

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

熱帶念珠菌失去異質合子性導致 5-Flucytosine 抗藥性及
鑑別 *CaNDT80* 活化區重要胺基酸之研究

**Loss of heterozygosity contributes to the resistance to
5-flucytosine in *Candida tropicalis* and the study of
identifying the crucial amino acids in the activation
domain of *CaNDT80***

研究生：吳佳真

指導教授：楊昀良博士

中華民國九十八年七月

熱帶念珠菌失去異質合子性導致 5-Flucytosine 抗藥性及
鑑別 *CaNDT80* 活化區重要胺基酸之研究

**Loss of heterozygosity contributes to the resistance to
5-flucytosine in *Candida tropicalis* and the study of
identifying the crucial amino acids in the activation
domain of *CaNDT80***

研究生：吳佳真

Student: Chia-Chen Wu

指導教授：楊昶良 博士

Adviser: Dr. Yun-Liang Yang

A Thesis Submitted to Institute of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
in
Biological Science and Technology
July 2009
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年七月

中文摘要

實驗室先前在 *C. tropicalis* 臨床菌株的 5-flucytosine (5-FC) 感受性測試中分離到抗藥衍生株。根據前人研究，破壞 pyrimidine 生合成途徑任何一個蛋白質，或是影響其調控都會導致 5-FC 抗藥性。於是將 parental strain 與其抗藥衍生株進行相關抗藥基因 *FCY1*、*FCY2*、*FUR1* 和 *URA3* 序列分析，發現有些 parental strains 的 *FCY2* 為異質合子型，但其抗藥衍生株卻變成同質合子型。因此更進一步以 *SAT1* flipper 建構 *FCY2* 同質合子置換株及單股缺陷突變株，並證實失去異質合子性與 5-FC 抗藥性發生有關。但 *FCY2* 失去異質合子性所造成的 5-FC 抗藥有兩個可能原因，第一，Fcy2p 第 91 個胺基酸由 Met 變為 Ile；第二，promoter 序列的變異使 *FCY2* mRNA 表現量下降。

本研究第二部分與排藥幫浦 *CDR1* 相關，文獻指出其大量表現與 azoles 抗藥性相關，然而其調控機制目前瞭解並不多。實驗室先前於 *C. albicans* genomic DNA library 中篩選到 *CaNDT80* 為 *CDR1* 可能的正向轉錄因子。經由序列比對 *CaNDT80* 與 *S. cerevisiae* 的 *ScNDT80* 為同源基因，它們的 DNA 結合區有 35% 相同度和 53% 相似度，有趣的是活化區卻沒有任何相似性，這是一段全新的序列，沒有人研究過它的功能。因此利用 error-prone PCR 在 *CaNDT80* 活化區產生隨機突變，建構成一個 library，想要找出哪些胺基酸對於調控 *CDR1* 扮演重要的角色。為了達到這個目標，於是分別建構了以 chloramphenicol 及 kanamycin 為報導基因的篩選性質體的 clones，用來剔除 library 中帶有 nonsense 及 frameshift mutations 的 clones，以利日後的研究。初步測試顯示於適當濃度的抗生素培養基中，此二質體均具有篩選功能，可作為之後的應用。

Abstract

In the laboratory, *C. tropicalis* clinical isolates were selected for derivatives resistant to 5-flucytosine (5-FC). Researchers have previously shown that disruption of the function of any protein involved in pyrimidine biosynthetic pathway or regulation could contribute to 5-FC resistance. Accordingly, four genes, *FCY1*, *FCY2*, *FUR1* and *URA3* involved in pyrimidine biosynthetic pathway was sequenced. The result revealed that some strains were heterozygous in *FCY2* encoding purine cytosine permease (PCP), whereas their drug-resistant derived strains were homozygous. I further used the *SATI* flipper to generate homozygous strains and single allele mutants in *FCY2* and demonstrated that the 5-FC resistance was associated with loss of heterozygosity (LOH) in *C. tropicalis*. According to the result, there are two possibilities of LOH in *FCY2* contributing to 5-FC resistance. One was that the change of M91I in PCP was affecting the function and the other was that *FCY2* mRNA expression was decreased in the resistant allele.

My second project was to study the regulation of drug resistance. Previously in the laboratory, a *C. albicans* genomic DNA library screening identified *CaNDT80* as a positive regulator of *CDR1*, an efflux pump for the azole resistance in *C. albicans*. CaNdt80p is 672 amino acids in length and homologous to ScNdt80p (592 aa) in *S. cerevisiae*. There are 35% identity and 53% similarity between their DNA-binding domains. Interestingly, their activation domains share no similarity. The sequence of the activation domain of CaNdt80p is novel and has not yet been characterized.

Hence, I have conducted a study to construct the library containing randomly mutated DNA sequences of the activation domain of *CaNDT80* by error-prone PCR to identify important residues for the function and also constructed two plasmids using chloramphenicol and kanamycin, separately, as reporters to eliminate the undesired nonsense and frameshift mutations in the library for future studies. According to testing results, reporter plasmids are potential tools with selective functions in appropriate conditions.

誌 謝

沒想到一轉眼兩年就過去了，能夠順利畢業要感謝的人很多。首先感謝指導教授楊昀良老師和國衛院羅秀容老師，願意收留我這個沒有實驗室經驗的新手進實驗室，兩年來在研究上細心指導與寶貴意見，啟發我獨立思考和解決問題的能力，使我獲益良多。另外，擔任口試委員的彭慧玲老師，給我許多論文上的建議，使本論文能夠更完善。由於上述三位老師的提攜，讓我順利取得學位，不勝感激。

當然實驗室的伙伴是平時支持我努力的動力。記得初到國衛院人生地不熟，惠蒼學姐幫我找落腳處和帶我熟悉環境，使我倍感窩心，學姐送我的神秘小禮物，讓我在最後一個月實驗若有神助。還有超短程交通車司機既準媽媽向寧、活潑開朗的美麗準新娘子瑋婷，和保養得宜完全看不出生過小孩的琬立，沒事和你們閒聊是我最大的樂趣。才不會忘記你們的臨床四寶：號稱有實驗神之手的大總管誌偉、夜夜笙歌總是”我是說...”的啟宏、很愛 murmur 的 knockout king 志兆，和廚藝精湛又賢慧的德斌，謝謝你們在我實驗有挫折的時候幫忙想辦法，平時又有娛樂的功能，讓我的研究生生活多了很多歡笑。交大實驗室的刻苦耐勞之妳一定會成功的淑萍、溫柔婉約的淑貞、羽球球友旻秀、老是被我調侃但脾氣好好的敏書、開朗大方的阿毛、擁有自我風格的小倩、實驗室好媽媽兼口試戰友的馨儀、英文一級棒又是團購好咖的妍寧、實驗室我最美的阿澎、直率爽朗的阿大、妹妹的老爸重延、可愛帶點迷糊的禎憶、認真好學的幸璇，以及在新竹認識的朋友們，因為有你們使隻身在異地求學的我不寂寞。

最後，我要感謝我的家人，因為你們的支持和鼓勵，讓我無後顧之憂，全心全意的完成學業，在此謹將此論文獻給各位，表達我無限的感謝之意。

目 錄

	頁數
中文摘要	i
英文提要	ii
誌謝	iii
目錄	iv
表目錄	vii
圖目錄	viii
一、 緒論 I.....	1
1.1 Candidiosis 和 <i>Candida tropicalis</i> 介紹.....	1
1.2 常用臨床抗真菌藥物.....	2
1.3 5-flucytosine 抗藥分子機制先前研究.....	5
1.4 論文研究目的 I.....	5
二、 材料 I.....	7
2.1 菌株.....	7
2.2 質體.....	8
2.3 引子 for <i>C. tropicalis</i>	8
2.4 藥品試劑.....	10
2.5 緩衝溶液.....	11
2.6 培養液和培養基.....	11
2.7 儀器設備.....	12
三、 方法 I.....	14
3.1 DNA 方法.....	14
3.1.1 大腸桿菌質體純化.....	14
3.1.2 洋菜膠內 DNA 萃取和 PCR 產物純化.....	14
3.1.3 萃取真菌 genomic DNA.....	14
3.1.4 聚合酶連鎖反應.....	14
3.1.5 DNA 黏合反應.....	15
3.1.6 TA cloning.....	15
3.2 <i>E. coli</i> 轉形反應-熱休克法.....	15
3.2.1 製備 <i>E. coli</i> 轉形細胞.....	15
3.2.2 轉形反應.....	16
3.3 <i>Candida</i> 轉形反應-電穿孔法.....	16
3.3.1 製備 <i>Candida</i> 轉形細胞.....	16
3.3.2 轉形反應.....	16
3.4 CLSI broth microdilution method.....	17

四、	結果 I.....	20
4.1	以 broth microdilution 分析 <i>Candida tropicalis</i> 的 parental strain 和其抗藥衍生株之間對於 5-flucytosine 的感受性差異.....	20
4.2	將有興趣組別的 <i>URA3</i> 、 <i>FUR1</i> 、 <i>FCY1</i> 、 <i>FCY2</i> 基因定序分析.....	21
4.3	挑選對 5-FC 非常敏感菌株定序 <i>FCY2</i> ORF 作為對照組.....	22
4.4	建構 <i>SAT1</i> flipper 所需質體 LOB319、LOB320、LOB321 及 LOB322.....	22
4.5	建構 <i>FCY2</i> (273G)/ <i>FCY2</i> (273G) 和 <i>FCY2</i> (273T)/ <i>FCY2</i> (273T) 的同質合子置換菌株.....	23
4.6	建構 <i>FCY2</i> (273G)/ <i>fcy</i> Δ 和 <i>FCY2</i> (273T)/ <i>fcy</i> Δ 的單股缺陷突變株.....	24
4.7	以 broth microdilution 分析 YM020291、同質置換菌株和單股缺陷突變株之間對 5-flucytosine 的感受性差異.....	24
五、	討論 I.....	25
5.1	<i>C. tropicalis</i> 臨床分離株對於 5-FC 抗藥探討.....	25
5.2	探討 <i>URA3</i> 、 <i>FUR1</i> 、 <i>FCY1</i> 、 <i>FCY2</i> 序列與不同物種間 5-FC 抗藥性的產生.....	25
5.3	Loss of heterozygosity 發生機制探究與抗藥性產生的關係.....	29
5.4	Purine-cytosine permease 在不同物種間對於抗藥性的相關研究和蛋白質相似度.....	30
5.5	其他可能牽涉 5-FC 抗藥機制討論.....	31
六、	緒論 II.....	32
6.1	<i>Candida albicans</i> 介紹.....	32
6.2	Azoles 類藥物抗藥分子機制.....	32
6.3	<i>Candida</i> drug resistance gene : <i>CDR1</i> 介紹.....	33
6.4	<i>CDR1</i> 的 cis-和 trans-acting factor.....	34
6.4.1	Cis-acting factor.....	34
6.4.2	Trans-acting factor.....	34
6.5	論文研究目的 II.....	36
七、	材料 II.....	37
7.1	菌株.....	37
7.2	質體.....	37

7.3	引子.....	38
7.4	藥品試劑.....	40
7.5	緩衝溶液.....	41
7.6	培養基和培養液.....	42
7.7	濾紙.....	43
7.8	儀器設備.....	43
八、	方法 II.....	44
8.1	易誤聚合酶連鎖反應.....	44
8.2	<i>E. coli</i> 轉形反應—電穿孔法 library scale.....	44
8.3	啤酒酵母轉形反應—LioAc method.....	44
8.3.1	製備啤酒酵母轉形細胞.....	44
8.3.2	轉形反應.....	45
8.4	β -galactosidase colony lift filter assay.....	45
8.5	從啤酒酵母中萃取質體 DNA 並轉形到 <i>E. coli</i>	46
九、	結果 II.....	47
9.1	建構 <i>CDR1</i> ₃₄₈ promoter 驅動 <i>lacZ</i> 為報導基因的啤酒 酵母 SLO121.....	47
9.2	以 site-directed mutagenesis 進行前人所篩選 <i>CaNDT80</i> 活化區的可能重要胺基酸突變，並以 β -galactosidase filter assay 測試.....	48
9.3	測試 error-prone PCR 在不同鎂離子濃度下合成錯誤 率.....	48
9.4	以 β -galactosidase filter assay 來篩選 library.....	49
9.5	建構篩選質體 LOB295 並測試.....	49
9.6	建構篩選質體 LOB324 和 LOB325 並測試.....	50
十、	討論 II.....	54
10.1	以 error-prone PCR 進行隨機突變探討.....	54
10.2	篩選質體 LOB295 結果討論.....	54
10.3	篩選質體 LOB324 和 LOB325 結果討論.....	56
十一、	結論.....	59
十二、	未來展望.....	60
十三、	參考文獻.....	62
附錄一	pyrimidine biosynthetic pathway in <i>Candida albicans</i>	120
附錄二	以 fusion PCR 建構 LOB280 示意圖.....	121

表目錄

	頁數
表一、 5-flucytosine broth microdilution 的 24 小時與 48 小時 MIC 整理.....	71
表二、 <i>FUR1</i> 定序結果整理.....	73
表三、 <i>FCY2</i> 定序結果整理.....	74
表四、 有 LOH 現象的六組 <i>FCY2</i> 和上下游各 500bp 定序結果整理.....	75
表五、 <i>CaNDT80</i> 活化區隨機突變 library 挑選其中 10 菌落定序結果.....	76
表六、 經由 β -galactosidase filter assay 篩選的 <i>CaNDT80</i> 活化區隨機突變 library 定序結果.....	77
表七、 測試篩選質體功能的 <i>CaNDT80</i> 活化區突變插入片段序列....	82



圖目錄

		頁數
圖一、	broth microdilution 48 小時 5-FC 藥盤照片.....	83
圖二、	YM020347、YM020715 及 YM020112 之 <i>URA3</i> 於核苷酸 791 的定序波峰圖.....	88
圖三、	有 LOH 現象的六組 <i>FCY2</i> ORF 於 273 nt 定序波峰圖....	89
圖四、	對 5-FC 非常敏感菌株定序 <i>FCY2</i> ORF 比對結果與定序波峰圖.....	91
圖五、	建構 <i>SAT1</i> flipper 所需的質體 LOB319、LOB320、LOB321 及 LOB322 示意圖.....	92
圖六、	LOB319 質體的序列比對和定序波峰圖.....	93
圖七、	LOB319、LOB320、LOB321 及 LOB322 限制內切酶圖譜.....	94
圖八、	以 <i>SAT1</i> flipper 建構同質合子置換株示意圖.....	95
圖九、	以 <i>SAT1</i> flipper 建構單股缺陷突變株示意圖.....	96
圖十、	以 PCR 確認 <i>SAT1</i> cassette 是否進入正確位子，和以限制酵素 <i>Bbs</i> I 確認菌株置換與突變情形.....	97
圖十一、	定序 YLO415、YLO416、YLO417 和 YLO418 上游區域比對結果及定序波峰圖.....	98
圖十二、	以 broth microdilution 分析同質合子置換株和單股缺陷突變株對 5-FC 感受性.....	100
圖十三、	<i>C. tropicalis</i> 、 <i>S. cerevisiae</i> 和 <i>C. albicans</i> 的 purine-cytosine permease 蛋白質序列比對.....	101
圖十四、	質體 LOB285 建構示意圖與限制酵素圖譜.....	103
圖十五、	SLO121 建構示意圖與轉形不同質體後 β -galactosidase 活性測試.....	104
圖十六、	<i>CaNDT80</i> 活化區可能重要胺基酸以 site-directed mutagenesis 突變定序結果.....	105
圖十七、	以 β -galactosidase filter assay 測試 <i>CaNDT80</i> 活化區的可能重要胺基酸突變是否對功能有影響.....	106
圖十八、	error-prone PCR 在不同鎂離子濃度下合成錯誤率.....	107
圖十九、	第三次以 β -galactosidase filter assay 篩選 <i>CaNDT80</i> 活化區隨機突變 library 轉形株結果.....	108
圖二十、	篩選質體 LOB295 設計圖與限制內切酶圖譜.....	110
圖二十一、	以 fusion PCR 進行 LOB137 序列突變之結果.....	112
圖二十二、	篩選質體 LOB324 和 LOB325 設計圖.....	113
圖二十三、	LOB324 和 LOB325 限制內切酶圖譜.....	115

圖二十四、於不同的培養基測試 LOB324 和 LOB325 的篩選功能...	116
圖二十五、於不同的培養基測試 LOB324 篩選功能.....	117
圖二十六、於不同的培養基測試 LOB325 篩選功能.....	119
圖二十七、於不同濃度之篩選抗生素培養基測試 LOB324 和 LOB325 的篩選功能.....	120



一、緒 論 I

1.1 念珠菌症 (Candidiosis) 和 熱帶念珠菌 (*Candida tropicalis*) 介紹

在過去二十年，念珠菌 (*Candida species*) 感染的數量以及嚴重性有逐年增加的趨勢 (Weinberger *et al.*, 1997)。念珠菌是人類常見的伺機性共生真菌，當宿主的微生物菌相改變或免疫力低落時，就會轉成致病菌造成局部感染 (Calderone and Frozi, 2001)，如口腔、泌尿道或生殖道，在免疫力受損的病患 (如 AIDS、器官移植、癌症化療)，念珠菌極有機會侵犯宿主全身器官，造成嚴重的系統性感染 (systemic infection)，進而威脅宿主生命 (Bustamante, 2005; Georgopapadakou and Walsh, 1996)。在美國念珠菌是第四大血液感染的病原菌，大約佔 10% 的比例 (Edmond *et al.*, 1999)，因此美國每年治療念珠菌症的花費估計超過十億美元 (Miller *et al.*, 2001)。在台灣，國立台灣大學醫學院附設醫院統計念珠菌院內感染發生率從 1981 到 1993 增加了二十七倍 (Chen *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 1996)，無疑地，念珠菌感染已經成為公共衛生主要議題。

臨床上嚴重的念珠菌感染最主要的病原菌是 *Candida albicans*，但是其他念珠菌的感染也有越來越有其重要性存在 (Rangel-Frausto *et al.*, 1999; van't Wout, 1996)，其中 *Candida tropicalis* 是亞洲太平洋地區及巴西第二大的念珠菌病原 (Colombo *et al.*, 2006; Pfaller and Segreti, 2006)，在台灣地區念珠菌臨床分離株 *C. tropicalis* 佔有約 16~25% 的比率，明顯高於其他地區 (5~11%) (Ruan and Hsueh, 2009)。不像 *C. albicans* 是人類黏膜上的常見共生菌，*C. tropicalis* 則是常常在重度真菌感染的病患中被分離出 (Horn *et al.*, 1985; Komshian *et al.*, 1989)。 *C. tropicalis* 是雙倍體子囊菌 (diploid ascomycetes)，目前只有發現利用無性生殖進行繁殖，在宿主的皮膚和腸胃道可發現它蹤跡 (Odds, 1988; Rangel-Frausto *et al.*, 1999; van't Wout, 1996)。根據地區、危險因子 (risk factor) 和研究年代的不同，約有 4%-24% 的念珠菌菌血症 (candidemia) 患者是因為感染 *C. tropicalis* 所引起 (Pfaller and Diekema., 2007)，並且在 neutropenia 和 hematologic

malignancies 的病患是重要的病原菌 (Abi-Said *et al.*, 1997; Kontoyiannis *et al.*, 2001; Marr *et al.*, 2000; Wingard, 1995)，大約 60% 至 80% 帶有 *C. tropicalis* 的 neutropenia 患者最後會發展成侵入性感染 (Kontoyiannis *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 1987; Sandford *et al.*, 1980)，所以在美國會預防性地給予這些病患服用 fluconazole 來減少院內血液感染 (nosocomial bloodstream infection) 發生 (Abi-Said *et al.*, 1997; Kontoyiannis *et al.*, 2001)。

1.2 常用臨床抗真菌藥物

由於念珠菌與人類都是真核生物，故和人類某些生理過程相當相似。因此大多數的抗真菌藥物容易對人體產生副作用，必須依循適當的劑量使用，並且這些藥物往往為抑菌劑而非殺菌劑，所以藥物治療下產生選擇性壓力使得抗藥性菌株佔有優勢。故希望透過研究念珠菌抗藥性的產生機制，尋找適當藥物標的 (drug target)，以期做為新一代抗真菌藥物開發契機 (Berman and Sudbery, 2002)。直到現今，臨床用來治療真菌感染症的藥物根據作用方式主要分為以下四大類：

(1) Polyenes:

有 amphotericin B、pimaricin 和 nystatin。ergosterol 是真菌細胞膜最主要的膽固醇，與哺乳類動物的 cholesterol 類似。ergosterol 的功能是維持細胞膜完整性 (integrity) 和流動性 (fluidity)，確保膜上蛋白質有適當功能 (Lupetti, 2002)。polyenes 類藥物會與 ergosterol 結合嵌入細胞膜，形成離子通道 (ion channel) 使胞內物質由內滲出，破壞離子梯度 (proton gradient)，造成菌體死亡 (Vanden Bossche *et al.*, 1994)。此類殺真菌劑 (fungicidal) 主要用來治療嚴重的系統性感染，不過因具有嚴重的副作用和細胞毒性，所以臨床上以短期治療為主，因此可能與抗藥性發生率低有關。有研究指出長期使用 amphotericin B 產生的念珠菌抗藥株與一般敏感株相比，細胞膜的 ergosterol 含量明顯下降 (White *et al.*, 1998)。

(2) Ergosterol biosynthesis inhibitor:

此類藥物產生細胞毒性較小，是臨床最常使用的抗真菌藥物。thiocarbamates、allylamines 和 azoles 主要與 ergosterol 合成途徑的酵素作用，thiocarbamates (tolnaftate 和 tolclolate) 與 allylamines (naftifine 和 terbinafine) 抑制 squalene epoxidase (*ERG1*) 將 squalene 轉換成 2'3-oxidosqualene (Ryder, 1992)。azoles 類則可分成兩類，包括治療皮膚及黏膜感染局部使用的 imidazoles (ketoconazole 和 miconazole) 與採口服或注射治療侵入性感染的 triazoles (fluconazole、itraconazole 和 voriconazole) (Vermitsky & Edlind, 2004)，它們的藥物標的是 *ERG11* 的產物, lanosterol 14 α -demethylase。lanosterol 14 α -demethylase 屬於 cytochrome p-450 的酵素，以 heme moiety 作為活化中心 (Hitchcock, 1991)，如果 lanosterol 14 α -demethylase 活性被 azoles 抑制會造成無法產生 ergosterol，使這個細胞膜最主要的膽固醇耗盡，並且累積中間產物 14 α -methylsterols，例如 lanosterol 和 14 α -methyl-3-6-diol，抑制細胞生長 (Kelly *et al.*, 1997)。與 imidazoles 相比之下，triazoles 因為有較好的 pharmacokinetics，更安全、有效，所以漸漸在治療系統性感染的治療取代 imidazoles。但是由於 azoles 作用機制為抑制真菌生長而非殺菌，所以此類藥物長期治療下容易篩選出抗藥性菌株，最早是以 ketoconazole 治療慢性黏膜皮膚念珠菌症 (chronic mucocutaneous candidiasis) 的病患中分離出 azoles 抗藥菌株 (Horsburgh & Kirkpatrick, 1983)，之後在長期使用 azoles 藥物的後天免疫不全症候群 (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) 病患也發現了抗藥菌株 (Rex *et al.*, 1995; Albertson *et al.*, 1996; Georgiev, 1998; White, 1997; Perea *et al.*, 2001)。

(3) Cell wall synthesis inhibitor:

雖然真菌和人類都是真核生物，但是真菌具有細胞壁是最大的差異。真菌細胞壁最主要的成分是 1, 3- β -glucan。echinocadins 主要與 1, 3- β -glucan synthase 作用，抑制細胞壁 1, 3- β -glucan 合成 (Radding *et*

al.,1998), 導致細胞壁異常脆弱無法承受滲透壓力, 是很有效也是最新一代的殺真菌劑, 而且對於宿主所產生的細胞毒性極小 (Georgopadakou, 2001; Tkacz & DiDomenico, 2001)。caspofungin 是第一個通過 US Federal Drug Agency (FDA) 核准的此類藥物, 用於臨床治療曲黴病 (aspergillosis) 和傳播性念珠菌感染 (disseminated *Candida* infection) 的此類藥物, 對 *Candida* spp. (包括對於 polyenes 和 azoles 已有抗藥性者) 都有殺菌效果, 可抑制 *Aspergillus* spp. 生長 (Letscher-Bru and Herbrecht, 2003), 目前還有 micafungin 和 anidulafungin 也已核准用於臨床治療。

(4) Nucleic acid synthesis inhibitor:

5-flucytosine (5-FC) 最早在 1957 年合成用來當作抗癌藥物, 但因沒有預期抗腫瘤的效果, 不過後來發現能對抗真菌後, 於是在 1968 年開始用於治療 cryptococcosis 和 candidiasis (Vermes *et al.*, 2000)。5-FC 本身並沒有抗真菌活性, 但可透過進入 pyrimidine salvage pathway 後產生核苷酸類似物, 破壞 DNA 和蛋白質合成 (請參考附錄一)。首先, 5-FC 利用 purine-cytosine permease 吸收進入菌體後, 隨即被 cytosine permease 去氨基 (deamination) 轉換成能抗真菌的 5-fluorouracil (5-FU)。5-FU 透過兩種機制達到抗真菌的效果, 第一, 5-FU 之後被 uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 轉換成 5-fluorouridine monophosphate (FUMP) 和 5-fluorouridine diphosphate (FUTP), FUTP 可取代 uridylic acid 合成 RNA, 抑制蛋白質合成 (Bennett, 1996; Scholer, 1980; Waldorf and Polak, 1983; White *et al.*, 1998); 第二, 5-FU 代謝成 FUMP 後, 還原成 uridine monophosphate pyrophosphoryl (FdUMP), FdUMP 會抑制合成 thymidine 的必要酵素 thymidylate synthetase, 因此 DNA 合成受阻 (Polak and Scholer, 1980; Diasio *et al.*,1978), 造成真菌死亡。哺乳動物因為缺乏 cytosine deaminase, 所以對 5-FC 沒有直接的毒性效應, 但有案例服用 5-FC 會有 hepatotoxicity 和 bone-marrow depression 等嚴重副作用, 機制目前不清楚, 並且因為真菌對於 5-FC 產生抗藥性迅速, 故使得臨床應用有限 (Vermes

et al., 2000)。目前 5-FC 常與 amphotericin B 或 azole 類的藥物，如 fluconazole 結合使用，減少因 5-FC 單一用藥產生抗藥性 (Sheehan, 1999)。

1.3 5-flucytosine (5-FC) 抗藥分子機制先前研究

在 *S. cerevisiae* 和 *C. albicans* 的研究下，5-FC 抗藥原因有底下幾個可能機制：第一，pyrimidine salvage pathway 上的任一蛋白質產生突變導致功能性缺陷，例如：purine-cytosine permease 突變可能造成 5-FC 無法運送吸收進入菌體內發揮作用，cytosine deaminase 和 uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 突變則可能使 5-FC 不能轉換成具有抗菌活性的代謝產物；第二，pyrimidine de novo biosynthetic pathway 中的任一基因變異，例如：造成 *URA3* 的大量表現，或對受質親和力變佳，並失去對 UPRT (pyrimidine salvage pathway 重要調控酵素) 負向回饋抑制 (negative feedback inhibition) (Jund and Lacroute, 1970)，增加 UMP 合成，與類似物 5-FUMP 進行競爭 (Hope *et al.*, 2004; Polak, 1977)。

對於 5-FC 抗藥性的發生率根據物種的不同而有所差異。除了 *Candida krusei* 對於 5-FC 的 primary resistance 高達 28% 外，其他念珠菌只有小於 5% 的發生率 (Pfaller *et al.*, 2002)，不過在巴黎由 French National Reference Center for Mycoses and Antifungals (NRCMA) 從血液取得的臨床分離菌株 *C. tropicalis* 高達 35%，且序列分析發現 5-FC 敏感株 *URA3* 在 529 nt 的位置不是 A/A 就是 A/G，但是抗藥株則是 G/G (Desnos-Ollivier *et al.*, 2008)，但是目前 *C. tropicalis* 對於 5-FC 抗藥分子機制並沒有其他相關報導。

1.4 論文研究目的 I

實驗室同仁柯惠菁以 E-test 分析 *C. tropicalis* 臨床分離株 (97 株) 對於 amphotericin B、fluconazole、voriconazole、caspofungin 和 5-flucytosine (5-FC) 五種藥物的感受性，於 48 小時在 5-FC 抑菌圈分離到抗藥衍生株，將其編號，選出 YM020347-R1、YM020671-R1、YM020743-R1、

YM060071-R1 和 YM060369-R1 再以 E-test 測試藥物感受性，結果 5-FC 抑菌圈完全消失，顯示衍生株對 5-FC 產生抗藥性，因此本研究欲透過以下過程來探究其機制。

- (1)透過 *URA3*、*FUR1*、*FCY1*、*FCY2* 這四個基因涉及 pyrimidine 生合成途徑 (請參考附錄一)，同時也是代謝 5-FC 使其具有抗菌活性的主要基因，以序列分析找到敏感性的 parental strain 和其抗藥衍生株之間的遺傳差異，來探討 *C. tropicalis* 對 5-FC 的抗藥機制為何。
- (2)利用實驗室 *SAT1* flipper 技術進行 *C. tropicalis* 的特定基因序列置換與缺陷性突變，得到兩股相同的同質合子型置換株和單股缺陷突變株，並測試其對於 5-FC 的感受性是否發生改變，來驗證突變的存在是否與抗藥性有關。



二、材 料 I

2.1 菌株 (strains)

1. *Escherichia coli* : DH5 α

2. *Candida tropicalis* : 除表一所列之臨床分離株外，以及下面所列：

No.	genotype	Susceptibility of 5-flucytosine	parental strain
YLO415	<i>FCY2 (273G)/FCY2 (273G)</i> with <i>SAT1</i> cassette	0.5 $\mu\text{g/ml}$	YM020291
YLO416	<i>FCY2 (273G)/FCY2 (273G)</i> with <i>SAT1</i> cassette	0.5 $\mu\text{g/ml}$	YM020291
YLO417	<i>FCY2 (273T)/FCY2 (273T)</i> with <i>SAT1</i> cassette	64 $\mu\text{g/ml}$	YM020291
YLO418	<i>FCY2 (273T)/FCY2 (273T)</i> with <i>SAT1</i> cassette	64 $\mu\text{g/ml}$	YM020291
YLO419	<i>FCY2 (273T)/fcy2Δ</i> with <i>SAT1</i> cassette	64 $\mu\text{g/ml}$	YM020291
YLO420	<i>FCY2 (273G)/fcy2Δ</i> with <i>SAT1</i> cassette	0.5 $\mu\text{g/ml}$	YM020291
YLO421	<i>FCY2 (273T)/fcy2Δ</i> with <i>SAT1</i> cassette	64 $\mu\text{g/ml}$	YM020291

3. **Broth microdilution 的標準菌株 (standard controls) :**

No.	species	Susceptibility of 5-flucytosine
YLO6 (ATCC [®] 6258)	<i>C. krusei</i>	4.0~16 $\mu\text{g/ml}$
YLO7 (ATCC [®] 22019)	<i>C. parapsilosis</i>	0.12~0.5 $\mu\text{g/ml}$
YLO12 (ATCC [®] 90028)	<i>C. albicans</i>	0.5~2.0 $\mu\text{g/ml}$

2.2 質體 (plasmids)

No.	特性
LOB319	<i>C. tropicalis</i> FCY2 的 G 股 SAT1 flipper 同源重組和基因補救質體
LOB320	<i>C. tropicalis</i> FCY2 的 T 股 SAT1 flipper 同源重組和基因補救質體
LOB321	<i>C. tropicalis</i> FCY2 的 G 股 SAT1 flipper 基因剔除質體
LOB322	<i>C. tropicalis</i> FCY2 的 G 股 SAT1 flipper 基因剔除質體

2.3 引子 (primers) for *C. tropicalis*

Name	Sequence (5'→3')	position	Reference
HJL1205	ATCATTAGTTCAGATGGTAAAGTCTTG	<i>FCY1</i> up stream -81~-55	Desnos-Ollivier <i>et al.</i> , 2008
HJL1206	CCTTTTTAGTAACATGTCTATTCTCCA	<i>FCY1</i> down steam 25~ORF +221	
HJL1207	TGCCATAAATTAATGCAGAA	<i>FCY2</i> up stream -88~-67	
HJL1208	GGAAGCAACAAACCCAAAAA	<i>FCY2</i> ORF +650~+631	
HJL1209	TGCTGCCGATTATGTTGTTT	<i>FCY2</i> ORF +567~+568	
HJL1210	GTGAAAACGAGCCAATCCAT	<i>FCY2</i> down steam 20~1	

HJL1211	TCATCAAACCATGTCTGCTG	<i>FUR1</i> up stream -11~ ORF +10	
HJL1212	AAGTGTATGTAGTGATAATTGCTATGC	<i>FUR1</i> down steam 83~57	
HJL1413	ATTGGATAGTCCCTCTAAACTCACTACTA	<i>URA3</i> up stream -60~-32	
HJL1414	AGCATTAGTTATATCACTCCACGATGAA	<i>URA3</i> ORF +366~+339	
HJL1415	TGCCGATATTGGAAATACAGTTA	<i>URA3</i> ORF +285~+307	
HJL1416	AATCAACTATTCAAGTTGACCG	<i>URA3</i> down steam 6~ ORF +792	
HJL1420	ggtaccTCAACTCAACCCCAAAGT	<i>FCY2</i> up stream -500~-483	本實驗
HJL1421	ctcgagCCCAAGGAGAAAGTAGCA	<i>FCY2</i> ORF +44~+27	
HJL1422	CGGATTCAATGTAGCCAG	<i>FCY2</i> ORF +1272~+1289	
HJL1423	GTCATTCCATGTCGTGGT	<i>FCY2</i> down steam 441~424	
HJL1424	ctcgagGTCATTCCATGTCGTGGT	<i>FCY2</i> down steam 441~424	
HJL1477	CTGTTGCTCCAGGTGAATCa	<i>FCY2</i> down steam 554~535	
HJL814	CTCAACATGGAACGATCTAGC	in <i>SAT1</i> cassette	

2.4 藥品試劑

- Amersham Biosciences : *rTaq* DNA polymerase (Cat. No. 27-0798-06)
- BIO-RAD: 50 x TAE (Cat. No. 161-0773)
- Difco laboratories :
Bacto agar (Cat. No. 214040), LB agar (Cat. No. 244520), yeast nitrogen base w/o amino acid (Cat. No. 291940), LB broth (Cat. No. 244620), YPD broth (Cat. No. 242820), BHI (Cat. No. 0037-17)
- Invitrogen :
Agarose (Cat. No. 15510-027), 1kb plus DNA ladder (Cat. No. 12308-011)
- NEB : Calf intestinal(CIP), Restriction Enzymes
- Promega : T4 DNA ligase(Cat. No. M-1801)
- Sigma Chemical Co. :
Dithiothreitol (DTT) (Cat. No. D9779), Disodium ethylenediamine-tetraacetate (EDTA) (Cat. No. E-5134), Glass – beads (425~600 μ m) (Cat. No. G9268-500G), Histidine (Cat. No. H-8125), Lithium acetate(CH₃COOLi)(Cat. No. L-6883), L-leucine (Cat. No. L-8000), Polyethylene Glycol3350 (PEG3350) (Cat. No. P4338), Uridine(Cat. No. U-3003), 5-Flucytosine (SI-F7129),
- E Merck. Germany:
Chloroform (Cat. No. 1.0244511000), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Cat. No. S26740), Ethanol (Cat. No. K33534874), Ethidium bromide(Cat. No. K27928515), Glucose (Cat. No. K33069537), N,N-dimethylformamide (Cat.No. K27226853), Potassium chloride (KCl) (Cat. No. K24252236), Isopropanol (Cat. No. K32632434), Sodium carbonate (Na₂CO₃) (Cat. No. A375692), Sodium hydroxide (NaOH) (Cat.No.B886298), Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrogen chloride (Tris-HCl) (Cat.No.8382T006), Sodium chloride (NaCl) (Cat. No. K29779304), Triton X-100 (Cat. No. K23841503)

- USB:

Glycerol (Cat.No.US16374), phenol: chloroform: isoamyl alcohol (Cat. No US75831)

2.5 緩衝溶液 (buffers)

- 10 x TE buffer (pH 7.5 & pH 8.0):

20 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5& 8.0), 8 ml 0.25M EDTA (pH 8.0) 加無菌二次水至體積 200 ml

- 10X (1 M) Lithium Acetate (LioAc):

40.8 g Lithium Acetate加無菌二次水至體積400 ml

- 1X TE/LioAc solution (現配現用)

1 ml 10 x TE buffer, 1 ml 1 M Lithium Acetate 加無菌二次水至體積 10 ml

2.6 培養液和培養基

- DYT

1.6 g Tryptone, 1 g Yeast extract, 0.5 g NaCl 加無菌二次水水至體積 100 ml

- BHI broth: (Difco, Cat. No. 0037-17)

33.7% Calf brain infusion solids, 13.5 % Beef heart infusion solids, 27 % Proteose peptone, 5.4 % Glucose, 13.5 % Sodium chloride, 6.7 % Disodium phosphate

- LB (Lucia-Bertni) broth: (Difco, Cat. No. 244620)

1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl

- LB/ ampicillin broth:

1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 µg/ml ampicillin

- LB/ kanamycin broth:

1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 50 µg/ml kanamycin

- LB/ Chloramphenicol broth:
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 34 µg/ml Chloramphenicol
- SD broth: (Difco, Cat. No. 291940)
0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid, 2 % dextrose
- YPD broth: (Difco, Cat. No. 242820)
2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose
- YPD agar
2 % Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose

2.7 儀器設備

程式溫度控制儀 PTC-200 (MJ Research)

迴轉式震盪培養箱 (TKS)

落地型高速離心機 J2-MC (Beckman)

桌上型高速冷凍離心機 (Heraeus)

桌上型低速冷凍離心機 (SORVALL RT7)

微量高速離心機 DENVILLE 260D (DENVILLE SCIENTIFIC INC)

電子天平 AT261 DeltaRange (METTLER TOLEDO)

GG4002-S (METTLER TOLEDO)

加熱攪拌器 (CORNING)

酸鹼度計微電腦自動溫度 (HANNA instruments)

單槽乾浴器 (Violet Bio Sciences, Inc.)

恆溫水浴器 (CHERNG HUEI Co.)

