

國立交通大學

生物科技系暨研究所

碩士論文

探討剔除白色念珠菌 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及
CaHGT7 對白色念珠菌型態變化及藥物感受性
之影響

The study of *CaCDR3*, *CaHGT1* and *CaHGT7* null mutations
on the morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida*
albicans

研究生：陳映如

指導教授：楊昀良 博士

中華民國 一百零二年 五月

探討剔除白色念珠菌 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 對白色念珠菌型態

變化及藥物感受性之影響

The study of *CaCDR3*, *CaHGT1* and *CaHGT7* null mutations on the
morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*

研 究 生：陳映如

Student：Ying-Ru Chen

指導教授：楊昀良

Advisor：Yun-Liang Yang



A Thesis

Submitted to Institute of Biological Science and technology

Department of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

in

Biological Science and Technology

May 2013

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國 一百零二年 五月

摘要

白色念珠菌為人體中伺機性的病原，而其致病力與其型態轉變相關，當白色念珠菌無法在酵母菌型及菌絲型態間轉換時，會降低或失去致病能力。

然而，葡萄糖被認為與菌絲的生成有相關性，本篇研究之基因 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 即與葡萄糖的傳送有關，因而被認為與菌絲的生成有關。先前研究也發現菌絲生成與抗藥性有一定的關連，因此由文獻中發現基因 *CaCDR1* 及 *CaCDR2* 的過表現會增強菌株對azole 類藥物的抗藥性。本篇的 *CaCDR3* 因其序列相似度與 *CaCDR1* 和 *CaCDR2* 極高，推測可能與抗藥性現象有關聯。而本研究之目的即在探討此三基因之生理功能是否與型態轉換或抗藥性有直接關係。

本篇研究利用 *SAT1* flipper cassette 分別建構出白色念珠菌 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 的雙套基因剔除株，並將建構完成的菌株做型態以及藥物感受性的測試。而結果中，對於型態所做的芽管生成、菌絲生成及侵犯力的實驗，此三基因之剔除菌株與野生株並無明顯不同；在針對藥物 fluzonazole、miconazole 及 amphotericin B 的感受性測試中，其結果也並未發現明顯差異。因此，由結果推測此三基因在測試的條件下，對於白色念珠菌之型態轉變及藥物感受性並非主要調控之基因。

Abstract

Candida albicans is a major opportunistic pathogen in human. Furthermore, the pathogenicity of *C. albicans* is related to their morphogenesis, the ability to switch between yeast form and hyphal form.

The presence of glucose triggers *C. albicans* yeast-to-hyphal transition, a vital determinant of virulence. Two genes, *CaHGT1* and *CaHGT7*, members of HGT family (High-affinity Glucose Transporter), may be linked to the formation of filamentous growth. Furthermore, it may also be linked to the drug resistance phenomenon in *C. albicans*, since previous researches have shown an association between filamentous growth and drug resistance.

C. albicans can cause infections in immunocompromised individuals. Azole derivatives are often used for clinical treatments, but the resistance to this class of drugs is becoming common. Two genes, *CaCDR1* and *CaCDR2*, are known to increase the resistance when overexpressed. Orf19.1313 (*CaCDR3*) possesses high level of homology to Cdr1p and Cdr2p. It is also considered to be potential of drug resistance gene of *C. albicans*.

In this study, I use *SAT1* flipper cassette containing a drug selection marker to construct null mutations of *CaCDR3*, *CaHGT1* and *CaHGT7* to study the effects on morphology and drug resistance of homologous strain to understand the physiological functions of these genes in *C. albicans*. The results indicated that *CaCDR3*, *CaHGT1* and *CaHGT7* null mutants did not have significant difference than the wild-type on the morphogenesis and drug susceptibilities of *C. albicans*.

致謝

碩士生活終於結束了，這一路上受到了很多人的幫助才讓我順利完成實驗以及論文。首先要感謝的是小楊老師，在碩士的生活中對我實驗上的幫助，讓我學到研究上的邏輯判斷以及思考上的完整性。另外，要感謝也擔任口委的羅秀容老師，部分在國衛院進行的實驗受到羅老師很多的教導讓我對實驗更加的仔細謹慎，而口委林苔吟老師對論文的指教也讓我對做實驗的背後意義有更多且更深入的思考。

感謝陪伴我碩士生活的小楊家的大家，小倩跟幸璇兩位分生神人對剛進實驗室的我傳授了很多實驗上的技巧，讓我除了崇拜還是崇拜啊！剛開始坐我旁邊一天到晚騷擾我的重哥其實人很好，請他幫忙的事他還是都會幫我解決；深藏不漏的小楊家一姊洪優，看似神秘但其實人很好相處，能跟你嘻嘻哈哈的玩很開心！充滿熱情的阿大對我最好了，喜歡妳那充滿溫暖的大大擁抱，只要看到你心情就會變好；有條理的凱薩思想周全，實驗室辦活動有你就不用擔心會漏掉什麼；做事小心謹慎的阿賢其實內心狂野，認真玩起來也是可以很瘋狂的！總是利用身高來做偽裝的小善"姊姊"，每次見面都打打鬧鬧的我們其實是一種感情好的表現(吧?!)，感謝你這三年的陪伴；碩士生活的好玩伴阿白，和你一起到處玩樂吃吃喝喝的日子讓我很懷念也充滿了回憶；共同奮鬥的春榮，你那我永遠都搞不懂的領域總是在你報告時讓我覺得非常的神奇。還有學弟妹們：克威總是跟我分享很多有趣的事；游青常常當小天使幫我餵嗷嗷待哺的魚兒；昇樺在我去國衛院時都會陪著我吃飯和聊天；子喬常幫忙處理實驗室的大小事；郁琳總是帶給實驗室歡樂；柏毅把實驗室帶往運動的健康道路；瑋德常常被我當出氣筒的揍也不生氣。最後要感謝總是支持我的家人以及朋友，香菇團的大家，和你們相聚的時刻是我最美好的時光！感謝從大學以來無論我心情好壞總是陪伴在我身旁的小樹，還有其他許多曾經幫助過我的人，希望每個人都能夠開開心心的過每一天，心中所有的目標以及夢想都能夠順利達成！

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
致謝.....	iii
目錄.....	iv
圖表目錄.....	xi
附圖目錄.....	xv
一、緒論.....	1
1.1 白色念珠菌.....	1
1.2 白色念珠菌型態轉變與致病力之關聯.....	1
1.3 抗真菌藥物及抗菌機制.....	3
1.4 HGT family.....	4
1.5 篩選標記之介紹.....	4
1.6 本論文研究之目的.....	5
1.6.1 白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 基因之相關探討.....	5
1.6.2 白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 基因之相關探討.....	6
二、材料與儀器.....	7
2.1 菌株.....	7
2.2 質體.....	8
2.3 引子.....	10
2.3.1 針對使用 SAT1 system 剔除 <i>CaCDR3</i> 所設計的引子.....	10
2.3.2 針對使用 SAT1 system 剔除 <i>CaHGT1</i> 所設計的引子.....	10
2.3.3 針對使用 SAT1 system 剔除 <i>CaHGT7</i> 所設計的引子.....	11
2.3.4 篩選用引子.....	11
2.3.5 定序用引子.....	12
2.4 化學藥品.....	12

2.5 酵素.....	13
2.6 藥品配製.....	14
2.6.1 緩衝溶液及溶劑	14
2.6.2 培養基配製	15
2.7 儀器設備.....	15
 三、方法與步驟	17
3.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的製備	17
3.2 大腸桿菌勝任細胞的轉型 (Transformation)	17
3.3 質體 DNA 的萃取.....	17
3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
3.4.1 Fermentas Taq DNA polymerase	18
3.4.2 DreamTaq™ DNA polymerase	18
3.4.3 TaKaRa Ex Taq™	18
3.4.4 PCR 溫度設定.....	18
3.5 限制酶反應	19
3.5.1 質體確認之限制酶反應	19
3.5.2 為 clone 所需之限制酶反應	19
3.6 萃取洋菜膠中的 DNA 片段 (Gel extraction)	19
3.6.1 配製含有結晶紫的洋菜膠	19
3.6.2 萃取洋菜膠中的 DNA 片段.....	19
3.7 接合反應 (Ligation)	20
3.8 白色念珠菌勝任細胞的轉型 (Transformation)	20
3.8.1 白色念珠菌勝任細胞的製備	20
3.8.2 電穿孔 (Electroporation)	20
3.9 培養基中添加 Maltose 進行 SAT 1 flipper cassette 之剔除	21
3.10 複製平皿培養法 (Replica plating)	21
3.11 建構白色念珠菌單套剔除株及雙套剔除株	21

3.12 建構白色念珠菌單套基因回復株	22
3.13 白色念珠菌 Genomic DNA 純化	22
3.13.1 冷熱法萃取	22
3.13.2 傳統法萃取	23
3.14 南方點墨法	23
3.14.1 探針 (Probe) 的合成	23
3.14.2 南方點墨法	24
3.15 突變株之性狀分析 (Characterization)	26
3.15.1 不同葡萄糖濃度之環境生長情形	26
3.15.2 芽管試驗 (Germ tube assay)	26
3.15.3 誘發菌絲生長觀察型態變化 (Colony morphology)	26
3.15.4 侵犯力測試 (Invasion assay)	26
3.16 CLSI Broth Microdilution Method	26
3.16.1 藥盤配製	26
3.16.2 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 偵測各突變株之藥物感受性實驗	27
3.17 Agar dilution test	28
四、結果	30
4.1 建構 <i>CaCDR3</i> 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株	30
4.1.1 建構基因剔除所需含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaCDR3</i> 上下游同源區域之質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -A1B1 及質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -A2B2	30
4.1.1.1 建構含 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaCDR3</i> 上下游同源區域之質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -A1B1	30
4.1.1.2 建構含 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaCDR3</i> 上下游同源區域之質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -A2B2	31
4.1.2 建構基因回復株所需含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及	

<i>CaCDR3</i> 完整基因之質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -RESA1B1-B1.....	32
4.1.3 回復株質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -RESA1B1-B1 之序列分析	32
4.1.4 建構 <i>CaCDR3</i> 之單套基因剔除菌株.....	33
4.1.5 建構 <i>CaCDR3</i> 之雙套基因剔除菌株.....	33
4.1.6 建構 <i>CaCDR3</i> 之單套基因回復菌株.....	34
4.1.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaCDR3</i> 各突變株.....	35
4.1.7.1 南方點墨法檢驗 <i>CaCDR3</i> 單套剔除株	35
4.1.7.2 南方點墨法檢驗 <i>CaCDR3</i> 雙套剔除株	35
4.1.7.3 南方點墨法檢驗 <i>CaCDR3</i> 單套回復株	36
4.2 建構 <i>CaHGT1</i> 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株	37
4.2.1 建構基因剔除所需含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaHGT1</i> 上下游同源區域之質體 pSAT1- <i>HGT1</i> -AB.....	37
4.2.2 建構基因回復株所需含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaHGT1</i> 完整基因之質體 pSAT1- <i>HGT1</i> - H1RES-B	38
4.2.3 回復株質體 pSAT1- <i>HGT1</i> -H1RES-B 之序列分析	39
4.2.4 建構 <i>CaHGT1</i> 之單套基因剔除菌株.....	39
4.2.5 建構 <i>CaHGT1</i> 之雙套基因剔除菌株.....	40
4.2.6 建構 <i>CaHGT1</i> 之單套基因回復菌株.....	41
4.2.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT1</i> 各突變株.....	41
4.2.7.1 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT1</i> 單套及雙套 基因各突變株	41
4.2.7.2 南方點墨法檢驗 <i>CaHGT1</i> 單套回復株	42
4.3 建構 <i>CaHGT7</i> 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株	43
4.3.1 建構基因剔除所需含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaHGT7</i> 上下游同源區域之質體 pSAT1- <i>HGT7</i> -AB.....	43
4.3.2 建構基因回復株所需含篩選標記 <i>SAT1</i> flipper cassette 及 <i>CaHGT7</i> 完整基因之質體 pSAT1- <i>HGT7</i> - H7RES-B.....	44
4.3.3 回復株質體 pSAT1- <i>HGT7</i> -H1RES-B 之序列分析	44

4.3.4 建構 <i>CaHGT7</i> 之單套基因剔除菌株.....	45
4.3.5 建構 <i>CaHGT7</i> 之雙套基因剔除菌株.....	45
4.3.6 建構 <i>CaHGT7</i> 之單套基因回復菌株.....	46
4.3.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT7</i> 各突變株.....	46
4.3.7.1 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT7</i> 單套基因之突變株	46
4.3.7.2 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT7</i> 雙套基因之突變株	47
4.3.7.3 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT7</i> 單套基因之回復株	48
4.4 白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株之性狀分析	49
4.4.1 不同葡萄糖濃度之環境生長情形	49
4.4.2 芽管試驗 (Germ tube assay)	49
4.4.2.1 白色念珠菌之 <i>CaCDR3</i> 各突變株之芽管試驗結果.....	49
4.4.2.2 白色念珠菌之 <i>CaHGT1</i> 各突變株之芽管試驗結果.....	50
4.4.2.3 白色念珠菌之 <i>CaHGT7</i> 各突變株之芽管試驗結果.....	50
4.4.3 白色念珠菌之 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株之菌絲生成型態觀察 – 培養於含 4% FBS 之 YPD 培養基之結果	50
4.4.3.1 白色念珠菌之 <i>CaCDR3</i> 各突變株之菌絲生成試驗結果 .	50
4.4.3.2 白色念珠菌之 <i>CaHGT1</i> 各突變株之菌絲生成試驗結果 .	50
4.4.3.3 白色念珠菌之 <i>CaHGT7</i> 各突變株之菌絲生成試驗結果 .	50
4.4.4 白色念珠菌之 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株之菌絲生成型態觀察 – 培養於含 4% FBS 之 Bacto Agar 培養基之結果	51
4.4.4.1 白色念珠菌之 <i>CaCDR3</i> 各突變株之菌絲生成試驗結果 .	51
4.4.4.2 白色念珠菌之 <i>CaHGT1</i> 各突變株之菌絲生成試驗結果 .	51

4.4.4.3 白色念珠菌之 <i>CaHGT7</i> 各突變株之菌絲生成試驗結果	51
4.4.5 白色念珠菌之 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株之侵犯能力之性狀觀察	51
4.4.5.1 白色念珠菌之 <i>CaCDR3</i> 各突變株之侵犯能力之試驗結果	51
4.4.5.2 白色念珠菌之 <i>CaHGT1</i> 各突變株之侵犯能力之試驗結果	52
4.4.5.3 白色念珠菌之 <i>CaHGT7</i> 各突變株之侵犯能力之試驗結果	52
4.5 白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株之藥物 (Fluconazole、Miconazole、Amphotericin B) 感受性測試	52
4.5.1 白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 Fluconazole 之感受性測試結果	52
4.5.2 白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 Miconazole 之感受性測試結果	53
4.5.3 白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 Amphotericin B 之感受性測試結果	53
4.6 白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各基因突變株對不同濃度之 Amphotericin B 的 Agar dilution test	54
4.6.1 白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 各基因突變株對不同濃度之 Amphotericin B 的 Agar dilution test	54
4.6.2 白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 各基因突變株對不同濃度之 Amphotericin B 的 Agar dilution test	54
五、討論	56
5.1 基因 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株性狀分析之探討	56
5.1.1 不同葡萄糖濃度之環境生長情形結果探討	56

5.1.2 芽管試驗結果之探討	56
5.1.3 含 4% FBS 之 YPD 培養基菌落型態探討.....	57
5.1.4 含 4% FBS 之 Bacto agar 培養基菌落型態探討	57
5.1.5 侵犯力測試之探討	58
5.2 基因 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 (Fluconazole、Miconazole、Amphotericin B) 感受性之探討	58
5.2.1 基因 <i>CaCDR3</i> 各突變株對藥物 Fluconazole、Miconazole、 Amphotericin B 感受性之探討	58
5.2.2 基因 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 Fluconazole、 Miconazole、Amphotericin B 感受性之探討	59
5.3 白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 各基因突變株對不同濃度之 Amphotericin B 的 Agar dilution test 結果之探討	60
5.4 結語.....	60
5.5 未來展望.....	61
六、參考文獻.....	63

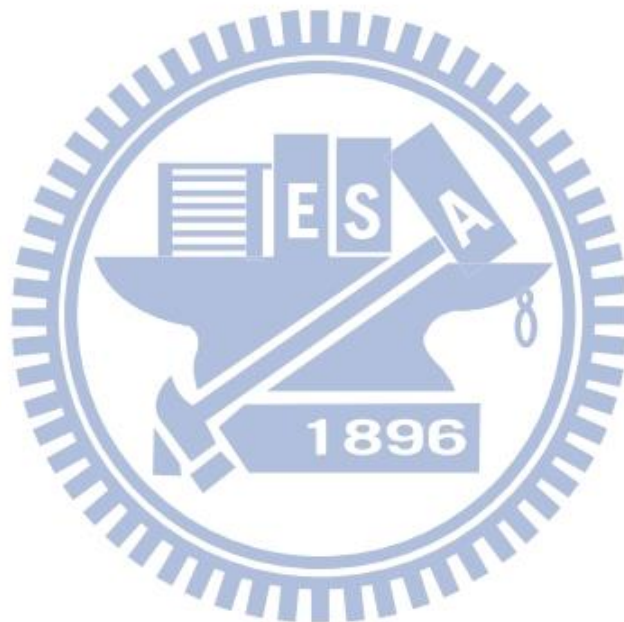
圖表目錄

圖一：SAT1 flipper cassette 示意圖.....	69
圖二：建構白色念珠菌基因剔除株流程圖	70
圖三：白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 之同源區域設計及基因剔除流程示意圖	72
圖四：以限制酶確認質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -A1 和 pSAT1- <i>CDR3</i> -A1B1.	73
圖五：以限制酶確認質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -A2 和 pSAT1- <i>CDR3</i> -A2B2.	74
圖六：以限制酶確認質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -RESA1B1-B1.....	75
圖七：質體 pSAT1- <i>CDR3</i> -RESA1B1-B1 序列分析結果.....	76
圖八：白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 之同源區域設計及基因剔除流程示意圖	78
圖九：以限制酶確認質體 pSAT1- <i>HGT1</i> -A 和 pSAT1- <i>HGT1</i> -AB ...	80
圖十：以限制酶確認質體 pSAT1- <i>HGT1</i> -H1RES-B.....	81
圖十一：質體 pSAT1- <i>HGT1</i> -H1RES-B 序列分析結果.....	82
圖十二：以限制酶確認質體 pSAT1- <i>HGT7</i> -A 和 pSAT1- <i>HGT7</i> -AB	84
圖十三：以限制酶確認質體 pSAT1- <i>HGT7</i> -H7RES-B.....	85
圖十四：質體 pSAT1- <i>HGT7</i> -H7RES-B 序列分析結果.....	86
圖十五：以 PCR 確認 <i>CaCDR3</i> 單套基因剔除株.....	88
圖十六：以 PCR 確認 <i>CaCDR3</i> 雙套基因剔除株.....	89
圖十七：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaCDR3</i> 單套基因突變株	90
圖十八：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaCDR3</i> 單套及雙套基因突變株	91
圖十九：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaCDR3</i> 單套基因回復株	93

圖二十：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaCDR3</i> 單套基因回復株	94
圖二十一：以 PCR 確認 <i>CaHGT1</i> 單套基因剔除株	95
圖二十二：以 PCR 確認 <i>CaHGT1</i> 雙套基因剔除株	96
圖二十三：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT1</i> 單套及雙套基因突變株	97
圖二十四：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT1</i> 單套基因回復株	99
圖二十五：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT1</i> 單套基因回復株	100
圖二十六：以 PCR 確認 <i>CaHGT7</i> 單套基因剔除株	101
圖二十七：以 PCR 確認 <i>CaHGT7</i> 雙套基因剔除株	102
圖二十八：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT7</i> 單套基因突變株	103
圖二十九：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT7</i> 雙套基因突變株	105
圖三十：白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 兩股 allele 限制酶酵素切位之確認	106
圖三十一：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT7</i> 單套基因回復株	107
圖三十二：南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 <i>CaHGT7</i> 單套基因回復株	108
圖三十三： <i>CaCDR3</i> 各突變珠在不同濃度葡萄糖培養環境下生長之情形	109
圖三十四： <i>CaHGT1</i> 各突變珠在不同濃度葡萄糖培養環境下生長之情形	110
圖三十五： <i>CaHGT7</i> 各突變珠在不同濃度葡萄糖培養環境下生長之情形	111

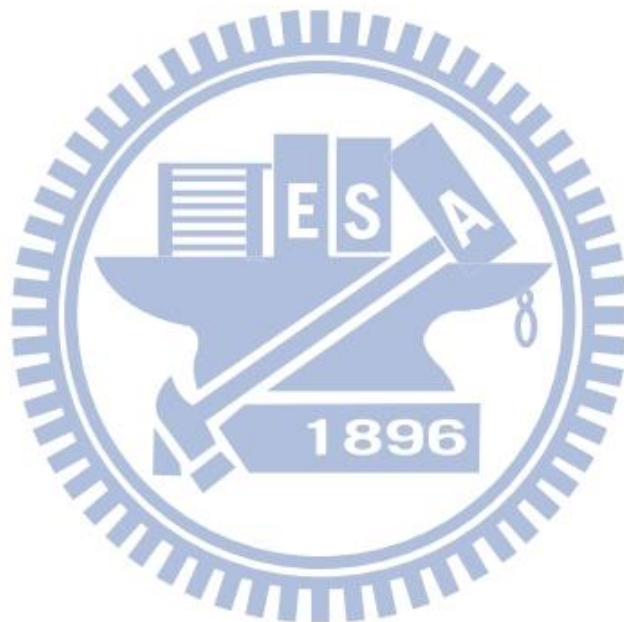
圖三十六：白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 各突變株之芽管實驗結果	112
圖三十七：白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 各突變株之芽管實驗結果	113
圖三十八：白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 各突變株之芽管實驗結果	114
圖三十九：白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 各突變株之菌絲生成實驗結果	115
圖四十：白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 各突變株之菌絲生成實驗結果	116
圖四十一：白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 各突變株之菌絲生成實驗結果	117
圖四十二：白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 各突變株之菌絲生成實驗結果	118
圖四十三：白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 各突變株之菌絲生成實驗結果	119
圖四十四：白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 各突變株之菌絲生成實驗結果	120
圖四十五：白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 各突變株侵犯力測試之結果	121
圖四十六：白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 各突變株侵犯力測試之結果	122
圖四十七：白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 各突變株侵犯力測試之結果	123
圖四十八：白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 各突變株對藥物 Fluconazole 敏感性測試之結果	124
圖四十九：白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 各突變株對藥物 Fluconazole 敏感性測試之結果	125
圖五十：白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 Fluconazole 敏感性測試之結果	126
圖五十一：白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 各突變株對藥物 Miconazole 敏感性測試之結果	127
圖五十二：白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 各突變株對藥物 Miconazole 敏感性測試之結果	128
圖五十三：白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 Miconazole 敏感性測試之結果	129
圖五十四：白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 各突變株對藥物 Amphotericin B 敏感性測試之結果	130
圖五十五：白色念珠菌 <i>CaHGT1</i> 各突變株對藥物 Amphotericin B 敏感性測試之結果	131

圖五十六：白色念珠菌 <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 Amphotericin B 敏感性測試之結果	32
圖五十七： <i>CaHGT1</i> 各突變株對藥物 Amphotericin B 不同濃度之 Agar dilution test 48 小時之結果	133
圖五十八： <i>CaHGT7</i> 各突變株對藥物 Amphotericin B 不同濃度之 Agar dilution test 48 小時之結果	134



附圖目錄

附圖一：白色念珠菌型態轉變的調控機制	135
附圖二：Polyene 類以及 Azole 類抗真菌藥物之作用機制.....	136
附圖三：文獻中將 Cdr1p、Cdr2p 及 Cdr3p 相互之間序列比對之結果內文	137
附圖四：利用 NCBI blast 比對 Cdr3p 及 Cdr1p 之結果.....	138
附圖五：利用 NCBI blast 比對 Cdr3p 及 Cdr2p 之結果.....	139



一、緒論

1.1 白色念珠菌 (*Candida albicans*)

白色念珠菌是人體內常見的共生菌叢，屬二倍體 (diploid) 伺機型的真菌 (Magee, 1998)，在正常的人體內會少量存在於口腔、皮膚、消化道及生殖道黏膜 (Joon Kim and Peter Sudbery, 2011；Odds, 1988)。在美國，有 30% ~ 55% 健康的年輕成人口腔中會發現念珠菌的存在。當人體免疫力下降時，白色念珠菌就有機會侵入人體並造成嚴重且全面性的感染 (Joon Kim and Peter Sudbery, 2011；Odds, 1988)。在美國的統計中，全身性系統感染的病人其血液中分離出的病原結果，白色念珠菌位居第四位 (Pfaller *et al.*, 2007；Rangel-Frausto MS *et al.*, 1999)。而在 HIV 的感染患者中，有 90 % 以上的病人在口腔黏膜中有白色念珠菌的發現 (Repentigny L *et al.*, 2004)。雖然目前臨床上已有許多抗真菌藥物並且有良好的抑菌效果；但因為藥物的濫用，真菌的抗藥性也隨之產生，造成治療效果不佳 (Cannon *et al.*, 2007；Ghannoum and Rice, 1999)。因此希望能研究出與白色念珠菌毒性或抗藥性有關的基因，可找出藥物的作用標的或將抗藥性的現象改善，做為日後治療上能夠發展的方向。

1.2 白色念珠菌型態轉變與致病力之關聯

白色念珠菌有三種型態：酵母菌型 (yeast form)、假菌絲型 (pseudohyphae form) 及菌絲型 (hyphae form)。其三種型態在特定環境條件下可以互相轉換 (Berman and Sudbery, 2002)。目前已知能夠刺激菌絲生成的因素包括：營養源、CO₂、細胞密度及黏附情形 (Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007)、N-acetylglucosamine (GlcNAc) (Mattia *et al.*, 1982)、pH 值 (Brown and Gow, 1999)、溫度、血清 (Gow and Gooday, 1982) 等，而在實驗上則會利用培養基中添加血清、環境中性及溫度 37 °C 的環境下誘導菌絲的生成 (Berman, 2006；Yang, 2003)。目前對於白色念珠菌型態轉變的機制尚未完全了解，而文獻研究中對於其中的三條調控路徑有較多且較清楚的研究，包括兩條正

調控路徑 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway 和 cAMP-PKA pathway 及一條負調控路徑 Tup1 pathway (Biswas and Van Dijck *et al.*, 2007)，其調控機制示意圖如附錄一所示。

A. MAPK pathway

此路徑包括了 Mep 2、Ras1、Cdc24、Cdc42、Cst20、Hst7、Cek1 而到達下游的轉錄因子 Cph1 調控白色念珠菌型態的轉變。目前已知此路徑能夠受到低氮源、細胞密度、外在環境壓力所調控 (Roman *et al.*, 2005；Sato *et al.*, 2004)。而在此路徑的研究中，若將此路徑之基因做雙套突變，導致路徑被阻礙，得到的菌株在 spider medium 上會失去菌絲生成能力，但若在特定環境下（外加血清、中性 pH 值）則仍然能夠形成菌絲 (Leberer *et al.*, 1996；Liu *et al.*, 1993)。另外，這些突變株對小鼠仍有部分毒性，亦會造成系統性的感染 (Lo *et al.*, 1997；Leberer *et al.*, 1996)。

B. cAMP signaling pathway

cAMP-PKA pathway 主要包括細胞膜上的 receptor Mep2 及 Gpr1，下游基因 Gpa2、Ras1、Cdc34、cAMP-dependent protein kinase A (PKA)等直到下游的轉錄因子 Efg1；路徑中可受一些外在環境訊號 (pH 值、CO₂含量、營養源) 所刺激，而路徑中基因的活化或抑制，皆能調控細胞由酵母菌型及菌絲型之間的轉變。此路徑目前被認為是調控白色念珠菌型態轉變的主要路徑，原因為此路徑的基因突變株的性狀改變比 MAPK 路徑的基因突變株較明顯 (Brown *et al.*, 2007；Dieterich *et al.*, 2002；Lo *et al.*, 1997)。文獻中，白色念珠菌 Efg1 的雙套剔除株在添加血清的培養條件下依然缺少菌絲生成的能力 並且對於小鼠的毒性及致病力大幅下降 (Sonneborn *et al.*, 2000；Lo *et al.*, 1997)。

C. Tup1 pathway

此路徑是第一個被定義為對於白色念珠菌的菌絲生成呈現負調控的路徑 (Burkhard R. *et al.*, 2000；Braun an Johnson, 1997)。

在剔除 Tup1 雙套基因的白色念珠菌發現正常應該停留在酵母菌型態的情況下，卻會出現菌絲的生長的情況，同時亦對小鼠毒性降低。而目前研究上認為 Nrg1 及 Rfg1 跟 Tup1 之間的作用很有相關性，會與 Tup1 形成 co-regulation 的現象 (Kadosh and Johnson, 2005 ; Braun *et al.*, 2001)。

1.3 抗真菌藥物及抗藥機制

由於真菌為真核生物，因此在抗真菌藥物的使用上也容易會對人體產生傷害或是許多的副作用 (Rex JH *et al.*, 2001 ; Dismukes WE., 2000 ; Georgopapadakou NH *et al.*, 1994) 。抗真菌藥物的種類有限，加上臨床治療上過度頻繁的使用，無形中篩選出對於藥物具有抗性的菌株或由於真菌長期暴露在藥物下而透過 genetic drift、recombination 及 migration 逐漸產生了抗性 (Leah E. Cowen *et al.*, 2002 ; Levin BR *et al.*, 1999 ; Taylor M *et al.*, 1996) 。此現象對於臨床治療上是一大難題，造成治療效果不佳。以下對於本研究中所使用到且也為常用的抗真菌藥物作用機制介紹 (附錄二)：

A. Polyene

此藥物作用於真菌細胞膜上的麥角固醇 (ergosterol) 上，臨床使用上屬本類的藥物為 amphotericin B。本類藥物的作用機制為藥物與細胞膜上的 ergosterol 結合後嵌入真菌的細胞膜中，使細胞膜上形成孔洞造成細胞內外離子濃度不平衡而使細胞死亡 (White T.C. *et al.*, 1998 ; Vanden Bossche *et al.*, 1994)。

B. Azoles

此類為抑真菌之藥物，其作用標的是阻斷麥角固醇 (ergosterol) 生合成的酵素。本類藥物又分兩小類：imidazoles (例如：ketocnazole、miconazole) 及 triazoles (例如：fluconazole、voriconazole)。例如 fluconazole 的藥物作用機制是利用抑制屬 cytochrome P450 酵素中的 lanosterol demethylase，此酵素是真菌合成細胞膜上 ergosterol 路徑中所需的，並且缺少此酵素後所形

成之中間產物亦對細胞有毒性，會造成細胞膜的破壞 (Lamb D. *et al.*, 1999 ; Sanglard D. *et al.*, 1998)。本類藥物在臨床上廣泛的被使用且目前也有許多人致力於此類抗真菌藥物的研究及發展 (Sheehan D.J. *et al.*, 1999 ; Georgopapadakou N.H., 1998)。

1.4 HGT family

葡萄糖在生物界被認為是最主要的碳來源及能量來源並且參與了許多代謝的過程。而對於白色念珠菌而言，葡萄糖被認為與菌絲的生成有相關性，能夠促使白色念珠菌由酵母菌型轉變為菌絲型，可以調控細胞的基因表現 (Victoria Brown *et al.*, 2006 ; Hudson *et al.*, 2004)。另外，葡萄糖同時也與 pH 的調節以及 germ tube 的生成有關 (Paranjape and Datta, 1991)。而在文獻中，負責傳送葡萄糖的 transporter 也被認為具有潛力夠發展成為與抗真菌藥物結合的作用標的，作為開發抗真菌藥物發展的一個新方向 (Fan. J *et al.*, 2002)。目前在白色念珠菌中被認為與葡萄糖傳送相關基因有 20 個，組成 HGT (High Glucose Transporter) family，此家族中每個基因之間的 ORF (open reading frame) 相似度由 10 ~ 90 % 不等，而這 20 個基因 (HGT1 ~HGT20) 利用 Phylogenetic Analysis 又可分成三個 subfamilies，而這些 subfamilies 作用的不同推測可能與環境中的葡萄糖的濃度有相關性 (Fan. J *et al.*, 2002)。另外也有文獻指出白色念珠菌的 glucose transporter 於抗藥性的現象有關連性 (Varma *et al.*, 2000)。

1.5 篩選標記之介紹

本實驗使用 SAT1 flipper cassette 作為基因剔除系統之藥物篩選標記，如同圖一之示意圖所示，其存在於質體 pSFS2-SAT1 中，可利用此質體直接在野生株 SC5314 中進行雙套目標基因的剔除，排除使用不同遺傳背景的菌株所造成的性狀影響 (Reuss *et al.*, 2004)。SAT1 flipper cassette 包含了由 ACT1 promoter 所調控表現之基因 CaSAT1，此基因可以轉譯出酵素 streptothrin acetyltransferase，此酵

素可使藥物 Nourseothricin 失去活性，在此處作為藥物篩選標記；此外，由 *MAL2* promoter 所調控的 *CaFLP*，當將培養基中將碳源換成 maltose 後可誘發 *MAL2* promoter 表現基因 *CaFLP*，產生酵素 site-specific recombinase。此酵素可辨認結合到 cassette 兩端的 FRT (minimal FLP recombination target sequence) 序列，進行 site-specific recombination 將 cassette 剔除出 genome 中（以下將此機制稱為 pop-out），只留下一個 FRT 序列，減少外來基因對白色念珠菌的影響 (Ding and Butler, 2007 ; Reuss *et al.*, 2004)。而其後可再重複使用此篩選標記，剔除目標基因的另一 allele，其作用流程如圖二所示。另外，在 *SAT1* flipper cassette 的上下游各包含一個 MCS (multiple cloning site) 利於之後做同源重組置換之 cloning 的設計。

1.6 本論文研究之目的

先前實驗室使用抑制刪除雜交法 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 找出白色念珠菌之野生型 SC5314 與酵母菌型 HLC54 (*efg1/efg1 cph1/cph1*) 兩者之間表現量有差異的基因，而本篇研究的基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 即為結果中發現表現量有差異的基因，因此推斷此三基因可能與致病力或菌絲的生成有關。本實驗室即利用 *SAT1* flipper (Reuss *et al.*, 2004) 系統將白色念珠菌的此三基因各別剔除後觀察性狀是否改變。此外，又有文獻研究中推測此三基因與白色念珠菌之抗藥性現象有關聯，因此本篇論文亦將此三基因之基因剔除株做藥物感受性測試實驗，探討基因與抗藥性現象之間的關聯性。

1.6.1 白色念珠菌 *CaCDR3* 基因之相關探討

由附錄三之文獻內文中得知 *CaCDR3* 因其蛋白質序列相似度與已知的基因 *CaCDR1* 及 *CaCDR2* 高 (相似度約 70 %)。自行由 NCBI blast 比對的結果如附錄四和附錄五所示，其 *CaCDR3* 蛋白質序列相似度與 *CaCDR1* 及 *CaCDR2* 有接近 50 % 的相似，因此將 *CaCDR3* 歸類於 CDR (Candida Drug Resistance) family

中，被認為或許與白色念珠菌的抗藥機制相關 (Balan I, *et al.*, 1997)。而目前已知 *CaCDR3* 屬 Pdrp/Cdrp family 且為 ATP-binding cassette (ABC)。目前文獻中發現，在 CAI4 的菌株 (Genotype : *ura3::imm434/ura3::imm434 iro1/iro1::imm434*) 中對 *CaCDR3* 做雙套剔除後，對於細胞型態、生長速率以及對藥物 fluconazole 的感受性並無明顯差異 (Balan I, *et al.*, 1997)。

1.6.2 白色念珠菌 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 基因之相關探討

CaHGT1 及 *CaHGT7* 皆屬於 HGT (High Glucose Transporter) family 中的基因，皆與葡萄糖的傳送相關。由於其家族中有部分的基因 ORF 相似度極高，如圖八<A>所示，因此在本實驗中的同源位置設計將此兩基因設計在 ORF 外，而基因剔除流程圖則由圖八 所示。然而，目前對於 *CaHGT1* 的文獻中發現 *CaHGT1* 基因表現量受 progesterone 及藥物 cycloheximide、chloramphenicol、benomyl 而增加 (Varma A, *et al.*, 2000)。另外，對於基因 *CaHGT7* (Alias : *CaHXT3*、*CaHXT62*、*CaHXT61*) 基因的研究，發現其表現量會受 glucose、fluconazole、Snf3p 刺激而增加，並且在 biofilm 中表現量也提升，而在單套剔除此基因的白色念珠菌中，對於 Amphotericin B 的抗性降低 (Xu D, *et al.*, 2007; Copping VM, *et al.*, 2005; Garcia-Sanchez S, *et al.*, 2004)。

二、材料與儀器

2.1 菌株 (Strain)

(1) *Escherichia coli* : DH5 α

(2) *Candida albicans* :

菌株 (Strain)	Broth microdilution method 結 果圖上之簡 寫	基因型 (Genotype)	來源 (Sources)
SC5314	SC5314	Wild-type strain	Gillum <i>et al.</i> , 1984
HLC54		<i>cph1/cph1 efg1/efg1</i>	Lo <i>et al.</i> ,1997
C3HE-6 C3HE-12	C3He1 C3He2	<i>CDR3/cdr3::FRT</i>	本實驗
C3HO-6-2 C3HO-6-3	C3Ho1 C3Ho2	<i>cdr3::FRT /cdr3::FRT</i>	本實驗
C3RES-6-3-6 C3RES-6-3-7	C3Res1 C3Res2	<i>cdr3::FRT /cdr3::CDR3</i>	本實驗
H1HE-4 H1HE-5	H1He1 H1He2	<i>HGT1/hgt1::FRT</i>	本實驗
H1HO-4-6 H1HO-4-14	H1Ho1 H1Ho2	<i>hgt1::FRT /hgt1::FRT</i>	本實驗
H1RES-4-6-1 H1RES-4-6-7	H1Res1 H1Res2	<i>hgt1::FRT /hgt1::HGT1</i>	本實驗
H7HE-3 H7HE-5	H7He1 H7He2	<i>HGT7/hgt7::FRT</i>	本實驗
H7HO-3-9 H7HO-3-11	H7Ho1 H7Ho2	<i>hgt7::FRT /hgt7::FRT</i>	本實驗
H7RES-3-9-1 H7RES-3-9-5	H7Res1 H7Res2	<i>hgt7::FRT /hgt7::HGT7</i>	本實驗

2.2 質體 (Plasmid)

質體 (Plasmid)	描述 (Description)	來源 (Sources)
pSFS2-SAT1	帶有 SAT1 marker，可抗 nourseothricin。並含有以 MAL2p 調控表現的 caFLP，可在含有 maltose 的培養條件下，誘使 marker 由 genome 中 pop-out。而其在 E. coli 中篩選標記為抗 Ampicillin。	Reuss <i>et al.</i> , 2004
pSAT1-CDR3-A1	pSFS2-SAT1 外接基因 CaCDR3 上游 (CaCDR3 gene: -49 ~ +451) 大小為 500 bp 的片段。在 E.coli 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSAT1-CDR3-A1B1	pSAT1-CDR3-A1 外接基因 CaCDR3 下游 (CaCDR3 gene: +1040 ~ +1289) 大小為 250 bp 的片段。在 E.coli 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSAT1-CDR3-A2	pSFS2-SAT1 外接基因 CaCDR3 上游 (CaCDR3 gene: -444 ~ -946) 大小為 503 bp 的片段。在 E.coli 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSAT1-CDR3-A2B2	pSAT1-CDR3-A2 外接基因 CaCDR3 中 (CaCDR3 gene: +792 ~ +1025) 大小為 234 bp 的片段。在 E.coli 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗

pSAT1- <i>CDR3</i> -RESA1B1-B1	pSAT1- <i>CDR3</i> -A1B1 將其中 A1 region 以 <i>CaCDR3</i> (<i>CaCDR3</i> gene : -49 ~ +1498) 大小為 1547 bp 的完整 ORF 序列片段。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSAT1- <i>HGT1</i> -A	pSFS2- <i>SAT1</i> 外接基因 <i>CaHGT1</i> 上游 (<i>CaHGT1</i> gene : -245 ~ -2) 大小為 244 bp 的片段。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSAT1- <i>HGT1</i> -AB	pSFS2- <i>HGT1</i> -A 外接基因 <i>CaHGT1</i> 下游 (<i>CaHGT1</i> gene : +1740 ~ +2193) 大小為 454 bp 的片段。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSAT1- <i>HGT1</i> -H1RES-B	pSAT1- <i>HGT1</i> -AB 將其中 A region 以 <i>CaHGT1</i> (<i>CaHGT1</i> gene : -101 ~ +1809) 大小為 1910 bp 的完整 ORF 序列片段。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSAT1- <i>HGT7</i> -A	pSFS2- <i>SAT1</i> 外接基因 <i>CaHGT7</i> 上游 (<i>CaHGT1</i> gene : -460 ~ -156) 大小為 305 bp 的片段。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
pSAT1- <i>HGT7</i> -AB	pSFS2- <i>HGT7</i> -A 外接基因 <i>CaHGT1</i> 下游 (<i>CaHGT1</i> gene : +1822 ~ +2347) 大小為 526 bp 的片段。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗

pSAT1- <i>HGT7</i> -H7RES-B	pSAT1- <i>HGT7</i> -AB 將其中 A region 以 <i>CaHGT7</i> (<i>CaHGT7</i> gene : -478 ~ +1689) 大小為 2167 bp 的完整 ORF 序列片段。在 <i>E.coli</i> 中篩選標記為抗 Ampicillin。	本實驗
-----------------------------	---	-----

2.3 引子 (Primer)

2.3.1 針對使用 SAT1 system 踢除 *CaCDR3* 所設計的引子

引子 (Primer)	序列 5' ~ 3'	位置
CDR3-A1-F	AAAGGTACCAAGAAATGGTGCTAGTAAATGTCC KpnI	<i>CDR3</i> gene : -49 ~ -26
CDR3-A1-R	TTTCTCGAGTCTTGGATGGTCTTTCTCTTGC XhoI	<i>CDR3</i> gene : +430 ~ +451
CDR3-B1-F	TTTCCGCGGCCATTCAATTTTGGTAGAGATAC SacII	<i>CDR3</i> gene : +1040 ~ +1064
CDR3-B1-R	AAAGAGCTCGGGGGTATAATAATTGTACATACATACG SacI	<i>CDR3</i> gene : +1262 ~ +1289
CDR3-A2-F	AAAGGTACCTCTGAAAGGTGAACTTTGGT KpnI	<i>CDR3</i> gene : -946 ~ -926
CDR3-A2-R	TTTCTCGAGAATTAGGCTGACGTAAACG XhoI	<i>CDR3</i> gene : -462 ~ -444
CDR3-B2-F	TTTCCGCGGTTGTACTCCATTGACTTATTT SacII	<i>CDR3</i> gene : +792 ~ +813
CDR3-B2-R	AAAGAGCTCTCCAAAAATTGGTTAGTCTTATCCATG SacI	<i>CDR3</i> gene : +999 ~ +1025
CDR3-RES-F	AAAGGTACCAAGAAATGGTGCTAGTAAATGTCC KpnI	<i>CDR3</i> gene : -49 ~ -26
CDR3-RES-R	TTTCTCGAGAATGGAAATTACAAGTTT XhoI	<i>CDR3</i> gene : +1481 ~ +1498

2.3.2 針對使用 SAT1 system 踢除 *CaCHGT1* 所設計的引子

引子 (Primer)	序列 5' ~ 3'	位置
HGT1-A-F	AAAGGTACCAAGAGTGGATTCAACACTTTAT KpnI	<i>HGT1</i> gene : -245 ~ -225
HGT1-A-R	TTTCTCGAGATTCGTTGAGATTATAAGTGA XhoI	<i>HGT1</i> gene : -22 ~ -2

HGT1-B-F	TTT <u>CCGCGG</u> TAATTCGTTATGTGTGTAGAT SacII	<i>HGT1</i> gene : +1740 ~ +1760
HGT1-B-R	AAAGAGCTCAGAAACAGGTGTTTAGTGTGGTT SacI	<i>HGT1</i> gene : +2171 ~ +2193
HGT1-RES-F	AAAGGTACCAACCCATGTAAGTCTCC KpnI	<i>HGT1</i> gene : -101 ~ -85
HGT1-RES-R	TTTCTCGAGTAACGAAAACAATACTGATAA XhoI	<i>HGT1</i> gene : +1789 ~ +1809

2.3.3 針對使用 SAT1 system 踢除 *CaCHGT7* 所設計的引子

引子 (Primer)	序列 5' ~ 3'	位置
HGT7-A-F	AAAGGTACCTTTATATCGTTAGTAGTGGACA KpnI	<i>HGT7</i> gene : -460 ~ -438
HGT7-A-R	TTTCTCGAGTTGACTATTCTTTTTCATTTG XhoI	<i>HGT7</i> gene : -177 ~ -156
HGT7-B-F	TTTCCGCGGTATAACTGATACTAATTGGTA SacII	<i>HGT7</i> gene : +1822 ~ +1842
HGT7-B-R	AAAGAGCTCACCCACACAAAGCAAATA SacI	<i>HGT7</i> gene : +2330 ~ +2347
HGT7-RES-F	AAAGGTACCCCAAACCTAACTGATAATCTT KpnI	<i>HGT7</i> gene : -478 ~ -458
HGT7-RES-R	TTTCTCGAGACAAATTAAAACATAACCG XhoI	<i>HGT7</i> gene : +1671 ~ +1689

2.3.4 篩選用引子

引子 (Primer)	序列 5' ~ 3'	位置
CDR3 pre-A	TGTGCCTAGTGGATTTGGATATCC	<i>CDR3</i> gene : -1168 ~ -1145
HGT1 pre-A	TGCACCTGCAATCAGAAAGTCATTTCTTAC	<i>HGT1</i> gene : -523 ~ -494
HGT1 pro-B	CGACTAAGTTTCCGGTATTTAGGGTTCA	<i>HGT1</i> gene : +2532 ~ +2559
HGT7 pre-A	CACTCTACACTGCTGGTATTTCTCAAGTC	<i>HGT7</i> gene : -532 ~ -503
HGT7 pro-B	CACCACTGGTGGAAAATGAGTGATAGA	<i>HGT7</i> gene : +2445 ~ +2471

2.3.5 定序用引子

引子 (Primer)	序列 5' ~ 3'	位置
C3seq1	CGCAATTAACCCTCACTAAAGGG	<i>CDR3</i> gene : -89 ~ -67
C3seq2	AAGACATTTTCGTGGTTGGCATT	<i>CDR3</i> gene : +448 ~ +470
C3seq3	TGGATAAGACTAACCAATTTTGGAT	<i>CDR3</i> gene : +1001 ~ +1026
H1seq1	CCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGA	<i>HGT1</i> gene : -308 ~ -286
H1seq2	GAAGATTATCATTATTGACTTGT	<i>HGT1</i> gene : +293 ~ +315
H1seq3	ATTGGTTATGCTACTTTATTCAC	<i>HGT1</i> gene : +793 ~ +815
H1seq4	TGCCATTTCCTTCTGCTAATT	<i>HGT1</i> gene : +1293 ~ +1316
H7seq1	CCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGA	<i>HGT7</i> gene : -685 ~ -663
H7seq2	CCCCATGGCAAAATGAAAAAGAA	<i>HGT7</i> gene : -185 ~ -161
H7seq3	GGTTGTGCCATTGGTGCATTATT	<i>HGT7</i> gene : +316 ~ +338
H7seq4	CCTTATACCGTGAACCTCAATTAATTC	<i>HGT7</i> gene : +806 ~ +832
H7seq5	CCATTGAAAGTTAGAAGTAAGGCTATGG	<i>HGT7</i> gene : +1312 ~ +1339

2.4 化學藥品

- Alpha Biociences Inc.: LB agar (Cat. No. L12-111)
- Ameresco: Agarose (Cat. No. 0710-500G) 、 EDTA (Cat. No. 0105-1KG) 、 Glycerol (Cat. No. 0854-1L-PTM) 、 Phenol (Cat. No. 0945-400ML) 、 Sodium chloride (Cat. No. 0241-1KG) 、 Tris base (Cat. No. 0826-1KG) 、 Tris-hydrogen chloride (Cat. No. 0234-500G)
- AppliChem: Ampicillin (Cat. No. A0839)
- Difco laboratories: Bacto agar (Cat. No. 143175) 、 D-mannitol (Cat. No. 217020), Nutrient broth (Cat. No. 149018) 、 YPD broth (Cat. No.

