

國立交通大學

生化工程研究所

碩士論文

探討剔除白色念珠菌 *ENG1* 之影響



Effect of *ENG1* null mutations in *Candida albicans*

研究生：蔡馨儀

指導教授：楊昀良 博士

中華民國九十八年七月

探討剔除白色念珠菌 *ENG1* 之影響

Effect of *ENG1* null mutations in *Candida albicans*

研究生：蔡馨儀

Student : Hsin-Yi Tsai

指導教授：楊昶良

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang



Submitted to Institute of Biological Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Biological Engineering

July 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年七月

摘要

白色念珠菌為人類常見之共生菌，也是一種伺機性病原菌。白色念珠菌之致病機轉與其型態變化的能力是相關的；當失去菌絲型和酵母菌型之型態互換的能力時，此白色念珠菌也失去造成毒性的能力。 β -glucan 是真菌細胞壁中最主要的成分，研究指出白色念珠菌細胞壁的 β -glucan 與調節宿主免疫機轉相關。白色念珠菌之 *CaENG1* 可轉譯出 β -1,3-glucan 內切酶，此基因與啤酒酵母菌之 *ENG1* 有很高的同源性。因此本文為探討 *CaENG1* 對於白色念珠菌型態轉變扮演之角色。實驗策略以抗藥性篩選標記 *SAT1* flipper 剔除白色念珠菌雙套 *CaENG1*，再以南方點墨法和 RNA 表現量確認建構之單套 *CaENG1* 突變株、雙套 *Caeng1* 突變株以及補償單套 *CaENG1* 之補償株；檢驗符合預期之突變株進行下一步性狀分析。然而至目前所進行的實驗，在生長曲線測定、芽管試驗、誘發菌絲生長觀察型態變化和侵犯力試驗中，*Caeng1* 雙套突變株與野生株相比，性狀上沒有明顯的差異，指出以目前的結果分析，*CaENG1* 並不會影響白色念珠菌型態轉變之過程；在化學藥品感受性實驗中也發現 *Caeng1* 雙套突變株生長表現也與野生株無明顯差異；在細胞分裂時，觀察到 *Caeng1* 雙套突變株有少數細胞分裂不完全，形成四、五顆細胞聚集的現象。然而，將 *Caeng1* 雙套突變株從 a/α 基因型誘發為 a/a 之 a -type 型態之菌株，可發現在添加血清誘發菌絲生長時， a -type 型態的 *Caeng1* 雙套突變株有 3/5 機率，其菌絲生長能力下降。而當中一 a -type 型態的 *Caeng1* 雙套突變株對於 0.1% SDS 有高度敏感性，推測此突變株之細胞壁組成有缺陷，進而提高對 SDS 的感受性。

Abstract

Candida albicans is a commensal fungus and a major opportunistic pathogen. The pathogenicity of *C. albicans* is related to its ability to switch between yeast and filamentous forms and cells defective in the switching is avirulent. β -glucan is a major structural component of fungal cell wall and several studies have suggested that the β -glucan of *C. albicans* has immunomodulatory effects on the host defense system. *CaENG1* shares homology with *Saccharomyces cerevisiae* *ENG1*, which encodes an endo-1,3- β -glucanase. Hence, it is interesting to know the role of *CaENG1* in the morphogenesis and virulence. I used the *SAT1* flipper, a drug resistance marker to disrupt *CaENG1* in *C. albicans*. The genomic constructions of the heterozygous, homozygous knock-out mutants and a rescued strain have been confirmed by Southern blot and RNA expression analysis. However, there is no significant difference between the wild-type strain and the *Caeng1* null mutant strains in all the morphology analyses conducted, including growth rate, germ tube assay, colony morphology observation and invasion assay. These results indicate that *CaENG1* is not involved directly in hyphal morphogenesis in *C. albicans* under experimental conditions. In various chemical susceptibility tests, the null mutants displayed the same phenotypes as the wild type. I also analyzed the cell morphology of the null mutant cells, and few could form small clusters of cells that were defective in completing cellular separation. However, after the *Caeng1* null mutants were induced to form a-type cells from initial heterozygous a/ α type, in 3/5 chance the a-type *Caeng1* null mutants have reduced hyphal formation in the presence of serum. An a-type *Caeng1* null mutant, EKP2-3a, defective in hyphal growth was also

hypersensitive to 0.1% SDS. It is suggested that this mutant strain was defective in cell wall composition or organization to become more sensitive to SDS.



誌謝

碩士班這兩年中，做實驗的日子雖然感覺很漫長，不過還是很快就到了可以寫這篇文章的時候，既開心又不捨。能夠順利的度過碩班生涯，最主要感謝指導教授楊昀良老師，謝謝老師的收留與指導，對於分生技術完全一竅不通的我給予耐心的教導。也非常感謝國衛院羅秀容老師和本校彭慧玲老師，在口試時給予present和論文上很多指導。

而實驗室同玩樂、共患難的夥伴們也謝謝你們這一兩年來的陪伴！外表溫柔、講話犀利的惠菁學姊，感謝妳讓我的實驗柳暗花明又一村；而又白又漂亮的師傅淑貞，謝謝妳教我分生入門的所有技術；做自己的實驗室燈塔淑萍，有你在的地方氣氛就很high；講話很多笑點的旻秀以及熱心助人但不能被嗆太久的敏書，謝謝你們完全沒有學長的架子，和你們這屆相處很開心。再來是我親愛的同學們：外表不笑很冷豔但內心孩子氣到極點的小倩，跟妳同一組真好；號稱lucky queen以及我心目中一姐的阿毛，妳是我見過最開心的人，可愛這形容就讓給你唄；氣勢女王兼美食老饕佳真，跟妳一起奮鬥口試的日子真難忘；活潑又愛笑的妍寧是兩年來實驗室座位難分難捨的鄰居；傑尼斯外型、公主脾氣的阿澎有時也是滿溫馨的。以及可愛的學弟妹：Sunny mama的貼心乖女兒阿大，人超好但氣勢也要大喔；疼妹妹的好老爸兼ppt天才重延、愛籃球的小隻Ubi、其實很豪邁的幸璇、專題生祖元和俊嵐、新加入成員阿賢和慧婷。還有小楊家榮譽成員咏馨、很懂facebook的助理阿金吳、常幫我們換燈管辛苦的葉大哥、管理confocal的佳穎學姊。在此感謝大家的溫馨相伴！

還要謝謝朋友們的噓寒問暖，讓我初到新竹不孤單。最後，尤其要感謝家人的支持和鼓勵，這是我們一起完成的學業！

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iv
目錄.....	v
表目錄.....	x
圖目錄.....	xi
附錄目錄.....	xiii
一、緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 白色念珠菌型態變化與致病機轉之關聯.....	1
1.3 白色念珠菌之細胞壁相關研究.....	4
1.3.1 細胞壁之組成.....	4
1.3.2 β -glucan 與型態變化及引發宿主免疫機轉之研究.....	5
1.3.3 1,3- β -glucan 為生物膜之細胞壁主要成分.....	6
1.3.4 白色念珠菌中與 1,3- β -glucanase 相關之基因.....	6
1.4 <i>ENG1</i> 之相關研究.....	7
1.4.1 <i>CaENG1</i> 之相關研究.....	7
1.4.2 高同源性物種之 <i>ENG1</i> 相關研究.....	8
1.5 <i>CaENG1</i> 與 <i>MTL</i> 基因之研究.....	9
1.6 篩選標記之介紹.....	10
1.7 本文之研究起源及目的.....	12
二、材料與儀器.....	14
2.1 菌株.....	14

2.2 質體.....	15
2.3 引子.....	16
2.4 化學藥品.....	18
2.5 酵素.....	20
2.6 藥品配製.....	20
2.6.1 培養基及培養液配製.....	20
2.6.2 緩衝溶液及試劑.....	21
2.7 儀器設備.....	23
三、方法與步驟.....	25
3.1 質體 DNA 的萃取.....	25
3.2 聚合酶連鎖反應).....	25
3.2.1 一般 PCR 反應.....	25
3.2.2 Rescued <i>ENGI</i> PCR 反應.....	25
3.3 大腸桿菌勝任細胞的製備.....	26
3.4 限制酶反應.....	27
3.4.1 確定質體 DNA 片段大小之限制酶反應.....	27
3.4.2 為 clone 所需之限制酶反應.....	27
3.5 接合反應.....	27
3.6 轉形反應.....	27
3.7 洋菜膠內之 DNA 萃取.....	28
3.7.1 結晶紫洋菜膠之製備.....	28
3.7.2 洋菜膠內之 DNA 片段萃取.....	28
3.8 白色念珠菌轉形反應.....	28
3.8.1 白色念珠菌勝任細胞之製備.....	28
3.8.2 電穿孔.....	29



3.9 <i>SAT1</i> flipper 之剔除.....	29
3.10 複製平皿培養法.....	30
3.11 白色念珠菌染色體 DNA 之萃取.....	30
3.11.1 方法一.....	30
3.11.2 方法二.....	31
3.12 南方點墨法.....	31
3.12.1 製備 DNA 探針.....	31
3.12.2 轉漬 DNA.....	32
3.12.3 雜交反應.....	32
3.12.4 免疫偵測.....	33
3.13 RNA 萃取.....	33
3.14 RNA 電泳.....	34
3.14.1 RNA 電泳前處理.....	34
3.14.2 RNA 電泳.....	34
3.15 反轉錄聚合酶連鎖反應.....	35
3.16 突變株之性狀分析.....	35
3.16.1 生長曲線之測定.....	35
3.16.2 芽管試驗.....	36
3.16.3 誘發菌絲生長觀察型態變化.....	36
3.16.4 侵犯力試驗.....	36
3.17 細胞分裂之觀察.....	36
3.18 化學藥品感受性測試.....	37
3.19 類接合型之基因型分析.....	38
四、結果.....	39
4.1 建構 <i>CaENG1</i> 突變株之流程.....	39



4.2 建構 <i>CaENG1</i> 單套、雙套基因剔除之突變株.....	40
4.2.1 建構含篩選標記及 <i>CaENG1</i> 上下游同源區域之質體.....	40
4.2.2 確認 <i>CaENG1</i> 單套基因之剔除.....	40
4.2.3 確認 <i>Caeng1</i> 雙套基因之剔除.....	41
4.3 建構 <i>CaENG1</i> 補償之突變株.....	42
4.3.1 建構含 <i>CaENG1</i> open reading frame 之質體.....	42
4.3.2 <i>CaENG1</i> open reading frame 序列分析.....	42
4.3.3 確認 <i>CaENG1</i> 補償之突變株.....	43
4.4 南方點墨法檢驗 <i>CaENG1</i> 各突變株.....	43
4.5 反轉錄聚合酶連鎖反應檢驗 <i>CaENG1</i> 各突變株.....	44
4.6 <i>CaENG1</i> 各突變株之性狀分析.....	44
4.6.1 <i>CaENG1</i> 各突變株之生長曲線.....	44
4.6.2 芽管試驗之結果.....	45
4.6.3 菌落型態變化之結果.....	46
4.6.3.1 含 4% 山羊血清之 Bacto agar 培養基上之生長.....	46
4.6.3.2 含 4% 山羊血清之 YPD 培養基上之生長.....	46
4.6.4 侵犯力試驗之結果.....	47
4.7 營養素 uridine 影響營養基因缺陷野生株 BWP17 之結果.....	47
4.8 細胞分裂觀察之結果.....	48
4.9 <i>CaENG1</i> 各突變株於化學藥品感受性試驗之結果.....	49
4.10 確認 <i>Caeng1</i> 類接合型突變株.....	50
4.11 <i>Caeng1</i> 類接合型突變株菌落型態之變化.....	51
4.11.1 於含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基.....	51
4.11.2 於 YPD、solid Spider 及含 10% 山羊血清之 YPD 培養基.....	52
4.12 <i>Caeng1</i> 類接合型突變株於化學藥品感受性試驗.....	52

五、討論.....	54
5.1 以抗藥性篩選標記 <i>SAT1</i> flipper 剔除 <i>CaENG1</i> 結果之探討.....	54
5.2 以南方點墨法及分析 RNA 表現量檢驗 <i>Caeng1</i> 突變株.....	55
5.3 <i>CaENG1</i> 各突變株性狀分析之探討.....	55
5.3.1 生長曲線之探討.....	56
5.3.2 芽管試驗之探討.....	56
5.3.3 以血清誘發菌絲生長之型態探討.....	56
5.3.3.1 含 4%山羊血清之 Bacto agar 培養基.....	56
5.3.3.2 含 4%山羊血清之 YPD 培養基.....	57
5.3.4 侵犯力試驗之探討.....	58
5.4 營養素 uridine 影響營養基因缺陷野生株 BWP17 之結果探討.....	58
5.5 細胞分裂之結果探討.....	59
5.6 化學藥品感受性試驗之結果探討.....	60
5.7 以南方點墨法檢驗 <i>Caeng1</i> 接合型突變株 (a/a or α/α) 之探討.....	60
5.8 以血清誘發 <i>Caeng1</i> 接合型突變株菌絲生長之型態探討.....	60
5.8.1 於含 4%山羊血清之 YPD 培養基上的菌落型態.....	60
5.8.2 於三種不同之培養基上菌落型態變化之探討.....	61
5.9 <i>Caeng1</i> 接合型突變株於化學藥品感受性試驗之結果探討.....	62
5.10 結語.....	63
5.11 未來展望.....	64
六、參考文獻.....	65
簡歷.....	112

表目錄

表一、白色念珠菌中 *CaENG1* Blast 之結果.....79



圖目錄

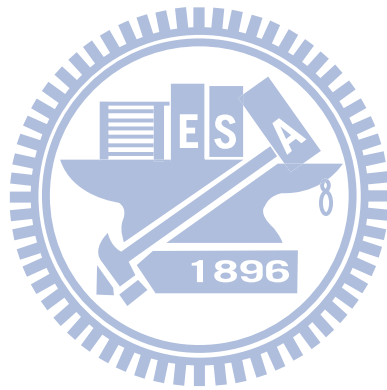
圖一、建構 <i>Caeng1</i> 突變株之示意圖	82
圖二、以限制酶確認 plasmid SAT1-BA	83
圖三、PCR確認 <i>CaENG1</i> heterozygous knock-out 突變株	84
圖四、Replica plating 及 PCR 檢驗 <i>CaENG1</i> heterozygous knock-out 突變株	85
圖五、PCR確認 <i>Caeng1</i> homozygous knock-out 突變株	86
圖六、Replica plating 及 PCR 檢驗 <i>Caeng1</i> homozygous knock-out 突變株 .	87
圖七、建構帶有 <i>CaENG1</i> ORF 之質體	89
圖八、質體 Res 20 中 <i>CaENG1</i> 之定序結果	93
圖九、PCR 及 Replica plating 確認 <i>CaENG1</i> rescued 突變株	94
圖十、南方點墨法分析 <i>Caeng1</i> 之突變株	95
圖十一、利用反轉錄聚合酶連鎖反應檢驗 <i>Caeng1</i> 之突變株	96
圖十二、 <i>CaENG1</i> 各突變株在 YPD 培養液之生長曲線	97
圖十三、芽管試驗	98
圖十四、 <i>CaENG1</i> 各突變株於含 4% 山羊血清的 Bacto-agar 培養基之菌落 型態	99
圖十五、 <i>CaENG1</i> 各突變株於含 4% 山羊血清的 YPD 培養基之菌落型態	100
圖十六、 <i>CaENG1</i> 各突變株之侵犯力試驗	101
圖十七、比較 uridine 對各突變株在含 4% 山羊血清之 YPD 培養基上的影響	102
圖十八、細胞分裂型態之觀察	104
圖十九、化學藥品感受性試驗	105

圖二十、南方點墨法分析a-type及 α -type mating strain	106
圖二十一、 <i>Caeng1</i> 類接合型突變株於 4%山羊血清的YPD培養基	108
圖二十二、 <i>Caeng1</i> 類接合型突變株於三種不同培養基之菌落型態	109
圖二十三、化學藥品感受性試驗	110



附錄目錄

附錄一、*C. albicans* 之 mating strains 反應途徑..... 111



一、緒論

1.1 前言

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是雙倍體的真菌 (diploid fungus)，屬於酵母菌 (yeast)，為人體中常見之共生菌，同時也是一種盛行率高的伺機性病原菌 (opportunistic pathogen) (Odds, 1988; Edmond *et al.*, 1999; Edwards, 2000)。在健康的人體中，白色念珠菌會伺機造成表面黏膜的感染，但在免疫功能不全之患者（如化療患者、器官移植患者及愛滋病患者）或接受侵入性治療之患者，白色念珠菌可造成嚴重的感染，如全身性念珠菌血症，致死率約高達三至五成 (Odds, 1988; Fisher-Hoch and Hutwagner, 1995; Vincent *et al.*, 1998; Edmond *et al.*, 1999; Kullberg and Filler, 2002)。

目前普遍使用之抗真菌藥物 (polyenes，如 amphotericin B; triazoles，如 itraconazole、fluconazole; imidazoles，如 miconazole) 因受限於其活性範圍、毒性或副作用等而效用下降 (Groll *et al.*, 1998b; Jack, 1998)。而隨著目前增加抗真菌藥物之使用，抗藥性菌株的發生率也隨之增加 (Pfaller *et al.*, 2000; Vanden Bossche *et al.*, 1994)。近年來由於抗藥性菌株產生，azoles 類等抗真菌藥物的治療效果已大幅下降 (De Backer *et al.*, 2001)。感染白色念珠菌盛行率增加，但目前現有藥物的效用卻下降，如何克服白色念珠菌抗藥性及找到適合藥物標的以開發新穎抗真菌藥物，是目前重要的課題。

1.2 白色念珠菌型態變化 (morphogenesis) 與致病機轉 (pathogenesis) 之關聯

白色念珠菌是一種多形態的真菌 (polymorphic fungus)，可生成酵母菌

型 (yeast form)、假菌絲型 (pseudohyphae form) 和菌絲型 (hyphae form)。酵母菌型和菌絲型皆有在感染的組織中發現，因此推測這兩種型態可能在致病機轉 (pathogenesis) 中扮演重要的角色：型態上菌絲型跟假菌絲型具侵入性，在實驗環境培養下皆可侵入洋菜膠中，此特性則是促進白色念珠菌在感染宿主初期可以滲透組織；而酵母菌型則適合散播在血液中 (Sudbery *et al.*, 2004)。白色念珠菌由單一酵母菌細胞形成假菌絲狀或菌絲狀，其病原性 (pathogenicity) 可被血清或巨噬細胞 (macrophage) 誘發 (Shepherd *et al.*, 1980; Dabrowa and Howard, 1981)。而在實驗環境培養下，例如額外添加血清以及培養在 37°C，也可誘發菌絲的生長，由酵母菌型轉變至菌絲型 (Odds, 1988)。

白色念珠菌細胞型態大部分在一般情況下為光滑、白色圓頂形之菌落 (Sudbery *et al.*, 2004)。然而，白色念珠菌不同的菌株在不同情況下可轉變不同的型態，如菌株 3153A 在少數情況下，可自發且可逆轉地轉變為多樣菌落型態 (如星狀、環狀、不規則狀、皺摺狀、絨毛狀等)，這些菌落都是同時包含酵母菌細胞和菌絲狀細胞。而菌株 WO-1 和其它在類接合型位置 (mating type like locus) 上為同型合子 (homozygote) 之菌株可做較簡單之 white-opaque 型態轉變 (Miller and Johnson, 2002); white 細胞為一般橢圓形平滑之酵母菌形態，opaque 細胞則為兩倍 white 細胞長之橢圓形，且細胞壁表面有不規則小突出，而 opaque 細胞較容易進行接合 (mating) (Miller and Johnson, 2002)。White-opaque 型態轉換對白色念珠菌於哺乳類宿主中的致病機轉相關 (Gow, 2002; Johnson, 2003; Magee and Magee, 2004; Soll, 2004)。

研究指出降低白色念珠菌 *EFG1* 之表現可抑制菌絲的形成，但血清仍可誘發其生成假菌絲 (Stoldt *et al.*, 1997)；而突變 *EFG1* 影響菌絲生成並降低白色念珠菌對小鼠之毒性 (virulence) (Lo *et al.*, 1997)。此外，白色

念珠菌雙突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 則失去了在血清誘發下形成菌絲的能力，且以此雙突變株感染小鼠，小鼠死亡率大幅降低，證明雙突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 不會造成毒性 (avirulent) (Lo *et al.*, 1997)。因此，白色念珠菌雙型態現象 (dimorphism) 至少有兩種途徑調控：一為 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 途徑調控的轉錄因子 Cph1p；二為 cyclic AMP protein kinase A 途徑調控的轉錄因子 Efg1p (Lengeler *et al.*, 2000)。受此二轉錄因子調控之下游基因，有哪些具有影響型態變化的能力且如何影響，都為可進行研究之方向。

而另一方面，主要負向調控白色念珠菌型態變化為 Tup1p，此蛋白質可抑制菌絲的生長 (Braun and Johnson, 1997)，而研究指出其它基因產物，如 Nrg1p、Rfg1p 或 Mig1p，可與 Tup1p 形成 DNA-binding protein 以抑制基因的表現 (Kaneko *et al.*, 2006; Sprague *et al.*, 2000)。剔除 *TUP1* 使得白色念珠菌無法形成酵母菌型，而固定在菌絲型態 (Braun and Johnson, 1997)，此負向調控型態變化的基因剔除後，更影響了白色念珠菌近三分之一的基因表現 (Murad *et al.*, 2001a; Murad *et al.*, 2001b)，也降低突變株對老鼠的毒性。其它研究也指出，白色念珠菌 *spt3* 雙套突變株為高度菌絲狀的表現型，即使在不誘發菌絲生長的環境下，*spt3* 雙套突變株依然生長菌絲；以此突變株感染小鼠亦無造成毒性 (Laprade *et al.*, 2002)。白色念珠菌 *SPT3* 在大多數酵母菌及其它真核類生物，如人類皆有保存相似 DNA 序列 (Madison and Winston 1998; Ogryzko *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998)，故也非為理想藥物標的之基因。

影響白色念珠菌型態變化的基因，部分研究發現同時也影響其毒性，如剔除 *CPH1* 和 *EFG1* 之菌株，無法表現菌絲型，此菌株對小鼠不會造成毒性 (Lo *et al.*, 1997)；而剔除 *TUP1* 或 *SPT3* 之菌株則大量表現菌絲型態，失去形成酵母菌型之能力，這些突變株也不會對小鼠造成毒性 (Braun

and Johnson, 1997; Laprade *et al.*, 2002)。因此研究認為白色念珠菌雙型態的變化和其致病力相關 (Saville *et al.*, 2003); 而型態轉換之能力被認為對於白色念珠菌之毒性是重要的 (Cutler, 1991)。

1.3 白色念珠菌之細胞壁相關研究

白色念珠菌細胞壁為細胞最外層之結構，和細胞生長及分裂有密切相關，並具在不同滲透壓下使細胞維持完整、黏附宿主等功能 (Cid *et al.*, 1995)，同時細胞壁也是病原菌和宿主細胞最初的接觸點 (Groll *et al.*, 1998a)。此外，哺乳類動物的細胞缺少細胞壁，因此這層結構也許適合作為研發抗真菌藥物 (antifungal drugs) 之標的位置 (Odds, 2003; Gimeno *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994)。而研究細胞壁的結構、組成和一些未知的細胞壁蛋白質之功能，可促成更進一步了解細胞壁在型態變化和致病機轉上參與的過程，以及開發新穎的抗真菌治療法 (Martinez-Lopez *et al.*, 2004)。

1.3.1 細胞壁之組成

白色念珠菌細胞壁主要包含碳水化合物、蛋白質 (6~25%) 及脂質 (1~7%)。其中主要多醣體為三種結構：1,3- β -glucan 和 1,6- β -glucan (50~60%)、mannoproteins (15~22%)，以及 chitin (0.6~9%) (Calderone and Braun, 1991; Chaffin *et al.*, 1998)。而白色念珠菌細胞壁的組成和啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的組成很相似，1,3- β -glucans 則是真菌細胞壁中主要的成分之一 (Klis *et al.*, 2001; Cid *et al.*, 1995; Mouyna *et al.*, 2002)。而已有文獻認為，細胞壁中的 β -glucans 經由內生性的 β -glucanases 水解，可能是發生於一些型態變化的過程中，例如出芽 (budding)、細胞壁生長、接合作用 (conjugation) 等 (Cid *et al.*, 1995; Nombela *et al.*, 1988)。

1.3.2 β -glucan 與型態變化及引發宿主免疫機轉之研究

在型態的變化上，芽管 (germ tube) 為白色念珠菌由酵母菌型態轉為菌絲的初期過渡型態 (Odds, 1988)，當芽管生成時， β -glucans 中 1,3- β 鍵結的含量由 30~39% 提升至 67%，1,6- β 鍵結的含量由 43~53% 降低至 14% (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006)。而細胞分裂時 (cell separation)，母細胞 (mother cell) 與子細胞 (daughter cell) 之間有一中隔 (septum)，此組織由三層構造組成：中心的初級中隔 (primary septum)，主要包含線性 1,3- β -glucan 以及中心外圍兩層次級中隔 (secondary septa)，為 1,3- β -glucan、1,6- β -glucan 構成 (Humbel *et al.*, 2001)。細胞分裂需要分解初級中隔，子細胞才能變成兩個獨立之個體 (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003)。

而在引發宿主免疫機轉方面相關研究指出，當白色念珠菌被巨噬細胞吞噬後，野生株可被誘發生成菌絲，最終殺死巨噬細胞，而菌絲型態也可躲避宿主免疫細胞之作用；酵母菌型態則為在宿主組織內增生的形式 (Gow, 1997; Mitchell, 1998)。因此菌絲型態被認為提供了白色念珠菌對於哺乳類免疫系統相互作用的好處 (Lo *et al.*, 1997; Calderone and Fonzi, 2001; Saville *et al.*, 2003)。而細胞壁成分對於宿主的免疫防禦系統也有免疫調節的作用，如細胞壁中含量最多的 β -glucan 會抑制人類單核球 (monocytes) 釋放細胞激素 (cytokine)，可因而避免引發後續之免疫反應 (Nakagawa *et al.*, 2003a)。

在人體中 Dectin-1 為一接受體 (receptor)，廣泛表現於吞噬細胞 (phagocytes)，如巨噬細胞或樹突細胞，此接受體辨別真菌細胞壁上之 β -glucan，進而引起免疫反應 (Brown and Gordon, 2003)。2005 年研究中發現，Dectin-1 能辨別白色念珠菌酵母菌型態中的 β -glucan，而菌絲型態細胞則因在細胞分裂時不會產生 bud scars，所以不會暴露出 β -glucan，因此 Dectin-1 無法辨識菌絲型態的細胞而引起免疫反應 (Odd, 1988)；

Gantner *et al.*, 2005)。近年來已研究出一些單株或融合之抗真菌的抗體 (antifungal antibodies)，可提供對抗真菌感染之預防，當中有一些抗真菌之抗體可藉由阻斷病原菌致病因子而提供保護作用 (De Bernardis *et al.*, 2007; Vilanova *et al.*, 2004; De Bernardis *et al.*, 2002)。研究指出藉由抗 β -glucan 抗體的保護，可抑制白色念珠菌之生長及附著力 (Torosantucci *et al.*, 2009)。

所以白色念珠菌細胞壁成分 β -glucan 與其細胞分裂型態變化及宿主之免疫機轉息息相關，研究 β -glucan 相關之基因也許可找到藥物治療的新方向。

1.3.3 1,3- β -glucan 為生物膜 (biofilm) 之細胞壁主要成分

生物膜 (biofilm) 為許多病原微生物常見的汙染方式，由於生物膜可以抵抗多種抗生素，並容易在侵入性導管內形成，使得治療不易且容易引起院內感染 (Andes *et al.*, 2004)。已生長成熟之生物膜 (mature biofilm) 與剛開始形成的浮游狀細胞 (planktonic cells) 相比，抗藥性可高達一千倍 (Lewis *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2003)。

白色念珠菌之生物膜也具有抗藥性，如抗 amphotericin B 和 triazoles (Ramage *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2002)。研究證實生物膜中細胞壁主要成分為 1,3- β -glucan，成熟的生物膜細胞較浮游狀細胞含較高 1,3- β -glucan 的含量；而加入 1,3- β -glucanase，則提高抗真菌藥物 fluconazole 和 amphotericin B 對生物膜的效用。推測可能因 1,3- β -glucan 和抗真菌藥物相互作用，而抑制藥物穿透，而經由 1,3- β -glucanase 降解後則減少抑制藥物穿透的現象；另一推測為細胞壁成份含量改變，以致無法保護生物膜細胞抵抗外在的抗真菌藥物 (Nett *et al.*, 2007)。

1.3.4 白色念珠菌中與 1,3- β -glucanase 相關之基因

細胞壁成分 1,3- β -glucan 是由 1,3- β -glucan synthase 所合成，而由

1,3- β -glucanases 所降解 (Adams, 2004; Chaffin *et al.*, 1998)。CaGsl1p 為 1,3- β -glucan synthase，此基因為白色念珠菌生存所必需，故無法剔除 *CaGSL1* 以進行研究 (Mio *et al.*, 1997)。而與 1,3- β -glucanase 相關基因有轉譯出酵素 exo-1,3- β -glucanases 的 *CaEXG1*、*CaEXG2*、*CaSPR1*，和轉譯出 endo-1,3- β -glucanase 的 *CaENG1* (又稱 *DSE4*)、*CaENG2* (在 *S. cerevisiae* 中的 homolog 為 *ACF2*)，如表一所示，比對白色念珠菌中與 *CaENG1* 轉譯出之胺基酸序列相似度較高的基因則為 *CaENG2*。

白色念珠菌有關 exo-1,3- β -glucanases 之研究可追溯至 1984 年，近年來多篇研究此蛋白質之發表，對於相關基因已有深入的了解；*CaEXG1* 為主要轉譯 exo-1,3- β -glucanases 的基因，CaExg1p 並不為白色念珠菌生長所必需，剔除 *CaEXG1* 不會對白色念珠菌造成型態變化上的差異，然而 *Caexg1* 突變株會增加對 chitin 和 glucan 合成抑制劑的感受性 (Ram *et al.*, 1984; González *et al.*, 1997)。

而關於白色念珠菌 endo-1,3- β -glucanase 之研究相對較少，僅有 2005 年對於 *CaENG1* 之研究，提到 CaEng1p 功能和啤酒酵母菌 Eng1p 功能相似，並與細胞分裂相關 (Esteban *et al.*, 2005)；以及文獻提到 *CaENG2* 基因表現對於生物膜生成並無影響 (Murillo *et al.*, 2005)。

1.4 *ENG1* 之相關研究

1.4.1 *CaENG1* 之相關研究

白色念珠菌 *CaENG1* 蛋白質產物為 endo-1,3- β -glucanase，此對偶基因分別位於 Contig19-10163 的 orf19.3066 (3438 bp, 1145 amino acids) 和 Contig19-20163 的 orf19.10584 (3441 bp, 1146 amino acids) (Candida Genome Database; Esteban *et al.*, 2005)。CaEng1p 可在啤酒酵母菌中表現，並補償啤酒酵母菌 *eng1* 突變株分裂缺陷的情況 (Esteban *et al.*,

2005)。CaEng1p 有一段大約 700 個胺基酸之區域，和 ScEng1p 相似 (P437 至 A1136)，為高度保留，此區域特徵屬於 GH81 (glycosyl hydrolases family 81) 家族，此家族之蛋白質皆擁有大約 650 個胺基酸之區域，其中包含可能具催化能力的部份 (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008)；GHF81 當中有些酵素高度專一於 1,3- β 鍵結，具有以內部水解模式降解 glucans 之特色 (Esteban *et al.*, 2005; Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Mouyna *et al.*, 2002; Coutinho *et al.*, 1999)。

而文獻發表 *CaENG1* 與 *CaCHT2* (轉譯出 chitinase) 之轉錄皆和細胞分裂過程有關，並在酵母菌型態至菌絲型態轉變期間，二者表現量皆下降，說明二者之酵素活性在型態轉變過程中是被抑制的 (Esteban *et al.*, 2005; McCreath *et al.*, 1995)。而白色念珠菌 *CDC14* 可轉譯出蛋白質磷酸酯酶 (protein phosphatase)，可負向調控 B 型細胞週期蛋白 (B-type cyclins)，而細胞週期蛋白則可能影響菌絲型態；剔除 *CDC14* 導致嚴重細胞分裂的缺陷，而 *cdc14* 突變株中，和細胞壁相關基因 *CHT3* (轉譯出 chitinase)、*CaENG1*、*DSE1* (預測其基因產物為細胞壁蛋白質) 表現量皆顯著下降 (Clemente-Blanco *et al.*, 2006)。文獻也指出 Sep7p 為 septin，野生株侵入性生長所必須，當剔除 *SEP7* 後，抑制了誘發白色念珠菌菌絲生長時的細胞分裂，而其 *sep7* 突變株中，*CaENG1*、*DSE1* 及轉錄因子 *ACE2* 之表現量皆上升 (González-Novo *et al.*, 2008)。

1.4.2 高同源性物種之 *ENG1* 相關研究

不同物種中 *ENG1* 之研究，在啤酒酵母菌 (*S. cerevisiae*) 和裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的 endo-1,3- β -glucanases 屬於醣基水解酶 (glycosyl hydrolases) 家族 81 (family 81, GH81)，皆發表與細胞分裂有關，剔除 *ENG1* 會造成細胞分裂的缺陷 (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Coutinho *et al.*, 1999)。

在啤酒酵母菌 (*S. cerevisiae*) 中，比對出其 Eng1p 和 CaEng1p 在保留區 (conserved region) 有高達 54% 同源性 (identity)，而啤酒酵母菌 *ENG1* 的轉錄只表現在營養性細胞中 (vegetative cells)，在孢子繁殖 (sporulation) 過程中表現量則顯著下降以致無法被偵測 (Baladrón *et al.*, 2002)。而啤酒酵母菌有一轉錄因子 *ACE2* 也可活化及轉譯出和 endo-1,3- β -glucanases 相同功能之蛋白質，研究發現 *ace2* 突變株中，偵測不到 *ENG1* 和 *CTS1* (轉譯出 chitinase) 基因之表現，故認為 *ENG1* 轉錄需要 Ace2p，且此現象與 *CTS1* 相似 (Baladrón *et al.*, 2002; Doolin *et al.*, 2001)。

在裂殖酵母 (*S. pombe*) 中，Eng1p 則參與了初級中隔 (primary septum) 裂解的過程 (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003)。而在煙麴菌 (*Aspergillus fumigatus*) 中，缺少 *ENG1* 轉譯之蛋白質並無造成明顯不同的表現型 (phenotype) (Mouyna *et al.*, 2002)。

1.5 *CaENG1* 與 *MTL* 基因 (mating type like) 之研究

白色念珠菌目前尚未發現有性生殖，雖然近來研究發現白色念珠菌可進行接合作用 (mating) 以及無性生殖周期 (parasexual cycle)，但並不能進行減數分裂 (meiosis) (Hull *et al.*, 2000; Tzung *et al.*, 2001; Bennett and Johnson, 2003; Forche *et al.*, 2008)。白色念珠菌雖然可經由增加 mating type locus 之變異而誘發其進行接合 (Magee and Magee, 2000; Hull *et al.*, 2000)，但在正常生長下，極少機率進行 mating，故其基因雜交 (genetic crosses) 極具困難 (De Backer *et al.*, 2001)。

誘發白色念珠菌進行接合作用，首先需將白色念珠菌由 a/ α 型態細胞轉變為 a/a 或 α/α 型態之細胞：白色念珠菌在五號染色體上帶有 *MTLa1* 之基因，而另一條 allele 則帶有 *MTLa1* 和 *MTLa2* (Hull and Johnson, 1999)。當給予白色念珠菌山梨糖 (sorbitol) 培養時，會致使白色念珠菌

失去一條五號染色體 (Janbon *et al.*, 1998)，推測因為負調控利用山梨糖 (negative regulator of the sorbose-utilization gene) 之基因存在於五號染色體上，當減少此負調控者的表現，例如失去其中一條五號染色體，則可以使菌株生長於山梨糖培養基中 (Bennett and Johnson, 2005)。當將菌株移除山梨糖培養的環境以後，剩下的一條五號染色體將會進行複製，產生兩條相同的五號染色體，故形成基因型 a/a 或 α/α 的 a-type 細胞或 α -type 細胞 (Janbon *et al.*, 1998; Janbon *et al.*, 1999)。

而 a-type 細胞及 α -type 細胞則較容易進行 white-opaque 型態轉變，當菌株轉變為 opaque 型態時，進行接合的效率約為 white 型態 10^6 倍 (Miller and Johnson, 2002)。文獻也指出，opaque 型態之細胞可分泌高表現量之毒性因子 aspartyl proteinase，white 型態則無此現象 (Morrow *et al.*, 1992)；動物實驗中則發現 white 型態細胞較 opaque 型態細胞更具毒性，而 opaque 型態則適合在感染處聚集增生 (Kvaal *et al.*, 1997; Kvaal *et al.*, 1999)；white-opaque 型態轉換也影響了白色念珠菌的致病機轉 (Gow, 2002; Johnson, 2003; Magee and Magee, 2004; Soll, 2004)。

