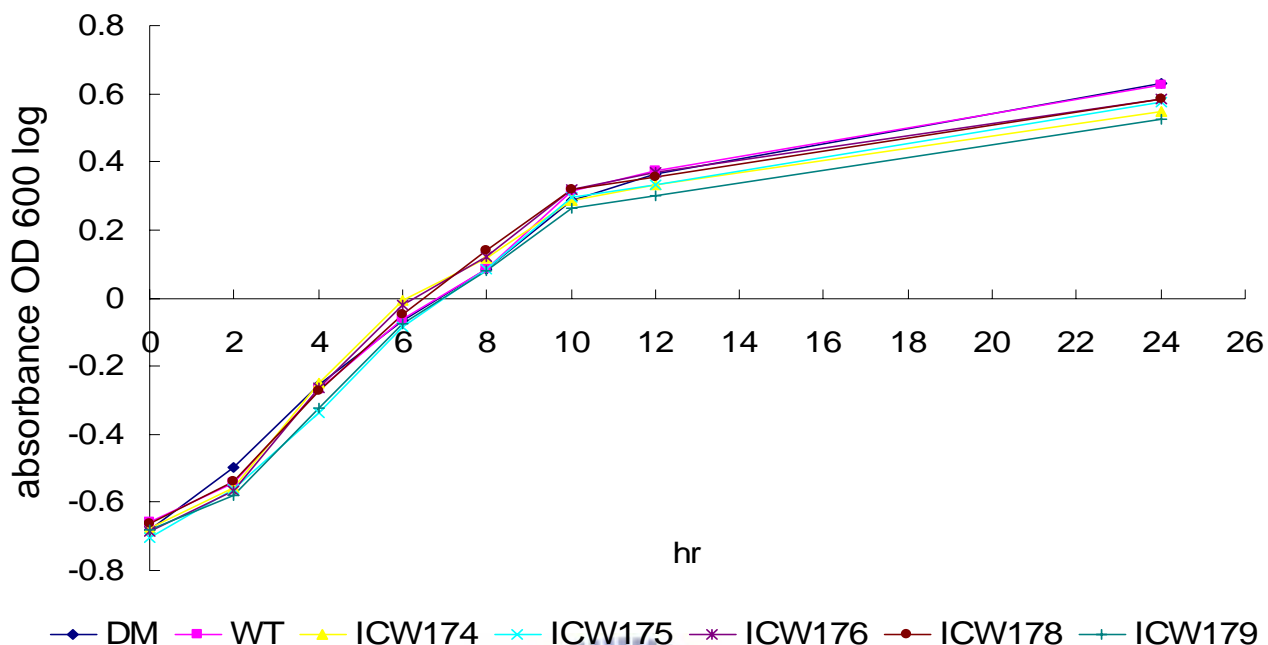


Time(hr)	DM	SC5314	ICW174	ICW175	ICW176	ICW178	ICW179
0	0.187	0.194	0.196	0.192	0.204	0.208	0.196
2	0.329	0.292	0.25	0.269	0.3	0.39	0.232
4	0.662	0.702	0.547	0.594	0.683	0.809	0.459
6	1.034	1.059	0.907	0.942	1.018	1.146	0.804
8	2.296	2.718	2.118	2.378	2.51	2.65	2.256
10	2.838	2.79	2.798	2.856	2.916	2.886	2.726
12	2.866	2.98	2.89	2.964	3.068	3.088	2.976
24	4.796	5.396	5.404	5.028	5.368	5.248	5

WT-SC5314  
 ICW174(*lip4/lip4*)  
 ICW176(*lip6/lip6*)  
 ICW179(*lip9/lip9*)

DM-HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)  
 ICW175(*lip5/lip5*)  
 ICW178(*lip8/lip8*)

<B> SD broth



Time(hr)	DM	SC5314	ICW174	ICW175	ICW176	ICW178	ICW179
0	0.208	0.219	0.211	0.198	0.206	0.217	0.209
2	0.318	0.287	0.278	0.273	0.272	0.289	0.263
4	0.554	0.542	0.563	0.458	0.544	0.531	0.474
6	0.856	0.868	0.985	0.82	0.949	0.895	0.84
8	1.212	1.215	1.306	1.22	1.328	1.386	1.197
10	1.944	2.05	1.938	1.97	2.086	2.084	1.838
12	2.304	2.356	2.144	2.156	2.342	2.264	1.998
24	4.272	4.204	3.532	3.756	3.836	3.828	3.332