235141XB)

- Fluka: Maleic acid (Cat. No. 63190-1KG)
- Invitrogen: Goat serum (Cat. No. 01-6201)
- J. T Baker: Sodium hydroxide (Cat. No. 3722-01) 、Triton X-100 (Cat. No. X198-07)
- Kodak: X-film (Cat. No. 1651454)
- Merck: Sodium acetate (Cat. No. 1.06268.0250)
- Protech: 100 bp DNA ladder (Cat. No. M1-100T)
- Riedel-de Haën: Chloroform (Cat. No. 32211) 、Sodium dodecyl sulfate (Cat. No. 62862)
- Roche: Anti-DIG-AP (Cat. No. 1093274) 、Blocking reagent (Cat. No. 1096176) 、CSPD (Cat. No. 1655884) 、DIG DNA labeling mix (Cat. No. 1277065) 、DIG Easy Hyb (Cat. No. 11603558001)
- Scharlau: LB broth (Cat. No. 02-385)
- Sigma Chemical Co.: Dithiothreitol (Cat. No. D9779) 、Glassbeads (425~600 μm) (Cat. No. G9268-50G) 、Lithium acetate (Cat. No. L-6883) 、Sorbitol (Cat. No. S-0900) 、Tween 20 (Cat. No. p-1379)
- Subenzyme: 1kb DNA ladder (Cat. No. SEM11C001)
- Werner Bioagents: Nourseothricin (Cat. No. 5.1000)
- 景明化工: 99.5% Ethanol

2.5 酵素

- Fermentas : T4 DNA Ligase (EL0011) 、*Taq* DNA polymerase (EP0402) 、Thermo Scientific Dream*Taq* DNA polymerase (EP0702)
- NEB : *Alf* II (Cat. No. R0520) 、*Alw* N I (Cat. No. R0514) 、*Ava* I (Cat. No. R0152) 、*Bam* H I-HF (Cat. No. R3136) 、*Bsa* I (Cat. No. R0535) 、*Bsa* I-HF (Cat. No. R3535) 、*Bsp* E I (Cat. No. R0540) 、*Bsp* H I (Cat. No. R0517) 、*Dra* III-HF (Cat. No. R3510) 、*Eco* R V-HF (Cat. No. R3195) 、*Hind* III (Cat. No. R0104) 、*Kpn* I-HF (Cat. No. R3142) 、

Nco I-HF (Cat. No. R3193) 、*Nsi* I (Cat. No. R0127) 、*Pci* I (Cat. No. R0655) 、*Sac* I-HF (Cat. No. R3156) 、*Sac* II (Cat. No. R0157) 、*Sca* –*HFI* (Cat. No. R3122) 、*Spe* I-HF (Cat. No. R3133) 、*Xho* I (Cat. No. R0146)

- Takara: EX *Taq*TM (Cat. No. RR001A)

2.6 藥品配製

2.6.1 緩衝溶液及溶劑

- 0.1 M CaCl₂: 1.47 g CaCl₂·2H₂O dissolved in ddH₂O to 100 ml
- Freezer solution: 50 mM CaCl₂, 15% glycerol
- 10X Tris-EDTA (TE): 100 mM Tris-Cl (pH 7.5), 10 mM EDTA (pH 8.0)
- 3 M Sodium acetate: 40.83 g sodium acetate dissolved in ddH₂O to 100 ml
- 1 M Dithiothreitol (DTT): 3.09 g DTT dissolved in 20 ml 0.01 M Sodium acetate, store at -20 °C
- 1 M Lithium acetate: 10.2 g lithium acetate dissolved in ddH₂O to 100 ml (pH7.5)
- 1 M sorbitol: 16.7 g sorbitol dissolved in ddH₂O to 100 ml
- Breaking buffer: 2% Triton X-100, 1% SDS, 0.1 M NaCl, 1X TE
- Denature buffer: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- Neutralization buffer: 0.5 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl
- 20X SSC (pH 7.0): 3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate
- Detection buffer (pH 9.5): 0.1 M Tris-Cl, 0.1 M NaCl
- Maleic acid buffer (pH 7.5): 0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl
- Washing buffer: maleic acid buffer contained 0.3% Tween 20
- 10X blocking buffer: 10% (w/v) blocking reagent dissolved in maleic acid buffer
- 10% (w/v) SDS: 10 g SDS dissolved in ddH₂O to 100 ml

2.6.2 培養基配製

- LB (Luria-Bertni) 培養液: 1% trytone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl
- LB 培養基 (含Ampicillin): 1% trytone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar, 50 µg/ml Ampicillin
- YPD 培養液: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose
- YP maltose 培養液: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% maltose
- YPD 培養基: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar
- YPD 培養基 (含nourseothricin): 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar, 200 µg/ml nourseothricin
- YPD 培養基 (含4% goat serum): 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar, 4% goat serum
- Bacto agar 培養基 (含4% goat serum): 2% agar, 4% goat serum
- Solid spider 培養基: 1% nutrient broth, 1% mannitol, 0.2 % K₂HPO₄, 1.35% agar
- SDA 培養基: 0.5 % peptic digest of animal tissue, 0.5 % pancreatic digest of casein, 4% dextrose, 1.5 % agar
- SD 培養基: 0.67 % Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid, 2 % dextrose, 2 % agar

2.7 儀器設備

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)

水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)

乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
水浴槽 B-100 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
恆溫式震盪培養箱 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
迴轉式震盪培養箱 721SR (WISDOM APPARATUS MFG COMPANY)
核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
電磁式奈米級偵測儀 ND-1000 (博克科技有限公司)
分光光度計 20GENESYS (SPECTRONIC INSTRUMENTS)
PCR溫度控制儀 Gene CycloerRT (BIO-RAD)
梯度核酸增值儀 labcycler (SENSOQUEST)
微量離心機 MICRO 240A (DINVILLE SCIENTIFIC INC.)
微量冷凍高速離心機 centrifuge 5415R (eppendorf)
桌上型低溫高速離心機 centrifuge 5804R (eppendorf)
桌上型高速離心機 KUBOTA 5100 (KUBOTA CORPORATION)
4 °C三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)
-20 °C直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)
-80 °C超低溫冷凍櫃 925/926 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
無菌操作台 VCM-420 (造鑫)
倒立相位差螢光顯微鏡 TE2000-U (Nikon)
數位相機 C-5050ZOOM (OLYMPUS)
脈衝器 Micro pulserTM 411BR 0897 (BIO-RAD)
雜交連結器 (UVITEC)

三、方法與步驟

3.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的製備

接種 DH5 α 的單一菌落於 5 ml LB 培養液中，37 °C、180 rpm 培養 14~16 小時後取 2 ml 的菌液轉養於 100 ml LB (含 5% glucose 及 2 mM MgCl₂) 培養液中，37 °C、180 rpm 培養至 OD_{600nm} 為 0.5~0.7 (約2~3小時)。將菌液移至 50 ml 離心管中，靜置於冰上 20 分鐘後以 1620 xg、4 °C 離心 10 分鐘，移除上清液並加入 1 ml 的 0.1 M CaCl₂ 將菌重新懸浮；再加入 24 ml 的 0.1 M CaCl₂，靜置於冰上 30 分鐘後以 720 xg、4 °C 離心 10 分鐘，移除上清液並加入 2.5 ml 的 0.1 M CaCl₂ 將菌重新懸浮，靜置冰上約 20 小時。將菌液以 720 xg、4 °C 離心 5 分鐘，移除上清液，加入 2.5 ml Freezer solution 將菌重新懸浮，分裝成每管 100 μ l，保存於 -80 °C 中。

3.2 大腸桿菌勝任細胞的轉型 (Transformation)

將 0.1~1 μ g 的質體 DNA 與 50 μ l 的勝任細胞混勻，靜置於冰上 20 分鐘。放置於 42 °C 水浴槽熱休克 45 秒後立刻放回冰上。加入 500 ml LB 培養液 37 °C、180 rpm 培養 1 小時後，取 100 μ l 菌液塗盤，以溫度 37 °C 培養 14~16 小時。

3.3 質體 DNA 的萃取

將帶質體的大腸桿菌單一菌落接種於 5 ml LB 培養液中 (視需要加入 Ampicillin : 50 μ g/ml)，37 °C、180 rpm 培養 14~16 小時。將菌液離心 720 xg、10 分鐘，去除上清液，將收集的菌體用 200 μ l 的 Solution I 回溶後移至 1.5 ml 的離心管。加入 200 μ l 的 Solution II 上下反轉輕搖 5~6 下後常溫靜置 5 分鐘。加入 300 μ l 的 Solution III 上下反轉輕搖 5~6 下，離心 15700 xg、8分鐘。取 650 μ l 離心後的上清液至已與 collection tube 組合好的 spin column 中。離心 15700 xg、30 秒，移除濾液後加入 700 μ l 的 washing buffer 離心 15700 xg、1 分鐘。重複此步驟一次。再次將組合好的 spin

column 和 collection tube，離心 15700 xg、3 分鐘以去除殘留的 buffer。將 spin column 移入新的 1.5 ml 離心管中，開蓋 60 °C 乾浴 5 分鐘，以揮發殘留的酒精。在 spin column 中加入 40 µl 無菌二次水，室溫靜置 5 分鐘。離心 15700 xg、2 分鐘，將濾液保存於 -20 °C。

3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.4.1 Fermentas Taq DNA polymerase

在 200 µl 微量離心管內混合以下藥品: 0.3~0.5 µg template genomic DNA、50 µM primer 1 µl、10X *Taq* buffer (-MgCl₂) 5 µl、25 mM MgCl₂ 4 µl、2.5 mM dNTPs 4 µl、1 unit *Taq* DNA polymerase，補無菌二次水至總體積 50 µl。

3.4.2 DreamTaq™ DNA polymerase

在 200 µl 微量離心管內混合以下藥品: 0.3~0.5 µg template genomic DNA、50 µM primer 1 µl、10X DreamTaq™ buffer 5 µl、2.5 mM dNTPs 4 µl、1.25 unit DreamTaq™ DNA polymerase，補無菌二次水至總體積 50 µl。

3.4.3 TaKaRa Ex Taq™

在 200 µl 微量離心管內混合以下藥品: <0.5 µg template genomic DNA、50 µM primer 1 µl、10X Ex *Taq* buffer 5 µl、2.5 mM dNTPs 4 µl、1.25 unit *Taq* DNA polymerase，補無菌二次水至總體積 50 µl。

3.4.4 PCR 溫度設定

Step	Temperature, °C	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	1-3 min	1
Denaturation	95	30 sec	30
Annealing	T _m (50~65°C)	30 sec	

Extension	72	1 min / kb	
Final extension	72	5-10 min	1
Stop reaction	4	-	-

3.5 限制酶反應

3.5.1 質體確認之限制酶反應

取 DNA 1.5 μ g、10 X buffer 2 μ l、10 X BSA 2 μ l (視酵素需求添加)、3~5 unit 限制酵素，補無菌二次水至總體積 20 μ l，在酵素作用溫度下反應 1.5~2 小時，再以洋菜膠電泳進行片段大小之確認。

3.5.2 Cloning 片段製備之限制酶反應

取 DNA 3 μ g、10 X buffer 2 μ l、10 X BSA 2 μ l (視酵素需求添加)、6~9 unit 限制酵素，補無菌二次水至總體積 50 μ l，在酵素作用溫度下反應 2~3 小時。將反應完的產物以 clean-up kit (Favorgen FAGCK001-1) 加以純化。

3.6 萃取洋菜膠中的 DNA 片段 (Gel extraction)

3.6.1 配製含有結晶紫的洋菜膠

取 0.4 g agarose 粉末加入 50 ml 1X TAE buffer 中，微波加熱溶解 agarose，待稍冷卻後加入 40 μ l 結晶紫溶液 (2.5 mg/ml) 混合均勻，倒入製膠器中冷卻凝固即可使用。

3.6.2 萃取洋菜膠中的 DNA 片段

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片段 (重量需小於 300 mg)，放入 1.5 ml 之微量離心管中，使用 Favorgen Gel Purification Mini Kit 進行片段純化。加入 500 μ l FADF buffer 至微量離心管中，接著將微量離心管放置於 60 $^{\circ}$ C 乾浴板上 10~20 分鐘 (每隔 2~3 分鐘以 vortex 方式混合均勻)，待洋菜膠完全溶解後，靜置室溫下降溫。將溶解並降溫後的混合物加入 spin column 中，以 15700 xg 離心 30 秒，移除濾液後加入 750 μ l washing buffer，以 15700 xg 離心 30 秒，將濾液移除後再以 15700 xg 空離 3 分鐘。將 spin column 移入新的 1.5 ml 微量離心管中，

開蓋置於室溫下 3 分鐘。加入 40 μ l 無菌二次水至 column 中，靜置 5 分鐘後以 13000 xg 離心 2 分鐘，將濾液保存於 -20 $^{\circ}$ C 中。

3.7 接合反應 (Ligation)

將以限制酵素作用並純化後的 vector 和 insert 以 1:3 的莫耳數比例在微量離心管中混合，接著加入 2 μ l 10X Ligase Buffer、1 μ l T4 Ligase (5 unit/ μ l)，並補無菌二次水至總體積為 20 μ l，22 $^{\circ}$ C 反應 2 小時。將整個反應的 DNA 濃度控制在 300~500 ng。

3.8 白色念珠菌勝任細胞的轉型 (Transformation)

3.8.1 白色念珠菌勝任細胞的製備

將白色念珠菌的單一菌落接種於 5 ml YPD 培養液中，30 $^{\circ}$ C、300 rpm 培養 16~18 小時。取 5 μ l 菌液轉養到 50 ml YPD 培養液中，30 $^{\circ}$ C、300 rpm 培養至 O.D_{600 nm} 為 1.6~2.2，約 12~14 小時(分光光度計線性測量範圍為 O.D_{600 nm} = 0.1~1.0，故菌液需先稀釋 10 倍再測量)。將菌液移至 50 ml 離心管中。離心 1620 xg、5 分鐘，移除上清液並加入 10 ml LATE buffer 將菌重新懸浮，置於 30 $^{\circ}$ C、300 rpm 培養 1 小時。加入 250 μ l 1M DTT，30 $^{\circ}$ C、300 rpm 培養 30 分鐘。以下開始冰上操作，加入 40 ml 4 $^{\circ}$ C 無菌二次水，離心 1620 xg、4 $^{\circ}$ C、5 分鐘。移除上清液並加入 25 ml 4 $^{\circ}$ C 的無菌二次水將菌重新懸浮。離心 1620 xg、4 $^{\circ}$ C、5 分鐘，將上清液移除後加入 5 ml 4 $^{\circ}$ C 的 1 M sorbitol 懸浮菌體。離心 1620 xg、4 $^{\circ}$ C、5 分鐘，移除上清液並加入 5 ml 4 $^{\circ}$ C 的 1 M sorbitol 懸浮菌體。離心 1620 xg、4 $^{\circ}$ C、5 分鐘，移除上清液並加入 50 μ l 4 $^{\circ}$ C 的 1 M sorbitol 將菌體重新懸浮，靜置於冰上即完成勝任細胞的製備。

3.8.2 電穿孔 (Electroporation)

在預冷的無菌 1.5 ml 微量離心管中混合 40 μ l 白色念珠菌之勝任細胞和 1 μ g 的 DNA 片段，稍作混合後加入預冷的 cuvette 中(電穿孔專用，0.2 cm)，靜置於冰上 5 分鐘。用試鏡紙擦拭電極處之水珠後，以 1.8 kV 進行電穿孔，之後在 cuvette 中加入 1 ml 冰的

1M sorbitol，混勻後吸出菌液，移入預冷新的無菌 1.5 ml 微量離心管中，離心 1620 xg、5分鐘。去除上清液後加入 1 ml YPD 培養液，30°C、300 rpm 培養 1 小時。取 100 μ l 的菌液塗盤（此處使用含有篩選藥物的 YPD 培養基：內添加 nourseothricin，200 μ g/ml），30°C 培養 20~24 小時。

3.9 培養基中添加 Maltose 進行 SAT1 flipper cassette 之剔除

在經過轉型後的白色念珠菌培養盤中，篩選單一菌落且再一次 sub-culture 於含有篩選藥物的 YPD 培養基（添加 nourseothricin，200 μ g/ml），30 °C 培養 18~20 小時。之後挑選單一菌落接種於 5 ml YP maltose 培養液中，30 °C、300 rpm 培養 3 天（每天 transfer 100 μ l 的菌液至新鮮的 5 ml YP maltose 培養液中）。

3.10 複製平皿培養法 (Replica plating)

將方法 3.9 的菌液，以 YPD 培養液做 $10^7 \sim 10^8$ 倍稀釋，取 100 μ l 稀釋後的菌液塗盤（YPD 培養基），以 30 °C 培養約 20 個小時。將培養完的菌轉印在無菌的絨布，並將無篩選性的培養基（YPD 培養基）和有篩選性的培養基（YPD 培養基含 nou⁺: 200 μ g/ml）依序壓蓋在絨布上，置於 30°C 培養 8~10 小時。而後挑選生長於無篩選性的培養基但不生長於具有篩選性的培養基上的菌落，轉養於 YPD 培養基中再進行菌株的確認。

3.11 建構白色念珠菌單套剔除株 (Heterozygote) 及雙套剔除株 (Homozygote)

利用前端加上限制酶切位之引子，以 PCR 方式分別將目標基因上游片段（稱為 A region）及下游片段（稱為 B region）增幅，依序 cloning 接進 SAT1 flipper cassette 上下游的 multiple cloning site。如圖一所示，而後將帶有目標基因上下游片段的 SAT1 flipper cassette 利用限制酵素 Kpn I 及 Sac I 由質體上切下，利用電穿孔的方式轉型至白色念珠菌野生株中。送入的片段利用目標基因上下游同源的區域進行同源重組置換 (homologous recombination)，將目標基因以

SAT1 flipper cassette 取代，接著藉由藥物 nourseothricin 篩選出帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株。再將篩選到的菌株培養在 YP/maltose 培養液中進行 pop-out，達到基因剔除的目的。三日後抽取菌株 genomic DNA，以 PCR 確認是否得到預期菌株後，藉由複製平皿培養法 (replica plating)，排除部分未將 *SAT1* flipper cassette 剔除的菌株，再一次抽取菌株 genomic DNA，並且再以 PCR 確認菌株內的構築符合預期，如此即獲得不帶有 *SAT1* flipper cassette 的單套基因剔除株 (heterozygous strain)。之後即可重複使用 *SAT1* flipper cassette 將另一個 allele 作剔除，得到雙套基因剔除株 (homozygous strain)。

3.12 建構白色念珠菌單套基因回復株 (rescued strain)

建構目的是當基因剔除株對於白色念珠菌性狀有影響，單套基因回復株可以作為反證的對照組。方法為建構一 *SAT1* flipper cassette 上游帶有目標基因 ORF 完整序列，以及 cassette 下游帶有目標基因 B region 的片段。設計能夠得到目標基因之完整 ORF 序列並在前端加上限制酶切位的引子，將此基因片段 PCR 增幅後 clone 進一個帶有 B region 的 *SAT1* flipper cassette 上游的 multiple cloning site，完成後將帶有整個 ORF 和 B region 的 *SAT1* flipper cassette 利用限制酵素 *Kpn* I 及 *Sac* I 由質體上切下，轉型到雙套基因剔除株 (homozygous strain)，經過同源重組置換和藥物篩選後，得到單套基因回復株 (rescued strain)。

3.13 白色念珠菌 Genomic DNA 純化

3.13.1 冷熱法萃取

挑選單一菌落之白色念珠菌培養於液態培養基中，30°C、300 rpm 培養 16~18 小時，取 300~500 µl 菌液至 1.5 ml 微量離心管，離心 15700 xg、10 分鐘。去除上清液，加入 200 µl Lysis buffer 將菌體重新懸浮，將菌液放至 -80 °C 兩分鐘，再將之放置在 95°C 一分鐘；再次放置 -80 °C 兩分鐘及 95 °C 一分鐘。將菌液 vortex 30 秒後加入 200 µl chloroform 再 vortex 2 分鐘，接著離心 15700 xg、10

分鐘。取 200 μ l 上清液移入新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 400 μ l 4 $^{\circ}$ C 乙醇及 25 μ l NaOAc 混勻後，靜置於 -20 $^{\circ}$ C 沉降至少 30 分鐘至 2 小時。離心 15700 \times g、5 分鐘後移除上清液並加入 500 μ l 70% 4 $^{\circ}$ C 乙醇沖洗管壁沉澱物。離心 15700 \times g、1 分鐘，移除上清液後將離心管倒置使 pellet 呈透明狀即可以 50 μ l 無菌二次水和 0.5 μ l 10 mg/ml RNase A 回溶，萃取完成之 genomic DNA 保存於 -20 $^{\circ}$ C 中。

3.13.2 傳統法萃取

挑選單一菌落之白色念珠菌培養於液態培養基中，30 $^{\circ}$ C、300 rpm 培養 16~18 小時，取 300~500 μ l 菌液至 1.5 ml 微量離心管，離心 15700 \times g、10 分鐘。去除上清液，加入 300 μ l Lysis buffer 將菌體重新懸浮。加入 1/3 體積的玻璃珠後 vortex 5 分鐘，再加 3 μ l 20 mg/ml proteinase K 以及 3 μ l 10 mg/ml RNase，37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時。加入 300 μ l phenol，vortex 5 分鐘接著加入 300 μ l 1X TE，vortex 5 分鐘。離心 4 $^{\circ}$ C、15700 \times g、10 分鐘，取 650 μ l 上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入等體積的 phenol，vortex 30 秒。離心 15700 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 分鐘後取 200 μ l 上清液移入新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 400 μ l 4 $^{\circ}$ C 乙醇及 25 μ l NaOAc 混勻後，靜置於 -20 $^{\circ}$ C 沉降至少 30 分鐘至 2 小時。離心 15700 \times g、5 分鐘後移除上清液並加入 500 μ l 70% 4 $^{\circ}$ C 乙醇沖洗管壁沉澱物。離心 15700 \times g、1 分鐘，移除上清液後將離心管倒置使 pellet 呈透明狀即可以 50 μ l 無菌二次水回溶，萃取完成之 genomic DNA 保存於 -20 $^{\circ}$ C 中。

3.14 南方點墨法

3.14.1 探針 (Probe) 的合成

使用 Roche 廠商產品 DIG labeling dNTP mix 以及 TaKaRa Ex TaqTM DNA polymerase system。

在 200 μ l 微量離心管內混合以下藥品：<0.5 μ g template genomic DNA、50 μ M primer 1 μ l、10X Ex Taq buffer 5 μ l、2.5 mM

dNTPs 2 μ l、DIG DNA labeling mix 2.5 μ l、1.25 unit *Taq* DNA polymerase，補無菌二次水至總體積 50 μ l 進行聚合酶連鎖反應。以 DIG 標記合成之 DNA 片段，即為 DNA 探針，保存於 -20 $^{\circ}$ C。

3.14.2 南方點墨法

● 轉漬 DNA (Transfer)

取10 μ g genomic DNA 以合適的限制酵素作用 6 小時以上。將反應完的 DNA 以 0.8 % 洋菜膠 50 V 進行電泳。接著將洋菜膠以 0.5 μ g/ml EtBr 染色 20 分鐘，退染 2 分鐘後以影像處理系統拍照。將照完的膠浸入 Denature Buffer，60 rpm 平面震盪 15 分鐘。換新的 Denature Buffer 再搖 15 分鐘，接著將膠以無菌二次水沖洗後將膠浸入 Neutralization Buffer，60 rpm 平面震盪 15 分鐘。換新的 Neutralization Buffer 再搖 15 分鐘。接著將膠浸入 10X SSC 中，60 rpm 平面震盪 10 分鐘以上。裁切一張和膠同樣大小的 nylon membrane (剪一角作為標記)，先以無菌二次水沖洗，再以 10X SSC 潤濕。裁切三張比膠大一些的 3M 濾紙和一張較大作為基底的 3M 濾紙，同樣以 10X SSC 潤濕。準備一張和濾紙同大小的投影片，中間裁切出一個和膠一樣大小的空洞。準備一個底盆和一個堅固的平台，將平台放入底盆中，在盆內加入 10X SSC。將較大的 3M 濾紙置於平台上，濾紙兩端低於 10X SSC 液面。在底部濾紙上中間鋪上一張小張的濾紙。將膠置於濾紙中央，並將投影片穿過膠體，置於濾紙之上。將 nylon membrane 鋪在膠上，小心的排除氣泡。蓋上兩張小張的濾紙，同樣的排除接觸面的氣泡。在上放置約 5 公分厚的平版衛生紙，以保鮮膜覆蓋整個裝置，減少 10X SSC 蒸散，並在裝置上壓上約 0.5 kg 的重物，放置約 18~20 小時。

● 雜交反應 (Hybridization)

將轉漬完的 nylon membrane 浸於 2X SSC 中。取一片比膠大之 3M 濾紙用 2X SSC 潤濕後將 membrane 以 DNA 面朝上的方式放置，以 UV 254 nm 照射兩次，每次 2 分鐘進行 cross-linking。將

membrane 以無菌二次水潤濕，再浸入預熱過的 DIG Easy Hyb 中，42 °C、60 rpm 平面震盪 2~3 小時。將探針放置於 95 °C 乾浴板上 10 分鐘，稍微離心後置於冰上 10 分鐘。將探針和已預熱的 DIG Easy Hyb 以 1 µl 探針加 1 ml DIG Easy Hyb 的比例混合均勻。將 membrane 浸入加有探針的 DIG Easy Hyb 中，42 °C、60 rpm 平面震盪 16~20 小時。將 membrane 移至 low stringency buffer (2X SSC，0.1% SDS) 在室溫下 60 rpm 平面震盪 5 分鐘，重複此步驟一次。接著將 membrane 換至已預熱的 high stringency buffer (0.5X SSC，0.1% SDS)，65 °C、60 rpm 平面震盪 15 分鐘，重複此步驟一次。

● 免疫偵測 (Detection)

將 membrane 浸入 washing buffer 中，60 rpm 平面震盪 5 分鐘。接著將 membrane 浸入 1X Blocking buffer 中以 60 rpm 平面震盪 2~3 小時。配製 Antibody buffer，將 Antibody (Roch, Anti-DIG-AP) 4 °C、10000 rpm 離心 5 分鐘，以 1 µl Antibody 加 10 ml 1X Blocking buffer 的比例混合均勻。將 membrane 移入 Antibody buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 30 分鐘。接著將 membrane 浸入 washing buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 15 分鐘，重複此步驟一次。再將 membrane 浸入 Detection buffer 中，以 60 rpm 平面震盪 5 分鐘。將 membrane 放置在投影片上 (DNA 面朝上)。將 10 µl CSPD 和 990 µl Detection buffer 混勻並均勻的加到 membrane 上。蓋上另一片投影片，去除多餘的 buffer 和氣泡，以鋁箔紙包覆後放置於 37 °C 中反應 15 分鐘，之後在暗房進行壓片。將底片隔著投影片放置於 membrane 上，經過適當時間感光後，將底片浸於 Developer buffer 約 2 分鐘成像，接著以清水稍微清洗底片後，將底片浸於 Fixer buffer 約 1 分鐘定影，最後以清水沖洗掉底片上殘留之 buffer 並陰乾後即可永久保存。

3.15 突變株之性狀分析 (Characterization)

3.15.1 不同葡萄糖濃度之環境生長情形

配置四種不同葡萄糖含量之 YPD plate (0 %、0.02 %、0.2 % 及 2 %)。將各突變菌株游動管劃出至每種葡萄糖濃度的 plate 中，每個 plate 包含六株菌：野生株、一株單套剔除株、兩株雙套剔除株及兩株單套回復株，將 plate 培養於 37 °C 兩天，兩天都拍照觀察 single colony 生長情況與野生株是否有差異。

3.15.2 芽管試驗 (Germ tube assay)

將含有 10 % FBS 之 YPD 培養液，以 2 ml /well 加至 24-well plate 中，用無菌牙籤沾取新鮮的單一菌落於 well 裡 (不需混勻)，於 37°C 培養 3 小時，利用倒立式顯微鏡 400 倍觀察芽管生成情形。

3.15.3 誘發菌絲生長觀察型態變化 (Colony morphology)

- 將單一菌落接種在含 4% FBS YPD 之固態培養基中，置於 37°C 培養三天，使用倒立式顯微鏡觀察菌落生長的型態。
- 將單一菌落接種在 4% FBS Bacto agar 之固態培養基中，置於 37°C 培養，每天觀察及記錄單一菌落生長情形 (本研究為培養 7 天之結果)。

3.15.4 侵犯力測試 (Invasion assay) (Navarro-Garcia *et al.*, 1998)

將單一菌落接種在 Solid Spider 培養基上，置於 37°C 培養至適當時間 (本研究培養 7 天)，之後以定時定量流水沖洗菌落，先觀察菌落是否會因菌絲侵入培養基而殘留。再戴手套將培養基表面的菌落推除，觀察是否有菌絲埋入培養基。

3.16 CLSI Broth Microdilution Method

3.16.1 藥盤配製

首先將實驗所需的藥物 amphotericin B、miconazole 及 fluconazole 溶於有機溶劑 dimethyl sulfoxide (DMSO) 中，而後使用 RPMI 1640 的培養基來稀釋藥物配成本實驗使用最高藥物濃度的二

倍濃度：fluconazole (128 mg/l)、amphotericin B (32 mg/l) 及 miconazole (4 mg/l)。接著將每一種藥物進行序列稀釋，最終配成十個濃度，藥物範圍分別是 Fluconazole (0.25~128 ug/ml)，Amphotericin B (0.0625~32 ug/ml)，Miconazole (0.0078~4 ug/ml)。分別在 96 孔盤第一到第十個孔盤加 100 μ l 的藥物，第十一個孔盤加入 100 μ l RPMI 1640 (之後加菌液做對照組)，第十二個孔盤加入 200 μ l RPMI 1640 作為控制組 blank (此孔盤不加菌液)。

3.16.2 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 偵測各突變株之藥物感受性實驗

根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (Clinical and Laboratory Standards Institute) 所建議的 M27-A3 的修編版本進行實驗 (CLSI, 2008)。配製適量 RPMI 1640 broth、無菌 0.85 % NaCl，置於 1 L 的血清瓶中，並裝上分注器置於 4 °C 冰箱中備用。

● DAY 1: 自 -80 °C 冰箱取出本實驗中之 mutant strains (Heterozygous、Homozygous、Rescued strains)、wild-type strain (SC5314)、negative control (HLC54)，以及控制組 YLO6 (ATCC® 6258)，YLO7 (ATCC® 22019)，YLO12 (ATCC® 90028)。用滅菌之竹籤挖取少許菌液，塗抹在 SDA 培養基，溫度 35 °C 培養 24 小時。準備所需數量之 12 × 75 mm 玻璃試管，以標示筆標示待測菌株編號，置於鐵架以鋁箔紙覆蓋後，利用高壓滅菌鍋滅菌。準備 15 ml 無菌離心管，標示待測菌株編號後，放置於鐵架上備用。

● DAY 2: 至 -80 °C 冰櫃中取出已配好之 2 倍藥物濃度的藥性試驗培養盤，置於室溫下回溫備用並依序標示菌株編號。取出 35 °C 培養 24 小時後的 SDA plate，使用滅菌之竹籤刮取少量菌液加入含有 2 ml 0.85% NaCl 的玻璃試管中混合均勻，而後在 530 nm 波長下利用比色計測量其波長，調整菌液濃度至 0.5 McFarland，此時可以得到約 $1\sim5 \times 10^6$ cells/ml。而後將調好的菌液取 200 μ l 先稀釋 10 倍在裝有 1.8 ml 0.85% NaCl 玻璃試管中，再從上述菌液中取 200 μ l

稀釋 10 倍於含 1.8 ml RPMI 1640 培養液的離心管中，最後再從上述菌液中依待測菌盤數稀釋 10 倍於 RPMI 1640 培養液離心管中，總共稀釋 1000 倍。將離心管中之菌液混合均勻後，倒入無菌藥品槽，利用 12 爪電動 Pipet 裝上 11 支 tips，吸取 100 μ l 菌液，同時加入 96 孔盤 A 列 1~11 行的兩倍藥物濃度序列稀釋的藥盤中。第 12 行不加菌液，為無菌操作的對照組。(本實驗使用三種藥物，故須分別將菌液分別加至三種藥盤的 A 列)。更換 tips，接著依照同樣方式將所有菌株依序加入 每種藥盤的 B~H 列，此時藥盤濃度稀釋兩倍，而菌液稀釋倍率為 2000 倍，最終接種數量約 $1\sim5 \times 10^3$ cells / ml。添加完畢後，蓋上抗藥性試驗培養盤蓋子，放入 35 $^{\circ}$ C 培養箱中分別培養 24 和 48 小時後，測定吸光值。

● Day 3: 讀取培養 24 小時菌液生長濃度。開啟電腦及 Bio-rad microplate reader 的電源，點選電腦桌面程式 20120416 bio-rad protein assay dye 595nm，開啟視窗後，點選 read new plate，再點選 AutoExport 後即可讀取培養盤之數值。取出已 35 $^{\circ}$ C 培養 24 小時的抗藥性試驗培養盤，放在具有 96 孔盤專用承載盤的震盪器上，調整震盪速度於 2~3 之間，震盪時間約 1 min。震盪均勻後，點選 reader 之 open 鍵後將培養盤放入 reader 中並將蓋子打開，之後點選 reader 之 close 鍵，接著點選電腦程式上之 Read 鍵讀取吸光值。讀取完畢後待電腦程式中顯示出 96 孔盤的 OD 數值後點選 reader 之 open 鍵將培養盤取出並將培養盤蓋子蓋上，於程式中點選 Done 將結果匯出到 Excel 並存檔，培養盤放回 35 $^{\circ}$ C 培養箱繼續再培養 24 小時。

● Day 4: 讀取培養 48 小時菌液生長濃度。

3.17 Agar dilution test

● DAY1: 將所有試驗菌株從凍管劃在 SDA plate 上，溫度 30 $^{\circ}$ C，培養 18~24 小時。

- DAY2:將所需要的藥物濃度之 SD (含 2% Glucose) plate 配好後放置於室溫下待使用。準備含有 2 ml 滅菌 0.85 % NaCl 之玻璃試管，利用竹籤挖取菌體至 0.85 % NaCl 中並稀釋 100 倍測 OD₆₀₀ 值，將菌量調整至 OD₆₀₀ 值為 0.2 (菌量過多再加 0.85 % NaCl 稀釋)，此調完之菌即為 agar dilution 最高濃度的菌量。將調好 OD₆₀₀ 值 0.2 的菌液做十倍序列稀釋連續三次後可得到每株菌的四種濃度。將 Agar dilution 的裝置架設好後，在每排加入 300 ul 的菌液，因此每排會有一株菌之四種濃度的菌液，經推算後約為 10⁴、10³、10²、10 四種不同菌量。操作裝置將菌液複印在含有藥物之 SD plate 上，待表面菌液乾後放置至 30°C 培養箱培養 24~72 小時，每天拍照觀察。
- DAY3~DAY5：拍照觀察。



四、結果

4.1 建構 *CaCDR3* 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株

4.1.1 建構基因剔除所需含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaCDR3* 上下游同源區域之質體 pSAT1-*CDR3*-A1B1 及質體 pSAT1-*CDR3*-A2B2

本實驗針對剔除白色念珠菌雙套 *CaCDR3* 基因，設計了兩組不同的質體 pSAT1-*CDR3*-A1B1 及 pSAT1-*CDR3*-A2B2 分別做念珠菌的兩個 allele 的基因剔除，其原因為使用質體 pSAT1-*CDR3*-A1B1 一直無法成功剔除第二套 *CaCDR3* 基因，因此設計第二組同源置換位置建構出質體 pSAT1-*CDR3*-A2B2 對第二套 *CaCDR3* 基因做更專一性的同源重組置換。其質體之同源位置序列設計如圖三<A>所示，而其白色念珠菌的雙套基因剔除流程圖則由圖三 所示。

4.1.1.1 建構含 *SAT1* flipper cassette 及 *CaCDR3* 上下游同源區域之質體 pSAT1-*CDR3*-A1B1

以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板 (template)，利用前端已加入限制酶切位之引子依方法 3.4 利用 PCR 方式增幅 *CaCDR3* 之上下游片段 (即設計之 A/B region)。先利用帶有限制酶切位 *Kpn* I 和 *Xho* I 的引子 CDR3-A1-F 及 CDR3-A1-R 得到 *CaCDR3* 上游 500 bp DNA 片段，稱之為 A region。之後以限制酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 分別作用 PCR 產物 A region 及質體 pSFS2-SAT1 後，進行接合反應，將所得產物依方法 3.2 進行轉型選殖，得到 *SAT1* flipper cassette 帶有 A region 的質體 pSAT1-*CDR3*-A1。如圖四<A>所示，將質體以限制酶 *Bsp*HI 做質體確認，預期會得到片段 4162 bp、2400 bp 和 1008 bp；電泳圖結果所示，NC (pSFS2-SAT1) 有得到符合預期約 4.2 kbp (4162 bp)、1.9 kbp 及 1 kbp (1008 bp) 三個片段。而 Lane 3 和 Lane 7 在 4 kbp 上方、2.5 kbp 下方及 1 kbp 處各有一條片段，將所得質體命名為 pSAT1-*CDR3*-A1。下游片段同樣以 PCR 方式，利用分別帶有限制酶

切位 *Sac* II 和 *Sac* I 的引子 CDR3-B1-F 及 CDR3-B1-R 得到 *CaCDR3* 下游 250 bp DNA 片段，稱之為 B region。接著以限制酶 *Sac* II、*Sac* I 分別作用 PCR 產物 B region 及質體 pSAT1-*CDR3*-A1 後，進行接合反應，經過轉型選殖得到 SAT I flipper cassette 帶有 A、B region 的質體。將質體以限制酶 *Bsp*HI 做質體確認，預期會得到片段 3593 bp、2391 bp、1008 bp 及 817 bp；如圖四之電泳圖結果所示，NC (pSAT1-*CDR3*-A1) 有得到符合預期約 4.2 kbp (4162 bp)、1.9 kbp 及 1 kbp (1008 bp) 三個片段。而結果部分除了 Lane7 之外，其餘皆在 3 kbp 和 4 kbp 間、2.5 kbp 下方、1 kbp 處及在 750 bp 上方各有一條合乎預期之片段。將此質體命名為 pSAT1-*CDR3*-A1B1。

4.1.1.2 建構含 SAT I flipper cassette 及 *CaCDR3* 上下游同源區域之質體 pSAT1-*CDR3*-A2B2

同建構 pSAT1-*CDR3*-A1B1 之方法，將上游片段利用帶有限制酶切位 *Kpn* I 和 *Xho* I 的引子 CDR3-A2-F 及 CDR3-A2-R 得到 *CaCDR3* 上游 503 bp DNA 片段，並利用限制酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 分別作用 PCR 產物 A region 及質體 pSFS2-SAT1 後，進行接合反應，將所得產物進行轉型選殖，得到 SAT I flipper cassette 帶有 A2 region 的質體。將質體以限制酶 *Sac* I 及 *Hind* III 做確認，預期會得到片段 3325 bp、2749 bp 及 1490 bp；如圖五<A>之電泳圖結果所示，NC (pSFS2-SAT1) 有得到符合預期約 4.3 kbp (4321 bp) 及 2.7 kbp (2749 bp) 兩個片段。除了 Lane 1 ~ Land 3 皆在 3 kbp 上方、2.5 kbp 上方、1.5 kbp 下方處各有一條合乎預期之片段，將此質體命名為 pSAT1-*CDR3*-A2。下游片段以同樣方式，利用分別帶有限制酶切位 *Sac* II 和 *Sac* I 的引子 CDR3-B2-F 及 CDR3-B2-R 得到 *CaCDR3* 下游 234 bp DNA 片段，稱之為 B2 region。接著以限制酶 *Sac* II、*Sac* I 分別作用 PCR 產物 B2 region 及質體 pSAT1-*CDR3*-A2 後，進行接合反應，經過轉型選殖得到 SAT I flipper cassette 帶有 A2、B2 region 的質體。將質體以限制酶 *Sac* I 及 *Ava* I 做質體確認，預

期會得到片段 3964 bp、3364 bp 及 468 bp；如圖五之電泳圖結果所示，NC (pSAT1-*CDR3*-A2) 有得到符合預約 4.0 kbp (3964 bp)、3.4 kbp (3364 bp) 及 0.24 kbp (236 bp) 三個片段 Lane 1、2、3、5 皆在 4 kbp 下方、3 kbp 上方及在 500 bp 下方各有一條合乎預期之片段。將此質體命名為 pSAT1-*CDR3*-A2B2。

4.1.2 建構基因回復株所需含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaCDR3* 完整基因之質體 pSAT1-*CDR3*-RESA1B1-B1

利用質體 pSAT1-*CDR3*-A1B1 將其 A1 region 置換成 *CaCDR3* 完整基因片段來建構回復株之質體。首先以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板 (template)，利用前端已加入限制酶切位利 *Kpn* I 和 *Xho* I 的引子 CDR3-RES-F 及 CDR3-RES-R 得到 *CaCDR3* 之完整基因片段 (使用含 proof-reading 功能之 TAKARA Taq system)，稱之為 CDR3 RES。之後以限制酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 分別作用 PCR 產物 CDR3 RES 及質體 pSAT1-*CDR3*-A1B1 後，依方法進行接合反應，將所得產物依方法 3.2 進行轉型選殖，得到 *SAT1* flipper cassette 帶有 CDR3 RES 及 B1 region 的質體。如圖六所示，將質體以限制酶 *Hind* III 做質體確認，預期會得到片段 4203 bp、2861 bp 和 1792 bp (由圖六中箭號所示)；電泳圖結果所示，NC (pSAT1-*CDR3*-A1B1) 有得到符合預期約 4.9 kbp (4948 bp) 及 2.9 kbp (2861 bp) 兩個片段。而 Lane 5、6、10、12 和 Lane 15 在 4 kbp 上方、3 kbp 下方及 1.5 kbp 上方處各有一條符合預期之片段，將所得質體命名為 pSAT1-*CDR3*-RESA1B1-B1。之後再利用定序作分析。

4.1.3 回復株質體 pSAT1-*CDR3*-RESA1B1-B1 之序列分析

如圖七<A>所示，利用引子 C3seq 1、C3seq 2 及 C3seq 3 進行定序分析，確認 CDR3 RES 是否有成功接合進 *SAT1* flipper cassette 上游並且在正確的位置上。如圖七定序結果顯示，CDR3 RES 有正確連結質體 pSFS2-SAT1 的預期區域，但在 +83 位置有點突變

G → A，並且胺基酸由 Arg → Gln；另外，在 + 622 位置有點突變 A → T，並且胺基酸由 Thr → Ser。此兩突變點為所有定序之質體（總共有四個 clone）皆有，判斷為原 genomic template 上即帶有，因此以此質體往下建構回復菌株。

4.1.4 建構 *CaCDR3* 之單套基因剔除菌株

將質體 pSAT1-*CDR3*-A1B1 以限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaCDR3* 上下游 A1、B1 region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，再以電穿孔的方式轉型至白色念珠菌野生株 SC5314 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選出將目標基因置換成帶有 *SAT1* flipper cassette 及 A1、B1 region 之菌株。再挑選 single colony 培養至 YP maltose 培養液中，進行 *SAT1* flipper cassette 的 pop-out，三天後萃取 genomic DNA，依圖十五<A>所示利用引子 CDR3-A2-F 和 CDR3-B1-R 進行 PCR 確認。若有成功剔除一股 *CaCDR3* 基因，預期會得到片段 2235 bp、1681 bp。為了排除在 YP maltose 的菌液中部份仍還帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株，會再利用方法 3.10 將上述 PCR 結果合乎預期的菌株稀釋塗於 YPD 培養基進行 replica plating，藉以挑選出將 *SAT1* flipper cassette pop-out 之菌株。選擇只生長於不含 nourseothricin 培養基的菌落，進行存菌並萃取 genomic DNA。依圖十五<A>所示同樣再使用引子 CDR3-A2-F 和 CDR3-B1-R 進行 PCR 確認。以圖十五之電泳圖所示，除了 Lane 4 外之其餘皆在 2 kbp 及 2.5 kbp 及在 1.5 kbp 和 2 kbp 之間皆有一條符合預期之片段。挑選 Lane 2、3、5、6、8、12 命名為 C3HE- 2、-3、-5、-6、-8、-12 做進一步之 southern blot 確認。

4.1.5 建構 *CaCDR3* 之雙套基因剔除菌株

重複之前的步驟，將質體 pSAT1-*CDR3*-A2B2 以限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaCDR3* 上下游 A2、

B2 region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，以電穿孔的方式送入 *CaCDR3* 單套基因剔除株 C3HE-6 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。再挑選 single colony 培養至 YP maltose 培養液中，進行 pop-out，三天後萃取 genomic DNA，如圖十六<A>所示，利用引子 CDR3-A2-F 和 CDR3-B1-R 進行 PCR 確認。若成功剔除第二股 *CaCDR3* 基因，預期會得到片段 1681 bp、1035 bp。為了排除在 YP maltose 的菌液中部份仍還帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株，會再利用方法 3.10 將上述 PCR 結果合乎預期的菌株稀釋塗於 YPD 培養基進行 replica plating，藉以挑選出將 *SAT1* flipper cassette pop-out 之菌株。選擇只生長於不含 nourseothricin 培養基的菌落，進行存菌並和萃取 genomic DNA。同樣使用引子 CDR3-A2-F 和 CDR3-B1-R 進行 PCR 確認。圖十六 之電泳圖所示，除了 Lane 2、3、6、7、15 皆在 1.5 kbp 與 2 kbp 間以及在 1 kbp 處皆各有一條符合預期之片段。將符合預期之菌株命名為 C3HO6-2、-3、-6、-7、-15 做進一步之 southern blot 確認。

4.1.6 建構 *CaCDR3* 之單套基因回復菌株

將質體 pSAT1-*CDR3*-RESA1B1-B1 以限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaCDR3* 完整基因及 B1 region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，以電穿孔的方式送入 *CaCDR3* 雙套基因剔除株 C3HO-6-3 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。培養至 YPD 培養液中 16~18 小時，萃取 genomic DNA，之後利用南方點墨法進行菌株確認。

4.1.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaCDR3* 各突變株

4.1.7.1 南方點墨法檢驗 *CaCDR3* 單套剔除株

依方法 3.13.2 萃取單套剔除株之 genomic DNA，再以方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 CDR3 pre-A 及 CDR3-A2-R 用方法 3.14.1 合成南方點墨法所需之探針。分別以兩組限制酶酵素 *Bam*HI / *Sca*I 及 *Eco*R V / *Bsp*E I 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交及免疫偵測後利用感光底片經顯影及定影後得到結果。使用限制酶酵素 *Bam*HI / *Sca*I 組之結果如圖十七<A>示意圖所示，預期 wild-type 得到 2603 bp 的片段；而用 A1、B1 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 則預期會有 2074 bp 的片段。由圖十七<A> 底片結果圖所示 wild-type 有得到在 2.5 kbp 及 3 kbp 間的預期片段；而 C3HE-6 也有得到分別於 2.5 kbp 及 3 kbp 間以及 2kbp 上方之兩條預期片段，其餘 C3HE-2、C3HE-3、C3HE-5 雖有預期片段但仍有其餘非預期片段產生。而第二組使用限制酶酵素 *Eco*R V / *Bsp*E I 之結果圖十七示意圖所示，預期 wild-type 得到 2893 bp 的片段；而用 A1、B1 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 則預期會有 2311 bp 的片段，結果圖十七 底片圖所示 wild-type 有得到在 3 kbp 下方的預期片段；而在 C3HE-2、C3HE-3、C3HE-5、C3HE-6 皆有得到分別於 3 kbp 下方以及 2.5 kbp 下方之兩條預期片段。選用兩組酵素確認皆正確之 C3HE-6 菌株向下建構 *CaCDR3* 雙套剔除株。

4.1.7.2 南方點墨法檢驗 *CaCDR3* 雙套剔除株

依方法 3.13.2 萃取雙套剔除株之 genomic DNA，再以方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 CDR3 pre-A 及 CDR3-A2-R 用方法 3.14.1 合成南方點墨法所需之探針。依然分別以兩組限制酶酵素 *Bam*HI / *Sca*I 及 *Eco*R V / *Bsp*E I 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交及免疫偵測後利用感光底片經顯影及定影後得到結果。使用限制酶酵素 *Bam*HI / *Sca*I 組之結果如圖十八<A>示意圖所示，預期 wild-type 得到 2603 bp 的片段；利用 A1、B1 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele

則預期會有 2074 bp 的片段；而利用 A2、B2 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 則預期會有 1410 bp 的片段。由圖十八<A> 底片結果圖所示 wild-type 有得到在 2.5 kbp 上方的預期片段，C3HE-8 及 C3HE-12 之單套剔除株也皆得到分別於 2.5 kbp 上方及 2 kbp 處之兩條預期片段。而雙套剔除株的部分除 C3HO-6-7 外，其餘 C3HO-6-2 (-1 及-2)、C3HO-6-3 (-1 及-2)、C3HO-6-6 及 C3HO-6-15 皆有得到符合預期之 2 kbp 處及 1.5 kbp 處之兩條預期片段。而第二組限制酶 *EcoRV* / *BspEI* 之結果，如圖十八 示意圖所示，預期 wild-type 得到 2893 bp 的片段；利用 A1、B1 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 則預期會有 2311 bp 的片段；而利用 A2、B2 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 則預期會有 1714 bp 的片段。由圖十八 底片結果圖所示 wild-type 有得到在 2.5 kbp 及 3 kbp 之間符合預期之片段，而單套剔除株之 C3HE-8 及 C3HE-12 中 C3HE-8 有出現非預期片段而 C3HE-12 則是符合預期之 2.5 kbp 及 3 kbp 間以及 2.5 kbp 下方的兩條片段。而雙套剔除株的部分 C3HO-6-2 (-1 及-2)、C3HO-6-3 (-1 及-2)、C3HO-6-6、C3HO-6-7 及 C3HO-6-15 如同第一組酵素，除了 C3HO-6-7 之外其餘皆得到符合預期於 2.5 kbp 下方以及 1.5 kbp 上方的兩條片段。

4.1.7.3 南方點墨法檢驗 *CaCDR3* 單套回復株

同樣以傳統法萃取雙套剔除株之 genomic DNA 後進行南方點墨法確認菌株。利用引子 CDR3 pre-A 及 CDR3-A2-R 合成南方點墨法所需之探針。分別以兩組限制酶酵素 *AlwNI* / *BspEI* 及 *DraIII* / *AflII* 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交及免疫偵測後利用感光底片經顯影及定影後得到結果。第一組使用 *AlwNI* / *BspEI* 的結果如圖十九<A>示意圖所示，野生株 wild-type 會得到 4486 bp 的片段；使用 A1、B1 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 預期為 3936 bp 的片段；而利用 A2、B2 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 則預期會有 3290 bp 的片段；然而若為基因回復之 allele 會得到 9139 bp 的片段。結

果由圖十九底片圖所示 wild-type 有得到 4 kbp 及 5 kbp 之間的預期片段，單套剔除株 (He) 也有得到在 4 kbp 及 5 kbp 間以及 4 kbp 處的兩個預期片段，而雙套剔除株 (Ho) 也得到在 4 kbp 處及 3 kbp 與 4 kbp 之間的兩個預期片段。另外，在 Lane 1 ~ Lane 8 的單套基因回復株結果上，只有 Lane 6 及 Lane 7 有得到符合預期之在 8 kbp 及 10 kbp 間以及 3 kbp、4 kbp 間的兩個預期片段。在第二組使用 *Dra* III / *Afl* II 的結果如圖二十<A>示意圖所示，野生株 wild-type 會得到 4307 bp 的片段；使用 A1、B1 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 預期為 3757 bp 的片段；而利用 A2、B2 region 之 *CaCDR3* 剔除 allele 則預期會有 2811 bp 的片段；然而若為基因回復之 allele 會得到 8960 bp 的片段。結果由圖二十底片結果圖所示 wild-type 有得到 4 kbp 上方的預期片段，單套剔除株 (He) 也有得到在 4 kbp 上方及 3 kbp、4 kbp 間的兩個預期片段，而雙套剔除株 (Ho) 也得到在 3 kbp、4 kbp 之間以及 3 kbp 下方處的兩個預期片段。另外，在 Lane 1 ~ Lane 8 的單套基因回復株結果上，依然只有 Lane 6 及 Lane 7 有得到符合預期之在 8 kbp 上方以及 3 kbp 下方處的兩個預期片段。將符合預期之 Lane 6 及 Lane 7 的菌株命名回 C3RES-6-3-6 及 C3RES-6-3-7。

4.2 建構 *CaHGT1* 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株

4.2.1 建構基因剔除所需含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及

CaHGT1 上下游同源區域之質體 pSAT1-*HGT1*-AB

以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板 (template)，利用前端已加入限制酶切位之引子依方法 3.4 利用 PCR 方式增幅 *CaHGT1* 之上下游片段 (即設計之 A/ B region)。先利用帶有限制酶切位 *Kpn* I 和 *Xho* I 的引子 HGT1-A-F 及 HGT1-A-R 得到 *CaHGT1* 上游 244 bp DNA 片段，稱之為 A region。之後以限制酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 分別作用 PCR 產物 A region 及質體 pSFS2-SAT1 後，依方法進行接合反應，將所得產物依方法 3.2 進行