Alpha pheromone 由 α opaque 細胞分泌，並影響接合初期時的 a opaque 細胞 (Miller and Johnson, 2002; Lockhart *et al.*, 2003)。在 2006 年研究以 microarray 分析發現，在營養源不足、甘露醇 (mannitol) 作為唯一碳源之培養環境下 (SpiderM 培養基)，給予野生株 SC5314 衍生出之 opaque 狀態 a/a 細胞 alpha pheromone (10 $\mu\text{g/ml}$)，其 *CaENGI* 表現較正常情況下減少了三倍以上的表現量 (Bennett and Johnson, 2006; Côte and Whiteway, 2008)。而 *CaENGI* 與 *MTL* 基因之相互影響，或在 white-opaque 型態轉變中扮演之角色目前並無研究探討。

1.6 篩選標記之介紹

研究白色念珠菌之基因功能的困難度在於：一、基因雜交 (genetic crosses) 是困難的 (De Backer *et al.*, 2001)。二、沒有已知質體 (plasmid)，故目前沒有較方便突變基因的方法 (Matthews *et al.*, 1997)。三、由於是雙倍體真菌，因此剔除基因需要重覆流程 (Pla *et al.*, 1996)。四、轉形的效率很低。先前研究常以營養性篩選標記 (*ARG4*, *HIS1*, *URA3* marker) 剔除白色念珠菌標的基因 (Dennison *et al.*, 2005)，不但要在三種不同的篩選標記上建構標的基因上下游相似序列，花費較多的時間，也因白色念珠菌沒有已知質體、轉形困難，增加了基因剔除的難度 (Matthews *et al.*, 1997; De Backer *et al.*, 2001)。且近年來研究發現篩選標記 *URA3* 會隨插入不同基因體中的位置而有不同程度的表現量，進而影響菌株型態之變化，而剔除 *URA3* 的菌株則無毒性 (avirulence) (Lay *et al.*, 1998; Staab and Sundstrom, 2003; Kirsch and Whitney, 1991; Cole *et al.*, 1995)。白色念珠菌對宿主細胞之附著力及其它毒性因子也會因 *URA3* 表現的程度而受影響 (Bain *et al.*, 2001)。因此以 *URA3* 篩選標記作為研究白色念珠菌中標的基因之工具會無法避免 *URA3* 此基因在菌株內表現而帶來的影響 (Staab and Sundstrom, 2003)。

故近年來發展適用於白色念珠菌野生株 SC5314 之篩選標記 *SAT1* flipper (Reuss *et al.*, 2004)，其所在之質體 pSFS2 上帶有白色念珠菌 *caSAT1*，可抗藥物 nourseothricin 以作為篩選；以及 *caFLP*，轉譯出蛋白質 (site-specific recombinase) 會和 *SAT1* flipper 兩端特定序列 FRT (minimal FLP recombination target sequence) 結合，彎曲兩端 FRT 包圍之 DNA 序列並進行切除，進而將序列從基因體中 pop-out，而後只剩下一端 FRT 序列留於基因體中，此法可減少外來基因對白色念珠菌造成之影響 (Reuss *et al.*, 2004; Wirsching *et al.*, 2000; Luetke and Sadowski, 1995; Shaikh and Sadowski, 2000)。而 pop-out 篩選標記另一好處，則可再重覆

使用篩選標記剔除另一股 allele 之標的基因，故節省許多時間與精力。

1.7 本文之研究起源及目的

由於白色念珠菌伺機感染免疫功能不全之患者，造成嚴重症狀且有高致死率 (Kullberg and Filler, 2002; Ruan and Hsueh, 2009)，而近年來抗藥性菌株的產生，使得治療上更加困難 (De Backer *et al.*, 2001)。白色念珠菌細胞壁的相關基因應是理想的藥物標的，在細胞壁中 1,3- β -glucan 為主要成分之一，而 β -glucan 也被研究證實與宿主的免疫機制相關 (Nakagawa *et al.*, 2003a; Brown and Gordon, 2003)。*CaENG1* 之蛋白質產物為 endo-1,3- β -glucanase，裂解 β -glucan 中 1,3 共價鍵 (Esteban *et al.*, 2005)。研究證實在不同物種中 *ENG1* 和細胞分裂相關 (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Esteban *et al.*, 2005)；在酵母菌型態至菌絲型態轉變期間 *CaENG1* 表現量下降 (Esteban *et al.*, 2005)；剔除 *CDC14* 導致細胞分裂嚴重的缺陷，且 *CaENG1* 表現量顯著減少 (Clemente-Blanco *et al.*, 2006)；剔除 *SEP7*，野生株侵入性生長所必須之基因，*CaENG1* 表現量明顯上升 (González-Novo *et al.*, 2008)。以上研究顯示了 *CaENG1* 在型態變化上的重要性。

承襲實驗室先前發表之論文，以營養篩選標記 *ARG4*、*URA3* 及 *HIS1* 剔除 *CaENG1*，結果發現 *CaENG1* 和篩選標記 *URA3* 會影響白色念珠菌菌絲的生成：剔除 *CaENG1* 降低同環境下細胞菌絲的生長；而營養性篩選標記 *URA3* 則會增加同環境下細胞菌絲的生長，此二者對菌絲生長出現相反的誘因，故於結果判斷上顯得困難 (交大碩士論文 謝志豪, 2006)。然而重新檢驗先前建構之 *Caeng1* 突變株、驗證營養性篩選標記影響菌絲生長之程度，以及確認實驗流程之設計需耗費大量時間。

因此本論文之目的為排除營養性篩選標記 *URA3* 之影響，探討 *CaENG1*

對白色念珠菌型態變化及致病力是否相關。實驗策略為以抗藥性篩選標記剔除 *CaENGI*，再以南方點墨法和 RNA 表現量來檢驗突變株之建構，之後進行突變株的性狀分析，觀察剔除 *CaENGI* 後的結果是否與先前之研究相符合，以求更進一步確認 *CaENGI* 對白色念珠之影響為何。



二、材料與儀器

2.1 菌株 (strain)

(1) *Escherichia coli* (strain : DH5 α) :

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

(2) *Candida albicans* :

菌株 (Strain)	基因型 (Genotype)	來源 (Sources)
SC5314	wild-type strain	(Gillum <i>et al.</i> ,1984)
BWP17	<i>arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 1999)
JKC19	<i>cph1/cph1 EFG1/EFG1</i>	(Liu <i>et al.</i> ,1994)
HLC52	<i>CPH1/CPH1 efg1/efg1</i>	(Lo <i>et al.</i> , 1997)
HLC54	<i>cph1/cph1 efg1/efg1</i>	(Lo <i>et al.</i> , 1997)
EHK1	<i>CaENG1/Caeng1::FRT</i>	本實驗
EKG7	<i>Caeng1::FRT/Caeng1::FRT</i>	本實驗
EKP2	<i>Caeng1::FRT/Caeng1::FRT</i>	本實驗
EGR	<i>Caeng1::FRT/CaENG1::FRT</i>	本實驗
WT-1a	a/a, <i>CaENG1/ CaENG1</i>	交大楊昀良實驗室
WT-2a		博士生 柯惠菁
WT-3a		

菌株 (Strain)	基因型 (Genotype)	來源 (Sources)
WT-4 α	α/α , <i>CaENGI/ CaENGI</i>	交大楊昀良實驗室
WT-5 α		博士生 柯惠菁
WT-6 α		
EKP2-1a	a/a , <i>Caeng1::FRT/Caeng1::FRT</i>	交大楊昀良實驗室
EKP2-3a		博士生 柯惠菁
EKP2-4a		
EKP2-5a		
EKP2-6a		
EKP2-2 α	α/α , <i>Caeng1::FRT/Caeng1::FRT</i>	交大楊昀良實驗室
		博士生 柯惠菁

2.2 質體 (plasmid)

質體 (Plasmid)	描述 (Description)	來源 (Sources)
pSFS2	帶有 <i>SAT1</i> marker，可抗 nourseothricin。並含 <i>caFLP</i> 及 <i>MAL2p</i> ，可經 maltose 誘使 marker 從 genome 中 pop-out。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 ampicillin。	(Reuß <i>et al.</i> ,2004)
pSAT1-B	pSFS2 質體外接 <i>CaENGI</i> 下游約 360 bp 的片段。	本實驗
pSAT1-BA	pSAT1-B 質體外接 <i>CaENGI</i> 上游約 600 bp 的片段。	本實驗

pRes20

pSAT1-B 質體外接 *CaENG1* 上

本實驗

游至下游約 4.4 kb 之片段，經定

序確認包含 *CaENG1* open

reading frame 正確之序列。

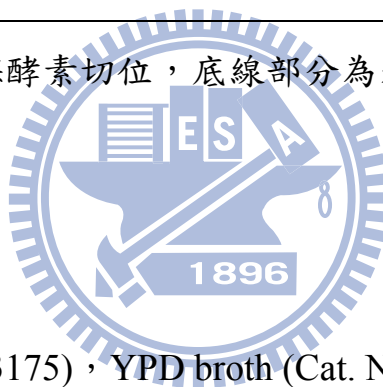
2.3 引子 (primer)

引子	序列 5' ~ 3'	位置
ENG1A-F	<u>CGGGGTACCGTCATTAACAATTGAGAT</u> <i>Kpn</i> I	<i>ENG1</i> gene : -703 ~ -686
ENG1A-R	<u>CCGCTCGAGATTGAATAGACATGAGAA</u> <i>Xho</i> I	<i>ENG1</i> gene : -102 ~ -119
ENG1B-F	<u>CCTTGCGGCCGCTGCATCAAATAACT</u> <i>Not</i> I	<i>ENG1</i> gene : +3345 ~ +3359
ENG1B-R	<u>GCCCGCGGGACATGAGTACCCAAA</u> <i>Sac</i> II	<i>ENG1</i> gene : +3706 ~ +3691
pENG1A-F	GCAATAGAAGCCTGCAAACATCATAAA	<i>ENG1</i> gene : -863 ~ -838
ENG1-3656-F	GGCTCTGCATATTATAACGACCACGATTT	<i>ENG1</i> gene : +2656 ~ +2684
SAT1-860-R	GCTACAACCTCAGAGCACGCTAGACAAATT	pSFS2 plasmid : +267 ~ +239
resA-F	<u>GGGGTACCGTCATTAACAATTGAGATGAAAAG</u> <i>Kpn</i> I	<i>ENG1</i> gene : -703 ~ -680

resB-R	<u>CCCTCGAGG</u> GACATGAGTACCCAAAAGATAC <i>Xho</i> I	<i>ENG1</i> gene : +3706~+3685
DSR1	GCTTCCTTTGTAATTGTAAGTGCATCTG	<i>ENG1</i> gene : +747~+719
DSR2	CCGTTGTTGTCGACACCAGCAGGAATTG	<i>ENG1</i> gene : +1375~+1346
DS3	CCAATGGGTCTATTTCTTTATATCG	<i>ENG1</i> gene : +785~+810
DS4	CCAGTTCAAGTTCAGAAAGTGTTG	<i>ENG1</i> gene : +1214~+1238
DS5	GCTGAATTGTCTGCCTTGGTTAC	<i>ENG1</i> gene : +1651~+1674
DS6	GCCACTGTTCTGGGAAGTGTATC	<i>ENG1</i> gene : +2060~+2081
DS7	GGTTAGTGAAATCATAAGGATGAA	<i>ENG1</i> gene : +2484~+2508
ENG1OB-R	GGTGTGCAGTAGAATGAGGAATGACATTC	<i>ENG1</i> gene : +3990~+3962
HJL00134-F	TTGAAGCGTGAGAGGCTAGGAG	<i>MTLal</i> gene : +109~+129
HJL00135-R	ATCAATTCCCTTTCTCTTCGATTAGG	<i>MTLal</i> gene : +595~+570
HJL00136-F	TTCGAGTACATTCTGGTCCGCG	<i>MTLal</i> gene : +56~+76

HJL00137-R	TGTAACATCCTCAATTGTACCCGA	<i>MTLa1</i> gene : +571~+547
ACT1-F	GGATTCTGGTGATGGTGTACTC	<i>ACT1</i> gene : +1120~+1142
ACT1-R	ACCATGTTCCCAGGTATTGC	<i>ACT1</i> gene : +1590~+1571
FN-F	GGCAACTGGTTTGTTCGTCACTT	<i>ENGI</i> gene : +2871~+2893
FN-R	CCAGTCCAGCCACTATCAACATT	<i>ENGI</i> gene : +3291~+3268

註：灰色部分為限制酶酵素切位，底線部分為外加之核苷酸



2.4 化學藥品

- Difco laboratories

Bacto agar (Cat. No. 143175), YPD broth (Cat. No. 235141XB), Nutrient broth (Cat. No. 149018), D-mannitol (Cat. No.217020, Yeast nitrogen base w/o amino acid (Cat. No. 145368)

- J.T Baker

Tris base (Cat. No. 4109-01), Triton X-100 (Cat. No. X198-07), Formaldehyde (Cat. No. 15512), 3-N-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) (Cat. No. 1132612)

- Amersco :

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

- Roche :

DIG DNA labeling mix (Cat. No. 1277065) , Anti-DIC-AP (Cat. No. 1093274) , CSPD (Cat. No. 1655884) , DIG Easy Hyb (Cat. No. 11603558 001) , Blocking reagent (Cat. No. 1096176)

- Sigma Chemical Co.

Dithiothreitol (DTT) (Cat. No. D9779) , Glassbeads (425~600 μm) (Cat. No. G9268-500G) , Lithium acetate (CH₃COOLi) (Cat. No. L-6883)
Congo red (Cat. No. C6767)

- Merck

Chloroform (Cat. No. 1.0244511000) , Dodecyl sulfate sodium (SDS) (Cat. No. 113760.0100) , Ethanol (Cat. No. K33534874) , Potassium chloride (KCl) (Cat. No. K24252236) , Sodium acetate (Cat. No. 1.06268.0250) , Sodium hydroxide (NaOH) (Cat. No. B886298) , Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrogen chloride (Tris-Cl) (Cat. No. 8382T006) , Sodium chloride (NaCl) (Cat. No. K29779304) , Maleic acid (Cat. No. S27857) , Tween 20 (Cat. No. P-1379) , Triton X-100 (Cat. No. K23841503)

- Scharlau

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

- AppliChem

Ampicillin (Cat. No. A0839)

- Invitrogen

Goat serum (Cat. No. 01-6201) , SuperScript[™] One-Step RT-PCR with Platinum *Taq* (Cat. No. 10928-034)

- Fluka

Calcofluor white stain (Cat. No. F3397)

- Werner Bioagents

Nourseothricin (Cat. No. 5.1000)

- Kodak

X-film (Cat. No.1651454)

- Subenzyme :

1kb DNA ladder (Cat. No. SEM11C001)

2.5 酵素

- NEB

*Bam*H I (Cat. No. R0136S), *Bsp*E I (Cat. No. R0540S), *Bsr*G I (Cat. No. R0575S), *Eco*R I (Cat. No. R0101S), *Hpa* I (Cat. No. R0105S), *Kpn* I (Cat. No. R0142S), *Not* I (Cat. No. R0189S), *Sac* II (Cat. No. R0157S), *Xba* I (Cat. No. R0145S), *Xho* I (Cat. No. R0146S)

2.6 藥品配製

2.6.1 培養基及培養液配製

- LB (Luria-Bertni) 培養液

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

- LB/Ampicillin 培養基

1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml

Ampicillin

- YPD 培養液

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

- YP/Maltose 培養液

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

- YPD/10% goat serum 培養液

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

- YPD 培養基

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

- YPD/nourseothricin 培養基

1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% dextrose, 2% Bacto-agar , 200 µg/ml Nourseothricin

- YPD/4% goat serum 培養基

1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% dextrose , 2% Bacto-agar , 4% goat serum

- YPD/Uridine/4% goat serum 培養基

1% yeast extract , 2% Bacto-peptone , 2% dextrose , 2% Bacto-agar , 4% goat serum , 80 mg/L uridine

- Bacto agar/4% goat serum 培養基

2% Bacto-agar , 4% goat serum

- Solid spider 培養基

1% nutrient broth , 1% mannitol , 0.2% K_2HPO_4 , 1.35% Bacto-agar

- YEPS 培養基

1% yeast extract , 2% peptone , 2% sorbose , 2% Bacto-agar

2.6.2 緩衝溶液及試劑

- 20 mM $CaCl_2$

0.406 g $CaCl_2$ dissolved in dd H_2O to 100 ml

- Freezer solution

50 mM $CaCl_2$, 15% glycerol

- 10 X Tris-EDTA (10 X TE)

100 mM Tris-Cl , 10 mM EDTA (pH 7.5)

- 3 M Sodium acetate (NaOAC)

40.83 g NaOAC dissolved in dd H₂O to 100 ml (pH 7.0)

- 1 M Dithiothreitol (DTT)

3.09 g DTT dissolved in 0.01 M NaOAC 20 ml , store at -20°C

- 1 M Lithium acetate (LiOAC)

20.4 g LiOAC dissolved in dd H₂O to 200 ml (pH 7.5)

- 1 M Sorbitol

33.4 g sorbitol in dd H₂O to 200 ml

- Breaking buffer

2% Triton X-100 , 1% SDS , 0.1 M NaCl , 1 X TE

- Denaturation solution

0.5 M NaOH , 1.5 M NaCl

- Neutralization solution

0.5 M Tris-Cl , 1.5 M NaCl (pH 7.5)

- 20 X SSC

3 M NaCl , 0.3 M Sodium citrate (pH 7.0)

- Dectection buffer

0.1 M Tris-Cl , 0.1 M NaCl (pH 9.5)

- 2 X Washing buffer

10 × SSC , 0.1% (w/v) SDS

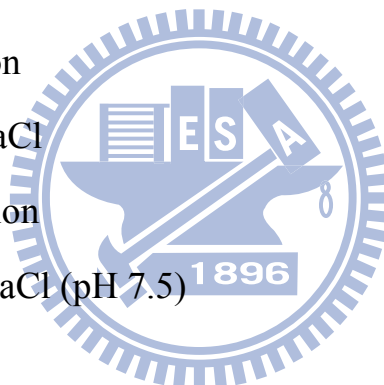
- 0.5 X Washing buffer

5 X SSC , 0.1% (w/v) SDS

- Washing buffer

0.1 M Maleic acid , 0.15 M NaCl (pH 7.5) , 0.3% Tween 20

- Maleic acid buffer



0.1 M Maleic acid , 0.15 M NaCl (pH 7.5)

- 10 X Blocking buffer

1% (w/v) blocking reagent (Roche) dissolved in maleic acid buffer

- 10% (w/v) SDS

10 g SDS dissolved in dd H₂O to 100 ml (pH 7.2)

- 10% (w/v) Potassium hydroxide

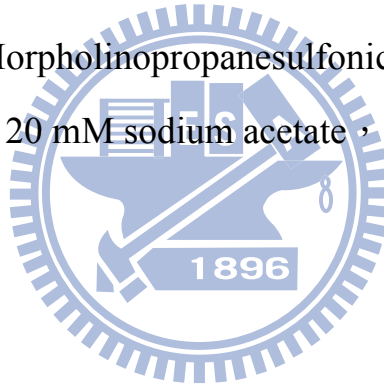
10 g potassium hydroxide dissolved in dd H₂O to 100 ml

- RNA isolation buffer (RIB)

2.5 M NaCl , 0.5 M Tris-Cl , 0.25 M EDTA , 1% (w/v) SDS , 0.1% DEPC
(diethyl pyrocarbonate)

- 10 X MOPS (3-N-Morpholinopropanesulfonic acid)

0.2 M MOPS (pH 7.0) , 20 mM sodium acetate , 10 mM EDTA (pH 8.0) in
DEPC-treated H₂O



2.7 儀器設備

微電腦多功能冷凍高速離心機 Cebtrifuge 5804R (eppendorf)

離心機 KUBOTA 5100 (KUBOTA CORPORATION)

微量高速冷凍離心機 Centrifuge 5415R (eppendorf)

雜交連結器 (UVITEC)

電子防潮箱DX106 (台灣防潮科技)

超純水製造機 Simplicity (MILLIPORE)

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

平面式震盪器 S-101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

乾燥加熱板 DB102 (Violet BioSciences, Inc.)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)

往復式恆溫水槽 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

水浴槽 B-100 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

迴轉式震盪培養箱 721SR (WISDOM APPARATUS MFG COMPANY)

恆溫式震盪培養箱 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

梯度核酸增殖儀 labcycler (SENSQUEST)

脈衝器 MicroPulser™ (BIO-RAD)

核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

電磁式奈米級偵測儀 ND-100 (NanoDrop)

無菌操作台 Legrand (CHERNG HUEI)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)

4 °C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)

-20 °C 冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)

-86 °C 冷凍櫃 925/926 (Forma Scientific)

倒立顯微鏡 CK40 (OLYMPUS)

數位相機 C-5050ZOOM (OLYMPUS)

實體顯微鏡

數位相機 K200D (PENTAX)

雷射掃描式共軛焦顯微鏡 (Laser Scanning Confocal Microscope)
(Olympus)

三、方法與步驟

3.1 質體 DNA (plasmid DNA) 的萃取

取單一菌落培養約12~16小時後，離心 $1,125\times g$ 、12分鐘，去上清液。以DNA isolation kit (Premier PM250) 萃取質體DNA。加入200 μl solution 1，混合均勻，將菌體移置新的1.5 ml 離心管，溫和反轉5次。加入200 μl solution 2，混合均勻，溫和反轉5次，等待2分鐘。再加入200 μl solution 3，混合均勻，溫和反轉5次。迅速離心 $15,700\times g$ 、5分鐘，小心取上清液至spin column。離心 $15,700\times g$ 、1分鐘，倒掉過濾液。加入700 μl washing buffer，離心 $15,700\times g$ 、1分鐘，倒掉過濾液。再加入700 μl washing buffer，離心 $15,700\times g$ 、1分鐘，倒掉過濾液。Spin column $15,700\times g$ 空轉5分鐘。將spin column移置新的1.5 ml 離心管，於乾燥加熱板上 $65^\circ C$ 、5分鐘。以50 μl 二次無菌水或1 X TE buffer加入spin column中，靜置2分鐘。 $15,700\times g$ 、3分鐘收下質體DNA，儲存於 $-20^\circ C$ 。

3.2 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction)

以設計好之一對 primer，配合 DNA template 及 taq polymerase，可將欲得到之 DNA 片段合成出來。將下列材料混合於 200 μl 微量離心管內：

3.2.1 一般 PCR 反應

1 unit (U) 的 Taq Polymerase (5 U/ μl) (NEB M0267S)、10 X PCR buffer 5 μl 、50 μM 的引子各 1 μl 、2.5 mM dNTPs mixture 4 μl 、0.1 μg 的 template DNA，補二次無菌水至總體積 50 μl ，置於 PCR 溫度控制儀進行聚合酶連鎖反應。以此方法反應預計得到 *CaENGI* 上游 A region 及下游 B region。

3.2.2 Rescued *CaENGI* PCR 反應

欲合成 *CaENGI* 上游之 A region 及 *CaENGI* open reading frame 至下游

B region 之片段約為 4.4 kb。使用 Phusion™ High-Fidelity PCR Kit (NEB F-553S) 進行 PCR 反應，其聚合酶不會在 DNA 產物後加上 dATP，且有 proof reading 之功能。故選用此酵素進行反應。以傳統法萃取的 *Candida albicans* 之 gDNA 為 template (~1 µg)、5 X Phusion HF buffer 10 µl、1 mM dNTPs 1 µl、50 µM 的引子各 1 µl、Phusion™ DNA polymerase 0.5 µl (2 U/µl)，補二次無菌水至總體積 50 µl，再置於 PCR 溫度控制儀進行反應。

PCR 溫度控制儀的設定如下：

一般 PCR	Rescued <i>ENG1</i> PCR
95 °C 5 分鐘	95 °C 30 秒
95 °C 1 分鐘	95 °C 10 秒
52~55 °C 1 分鐘	52 °C 30 秒
72 °C 1 分鐘 (重複 30 個循環)	72 °C 2.5 分鐘(重複 30 個循環)
72 °C 5 分鐘	72 °C 10 分鐘
4 °C 停止反應	4 °C 停止反應

反應完成後，利用 0.8% 洋菜膠電泳確認 PCR 產物片段大小是否正確，再利用 PCR Clean-up Kit (Premier CU250) 來純化 DNA 去除酵素及鹽類。

3.3 大腸桿菌勝任細胞(competent cell)的製備 (Dagert and Ehrlich, 1979)

單一菌落 (DH5α) 培養至 37 °C、250 rpm 隔夜培養 12~16 小時。取 2 ml 菌液轉養至 100 ml LB 培養液(含 5% glucose 及 10 mM MgCl₂) 中。37 °C、250 rpm，培養至 OD₆₀₀ 約 0.4~0.7。將培養之細胞置於冰上 20 分鐘，將菌液分裝至 50 ml 離心管，4 °C 離心 1,620×g、10 分鐘，去上清液。將離心管倒置於紙巾上 3 分鐘，加入 25 ml 預冷之 0.1 M CaCl₂，以手搖晃懸浮菌體。

將離心管置於冰上30分鐘，4 °C 離心720×g、10分鐘，去上清液。加入2.5 ml預冷之0.1 M CaCl₂，置冰上1小時後可直接進行轉形。或置4 °C 12~16小時後，低溫離心720×g、5分鐘，去上清液。加入2.5 ml預冷之freezer solution，混合均勻後，分裝至1.5 ml離心管，迅速儲存於 -80 °C。(以上均為無菌操作)。

3.4 限制酶反應 (enzyme digestion)

3.4.1 確定質體 DNA 片段大小之限制酶反應

取 DNA 1 μg、1 U/kb 限制酶、10 X buffer 1 μl、10 X BSA 1 μl，補充無菌二次水至總體積 10 μl，37 °C 水浴培養 1 小時，再以 0.8% 洋菜膠電泳進行片段大小之分析。

3.4.2 為 clone 所需之限制酶反應

取 DNA 10μg、10 X buffer 5 μl、10 X BSA 5μl、限制酶 1 μl、補二次無菌水至總體積為 50 μl，37 °C 反應 3 小時至 18 小時 (依酵素特性)。反應完成後，以 clean up kit (Premier CU250) 去除限制酶、buffer 及鹽類等，所得到之 DNA 片段用以進行下一步接合反應。

3.5 接合反應 (ligation)

將載體 DNA (vector DNA) 及欲插入之 DNA 片段 (insert DNA) 連結之反應條件為：vector DNA 50~400 ng、insert DNA 和 vector DNA 莫耳濃度比為 3：1、10 X ligase buffer 1 μl、T4 DNA ligase (5 U/μl) (Fermentas EP0402) 0.4 μl，補無菌二次水至總體積 10 μl。4 °C 培養 12~16 小時，或 22 °C 培養 1 小時。

3.6 轉形反應 (transformation) (Dagert and Ehrlich, 1979)

將 competent cell 冰上解凍，分裝至 50 μ l，加入 pDNA (0.1~1 μ g)，其中一管不加入 pDNA 以做為控制組。冰浴 30 分鐘，42 $^{\circ}$ C 熱休克 (heat shock) 60 秒 (<90 秒)。加入 300 μ l LB broth，37 $^{\circ}$ C、150 rpm 培養 1 小時。再取 80~100 μ l 菌液塗抹至含有 ampicillin 之 LB 的培養基上 (AMP: 50 μ g/ml)，37 $^{\circ}$ C 培養 12~16 小時。(以上均為無菌操作)

3.7 洋菜膠內之 DNA 萃取 (gel extraction)

3.7.1 結晶紫洋菜膠之製備

將 0.4 g agarose 粉末加入 50 ml 1 X TAE buffer 中，微波爐加熱溶解 agarose，稍冷後加入 40 μ l 結晶紫溶液 (2.5 mg/ml)，混合均勻，倒入製膠台中，冷卻凝固即可使用。

3.7.2 洋菜膠內之 DNA 片段萃取

將欲萃取之洋菜膠上的 DNA 片段以電泳方式分離，以刀片切下欲得到之 DNA 片段。將洋菜膠片段放置微量離心管中，以 Gel extraction kit (Premier DE250)，加入與片段等量之 binding buffer，60 $^{\circ}$ C 加熱板上加熱 10 分鐘，確定洋菜膠片段完全融化後，冷卻至室溫。將混合液移至 spin column，15,700 \times g、1 分鐘、去收集管內液體。加入 700 μ l washing buffer，15,700 \times g、1 分鐘、去收集管內液體。重覆加入 700 μ l washing buffer，15,700 \times g、1 分鐘、去收集管內液體之後，空轉 15,700 \times g、2 分鐘。將 spin column 移至新的微量離心管，60 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘，30 μ l 無菌二次水加入 spin column 正中央，等待 2 分鐘，15,700 \times g、1 分鐘離心後，即得欲萃取之 DNA，將之儲存於 -20 $^{\circ}$ C。

3.8 白色念珠菌轉形反應

3.8.1 白色念珠菌勝任細胞之製備

接種單一菌落至 5 ml YPD 培養液中、30 °C 培養 18~24 小時、150 rpm。取 5 µl 已培養之菌液轉養至 50 ml YPD 培養液 30 °C 16~24 小時、150 rpm 至 OD₆₀₀ 約 1.6~2.2。菌液分裝至 50 ml 離心管中，離心 1,620×g、5 分鐘，去上清液。加入 1 ml 1 M lithium acetate 及 1 ml 10 X TE 和 8 ml 無菌二次水。30 °C 培養 1 小時、150 rpm。再加入 250 µl 1 M DTT，30 °C 培養半小時、150 rpm。之後加入 40 ml 無菌二次水，離心 1,620×g、5 分鐘。以下開始冰上操作：加入 25 ml 預冷過之無菌二次水懸浮菌體，4 °C 低溫離心 1,620×g、5 分鐘，去上清液。再加入 5 ml 預冷過之 1 M sorbitol，4 °C 低溫離心 1,620×g、5 分鐘，去上清液。重複加入 5 ml 1 M sorbitol，4 °C 低溫離心 1,620×g、5 分鐘，去上清液。最後加入 50 µl 1 M sorbitol，靜置於冰上，即為白色念珠菌之勝任細胞。此勝任細胞無法儲存，故操作完後直接進行白色念珠菌之轉形反應。

3.8.2 電穿孔 (electroporation) (Köhler *et al.*, 1997)

取欲轉形之線狀 DNA 片段 (~1 µg) 和 40 µl 勝任細胞於 1.5 ml 微量離心管中，混合均勻置於冰上培養 5 分鐘。之後將反應物移至 0.2 cm cuvette 中，進行電穿孔反應 (1.8 kV, 6.1 ms)，反應後迅速將 cuvette 置於冰上，並加入 1 ml 預冷過之 1 M sorbitol，混合均勻後移至新的 1.5 ml 微量離心管。4 °C 低溫離心 800×g、5 分鐘，以 pipette 去上清液。加入 1 ml YPD 培養液後，30 °C 培養 1 小時、150 rpm。之後取 80~100 µl 菌液塗抹至篩選培養基上 (nourseothricin : 200 µg/ ml) (Werner Bioagents, Jena, Germany)，30 °C 培養兩天。

3.9 SAT1 flipper 之剔除 (pop-out)

將篩選後之較大顆的菌落於 YPD 培養基上再劃出單一菌落。接種單一菌落至 YP+Maltose 培養液中，30 °C 培養 3~7 天、150 rpm，即可剔除

SAT1 flipper。之後將一半菌液儲存於 4 °C，以便於五日內劃出 replica plating 所需之 master plate；另一半菌液用以萃取 genomic DNA (gDNA)，進行 PCR 確認。

3.10 複製平皿培養法 (replica plating)

將 master plate (YPD 培養基) 覆蓋於固定好之絨布上，輕壓培養基，將絨布沾上菌落之後，再以不含篩選之培養基 (YPD 培養基) 及含篩選之培養基 (Nou⁺ : 200 µg/ml) 依序覆蓋於絨布上。將 replica 後之培養基置於 30 °C 培養一天，再比對含篩選及不含篩選之培養基上的菌落。如在不含篩選之培養基上 (YPD 培養基) 有菌落生長，而在含篩選之培養基上對應同一位置沒有生長菌落，應為 *SAT1* flipper 被剔除出基因體中。

3.11 白色念珠菌染色體 DNA 之萃取

本實驗中使用了兩種方法萃取白色念珠菌之 gDNA，方法一為製備一般 PCR 所需之 template；方法二為製備南方點墨法中所使用之 gDNA 和 rescued *ENG1* PCR 中所需之 template，操作方法如下：

3.11.1 方法一：

接種單一菌落至 5 ml YPD 培養液中，30 °C 培養 18~24 小時、150 rpm。離心 1,125×g、12 分鐘，去上清液。加入 200 µl breaking buffer，混合均勻並移至 1.5 ml 微量離心管中。將離心管置於 -80 °C、2 分鐘，95 °C、1 分鐘；並重複 -80 °C、2 分鐘，95 °C、1 分鐘，vortex 震盪 30 秒，再加入 200 µl chloroform，vortex 震盪 2 分鐘至溶液變乳白色。將其離心 15,700×g、10 分鐘，取 200 µl 上清液至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 400 µl 99.9% 酒精及 25 µl 3 M NaOAc，手搖均勻。將其置於 -20 °C 沉降 10 分鐘到 2 小時。4 °C 低溫離心 15,700×g、5 分鐘，去上清液。再加入

500 μ l 70%酒精沖洗管壁沉澱物，4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、5 分鐘，以 pipette 去上清液。將微量離心管斜放靜置室溫下 20 分鐘，乾燥 pellet，再以 30 μ l 無菌二次水溶解 DNA，置於 4 $^{\circ}$ C 回溶 12~18 小時。DNA 儲存於 -20 $^{\circ}$ C。

3.11.2 方法二：

接種單一菌落至 5 ml YPD 培養液中，30 $^{\circ}$ C 培養 18~24 小時、150 rpm。離心 1,125 \times g、12 分鐘，去上清液。加入 1 ml 無菌二次水懸浮菌體並移至 1.5 ml 微量離心管中。離心 15,700 \times g、10 分鐘，去上清液。加入 300 μ l breaking buffer，vortex 震盪 5 分鐘。再加入 1/3 倍體積的玻璃珠，vortex 震盪 5 分鐘。加入 3 μ l (20 mg/ml) proteinase K、3 μ l (10 mg/ml) RNase A，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中 1 小時反應。之後再加入 300 μ l phenol，vortex 震盪 5 分鐘。加入 300 μ l 1 X TE，vortex 震盪 5 分鐘。離心 15,700 \times g、10 分鐘，小心取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入等量之 phenol，4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、5 分鐘；取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入等量之 phenol，4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、5 分鐘；取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 2 倍體積之 99.9%酒精和 1/8 倍體積的 NaOAC，置於 -20 $^{\circ}$ C 沉降 5~20 分鐘。4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、10 分鐘，去上清液。加入 1 ml 75%酒精沖洗管壁沉澱物，4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、10 分鐘，以 pipette 去上清液。將微量離心管斜放靜置室溫下 20 分鐘，乾燥 pellet，再以 50 μ l 無菌二次水溶解 DNA，置於 4 $^{\circ}$ C 回溶 12~18 小時。DNA 儲存於 -20 $^{\circ}$ C。

3.12 南方點墨法 (Southern blot)

3.12.1 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling)

以 PCR 方式合成 DNA 探針：於微量離心管中，加入 1 unit (U) 的 Taq

Polymerase (5 U/ μ l) (NEB M0267S)、template DNA (約 10~100 ng)、10 X PCR buffer 5 μ l、50 μ M 的引子各 1 μ l、2.5 mM dNTPs mixture 2 μ l、DIG (Roche 1277065) 2.5 μ l，補二次無菌水至總體積 50 μ l，置於 PCR 溫度控制儀進行聚合酶連鎖反應。以 DIG 標記欲合成之 DNA 片段，即為 DNA 探針，儲存於 -20 $^{\circ}$ C。探針於進行雜交反應前，先置於 95 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘後，迅速放置冰上 5 分鐘，即可進行雜交反應。

3.12.2 轉漬 DNA (DNA transfer)

將 *Candida albicans* 之 gDNA (10 μ g~15 μ g) 以酵素 *BsrG I* 於 37 $^{\circ}$ C 反應 3 小時後，進行 50 伏特、0.7% 洋菜膠電泳。將洋菜膠於現配之 EtBr (1 μ g/ml) 中染色 20 分鐘，即可於電泳影像處理系統中照相。將洋菜膠置於 50 ml Denaturation solution 中，平面震盪 50 rpm、15 分鐘。再以滅菌過之二次水沖洗洋菜膠，平面震盪 50 rpm、5 分鐘。以上兩步驟重複一次。再將洋菜膠置於 50 ml Neutralization solution 中，平面震盪 50 rpm、15 分鐘。再以滅菌過之二次水沖洗洋菜膠，平面震盪 50 rpm、5 分鐘。以上兩步驟重複一次。最後置於 10 X SSC 中，平面震盪 50 rpm、10 分鐘。將以下材料依序架起來：長型 Whatman 3MM 濾紙 (可吸附到 10 X SSC)、3 張與膠體同大之 Whatman 3MM 濾紙、洋菜膠、中空投影片、與膠體同大之耐龍膜 (nylon membrane)、3 張 Whatman 3MM 濾紙、5 公分平版衛生紙 (濾紙和耐龍膜先以 10 X SSC 完全浸泡過，時間勿太久)，以保鮮膜將裝置包覆起來以避免外物掉落，再於裝置最上層放置重物，利用毛細現象將膠體中之 DNA 轉漬到帶正電之耐龍膜上。經過 14 至 16 小時後，將耐龍膜取出，於雜交連結器中，利用 UV 光 (254nm) 做 cross-link，將 DNA 固定於耐龍膜上，固定步驟重複兩次。將耐龍膜靜置於室溫下至完全乾燥。

3.12.3 雜交反應 (hybridization)