試管震盪器 Vortex-2 genie (Scientific Industry)

全光域多功能分析系統 (Molecular Devices)

倒立顯微鏡 (OLYMPUS)

數位相機 COOLPIX 990 (Nikon)

基因脈衝儀 GENE PULSER II (BIO-RAD)

往覆式細菌接種套組 (Cathra)

電泳影像擷取分析系統 (Alpha Innotech Corporation)

水平式電泳槽SUB-CELL GT (BIO- RAD)

玻璃雙門 4 °C 冷凍櫃 (LEVEL)

-30 °C 直立式雙門冷凍櫃 (SANYO)

-80 °C 超低溫冷凍櫃 Ultima II (REVCO)



三、方 法 I

3.1 DNA 方法

3.1.1 大腸桿菌 (*E. coli*) 質體純化

使用 Qiagen Inc 的產品 QIAprep spin miniprep kit (Cat. No. 27106、28106)，萃取出大腸桿菌的質體。要純化大量的大腸桿菌質體時，使用的是 VIOGENE 的產品 Midi Plus™ Ultrapure Plasmid Extraction System (Cat. No. GDV2002)。

3.1.2 洋菜膠內 DNA 萃取和 PCR 產物純化

萃取出洋菜膠內特定的 DNA 片段和純化 PCR 產物使用 Qiagen Inc 的產品 QIAprep gel extraction kit (Cat. No.28706)。

3.1.3 萃取真菌 genomic DNA

純化 *C. albicans*、或 *C. tropicalis* 的 genomic DNA 用的是 EPICENTRE 的產品 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Cat. No. MPY80200)。

以上均依照廠商說明書操作。

3.1.4 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

本實驗聚合酶連鎖反應所使用的 DNA 模版 (DNA template) 有質體 DNA，或是白色念珠菌、熱帶念珠菌的 genomic DNA，利用所設計的引子夾出所要的片段並放大之。將下列物質混合於 0.2 ml 之微離心管：總體積為 50 μ l 的反應液中加入 5 μ l 的 10 X DreamTaq™ buffer、1.25 unit DreamTaq™ DNA polymerase (5 unit/ μ l, Fermentas, Cat. No. EP0701)、4 μ l 的 2.5 mM dNTP、1 μ l 的 25 mM MgCl₂、50 μ M 的 Forward primer 和 Reverse primer 各 0.5 μ l、DNA 模版 (0.01 ng ~ 1 ng 質體 DNA, 白色念珠菌、熱帶念珠菌的 genomic DNA 約 0.1 ~ 1 μ g)、無菌二次水。反應步驟

為：(1) 95°C, 5 分鐘 (2) 95°C, 30 秒 (3) 50 ~ 60°C, 30 秒 (依引子 T_m 值減 5°C) (4) 72°C, 時間依照欲合成片段大小決定 (DreamTaq™ DNA polymerase 合成速率 1 Kb / min) (5) 重複 (2) ~ (4) 步驟 30 次 (6) 72°C, 5 分鐘 (7) 4°C 停止反應。

3.1.5 DNA 黏合反應 (DNA ligation)

黏合反應使用 EPICENTRE 的 Fast-Link™ DNA Ligation Kit (Cat. No. LK6201H), 以適當限制酶處理的載體 DNA (vector DNA) 和欲黏合的 DNA 片段 (insert DNA), 取莫爾濃度比為載體 DNA : 欲黏合的 DNA 片段等於 1 : 3, 加入內含 2 unit 的 DNA ligase 總反應體積為 15 µl 的反應液中, 在 16°C 下進行黏合反應至隔天。

3.1.6 TA cloning

使用 Promega 的 pGEM-T Easy Vector System (Cat. No. A1360)。

3.2 *E. coli* 轉形反應 (transformation) — 熱休克法 (heat-shock)

3.2.1 製備 *E. coli* 轉形細胞 (competent cell)

前一天從凍管劃菌到 LB plate 以 37°C 培養, 次日用滅菌過的牙籤挑起單一菌落培養在 2 ml LB Broth 以 37°C 震盪培養, 隔天取 1 ml 的菌液加上 300 ml DYT 在 37°C 震盪培養 1~1.5 小時 (OD₆₀₀=0.4~0.6, 細胞密度勿超過 10⁸ cells/ml), 之後至於冰上 10 分鐘 (以下操作維持在 4°C), 然後以轉速 4000 rpm 離心 10 分鐘去除上清液, 加入 300 ml 50mM CaCl₂ (ice-cold) 輕輕的使 *E. coli* 重新懸浮再置於冰上 20 分鐘, 接下來以轉速 4000 rpm 離心 10 分鐘去除上清液, 加入 40 ml 50 mM CaCl₂ 使 *E. coli* 重新懸浮, 再加入 glycerol 使其最後濃度為 15% (約加入 8 ml 100% glycerol), 最後將製備好的轉形細胞以體積為 200 µl 分裝到 1.5 ml 微離心管後存於 -80°C 備用。

3.2.2 轉形反應

事先將黏合反應溶液置於 70°C 乾浴槽上 15 分鐘終止黏合反應，並將製備好的轉形細胞置於冰上解凍（約 5 分鐘），取適當體積的黏合反應溶液（小於轉型細胞體積的 10%）加入轉形細胞中輕拍混合，置於冰上 30 分鐘後，移到 42°C 水浴槽熱休克 1.5 分鐘，就迅速移至冰上 2 分鐘，再加入 1 ml DYT 以 37°C 震盪培養 1 小時，然後以轉速 8000 rpm 離心 2 分鐘吸取 1 ml 上清液丟棄，將剩下的菌液混合後用玻璃珠均勻塗於含適當抗生素的培養基，放到 37°C 培養箱至隔天看結果。

3.3 *Candida* 轉形反應—電穿孔法 (electroporation)

3.3.1 製備 *Candida* 轉形細胞

轉形方法是根據前人的報導所修改 (Kohler et al., 1997)。將欲轉形的菌株養在 3 ml YPD 中於 30°C 以轉速 150 rpm 震盪培養至隔天，再取 5 μ l 轉養至 50 ml YPD 震盪培養至隔天 $OD_{600} = 1.6\sim 2.2$ ，即可以轉速 5000 rpm 離心 5 分鐘收菌，之後將 pellet 重新懸浮於 1ml 10X TE buffer、1 ml 1M Lithium acetate 和 8 ml ddH₂O，並於 30°C 震盪培養 1 小時後，再加入 250 μ l 1M dithiothreitol (DTT) 於 30°C 震盪培養 30 分鐘，接下來加入 40 ml ddH₂O 充分混合後就離心去除上清液，將 cell pellet 以 25 ml ice-cold ddH₂O 混合清洗，便在 4°C 下以轉速 5000 rpm 離心 5 分鐘去除上清液，以 5 ml 1M ice-cold sorbitol 清洗，再離心去上清液，加入 50 μ l 1M ice-cold sorbitol 置於冰上備用。

3.3.2 轉形反應

將欲轉形的線性 DNA (2~3 μ g) 和 40 ml 的轉形細胞混合均勻後，加入已在冰上欲冷的 0.2 cm cuvette 溝槽中，輕輕 cuvette 拍打使去除氣泡和讓細胞完全在 cuvette 底部。電穿孔條件為 1.8 KV, 200 Ω , 25 μ F，完成後加入 1 ml ice-cold sorbitol 沖洗，離心去除上清液加入 1 ml YPD 在 30°C 震盪培養 1 小時，便可以取適量的菌量塗於含有 200 μ g nourseothricin 的

YPD plate 進行篩選，在 30 °C 下培養二到三天至菌落達適當大小，即挑起劃單一菌落再進行確認。

3.4 CLSI Broth Microdilution Method (5-flucytocine: 0.125~64 µg/ml)

根據 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 1997) 所發佈的 M27A 說明書操作。實驗操作前須先配製適量 RPMI 1640 broth (pH7.0, Gibco BRL, Cat. No. 31800022)、無菌 0.85% NaCl，放置於 1 liter 的血清瓶中，並裝上分注吸管後置於 4°C 冰箱中備用。配好 2 倍濃度梯度之抗藥性試驗培養盤 (避光)，放置於 -80°C 冰箱中備用。

第一天

1. 自 -80°C 冰櫃中取出標示有編號的單一菌株存菌管，用竹棒挖取少許菌液，放到含有 1.0 ml BHI (Cat. No. 237500) 的 24-well plate。置於 35°C 培養箱培養。
2. 取出所需數量的 12×75 mm 玻璃試管，以標示筆標示待測菌株編號，置於鐵架，以鋁箔紙覆蓋後，利用高壓滅菌鍋進行滅菌，滅菌後取出備用。
3. 取無菌離心管，標示待測菌株編號後，放置於鐵架上備用。

第二天

1. 至 -80°C 冰櫃中取出適量已配製好的 2 倍濃度梯度之抗藥性試驗培養盤，放置於室溫下，回溫備用。
2. 取出經 24 小時 35°C 培養的 24-well plate，利用 Pipet 混合均勻，吸取 100 µl 菌液，加入含有 2 ml 0.85% NaCl 的玻璃試管，以震盪器充分混合均勻。
3. 利用 colorimeter 調整使菌液約為 0.5 McFarland ($1\sim5\times 10^6$ CFU/ml)，過高或偏低可透過加入適量 0.85% NaCl 或菌液來調整。
4. 以震盪器充分混合均勻後，依序以 0.85% NaCl 十倍稀釋，再二十倍稀釋，最後以 RPMI 1640 broth 十倍稀釋。
5. 將已回溫的抗藥性試驗培養盤標示檢體編號，將稀釋好的 RPMI 1640 broth 菌液混合均勻後，倒入無菌藥品槽，利用 12 爪 Pipet 裝上 11 支

- tips，吸取 100 μ l 菌液，同時加入 A 列 1~11 行的培養盤中，第 12 行不加菌液，為無菌操作的對照組（注意 tip 不要沾到藥盤裡的 RPMI）。
6. 更換 tips，重複步驟 4 跟 5，依序將檢體分別加入 B~H 列。
 7. 添加完畢後，蓋上抗藥性試驗培養盤蓋子，放入 35°C 培養箱中培養。

第三天

讀取培養盤菌液生長濃度

1. 開啟 Biotrack II plate reader 電源，於主畫面中進入 select method 中選 YEAST 後，機器會進入 YEAST 模式。
2. 啟動電腦。在桌面上點選 Bio DC 程式捷徑，開啟視窗後，點選 run，在點選 new data 後即可讀取培養盤讀值
3. 取出已經 35°C 培養 24 小時的抗藥性試驗培養盤，放在具有 96-well plate 專用承載盤的震盪器上，調整震盪速度於 2~3 之間，震盪時間約 1 分鐘。
4. 震盪均勻後，將培養盤蓋子移開，將培養盤放置於 Biotrack II plate reader 的讀取槽內。在 Biotrack II plate reader 上輸入該培養盤的編號後，接著點選 run，則培養盤會進入機器內部，先進行 5 sec 的 pre-mix 後，再接著讀取吸光值。讀取完畢後培養盤會退出，且在電腦程式中顯示出 96-well 的 OD 數值。
5. 將培養盤取出，並將培養盤蓋子蓋上，重複操作步驟 3、4、5 直到全部的培養盤都讀取完成後，於 Bio DC 點選 finish 將結果匯出到 Excel 並存檔，培養盤放回 35°C 培養箱繼續培養 24 小時。

分析結果，判讀 MIC 數值。

1. 開啟存有 OD 讀值的 Excel 檔，將所有資料轉貼到新的 Excel，再利用 Excel 的運算功能，先進行歸零減除 Blank 的運算，再運算每一 well 與 Postive (growth) control 的百分比數值。
2. 利用 Excel 中 If 函數的功能 [if(value <=50,"R",mic conc.)]，在 Flucytocine 若百分比數值 >50，則顯示 R，若百分比數值 <=50 則顯示該 well 的試藥濃度。

3. 讀取 MIC 數值，將結果輸入資料庫中。

第四天

讀取 48 小時培養盤黴菌生長濃度，重複第三天的操作方式，讀取 MIC 數值，並將結果輸入資料庫中。Flucytocine 的 MIC 數值判讀為以 48 小時時菌量混濁度為不加藥的正對照組的百分之五十的藥物濃度。



四、結 果 I

4.1 以 broth microdilution 分析 *Candida tropicalis* 的 parental strain 和其抗藥衍生株 (derivated resistant strain) 之間對於 5-flucytosine (5-FC) 的感受性差異

將實驗室同仁柯惠菁從 E-test 藥盤所收集的 *Candida tropicalis* 的衍生株 (若取兩個 isolates 編號為 R1 及 R2；只有一株則為 R) 及其 parental strain 為一組，總共 35 組 (102 株菌)，以 broth microdilution 測 minimal inhibition concentration (MIC)，並將 24 小時和 48 小時的讀值整理於表一。圖一為 48 小時藥盤照片。結果判讀以 48 小時抑制 50% 菌量生長的藥物濃度為此菌株之 MIC，如果菌株的 MIC $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ 代表對 5-FC 感受性是敏感的 (susceptible)，MIC 為 8-16 $\mu\text{g/ml}$ 是中間性 (intermediate)，MIC $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ 是抗藥性的 (resistant)。

雖然根據 broth microdilution 的結果 YM020055、YM060051、YM060071 和 YM060173 這四組衍生株對 5-FC 的感受性歸類為敏感 (MIC $\leq 4 \mu\text{g/ml}$)，但是除了 YM060051-R2 和其 parental strain 的 MIC 是一致之外 (0.125 $\mu\text{g/ml}$)，其他的組別衍生株與其 parental strain 相較之下都是更加地不敏感。且在全部 35 組之中，超過 80% 組別的衍生株已達到 5-FC 抗藥的程度 (MIC $\geq 32 \mu\text{g/ml}$)。

為了探討各組 parental strain 與衍生抗藥株之間 MIC 的差異究竟是否受到基因層次因素的影響，以瞭解產生 5-FC 抗藥性的機制為何，於是挑選有興趣的組別分析相關基因的序列。挑選標準為：1. 同組的 parental strain 對 5-FC 是敏感的之外，兩個 isolates-R1 及 R2 感受性為中間性和抗藥性的 YM020438、YM060088、YM060616 這三組；2. 組內 R1 與 R2 在 24 小時的 MIC 都相同，並且 48 小時的 MIC 也很接近，但是和其他兩組相較之下有程度上差異 (敏感性及抗藥性) 的 YM060173、YM020055、YM060369 這三組；3. 組內 R1 與 R2 的 24 小時 MIC 有差異，但是 48 小時卻都非常一致地達到抗藥程度 (MIC $\geq 64 \mu\text{g/ml}$) 的

YM020743、YM020112 這二組；4. 組內 R1 與 R2 的 24 小時 MIC 一致，但是組別之間有差異，並且於 48 小時卻都具有抗藥性 ($MIC \geq 32 \mu\text{g/ml}$) 的 YM020715、YM020347、YM020291 這三組；5. 以及其 parental strain 的 MIC 與其他組相較之下較為抗藥的 YM060800、YM060210 這二組，以上 13 組，總共 38 株菌株將分析以下基因的序列。

4.2 將有興趣組別的 *URA3*、*FUR1*、*FCY1*、*FCY2* 基因定序分析

URA3、*FUR1*、*FCY1* 及 *FCY2* 是涉及 pyrimidine 生合成途徑的主要基因，希望透過這四個基因 ORF (open reading frame) 的序列分析找到敏感性的 parental strain 和其抗藥衍生株之間的差異，來探討 *C. tropicalis* 對 5-FC 的抗藥機制為何，序列分析結果整理於表二和表三。

URA3 (807 nt, orotidine-5'-phosphate decarboxylase, ODCase) 的序列分析，只有在 parental strain-YM020112 第 791 個核苷酸是 C/T 的異質合子型 (heterozygous)，兩個抗藥衍生株都是 T/T 的同質合子型 (homozygous)，造成第 264 個胺基酸由 Thr (ACC) 變成 Ile (ATC) 是有差異的之外 (圖二 (B))，其他 12 組 parental strain 和抗藥衍生株之間序列並無差異，在組別之間的差別則是除了 YM020347 和 YM020715 與抗藥衍生株第 791 個核苷酸是 C/T (圖二 (A))，其他組別則都是 C/C。

分析 *FUR1* (657 nt, uracil phosphoribosyl transferase, UPRT) 的結果整理於表二，所有組別 parental strain 和抗藥衍生株沒有不同，但是組別之間會有序列上的差異，主要在 21、93、237、501 和 507 nt 有單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 發生，不過這些變化都不會改變 UPRT 的胺基酸組成。*FCY1* (363 nt, cytosine deaminase) 在所有組別 parental strain 和抗藥衍生株序列並沒有不同，並且所分析的 38 株菌株序列都一致，代表 *FCY1* 是序列相當保守的基因。

表三為 *FCY2* (1317 nt, purine-cytosine permease, PCP) 定序整理，在組別之間主要 102、225、273、750 和 756 nt 也有單一核苷酸多型性的情形，但是特別的是 YM020112、YM020291、YM020347、YM00743、YM060088

和 YM060800 這六組抗藥衍生株和 parental strain 序列比較後發現在抗藥衍生株中全為同質序列，其中 parental strain 在第 273 個核苷酸是 G/T 的異質合子型，兩股所轉譯的 PCP 在第 91 個胺基酸分別是 Met (ATG) 和 Ile (ATT) (圖三)，但抗藥衍生株從定序結果顯示失去了能轉譯出第 91 個胺基酸為 Met 的 G 股，只留下轉譯為 Ile 的 T 股，會不會是因為這個位置 loss of heterozygosity (LOH) 的發生造成了抗藥性的產生？為了驗證這個假設，利用實驗室已經建立好的 *SAT1* flipper 技術進行 G 股和 T 股的置換與缺陷性突變，得到兩股相同的同質合子型置換株 (homozygous recombination strain) 和單股缺陷突變株 (single allele mutation strain)，並測試其對於 5-FC 的感受性是否發生改變。

4.3 挑選對 5-FC 非常敏感菌株定序 *FCY2* ORF 作為對照組

將在 E-test 中對 5-FC 非常敏感並且 72 小時抑菌圈沒有長出抗藥衍生株的 YM020367、YM020649、YM060302 和 YM060559 定序 *FCY2* ORF，結果整理於圖四，這四個菌株都在 273 nt 為 G/G 同質合子型。

4.4 建構 *SAT1* flipper 所需質體 LOB319、LOB320、LOB321 及 LOB322

根據 *FCY2* ORF 定序，用來進行 *SAT1* flipper 挑選的是 parental strain 與抗藥衍生株之間 SNP 較少的 YM020291。建構同源重組 (homologous recombination) 和基因補救 (gene rescue) 質體 LOB319 與 LOB320，以 YM020291 的 genomic DNA 為模板，分別用引子 HJL1420 和 HJL1424 夾出包含 *FCY2* ORF 和上下游約 500 bp 的 A 與 B 區域，以及引子 HJL1422 和 HJL1423 夾出下游 B 區域，定序區別 G 股與 T 股後，*FCY2* ORF 包含 A、B 區域利用限制酵素切位 *Kpn* I 和 *Xho* I，以及 B 區域利用 *Sac* II 和 *Sac* I 接入 pSFS2A，如圖五所示，質體 LOB319 為 G 股序列，質體 LOB320 為 T 股序列。質體定序只列出質體 LOB319 的部分結果，因為 LOB319 在 *FCY2* ORF 第 1143 個核苷酸從 T 突變成 G，密碼子 GGT 變成 GGC，但是並不會改變胺基酸的組成仍為 Gly (圖六)。最後

以限制酵素圖譜確認質體建構整體上是否正確，結果於圖七 (A)，片段大小都符合預計。

建構基因剔除 (gene knockout) 質體 LOB321 與 LOB322，則是分別用引子 HJL1420 和 HJL1421 夾出包含 *FCY2* 上游約 500 bp 的 A 區域，以及引子 HJL1422 和 HJL1423 夾出下游 B 區域，定序區別 G 股與 T 股後，A 區域利用限制酵素切位 *Kpn* I 和 *Xho* I，以及 B 區域利用 *Sac* II 和 *Sac* I 接入 pSFS2A，如圖五所示，質體 LOB321 為 G 股序列，質體 LOB322 為 T 股序列。最後以限制酵素圖譜確認質體結構，結果於圖七 (B)，片段大小都符合預計。

由於建構質體過程中，定序發現 *FCY2* 不只有 ORF 有 SNP，上游 -69、-224 和下游 201 nt 也有 SNP 位置，於是定序其抗藥衍生株上下游片段，確認是否也是 LOH 範圍，並與其他五組的定序結果一起整理於表四，結果顯示這六組 LOH 的區域涵蓋了 *FCY2* ORF 及其上下游。

4.5 建構 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 和 *FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 的同質合子 (homozygous) 置換菌株

將 LOB319、LOB320 以 *Kpn* I 和 *Sac* I 切下包含 *FCY2* 序列和 *SAT1* cassette 的片段，純化後轉形至 YM020291 進行置換，如圖八所示。經由 nourseothricin 篩選所得之菌株以 *SAT1* cassette 上的引子 HJL814 和 B 區域更下游的 HJL1477 確認 *SAT1* cassette 是否進入正確的位子後 (圖十 (A))，利用引子 HJL1207 和 HJL1210 夾出 *FCY2* ORF，再以限制酵素 *Bbs* I 確認 (辨認序列為 GAAGAC) 是否在第 273 核苷酸是否置換成 G/G 或 T/T 的同質合子型 (圖十 (B))，將所得之 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 菌株命名為 YLO415 和 YLO416，*FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 命名為 YLO417 和 YLO418。之後定序確認上游 -69、-224 的 SNP 位置是否置換，結果為圖十一，此四個菌株都有置換到上游這兩個 SNP 位置。

4.6 建構 *FCY2 (273G)/fcy2 Δ* 和 *FCY2 (273T)/fcy2 Δ* 的單股缺陷突變株

將 LOB321、LOB322 以 *Kpn I* 和 *Sac I* 切下包含 *FCY2* 上下游和 *SAT1* cassette 的片段，純化後並轉形至 YM020291 進行 *FCY2* 基因剔除，如圖九所示。經由 nourseothricin 篩選所得之菌株以 *SAT1* cassette 上的引子 HJL814 和 B 區域更下游的 HJL1477 確認 *SAT1* cassette 是否進入正確的位子後 (圖十 (A))，利用引子 HJL1207 和 HJL1210 夾出剩下那一股 *FCY2* ORF，再以限制酵素 *Bbs I* 確認被剔除的是 G 股還是 T 股後 (圖十 (B))，將所得之 *FCY2 (273G)/fcy2 Δ* 菌株命名為 YLO420，*FCY2 (273T)/fcy2 Δ* 命名為 YLO419 和 YLO421。

4.7 以 Broth microdilution 分析 YM020291、同質置換菌株和單股缺陷突變株之間對 5-flucytosine 的感受性差異

將以上所得之 *FCY2 (273G)/FCY2 (273G)* 和 *FCY2 (273T)/FCY2 (273T)* 的同質置換株、*FCY2 (273G)/fcy2 Δ* 和 *FCY2 (273T)/fcy2 Δ* 的單股缺陷突變株，以及 parental strain YM020291、抗藥株 YM020291-R1 和 YM020291-R2 以 Broth microdilution 分析 MIC 藥盤照片和 MIC 值整理於圖十二。*FCY2 (273G)/FCY2 (273G)* 的 YLO415、YLO416，和 *FCY2(273G)/fcy2 Δ* 的 YLO420 的 MIC 讀值雖然與 YM020291 一致為 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，但是可從圖十二發現 YLO415、YLO416 和 YLO420 在第三行長的菌量比 YM020291 少，代表此三菌株對於 5-FC 比 parental strain 更敏感。另外 *FCY2 (273T)/FCY2 (273T)* 的 YLO417、YLO418，和 *FCY2 (273G)/fcy2 Δ* 的 YLO419、YLO421 的 MIC 和抗藥株 YM020291-R1、YM020291-R2 不是大於 64 $\mu\text{g/ml}$ ，就是等於 64 $\mu\text{g/ml}$ ，對於 5-FC 都具有抗藥性的。

五、討 論 I

5.1 *C. tropicalis* 臨床分離株對於 5-FC 抗藥探討

柯惠菁以 E-test 分析 *C. tropicalis* 臨床分離株對於藥物的感受性，36% (35/97) 可以在 5-FC 抑菌圈分離到抗藥衍生株，比例上相當高。表示 *C. tropicalis* 很容易對 5-FC 產生抗藥性 (in vitro)，在臨床上也因為真菌感染 5-FC 單一用藥容易造成抗藥性，所以 5-FC 常與 amphotericin B 或者 azole 類的藥物，如 fluconazole 結合使用 (Sheehan, 1999)。在本實驗中，將 parental strain 長於 E-test 藥盤上，48 小時後在 5-FC 抑菌圈裡就可以很清楚看到衍生株菌落的產生，甚至有些菌株在 24 小時就可以看到菌落。有可能是當 *C. tropicalis* 在 5-FC 的藥物篩選壓力下，48 小時之內就可以啟動已存在的抗藥機制來做反應，或者有些抗藥性突變株早已存在於自然族群中，現在經由藥物篩選出。之後將所收集的衍生株以及其 parental strain 總共 102 株菌 (35 組) 進行 MIC 分析，比較每一組對 5-FC 感受性的差異，發現所有的 parental strain 都是屬於敏感性的，但是超過 80% 組別的衍生株已達到抗藥的程度 ($MIC \geq 32 \mu\text{g/ml}$)，所以無論機制為何，*C. tropicalis* 對於 5-FC 是能有效地達到抗藥的結果。

5.2 探討 *URA3*、*FUR1*、*FCY1*、*FCY2* 序列與不同物種間 5-FC 抗藥性的產生

根據 MIC 結果挑選有興趣的 13 組 (38 個菌株，表一編號以紅色底線標示者)，並將挑選原則詳細列於結果 4.1。根據前人研究 pyrimidine de novo pathway 中的基因變異，例如：造成 *URA3* 的大量表現，或對受質親和力變佳，會增加 UMP 合成，與 5-FC 的代謝物進行競爭，這是可能的抗藥機制之一 (Hope *et al.*, 2004; Polak, 1977)。以及 UV 處理 *C. albicans* (Fasoli and Kerridge, 1988) 和 *Saccharomyces cerevisiae* (Jund and Lacroute, 1970) 的實驗顯示，發現破壞任何與 pyrimidine salvage pathway 上相關蛋白質或是影響其相關調控會對 5-FC 產生抗藥性，所以我們就從

pyrimidine de novo pathway 的 *URA3* 和 salvage pathway 的 *FUR1*、*FCY1*、*FCY2* 這四個基因進行序列分析

首先，*URA3* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase, ODCase) 的結果只有 YM020112 在第 791 個核苷酸是 C/T 的異型合子，其抗藥衍生株 R1 和 R2 都是 T/T 的同型合子，分別在 ODCase 第 264 個胺基酸為 Thr (ACC) 和 Ile (ATC) 是有差異，其他組 parental strain 與抗藥衍生株之間序列一致，組別之間的差別則是除了 YM020347 和 YM020715 與其抗藥衍生株第 791 個核苷酸是 C/T 之外，其他組別則都是 C/C。至於核苷酸 791 的改變是否對於 *URA3* 功能有影響，故造成對 5-FC 感受性變化，有待更多的證據。*URA3* 的相關研究，由 Desnos-Ollivier 等人分析所收集的 *C. tropicalis* 臨床菌株時，發現 5-FC 敏感株在 529 nt 的位置不是 A/A 就是 A/G，但是抗藥株則是 G/G (Desnos-Ollivier *et al.*, 2008)，但是本實驗的菌株無論是敏感株或是抗藥衍生株都是 A/A 的同型合子型，並沒有發現相同的狀況。

FUR1 (uracil phosphoribosyl transferase, UPRT) 分析結果顯示所有組別 parental strain 和抗藥衍生株之間沒有不同，但是組別之間主要在 21、93、237、501 和 507 核苷酸位置有 SNP 的差異，但是這些變化不會改變 UPRT 的胺基酸組成，將這些 SNP 差異和分離出菌株的醫院與採集的部位，如血液、尿液做比較，沒有找到任何關連。UPRT 在 *C. tropicalis* 目前沒有相關的研究文獻，但在 *S. cerevisiae* 中 UPRT 胺基酸 134 被報導過和 5-FC 抗藥性有關連 (Kern *et al.*, 1991)，在 *C. albicans* 有研究指出，在同源位置核苷酸 301 的位置是同型合子型 C/C 對 5-FC 是敏感的，異型合子型 C/T 較不敏感，T/T 則會有抗藥性 (Dodgson *et al.*, 2004)，同年 Hope 等人的研究也指出在相同位置胺基酸 101 由 Arg (CGT) 被置換成 Cys (TGT) 與 5-FC 抗藥性有關。根據 *Toxoplasma gondii* 的 UPRT 3D 結晶結構所提供的訊息 (Schumacher *et al.*, 1998, and 2002)，推測 *C. albicans* 的 UPRT 胺基酸 Arg101 可能與 Asp36 產生鹽橋 (salt bridge) 後，以靜電力 (electrostatic force) 形成二聚體 (dimer)，再聚合成四聚體 (tetramer)，才使

UPRT 有適當酵素活性，所以如果 Arg101 被取代成 Cys 則無法與 Asp36 產生鹽橋 (Hope *et al.*, 2004)。

FCY1 (cytosine deaminase) 在 38 株菌中的序列完全一致，表示這個基因是非常保守的。在 *Candida lusitanae* 的研究發現 *FCY1* 核苷酸 26T 置換為 C，產生 missense mutation 使第 9 個胺基酸由 Met 變成 Thr，會對 5-FC 產生抗藥性 (Florent *et al.*, 2009)，另外，同一個團隊研究 *FCY2* 突變也有相同結果，而且當 5-FC 和 fluconazole 同時存在時，不管 *FCY1* 或是 *FCY2* 的突變都會產生交互抗性 (cross-resistance)，推測可能的機制是在細胞之外 5-FC 是 fluconazole 運送吸收的競爭抑制物 (competitive inhibitor) (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005; Papon *et al.*, 2007)，在 *C. tropicalis* 是否有相同競爭現象需要更進一步研究。

最後是 *FCY2* (purine-cytosine permease, PCP) 序列分析，在組別之間 ORF 主要在 102、225、273、750 和 756 nt 發現有差異，比較不一樣的是組別 YM020112、YM020291、YM020347、YM020743、YM060088 和 YM060800 這六組抗藥衍生株和 parental strain 序列比較後，在抗藥衍生株中發現原本的 SNP 消失，變成同質序列，發生了 Loss of heterozygosity (LOH) 的現象。在 102、225、750 和 756 nt 的 SNP 差異不會造成 PCP 胺基酸組成改變，但是原本在第 273 個核苷酸是 G/T 的異質合子型的 parental strain，所轉譯的 PCP 在第 91 個胺基酸分別是 Met (ATG) 和 Ile (ATT)，而抗藥衍生株從定序結果顯示只有轉譯為 Ile 的 T 股序列，會不會是因為 T 股轉譯的 PCP 在第 91 個胺基酸的突變造成功能性的影響，以致於產生抗藥？另外，也將這六組定序 *FCY2* 上下游 500 bp 找到各有 5 個和 1 個 SNP，所以也有可能因為 T 股的 promoter 上面的訊號區突變造成 *FCY2* mRNA 的表現量下降，造成其基因產物 PCP 產量不足，使得 5-FC 無法經由 PCP 運送進入菌體內代謝達到抗菌效果，因此產生抗藥性。

為了驗證 *FCY2* 的 LOH 現象與 5-FC 抗藥性有關，挑選抗藥衍生株與 parental strain 之間 SNP 差異較少的 YM020291 (表四)，以 *SAT1*

flipper 進行 G 股和 T 股同源重組置換與單股缺陷性突變，得到兩股相同的同質合子型置換株和單股缺陷突變株，測試對 5-FC 的感受性。結果如圖十二所示，發現 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 同質置換株和 *FCY2*(273G)/*fcy2*△ 單股缺陷突變株比 YM020291 更敏感一點，至於 *FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 同質置換株和 *FCY2* (273T)/*fcy2*△ 單股缺陷突變株則是比 YM020291 更加地抗藥 ($\geq 64 \mu\text{g/ml}$)，故抗藥衍生株不論是在 G 股發生缺失了包含 *FCY2* 的部分片段，或者是因為 recombination 將 G 股置換成 T 股，都能因此得到抗藥性，證實了 *FCY2* 的 LOH 現象與 5-FC 抗藥性有關。由於定序同質合子型置換株的上游序列確認置換範圍，結果都有置換到上游 -69、-224 的 SNP 位置，因此 *FCY2* 的 LOH 產生抗藥的原因則有兩種可能：第一，T 股轉譯的 PCP 在第 91 個胺基酸變成 Ile，可能造成功能性突變，例如：使 PCP 失去運送 5-FC 的能力；第二，T 股上游的 SNP 為 promoter 訊號區，因為突變造成 *FCY2* mRNA 的表現量下降，使 5-FC 無法經由 PCP 運送進入菌體。因此 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 和 *FCY2*(273G)/*fcy2*△ 會比 YM020291 (*FCY2* (273G)/*FCY2* (273T)) 更敏感的原因，可能是他們 *FCY2* 所產生的 PCP 具有正常功能，或是 *FCY2* mRNA 表現量正常。針對 *FCY2* 上游 -69、-224 的 SNP 位置是否位於可能的調節序列中，如 TATA box (5'-TATA(A/T)A(A/T)(A/G)-3') (Basehoar *et al.*, 2004)，經比對發現 -314~-307 有可能是 TATA box，序列為 5'-TATATATA-3'，但 -69、-224 則不在已知調節序列中。

本實驗序列分析之 13 個 parental strains 將 *URA3*、*FUR1*、*FCY1* 及 *FCY2* 序列的 SNP 位置差異與菌株分離的來源區域進行統整比較，沒有發現兩者之關連性。另外，挑選在 E-test 對 5-FC 非常敏感並且 72 小時抑菌圈沒有長出抗藥衍生株的 YM020367、YM020649、YM060302 和 YM060559 定序 *FCY2* ORF 做為對照，發現他們都是在 273 為 G/G 同質合子型。所以推測這些菌株對 5-FC 如此敏感的可能原因，也許是因為在藥物篩選下即使 LOH 機制啟動，但因他們只有 G 股，沒有 T 股可作為置換模版，因此無法產生抗藥衍生株。

5.3 Loss of heterozygosity (LOH) 發生機制探究與抗藥性產生的關係

最早在某些癌症高危險群中發現他們在癌症相關基因為異型合子型 (heterozygosity)，例如 tumor suppressor，原本一股 (wild type allele) 有正常功能，但另一股 (non-functional allele) 因突變失去功能，可能在 wild type allele 發生了 chromosome loss 或缺失了部分片段，也可能因為 recombination 將 wild type allele 置換成 non-functional allele，於是細胞不正常增生，故導致癌症發生，以上的基因變化，稱為 Loss of heterozygosity (LOH) (Cavenee *et al.*, 1983; Carr and Gottschling, 2008)。在 *C. albicans* 有研究指出 LOH 與 azole 抗藥性有關。Azole 類藥物 efflux pump-*CDR1*、*CDR2* 的轉錄因子 *Tac1*，因為 LOH 讓兩股變成 hyperactive mutated alleles，使 *CDR1* 和 *CDR2* 大量表現，或者是 LOH 發生在同樣的位於 chromosome 5 上的 azole 標的基因 *ERG11* 導致兩股為 mutant allele，使藥物無法與其結合作用 (Coste *et al.*, 2007)，以及在另一個 efflux pump-*MDR1* 的轉錄因子 *MRR1* 也發生 LOH 造成 azole 抗藥 (Dunkel *et al.*, 2008)。

LOH 發生的原因可能是 gene conversion、allelic recombination/break-induced replication，或者是 chromosome loss 和 reduplication 所導致 (Coste *et al.*, 2007)，這些過程與 DNA repair 相關。Legrand *et al.* 將 *C. albican* 中與 mismatch repair (MMR) (*MEH1*、*PMS1*) 和 double-strand break repair (DSBR) (*MRE11*、*RAD50*、*RAD52*、*YKU80*) 的相關基因剔除，研究指出 MMR mutant (*msh2*△/*msh2*△、*pms1*△/*pms1*△) 和 DSBR mutant (*rad50*△/*rad50*△) 在 fluconazole 的 E-test 抑菌圈產生抗藥菌落的頻率增加，Legrand *et al.* 研究顯示 DNA repair pathway、genome instability 與藥物抗藥性是彼此連結的 (Legrand *et al.*, 2007)。因此在本實驗於 *FCY2* 發現有 LOH 現象之菌株也許在 DNA repair 的機制有缺陷，故造成 genome 的不穩定，使得 LOH 發生，這可做為未來研究的方向之一。

5.4 Purine-cytosine permease (PCP) 在不同物種間對於抗藥性的相關研究和蛋白質相似度

Purine-cytosine permease (PCP) 可運送 adenine、hypoxanthine 和 cytosine，以 proton gradient 作為運送物質能量 (Vanden Bossche *et al.*, 1987)，5-FC 則是 cytosine 類似物 (fluorinated analogue)，也可被 PCP 所運送，是 cytosine 的 competitive antagonist (Polak and Grenson, 1973)。在 *S. cerevisiae* 中已有研究指出 *FCY2* 發生突變會造成 5-FC 抗藥性 (Jund and Lacroute, 1970; Chevallier *et al.*, 1975)，並且 Paluszynski *et al.* 發現 *FCY2* 突變株只在 5-FC 濃度低時有抗藥性，濃度高還是會抑制生長，表示可能還有其他 5-FC 吸收途徑存在，於是找到同樣位於 chromosome 5 的同源基因 *FCY21* 和 *FCY22*。他們分別與 *FCY2* 有 89% 和 85% 相似度 (Wagner *et al.*, 2001; Paluszynski *et al.*, 2006)，以基因剔除研究，發現同時失去三個基因，對 5-FC 抗藥性比起任何一個基因單一突變效果更好。除此之外，作者也提出 *TPN1*、*FUR4* 和 *yOR071c* (Stolz and Vielreicher, 2003; Seron *et al.*, 1999; Enjo *et al.*, 1997) 也可能是參與 5-FC 運送的 permease (Paluszynski *et al.*, 2006)。在 *C. albicans* 中則有四個可能的 PCP 同源基因：*FCY21*、*FCY22*、*FCY23* 和 *FCY24*，根據 PCP 輻射系統發生樹分析，*C. albicans* 的 *FCY21* 和 *FCY22* 與 *S. cerevisiae* 運送 cytosine 的 *FCY2* 比較接近 (Schmidt *et al.*, 1984; Weber *et al.*, 1990)，*FCY23* 和 *FCY24* 則是與負責運送維他命 B6 的 *Tpn1* 親源關係較近 (Stolz and Vielreicher, 2003)，所以 *FCY21* 和 *FCY22* 可能是運送 5-FC 的 PCP 基因，另外，有臨床分離抗藥性菌株在這兩個基因上發現胺基酸取代現象，但是目前仍需要相關文獻提出有力的證據證實是否相關 (Hope *et al.*, 2004)。在本研究中，證實了 *C. tropicalis* 的 *FCY2* 基因的 LOH 現象與 5-FC 抗藥性產生有關，其中一個可能的原因為 PCP 的第 91 個胺基酸可能扮演重要功能。把 *C. tropicalis* 的 *FCY2* 蛋白質序列與 *S. cerevisiae* 的 *FCY2*、*FCY21*、*FCY22* 和 *C. albicans* 的 *FCY21* 和 *FCY22*，以及另一個 *C. tropicalis* 可能的 PCP-CTRG00460 進行蛋白質序列比對，結果整理於圖十三。目前 PCP

蛋白質結構功能在 *S. cerevisiae* 研究比較透徹，在親水性片段 371-377 (I-A-N-N-I-P-N) 功能為產生正確的 3D 結構，其中 Pro376 在 translocation 的過程中形成二級 β -turn motif，扮演一個動態的角色 (Ferreira *et al.*, 1997; 1998, and 1999)，另外，Ser272 則是在牽涉 translocation 過程的親水性孔洞的一部份 (Ferreira *et al.*, 1999)，但是 *C. tropicalis* 的 PCP 第 91 個胺基酸都不在這幾個位置，比對結果顯示也非保守的胺基酸，所以這個位置可能是 *C. tropicalis* 的 PCP 重要功能胺基酸。至於 *C. tropicalis* 另一個可能的 PCP 是 CTRG00460 與自己的 *FCY2* 比對後只有 48% 的相同度 (identity)，但和 *C. albicans* 的 *FCY22* 有 75% 的相同度；反過來，*FCY2* 與 *C. albicans* 的 *FCY21* 比對則有高達 85% 的相同度，也許代表著雖然他們都是 PCP，但是在細胞中在運送物質上扮演的不同的角色。

5.5 其他可能牽涉 5-FC 抗藥機制討論

在這 13 組 (38 株菌) 的序列分析中只有 6 組 (18 株菌) 找到 *FCY2* 基因的 LOH 現象與 5-FC 抗藥性產生有關，代表 *C. tropicalis* 仍然有其他的機制涉及 5-FC 抗藥，有待研究。底下推測可能其他的機制：第一，另一個可能的 PCP 是 CTRG00460 序列突變造成的抗藥性，有待序列的分析；第二，由於 *C. tropicalis* 的 genome database 尚未建構完成，所以可能還有其他 PCP 參與 5-FC 運送至菌體內的過程；第三，除了 *URA3* 之外的 pyrimidine 生合成的 de novo pathway 基因發生序列變化，或基因表現量改變，或者是還有其他的途徑共同參與，以上都有可能是發生抗藥性的原因，有待更進一步的研究。

六、緒 論 II

6.1 *Candida albicans* 介紹

Candida albicans 是僅次於 *Enterobacteriaceae*、*Staphylococcus aureus* 及 *Pseudomonas* 的院內感染第四大真核生物感染源 (Calderone, 2002)，也是臨床上的念珠菌感染最主要的病原菌。*C. albicans* 是雙倍體真菌，目前只發現以無性生殖繁殖 (Pujol *et al.*, 1993)。約有 80% 健康人可在口腔、腸胃道及生殖道發現它的蹤跡，是人類常見伺機性共生真菌，但是當宿主免疫力低落或缺損，便會造成念珠菌感染症。大約有 70% 婦女有過念珠菌屬 (*Candida* spp.) 所造成的陰道感染經驗，其中有 20% 深受反覆復發之苦 (Fidel *et al.*, 1999)。在台灣，台大醫院研究報告指出，於 1994~2000 年共有 1095 件院內感染念珠菌菌血症 (candidemia) 案例，其中 50.4% 為 *C. albicans* 導致 (Chen *et al.*, 2003)。由於目前真菌治療藥物有限，當演變為傳播性念珠菌感染 (disseminated *Candida* infection) 致死率 (mortality) 高達 25%~60% (Gudlaugsson *et al.*, 2003)。

6.2 Azoles 類藥物抗藥分子機制

目前有許多抗真菌藥物在臨床上使用，但是由於藥物大量且重複性使用造成抗藥性菌株的產生，使得近年來臨床治療失敗的案例增加。所以我們希望透過研究 *C. albicans* 抗藥機轉來找尋新的藥物標的，發展新一代抗真菌藥物 (Berman and Sudbery, 2002)。