圖二十六、LIP4,5,6,8,9突變株在YPD以及SD培養液之生長曲線。

<A>之分布圖是比較各菌株在YPD培養液轉養0~24小時的生長。

<B>之分布圖是比較各菌株在SD培養液轉養0~24小時的生長。

菌株分別為：破壞菌株HLC54、野生株SC5314、破壞菌株ICW174

(*lip4::ARG4/lip4::URA3*)、破壞菌株ICW175

(*lip5::ARG4/lip5::URA3*)、破壞菌株ICW176

(*lip6::ARG4/lip6::URA3*)、破壞菌株ICW178

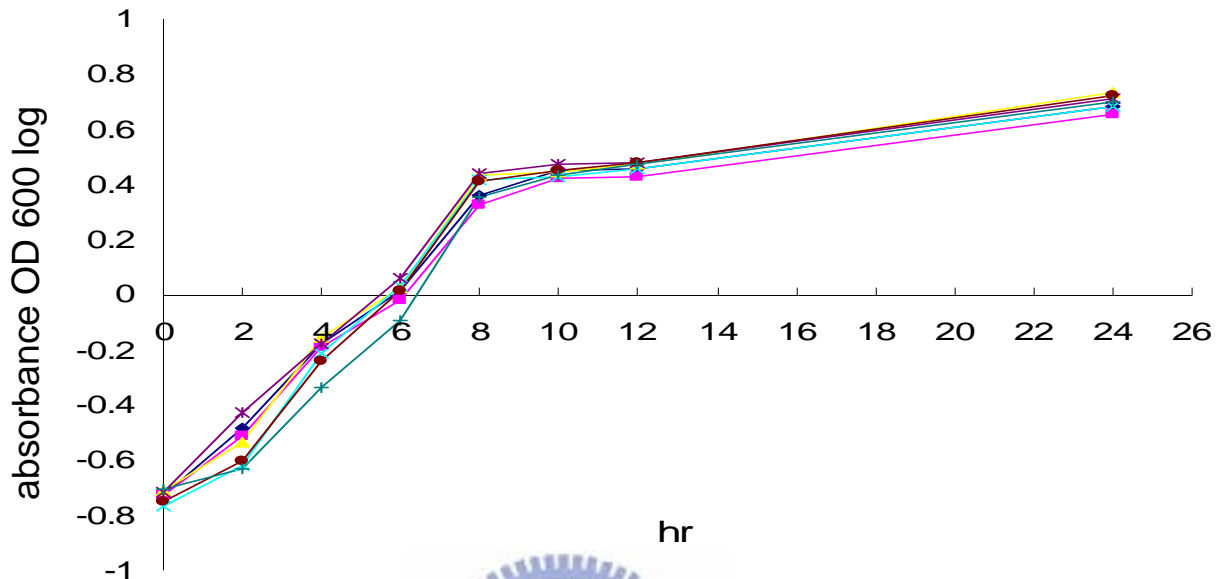
(*lip8::ARG4/lip8::URA3*)、破壞菌株ICW179

(*lip9::ARG4/lip9::URA3*)。折線圖下方標示菌株的編號、

圖例符號、名稱。

# Growth curve of different *LIP9* construction strains

## <A> YPD broth



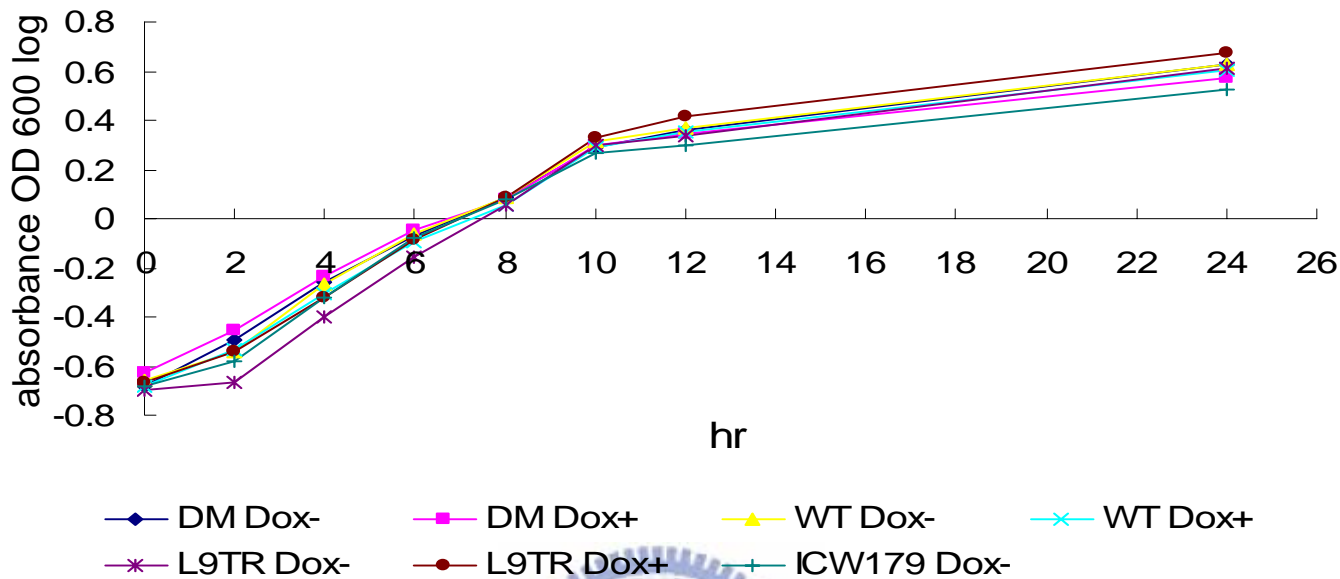
◆ DM Dox-      ■ DM Dox+      ▲ WT Dox-      × WT Dox+  
✱ ICW181 Dox-      ● ICW181 Dox+      + ICW179 Dox-

Time(hr)	DM (Dox-)	DM (Dox+)	SC5314 (Dox-)	SC5314 (Dox+)	ICW181 (Dox-)	ICW181 (Dox+)	ICW179
0	0.187	0.187	0.194	0.171	0.193	0.178	0.196
2	0.329	0.309	0.292	0.241	0.375	0.248	0.232
4	0.662	0.642	0.702	0.611	0.666	0.573	0.459
6	1.034	0.952	1.059	1.072	1.151	1.033	0.804
8	2.296	2.12	2.718	2.601	2.742	2.584	2.256
10	2.838	2.63	2.79	2.68	2.974	2.818	2.726
12	2.866	2.664	2.98	2.862	3.01	3.028	2.976
24	4.796	4.508	5.396	4.832	5.164	5.248	5

**WT-SC5314**  
**ICW181 (*lip9/LIP9::TR::URA3*)**

**DM-HLC54(*cph1/cph1 efg1/efg1*)**  
**ICW179(*lip9/lip9*)**

<B> SD broth



Time(hr)	DM (Dox-)	DM (Dox+)	SC5314 (Dox-)	SC5314 (Dox+)	ICW181 (Dox-)	ICW181 (Dox+)	ICW179
0	0.208	0.237	0.219	0.209	0.201	0.216	0.209
2	0.318	0.349	0.287	0.292	0.216	0.286	0.263
4	0.554	0.586	0.542	0.491	0.4	0.476	0.474
6	0.856	0.903	0.868	0.8	0.703	0.814	0.84
8	1.212	1.206	1.215	1.13	1.14	1.22	1.197
10	1.944	1.998	2.05	1.952	1.988	2.128	1.838
12	2.304	2.202	2.356	2.274	2.16	2.582	1.998
24	4.272	3.768	4.204	4.04	4.1	4.724	3.332

圖二十七、LIP9突變株在YPD以及SD培養液之生長曲線。

<A>之折線圖是比較各菌株在YPD轉養0~24小時的生長。

<B>之折線圖是比較各菌株在SD轉養0~24小時的生長。

菌株分別為：破壞菌株HLC54、野生株WT SC5314、已置入TR promoter之ICW181 (*lip9::ARG4/LIP9::TR- LIP9-URA3*)以及菌株ICW179 (*lip9::ARG4/lip9::URA3*)。折線圖下方標示菌株的編號、圖例符號、名稱和是否加入doxycycline (濃度為：20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。



In YPD agar 30°C

DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW174  
*efg1/efg1* SC5314 *lip4/lip4*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW175  
*efg1/efg1* SC5314 *lip5/lip5*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW176  
*efg1/efg1* SC5314 *lip6/lip6*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW178  
*efg1/efg1* SC5314 *lip8/lip8*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW181  
*efg1/efg1* SC5314 *lip9/LIP9*



Dox-

DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW179  
*efg1/efg1* SC5314 *lip9/lip9*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW181  
*efg1/efg1* SC5314 *lip9/LIP9*



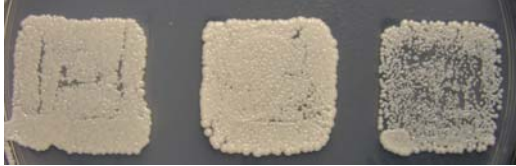
Dox +

Doxycycline concentration : 20µg / ml

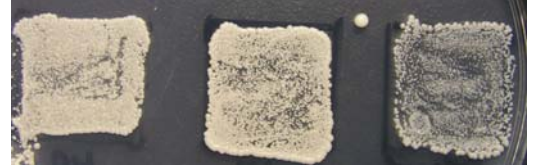
圖二十八、菌株在YPD培養基培養三天之生長情形。  
 圖上方表示不同基因型之菌株，圖左方標示是否添加 doxycycline (濃度為：20 µg / ml)

In SD agar 30°C

DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW174  
*efg1/efg1* SC5314 *lip4/lip4*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW175  
*efg1/efg1* SC5314 *lip5/lip5*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW176  
*efg1/efg1* SC5314 *lip6/lip6*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW178  
*efg1/efg1* SC5314 *lip8/lip8*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW181  
*efg1/efg1* SC5314 *lip9/LIP9*



DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW179  
*efg1/efg1* SC5314 *lip9/lip9*