將乾燥之耐龍膜置於 12 ml prehybridization buffer (Roche 11603558 001) 中，42 °C、平面震盪 50 rpm、3 小時。再將耐龍膜移置 12 ml 含有標記探針 hybridization buffer 中 (探針濃度：50 ng/ml)，42 °C、平面震盪 50 rpm、12~24 小時。

3.12.4 免疫偵測 (detection)

將耐龍膜移置 50 ml 的 2 X washing buffer 中，室溫下平面震盪 50 rpm、20 分鐘。此步驟重複一次。再將耐龍膜於 50 ml 0.5 X washing buffer 中，60 °C 下平面震盪 50 rpm、20 分鐘。之後移置新的 50 ml 0.5 X washing buffer 中，室溫下平面震盪 50 rpm、20 分鐘。此步驟重複一次。耐龍膜移置於 25 ml 的 1 X blocking buffer 室溫下平面震盪 50 rpm、30 分鐘。再加入 2.5 µl Anti-DIG-AP (Roche 1093274) 形成 antibody buffer，平面震盪 50 rpm、30 分鐘。之後再以 30 ml washing buffer 清洗耐龍膜，平面震盪 50 rpm、15 分鐘。此步驟重複一次。再以 30 ml detection buffer 平面震盪耐龍膜 5 分鐘，將耐龍膜置於投影片夾層中，以含有 10 µl CSPD (Roche 1655884) 之 1 ml detection buffer 均勻潤濕耐龍膜，於 37 °C 避光靜置 20 分鐘。之後於暗房中以 X 光底片進行壓片，1 小時後進行底片沖洗動作 (develop buffer 中搖晃至底片有顯影，再將底片置於 fixer 中完全浸潤，之後以清水沖洗一下即可)。

3.13 RNA 萃取 (RNA extraction)

接種單一菌落至 5 ml YPD 中，30 °C 培養 18~24 小時、150 rpm。隔日取 1.5 ml 菌液轉養至 36 ml 新鮮之 YPD 中，30 °C 培養至指數生長期 (mid-log phase)。將培養好之菌液分裝至 50 ml 離心管中，4 °C 低溫離心 1,620×g、5 分鐘，去上清液。加入 2 ml DEPC-treated H₂O 懸浮菌體。將之移至 15 ml 離心管中，4 °C 低溫離心 1,620×g、10 分鐘，去上清液。加

入 300 μ l RIB (RNA isolation buffer) 懸浮菌體、加入 1/3 倍體積的玻璃珠 (Sigma G9268-500G)，低溫震盪 5 分鐘、再加入 300 μ l phenol，低溫震盪 5 分鐘、重複加入 1/3 倍體積的玻璃珠，低溫震盪 5 分鐘、加入 500 μ l RIB，低溫震盪 5 分鐘。4 $^{\circ}$ C 低溫離心 1,620 \times g、10 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 離心管 (DEPC-treated)，再 4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、5 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 離心管。加入等量之 phenol，震盪 30 秒。4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、10 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 離心管。加入等量之 phenol，震盪 30 秒。4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、10 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 離心管。加入 1/8 倍體積之 2.5 M NaOAc 及 2.5 倍體積之 99.9% 冰乙醇，置於冰上 30 分鐘 (或置 -20 $^{\circ}$ C 沉降 30~90 分鐘)。4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、10 分鐘，以 pipet 去上清液。加入 1 ml 75% 冰乙醇清洗沉澱物，4 $^{\circ}$ C 低溫離心 15,700 \times g、10 分鐘，以 pipet 去上清液。將 1.5 ml 微量離心管斜放於室溫下至微乾狀態，再以 50 μ l DEPC-treated H₂O 回溶 RNA。RNA 儲存於 -80 $^{\circ}$ C。

3.14 RNA 電泳

3.14.1 RNA 電泳前處理

將 8~12 μ g RNA、3.5 μ l 10 X MOPS、5 μ l 37% formaldehyde、10 μ l formamide、3 μ l RNA dye 以及 1 μ l 10 mg/liter EtBr 置於 1.5 ml 微量離心管中，混合均勻。於 65 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘後迅速置於冰上 5 分鐘。

3.14.2 RNA 電泳

首先配製 1% 洋菜膠：0.5 g agarose 於 36 ml DEPC-treated H₂O 中微波加熱溶解，稍冷後加入 5 ml 10 X MOPS、9 ml 36.5% formaldehyde 混合均勻倒入製膠台中。將處理過之 RNA 樣品注入至膠體之孔洞中，以 1 X MOPS 為電泳緩衝液，50 伏特電壓進行 RNA 電泳。電泳結束後，於電

泳影像處理系統照相。

3.15 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

使用 SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platimun *Taq* (invitrogen 10928-042) 來進行 RT-PCR：25 μ l 2 X Reaction Mix、1 μ g RNA、10 μ M sense primer (FN-F) 1 μ l、10 μ M anti-sense primer (FN-R) 1 μ l、RT/Platunum *Taq* Mix 0.75 μ l，補二次無菌水至 50 μ l，再置於 PCR 溫度控制儀進行反應。預計得到 *CaENG1* 片段大小為 421 bp。
PCR 溫度控制儀的設定如下：

RT-PCR	
42~55 °C	15~30 分鐘
94 °C	2 分鐘
94 °C	15 秒
55~60 °C	30 秒
72 °C	1 分鐘/kb (重複 26 個循環)
72 °C	5~10 分鐘
4 °C	停止反應

Internal control 為 *CaACT1*，以 primer ACT1-F 及 ACT1-R 合成出 471bp 之片段。

RT-PCR 反應完成後以 0.8% 洋菜膠電泳確認 RT-PCR 產物片段。

3.16 突變株之性狀分析 (characterization)

3.16.1 生長曲線之測定 (growth curve)

接種單一菌落至 5 ml YPD 中，30 °C 培養一天。取適量過夜培養細胞轉

養至新鮮 5 ml YPD 中，混合均勻使菌液此時 OD₆₀₀ 吸光值為 0.2。而後將菌液置於 30 °C 培養箱震盪培養 (150 rpm)。每隔兩小時取出 100 μl 之菌液稀釋十倍，測量其 OD₆₀₀ 吸光值，連續紀錄觀察至 24 小時。

3.16.2 芽管試驗 (germ tube assay)

將單一菌落接種至含 10% 山羊血清之 YPD 培養液中，於 37 °C 培養五小時後，於倒立式顯微鏡下觀察是否有芽管生成。

3.16.3 誘發菌絲生長觀察型態變化

將單一菌落接種至含適量山羊血清之培養基中，於 37 °C 下培養誘發其菌絲生長，觀察突變株之型態變化及其和野生株型態之比較：

含有 4% 山羊血清之 Bacto agar 培養基 (Staab *et al.*, 2003)

將單一菌落接種至含有 4% 山羊血清之 Bacto agar 培養基，於 37 °C 中培養七天後，置於倒立式顯微鏡下觀察其菌絲誘發之情形。

含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基

將單一菌落接種至含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基，於 37 °C 中培養三天後，觀察菌落之型態變化。

3.16.4 侵犯力試驗 (invasion assay) (Navarro-Garcia *et al.*, 1998)

將單一菌落接種至 solid Spider 培養基，於 37 °C 中培養七天後，以固定水流量沖洗培養基，觀察是否有菌絲侵入培養基中，進而有菌落殘留之現象。

3.17 細胞分裂之觀察

接種單一菌落至 5 ml YPD 中，30 °C 培養一天。取過夜培養細胞 400 μl 轉養至新鮮 10 ml YPD 中，30 °C 震盪培養 (150 rpm) 三小時至 mid-log phase (OD₆₀₀ 吸光值為 0.4~0.6)。取 315 μl 菌液至 1.5 ml 微量離心管，加入 50 μl 之 36.5% formaldehyde。離心 9,300×g、10 分鐘，去上清液。

以 100 μ l 1 X PBS 沖洗沉澱物，離心 9,300 \times g、10 分鐘，去上清液。1 X PBS 沖洗沉澱物重覆一次後，離心後去上清液，再以 500 μ l 1 X PBS 回溶細胞。取 5 μ l 回溶之細胞於覆蓋 poly-lysine 之載玻片上，靜置 20 分鐘後，以 100 μ l 1 X PBS 清洗兩次，於 50 $^{\circ}$ C 烘箱烘乾玻片。之後以 20 μ l 之 1 mg/ml Calcofluor white (Fluka F3397) (355~433 nm) 染色五分鐘後，以 100 μ l 1 X PBS 清洗五次，於 50 $^{\circ}$ C 烘箱烘乾玻片。再加入 20 μ l 之 10% potassium hydroxide，靜置一分鐘後，以 100 μ l 1 X PBS 清洗，於 50 $^{\circ}$ C 烘箱烘乾玻片。加入 15 μ l 甘油後，以蓋玻片封片。避光靜置一天即可以雷射掃描式共軛焦顯微鏡 (Laser Scanning Confocal Microscope) 觀察細胞分裂之情形。

3.18 化學藥品感受性測試

接種單一菌落至 5 ml YPD 中，30 $^{\circ}$ C 培養一天。隔日取適量菌液至 10 ml YPD 中，使之 OD₆₀₀ 吸光值為 0.2 (OD₆₀₀ 吸光值 0.2 之細胞數約 2×10^6 /ml)。將 10 ml 菌液以 1,620 \times g 離心 10 分鐘，去上清液。以無菌二次水清洗菌體後，離心後去上清液。加 1 ml 1 X PBS 回溶菌體，並以此依序稀釋十倍、百倍及千倍。將此四種不同濃度菌液各取 5 μ l 至 YPD 培養基，30 $^{\circ}$ C 培養一天。將培養好之 master plate 經複製平皿培養法複製至含不同化學藥品之 YPD 培養基上，30 $^{\circ}$ C 培養一至兩天，觀察菌落生長之情形：42 $^{\circ}$ C (Nakagawa *et al.*, 2003b)、1 M sorbitol (Heinisch *et al.*, 1999)；pH 10；2 mM hydroxyurea (Srikantha *et al.*, 2006)；1 M、1.5 M NaCl (Chauhan *et al.*, 2003)；2 M、2.5 M、3 M sorbitol (Nikolaou *et al.*, 2009)；5 mM H₂O₂ (Chauhan *et al.*, 2003)；50 mM、100 mM DTT (dithiothreitol) (Islam *et al.*, 1999)；0.02%、0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) (Nakagawa *et al.*, 2003b)；0.15% Triton X-100 (Thimmaraju *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*,

2003b) ; 0.2% Tween 20 (Thimmaraju *et al.*, 2003) ; 50 µg/ml 、 100 µg/ml Calcofluor white (Zhao *et al.*, 2007) ; 100 µg/ml 、 200 µg/ml Congo red (Zhao *et al.*, 2007)

3.19 類接合型之基因型分析 (mating type like, MTL) (Janbon *et al.*, 1998)

接種單一菌落至 YPD 培養基，30 °C 培養一天。將新鮮之單一菌落轉養至 YEPS 培養基，37 °C 培養七天。再將培養七天之單一菌落轉養至新 YEPS 培養基，37 °C 培養兩天。經 37 °C 培養兩天之單一菌落將其轉養至 5 ml YPD 中，30 °C 培養三天後萃取染色體 DNA，以 PCR 方式初步確認 *MTLa1* (487 bp : HJL00134、HJL00135) 以及 *MTL α1* (516 bp : HJL00136、HJL00137)，再以南方點墨法進一步確認其基因型。



四、結果

4.1 建構 *CaENGI* 突變株之流程

以 *SAT1* flipper 作為剔除 *CaENGI* 之篩選標記，觀察於 *C. albicans* 中，缺少 *CaENGI* 此基因所造成之影響。

如圖一<A>所示，將 *CaENGI* 上游 602 bp 片段（以下稱之 A region）及下游 362 bp 片段（以下稱之 B region）分別以限制酶 *Kpn* I、*Xho* I 和 *Not* I、*Sac* II 作用後建構至帶有 *SAT1* flipper 之質體 pSFS2 上 (Reuss *et al.*, 2004)，形成質體 pSAT1-BA。將 pSAT1-BA 以限制酶 *Kpn* I 及 *Sac* II 作用後，經白色念珠菌轉形反應 (*C. albicans* transformation) 送入白色念珠菌，進行同源重組置換 (homologous recombination)，剔除單套之 *CaENGI*，並以藥物 nourseothricin (200 µg/ml) 於 YPD 培養基篩選，形成 *CaENGI* 突變株 (*CaENGI/Caeng1::SAT1*)，如圖一所示。

以 PCR 做初步確認之突變株經由 2% maltose 培養液進行 *SAT1* flipper 之 pop-out，之後再由複製平皿培養法 (replica plating) 篩選 *SAT1* flipper 被 pop-out 之菌株，最後以 PCR 做重複檢驗。所得單套 *CaENGI* 剔除之突變株 (heterozygous knock-out strain) (*CaENGI/Caeng1::FRT*)，命名為 EHK1，為圖一<C>所示。重複將質體 pSAT1-BA 經限制酶 *Kpn* I 及 *Sac* II 作用後送入 *CaENGI* heterozygous strain，剔除另一單套 *CaENGI* 並重複上述檢驗流程後，得到雙套 *Caeng1* 剔除之突變株 (homozygous knock-out strain) (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)，命名為 EKG7、EKP2，如圖一<D>所示。圖一<E>為建構 *CaENGI* 補償 (rescue) 之突變株。以 PCR 方式合成 *CaENGI* 上游 A region 至下游 B region 之 DNA 片段 (約 4.4 kb)。將此 DNA 片段以限制酶 *Kpn* I、*Xho* I 作用後接合至質體 pSAT1-B 上，經定序確認 *ENGI* 序列而得質體 pRes 20。以 *Kpn* I 及 *Sac* II 作用 pRes 20 後，

送入 *Caeng1* homozygous knock-out 突變株，經同源重組置換得到 *CaENG1* rescued 突變株，命名為 EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*)。

4.2 建構 *CaENG1* 單套、雙套基因剔除之突變株 (heterozygous knock-out strain、homozygous knock-out strain)

4.2.1 建構含篩選標記及 *CaENG1* 上下游同源區域之質體

利用PCR方式，依方法 3.2.1，以引子ENG1B-F及ENG1B-R得到*CaENG1* 下游約 362 bp DNA片段，稱之B region，引子兩端各帶有限制酶*Not I*、*Sac II*之切位。以限制酶*Not I*、*Sac II*分別作用PCR產物B region及帶有*SAT1 flipper*之質體pSFS2 (Reuss *et al.*, 2004) 後，進行接合反應 (ligation)，所得之產物以方法 3.6 進行轉形選殖，經由限制酶確認後而得質體pSAT1-B。同樣再以PCR方式，引子 ENG1A-F及ENG1A-R得到 *CaENG1* 上游約 602 bp之DNA片段，稱之A region，引子兩端各帶有限制酶*Kpn I*、*Xho I*之切位。將PCR產物A region和質體pSAT1-B分別以限制酶*Kpn I*、*Xho I*作用後，進行接合反應，經過轉形選殖後得到帶有A、B region之質體。如圖二<A>所示，以限制酶*BsrG I*、*BstX I*作用，所得片段大小預計約為 7.2 kb及 815 bp，Lane 1、3、5 符合預期。將初步符合預期之選植株再以限制酶*BspE I*、*Not I*做雙重確認，預計所得片段大小約為 4.3 及 3.7 kb，如圖二。符合雙重確認之質體即命名為pSAT1-BA。質體SAT1-BA以限制酶*Kpn I*、*Sac II*作用後，經clean-up純化DNA並去除酵素及鹽類，則可將DNA片段進行白色念珠菌轉形作用 (*C. albicans* transformation)。

4.2.2 確認 *CaENG1* 單套基因之剔除 (heterozygous knock-out)

將上述處理過pSAT1-BA之片段經由電穿孔於野生株SC5314 進行白色念珠菌轉形 (Köhler *et al.*, 1997)，初步以藥物nourseothricin篩選帶有*SAT1*

flipper之菌株，約可得到 400 顆以上之菌落。再挑選其中較大顆菌落，給予 maltose 培養，使其進行 *SAT1* flipper pop-out，並萃取 gDNA 以 PCR 確認。如圖三<A>，設計引子 pENG1A-F 和 ENG1B-R 以確認 *CaENG1* 剔除之 allele，設計 forward primer 於 *CaENG1* 上游是為確保同源重組置換發生於白色念珠菌之 genome 正確的位置上。此外以引子 ENG1-3650-F 和 ENG1B-R 確認 *CaENG1* wild type 之 allele；而 non-popout 之菌株以引子 pENG1A-F 和 SAT1-860-R 確認。圖三為 *CaENG1* 單套基因剔除之 PCR 結果，預計 PCR 產物片段大小約為 1.1 kb。Lane 1、2、5、6、10 符合預期，上述初步確認之菌株再進行 replica plating。圖三<C>為另一條 *CaENG1* wild type allele 之 PCR 結果，預計片段大小約為 1 kb。而圖三<D>為 *SAT1* flipper 之 PCR 結果，除了表示圖三中無 PCR 產物之菌株 (Lane 4、7) 為 *SAT1* flipper non-popout 外，也可證明 *SAT1* flipper 曾經進入白色念珠菌之 genome 中，進而被 pop-out 出 genome。圖四<A>表將 PCR 初步確認之 heterozygous knock-out strain，再以 replica plating 驗證，挑選 replica 後於 YPD 培養基上有生長，相對位置之 YPD/Nou⁺ 培養基上無生長之菌落，再次以 PCR 做雙重確認，如圖四所示。

4.2.3 確認 *Caeng1* 雙套基因之剔除 (homozygous knock-out)

將前述處理過 pSAT1-BA 之片段經由電穿孔送入 *CaENG1* heterozygous knock-out strain 進行白色念珠菌轉形。初步以藥物 nourseothricin 篩選帶有 *SAT1* flipper 之菌株，依然約可得到 400 顆以上之菌落。挑選其中較大顆菌落，給予 maltose 培養，使其進行 *SAT1* flipper pop-out，並萃取 gDNA 以 PCR 確認。因第二次送入 pSAT1-BA 之 DNA 片段進行同源重組置換，其正確置換於第二條 *CaENG1* wild type allele 的機率較低，故先以引子 ENG1-3650-F 和 ENG1B-R 確認 *CaENG1*，如有得到約 1 kb 片段大小，則表示無剔除 *CaENG1* 雙套基因，如圖五所示。將 PCR 確認沒有

CaENG1 之菌株再以引子 pENG1A-F 和 ENG1B-R 檢驗，得到預期片段大小 1.1 kb，證明剔除 *CaENG1*，如圖五<C>所示。此後再進行 replica plating，如圖六<A>，挑選 replica 後於 YPD 培養基上有生長，相對位置之 YPD/Nou⁺ 培養基上無生長之菌落，再次以引子 pENG1A-F 和 ENG1B-R 做 PCR 雙重確認，如圖六所示。

4.3 建構 *CaENG1* 補償之突變株 (*CaENG1* rescued strain)

4.3.1 建構含 *CaENG1* open reading frame (ORF) 之質體

如圖七<A>，利用 PCR 方式，依方法 3.2.2，以引子 ResA-F 及 ResB-R 進行 PCR 合成出包含 *CaENG1* 上游 A region、*CaENG1* ORF 至下游 B region 約 4.4 kb 大小的 DNA 片段，以 0.8% 洋菜膠電泳確認 PCR 產物大小。引子兩端各帶有限制酶 *Kpn* I、*Xho* I 之切位，將此 PCR 產物和質體 pSAT1-B 分別以限制酶 *Kpn* I、*Xho* I 作用後，進行接合反應 (此設計為 rescued allele 將比 wild type allele 多一 362 bp 的 B region 片段，可以用來區隔彼此間之差異)，經過轉形選殖後，萃取其質體 DNA 做進一步限制酶確認。圖七，以限制酶 *Bsr*G I、*Bst*X I 作用於上述之質體 DNA，所得預期片段大小約為 7.2 kb、2.5 kb、2.2 kb。如圖七<C>，將初步符合限制酶檢驗結果之質體再以限制酶 *Hind* III 作用，預期片段大小約為 6.8 kb、3.2 kb、1.9 kb。確認無誤之質體再進行 *CaENG1* 序列分析。

4.3.2 *CaENG1* open reading frame (ORF) 序列分析

以 PCR 合成 *CaENG1* 之 ORF 作補償之功能，故需以定序方式確認合成之 *CaENG1* 的序列無誤。如圖八<A>，設計引子 DSR1、DSR2、DS3~7 以進行定序分析。圖八為定序結果，以 *Candida* Genome Database (CGD) 上之序列 *ENG1* (orf19.3066) 作為比對之樣本。比對結果至核苷酸 2796 (nucleotide, nt) 皆無誤，而在 nt 2797 位置有 C→T 之突變，nt 2863

位置有 T→C 之突變 (C, cytosin 胞嘧啶、T, thymine 胸嘧啶)，而其轉譯出之胺基酸仍不變，分別為麩胺酸 (Asp) 及甘胺酸 (Gly)。合成的 *CaENG1* 序列轉譯出之胺基酸不改變，故其存在正常蛋白質功能。將此以限制酶檢驗、定序確認之質體命名為 pRes 20。

4.3.3 確認 *CaENG1* 補償之突變株 (rescued strain)

將質體 pRes 20 以限制酶 *Kpn* I、*Sac* II 作用後，經 clean-up 去除酵素及鹽類，將片段 DNA 進行白色念珠菌轉形作用送入 *Caeng1* 雙套剔除之突變株。初步以藥物 nourseothricin 篩選帶有 *SAT1* flipper 之菌株，再挑選其中較大顆菌落，給予 maltose 培養，使其進行 *SAT1* flipper pop-out，並萃取 gDNA 以 PCR 確認。如圖九<A>，以引子 ENG1-3650-F 及 ENG1OB-R 進行 PCR，得到預期片段大小約為 1.7 kb。如果是 *CaENG1* wild type 之 allele，將會得到片段約 1.3 kb (因 rescued allele 多一 B region)、*Caeng1* 剔除之 allele 則不會得到 PCR 產物，將圖九<A>之 DNA 電泳圖中符合預期 PCR 結果之 strain 再進行 replica plating。圖九，挑選 replica 後於 YPD 培養基上有生長，相對位置之 YPD/Nou⁺ 培養基上無生長之菌落，再次以引子 ENG1-3650-F 及 ENG1OB-R 做 PCR 雙重檢驗，如圖九<C>所示。

4.4 南方點墨法檢驗 *CaENG1* 各突變株 (Southern blot)

依方法 3.11.2 萃取各突變株之 gDNA，再依 3.12 進行南方點墨法分析。以 A region 作為 probe，限制酶 *Bsr*G I 作用於 gDNA，經雜交、免疫偵測後，如圖十，預計 *CaENG1* wild type allele 片段偵測到約 7.6 kb、*CaENG1* rescued allele 片段約 8 kb、*Caeng1* knock-out allele 片段約 4.2 kb。結果顯示 SC5314 (wild type) 有符合預期片段大小 7.6 kb；EHK1 (*CaENG1*/*Caeng1*::FRT) 則有符合片段 7.6 kb 及 4.2 kb；EKG7 和 EKP2 均為 *Caeng1*

homozygous knock-out strain (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)，符合預期片段 4.2 kb；EGR 為 *CaENG1* rescued strain (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*)，符合預期片段 8 kb 和 4.2 kb。

4.5 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 檢驗 *CaENG1* 各突變株

依方法 3.13、3.14 萃取各突變株之 RNA 並以 0.8% 洋菜膠電泳確認 RNA 品質。再依方法 3.15 進行反轉錄聚合酶連鎖反應，檢驗各突變株之 *CaENG1* 基因有無表現。

CaENG1 的 mRNA 大小約為 3438 bp，如圖十一，設計引子 FN-F、FN-R，合成出約 421 bp 之片段；internal control 為 *CaACT1*，以引子 ACT1-F、ACT1-R 得到約 471 bp 之 RT-PCR 產物。如圖所示，SC5314 (wild type) 為對照組，有預期 421 bp 之片段大小；EHK1 (*CaENG1/Caeng1::FRT*) 也有 *CaENG1* 基因表現之結果；而 *Caeng1* 雙套突變株 EKG7 及 EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 之 mRNA 則無 *CaENG1* 基因之表現；而 EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*) 也有得到預期片段大小 421 bp。此結果與預期 *CaENG1* 剔除 (knock-out) 及補償 (rescue) 之突變株的建構相符合。

4.6 *CaENG1* 各突變株之性狀分析

4.6.1 *CaENG1* 各突變株之生長曲線 (growth curve)

將 *CaENG1* 各突變株與對照組野生株 SC5314、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*) 及 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 比較其生長曲線之差異。圖十二為比較各菌株於 YPD 培養液中轉養 0~24 小時之生長曲線圖，圖十二<A>為各菌株之生長曲線，其中突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 及 HLC52 (*efg1/efg1*) 之生長較野生株 SC5314 緩慢，而結果顯

示 *CaENGL1* 各突變株與野生株 SC5314 之生長成同趨勢，但 EKG7 和 EKP2 於培養 16 小時後細胞數和野生株 SC5314 及 *cph1* 突變株 JKC19 相比有較少的現象 (OD_{600} 為 0.55、0.532、0.603、0.627)，不過於培養 18 小時後，*Caengl1* 突變株 EKG7 細胞數趨向野生株 SC5314，而 *Caengl1* 突變株 EKP2 至培養 24 小時後細胞數仍少於野生株 SC5314 (OD_{600} 為 0.628、0.68)，但是彼此間的差異性不大。圖十二為取各菌株 OD_{600} 吸光值之對數而成的生長曲線，各菌株於生長八小時後開始趨緩，而長時間培養後也可達到相似之對數值。以培養 4 小時至 6 小時之吸光值計算對照組與 *CaENGL1* 各突變株的細胞倍增時間 (doubling time)：野生株 SC5314 的倍增時間為 1.98 小時，突變株 HLC54 的倍增時間為 2.32 小時，而 *CaENGL1* heterozygous knock-out 突變株 EHK1 的倍增時間為 2.37 小時，*Caengl1* homozygous knock-out 突變株 EKG7 和 EKP2 的倍增時間各為 1.98 小時和 2.24 小時，*CaENGL1* rescued 突變株 EGR 之倍增時間為 2.18 小時，各菌株之倍增時間差異皆小於 0.4 小時。

4.6.2 芽管試驗之結果 (germ tube assay)

以野生株 SC5314、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*) 和 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作為正負對照組，比較 *CaENGL1* 各突變株於 YPD 培養液加 10% 山羊血清、37 °C 培養五小時下芽管生成之情形。以倒立式顯微鏡放大四百倍觀察，如圖十三，野生株 SC5314 於誘發培養條件下，有芽管生成之情形，*cph1* 突變株 JKC19 與 SC5314 一樣有芽管生成，而 *efg1* 突變株 HLC52 和雙突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 則無芽管生成；結果顯示 *CaENGL1* 各突變株 EHK1 (*CaENGL1/Caengl1::FRT*)、EKG7 (*Caengl1::FRT/Caengl1::FRT*)、EKP2 (*Caengl1::FRT/Caengl1::FRT*) 和 EGR (*Caengl1::FRT/CaENGL1::FRT*) 有生成芽管之能力，由此可知剔除 *CaENGL1* 並不影響白色念珠菌芽管生成之能力。

4.6.3 菌落型態變化之結果

將單一菌落接種至含適量山羊血清之培養基中，於 37 °C 下培養誘發其菌絲生長，觀察突變株之型態變化及其和野生株型態之比較。

4.6.3.1 含 4% 山羊血清之 Bacto agar 培養基上之生長

將單一菌落培養至含 4% 山羊血清之 Bacto agar 培養基、37 °C 培養七天後觀察菌落型態的變化。以倒立式顯微鏡放大一百倍觀察單一菌落，如圖十四，野生株 SC5314、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*) 和 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作為正負對照組，以血清和 37 °C 培養誘發菌絲的生長，在營養缺乏之 Bacto agar 培養下，SC5314 和 JKC19 有菌絲生長的情形，菌絲呈不規則放射狀；而 HLC52 和雙突變株 HLC54 則無菌絲生長，呈酵母菌型態。而 *CaENGI* 各突變株 EHK1 (*CaENGI/Caengl::FRT*)、EKG7 (*Caengl::FRT/Caengl::FRT*)、EKP2 (*Caengl::FRT/Caengl::FRT*) 和 EGR (*Caengl::FRT/CaENGI::FRT*) 也觀察到菌絲生長的情形，型態變化和對照組野生株 SC5314 和 JKC19 相似。

4.6.3.2 含 4% 山羊血清之 YPD 培養基上之生長

將單一菌落培養至含 4% 山羊血清之 YPD 培養基、37 °C 培養三天後觀察菌落型態的變化。如圖十五所示，野生株 SC5314、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*) 和 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 作為正負對照組，以血清和 37 °C 培養誘發菌絲的生長，在營養充足之 YPD 培養下，野生株 SC5314 單一菌落表面呈現不規則皺摺，菌落外圍亦不平整，而 *cph1* 突變株 JKC19 也有菌落表面皺摺之情形；而 *efg1* 突變株 HLC52 和雙突變株 HLC54 之菌落表面則無皺摺，呈現光滑的酵母菌型態。而 *CaENGI* 各突變株 EHK1 (*CaENGI/Caengl::FRT*)、EKG7 (*Caengl::FRT/Caengl::FRT*)、EKP2 (*Caengl::FRT/Caengl::FRT*) 和 EGR (*Caengl::FRT/CaENGI::FRT*) 單一菌落之型態和野生株 SC5314 相似，皆為菌落表面有

明顯不規則皺摺之情形。

4.6.4 侵犯力試驗之結果 (invasion assay)

將單一菌落培養至 solid Spider 培養基、37 °C 培養七天，誘發菌絲之生長，進而增加菌落於培養基的附著力，再以固定水流沖洗培養基，觀察菌落殘留之情形。如圖十六，野生株 SC5314、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*) 和 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 為對照組，以無菌絲生長能力之雙突變株 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 被固定水流完全沖洗掉之時間作為基準，野生株 SC5314 於固定水流、固定時間下並無沖洗掉之情形；*cph1* 突變株 JKC19 被沖洗後，則有部分菌落表面可被沖刷掉，但菌落不會被沖洗掉；*efg1* 突變株 HLC52 之菌落則幾乎完全被沖刷掉。而比較 *CaENG1* 各突變株 EHK1 (*CaENG1/Caeng1::FRT*)、EKG7 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 和 EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*)，其菌落皆無被沖洗掉，菌落表面也不會被沖刷掉，生成菌絲之能力和野生株 SC5314 相似。

4.7 營養素 uridine 影響營養基因缺陷野生株 BWP17 之結果

使用抗藥性篩選標記 *SAT1* flipper 所建構的 *Caeng1* (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 突變株在目前所測試的性狀試驗中，和野生株 SC5314 並無明顯不同。此結果和前人 (交大碩士論文 謝志豪, 2006) 以營養篩選標記建構之 *Caeng1* 突變株有些許出入。由於在含 4% 山羊血清的 YPD 培養基中，以 *SAT1* flipper 在野生株 SC5314 剔除 *CaENG1* 之突變株 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 會被血清及 37 °C 誘發生長菌絲，故於單一菌落表面有皺摺產生；而以營養篩選標記於營養基因缺陷之野生株 BWP17 (*arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3*) 中剔除 *CaENG1* 的突變株，如圖十七<A>所示，不額外給予其它營養素之情況下，突變株 BAU2

(*Caeng1::ARG4/Caeng1::URA3*) 在含 4% 山羊血清的 YPD 培養基中，生長之單一菌落表面也有皺摺產生，但突變株 BAH1-1 (*Caeng1::ARG4/Caeng1::HIS1*) 在給予營養素 uridine 後，生長的單一菌落表面有皺摺及光滑兩種情形，而不給予 uridine 培養下，單一菌落表面則皆為光滑。由於圖十七<A>中，比較 uridine 給予與否對各突變株之影響的實驗中所選用的野生株為 SC5314，而不是營養基因缺陷之野生株 BWP17，故先由補全 uridine 對 BWP17 之影響的實驗著手。

如圖十七，接種野生株 BWP17 (*arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3*) 於含 4% 山羊血清的 YPD 培養基，分別添加 uridine 及不添加 uridine，37 °C 培養三天後，在添加 uridine 所生長之單一菌落表面有光滑、皺摺及介於中間型，而不添加 uridine 所生長的單一菌落表面則皆為光滑。此結果可解釋前人所建構之突變株 BAH1-1 (*Caeng1::ARG4/Caeng1::HIS1*) 於給予 uridine 與否而造成生長型態不同之單一菌落。因此造成 BAH1-1 在含 4% 山羊血清的 YPD 培養基中形成皺摺和光滑表面兩種不同型態的單一菌落，極有可能為野生株 BWP17 之影響，而非 *CaENG1* 缺陷所造成。

4.8 細胞分裂觀察之結果

依方法 3.17 將細胞培養至 mid-log phase，以 5% formaldehyde 固定細胞後，1 mg/ml Calcofluor white stain (Fluka F339) 染色細胞壁中之 chitin，以雷射掃描式共軛焦顯微鏡 (Laser Scanning Confocal Microscope) 放大一千倍觀察細胞分裂之情形。如圖十八所示，白色箭頭標示為 septum 之位置，septum 是細胞分裂中，母細胞 (mother cell) 和子細胞 (daughter cell) 之間的分隔構造，其富含細胞壁成分 chitin，故可清楚地以染劑 Calcofluor white stain 辨識。野生株 SC5314 之細胞呈橢圓形，其細胞分裂之 septum 可明顯辨別，以單顆細胞或分裂中之 2~3 顆細胞為主要細

胞分布情形；JKC19 (*cph1/cph1*) 和 HLC52 (*efg1/efg1*) 細胞型態和野生株 SC5314 相似，為橢圓形，且同樣為單顆細胞或分裂中之 2~3 顆細胞分布。HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 細胞則為細長型，呈現單顆或兩顆細胞分裂的型態。EHK1 (*CaENG1/Caeng1::FRT*) 和 EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*) 細胞和野生株 SC5315 細胞型態相似，細胞分布為單顆及 2~3 顆細胞。EKG7 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 和 EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 則有觀察到少數 4~5 顆細胞分裂不完全的現象，但此一現象僅觀察到極少數，大部分細胞型態為單顆細胞或分裂中 2~3 顆細胞的分布，因此需對是否可以代表性狀上的差異存疑。

4.9 *CaENG1* 各突變株於化學藥品感受性試驗之結果 (chemical susceptibility test)

依方法 3.18 將各菌株培養至細胞總數 2×10^7 ，再將菌體離心後以 1 X PBS 回溶，依序十倍、百倍、千倍稀釋，各取 0.5 μ l 至 YPD 培養基，30 $^{\circ}$ C 培養一天，如此培養基上各菌株之細胞數依序為 10^4 、 10^3 、 10^2 及 10。將培養好之 master plate 經複製平皿培養法複製至含不同化學藥品之 YPD 培養基上，30 $^{\circ}$ C 培養一至兩天，觀察菌落生長之情形。培養於各種不同化學品配製成的培養基，*CaENG1* 各突變株之細胞和野生株 SC5314 之細胞生長情形並沒有太大的差別。如圖十九，在熱感受實驗中，將細胞培養於 42 $^{\circ}$ C 一天，野生株 SC5314 之細胞和 *CaENG1* 各突變株之細胞生長完好，並無顯著差異；強鹼環境培養下 (pH 10)，EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 和 EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*) 分別在細胞數 10 有生長較少之趨勢，但與野生株 SC5314 之細胞相比並無太大區別；於 1.5 M NaCl 之 YPD 培養基，各菌株在細胞數 10^2 、10 之生長明顯趨緩，推測和鹽濃度造成滲透壓改變相關；於 0.1% SDS 培養基上，各菌株有生長較

少之趨勢，但相比則無明顯差別；在含 200 µg/ml 細胞壁染劑 Congo red 之培養基上，各菌株之細胞數也成相同生長趨勢，細胞壁染劑並無對缺少細胞壁相關基因 *CaENGI* 之突變株造成影響。而以其他化學藥品製成之培養基，如 Tween 20、sortibitol、DTT、hydroxyurea、H₂O₂、Calcofluor white stain (CFW)，也無造成 *CaENGI* 各突變株和野生株 SC5314 生長之不同。

4.10 確認 *Caeng1* 類接合型 (mating type like) 突變株

依照方法 3.19 培養野生株 SC5314 及 *Caeng1* 突變株 EKP2

(*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 於 YEPS 培養基，由於培養基中山梨糖 (sorbitol) 成分有一定的機率會使 *C. albicans* 在生長過程中缺失一條五號染色體 (chromosome 5) (Janbon *et al.*, 1998)，兩條五號染色體各含 mating type like (MTL) 相關基因 *MTLa1*、*MTLa2* 以及 *MTLa1*、*MTLa2* (Hull *et al.*, 1999)。而移除 sorbitol 後，*C. albicans* 其中剩餘的一條五號染色體會進行複製，形成 homozygous a/a 或 α/α 之突變株 (Janbon *et al.*, 1998; Janbon *et al.*, 1999)，如附錄一所示。之後將 YEPS 培養基培養後之菌株，轉養至 YPD 培養液中，再萃取其染色體 DNA，以引子 HJL00134-F 和 HJL00135-R 確認 *MTLa1* 之存在，以及引子 HJL00136-F 和 HJL00137-R 確認 *MTLa1* (交大柯惠菁 未發表)。PCR 初步符合結果之菌株再以南方點墨法 (Southern blot) 進行雙重檢驗，如圖二十，限制酶 *EcoR* I 作用各菌株之染色體 DNA，以引子 HJL00134-F 和 HJL00135-R 合成之 DNA 片段當探針，偵測 *MTLa1*，可得預期片段約 6.5 kb；而以引子 HJL00136-F 和 HJL00137-R 合成之 DNA 片段做為探針，偵測 *MTLa1*，可得預期片段約 4.8 kb。如圖二十<A>，SC5314 (a/α, *CaENGI/CaENGI*) 為對照組，可得 a-type mating strains 皆有偵測到約 6.5 kb 大小之 DNA，而 α-type mating strains 則無被偵測到 *MTLa1*；如圖