轉型選殖，得到 *SAT1* flipper cassette 帶有 A region 的質體。如圖九<A>所示，將質體以限制酶 *Sac* I 及 *Hind* III 做質體確認，預期會得到片段 2949 bp、2749 bp 和 1607 bp；電泳圖結果所示，NC (pSFS2-SAT1) 得到符合預期之 4321 bp 及 2749 bp 兩個片段。而 Lane 1 ~ Land 3 在 3 kbp 處、3 kbp 下方及 1.5 kbp 上方各有一條符合預期之片段，將所得質體命名為 pSAT1-*HGT1*-A。下游片段同樣以 PCR 方式，利用分別帶有限制酶切位 *Sac* II 和 *Sac* I 的引子 HGT1-B-F 及 HGT1-B-R 得到 *CaHGT1* 下游 454 bp DNA 片段，稱之為 B region。接著以限制酶 *Sac* II 及 *Sac* I 分別作用 PCR 產物 B region 及質體 pSAT1-*HGT1*-A 後，進行接合反應，經過轉型選殖得到 *SAT1* flipper cassette 帶有 A、B region 的質體。將質體以限制酶 *Sac* I 及 *Ava* I 做質體確認，預期會得到片段 3964 bp、3105 bp 及 688 bp；如圖九之電泳圖結果所示，NC (pSAT1-*HGT1*-A) 有得到符合預期之 3964 bp、3105 bp 及 236 bp 三個片段。而 Lane 1 ~ Land 10 皆在 4 kbp 處、3 kbp 上方及在 1 kbp 和 0.5 kbp 間各有一條合乎預期之片段。此質體命名為 pSAT1-*HGT1*-AB。

4.2.2 建構基因回復株所需含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT1* 完整基因之質體 pSAT1-*HGT1*-H1RES-B

利用質體 pSAT1-*HGT1*-AB 將其 A region 置換成 *CaHGT1* 完整基因片段來建構回復株之質體。首先以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板 (template)，利用前端已加入限制酶切位 *Kpn* I 和 *Xho* I 的引子 HGT1-RES-F 及 HGT1-RES-R 得到 *CaHGT1* 之完整基因片段 (使用含 proof-reading 功能之 TAKARA Taq system)，稱之為 HGT1 RES。之後以限制酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 分別作用 PCR 產物 HGT1 RES 及質體 pSAT1-*HGT1*-AB 後，依方法進行接合反應，將所得產物依方法 3.2 進行轉型選殖，得到 *SAT1* flipper cassette 帶有 HGT1 RES 及 B region 的質體。如圖十所示，將質體以限制酶 *Ava* I 及 *Nco* I 做質體確認，預期會得到片段 3964 bp、3793 bp 和

1580 bp；電泳圖結果所示，NC (pSAT1-*HGT1*-AB) 得到符合預期約 4kbp (3964 bp) 及 3.8 kbp (3793 bp) 兩個片段。而除了 Lane 4 之外，其餘皆在 4 kbp 下方及 1.5 kbp 上方處各有一條符合預期之片段，將所得質體命名為 pSAT1-*HGT1*-H1RES-B。之後再利用定序作分析。

4.2.3 回復株質體 pSAT1-*HGT1*-H1RES-B 之序列分析

如圖十一<A>所示，利用引子 H1seq1、H1seq2、H1seq3 及 H1seq4 進行定序分析，確認 *HGT1* RES 是否有成功接合進 *SAT1* flipper cassette 上游並且在正確的位置上。如圖十一定序結果及圖十一<C>結果總表顯示，*HGT1* RES 有正確連結質體 pSFS2-*SAT1* 的預期區域，但在 +150 位置有點突變 T → C，並且胺基酸由 Ser → Pro；位置 +990 另外有點突變 C → T；位置 +993 另外有點突變 T → G；位置 +1239 有點突變 T → C；位置 +1248 另外有點突變 C → T；位置 +1269 另外有點突變 T → C；位置 +1351 另外有點突變 A → T，並且胺基酸由 Thr → Ser；位置 +1371 有點突變 C → T；位置 +1446 有點突變 T → C 及位置 +1539 有點突變 C → T。其中 +150 及 +990 兩突變點有胺基酸的改變，但此二突變處為所有定序之質體（總共有五個 clone）皆有，判斷為原 genomic template 上即帶有，因此以此質體往下建構回復菌株。

4.2.4 建構 *CaHGT1* 之單套基因剔除菌株

將質體 pSAT1-*HGT1*-AB 以限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT1* 上下游 A、B region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，再以電穿孔的方式轉型至白色念珠菌野生株 SC5314 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選出將目標基因置換成帶有 *SAT1* flipper cassette 及 A、B region 之菌株。再挑選 single colony 培養至 YP maltose 培養液中，進行 *SAT1* flipper cassette 的 pop-out，三天後萃取 genomic DNA，如圖二十一

<A>示意圖所示利用引子 HGT1 pre-A 和 HGT1-B-R 進行 PCR 確認。若有成功剔除一股 *CaHGT1* 基因，預期會得到片段 2716 bp、1023 bp。為了排除在 YP maltose 的菌液中部份仍還帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株，會再利用方法 3.10 將上述 PCR 結果合乎預期的菌株稀釋塗於 YPD 培養基進行 replica plating，藉以挑選出將 *SAT1* flipper cassette pop-out 之菌株。選擇只生長於不含 nourseothricin 培養基的菌落，進行存菌並和萃取 genomic DNA。同樣再使用引子 HGT1 pre-A 和 HGT1-B-R 進行 PCR 確認。以圖二十一之電泳圖所示，除了 Lane 6 及 Lane 11 外之其餘皆在 2.5 kbp 及 3 kbp 及在 1 kbp 上方皆有一條符合預期之片段。將 Lane 4、5、7、8 菌株命名為 H1HE-4、-5、-7、-8 做進一步之 southern blot 確認。

4.2.5 建構 *CaHGT1* 之雙套基因剔除菌株

重複之前的步驟，將質體 p*SAT1-HGT1AB* 以限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT1* 上下游 A、B region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，以電穿孔的方式送入 *CaHGT1* 單套基因剔除株 H1HE-4 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。再挑選 single colony 培養至 YP maltose 培養液中，進行 pop-out，三天後萃取 genomic DNA，如圖二十二<A>所示，利用引子 HGT1 pre-A 和 HGT1-B-R 進行 PCR 確認。若有成功剔除第二股 *CaHGT1* 基因，預期會得到單一片段 1023 bp。為了排除在 YP maltose 的菌液中部份仍還帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株，會再利用方法 3.10 將上述 PCR 結果合乎預期的菌株稀釋塗於 YPD 培養基進行 replica plating，藉以挑選出將 *SAT1* flipper cassette pop-out 之菌株。選擇只生長於不含 nourseothricin 培養基的菌落，進行存菌並和萃取 genomic DNA。同樣使用引子 HGT1 pre-A 和 HGT1-B-R 進行 PCR 確認。如圖二

十二 之電泳圖所示，除了 Lane 2、Land 6 及 Land 14 只在 1 kbp 上方處有一條單一符合預期之片段。因此將 Lane 2、6 和 Lane 14 的菌株命名為 H1HO-4-2、H1HO-4-6 及 H1HO-4-14。

4.2.6 建構 *CaHGT1* 之單套基因回復菌株

將質體 pSAT1-*HGT1*-H1RES-B 限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT1* 完整基因及 B region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，以電穿孔的方式送入 *CaHGT1* 雙套基因剔除株 H1HO-4-6 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。培養至 YPD 培養液中 16~18 小時，萃取 genomic DNA，之後利用南方點墨法進行菌株確認。

4.2.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT1* 各突變株

4.2.7.1 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT1* 單套及雙套基因各突變株

依方法 3.13.2 萃取單套剔除株之 genomic DNA，再以方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 HGT1-B-F 及 HGT1 pro-B 用方法 3.14.1 合成南方點墨法所需之探針。分別以兩組限制酶酵素 *Nsi* I 及 *Bsa* I / *Kpn* I 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交及免疫偵測後利用感光底片經顯影及定影後得到結果。使用限制酶酵素 *Nsi* I 組之結果如圖二十三<A>示意圖所示，預期 wild-type 得到 3128 bp 的片段；而 *CaHGT1* 之剔除 allele 則預期會有 1422 bp 的片段。由圖二十三<A>底片結果圖所示 wild-type 有得到在 3 kbp 處的預期片段；而 H1HE-4、-5、-7、-8 的 *CaHGT1* 單套突變株也有得到分別於 3 kbp 及 1.5 kbp 下方之兩條預期片段，另外，H1HO-4-2、H1HO-4-6 (-1 及 -2) 及 H1HO-4-14 的 *CaHGT1* 雙套突變株也有得到於 1.5 kbp 下方處之單一預期片段。而第二組使用限制酶酵素 *Bsa* I / *Kpn* I 之結果如圖二十三示意圖所示，預期 wild-type 得到 3483 bp 的片段；

而 *CaHGT1* 之基因剔除 allele 則預期會有 1761 bp 的片段，結果圖二十三底片圖所示 wild-type 有得到在 3 kbp 上方的預期片段；而 H1HE-4、-5、-7、-8 的 *CaHGT1* 單套突變株也有得到分別於 3 kbp 上方及 1.5 kbp 上方處之兩條預期片段，另外，H1HO-4-2、H1HO-4-6 (-1 及 -2) 及 H1HO-4-14 的 *CaHGT1* 雙套突變株也有得到於 1.5kbp 上方處之單一預期片段。

4.2.7.2 南方點墨法檢驗 *CaHGT1* 單套回復株

同樣以傳統法萃取雙套剔除株之 genomic DNA 後進行南方點墨法確認菌株。利用引子 HGT1-B-F 及 HGT1 pro-B 合成南方點墨法所需之探針。分別以兩組限制酶酵素 *Bsa* I / *Dra* III 及 *Bmg* BI / *Pci* I 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交及免疫偵測後利用感光底片經顯影及定影後得到結果。如圖二十四<A>所示第一組使用 *Bsa* I / *Dra* III，野生株 wild-type 會得到 4384 bp 的片段；而 *CaHGT1* 之基因剔除 allele 預期會得到 2678 bp 的片段；然而若為基因回復之 allele 會得到 8648 bp 的片段。由圖二十四底片結果圖所示 wild-type 得到 4 kbp 及 5 kbp 之間的預期片段，單套剔除株 (He) 也得到在 4 kbp 及 5 kbp 間以及 2.5 kbp 上方處的兩個預期片段，而雙套剔除株 (Ho) 也只得到在 2.5 kbp 上方處的單一預期片段。另外，在 Lane 1 ~ Lane 12 的單套基因回復株結果上，只有 Lane 1 ~ Lane 3、Lane 6 ~ Lane 7 及 Lane 9 ~ Lane 12 有得到符合預期之在 8 kbp 上方以及 2.5 kbp 上方處的兩個預期片段。而後將第一組酵素確認後符合預期的菌株再利用第二組酵素做確認，如圖二十五<A>所示而在第二組使用 *Bmg* BI / *Pci* I，野生株 wild-type 會得到 4191 bp 的片段；而 *CaHGT1* 剔除 allele 預期為 2487 bp 的片段；然而若為基因回復之 allele 會得到 8455 bp 的片段。由圖二十五底片結果圖所示 wild-type 有得到 4 kbp 上方的預期片段，單套剔除株 (He) 也有得到在 4 kbp 上方及 2.5 kbp 下方的兩個預期片段，而雙套剔除株 (Ho) 也得到在 2.5 kbp 下方處的單一預期片段。另外，在單套

基因回復株結果上，除 Strain 2 與 10 外其餘皆有得到符合預期之在 8 kbp 上方以及 2.5 kbp 下方處的兩個預期片段。將符合預期之 Lane 1 及 Lane 7 的菌株命名為 H1RES-4-6-1 及 H1RES-4-6-7。

4.3 建構 *CaHGT7* 單套、雙套基因剔除株和單套基因回復株

4.3.1 建構基因剔除所需含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT7* 上下游同源區域之質體 pSAT1-*HGT7*-AB

以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板 (template)，利用前端已加入限制酶切位之引子依方法 3.4 利用 PCR 方式增幅 *CaHGT7* 之上下游片段 (即設計之 A/B region)。先利用帶有限制酶切位 *Kpn* I 和 *Xho* I 的引子 HGT7-A-F 及 HGT7-A-R 得到 *CaHGT7* 上游 305 bp DNA 片段，稱之為 A region。之後以限制酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 分別作用 PCR 產物 A region 及質體 pSFS2-SAT1 後，依方法進行接合反應，將所得產物依方法 3.2 進行轉型選殖，得到 *SAT1* flipper cassette 帶有 A region 的質體。如圖十二<A>所示，將質體以限制酶 *Spe* I 及 *Nco* I 做質體確認，預期會得到片段 3172 bp、2501 bp 和 1693 bp；電泳圖結果所示，NC (pSFS2-SAT1) 得到符合預期約 4.6 kbp (4569 bp) 及 2.5 kbp (2501 bp) 兩個片段。而 Lane 1 ~ Land 4 在 3 kbp 上方、2.5 kbp 處及 1.5 kbp 上方各有一條符合預期之片段，將所得質體命名為 pSAT1-*HGT7*-A。下游片段同樣以 PCR 方式，利用分別帶有限制酶切位 *Sac* II 和 *Sac* I 的引子 HGT7-B-F 及 HGT7-B-R 得到 *CaHGT7* 下游 526 bp DNA 片段，稱之為 B region。接著以限制酶 *Sac* II、*Sac* I 分別作用 PCR 產物 B region 及質體 pSAT1-*HGT7*-A 後，進行接合反應，經過轉型選殖得到 *SAT1* flipper cassette 帶有 A、B region 的質體。將質體以限制酶 *Sac* I 及 *Ava* I 做質體確認，預期會得到片段 3964 bp、3166 bp 及 760 bp；如圖十二之電泳圖結果所示，NC (pSAT1-*HGT7*-A) 得到符合預期約 4.0 kbp (3964 bp)、3.2 kbp (3166 bp) 及 2.4 kbp (236 bp) 三個片段。而除了 Lane 1 之外，其餘 Land 2

~Land 10 皆在 4 kbp 處、3 kbp 上方及 1 kbp 和 0.5 kbp 間各有一條合乎預期之片段。此質體命名為 pSAT1-HGT7-AB。

4.3.2 建構基因回復株所需含篩選標記 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT7* 完整基因之質體 pSAT1-HGT7-H7RES-B

利用質體 pSAT1-HGT7-AB 將其 A region 置換成 *CaHGT7* 完整基因片段來建構回復株之質體。首先以白色念珠菌野生株 SC5314 genomic DNA 作為模板 (template)，利用前端已加入限制酶切位 *Kpn* I 和 *Xho* I 的引子 HGT7-RES-F 及 HGT7-RES-R 得到 *CaHGT7* 之完整基因片段 (使用含 proof-reading 功能之 TAKARA Taq system)，稱之為 HGT7 RES。之後以限制酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 分別作用 PCR 產物 HGT7 RES 及質體 pSAT1-HGT7-AB 後，依方法進行接合反應，將所得產物依方法 3.2 進行轉型選殖，得到 *SAT1* flipper cassette 帶有 HGT7 RES 及 B region 的質體。如圖十三所示，將質體以限制酶 *Ava* I 及 *Sac* I 做質體確認，預期會得到片段 5028 bp、3964 bp 和 760 bp；電泳圖結果所示，NC (pSAT1-HGT7-AB) 有得到符合預期約 4.0 kbp (3964 bp)、3.2 kbp (3166 bp) 及 0.76 kbp (760 bp) 三個片段。而 Lane 1、2、Lane 6~Land 9、Lane 12、13、15、16 皆在 4 kbp 下方及 1.5 kbp 上方處各有一條符合預期之片段，將所得質體命名為 pSAT1-HGT1-H1RES-B。之後再利用定序作分析。

4.3.3 回復株質體 pSAT1-HGT1-H1RES-B 之序列分析

如圖十四<A>示意圖所示，利用引子 H7seq1、H7seq2、H7seq3、H7seq4 及 H7seq5 進行定序分析，確認 HGT7 RES 是否有成功接合進 *SAT1* flipper cassette 上游並且在正確的位置上。如圖十四定序結果顯示，HGT7 RES 有正確連結質體 pSFS2-SAT1 的預期區域，但在 +77 位置有點突變 G → C，並且胺基酸由 Arg → Pro；位置 +117 另外有點突變 T → A；位置 +278 另外有點突變 A → G；位置 +822 有點突變 T → C。其中 +77 的突變點有胺基酸的改變，但此突變處為所有定序之質體 (總共有五個 clone) 皆有，判斷為原

genomic template 上即帶有，因此以此質體往下建構回復菌株。

4.3.4 建構 *CaHGT7* 之單套基因剔除菌株

將質體 pSAT1-*HGT7*-AB 以限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT7* 上下游 A、B region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，再以電穿孔的方式轉型至白色念珠菌野生株 SC5314 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選出將目標基因置換成帶有 *SAT1* flipper cassette 及 A、B region 之菌株。再挑選 single colony 培養至 YP maltose 培養液中，進行 *SAT1* flipper cassette 的 pop-out，三天後萃取 genomic DNA，如圖二十六<A>示意圖所示利用引子 *HGT7* A-F 和 *HGT7* pro-B 進行 PCR 確認。若有成功剔除一股 *CaHGT7* 基因，預期會得到片段 2931 bp、989 bp。為了排除在 YP maltose 的菌液中部份仍還帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株，會再利用方法 3.10 將上述 PCR 結果合乎預期的菌株稀釋塗於 YPD 培養基進行 replica plating，藉以挑選出將 *SAT1* flipper cassette pop-out 之菌株。選擇只生長於不含 nourseothricin 培養基的菌落，進行存菌並和萃取 genomic DNA。同樣再使用引子 *HGT7* A-F 和 *HGT7* pro-B 進行 PCR 確認。以圖二十六之電泳圖所示，Lane 2、3、5、7 及 Lane 8 有在 3 kbp 下方及在 1 kbp 處皆有一條符合預期之片段。將 Lane 2、3、5、7 及 Lane 8 的菌株命名為 H7HE-2、-3、-5、-7 及 H7HE-8。

4.3.5 建構 *CaHGT7* 之雙套基因剔除菌株

重複之前的步驟，將質體 pSAT1-*HGT7*-AB 以限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT7* 上下游 A、B region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，以電穿孔的方式送入 *CaHGT7* 單套基因剔除株 H7HE-3 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。再挑選 single

colony 培養至 YP maltose 培養液中，進行 pop-out，三天後萃取 genomic DNA，如圖二十七<A>示意圖所示，利用引子 HGT7 A-F 和 HGT7 pro-B 進行 PCR 確認。若有成功剔除第二股 *CaHGT7* 基因，預期會得到單一片段 989 bp。為了排除在 YP maltose 的菌液中部份仍還帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株，會再利用方法 3.10 將上述 PCR 結果合乎預期的菌株稀釋塗於 YPD 培養基進行 replica plating，藉以挑選出將 *SAT1* flipper cassette pop-out 之菌株。選擇只生長於不含 nourseothricin 培養基的菌落，進行存菌並和萃取 genomic DNA。同樣使用引子 HGT7 A-F 和 HGT7 pro-B 進行 PCR 確認。圖二十七 之電泳圖所示，Lane 2、3、8、9、11 及 Lane 14 只在 1 Kbp 處有一條單一符合預期之片段。因此將 Lane 2、3、8、9、11 及 Lane 14 的菌株命名為 H7HO-3-2、-3、-8、-9、-11 及 H7HO-3-14 做後續之 southern blot 確認。

4.3.6 建構 *CaHGT7* 之單套基因回復菌株

將質體 pSAT1-HGT7-H7RES-B 限制酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 處理，將帶有 *SAT1* flipper cassette 及 *CaHGT7* 完整基因及 B region 片段的質體利用膠上純化的方式得到，以電穿孔的方式送入 *CaHGT7* 雙套基因剔除株 H7HO-3-9 中。透過相似序列同源重組置換 (homologous recombination) 的機制再以含藥物 nourseothricin 的 YPD 培養基篩選帶有 *SAT1* flipper cassette 之菌株。培養至 YPD 培養液中 16~18 小時，萃取 genomic DNA，之後利用南方點墨法進行菌株確認。

4.3.7 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT7* 各突變株

4.3.7.1 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT7* 單套基因之突變株

依方法 3.13.2 萃取單套剔除株之 genomic DNA，再以方法 3.14 進行南方點墨法。利用引子 HGT7-B-F 及 HGT7 pro-B 用方法 3.14.1 合成南方點墨法所需之探針。分別以兩組限制酶酵素 *Bsa* I /

Hind III 及 *Alw*NI / *Kpn* I 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交及免疫偵測後利用感光底片經顯影及定影後得到結果。使用限制酶酵素 *Bsa* I / *Hind* III 組之結果如圖二十八<A>示意圖所示，預期 wild-type 得到 7707 bp 的片段；而 *CaHGT7* 之剔除 allele 則預期會有 5767 bp 的片段。由圖二十八圖<A> 底片結果圖所示 wild-type 有得到在 6 Kbp 與 7 Kbp 之間的預期片段；而 H7HE-2 (-1 及-2)、H7HE-3 (-1 及-2)、H7HE-5 (-1 及-2) 與 H7HE-8 (-1 及-2) 的 *CaHGT7* 單套突變株也有得到分別於 6 kbp 與 7 kbp 之間及 5 kbp 與 6 kbp 之間的兩條預期片段。而第二組使用限制酶酵素 *Alw*NI / *Kpn* I 之結果如圖二十八示意圖所示，預期 wild-type 得到 4256 bp 的片段；而 *CaHGT7* 之基因剔除 allele 則預期會有 2314 bp 的片段，結果如圖二十八 所示 wild-type 有得到在 4 kbp 上方的預期片段（箭頭 A），但在 3 kbp 下方也有得到明顯的片段（箭頭 B）。為了解釋此片段的產生，利用了如圖三十<A>所示之引子 HGT7 pre-A 及 HGT pro-B 以 SC5314 作為模坂做 PCR 得到 3003 bp 的片段後利用限制酶酵素 *Alw*NI 及 *Kpn* I 作用處理。由圖三十之結果之 PCR 後電泳圖可看到有得到符合預期在 3 kbp 處的單一片段，將此片段純化之後利用限制酶酵素 *Alw*NI 及 *Kpn* I 作用處理後跑膠，結果如圖三十<C>所示，得到三個片段分別為 3 kbp、~ 2.3 kbp 及 ~ 750 bp，由此結果推斷此基因之兩股 allele 序列有些許差異，其中一個 allele 可被限制酶作用變成兩個較小片段，因此會在南方墨點法的 wild-type 中得到第二條較預期略小之片段。而在圖二十八之結果圖 H7HE-2 (-1 及-2)、H7HE-3 (-1 及-2)、H7HE-5 (-1 及-2) 的 *CaHGT7* 單套突變株也有得到分別於 4 kbp 上方及 2.5 kbp 與 3 kbp 之間的兩條預期片段。

4.3.7.2 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT7* 雙套基因之突變株

依方法 3.13.2 萃取單套剔除株之 genomic DNA，再以方法 3.14

進行南方點墨法。利用引子 HGT7-B-F 及 HGT7 pro-B 用方法 3.14.1 合成南方點墨法所需之探針。分別以兩組限制酶酵素 *Bsa* I / *Hind* III 及 *Alw*NI / *Kpn* I 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交及免疫偵測後利用感光底片經顯影及定影後得到結果。使用限制酶酵素 *Bsa* I / *Hind* III 組之結果如圖二十九<A>示意圖所示，預期 wild-type 得到 7707 bp 的片段；而 *CaHGT7* 之剔除 allele 則預期會有 5767 bp 的片段。由圖二十九<A>底片結果圖所示 wild-type 有得到在 6 kbp 與 7 kbp 之間的預期片段；而 H7HO-3-9、-11、-14 的 *CaHGT7* 雙套突變株也有得到於 5 kbp 與 6 kbp 之間的單一預期片段。而第二組使用限制酶酵素 *Alw*NI / *Kpn* I 之結果如圖二十九示意圖所示，預期 wild-type 得到 4256 bp 的片段；而 *CaHGT7* 之基因剔除 allele 則預期會有 2314 bp 的片段，結果如圖二十九底片圖所示 wild-type 有得到在 4 kbp 上方的預期片段（在 3 kbp 處也有得到片段，出現此片段之原因同在 4.3.7.1 中所提），而 H7HO-3-9、-11、-14 的 *CaHGT7* 雙套突變株也有得到分別於 2.5 kbp 與 3 kbp 之間的單一預期片段。

4.3.7.3 南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT7* 單套基因之回復株

同樣以傳統法萃取雙套剔除株之 genomic DNA 後進行南方點墨法確認菌株。利用引子 HGT7-B-F 及 HGT7 pro-B 合成南方點墨法所需之探針。分別以兩組限制酶酵素 *Bsa*BI / *Bsp*E I 及 *Bmg*BI / *Bsa* I 作用於 genomic DNA，經轉漬、雜交及免疫偵測後利用感光底片經顯影及定影後得到結果。如圖三十一<A>示意圖所示，第一組使用 *Bsa*BI / *Bsp*E I，野生株 wild-type 會得到 3900 bp 的片段；而 *CaHGT7* 之基因剔除 allele 預期會得到 1958 bp 的片段；然而若為基因回復之 allele 會得到 7960 bp 的片段。結果由圖三十一底片圖所示 wild-type 得到 4 kbp 下方處的預期片段，單套剔除株 (He) 也得到在 4 kbp 下方以及 2 kbp 處的兩個預期片段，而雙套剔除株

(Ho) 也只得到在 2 kbp 處的單一預期片段。另外，在 Lane 1 ~ Lane 6 的單套基因回復株結果上皆有得到符合預期之在 8 kbp 處以及 2 kbp 處的兩個預期片段。由圖三十二<A>示意圖所示在第二組使用 *BmgB I*/*Bsa I* 結果，野生株 wild-type 會得到 3562 bp 的片段；而 *CaHGT7* 之基因剔除 allele 預期會得到 1616 bp 的片段；然而若為基因回復之 allele 會得到 7624 bp 的片段。由圖三十二底片結果圖所示 wild-type 得到 3 kbp 與 4 kbp 間的預期片段，單套剔除株 (He) 也得到在 3 kbp 與 4 kbp 間及 1.5 kbp 與 2 kbp 間的兩個預期片段，而雙套剔除株 (Ho) 也得到在 1.5 kbp 與 2 kbp 間的單一預期片段。另外，在 Lane 1 ~ Lane 6 的單套基因回復株結果上，得到符合預期之在 8 kbp 下方以及 1.5 kbp 與 2 kbp 間的兩個預期片段。將符合預期之 Lane 1 及 Lane 5 的菌株命名為 H7RES-3-9-1 及 H7RES-3-9-5。

4.4 白色念珠菌 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株之性狀分析

4.4.1 不同葡萄糖濃度之環境生長情形

由於 HGT family 為 glucose transporter，因此想探討其在缺乏或不同濃度葡萄糖環境下生長情況是否有差異；而 *CaCDR3* 突變株部分也做了相同的測試，觀察在基因剔除後的生長情形與野生株是否有差異。結果如圖三十三、三十四及圖三十五所示，*CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株在不同濃度葡萄糖培養環境下，藉由觀察 single colony 的生長大小與其對照之野生株並無明顯差異。

4.4.2 芽管試驗 (Germ tube assay)

4.4.2.1 白色念珠菌之 *CaCDR3* 各突變株之芽管試驗結果

結果如圖三十六所示 *CaCDR3* 各突變株在含有 10 % FBS 的 YPD 培養條件下，於 37 °C 培養三小時後觀察 (每小時觀察，本實驗為觀察三小時之結果)，結果顯示各突變株與 SC5314 (Wild-type)

皆有看到芽管的生成；HLC54 為 Negative control，呈酵母菌型態 (yeast form) 且無芽管生成。

4.4.2.2 白色念珠菌之 *CaHGT1* 各突變株之芽管試驗結果

結果如圖三十七所示 *CaHGT1* 各突變株在含有 10 % FBS 的 YPD 培養條件下，於 37 °C 培養三小時後觀察 (每小時觀察，本實驗為觀察三小時之結果)，結果顯示各突變株與 SC5314 (Wild-type) 皆有看到芽管的生成；HLC54 為 Negative control，呈酵母菌型態 (yeast form) 且無芽管生成。

4.4.2.3 白色念珠菌之 *CaHGT7* 各突變株之芽管試驗結果

結果如圖三十八所示 *CaHGT7* 各突變株在含有 10 % FBS 的 YPD 培養條件下，於 37 °C 培養三小時後觀察 (每小時觀察，本實驗為觀察三小時之結果)，結果顯示各突變株與 SC5314 (Wild-type) 皆有看到芽管的生成；HLC54 為 Negative control，呈酵母菌型態 (yeast form) 且無芽管生成。

4.4.3 白色念珠菌之 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株之菌絲生成型態觀察 – 培養於含 4% FBS 之 YPD 培養基之結果

4.4.3.1 白色念珠菌之 *CaCDR3* 各突變株之菌絲生成試驗結果

已知對照組中的野生株 SC5314 會呈現皺褶表面，而 HLC54 則為光滑表面。結果如圖三十九所示 *CaCDR3* 各突變株之菌落型態與 SC5314 (wild-type) 皆呈皺褶表面，顯示各突變株與野生株相同。

4.4.3.2 白色念珠菌之 *CaHGT1* 各突變株之菌絲生成試驗結果

已知對照組中的野生株 SC5314 會呈現皺褶表面的產生，而其原因可能與菌絲生成相關。另外，HLC54 則為光滑表面。結果如圖四十所示 *CaHGT1* 各突變株之菌落型態與 SC5314 (wild-type) 皆呈皺褶表面，顯示各突變株與野生株相同。

4.4.3.3 白色念珠菌之 *CaHGT7* 各突變株之菌絲生成試驗結果

已知對照組中的野生株 SC5314 會呈現皺褶表面，而 HLC54 則為光滑表面。結果如圖四十一所示 *CaHGT7* 各突變株之菌落型態

與 SC5314 (wild-type) 皆呈皺褶表面，顯示各突變株皆與野生株相同。

4.4.4 白色念珠菌之 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株之菌絲生成型態觀察 – 培養於含 4% FBS 之 Bacto Agar 培養基之結果

4.4.4.1 白色念珠菌之 *CaCDR3* 各突變株之菌絲生成試驗結果

已知對照組中野生株 SC5314 呈現放射狀菌絲生成，而 HLC54 為無菌絲生成且為圓形光滑表面。結果如圖四十二所示 *CaCDR3* 各突變株之菌落型態與 SC5314 (wild-type) 皆有放射狀菌絲生成，顯示各突變株皆同野生株具有菌絲生成的能力。

4.4.4.2 白色念珠菌之 *CaHGT1* 各突變株之菌絲生成試驗結果

已知對照組中野生株 SC5314 呈現放射狀菌絲生成，而 HLC54 為無菌絲生成且為圓形光滑表面。結果如圖四十三所示 *CaHGT1* 各突變株之菌落型態與 SC5314 (wild-type) 皆有放射狀菌絲生成，顯示各突變株皆同野生株具有菌絲生成的能力。

4.4.4.3 白色念珠菌之 *CaHGT7* 各突變株之菌絲生成試驗結果

已知對照組中野生株 SC5314 呈現放射狀菌絲生成，而 HLC54 為無菌絲生成且為圓形光滑表面。結果如圖四十四所示 *CaHGT7* 各突變株之菌落型態與 SC5314 (wild-type) 皆有放射狀菌絲生成，顯示各突變株皆同野生株具有菌絲生成的能力。

4.4.5 白色念珠菌之 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株之侵犯能力之性狀觀察

4.4.5.1 白色念珠菌之 *CaCDR3* 各突變株之侵犯能力之試驗結果

已知對照組 SC5314 得到結果為菌落表面呈皺褶狀並且經流水沖洗後不會沖掉菌落，且可看到菌絲侵入洋菜膠內。另一對照組 HLC54 菌落表面呈圓形平滑狀且經流水沖刷可輕易洗掉菌落，顯示並無菌絲侵入洋菜膠內。由圖四十五結果顯示所有突變株與 SC5314 一樣，經流水沖洗後依然附著於洋菜膠上，且有菌絲侵入膠內。

4.4.5.2 白色念珠菌之 *CaHGT1* 各突變株之侵犯能力之試驗結果

已知對照組 SC5314 得到結果為菌落表面呈皺褶狀且經流水沖洗後並不會沖掉菌落，且可看到菌絲侵入洋菜膠內。另一對照組 HLC54 菌落表面呈圓形平滑狀且經流水沖刷可輕易洗掉菌落，顯示並無菌絲侵入洋菜膠內。由圖四十六結果顯示所有突變株與 SC5314 一樣，經流水沖洗後依然附著於洋菜膠上，且有菌絲侵入膠內。

4.4.5.3 白色念珠菌之 *CaHGT7* 各突變株之侵犯能力之試驗結果

已知對照組 SC5314 得到結果為菌落表面呈皺褶狀且經流水沖洗後並不會沖掉菌落，且可看到菌絲侵入洋菜膠內。另一對照組 HLC54 菌落表面呈圓形平滑狀且經流水沖刷可輕易洗掉菌落，顯示並無菌絲侵入洋菜膠內。由圖四十七結果顯示所有突變株與 SC5314 一樣，經流水沖洗後依然附著於洋菜膠上，且有菌絲侵入膠內。

4.5 白色念珠菌 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株之藥物 (Fluconazole、Miconazole、Amphotericin B) 感受性測試

依據 CLSIM27-S3 控制組 YLO6、YLO7、YLO12 皆須在各藥物之 MIC 範圍 (miconazole 未有資料)，確保實驗操作。而本實驗中此三中控制組皆符合範圍限制，因此判斷本操作具有可信度。此外，本實驗參考 CLSIM27-A3 配置十個梯度的藥物濃度：fluconazole 為 0.125 ~ 64 µg/ml、amphotericin B 為 0.0313 ~ 16 µg/ml、miconazole 為 0.0078 ~ 4 µg/ml。

4.5.1 白色念珠菌 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株對藥物 Fluconazole 之感受性測試結果

A. *CaCDR3* 各突變株對 fluconazole 之感受性測試結果如圖四十八所示，其所有突變株對於藥物 fluconazole 十種不同濃度的感受性與野生株 SC5314 並無明顯差異性。

B. *CaHGT1* 各突變株對 fluconazole 之感受性測試結果如圖四十九所示，其所有突變株對於藥物 fluconazole 十種不同濃度的感受性與野生株 SC5314 並無明顯差異性。

C. *CaHGT7* 各突變株對 fluconazole 之感受性測試結果如圖五十所示，其所有突變株對於藥物 fluconazole 十種不同濃度的感受性與野生株 SC5314 大致上並無明顯差異性，其中在藥物濃度為 0.25 ug/ml 時，*CaHGT7* 的雙套基因剔除株得到些微的差異。另外，在濃度 16ug/ml 及 32 ug/ml 有兩個跳動較大的點，推判可能是操作上的問題所致。

4.5.2 白色念珠菌 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株對藥物 Miconazole 之感受性測試結果

A. *CaCDR3* 各突變株對 miconazole 之感受性測試結果如圖五十一所示，大部分突變株對於藥物 miconazole 十種不同濃度的感受性與野生株 SC5314 並無明顯差異性，在 C3Ho1 的部分在濃度 0.0078 ug/ml ~ 0.0625 ug/ml 時對藥物敏感性降低。

B. *CaHGT1* 各突變株對 miconazole 之感受性測試結果如圖五十二所示，其所有突變株對於藥物 miconazole 十種不同濃度的感受性與野生株 SC5314 並無明顯差異性。

C. *CaHGT7* 各突變株對 miconazole 之感受性測試結果如圖五十三所示，大部分突變株對於藥物 miconazole 十種不同濃度的感受性與野生株 SC5314 並無明顯差異性，在 H7Res2 的部分在十種濃度中發現對藥物敏感性降低。

4.5.3 白色念珠菌 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株對藥物 Amphotericin B 之感受性測試結果

A. *CaCDR3* 各突變株對 amphotericin B 之感受性測試結果如圖五十四所示，其所有突變株對於藥物 amphotericin B 十種不同濃度的感受性與野生株 SC5314 並無明顯差異性，。

B. *CaHGT1* 各突變株對 amphotericin B 之感受性測試結果如圖五十五所示，其所有突變株對於藥物 amphotericin B 十種不同濃度的感受性在濃度 0.0313 ug/ml ~ 1 ug/ml 之間趨勢較不固定，而較為明顯的部分是在藥物濃度 0.5ug/ml 時，H1He1 及

H1He2 菌株存活率幾乎降為零，與其野生株及其他菌株產生較大差異，研判其對藥物敏感度較大，因此進行 agar dilution test 進一步檢驗。

C. *CaHGT7* 各突變株對 amphotericin B 之感受性測試結果如圖五十六所示，其所有突變株對於藥物 amphotericin B 十種不同濃度的感受性在濃度 0.0313 ug/ml ~ 1 ug/ml 之間趨勢較不固定，而較為明顯的部分是在藥物濃度 0.5ug/ml 時，H7He2、H7Ho1 及 H7Ho2 菌株存活率幾乎降為零，與其野生株及其他菌株產生較大差異，研判其對藥物敏感度較大，因此進行 agar dilution test 進一步檢驗。

4.6 白色念珠菌 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各基因突變株對不同濃度之 Amphotericin B 的 Agar dilution test

本實驗將 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株測試了四種不同的 amphotericin B 藥物濃度，分別為 0.125 ug/ml、0.25 ug/ml、0.375 ug/ml 及 0.5 ug/ml。而每個株菌也測試了四種不同的菌量，經推算後菌量約為 10^4 、 10^3 、 10^2 及 10。其目的為測試各菌株在不同菌量下對於四種不同濃度之 amphotericin B 感受性是否有差異。

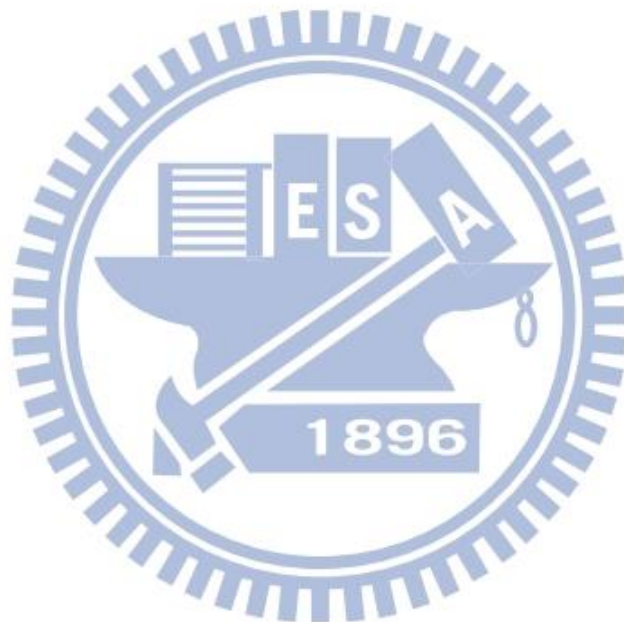
4.6.1 白色念珠菌 *CaHGT1* 各基因突變株對不同濃度之 Amphotericin B 的 Agar dilution test

結果如圖五十七所示，其中 NC 為不加藥物之控制組。由四張不同 amphotericin B 濃度之結果圖來看，在最高濃度 0.5 ug/ml 情況下的野生株及各突變株在四種不同的菌量情況下依然有能力生長，並無明顯差異性。而在實驗的結果中，在各濃度中有部分菌株之最低菌量（菌量 10）得到未生長之結果，但同菌量在濃度 0.5 ug/ml 中仍可生長，研判為操作上的誤差，而並非真的存在差異性。

4.6.2 白色念珠菌 *CaHGT7* 各基因突變株對不同濃度之 Amphotericin B 的 Agar dilution test

結果如圖五十八所示，其中 NC 為不加藥物之控制組。由四張

不同 amphotericin B 濃度之結果圖來看，在最高濃度 0.5 ug /ml 情況下的野生株及各突變株在四種不同的菌量情況下依然有能力生長，並無明顯差異性。而在實驗的結果中，在濃度 0.375 ug /ml 中 H7He 1 的最低菌量（菌量 10）得到未生長之結果，但同菌量在濃度 0.5 ug /ml 中仍可生長，研判為操作上的誤差，而並非真的存在差異性。



五、討論

文獻指出當在白色念珠菌的 *cph1/cph1 efg1/efg1* 雙基因剔除株 (HLC54) 會使白色念珠菌在多種誘發菌絲生成的培養條件下，失去菌絲型態和假菌絲型態的能力而停留在酵母菌型的型態，並且對於小鼠失去致病的能力 (Lo *et al.*, 1997)。而實驗室先前使用抑制刪除雜交法 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 篩選出可能與型態變化相關的基因，用 SSH 方法找出白色念珠菌之野生型 SC5314 與酵母菌型 HLC54 (*efg1/efg1 cph1/cph1*) 兩者之間表現量有差異的基因，推斷此基因可能與致病力或促進菌絲生成有關。而本篇研究的基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 即為結果中發現表現量有差異的基因，因此實驗室希望利用 *SAT1* flipper cassette (Reuss *et al.*, 2004) 將白色念珠菌的此三基因各別剔除後觀察其是否會影響菌絲生長及藥物感受性，以下就對性狀之實驗結果作個別的討論。

5.1 基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株性狀分析之探討

5.1.1 不同葡萄糖濃度之環境生長情形結果探討

由於 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 被認為是 glucose transporter，因此探討其基因剔除株在缺乏或是不同濃度的葡萄糖環境下，生長情況是否會與野生株有差異。而 *CaCDR3* 的部分也藉由此實驗觀察其基因剔除之後生長的情況是否與野生株有差異。由圖三十三、三十四及三十五的結果所示，觀察到三基因之所有突變株的 single colony 生長的情形和大小與野生株並未發現有明顯差異，推測在剔除基因後，對菌株使用葡萄糖的能力並未有太大影響，原因可能與其家族中仍然具有相同或功能相似的基因可以補足其功能。

5.1.2 芽管試驗結果之探討

芽管為白色念珠菌形成菌絲的早期型態 (Odds, 1988)，試驗方式為將 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株培養在添加 10 % FBS 的 YPD 液態培養液中以溫度 37 °C 培養適當時間 (本研究為三小時) 後觀察是否有差異。由圖三十六、三十七及三十八的結果判

斷，基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 的各突變株皆有芽管生成的能力。因此判斷剔除 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 皆不影響白色念珠菌生成芽管的能力，或其 family 中存在許多相似或相同功能的基因，在缺少其中一個基因的情況下其功能仍然能由其他基因補足。其中，根據文獻，當以白色念珠菌野生型菌株 SN512 (Genotype : *ura3::imm434::URA3/ura3::imm434 iro1::IRO1/iro1::imm434 his1::hisG/his1::hisG leu2/leu2 arg4/arg4*) 並利用營養篩選的方式建構出的雙套 *CaHGT1* 剔除菌株，將其培養在 RPMI 或 YPD 的 medium 中，以溫度 30 °C 或 37 °C 下培養 24 小時，發現其突變菌株依然有菌絲生成的能力但其菌絲生長的長短會較 SN512 短 (Iwona *et al.*, 2011)；本研究中以添加 10 % FBS 的 YPD 培養液在溫度 37 °C 的培養條件下，並未發現突變株之芽管生成能力與野生株有差異，其原因推測可能與所使用不同背景的菌株進行實驗所產生的結果差異性。

5.1.3 含 4 % FBS 之 YPD 培養基菌落型態探討

白色念珠菌菌絲的生成與其致病力有相關性，實驗上可將菌培養在正常營養成分下並含 4 % FBS 之 YPD 培養基中以溫度 37 °C 培養三天後觀察其菌絲生長的能力及情況，若菌落表面會呈現皺摺，表示可能與菌絲生成相關；若不具菌絲生成能力則呈現圓形光滑的菌落。由圖三十九、四十及四十一的結果判斷，基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 的各突變株菌落皆同野生株，呈現皺摺狀。因此判斷在剔除 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 皆不會明顯影響白色念珠菌生成菌絲的能力，其原因推測可能為基因家族 (HGT family) 中存在許多相似或相同功能的基因，在缺少其中一個基因的情況下其功能仍然能由其他基因補足 (Fan, J. *et al.*, 2002)。

5.1.4 含 4 % FBS 之 Bacto agar 培養基菌落型態探討

白色念珠菌菌絲的生成與其致病力有相關性，本實驗利用營養成分較低之含 4 % FBS 之 Bacto agar 培養基將菌株以 30 °C 培養

七天後用顯微鏡觀察菌株在環境不佳的情況下菌絲生長的情形。由圖四十二、四十三及四十四的結果判斷，基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 的各突變株菌落皆同野生株呈現放射狀菌絲，顯示個別將此三基因做雙套剔除後的菌株依然同野生株，具有菌絲生成的能力並無明顯差異。

5.1.5 侵犯力測試之探討

當白色念珠菌有菌絲的生成情況下，就有能力對宿主產生侵入性的感染，因此本實驗藉以觀察念珠菌之侵入 agar 的能力推斷其菌絲的生成與否及其致病的能力。已知野生株 SC5314 得到之結果為菌落表面呈皺褶狀並且經流水沖洗後並不會沖掉菌落，且可看到菌絲侵入洋菜膠內。而失去菌絲生成能力並不具致病能力之 HLC54 則呈現菌落表面呈圓形平滑狀且經流水沖刷可輕易洗掉菌落，並無菌絲侵入洋菜膠內的現象。由圖四十五、四十六及四十七的結果判斷，基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 的各突變株菌落皆同野生株表面呈現皺摺並且經水流沖刷後依然附著於洋菜膠上，有菌絲侵入洋菜膠的現象。

由以上三種性狀測試，結果顯示此三基因做雙套剔除後的菌株依然同野生株，以此推測基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 並不是直接影響白色念珠菌菌絲生成之基因，或是其 family 中存在許多相似或相同功能的基因，在缺少其中一個基因的情況下其功能仍然能由其他基因補足 (Fan, J. et al., 2002)。

5.2 基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株對藥物

(Fluconazole、Miconazole、Amphotericin B) 感受性之探討

5.2.1 基因 *CaCDR3* 各突變株對藥物 Fluconazole、Miconazole、Amphotericin B 感受性之探討

白色念珠菌之基因 *CaCDR3* 分類於 CDR (Candida Drug Resistance) family 中的基因，目前被推測與白色念珠菌之抗藥性現象相關。而已知 family 中的 *CaCDR1* 及 *CaCDR2* 的功能確實與藥

物的抗性相關，並且針對 azole 類藥物有抗藥的現象，文獻上發現 *CaCDR1* 及 *CaCDR2* 的大量表現會使白色念珠菌細胞膜上通道增加，而其通道的作用是将 azole 類藥物排出細胞外以致抗藥性現象產生。因此本實驗目的即測試剔除雙套 *CaCDR3* 基因之菌株對藥物的感受性是否有差異，試驗的藥物有 fluconazole、miconazole 及 amphotericin B。而由實驗結果圖四十八、五十一、五十四得到 *CaCDR3* 各突變株對三種藥物的感受性與野生株 (SC5314) 並無明顯差異，推測基因剔除後對於藥物感受性的影響並不大。而由文獻中得知，*CaCDR1*、*CaCDR2* 及 *CaCDR3* 除了被認為與抗藥性相關外，也被研究出屬磷脂轉位蛋白 (phospholipid translocator)，其功能為將磷脂從細胞膜的內層及外層膜之間做翻轉的酵素。此文獻研究中得到 *CaCDR3* 不同於 *CaCDR1* 及 *CaCDR2*，不具有抗 azole 藥物的能力，並且轉位的方向也不同：*CaCDR1* 及 *CaCDR2* 的方向是由內至外；而 *CaCDR3* 的方向則由外至內 (Smriti et al., 2002)。其文獻結果與本實驗中對兩種 azole 類藥物的藥物敏感性實驗相符。因此推測白色念珠菌之 *CaCDR3* 蛋白質序列雖相似於 *CaCDR1* 及 *CaCDR2*，但其對藥物感受性及抗藥性功能卻可能不同。

5.2.2 基因 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各突變株對藥物 Fluconazole、Miconazole、Amphotericin B 感受性之探討

白色念珠菌之 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 都屬於 HGT family 中的基因，而此家族之基因被認為與白色念珠菌葡萄糖的運送有相關性。文獻也指出此類的 glucose transporter 於抗藥性的現象有關連性 (Varma et al., 2000)。在兩種 azole 類藥物 fluconazole 及 miconazole 的部分由圖四十九、五十二結果得到 *CaHGT1* 的各基因突變株在本研究的條件下，藥物感受性與野生株 (SC5314) 並無明顯差異性；而在 *CaHGT7* 對藥物 fluconazole 的感受性結果中，由圖五十則可得到在藥物濃度為 0.25 ug/ml 時，*CaHGT7* 的雙套基因剔除株得到些微的差異，而在 miconazole 的部分由圖五十二得到無顯著差異之結

果。另外，在藥物 amphotericin 感受性的實驗中，依結果由圖五十五及五十六得到 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 的部分基因剔除株對藥物的感受性似乎有增加的現象。

5.3 白色念珠菌 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 各基因突變株對不同濃度之 Amphotericin B 的 Agar dilution test 結果之探討

由本實驗之藥物感受性實驗結果得到，在藥物 amphotericin B 濃度為 0.5 ug/ml 的情況下，基因 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 部分突變株有出現差異性。在 *CaHGT1* 的部分，發現其兩株單套基因突變株得到對藥物較敏感的結果；而 *CaHGT7* 則是單套基因突變株以及雙套基因突變株各有一株得到對藥物較為敏感的結果，因此再利用 agar dilution 的實驗做進一步的確認。在 agar dilution 實驗部分選用了四種濃度的 amphotericin B，分別為 0.125 ug/ml、0.25 ug/ml、0.375 ug/ml 及 0.5 ug/ml。在 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 的結果由圖五十七及圖五十八得到，在 0.125 ug/ml、0.25 ug/ml 及 0.375 ug/ml 三種藥物濃度下，各突變株的四種菌量 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 生長情況與 WT 並無明顯差異；而在濃度 0.5 ug/ml 時，*CaHGT1* 及 *CaHGT7* 的單套及雙套基因突變株雖同野生株 (WT) 四種菌量都能生長，但在 10 的菌量可觀察到生長情形有些許不如野生株，但必須再經過進一步的測試才能夠做確定。

5.4 結語

CaCDR3、*CaHGT1* 和 *CaHGT7* 是由本實驗先前比對白色念珠菌野生株 SC5314 以及 *cph1/cph1 efg1/efg1* 剔除株之間表現量有差異性的基因，顯示可能受到轉錄因子 Cph1p 或 Efg1p 調控，可能影響菌絲生長。因此本實驗分別剔除基因 *CaCDR3*、*CaHGT1* 和 *CaHGT7*，建構完成後用以進行之後的型態及藥物感受性的分析。而在芽管試驗、含營養源並添加血清之固態培養基、缺乏營養源並添加血清之固態培養基以及侵犯力測試等實驗結果，顯示 *CaCDR3*、*CaHGT1* 和 *CaHGT7* 剔除株在以上培養條件下，所表現出來的性狀

仍然與野生株 SC5314 相同，表示在本研究的測試條件下剔除基因後並不影響白色念珠菌接受外界刺激後（例如：血清添加、37°C 液態或固態培養以及 solid spider培養基），產生菌絲型態的能力。另外在利用 broth microdilution method 進行藥物感受性的測試下，*CaCDR3*、*CaHGT1* 和 *CaHTT7* 各剔除株對兩種 azole 類藥物 (Fluconazole、Miconazole) 的感受性與野生株並無顯著差異。而在藥物 amphotericin B 下得到 *CaHGT1* 和 *CaHGT7* 突變株有感受性增加之結果，而後又利用 agar dilution method 進行再次確認，而結果卻並未看到明顯差異性，仍舊無法確認是否真與藥物感受性現象相關。

5.5 未來展望

1. 白色念珠菌之 *CaCDR3* 基因在目前的研究文獻以及本篇研究中都顯示皆並未發現如同 *CaCDR1* 及 *CaCDR2* 對於 azole 類藥物感受性有差異，若想得到更加完整的研究，可嘗試將 *CaCDR3* 基因做過量表現，在進行藥物感受性的測試看看是否有差異。另外，在文獻中 *CaCDR1* 研究中發現血清的存在會影響 efflux pump 的表現 (Yang, Y. L., et al., 2006)，未來也可對這部分做嘗試，看看是否有對藥物的感受程度有差異。

文獻也指出 *CaCDR1*、*CaCDR2* 及 *CaCDR3* 屬磷脂轉位蛋白 (phospholipid translocator) (Smriti et al., 2002)。由此推測白色念珠菌之 *CaCDR3* 基因序列雖與 *CaCDR1* 及 *CaCDR2* 相似度高，但其功能以及參與調控之機制卻可能不同，因此未來針對 *CaCDR3* 的研究可將本實驗已建構完成之基因剔除株做與磷脂轉位機制相關之研究，以瞭解其在白色念珠菌中主要扮演的腳色以及功能為何。

2. 白色念珠菌之 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 基因在本研究中對於藥物 amphotericin B 感受性之實驗，在 broth microdilution method 下有差異性但在 agar dilution 方法則並無觀察到明顯的差異性。

其原因可能與培養條件的不同，使得接收到了外在環境壓力不同或許有相關 (Biswas S. et al, 2007)，但仍需再經實驗才能證實。另外，在不同的培養條件下，對藥物濃度的感受性可能也會不相同，曾有文獻中將 broth microdilution method 的方法與 Agar dilution 做比較，發現使用 broth microdilution method 所需抑制菌株的藥物濃度會比 agar dilution 低 (Therese, K. L., et al., 2006；Menezes, E.A. et al., 2013)，因此在實驗設計上或許必須再將 broth microdilution method 濃度提高，測試是否有能夠得到一致的實驗結果。



六、参考文献

- Balan, I., Alarco, A. M., Raymond, M. (1997). "The *Candida albicans* CDR3 gene codes for an opaque-phase ABC transporter." J Bacteriol **179** (23): 7210-7218.
- Berman, J. (2006). "Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*." Curr Opin Microbiol **9** (6): 595-601.
- Berman, J. and P. E. Sudbery (2002). "Candida Albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast." Nat Rev Genet **3** (12): 918-930.
- Biswas, S., Van Dijck, P. and Datta, A. (2007) "Signaling dynamics among morpho-pathogenic determinants of *Candida albicans*." Microbiology and Molecular Biology Reviews **71**:348-376.
- Biswas, S., Van Dijck, P., Datta, A.. (2007). "Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*." Microbiol Mol Biol Rev **71** (2): 348-376.
- Braun B.R., Kadosh D., Johnson A.D. (2001) NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated 1. during filament induction. EMBO J **20**:4753-4761.
- Braun, B. R. and A. D. Johnson (1997). "Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1." Science **277** (5322): 105-109.
- Brown, A. J. and N. A. Gow (1999). "Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis." Trends Microbiol **7** (8): 333-338.
- Brown, A. J., Odds, F. C., Gow, N. A. (2007). "Infection-related gene expression in *Candida albicans*." Curr Opin Microbiol **10** (4): 307-313.
- Brown, V., Sexton, J. A., Johnston, M. (2006). "A glucose sensor in *Candida albicans*." Eukaryot Cell **5** (10): 1726-1737.
- Burkhard R. Braun and Alexander D. Johnson (2000). "*TUP1*, *CPH1* and *EFG1* Make Independent Contributions to Filamentation in *Candida albicans* ." Genetics **155** (1):57-67.
- Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M., Monk, B. C.. (2007). "Candida albicans drug resistance another way to cope with stress." Microbiology **153** (Pt 10): 3211-3217.

- Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V., Keniya, M. V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., Monk, B. C. (2009). "Efflux-mediated antifungal drug resistance." Clin Microbiol Rev **22**(2): 291-321.
- Copping, V. M., Barelle, C. J., Hube, B., Gow, N. A., Brown, A. J., Odds, F. C. (2005). "Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes." J Antimicrob Chemother **55** (5): 645-654.
- Cowen, L. E., Anderson, J. B., Kohn, L. M. (2002). "Evolution of drug resistance in *Candida albicans*." Annu Rev Microbiol **56**: 139-165.
- de Repentigny, L., Lewandowski D., Jolicoeur P. (2004). "Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection." Clin Microbiol Rev **17** (4): 729-759.
- Dieterich, C., Schandar, M., Noll, M., Johannes, F. J., Brunner, H., Graeve, T., Rupp, S. (2002). "In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion." Microbiology **148** (Pt 2): 497-506.
- Ding, C. and G. Butler (2007). "Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation." Eukaryot Cell **6** (8): 1310-1319.
- Dismukes, W. E. (2000). "Introduction to antifungal drugs." Clin Infect Dis **30**(4): 653-657.
- Fan, J., Chaturvedi, V., Shen, S. H. (2002). "Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*." J Mol Evol **55** (3): 336-346.
- Garcia-Sanchez S, Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M., and d'Enfert, C. (2004) "*Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns." Eukaryot Cell **3** (2):536-45.
- Georgopapadakou N.H. (1998). "Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs." Curr. Opin. Microbiol **1**:547–57.
- Georgopapadakou, N. H. and T. J. Walsh (1994). "Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens." Science **264**(5157): 371-373.
- Ghannoum, M. A. and L. B. Rice (1999). "Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance." Clin Microbiol Rev **12** (4): 501-517.

- Gillum, A. M., Tsay, E. Y., Kirsch, D. R. (1984). "Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations." Mol Gen Genet **198**(1): 179-182.
- Gow, N. A. and G. W. Gooday (1982). "Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*." J Gen Microbiol **128** (9): 2187-2194.
- Hudson, D. A., Sciascia, Q. L., Sanders, R. J., Norris, G. E., Edwards, P. J., Sullivan, P. A., Farley, P. C. (2004). "Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*." Microbiology **150** (Pt 9): 3041-3049.
- Iwona Lesiak-Markowicz, Vogl, G., Schwarzmuller, T., Speth, C., Lass-Flörl, C., Dierich M.P., Kuchler, K. and Wurzner, R. (2011). "*Candida albicans* Hgt1p, a multifunctional Evasion Molecule: Complement Inhibitor, CR3 Analogue, and Human Immunodeficiency Virus–Binding Molecule." J Infect Dis. **204**:802-809
- Kadosh, D. and A. D. Johnson (2005). "Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis." Mol Biol Cell **16** (6): 2903-2912.
- Kim, J. and P. Sudbery (2011). "*Candida albicans*, a major human fungal pathogen." J Microbiol **49** (2): 171-177.
- Lamb D, Kelly D, Kelly S. (1999). "Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. " Drug Resist **2**:390–402.
- Leberer, E., Marcus D., Broadbent I.D., Clark K.L., Dignard D., Ziegelbauer K., Schmidt A., Gow N.A., Brown A.J., Thomas D.Y. (1996). "Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*." Proc Natl Acad Sci U S A **93** (23): 13217-13222.
- Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S.(1999). " Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. " Science **283**:806–9.
- Liu, H., Styles, C. A., Fink, G. R. (1993). "Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids." Science **262** (5140): 1741-1744.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G. R. (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." Cell **90** (5): 939-949.
- Magee, B. D. (1998). "Hospital services in the United States and Canada." JAMA **280** (7): 599.

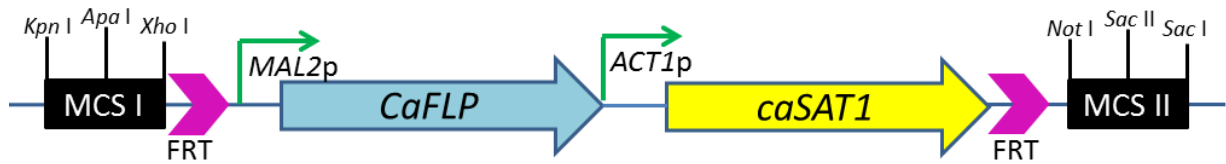
- Mattia, E., Carruba, G., Angiolella, L., Cassone, A. (1982). "Induction of germ tube formation by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*: uptake of inducer and germinative response." J Bacteriol **152** (2): 555-562.
- Navarro-Garcia, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Pla, J., Sentandreu, R., Nombela, C. (1998). "A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*." Microbiology **144** (Pt 2): 411-424.
- Menezes, E.A., Vasconcelos Júnior, A.A., Angelo, M.R., Cunha Mda, C., Cunha, F.A. (2013.) "Correlation between microdilution, Etest, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole against *Candida* sp. blood isolates." Rev Soc Bras Med Trop **46**(1):106-7.
- Odds F.C. (1988). "Candida and candidosis." 2nd Ed. Bailliere Tindall, London.
- Paranjape, V. and A. Datta (1991). "Role of nutritional status of the cell in pH regulated dimorphism of *Candida albicans*." FEMS Microbiol Lett **64** (2-3): 333-336.
- Pfaller MA, Diekema DJ. (2007) "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." Clin Microbiol Rev **20** (1):133-63.
- Rangel-Frausto, M. S., Wiblin, T., Blumberg, H. M., Saiman, L., Patterson, J., Rinaldi, M., Pfaller, M., Edwards, J. E., Jr., Jarvis, W., Dawson, J., Wenzel, R. P. (1999). "National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units." Clin Infect Dis **29**(2): 253-258.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., Morschhauser, J. (2004). "The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*." Gene **341**: 119-127.
- Rex, J. H., Pfaller, M. A., Walsh, T. J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Gosey, L. L., Odds, F. C., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J., Warnock, D. W. (2001). "Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges." Clin Microbiol Rev **14**(4): 643-658.
- Román, E., Arana, D.M., Nombela, C., Alpnso-Monge, R., Pla, J. (2007) "MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence." Trends Microbiol. **15**:181-190.

- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, de Micheli M, Bille J. (1998). "Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. " Drug Resist **1**:255–65.
- Sato, T., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T. (2004). "Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade." Biol Pharm Bull **27** (5): 751-752.
- Smriti, Krishnamurthy, S., Dixit, B. L., Gupta, C. M., Milewski, S., Prasad, R. (2002). "ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators." Yeast **19**(4): 303-318.
- Sheehan D.J., Hitchcock C.A., Sibley C.M. (1999). "Current and emerging azole antifungal agents. " Clin. Microbiol. Rev **12**:40–79.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., Ernst, J. F. (2000). "Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*." Mol Microbiol **35** (2): 386-396.
- Taylor M, Feyereisen R. (1996). "Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. " Mol. Biol. Evol. **13**:719–34.
- Therese, K. L., Bagyalakshmi, R., Madhavan, H. N., Deepa, P. (2006). "In-vitro susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole against ocular fungal isolates." Indian J Med Microbiol **24**(4): 273-279.
- Vanden Bossche, H., D. W. Warnock, B. Dupont, D. Kerridge, G. S. Sen, L. Improvisi, P. Marichal, F. C. Odds, F. Provost, and O. Ronin. (1994). "Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. " J. Med. Vet. Mycol **32**:189–202.
- Vanden Bossche, H., P. Marichal, and F. C. Odds. (1994). "Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. " Trends Microbiol **2**:393–400.
- Varma, A., Singh, B. B., Karnani, N., Lichtenberg-Frate, H., Hofer, M., Magee, B. B., Prasad, R. (2000). "Molecular cloning and functional characterisation of a glucose transporter, CaHGT1, of *Candida albicans*." FEMS Microbiol Lett **182** (1): 15-21.
- White T.C., Marr K.A., Bowden R.A. (1998). "Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. " Clin Microbiol Rev **11**(2):382.

- Xu D, Jiang, B., Ketela, T., Lemieux, S., Veillette, K., Martel, N., Davison, J., Sillaots, S., Trosok, S., Bachewich, C., Bussey, H., Youngman, P., Roemer, T. (2007) "Genome-wide fitness test and mechanism-of-action studies of inhibitory compounds in *Candida albicans*." PLoS Pathog **3** (6):e92.
- Yang, Y. L. (2003). "Virulence factors of *Candida* species." J Microbiol Immunol Infect **36** (4): 223-228.
- Yang, Y. L., Lin, Y. H., Tsao, M. Y., Chen, C. G., Shih, H. I., Fan, J. C., Wang, J. S., Lo, H. J. (2006). "Serum repressing efflux pump CDR1 in *Candida albicans*." BMC Mol Biol **7**: 22.



SAT1 flipper cassette of plasmid pSFS-SAT1

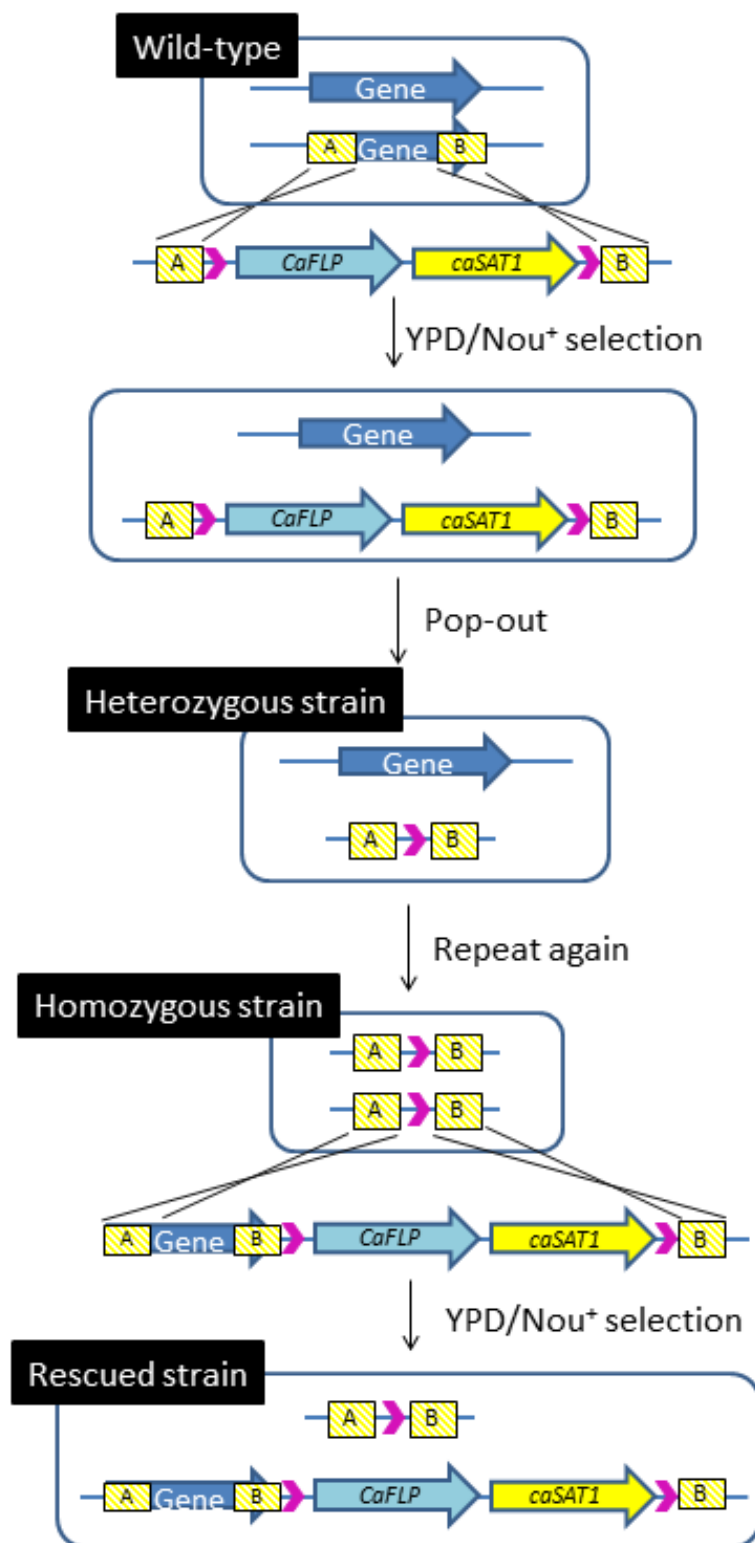


- caSAT1 : nourseothricin (Nou) resistance marker
- caFLP : encoding the site-specific recombinase
- FRT : minimal FLP recombination target sequence
- MCS : multiple cloning site

O. Reuß et al. / Gene, 2004

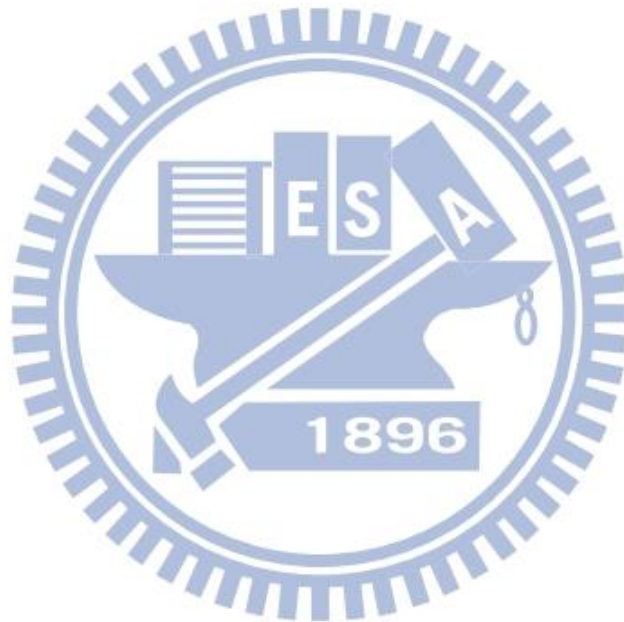
圖一、 SAT1 flipper cassette 示意圖。

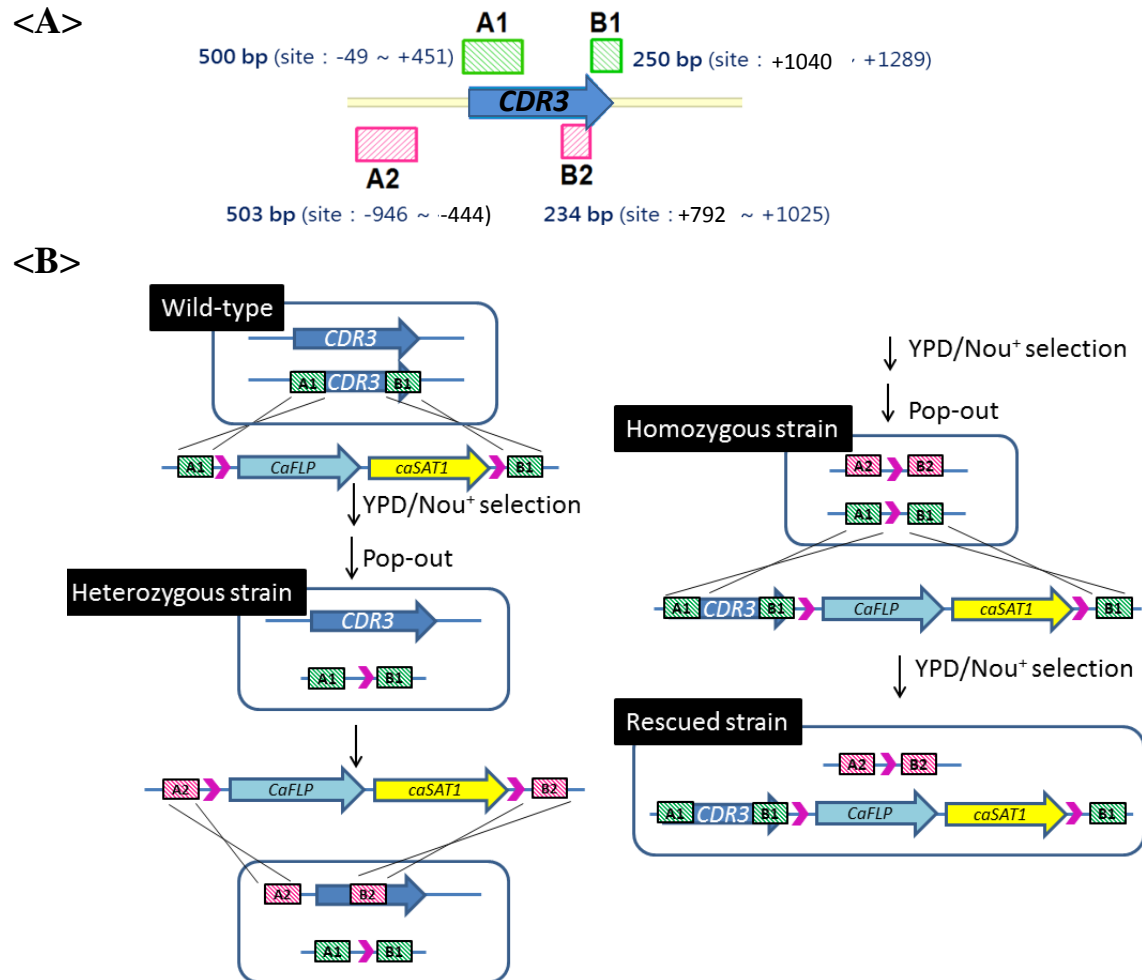
SAT1 flipper cassette 存在於質體 pSFS2-SAT1 中，其中包含了由 *ACT1* promoter 所調控表現之基因 *CaSAT1*，可抗藥物 Nourseothricin 以作為藥物篩選標記；由 *MAL2* promoter 所調控的 *CaFLP*，可產生 site-specific recombinase，此酵素可辨認結合到兩端的 FRT (minimal FLP recombination target sequence) 序列，進行 site specific recombination，以將 cassette 剔除出 genome 中，而只留下一個 FRT 序列。此外，此 cassette 上下游各有一個 multiple cloning site (MCS)。



圖二、建構白色念珠菌基因剔除株流程圖。

利用 *SAT1* flipper cassette 前後兩端帶有目標基因的同源性區域 (即圖中之 A 與 B)，與目標基因進行同源重組置換，藉由藥物 nourseothricin 篩選出帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株，再經用 maltose 使 *SAT1* flipper pop-out，得到單套基因剔除株 (Heterozygous strain)。同樣的流程重複進行一次，得到雙套基因剔除株 (Homozygous strain)。之後再利用帶有整個目標基因片段和 B region 的 *SAT1* flipper cassette 送進雙套基因剔除株，得到單套基因回復株 (Rescued strain)。





圖三、白色念珠菌 *CaCDR3* 之同源區域設計及基因剔除流程示意圖。

<A> 白色念珠菌之 *CaCDR3* 剔除所用 plasmid : pSAT1-*CDR3*-A1B1 及

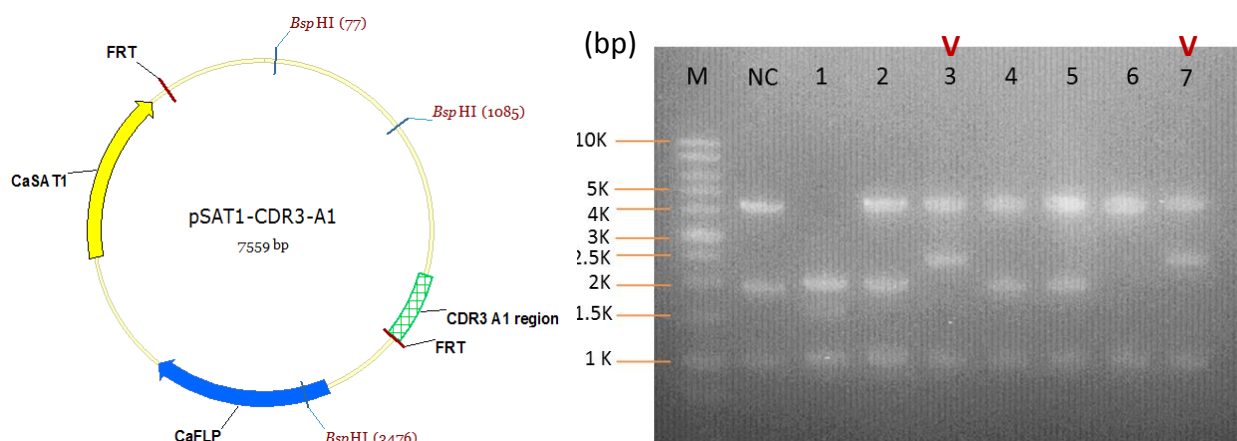
pSAT1-*CDR3*-A2B2 之上下游同源序列設計之相對位置。

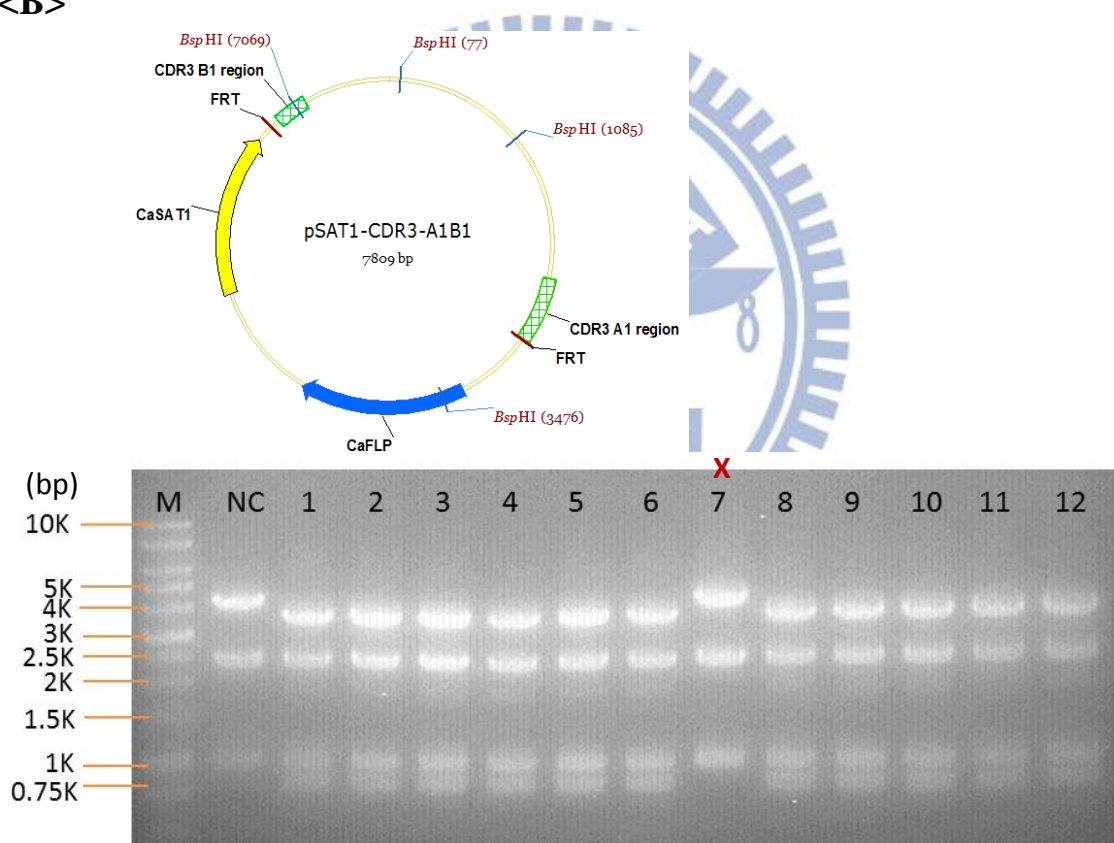
pSAT1-*CDR3*-A1B1 的 A1 region 位於基因 -49 ~ +451 片段大小 500 bp ; B1 region 位於基因 +1040 ~ +1289 片段大小 250 bp ;

pSAT1-*CDR3*-A2B2 的 A2 region 位於基因 -946 ~ -444 片段大小 503 bp ; B2 region 位於基因 +792 ~ +1025 片段大小 234 bp 。

**** 白色念珠菌 *CaCDR3* 剔除之流程圖。先利用 pSAT1-*CDR3*-A1B1 做第一套 allele 之 *CaCDR3* 剔除而得到單套基因剔除株 (Heterozygous strain), 而後再利用 pSAT1-*CDR3*-A2B2 做第二套 allele 之 *CaCDR3* 剔除而得到雙套基因剔除株 (Homozygous strain)。最後再利用帶有整個目標基因片段和 B1 region 的 *SAT1* flipper cassette 送進雙套基因剔除株, 得到單套基因回復株 (Rescued strain) 。

<A>

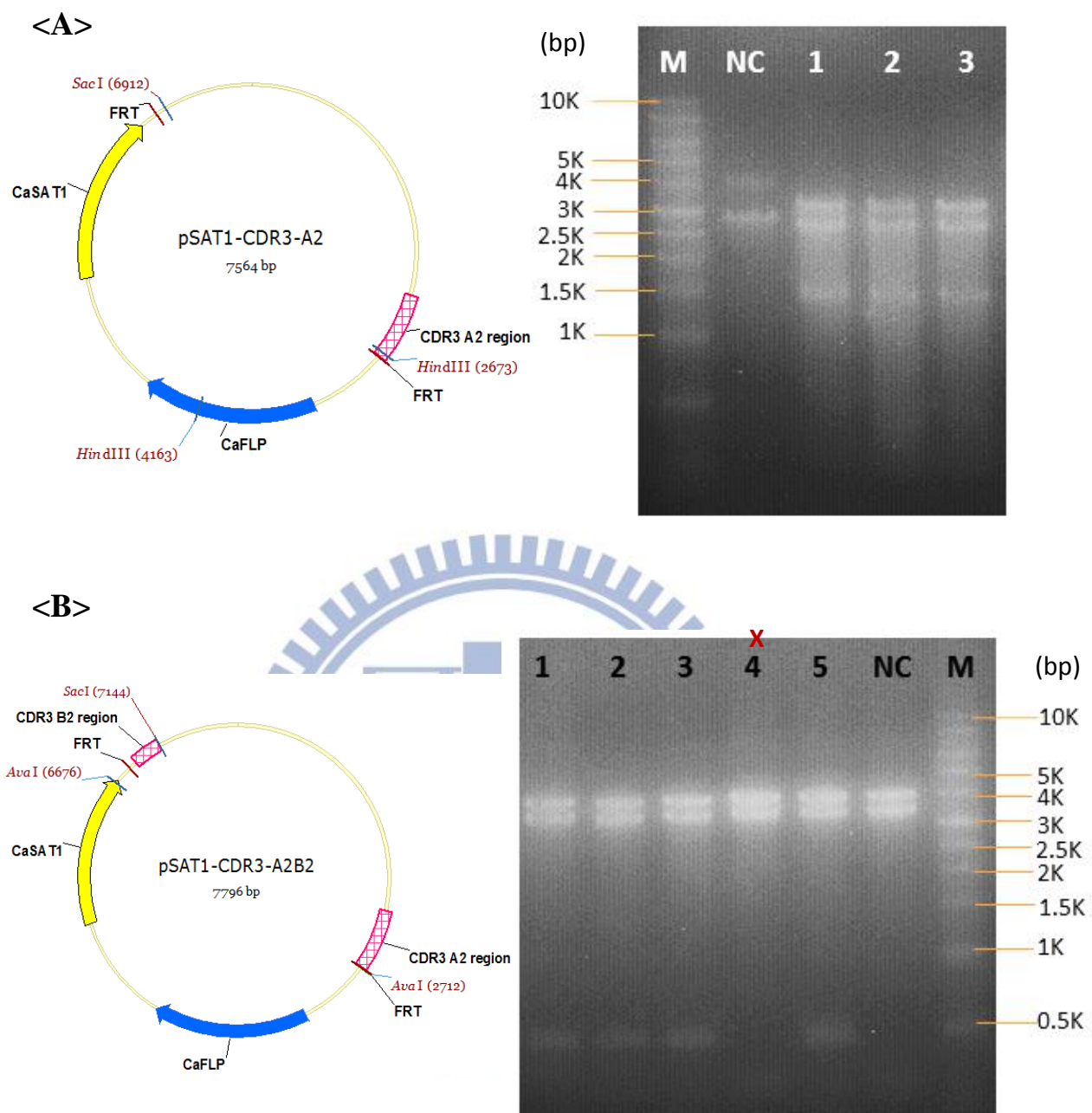




圖四、以限制酶確認質體 pSAT1-CDR3-A1 和 pSAT1-CDR3-A1B1。

<A> 以限制酶 *Bsp*HI 作用於質體 pSAT1-CDR3-A1。預期得到片段 4162 bp、2400 bp 和 1008 bp; NC 為 pSFS2-SAT1; Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

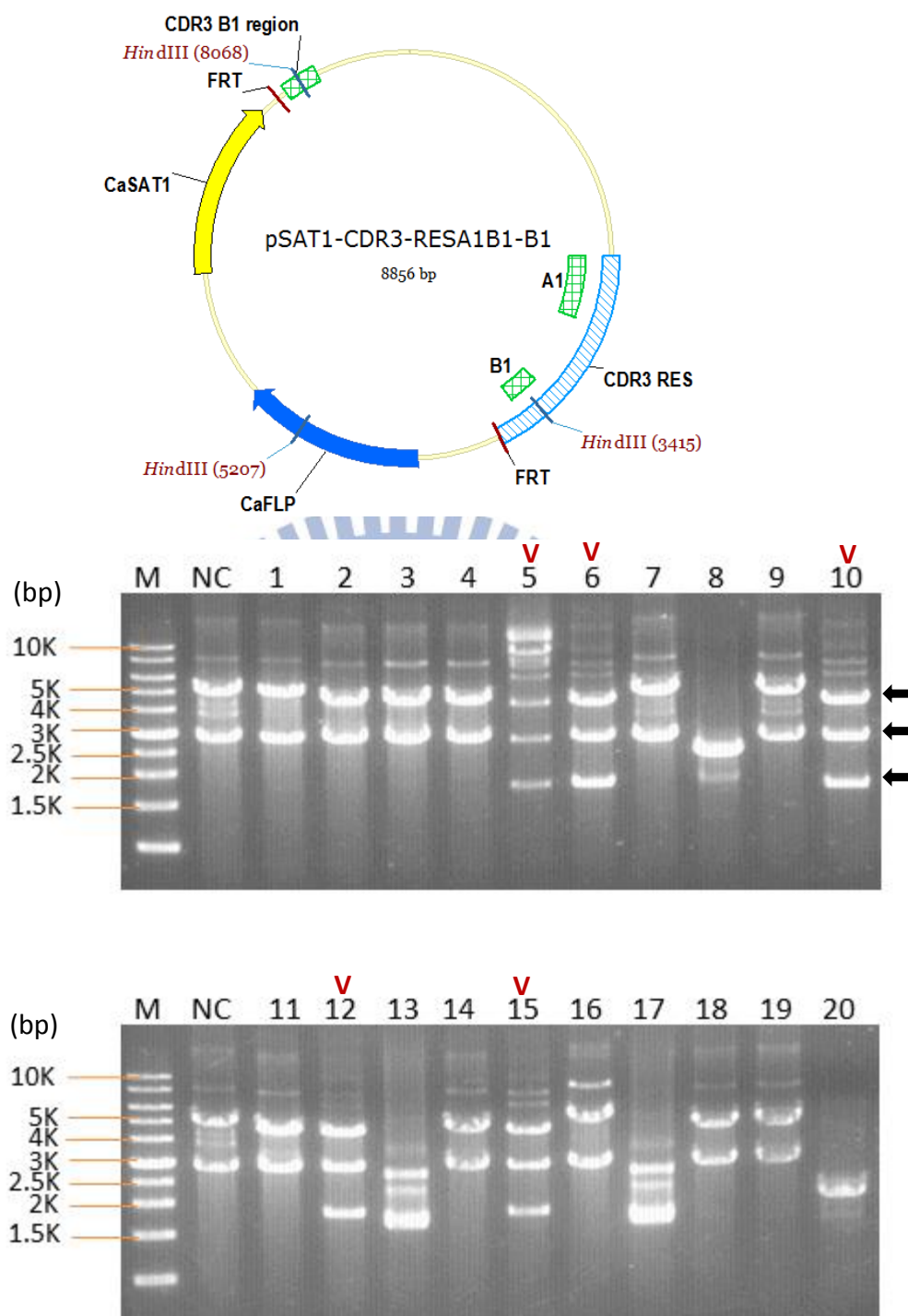
 以限制酶 *Bsp*HI 作用於質體 pSAT1-CDR3-A1B1。預期得到片段 3593 bp、2391 bp、1008 bp 及 817 bp; NC 為 pSAT1-CDR3-A1; Lane M 為 1 Kbp DNA marker。“v”：符合預期之結果。“x”：非符合預期之結果。



圖五、以限制酶確認質體 pSAT1-CDR3-A2 和 pSAT1-CDR3-A2B2。

<A> 以限制酶 *Hind* III 及 *Sac* I 作用於質體 pSAT1-CDR3-A2。預期得到片段 3325 bp、2749 bp 及 1490 bp；NC 為 pSFS2-SAT1；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

**** 以限制酶 *Ava* I 及 *Sac* I 作用於質體 pSAT1-CDR3-A2B2。預期得到片段 3964 bp、3364 bp 及 468 bp；NC 為 pSAT1-CDR3-A1；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。“x”：非符合預期之結果。



圖六、以限制酶確認質體 pSAT1-CDR3-RESA1B1-B1。

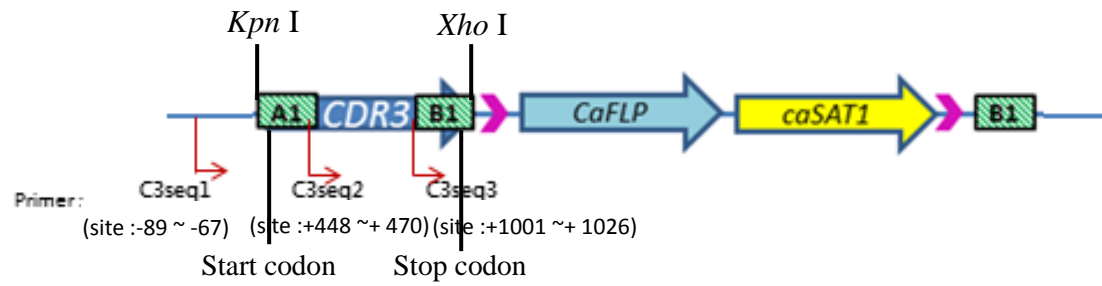
以限制酶 *Hind* III 作用於質體 pSAT1-CDR3-RESA1B1-B1。

pSAT1-CDR3-RESA1B1-B1 預期得到片段4203 bp、2861 bp 和 1792 bp ；

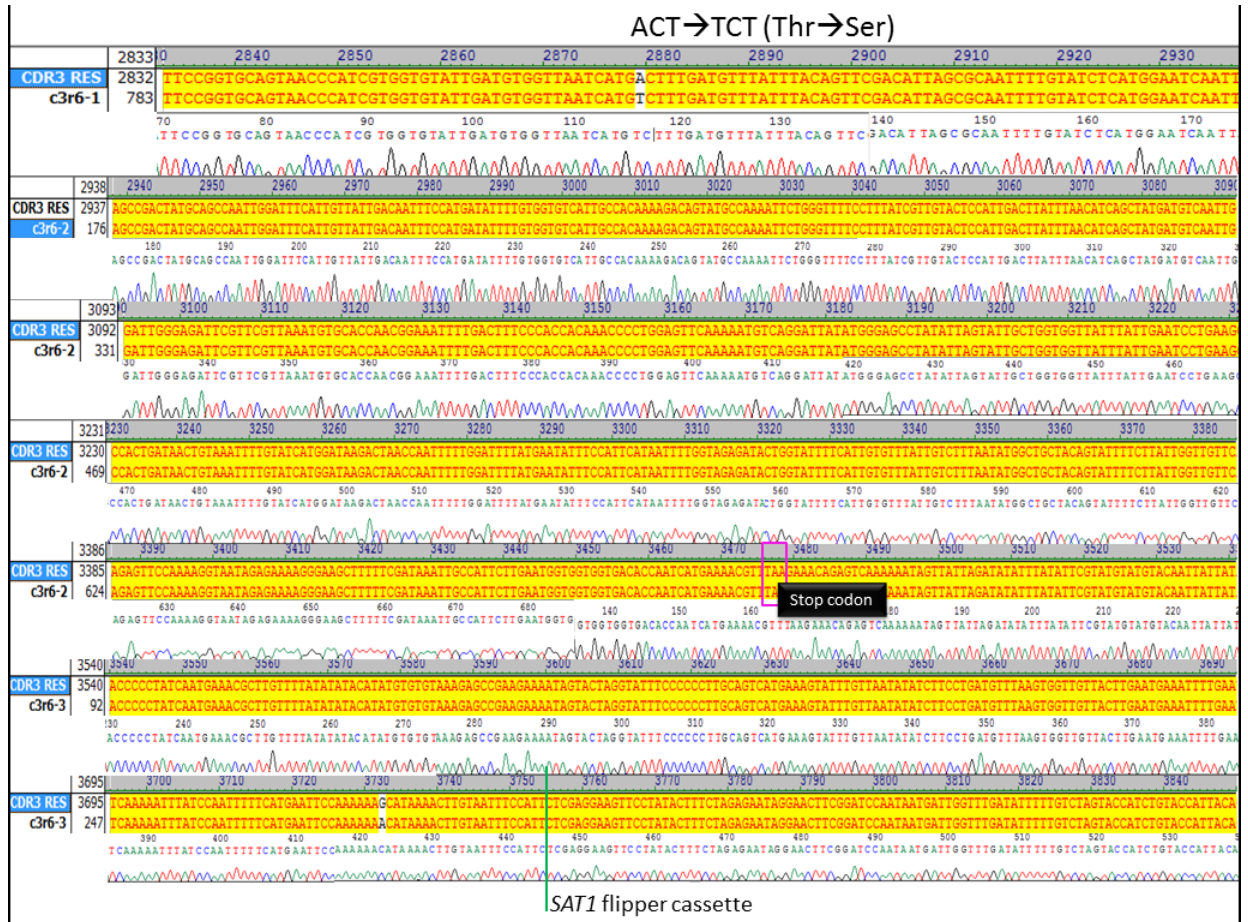
NC 為 pSAT1-CDR3-A1B1；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

“v”：符合預期之結果。

<A>



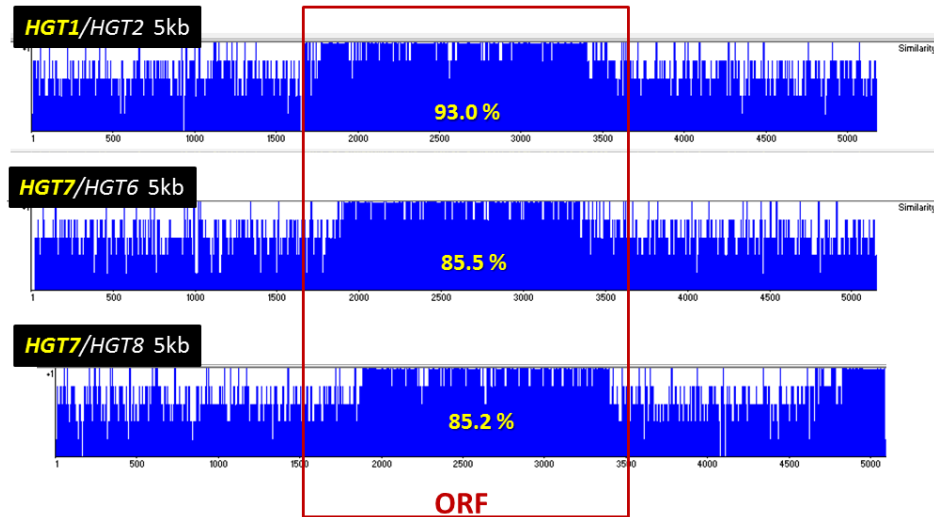


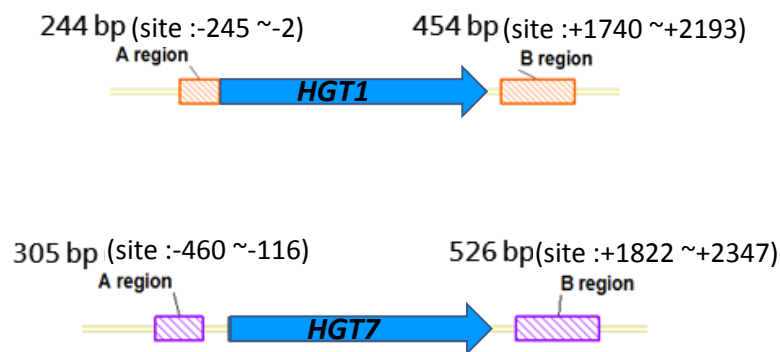


圖七、質體 pSAT1-CDR3-RESA1B1-B1 序列分析結果。

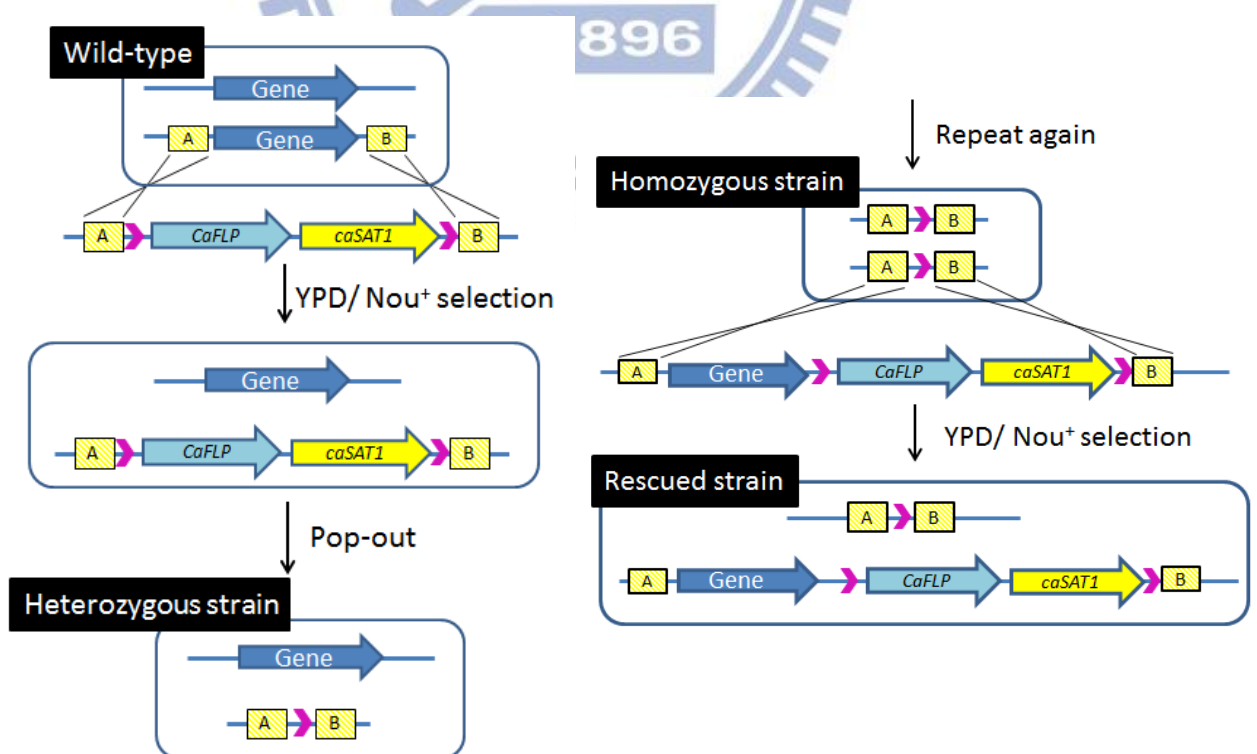
- <A> 用於定序之引子 C3seq 1、C3seq 2 及 C3seq 3 之位置。C3seq 1 位於 *CaCDR3* - 89 ~ - 67；C3seq 2 位於 *CaCDR3* + 448 ~ + 470 而 C3seq 3 位於 *CaCDR3* + 1001 ~ + 1026。以此三個引子來進行定序。
- 定序之結果圖。可看到定序之前後有 SAT1 flipper cassette 之序列，確認接於 pSFS2-SAT1 之正確位置上。而從 start codon 至 stop codon 間之 *CaCDR3* 結果，在 + 83 位置有點突變 G → A，並且胺基酸由 Arg → Gln；另外，在 + 622 位置有點突變 A → T，並且胺基酸由 Thr → Ser。

<A>





<C>



圖八、白色念珠菌 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 之同源區域設計及基因剔除流程示意圖。

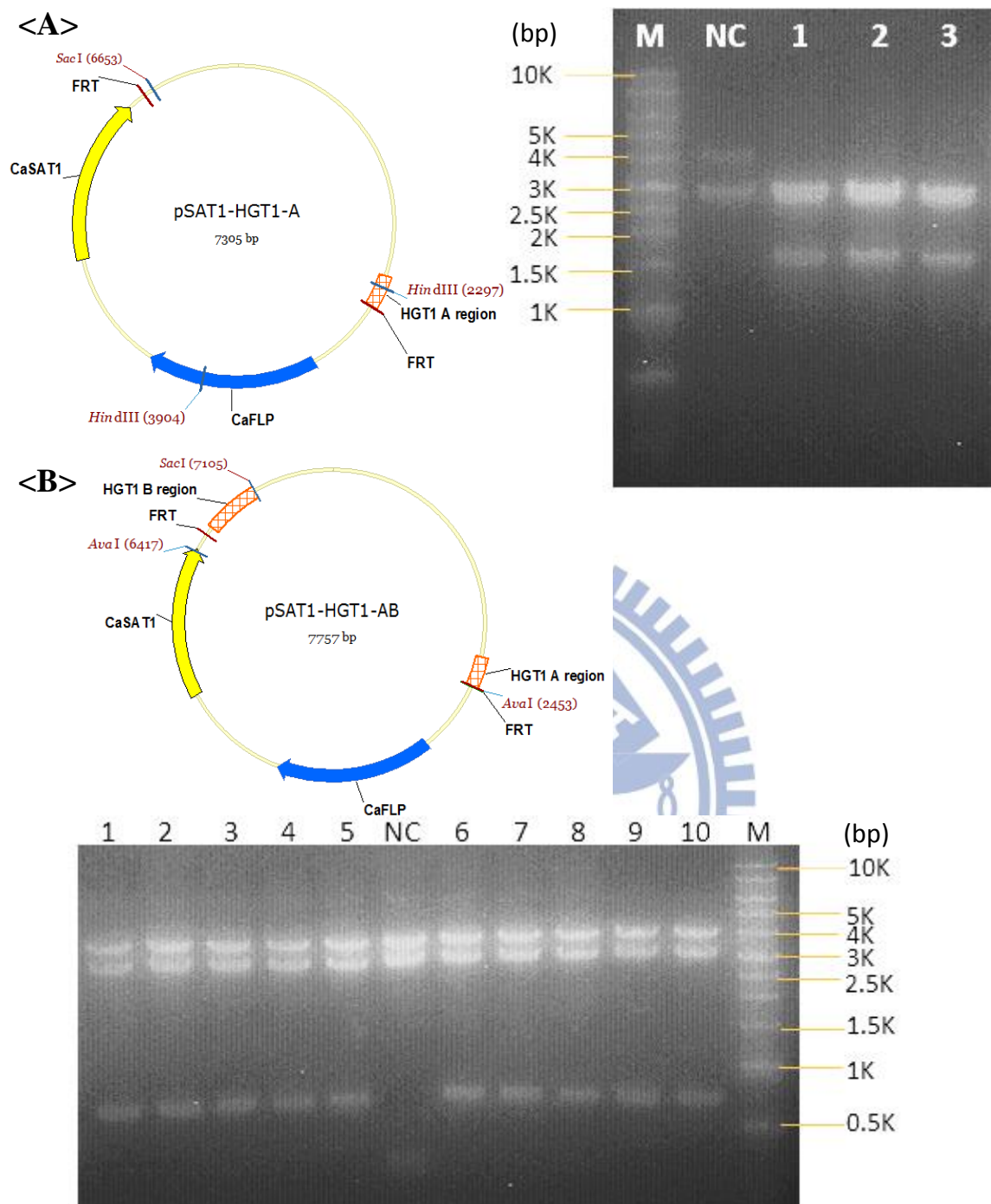
<A> 白色念珠菌 HGT family 之間的 align 結果。分別將本研究之 *CaHGT1* 與 *CaHGT2* 比對；而 *CaHGT7* 與 *CaHGT6* 和 *CaHGT8* 比對。結果圖可見其 ORF 序列相似度極高。*CaHGT1* / *CaHGT2* 有 93 % 相似；*CaHGT7* / *CaHGT6* 有 85.5 % 相似；而 *CaHGT7* / *CaHGT8* 有 85.2 % 相似。因此原因，將其上下游枝同源相似序列設計於 ORF 外。