Dox-

DM-HLC54  
*cph1/cph1* WT ICW181  
*efg1/efg1* SC5314 *lip9/LIP9*



Dox +

Doxycycline concentration : 20  $\mu$ g / ml

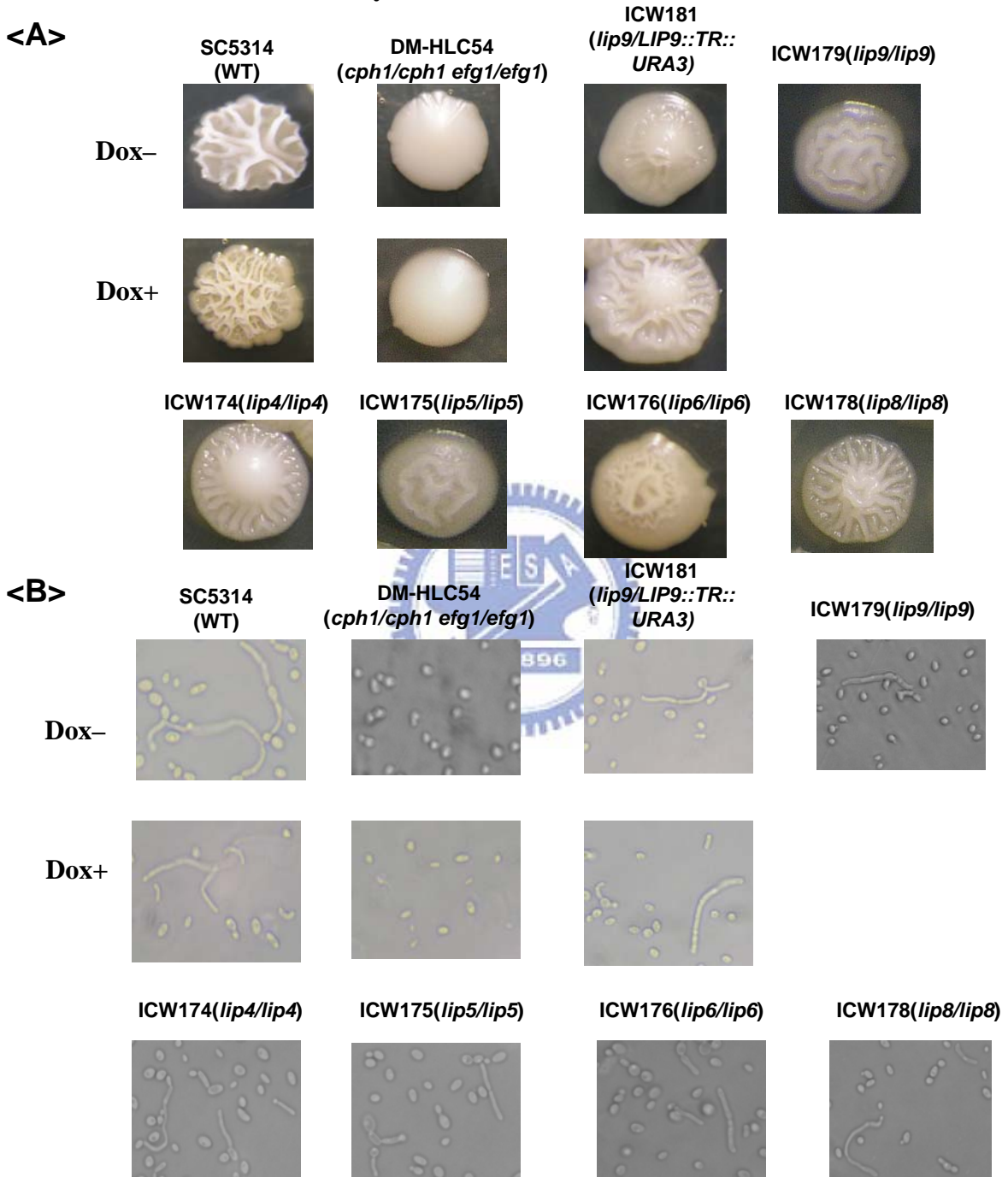
圖二十九、 菌株在SD培養基培養三天之生長情形。

圖上方表示不同基因型之菌株，圖左方標示是否添加 doxycycline (濃度為：20  $\mu$ g / ml)。

# Colony Morphology

YPD agar with 4% goat serum  
incubate at 37°C for 3 days

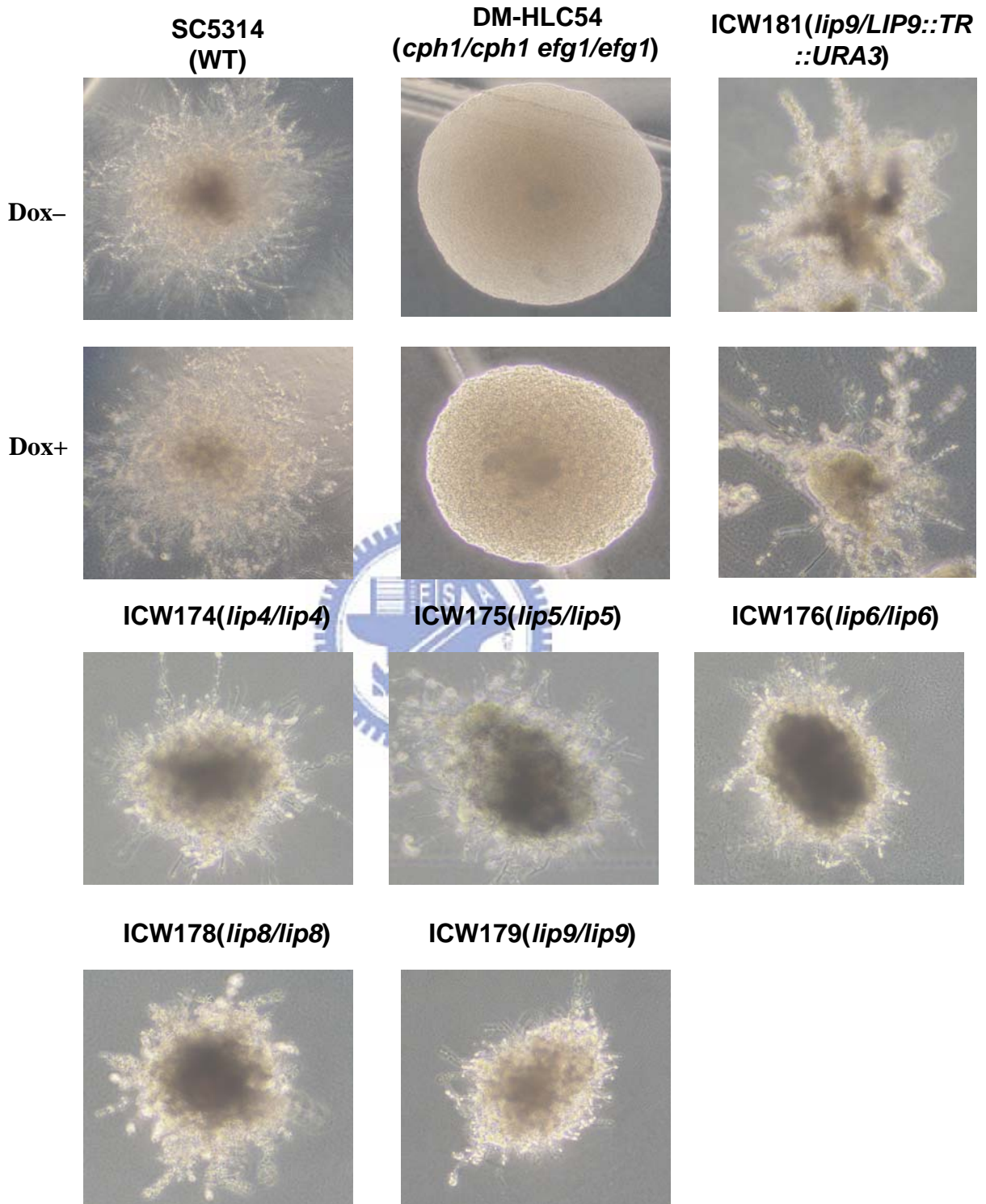