其中 azoles 藥物因產生細胞毒性較小，是臨床最常使用的抗真菌藥物。在 *C. albicans* 目前已知的 azoles 類抗藥機制有：(1) Ergosterol 生合成途徑中的酵素發生改變，例如：azoles 藥物標的 *ERG11* 的大量表現 (overexpression)，或因突變而造成與 azoles 親和力下降；(2) Efflux pump 的大量表現，將 azoles 類藥物排出菌體外，使藥物無法累積於菌體內，這是目前認為最主要的 azoles 抗藥機制之一 (Lamp *et al.*, 1999; Sanglard *et al.*, 1998)。這類抗藥 efflux pump 已知有兩大類：major facilitator superfamily

(Multidrug Resistance 1, *MDR1*) (Sanglard *et al.*, 1995; Franz *et al.*, 1998) 和 ATP-binding cassette transporter family (*Candida* drug resistance genes, *CDRs*) (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1995 and 1997), 其中 *MDR1* 大量表現主要造成 fluconazole 抗藥性, 然而 *CDR1* 和 *CDR2* 則是對 fluconazole、itraconazole 和 voriconazole 等多種 azoles 產生抗藥有關 (Coste *et al.*, 2006)。 *MDR1*、*CDR1* 和 *CDR2* 已有研究指出在 azoles 抗藥菌株會被其他相關基因正向調節 (upregulation) 而大量表現 (Akins, 2005; Barker and Rogers, 2006)。

6.3 *Candida* drug resistance gene *CDR1* 介紹

CDR1 為 ATP-binding cassette (ABC) transporter family 之中最主要 azoles 抗藥幫浦 (Hernández *et al.*, 1998; Niimi *et al.*, 2004), 由 Prasad *et al.* 將 *CDR1* 轉形至 *Saccharomyces cerevisiae* 的 *pdr5/pdr5* 同型缺陷突變株中, 發現對於 cycloheximide、chloramphenicol、miconazole、oligomycin、nystatin 和 2,4-dinitrophenol 會發生抗藥現象 (Prasad *et al.*, 1995)。如同 ABC transporter family 的典型結構, Cdr1p (約 170 kDa) 具有兩個高度疏水性穿膜區域 (transmembrane domains, TMD) 及兩個位於細胞質內側的親水性核苷酸結合區域 (nucleotide-binding domains, NBD)。每一個 NBD 伴隨著一個由六個跨膜區段 (transmembrane segments, TMS) 所組成的 TMD, TMS 決定 Cdr1p 的受質特異性 (substrate specificity) (Prasad *et al.*, 1995), Cdr1p 受質種類廣泛, 包括 azoles 藥物、脂質及類固醇 (Krishnamurthy *et al.*, 1998; Dogra *et al.*, 1999; Saini *et al.*, 2005)。

研究指出在 azoles-resistant 臨床菌株的 *CDR1* mRNA 表現量高於 azoles-susceptible 臨床菌株 (White, 1997; Sanglard *et al.*, 1995), 並且 *cdr1/cdr1* 同型缺陷突變株對 azoles 藥物敏感性增加 (Coste *et al.*, 2004)。但目前對於 *CDR1* 的調控及抗藥性產生之間的分子機制與基因調節網絡瞭解不多, 因此透過瞭解 *CDR1* 如何被 cis- 和 trans-acting factor 所調控對於探究抗藥性產生是很重要的。

6.4 *CDR1* 的 cis-和 trans-acting factor

6.4.1 Cis-acting factor

研究指出 *CDR1* promoter 不止與多種藥物作用，如：miconazole、fluconazole、nystatin 以及 vinblastine，也會被人類的類固醇與其他環境因素所刺激 (Krishnamurthy *et al.*, 1998)。經由 *CDR1* promoter 連續刪除分析 (serial deletion analysis)，發現 promoter 近端區域 (-345/+1) 包含多個藥物調控區域，而由 miconazole 所作用的 AP-1 site (TGACCCA) 則位於遠端區域 (-857/-1147) (Puri *et al.*, 1999)。Micheli *et al.* 找到了 *CDR1* promoter 內的 drug response element (DRE) 序列位於 -460~-440，序列為 5'-ACGG(A/T)TATCGGATATTTTTT-3'，為正向調控 *CDR 1* 所必需，另外，也發現了一個位於 -860~-810 的 basal response element (BRE) (de Micheli *et al.*, 2002)。Karnani *et al.* 則找到可被類固醇所調控的 steroid response element (SRE)，經由刪除分析研究更進一步發現了只與 progesterone 作用的 SRE1 (-667~-648) 與對 β -oestradiol 及 progesterone 兩者皆有反應的 SRE2 (-628~-598) 序列，它們對類固醇有極高的專一性，不受其他藥物影響 (Karnani *et al.*, 2004)。Gaur *et al.* 找到了一個位於 -272~-265 負向調控因子 (negative regulatory element, NRE)，並且純化了一個能與 NRE 結合的核蛋白，此蛋白可能參與了調控 *CDR 1* 的表現 (Gaur *et al.*, 2004)。

6.4.2 Trans-acting factor

下列為已知的 *CDR1* trans-acting factor

(i) Tac1p :

為 *CDR1* 及 *CDR2* 的轉錄因子 (transcriptional factor)，具有 Zn(2)-Cys(6) motif 的鋅指狀蛋白 (Coste *et al.*, 2004)。實驗發現 Tac1p 可以與 *CDR1* promoter 上的 drug response element (DRE) 結合，因為 DRE 上有兩個 CGG 序列為典型 Zn(2)-Cys(6) motif 的轉錄因子 DNA 結合區域

(DNA-binding domain)。 *tac1/tac1* 同型缺陷突变株於 fluphenazine 誘導下便無法正向調控 *CDR1* 表現，且此菌株對於 fluphenazine、fluconazole 及 terbinafine 敏感性提高，但在置入單套 *TAC1* 基因的 *tac1/tac1::TAC1* 補救株此現象可以被彌補回來。將 azole-resistant 臨床菌株的 *TAC1* hyperactive allele 置入 *tac1/tac1* 同型缺陷突变株中發現造成 *CDR1* 及 *CDR2* 持續高表現量。以上結果可知 Tac1p 為 *CDR1* 和 *CDR2* 轉錄活化因子 (transcriptional activator) (Coste *et al.*, 2004 and 2006)。

(ii) CaNdt80p :

為 *S. cerevisiae* 在減數分裂中出現的轉錄因子 ScNdt80p 的同源蛋白 (Chu *et al.*, 1998)。由 Chen *et al.* 在 *S. cerevisiae* 中，以 *CDR1* promoter-*lacZ* 為報導系統篩選 *C. albicans* genomic library 所得之假定轉錄因子。於 *C. albicans* 將 *CaNDT80* 剔除後的同型缺陷突变株會提高對 azoles 藥物 fluconazole、voriconazole 和 miconazole 敏感性，並且 Real-time PCR 實驗中，在 miconazole 誘導下 *CDR1* 表現量降低，僅剩原來的 15% 左右 (Chen *et al.*, 2004)。以上結果顯示，CaNdt80p 為 *CDR1* 正向轉錄因子。

(iii) Cka2p :

此蛋白與真核動物 serine/threonine 蛋白激酶 (protein kinase) CK2 具有催化能力的 α -subunit 有相當程度的相似度，尤其以 *S. cerevisiae* 的 Cka2p 最相近，相似性高達 65%。研究指出 *cka2/cka2* 同型缺陷突变株對 fluconazole 敏感性降低。於 northern blotting 實驗發現，*cka2/cka2* 同型缺陷突变株的 *CDR1* 和 *CDR2* 表現量提高了 3~5 倍。由以上結果作者推論 Cka2p 可能為 *CDR1* 和 *CDR2* 之負向調控因子 (negative regulator) (Bruno and Mitchell, 2005)。

6.5 論文研究目的 II

先前實驗室為了篩選出白色念珠菌抗藥幫浦 *CDR1* 的調控者，於 *S. cerevisiae* 中利用 *CDR1 promoter-lacZ* 作為報導系統進行 *C. albicans* genomic library screening，發現 *CaNDT80* 可以正向調控 *CDR1* 的表現。將 *C. albicans* 的 *CaNnt80p* (672 aa) 與 *S. cerevisiae* 的 *ScNnt80p* (592 aa) 進行序列比對後，發現具有同源性。其中 *CaNnt80p* 的 DNA 結合區 (DNA-binding domain) 胺基酸序列 221~592 與 *ScNnt80p* 的 DNA 結合區胺基酸序列 1~330 有 35% 一致性 (identity) 和 53% 相似度 (similarity)。有趣的是 *CaNnt80p* N 端的活化區 (activation domain) 和 *ScNnt80p* C 端的活化區沒有任何相似性，這是一段全新的序列沒有人研究過它的功能 (Chen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006)。故本實驗目的為：

- (1) 在 *CaNnt80p* 活化區製造 random mutation 建構成一個 library，於 *S. cerevisiae* 中利用 *CDR1 promoter-lacZ* 作為報導系統進行篩選，要找出 *CaNnt80p* 活化區哪些胺基酸對於正向調控 *CDR1* 的表現扮演重要的角色。
- (2) 建構具有篩選性的質體，除去 random mutation DNA 片段中帶有不要想要的突變，如：nonsense 及 frameshift mutation，以便於後續篩選 *CaNnt80p* 活化區重要胺基酸的研究。

七、材 料 II

7.1 菌株(strains)

1. 大腸桿菌 (*Escherichia coli*) : DH5 α 、BL21(DE3)

2. 啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

Strains	Genotype	Reference
Sigma10560-2B	ura3-52 his3::hisG leu2::hisG	
SLO121	YIp363- <i>CDR1</i> p348- <i>lacZ</i> -ade3 integrated in <i>ADE3</i> locus in Sigma10560-2B	本研究
SLO122、123	B2803 in SLO121	本研究
SLO124、125	LOB45 in SLO121	本研究
SLO126、127	LOB280 in SLO121	本研究

3. 白色念珠菌 (*Candida albicans*)

Strains	Characteristic
YM990348	Low <i>CDR1</i> expression level

7.2 質體(plasmids)

Strains	Characteristic	Reference
YIP363	在 <i>S. cerevisiae</i> 篩選標記 <i>LEU2</i> ; 在 <i>E. coli</i> 篩選標記 ampicillin	YIp363 from YEp363 & YIp351
B2803 (pRS426)	在 <i>S. cerevisiae</i> 篩選標記 <i>URA3</i> ; 在 <i>E. coli</i> 篩選標記 ampicillin	Christianson <i>et al</i> , 1992
LOB45	B2803 含 <i>CaNDT80</i> 基因全長	Chen <i>et al.</i> , 2004
LOB238	Yip363-CaErg11 promoter sequence1 plus Ade3	Lo lab
LOB280	B2803 含 <i>CaNDT80</i> 基因全長並且在 start codon 前另加限制酵素切位 <i>Afl</i> II (附錄二)	附錄二

LOB285	YIP363- <i>CDR1</i> ₃₄₈ promoter- <i>ade3</i>	本研究
LOB295	改造 pGEM-T easy vector，並使用 kanamycin resistant gene 作為隨機突變片段的篩選標記	本研究
LOB137	pET-43.1a (+)-Factor Xa	中研院
LOB323	pET-43.1a (+)-Factor Xa 去除 <i>BstE</i> II	本研究
LOB324	改造 LOB323，並使用 chloramphenical resistant gene 作為隨機突變片段的篩選標記	本研究
LOB325	改造 LOB323，並使用 kanamycin resistant gene 作為隨機突變片段的篩選標記	本研究

7.3 引子 (primers)

Name	Sequence (5'→3')	position
HJL21	TTTCCCGGGGGATCCTCGTTACTCAA	<i>CDR1</i> : -1207~-1190
HJL22	CCCAAGCTTGCATAATTTTTTCTTTTTGA CCT	<i>CDR1</i> : +3~-20
HJL61	CATATCGGTCCCCACACAAT	<i>CaNDT80</i> : +927~+908
HJL238	gTTTTgCTTACTgTggAggAg	<i>CaNDT80</i> : +1786~+1766
HJL321	CAAACGGAACGACTGAGGAA	<i>CaNDT80</i> : -558~-539
HJL477	ATTgaattcATGAATCAAACCTCTTGTCAGAA	<i>CaNDT80</i> : +1~ +22
HJL1130	CAACATTTCCAACAACAAATtCACCCCTCAATTACACCA C GA	<i>CaNDT80</i> : +397~+437
HJL1131	TCGTGGTGTAATTGAGGGTGaATTTGTTGTTGGAAATG	<i>CaNDT80</i> :

	TTG	+437~+397
HJL1132	AACATTTCCAACAACAAATGgACCCTCAATTACACCAC GAG	<i>CaNDT80</i> : +398~+438
HJL1133	CTCGTGGTGTAATTGAGGGTcCATTGTGTTGGAAAT GTT	<i>CaNDT80</i> : +438~+398
HJL1134	CACCATTTCCGGTCACCAAgTTCCAGCCCCCCTGCTC	<i>CaNDT80</i> : +529~+565
HJL1135	GAGCAGGGGGGGCTGGAAcTTGGTGACCGAAATGGT G	<i>CaNDT80</i> : +565~+529
HJL1136	CAGCAGCAACAACAACAACATTTGCACCATTTTCG GTCAC	<i>CaNDT80</i> : +499~+543
HJL1137	GTGACCGAAATGGTGCAAATGTTGTTGTTGTTGTTGCT GCTG	<i>CaNDT80</i> : +543~+499
HJL1362	GGGCCC TCAGGGCGCAAGGGCTGC	<i>Kan^r</i> : -333~-316
HJL1363	GGGCCCAATCATGCGAAACGATCCTC	<i>Kan^r</i> : +6~-18
HJL1364	GAGCTCGCTTAAGGGAGGAGGTCACCAAGATGGATTG CACGCAGG	<i>Kan^r</i> : +11~29
HJL1365	GAGCTC ACTCTTCCTTTTTCAATTCAG	<i>Kan^r</i> : +795~+774
HJL1457	CATATGCTTAAGGGAGGAGGTCACCGAGAGAAAAA ATCACTGGATATAC	<i>CAT</i> : +4~+26
HJL1458	CTCGAGTTACGCCCCGCCCTGCCACTC	<i>CAT</i> : +660~+640
HJL1459	CATATGCTTAAGGGAGGAGGTCACCGAATTGAACAAG ATGGATTGCAC	<i>Kan^r</i> : +4~+24

HJL1460	CTCGAGTCAGAAGAAGACTCGTCAAGAAG	<i>Kan^r</i> : +795~+775
HJL1461	GAGCATCTGGTCGCATTGGGACACCAGCAAATCGCGC TGTT	<i>lacI</i> : +514~+554
HJL1462	AACAGCGCGATTTGCTGGTGTCCCAATGCGACCAGAT GCTC	<i>lacI</i> : +554~+514
HJL1508	GCCTATATCGCCGACATCAC	in LOB137
HJL1509	CGGTGCCTAATGAGTGAGC	in LOB137

7.4 藥品試劑

- Amersham Biosciences : rTaq DNA polymerase (Cat. No. 27-0798-06)
- BIO-RAD: 50 x TAE (Cat. No. 161-0773)
- Difco laboratories :
Bacto agar (Cat. No. 214040), LB agar (Cat. No. 244520), yeast nitrogen base w/o amino acid (Cat. No. 291940), LB broth (Cat. No. 244620), YPD broth (Cat. No. 242820), BHI (Cat. No. 0037-17)
- Invitrogen :
Agarose (Cat. No. 15510-027), 1kb plus DNA ladder (Cat. No. 12308-011)
- NEB : Calf intestinal(CIP), Restriction Enzymes
- Promega : T4 DNA ligase(Cat. No. M-1801)
- Sigma Chemical Co. :
Disodium ethylenediamine-tetraacetate (EDTA) (Cat. No. E-5134), Glass – beads (425~600μm) (Cat. No. G9268-500G), Histidine (Cat. No. H-8125), Lithium acetate(CH₃COOLi)(Cat. No. L-6883), L-leucine (Cat. No. L-8000), Polyethylene Glycol3350 (PEG3350) (Cat. No. P4338), Uridine(Cat. No. U-3003).
- E Merck. Germany:

Chloroform (Cat. No. 1.0244511000), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Cat. No. S26740), Ethanol (Cat. No. K33534874), Ethidium bromide (Cat. No. K27928515), Glucose (Cat. No. K33069537), N,N-dimethylformamide (Cat.No. K27226853), Potassium chloride (KCl) (Cat. No. K24252236), Isopropanol (Cat. No. K32632434), Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Cat. No. A375692), Sodium hydroxide (NaOH) (Cat.No.B886298), Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrogen chloride (Tris-HCl) (Cat.No.8382T006), Sodium chloride (NaCl) (Cat. No. K29779304), Triton X-100 (Cat. No. K23841503)

● USB:

Glycerol (Cat.No.US16374), phenol: chloroform: isoamyl alcohol (Cat. No US75831)

7.5 緩衝溶液 (buffers)

● 10 x TE buffer (pH 7.5 & pH 8.0):

20 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5& 8.0), 8 ml 0.25M EDTA (pH 8.0) 加無菌二次水至體積 200 ml

● 50 mM CaCl_2

3.68 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 加無菌二次水至 500 ml

● 50% PEG₃₃₅₀:

200 g polyethyleneglycol₃₃₅₀ 加無菌二次水至體積 400 ml

● 40% Dextrose:

40 g Dextrose 加無菌二次水至體積 100 ml

● 10X (1 M) Lithium Acetate (LioAc):

40.8 g Lithium Acetate加無菌二次水至體積400 ml

● Breaking buffer:

2 ml 100% Triton X-100, 10 ml 10% SDS, 5 ml 2M NaCl, 1 ml 1M Tris – HCl (pH8.0), 0.4 ml 2.5M EDTA 加無菌二次水至體積 100 ml

- Z buffer (pH 7.0):
16.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5.5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75 g KCl, 0.246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.7 ml β -mercaptoethanol 加無菌二次水至體積 1000 ml
- 1.1X TE/LioAc solution (現配現用)
1.1 ml 10 x TE buffer, 1.1 ml 1 M Lithium Acetate 加無菌二次水至體積 10 ml
- PEG/LioAc solution (現配現用)
8 ml 50% PEG3350, 1 ml 10X TE buffer, 1 ml 1M LioAc
- X – gal stock (40 mg/ml in DMF)
- Z buffer/2ME/X-gal (10 ml/14 μl /84 μl) (現配現用)

7.6 培養液和培養基

- DYT
1.6 g Tryptone, 1 g Yeast extract, 0.5 g NaCl 加無菌二次水至體積 100 ml
- BHI broth: (Difco, Cat. No. 0037-17)
33.7% Calf brain infusion solids, 13.5 % Beef heart infusion solids, 27 % Proteose peptone, 5.4 % Glucose, 13.5 % Sodium chloride, 6.7 % Disodium phosphate
- LB (Lucia-Bertni) broth: (Difco, Cat. No. 244620)
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl
- LB/ ampicillin broth:
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin
- LB/ kanamycin broth:
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin
- LB/ Chloramphenicol broth:
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol

- SD broth: (Difco, Cat. No. 291940)
0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid, 2 % dextrose
- YPD borth: (Difco, Cat. No. 242820)
2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose
- YPD agar
2 % Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose
- SD (Synthetic Dextrose) agar: Non-selective agar
0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid, 2% dextrose, 2% agar
配製含有營養缺陷菌株所需之 SD 培養基時，需外加下述濃度之胺基酸
L-Histidine-HCl (Sigma H-9511) 20 mg/L
Uridine (Sigma U- 3003) 80 mg/L

7.7 濾紙：(β-gal colony-lift filter assay 實驗所需)

濾紙	for cololny growth	for assay
90 mm	Whatman # 50 (Cat. No. 1450 090)	Whatman # 3 (Cat. No. 1003 090)
150 mm	Schleicher & Schuel # (Cat. No. RPN137E)	Whatman # 3 (Cat. No. 1003 150)

八、方 法 II

8.1 易誤聚合酶連鎖反應 (error-prone PCR)

此方法用來產生隨機突變的 CaNDT80 活化區 DNA 片段，所使用的 DNA 模版是 LOB280。將下列物質混合於 0.5 ml 之微離心管：總體積為 50 μ l 的反應液中加入 5 μ l 的 10 X PCR buffer、1 unit rTaq DNA polymerase (5 unit/ μ l, GE Healthcare, Cat. No. 27-0798-06)、5 μ l 的 2.5 mM dNTP、5 ~ 9 mM 的 MgCl₂ (依照所要突變的頻率來決定所需濃度，本實驗的 library 使用的濃度是 7 mM)、50 μ M 的 Forward primer– HJL321 和 Reverse primer– HJL61 各 1 μ l、5 ng 質體 LOB280、無菌二次水。反應步驟為：(1) 95°C, 5 分鐘 (2) 95°C, 1 分鐘 (3) 50°C, 1 分鐘 (4) 72°C, 5 分鐘 (5) 重複 (2) ~ (4) 步驟 35 次 (6) 72°C, 8 分鐘 (7) 4°C 停止反應。

8.2 *E. coli* 轉形反應—電穿孔法 (electroporation) library scale

CaNDT80 活化區的隨機突變 library 使用的是 Lucigen 的轉形細胞 *E. coli* 10G SUPREME DUOs (Cat. No. 60080-1)，並依照說明書操作電穿孔轉形反應後，將菌液均勻塗於含 Ampicillin 的培養基上，放到 37°C 培養箱至隔天，將長出的菌落以細胞刮刀刮下溶於 30 ml 含 Ampicillin 的 LB Broth，取其中 5 ml 菌液存凍管，剩餘的菌液養在 500 ml 含 Ampicillin 的 LB Broth 以 37°C 培養 4 小時後，使用 Qiagen Inc 的產品 QIAGEN Plasmid Mega Kits (Cat. No. 12183)，並依照說明書純化取得 CaNDT80 活化區的隨機突變 DNA library 質體。

8.3 啤酒酵母轉形反應—LioAc method

8.3.1 製備啤酒酵母轉形細胞 (「」內體積或質量是 library-scale 轉形方法)

將啤酒酵母養在 3 ml YPD medium 中，於 30°C 以 150 rpm 震盪培

養 8~12 小時後，取 5 μ l 菌液轉養到 50 ml YPD medium 中，於 30°C 以 230~250 rpm 震盪培養 16~20 小時後 (OD_{600} 約 0.15~0.3)，室溫下以轉速 3000 rpm 離心 5 分鐘，「去除上清液，以 100 ml YPD 將細胞重新懸浮，震盪培養於 30°C 3 小時後 (最後 OD_{600} 約 0.4~0.5)，離心 5 分鐘」，去除上清液以 50 ml 無菌二次水清洗細胞，再離心 5 分鐘去除上清液，以 3 ml 1.1X TE/LiOAc 使細胞懸浮，分裝在兩個 1.5 ml 微離心管中，以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液後各加入 600 μ l 1.1X TE/LiOAc 混合均勻，製備好的啤酒酵母轉形細胞在室溫下備用。

8.3.2 轉形反應

將 1.5 ml 「15 ml」的離心管放在冰上預冷，加入 0.1–1 μ g 「1–10 μ g」欲轉形的 DNA、事先以 100°C 加熱 5 分鐘然後移至冰上急速冷卻的 5 μ l 「20 μ l」Herring Testes Carrier DNA (10 μ g/ml)，以及 50 μ l 「600 μ l」轉形細胞輕輕的混合後，再加入 0.5 ml 「2.5 ml」PEG/LiOAc solution 均勻混合，於 30°C 培養箱慢速旋轉 30 分鐘 「45 分鐘」，然後加入 20 μ l DMSO 混合，接著在 42°C 水浴槽，進行 15 分鐘 「20 分鐘」熱休克 (Heat shock) 反應，過程中每 5 分鐘 「10 分鐘」輕輕上下翻轉，結束後以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘 「5 分鐘」去除上清液後，「加入 3 ml YPD 在 30°C 震盪培養 90 分鐘後以轉速 13000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液」，加入 200 μ l 無菌二次水使細胞懸浮，取適量菌液均勻塗於適量的 100 mm 「150 mm」篩選 SD 培養基，於 30°C 培養 2~3 天，直到菌落長成適當大小。

8.4 β -galactosidase Colony Lift Filter Assay

將啤酒酵母培養在營養篩選的 SD 培養基上，在 30°C 培養箱中培養 2–3 天後，把啤酒酵母複印到有濾紙的新培養基上，於 30°C 培養至隔天。將長有菌落的濾紙邊緣以鉛筆做記號方便辨認方位，之後浸入液態氮中 10 秒後 (有菌落那一面朝上)，於室溫下回溫，此步驟重複兩次確保破菌完

全。在回溫的空檔以 Z buffer/2ME/X-gal 浸潤新濾紙（需浸潤完全，但溶液不會到處流動狀態），接著小心地將長有菌落的濾紙疊放在已經含有 Z buffer/2ME/X-gal 的濾紙上，兩張濾紙間若有氣泡可用鏢子趕走，最後放到 30°C 培養箱中進行反應，每隔 15~20 分鐘觀察呈色反應。

8.5 從啤酒酵母中萃取質體 DNA 並轉形到 *E. coli*

將啤酒酵母培養在 5 ml 篩選性的培養液中，在 30°C 培養箱中以 150 rpm 震盪培養 2 天後，取 1.5 ml 的菌液以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液，加入 0.2 ml Breaking Buffer、0.2 ml phenol-chloroform-isoamyl alcohol（25:24:1）和 0.3 g acid-washed glass beads，在室溫下以最大速度震盪以上混合物 10 分鐘，接著以轉速 13000 rpm 離心 5 分鐘，將含有質體 DNA 的水層移至乾淨的 1.5 ml 微離心管，取 5 μ l 進行 *E. coli* 的轉形反應，所使用的轉形細胞為 RBC Bioscience 的 Value 10⁸ HIT-DH5 α （Cat. No. RH617）。

九、結 果 II

9.1 建構 *CDR1*₃₄₈ promoter 驅動 *lacZ* 為報導基因的啤酒酵母 SLO121

建構 *CDR1* promoter 驅動 *lacZ* 為報導基因的啤酒酵母來篩選 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library，但為了避免篩選 library 時 β -galactosidase filter assay 的背景值太高，因此選用 *CDR1* 基礎表現量較低的臨床菌株 YM990348，利用其 *CDR1* promoter 來驅動 *lacZ* 表現。建構方式是以 YM990348 的 genomic DNA 為模版，用引子 HJL21 和 HJL22 夾出 *CDR1*₃₄₈ promoter (1.2 Kb)，利用引子上設計好的切位 *Hind* III 和 *Xma* I 接進 YIP363，再將用限制酵素 *Xma* I 從 LOB238 切下啤酒酵母 *ade3* 部分序列 (1.62 Kb) 接入。圖十四 (A) 為質體建構示意圖，並以限制酵素圖譜確認結構，如圖十四 (B) 所示菌落 #2 片段大小符合預期，將此質體命名為 LOB285。接下來如同圖十五 (A) 所表示，LOB285 以 *Xho* I 切開成為線性 DNA 後，轉形至啤酒酵母 10560-2B，利用 *ade3* 部分同源序列與染色體上的 *ADE3* 進行同源重組，再以營養篩選挑選出 *CDR1*₃₄₈ promoter-*lacZ* 片段進入 *ADE3* locus 的菌株，將所得的菌株命名為 SLO121。為了測試 SLO121 是否能夠因轉形的質體而有不同 β -galactosidase 活性，所以分別轉形 B2803 (空質體)、LOB45 (B2803 含 *CaNDT80* 基因全長) 和 LOB280 (B2803 含 *CaNDT80* 基因全長，並且在 start codon 前另加限制酵素切位 *Afl* II，請參照附錄二)，各挑五個轉形株 (transformant) 以 β -galactosidase filter assay 比較其呈色結果 (圖十五 (B))，菌株 *CaNDT80/CDR1p-YEP363* 作為正對照組。由圖十五 (B) 得知 LOB45 和 LOB280 的轉形株與正對照組的呈色沒有太大差異，都偏藍色，反過來 B2803 的轉形株呈色則是偏白色。所以將分別轉形 B2803、LOB45 和 LOB280 的轉形株各挑兩株命名編號如圖十五 (B) 所示，作為之後篩選 library 的正、負對照組。

9.2 以 site-directed mutagenesis 進行前人所篩選 *CaNDT80* 活化區的可能重要胺基酸突變，並以 β -galactosidase filter assay 測試

前人篩選到四個 *CaNDT80* 活化區的可能重要胺基酸分別為 Met139、His140、Ile183 和 Gln174，以 LOB280 為模版利用 site-directed mutagenesis 依序將這四個位置改變成 Met139_Ile、His140_Asp、Ile183_Val 和 Gln174_del (deletion)，以定序確定是否突變成想要的胺基酸，定序結果整理於圖十六。將以上突變成功之質體，轉形至 SLO121，各挑五個轉形株，進行 β -galactosidase filter assay 確認這四個突變在 *CaNDT80* 活化區是否重要，使其活化 *CDR1* 啟動子功能受影響。如圖十七所示，此四個突變轉形至 SLO121 的轉形株，在 β -galactosidase filter assay 呈色反應與正對照組 (LOB45 和 LOB280 的轉形株) 並無太大的差異，代表這四個位置不是 *CaNDT80* 活化區的可能重要胺基酸。

9.3 測試 error-prone PCR 在不同鎂離子濃度下合成錯誤率

在鎂離子濃度 4、5、6、7、8、9、10 和 11.5 mM 的 error-prone PCR 條件下，以 LOB45 為模板利用引子 HJL477 和 HJL238 夾出約 1700 bp 片段，送定序後計算 *CaNDT80* ORF +50~+700 這區段突變的核苷酸數目，將統計結果製成圖十八。10 和 11.5 mM 因為突變的位子太多無法計數，所以結果沒有列出。在測試的結果和 *CaNDT80* 的活化區長度有 660 bp 的考量之下，在 7 mM 鎂離子濃度條件下的 error-prone PCR 約產生 1~2 核苷酸突變最為恰當，所以以此條件進行製備 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library。

製備 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library 時，是以 LOB280 為模板利用引子 HJL321 和 HJL61 夾出約 1200 bp 片段，然後用限制酵素 *Afl* II 和 *BstE* II 切下中間約 500 bp 活化區隨機突變的片段，置換回 LOB280 並轉形到 DH5 α ，即得 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library，估計約有兩萬個菌落。挑選其中 10 菌落將所攜帶的質體送定序，來檢視 Library 歧異度 (diversity) 和突變率，結果為表五。在這 10 菌落的定序結果中有 55

% 帶有突變的質體，突變的數目約在 1~3 個核苷酸之間，並且也有 frameshift mutation 產生。

9.4 以 β -galactosidase filter assay 來篩選 library

將 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library DNA 轉形至 SLO121，把所有經過營養篩選產生的菌落進行第一次 β -galactosidase filter assay，挑得 150 個呈色偏白的菌株。接下來將這些可能因為攜帶的質體上在 *CaNDT80* 活化區有重要突變而影響其功能的菌株劃出單一菌落，並進行第二次 β -galactosidase filter assay，排除與正、負對照組比較後呈色偏藍者，得到 144 個菌株，再將這些菌株挑起做第三次 β -galactosidase filter assay 的確認 (圖十九)，最後得到 142 個菌株。純化其中 93 個菌株所攜帶的質體並定序 *CaNDT80* 活化區做比對，定序比對結果整理於表六，結果發現篩選所得的質體在 *CaNDT80* 活化區的突變，不是 frameshift mutation，就是 nonsense mutation，所以造成 *CaNDT80* 失去功能，因此才會經由 β -galactosidase filter assay 篩選出來。

9.5 建構篩選質體 LOB295 並測試

為了要排除 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library 中帶有 frameshift mutation 和 nonsense mutation 者，因此想要建構一個篩選質體。本實驗改造的質體選用 pGEM-T easy vector，並使用 kanamycin resistant gene 作為隨機突變片段的篩選標記 (selective marker)，細部設計如圖二十 (A) 所示。建構方式以質體 LOB64 (pCRII-TOPO-EFG1) 為模板，利用引子 HJL1362 和 HJL1363 進行聚合酶連鎖反應夾出 kanamycin resistant gene 啟動子，以及引子 HJL1364 和 HJL1365 夾出 ORF，並以定序確認序列正確。設計引子 HJL1362 和 HJL1363 時在 5' 端加上限制酵素切位 *Apa* I 以便將啟動子接進 pGEM-T easy vector 上，同樣地引子 HJL1364 和 HJL1365 在 5' 端加上 *Sac* I 以便將 ORF 接入。另外 HJL1364 在不影響 kanamycin resistant gene ORF 下額外加上將來要接入 *CaNDT80* 活化區隨

機突變 DNA 片段所需的限制酵素切位 *Afl* II 和 *BstE* II，至於保留 pGEM-T easy vector 中間的 multiple cloning site (MCS) 是為了方便後人使用，並以限制酵素確認結構圖二十 (C)，所得之質體命名為 LOB295。

首先測試在 kanamycin resistant gene 前加上近 100 bp 的 MCS 片段會不會影響其功能表現，所以將帶有質體 LOB295 之大腸桿菌 (DH5 α) 劃到含有 kanamycin 的 LB agar plate 培養，發現菌株無法在上頭生長，推測可能是因為加上近 100 bp 的片段中斷了表現訊號，造成 kanamycin resistant gene 啟動子沒有作用。於是將質體 LOB295 轉形至 BL21 (*DE3*)，希望利用 pGEM-T easy vector 上的 T7 啟動子來啟動 kanamycin resistant gene 的表現，發現菌株就可以在 kanamycin 的 LB 培養基生長。接下來測試 LOB295 放進不同狀況的 *CaNDT80* 活化區隨機突變 DNA 片段後是否具有篩選功能，包含 wild type 序列、帶有 missense、frameshift (deletion 與 insertion)，以及 nonsense mutation 共五種插入片段，如表七所示。將測試片段以限制酵素切位 *Afl* II 和 *BstE* II 接進 LOB295 後，轉形至 BL21 (*DE3*)，先培養在含有 ampicillin 的 LB 培養基上，用來確保菌株帶有質體，以及確認帶有預期的 *CaNDT80* 活化區序列後，再劃到含有 kanamycin 的 LB 培養基測試質體篩選功能，結果五種狀況都會生長，代表質體 LOB295 並無預期篩選功能。

9.6 建構篩選質體 LOB324 和 LOB325 並測試

本實驗改造質體選用專門用來表現蛋白質的質體 LOB137 (pET-43.1a (+)-Factor Xa)，本身帶有 ampicillin 標記，並分別建構使用 kanamycin resistant gene 和 chloramphenicol resistant gene (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 作為篩選標記 (selective marker) 的質體。因為 LOB137 在 *lacI* ORF 上有接入 *CaNDT80* 活化區隨機突變 DNA 片段所需的切位 *BstE* II，所以首先必須去除之，於是設計在不改變 *lacI* 胺基酸的情況下帶有想要突變序列的互補引子 HJL1461 和 HJL1462。以 LOB137 為模板，分別用引子 HJL1461 和 HJL1509 進行聚合酶連鎖反應夾取片段

一，以及引子 HJL1508 和 HJL1462 夾取片段二。再將片段一和二混合，利用兩片段重疊互補區域，以引子 HJL1508 和 HJL1509 合成全長約 1500 bp 的片段，之後用限制酵素 *Apa* I 和 *Sph* I 切下中間約 780 bp 的部分，再以相同的切位接進 LOB137，最後用限制酵素 *BstE* II 和定序 *lac*I ORF 確認核苷酸 632T 是否成功改變為 A (圖二十一)，所得質體命名為 LOB323。

篩選質體細部設計如圖二十二所示，chloramphenical 作為篩選標記的質體 LOB324 建構方式是以質體 pSFS2A 為模板，利用引子 HJL1457 和 HJL1458 進行聚合酶連鎖反應夾出 CAT ORF，定序確認序列正確後，然後以限制酵素 *Nde* I 和 *Xho* I 接進 LOB323。Kanamycin 作為篩選標記的質體 LOB325 則是以質體 LOB64 為模板，利用引子 HJL1459 和 HJL1460 進行聚合酶連鎖反應夾出 kanamycin resistant gene ORF，定序確認序列正確後，同樣地以限制酵素 *Nde* I 和 *Xho* I 接進 LOB323。HJL1457 和 HJL1459 都在不影響篩選標記 ORF 的表現下，增加切位 *Afl* II 和 *BstE* II，最後以限制酵素確認結構正確 (圖二十三)。將 LOB324 和 LOB325 養在含有適當篩選抗生素的培養基，確認質體上隨機突變片段的篩選標記具有功能後，分別把包含 wild type 序列、missense、frameshift (deletion 和 insertion)，以及 nonsense mutation 共五種插入片段，以限制酵素切位 *Afl* II 和 *BstE* II 接入後，並轉形至 BL21 (*DE3*) 進行測試。

因為 pET Expression System Vector 上的 T7 promoter 由 lac operator 所控制，所以加入 IPTG 作為 inducer，使 T7 promoter 能夠驅動後面基因之表現。於是將 LOB324 與接入五種測試插入片段者依序轉印複製到含有 34 µg/ml chloramphenical 加上 0.5 mM IPTG、34 µg/ml chloramphenical 加上 1 mM IPTG 和 100 µg/ml ampicillin 的 LB 培養基中；同樣地，LOB325 與接入五種測試插入片段者複製到含有 50 µg/ml kanamycin 加上 0.5 mM IPTG、50 µg/ml kanamycin 加上 1 mM IPTG 和 100 µg/ml ampicillin 的 LB 培養基。預計會在含有篩選插入片段用的抗生素培養基會長出菌落的有 wild type、missense mutation 和空的質體 (LOB324 或 LOB325)，在

ampicillin 培養基所有的質體都會生長，測試結果整理於圖二十四。在 chloramphenical 作為篩選抗生素的 LOB324 的部分，在 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenical 加上 0.5 mM IPTG 生長狀況，如預計的含有篩選插入片段 wild type、missense mutation 和空的質體 (LOB324 或 LOB325) 均有生長，只不過 wild type 與 missense mutation 生長狀況不如空質體 LOB324 好，並且三者生長狀況與 ampicillin 培養基比較明顯來得差。在 kanamycin 作為篩選抗生素的 LOB325 的部分，在 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin 加上 0.5 mM IPTG 生長狀況，只有帶有 deletion mutation 片段的不長，其餘均有零星菌落長出，不符合預計。而且兩組都有當 IPTG 濃度增加反而會讓菌長不好的現象，並與 ampicillin 培養基相比都明顯來得差。

為了瞭解 IPTG 是否對 BL21 (*DE3*) 的生長造成影響，所以將 LOB324 與 LOB325，以及分別包含五種測試插入片段者依序轉印複製到只含有篩選用抗生素、篩選用抗生素加上 0.5 mM IPTG、只含 0.5 mM IPTG 和 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin 的 LB 培養基上進行測試。Chloramphenical 作為篩選抗生素的 LOB324 的結果 (圖二十五)，顯示只有在 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenical 上含有篩選插入片段 wild type 和 missense mutation 的菌落長出，但生長狀況並不佳。在 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenical 加上 0.5 mM IPTG 培養基上，除了質體 LOB324 有微量零星的菌落生成，其他狀況都不長，0.5 mM IPTG 培養基與 ampicillin 培養基生長狀況一致，顯示 IPTG 並不會抑制 BL21 (*DE3*) 的生長。Kanamycin 作為篩選抗生素的 LOB325 結果 (圖二十六)，顯示只有在 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin 上如預計的含有篩選插入片段 wild type、missense mutation 和空質體 LOB325 均有生長，nonsense 和 insertion mutation 則有些微菌落產生，但明顯長的比前三者差，deletion 完全不長。在 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin 加上 0.5 mM IPTG 培養基上，只有帶有 deletion mutation 片段的不長，其餘均有零星菌落長出，但生長狀況比起在只有 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin 培養基上狀況差，0.5 mM IPTG 培養基則與 ampicillin 培養基生長狀況一致。

為了瞭解抗生素的濃度是否會影響篩選效果，於是將 chloramphenical

濃度減半為 17 $\mu\text{g/ml}$ 進行 LOB324 測試，顯示原於 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol 生長不佳之帶有 wild type 和 missense mutation 片段的菌落因抗生素濃度降低而生長情形變好，且帶有 LOB324 空質體者也變好，但是空質體生長狀況仍比前兩者差一些；另外，LOB325 因在 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin 上帶有 nonsense 和 insertion mutation 者有些微菌落產生，所以提高 kanamycin 濃度 0.5 倍為 75 $\mu\text{g/ml}$ ，希望能殺死這些非預期的菌（圖二十七），結果顯示的確能抑制其生長，不過也發現與 LOB324 相同情形，空質體生長狀況比帶有 wild type 和 missense mutation 片段的兩者差。