 白色念珠菌之 *CaHGT1* 及 *CaHGT7* 剔除所用之 plasmid：

pSAT1-*HGT1*-AB 及 pSAT1-*HGT7*-AB 之上下游同源序列設計之相對位置。pSAT1-*HGT1*-AB 的 A region 位於基因 -245 ~ -2 片段大小 244 bp；B region 位於基因 +1740 ~ +2193 片段大小 454 bp；

pSAT1-*HGT7*-AB 的 A region 位於基因 -460 ~ -116 片段大小 305 bp；B region 位於基因 +1822 ~ +2347 片段大小 526 bp。

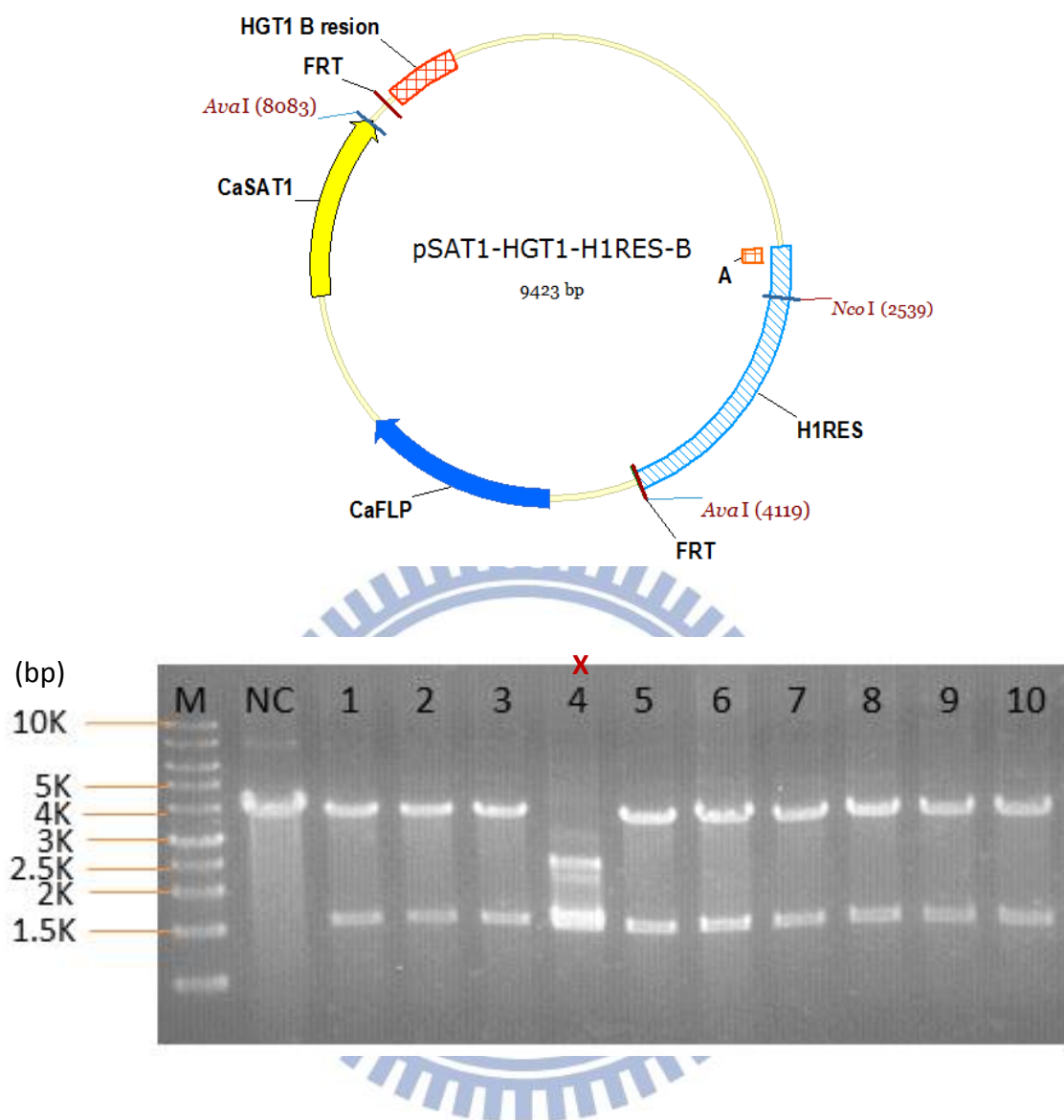
<C> 利用 *SAT1* flipper cassette 前後兩端帶有目標基因的同源性區域(即圖中之 A 與 B)，與目標基因進行同源重組置換，藉由藥物 nourseothricin 篩選出帶有 *SAT1* flipper cassette 的菌株，再經用 maltose 使 *SAT1* flipper pop-out，得到單套基因剔除株 (Heterozygous strain)。同樣的流程重複進行一次，得到雙套基因剔除株 (Homozygous strain)。之後再利用帶有整個目標基因片段和 B region 的 *SAT1* flipper cassette 送進雙套基因剔除株，得到單套基因回復株 (Rescued strain)。



圖九、以限制酶確認質體 pSAT1-HGT1-A 和 pSAT1-HGT1-AB。

<A> 以限制酶 *Hind* III 及 *Sac* I 作用於質體 pSAT1-HGT1-A。預期得到片段 2949 bp、2749 bp 和 1607 bp；NC 為 pSFS2-SAT1；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

**** 以限制酶 *Ava* I 及 *Sac* I 作用於質體 pSAT1-HGT1-AB。預期得到片段 3964 bp、3105 bp 及 688 bp；NC 為 pSAT1-HGT1-A；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。



圖十、以限制酶確認質體 **pSAT1-HGT1-H1RES-B**。

以限制酶 *Ava* I 及 *Nco* I 作用於質體 **pSAT1-HGT1-H1RES-B**。預期得到片段 3964 bp、3793 bp 和 1580 bp；NC 為 **pSAT1-HGT1-AB**；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

“x”：非符合預期之結果。



<C>

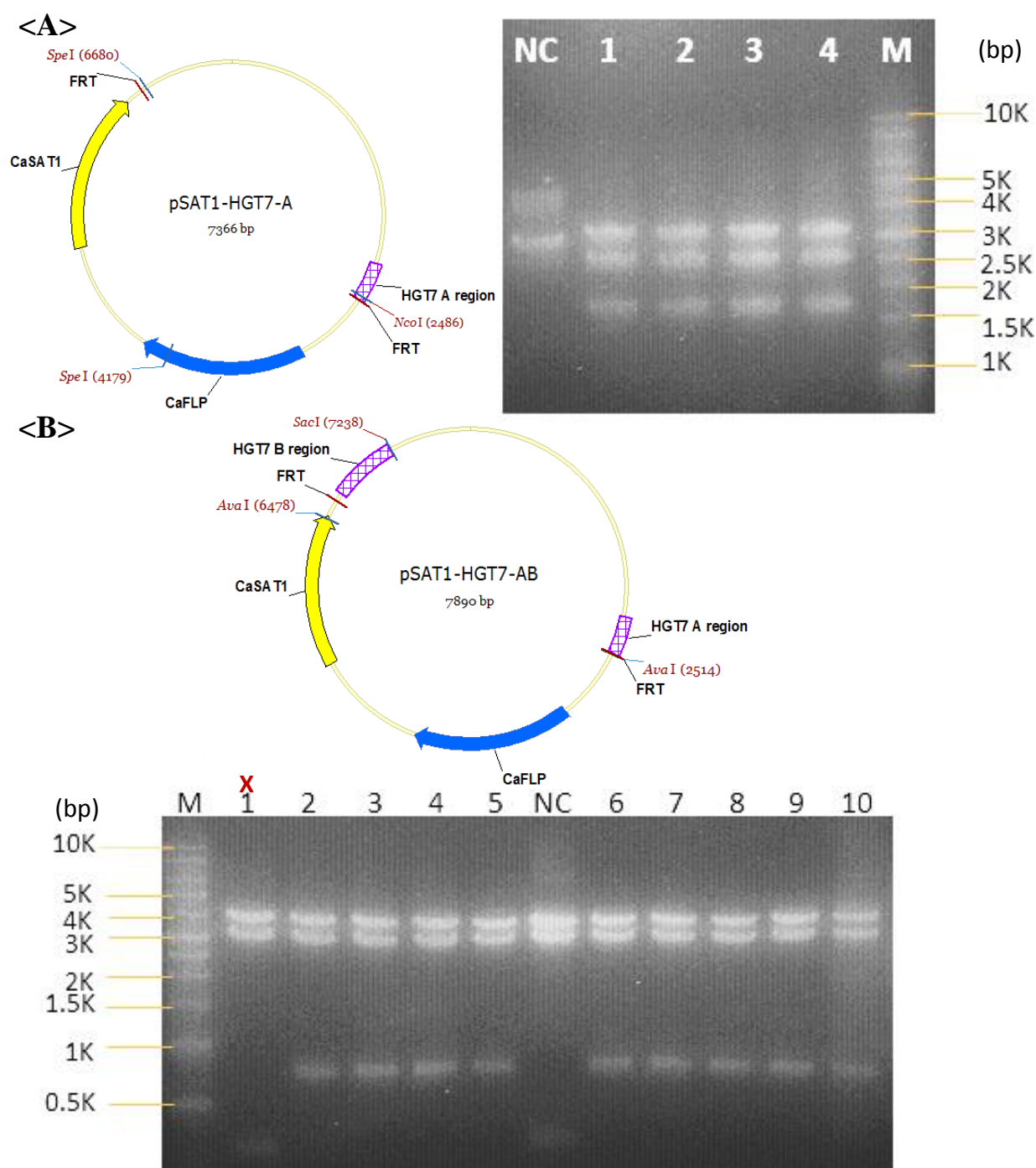
site	mutation	site	mutation
+ 150	TCC (Ser) → CCC (Pro)	+ 1371	AGC (Ser) → AGT (Ser)
+ 990	ACC (Thr) → ACT (Thr)	+ 1446	ACT (Thr) → ACC (Thr)
+ 993	GTT (Val) → GTG (Val)	+ 1539	GCC (Ala) → GCT (Ala)
+ 1239	ATT (Ile) → ATC (Ile)		
+ 1248	TAC (Tyr) → TAT (Tyr)		
+ 1269	GAT (Asp) → GAC (Asp)		
+ 1351	ACT (Thr) → TCT (Ser)		

圖十一、質體 pSAT1-HGT1-H1RES-B 序列分析結果。

<A> 用於定序之引子 H1seq 1、H1seq 2、H1seq 3 及 H1seq 4 之位置。

 定序之結果圖。

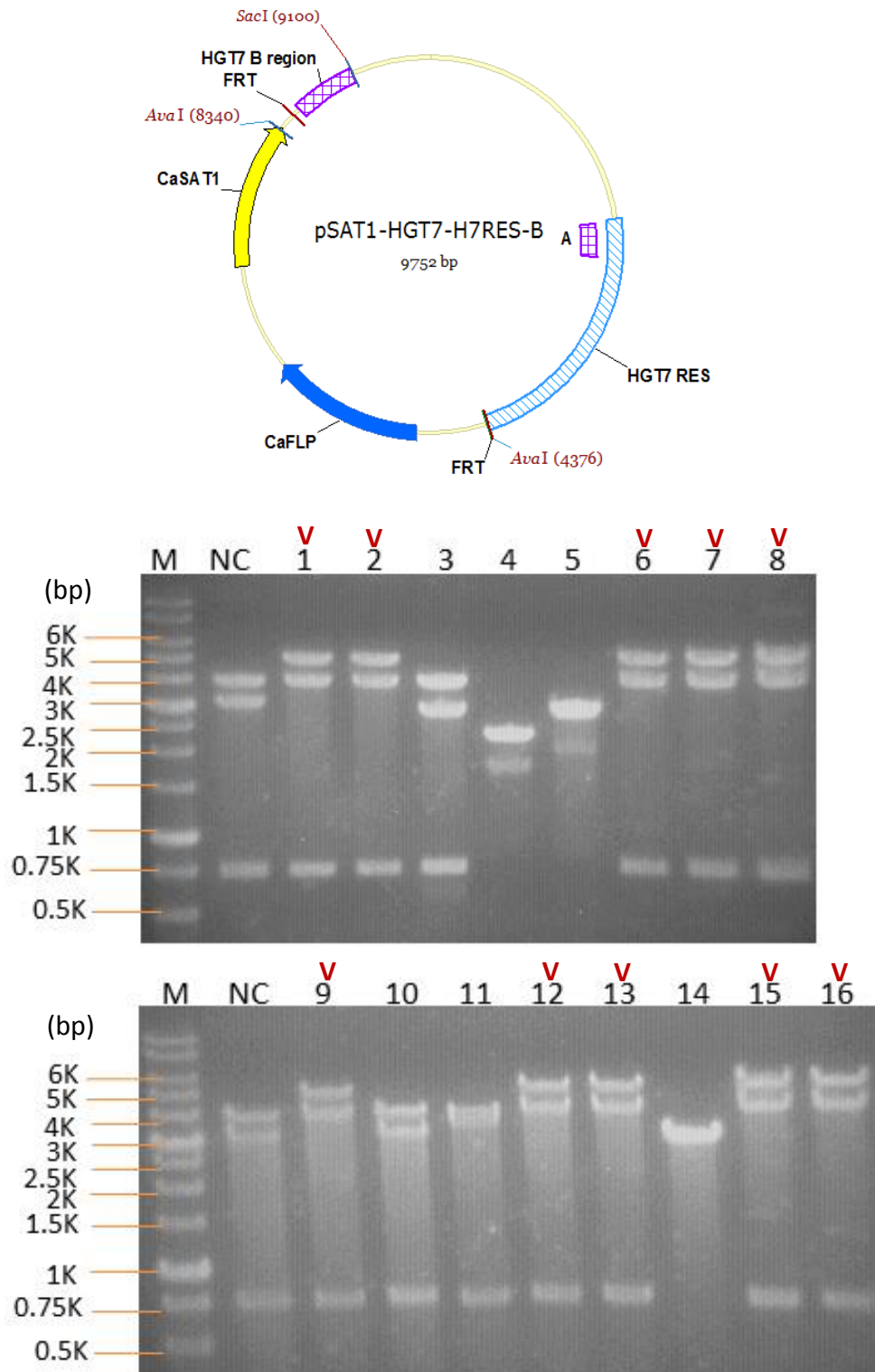
<C> 突變位置總表。



圖十二、以限制酶確認質體 pSAT1-HGT7-A 和 pSAT1-HGT7-AB。

<A> 以限制酶 *Spe* I 及 *Nco* I 作用於質體 pSAT1-HGT7-A。預期得到片段 3172 bp、2501 bp 和 1693 bp；NC 為 pSFS2-SAT1；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

**** 以限制酶 *Ava* I 及 *Sac* I 作用於質體 pSAT1-HGT7-AB。預期得到片段 3964 bp、3166 bp 及 760 bp；NC 為 pSAT1-HGT7-A；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。“x”：非符合預期之結果。



圖十三、以限制酶確認質體 pSAT1-HGT7-H7RES-B。

以限制酶 *AvaI* 及 *SacI* 作用於質體 pSAT1-HGT7-H7RES-B。預期得到片段 5028 bp、3964 bp 和 760 bp；NC 為 pSAT1-HGT7-AB；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。“v”：符合預期之結果。

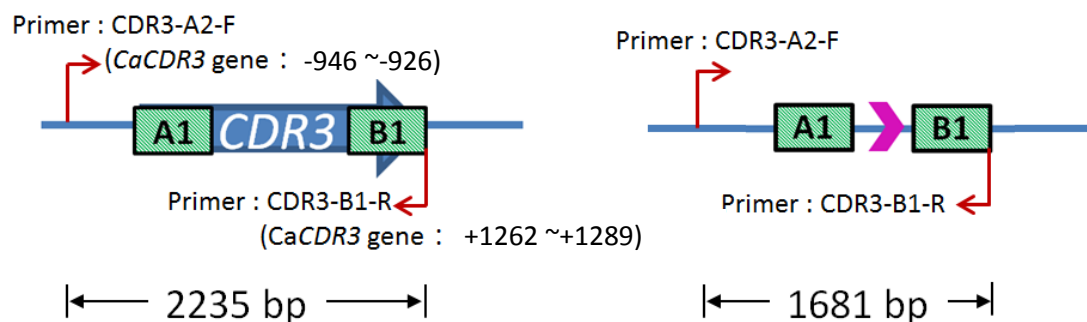


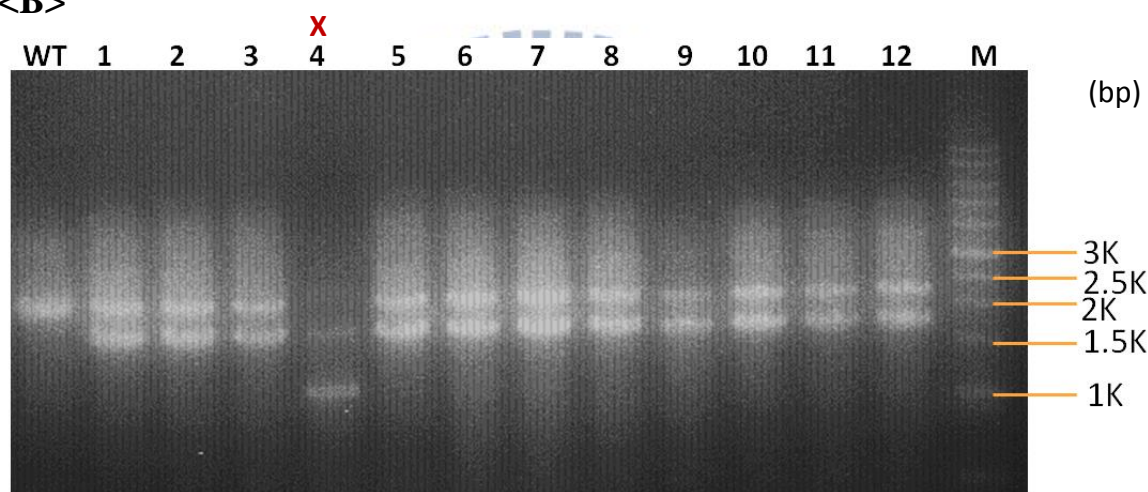
圖十四、質體 pSAT1-HGT7-H7RES-B 序列分析結果。

<A> 用於定序之引子 H7seq 1、H7seq 2、H7seq 3、H7seq 4 及 H7seq 5 之位置。

 定序之結果圖。

<A>



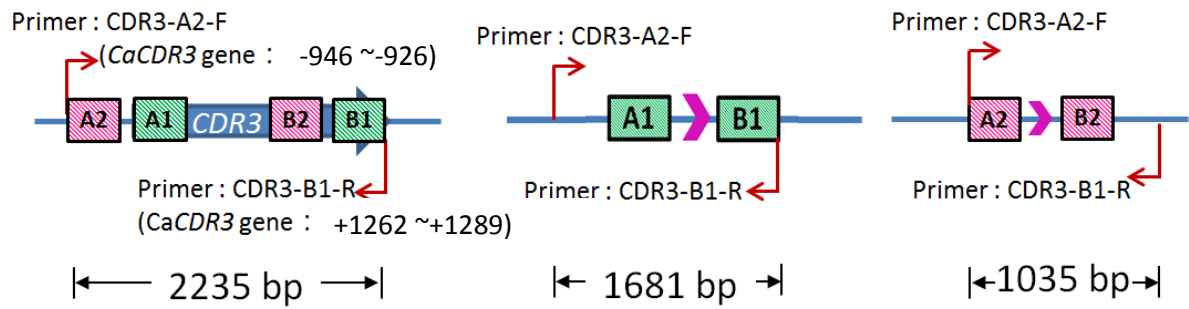


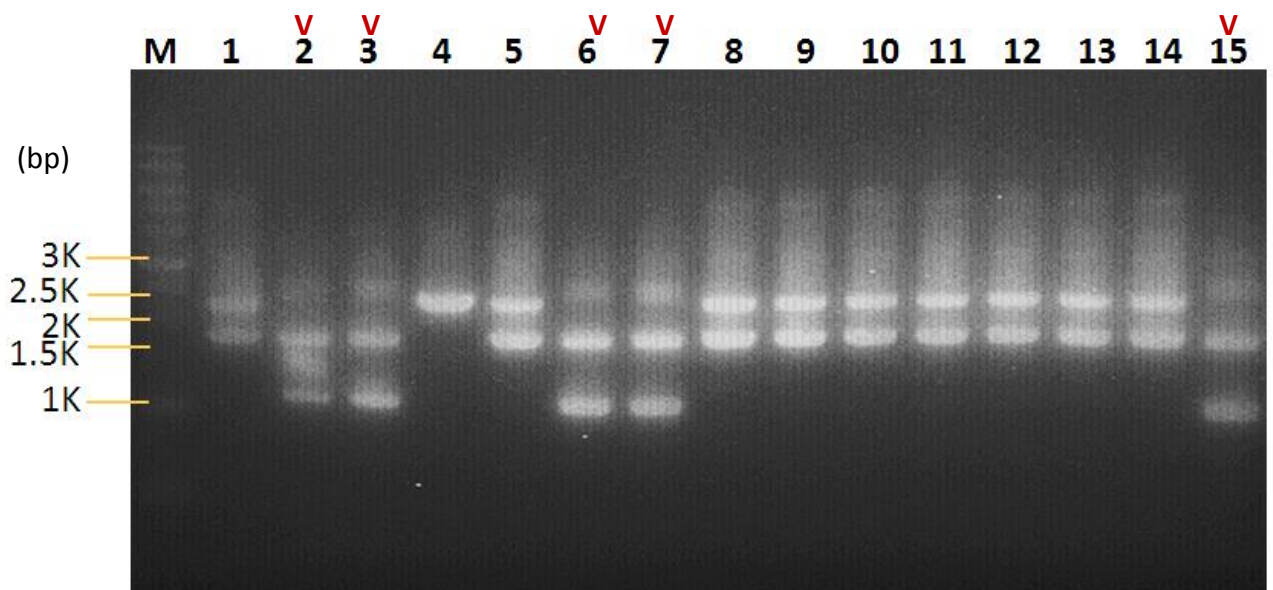
圖十五、以 PCR 確認 *CaCDR3* 單套基因剔除株。

<A> 以引子 CDR3-A2-F 和 CDR3-B1-R 進行 PCR 結果示意圖。Wild-type allele 預期得到片段 2235 bp；而利用 pSAT1-*CDR3*-A1B1 剔除基因並經過 pop-out 之 allele 預期得到片段 1681 bp。

 CaCDR3 單套基因剔除株之 PCR 確認結果。預期得到片段為 2235 bp 和 1681 bp；WT 為對照組野生株 SC5314；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。
“x”：非符合預期之結果。

<A>





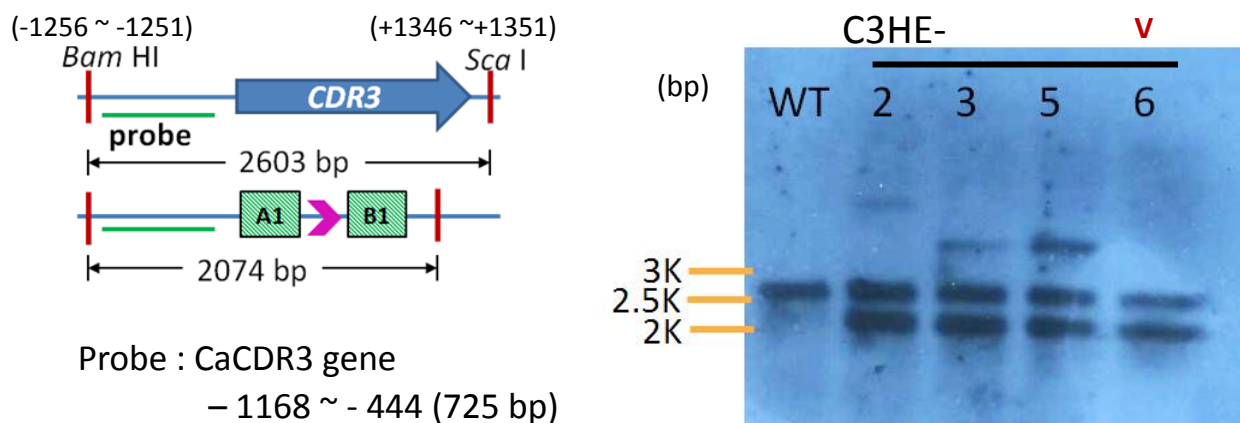
圖十六、以 PCR 確認 *CaCDR3* 雙套基因剔除株。

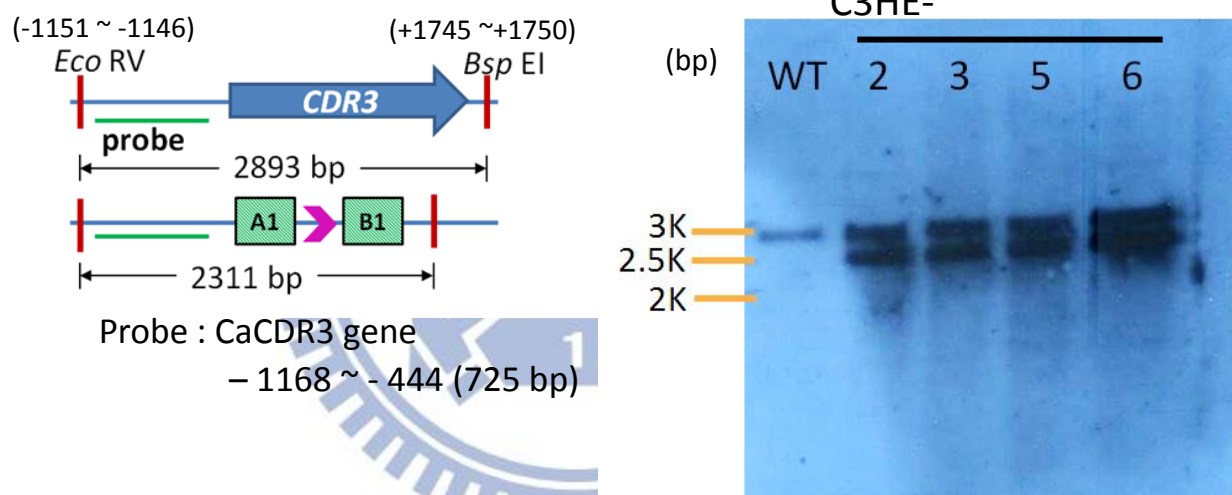
<A> 以引子 CDR3-A2-F 和 CDR3-B1-R 進行 PCR 結果示意圖。Wild-type allele 預期得到片段 2235 bp；利用 pSAT1-*CDR3*-A1B1 剔除基因並經過 pop-out 之 allele 預期得到片段 1681 bp；而利用 pSAT1-*CDR3*-A2B2 剔除基因並經過 pop-out 之 allele 預期得到片段 1035 bp。

 CaCDR3 雙套基因剔除株之 PCR 確認結果。預期得到片段為 1681 bp 和 1035 bp；WT 為對照組野生株 SC5314；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

“v”：符合預期之結果。

<A>



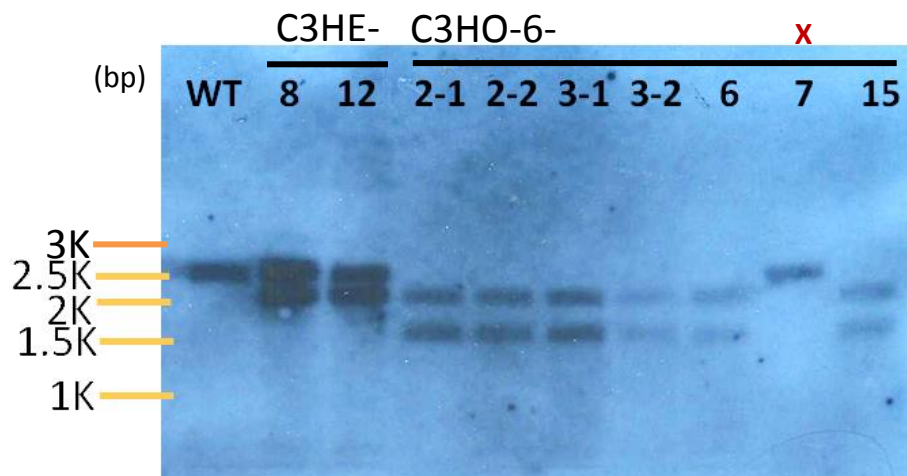
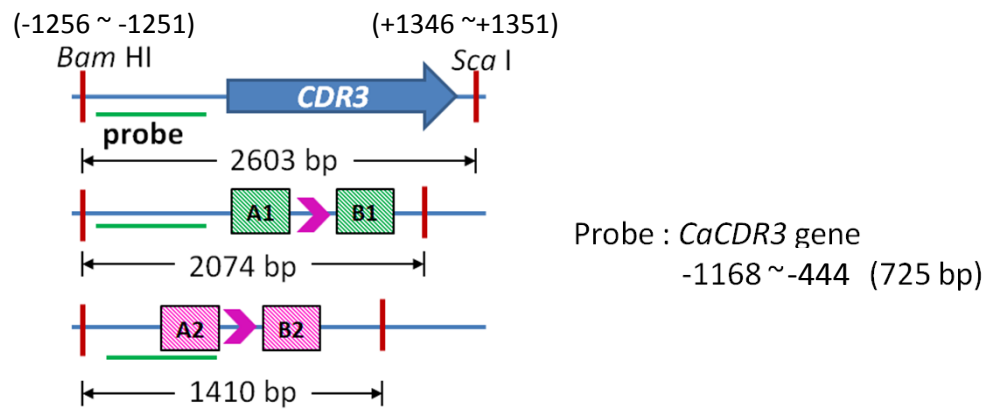


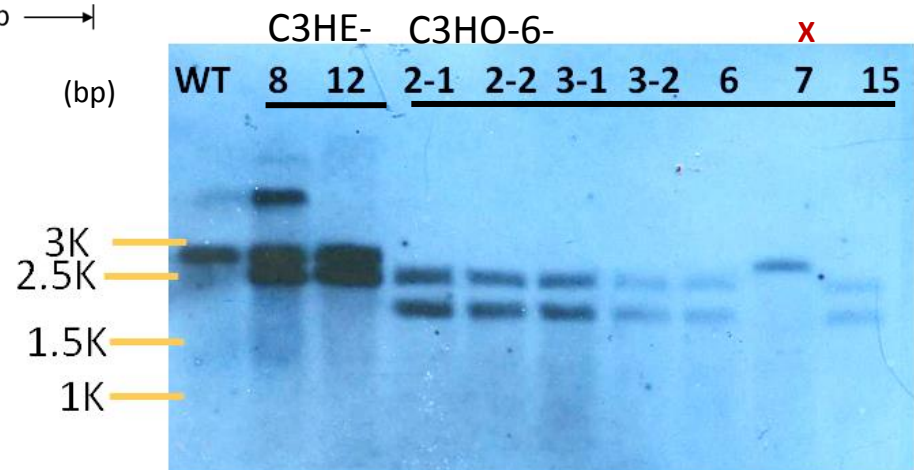
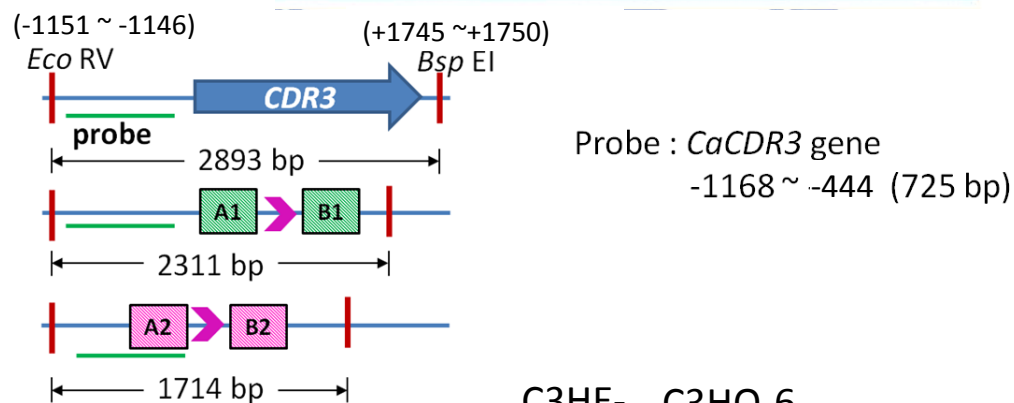
圖十七、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaCDR3* 單套基因突變株。

<A> 利用限制酵素 *Bam*HI 及 *Sca*I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Bam*HI 及 *Sca*I 作用位置；綠色底線代表探針位置。
CaCDR3 wild-type allele 預期可得片段 2603 bp；而利用 pSAT1-CDR3-A1B1 剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 2047 bp。
“v”：符合預期之結果。

 利用限制酵素 *Eco*R V 及 *Bsp*E I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Bam*HI 及 *Sca*I 作用位置；綠色底線代表探針位置。
CaCDR3 wild-type allele 預期可得片段 2893 bp；而利用 pSAT1-CDR3-A1B1 剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 2311 bp。

<A>



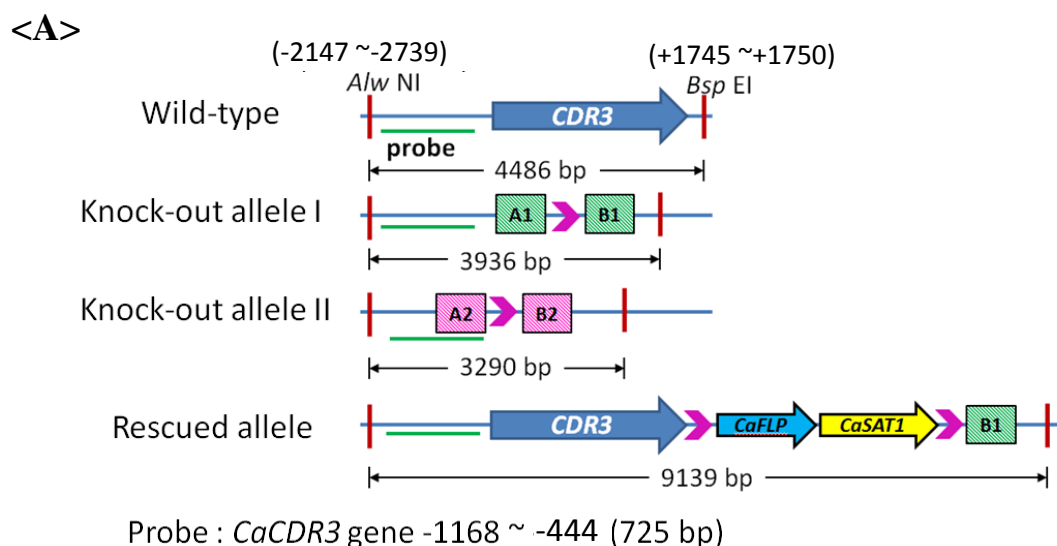


圖十八、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaCDR3* 單套及雙套基因突變株。

<A> 利用限制酵素 *Bam*H I 及 *Sca* I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Bam*H I 及 *Sca* I 作用位置；綠色底線代表探針位置。*CaCDR3* wild-type allele 預期可得片段 2603 bp；利用 pSAT1-*CDR3*-A1B1 剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 2047 bp；而利用 pSAT1-*CDR3*-A2B2 剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 1410 bp。Lane 1 及 Lane 2 為單套基因剔除株；Lane 3 ~ Lane 9 為雙套基因剔除株。

**** 利用限制酵素 *Eco*R V 及 *Bsp*E I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Eco*R V 及 *Bsp*E I 作用位置；綠色底線代表探針位置。*CaCDR3* wild-type allele 預期可得片段 2893 bp；利用 pSAT1-*CDR3*-A1B1 剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 2311 bp；而利用 pSAT1-*CDR3*-A2B2 剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 1714 bp。Lane 1 及 Lane 2 為單套基因剔除株；Lane 3 ~ Lane 9 為雙套基因剔除株。

“x”：非符合預期之結果。



圖十九、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaCDR3* 單套基因回復株。

<A> 利用限制酵素 *AlwNI* 及 *BspEI* 之南方點墨法示意圖。

紅色直線代表限制酶 *AlwNI* 及 *BspEI* 作用位置；綠色底線代表探針位置。

CaCDR3 wild-type allele 預期可得片段 4486 bp；利用 pSAT1-*CDR3*-A1B1

剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 3936 bp；利用 pSAT1-*CDR3*-A2B2

剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 3290 bp；而利用

pSAT1-*CDR3*-RESA1B1-B1 基因回復 allele 預期可得片段 9130 bp。

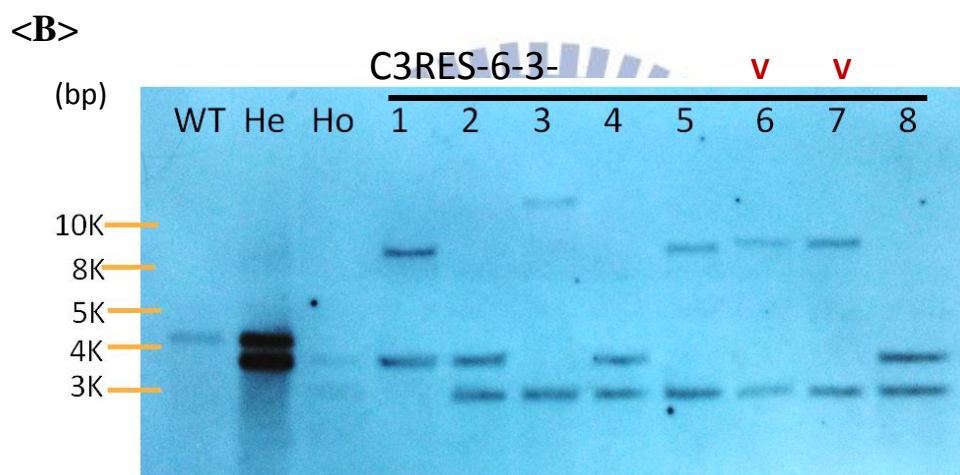
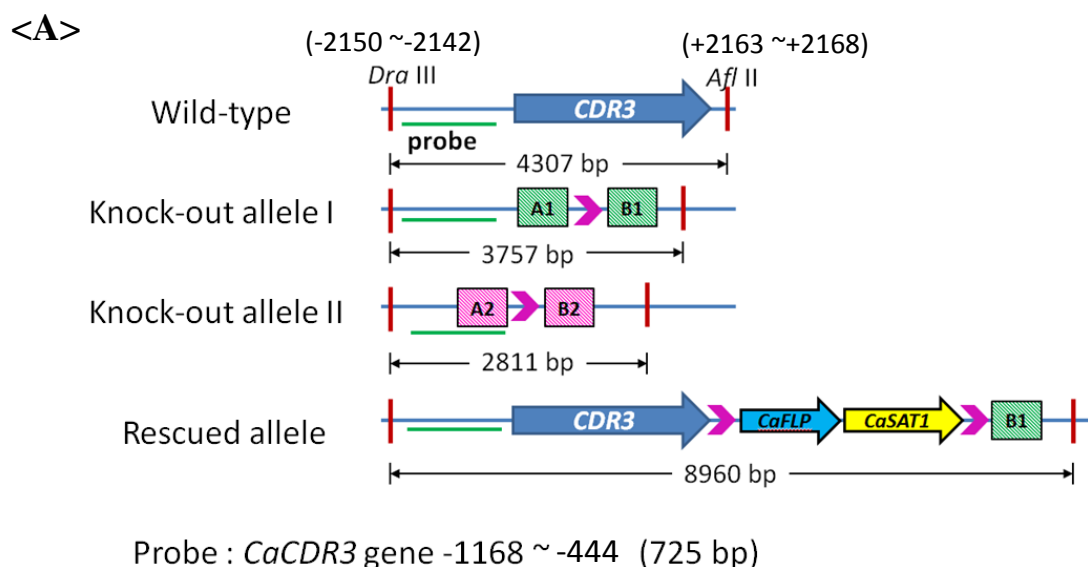
 利用限制酵素 *AlwNI* 及 *BspEI* 之南方點墨法結果圖。

WT 為野生株 wild-type 會得到 4486 bp 的片段；He 為單套剔除株，預

期有 4486 bp 及 3936 bp 的片段；Ho 為雙套剔除株，預期會有 3936 bp

及 3290 bp 的片段；然而基因回復株 Lane 1 ~ Lane 8 會得到 3290 bp 及

9139 bp 的片段。 “v”：符合預期之結果。



圖二十、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaCDR3* 單套基因回復株。

<A> 利用限制酵素 *Dra* III 及 *Afl* II 之南方點墨法示意圖。

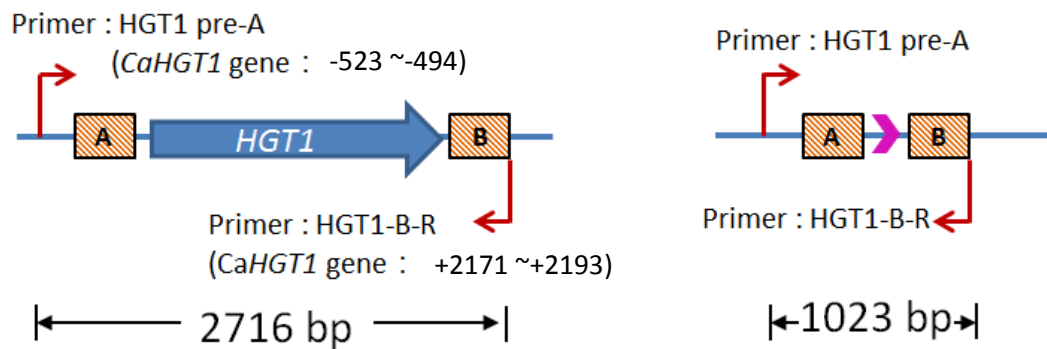
紅色直線代表限制酶 *Dra* III 及 *Afl* II 作用位置；綠色底線代表探針位置。

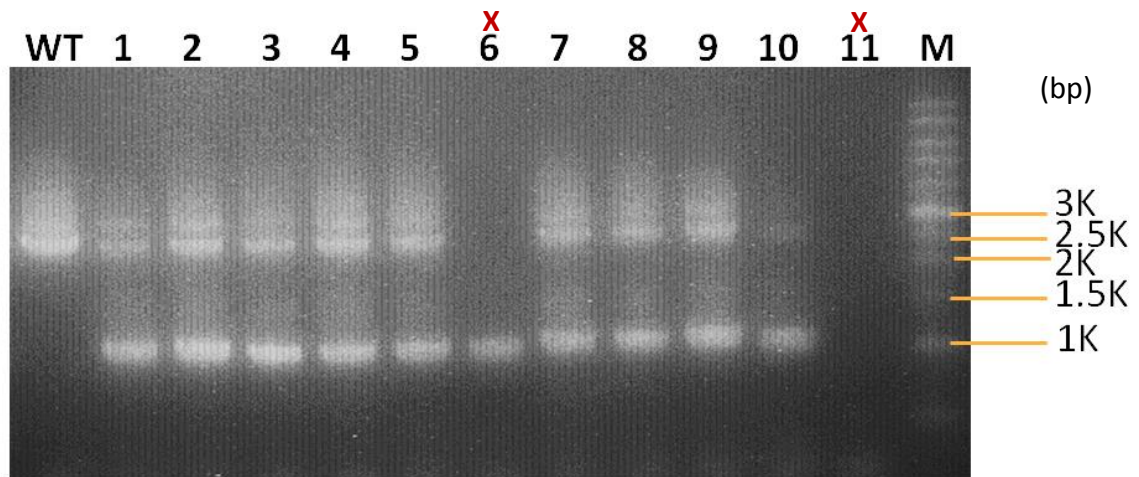
CaCDR3 wild-type allele 預期可得片段 4307 bp；利用 pSAT1-*CDR3*-A1B1 剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 3757 bp；利用 pSAT1-*CDR3*-A2B2 剔除 *CaCDR3* 之 allele 預期可得片段 2811 bp；而利用 pSAT1-*CDR3*-RESA1B1-B1 基因回復 allele 預期可得片段 8960 bp。

 利用限制酵素 *Dra* III 及 *Afl* II 之南方點墨法結果圖。

WT 為野生株 wild-type 會得到 4307 bp 的片段；He 為單套剔除株，預期有 4307 bp 及 3757 bp 的片段；Ho 為雙套剔除株，預期會有 3757 bp 及 2811 bp 的片段；然而基因回復株 Lane 1 ~ Lane 8 會得到 2811 bp 及 8960 bp 的片段。 “v”：符合預期之結果。

<A>



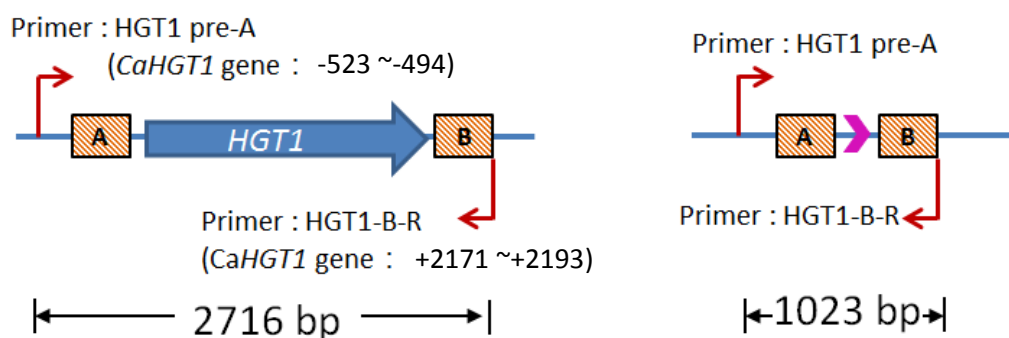


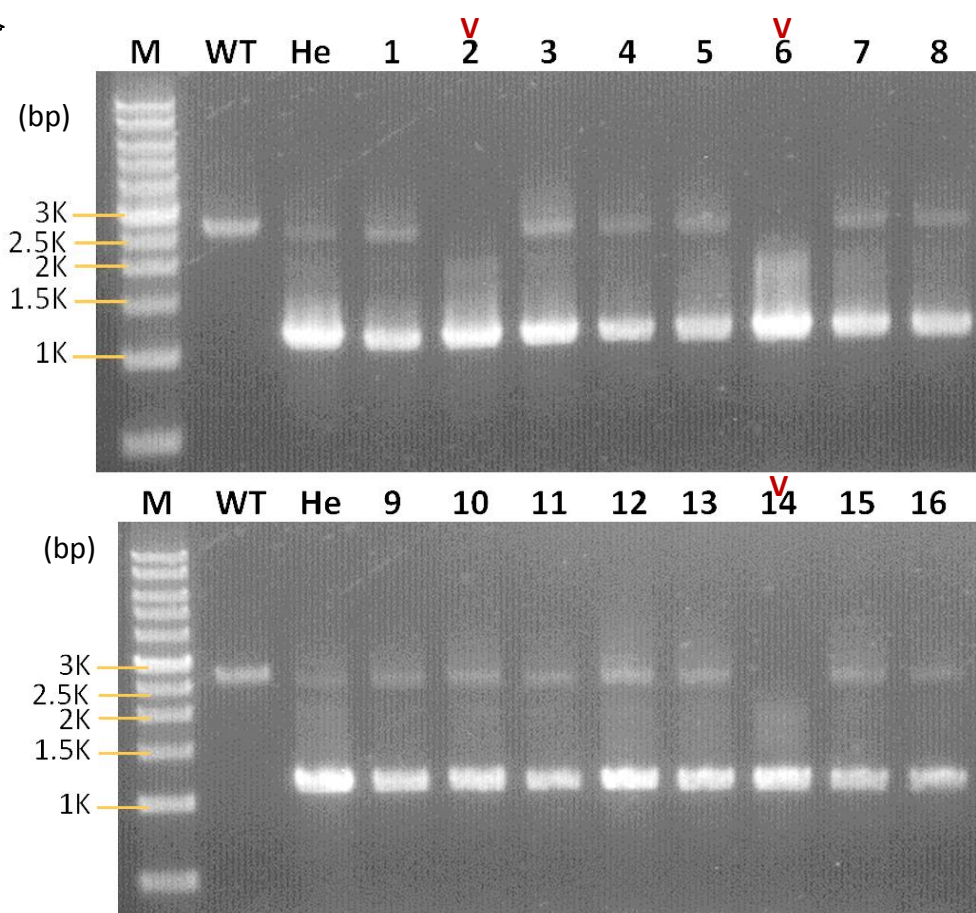
圖二十一、以 PCR 確認 *CaHGT1* 單套基因剔除株。

<A> 以引子 HGT1 pre-A 和 HGT1-B-R 進行 PCR 結果示意圖。Wild-type allele 預期得到片段 2716 bp；而利用 pSAT1-*HGT1*-AB 剔除基因並經過 pop-out 之 allele 預期得到片段 1023 bp。

 CaHGT1 單套基因剔除株之 PCR 確認結果。預期得到片段為 2716 bp 和 1023 bp；WT 為對照組野生株 SC5314；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。
“x”：非符合預期之結果。