Doxycycline concentration : 20 µg / ml



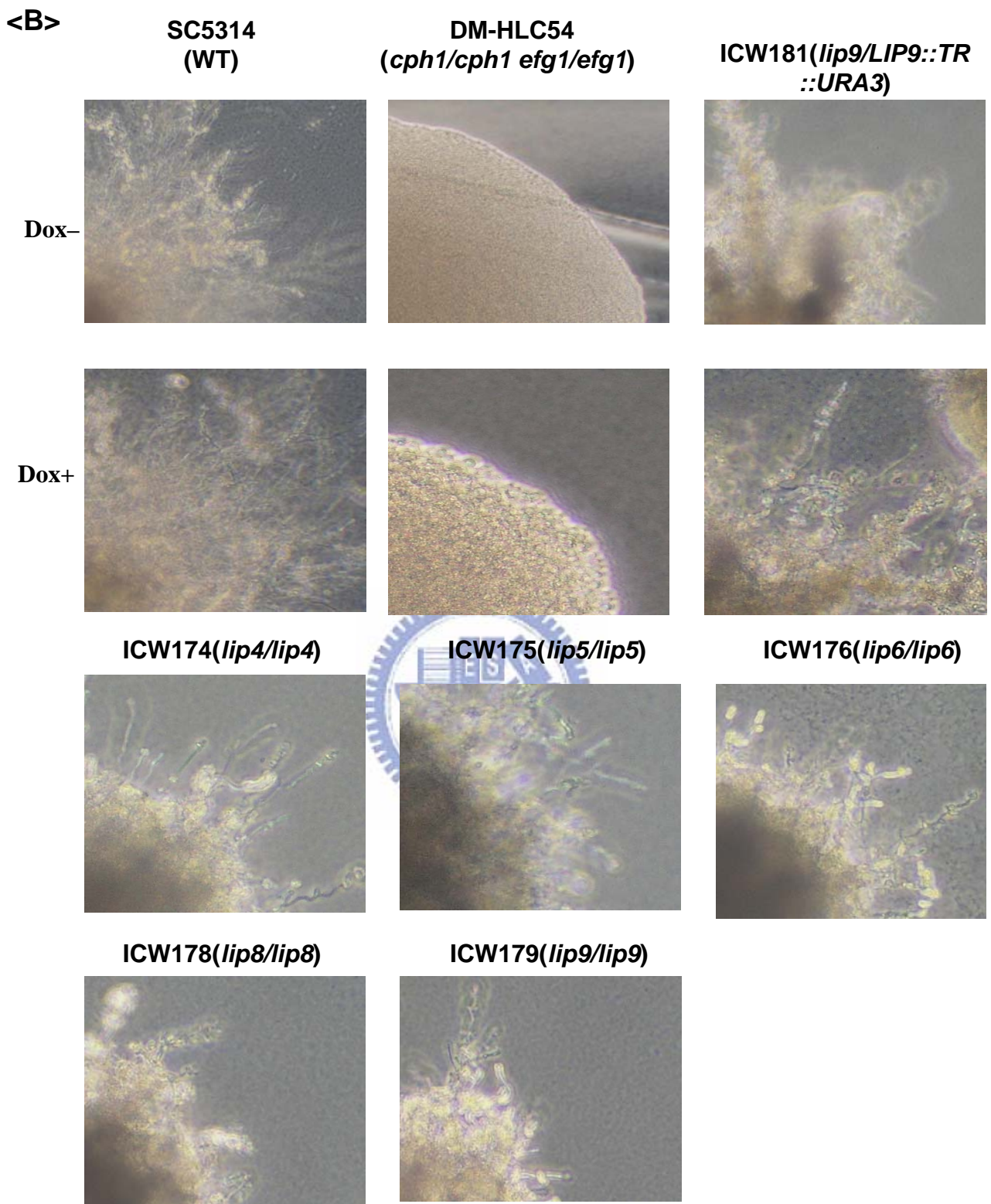
圖三十、在含山羊血清的YPD固態培養基之生長。圖上方表示不同基因型之菌株，圖左方標示有無加入doxycycline。37°C下培養三天<A>為單一菌落之型態。<B>是於倒立式顯微鏡下觀察<A>中之單一菌落的細胞型態。

# Colony Morphology on Bacto serum agar

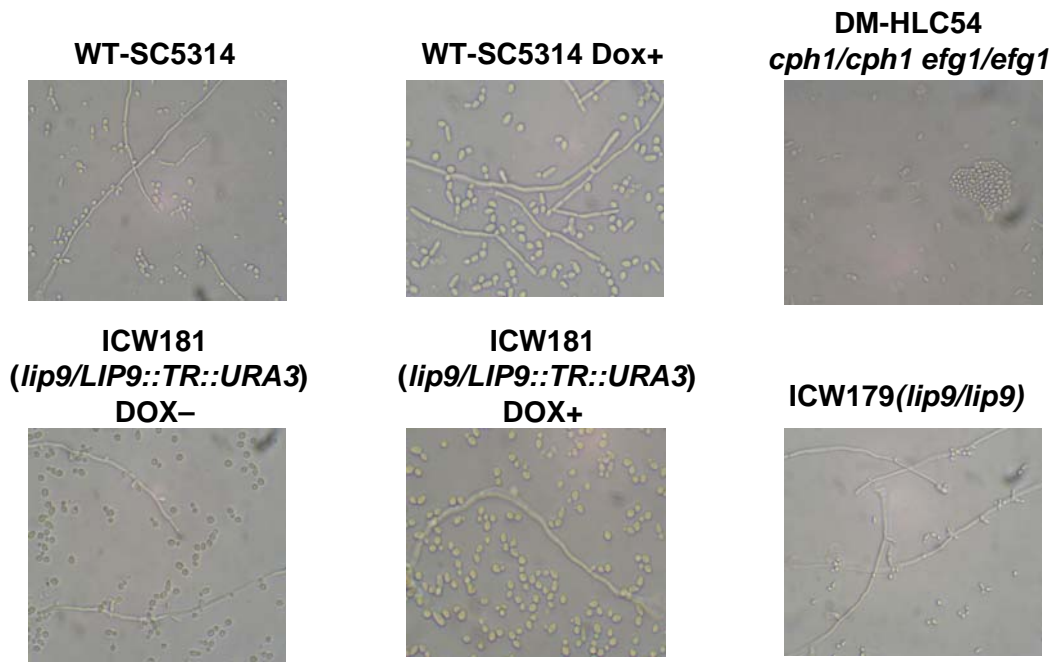
<A>



2% Bacto agar with 4% goat serum incubate at 37 °C for 7 days  
Doxycycline concentration : 20 µg / ml