二十，SC5314 (a/α, *CaENGI/CaENGI*) 為對照組，可得α-type mating strains皆有偵測到約 4.8 kb大小之DNA，而a-type mating strains則無被偵測到*MTLα1*。符合南方點墨法檢驗結果之菌株，野生株SC5314 之類接合型突變株命名為WT-1α、WT-2α、WT-3α (a/α, *CaENGI/CaENGI*)，WT-4α、WT-5α、WT-6α (α/α, *CaENGI/CaENGI*)；而EKP2 之類接合型突變株則命名為EKP2-1α、EKP2-3α、EKP2-4α、EKP2-5α、EKP2-6α (a/α, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 及EKP2-2α (α/α, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)。

4.11 *Caeng1* 類接合型 (mating type like) 突變株菌落型態之變化

4.11.1 於含有 4% 山羊血清之 YPD 培養基

將各突變株之單一菌落培養至含 4%山羊血清之 YPD 培養基、37 °C 培養三天，並觀察菌落型態之變化。以 WT-1α、WT-2α、WT-3α (a/α, *CaENGI/CaENGI*) 為 a-type mating strain 之對照組，而 WT-4α、WT-5α、WT-6α (α/α, *CaENGI/CaENGI*) 為 α-type mating strain 之對照組。如圖二十一<A>所示，對照組 WT-1α、WT-2α、WT-3α (a/α, *CaENGI/CaENGI*) 之單一菌落的表面皆有皺摺產生，菌落外圍也不規則；而實驗組 EKP2-1α、EKP2-3α、EKP2-4α、EKP2-5α、EKP2-6α (a/α, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 則出現兩種不同的情形：EKP2-1α、EKP2-3α、EKP2-5α 之單一菌落的表面皆呈現光滑、平整，為酵母菌型態，只有零星現象為菌落聚集處有出現皺摺。而 EKP2-4α 及 EKP2-6α 之單一菌落的表面則和對照組相同，有皺摺之情形。而 a-type mating 之 *Caeng1* 突變株出現兩種不同結果於後章討論會提到。

如圖二十一，對照組 WT-4α、WT-5α、WT-6α (α/α, *CaENGI/CaENGI*) 於培養後之單一菌落皆出現皺摺、外為不平整的情形，而實驗組 EKP2-2α (α/α, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 則與實驗組結果相同，單一菌落表面也

有皺摺之現象。

4.11.2 於 YPD、solid Spider 及含 10% 山羊血清之 YPD 培養基

將各突變株之單一菌落培養至 solid Spider 培養基上、37 °C 培養七天，並觀察單一菌落型態之變化。以 WT-1a (a/a, *CaENG1/CaENG1*) 為 a-type mating strain 之對照組，WT-4 α (α/α , *CaENG1/CaENG1*) 為 α -type mating strain 之對照組。如圖二十二<A>所示，對照組 WT-1a 與實驗組 EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-4a、EKP2-5a、EKP2-6a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 於不會誘發菌絲生長之 YPD 培養基上的單一菌落皆為光滑平整的表面；而在誘發菌絲生長之 solid Spider 培養基上的單一菌落，對照組 WT-1a 出現皺摺的表面，而實驗組的結果也分為兩種情形：EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-5a 之單一菌落的表面皆呈現光滑，但有長菌絲之現象；而 EKP2-4a、EKP2-6a 之單一菌落也與對照組相同，出現皺摺的表面。

如圖二十二，對照組 WT-4 α (α/α , *CaENG1/CaENG1*) 與實驗組 EKP2-2 α (α/α , *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 在 YPD 培養基上之單一菌落也皆為光滑平整的表面；而在 solid Spider 培養基上，WT-4 α 和 EKP2-2 α 之單一菌落也都呈現皺摺的狀態。

4.12 *Caeng1* 類接合型 (mating type like) 突變株於化學藥品感受性試驗之結果 (chemical susceptibility test)

依方法 3.18 將各菌株依序十倍稀釋之細胞培養至含不同化學藥品的 YPD 培養基上，30 °C 培養一至兩天，觀察菌落生長之情形。如圖二十三所示，以 WT-1a (a/a, *CaENG1/CaENG1*) 和 WT-4 α (α/α , *CaENG1/CaENG1*) 各為 a-type mating strain 及 α -type mating strain 之對照組。於熱感受實驗中，將細胞培養至 42 °C 一天，EKP2-3a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 較 WT-1a (a/a, *CaENG1/CaENG1*) 在細胞數 10^4 即有較少量的趨勢，而

EKP2-4a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 則和對照組沒有明顯差異；在 α -type mating strain 方面，EKP2-2 α (α/α , *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 和對照組 WT-4 α (α/α , *CaENG1/CaENG1*) 生長結果也相似。在鹼性環境培養下 (pH 10)，各實驗組和其對照組相比，並無明顯生長之差異。而於 1.5 M NaCl 培養下，EKP2-3a 之生長可能較 WT-1a 少，EKP2-4a 則較對照組無明顯區別。在 0.1% SDS 培養下，各菌株生長情況較差，且 α -type mating strain 生長情形較 a-type mating strain 差，而 EKP2-3a 在細胞數 10^4 開始則無生長趨勢，明顯和 WT-1a 有落差；而在 0.02% SDS 培養下和對照組相比並無顯著差異，顯示 EKP2-3a 對較高濃度之 SDS 有敏感性。在其它化學藥品如 Triton X-100、Tween 20、 H_2O_2 、DTT (dithiothreitol) 等之反應上，各突變株與對照組相比無顯著差異。而在含細胞壁染劑 CFW (Calcofluor white stain) 之培養基上，EKP2-3a 可能生長較對照組 WT-1a 少。



五、討論

承襲實驗室先前發表之論文指出 *CaENG1* 和 *CaURA3* 會影響白色念珠菌菌絲的生成，剔除 *CaENG1* 降低同環境下細胞菌絲的生長；而營養性篩選標記 *URA3* 則會增加同環境下細胞菌絲的生長，此二者對菌絲生長出現相反的誘因，故於結果判斷上顯得困難 (交大碩士論文 謝志豪, 2006)。而重新檢驗先前建構之 *Caeng1* 突變株、驗證營養性篩選標記影響菌絲生長之程度，以及確認實驗流程之設計需耗費大量時間，故選擇以非營養性篩選標記來重新剔除 *CaENG1*，再觀察剔除後的結果是否與先前之研究相符合，以求更進一步確認 *CaENG1* 對白色念珠菌菌絲生成之影響。本實驗選用抗藥性篩選標記 *SATI flipper* (Reuss *et al.*, 2004)，排除營養性篩選標記可能對白色念珠菌造成的影響，以探討剔除 *CaENG1* 後，對白色念珠菌影響的結果。

5.1 以抗藥性篩選標記 *SATI flipper* 剔除 *CaENG1* 結果之探討

因白色念珠菌為雙倍體 (Edwards, 1990)，利用抗藥性篩選標記 *SATI flipper* 可 pop-out 出基因體的特性，可重複使用此篩選標記做第二次白色念珠菌轉形。相較於先前研究常使用之營養性篩選標記 (*ARG4*, *HIS1*, *URA3* marker) (Dennison *et al.*, 2005)，需要在三種不同的篩選標記上建構標的基因上下游相似序列，使用 *SATI flipper* 剔除基因所花費之時間和精力較少；其次以藥物 nourseothricin 篩選帶有 *SATI flipper* 之菌株，會較傳統以營養素篩選菌株的篩選能力更具敏感性；再者，由於白色念珠菌轉形困難、沒有已知質體 (De Backer *et al.*, 1999)，相較於使用一般傳統白色念珠菌轉形方法得到少數轉形株 (transformants)，本實驗將結果 4.2.1 建構好之質體 pSAT1-BA，以酵素切下帶有 *SATI* 序列的片段後，以

clean-up 取代膠上純化方式 (gel extraction)，依電穿孔方法送入白色念珠菌，可得到多於四百顆轉形菌株數，推測因 clean-up 會帶有多餘 DNA 片段，其可能作用似 carrier DNA，故可得到較高之轉形效率。

5.2 以南方點墨法及分析 RNA 表現量檢驗 *Caeng1* 突變株

將初步符合 PCR 結果之 *CaENGI* 突變株進一步以南方點墨法 (Southern blot) 檢驗，如圖十，wild-type *CaENGI* allele 可偵測到約 7.6 kb 片段大小；*Caeng1* knock-out 且 *SAT1* flipper 已 pop-out 之 allele 可偵測到約 4.2 kb 大小的片段；而為避免無法區分 *CaENGI* rescued allele 和 wild-type allele，則將 *CaENGI* 片段以 PCR 方式合成出來後，建構至帶有 *CaENGI* 下游相似序列的 *SAT1* flipper，故 rescued construct 送入白色念珠菌並進行 *SAT1* flipper pop-out 後，rescued allele 會比 wild-type allele 多 *CaENGI* 下游相似序列之片段長，如此可得約 8.0 kb 片段，而與 wild-type allele 的 7.6 kb 作區隔。將符合南方點墨法檢驗之 *CaENGI* 各突變株分別命名為 EHK1 (*CaENGI*/*Caeng1*::FRT)、EKG7 (*Caeng1*::FRT/*Caeng1*::FRT)、EKP2 (*Caeng1*::FRT/*Caeng1*::FRT)、EGR (*Caeng1*::FRT/*CaENGI*::FRT)。

此後進行各突變株 RNA 表現量之分析，萃取各菌株的 RNA，以反轉錄酶聚合鏈反應 (RT-PCR) 檢驗各突變株 *CaENGI* 基因表現的情形。如圖十一，在 EHK1 及 EGR 突變株均可觀察到 RT-PCR 預期的產物大小，即表示 EGR 此突變株之 rescued allele 可順利轉錄出 *CaENGI* 之 RNA；而在雙套 *Caeng1* knock-out 之突變株 EKG7 及 EKP2 皆無法偵測到 RNA 的表現量，與預期中 *Caeng1* 突變株建構一致。

5.3 *CaENGI* 各突變株性狀分析之探討

5.3.1 生長曲線之探討

此實驗為比較 *CaENGI* 各突變株於相同環境條件培養下和對照組之生長速率的差異。對照組為野生株 SC5314、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*) 及 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)。由圖十二<A>可得知，在 YPD 培養液、30 °C 培養下，*CaENGI* 各突變株與野生株 SC5314 和 *cph1* 突變株 JKC19 生長同趨勢，HLC52 和 HLC54 則由培養四小時後生長開始較其他菌株趨緩；而由圖十二可發現，各菌株於生長八小時後開始趨緩，而長時間培養後也可達到相似之對數值。以上顯示剔除 *CaENGI* 對白色念珠菌並無造成生長威脅或影響其生長速率，此結果與先前發表之論文 (交大碩士論文 謝志豪, 2006) 及國外研究等結果 (Baladrón *et al.*, 2002; Esteban *et al.*, 2005) 相符合。

5.3.2 芽管試驗之探討

芽管為白色念珠菌由酵母菌型態轉為菌絲的初期過渡型態 (Odds, 1988)，將細胞培養於含 10% 山羊血清之 YPD 培養液、37 °C 培養五小時誘發芽管生成。由圖十三可看出對照組野生株 SC5314 和 JKC19 (*cph1/cph1*) 均生成較長之芽管；對照組 HLC52 (*efg1/efg1*) 及 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 則在有血清誘發之情況下沒有生成芽管。而在 *CaENGI* 各突變株於血清誘發的情形下，有生成芽管之能力，故剔除 *CaENGI* 並不影響白色念珠菌初期由酵母菌細胞過渡至菌絲生長之型態。

5.3.3 以血清誘發菌絲生長之型態探討

5.3.3.1 含 4% 山羊血清之 Bacto agar 培養基

於營養素缺乏之 Bacto agar 培養基上，培養於 37 °C 七天，以血清誘發菌絲生長，觀察 *CaENGI* 各突變株與對照組之間單一菌落型態的變化。圖十四可看出，對照組野生株 SC5314 和 JKC19 (*cph1/cph1*) 在倒立式顯微鏡下觀察，有菌落外圍呈放射狀菌絲的生長；對照組 HLC52 (*efg1/efg1*)

及 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 呈現菌落外圍平整之酵母菌型態，無菌絲生長能力；而 *CaENGI* 各突變株在相同環境培養下，均生成菌絲，與對照組 SC5314 和 JKC19 並無顯著差異。故剔除 *CaENGI*，缺乏細胞壁其一裂解酵素的作用仍不影響白色念珠菌形成菌絲生長的能力。

5.3.3.2 含 4% 山羊血清之 YPD 培養基

將菌株培養至富含營養源之 YPD 培養基，給予 4% 山羊血清，培養於 37 °C 三天誘發白色念珠菌生成菌絲，並觀察 *CaENGI* 各突變株與對照組間單一菌落型態的變化。如圖十五，對照組野生株 SC5314 和 JKC19 (*cph1/cph1*) 生成表面皺摺之單一菌落；對照組 HLC52 (*efg1/efg1*) 及 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 呈現菌落表面圓滑、外圍平整之酵母菌型態；而 *CaENGI* 各突變株在相同環境培養下，也皆出現表面皺摺、外圍型態不規則之單一菌落，此結果與前述實驗結果相符，剔除 *CaENGI*，不影響白色念珠菌形成菌絲生長的能力。但與先前發表之論文的結果有些許落差，文中提到在含 4% 山羊血清之 YPD 培養基中不額外添加營養素的情形下，*Caeng1* 突變株 BAU2 (*Caeng1::ARG4/Caeng1::URA3*) 會生成表面皺摺之單一菌落；而 *Caeng1* 突變株 BAH1-1 (*Caeng1::ARG4/Caeng1::HIS1*) 則出現光滑平整之單一菌落，如額外添加 uridine 的情形下，BAH1-1 之單一菌落分別出現兩種不同情形：一為菌落表面皺摺，一為光滑平整 (交大碩士論文 謝志豪, 2006)。至此以營養篩選標記剔除 *CaENGI* 和以抗藥性篩選標記 *SAT1* flipper 剔除 *CaENGI* 出現不同的性狀結果，其建構突變株過程之差異除篩選標記可能會對白色念珠菌造成不同的影響以外 (Lay *et al.*, 1998)，所建構之菌株也不同，抗藥性篩選標記 *SAT1* flipper 是以野生株 SC5314 進行基因置換；而營養篩選標記需使用於營養基因缺陷之菌株 BWP17 (*arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3*) (Wilson *et al.*, 1999)，又有研究指出 uridine 營養缺陷會致使白色念珠菌無毒性 (Cole

et al., 1995), 因此之後會以實驗先釐清是否為 BWP17 菌株本身為 uridine 補給所影響型態變化。

5.3.4 侵犯力試驗之探討

將菌株培養至 solid Spider 培養基、37 °C 培養七天誘發白色念珠菌生長菌絲侵入培養基，再以固定水流沖洗培養基，觀察菌落殘留之情形。如圖十六，*CaENG1* 各突變株與對照組野生株 SC5314 及 *cph1* 突變株 JKC19 均有菌絲生成並侵入培養基中；而對照組 *efg1* 突變株 HLC52 及 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*) 則無生長菌絲侵入培養基之能力。此結果也與前述實驗結果相符，*CaENG1* 並沒有直接參與菌絲型態變化之過程。而在本實驗室於 2006 年發表之論文則記載將 *Caeng1* 突變株培養至 solid Spider 培養基中，不額外添加其它營養素的情形下，BAH1-1 (*Caeng1::ARG4/Caeng1::HIS1*) 菌落可被沖刷掉，BAU2 (*Caeng1::ARG4/Caeng1::URA3*) 情形則與野生株 SC5314 相同，菌落無法被水流沖刷掉 (交大碩士論文謝志豪, 2006)。此部分結果也與 2006 年發表之論文有出入，但由於 2006 年發表之論文於性狀分析實驗中所採用的對照組為野生株 SC5314，而非 BWP17 (*arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3*)，故應重現對照組 BWP17 於相同實驗條件下給予營養素 uridine 與否之型態變化，再予以討論。

5.4 營養素 uridine 影響營養基因缺陷野生株 BWP17 之結果探討

由圖十七可見，於含 4% 山羊血清之 YPD 培養基中，給予 uridine，培養 37 °C 三天誘發菌絲生長，BWP17 (*arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3*) 之單一菌落有三種型態出現，分別為光滑之酵母菌型、菌落中間凹陷，有初步皺摺情形以及菌落表面呈皺摺狀，菌落外圍不平整；而同樣生長條件下，不給予 uridine，BWP17 之單一菌落均為光滑表面。由此結果可得知，與 2006 發表之論文間的出入在於 BWP17 之型態變化受 uracil 生合

成影響，而當菌株無法自行合成 uracil，且外界無補充營養素時，白色念珠菌則失去毒性 (Cole *et al.*, 1995)。故 2006 年論文發表之菌落型態變化於含 4% 山羊血清的 YPD 培養基以及侵犯力試驗的結果中，以營養篩選標記 *ARG4* 和 *HIS1* 剔除 *CaENG1* 之突變株會有菌絲生成能力下降的原因，應為營養基因缺陷菌株 BWP17 受 uracil 缺乏的影響，而非剔除 *CaENG1* 所造成的影響。

5.5 細胞分裂之結果探討

先前國外相關研究發表，在不同的真菌中 Eng1p 之功能為 endo-1,3- β -glucanase，剔除 *ENG1* 則會造成細胞分裂不完全之現象 (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Esteban *et al.*, 2005)。將細胞培養至 mid-log phase，以細胞壁染劑 Calcofluor white stain 進行染色，再以雷射掃描式共軛焦顯微鏡 (Laser Scanning Confocal Microscope) 放大一千倍觀察細胞分裂之情形。如圖十八所示，在對照組野生株 SC5314、*cph1* 突變株 JKC19、*efg1* 突變株 HLC52 及 HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)，呈現單顆或兩三顆細胞分裂的型態；而在 *Caeng1* 突變株 EKG7 及 EKP2 偶有發現四至六顆細胞分裂不完全的現象，但並不是一種普遍的現象，大多數細胞為二至三顆分裂的狀態。顯示缺少 *CaENG1* 此基因對細胞壁的裂解還是有造成些許程度之影響，而 CaEng1p 非細胞分裂不完全主要關鍵的原因推測為其上游還有主要控制的基因 *CaRHO4*，於 2007 年發表剔除 *CaRHO4* 可造成七成以上觀察之細胞均為分裂不完全的現象 (11 顆以上細胞裂解不完全)，而在 *Carho4* 突變株中過量表現 *CaENG1* 則可以補償分裂不完全的現象 (Dünkler *et al.*, 2007)。因此推論可能 *CaRHO4* 可以在 *CaENG1* 缺損之下，提高其他類似功能的基因來補償，所以剔除 *CaENG1* 後並沒有看到普遍細胞分裂不全的現象。

5.6 化學藥品感受性試驗之結果探討

由於*CaENGI* 為細胞壁裂解相關之基因，而文獻指出和白色念珠菌同源性高之啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)，如剔除與細胞壁建構或重組相關基因，則對於細胞壁染劑等化學試劑有高度敏感性 (Ram *et al.*, 1994; Popolo *et al.*, 1997; Rodríguez-Peña *et al.*, 2000)。因此以細胞壁染劑等化學藥品做感受性試驗。如圖十九之結果，*CaENGI* 各突變株於含不同化學藥品之YPD培養基，和野生株SC5314 相比，生長情形並無顯著差異。此結果顯示在目前所測試過之化學藥品中，白色念珠菌缺少 endo-1,3- β -glucanases 並無對細胞壁組成造成明顯缺陷，進而對化學藥品產生敏感性。

5.7 以南方點墨法檢驗 *CaengI* 接合型突變株 (a/a or α/α) 之探討

誘發 *CaengI* 突變株 EKP2 之五號染色體缺失後 (交大柯惠菁 未發表)，進一步以南方點墨法檢驗其接合型 (mating type)。如圖二十<A>為檢驗 *MTLa1* 之存在，圖二十為檢驗 *MTLa1* 之存在。只存在 *MTLa1* 則為 a-type mating strain，分別命名為 WT-1a、WT-2a、WT-3a (a/a, *CaENGI*/*CaENGI*) 及 EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-4a、EKP2-5a、EKP2-6a (a/a, *CaengI*::FRT/*CaengI*::FRT)；而只存在 *MTLa1* 之菌株則為 α -type mating strain，分別命名為 WT-4 α 、WT-5 α 、WT-6 α (α/α , *CaENGI*/*CaENGI*) 及 EKP2-2 α (α/α , *CaengI*::FRT/*CaengI*::FRT)。

5.8 以血清誘發 *CaengI* 接合型突變株菌絲生長之型態探討

5.8.1 於含 4% 山羊血清之 YPD 培養基上的菌落型態

將菌株培養至富含營養源之 YPD 培養基，給予 4% 山羊血清，培養於 37 °C 三天誘發白色念珠菌生成菌絲，並觀察 *CaengI* 接合型突變株與對

照組間單一菌落型態的變化。圖二十一，對照組分別為 WT-1a、WT-2a、WT-3a (a/a, *CaENGI/CaENGI*) 及 WT-4a、WT-5a、WT-6a (α/α , *CaENGI/CaENGI*)，如結果所示， α -type mating strains 均受血清誘發，單一菌落表面生成皺摺；而 a-type mating strains 方面，對照組菌落表面皆為皺摺，而五株實驗組突變株中，EKP2-4a 及 EKP2-6a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 結果與對照組相同，均受血清誘發形成菌落表面皺摺，而 EKP2-1a、EKP2-3a 及 EKP2-5a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 菌落表面則為光滑的現象。在 a-type 實驗株方面，將近一半之比例有不同表現型 (phenotype)，分別為菌落表面皺摺狀及光滑狀兩種型態，但其來源皆為 *Caeng1* 突變株 EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 誘發成 a-type mating strain，會有不同實驗結果，推測應如 2009 年發表之文獻所提到，白色念珠菌在基因變異的情況時，如染色體缺失 (chromosome loss) 或基因重組置換 (mitotic recombination)，在其它染色體中常會伴隨基因變異的情形 (Diogo *et al.*, 2009)。故在五個 a-type 實驗株會出現不同表現型的結果，應為在誘導突變株缺失第五號染色體時，也伴隨其它基因的變異，因此造成菌株有不同的表現型出現。但在 a-type 實驗株中，菌落表面皺摺狀及光滑狀，哪一種狀態是因為 *CaENGI* 剔除及 *MTLa1* 缺失所造成，哪一種為額外伴隨其它基因變異所造成的，目前還無確切之定論，需日後更進一步實驗證明。

5.8.2 於三種不同之培養基上菌落型態變化之探討

如圖二十二，各接合型突變株培養於 YPD 培養基時，因無給予任何外在條件誘發白色念珠菌形成菌絲，故各突變株之菌落皆為光滑平整的表面。而將菌株培養至 solid Spider 培養基、37 °C 培養七天誘發白色念珠菌生長菌絲，在 a-type mating strains 方面，對照組 WT-1a (a/a, *CaENGI/CaENGI*) 菌落表面生成皺摺，且有菌絲深入培養基，實驗組 EKP2-4a

及 EKP2-6a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 與對照組 WT-1a 相同，而 EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-5a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 則是單一菌落表面光滑，但菌落周圍有菌絲生成。而提高 YPD 培養基中山羊血清的含量至 10%，可得與圖二十一<A>培養於 4% 山羊血清之 YPD 培養基一致的結果，實驗組 EKP2-4a 及 EKP2-6a 與對照組 WT-1a 相同，菌落生成皺摺之表面，而 EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-5a 則是單一菌落表面光滑。文獻指出菌絲狀細胞與酵母菌狀細胞之比例為決定菌落型態 (colony morphology) 的主要關鍵 (Dutton *et al.*, 1989)，而結果顯示 a-type mating 突變株 EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-5a 在 solid Spider 培養基中有菌絲生長，但不論是在 solid Spider 或含山羊血清之 YPD 培養基中，其菌落型態皆為光滑，因此推論突變株 EKP2-3a 及 EKP2-5a 其生成菌絲之能力較差，改變了菌落型態的變化。

5.9 *Caeng1* 接合型突變株於化學藥品感受性試驗之結果探討

如圖二十三，各接合型突變株於含各式化學藥品之 YPD 培養基中的生長情形。在 42 °C 培養下，EKP2-3a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 之生長較對照組 WT-1a (a/a, *CaENG1/CaENG*) 少，而 EKP2-4a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 之生長情形則與對照組相同，如討論 5.8，造成 EKP2-3a 不受血清誘發生成菌落表面皺摺，而 EKP2-4a 受調控而產生皺摺之變異，也同樣造成此二菌株對熱感受實驗有些微不同的生長情形。在給予 1.5 M NaCl 造成滲透壓改變之培養環境下，EKP2-3a 和對照組 WT-1a 相比，也出現生長可能較差的情況；而給予 0.1% SDS 則明顯對 EKP2-3a 造成生長之阻礙；EKP2-3a 在細胞壁染劑 CFW (calcofluor white stain) 培養下也出現與對照組 WT-1a 相比生長較少之情況。研究指出一些清潔劑可能會對真菌細胞膜或細胞壁造成壓力，導致誘發細胞對

於壓力做出反應 (Nakagawa *et al.*, 2003b)。在化學藥品感受性實驗中，EKP2-3a 對 0.1% SDS 有高度敏感性，因此推論 a-type mating 突變株 EKP2-3a 在細胞壁組成有缺陷，故對影響細胞壁之 SDS 有敏感性。

5.10 結語

本論文主要以抗藥性篩選標記進行 *CaENG1* 基因突變之研究，以和使用營養篩選標記及突變株 BWP17 系統做比較。以南方點墨法及 RNA 表現量雙重檢驗後，所建構之 *Caeng1* 雙套突變株 EKG7 及 EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 和單套突變之 EHK1 (*CaENG1/Caeng1::FRT*)、單套補償之 EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*) 在目前所採用之性狀分析實驗中，和對照組野生株 SC5314 結果相同，有生成菌絲之能力，故 *CaENG1* 與白色念珠菌之菌絲生長的型態變化並無直接關聯。在細胞分裂實驗中，僅觀察到 *Caeng1* 雙套突變株 EKG7 及 EKP2 少數細胞分裂不完全之現象，因此 *CaENG1* 對細胞分裂的影響並不是最主要的關鍵。而在各式化學藥品之感受性實驗中，剔除 *CaENG1* 也無影響菌株之生長，所以白色念珠菌缺少 *CaENG1* 作用並不會對細胞壁組成造成明顯缺陷，進而對化學藥品產生敏感性。而將 *Caeng1* 雙套突變株 EKP2 進一步誘發為 a-type mating strain，可得 EKP2-3a、EKP2-4a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*) 等接合型突變株，在血清誘發的實驗中，有兩種不同之結果，EKP2-3a 生成光滑之菌落表面；但 EKP2-4a 則與對照組結果相同，會被血清誘發生成表面皺摺，何種狀況為 *Caeng1* 及 MTL 相關基因之突變所影響，何種狀況為五號染色體缺失可能造成其它無法預期之基因變異所影響，都需要日後實驗去進一步驗證。不論如何，由 *Caeng1* 突變株誘發為 a-type mating strain 過程中，未知的基因變異之機率很高，而 a-type mating 之 *Caeng1* 突變株有 3/5 的機率為不受血清調控

生成表面皺摺，推測與白色念珠菌型態變化有關聯。在化學藥品感受性實驗方面，突變株 EKP2-3a 則對 0.1% SDS 有高度敏感性，因此推論此突變株之細胞壁組成有缺陷，對於影響細胞壁之 SDS 有較高的感受性。

5.11 未來展望

對於 *Caeng1* 雙套突變株 EKP2 進一步誘發為 a-type mating strain 相關性狀分析實驗中，發現在添加血清之培養下，突變株出現兩種不同菌落型態，3/5 為菌落表面光滑平整 (EKP2-1a, EKP2-3a, EKP2-5a)，2/5 為菌落表面皺摺 (EKP2-4a, EKP2-6a)。目前尚無定論何種情況為 *Caeng1* 及 MTL 相關基因之突變所影響，何種狀況為五號染色體缺失可能造成其它無法預期之基因變異所影響。日後可將 *CaENG1* 補償至形成菌落光滑表面之突變株 EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-5a 中，再添加血清培養，以觀察是否為 *CaENG1* 影響菌落型態之變化。此外，在化學藥品感受性實驗方面，突變株 EKP2-3a 則對 0.1% SDS 有高度敏感性，而 EKP2-1a 和 EKP2-5a 則尚未證明是否也對 0.1% SDS 有高度敏感性，因此可進一步實驗確認，同樣在血清培養下形成光滑菌落表面之突變株 EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-5a，是否皆對 0.1% SDS 有高度敏感性。

六、參考文獻

謝志豪 (2006). 白色念珠菌 ENG1 與細胞型態之關聯, 交通大學生物科技系所碩士論文

Adams DJ. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150(Pt 7):2029-35.

Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. (2004) Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun*. 72(10):6023-31.

Bain JM, Stubberfield C, Gow NA. (2001) Ura-status-dependent adhesion of *Candida albicans* mutants. *FEMS Microbiol Lett*. 204(2):323-8.

Baladrón V, Ufano S, Dueñas E, Martín-Cuadrado AB, del Rey F, Vázquez de Aldana CR. (2002) Enp1p, an endo-1,3-beta-glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 1(5):774-86.

Bennett RJ, Johnson AD. (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J*. 22(10):2505-15.

Bennett RJ, Johnson AD. (2005) Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol*. 59:233-55.

Bennett RJ, Johnson AD. (2006) The role of nutrient regulation and the Gpa2 protein in the mating pheromone response of *C. albicans*. *Mol Microbiol*. 62(1):100-19.

Braun, B. R., and A. D. Johnson. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* 277:105–109.

Brown GD, Gordon S. (2003) Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 19(3):311-5.

Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med.* 197(9):1119-24.

Cabib E, Bowers B. (1971) Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. *J Biol Chem.* 246(1):152-9.

Calderone RA, Braun P. (1991) Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev.* 55(1):1-20.

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):130-80.

Cid VJ, Durán A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C, Sánchez M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 59(3):345-86.

Clemente-Blanco A, González-Novo A, Machín F, Caballero-Lima D, Aragón L, Sánchez M, de Aldana CR, Jiménez J, Correa-Bordes J. (2006) The Cdc14p phosphatase affects late cell-cycle events and morphogenesis in *Candida albicans*. *J Cell Sci.* 119(Pt 6):1130-43.

Cole MF, Bowen WH, Zhao XJ, Cihlar RL. 1995. Avirulence of *Candida albicans* auxotrophic mutants in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett.* 126(2):177-80.

Côte P, Whiteway M. (2008) The role of *Candida albicans* *FAR1* in regulation of pheromone-mediated mating, gene expression and cell cycle arrest. *Mol Microbiol.*;68(2):392-404.

Coutinho PM, Henrissat B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B, Svensson B (eds) Recent advances in carbohydrate bioengineering. Cambridge, UK: *The Royal Society of Chemistry*, pp 3-12

- Cutler JE. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 45:187-218.
- Dabrowa N, Howard DH. (1981) Proline uptake in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 127(2):391-7.
- Dagert M, Ehrlich SD. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6(1):23-8
- De Backer MD, Maes D, Vandoninck S, Logghe M, Contreras R, Luyten WH. (1999) Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast* 15(15):1609-18.
- De Backer MD, Nelissen B, Logghe M, Viaene J, Loonen I, Vandoninck S, de Hoogt R, Dewaele S, Simons FA, Verhasselt P, Vanhoof G, Contreras R, Luyten WH. (2001) An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. *Nat Biotechnol.* 19(3):235-41.
- De Bernardis F, Boccanera M, Adriani D, Girolamo A, Cassone A. (2002) Intravaginal and intranasal immunizations are equally effective in inducing vaginal antibodies and conferring protection against vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 70(5):2725-9.
- De Bernardis F, Liu H, O'Mahony R, La Valle R, Bartollino S, Sandini S, Grant S, Brewis N, Tomlinson I, Basset RC, Holton J, Roitt IM, Cassone A. (2007) Human domain antibodies against virulence traits of *Candida albicans* inhibit fungus adherence to vaginal epithelium and protect against experimental vaginal candidiasis. *J Infect Dis.* 195(1):149-57.
- Dennison PM, Ramsdale M, Manson CL, Brown AJ. (2005) Gene disruption in *Candida albicans* using a synthetic, codon-optimised Cre-loxP system. *Fungal Genet Biol.* 42(9):737-48.
- Diogo D, Bouchier C, d'Enfert C, Bougnoux ME. (2009) Loss of heterozygosity in commensal isolates of the asexual diploid yeast *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 46(2):159-68.

Doolin MT, Johnson AL, Johnston LH, Butler G. (2001) Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol Microbiol.* 40(2):422-32.

Dünkler A, Wendland J. (2007) *Candida albicans* Rho-type GTPase-encoding genes required for polarized cell growth and cell separation. *Eukaryot Cell.* 6(5):844-54.

Dutton S, Penn CW. (1989) Biological attributes of colony-type variants of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 135(12):3363-72.

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.

Edwards, J. E., Jr. (2000) in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell, G. L., Bennett, J. E., and Dolin, R., eds) 5th Ed., pp. 2656-2674, Churchill Livingstone, Philadelphia

Esteban PF, Ríos I, García R, Dueñas E, Plá J, Sánchez M, de Aldana CR, Del Rey F. (2005) Characterization of the *CaENG1* gene encoding an endo-1,3-beta-glucanase involved in cell separation in *Candida albicans*. *Curr Microbiol.* 51(6):385-92.

Fisher-Hoch SP, Hutwagner L. (1995) Opportunistic candidiasis: an epidemic of the 1980s. *Clin Infect Dis.* 21(4):897-904.

Forche A, Alby K, Schaefer D, Johnson AD, Berman J, Bennett RJ. (2008) The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol.* 6(5):e110.

Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.*;24(6):1277-86.

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*. 68(6):1077-90.

González MM, Díez-Orejas R, Molero G, Alvarez AM, Pla J, Nombela C, Sánchez-Pérez M. (1997) Phenotypic characterization of a *Candida albicans* strain deficient in its major exoglucanase. *Microbiology*. 143 (Pt 9):3023-32.

González-Novo A, Labrador L, Jiménez A, Sánchez-Pérez M, Jiménez J. (2006) Role of the septin *Cdc10* in the virulence of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol*. 50(7):499-511.

González-Novo A, Correa-Bordes J, Labrador L, Sánchez M, Vázquez de Aldana CR, Jiménez J. (2008). *Sep7* is essential to modify septin ring dynamics and inhibit cell separation during *Candida albicans* hyphal growth. *Mol Biol Cell*. 19(4):1509-18.

Gow NA. (1997) Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol*. 8(1-2):43-55.

Gow NA. (2002) *Candida albicans* switches mates. *Mol Cell*. 10(2):217-8.

Groll AH, De Lucca AJ, Walsh TJ. (1998a) Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol*. 6(3):117-24.

Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ. (1998b) Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv Pharmacol*. 44:343-500.

Hull CM, Johnson AD. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285(5431):1271-5.

Hull CM, Raisner RM, Johnson AD. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289(5477):307-10.

Humbel BM, Konomi M, Takagi T, Kamasawa N, Ishijima SA, Osumi M. (2001) In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18(5):433-44.

Jack DB. (1998) The search for new antifungal drugs and strategies continues. *Drug News Perspect.* 11(5):306-9.

Janbon G, Sherman F, Rustchenko E. (1998) Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(9):5150-5.

Janbon G, Sherman F, Rustchenko E. (1999) Appearance and properties of L-sorbose-utilizing mutants of *Candida albicans* obtained on a selective plate. *Genetic* 153(2):653-64.

Johnson A. (2003) The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol.* 1(2):106-16.

Kaneko, A., T. Umeyama, Y. Utena-Abe, S. Yamagoe, M. Niimi, and Y. Uehara. (2006) Tcc1p, a novel protein containing the tetratricopeptide repeat motif, interacts with Tup1p to regulate morphological transition and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 5:1894–1905.

Klis FM, de Groot P, Hellingwerf K. (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol.* 39 Suppl 1:1-8.

Klotz, S. A. (1992) *Clin. Infect. Dis.* 14, 340-347

Köhler GA, White TC, Agabian N. (1997) Overexpression of a cloned *IMP* dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol.* 179(7):2331-8.

Kullberg, B. J., and S. G. Filler. (2002) *Candida* and candidiasis. ASM Press, Washington, DC.