<A>



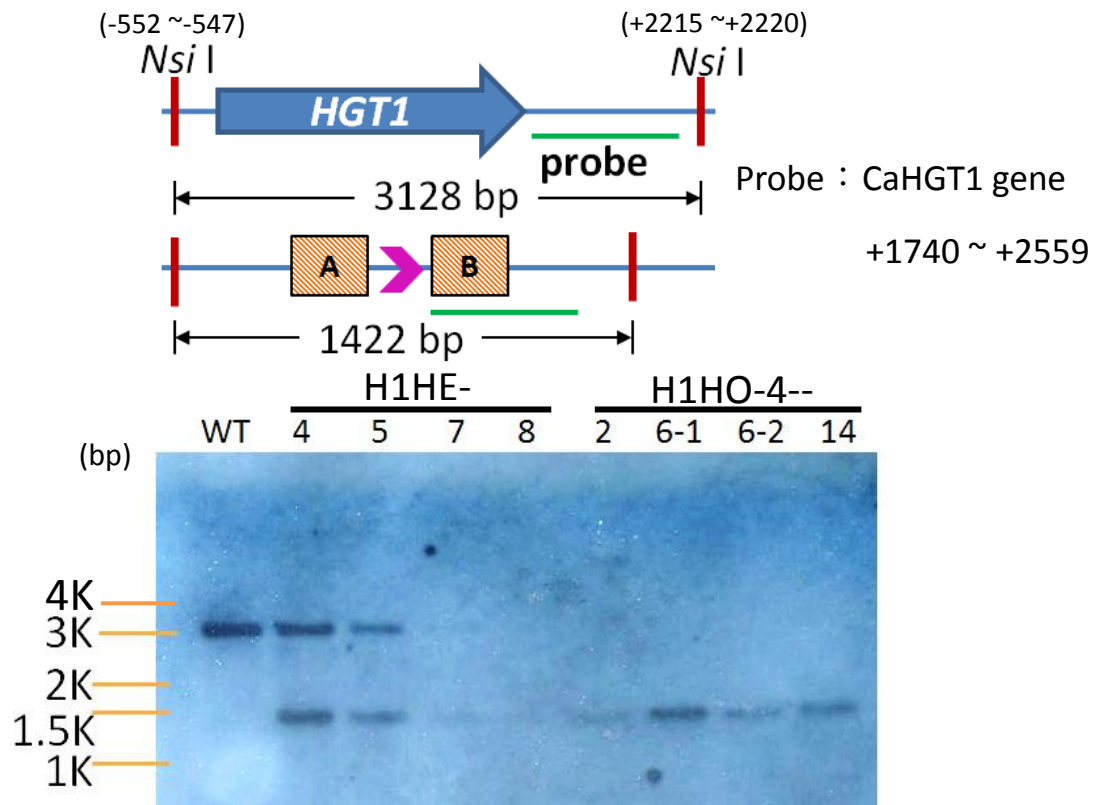


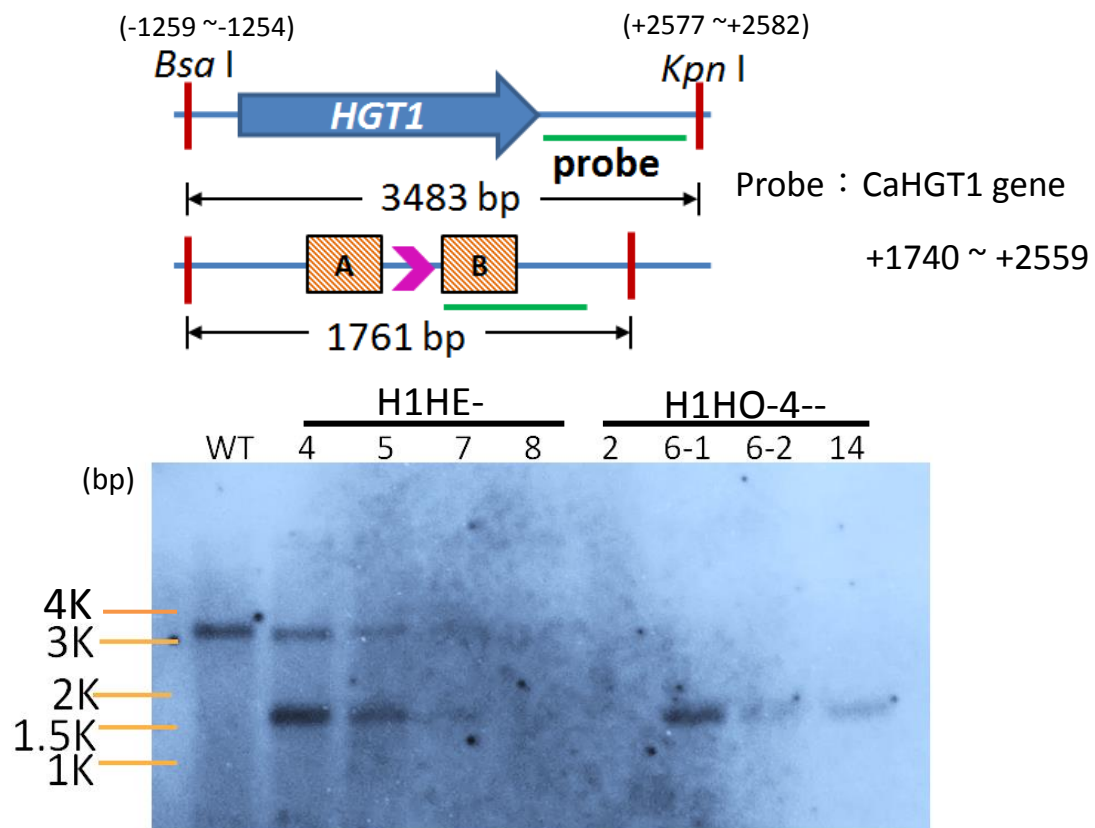
圖二十二、以 PCR 確認 *CaHGT1* 雙套基因剔除株。

<A> 以引子 HGT1 pre-A 和 HGT1-B-R 進行 PCR 結果示意圖。Wild-type allele 預期得到片段 2716 bp；而利用 pSAT1-*HGT1*-AB 剔除基因並經過 pop-out 之 allele 預期得到片段 1023 bp。

 CaHGT1 雙套基因剔除株之 PCR 確認結果。預期得到片段為 1023 bp；WT 為對照組野生株 SC5314；He 為單套基因剔除株；而 Lane M 為 1 Kbp DNA marker。 “v”：符合預期之結果。

<A>

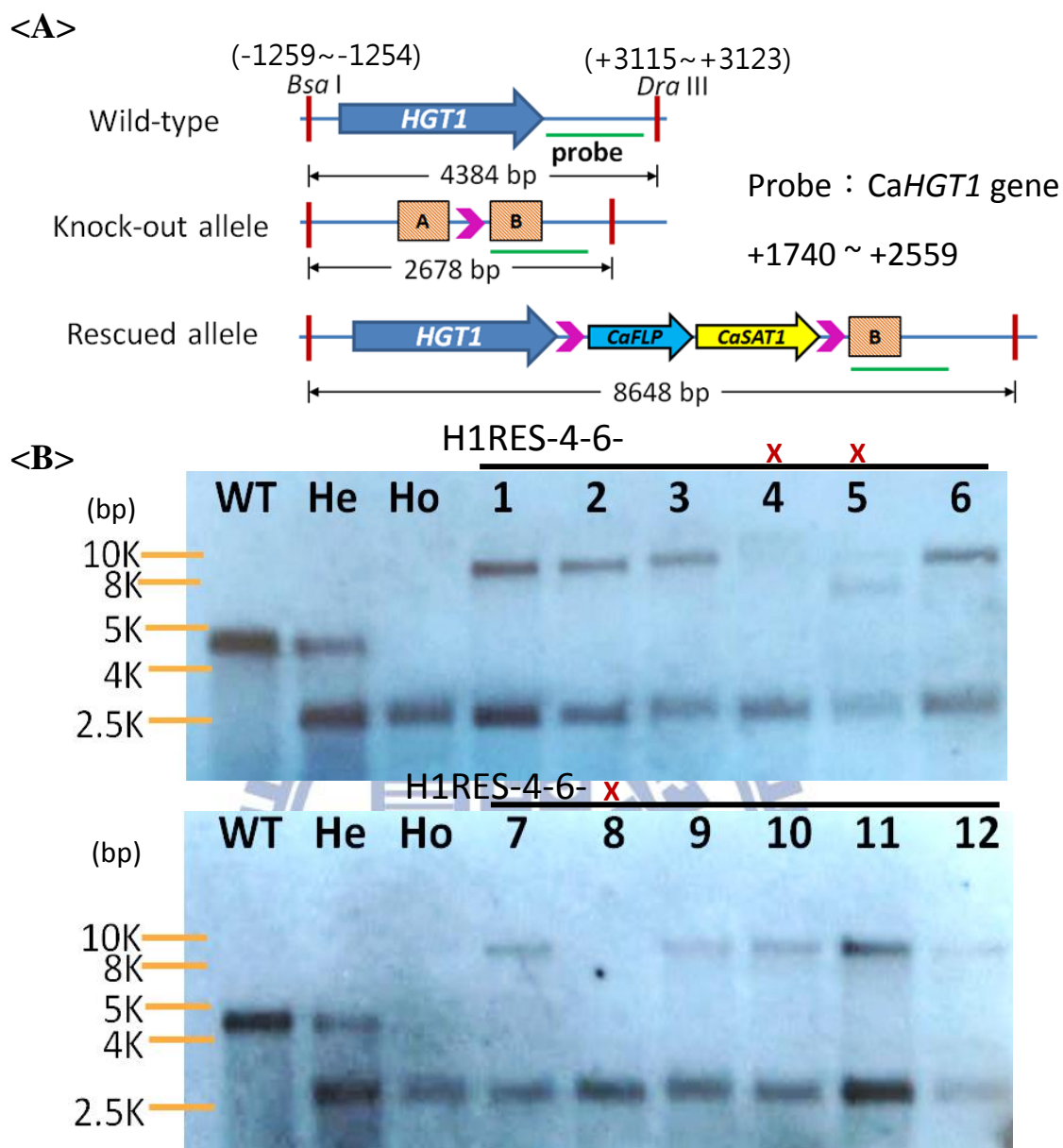




圖二十三、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT1* 單套及雙套基因突變株。

<A> 利用限制酵素 *Nsi* I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Nsi* I 作用位置；綠色底線代表探針位置。*CaHGT1* wild-type allele 預期可得片段 3128 bp；利用 pSAT1-*HGT1*-AB 剔除 *CaHGT1* 之 allele 預期可得片段 1422 bp。Lane 1：WT 為野生株 SC5314；Lane 2~5 為單套基因剔除株而 Lane 6~9 為雙套基因剔除株。

**** 利用限制酵素 *Bsa* I 及 *Kpn* I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Bsa* I 及 *Kpn* I 作用位置；綠色底線代表探針位置。*CaHGT1* wild-type allele 預期可得片段 3483 bp；利用 pSAT1-*HGT1*-AB 剔除 *CaHGT1* 之 allele 預期可得片段 1761 bp。Lane 1：WT 為野生株 SC5314；Lane 2~5 為單套基因剔除株而 Lane 6~9 為雙套基因剔除株。



圖二十四、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT1* 單套基因回復株。

<A> 利用限制酵素 *Bsa* I 及 *Dra* III 之南方點墨法示意圖。

紅色直線代表限制酶 *Bsa* I 及 *Dra* III 切位；綠色底線代表探針位置。

CaHGT1 wild-type allele 預期可得片段 4384 bp；利用 pSAT1-*HGT1*-AB

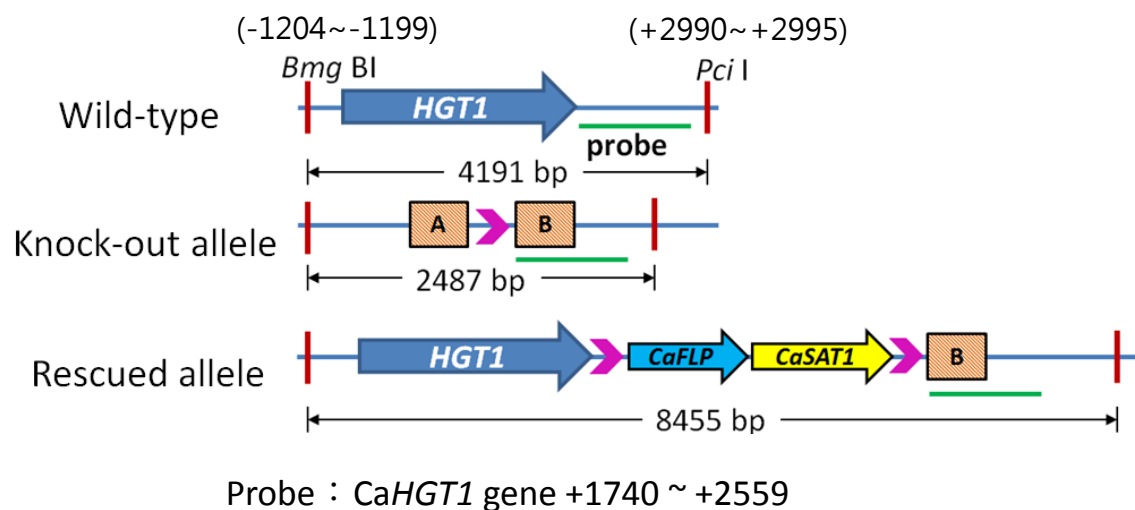
剔除 *CaHGT1* 之 allele 預期可得片段 2678 bp；而利用

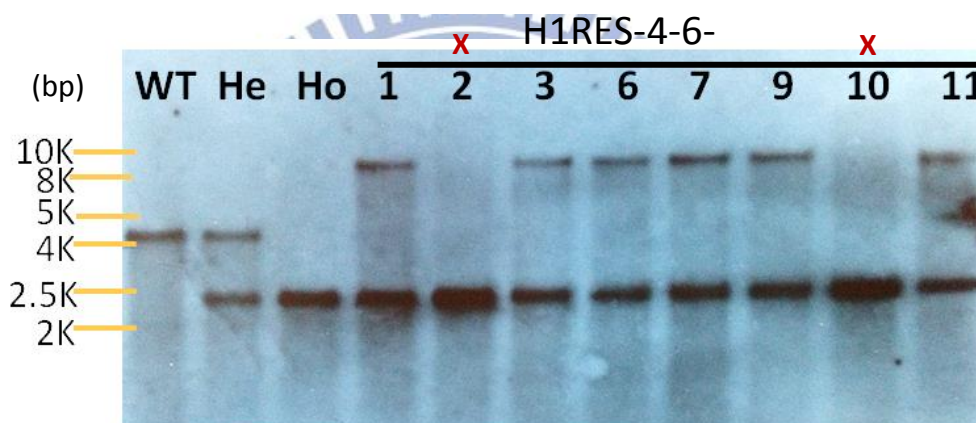
pSAT1-*HGT1*-H1RES-B 基因回復 allele 預期可得片段 8648 bp。

**** 利用限制酵素 *Bsa* I 及 *Dra* III 之南方點墨法結果圖。

WT 為野生株 wild-type 會得到 4384 bp 的片段；He 為單套剔除株，預期有 4384 bp 及 2678 bp 的片段；Ho 為雙套剔除株，預期會有 2678 bp 的片段；然而基因回復株 strain 1 ~ 12 會得到 2678 bp 及 8648 bp 的片段。

<A>





圖二十五、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT1* 單套基因回復株。

<A> 利用限制酵素 *BmgBI* 及 *PciI* 之南方點墨法示意圖。

紅色直線代表限制酶 *BmgBI* 及 *PciI* 作用位置；綠色底線代表探針位置。

CaHGT1 wild-type allele 預期可得片段 4191 bp；利用 pSAT1-*HGT1*-AB

剔除 *CaHGT1* 之 allele 預期可得片段 2478 bp；而利用

pSAT1-*HGT1*-H1RES-B 基因回復 allele 預期可得片段 8455 bp。

 利用限制酵素 *BmgBI* 及 *PciI* 之南方點墨法結果圖。

WT 為野生株 wild-type 會得到 4191 bp 的片段；He 為單套剔除株，預

期有 4191 bp 及 2478 bp 的片段；Ho 為雙套剔除株，預期會有 2678 bp 的

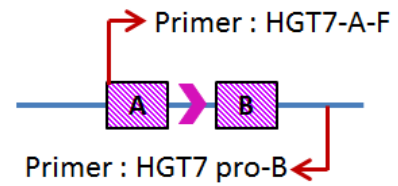
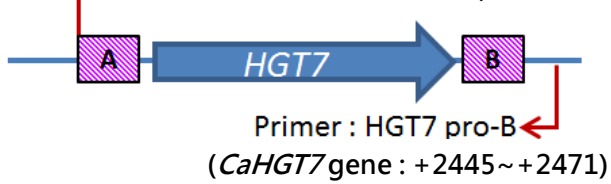
片段；然而基因回復株會得到 2478 bp 及 8455 bp 的片段。

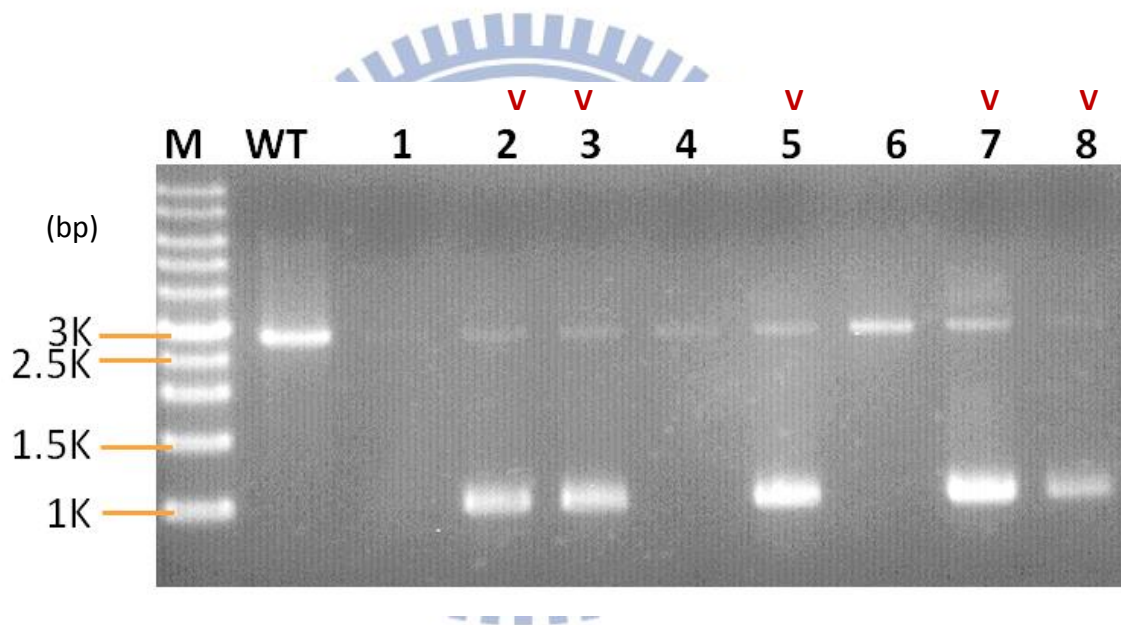
“x”：非符合預期之結果。

<A>

Primer : HGT7-A-F

(*CaHGT7* gene : -460~-438)



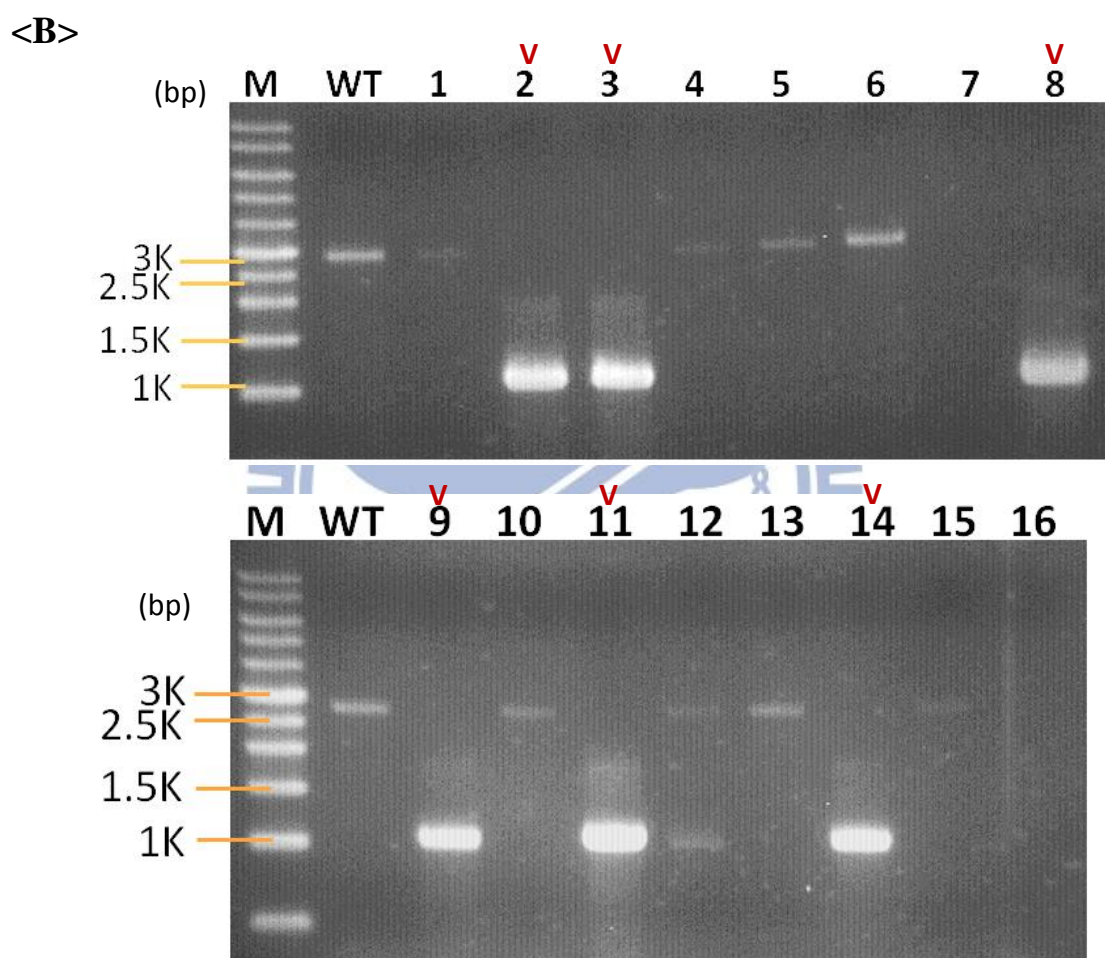
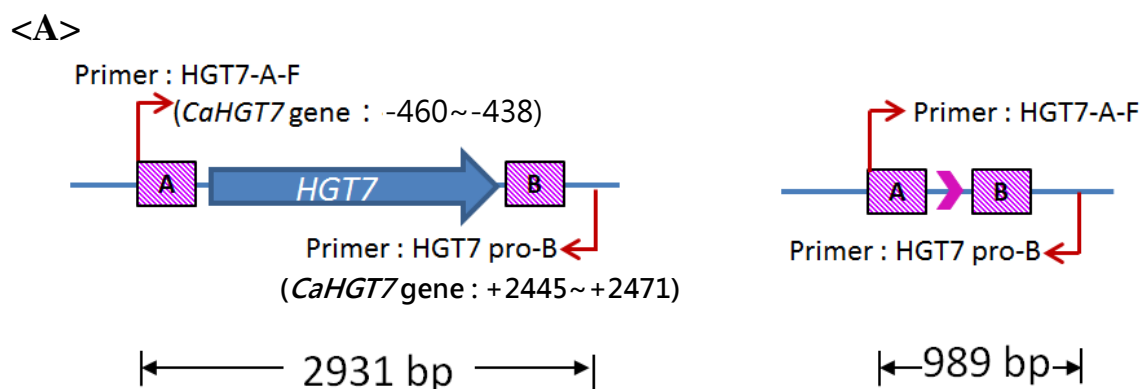


圖二十六、以 PCR 確認 *CaHGT7* 單套基因剔除株。

<A> 以引子 HGT7-A-F 和 HGT7 pro-B 進行 PCR 結果示意圖。Wild-type allele 預期得到片段 2931 bp；而利用 pSAT1-*HGT7*-AB 剔除基因並經過 pop-out 之 allele 預期得到片段 989 bp。

 CaHGT7 單套基因剔除株之 PCR 確認結果。預期得到片段為 2931 bp 和 989 bp；WT 為對照組野生株 SC5314；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

“v”：符合預期之結果。



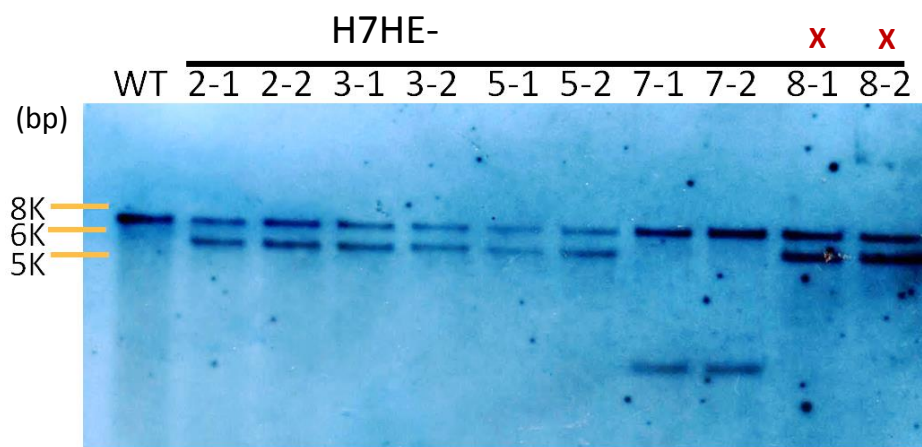
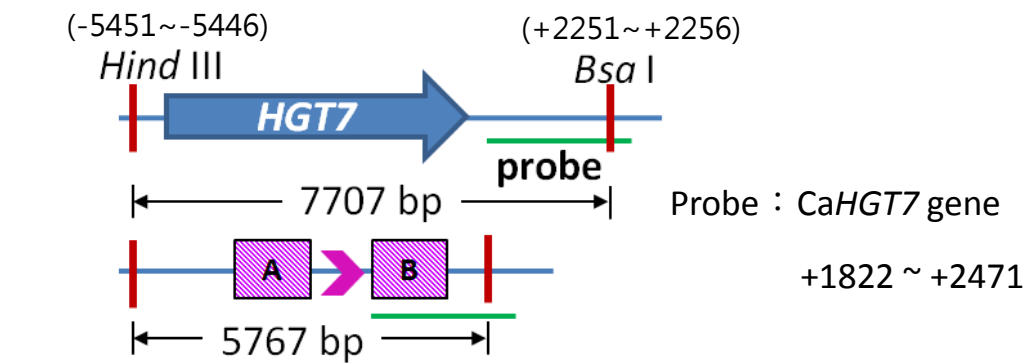
圖二十七、以 PCR 確認 *CaHGT7* 雙套基因剔除株。

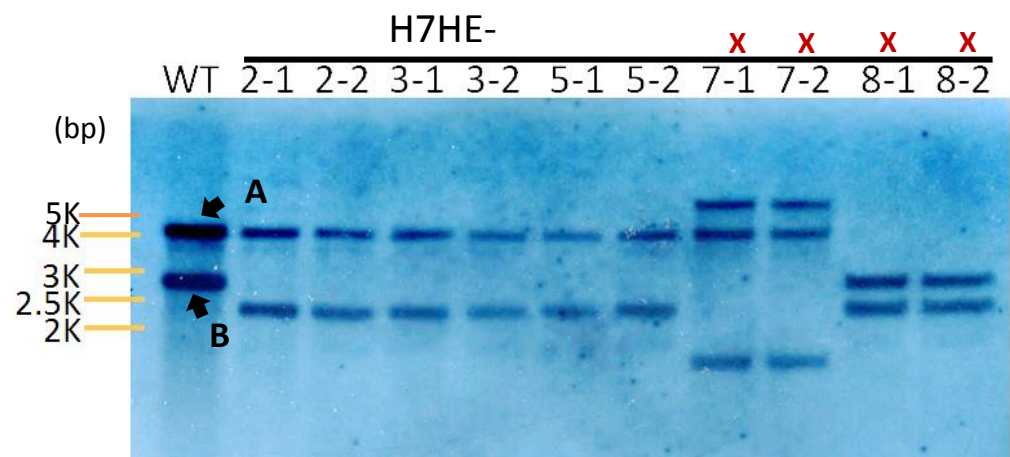
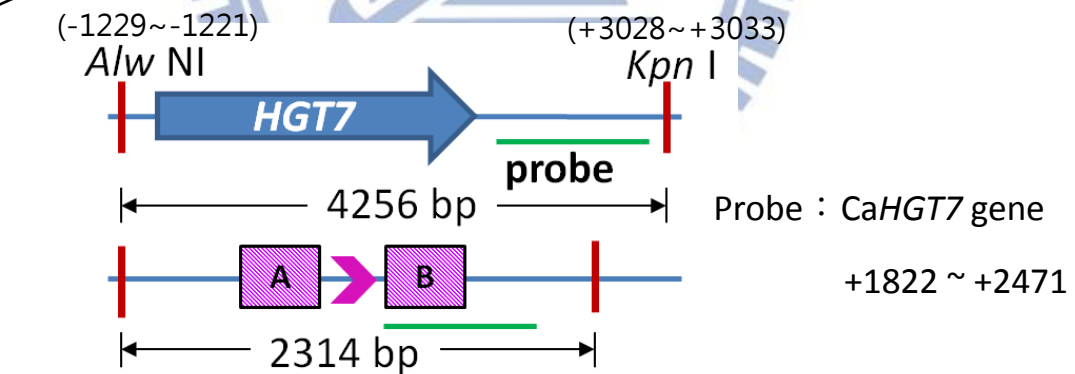
<A> 以引子 HGT7-A-F 和 HGT7 pro-B 進行 PCR 結果示意圖。Wild-type allele 預期得到片段 2931 bp；而利用 pSAT1-*HGT7*-AB 剔除基因並經過 pop-out 之 allele 預期得到片段 989 bp。

 CaHGT7 雙套基因剔除株之 PCR 確認結果。預期得到片段為 989 bp；WT 為對照組野生株 SC5314；Lane M 為 1 Kbp DNA marker。

“v”：符合預期之結果。 “x”：非符合預期之結果。

<A>





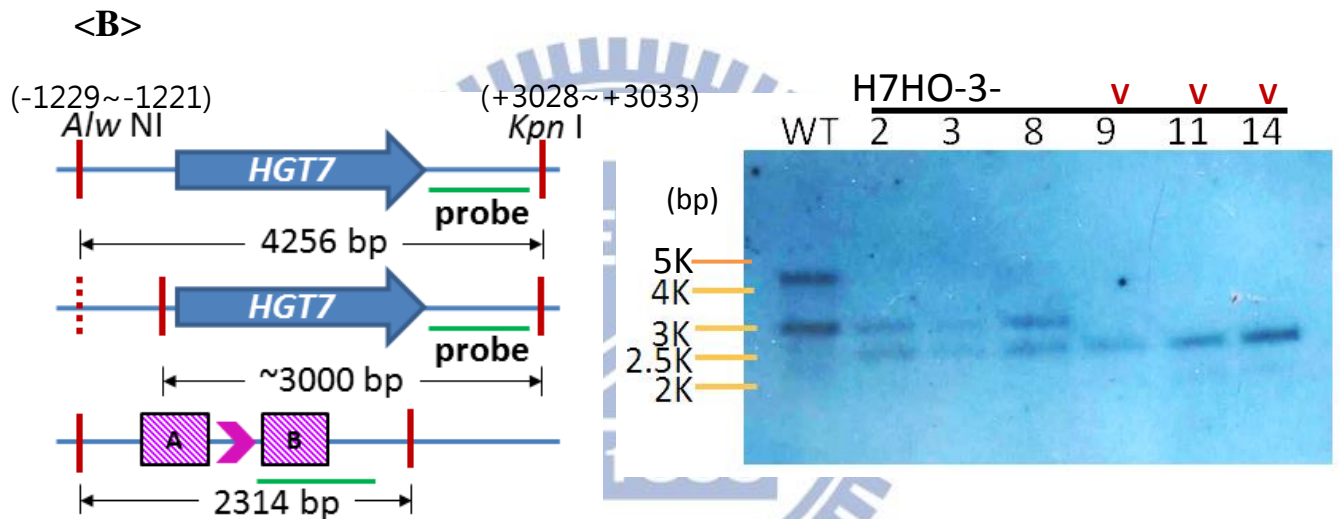
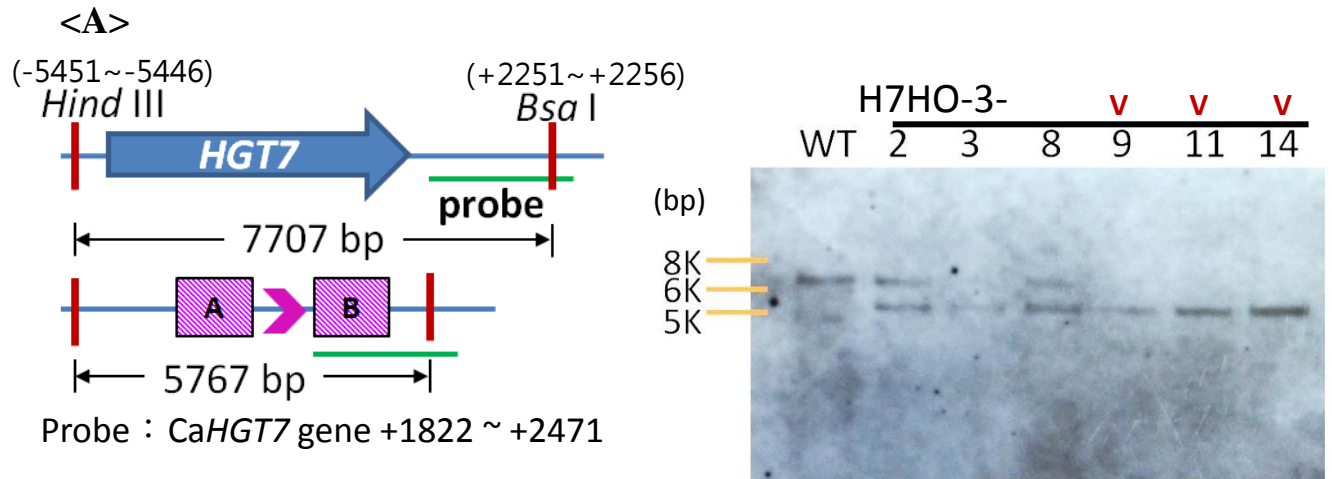
圖二十八、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT7* 單套基因突變株。

<A> 利用限制酵素 *Hind* III 及 *Bsa* I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Hind* III 及 *Bsa* I 作用位置；綠色底線代表探針位置。*CaHGT7* wild-type allele 預期可得片段 7707 bp；利用 pSAT1-*HGT7*-AB 剔除 *CaHGT7* 之 allele 預期可得片段 5767 bp。WT 為野生株 SC5314。

**** 利用限制酵素 *Alw*NI 及 *Kpn* I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Alw*NI 及 *Kpn* I 作用位置；綠色底線代表探針位置。*CaHGT7* wild-type allele 預期可得片段 4256 bp；利用 pSAT1-*HGT7*-AB 剔除 *CaHGT7* 之 allele 預期可得片段 2314 bp。WT 為野生株 SC5314。

“x”：非符合預期之結果。





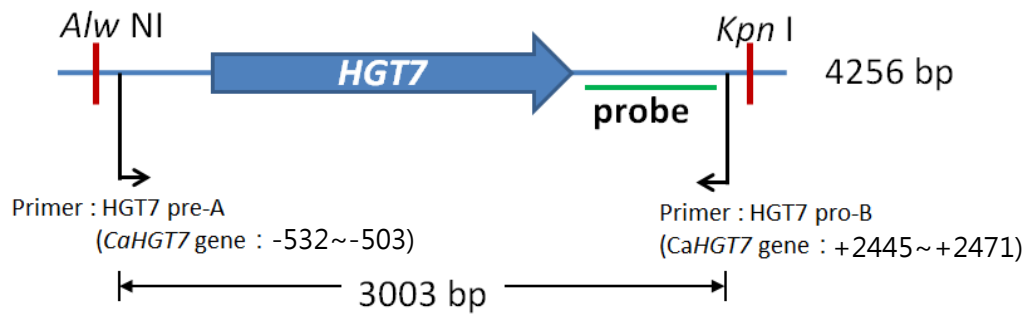
Probe : CaHGT7 gene +1822 ~ +2471

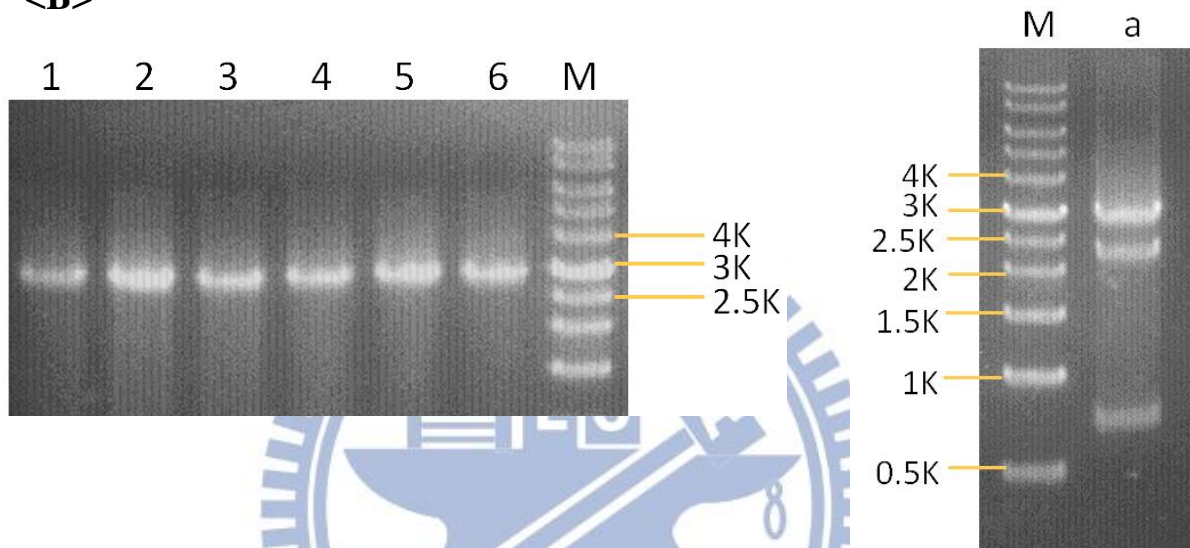
圖二十九、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT7* 雙套基因突變株。

<A> 利用限制酵素 *Hind* III 及 *Bsa* I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Hind* III 及 *Bsa* I 作用位置；綠色底線代表探針位置。*CaHGT7* wild-type allele 預期可得片段 7707 bp；利用 pSAT1-*HGT7*-AB 剔除 *CaHGT7* 之 allele 預期可得片段 5767 bp。WT 為野生株 SC5314。

 利用限制酵素 *Alw*NI 及 *Kpn* I 之南方點墨法示意圖及結果圖。紅色直線代表限制酶 *Alw*NI 及 *Kpn* I 作用位置；綠色底線代表探針位置。*CaHGT7* wild-type allele 預期可得片段 4256 bp；利用 pSAT1-*HGT7*-AB 剔除 *CaHGT7* 之 allele 預期可得片段 2314 bp。WT 為野生株 SC5314。
“v”：符合預期之結果。

<A>

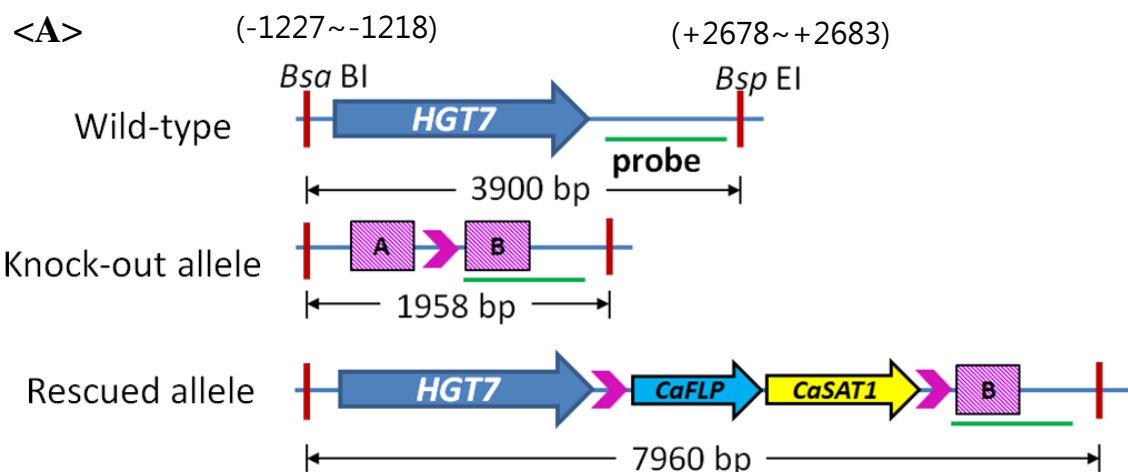




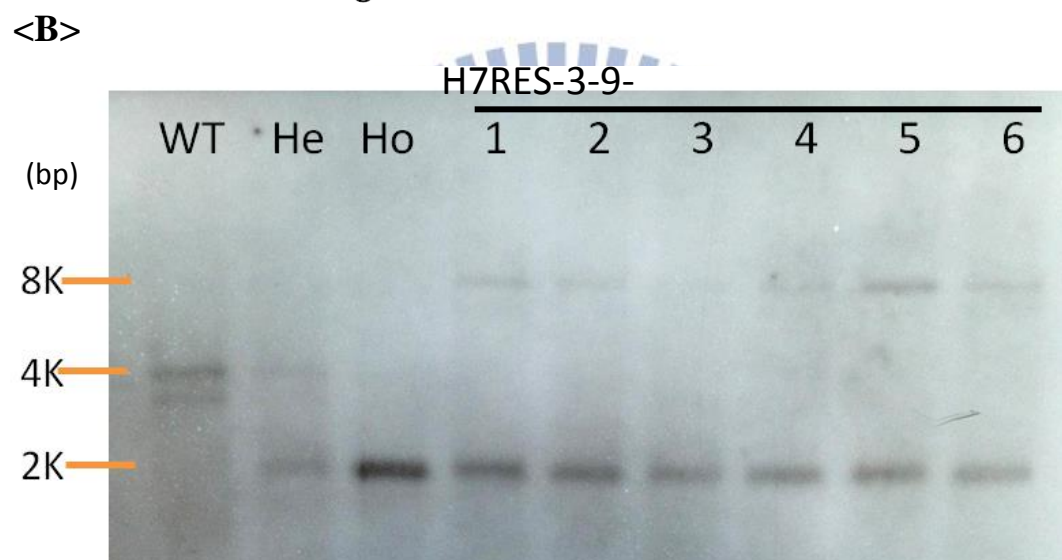
圖三十、白色念珠菌 *CaHGT7* 兩股 allele 限制酶酵素切位之確認。

<A> 利用引子 HGT7 pre-A 及 HGT pro-B 以 SC5314 作為模坂做 PCR 得到 3003 bp 的片段後利用限制酶酵素 *A/wNI* 及 *Kpn I* 作用處理。

 左圖的 PCR 後電泳圖可看到有得到符合預期在 3 Kbp 處的單一片段，將此片段純化之後利用限制酶酵素 *A/wNI* 及 *Kpn I* 作用處理後跑膠，結果如右圖所示，得到三個片段分別為 3 Kbp、~2.3 Kbp 及 ~750 bp，由此結果推斷此基因之兩股 allele 序列有些許差異，其中一個 allele 可被限制酵素作用變成兩個較小片段



Probe : *CaHGT7* gene +1822 ~ +2471



圖三十一、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT7* 單套基因回復株。

<A> 利用限制酵素 *Bsa*B I 及 *Bsp*E I 之南方點墨法示意圖。

紅色直線代表限制酶 *Bsa*B I 及 *Bsp*E I 作用位置；綠色底線代表探針位置。

CaHGT7 wild-type allele 預期可得片段 3900 bp；利用 pSAT1-*HGT7*-AB

剔除 *CaHGT7* 之 allele 預期可得片段 1958 bp；而利用

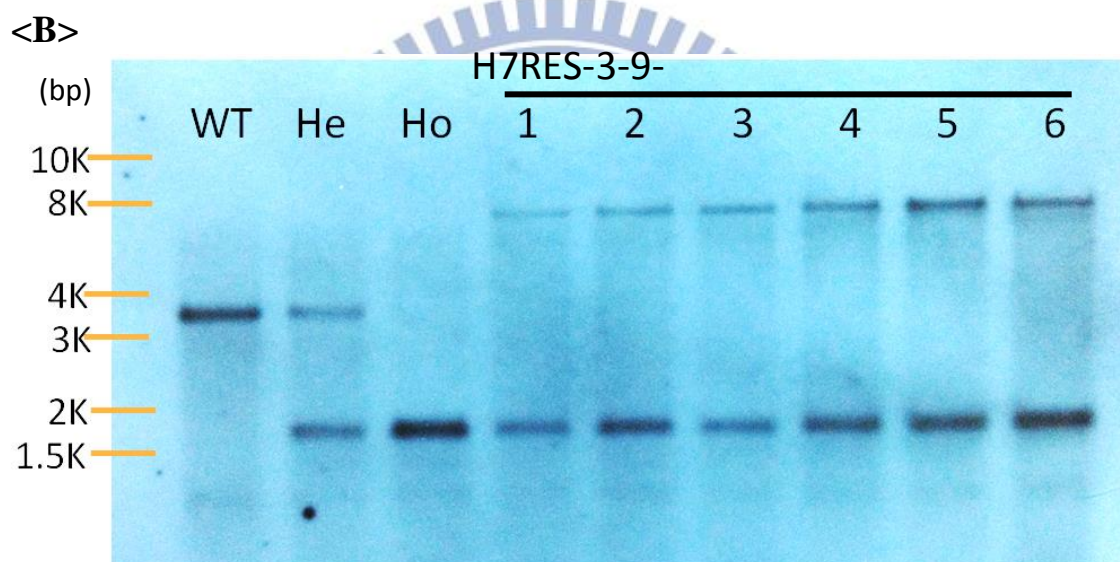
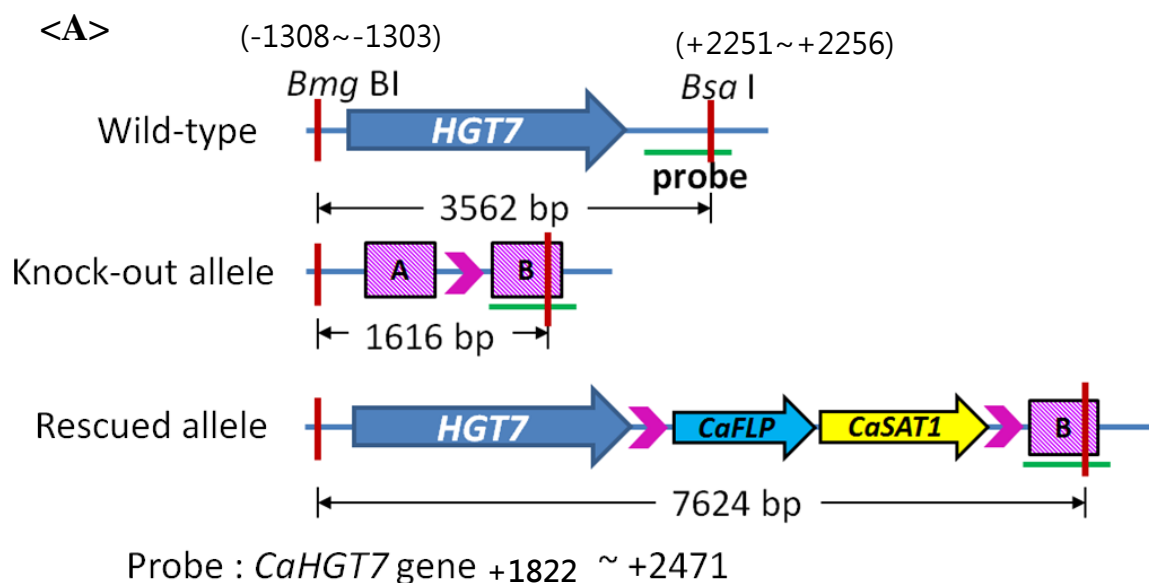
pSAT1-*HGT7*-H7RES-B 基因回復 allele 預期可得片段 7960 bp。