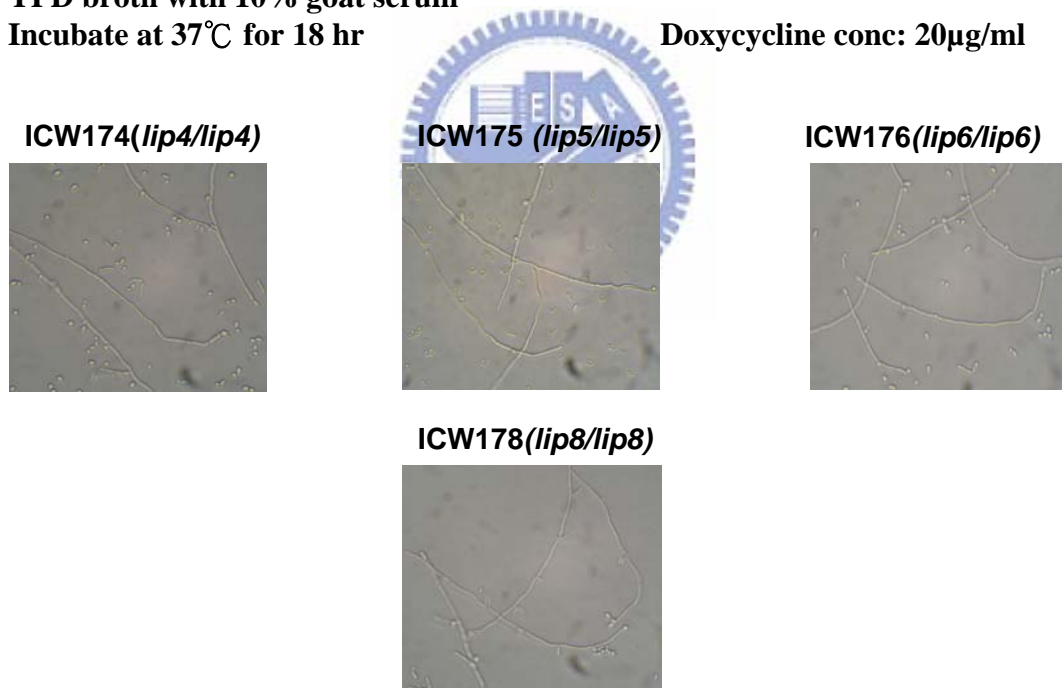


圖三十一、在含山羊血清的Bacto agar培養基之菌落形態。  
 將菌落培養在含4% 血清之2% Bacto agar，置於 37 °C  
 培養七天。<A>圖為單一菌落的型態，<B>圖為局  
 部放大的圖像。



**YPD broth with 10% goat serum  
Incubate at 37°C for 18 hr**

**Doxycycline conc: 20µg/ml**



圖三十二、在含山羊血清之YPD培養液之生長。

圖上方表示不同基因型之菌株以及是否加入doxycycline (濃度為：20 µg / ml)。

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。

# Germ tube assay

YPD broth with no serum  
Incubate at 30°C for 2.5hr

Doxycycline conc: 20µg/ml

<A>

WT-SC5314 Dox-



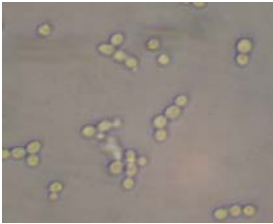
WT-SC5314 Dox+



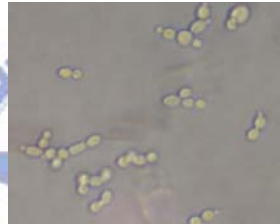
DM-HLC54  
*cph1/cph1 efg1/efg1*



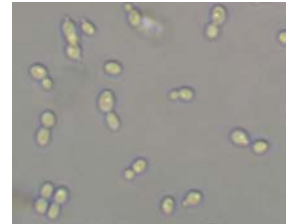
ICW181  
(*lip9/LIP9::TR::URA3*)  
DOX-



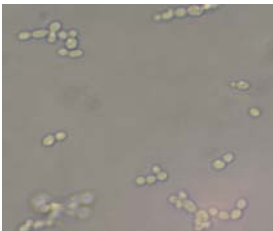
ICW181  
(*lip9/LIP9::TR::URA3*)  
DOX+



ICW179(*lip9/lip9*)



ICW174(*lip4/lip4*)



ICW175 (*lip5/lip5*)



ICW176(*lip6/lip6*)



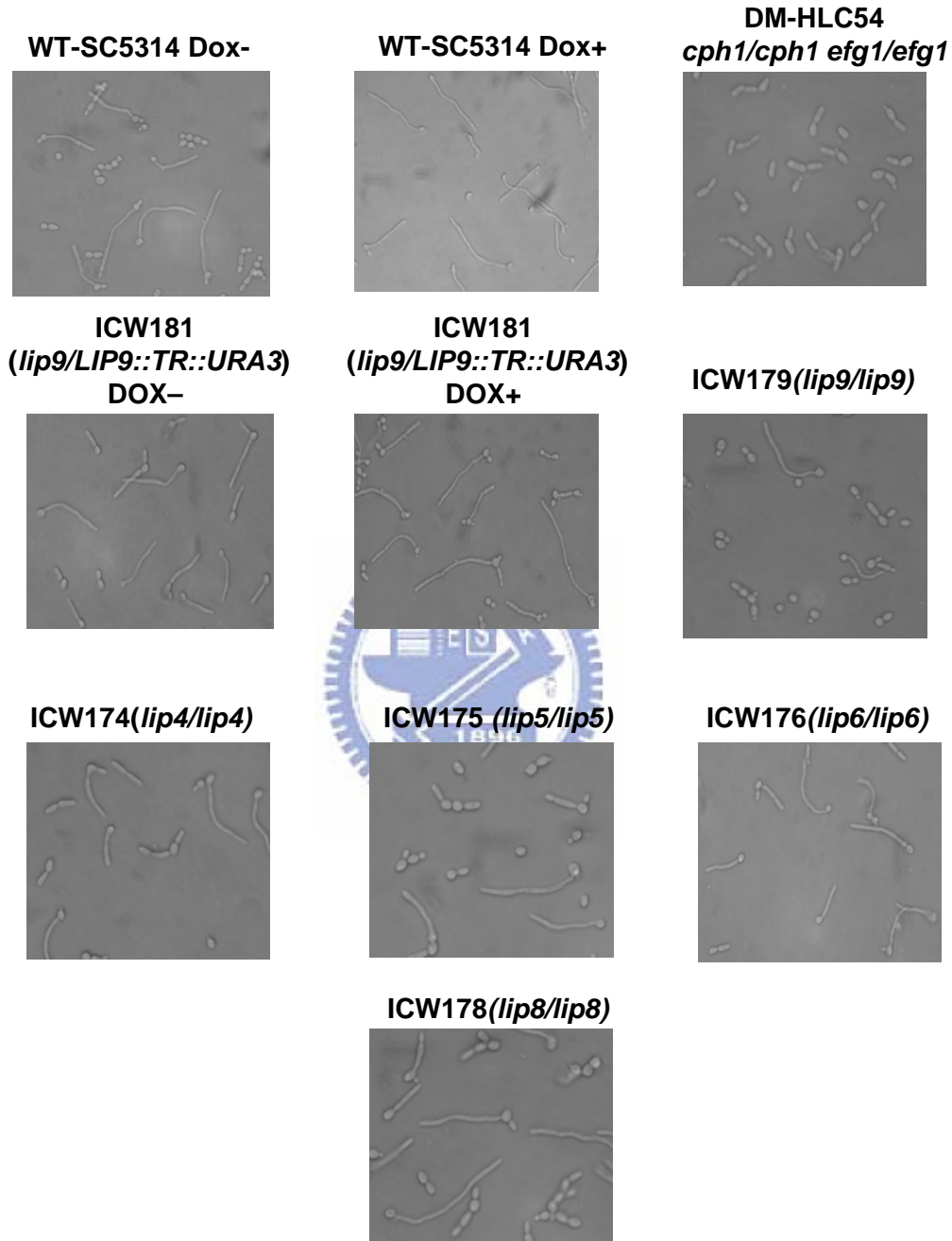
ICW178(*lip8/lip8*)