十、討 論 II

10.1 以 error-prone PCR 進行隨機突變探討

探討蛋白質功能性胺基酸時，在序列上製造隨機突變進行篩選是很有用的方式。製造隨機突變的方式有：使用在 DNA repair 相關基因的 *E. coli* 突變株，如 XL1-red、利用 UV irradiation、或者使用化學方法 (deamination、alkylation 和核苷酸類似物)，以及 PCR 方法，如 error-prone PCR，其中 error-prone PCR 是目前最廣為使用的方法 (Wong *et al.*, 2006)。error-prone PCR 基本原理主要是利用 rTaq DNA polymerase 沒有 3'→5' 端 proof-reading 的功能，依據條件的不同約有 10^{-4} ~ 10^{-5} 的突變率，並且可以透過以下方法增加其突變率：(1) 使用比例不同的 dNTP；(2) 增加 rTaq DNA polymerase 濃度；(3) 增加 extension 的時間；(4) 提高鎂離子濃度 (Mg^{2+})；(5) 額外添加 0.5 mM 錳離子 (Mn^{2+})，以上都有穩定 mismatch base pair 和增加突變率的效果 (Cadwell and Joyce, 1992 and 1994 ; Leung *et al.*, 1989)，透過上述幾點的調整就可以得到適當突變率。但是無論是以任何一種隨機突變方法，都無法避免 nonsense 和 frameshift mutation 發生，並且尤其以 XL1-red 產生 deletion 的比率較高 (Rasila *et al.*, 2009)，同時本實驗因為在 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library 篩選結果，都是得到 nonsense 和 frameshift mutation，因此想要利用一些策略去除製造隨機突變 library 時不想要的突變。

10.2 篩選質體 LOB295 結果討論

設計篩選質體的概念為利用質體上的抗生素基因，於 ORF 前端，start codon 之後，接入欲篩選之隨機突變 DNA 片段，如果置入前端的隨機突變 DNA 片段帶有 nonsense 和 frameshift mutation，則會連帶影響後端抗生素基因之表現，如中斷抗生素基因表現或使抗生素基因 out-frame，故無法產生正確蛋白質，造成菌落無法在含有抗生素培養基上生長，故只留下帶有不會影響後端抗生素基因之表現的 missense mutation 片段。實驗室常

用之抗生素有 ampicillin、kanamycin 和 chloramphenical。ampicillin 殺菌機制為抑制 transpeptidase 活性，抑制 cell wall 合成，造成菌體瓦解。但 ampicillin 抗藥基因為 β -lactamase，是一種穿膜蛋白質，故非常可能因為接入欲篩選之隨機突變 DNA 片段後，造成無法在細胞膜上有正常折疊而影響其功能，因此不列入篩選質體之抗生素考量。kanamycin 和 chloramphenical 作用機制則是分別針對核糖體 30 S 和 50 S 作用，抑制蛋白質合成。kanamycin 和 chloramphenical 抗藥基因分別為 aminoglycoside phosphotransferase 和 chloramphenical acetyltransferase (CAT)，都是針對標的抗生素進行修飾，使其失去殺菌活性。

LOB295 是一個利用 kanamycin 進行篩選隨機突變片段的質體 (圖二十)，改造的質體選用實驗室進行 TA cloning 的 pGEM-T easy vector，並且利用 kanamycin 本身的啟動子驅動抗藥基因的表現，在啟動子與抗藥基因之間有約 100 bp 的 multiple cloning site (MCS) 方便後人使用。但是當建構完成後，發現菌株不能在 kanamycin 培養基上生長，推可能原因有：(1) 從 LOB64 經由 PCR 得到的 kanamycin 啟動子和 ORF 序列不完整，所以抗藥基因無法正常表現；(2) 因為啟動子與抗藥基因之間有約 100 bp 的 multiple cloning site (MCS) 中斷了某些訊號，影響 kanamycin 啟動子的功能，無法驅動後端 kanamycin 抗藥基因表現；(3) 有正常表現 kanamycin 基因，但產生 fusion protein 不正常折疊使其失去功能。為了釐清可能原因，所以首先將 LOB285 轉形至 BL21 (DE3)，此菌株帶的 DE3 基因為 T7 RNA polymerase，故可利用 pGEM-T easy vector 上的 T7 啟動子來趨動 kanamycin 抗藥基因的表現，從此瞭解是否為可能原因 (2) 導致抗藥基因無法正常表現。結果 LOB295 轉形至 BL21 (DE3) 便能生長在 kanamycin 培養基，表示 MCS 影響了 kanamycin 啟動子的功能。接著 LOB295 放進五種不同狀況的 *CaNDT80* 活化區隨機突變 DNA 片段進行測試 (表七)，發現五種狀況都會生長，代表質體 LOB295 並無預期篩選功能，列舉可能原因有：(1) 因為原本設計的 kanamycin 啟動子無法驅動後面 kanamycin 抗藥基因表現，而使用 T7 promoter，也許 T7 promoter 驅動抗

藥基因的表現並非從我們所預計的位置，但是透過軟體分析其他可能的 ORF，並沒有發現其他可以讓 kanamycin 抗藥基因 in-frame 者；(2) 因為插入片段使 fusion protein 在 kanamycin 之前產生了新的 translation initiation site。

10.3 篩選質體 LOB324 和 LOB325 結果討論

接下來改造質體選用專門用來表現蛋白質的質體 LOB137 (pET-43.1a (+)-Factor Xa)，本身帶有 ampicillin 標記，並以 pusion PCR 去除接入 *CaNDT80* 活化區隨機突變片段所需之切位 *BstE* II，將所得質體 LOB323 作為之後改造質體使用。分別建構以 chloramphenicol 抗藥基因 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 和 kanamycin 抗藥基因 (aminoglycoside phosphotransferase) 作為篩選標記的質體 LOB324 和 LOB325 (圖二十二)。

以 chloramphenicol 作為篩選標記的質體 LOB324 把包含 wild type 序列、missense、frameshift (deletion 與 insertion)，以及 nonsense mutation，共五種 *CaNDT80* 活化區插入片段接入後進行測試 (圖二十五)，結果顯示在 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol 上含有篩選插入片段 wild type 和 missense mutation 有菌落長出，但是與 ampicillin 培養基相比生長狀況並不佳，可能因為加入了 *CaNDT80* 活化區片段 (約 500 bp)，使 CAT 功能不如原來好，也許降低 chloramphenicol 濃度後可讓菌長得較好，於是將 chloramphenicol 濃度減半為 17 $\mu\text{g/ml}$ (圖二十七)，顯示帶有 wild type 和 missense mutation 片段的菌落因抗生素濃度降低而生長情形變好，且帶有 LOB324 空質體者也變好，但是其生長狀況仍比前兩者差一些，故只要調整適當之抗生素濃度，即可篩選得想要的片段，並去除空質體。但是令人意外的是 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol 加上 0.5 mM IPTG 培養基五種測試插入片段都不生長，只有空的質體 LOB324 產生微量零星菌落，並且由於菌落在單獨只有 0.5 mM IPTG 培養基上生長狀況良好，代表並非 IPTG 所致之不良影響，重複兩次結果均一致，似乎是當 chloramphenicol 和 0.5 mM

IPTG 同時存在時，所造成的非預期結果。實驗中加入 IPTG 進行測試是因為 pET Expression System Vector 上的 T7 promoter 由 lac operator 所控制，所以加入 IPTG 作為 inducer，使 T7 promoter 能夠驅動後面基因之表現，但是 LOB324 在有抗生素的狀況下加入 IPTG，反而造成 chloramphenicol 抗藥基因 CAT 不能正常表現，也許是在設計上改變了質體上某些訊號，但是在設計上除了將不必要 tag 去除外 (圖二十二)，找不到其他可能改變的訊號。另外，在有抗生素之下含有篩選插入片段 wild type 和 missense mutation 者有菌落產生，顯示在沒有 IPTG 之一般狀況下 CAT 的 fusion protein 就有表現，空的質體 LOB324 卻無法生長，但因抗生素濃度降低使得以上三者生長情形變好，且三者僅在插入片段有差異，推測可能原因之一是也許 T7 RNA polymerase 傾向於選擇插入片段在 *Afl* II 切位後的 CaNDT80 之 start codon 開始轉錄，而不選擇預期之 start codon，並且因為插入片段造成 chloramphenicol 抗藥基因的 fusion protein 功能受影響，所以才會在 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol 生長不佳，降低濃度後便可獲得改善。但是如果在 chloramphenicol 培養基的篩選結果真的是因篩選質體加入插入片段所造成，那麼 LOB324 將會是一個很好的工具，可篩選出想要的片段，並且去除 frameshift、nonsense mutation 和空質體 (vector only)。

以 kanamycin 作為篩選標記的質體 LOB325 測試結果顯示 (圖二十六)，在 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin 培養基含有插入片段 wild type、missense mutation 和空質體 LOB325 均有生長，表示 kanamycin 抗藥基因在未加 IPTG 之下即有表現，並且 nonsense 和 insertion mutation 有些微菌落產生，但明顯長的比前三者差，deletion 則完全不長。將帶有 nonsense 和 insertion mutation 的 kanamycin 抗藥基因以軟體預測是否有其他能讓部分 kanamycin 抗藥基因 in-frame 表現的 ORF，但是沒有發現這樣的 ORF 存在，也許這些少量的菌體為了存活所以啟動了目前不明的機制，例如：跳過 stop codon 而表現後面的 kanamycin 抗藥基因所產生，提高 kanamycin 的濃度或許就可以殺死這些菌，於是將 kanamycin 濃度增加 0.5 倍為 75

$\mu\text{g/ml}$ 進行測試 (圖二十七)，結果顯示帶有 nonsense 和 insertion mutation 片段的菌落的確因抗生素濃度增加而使菌落減少，且帶有 LOB325 空質體者生長狀況與 LOB324 測試結果類似，比 wild type 和 missense mutation 片段的菌落來得差，這可能因為插入片段對 kanamycin 抗藥基因之影響。故以上測試結果顯示報導質體 LOB324 和 LOB325 只要施用適當之抗生素濃度，可篩選得想要的片段，並去除空質體，此二質體均具有篩選功能，可作為日後之應用。

另外，在 $50 \mu\text{g/ml}$ kanamycin 加上 0.5 mM IPTG 培養基上，只有帶有 deletion mutation 片段的不長，其餘均有零星菌落長出，且生長狀況比只有 $50 \mu\text{g/ml}$ kanamycin 培養基上來得差許多，這一點跟 LOB324 相當類似，兩者都在有抗生素的狀況下加入 IPTG 造成菌落生長不佳，抗藥基因不能如預期因為 IPTG 而大量表現，並且 LOB325 的結果讓人意外的在 kanamycin 培養基原本生長不佳的 nonsense 和 insertion mutation 加入 IPTG 後菌落明顯增加的現象，這與預期不同。推測可能因素有：(1) 改造的質體 LOB324 和 LOB325 某些表現訊號改變，造成當抗生素與 IPTG 同時存在時生長狀況不如預計；(2) BL21 (DE3) 不適用於本實驗；(3) 菌落的生長非轉形之質體所致，可能產生了某些變異導致抗藥性，以上原因仍須更進一步研究來釐清。

十一、結 論

- I. 將 *C. tropicalis* 臨床菌株的 5-FC 感受性測試中分離到抗藥衍生株，進行相關抗藥基因序列分析，發現有些 parental strains 的 *FCY2* 為異質合子型，但其抗藥衍生株卻變成同質合子型。進一步將 YM020291 (*FCY2* (273G)/*FCY2* (273T)) 以 *SAT1* flipper 建構 *FCY2* 同質合子置換株及單股缺陷突變株，發現 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 同質置換株和 *FCY2*(273G)/*fcy2*△ 單股缺陷突變株對 5-FC 比 YM020291 更敏感一點，至於 *FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 同質置換株和 *FCY2* (273T)/*fcy2*△ 單股缺陷突變株則是比 YM020291 更加地抗藥，暗示著在 *C. tropicalis* 中 *FCY2* 的 LOH 現象與 5-FC 抗藥性有關連。
- II. 為了利於之後以 error-prone PCR 在 *CaNDT80* 活化區產生隨機突變，建構成一個 library 找出重要胺基酸的研究，於是建構了以 chloramphenical 及 kanamycin 為報導基因之篩選性質體，分別為 LOB324 與 LOB325，初步測試結果發現於適當濃度之篩選抗生素培養基具有想要之篩選效果，但因仍有非預期之現象發生，仍需要更進一步研究來釐清其機制。

十二、未來展望

- I. 本實驗證實 *C. tropicalis* 中 *FCY2* 的 LOH 現象與 5-FC 抗藥性有關，但仍有兩種可能原因需釐清：第一，因第 91 個胺基酸的改變；第二，因 promoter 於 -224 和 -69 的變化。首先，以 real-time PCR 比較 YM020291、YM020291-R1、YM020291-R2、*FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 同質置換株 及 *FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 同質置換株等菌株的 *FCY2* mRNA 表現量是否有差異，確認第二種可能性。或者以 site-directed mutagenesis 將同源重組質體 LOB319 (G 股) 的 *FCY2* 之核苷酸 273G 突變為 T，LOB320 (T 股) 的 273T 突變為 G，分別送入 YM020291 進行同源置換後，進行感受性測試，確認第一種可能性。
- II. 由於 Legrand *et al.* 的研究指出 DNA repair pathway、genome instability 與藥物抗藥性是彼此相關 (Legrand *et al.*, 2007)。推測本實驗於 *FCY2* 發現有 LOH 現象之六個臨床菌株也許在 DNA repair 的機制有缺陷，故找出可能的 DNA repair 相關基因之進行研究，對 5-FC 敏感且不會產生抗藥衍生株之臨床菌株進行相關基因剔除，測試是否增加其產生抗藥菌株之頻率。
- III. 由於仍有菌株尚未發現其 5-FC 抗藥機制為何，代表 *C. tropicalis* 仍然有其他的機制涉及 5-FC 抗藥，推測可能其他的機制有：第一，另一個可能的 PCP 是 *CTRG00460* 序列突變造成的抗藥性，有待序列分析；第二，還有其他 PCP 參與 5-FC 運送至菌體內的過程，找出具有同源序列者，進行功能探討及研究；第三，除了 *URA3* 外的 pyrimidine de novo pathway 基因發生序列變化，或基因表現量改變，或者是還有其他的途徑共同參與，以上都有可能是發生抗藥性的原因，有待更進一步的研究。

IV. 第二部分之初步結果發現以 chloramphenical 及 kanamycin 為報導基因之篩選性質體 LOB324 及 LOB325，於適當濃度之篩選抗生素培養基具有想要之篩選效果，之後可以 error-prone PCR 產生隨機突變 DNA 片段之 pool，接入質體 LOB324 及 LOB325 進行測試，是否於篩選抗生素培養基中能剔除隨機突變 DNA 片段中帶有 nonsense 及 frameshift mutations，以利日後的研究。



十三、參考文獻

- Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S.** 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.* 24:1122-1128.
- Akins RA.** 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol.* 43(4):285-318.
- Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF.** 1996. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(12):2835-41.
- Basehoar AD, Zanton SJ, Pugh BF.** 2004. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell.* 116(5):699-709.
- Barker KS, Rogers PD.** 2006. Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. *Curr Infect Dis Rep.* 8(6):449-456.
- Bennett JE.** 1996. *Antifungal agents.* In Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edn*, (Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW & Goodman Gilman A., Eds), pp. 1175-90. McGraw-Hill, New York.
- Berman J, Sudbery PE.** 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 3(12):918-30. Review.
- Bruno VM, Mitchell AP.** 2005. Regulation of azole drug susceptibility by *Candida albicans* protein kinase CK2. *Mol Microbiol.* 56(2):559-73.
- Bustamante CI.** 2005. Treatment of *Candida* infection: a view from the trenches! *Curr Opin Infect Dis.* 18(6):490-5. Review.
- Cadwell RC, Joyce GF.** 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2(1):28-33.
- Cadwell RC, Joyce GF.** 1994. Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.* 3(6):S136-40.
- Calderone RA, Fonzi WA.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9(7):327-35. Review.
- Calderone RA.** (Ed.) 2002 *Candida and Candidiasis.* ASM Press, Washington, DC.
- Carr LL, Gottschling DE.** 2008. Does age influence loss of heterozygosity? *Exp Gerontol.* 43(3):123-9. Review.
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL.** 1983. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature.* 305(5937):779-84.
- Chapeland-Leclerc F, Bouchoux J, Goumar A, Chastin C, Villard J, Noël T.** 2005. Inactivation of the *FCY2* gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(8):3101-8.

- Chen CG, Yang YL, Shih HI, Su CL, Lo HJ.** 2004. CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating *CDR1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(12):4505-12.
- Chen YC, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC.** 2003. Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother.* 52(1):71-7.
- Chen YC, Chang SC, Sun CC, Yang LS, Hsieh WC, Luh KT.** 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.
- Chevallier MR, Jund R, Lacroute F.** 1975. Characterization of cytosine permeation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 122(2):629-41.
- Chu S, Herskowitz I.** 1998. Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Mol Cell.* 1(5):685-96.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J; Brazilian Network Candidemia Study.** 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 44(8):2816-23.
- Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D.** 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell.* 6(10):1889-904.
- Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, Berman J, Bille J, Sanglard D.** 2006. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics.* 172(4):2139-56.
- Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D.** 2004. *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell.* 3(6):1639-52.
- de Micheli M, Bille J, Schueller C, Sanglard D.** 2002. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol.* 43(5):1197-214.
- Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Bernède C, Robert V, Raoux D, Chachaty E, Forget E, Lacroix C, Dromer F; Yeasts Group.** 2008. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerg Infect Dis.* 14(4):557-65.
- Diasio RB, Bennett JE, Myers CE.** 1978. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochem Pharmacol.* 27(5):703-7.
- Dodgson AR, Dodgson KJ, Pujol C, Pfaller MA, Soll DR.** 2004. Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(6):2223-7.
- Dogra S, Krishnamurthy S, Gupta V, Dixit BL, Gupta CM, Sanglard D, Prasad R.** 1999.

- Asymmetric distribution of phosphatidylethanolamine in *C. albicans*: possible mediation by *CDR1*, a multidrug transporter belonging to ATP binding cassette (ABC) superfamily. *Yeast*. 15(2):111-21.
- Dunkel N, Blass J, Rogers PD, Morschhäuser J.** 2008. Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol*. 69(4):827-40.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP.** 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*. 29(2):239-44.
- Enjo F, Nosaka K, Ogata M, Iwashima A, Nishimura H.** 1997. Isolation and characterization of a thiamin transport gene, *THI10*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 272(31):19165-70.
- Fasoli M, Kerridge D.** 1988. Isolation and characterization of fluoropyrimidine-resistant mutants in two *Candida* species. *Ann NY Acad Sci*. 544:260-3.
- Ferreira T, Brèthes D, Pinson B, Napias C, Chevallier J.** 1997. Functional analysis of mutated purine-cytosine permease from *Saccharomyces cerevisiae*. A possible role of the hydrophilic segment 371-377 in the active carrier conformation. *J Biol Chem*. 272(15):9697-702.
- Ferreira T, Chevallier J, Napias C, Brèthes D.** 1998. Role of the proline residue 376 in the catalytic activity of purine-cytosine permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)*. 43(2):193.
- Ferreira T, Chevallier J, Napias C, Brèthes D.** 1998. Role of the proline residue 376 in the catalytic activity of purine-cytosine permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)*. 43(2):191-3.
- Ferreira T, Chevallier J, Paumard P, Napias C, Brèthes D.** 1999. Screening of an intragenic second-site suppressor of purine-cytosine permease from *Saccharomyces cerevisiae*. Possible role of Ser272 in the base translocation process. *Eur J Biochem*. 260(1):22-30.
- Ferreira T, Napias C, Chevallier J, Brèthes D.** 1999. Evidence for a dynamic role for proline376 in the purine-cytosine permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 263(1):57-64.
- Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD.** 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 12(1):80-96. Review.
- Florent M, Noël T, Ruprich-Robert G, Da Silva B, Fitton-Ouhabi V, Chastin C, Papon N, Chapeland-Leclerc F.** 2009. Nonsense and missense mutations in *FCY2* and *FCY1* genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in

- clinical isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(7):2982-90.
- Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J.** 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(12):3065-72.
- Gaur NA, Puri N, Karnani N, Mukhopadhyay G, Goswami SK, Prasad R.** 2004. Identification of a negative regulatory element which regulates basal transcription of a multidrug resistance gene *CDR1* of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 4(4-5):389-99.
- Georgiev, V.St.** 1998 *Infectious Diseases in Immunocompromised Hosts*, CRC Press, Boca Raton, New York.
- Georgopapadakou NH, Walsh TJ.** 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(2):279-91. Review.
- Georgopapadakou NH.** 2001. Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on beta-1,3-glucan synthase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs.* 10(2):269-80. Review.
- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D.** 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 37(9):1172-7.
- Hernández ML, Gil C, Pla J, Nombela C.** 1998. Induced expression of the *Candida albicans* multidrug resistance gene *CDR1* in response to fluconazole and other antifungals. *Yeast.* 14(6):517-26.
- Hitchcock CA.** 1991. Cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *Biochem Soc Trans.* 19(3):782-7. Review.
- Hope WW, Taberner L, Denning DW, Anderson MJ.** 2004. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(11):4377-86.
- Horn R, Wong B, Kiehn T E, Armstrong D.** 1985. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy. *Rev Infect Dis.* 7:646-655.
- Horsburgh CR Jr, Kirkpatrick CH.** 1983. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. *Am J Med.* 74(1B):23-9.
- Hung CC, Chen YC, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC.** 1996. Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 95(1):19-28.
- Jund R, Lacroute F.** 1970. Genetic and physiological aspects of resistance to 5-fluoropyrimidines in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 102(3):607-15.
- Karnani N, Gaur NA, Jha S, Puri N, Krishnamurthy S, Goswami SK, Mukhopadhyay G, Prasad R.** 2004. SRE1 and SRE2 are two specific steroid-responsive modules of *Candida* drug resistance gene 1 (*CDR1*) promoter. *Yeast.* 21(3):219-39.
- Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart H, Schumacher U,**

- Einsele H.** 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett.* 400(1):80-2.
- Kern L, de Montigny J, Lacroute F, Jund R.** 1991. Regulation of the pyrimidine salvage pathway by the *FUR1* gene product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 19(5):333-7.
- Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD, Crane LR.** 1989. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev Infect Dis.* 11:379–390.
- Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP, Raad II.** 2001. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* 33:1676-1681.
- Krishnamurthy S, Gupta V, Prasad R, Panwar SL, Prasad R.** 1998. Expression of *CDR1*, a multidrug resistance gene of *Candida albicans*: transcriptional activation by heat shock, drugs and human steroid hormones. *FEMS Microbiol Lett.* 160(2):191-7.
- Krishnamurthy S, Gupta V, Snehlata P, Prasad R.** 1998. Characterisation of human steroid hormone transport mediated by Cdr1p, a multidrug transporter of *Candida albicans*, belonging to the ATP binding cassette super family. *FEMS Microbiol Lett.* 158(1):69-74.
- Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK.** 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin Pharmacokinet.* 36(5):353-73. Review.
- Legrand M, Chan CL, Jauert PA, Kirkpatrick DT.** 2007. Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 6(12):2194-205.
- Letscher-Bru V, Herbrecht R.** 2003. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother.* 51(3):513-21. Review.
- Leung DW, Chen E, Goeddel DV.** 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1:11-15.
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S.** 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med.* 8(2):76-81. Review.
- Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA.** 2000. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J. Infect. Dis.* 181:309-316.
- Miller LG, Hajjeh RA, Edwards JE Jr.** 2001. Estimating the cost of nosocomial candidemia in the united states. *Clin Infect Dis.* 32(7):1110.
- National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS).** 1997. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, CLSI, M27A. Wayne, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** 2002. Publication Of

- M27-A2: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard—second edition. 22:1–29.
- Niimi M, Niimi K, Takano Y, Holmes AR, Fischer FJ, Uehara Y, Cannon RD.** 2004. Regulated overexpression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 54(6):999-1006.
- Odds F C.** 1988. Ecology of *Candida* and epidemiology of candidosis. *Candida and candidosis: a review and bibliography.* 2nd ed. London, United Kingdom: Baillière Tindall pp. 68-82.
- Paluszynski JP, Klassen R, Rohe M, Meinhardt F.** 2006. Various cytosine/adenine permease homologues are involved in the toxicity of 5-fluorocytosine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 23(9):707-15.
- Papon N, Noël T, Florent M, Gibot-Leclerc S, Jean D, Chastin C, Villard J, Chapeland-Leclerc F.** 2007. Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the *FCY2*, *FCY1*, and *FUR1* genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(1):369-71.
- Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF.** 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(10):2676-84.
- Pfaller MA, Diekema DJ.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 20(1):133-63. Review.
- Pfaller MA, Segreti J.** 2006. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* 42 Suppl 4:S153-63.
- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Huynh H, Hollis RJ, Diekema DJ.** 2001. In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(11):3518-21.
- Pfaller M, Cabezudo I, Koontz F, Bale M, Gingrich R.** 1987. Predictive value of surveillance cultures for systemic infection due to *Candida* species. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6:628-633.
- Polak A, Grenson M.** 1973. Interference between the uptake of pyrimidines and purines in yeasts. *Pathol Microbiol (Basel).* 39(1):37-8.
- Polak A, Scholer HJ.** 1980. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Revue de l'Institute Pasteur de Lyon* 13:233-44.
- Polak A, Wain WH.** 1977. The influence of 5-fluorocytosine on nucleic acid synthesis in *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*. *Chemotherapy.* 23(4):243-59.

- Polak A.** 1977. 5-Fluorocytosine--current status with special references to mode of action and drug resistance. *Contrib Microbiol Immunol.* 4:158-67.
- Prasad R, Murthy SK, Gupta V, Prasad R.** 1995. Multiple drug resistance in *Candida albicans*. *Acta Biochim Pol.* 42(4):497-504. Review.
- Pujol C, Reynes J, Renaud F, Raymond M, Tibayrenc M, Ayala FJ, Janbon F, Mallié M, Bastide JM.** 1993. The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *PNAS. U S A.* 90(20):9456-9.
- Puri N, Krishnamurthy S, Habib S, Hasnain SE, Goswami SK, Prasad R.** 1999. *CDR1*, a multidrug resistance gene from *Candida albicans*, contains multiple regulatory domains in its promoter and the distal AP-1 element mediates its induction by miconazole. *FEMS Microbiol Lett.* 180(2):213-9.
- Radding JA, Heidler SA, Turner WW.** 1998. Photoaffinity analog of the semisynthetic echinocandin LY303366: identification of echinocandin targets in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(5):1187-94.
- Rangel-Frausto M S, Wiblin T, Blumberg H M, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards J E, Jr, Jarvis W, Dawson J, Wenzel R P.** 1999. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis.* 29:253–258.
- Rasila TS, Pajunen MI, Savilahti H.** 2009. Critical evaluation of random mutagenesis by error-prone PCR protocols, *Escherichia coli* mutator strain and hydroxylamine treatment. *Anal Biochem.* [Epub ahead of print]
- Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA.** 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(1):1-8. Review.
- Ryder NS.** 1992. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br J Dermatol.* 126 Suppl 39:2-7. Review.
- Ruan SY, Hsueh PR.** 2009. Invasive candidiasis: an overview from taiwan. *J Formos Med Assoc.* 108(6):443-51.
- Saini P, Prasad T, Gaur NA, Shukla S, Jha S, Komath SS, Khan LA, Haq QM, Prasad R.** 2005. Alanine scanning of transmembrane helix 11 of Cdr1p ABC antifungal efflux pump of *Candida albicans*: identification of amino acid residues critical for drug efflux. *J Antimicrob Chemother.* 56(1):77-86.
- Sandford, GR, Merz W G, Wingard JR, Charache P., and Saral R.** 1980. The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections. *J. Infect. Dis.* 142:503-509.
- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Micheli M, Bille J.** 1998. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resist Updat.* 1(4):255-65.

- Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J.** 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology*. 143 (Pt 2):405-16.
- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J.** 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 39(11):2378-86.
- Schmidt R, Manolson MF, Chevallier MR.** 1984. Photoaffinity labeling and characterization of the cloned purine-cytosine transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS. U S A*. 81(20):6276-80.
- Scholer HJ.** 1980. Flucytosine. In *Antifungal Chemotherapy*, (Speller, D. C. E., Ed), pp.35-106. Willey, Chichester.
- Schumacher MA, Bashor CJ, Song MH, Otsu K, Zhu S, Parry RJ, Ullman B, Brennan RG.** 2002. The structural mechanism of GTP stabilized oligomerization and catalytic activation of the *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase. *PNAS. U S A*. 99(1):78-83.
- Schumacher MA, Carter D, Scott DM, Roos DS, Ullman B, Brennan RG.** 1998. Crystal structures of *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase reveal the atomic basis of pyrimidine discrimination and prodrug binding. *EMBO J*. 17(12):3219-32.
- Séron K, Blondel MO, Haguenaer-Tsapis R, Volland C.** 1999. Uracil-induced down-regulation of the yeast uracil permease. *J Bacteriol*. 181(6):1793-800.
- Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM.** 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*. 12(1):40-79.
- Stolz J, Vielreicher M.** 2003. Tpn1p, the plasma membrane vitamin B6 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 278(21):18990-6.
- Tkacz JS, DiDomenico B.** 2001. Antifungals: what's in the pipeline. *Curr Opin Microbiol*. 4(5):540-5. Review.
- Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC.** 1994. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol*. 2(10):393-400. Review.
- Vanden Bossche H, Willemsens G, Marichal P.** 1987. Anti-*Candida* drugs--the biochemical basis for their activity. *Crit Rev Microbiol*. 15(1):57-72.
- van't Wout J W.** 1996. Fluconazole treatment of candidal infections caused by non-albicans *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 15:238-242.
- Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J.** 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother*. 46(2):171-9. Review.
- Vermitsky JP, Edlind TD.** 2004. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(10):3773-81.

- Wagner R, Straub ML, Souciet JL, Potier S, de Montigny J.** 2001. New plasmid system to select for *Saccharomyces cerevisiae* purine-cytosine permease affinity mutants. *J Bacteriol.* 183(14):4386-8.
- Waldorf AR, Polak A.** 1983. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 23(1):79-85.
- Wang JS, Yang YL, Wu CJ, Ouyang KJ, Tseng KY, Chen CG, Wang H, Lo HJ.** 2006. The DNA-binding domain of CaNdt80p is required to activate *CDR1* involved in drug resistance in *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 55(10):1403-11.
- Weber E, Rodriguez C, Chevallier MR, Jund R.** 1990. The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the *FCY2* gene product. *Mol Microbiol.* 4(4):585-96.
- Weinberger M, Sacks T, Sulkes J, Shapiro M, Polacheck I.** 1997. Increasing fungal isolation from clinical specimens: experience in a university hospital over a decade. *J Hosp Infect.* 35:185–195.
- White TC, Marr KA, Bowden RA.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 11(2):382-402. Review.
- White TC.** 1997. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(7):1482-7.
- Wingard, J. R.** 1995. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.* 20:115-125.

strain NO.	24hr MIC	48hr MIC
<u>YM020055</u>	< 0.125	0.25
<u>YM020055-R1</u>	< 0.125	2
<u>YM020055-R2</u>	< 0.125	4
<u>YM020112</u>	< 0.125	0.25
<u>YM020112-R1</u>	16	64
<u>YM020112-R2</u>	< 0.125	64
YM020274	< 0.125	0.25
YM020274-R1	32	64
YM020274-R2	64	64
<u>YM020291</u>	< 0.125	0.5
<u>YM020291-R1</u>	64	> 64
<u>YM020291-R2</u>	>64	> 64
YM020311	< 0.125	0.5
YM020311-R1	32	64
YM020311-R2	16	64
<u>YM020347</u>	< 0.125	< 0.125
<u>YM020347-R1</u>	16	32
<u>YM020347-R2</u>	16	64
<u>YM020438</u>	< 0.125	0.5
<u>YM020438-R1</u>	< 0.125	8
<u>YM020438-R2</u>	< 0.125	64
YM020671	< 0.125	< 0.125
YM020671-R1	>64	>64
YM020671-R2	>64	>64
YM020693	< 0.125	< 0.125
YM020693-R1	16	32
YM020693-R2	64	> 64

strain NO.	24hr MIC	48hr MIC
<u>YM020715</u>	< 0.125	0.25
<u>YM020715-R1</u>	4	64
<u>YM020715-R2</u>	4	64
<u>YM020743</u>	< 0.125	0.5
<u>YM020743-R1</u>	64	> 64
<u>YM020743-R2</u>	2	> 64
YM060051	< 0.125	< 0.125
YM060051-R1	< 0.125	1
YM060051-R2	< 0.125	< 0.125
YM060071	< 0.125	< 0.125
YM060071-R1	< 0.125	1
YM060071-R2	< 0.125	0.5
YM060075	< 0.125	< 0.125
YM060075-R	32	32
<u>YM060088</u>	16	< 0.125
<u>YM060088-R1</u>	16	64
<u>YM060088-R2</u>	< 0.125	16
YM060097	< 0.125	< 0.125
YM060097-R1	1	64
YM060097-R2	2	32
YM0601047	< 0.125	< 0.125
YM0601047-R1	64	> 64
YM0601047-R2	32	> 64
YM060146	< 0.125	< 0.125
YM060146-R1	?	64
YM060146-R2	?	64

strain NO.	24hr MIC	48hr MIC
<u>YM060173</u>	< 0.125	< 0.125
<u>YM060173-R1</u>	< 0.125	0.5
<u>YM060173-R2</u>	< 0.125	0.5
<u>YM060210</u>	< 0.125	2
<u>YM060210-R</u>	2	> 64
YM060237	< 0.125	0.25
YM060237-R1	32	64
YM060237-R2	32	32
YM060299	< 0.125	0.25
YM060299-R1	64	>64
YM060299-R2	64	64
YM060300	< 0.125	0.5
YM060300-R1	64	>64
YM060300-R2	64	>64
YM060325	< 0.125	1
YM060325-R1	64	64
YM060325-R2	64	64
YM060330	< 0.125	< 0.125
YM060330-R1	32	>64
YM060330-R2	>64	>64
<u>YM060369</u>	< 0.125	0.25
<u>YM060369-R1</u>	< 0.125	>64
<u>YM060369-R2</u>	< 0.125	64
YM060371	< 0.125	0.125
YM060371-R1	32	64
YM060371-R2	32	>64

strain NO.	24hr MIC	48hr MIC
YM060379	< 0.125	0.25
YM060379-R2	32	>64
YM060379-R2	32	64
YM060481	< 0.125	< 0.125
YM060481-R1	64	64
YM060481-R2	32	64
YM060507	< 0.125	0.5
YM060507-R1	64	64
YM060507-R2	32	>64
YM060508	< 0.125	1
YM060508-R1	32	>64
YM060508-R2	64	>64
YM060512	< 0.125	< 0.125
YM060512-R	< 0.125	16
YM060565	< 0.125	0.5
YM060565-R1	32	>64
YM060565-R2	32	>64
<u>YM060616</u>	< 0.125	0.25
<u>YM060616-R1</u>	< 0.125	8
<u>YM060616-R2</u>	< 0.125	>64
<u>YM060800</u>	< 0.125	1
<u>YM060800-R1</u>	64	>64
<u>YM060800-R2</u>	64	64

單位：μg/ml

表一. 5-flucytosine (5-FC) broth microdilution 的 24 小時與 48 小時之 MIC 整理

分析菌株為 *Candida tropicalis* 臨床分離株，以及柯惠菁從 E-test 藥盤所收集的抗藥衍生株 (2 個 isolates 編號為 -R1 及 R2)，以上總共 35 組 (102 株菌)。5-FC MIC 讀值以 48 小時抑制 50% 菌量生長的藥物濃度為標準，如果菌株的 MIC $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ 代表對 5-FC 感受性是敏感的 (susceptible)，MIC 為 8-16 $\mu\text{g/ml}$ 是中間性 (intermediate)，MIC $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ 是抗藥性的 (resistant)。編號以紅色底線標示者為之後進行序列分析的菌株，? 表示 MIC 無法計算。



strain NO. ^c	<i>FUR1</i> ^a ORF (全長 657 nt) 單位：nt				
	21 ^b	93 ^b	237 ^b	501 ^b	507 ^b
YM020055	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM020055-R1	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM020055-R2	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM020112	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020112-R1	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020112-R2	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020291	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM020291-R1	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM020291-R2	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM020347	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020347-R1	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020347-R2	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020438	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM020438-R1	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM020438-R2	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM020715	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020715-R1	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020715-R2	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T
YM020743	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM020743-R1	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM020743-R2	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM060088	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM060088-R1	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM060088-R2	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM060173	A/T	T/T	A/G	C/T	C/T
YM060173-R1	A/T	T/T	A/G	C/T	C/T
YM060173-R2	A/T	T/T	A/G	C/T	C/T
YM060210	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM060210-R	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM060369	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM060369-R1	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM060369-R2	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM060616	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM060616-R1	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM060616-R2	A/A	C/T	G/G	C/T	C/T
YM060800	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM060800-R1	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T
YM060800-R2	A/T	T/T	A/A	C/T	C/T

表二. *FUR1* 定序結果整理

- FUR1* 所轉譯的蛋白為 uracil phosphoribosyl transferase (UPRT)。
- 為 *FUR1* 的 SNP 位置，但這五個位置的核苷酸差異沒有改變胺基酸組成。
- 總共分析了十三組，三十八個菌株

註：灰色標示表示非 SNP 位置。

strain NO.	FCY2 ^a ORF (全長 1317 nt) 單位：nt				
	102 ^b	225 ^b	273 ^{bc}	750 ^b	756 ^b
YM020055	A/A	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020055-R1	A/A	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020055-R2	A/A	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020112	A/C	G/C	G/T	A/G	C/T
YM020112-R1	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T
YM020112-R2	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T
YM020291	C/C	G/C	G/T	A/G	C/T
YM020291-R1	C/C	CC	T/T	G/G	T/T
YM020291-R2	C/C	CC	T/T	G/G	T/T
YM020347	A/C	G/C	G/T	A/G	C/T
YM020347-R1	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T
YM020347-R2	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T
YM020438	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020438-R1	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020438-R2	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020715	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020715-R1	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020715-R2	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM020743	C/C	G/C	G/T	A/G	C/T
YM020743-R1	C/C	CC	T/T	G/G	T/T
YM020743-R2	C/C	CC	T/T	G/G	T/T
YM060088	A/C	G/C	G/T	A/G	C/T
YM060088-R1	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T
YM060088-R2	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T
YM060173	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060173-R1	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060173-R2	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060210	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060210-R	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060369	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060369-R1	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060369-R2	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060616	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060616-R1	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060616-R2	A/C	G/G	G/G	A/A	C/C
YM060800	C/C	G/C	G/T	A/G	C/T
YM060800-R1	C/C	CC	T/T	G/G	T/T
YM060800-R2	C/C	CC	T/T	G/G	T/T

表三. FCY2 定序結果整理

a. FCY2 所轉譯的蛋白為 purine-cytosine permease (PCP)。

b. 為 FCY2 的 SNP 位置，102、225、750 和 756 核苷酸差異沒有改變胺基酸組成。

c. 第 273 個核苷酸是 G/T 的異質合子型，兩股所轉譯 PCP 的第 91 個胺基酸分別是 Met (ATG) 和 Ile (ATT)

註：灰色標示表示非 SNP 位置。

strain NO.	up stream (500 nt)					FCY2 ORF (全長 1317 nt) 單位：nt					down stream (500 nt)
	-360 ^a	-224 ^a	-196 ^a	-187 ^a	-69 ^a	102 ^a	225 ^a	273 ^{ab}	750 ^a	756 ^a	201 ^a
YM020112	A/C	C/C	G/A	T/C	G/T	A/C	G/C	G/T	A/G	C/T	C/T
YM020112-R1	C/C	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T	T/T
YM020112-R2	C/C	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T	T/T
YM020291 ^c	A/A	T/C	A/A	C/C	G/T	C/C	G/C	G/T	A/G	C/T	C/T
YM020291-R1	A/A	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	CC	T/T	G/G	T/T	T/T
YM020291-R2	A/A	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	CC	T/T	G/G	T/T	T/T
YM020347	A/C	C/C	G/A	T/C	G/T	A/C	G/C	G/T	A/G	C/T	C/T
YM020347-R1	C/C	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T	T/T
YM020347-R2	C/C	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T	T/T
YM020743	A/A	T/C	A/A	C/C	G/T	C/C	G/C	G/T	A/G	C/T	C/T
YM020743-R1	A/A	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	CC	T/T	G/G	T/T	T/T
YM020743-R2	A/A	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	CC	T/T	G/G	T/T	T/T
YM060088	A/A	C/C	G/A	T/C	G/T	A/C	G/C	G/T	A/G	C/T	C/T
YM060088-R1	A/A	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T	T/T
YM060088-R2	A/A	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	G/G	T/T	T/T
YM060800	A/A	T/C	A/A	C/C	G/T	C/C	G/C	G/T	A/G	C/T	C/T
YM060800-R1	A/A	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	CC	T/T	G/G	T/T	T/T
YM060800-R2	A/A	C/C	A/A	C/C	T/T	C/C	CC	T/T	G/G	T/T	T/T