- Kvaal CA, Srikantha T, Soll DR. (1997) Misexpression of the white phasespecific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun.* 65:4468–4475.
- Kvaal C, Lachke S, Srikantha T, Daniels K, McCoy J, Soll DR. (1999) Misexpression of the opaque phase-specific gene *PEP1 (SAPI)* in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun.* 67:6652–6662.
- Laprade L, Boyartchuk VL, Dietrich WF, Winston F. (2002) *Spt3* plays opposite roles in filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* and is required for *C. albicans* virulence. *Genetics* 161(2):509-19.
- Lay J, Henry LK, Clifford J, Koltin Y, Bulawa CE, Becker JM. (1998) Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun.* 66(11):5301-6.
- Lengeler, K. B., R. C. Davidson, C. D'Sousa, *et al.* (2000) Signal transduction regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:746-785.
- Lewis RE, Kontoyiannis DP, Darouiche RO, Raad II, Prince RA. (2002) Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an in vitro model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(11):3499-505.
- Liu H, Köhler J, Fink GR. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science.* 266(5191):1723-6.
- Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90(5):939-49.
- Lo HJ, Wang JS, Lin CY, Chen CG, Hsiao TY, Hsu CT, Su CL, Fann MJ, Ching YT, Yang YL. (2005) *Efg1* involved in drug resistance by regulating the expression of *ERG3* in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(3):1213-5.
- Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D, Soll DR. (2003) Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2(1):49-61.

Luetke KH, Sadowski PD. (1995) The role of DNA bending in Flp-mediated site-specific recombination. *J Mol Biol.* 251(4):493-506.

Madison JM, Winston F. (1998) Identification and analysis of homologues of *Saccharomyces cerevisiae Spt3* suggest conserved functional domains. *Yeast* 14(5):409-17.

Magee BB, Magee PT. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLalpha* strains. *Science* 289(5477):310-3.

Magee PT, Magee BB. (2004) Through a glass opaquely: the biological significance of mating in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 7(6):661-5.

Martín-Cuadrado AB, Dueñas E, Sipiczki M, Vázquez de Aldana CR, del Rey F. (2003) The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 116(Pt 9):1689-98.

Martín-Cuadrado AB, Fontaine T, Esteban PF, del Dedo JE, de Medina-Redondo M, del Rey F, Latgé JP, de Aldana CR. (2008) Characterization of the endo-beta-1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae Eng2* and other members of the GH81 family. *Fungal Genet Biol.* 45(4):542-53.

Martinez-Lopez R, Monteoliva L, Diez-Orejas R, Nombela C, Gil C. (2004) The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* 150(Pt 10):3341-54.

Matthews GD, Goodwin TJ, Butler MI, Berryman TA, Poulter RT. (1997) pCal, a highly unusual Ty1/copia retrotransposon from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 179(22):7118-28.

McCreath KJ, Specht CA, Robbins PW. (1995) Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(7):2544-8.

Miller MG, Johnson AD. (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110(3):293-302.

Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Watanabe T, Yamada-Okabe H. (1997) Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSCI/FKS1* and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol.* 179(13):4096-105.

Mitchell AP. (1998) Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 1(6):687-92.

Morrow B, Srikantha T, Soll DR. (1992) Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* 12:2997-3005.

Mouyna I, Sarfati J, Recco P, Fontaine T, Henrissatz B, Latge JP. (2002) Molecular characterization of a cell wall-associated beta(1-3)endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 40(5):455-64.

Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. (2003) Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun.* 71(8):4333-40.

Murad, A. M., C. d'Enfert, C. Gaillardin, H. Tournu, F. Tekaia, D. Talibi, D. Marechal, V. Marchais, J. Cottin, and A. J. Brown. (2001a) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol.* 42:981-993.

Murad, A. M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, D. MacCallum, N. Schnell, D. Talibi, D. Marechal, F. Tekaia, C. d'Enfert, C. Gaillardin, F. C. Odds, and A. J. Brown. (2001b) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.* 8. 20:4742-4752.

- Murillo LA, Newport G, Lan CY, Habelitz S, Dungan J, Agabian NM. (2005) Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 4(9):1562-73.
- Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. (2003a) Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis*. 187(4):710-3.
- Nakagawa Y, Kanbe T, Mizuguchi I. (2003b) Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol*. 47(6):395-403.
- Navarro-García F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R, Nombela C. (1998) A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology*. 144 (Pt 2):411-24.
- Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holyoak K, Hoff B, VanHandel M, Andes D. (2007) Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 51(2):510-20.
- Nombela C, Molina M, Cenamor R, Sanchez M. (1988) Yeast beta-glucanases: a complex system of secreted enzymes. *Microbiol Sci*. 5(11):328-32.
- Odds FC. (1988) *Candida and Candidosis*. WB Saunders: Philadelphia, PA.
- Odds FC. (2003) Reflections on the question: what does molecular mycology have to do with the clinician treating the patient? *Med Mycol*. 41(1):1-6.
- Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schiltz RL, Howard T, Yang XJ, Howard BH, Qin J, Nakatani Y. (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94(1):35-44.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. (2000) Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother*. 44(3):747-51.

- Pla J, Gil C, Monteoliva L, Navarro-García F, Sánchez M, Nombela C. (1996) Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* 12(16):1677-702.
- Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P, Vai M. (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1*delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 179(2):463-9.
- Ram AF, Wolters A, Ten Hoopen R, Klis FM. (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* 10(8):1019-30
- Ram SP, Romana LK, Shepherd MG, Sullivan PA. (1984) Exo-(1----3)-beta-glucanase, autolysin and trehalase activities during yeast growth and germ-tube formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 130(5):1227-36.
- Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. (2001) Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(9):2475-9.
- Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. (2002) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 49(6):973-80.
- Reuss O, Vik A, Kolter R, Morschhäuser J. (2004) The *SAT1* flipper, an optimized tool for disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341:119-27
- Rodríguez-Peña JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C. (2000) A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol.* 20(9):3245-55.
- Ruan SY, Hsueh PR. (2009) Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 108(6):443-51.

- Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 6(1):14-29.
- Rustchenko E, Sherman F. (2002) Genetic instability of *Candida albicans*. In *Fungi Pathogenic for Humans and Animals*, Howard DH (ed.). Marcel Dekker: New York; 723-776.
- Rustchenko E. (2007) Specific chromosome alterations of *Candida albicans*: mechanism for adaptation to pathogenicity. In *Introduction for the Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*, Nombela C, Baquero F, Gutierrez-Fuentes JA (eds). ASM Press: Washington, DC. (in press).
- Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell.* 2(5):1053-60.
- Shaikh AC, Sadowski PD. (2000) Chimeras of the Flp and Cre recombinases: tests of the mode of cleavage by Flp and Cre. *J Mol Biol.* 302(1):27-48.
- Shepherd MG, Yin CY, Ram SP, Sullivan PA. (1980) Germ tube induction in *Candida albicans*. *Can J Microbiol.* 26(1):21-6.
- Sherwood RK, Bennett RJ. (2008) Microtubule motor protein Kar3 is required for normal mitotic division and morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 7(9):1460-74.
- Soll DR. (2004) Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays* 26(1):10-20.
- Sprague, E. R., M. J. Redd, A. D. Johnson, and C. Wolberger. (2000) Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *EMBO J.* 19:3016–3027.
- Srikantha T, Borneman AR, Daniels KJ, Pujol C, Wu W, Seringhaus MR, Gerstein M, Yi S, Snyder M, Soll DR. (2006) *TOS9* regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 5(10):1674-87.

Staab JF, Bahn YS, Sundstrom P. (2003) Integrative, multifunctional plasmids for hypha-specific or constitutive expression of green fluorescent protein in *Candida albicans*. *Microbiology*. 149(Pt 10):2977-86.

Staab JF, Sundstrom P. (2003) *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol.* 11(2):69-73.

Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* 16(8):1982-91.

Sudbery P, Gow N, Berman J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 12(7):317-24.

Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Narayan MS, Ravishankar GA. (2003) Food-grade chemical and biological agents permeabilize red beet hairy roots, assisting the release of betalaines. *Biotechnol Prog.* 19(4):1274-82.

Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Palma AS, Liu Y, Mignogna G, Maras B, Colone M, Stringaro A, Zamboni S, Feizi T, Cassone A. (2009) Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One.* 4(4):e5392.

Tzung KW, Williams RM, Scherer S, Federspiel N, Jones T, Hansen N, Bivolarevic V, Huizar L, Komp C, Surzycki R, Tamse R, Davis RW, Agabian N. (2001) Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(6):3249-53.

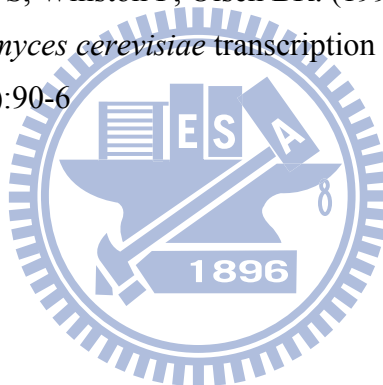
Vanden Bossche H, Warnock DW, Dupont B, Kerridge D, Sen Gupta S, Improvisi L, Marichal P, Odds FC, Provost F, Ronin O. (1994) Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol.* 32 Suppl 1:189-202.

Vilanova M, Teixeira L, Caramalho I, Torrado E, Marques A, Madureira P, Ribeiro A, Ferreira P, Gama M, Demengeot J. (2004) Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. *Immunology*. 111(3):334-42.

Vincent JL, Anaissie E, Bruining H, Demajo W, el-Ebiary M, Haber J, Hiramatsu Y, Nitenberg G, Nyström PO, Pittet D, Rogers T, Sandven P, Sganga G, Schaller MD, Solomkin J. (1998) Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. *Intensive Care Med*. 24(3):206-16.

Wirsching S, Michel S, Köhler G, Morschhäuser J. (2000) Activation of the multiple drug resistance gene *MDR1* in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol*. 182(2):400-4.

Yu J, Madison JM, Mundlos S, Winston F, Olsen BR. (1998) Characterization of a human homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor *spt3* (SUPT3H). *Genomics*. 53(1):90-6



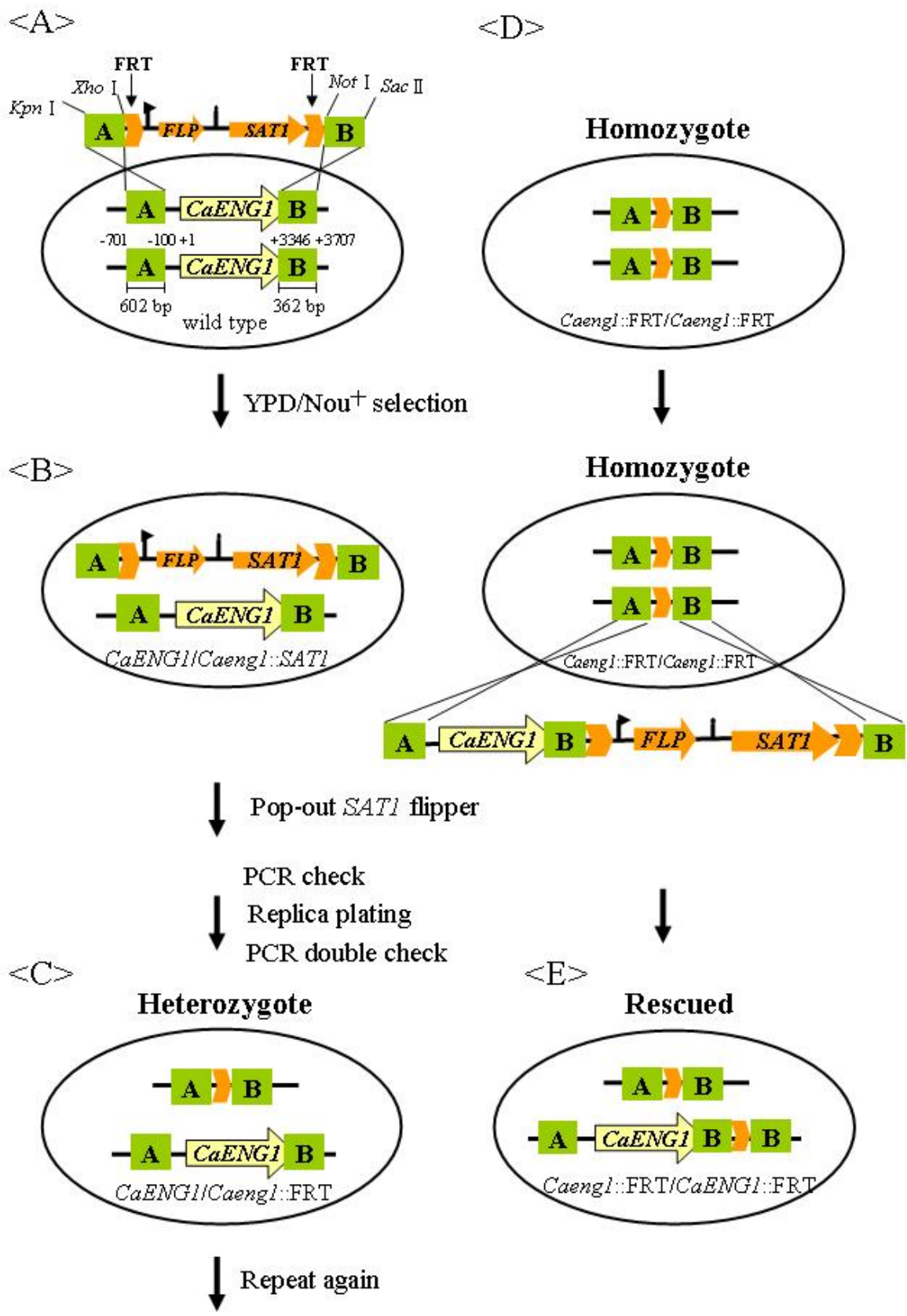
表一、於白色念珠菌中 *CaENG1* Blast 之結果

Name	Function	Length	Identities	Score	E-value	Gap	Comment
orf19.3066 (<i>CaENG1</i>)	Endo-1,3-beta-glucanase cell wall protein	3438 nt	-	-	-	-	(1)Located in chr1
		1145 residues	-	-	-	-	
orf19.3417 (<i>ACF2</i>)	Putative endo-1,3-beta-glucanase	2205 nt	485/803 (60%)	149.3 bits	1.3e-37	33/803 (4%)	(1)Uncharacterized ORF (2)Alias: <i>ENG2</i> (3)Located in chr6
		734 residues	297/721 (41%)	536 bits	2e-156	51/721 (7%)	
orf19.4906	Unknown function, transcription is positively regulated by Tbf1p	2307 nt	551/1005 (54%)	51.5 bits	2.5e-05	106/1005 (10%)	(1)Uncharacterized ORF (2)Located in chr1 (3)Ortholog with <i>S. cerevisiae</i> <i>TDA7</i> : Cell cycle-regulated gene of unknown function, promoter bound by Fkh2p
		768 residues	10/25 (40%)	16.9 bits	6.5	3/25 (12%)	
orf19.3697	Unknown function	2982 nt	1249/2405 (51%)	50.3 bits	6.2e-05	221/2405 (9%)	(1)Uncharacterized ORF (2)Located in chr7 (3)Ortholog with <i>S. cerevisiae</i> <i>FAR11</i> : Protein involved in
			365/673 (54%)	38.3 bits	0.28	63/673 (9%)	

		993 residues	7/18 (38%)	18.9 bits	2.1	0/18 (0%)	pheromone-induced G1 cell cycle arrest, functions in a pathway different from the Far1p-dependent pathway
--	--	-----------------	------------	--------------	-----	-----------	--

註：由 Candida Genome Database 中 blast 與 *CaENGI* 相似之基因序列，再由 NCBI (National Center for Biotechnology Information) blastx program 比對工具比對各基因轉譯之胺基酸序列與 *CaENGI* 轉譯之胺基酸序列之相似度。





圖一、建構 *Caeng1* 突變株之示意圖

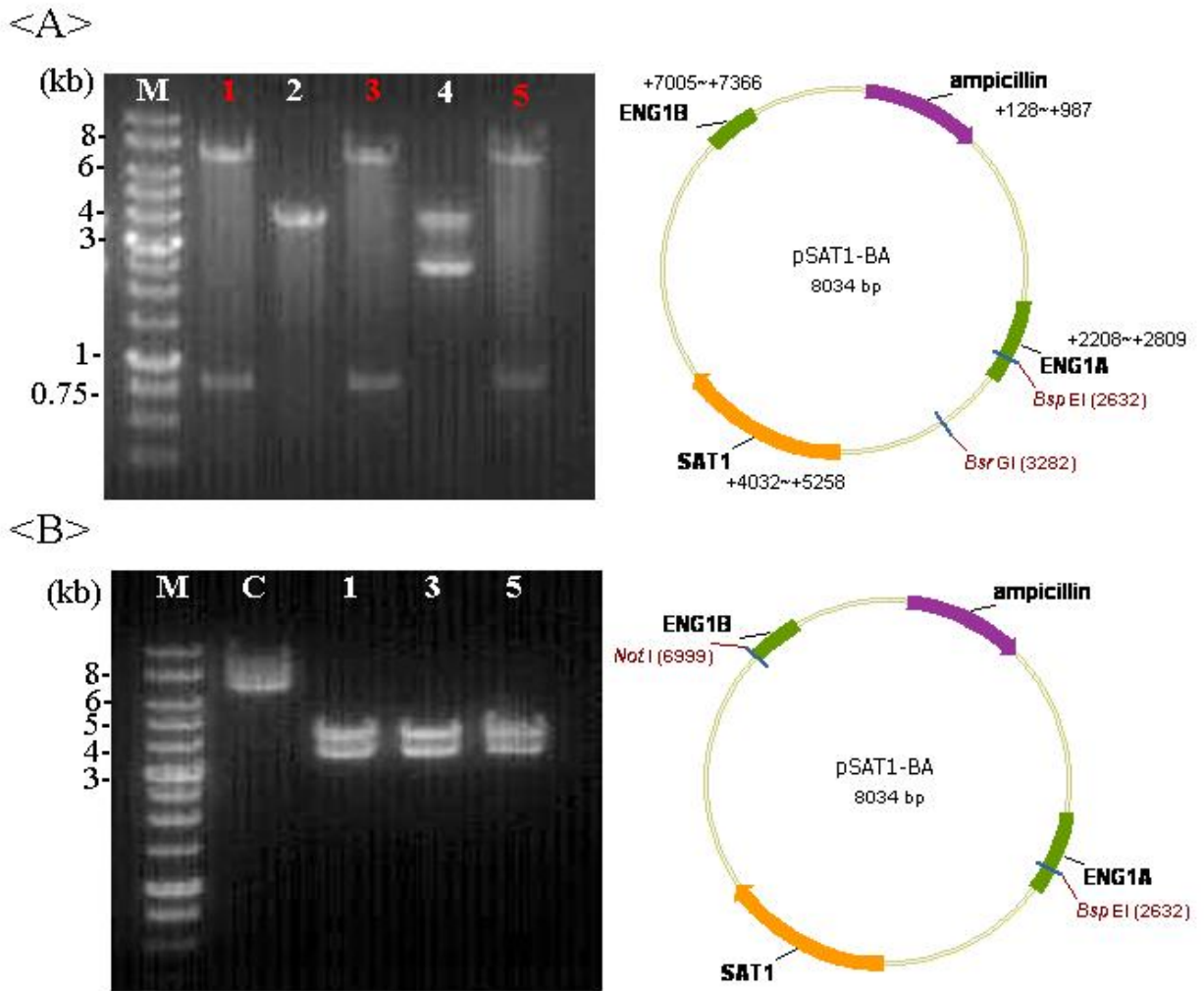
圖<A>利用同源重組置換 (homologous recombination) 方式將 *CaENGI* 上游片段 A (602 bp) 與下游片段 B (362 bp) 分別以 *Kpn* I、*Xho* I 與 *Not* I、*Sac* II 建構至帶有 *SAT1* flipper 之質體 pSFS2 而得質體 pSAT1-BA。將其經由 *Candida albicans* transformation 送入白色念珠菌中進行 *CaENGI* 同源重組置換。

圖以 nourseothricin 篩選出帶有 *SAT1* 篩選 marker 之菌株後，再經由 maltose 誘使 *SAT1* flipper pop-out。而後進行 PCR 及 replica plating 確認。

圖<C>為 *CaENGI* heterozygous knock-out 突變株。

圖<D>將 *SAT1* flipper 送入 *CaENGI* heterozygous knock-out 突變株中進行同源重組置換，經由前述同樣之篩選及確認方法，得到 *Caeng1* homozygous knock-out 突變株。

圖<E>將 *CaENGI* 上游 A 至下游 B 片段以 PCR 方式合成出來，建構於帶有 B region 之 *SAT1* flipper 上，將其送入 *Caeng1* homozygous knock-out 突變株中，經由前述同樣之篩選及確認方法，得到 *CaENGI* 補償之突變株 (rescued strain)。

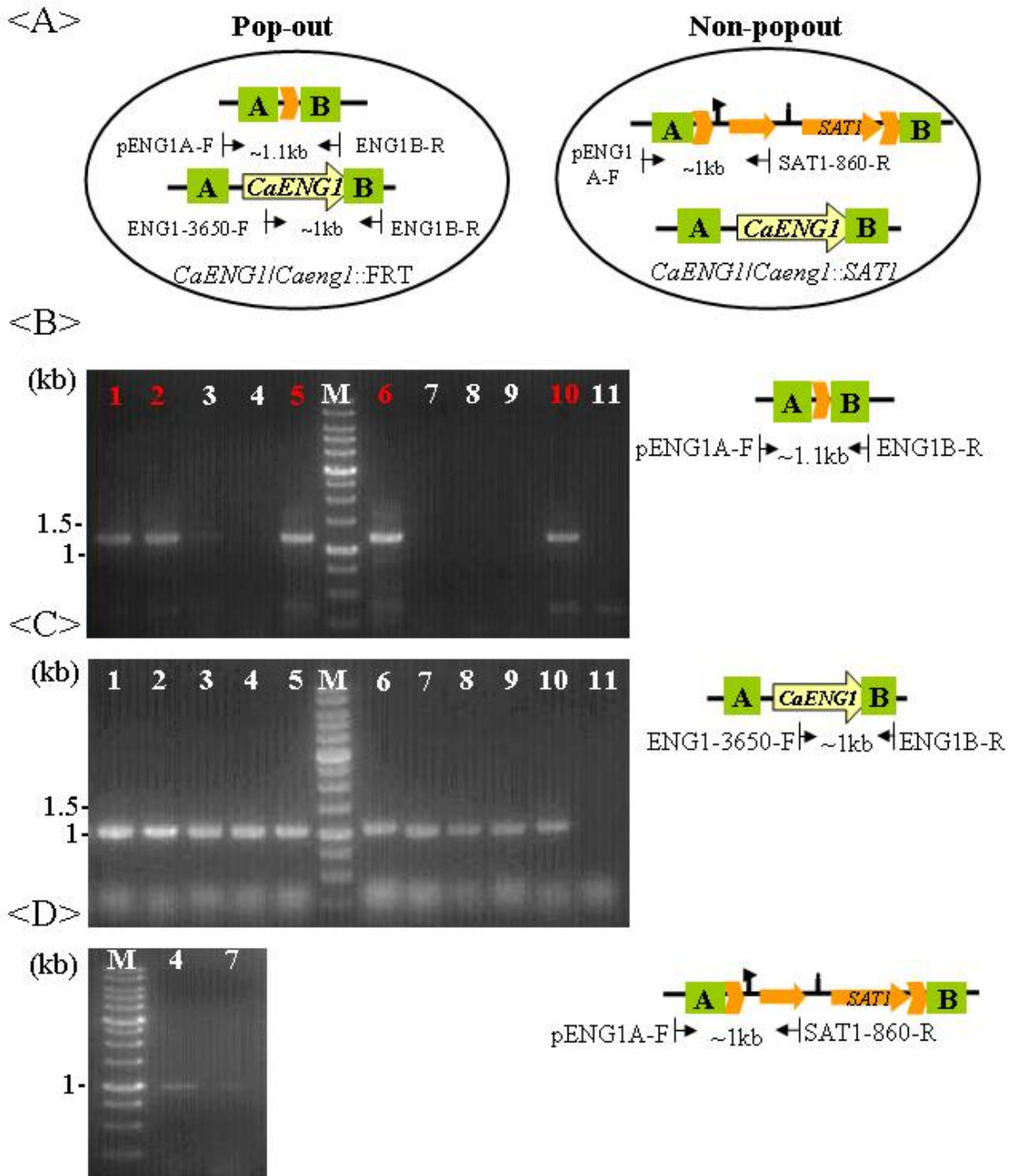


圖二、以限制酶確認 plasmid SAT1-BA

圖<A>以限制酶 *BsrG* I、*BstX* I 作用於質體 DNA，預計得到片段大小約為 7.2 kb 及 824 bp。Lane 1~5 為 pSAT1-BA candidates。紅色標示為限制酶作用質體 DNA 後符合預期之片段大小之 pSAT1-BA。

圖以限制酶 *BspE* I、*Not* I 作用於 pSAT1-BA，進行重複檢驗，預計得到片段大小約為 4.3 kb 及 3.7 kb。Lane C 為對照組 pSFS2，預計酵素作用後所得片段大小約為 7 kb。

Lane M 為 1 kb DNA marker



圖三、PCR 確認 *CaENG1* heterozygous knock-out 突變株

圖<A>*CaENG1* heterozygous knock-out 突變株於 *SAT1* flipper pop-out 及 non-popout 示意圖。

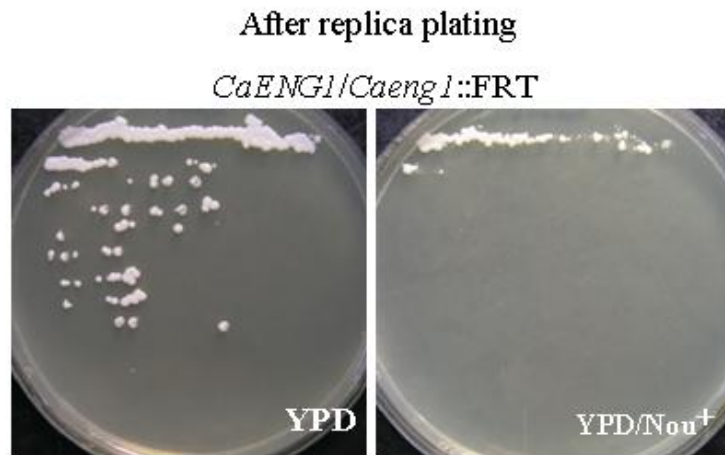
圖PCR 確認 *Caengl* 剔除之單套基因，預計得到片段為 1.1 kb，紅色標記為成功置換 *CaENG1* 且 *SAT1* 已 pop-out 之菌株。

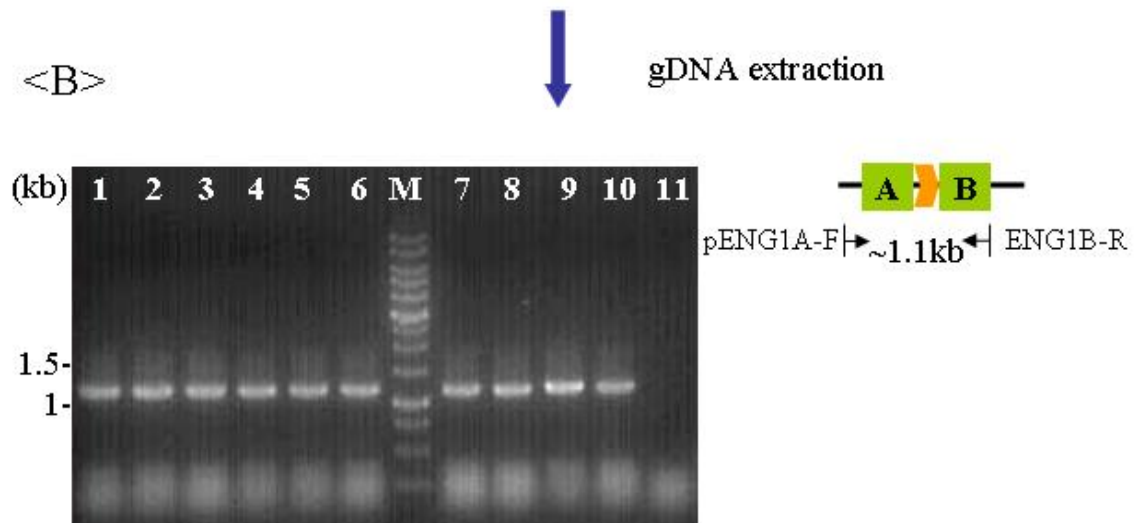
圖<C>PCR 確認 *CaENG1* wild type 之單套基因，預計片段大小為 1 kb。

圖<D>PCR 確認篩選標記 *SAT1* 插入正確的 genome 位置，預計片段大小為 1 kb。

Lane M 為 1 kb DNA marker

<A>



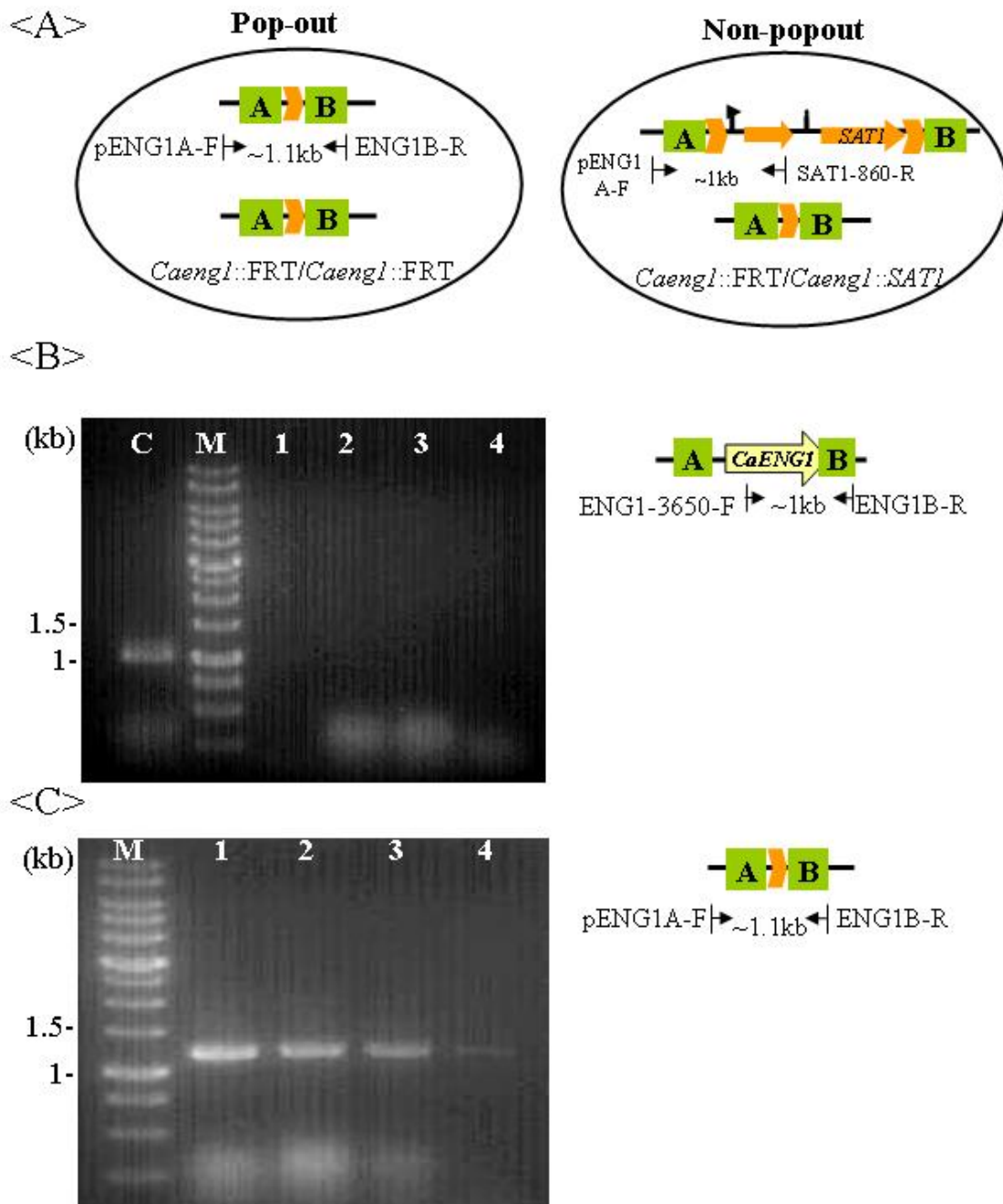


圖四、Replica plating 及 PCR 檢驗 *CaENG1* heterozygous knock-out 突變株

圖<A>將初步 PCR 確認之 *SATI* flipper pop-out 之菌株進行 replica plating，replica 後對照加藥及不加藥之 YPD 培養基，如於加藥培養基上無生長，相同位置於不加藥之 YPD 培養基上有生長，即可挑菌萃取 DNA，做進一步 PCR 確認。

圖PCR 確認 replica 後 *Caeng1* 剔除之單套基因，預計得到片段為 1.1 kb 。

Lane M 為 1 kb DNA marker



圖五、PCR 確認 *Caengl* homozygous knock-out 突變株

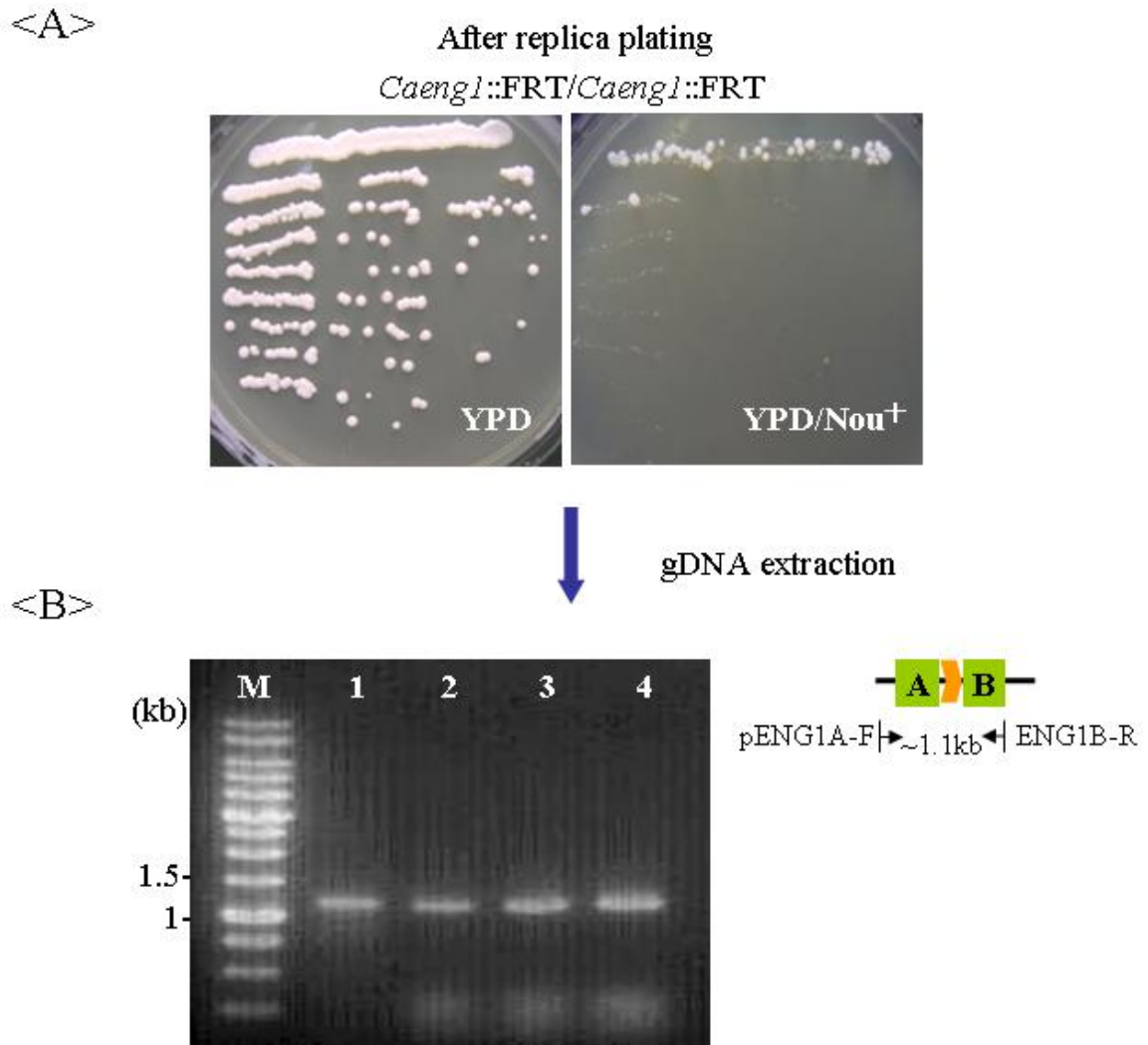
圖<A>*Caengl* homozygous knock-out 突變株於 *SAT1* flipper pop-out 及 non-popout 示意圖

圖PCR 確認 *CaENG1* wild type 之單套基因，預計片段大小為 1 kb ，如 *CaENG1* 雙套基因皆被剔除則無出現 PCR 產物。

Lane C 為 *CaENG1* heterozygous strain

圖<C>PCR 確認 *Caengl* 剔除之基因，預計得到片段為 1.1 kb 。

Lane M 為 1 kb DNA marker

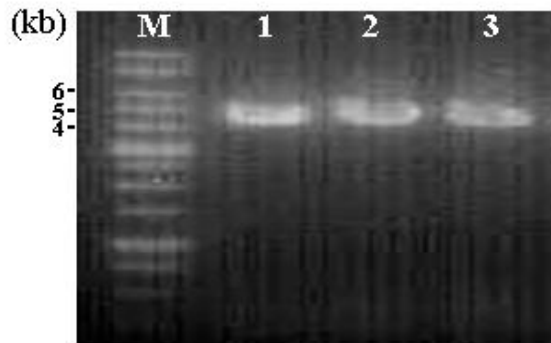
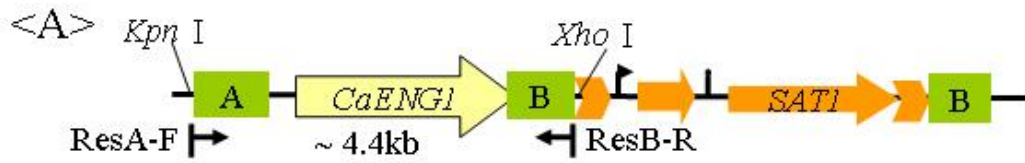