YPD broth with 10% goat serum  
Incubate at 37°C for 2.5hr

Doxycycline conc: 20µg/ml

<B>



圖三十三、芽管試驗(germ tube assay)。

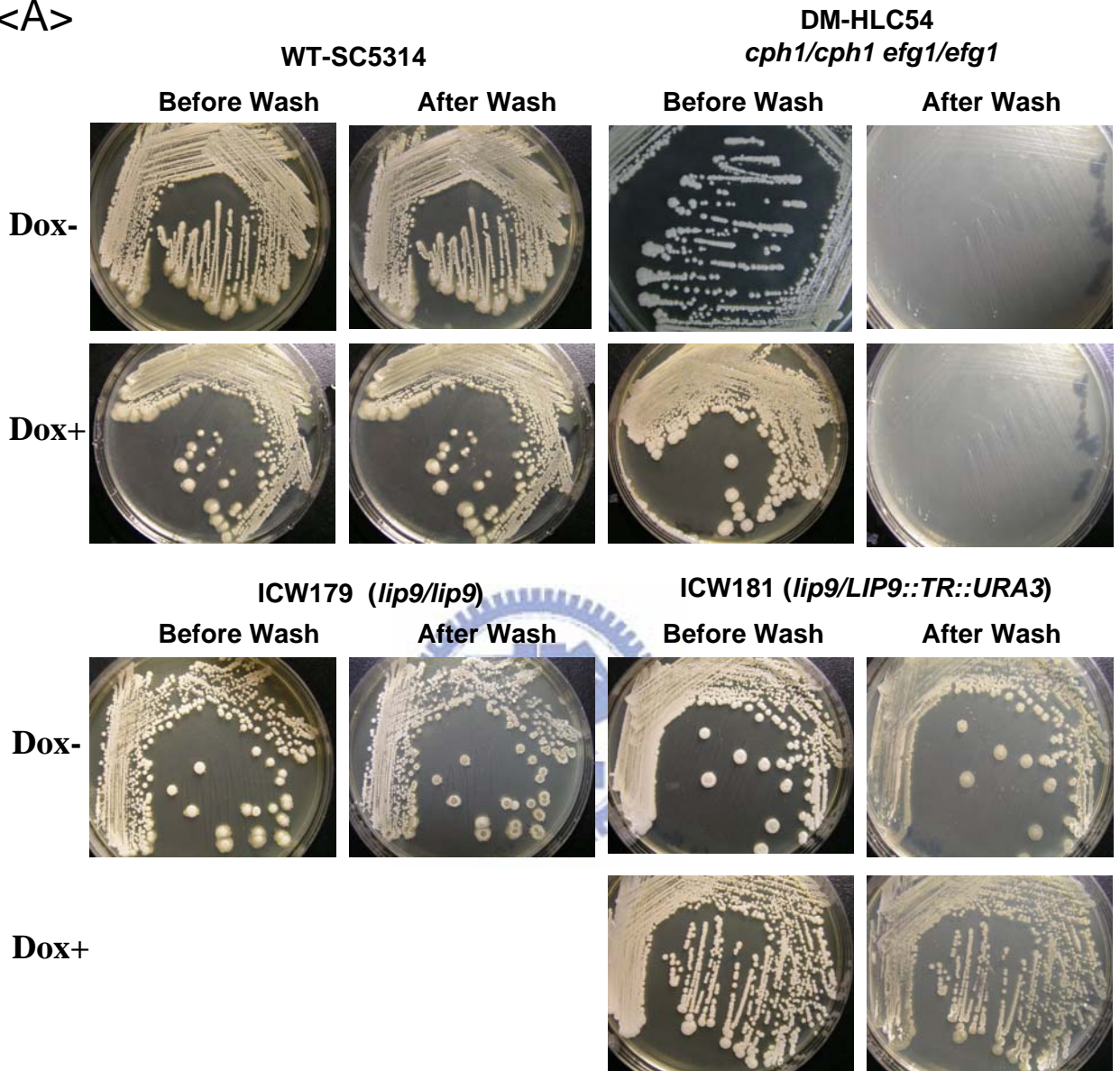
圖上方表示不同基因型之菌株以及是否加入doxycycline  
(濃度為：20µg/ml)。以SC5314、HLC54作為正負對照

，將菌落接種於<A>不含山羊血清之YPD培養液中，於30°C  
反應二點五小時<B>含10%山羊血清之YPD培養液中，於37°C  
反應二點五小時，進行芽管試驗。