表四. 有 LOH 現象的六組 FCY2 和上下游各 500bp 定序結果整理

a. 為 FCY2 和上下游各 500bp 的 SNP 位置。

b. 第 273 個核苷酸是 G/T 的異質合子型，兩股所轉譯 PCP 的第 91 個胺基酸分別是 Met (ATG) 和 Ile (ATT)

c. 進行 SAT1 flipper 之 parental strain

註：灰色標示表示非 SNP 位置。

No.	Sequence (nt)
1	normal
2	53 T→C
3	20 G→A ; 178 C→T ; 269 C del
4	normal
5	93 T→C ; 436 G→A
6	normal
7	489 G→A ; 491-492 AGC del
8	normal
10	359 A→T

表五. *CaNDT80* 活化區隨機突變 library 挑選其中 10 菌落定序結果

定序結果顯示 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library 約有 55% 帶有突變序列。Del 表示發生 deletion mutation。

WLB NO.	Sequencing result (nt)	附註
1	379A->C , 476C del	1.6 the same
2	188A->G , 202C del , 250C->T , 406C->A	
3	174-176ACA del , 187C del , 513A->G	
5	244C del , 524A->C	
6	379A->C , 476C del	1.6 the same
8	122A->G , 306C del	
10	104A del , 363A->G	
11	244C->T	82aa : CAG -> TAG stop
12	244C->T	11.12 the same
13	187C del	
14	274G->A , 298T->C , 340C->T , 364C->T	92aa : GCT Ala -> ACT Thr ; 100aa : TTG Leu -> CTG Leu ; 114aa : CAA Gln -> TAA stop ; 122aa : CAC His -> TAC Tyr
15	232C->T	78aa : CAA Pro -> TAA stop
16	63A->G , 544C del	
17	160C->A , 340C->T	54aa : CAA Gln -> AAA Lys ; 114aa : CAA Gln -> TAA stop
18	458T del	
19	299T->A , 430C->T , 477A->T	100aa : TTG Leu -> TAG stop ; 144aa : CAC His -> TAC Tyr ; 159aa : CCA Pro -> CCT Pro
20	108A add , 464C->G , 536T->A	
21	29A->G , 56C->A , 426A->T	10aa : AAC Asn -> AGC Ser ; 19aa : TCG Ser -> TAG stop ; 142aa : CAA Gln -> CAT His

WLB NO.	Sequencing result (nt)	附註
22	278Gdel	
23	221Gdel	
24	140A->C , 383Cdel , 446T->C	
25	384Adel	
26	36Cdel , 161A->T , 345A->G , 359A->T , 466A->G	
27	221Gdel , 283A->G	
28	316C->T , 413A->G ,	106aa : CAG Gln -> TAG stop ; 138aa CAA Gln -> CGA Arg
29	115Tdel , 439G->T	
30	134Gdel , 240G->A , 461A->T	
32	2T->C , 99T->A , 128A->G , 292Cdel , 301A->C	
35	90T->A , 319C->T ,	30aa : ACT Thr -> ACA Thr ; 107aa : CAG Gln -> TAG stop
38	187Cdel ,	38. 61 the same
40	184ACadd ,	
41	121C->T , 370C->T ,	41aa : CAC His -> TAC Tyr ; 124aa : CAG Gln -> TAG stop
42	442Cdel , 505Cdel	
43	184Cdel ,	
44	499C->T	167aa : CAG Gln -> TAG stop codon
45	228T->A , 304Cdel , 398A->T , 489G->A , 534T->C	
46	36Cdel , 335A->G ,	
47	178C->T , 448A->G	60aa : CAA Gln -> TAA stop ; 150aa : AAT Asn -> GAT Asp
48	73GCdel ,	
49	55T->C , 173A->G , 184Cdel , 500A->T	
50	127C->T ,	43aa : CAA Gln -> TAA stop

WLB NO.	Sequencing result (nt)	附註
51	178C->T ,	60aa : CAA Gln -> TAA stop
52	153T->C , 216T->A , 277G->A	51aa : ATT Ile -> ATC Ile ; 72aa : TAT Tyr -> TAA stop ; 93aa : GGT Gly -> AGT Ser
53	389Cdel , 520CAAdel ,	
54	213C->T , 446T->A	71aa : CAC His -> CAT His ; 149aa : TTG Leu -> TAG stop
55	86Cdel , 245A->G , 317A->G	
56	478C->T	160aa : CAA Gln -> TAA stop
57	340Cdel ,	
58	209T->C , 216T->A , 484CAAdel , 502C->T , 533A->G	70aa : ATT Ile ->ACT Thr ; 72aa : TAT Tyr -> TAA stop ; 162aa ; 178aa
59	83T->A , 218A->T , 307C->T ,	28aa : GTT Val -> GAT Asp ; 73aa : CAT His -> CTT Ile ; 103aa : CAG Gln -> TAG stop
60	230A->G ,429A->G , 446T->A , 521AACdel	77aa : CAG Gln -> CGG Arg ; 143aa : TTA Leu -> TTG Leu ; 149aa : TTG Leu -> TAG stop ; 174aa del
61	187Cdel ,	38. 61 the same
62	41A->T , 139Cdel , 391T->C , 395A->G , 398A->G	
63	278Gdel , 256T->C ,	
64	35C->T , 56C->T , 187Cdel	
65	22A->G , 251C->T , 278Gdel	
66	404Tdel ,	
67	304Cdel ,	
68	493C->T	165aa : CAA Gln -> TAA stop
69	464Cdel , 500A->G	

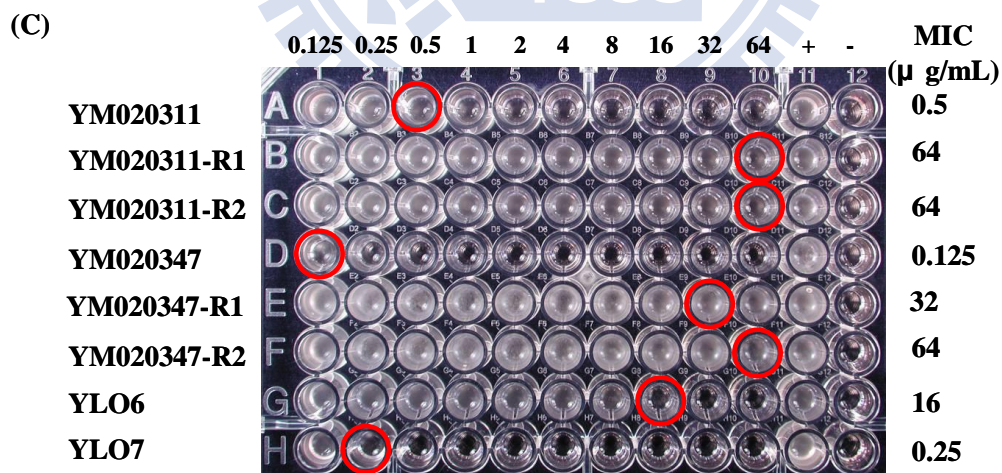
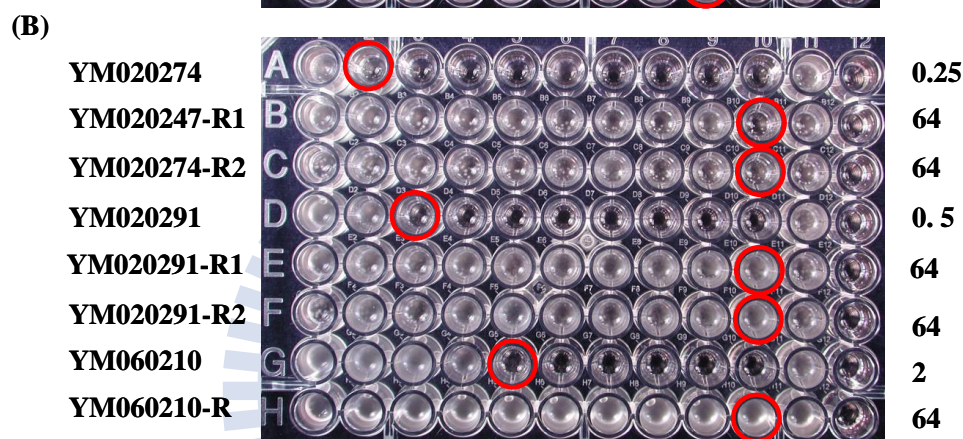
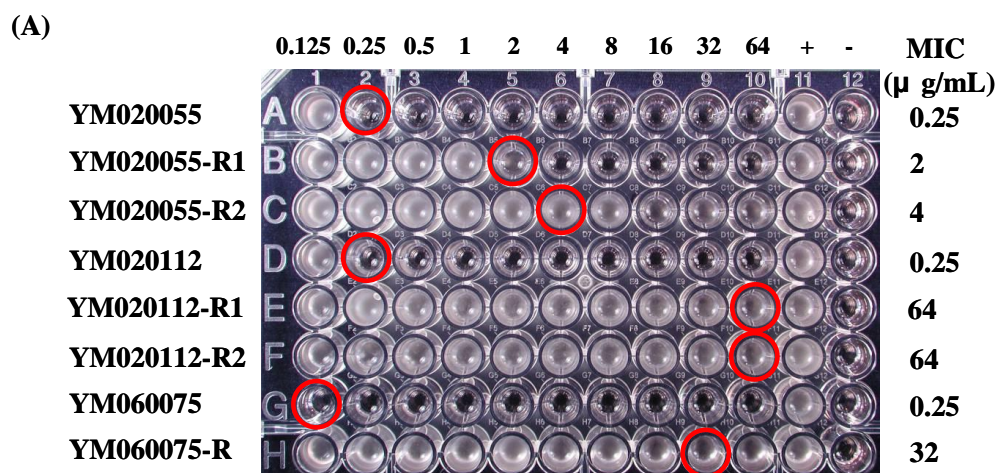
WLB NO.	Sequencing result (nt)	附註
70	383Cdel	70.72 the same
71	127C->T , 496C->T	43aa : CAA Gln -> TAA stop ; 166aa : CAG Gln -> TAG stop
72	383Cdel	70.72 the same
73	42A->G , 429A->C , 532Cdel	
74	107A del , 165A->T , 255T->A , 284A->G	
75	132Tdel , 223A->C , 482A->G	
76	233A->G , 255T->C , 448A->T , 478C->T	78aa : CAA Gln -> CGA Arg ; 85aa : CAT His -> CAC His ; 150aa : AAT Asn ->TATTyr ; 160aa : CAA Gln ->TAA stop
77	64G->A , 80A del , 532Cdel	
78	442Cdel	
79	151A->G , 444T->C , 476Cdel	
80	480A del	
81	149C->A ,	50aa : TCA Ser -> TAA stop
82	48T->A ; 229C->T	
83	117Cdel ;	
84	278Gdel	
87	125A->T , 194T->C , 423Cadd , 431A->G , 512A->G	
88	244C->T , 320A->T , 365A->G ,	82aa : CAG Gln -> TAG stop ; 107aa : CAG Gln -> CTG Leu ; 122aa : CAC His -> CGC Arg
89	440A->G , 544Cdel	
90	124C->T , 137A->T , 428Tdel , 455A->G	
91	117Cdel ,	
92	376A->G , 433Cdel	

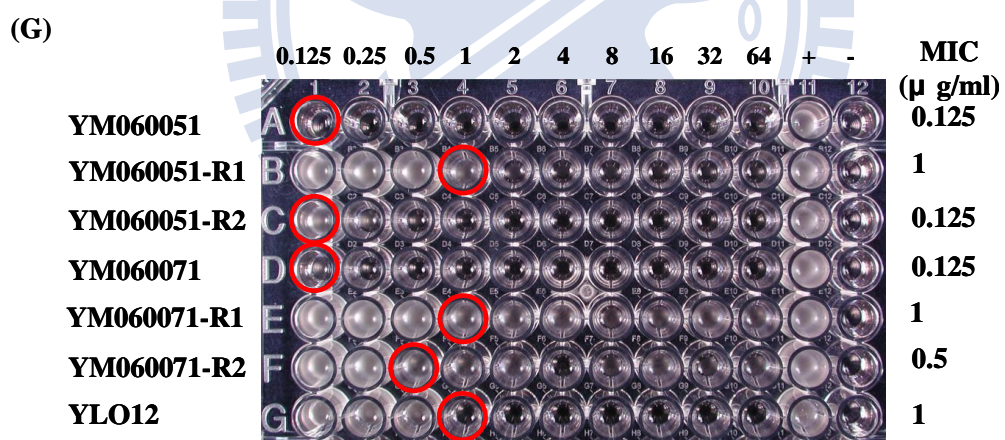
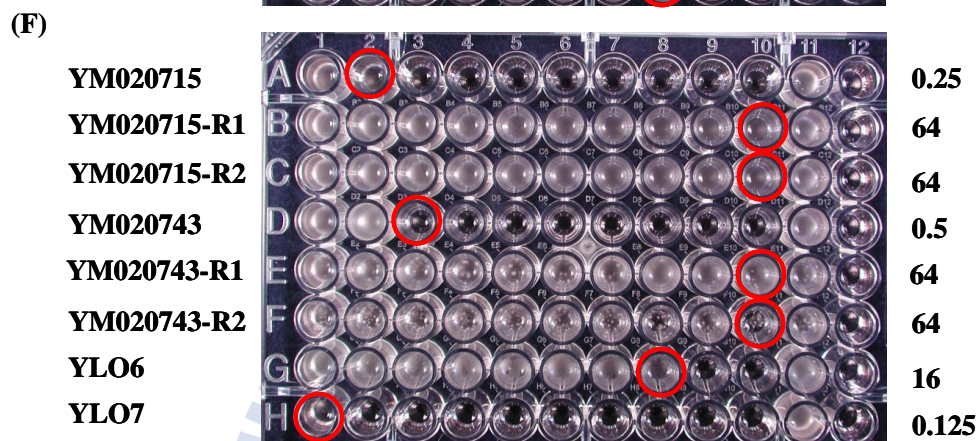
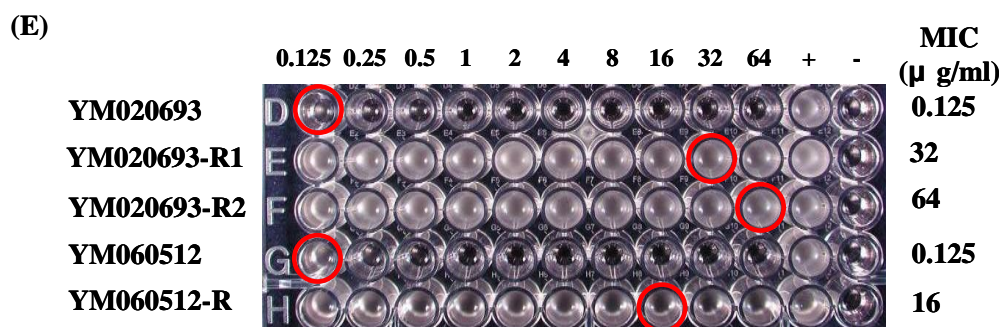
WLB NO.	Sequencing result (nt)	附註
94	316Cdel	
95	134Gdel	
96	323T->C , 340C->T	108aa : ATG Met -> ACG Thr ; 114aa : CAA Gln -> TAA stop
97	5A->G , 292Cdel , 368A->G	
98	15T->C , 184Cdel , 443A->T	
99	493C->T , 494A->G	165aa : CAA Gln -> TGA stop
100	141Tdel , 341A->G	
101	464Cdel	
102	238C->T , 405C->T	80aa : CAG Gln -> TAG stop ; 135aa : TTC Phe -> TTT Phe
103	246G->A , 389Cdel	

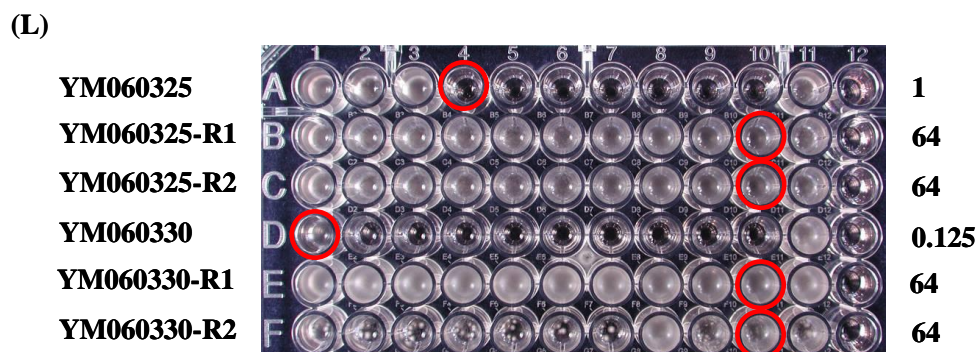
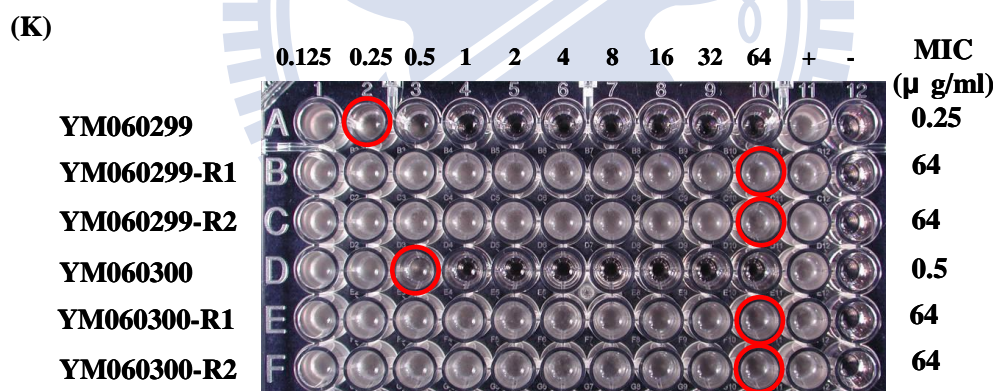
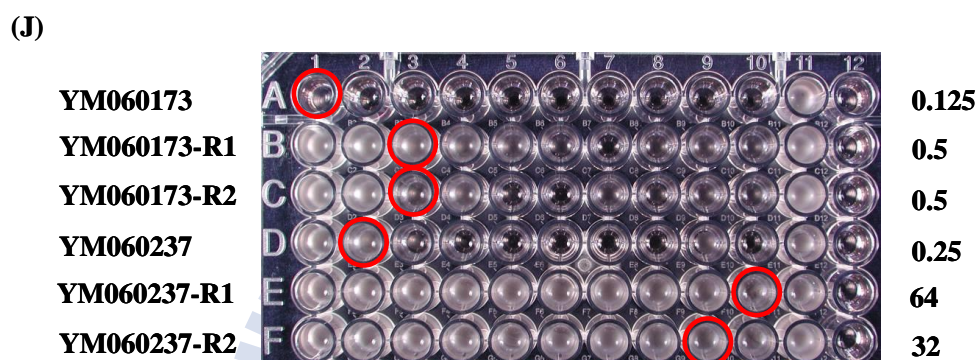
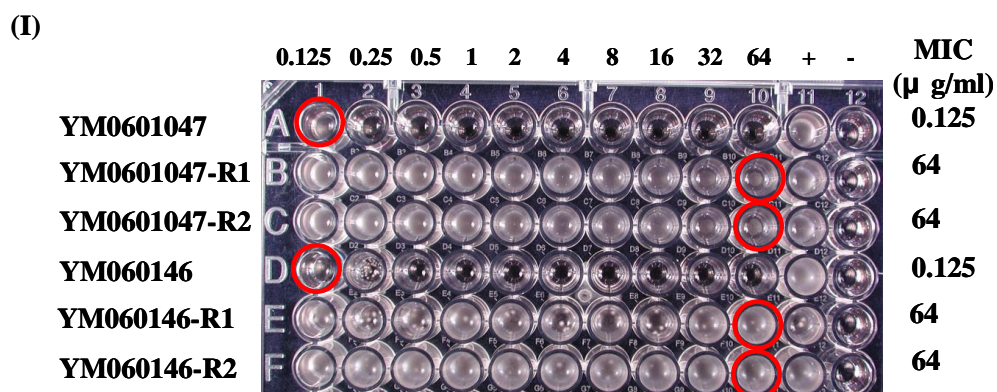
表六. 經由 β -galactosidase filter assay 篩選的 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library 定序結果 del 表示發生 deletion mutation , stop 表示發生了 nonsense mutation 產生 stop codon 。

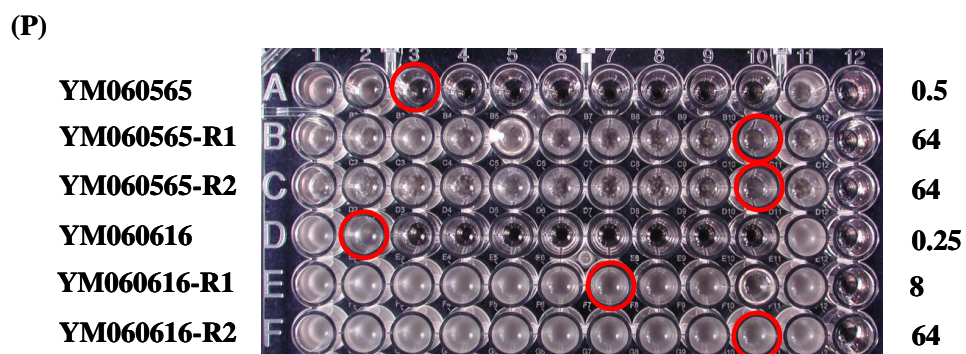
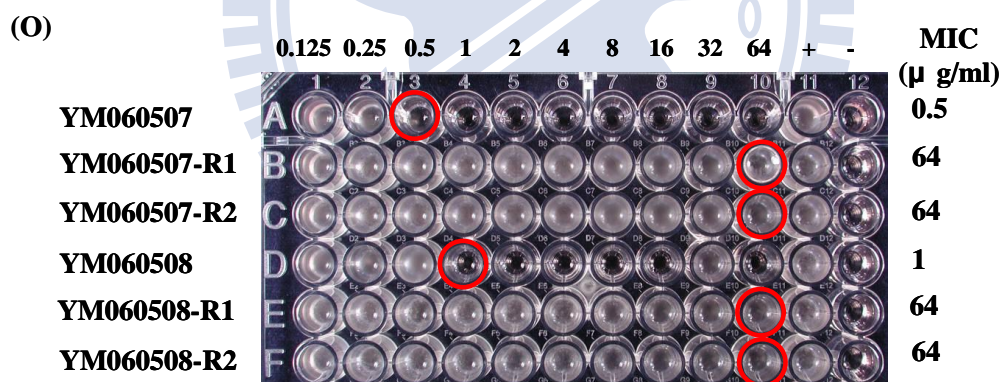
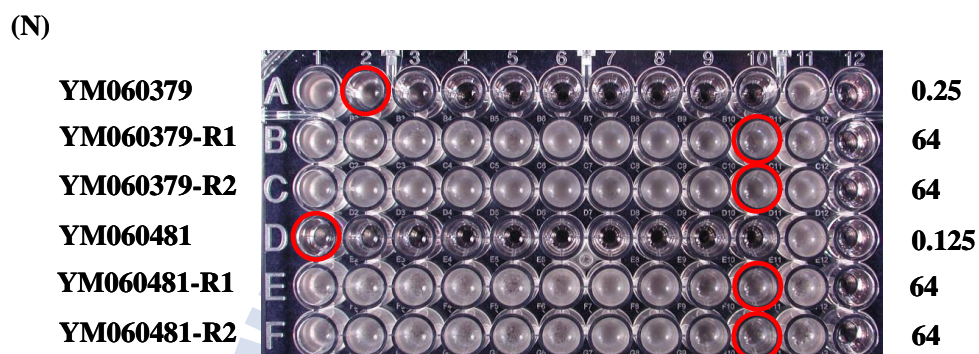
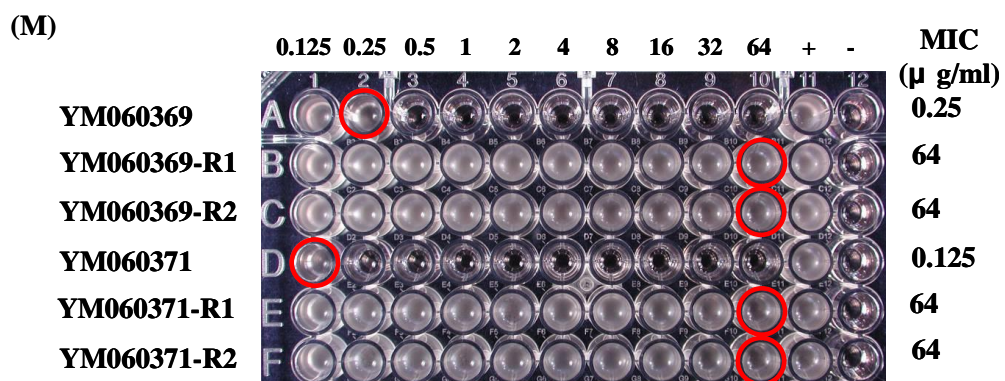
NO.	Name	Mutation of insert fragment
1	LOB280	No mutation (wild type sequence)
2	Library#2	Missense mutation: 53T->C
3	WLB001	Deletion: 379A->C; 467Cdel
4	WLB011	Stop codon: 244C->T
5	WLB020	Addition: 108Aadd; 464C->G; 536T->A

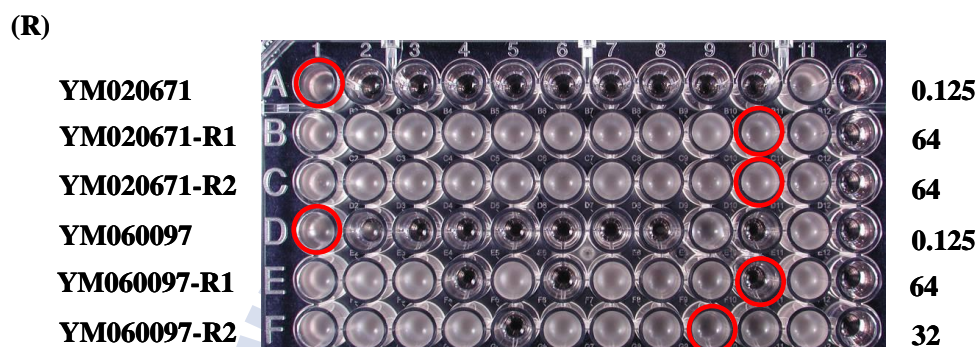
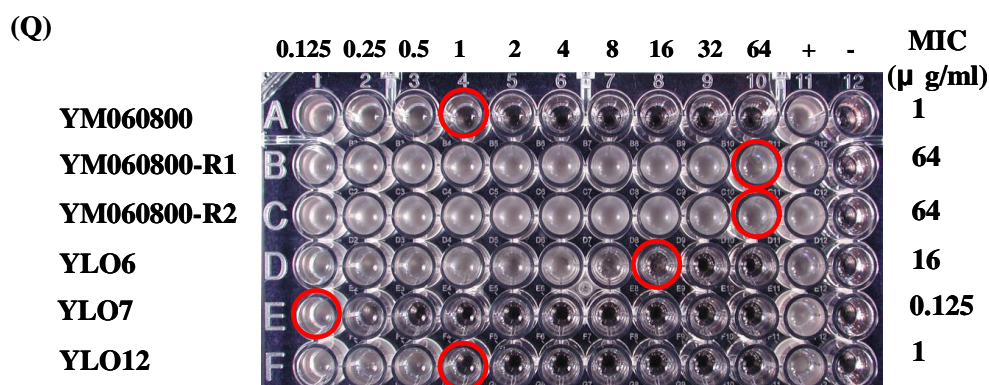
表七. 測試篩選質體功能的 *CaNDT80* 活化區突變插入片段序列
 預計於篩選用抗生素培養基上，篩選質體帶有 No. 1 及 2 片段者會生長。





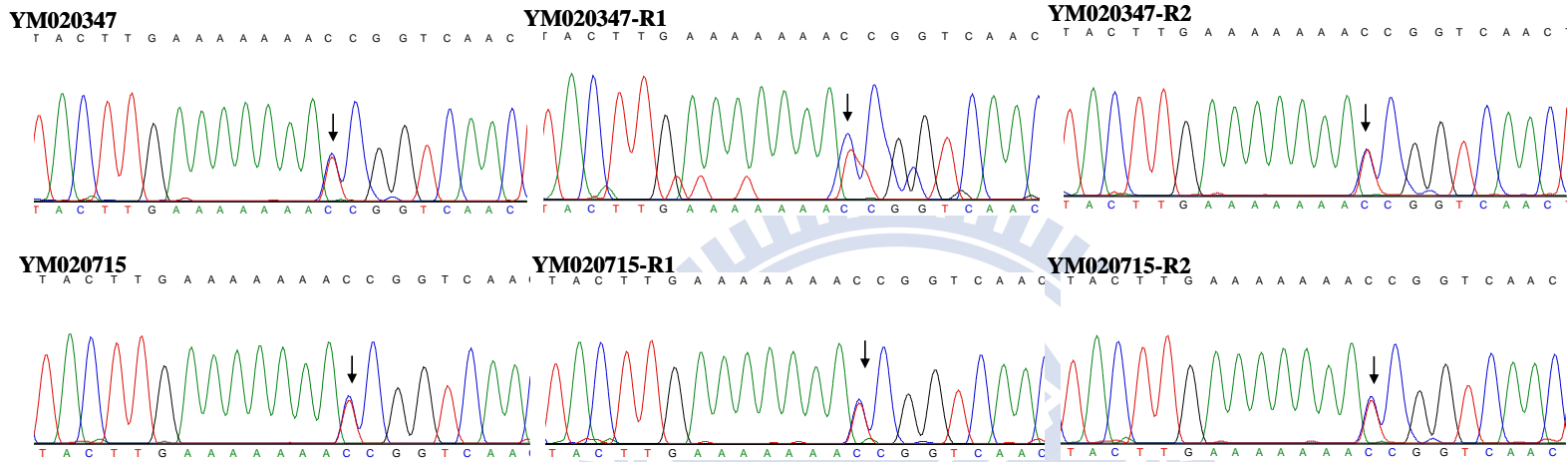




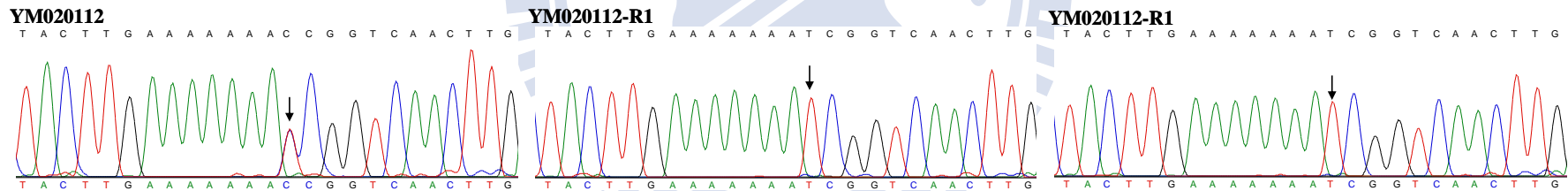


圖一. broth microdilution 48 小時 5-flucytosine (5-FC) 藥盤照片
 分析菌株為 *Candida tropicalis* 臨床分離母株，以及柯惠菁從 5-FC E-test 藥盤所收集的抗藥衍生株，以上總共 102 株菌，編號標示於藥盤左側。5-FC 的濃度由第一行到第十行從 0.125 μ g/ml 以兩倍遞增至 64 μ g/ml，第十一行是沒有加藥只有加菌和 RPMI 培養液的正對照組，第十二行是只有 RPMI 培養液無菌的負對照組。5-FC 結果判讀以 48 小時抑制 50% 菌量生長的藥物濃度為此菌株之 MIC，數值標示於藥盤右側。YLO12 (ATCC[®] 90028, *C. albicans*, 0.5~2.0 μ g/ml), YLO6 (ATCC[®] 6258, *C. krusei*, 4.0~16 μ g/ml), 和 YLO7 (ATCC[®] 22019, *Candida parapsilosis*, 0.12~0.5 μ g/ml) 為標準菌株 (standard controls)。所有菌株 24 小時和 48 小時 MIC 總整理於表一。

(A)



(B)

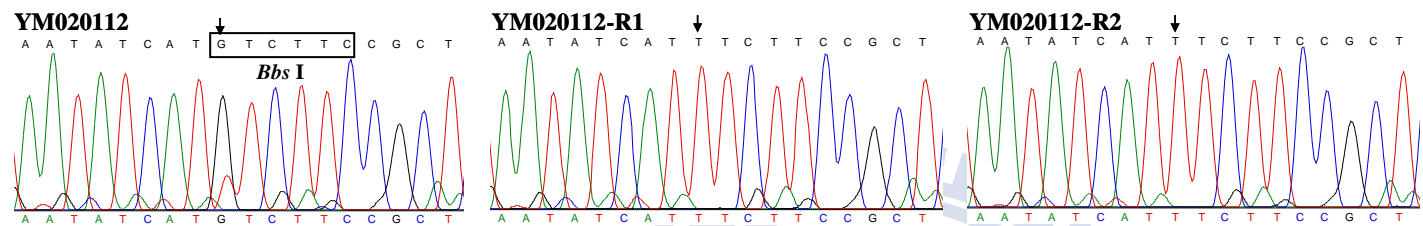


圖二. YM020347、YM020715 及 YM020112 之 *URA3* 於核苷酸 791 的定序波峰圖

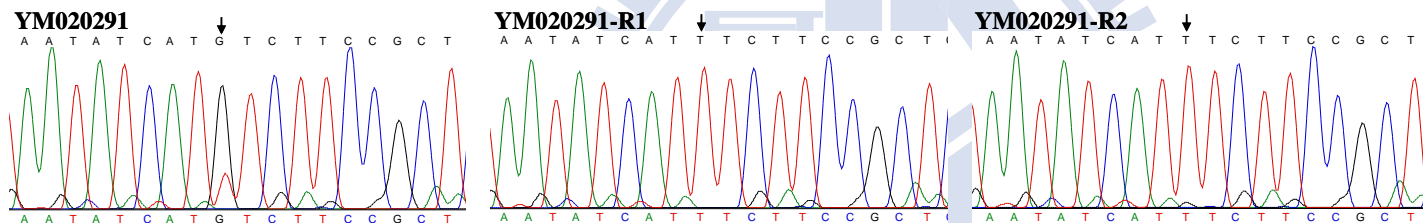
(A) 在 *URA3* 之定序結果，除了 YM020112 這一組，其餘 12 組的 parental strain 與其衍生株無序列差異，組別間的差異則是 YM020347 和 YM020715 這兩組在核苷酸 791 為 C/T 異質合子型，其他十組別則為 C/C 同質合子型。箭頭標示為核苷酸 791 之位置。

(B) YM020112 這一組 parental strain 與其衍生株於核苷酸 791 有差異，parental strain 為 C/T 異質合子型，其衍生株則為 T/T 同質合子型，造成第 264 個胺基酸由 Thr (ACC) 變為 Ile (ATC)。箭頭標示為核苷酸 791 之位置。

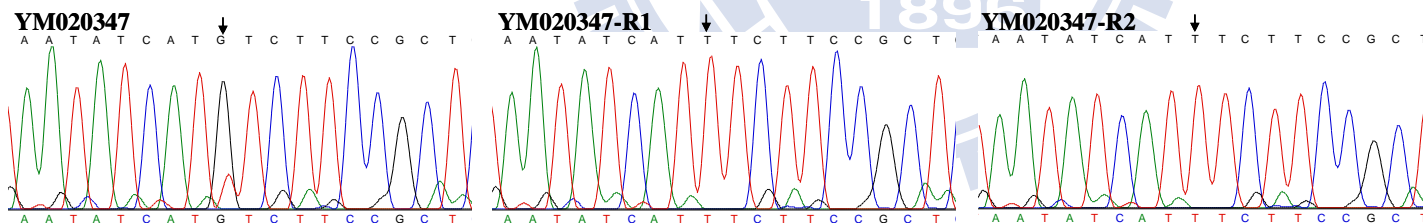
(A)



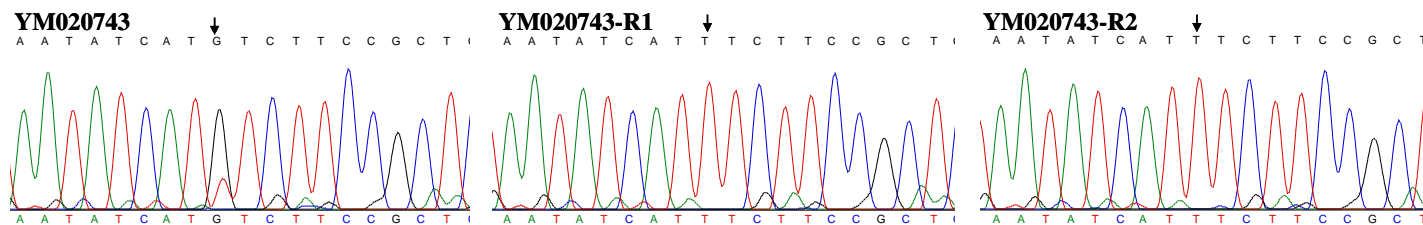
(B)



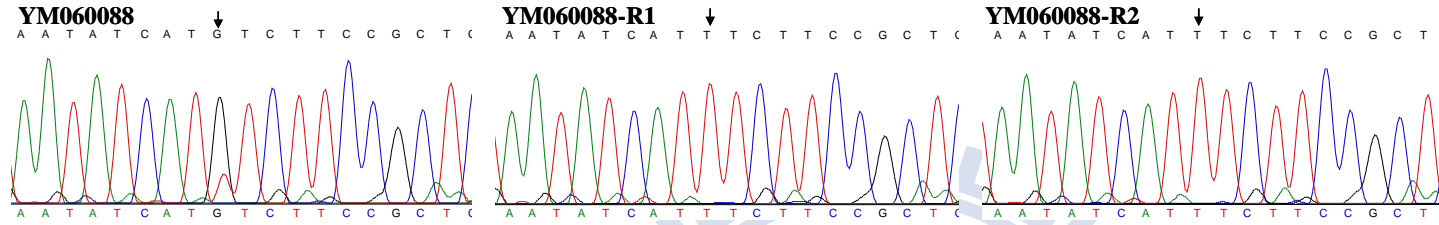
(C)



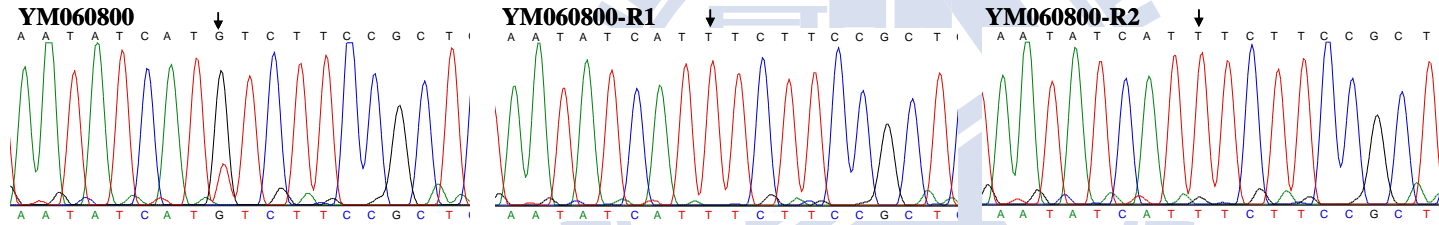
(D)



(E)



(F)