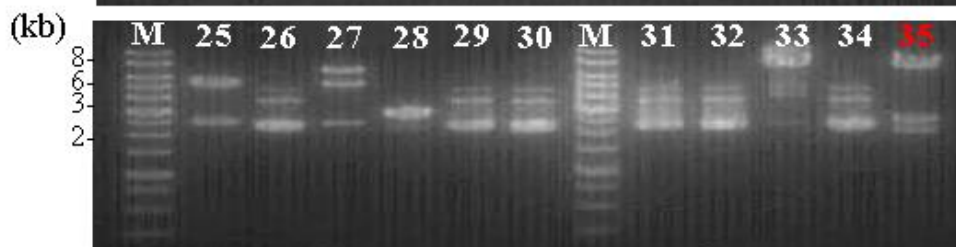
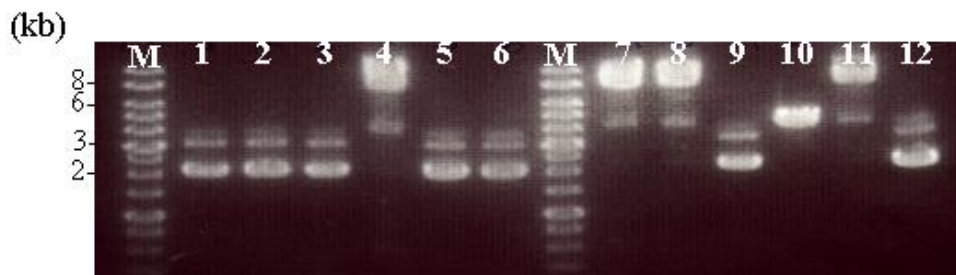
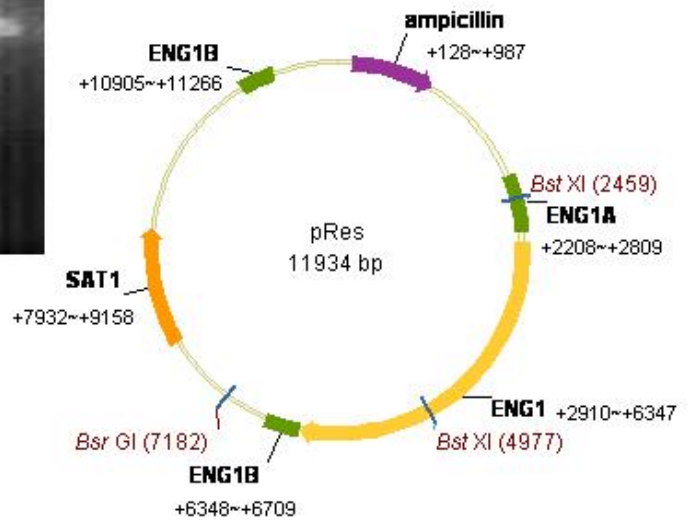
圖六、Replica plating 及 PCR 檢驗 *Caengl* homozygous knock-out 突變株

圖<A>將初步 PCR 確認之 *SAT1* flipper pop-out 之菌株進行 replica plating， replica 後對照加藥及不加藥之 YPD 培養基，如於加藥培養基上無生長，相同位置於不加藥之 YPD 培養基上有生長，即可挑菌萃取 DNA，做進一步 PCR 確認。

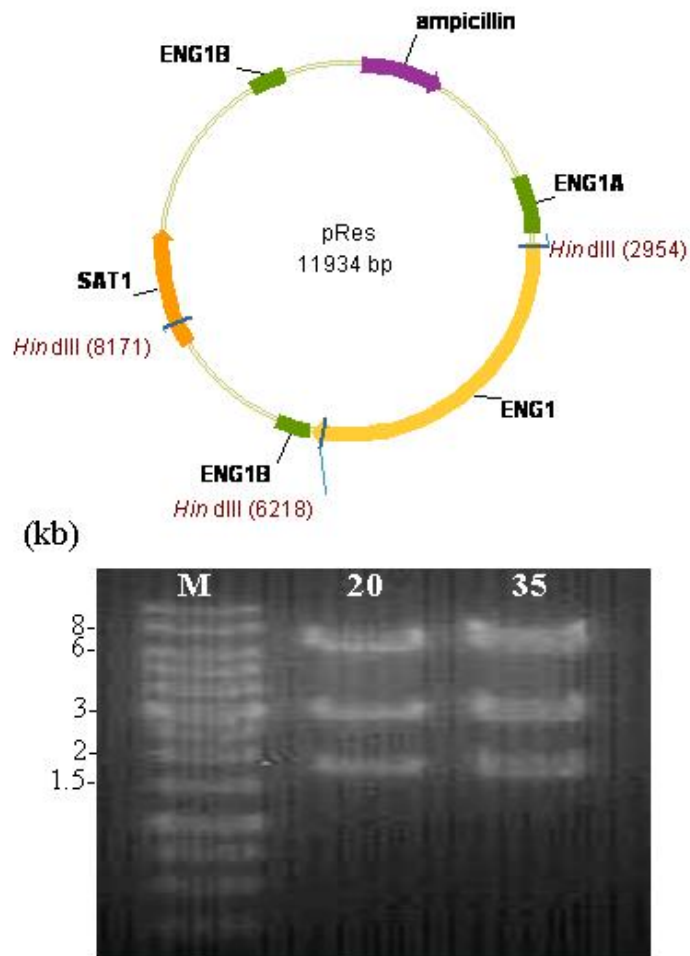
圖PCR 確認 replica 後 *Caengl* 剔除之雙套基因，預計得到片段為 1.1 kb。

Lane M 為 1 kb DNA marker





<C>



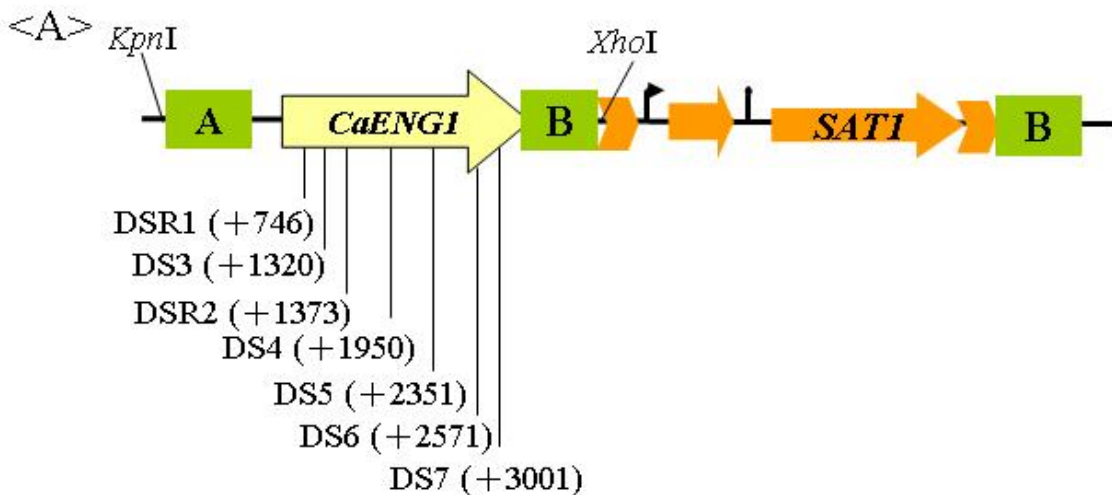
圖七、建構帶有 *CaENG1* ORF (open reading frame) 之質體

圖<A>以 PCR 合成 *CaENG1* 上游至下游片段，預計片段大小為 4.4 kb，經 *Kpn* I 及 *Xho* I 作用後，將其接合至質體 pSAT1-B，為帶有 *CaENG1* ORF 之質體 pRes。

圖將質體 pRes 1~35 candidates 以 *Bsr*G I、*Bst*X I 作用後，預計得到片段大小為 7.2 kb、2.5 kb、2.2 kb，紅色標記為 pRes 經限制酶作用後符合預期片段之質體。

圖<C>進行限制酶酵素重複檢驗，將 pRes 20、pRes 35 以 *Hind* III 作用後，預計得到片段大小為 6.8 kb、3.2 kb、1.9 kb。確認無誤之質體 pRes 20、pRes 35 再進一步定序分析。

Lane M 為 1 kb DNA marker



	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ENG1-af19.3006	(1) ATGC TTTTC AAAF CCG TATTAC TTA GCA CAC TAA TAGC CGTTC AAGC TTT GGC AGA GAA CCG GCT CAT CAA GAA ATC GTTACT GTTACT AAAA CTA CAC										
chr11-20	(1) ATGC TTTTC AAAF CCG TATTAC TTA GCA CAC TAA TAGC CGTTC AAGC TTT GGC AGA GAA CCG GCT CAT CAA GAA ATC GTTACT GTTACT AAAA CTA CAC										
Contig1616	(1) ATGC TTTTC AAAF CCG TATTAC TTA GCA CAC TAA TAGC CGTTC AAGC TTT GGC AGA GAA CCG GCT CAT CAA GAA ATC GTTACT GTTACT AAAA CTA CAC										
ENG1-af19.3006	(10) ATATAAG CAA CCC TTG CTTAG AAAA CTATGC TAAA AAG TTA TTA CCA AAC AAC CCA ACT GGA TAA CTA CTG GTA TAC CTA TAG TGA TAGI CTA CGC ACC										
chr11-20	(10) ATATAAG CAA CCC TTG CTTAG AAAA CTATGC TAAA AAG TTA TTA CCA AAC AAC CCA ACT GGA TAA CTA CTG GTA TAC CTA TAG TGA TAGI CTA CGC ACC										
Contig1616	(10) ATATAAG CAA CCC TTG CTTAG AAAA CTATGC TAAA AAG TTA TTA CCA AAC AAC CCA ACT GGA TAA CTA CTG GTA TAC CTA TAG TGA TAGI CTA CGC ACC										
ENG1-af19.3006	(20) ACBA CAA CCA GAC AAC CAA GTA AAG CAATCA GAAC TGC TAC AAC CAA CAC AAC TGT CAAA AAG CAC AAC ACAA CAC AAC AAA TAC AAGG GTCTCTTG TTA CCA										
chr11-20	(20) ACBA CAA CCA GAC AAC CAA GTA AAG CAATCA GAAC TGC TAC AAC CAA CAC AAC TGT CAAA AAG CAC AAC ACAA CAC AAC AAA TAC AAGG GTCTCTTG TTA CCA										
Contig1616	(20) ACBA CAA CCA GAC AAC CAA GTA AAG CAATCA GAAC TGC TAC AAC CAA CAC AAC TGT CAAA AAG CAC AAC ACAA CAC AAC AAA TAC AAGG GTCTCTTG TTA CCA										
ENG1-af19.3006	(30) GCCT CCATAC ATG ATACCC CAACTC CAACTG ATCAT ACTAAA AAT TACTGT CAC GAG CACT ACC ATATGC AAC CAAA AG GTGTGC ACT GTAAA AACTTTTT										
chr11-20	(30) GCCT CCATAC ATG ATACCC CAACTC CAACTG ATCAT ACTAAA AAT TACTGT CAC GAG CACT ACC ATATGC AAC CAAA AG GTGTGC ACT GTAAA AACTTTTT										
Contig1616	(30) GCCT CCATAC ATG ATACCC CAACTC CAACTG ATCAT ACTAAA AAT TACTGT CAC GAG CACT ACC ATATGC AAC CAAA AG GTGTGC ACT GTAAA AACTTTTT										
ENG1-af19.3006	(40) CCAC CAT AATTTCTC AAGTGA GTCTCCTACTACT ACT ACT ACA ACC AAA CAAA AAT GAA GAAA AGT CTATTTG CTG ATACAA AGT CTTTC ACTC ACAA AGC										
chr11-20	(40) CCAC CAT AATTTCTC AAGTGA GTCTCCTACTACT ACT ACT ACA ACC AAA CAAA AAT GAA GAAA AGT CTATTTG CTG ATACAA AGT CTTTC ACTC ACAA AGC										
Contig1616	(40) CCAC CAT AATTTCTC AAGTGA GTCTCCTACTACT ACT ACT ACA ACC AAA CAAA AAT GAA GAAA AGT CTATTTG CTG ATACAA AGT CTTTC ACTC ACAA AGC										
ENG1-af19.3006	(50) CCTC CCC AGCTCC AAT GGT GCT GTG ACPTT AAA GA CAA CTAGTGTG AAAA CTGC AACTACTAC CAC CTC AAC AGT HTT TAGTGTCTAC ATC TTT ACCGTCA										
chr11-20	(50) CCTC CCC AGCTCC AAT GGT GCT GTG ACPTT AAA GA CAA CTAGTGTG AAAA CTGC AACTACTAC CAC CTC AAC AGT HTT TAGTGTCTAC ATC TTT ACCGTCA										
Contig1616	(50) CCTC CCC AGCTCC AAT GGT GCT GTG ACPTT AAA GA CAA CTAGTGTG AAAA CTGC AACTACTAC CAC CTC AAC AGT HTT TAGTGTCTAC ATC TTT ACCGTCA										
ENG1-af19.3006	(60) ACGACTT ATAC ACCCTCC ACTTC CGPTTC CTT AGTCT CCA										
chr11-20	(60) ACGACTT ATAC ACCCTCC ACTTC CGPTTC CTT AGTCT CCA										
Contig1616	(60) ACGACTT ATAC ACCCTCC ACTTC CGPTTC CTT AGTCT CCA										
ENG1-af19.3006	(70) CAAC AAA GAAA AATCC AGT GAG CTC ACAGTC AGTT GTT AGC ACA ACT AAA ACT HTT TCC HTT AAC AAT CATT AATCACAG ATG CAGTTAC AAT TAC AAA										
chr11-20	(70) CAAC AAA GAAA AATCC AGT GAG CTC ACAGTC AGTT GTT AGC ACA ACT AAA ACT HTT TCC HTT AAC AAT CATT AATCACAG ATG CAGTTAC AAT TAC AAA										
Contig1616	(70) CAAC AAA GAAA AATCC AGT GAG CTC ACAGTC AGTT GTT AGC ACA ACT AAA ACT HTT TCC HTT AAC AAT CATT AATCACAG ATG CAGTTAC AAT TAC AAA										
ENG1-af19.3006	(80) GGAAGCA ACA ACTTTG CCA AAT TCT AAACACT CTT CCATT TTT ACCA ATG GGT CTATTT CCTTTAT ATC GACT AGTGTCTAAT AAGGT TAAA AGC ACT GTC										
chr11-20	(80) GGAAGCA ACA ACTTTG CCA AAT TCT AAACACT CTT CCATT TTT ACCA ATG GGT CTATTT CCTTTAT ATC GACT AGTGTCTAAT AAGGT TAAA AGC ACT GTC										
Contig1616	(80) GGAAGCA ACA ACTTTG CCA AAT TCT AAACACT CTT CCATT TTT ACCA ATG GGT CTATTT CCTTTAT ATC GACT AGTGTCTAAT AAGGT TAAA AGC ACT GTC										
ENG1-af19.3006	(90) ACAT CCG AT ATAT CAA AT AAT CAC AGA ATG GATCTAG CTT GAGTCTT ACTTC AACTAT AAA CAA TTAGCTTCC HTT ACG AACTCA AACTCTTAC AACA CA										
chr11-20	(90) ACAT CCG AT ATAT CAA AT AAT CAC AGA ATG GATCTAG CTT GAGTCTT ACTTC AACTAT AAA CAA TTAGCTTCC HTT ACG AACTCA AACTCTTAC AACA CA										
Contig1616	(90) ACAT CCG AT ATAT CAA AT AAT CAC AGA ATG GATCTAG CTT GAGTCTT ACTTC AACTAT AAA CAA TTAGCTTCC HTT ACG AACTCA AACTCTTAC AACA CA										

(91) 941 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 ENG1-0119.3066 (91) TTACCAAGCCTACTTC GTT GGT GCC AGATT CAGCTAC ACAAACTCATCGCGGTTGTC AAGTACTATGAGAAATT CTI CAG AAG AAT CCTCTAT GGT GCT
 ch 2-20 (91) TTACCAAGCCTACTTC GTT GGT GCC AGATT CAGCTAC ACAAACTCATCGCGGTTGTC AAGTACTATGAGAAATT CTI CAG AAG AAT CCTCTAT GGT GCT
 Cont 1616 (91) TTACCAAGCCTACTTC GTT GGT GCC AGATT CAGCTAC ACAAACTCATCGCGGTTGTC AAGTACTATGAGAAATT CTI CAG AAG AAT CCTCTAT GGT GCT

(101) 1041 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 ENG1-0119.3066 (101) TGAAAAATCGAGTCC AAATGGTTATCI AGC ACTT CAPTTTTAAATT CCI CAF CAATCGCMTCTACTAC AGAGTCTTCTGAATT AGC ATCF GCAACAACA
 ch 2-20 (101) TGAAAAATCGAGTCC AAATGGTTATCI AGC ACTT CAPTTTTAAATT CCI CAF CAATCGCMTCTACTAC AGAGTCTTCTGAATT AGC ATCF GCAACAACA
 Cont 1616 (101) TGAAAAATCGAGTCC AAATGGTTATCI AGC ACTT CAPTTTTAAATT CCI CAF CAATCGCMTCTACTAC AGAGTCTTCTGAATT AGC ATCF GCAACAACA

(111) 1141 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240
 ENG1-0119.3066 (111) TCFGATAGCF CACTTAACC ACAGTT CTT CCAAGTTCGTGAACTTAGCTC CAGTTT AAGCTCGGAAAGCC GACTCC AGTTC AAGTTCAGAAAAGTGTGAAA
 ch 2-20 (111) TCFGATAGCF CACTTAACC ACAGTT CTT CCAAGTTCGTGAACTTAGCTC CAGTTT AAGCTCGGAAAGCC GACTCC AGTTC AAGTTCAGAAAAGTGTGAAA
 Cont 1616 (111) TCFGATAGCF CACTTAACC ACAGTT CTT CCAAGTTCGTGAACTTAGCTC CAGTTT AAGCTCGGAAAGCC GACTCC AGTTC AAGTTCAGAAAAGTGTGAAA

(121) 1241 1250 1260 1270
 ENG1-0119.3066 (121) CAGGGTCTAGT GACGAAACTGCTAGCAATT
 ch 2-20 (121) CAGGGTCTAGT GACGAAACTGCTAGCAATT
 Cont 1616 (121) CAGGGTCTAGT GACGAAACTGCTAGCAATT

(125) 1285 1290 1300 1310 (127) 1271 1284
 ENG1-0119.3066 (125) T GTT CAAAGC AATAGATACC AACGCT ENG1-0119.3066 (127) ACTCAGGTGACTTG
 ch 2-20 (125) T GTT CAAAGC AATAGATACC AACGCT ch 2-20 (127) ACTCAGGTGACTTG
 Cont 1616 (125) T GTT CAAAGC AATAGATACC AACGCT Cont 1616 (127) ACTCAGGTGACTTG

(131) 1311 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410
 ENG1-0119.3066 (131) CACC AAC AGTTTT CGC AAG AAGTGA AATTCCTTTAACAATT CCI GCF GGT CTC GAC AAC AACGCTA AAC CAATTGGAACCAACA AATTTCTATAC CAATT
 ch 2-20 (131) CACC AAC AGTTTT CGC AAG AAGTGA AATTCCTTTAACAATT CCI GCF GGT CTC GAC AAC AACGCTA AAC CAATTGGAACCAACA AATTTCTATAC CAATT
 Cont 1616 (131) CACC AAC AGTTTT CGC AAG AAGTGA AATTCCTTTAACAATT CCI GCF GGT CTC GAC AAC AACGCTA AAC CAATTGGAACCAACA AATTTCTATAC CAATT

(141) 1411 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510
 ENG1-0119.3066 (141) ATTACTT GGC AAT CAAAGATTC ATG GTGTAT CCAATG CCAI ACGGACTTT ATT GGAAT A AAC AAGTTAATTATGG ATTTGCTGTC AACAAT AAT AAT GTA
 ch 2-20 (141) ATTACTT GGC AAT CAAAGATTC ATG GTGTAT CCAATG CCAI ACGGACTTT ATT GGAAT A AAC AAGTTAATTATGG ATTTGCTGTC AACAAT AAT AAT GTA
 Cont 1616 (141) ATTACTT GGC AAT CAAAGATTC ATG GTGTAT CCAATG CCAI ACGGACTTT ATT GGAAT A AAC AAGTTAATTATGG ATTTGCTGTC AACAAT AAT AAT GTA

(151) 1511 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 ENG1-0119.3066 (151) TCCGACA GAGTTTTT GAT CAA TAAACA CTAATATA TAA GGGAGTTGCTTC TTATTA CTTTAAC CCAACTAAC AAT GCF GAATTGATATTTT CTG CTA CAI
 ch 2-20 (151) TCCGACA GAGTTTTT GAT CAA TAAACA CTAATATA TAA GGGAGTTGCTTC TTATTA CTTTAAC CCAACTAAC AAT GCF GAATTGATATTTT CTG CTA CAI
 Cont 1616 (151) TCCGACA GAGTTTTT GAT CAA TAAACA CTAATATA TAA GGGAGTTGCTTC TTATTA CTTTAAC CCAACTAAC AAT GCF GAATTGATATTTT CTG CTA CAI

(161) 1611 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710
 ENG1-0119.3066 (161) CGTTTT TAAAGATTC AATGCATAT GAAAGT GTC CAAATG GCF GAATGTC F GCC TTG GTTA CATTAT CAA GTT CTT CCAATGATGAGTC TAATTAATT
 ch 2-20 (161) CGTTTT TAAAGATTC AATGCATAT GAAAGT GTC CAAATG GCF GAATGTC F GCC TTG GTTA CATTAT CAA GTT CTT CCAATGATGAGTC TAATTAATT
 Cont 1616 (161) CGTTTT TAAAGATTC AATGCATAT GAAAGT GTC CAAATG GCF GAATGTC F GCC TTG GTTA CATTAT CAA GTT CTT CCAATGATGAGTC TAATTAATT

(171) 1711 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790
 ENG1-0119.3066 (171) GGAATTT CCTTTAGTTC AAGGTATGGTTTT GTTACC GGATTT AT AACGGAAATTTGACTC CCTT GTTGAAATT CGTT GT
 ch 2-20 (171) GGAATTT CCTTTAGTTC AAGGTATGGTTTT GTTACC GGATTT AT AACGGAAATTTGACTC CCTT GTTGAAATT CGTT GT
 Cont 1616 (171) GGAATTT CCTTTAGTTC AAGGTATGGTTTT GTTACC GGATTT AT AACGGAAATTTGACTC CCTT GTTGAAATT CGTT GT

(179) 1791 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ENG1-0119.3066 (179) CCGAATT AAGATTTATCF CTT GAGACTCF GATGCTTTAATTA CCAATGTTTGA AAT ATCGTGTACT ATTT AT GAACAAATGTC AATGGTTGATTTAC
 ch 2-20 (179) CCGAATT AAGATTTATCF CTT GAGACTCF GATGCTTTAATTA CCAATGTTTGA AAT ATCGTGTACT ATTT AT GAACAAATGTC AATGGTTGATTTAC
 Cont 1616 (179) CCGAATT AAGATTTATCF CTT GAGACTCF GATGCTTTAATTA CCAATGTTTGA AAT ATCGTGTACT ATTT AT GAACAAATGTC AATGGTTGATTTAC

(189) 1891 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990
 ENG1-0119.3066 (189) GTTACATTAC CAGNTAAGNTACTGACTTTAAATT AGAGGT CGAAGATTI CTACAACIT AAAGGGATCC AAACCAATTI GAT GGATTATTI ATTC AAGTCG
 ch 2-20 (189) GTTACATTAC CAGNTAAGNTACTGACTTTAAATT AGAGGT CGAAGATTI CTACAACIT AAAGGGATCC AAACCAATTI GAT GGATTATTI ATTC AAGTCG
 Cont 1616 (189) GTTACATTAC CAGNTAAGNTACTGACTTTAAATT AGAGGT CGAAGATTI CTACAACIT AAAGGGATCC AAACCAATTI GAT GGATTATTI ATTC AAGTCG

(199) 1991 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090
 ENG1-0119.3066 (199) CAATGCTCCTGAAAGAT AATGAT AATGATAAGTACTAT GAT GCC GCF GCF GGT ATGTAC GTTACC GGTCCACTGTTCTGGGAAATGTAFC CCAGGGCAC
 ch 2-20 (199) CAATGCTCCTGAAAGAT AATGAT AATGATAAGTACTAT GAT GCC GCF GCF GGT ATGTAC GTTACC GGTCCACTGTTCTGGGAAATGTAFC CCAGGGCAC
 Cont 1616 (199) CAATGCTCCTGAAAGAT AATGAT AATGATAAGTACTAT GAT GCC GCF GCF GGT ATGTAC GTTACC GGTCCACTGTTCTGGGAAATGTAFC CCAGGGCAC

(209) 2091 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190
 ENG1-0119.3066 (209) AGCT GCT AGTTAT AAGTTC AGCTAC ACC ACF GCCG GTA AAT CTT CAF CCAAT AAC CAATTGT CTTTGCTTTI ACC ACATCATAT GGATTCATT AACGGT
 ch 2-20 (209) AGCT GCT AGTTAT AAGTTC AGCTAC ACC ACF GCCG GTA AAT CTT CAF CCAAT AAC CAATTGT CTTTGCTTTI ACC ACATCATAT GGATTCATT AACGGT
 Cont 1616 (209) AGCT GCT AGTTAT AAGTTC AGCTAC ACC ACF GCCG GTA AAT CTT CAF CCAAT AAC CAATTGT CTTTGCTTTI ACC ACATCATAT GGATTCATT AACGGT

2191 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290
 ENG1-0119.3036 (219) **TC TCG CTC TTGATG CATTGA CTG GTATTA CAGTTAC ATC TAC TAC TAAAGG TGAAT GAC CGG TTTT TTAACA AAT GAATTG GAATTT AGT GAAA CAATTA**
 04-20 (219) **TC TCG CTC TTGATG CATTGA CTG GTATTA CAGTTAC ATC TAC TAC TAAAGG TGAAT GAC CGG TTTT TTAACA AAT GAATTG GAATTT AGT GAAA CAATTA**
 04-20 (219) **TC TCG CTC TTGATG CATTGA CTG GTATTA CAGTTAC ATC TAC TAC TAAAGG TGAAT GAC CGG TTTT TTAACA AAT GAATTG GAATTT AGT GAAA CAATTA**

2291 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390
 ENG1-0119.3036 (229) **ATCAAGACGT GGAATT CTT GCC ATG GAC AGA AAT ATG ACAGGT AGTTG ACCTAC ACT AAGG ATC AAT TAG AAT TAT TAG CTAGTG CTGCTAACAAAG**
 04-20 (229) **ATCAAGACGT GGAATT CTT GCC ATG GAC AGA AAT ATG ACAGGT AGTTG ACCTAC ACT AAGG ATC AAT TAG AAT TAT TAG CTAGTG CTGCTAACAAAG**
 04-20 (229) **ATCAAGACGT GGAATT CTT GCC ATG GAC AGA AAT ATG ACAGGT AGTTG ACCTAC ACT AAGG ATC AAT TAG AAT TAT TAG CTAGTG CTGCTAACAAAG**

2391 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490
 ENG1-0119.3036 (239) **ATG GCG ACAAAT ATG GCF GCAACAGTG AAG AAT ATG AACT CT A AT TTTT CAG GAA AAGT CTTGAC AAGT ATGCTCAAAT AT TTTG GTG GTT AGT**
 04-20 (239) **ATG GCG ACAAAT ATG GCF GCAACAGTG AAG AAT ATG AACT CT A AT TTTT CAG GAA AAGT CTTGAC AAGT ATGCTCAAAT AT TTTG GTG GTT AGT**
 04-20 (239) **ATG GCG ACAAAT ATG GCF GCAACAGTG AAG AAT ATG AACT CT A AT TTTT CAG GAA AAGT CTTGAC AAGT ATGCTCAAAT AT TTTG GTG GTT AGT**

2491 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590
 ENG1-0119.3036 (249) **GAAATCATAC AGG ATG AAG AAGTTACCA AAG ATGC CTT AAACGC AAT GAAGGATGC CTTTAAAGTTTC ACG CAG AAC AAACAAT ACTATC CATTGATGT**
 04-20 (249) **GAAATCATAC AGG ATG AAG AAGTTACCA AAG ATGC CTT AAACGC AAT GAAGGATGC CTTTAAAGTTTC ACG CAG AAC AAACAAT ACTATC CATTGATGT**
 04-20 (249) **GAAATCATAC AGG ATG AAG AAGTTACCA AAG ATGC CTT AAACGC AAT GAAGGATGC CTTTAAAGTTTC ACG CAG AAC AAACAAT ACTATC CATTGATGT**

2591 2600 2610
 ENG1-0119.3036 (259) **AT GAT ACTAA ATTTG GT GGA**
 04-20 (259) **AT GAT ACTAA ATTTG GT GGA**
 04-20 (259) **AT GAT ACTAA ATTTG GT GGA**

2611 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710
 ENG1-0119.3036 (261) **GTAA CGT CAACAT CTG CTC AAG ACG GCG ATC CAAACGCTG AITTTGGCTCTGC ATATTATAC GAC CAC GATTC CATTAT GGT ACTTTATTC ACGCTG**
 04-20 (261) **GTAA CGT CAACAT CTG CTC AAG ACG GCG ATC CAAACGCTG AITTTGGCTCTGC ATATTATAC GAC CAC GATTC CATTAT GGT ACTTTATTC ACGCTG**
 04-20 (261) **GTAA CGT CAACAT CTG CTC AAG ACG GCG ATC CAAACGCTG AITTTGGCTCTGC ATATTATAC GAC CAC GATTC CATTAT GGT ACTTTATTC ACGCTG**

2711 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810
 ENG1-0119.3036 (271) **CAGC CAT AGTTGGTTACGT CGATAAGAA ATT AGGT GGT ACTTGGGCT CAAAGT AAT AAGGACT GGGTGAACI CTTTATGTAAGAG C GCTTC GAATCCTTC**
 04-20 (271) **CAGC CAT AGTTGGTTACGT CGATAAGAA ATT AGGT GGT ACTTGGGCT CAAAGT AAT AAGGACT GGGTGAACI CTTTATGTAAGAG C GCTTC GAATCCTTC**
 04-20 (271) **CAGC CAT AGTTGGTTACGT CGATAAGAA ATT AGGT GGT ACTTGGGCT CAAAGT AAT AAGGACT GGGTGAACI CTTTATGTAAGAG C GCTTC GAATCCTTC**

2811 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910
 ENG1-0119.3036 (281) **TGCC GAT GAT ACTTATTTCC CCF GTTTC AAGA ATGTTG ACF GGTTCI CTGGC CMTT CAI GGGC AACTGGTTI GTT CGI CACTTACAAGAAC MTI GAATCA**
 04-20 (281) **TGCC GAT GAT ACTTATTTCC CCF GTTTC AAGA ATGTTG ACF GGTTCI CTGGC CMTT CAI GGGC AACTGGTTI GTT CGI CACTTACAAGAAC MTI GAATCA**
 04-20 (281) **TGCC GAT GAT ACTTATTTCC CCF GTTTC AAGA ATGTTG ACF GGTTCI CTGGC CMTT CAI GGGC AACTGGTTI GTT CGI CACTTACAAGAAC MTI GAATCA**

2911 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010
 ENG1-0119.3036 (291) **AGTT CCG AAT CATTAC ATTTGCTGCTGCTAT A A A AT TTTG GGGTAAAGT AGT CCGTGATCAATCG ATG GAA GCA AAGAGGT GGT TTTG ATG ATTT CCATTA**
 04-20 (291) **AGTT CCG AAT CATTAC ATTTGCTGCTGCTAT A A A AT TTTG GGGTAAAGT AGT CCGTGATCAATCG ATG GAA GCA AAGAGGT GGT TTTG ATG ATTT CCATTA**
 04-20 (291) **AGTT CCG AAT CATTAC ATTTGCTGCTGCTAT A A A AT TTTG GGGTAAAGT AGT CCGTGATCAATCG ATG GAA GCA AAGAGGT GGT TTTG ATG ATTT CCATTA**

3011 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110
 ENG1-0119.3036 (301) **TGGC ACGTTCCTTT AAC ATGTAATTTCTACT ATAAAT CAG AT AACTGTT GGAACC AAAACAATTTTACCA AACC AAGTCACTGCTATATATTTT CGAGAA**
 04-20 (301) **TGGC ACGTTCCTTT AAC ATGTAATTTCTACT ATAAAT CAG AT AACTGTT GGAACC AAAACAATTTTACCA AACC AAGTCACTGCTATATATTTT CGAGAA**
 04-20 (301) **TGGC ACGTTCCTTT AAC ATGTAATTTCTACT ATAAAT CAG AT AACTGTT GGAACC AAAACAATTTTACCA AACC AAGTCACTGCTATATATTTT CGAGAA**

3111 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210
 ENG1-0119.3036 (311) **TAAAGTT GAT TACACTACATCTTTGGAAC ACC AGCTGATCATCCAGAATAT GTC CAI GGTATCC ATATGCTTC CAAT TAC ACCTTC CTC ATCGTTG GTT**
 04-20 (311) **TAAAGTT GAT TACACTACATCTTTGGAAC ACC AGCTGATCATCCAGAATAT GTC CAI GGTATCC ATATGCTTC CAAT TAC ACCTTC CTC ATCGTTG GTT**
 04-20 (311) **TAAAGTT GAT TACACTACATCTTTGGAAC ACC AGCTGATCATCCAGAATAT GTC CAI GGTATCC ATATGCTTC CAAT TAC ACCTTC CTC ATCGTTG GTT**

3211 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310
 ENG1-0119.3036 (321) **AGAAAGACTT CTTACGTTCAAGAAGA ATGG AAGAT CAA AT TTTGCTGCTTTATTG ATATGTTGATAGTGGCTG GACI GGT MT TTTGAGATTA AACC AAG**
 04-20 (321) **AGAAAGACTT CTTACGTTCAAGAAGA ATGG AAGAT CAA AT TTTGCTGCTTTATTG ATATGTTGATAGTGGCTG GACI GGT MT TTTGAGATTA AACC AAG**
 04-20 (321) **AGAAAGACTT CTTACGTTCAAGAAGA ATGG AAGAT CAA AT TTTGCTGCTTTATTG ATATGTTGATAGTGGCTG GACI GGT MT TTTGAGATTA AACC AAG**

3311 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410
 ENG1-0119.3036 (331) **CTTT ATTTGATCCP AAATCATCATAT GAAT TTTT TTTGCAI CAA AT AACTG GAGTACAAAGTGGTT AGAT AAT GGT CAAAGT AAGAACTT GGAATTT GGCCTT**
 04-20 (331) **CTTT ATTTGATCCP AAATCATCATAT GAAT TTTT TTTGCAI CAA AT AACTG GAGTACAAAGTGGTT AGAT AAT GGT CAAAGT AAGAACTT GGAATTT GGCCTT**
 04-20 (331) **CTTT ATTTGATCCP AAATCATCATAT GAAT TTTT TTTGCAI CAA AT AACTG GAGTACAAAGTGGTT AGAT AAT GGT CAAAGT AAGAACTT GGAATTT GGCCTT**