 利用限制酵素 *Bsa*B I 及 *Bsp*E I 之南方點墨法結果圖。

WT 為野生株 wild-type 會得到 3900 bp 的片段；He 為單套剔除株，預

期有 3900 bp 及 1985 bp 的片段；Ho 為雙套剔除株，預期會有 1985 bp 的

片段；然而基因回復株會得到 1985 bp 及 7960 bp 的片段。



圖三十二、南方點墨法 (Southern blot) 檢驗 *CaHGT7* 單套基因回復株。

<A> 利用限制酵素 *BmgBI* 及 *BsaI* 之南方點墨法示意圖。

紅色直線代表限制酶 *BmgBI* 及 *BsaI* 作用位置；綠色底線代表探針位置。

CaHGT7 wild-type allele 預期可得片段 3562 bp；利用 pSAT1-*HGT7*-AB

剔除 *CaHGT7* 之 allele 預期可得片段 1616 bp；而利用

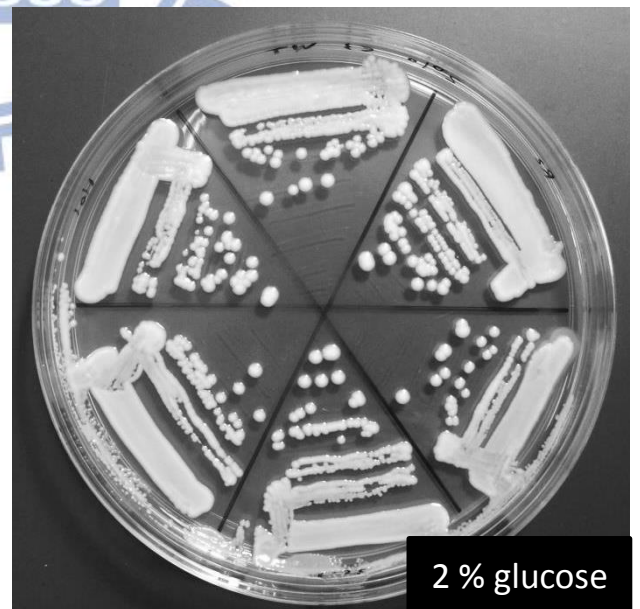
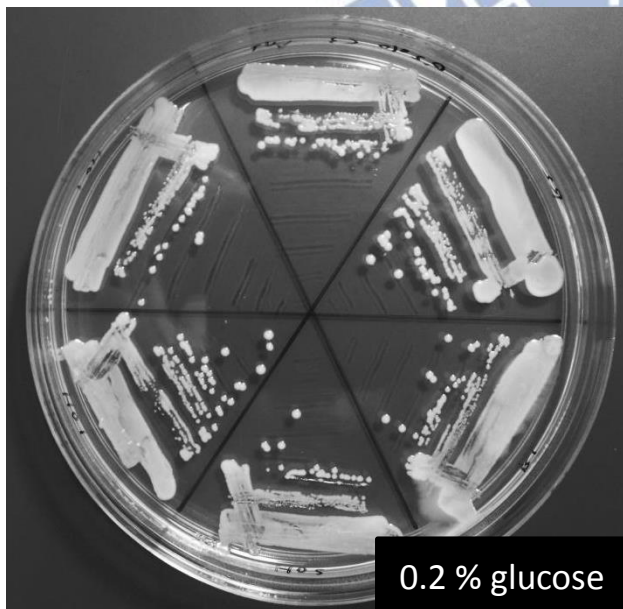
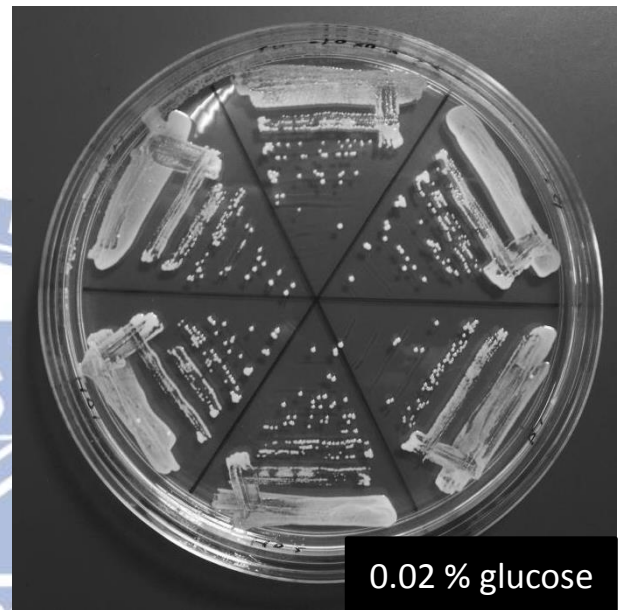
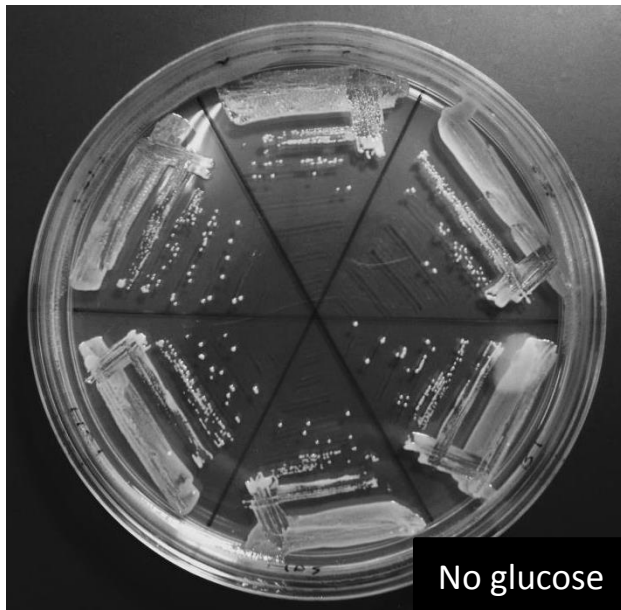
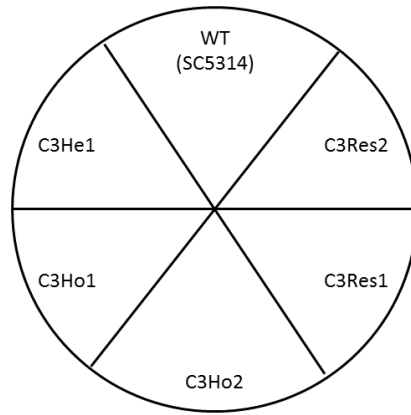
pSAT1-*HGT7*-H7RES-B 基因回復 allele 預期可得片段 7624 bp。

 利用限制酵素 *BmgBI* 及 *BsaI* 之南方點墨法結果圖。

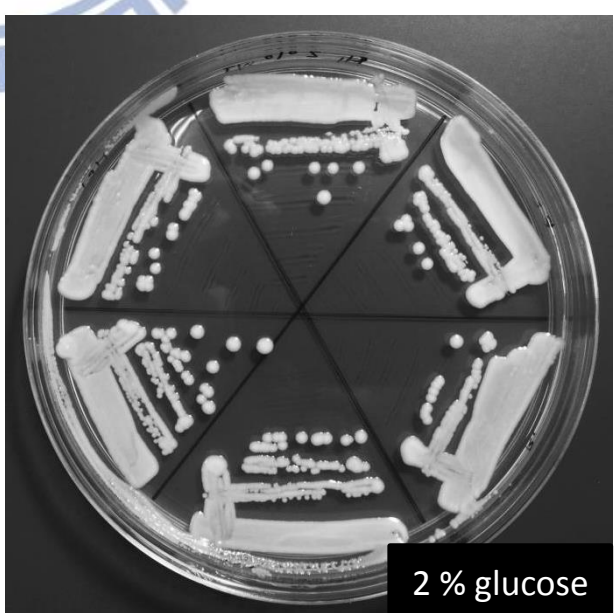
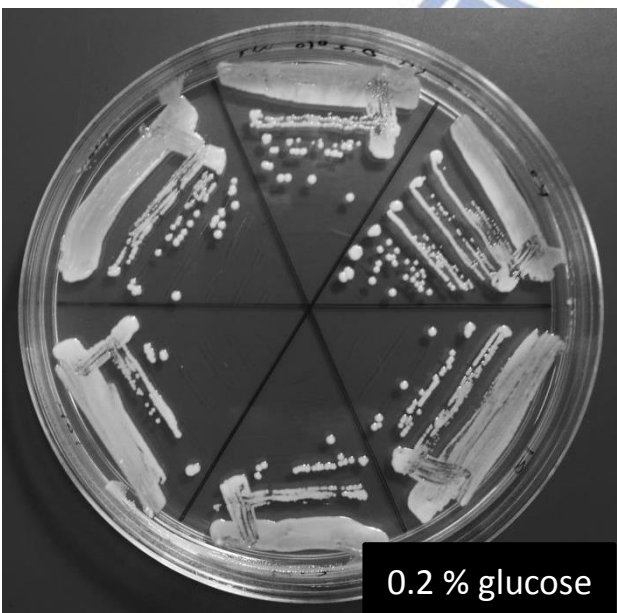
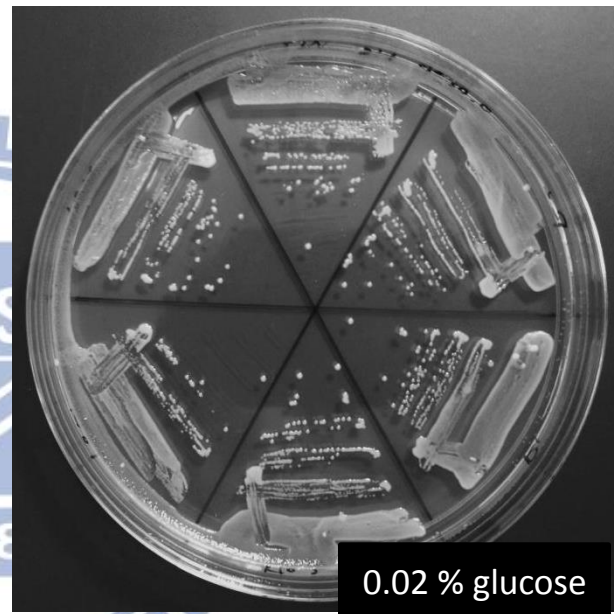
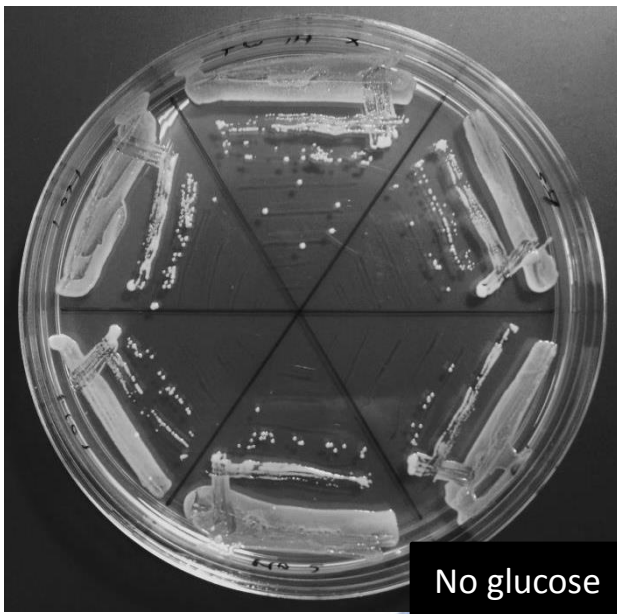
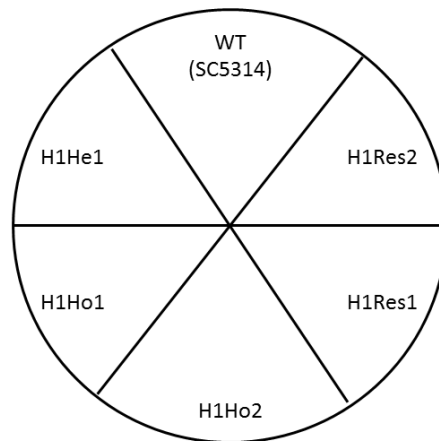
WT 為野生株 wild-type 會得到 3562 bp 的片段；He 為單套剔除株，預期

有 3562 bp 及 1616 bp 的片段；Ho 為雙套剔除株，預期會有 1616 bp 的

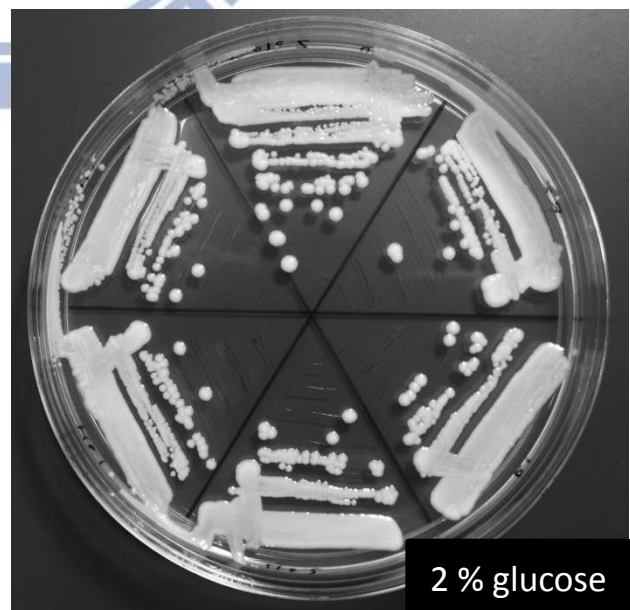
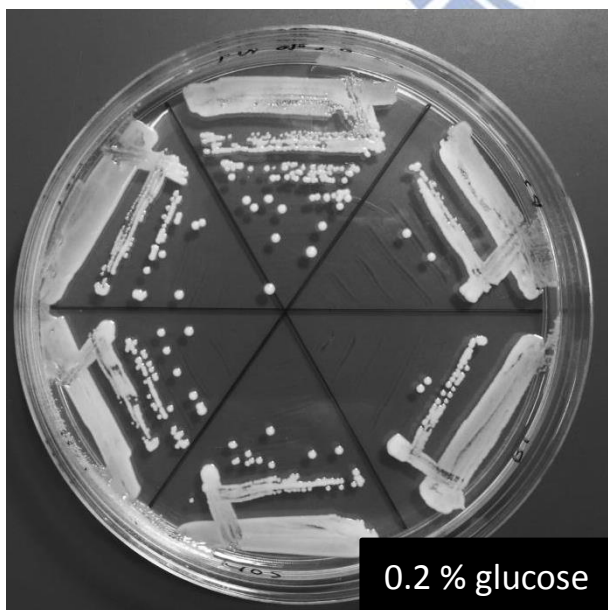
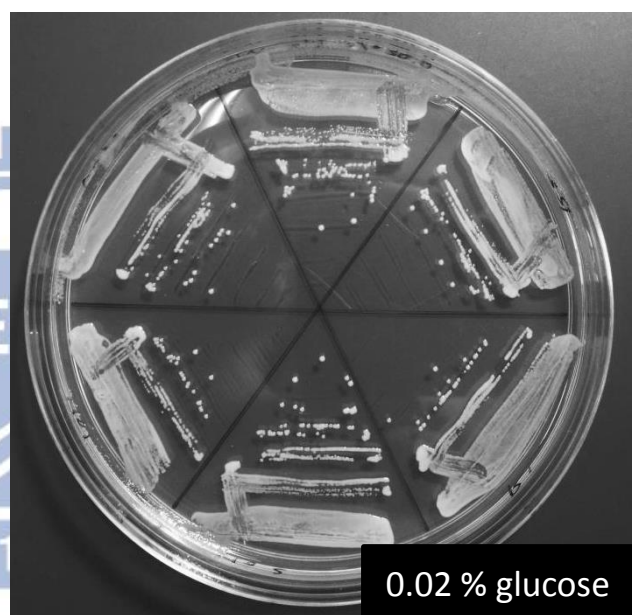
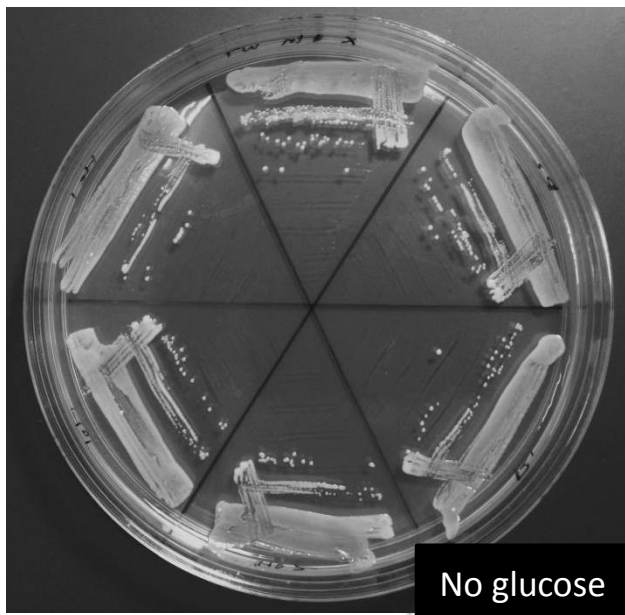
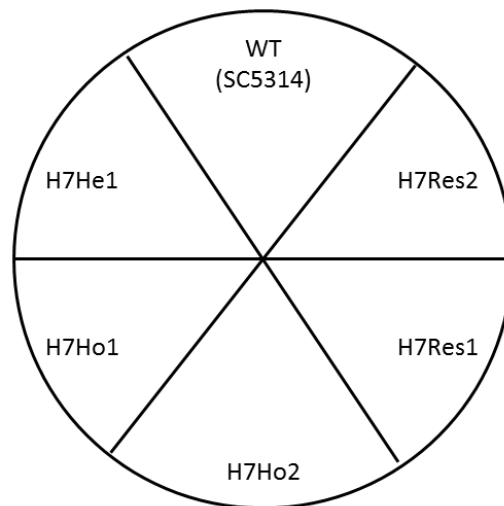
片段；然而基因回復株會得到 1616 bp 及 7624 bp 的片段。



圖三十三、*CaCDR3* 各突變株在不同濃度葡萄糖培養環境下生長之情形。



圖三十四、*CaHGT1* 各突變株在不同濃度葡萄糖培養環境下生長之情形。

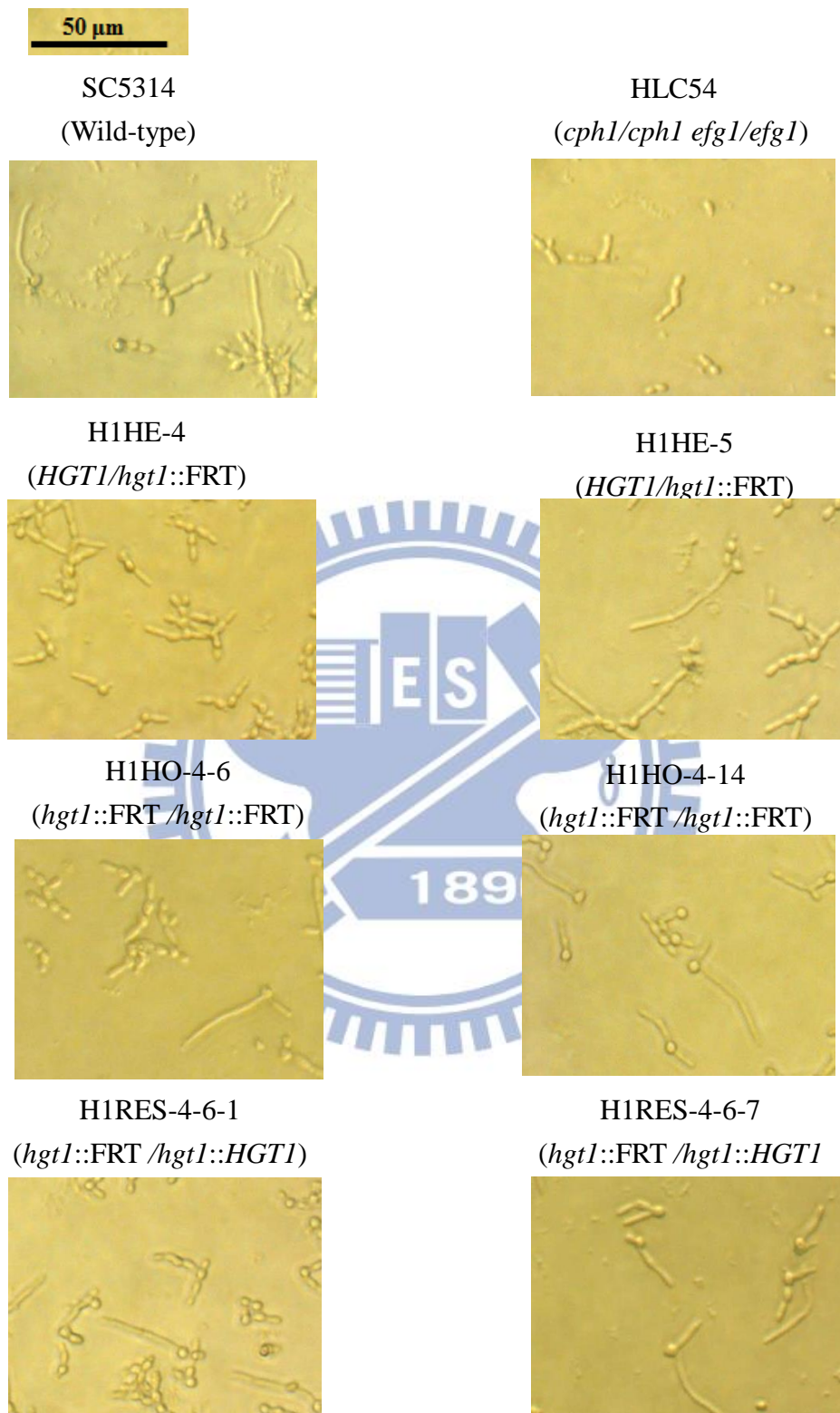


圖三十五、*CaHGT7* 各突變株在不同濃度葡萄糖培養環境下生長之情形。



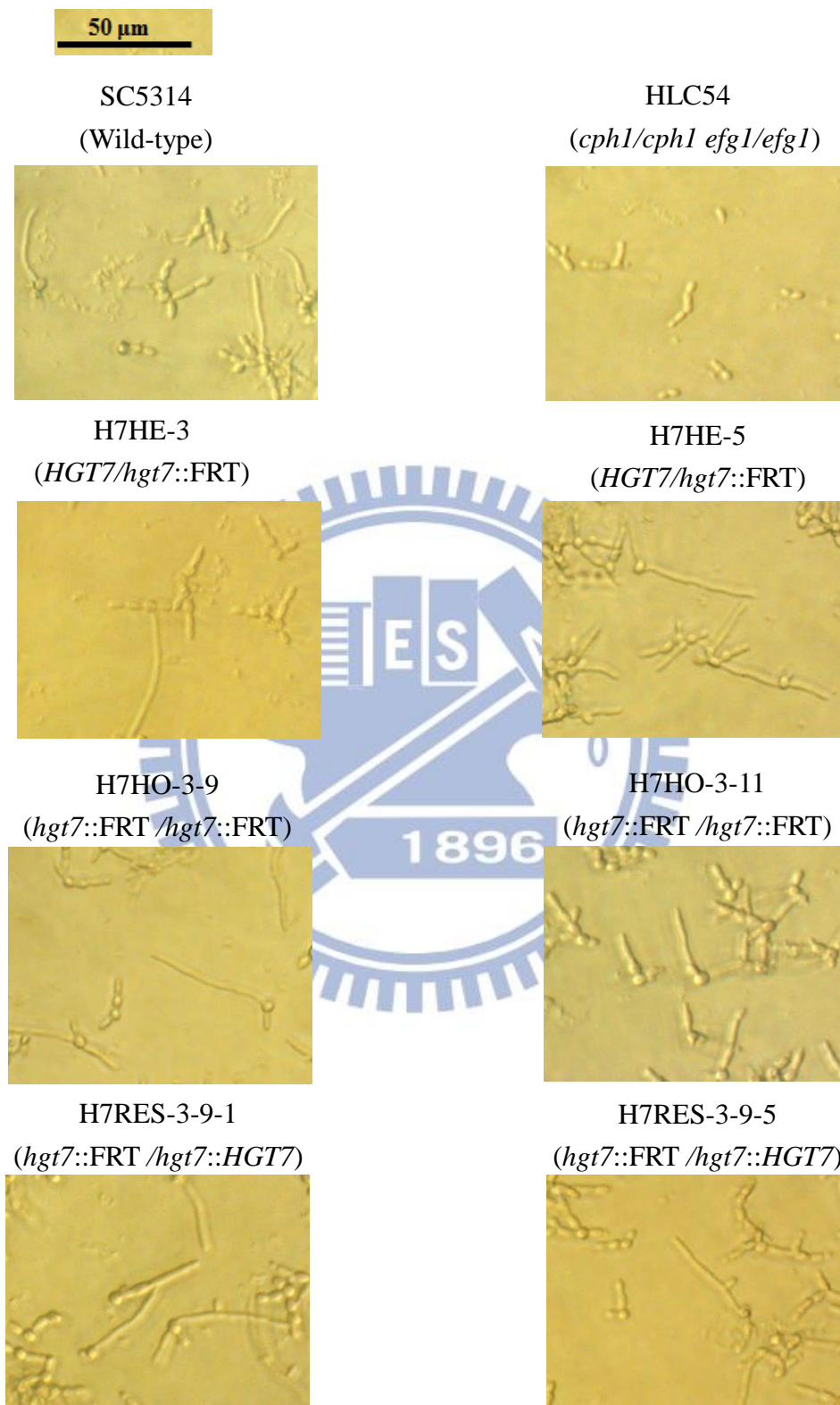
圖三十六、白色念珠菌 *CaCDR3* 各突變株之芽管實驗結果。

將 *CaCDR3* 個突變株接種於含 10% FBS 之 YPD 培養液中 37 °C 培養三小時後利用倒立式顯微鏡放大 400 倍觀察。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。



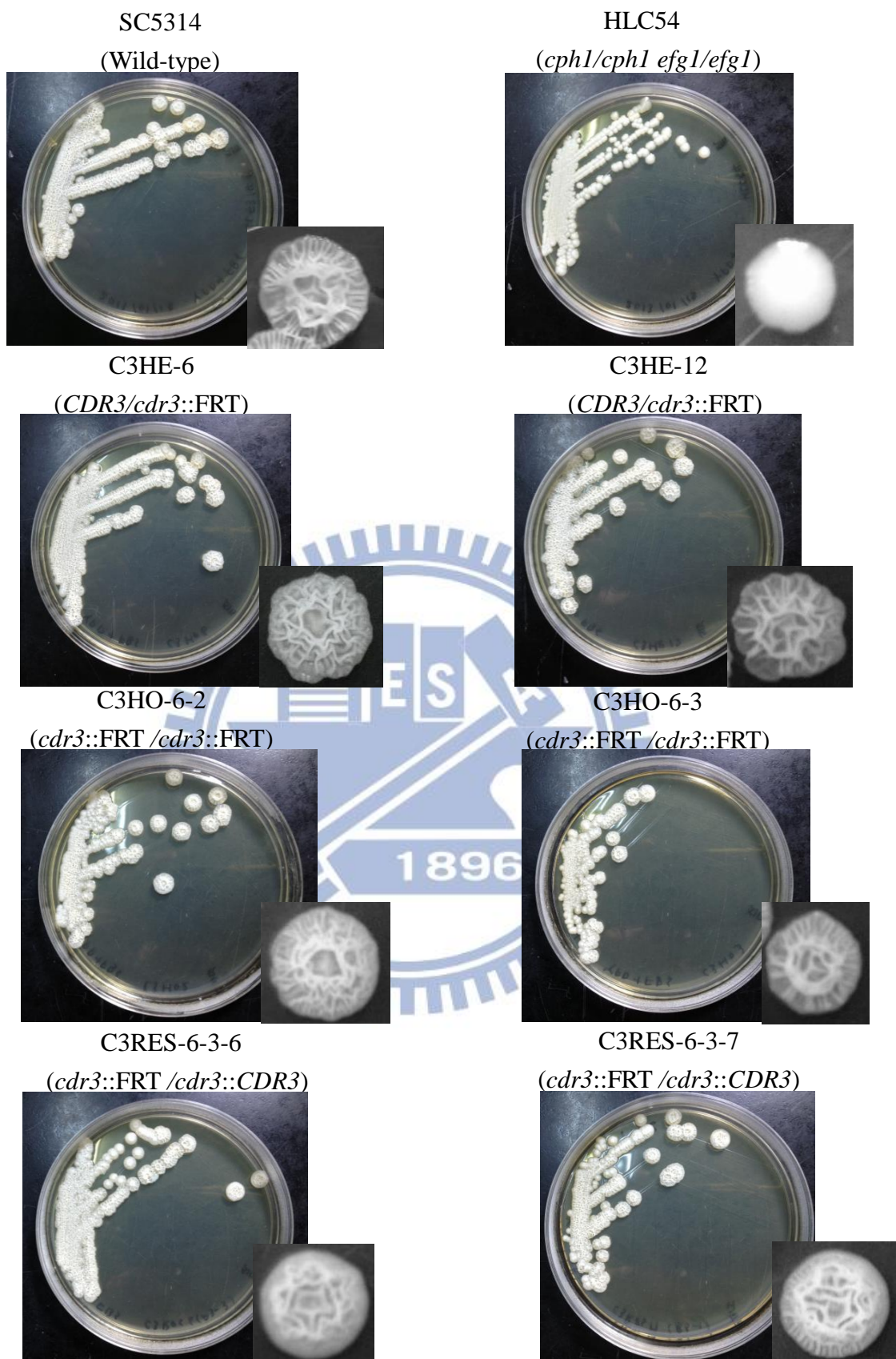
圖三十七、白色念珠菌 *CaHGT1* 各突變株之芽管實驗結果。

將 *CaHGT1* 個突變株接種於含 10% FBS 之 YPD 培養液中 37 °C 培養三小時後利用倒立式顯微鏡放大 400 倍觀察。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。

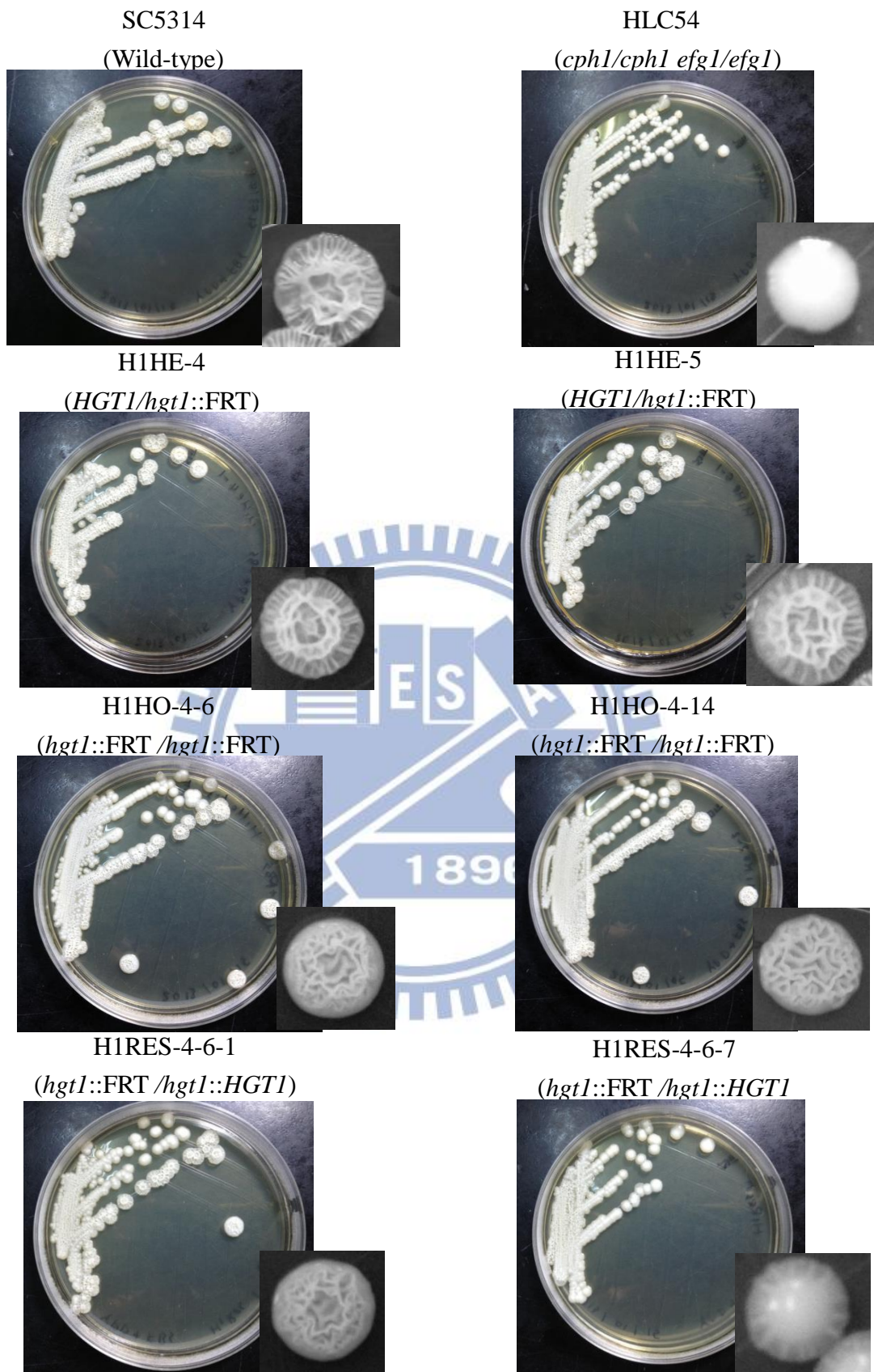


圖三十八、白色念珠菌 *CaHGT7* 各突變株之芽管實驗結果。

將 *CaHGT7* 個突變株接種於含 10% FBS 之 YPD 培養液中 37 °C 培養三小時後利用倒立式顯微鏡放大 400 倍觀察。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。

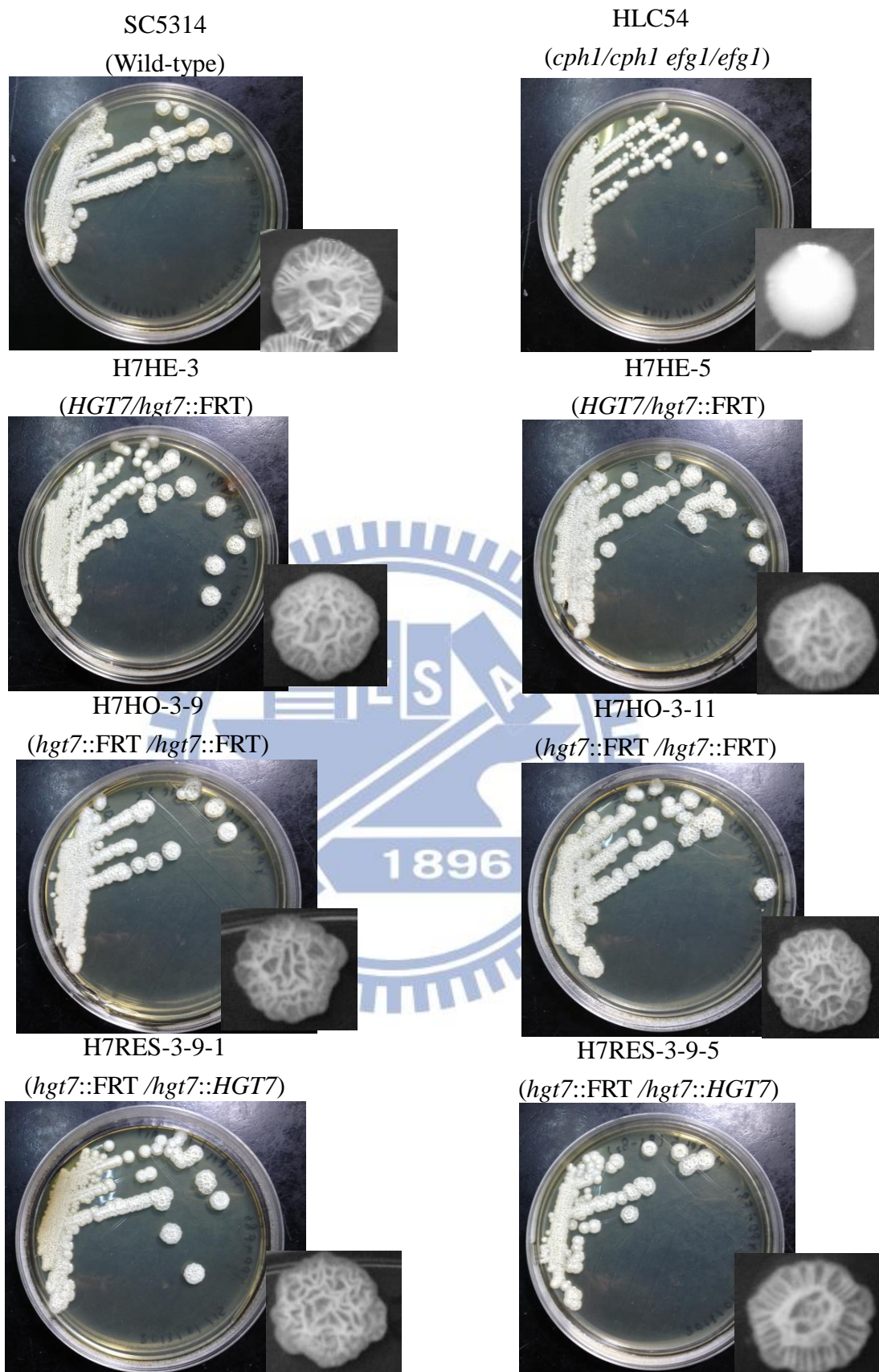


圖三十九、白色念珠菌 *CaCDR3* 各突變株之菌絲生成實驗結果。
在含 4% FBS 之 YPD 培養基以 37 °C 培養 *CaCDR3* 各突變株，三天後觀察菌落型態。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。



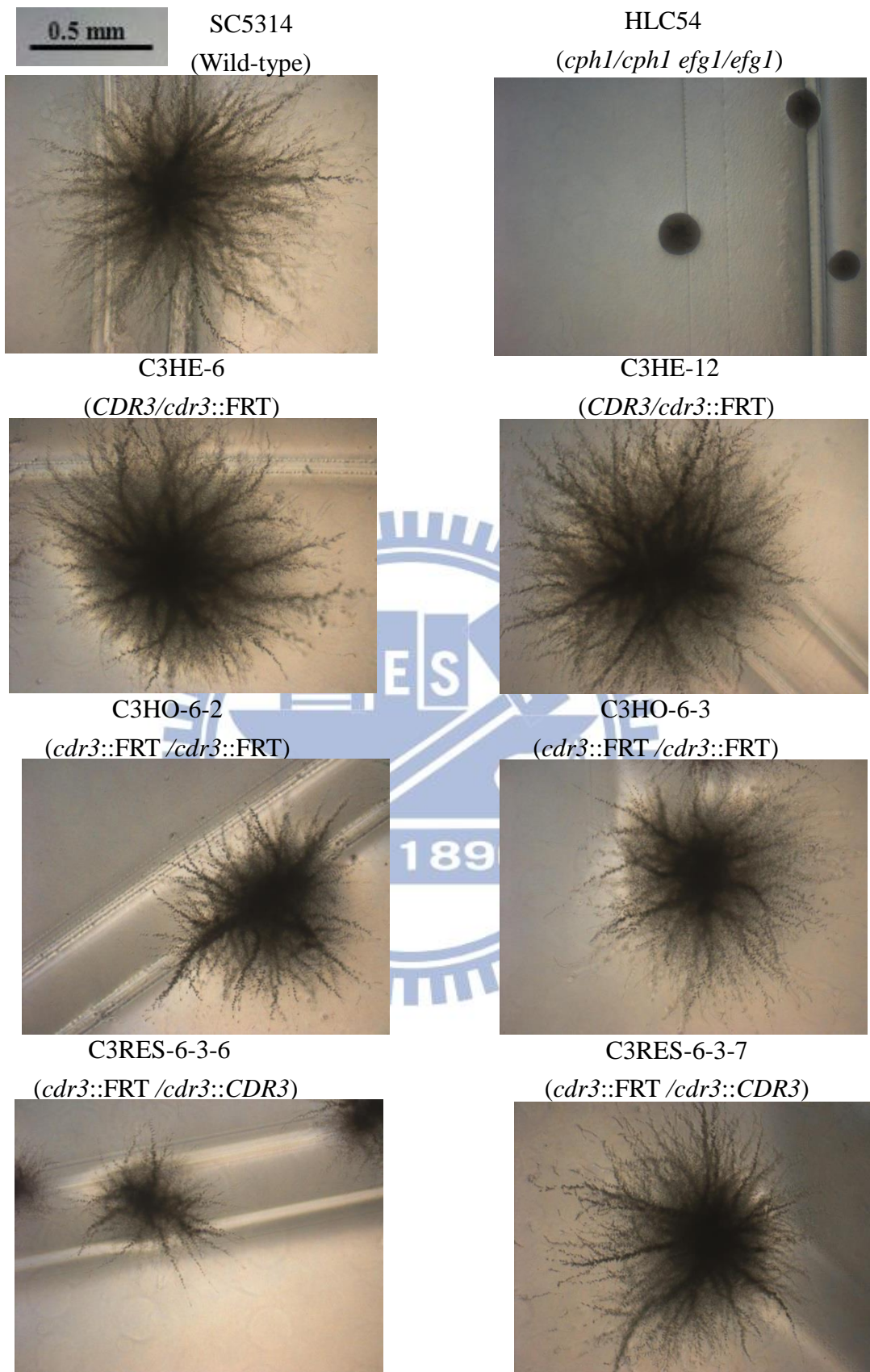
圖四十、白色念珠菌 *CaHGT1* 各突變株之菌絲生成實驗結果。

在含 4% FBS 之 YPD 培養基以 37 °C 培養 *CaHGT1* 各突變株，三天後觀察菌落型態。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。

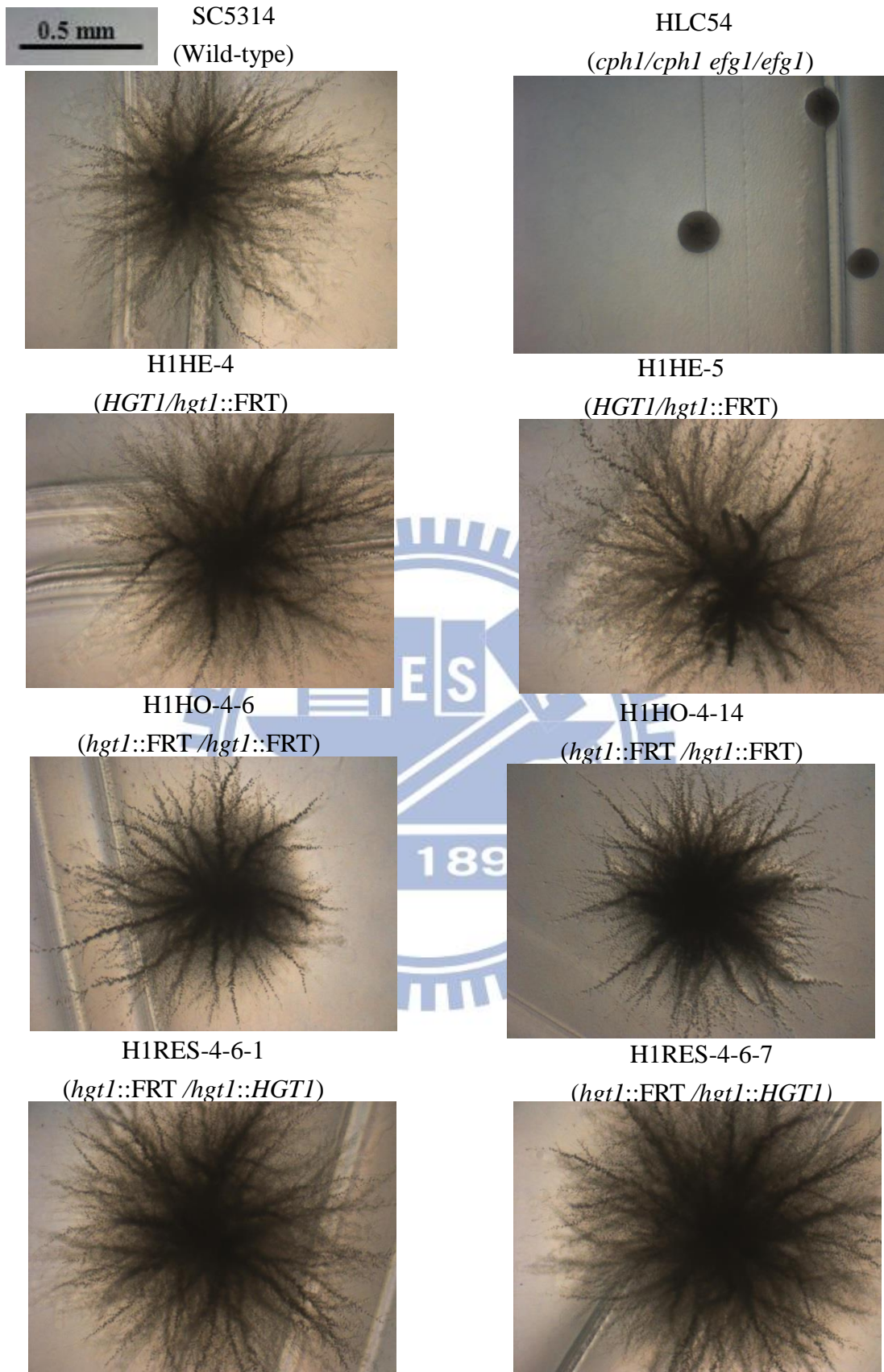


圖四十一、白色念珠菌 *CaHGT7* 各突變株之菌絲生成實驗結果。

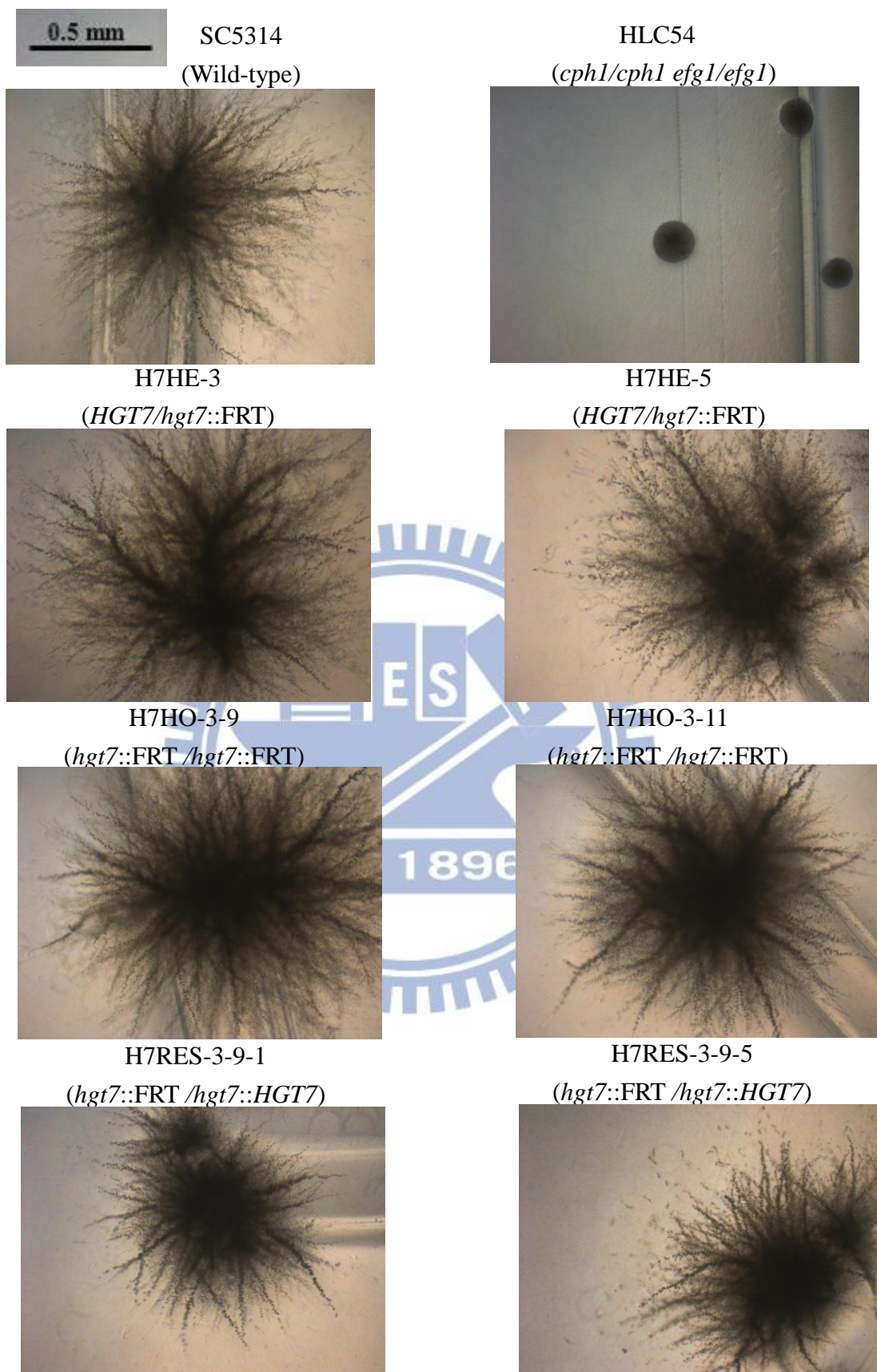
在含 4% FBS 之 YPD 培養基以 37 °C 培養 *CaHGT7* 各突變株，三天後觀察菌落型態。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。



圖四十二、白色念珠菌 *CaCDR3* 各突變株之菌絲生成實驗結果。
 在含 4% FBS 之 Bacto Agar 以 37 °C 培養 *CaCDR3* 各突變株，七天後以倒立式顯微鏡放大 40 倍觀察菌絲型態。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。



圖四十三、白色念珠菌 *CaHGT1* 各突變株之菌絲生成實驗結果。
 在含 4% FBS 之 Bacto Agar 以 37 °C 培養 *CaHGT1* 各突變株，七天後以倒立式顯微鏡放大 40 倍觀察菌絲型態。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。



圖四十四、白色念珠菌 *CaHGT7* 各突變株之菌絲生成實驗結果。
 在含 4% FBS 之 Bacto Agar 以 37 °C 培養 *CaHGT7* 各突變株，七天後以倒立式顯微鏡放大 40 倍觀察菌絲型態。菌株 SC5314 及 HLC54 為對照組。



圖四十五、白色念珠菌 *CaCDR3* 各突變株侵犯力測試之結果。

菌株接種於 Solid spider 培養基，37 °C 培養七天，之後以定時定量流水沖洗菌，觀察菌落附著於培養基的程度。菌株 SC5314 和 HLC54 作為對照組。



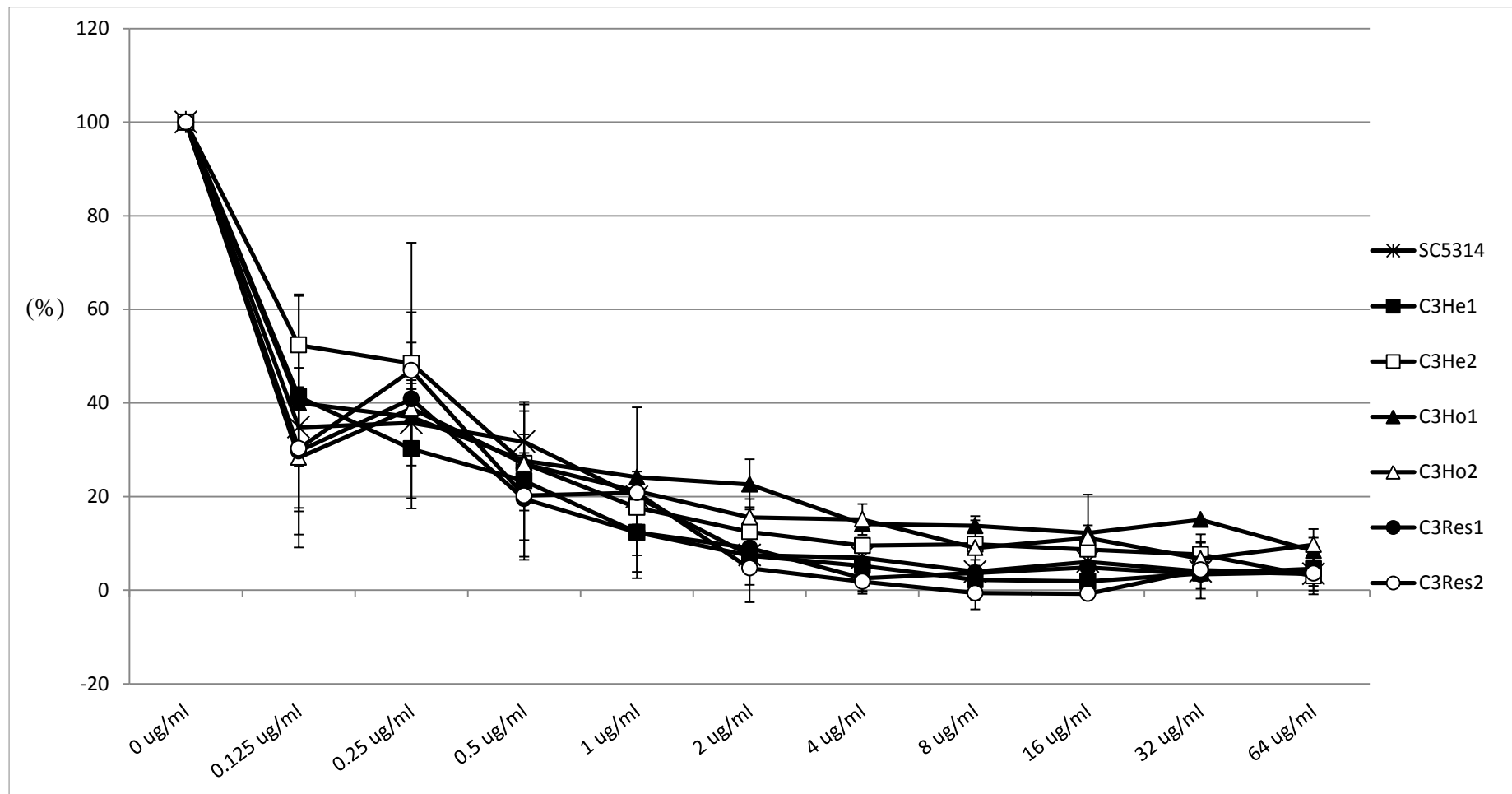
圖四十六、白色念珠菌 *CaHGT1* 各突變株侵犯力測試之結果。

菌株接種於 Solid spider 培養基，37 °C 培養七天，之後以定時定量流水沖洗菌，觀察菌落附著於培養基的程度。菌株 SC5314 和 HLC54 作為對照組。