# In Solid Spider medium 37 °C

<A>



solid Spider plate with no serum  
Incubate at 37°C for 7 days

Doxycycline conc: 20µg/ml

**WT-SC5314**

**Before Wash**



**After Wash**



**DM-HLC54**  
*cph1/cph1 efg1/efg1*

**Before Wash**



**After Wash**



**ICW174 (*lip4/lip4*)**

**Before Wash**



**After Wash**



**ICW175 (*lip5/lip5*)**

**Before Wash**



**After Wash**



**ICW176 (*lip6/lip6*)**

**Before Wash**



**After Wash**



**ICW178 (*lip8/lip8*)**

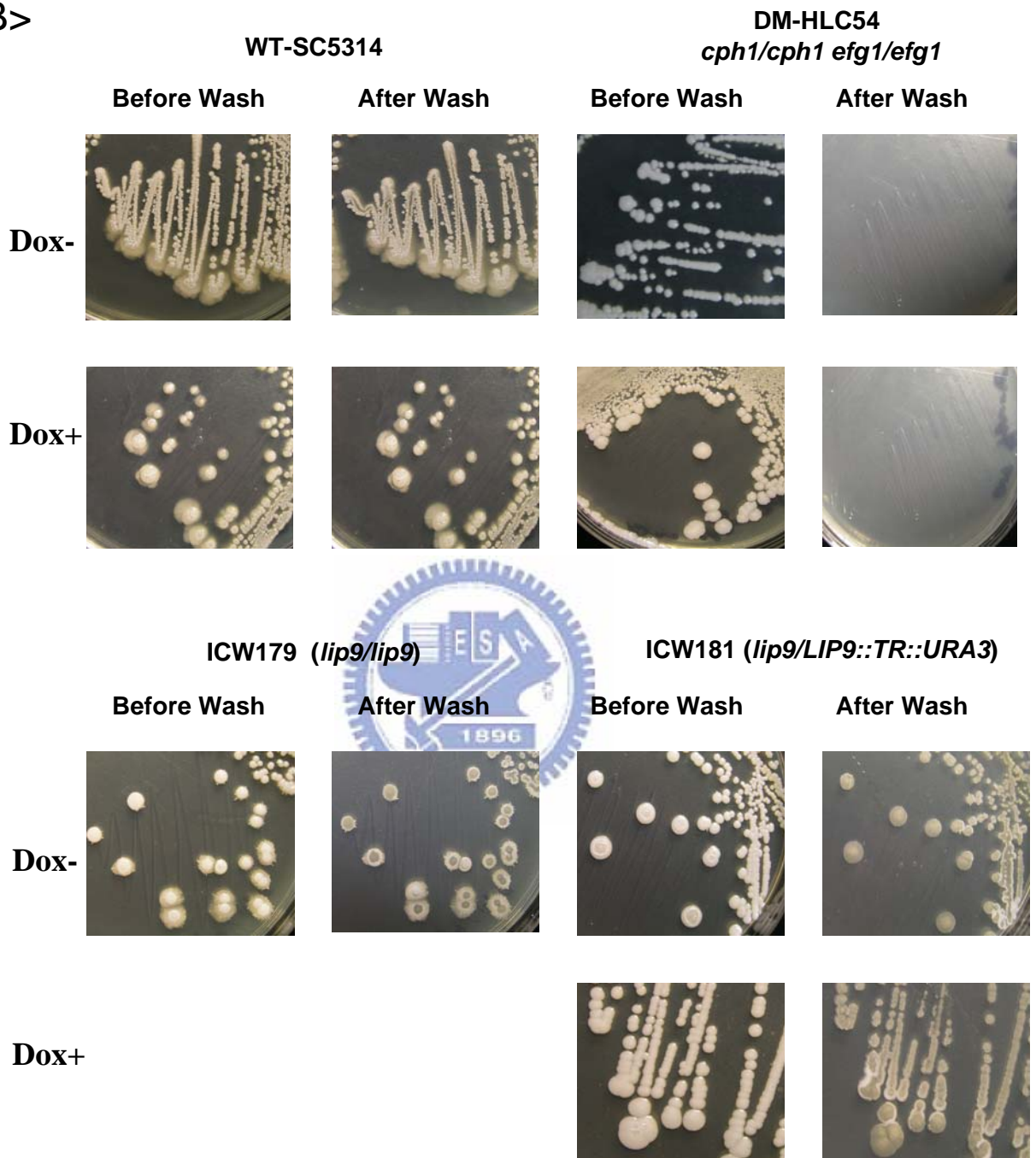
**Before Wash**

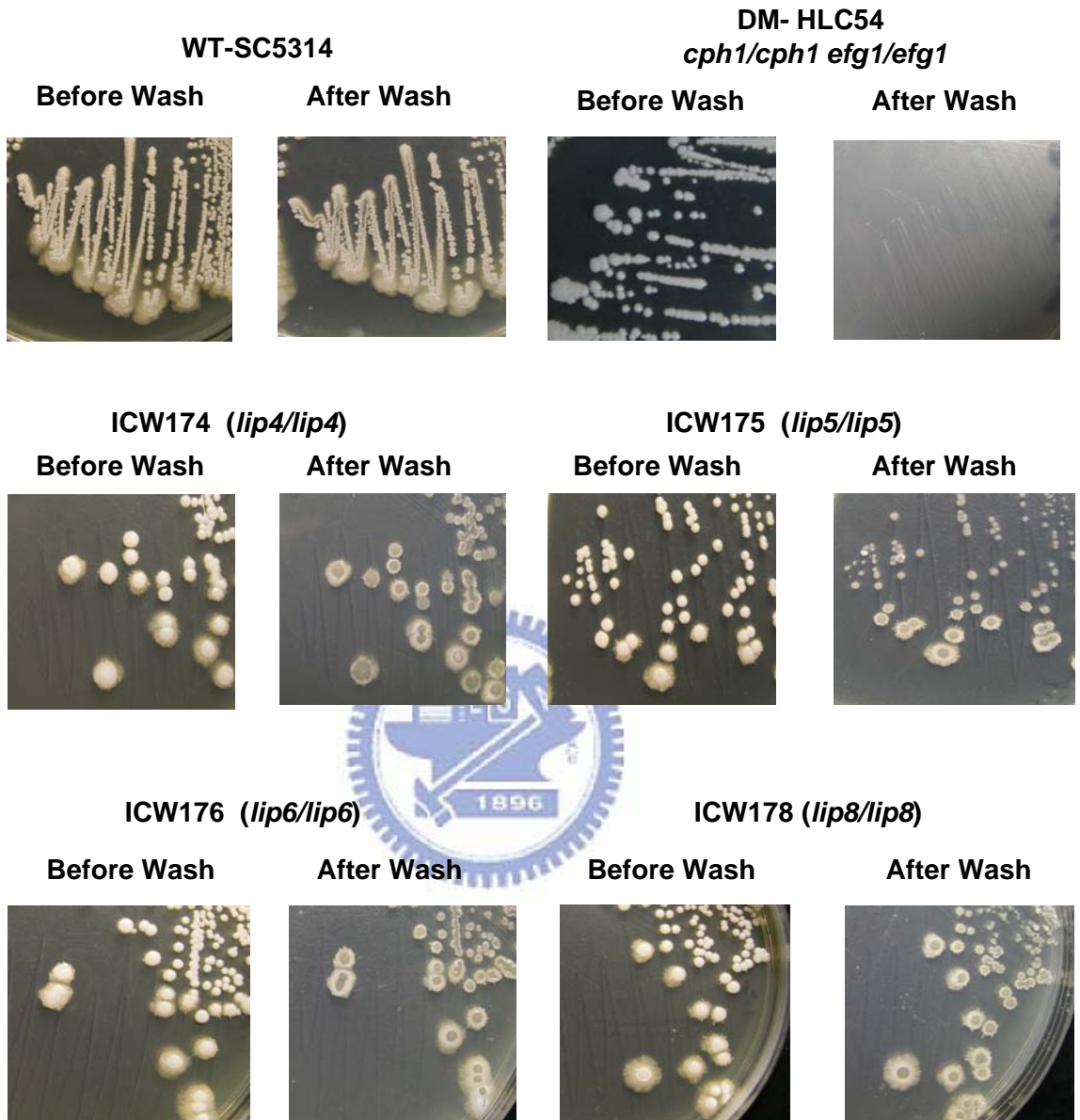


**After Wash**

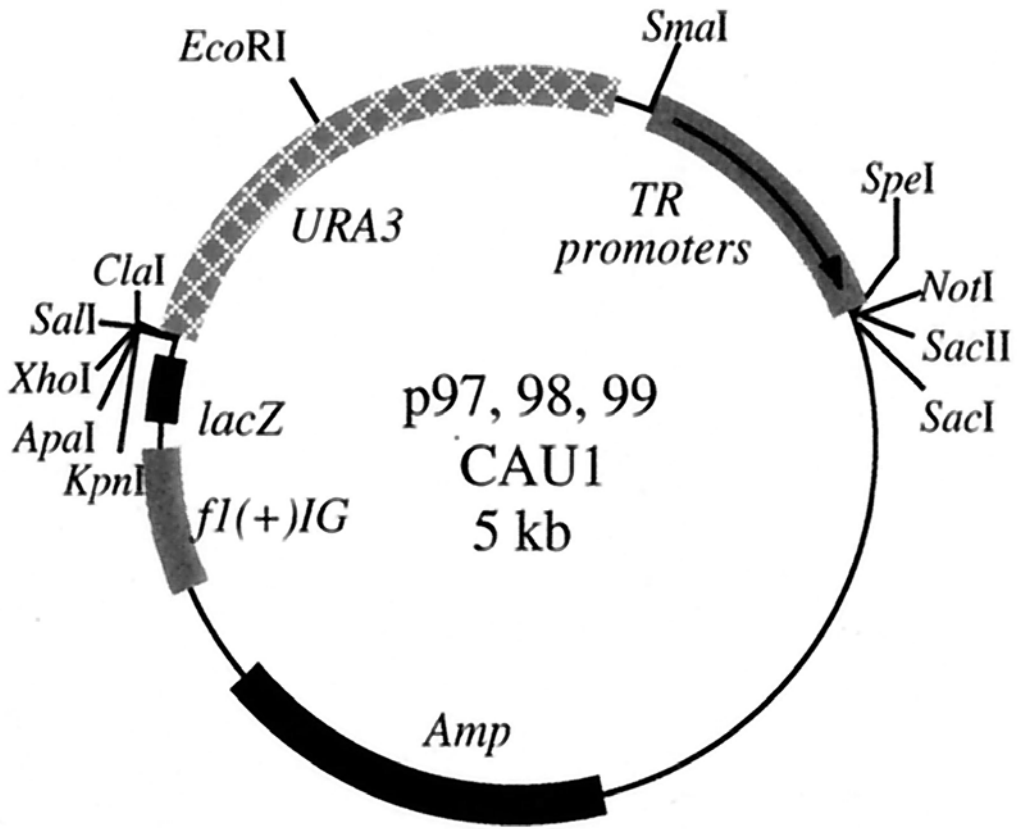