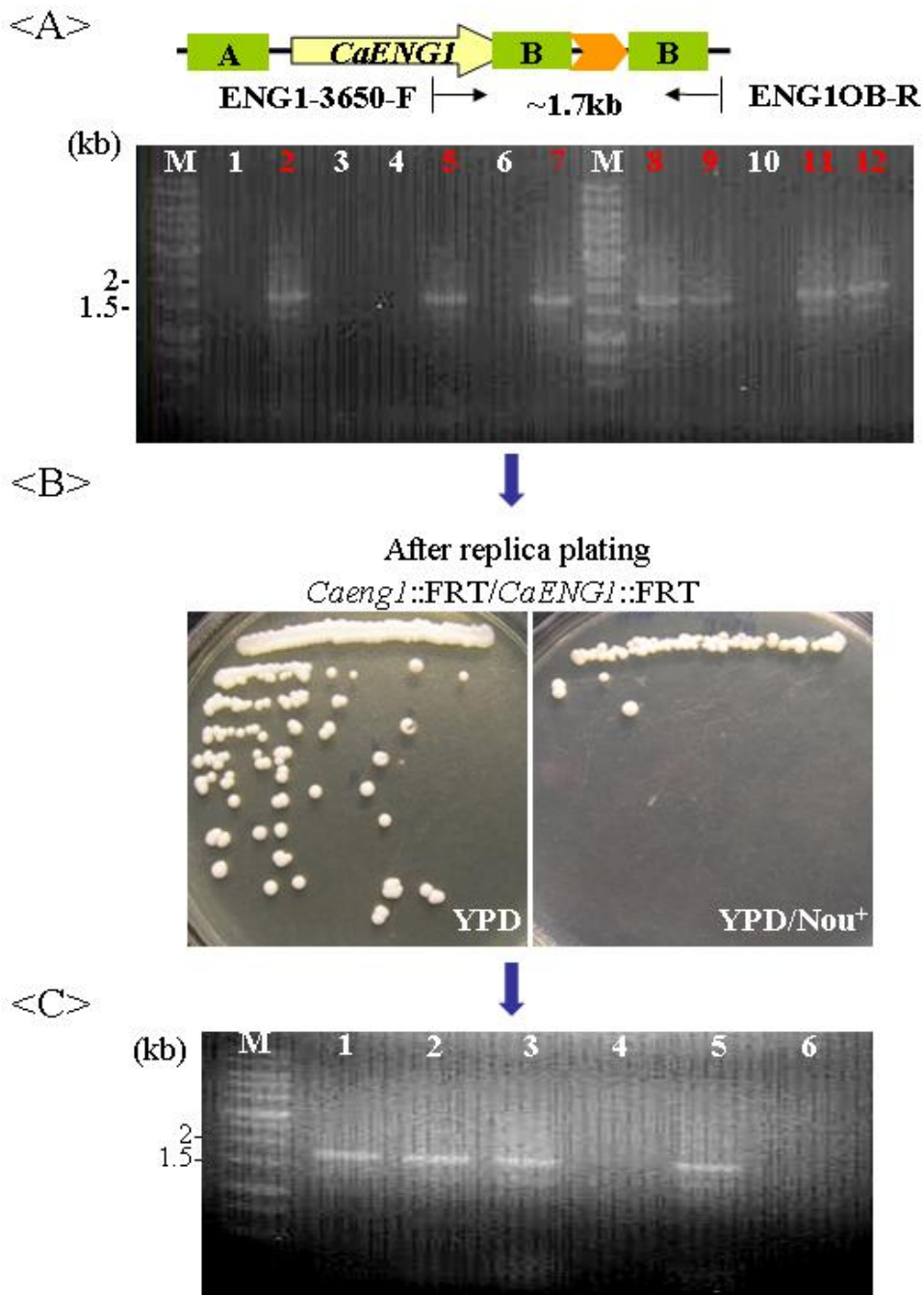
3411 3420 3430
 ENG1-0119.3036 (341) **TGCTGCTGGT GCT CTC AATGCTAGTT AG**
 04-20 (341) **TGCTGCTGGT GCT CTC AATGCTAGTT AG**
 04-20 (341) **TGCTGCTGGT GCT CTC AATGCTAGTT AG**

圖八、質體 pRes 20 中 *CaENGI* 之定序結果

圖<A>圖示以設計不同引子及各引子於 *CaENGI* 上之起始位置，定序質體 pRes 20 中 *CaENGI* 之序列。

圖 Res 20 中 *CaENGI* 之定序結果。結果顯示於 *CaENGI* 位置 +2797 及 +2863 各有 C→T、T→C 之突變。而此兩位置轉譯出之胺基酸仍為 Asp 及 Gly。其序列轉譯出之蛋白質不變，故將 pRes 20 以 *Kpn* I 及 *Xho* I 作用後，進行 *C. albicans* transformation，補償 *CaENGI* 之功能。





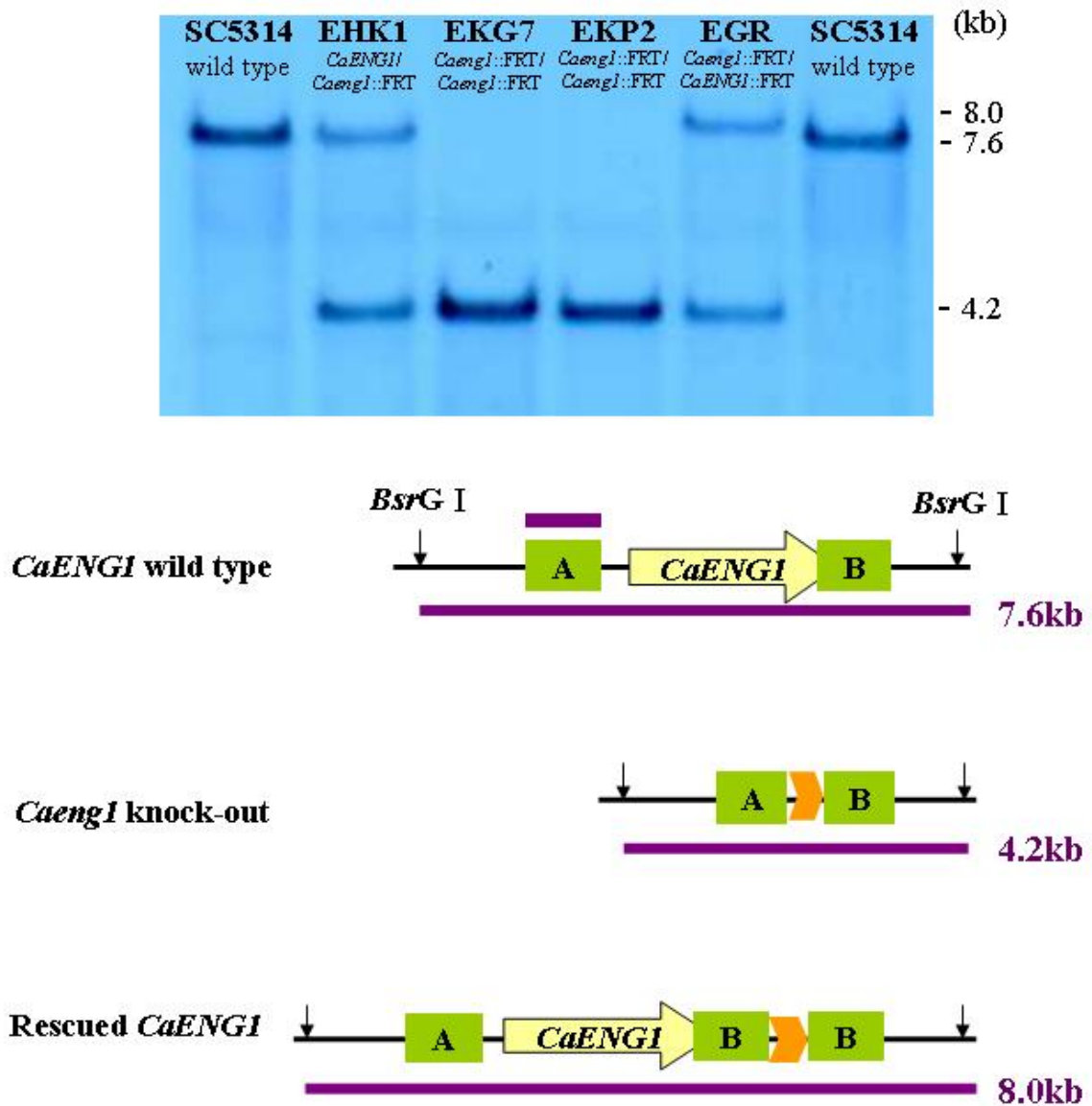
圖九、PCR 及 Replica plating 確認 *CaENGI* rescued 突變株

圖<A>將 *SATI* flipper pop-out 後之菌株做初步 PCR 確認，以 ENG1-3650-F 及 B region 下游之 ENG1OB-R 來進行 PCR，預期得到片段大小約為 1.7 kb。紅色標記為符合預期片段之菌株。

圖將 PCR 初步確認之菌株進行 replica plating。

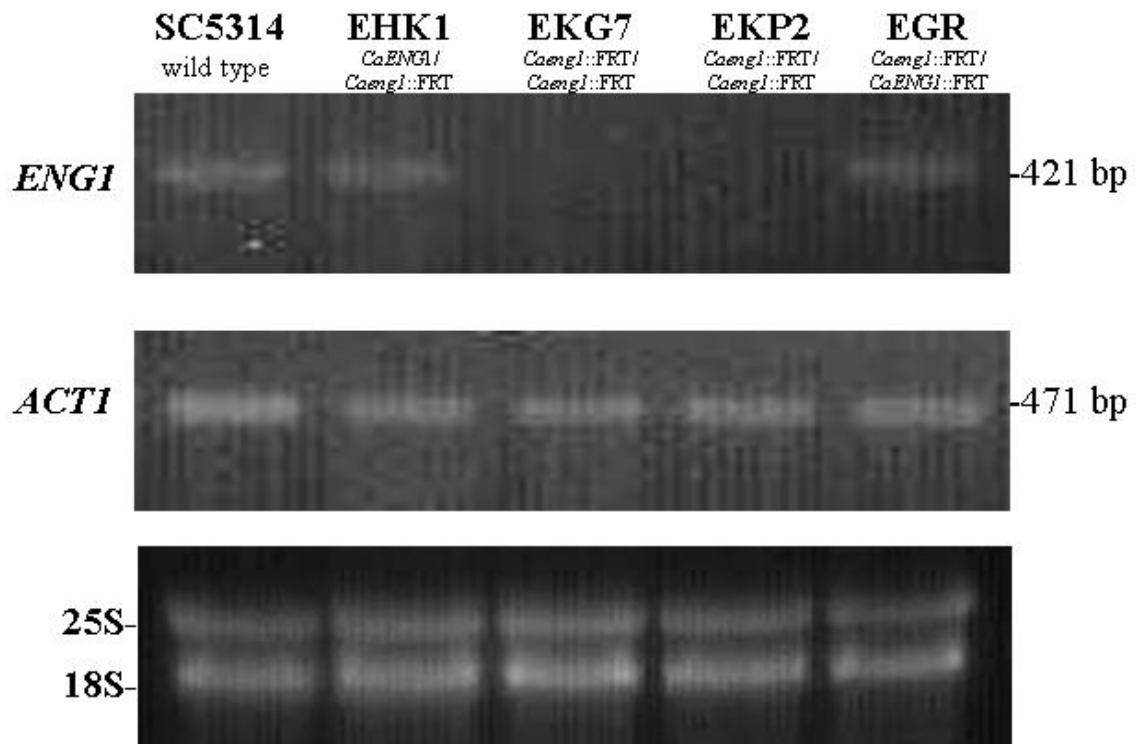
圖<C>PCR 重覆確認 replica 後 *SATI* flipper 已 pop-out 之菌株，*CaENGI* 已補償回去之單套基因，預計 PCR 確認得到預期片段約為 1.7 kb。

Lane M 為 1 kb DNA marker



圖十、南方點墨法 (Southern blot) 分析 *Caeng1* 之突變株

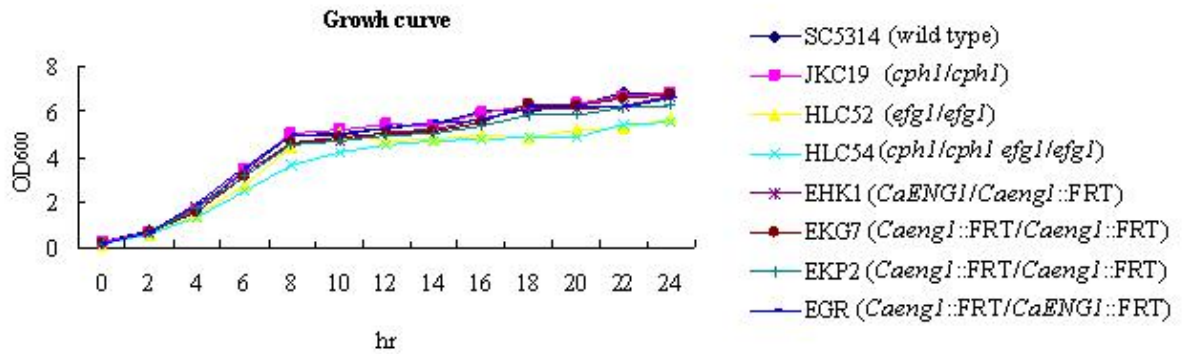
以 *CaENG1* 上游之 A region 為 probe, *BsrG* I 作用於各菌株之 gDNA, 將 DNA 轉漬至耐龍膜上, 免疫偵測後可得預期片段 *CaENG1* wild type 基因大小約為 7.6 kb, 補償 *CaENG1* 單套基因可得片段約 8.0 kb, *Caeng1* 剔除之片段約為 4.2 kb。SC5314 為野生株 (wild type) (*CaENG1*/*CaENG1*), EHK1 為 *CaENG1* 之 heterozygous strain (*CaENG1*/*Caeng1*::FRT), EKG7 及 EKP2 均為 *Caeng1* 雙套剔除之突變株 (*Caeng1*::FRT/*Caeng1*::FRT), EGR 為補償單套 *CaENG1* 之 rescued strain (*Caeng1*::FRT/*CaENG1*::FRT)。

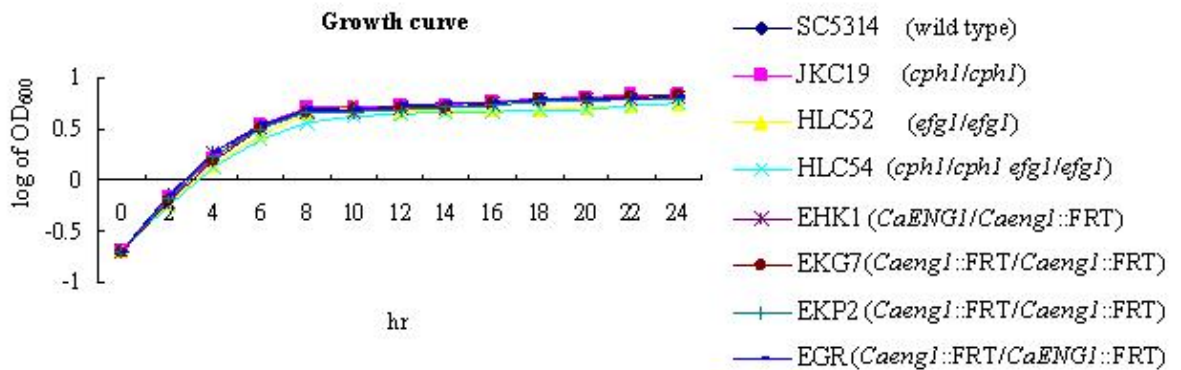


圖十一、利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 檢驗 *Caeng1* 之突變株

以傳統法萃取各菌株之 RNA，設計引子 FN-F、FN-R 合成出 *CaENG1* 中之 421 bp 片段 (nt +2871 至 nt +3268)，藉以偵測 *CaENG1* 之 RNA 表現量。*CaACT1* 為 internal control，以 ACT1-F、ACT1-R 合成出 471 bp 之片段 (nt +1120 至 nt +1571)。SC5314 為野生株 (wild type) (*CaENG1*/*CaENG1*)，EHK1 為 *CaENG1* 之 heterozygous strain (*CaENG1*/*Caeng1::FRT*)，EKG7 及 EKP2 均為 *Caeng1* 雙套剔除之突變株 (*Caeng1::FRT*/*Caeng1::FRT*)，EGR 為補償單套 *CaENG1* 之 rescued strain (*Caeng1::FRT*/*CaENG1::FRT*)。

<A>





圖十二、*CaENGI* 各突變株在 YPD 培養液之生長曲線

圖<A>為比較各菌株於 YPD 培養液中轉養 0~24 小時的生長數值之曲線圖。

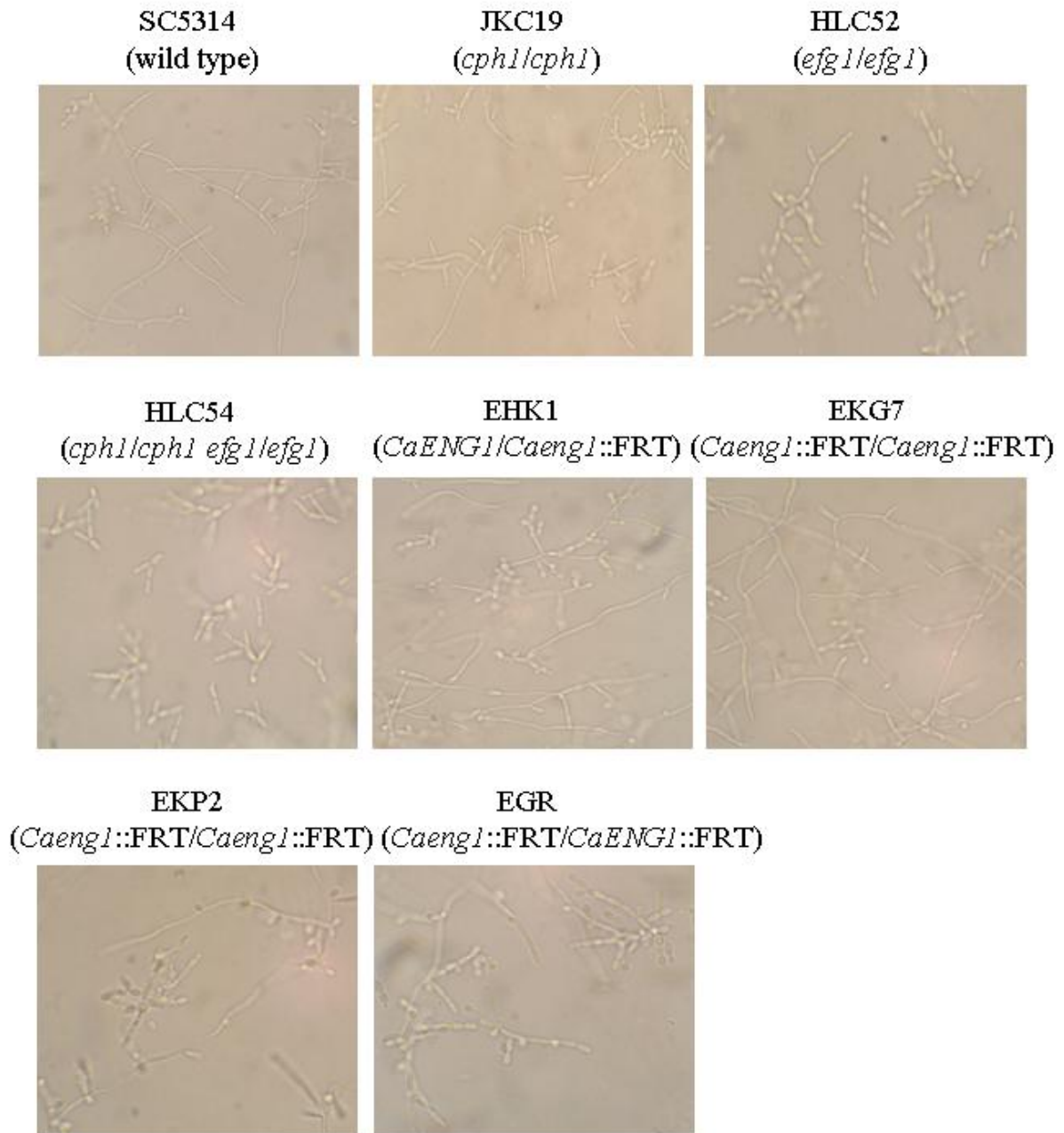
圖取各菌株在 YPD 培養液中轉養 0~24 小時的生長數值之對數而成的

生長曲線。實驗菌株如下：SC5314 (wild type)、JKC19 (*cph1/cph1*)、

HLC52 (*efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、EHK1

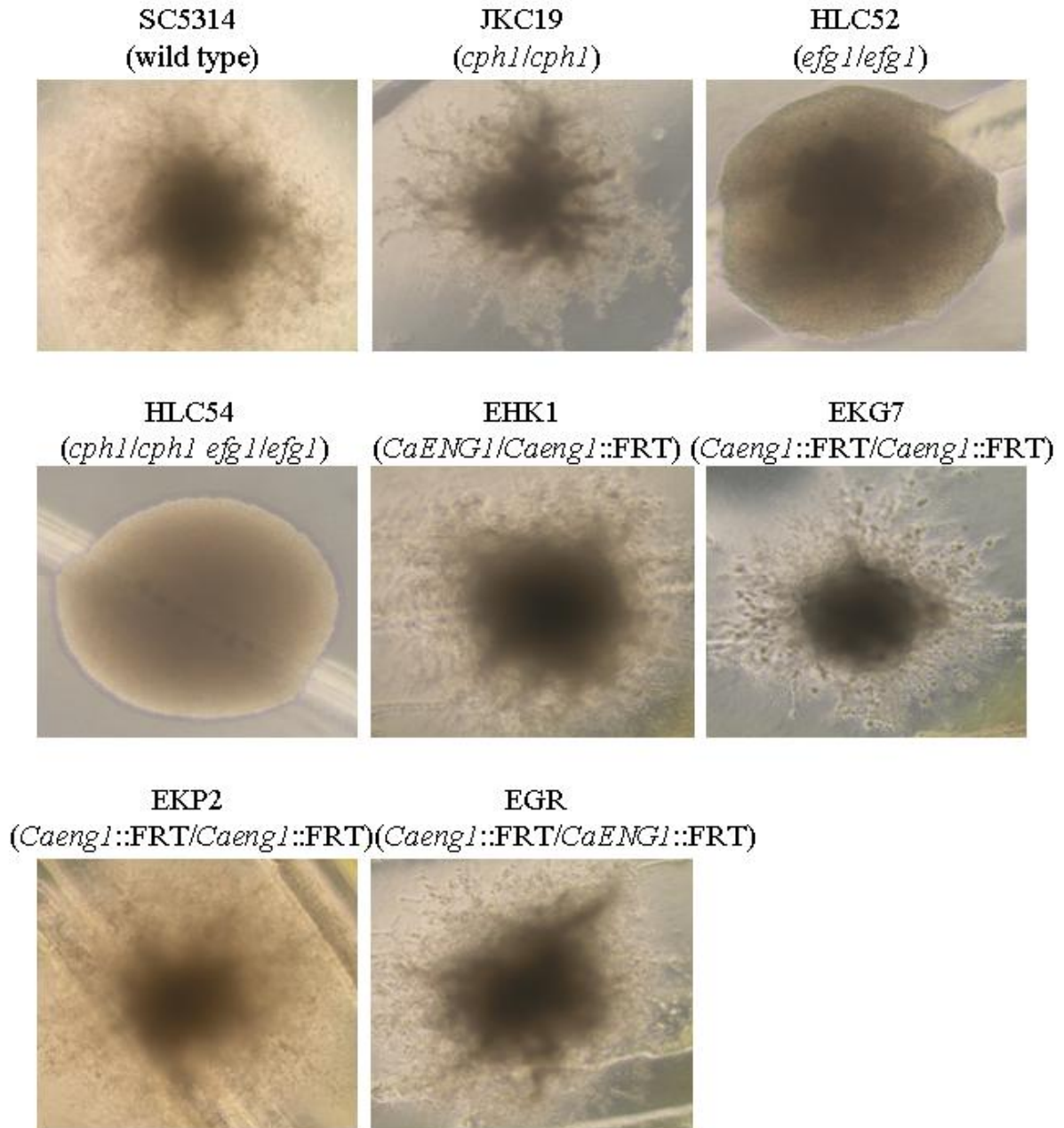
(*CaENGI/Caeng1::FRT*)、EKG7 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EKP2

(*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EGR (*Caeng1::FRT/CaENGI::FRT*)。



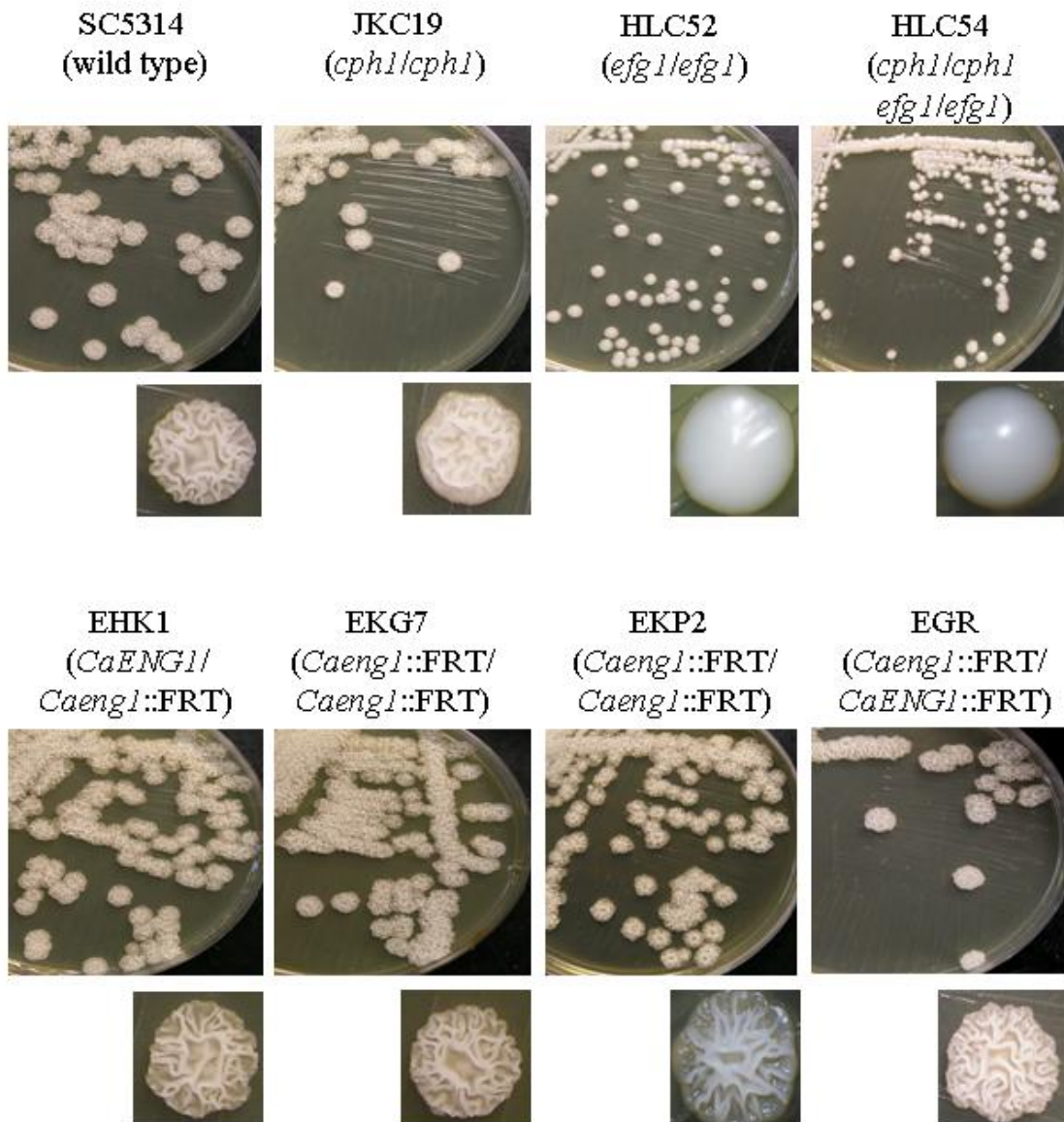
圖十三、芽管試驗 (germ tube assay)

培養 *CaENG1* 各突變株於含 10% 山羊血清之 YPD 培養液，37 °C 培養五小時後，於倒立式顯微鏡下觀察芽管之生成情形。以 SC5314 及 HLC54 作為正負對照。實驗菌株如下：SC5314 (wild type)、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、EHK1 (*CaENG1/Caengl::FRT*)、EKG7 (*Caengl::FRT/Caengl::FRT*)、EKP2 (*Caengl::FRT/Caengl::FRT*)、EGR (*Caengl::FRT/CaENG1::FRT*)。



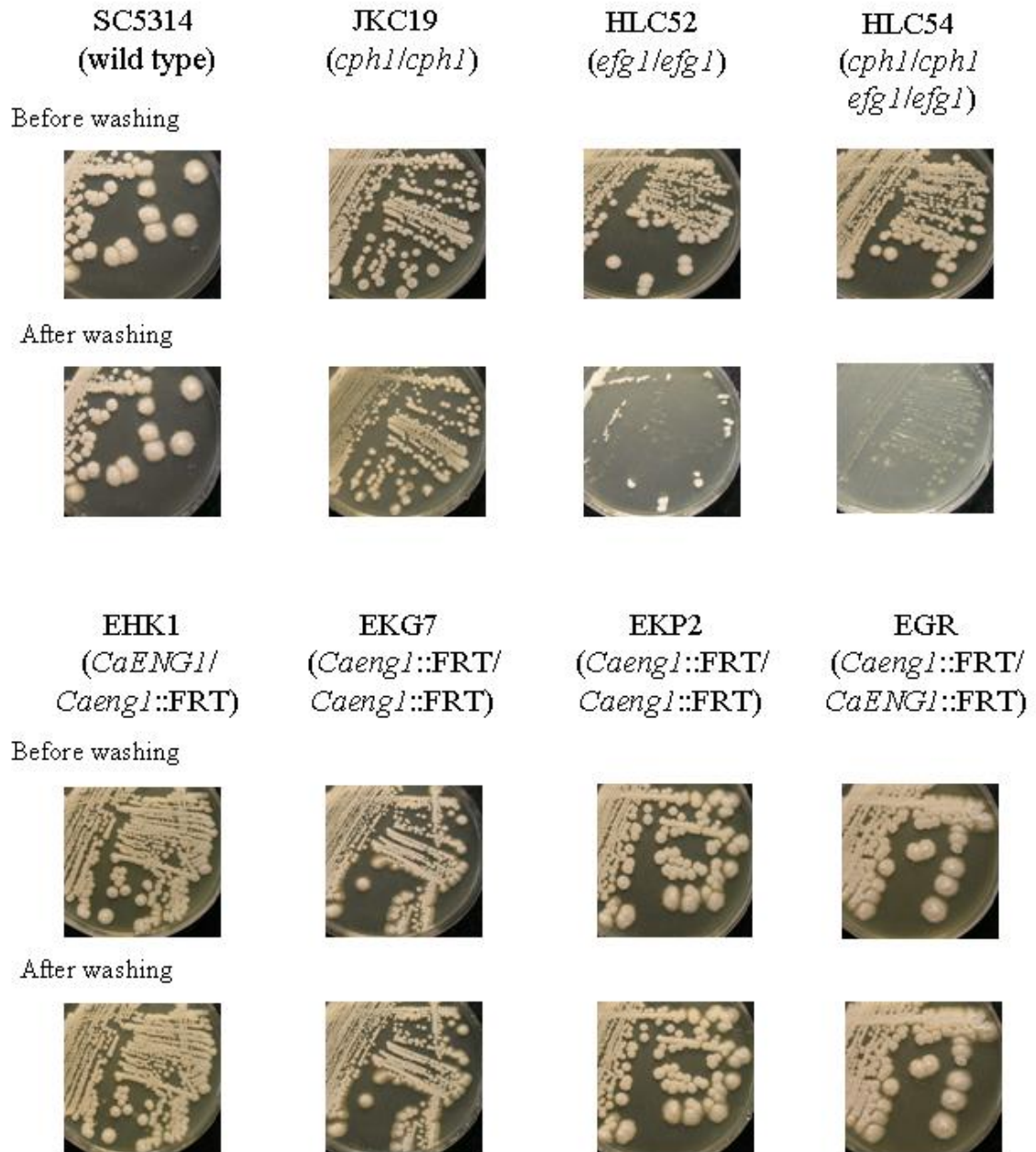
圖十四、*CaENG1* 各突變株於含 4%山羊血清的 Bacto-agar 培養基之菌落型態

CaENG1 各突變株於含 4%山羊血清之 Bacto-agar 培養基、37 °C 培養七天後，於倒立式顯微鏡下觀察菌絲生成之情形。以 SC5314 及 HLC54 作為正負對照。實驗菌株如下：SC5314 (wild type)、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、EHK1 (*CaENG1/Caeng1::FRT*)、EKG7 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*)。



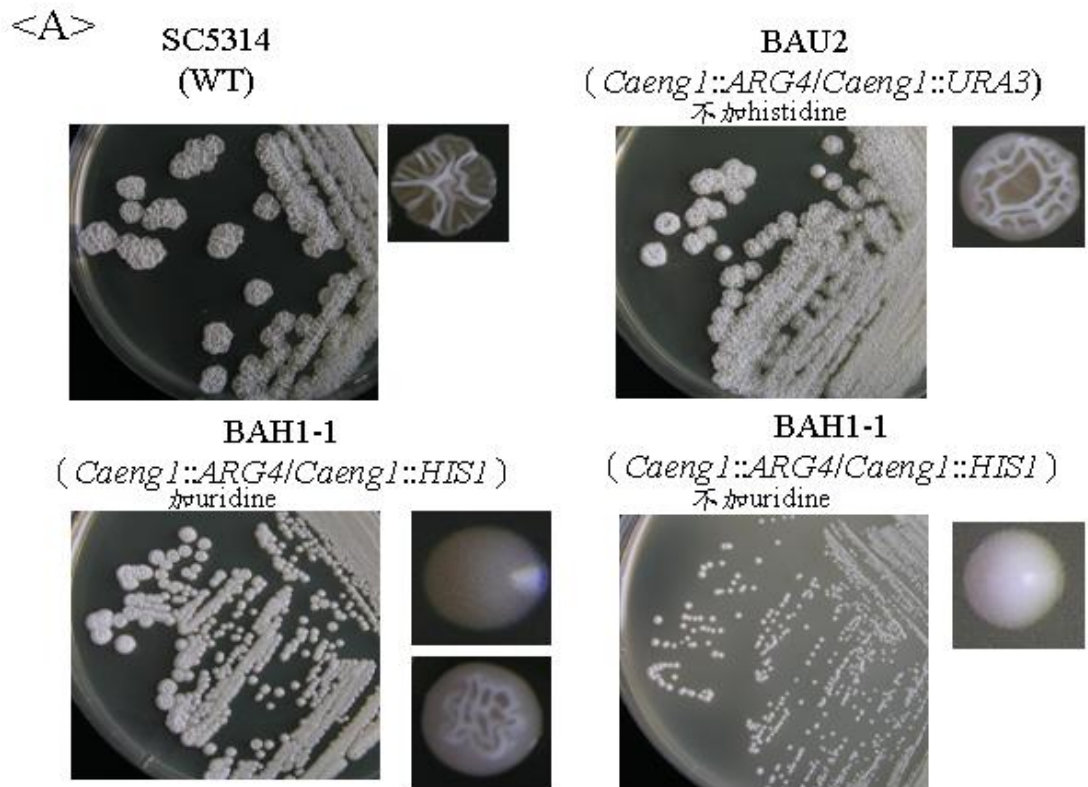
圖十五、*CaENG1* 各突變株於含 4% 山羊血清的 YPD 培養基之菌落型態

CaENG1 各突變株於含 4% 山羊血清之 YPD 培養基、37 °C 培養三天後，觀察菌落型態。以 SC5314 及 HLC54 作為正負對照。實驗菌株如下：SC5314 (wild type)、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1* *efg1/efg1*)、EHK1 (*CaENG1*/*Caengl::FRT*)、EKG7 (*Caengl::FRT*/*Caengl::FRT*)、EKP2 (*Caengl::FRT*/*Caengl::FRT*)、EGR (*Caengl::FRT*/*CaENG1::FRT*)。

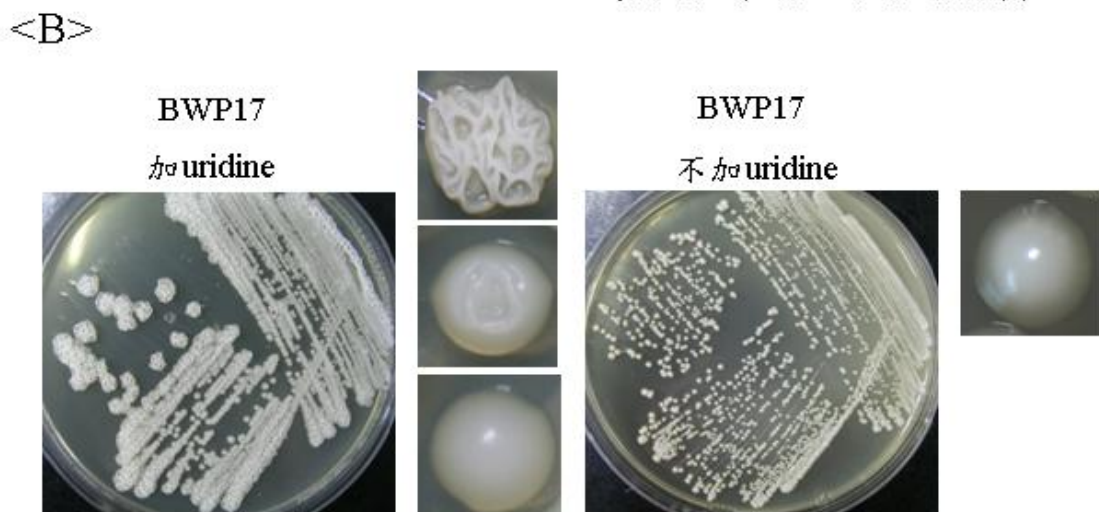


圖十六、*CaENG1* 各突變株之侵犯力試驗 (invasion assay)

CaENG1 各突變株於 solid Spider 培養基、37 °C 培養七天後，以固定水流沖洗菌體。以 SC5314 及 HLC54 作為正負對照。實驗菌株如下：SC5314 (wild type)、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、EHK1 (*CaENG1/Caeng1::FRT*)、EKG7 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*)。