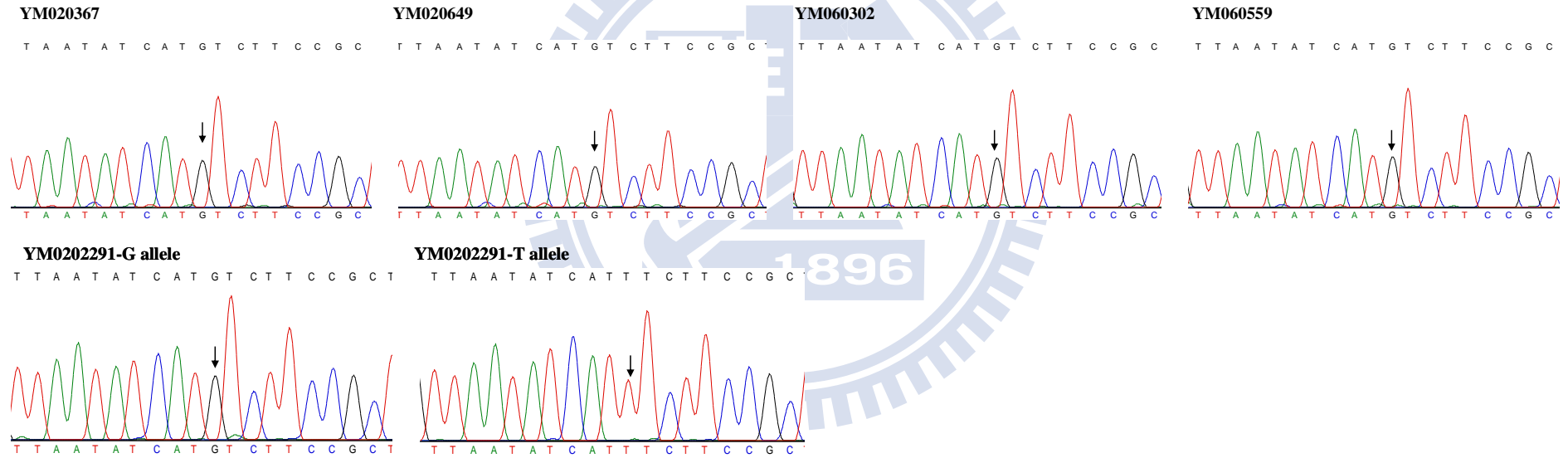
圖三. 有 LOH 現象的六組 *FCY2* ORF 於 273 nt 定序波峰圖

將 parental strain 與抗藥衍生株的 *FCY2* ORF 核苷酸 273 定序波峰圖並列比較。箭頭標示位置為第 273 個核苷酸，parental strain 是 G/T 的異質合子型，兩股所轉譯 PCP 的第 91 個胺基酸分別是 Met (ATG) 和 Ile (ATT)。六組的 *FCY2* 和上下游各 500bp 定序結果總整理請參照表四。以方框於 YM020211 定序波峰圖標示出之後 *Bbs* I 辨認位置。

(A)



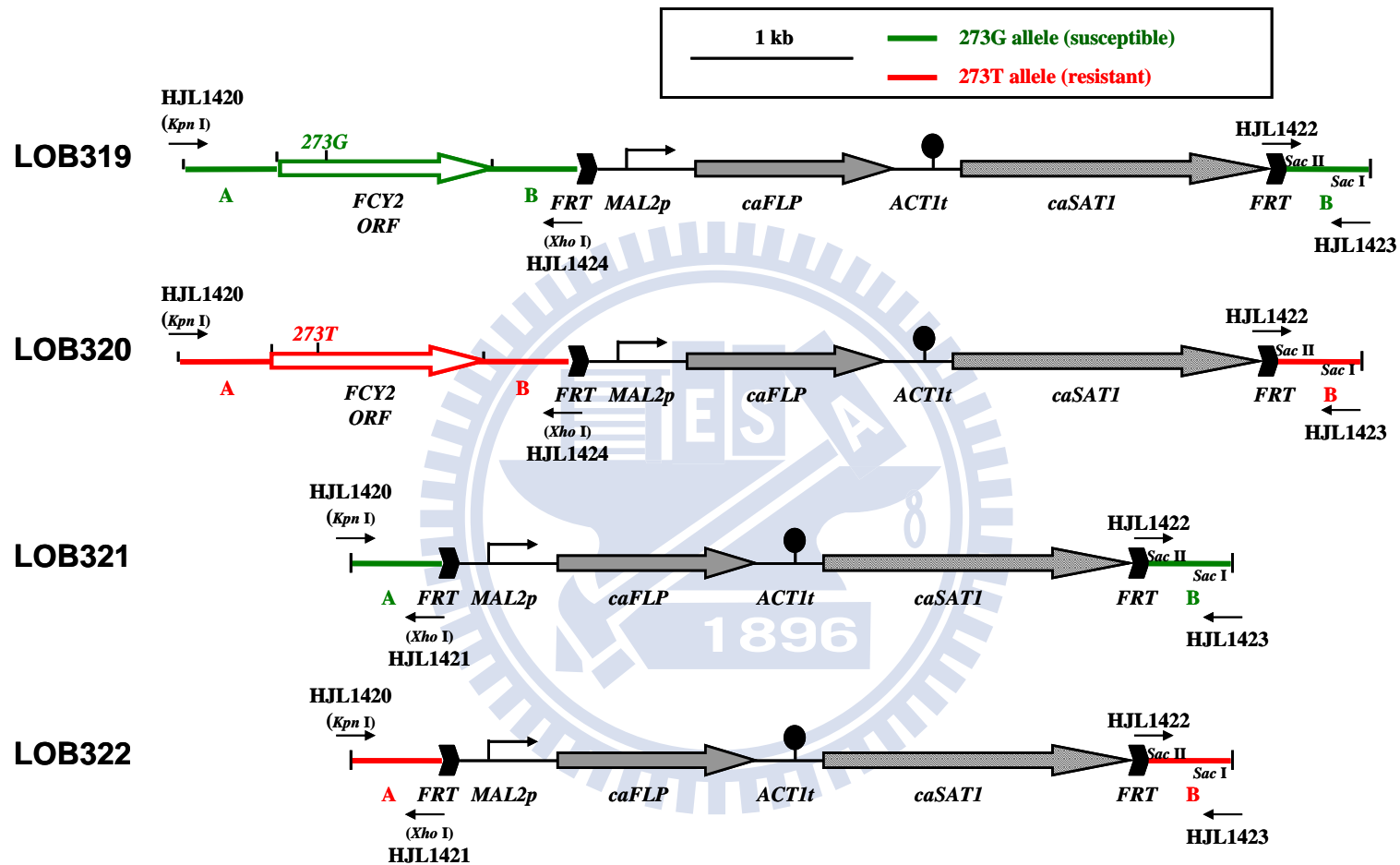
(B)



圖四. 對 5-flucytosine (5-FC) 非常敏感菌株定序 *FCY2* ORF 比對結果與定序波峰圖

(A) YM020367、YM020649、YM060302 和 YM060559 定序 *FCY2* ORF 序列分別為 236701、264901、630201 和 655901，FCY2-1G 為 YM020291 的 G 股序列，FCY2-1T 為 YM020291 的 T 股序列。225、273 nt 標示為 *FCY2* ORF 內 SNP 位置。

(B) 定序波峰圖箭頭表示核苷酸 273G 的位置。



圖五. 建構 SAT1 flipper 所需的質體 LOB319、LOB320、LOB321 及 LOB322 示意圖

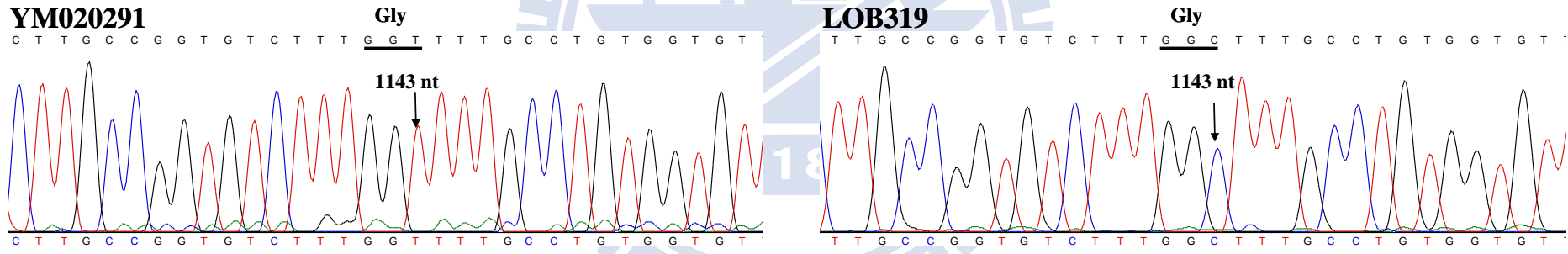
綠色線段代表 *FCY2* 在 ORF 核苷酸為 273G 的 allele，紅色線段代表為 273T 的 allele，A 區域表示 *FCY2* 上游約 500 bp 片段，B 區域表示 *FCY2* 下游約 500 bp 片段。LOB319 與 LOB320 為同源重組和基因補救質體，轉形到 YM0202291 分別可以得到 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 和 *FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 的同質合子置換菌株；質體 LOB321 與 LOB322 為基因剔除質體，轉形後可得 *FCY2* (273G)/*fcy2*Δ 和 *FCY2* (273T)/*fcy2*Δ 的單股缺陷突變株。

(A)

```
994                                     1093
AOBG  ATGAAC TTGATTTCTTACTACTTGGCCATTTATGAAAGTATGATGTATTCATCTCATTTCATTTGGTACAAAGGTAAAATGAGTGCTTATGATTATGAAA
AOBG3 ATGAAC TTGATTTCTTACTACTTGGCCATTTATGAAAGTATGATGTATTCATCTCATTTCATTTGGTACAAAGGTAAAATGAGTGCTTATGATTATGAAA

1094                                     1143 nt                                     1193
AOBG  GATGGAACGATAAACAAGCTTATCCATTAGGTCTTGCCGGTGTCTTTGGT TTTGCCTGTGGTGTGCTGGTGTGTTGTTT TAGGTATGGATCAAAC TTGGTA
AOBG3 GATGGAACGATAAACAAGCTTATCCATTAGGTCTTGCCGGTGTCTTTGGC TTTGCCTGTGGTGTGCTGGTGTGTTGTTT TAGGTATGGATCAAAC TTGGTA
```

(B)

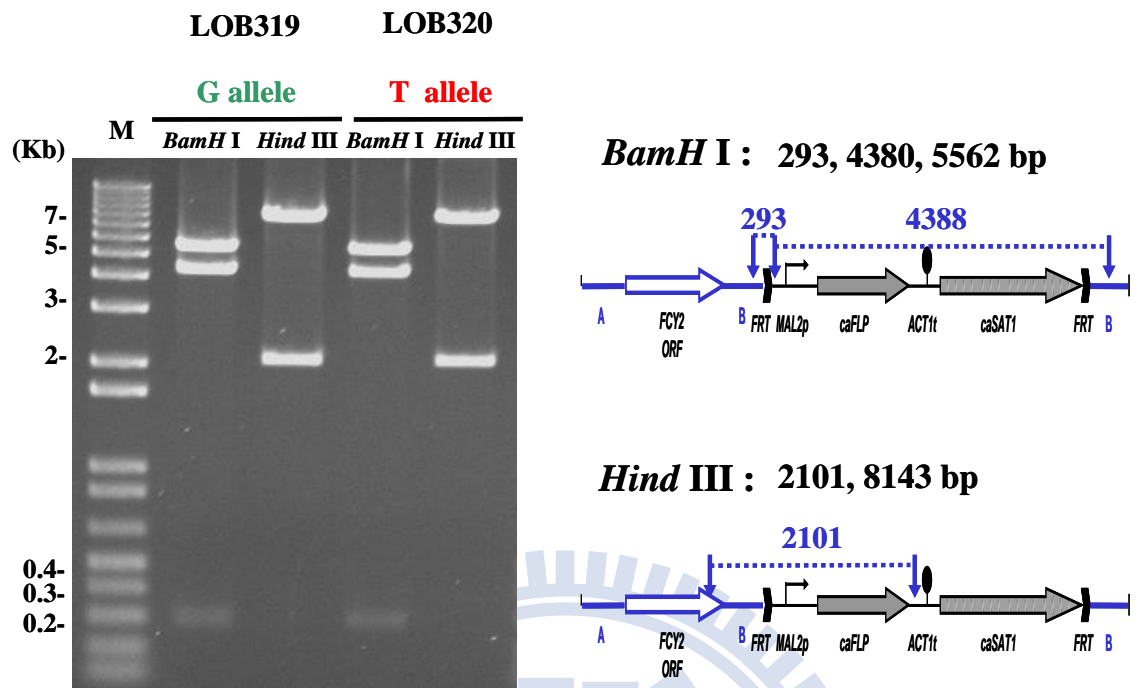


圖六. LOB319 質體的序列比對和定序波峰圖

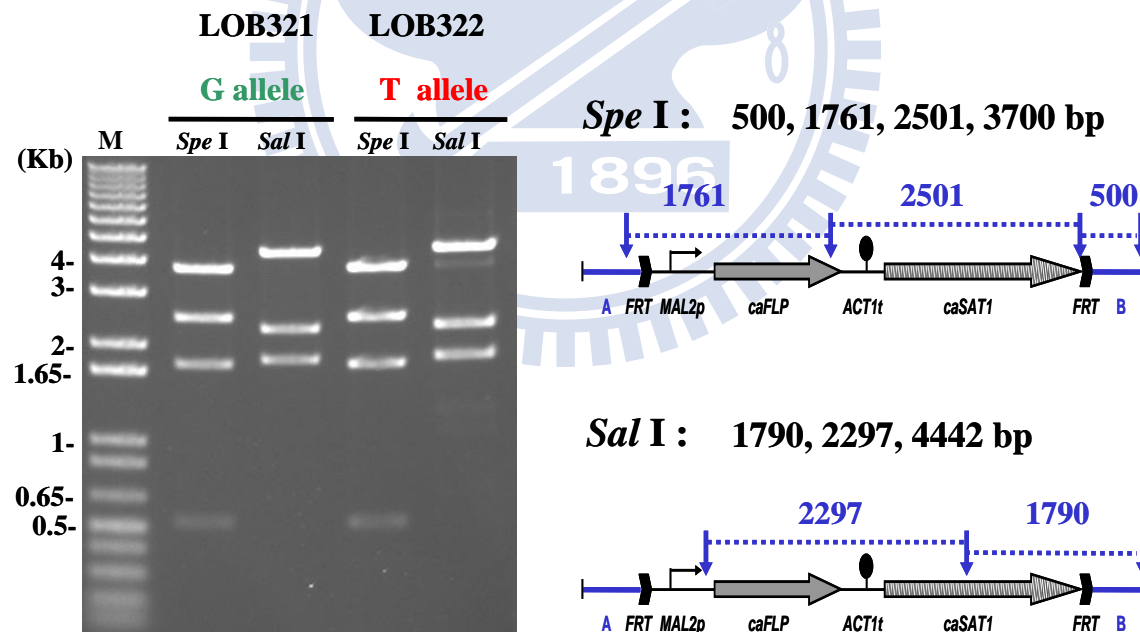
(A) AOBG 為 YM020291 原始序列，AOBG3 為 LOB319 定序序列。顯示質體 LOB319 中 *FCY2* ORF 片段第 1143 個核苷酸因為聚合酶鏈反應過程從 T 突變成 C，但不會改變胺基酸組成，仍然為 Gly。

(B) YM020291 和 LOB319 定序波峰圖箭頭表示核苷酸從 T 突變成 C 的位置。

(A)

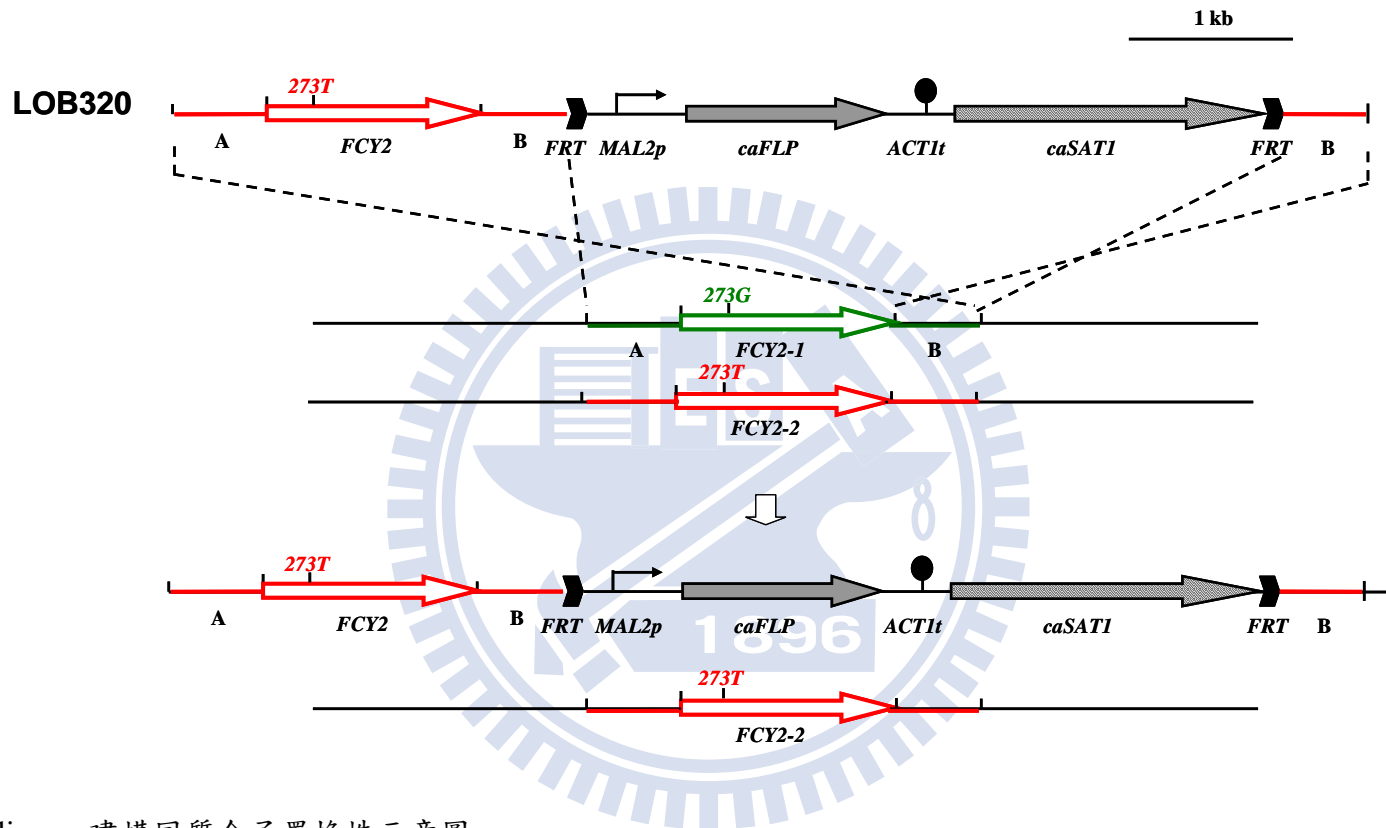


(B)



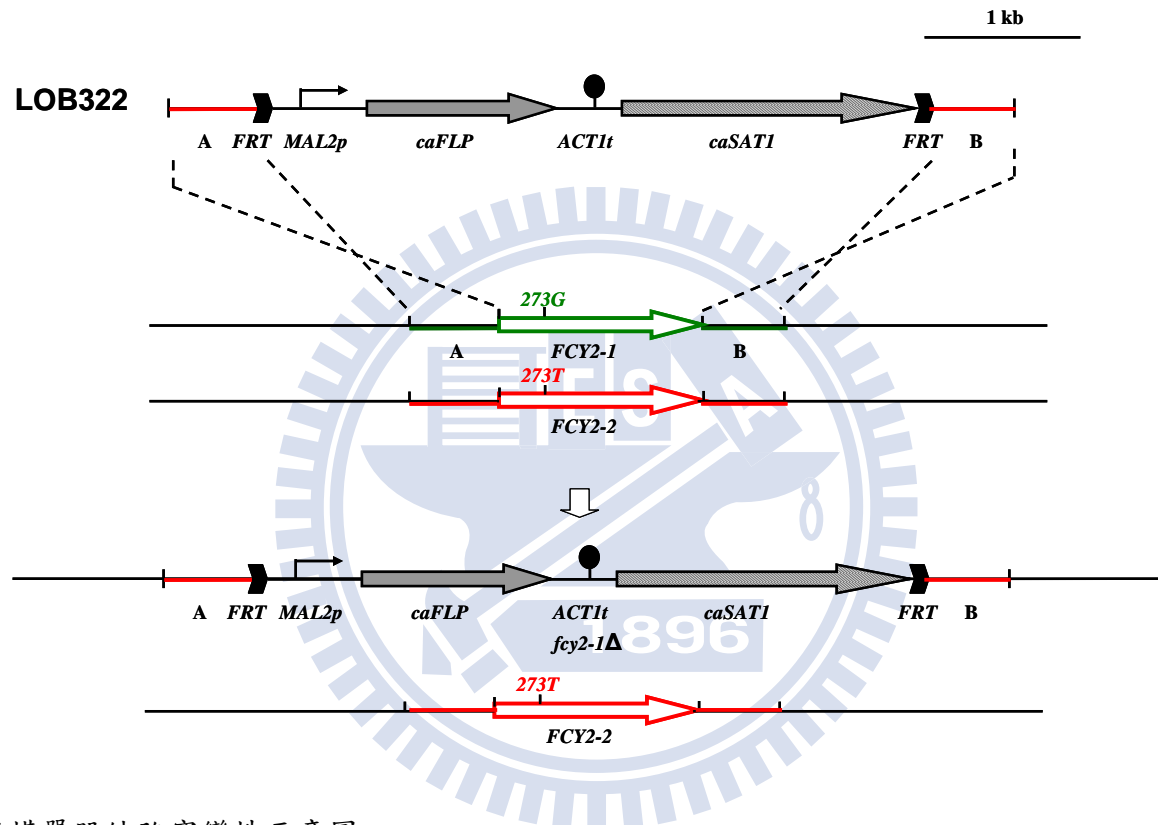
圖七. LOB319、LOB320、LOB321 及 LOB322 限制內切酶圖譜

- (A) LOB319、LOB320 以 *BamH I* 和 *Hind III* 確認，預計大小如示意圖所表示，結果符合預期。
- (B) LOB321、LOB322 以 *Spe I* 和 *Sal I* 確認，預計大小如示意圖所表示，結果符合預期。M 為 1 kb plus DNA ladder。



圖八. 以 *SAT1* flipper 建構同質合子置換株示意圖

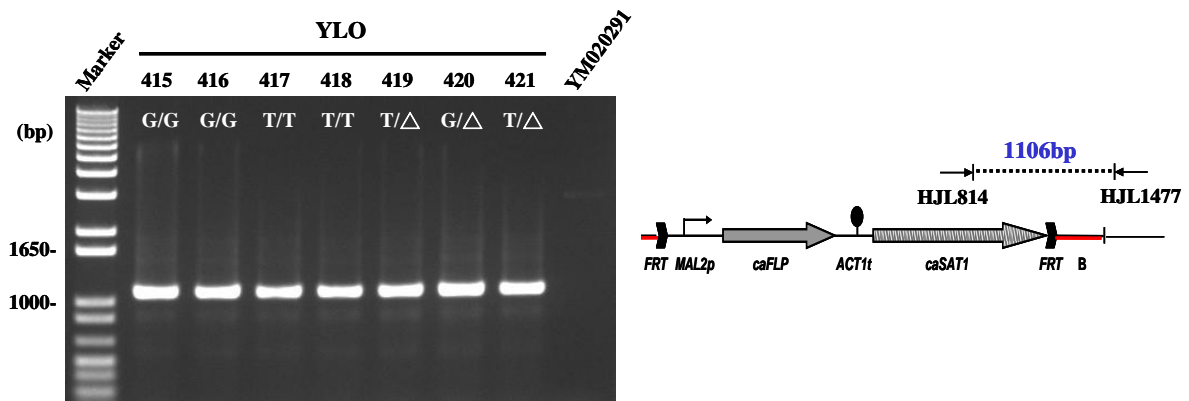
以建構 *FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 同質合子置換株為例，LOB320 以 *Kpn* I 和 *Sac* I 切下包含 *FCY2* 序列和 *SAT1* cassette 的片段轉形到 YM020291，利用同源區域進行同源重組置換。反之，建構 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 同質合子置換株則是轉形 LOB319。綠色線段代表 *FCY2* 在 ORF 核苷酸為 273G 的 allele，紅色線段代表為 273T 的 allele，A 區域表示 *FCY2* 上游約 500 bp 片段，B 區域表示 *FCY2* 下游約 500 bp 片段，虛線表示進行同源重組置換的區域。



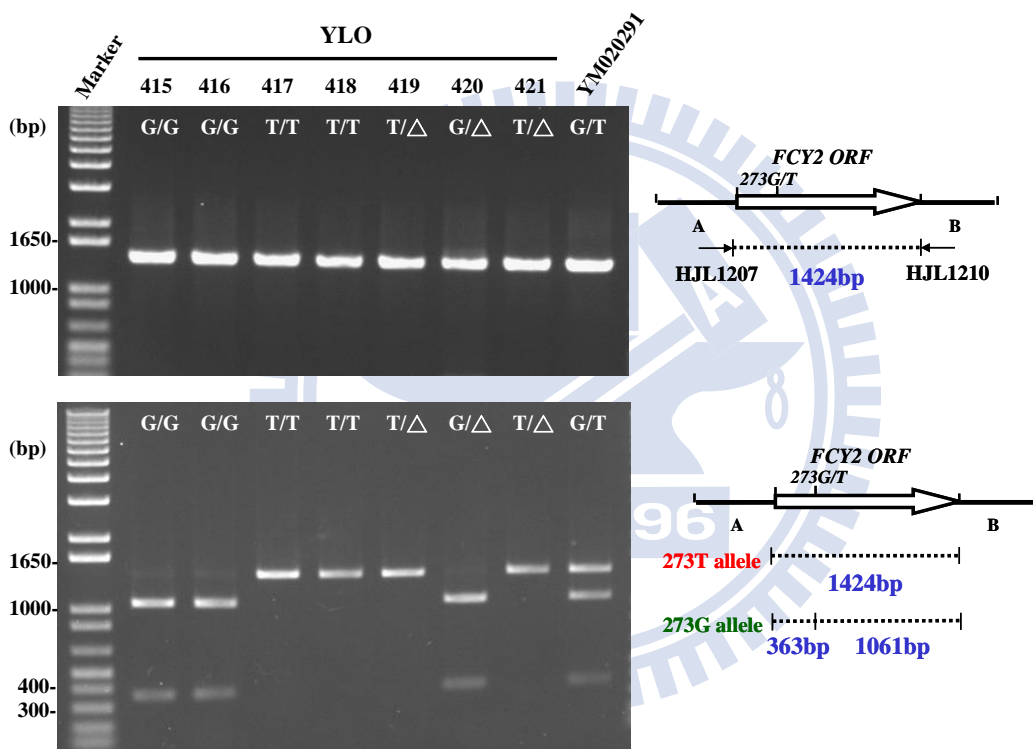
圖九. 以 SAT1 flipper 建構單股缺陷突變株示意圖

已建構 *FCY2* (273T)/*fcy2*Δ 的單股缺陷突變株為例，LOB319 或 LOB320 以 *Kpn*I 和 *Sac*I 切下包含 *FCY2* 序列和 *SAT1* cassette 的片段，轉形至 YM020291，利用同源區域進行同源重組置換，即可隨機剔除 G 股或 T 股的 *FCY2* 基因。綠色線段代表 *FCY2* 在 ORF 核苷酸為 273G 的 allele，紅色線段代表為 273T 的 allele，A 區域表示 *FCY2* 上游約 500 bp 片段，B 區域表示 *FCY2* 下游約 500 bp 片段，虛線表示進行同源重組置換的區域。

(A)



(B)

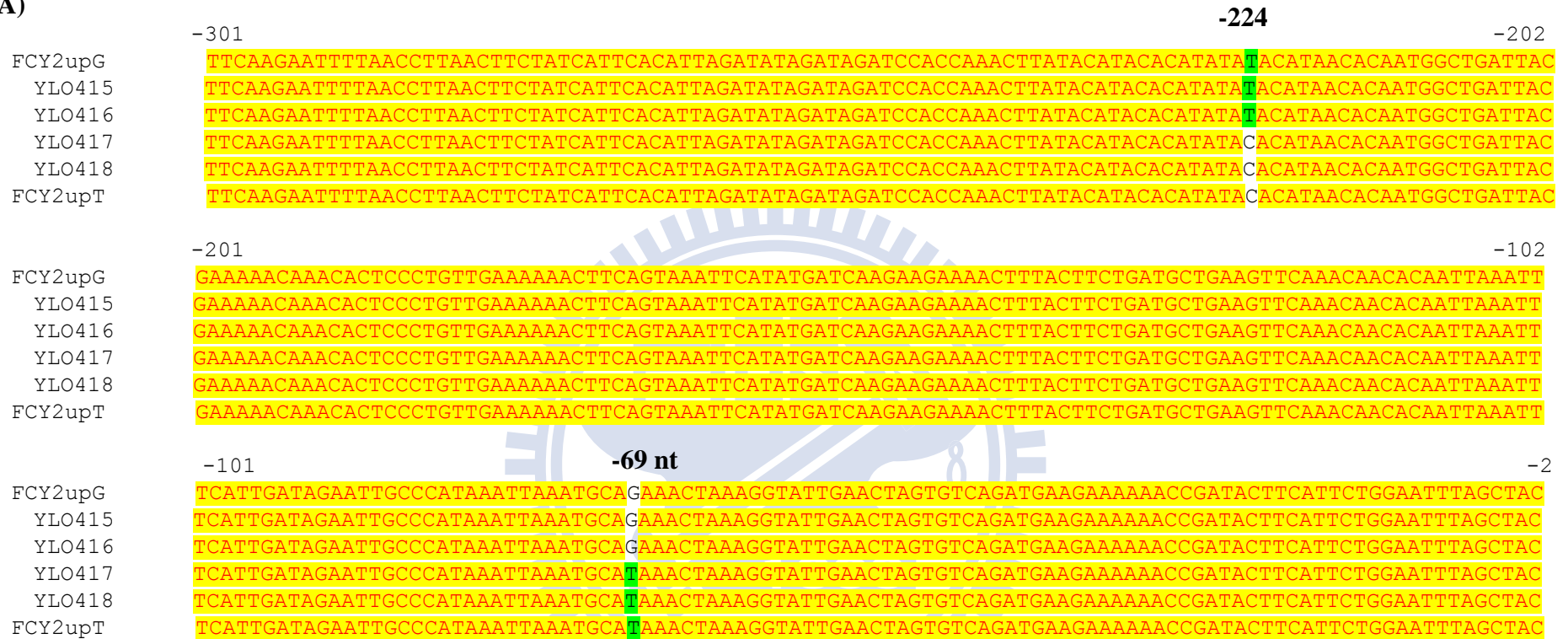


圖十. 以 PCR 確認 *SAT1* cassette 是否進入正確位子, 和以限制酵素 *Bbs* I 確認菌株置換與突變情形

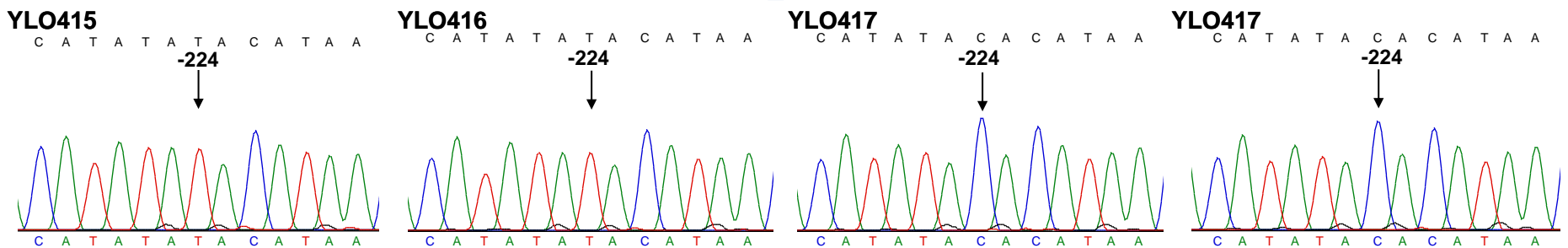
(A) 以 *SAT1* cassette 上的引子 HJL814 和 B 區域更下游的 HJL1477 確認 *SAT1* cassette 是否進入正確的位子, 預計夾出 1106 bp 的片段, parental strain YM020291 則不會夾出此片段。

(B) 以 PCR 夾出 *FCY2* ORF 後, 以 *Bbs* I 確認 (辨認序列 5'-GAAGAC-3', 如圖三方框標示位置) 同質合子置換株的置換情形, 和單股缺陷突變株留下哪一股。G 股在 273 nt 有 *Bbs* I 切位, T 股則無。Maker 為 1 kb plus DNA ladder, YLO415 和 YLO416 為 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 置換株, YLO417 和 YLO418 為 *FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 置換株, YLO420 為 *FCY2* (273G)/*fcy2*Δ 突變株, YLO419 和 YLO421 為 *FCY2* (273T)/*fcy2*Δ 突變株, YM020291 為 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273T) 的異質合子型。

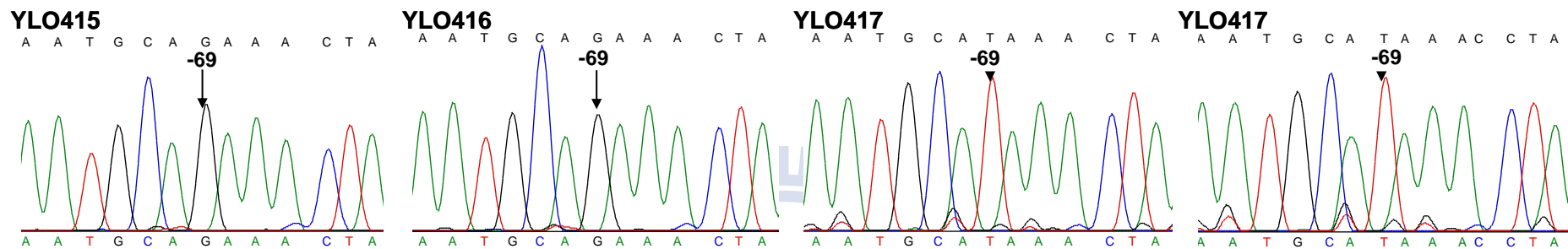
(A)



(B)



(C)

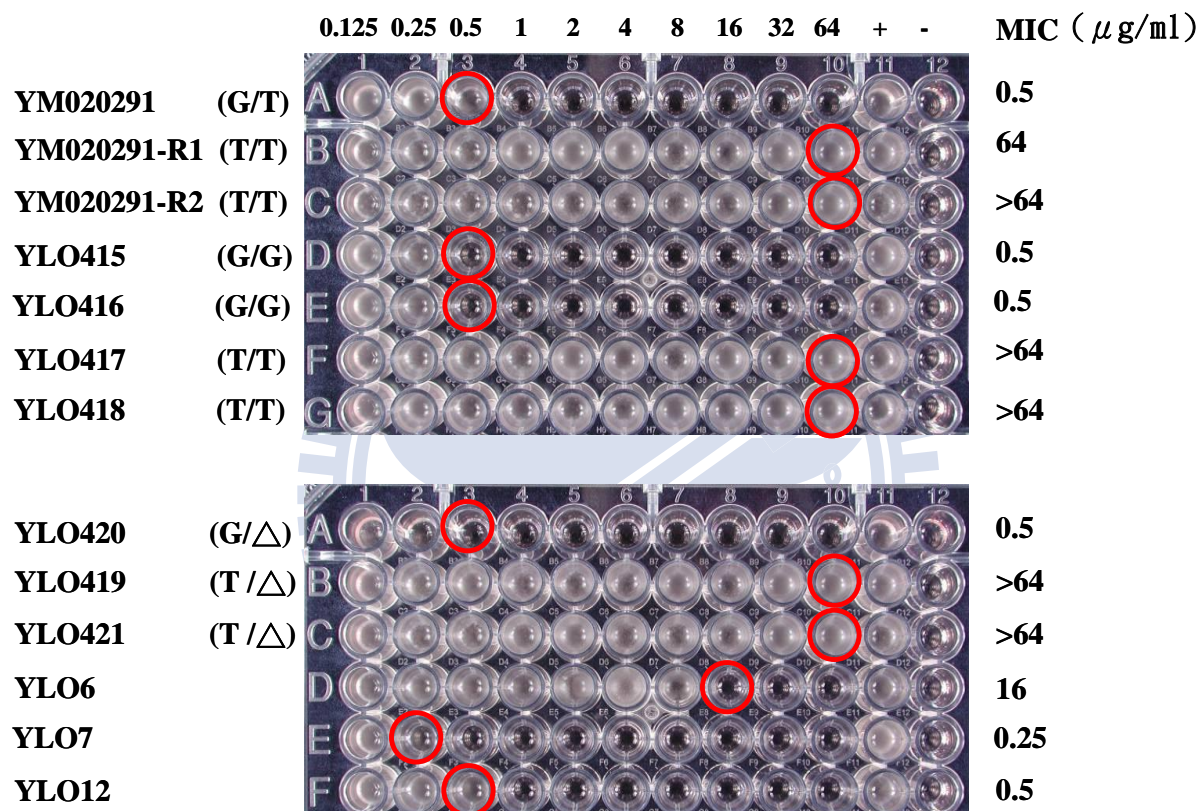


圖十一. 定序 YLO415、YLO416、YLO417 和 YLO418 上游區域比對結果及定序波峰圖

(A) FCY2upG 為 G 股 FCY2 上游序列，FCY2upT 為 T 股上游序列，YLO415、YLO416、YLO417 和 YLO418 為上游定序序列結果，-224 與 -69 為上游的 SNP 位置。YLO415 和 YLO416 為 FCY2 (273G)/FCY2 (273G) 置換株，YLO417 和 YLO418 為 FCY2 (273T)/FCY2 (273T) 置換株。

(B) 定序波峰圖以箭頭標示上游 -224 的位置。

(C) 定序波峰圖以箭頭標示上游 -69 的位置。



圖十二. 以 broth microdilution 分析同質合子置換株和單股缺陷突變株對 5-flucytosine (5-FC) 感受性分析的菌株編號標示於藥盤左側，YM020291 為 parental strain，YM020291-R1、R2 為抗藥衍生株，YLO415 和 YLO416 為 *FCY2* (273G)/*FCY2* (273G) 置換株，YLO417 和 YLO418 為 *FCY2* (273T)/*FCY2* (273T) 置換株，YLO420 為 *FCY2* (273G)/*fcy2* Δ 突變株，YLO419 和 YLO421 為 *FCY2*(273T)/*fcy2* Δ 突變株。MIC 標示於藥盤右側。YLO12 (ATCC[®] 90028, *C. albicans*, 0.5~2.0 $\mu\text{g/ml}$), YLO6 (ATCC[®] 6258, *C. krusei*, 4.0~16 $\mu\text{g/ml}$), 和 YLO7 (ATCC[®] 22019, *Candida parapsilosis*, 0.12~0.5 $\mu\text{g/ml}$) 為標準菌株 (standard controls)。