<B>



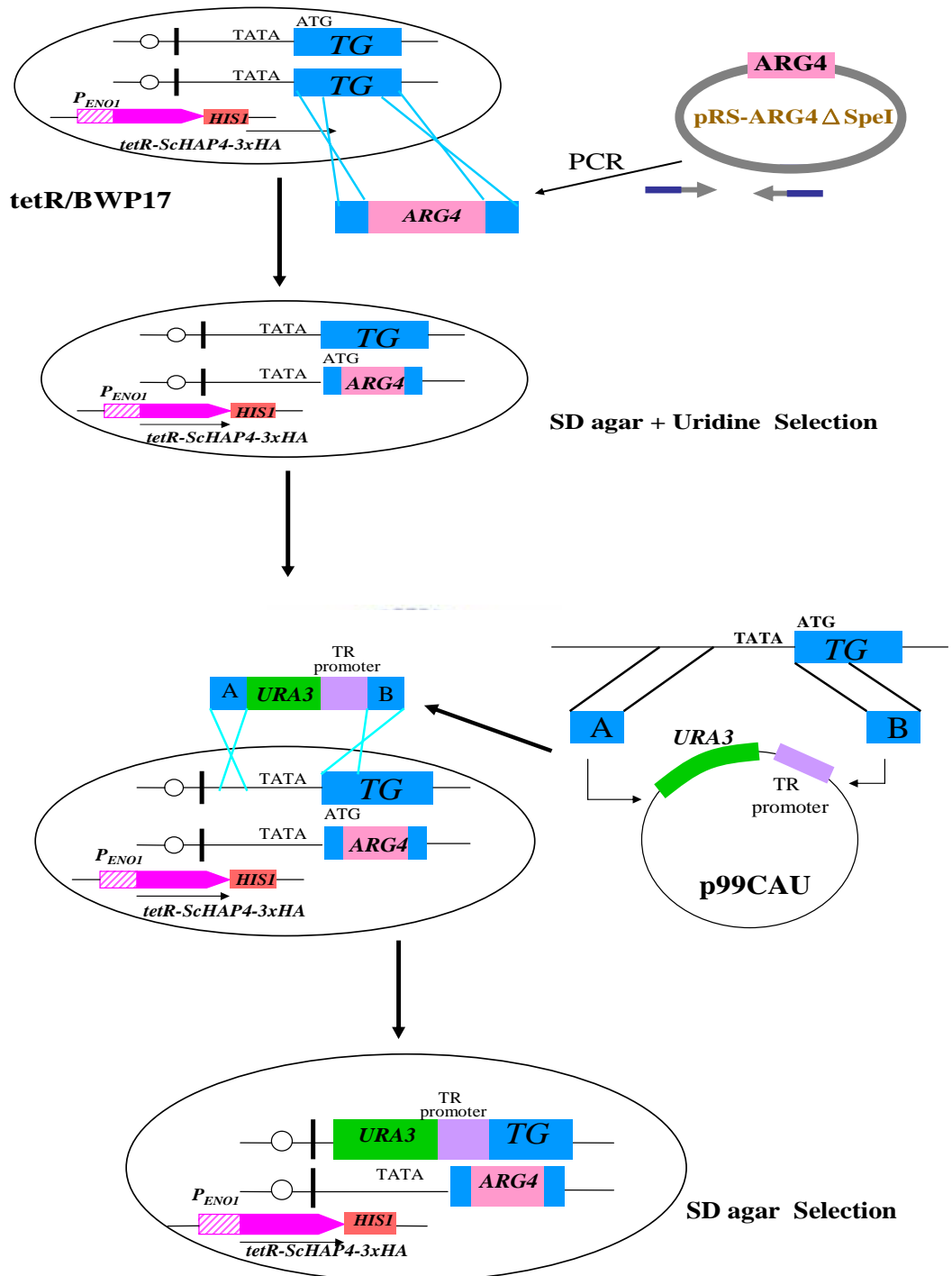


圖三十四、在solid Spider培養基上進行侵犯力試驗(invasion assay)。圖中表示不同基因型之菌株在加入doxycycline (濃度為：20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。以SC5314、HLC54作為正負對照，Before Wash為未沖洗時，After Wash為水流沖洗後之結果。<A>為遠觀plate之整體侵犯力情形，<B>為近距離觀察菌落之侵犯力



附圖一、p99CAU質體示意圖  
 p99CAU為已含有TR promoter及URA3標記之質體。

# Tetracycline - Regulatable (TR) System



附圖二、建構四環黴素調控表現系統 (Tetracycline-regulatable expression system, TR system) 之示意圖。

BWP17/*tetR* 為已含有驅動 *tet R* 表現之白色念珠菌株。TG 表示欲研究之目標基因 (target gene)。

*pRS-ARG4*  $\Delta$  *SpeI* 為含篩選標誌 *ARG4* 之質體。

*p99CAU* 為已含有 TR promoter 及 *URA3* 標記之質體。