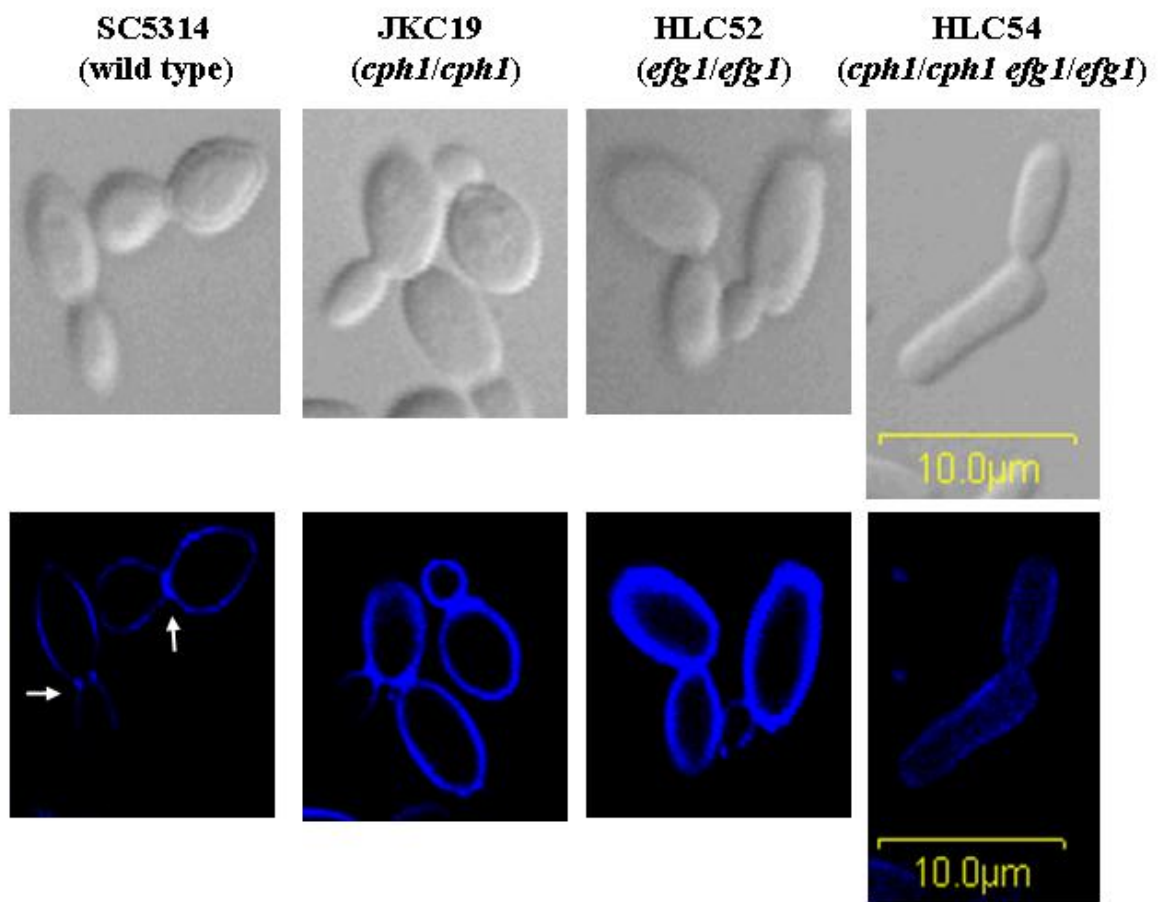
(交通大學碩士論文 謝志豪, 2006)

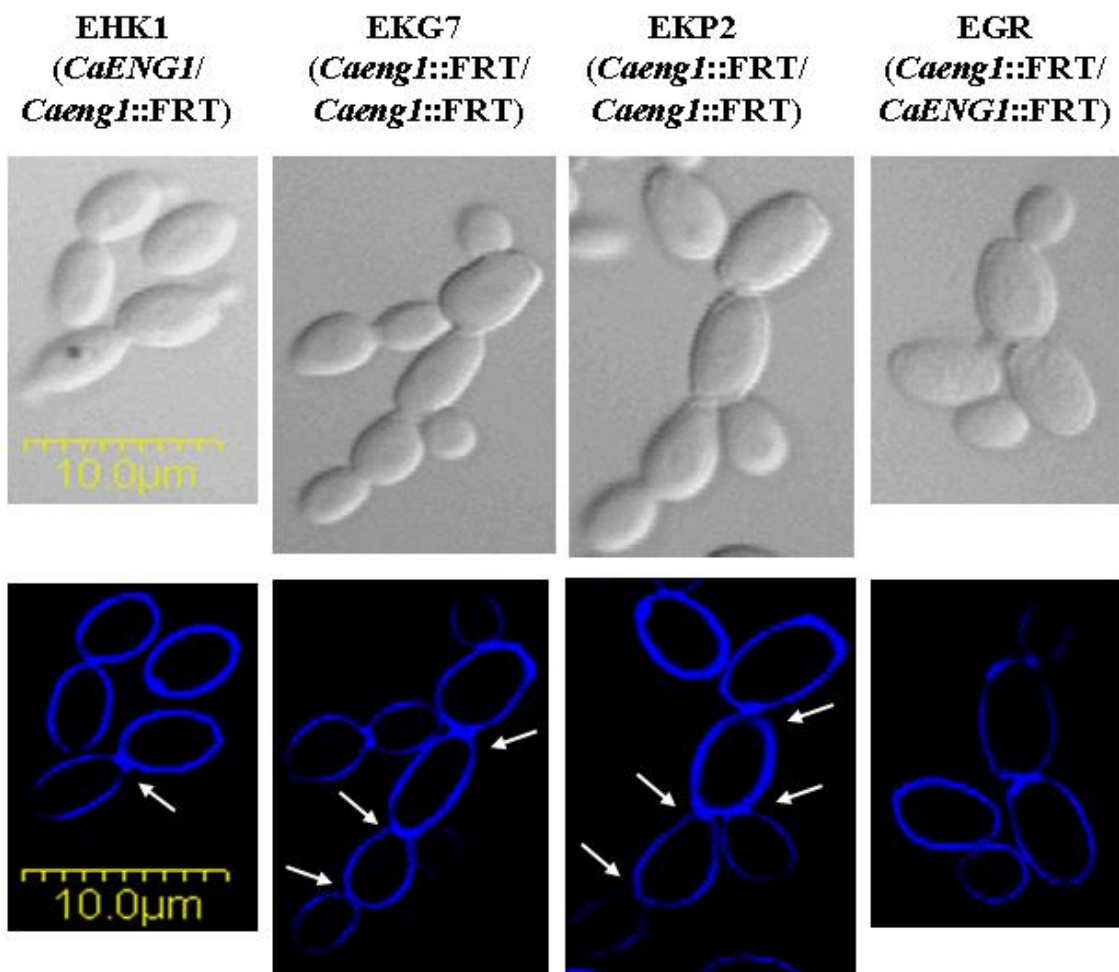


圖十七、比較 uridine 對各突變株在含 4% 山羊血清之 YPD 培養基上的影響

圖<A>發表於 2006 年之交通大學論文指出以營養篩選剔除之 *Caeng1* 突變株會因篩選 marker 不同而導致在給予營養素 uridine 與否會影響其菌落之型態。

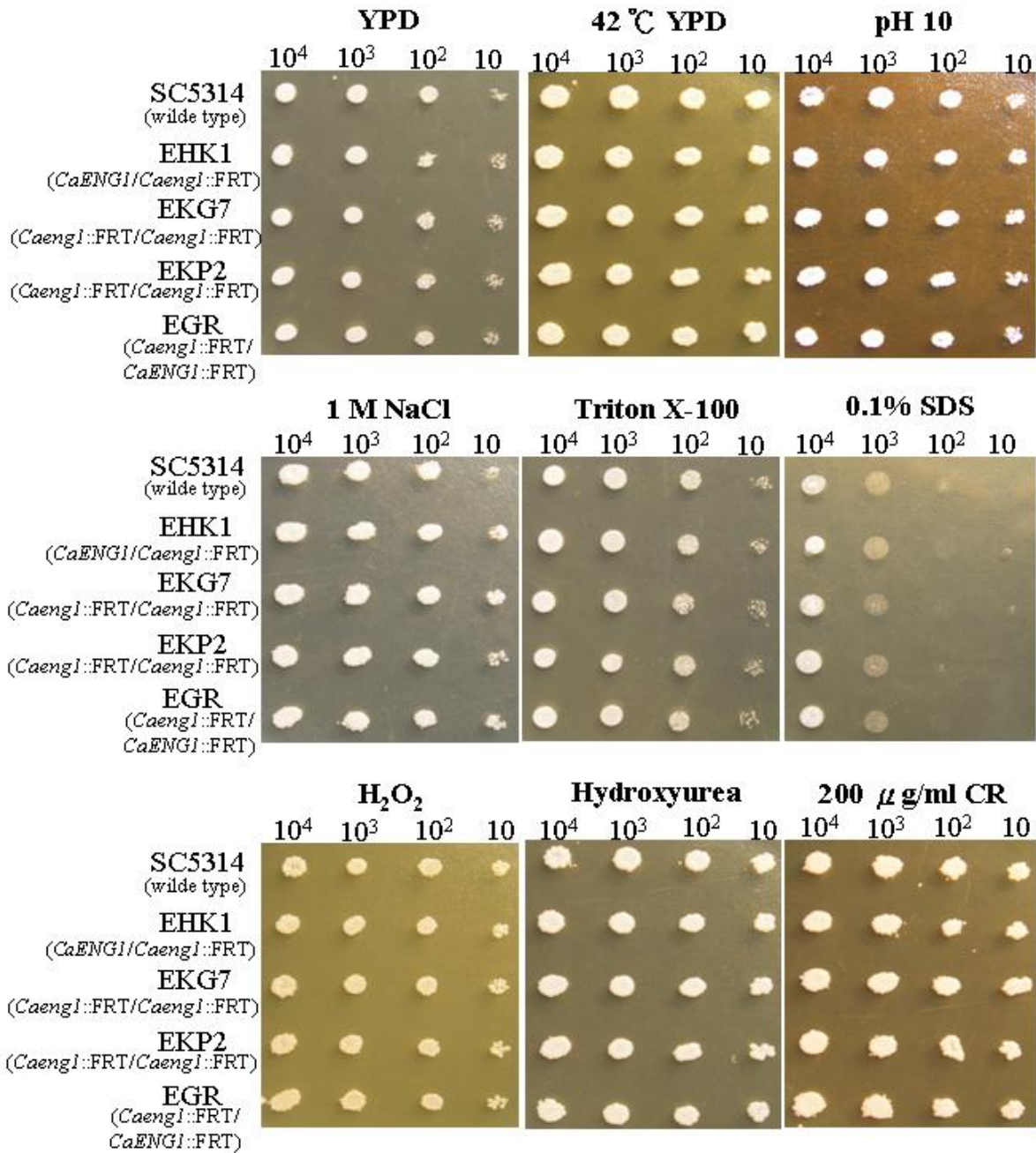
圖因營養篩選所使用之 wild type 菌株為有營養缺陷之 BWP17 (*arg4/arg4 his1/his1 ura3/ura3*)，故測試此菌株於 4% 山羊血清之 YPD 培養基上，給予 uridine 與否對其造成型態之影響。





圖十八、細胞分裂型態之觀察

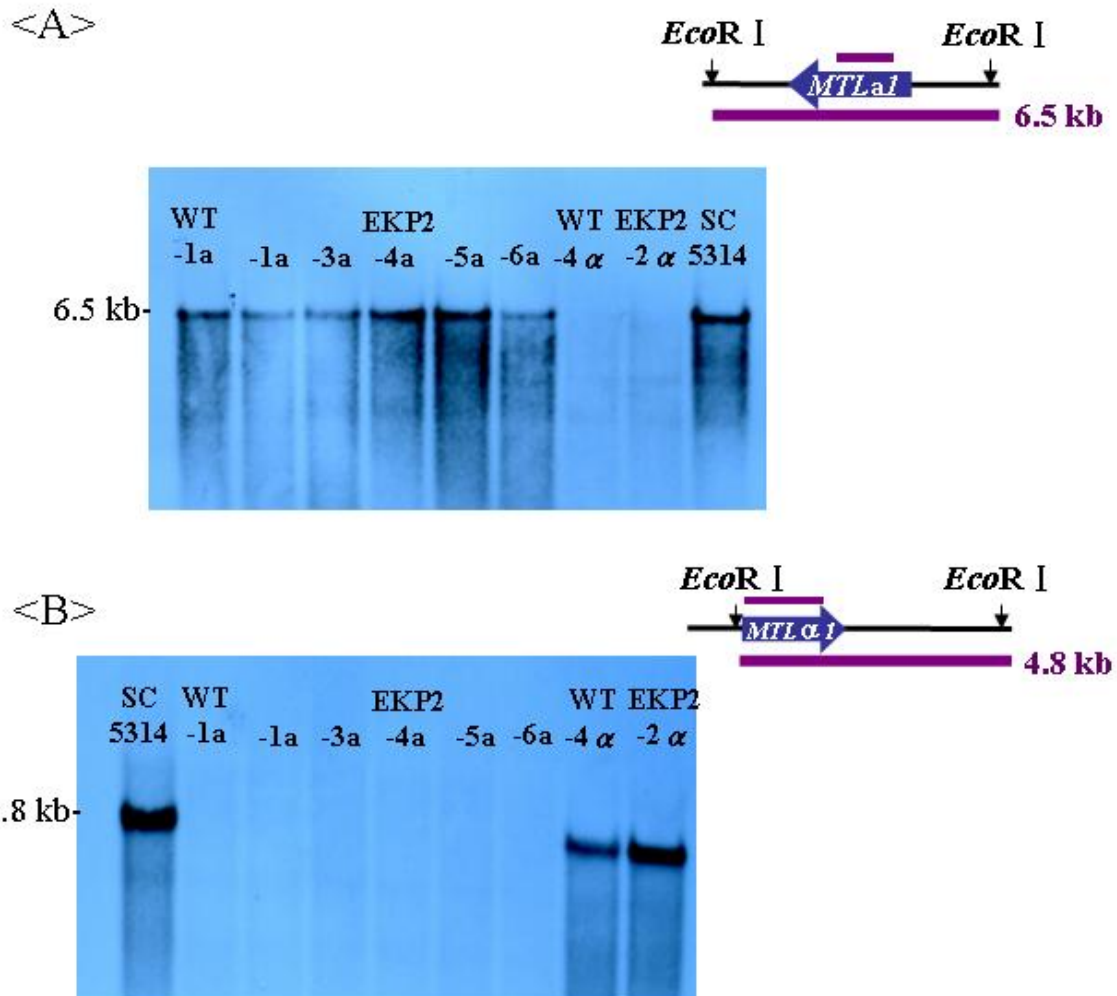
將培養至 mid-log phase 之菌株，以 Calcofluor white 染色細胞壁，於雷射掃描式共軛焦顯微鏡 (confocal) 放大一千倍觀察。白色箭頭標示為母細胞與子細胞之間 septum 之位置。實驗菌株如下：SC5314 (wild type)、JKC19 (*cph1/cph1*)、HLC52 (*efg1/efg1*)、HLC54 (*cph1/cph1 efg1/efg1*)、EHK1 (*CaENG1/Caeng1::FRT*)、EKG7 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EKP2 (*Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EGR (*Caeng1::FRT/CaENG1::FRT*)。



圖十九、化學藥品感受性試驗 (chemical susceptibility test)

將各菌株依序稀釋細胞數並培養至含不同化學藥品之 YPD 培養基，30 °C 培養一至兩天觀察。實驗菌株如下：SC5314 (wild type)、EHK1 (*CaENGI::FRT/Caengi::FRT*)、EKG7 (*Caengi::FRT/Caengi::FRT*)、EKP2 (*Caengi::FRT/Caengi::FRT*)、EGR (*Caengi::FRT/CaENGI::FRT*)。

CR 為細胞壁染劑 Congo red



圖二十、南方點墨法 (Southern blot) 分析 a-type 及 α -type mating strain

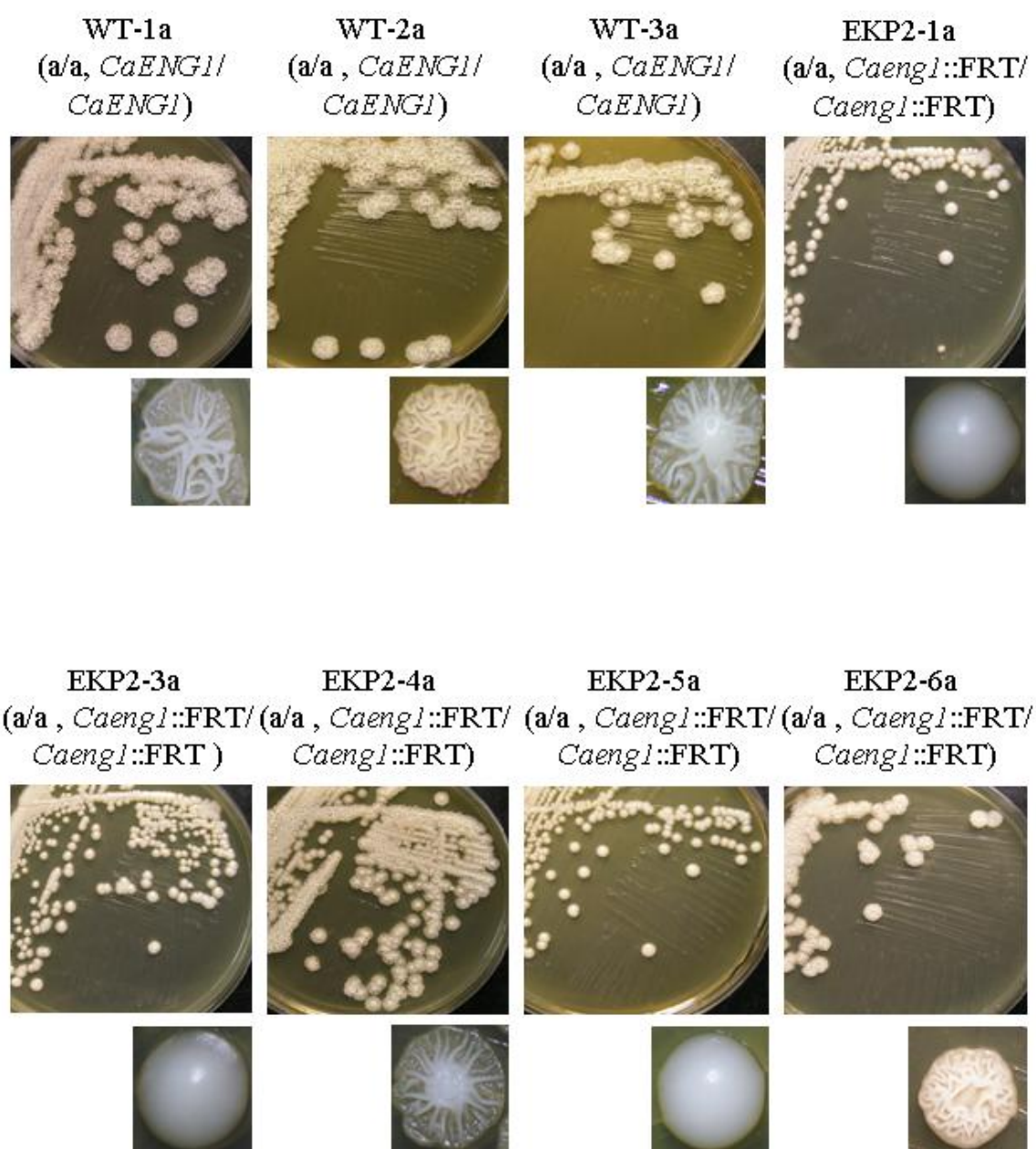
以 *EcoR* I 作用於各菌株之 gDNA，將 DNA 轉漬至耐龍膜上，免疫偵測後可得預期片段 *MTLa1* 6.5 kb 或 *MTL α 1* 4.8 kb。

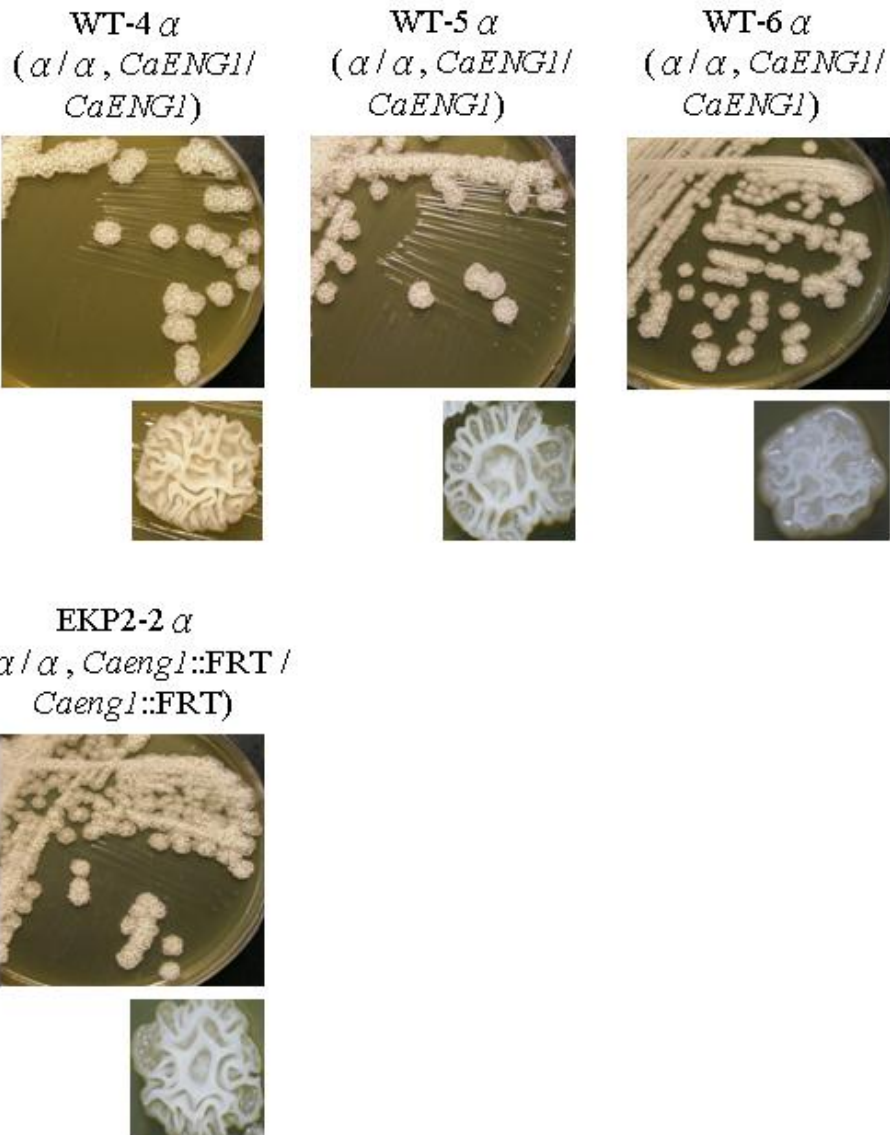
圖<A>以引子 HJL00134-F 和 HJL00135-R 合成之 DNA 片段作為 probe，可得到 *MTLa1* 預期片段 6.5 kb。

圖以引子 HJL00136-F 和 HJL00137-R 合成之 DNA 片段作為 probe，可得到 *MTL α 1* 預期片段 4.8 kb。

實驗之菌株為野生株 SC5314 (a/a, *CaENG1*/*CaENG1*)；a-type mating strains：WT-1a (a/a, *CaENG1*/*CaENG1*)，EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-4a、EKP2-5a、EKP2-6a (a/a, *Caeng1*::FRT/*Caeng1*::FRT)； α -type mating strains：WT-4 α (α / α , *CaENG1*/*CaENG1*)，EKP2-2 α (α / α , *Caeng1*::FRT/*Caeng1*::FRT)

<A>

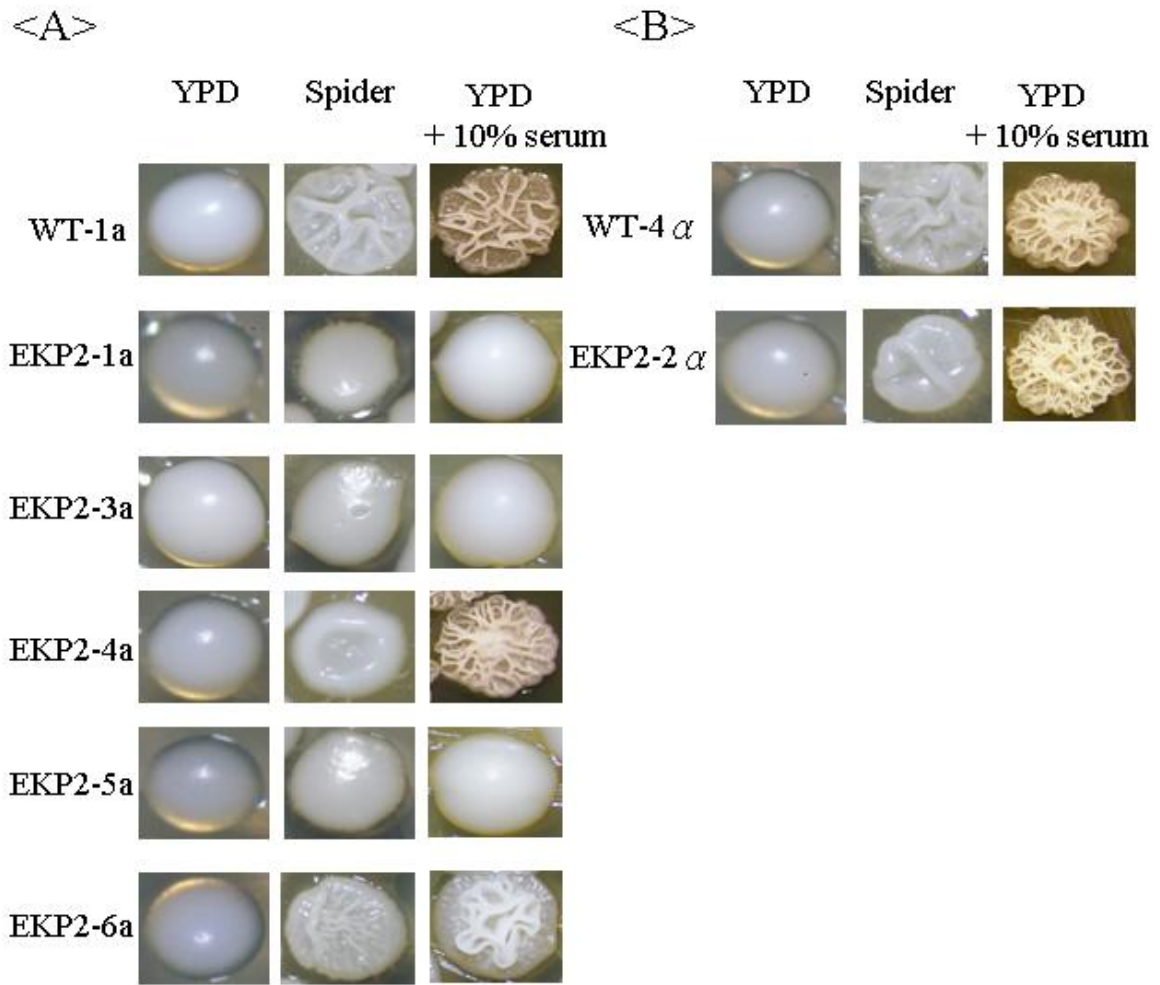




圖二十一、*Caeng1* 類接合型 (mating type like) 突變株於 4% 山羊血清的 YPD 培養基之菌落型態

圖<A>a-type mating strain 於含 4% 山羊血清之 YPD 培養基，37 °C 培養三天，觀察單一菌落之型態。實驗菌株如下：WT-1a、WT-2a、WT-3a (a/a , *CaENG1*/*CaENG1*) 為對照組；EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-4a、EKP2-5a、EKP2-6a (a/a , *Caeng1::FRT*/*Caeng1::FRT*)

圖 α -type mating strain 於含 4% 山羊血清之 YPD 培養基。實驗菌株如下：對照組 WT-4 α 、WT-5 α 、WT-6 α (α/α , *CaENG1*/*CaENG1*)；EKP2-2 α (α/α , *Caeng1::FRT*/*Caeng1::FRT*)



圖二十二、*Caeng1* 類接合型 (mating type like) 突變株於三種不同培養基之菌落型態

圖<A>a-type mating strains 於培養基 YPD 30 °C 培養一天、solid Spider 37

°C 培養七天及 10% 山羊血清之 YPD 培養基，37 °C 培養三天，觀

察單一菌落之型態。實驗菌株如下：WT-1a、WT-2a、WT-3a (a/a,

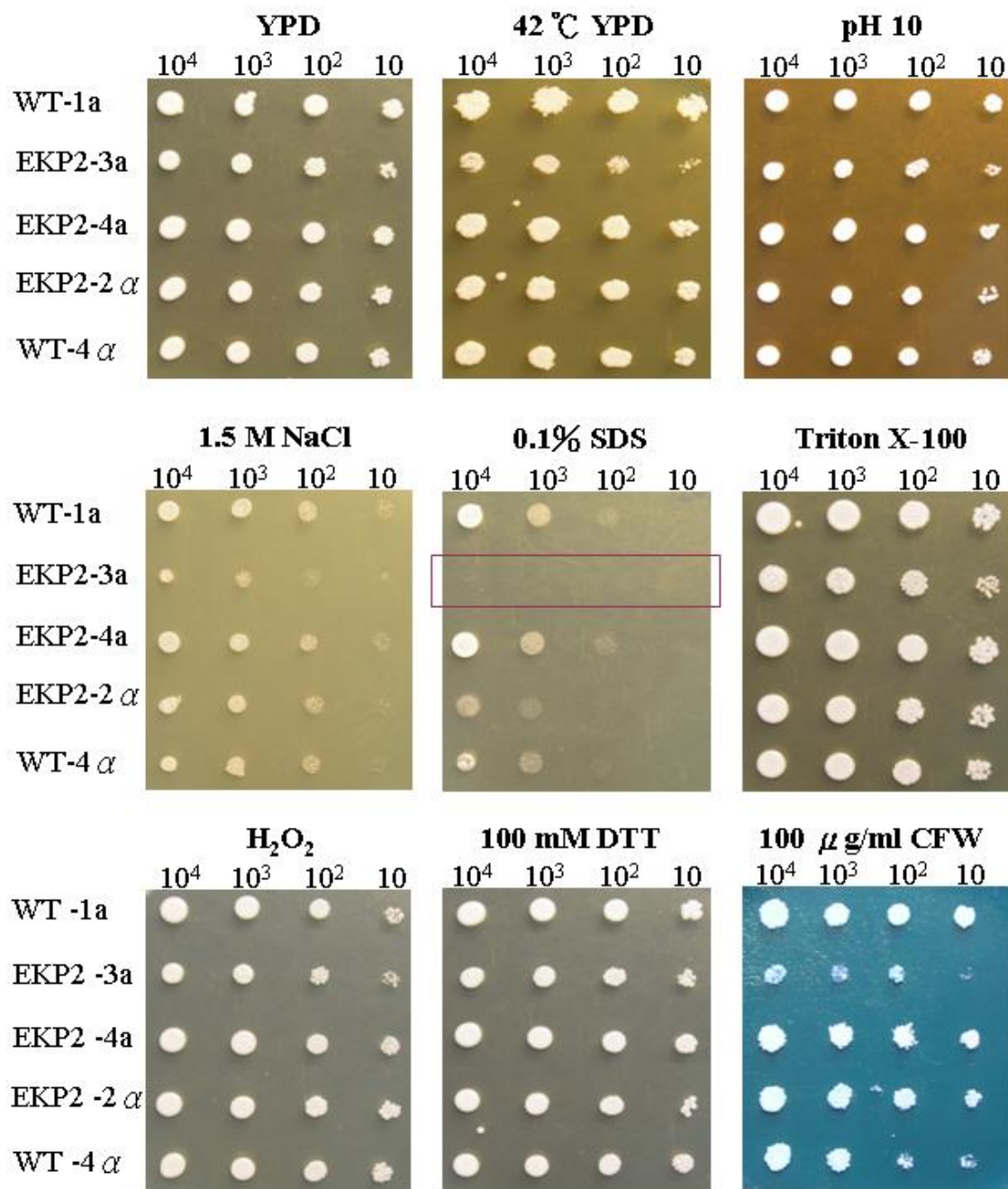
CaENG1/CaENG1) 為對照組；EKP2-1a、EKP2-3a、EKP2-4a、

EKP2-5a、EKP2-6a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)

圖alpha-type mating strain 於上述培養基培養，並觀察單一菌落之型態。

實驗菌株如下：對照組 WT-4a、WT-5a、WT-6a (alpha/alpha,

CaENG1/CaENG1)；EKP2-2a (alpha/alpha, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)



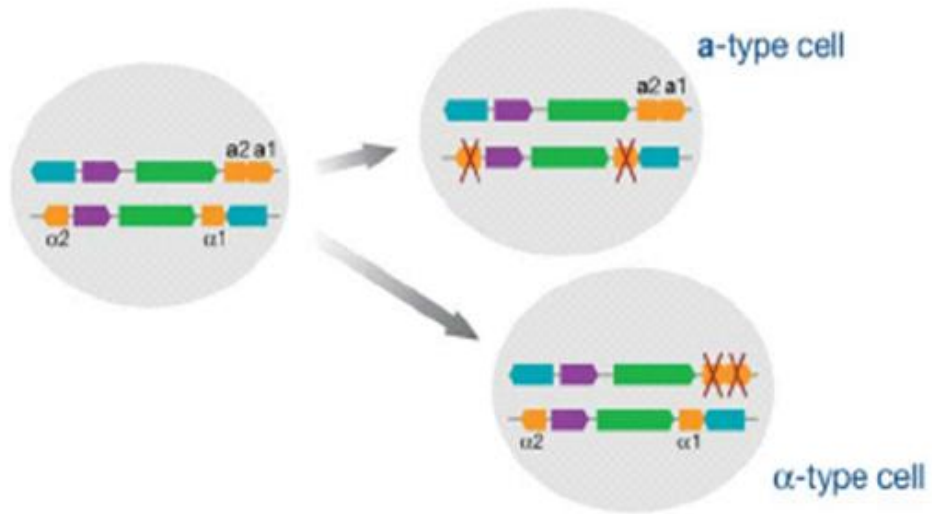
圖二十三、化學藥品感受性試驗 (chemical susceptibility test)

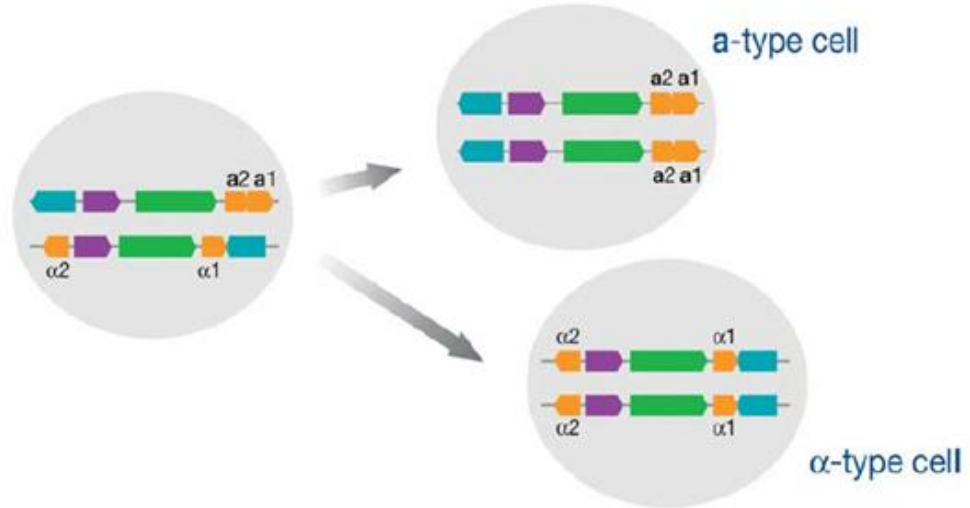
將各菌株依序稀釋細胞數並培養至含不同化學藥品之 YPD 培養基，30 °C 培養一至兩天觀察。實驗菌株如下：對照組 WT-1a (a/a, *CaENG1/CaENG1*)、WT-4α (α/α, *CaENG1/CaENG1*)；*Caeng1* 之 a-type 及 α-type mating strains：EKP2-3a 及 EKP2-4a (a/a, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)、EKP2-2α (α/α, *Caeng1::FRT/Caeng1::FRT*)

紫色細框表示感受性與對照組相比較明顯之菌株

CFW 為細胞壁染劑 Calcofluor white stain

<A>





Bennett and Johnson, 2005

附錄一、*C. albicans* 之 mating strains 反應途徑

圖<A>於 sorbose 環境下之培養，*C. albicans* 會缺失其 mating type like (MTL) 中調節性基因（位於五號染色體上）而成 hemizygous a-type 及 α -type 之 mating strain。

圖失去單套五號染色體之 *C. albicans* 經由複製，於 MTL locus 形成 homozygous a-type 及 α -type 之 mating strain。

簡歷

蔡馨儀 Hsin-Yi Tsai

教育程度：

學歷	學校科系名稱	修業期間
研究所	國立交通大學 生化工程研究所	2007 ~ 2009
大學	臺北醫學大學 保健營養學系	2001 ~ 2005
高中	臺北市市立中正高級中學	1998 ~ 2001

個人經歷：

年 度	活動類別	經 歷
2009 (研二)	壁報展示	參與第21屆國際生物化學與分子生物學聯盟 學術大會暨第12屆亞洲大洋洲生物化學家與 分子生物學家學術大會壁報展示
2005 ~ 2006	工作	聯迎興企業有限公司 會計助理
2003 ~ 2004 (大三)	實習	振興復健醫學中心 營養治療科 實習生
	專題	專題實驗-植物性乳酸飲料對腸胃菌相之影 響