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

```

Ca-FCY21      -----MSSDPEKNLGMPEKTSVN-SYDSMDPSSSSSGADAEIETT-----KLN 43
Ct-FCY2       -----
Sc-FCY2      MLEE-GNNVYEIQDLEKRSPVIGSSLENEKKVAASETFTATSEDDQQYIVESSEATKLSW 59
Sc-FCY22     MPEKLAMSMVDIKDAGSELRDLESALGDTKSSAADVYYEGVELHRTNEFIDN----KPSF 56
Sc-FCY21     MPQTHEMSLNGTQYLKYELKDLESRAHDAKTPSTNEFYDDVESHGTEELVEA----KLSF 56
Ca-FCY22     -MKENYDLEQQETQAPENQVNVKVLIDKSNVDEHPITSTIEQPSTSNSSLK---KPTNW 56
Ct-CTRG_00460 MSRSISDEKDQEKVNGISTIDREKALLNGD-----DESTTQIGTTK---EADNW 46

Ca-FCY21      IDRWAHKLNAETKGIELVTDEEKTDTSFWNLATMWLSANLVIATFSLGALGITVFLGAFG 103
Ct-FCY2       -----MWLSANLVIATFSLGALGITVFLGAFG 27
Sc-FCY2      FHKFFASLNAETKGVPEPTEDEKTDSDSI LNAASMWFSANMVI ASYALGALGPMVFLNFG 119
Sc-FCY22     FNRIAAALNAETKGI EPVTEDEKNDSDSI LNAATIWFSANMVI VAYSVGALGPLVFLNFG 116
Sc-FCY21     LNRIAAGLSAETKGI EPITEDEKTDSDSI LNAASMWFSANMVLPAYI GALGPMVFDL NFG 116
Ca-FCY22     VDKIGLRINAEIRGIERVPESEHRDNLSPFLVFLSPNMV I SGLS I GSLGPVAYNLD FR 116
Ct-CTRG_00460 VDKIGLRINAEIRGIERVPEEERTDTSLLSPLF I FLSPNMV I SGLS I GSLGPTAFDLD FR 106
                :::*.*:*:  :*:**  .:* *

Ca-FCY21      QAVLVI IFFSILGGFPVAFVSCFGSALGLRQMLLSKFLIGDLTTRLFAAINNVACVWGWA 163
Ct-FCY2       QAVLVI IFFSILGAFSVGFFSIFGSALGLRQMLLSKFLIGDYATRLFAAINNVACVWGWA 87
Sc-FCY2      QSVLVI IFFNIMGLIFVAFFSVFGAELGLRQMLLSRYLVGNVTARIFSLINVIACVWGWI 179
Sc-FCY22     QSVLVI IFFNILLGLIPVALFSLFGVELGLRQMLLSRYLAGNITARFFSLVNV IACVWCV 176
Sc-FCY21     QSVFVI IFFNLLGLVSVAFFSVFGAELGLRQMLLSRYLVGNIAARIFSFINFIACIGWI 176
Ca-FCY22     TSI I I I T I F C I I G S I P V G F F S A F G M R F G I R Q Q I L S R Y F T G N I M G R I F A L F N V I S C I G W N A 176
Ct-CTRG_00460 TST I I I C I W C F I G A C C T G I Y S A F G M R F G L R Q Q I L S R Y F T G N I M G R V F A L F N V I S C I G W N A 166
                : : : * : : : * . . . : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Ca-FCY21      VNTMSSAQLLHIVN--NGTLPPWAGCL I I VVCTVLVTFFGYHVI HAYEKWAWI PNL I I F 220
Ct-FCY2       VNI M SSAQLLHIVN--NGALPPWAGCL I L VVCTVLVTFFGYHVI H I YEKWSWI PNL I I F 144
Sc-FCY2      VNTSVSAQLLNMVNEGSGHVCP I WAGCL I I I GGTVLVTFFGYSV I HAYEKWSWVPNF A V F 239
Sc-FCY22     LNI SVSAQLLNMVNEGSGHNCP I WAGCL I I AGGTVLVTFFGYSV V HAYEKWSWVPNF A A F 236
Sc-FCY21     VNTVASSQVLNMVN--PGHQCPWAGCIV I I GATV I VTFFGYGV I HAYEKWAWVPNF A V F 234
Ca-FCY22     VNV I PCAQLLNSVG-----PLPPWAGCL I L V G C T C I F A V F G Y K T V H L Y E K Y S W I P N F I V F 231
Ct-CTRG_00460 VNV I PCAQLLSAVG-----PLPPWAGCL I L V I C T C I F A V F G Y K T V H L Y E K Y A W I P N F I V F 221
                : * : : * : * * * * * : : * : : : * * : * * * : * : * : * : * : *

Ca-FCY21      I I I I V R F A M T N K F T S K S F E G G E T T A G N V L S F G G T V F G F A T G W T T Y S S D Y V V Y H P R N T N S W 280
Ct-FCY2       I I I I V R F A M T G K F N S A D F V G G R T T A G S V L S F G G T V F G F A T G W S T Y A A D Y V V Y H P R N T N P Y 204
Sc-FCY2      L V I I A Q L S R S G K F K G G E W V G G A T T A G S V L S F G S I F G F A A G W T T Y A A D Y T V Y M P K S T N K Y 299
Sc-FCY22     L V I I A Q L S R S G K F K G G E W V G G A T T A G G V L S F G S S V F G S A A G W A T Y A A D Y T V Y M P K T T S K Y 296
Sc-FCY21     L V I I A R L A R S K K F V L G E W T S G P T T A G N V L S F G S T V Y G F A A G W T T Y A A D Y T V Y M P R K T N K Y 294
Ca-FCY22     M I I I A K F S Q T H A F N W G E K K S G P T E A G N V L N F I S A I F G F T V G W I P S S A D Y T V Y M P A N T N P W 291
Ct-CTRG_00460 I I I I A K F A P T H S F R W G E M K S G E T E I G N V L S F I A V I F G L N A G W I P S S A D Y T V Y M P S N S N P W 281
                : : * : : : : * . . . * * * * * : : * : * * : : * * * * : : :

Ca-FCY21      K I F F S I F F G L L T P L M F T L I L G A A C A T G I A G D - P E W T R L Y K E D S V G G L V Y A I L V H D S L H G F 339
Ct-FCY2       K V F F S V F L G L L L P L W F T L I L G A A C A T G I A N D - P E W T A M Y D E Y S V G G L V Y S I L V T K S L H G F 263
Sc-FCY2      K I F F S L V A G L A F P L F F T M I L G A A S A M A A L N D - P T W K A Y Y D K N A M G G V I Y A I L V P N S L N G F 358
Sc-FCY22     K I F F S V V A G L A F P L F F T M I L G A A C G M A A L N D - P T W K S Y Y D K N A M G G V I Y A I L V P N S L N G F 355
Sc-FCY21     K I F F S L V V G L A T P L Y F T M I L G A A V A M A A I G D - P A W K T Y Y D E N S I G G L T F A V L V P N S V H G F 353
Ca-FCY22     K V A F A M T T G L S L P A M F T A I L G A A I G T S V N L K G S R F E Q A Y N K N S T G G L I Y E I L C G D N N N Q G 351
Ct-CTRG_00460 K V A S A M V I G L T L P T I F A C V L G A A I G T S V S I D G S R F Q T A Y N E N S I G G L V Y E I L C G D N N N Q G 341
                * : : : * * * * : : * * * * . . . : * : : * * : : * * . . :

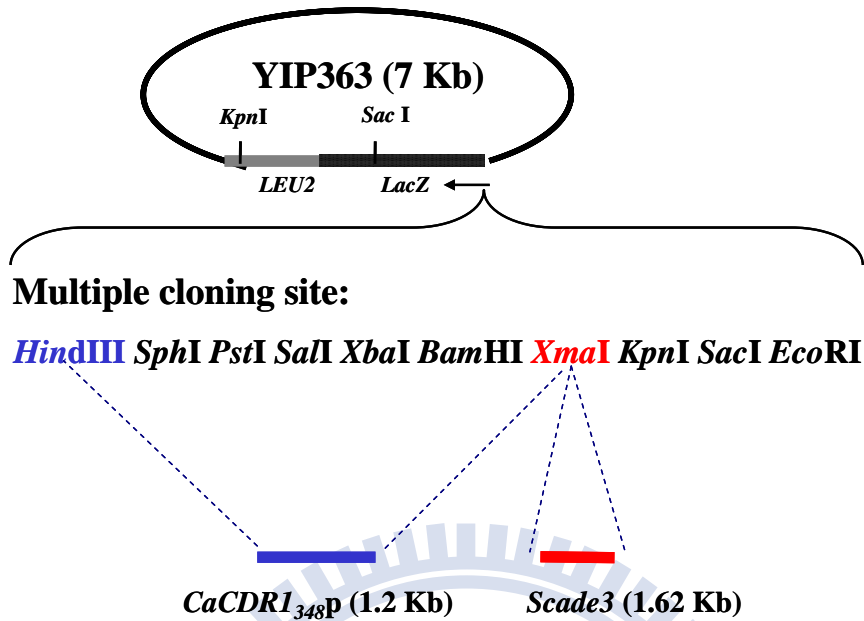
```


Ca-FCY21	GQFCCVVLALSTVANNVPNMYSMALSAQTVWAGFRKI PRVAWTIAGNGATLAI CIPAYYK	399
Ct-FCY2	GQFCCVVLALSTVANNVPNMYSMALSAQTVWSQFGKI PRVFWTLCGNAATLAI CIPAYYK	323
Sc-FCY2	GQFCCVLLALSTIANNIPNMYTVALSAQALWAPLAKI PRVVWTMAGNAATLGI SIPATYY	418
Sc-FCY22	GQFCCVLLALSTVANNVPGMYTVALSAQALWAPLAKI PRVVWTMAGNAATLGI SIPATYY	415
Sc-FCY21	GQFCCVLLSLSTIANNVPNMYTIALSVQATWEPLAKVPRVI WTLLGNAALGIAIPACY	413
Ca-FCY22	YRFIIVVFALGAIANGIPGSYSLSLAIQCIWSQCARVPRIAWCIIGNLVALAFSISAYYK	411
Ct-CTRG_00460	YRFIIVVFALGAVSNNMPGSYSLSLAIQCIWSQFARVPRIAWCIIGNLVSLAFSIPAYYK	401
	* * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Ca-FCY21	FEAVMENFMNLI SYLLS IYESIMFASHFIWNSGRFDGYDYERWNDKEAYPVGYAGVFGFA	459
Ct-FCY2	FESVMENFMNLI SYLLA IYESMMYSSHF IWKYKMSAYDYERWNDKQAYPLGLAGVFGFA	383
Sc-FCY2	FDGF MENFMDSI GYYLA IYIAI SCSEHFFYRRS -FSAYNIDDDWNWEHLPIGIAGTAALI	477
Sc-FCY22	FDGF MENFMDSI GYYLA IYIAI ACSEHF IYRRS -FSAYNIDDDWNWEHLPIGIAGTAALI	474
Sc-FCY21	FSTFMNYFMDSI GYYLA IYIAI ACSEHF IYRRS -FSAYNVDDWDSWERLPIGIAGTAALI	472
Ca-FCY22	FQDTMSNFLSI IAYNVS IYLSI SLTEHF IYRRG -FSGYDVTDFNNYKTMFVGIAGVVAFC	470
Ct-CTRG_00460	FEAALS NFLSI IGYNVS IYLSMSLAEHFIYRKG -FSGYDVSDFNPKTLP IGIAGVVGFC	460
	* . : : * : . * : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Ca-FCY21	CGVAGVVLGMNQTYWYSGVI GRRIGEFGGDIGFELAI GFAF IGFNVARYFEKKYIR-	514
Ct-FCY2	CGVAGVVLGMDQTYWYAGVI GRQIGEFGGDIGFELGF GFAF IGFNVARYFEKKYIR-	438
Sc-FCY2	VGAFGVALGMCQTYWVGEI GRLIGKYGGDIGFELGASWAFI IYNI LRPLELKYFGR	533
Sc-FCY22	AGAFGVALGMCQTYWVGEI SRLIGEYGGDIGFELGGSWAFI IYNI VRPLELKYFGR	530
Sc-FCY21	VGAFGVALGMCQTYWVGEI SRLIGDYGGDIGFELGLSWAFI VYNI ARPFLKYFGR	528
Ca-FCY22	FGICSTVLSMNQTYWYQGV IARKIGDSGGDISFEMNIMFAFI GYNLVRPFELKYFGR	526
Ct-CTRG_00460	FGICSTVLSMNQTYWYQGV IARQIGEYGGDISWELNI IFAFVGYNLARPFELKYFGR	516
	* * : * * * : : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

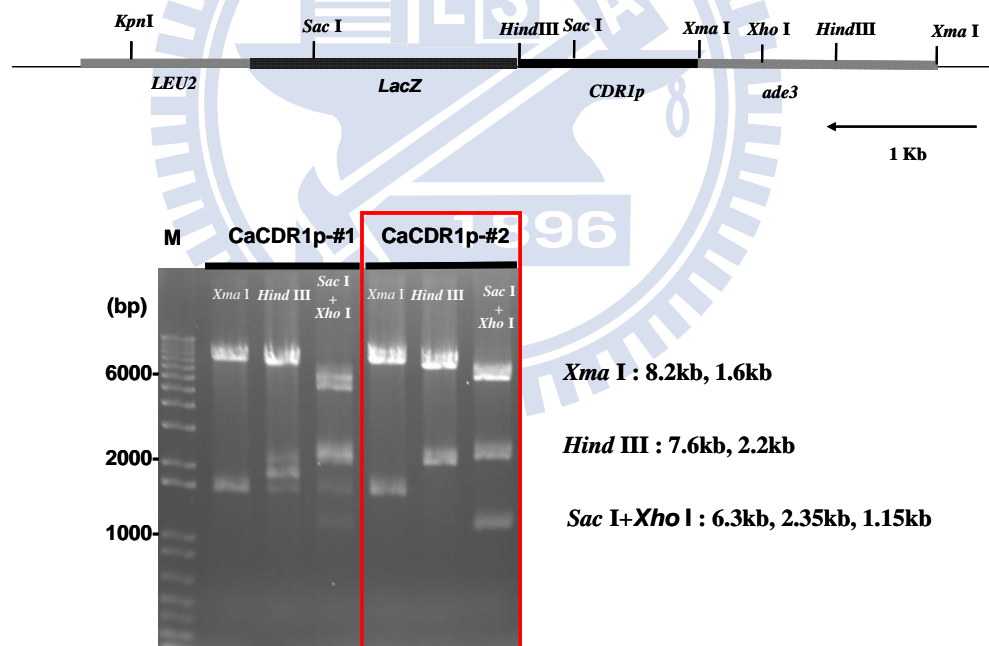
圖十三. *C. tropicalis*、*S. cerevisiae* 和 *C. albicans* 的 purine-cytosine permease (PCP) 蛋白質序列比對

使用 CLUSTAL 2.0.10 進行蛋白質序列比對。黃色區塊是 *C. tropicalis* 的 PCP 第 91 個胺基酸的位置，紅色區塊 *S. cerevisiae* 的 PCP 親水性片段 371-377 (I-A-N-N-I-P-N) 功能為產生正確的 3D 結構 (Ferreira *et al.*, 1997; and 1999)，綠色區塊為牽涉 translocation 過程的親水性孔洞的胺基酸 (Ferreira *et al.*, 1999)。“*” 表示胺基酸在所有比對的序列是一致的，“:” 表示是保守取代的胺基酸 (conserved substitutions)，“.” 表示是半保守取代胺基酸 (semi-conserved substitutions)。

(A)



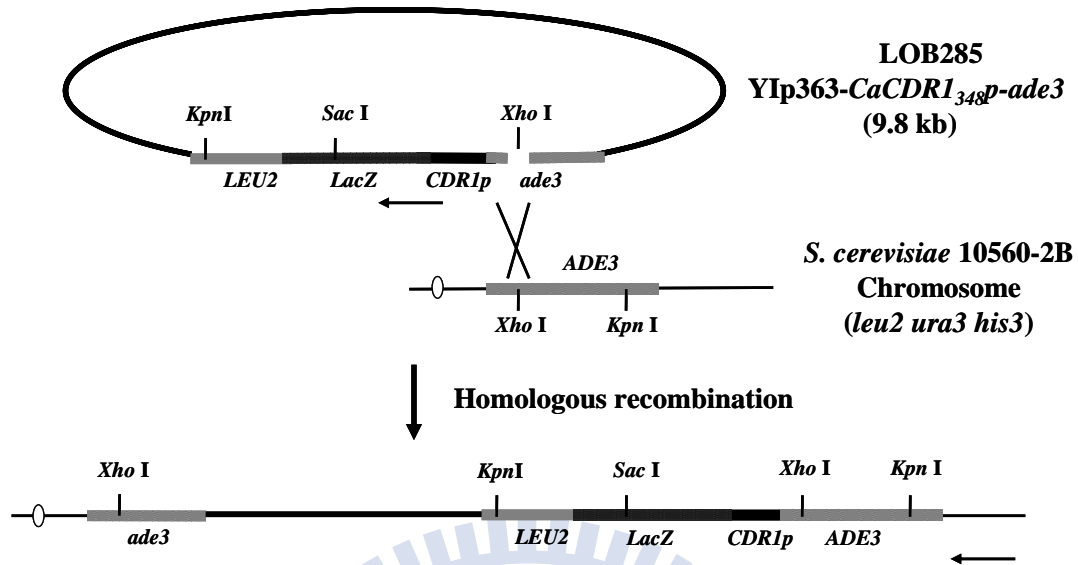
(B)



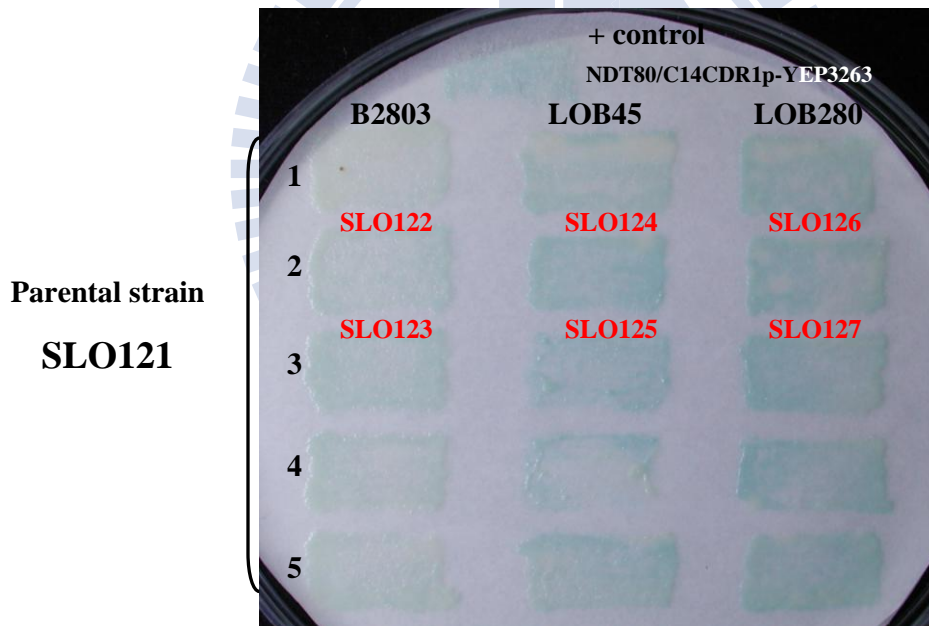
圖十四. 質體 LOB285 建構示意圖與限制酵素圖譜

- (A) 建構方式是以限制酵素 *Hind III* 和 *Xma I* 將 *CDR1₃₄₈* promoter 接進 YIP363，再以 *Xma I* 把 *S. cerevisiae* 的 *ade3* 部分序列接入。
- (B) 限制酵素切位相對位置示意圖標示電泳圖於上方，限制酵素圖譜預期大小標示於左側。菌落 #2 符合預期，命名為 LOB285。M 為 1 kb plus DNA ladder。

(A)



(B)

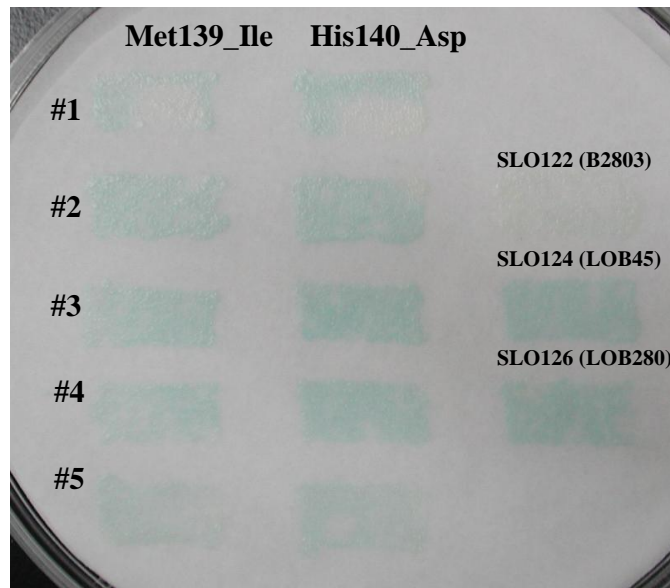


圖十五. SLO121 建構示意圖與轉形不同質體後 β -galactosidase 活性測試

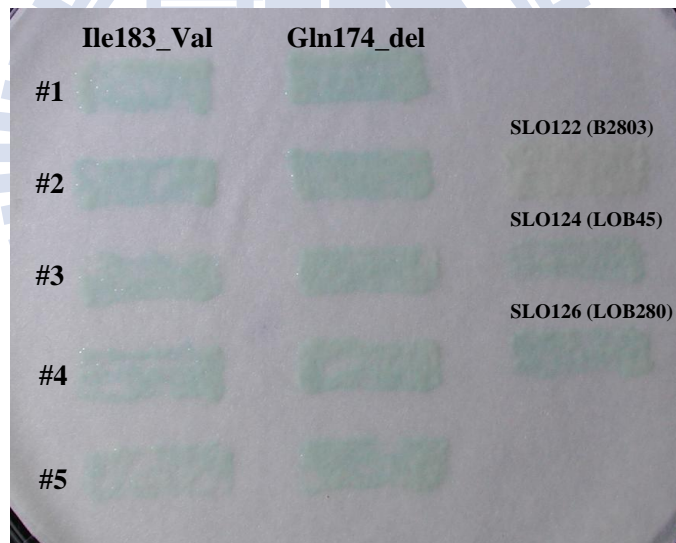
(A) LOB285 以 *XhoI* 切開成為線性 DNA 後，轉形至 *S. cerevisiae* 10560-2B，利用 *ade3* 部分同源序列與染色體上的 *ADE3* 進行同源重組，所得菌株為 SLO121。

(B) 以 β -galactosidase filter assay 測試 SLO121 是否能夠因轉形質體而有不同呈色反應。B2803 為空質體，LOB45 為含 *CaNDT80* 基因全長之 B2803 質體，LOB280 為帶有 *CaNDT80* 基因全長並且在 start codon 前另加限制酵素切位 *AflII* 之 B2803 質體，各挑五個轉形株測試，預計分別得到白色、藍色、藍色的結果。菌株 NDT80/CDR1p-YEP363 帶有 LOB45 與 CDR1p-YEP363 兩個質體作為正對照組。SLO122~127 為菌株標號，作為之後正、負對照組。

(A)

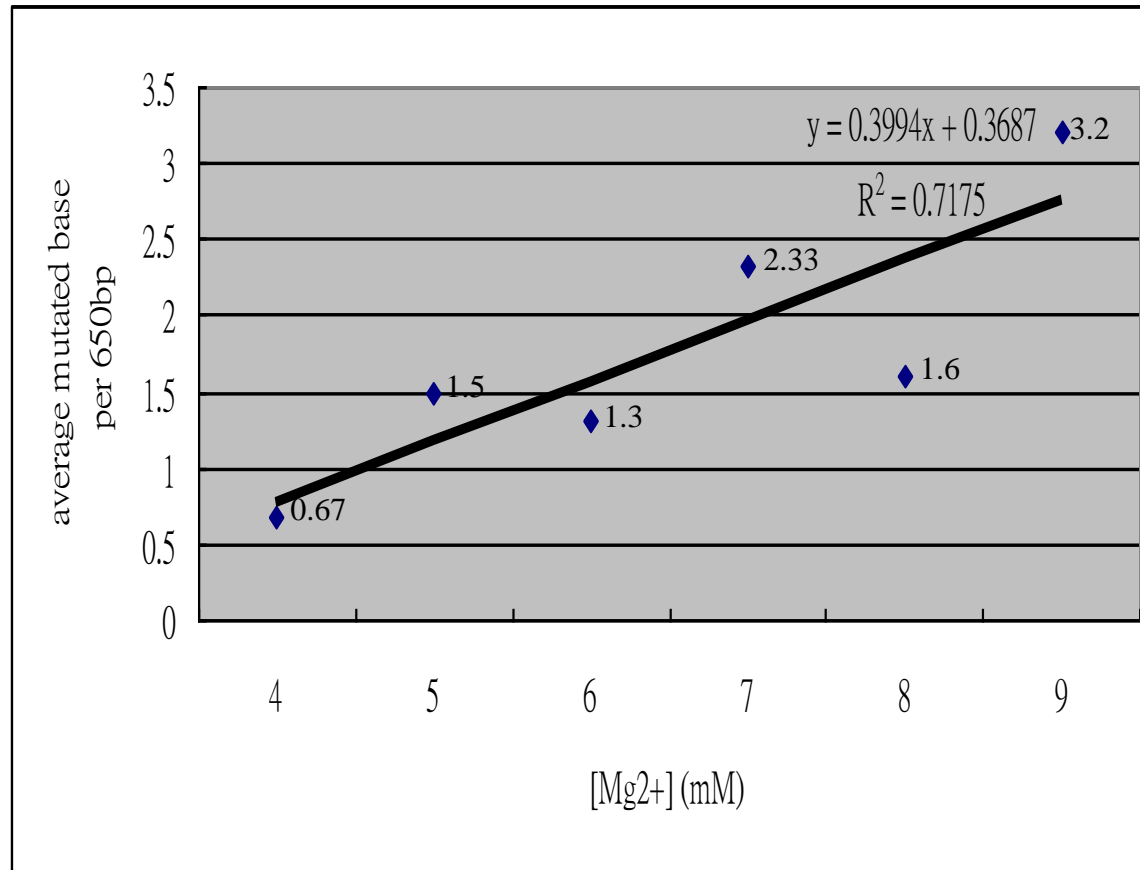


(B)



圖十七. 以 β -galactosidase filter assay 測試 *CaNDT80* 活化區的可能重要胺基酸突變是否對功能有影響

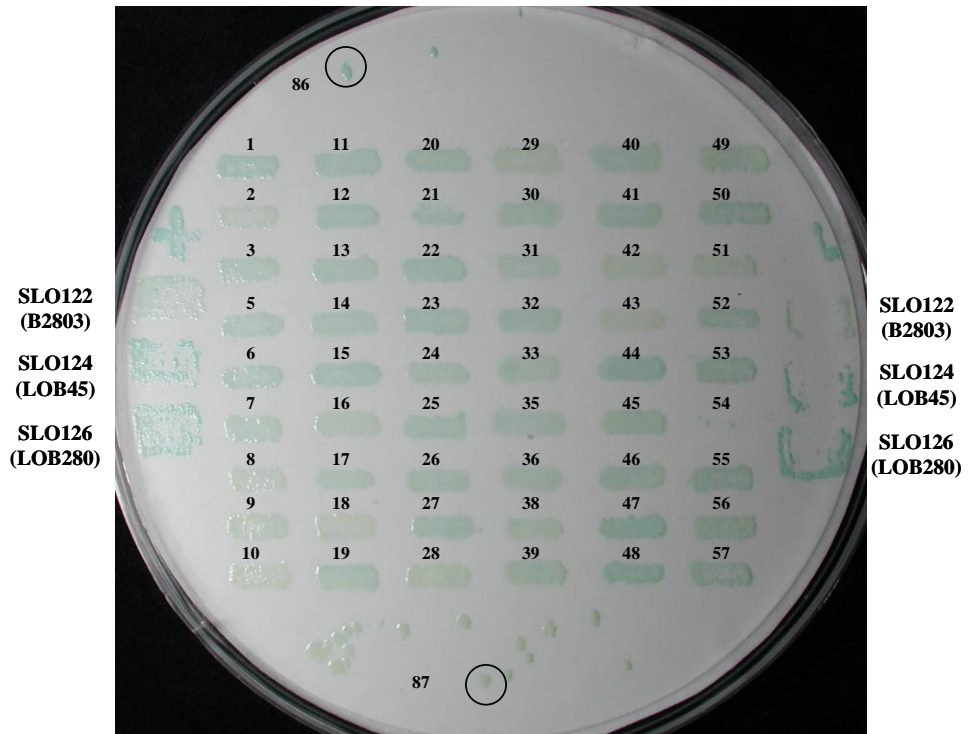
(A)為 Met139_Ile、His140_Asp 的轉形株結果。(B)為 Ile183_Val 和 Gln174_del (deletion) 的轉形株結果。菌株 SLO122 作為負對照組，呈色為偏白色，LO124、LO126 作為負對照組，呈色為偏藍色。



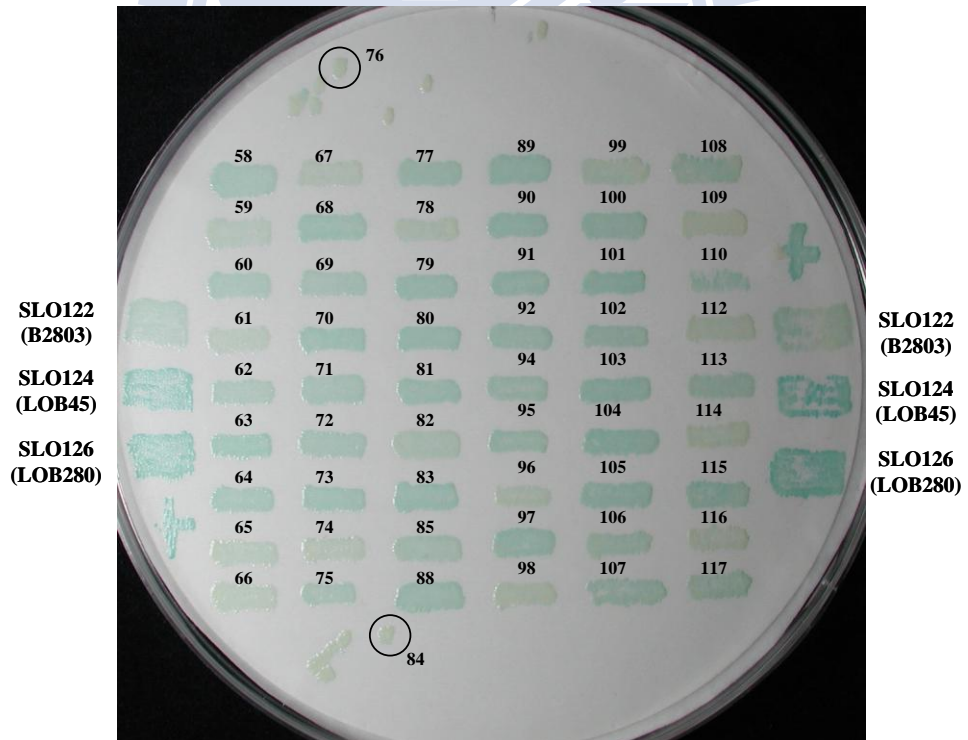
圖十八. error-prone PCR 在不同鎂離子濃度下合成錯誤率

在鎂離子濃度 4、5、6、7、8 和 9 mM 的 Error-prone PCR 條件下，計算 *CaNDT80* ORF +50~+700 這區段突變的核苷酸數目統計結果。因為 10 和 11.5 mM 條件下突變位置太多無法計數，所以結果沒有列出。

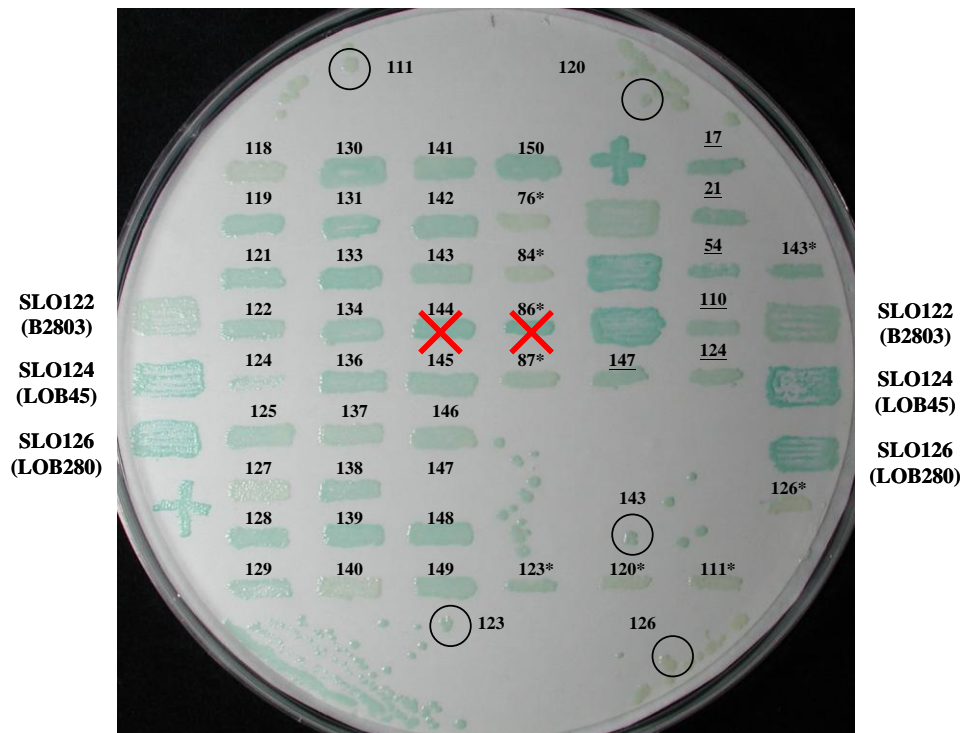
(A)



(B)

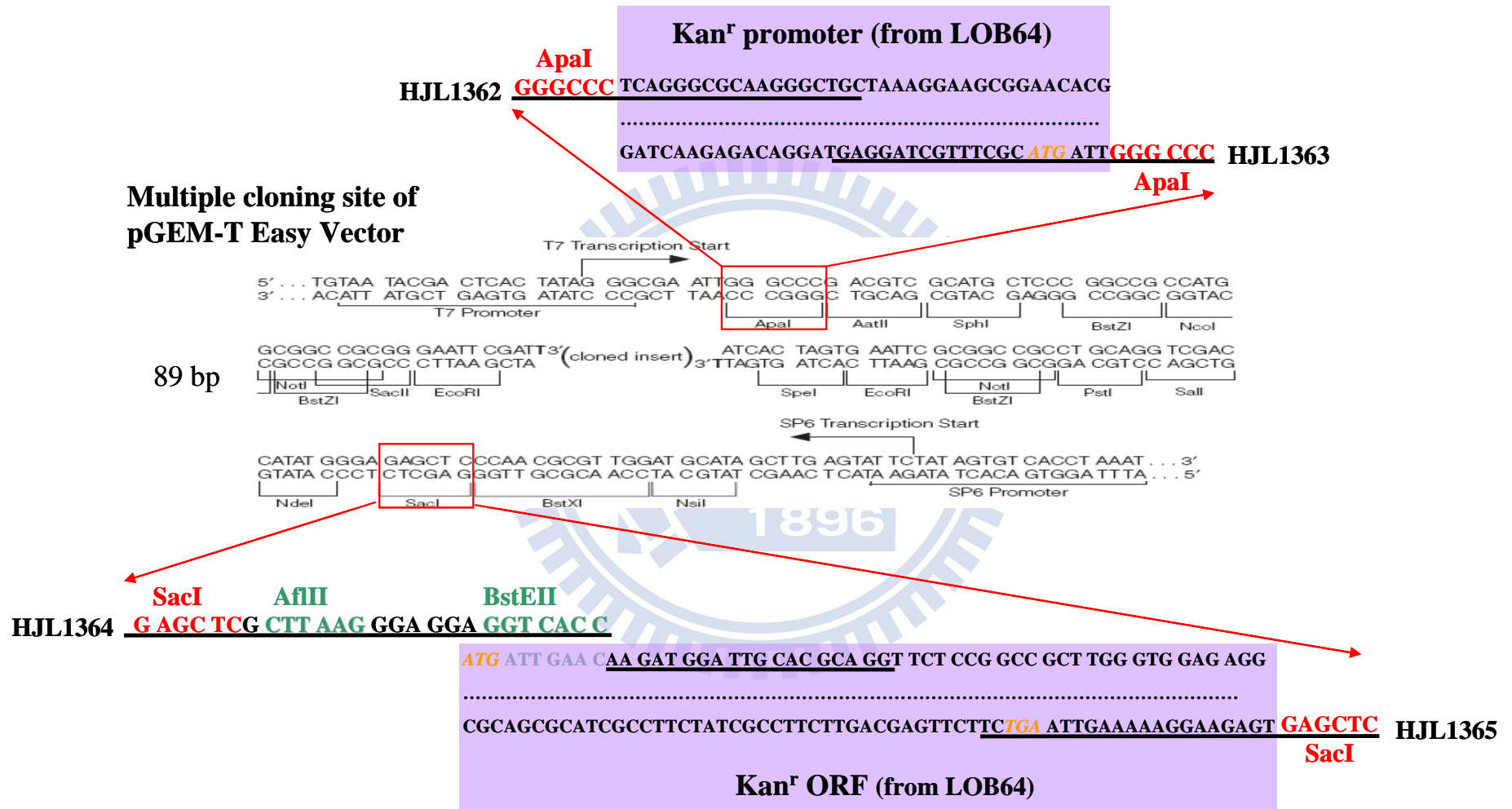


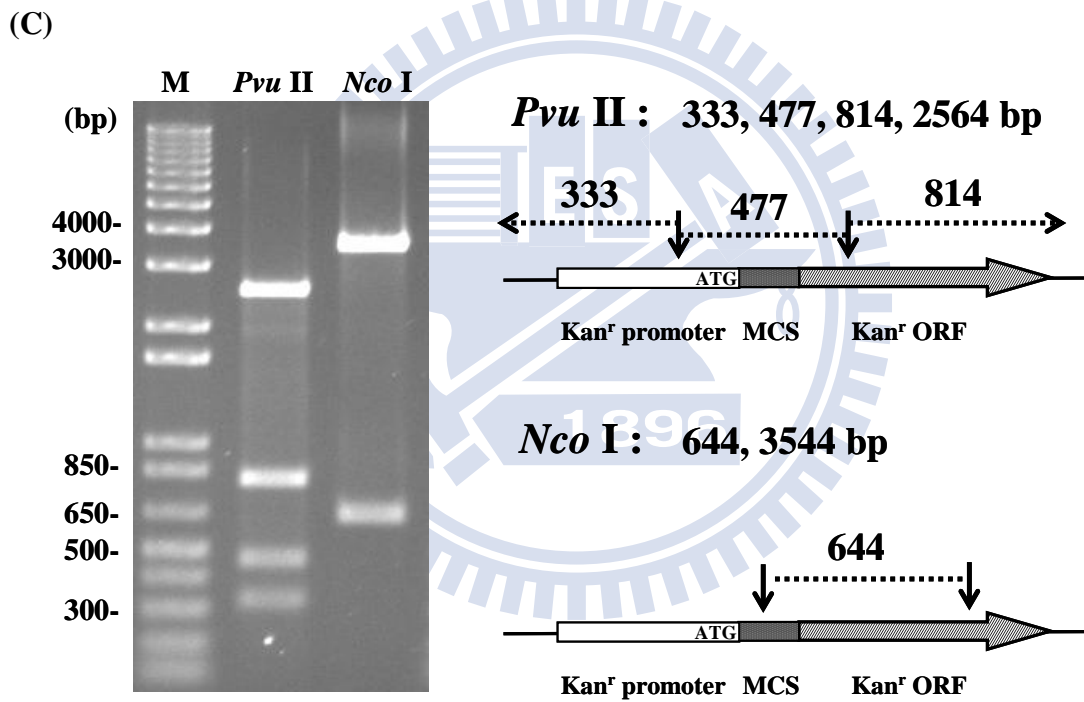
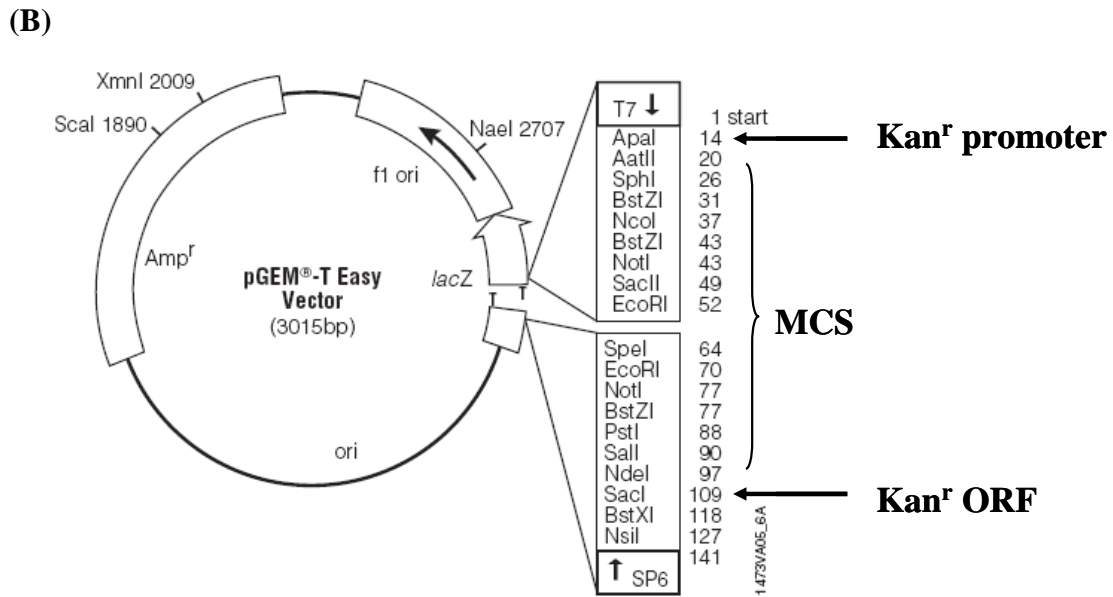
(C)



圖十九. 第三次以 β -galactosidase filter assay 篩選 *CaNDT80* 活化區隨機突變 library 轉形株結果

(A)(B)(C) 為 142 株可能攜帶有 *CaNDT80* 活化區重要胺基酸突變質體的菌株之 β -galactosidase filter assay 結果照片。編號 144 和 86 因為呈色與正對照組接近，所以排除。菌株 SLO122 作為負對照組，呈色為偏白色，LO124、LO126 作為負對照組，呈色為偏藍色。*表示第二次 β -galactosidase filter assay 沒有畫出單一菌落者，之後得到單一菌落後之結果。

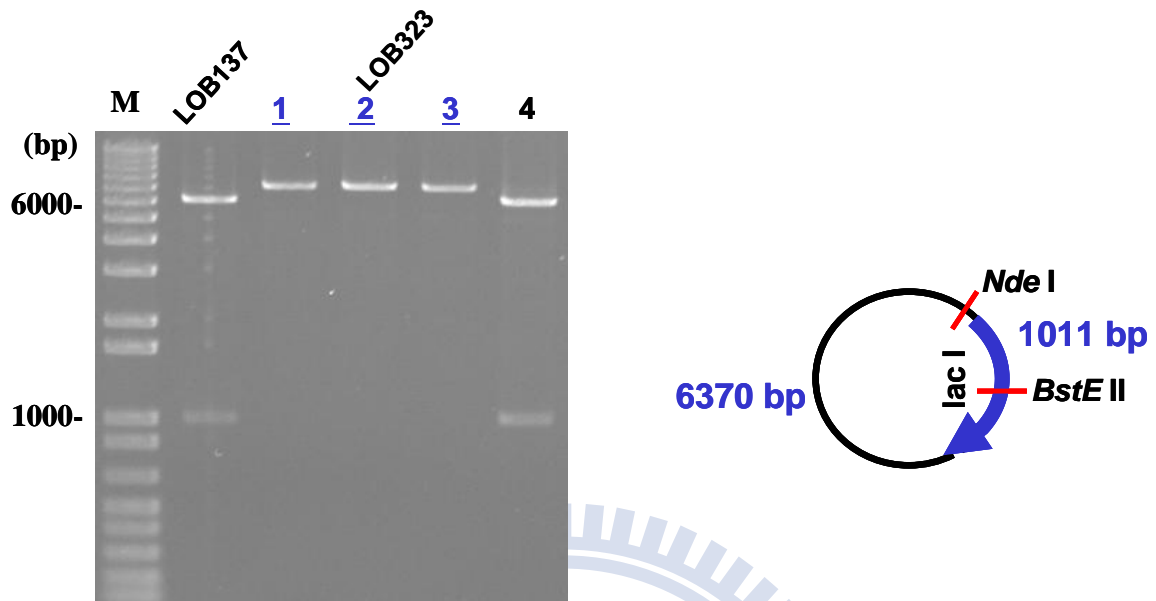




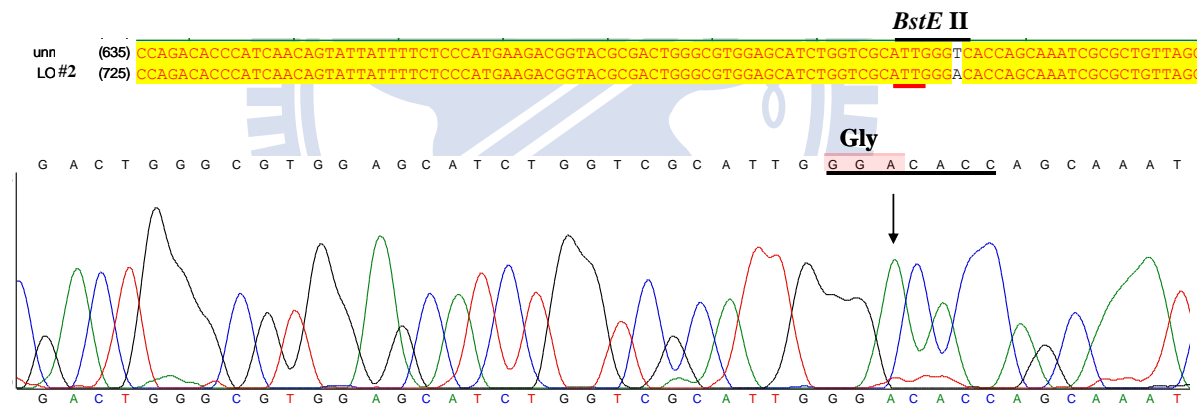
圖二十. 篩選質體 LOB295 設計圖與限制內切酶圖譜

- (A) 質體 LOB295 細部設計圖。紫色區塊為 kanamycin 啟動子與 ORF 序列，中間以虛線省略，序列有底線者為引子設計位置。
- (B) 質體 LOB295 的整體建構示意圖，在 HJL1362 和 HJL1363 5' 端加上限制酵素切位 *Apa* I 將 kanamycin 啟動子接進 pGEM-T easy vector 上，同樣地引子 HJL1364 和 HJL1365 在 5' 端加上 *Sac* I，以便將 ORF 接入。
- (C) 質體 LOB295 限制內切酶圖譜，預計大小如電泳圖左側所示，結果符合預期。M 為 1 kb plus DNA ladder。

(A)

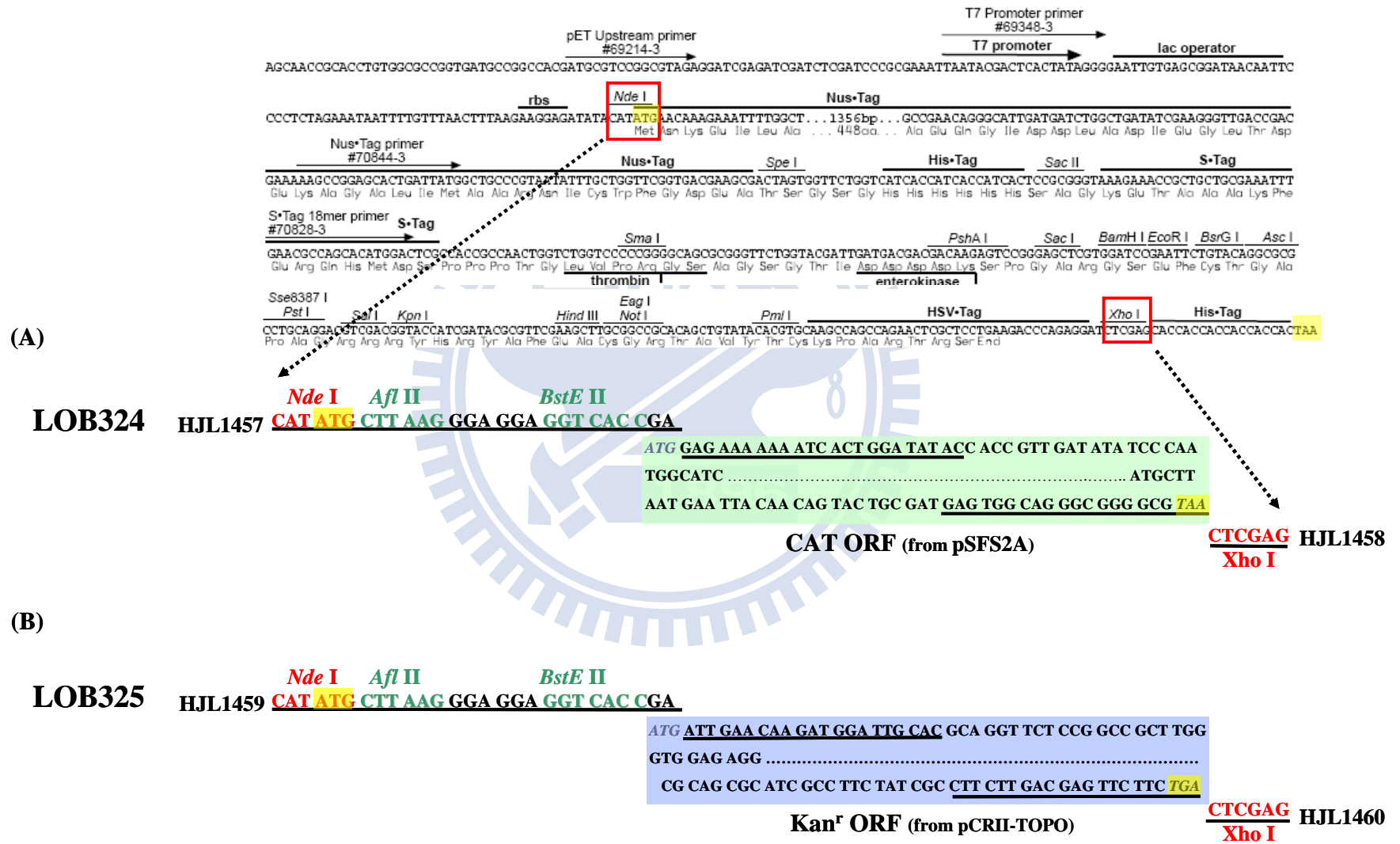


(B)



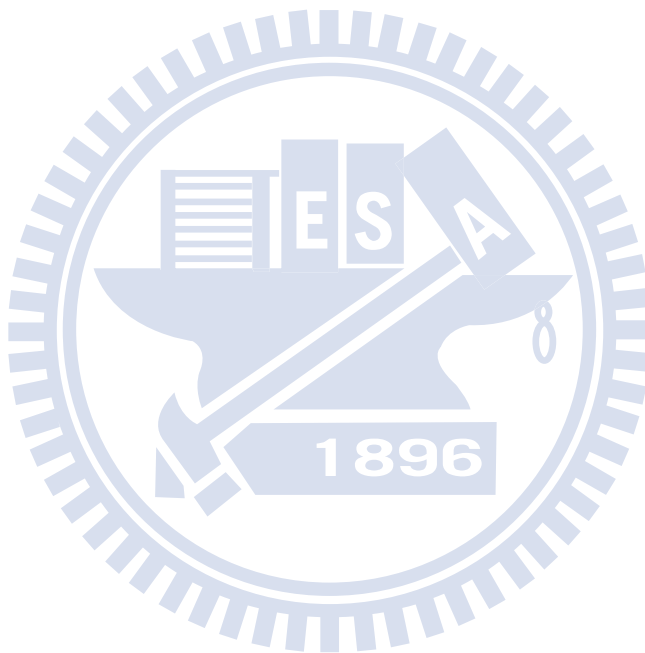
圖二十一. 以 fusion PCR 進行 LOB137 序列突變之結果

- (A) 以限制酵素 *BstE* II 和 *Nde* I 確認是否質體 1~4 失去 *BstE* II 切位。質體 1~3 為可能突變成功之質體。LOB137 為 pET-43.1a (+)-Factor Xa，帶有 *BstE* II 切位。M 為 1 kb plus DNA ladder。
- (B) 定序 *lacI* ORF 確認核苷酸 632T 是否成功改變為 A。將 LOB137 與菌落 #2 定序比對結果。Unmodify 為 LOB137 之原始序列 (Novagen website download)，LOB323 #2 為質體 #2 之定序序列，即為之後的 LOB323。定序波峰圖以箭頭指出欲突變位置核苷酸 632 之波峰，且不改變 *lacI* 之原來胺基酸組成，仍為 Gly。

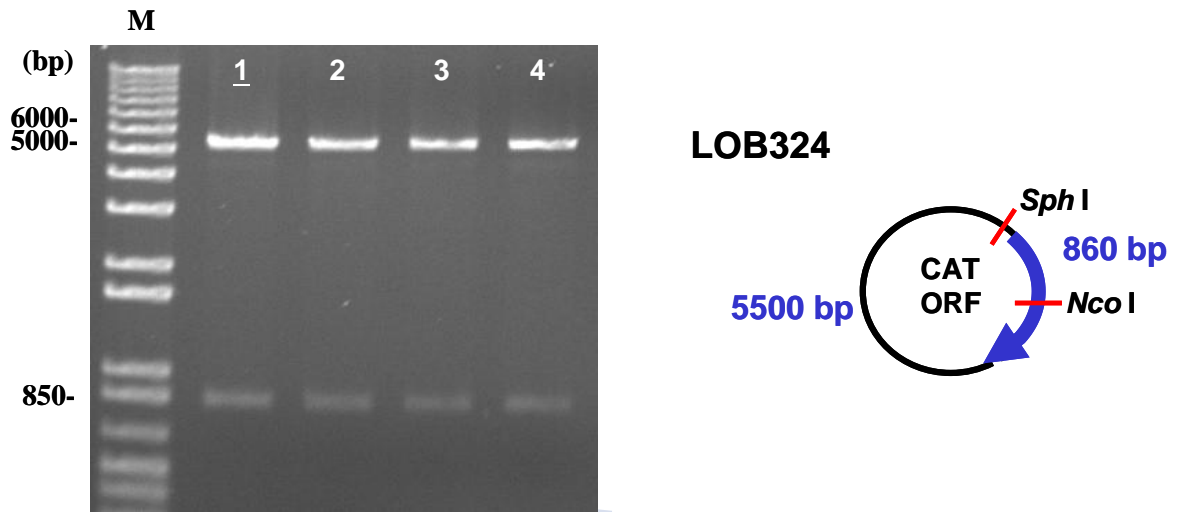


圖二十二. 篩選質體 LOB324 和 LOB325 設計圖

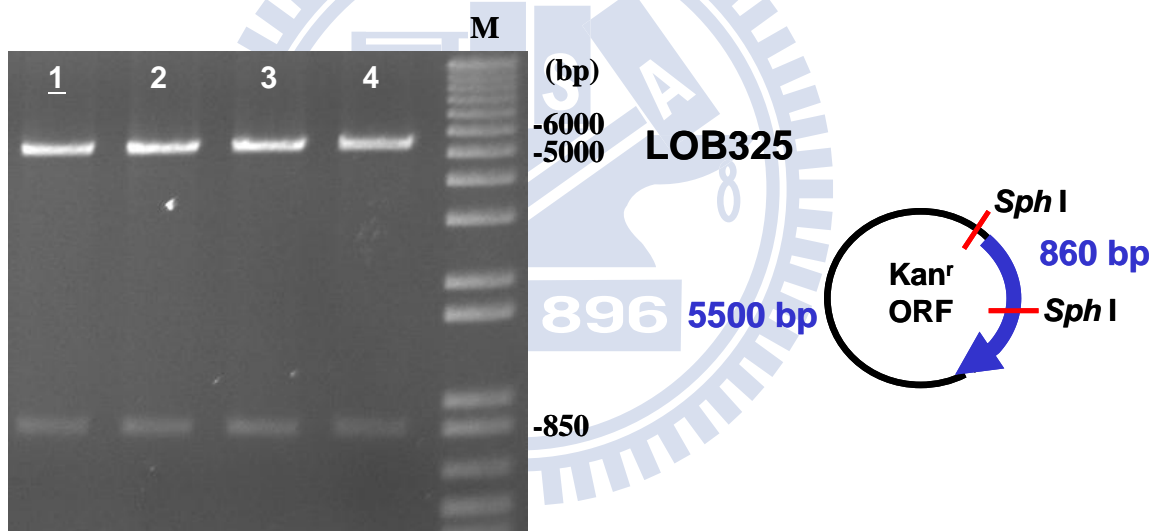
- (A) 質體 LOB324 細部設計圖。以限制酵素 *Nde* I 和 *Xho* I 將 chloramphenical resistant gene 序列接進 LOB323，即為 LOB324。綠色區塊為 chloramphenical resistant gene 序列，中間序列以虛線省略，序列有底線者為引子設計位置。
- (B) 質體 LOB325 細部設計圖。以限制酵素 *Nde* I 和 *Xho* I 將 kanamycin resistant gene 序列接進 LOB323，即為 LOB325。藍色區塊為 kanamycin resistant gene 序列，中間序列以虛線省略，序列有底線者為引子設計位置。黃色區塊標示 start codon 和 stop codon 位置。



(A)



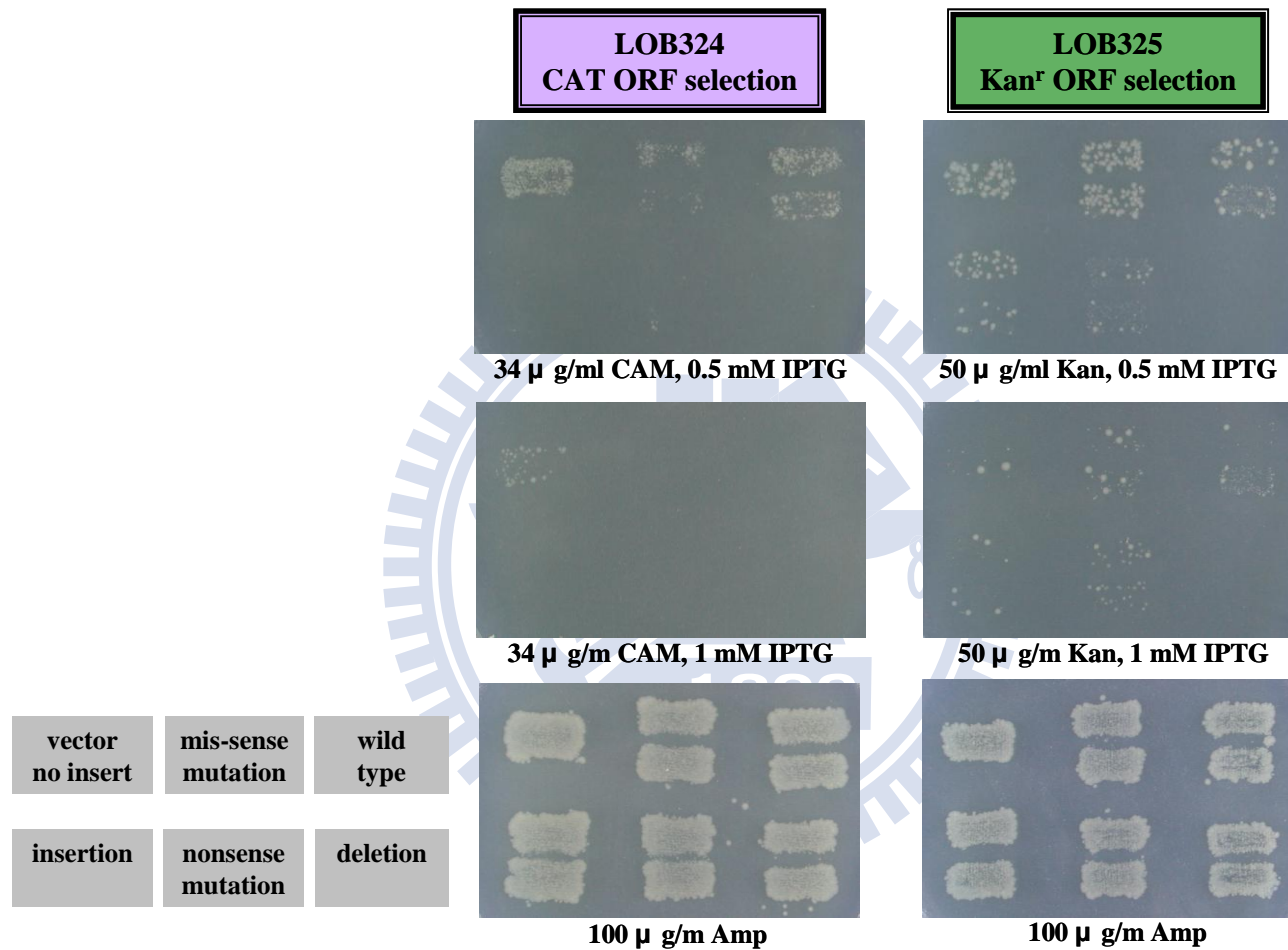
(B)



圖二十三. LOB324 和 LOB325 限制內切酶圖譜

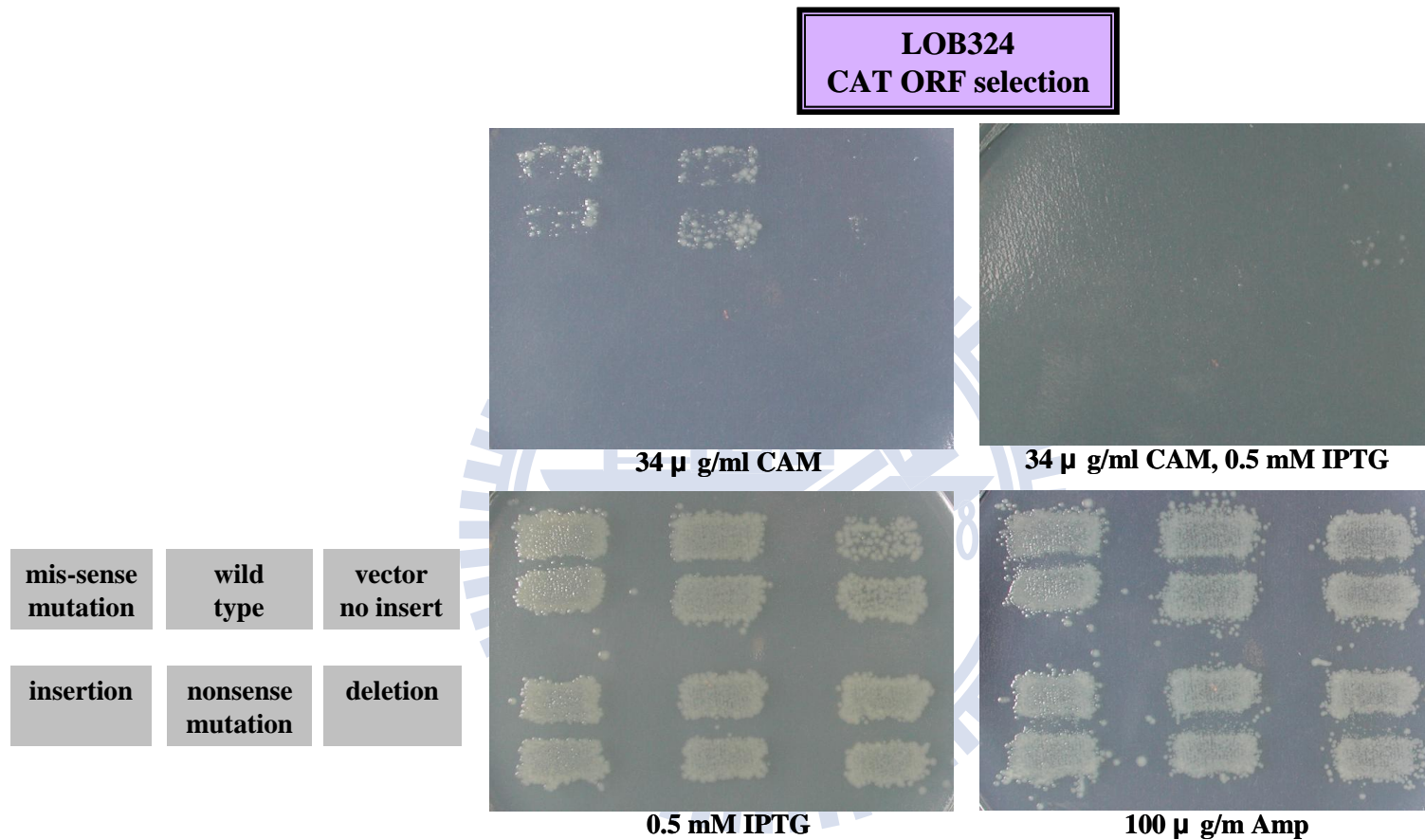
(A) 以限制內切酶確認結構，預計大小如電泳圖右側所示，均符合預期，將菌落 #1 命名為 LOB324。

(B) 以限制內切酶確認結構，預計大小如電泳圖右側所示，均符合預期，將菌落 #1 命名為 LOB325。M 為 1 kb plus DNA ladder。



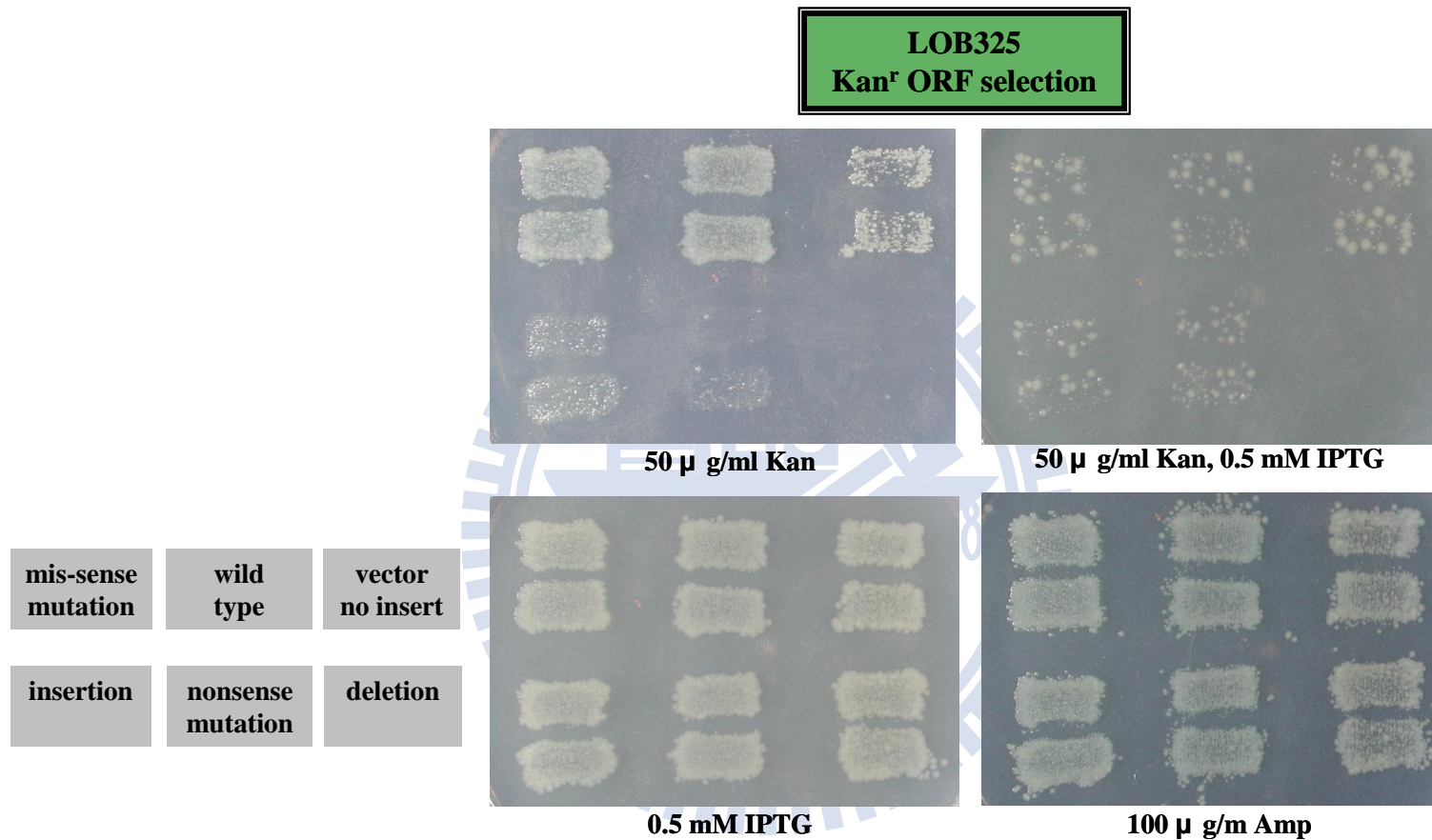
圖二十四. 於不同的培養基測試 LOB324 和 LOB325 的篩選功能

把包含 wild type 序列、missense、frameshift (deletion 與 insertion), 以及 nonsense mutation 共五種插入片段, 分別接入 LOB324 和 LOB325 後, 轉形至 BL21 (*DE3*) 進行測試, 其相對位置如左下所示。LOB324 和 LOB325 空質體做為對照。CAT 為 chloramphenicol resistant gene; Kan^r 為 kanamycin resistant gene; CAM 為 chloramphenicol; Kan 為 kanamycin; Amp 為 ampicillin。



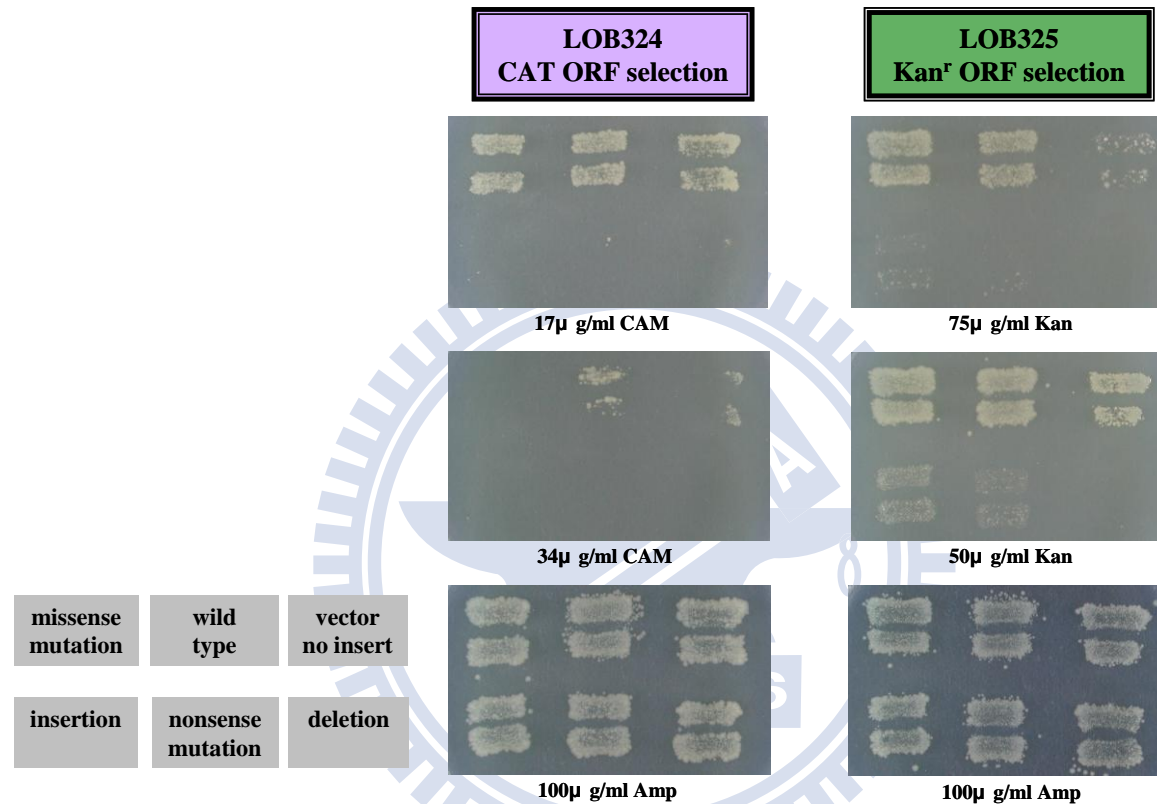
圖二十五. 於不同的培養基測試 LOB324 篩選功能

把包含 wild type 序列、missense、frameshift (deletion 與 insertion)，以及 nonsense mutation 共五種插入片段，分別接入 LOB324 後，轉形至 BL21 (DE3) 進行測試，其相對位置如左下所示。LOB324 空質體做為對照。CAT 為 chloramphenical resistant gene; CAM 為 chloramphenical; Amp 為 ampicillin。



圖二十六. 於不同的培養基測試 LOB325 篩選功能

把包含 wild type 序列、missense、frameshift (deletion 與 insertion), 以及 nonsense mutation 共五種插入片段, 分別接入 LOB325 後, 轉形至 BL21 (DE3) 進行測試, 其相對位置如左下所示。LOB324 空質體做為對照。Kan^r 為 kanamycin resistant gene; Kan 為 kanamycin; Amp 為 ampicillin。



圖二十七. 於不同濃度之篩選抗生素培養基測試 LOB324 和 LOB325 的篩選功能。把包含 wild type 序列、missense、frameshift (deletion 與 insertion)，以及 nonsense mutation 共五種插入片段，分別接入 LOB324 和 LOB325 後，轉形至 BL21 (*DE3*) 進行測試，其相對位置如左下所示。將 chloramphenicol 濃度減半為 17 $\mu\text{g/ml}$ 和 kanamycin 增加 0.5 倍為 75 $\mu\text{g/ml}$ ，分別測試其生長情況，顯示 LOB324 降低 chloramphenicol 濃度後，可使帶有 wild type、missense 序列者及空質體生長更好；LOB325 增加 kanamycin 則可減少帶有 insertion 及 nonsense mutation 者之生長，故只要調整抗生素濃度 LOB324 和 LOB325 便可有預期篩選效果。LOB324 和 LOB325 空質體做為對照。CAT 為 chloramphenicol resistant gene; Kan^r 為 kanamycin resistant gene; CAM 為 chloramphenicol; Kan 為 kanamycin; Amp 為 ampicillin

附錄一

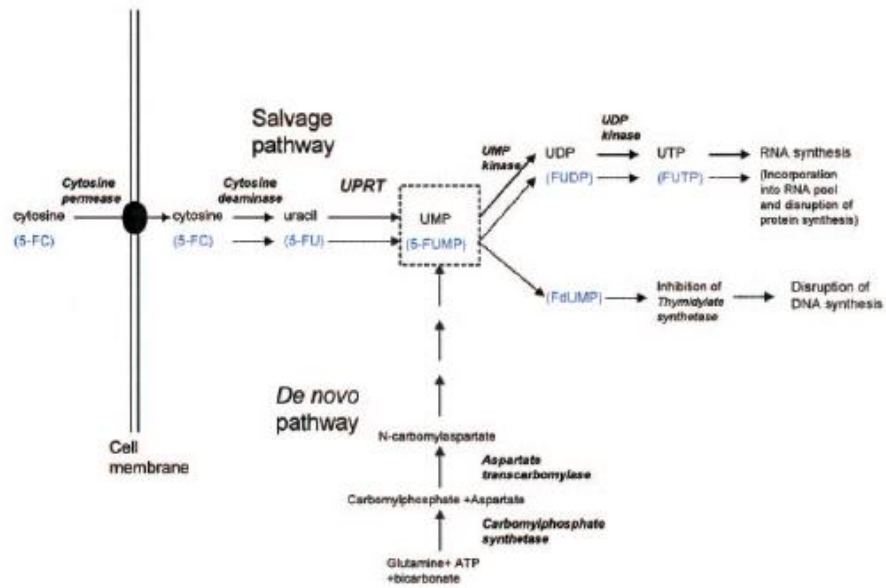
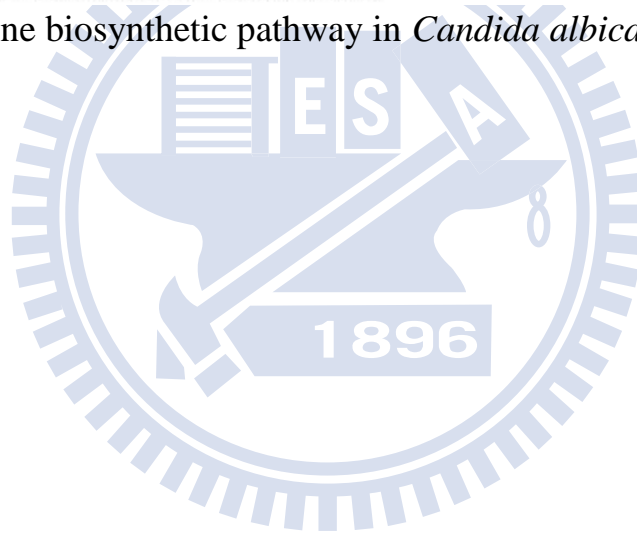


FIG. 1. The salvage and de novo pathways for the synthesis of UMP and subsequent incorporation into RNA. The relevant enzymes are shown in italics, and the fluorinated analogues are shown beneath the natural substrates in blue type. Cytosine deaminase is absent from mammalian cells. FUDP, fluoro-UDP; FUTP, fluoro-UTP; FdUMP; fluoro-deoxy-uridylylate.

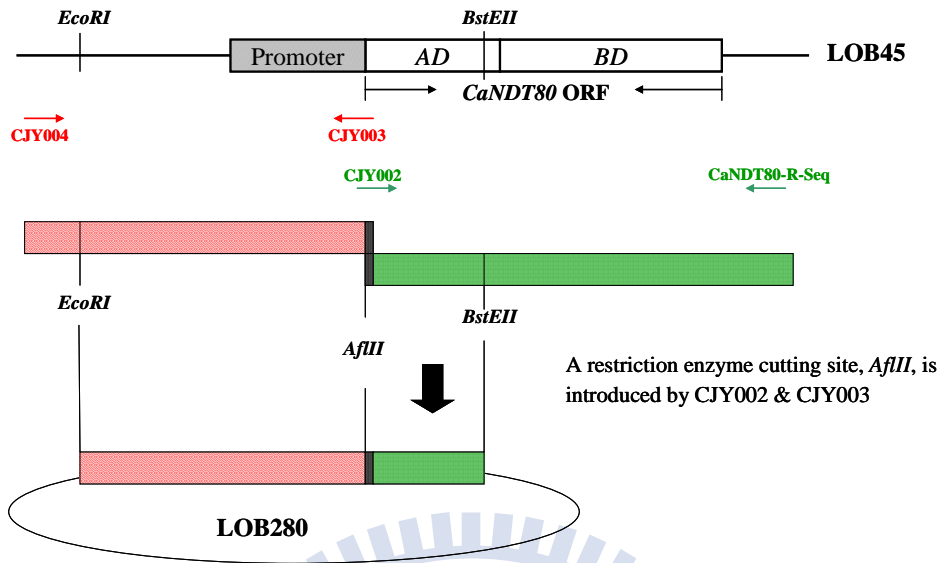
附錄一. pyrimidine biosynthetic pathway in *Candida albicans*

(Hope *et al.*, 2004)

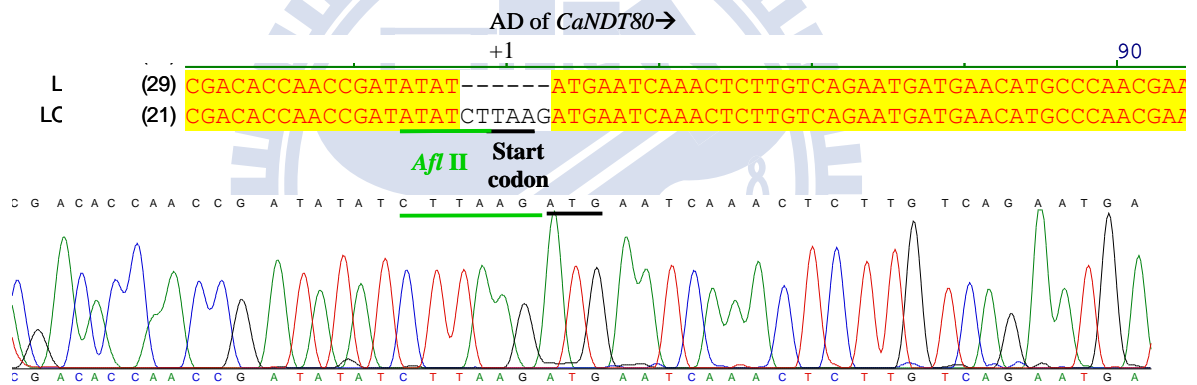


附錄二

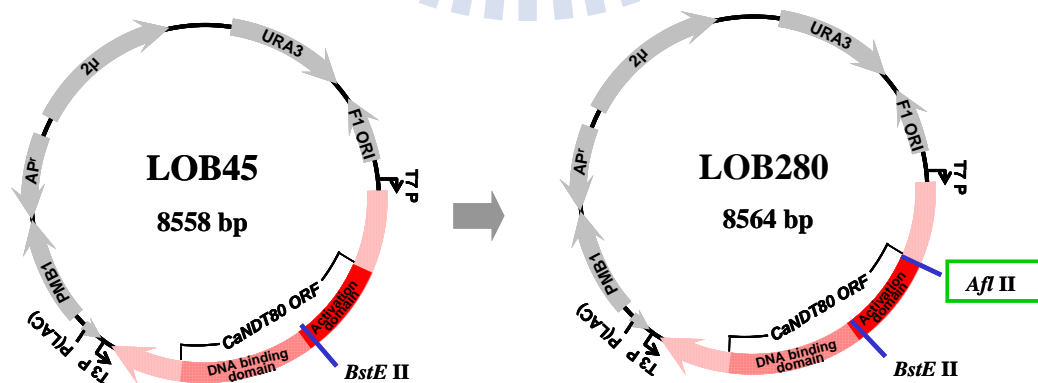
(A)



(B)



(C)



附錄二. 以 fusion PCR 建構 LOB280 示意圖

(A) 余家睿以 LOB45 為模版利用 fusion PCR 的方式於 *CaNDT80* start codon 前加入 *AflII* 切位，以便剪接置換。AD 為 activation domain，BD 為 DNA-binding domain。(B) LOB280 定序結果。(C) LOB45 與 LOB280 整體結構示意圖。