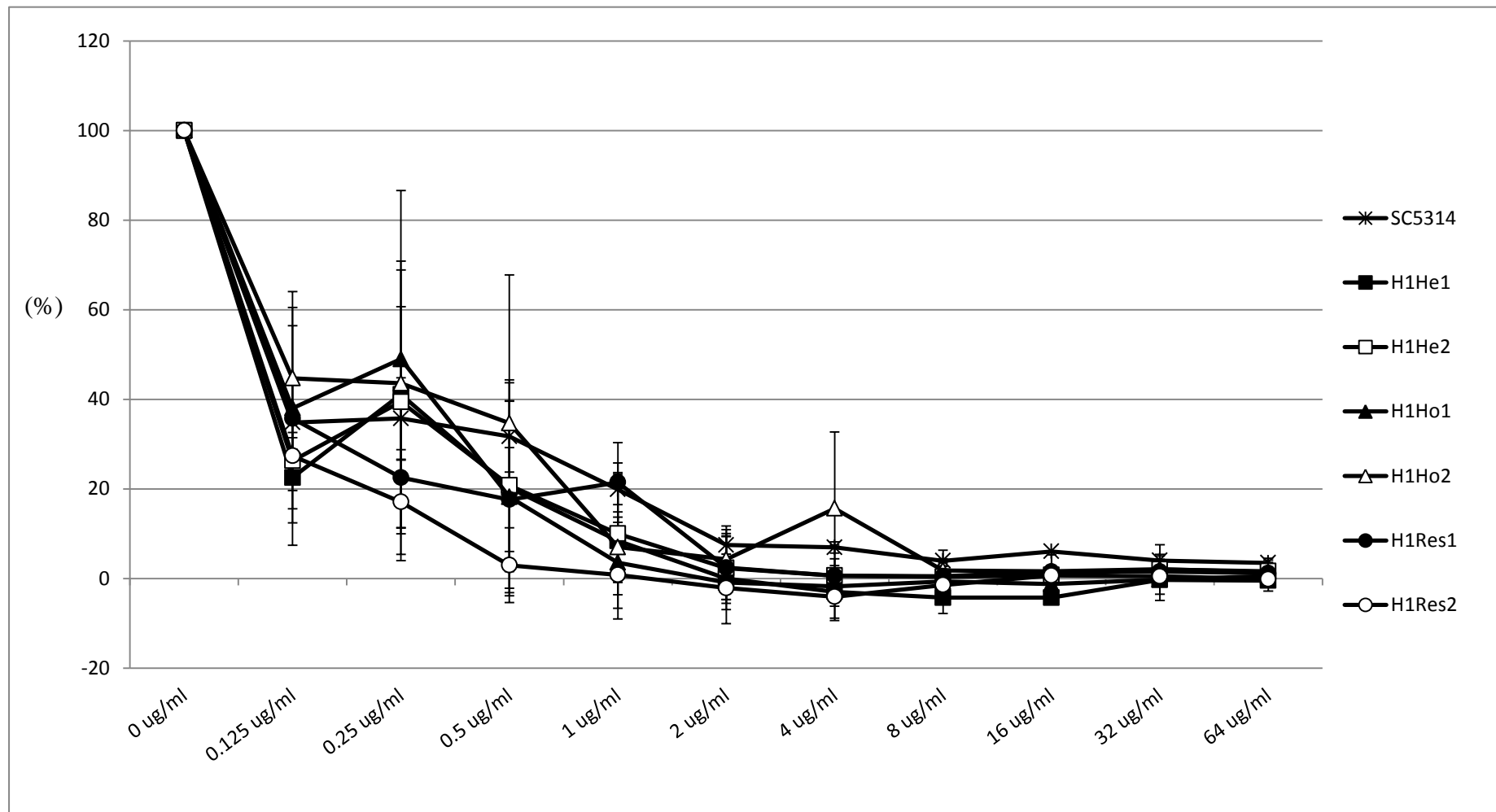


圖四十七、白色念珠菌 *CaHGT7* 各突變株侵犯力測試之結果。

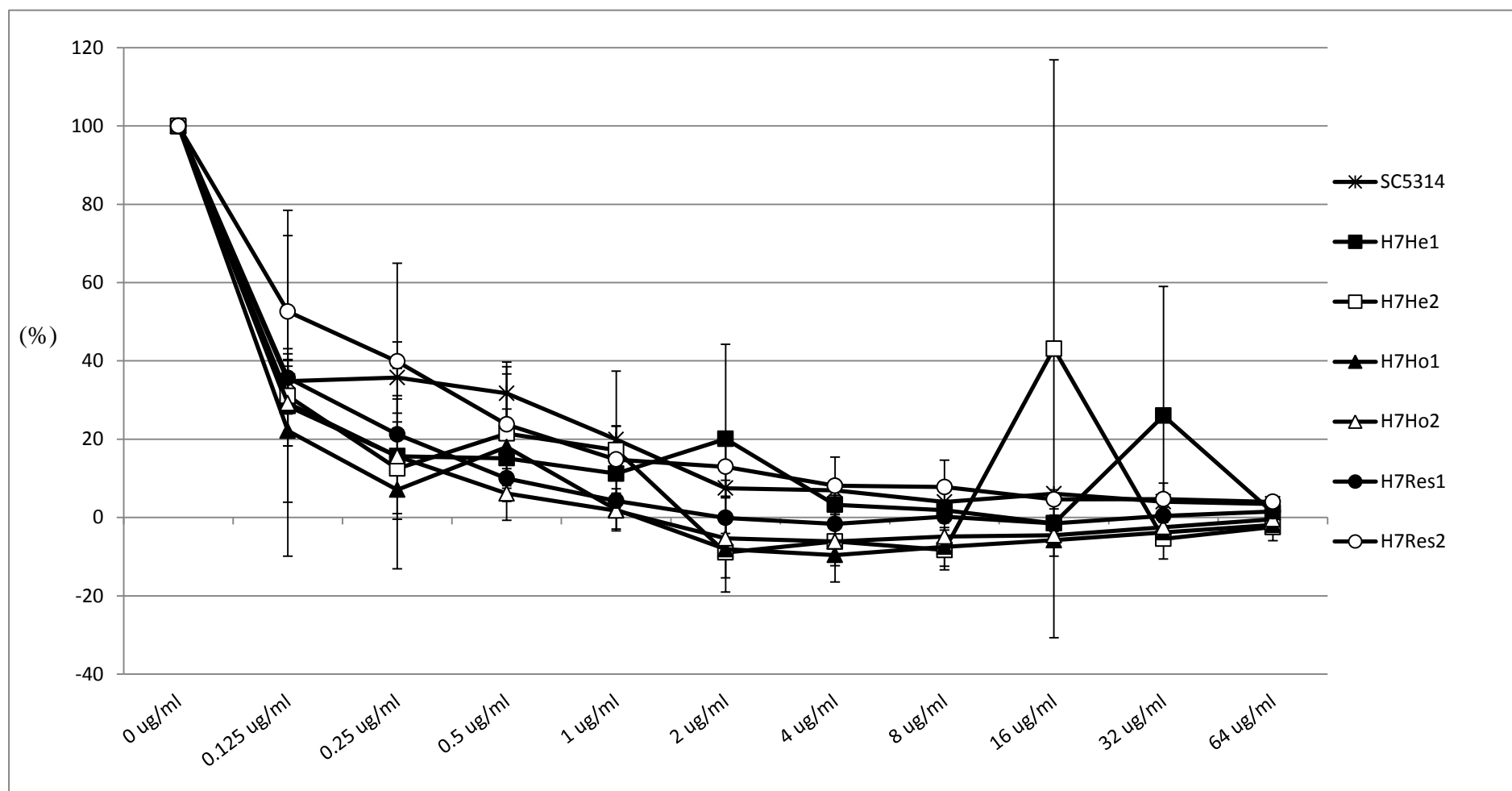
菌株接種於 Solid spider 培養基，37 °C 培養七天，之後以定時定量流水沖洗菌，觀察菌落附著於培養基的程度。菌株 SC5314 和 HLC54 作為對照組。



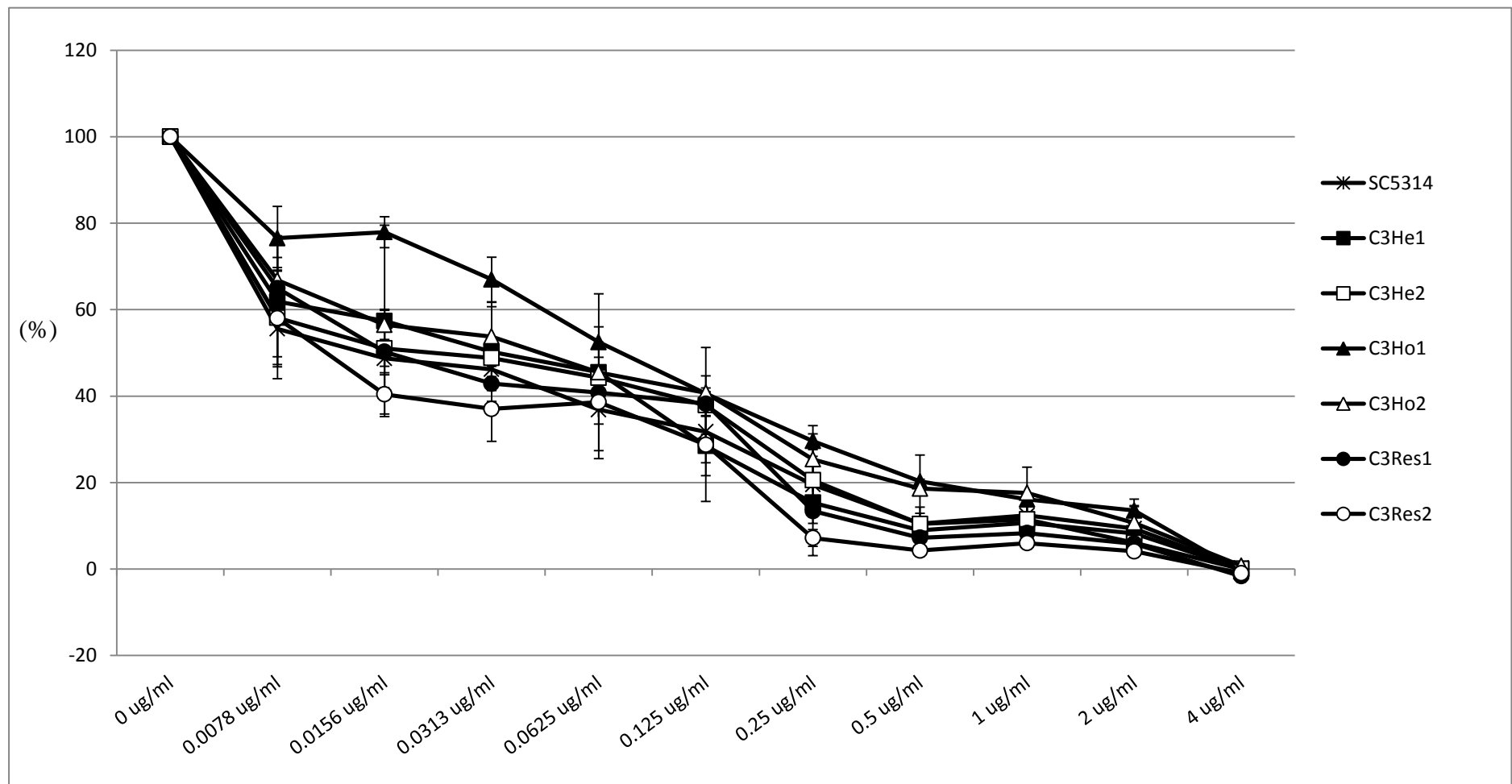
圖四十八、白色念珠菌 *CaCDR3* 各突變株對藥物 Fluconazole 感受性測試之結果。



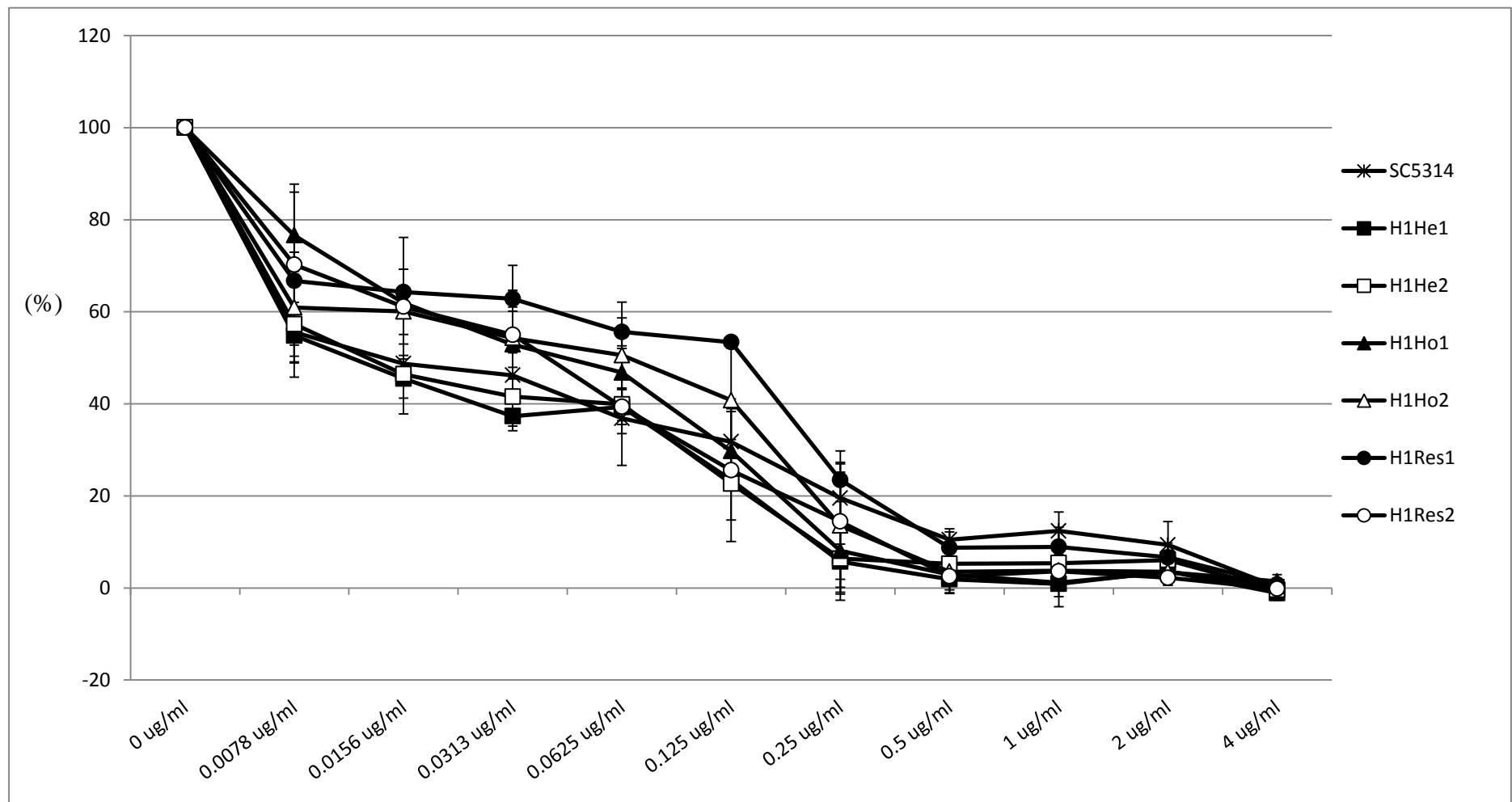
圖四十九、白色念珠菌 *CaHGT1* 各突變株對藥物 Fluconazole 感受性測試之結果。



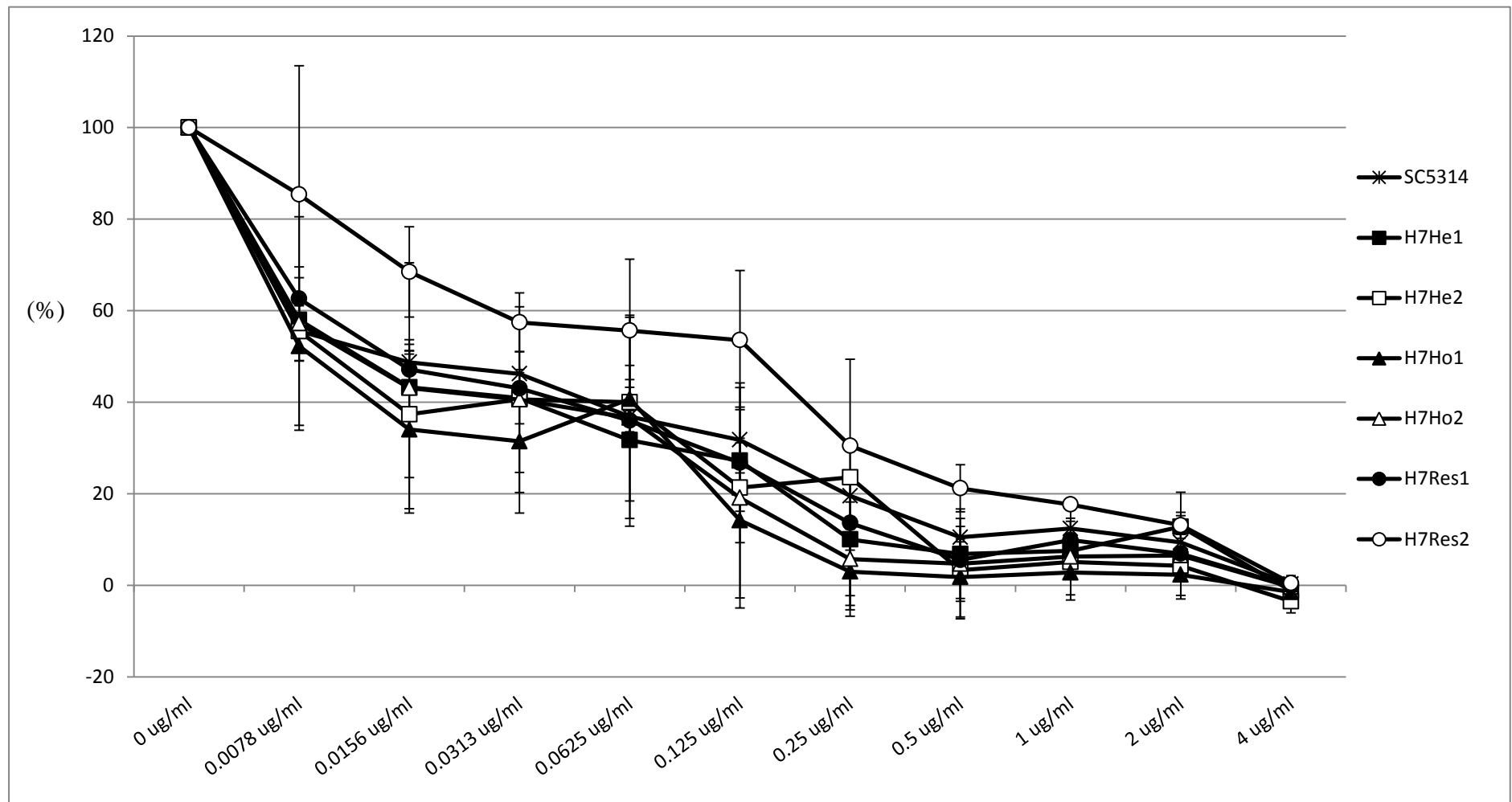
圖五十、白色念珠菌 *CaHGT7* 各突變株對藥物 Fluconazole 感受性測試之結果。



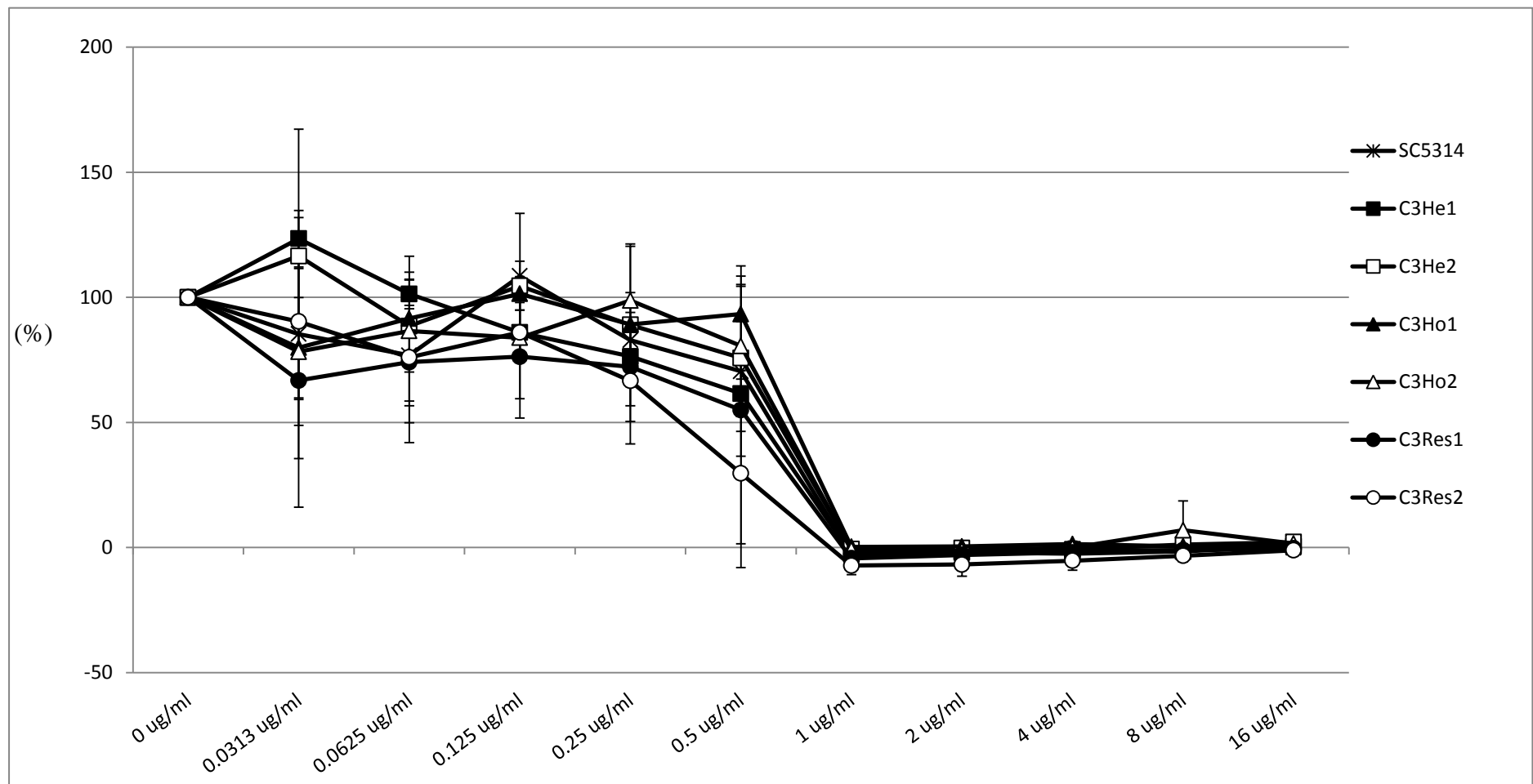
圖五十一、白色念珠菌 *CaCDR3* 各突變株對藥物 Miconazole 感受性測試之結果。



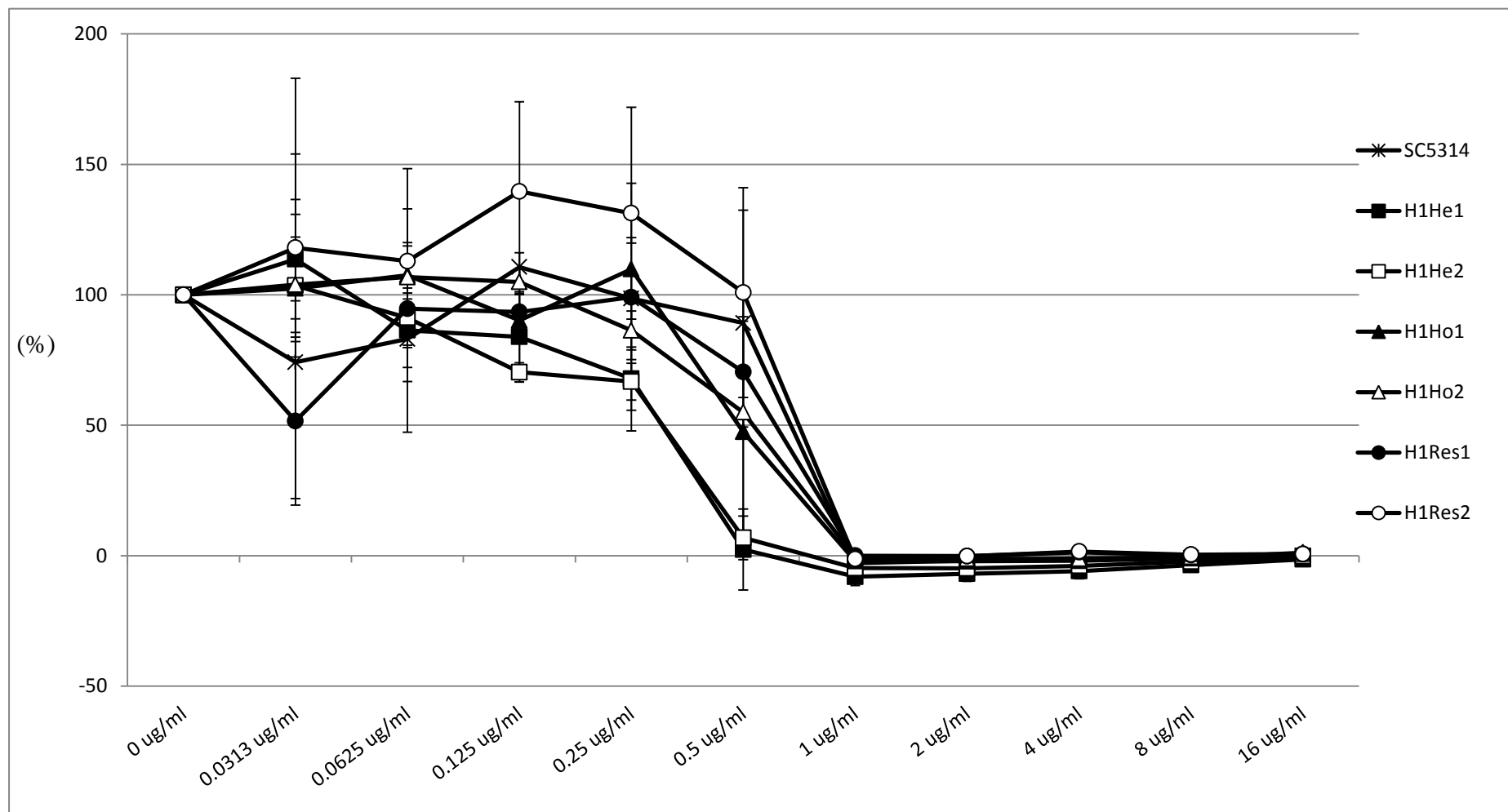
圖五十二、白色念珠菌 *CaHGT1* 各突變株對藥物 Miconazole 感受性測試之結果。



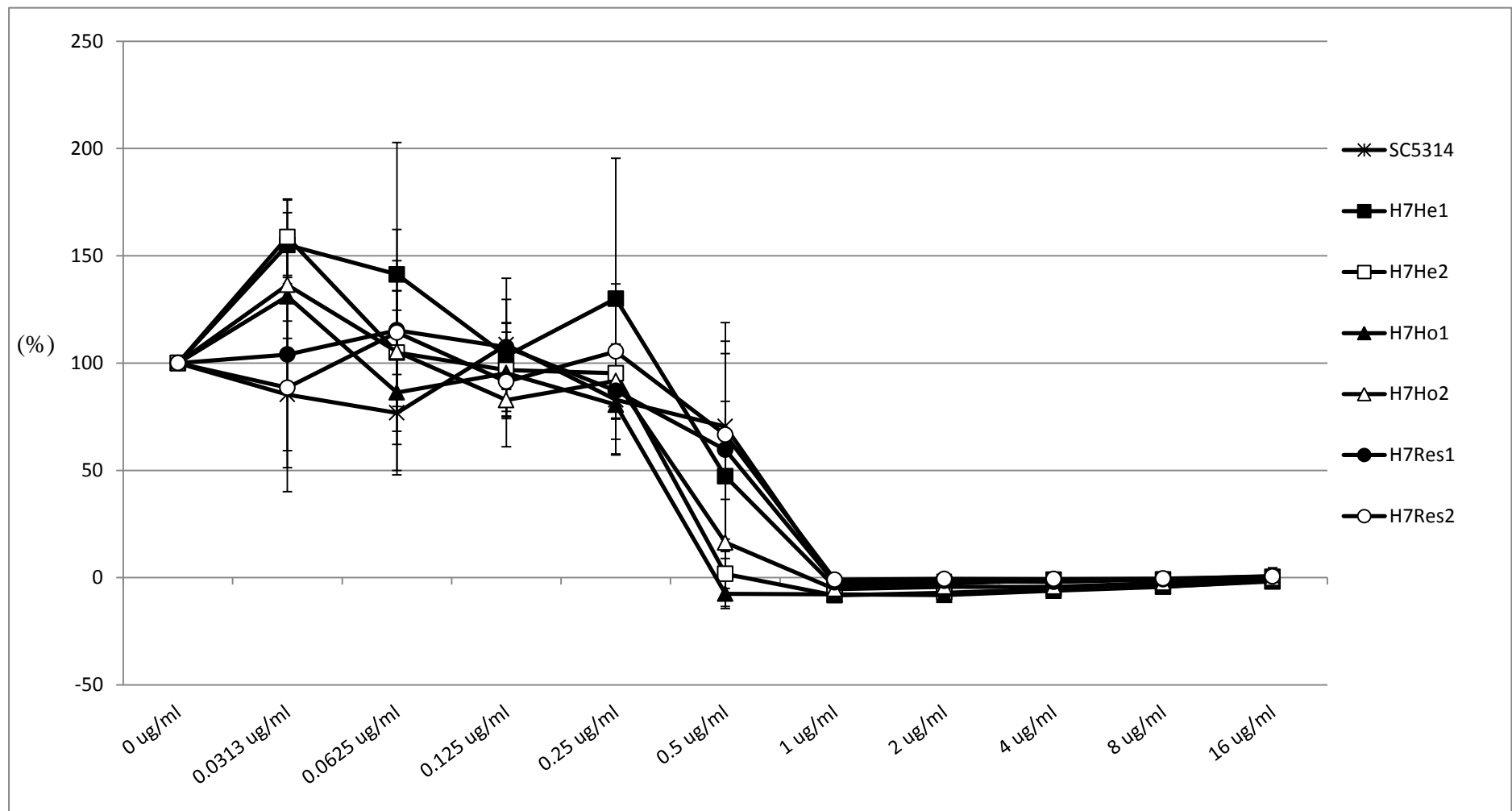
圖五十三、白色念珠菌 *CaHGT7* 各突變株對藥物 Miconazole 感受性測試之結果。



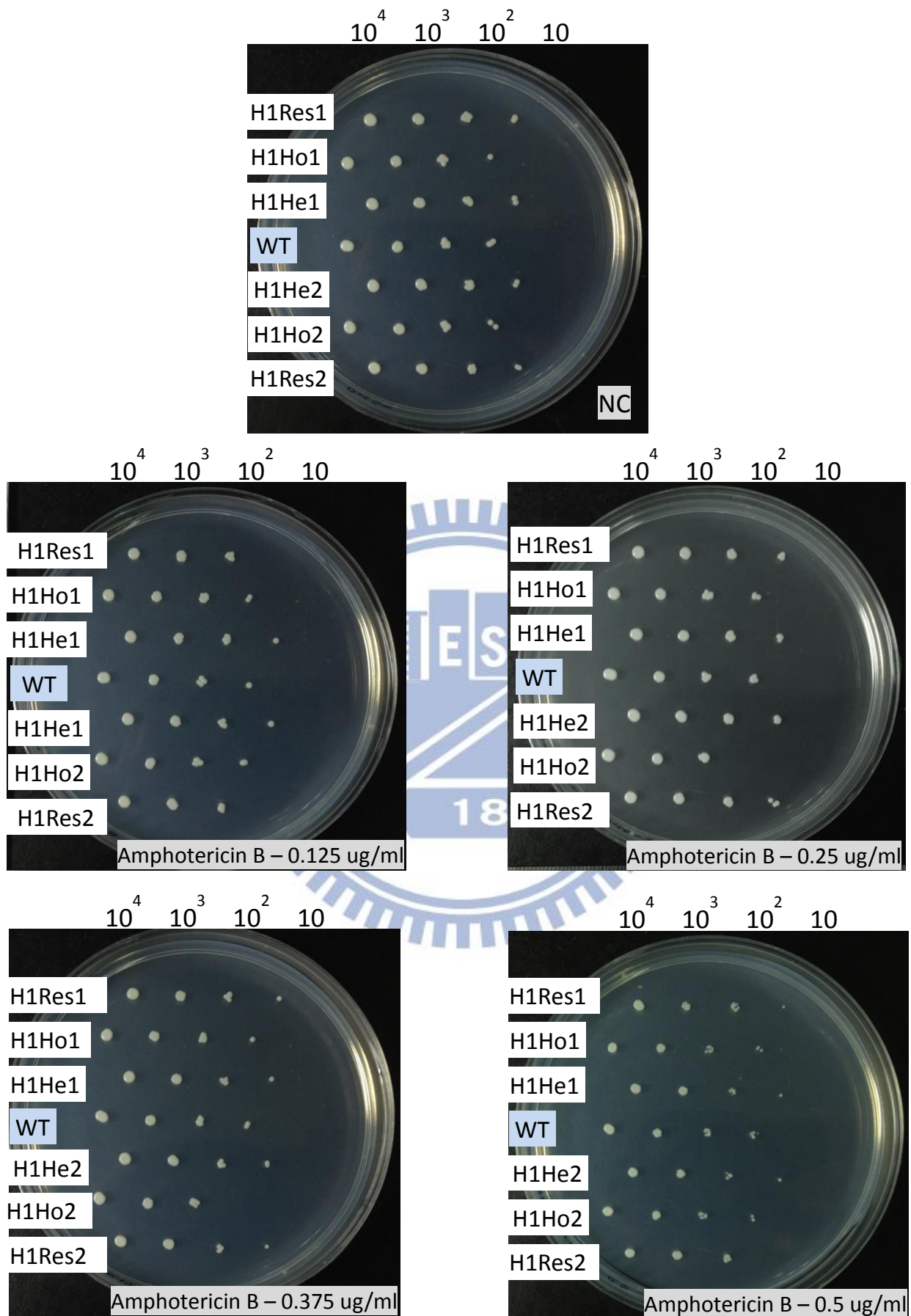
圖五十四、白色念珠菌 *CaCDR3* 各突變株對藥物 Amphotericin B 感受性測試之結果。



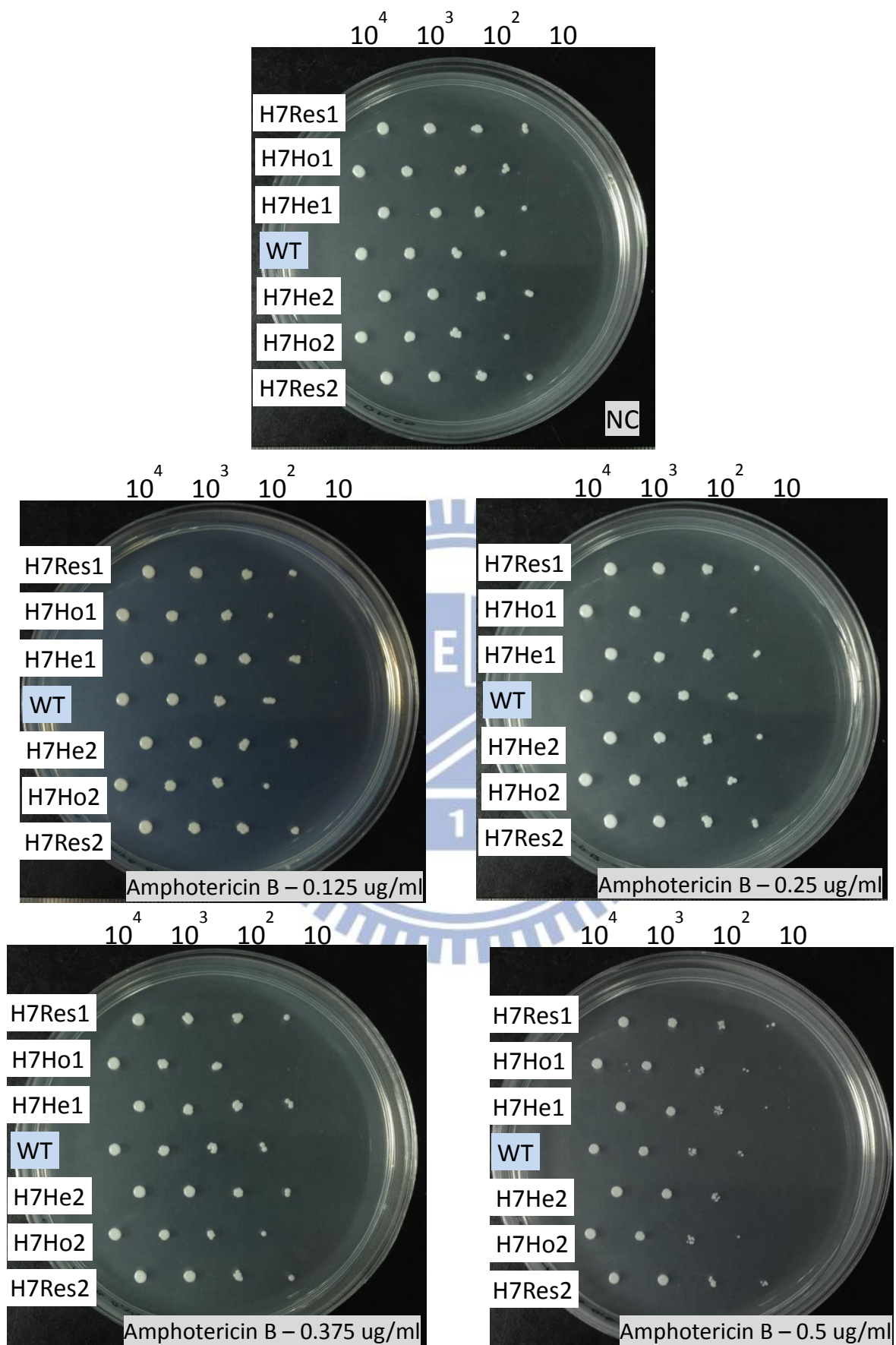
圖五十五、白色念珠菌 *CaHGT1* 各突變株對藥物 Amphotericin B 感受性測試之結果。



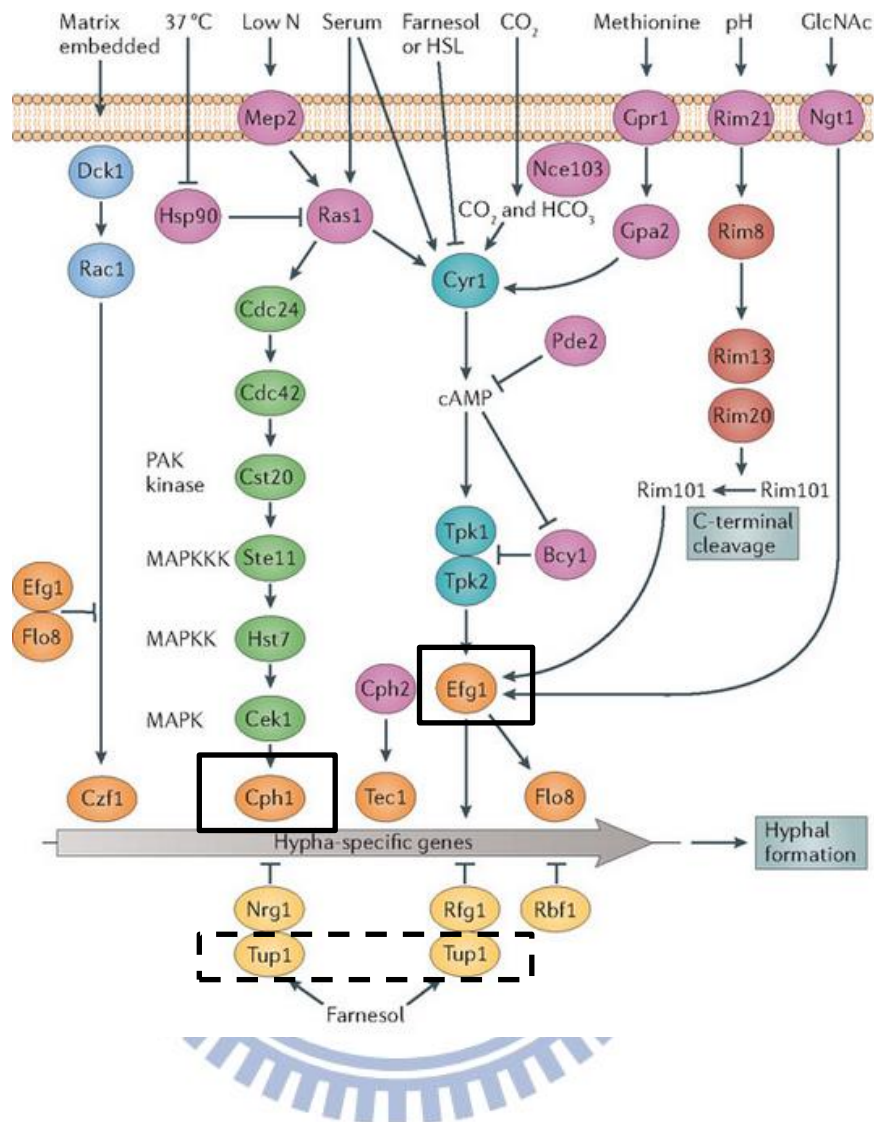
圖五十六、白色念珠菌 *CaHGT7* 各突變株對藥物 Amphotericin B 感受性測試之結果。



圖五十七、*CaHGT1* 各突變株對藥物 Amphotericin B 不同濃度之 Agar dilution test 48 小時之結果。其中 NC 為不加藥物之控制組



圖五十八、*CaHGT7* 各突變株對藥物 Amphotericin B 不同濃度之 Agar dilution test 48 小時之結果。其中 NC 為不加藥物之控制組。

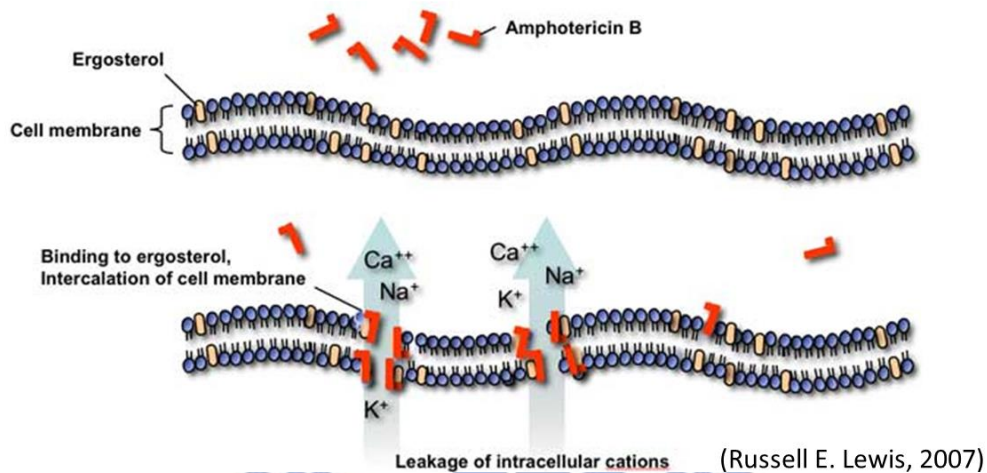


附圖一：白色念珠菌型態轉變的調控機制

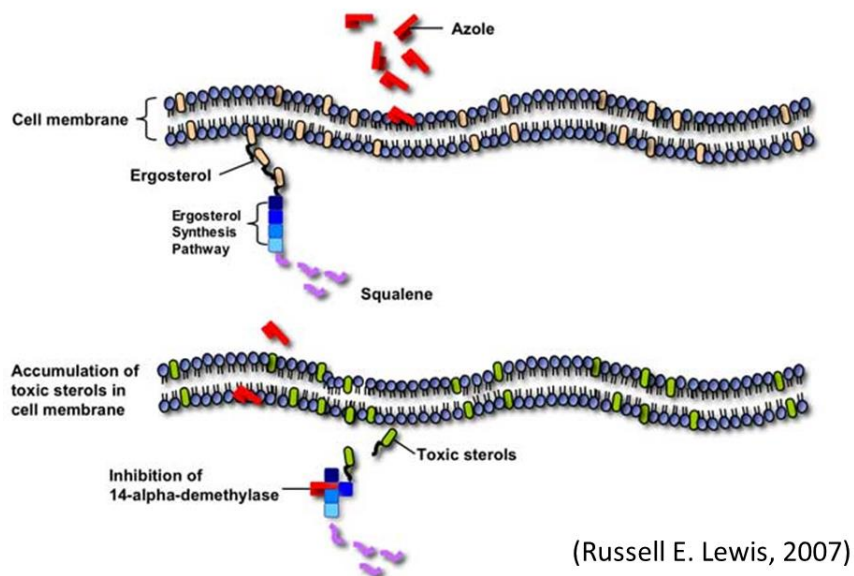
實線框框為 MAP kinase pathway 及 cAMP-PKA signaling pathway 此兩條正調控路徑下游的兩個 transcription gene Cph1 及 Efg1；而虛線框框為負調控路徑 Tup1 pathway 的主要調控基因 Tup1。

<A>

Polyene antifungals--Amphotericin B



Azole antifungals – Fluconazole and Miconazole



附圖二：Polyene 類以及 Azole 類抗真菌藥物之作用機制

<A> Polyene 類抗真菌藥物 Amphotericin B 之作用機制

 Azole 類抗真菌藥物 Fluconazole 及 Miconazole 之作用機制

The *Candida albicans* CDR3 Gene Codes for an Opaque-Phase ABC Transporter

INGA BALAN,[†] ANNE-MARIE ALARCO, AND MARTINE RAYMOND*

*Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal,
Québec, Canada H2W 1R7*

Received 5 August 1997/Accepted 22 September 1997

BLAST and FASTA homology searches of protein sequence databases with the full-length Cdr3p sequence show that the highest homology was with Cdr1p (34) and Cdr2p (40). Pair-wise sequence comparisons indicate that Cdr3p displays 56% sequence identity and 74% similarity with Cdr1p and 55% sequence identity and 75% similarity with Cdr2p, while Cdr1p and Cdr2p are 84% identical and 92% similar (40). These results indicate that Cdr1p and Cdr2p are more closely related to each other than to Cdr3p, probably reflecting a shorter evolutionary distance between Cdr1p and Cdr2p. The highest degree of sequence homology among the three proteins is found in the segments overlapping the two predicted intracellular domains that contain the ATP-binding sequences. The homology decreases in the membrane-associated domains, with the area of greatest divergence found in the N-terminal segment of the proteins (data not shown).



附圖三：文獻中將 Cdr1p、Cdr2p 及 Cdr3p 相互之間序列比對之結果內文

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [Graphics](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
unnamed protein product	405	458	94%	5e-132	51%	23293

[Download](#) [Graphics](#) Sort by: [E value](#)

unnamed protein product
Sequence ID: lc|23293 Length: 1501 Number of Matches: 3

Range 1: 1116 to 1497 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
405 bits(1042)	5e-132	Compositional matrix adjust.	198/385(51%)	260/385(67%)	3/385(0%)
Query 1	MLGVIGAAPGTOANQDYFETWRNSPEYRAVQNELHRLEEMPGLASGEKEPDNTQAYAAAF	60			
Sbjct 1116	ML V+GAAPG+ A QDYFE WRNS EY+AV+ E++R+E + +P+ YAA	1175			
Query 61	WKQYIFVVRHLFQQYWRTPSYIYSKFAMAVLCSLFNGFTYYKSNMQGLKNQMLSIFSM	120			
Sbjct 1176	WKQY+ V R Q WR+P YIYSK + V +LFNGF+++K++N+MQGL+NQM S+F	1235			
Query 121	FVVLTTLAQQYIPLFVTQRDLYEARERPSKTFSWLAFIAAQITAEIPYQVLAATVSFFSW	180			
Sbjct 1236	F+ TL QQ +P FV QRD+YE RE PS+TFSW AFIA QIT+EIPYQV T++FF W	1295			
Query 181	YYPVGLYRNAVYSGAVTHRGVLMWLIMTLMFIYSSTLAQFCISWNQLADYAAANWISLLLT	240			
Sbjct 1296	YYP+GLY NA + +V RGVLMW+++T ++Y++T+ Q C+S+++LAD AAN +LL T	1355			
Query 241	ISMIFCGVIATKDSMPKFWVFLYRCTPLTYLTSAMMSIGLGDSEVVKCAPTEILTFPPQTP	300			
Sbjct 1356	+ + FCGV+A D +P FW+F+YRC P TYL AM+S GL ++FVKCA E ++ P P	1413			
Query 301	GVQKCDQYMGAYISIAGGYLLNPEATDNCKFCIMDKTNQFLDFMNIHNFGRDGTGIFIV	360			
Sbjct 1414	+ C Y+ YI AGGY +C FC M TN FL +N R+ GIFI	1472			
Query 361	FIVFNMAATVFSYWLFRVPKGNREK	385			
Sbjct 1473	FI N+ TV YWL RVPKGNREK	1497			

附圖四：利用 NCBI blast 比對 Cdr3p 及 Cdr1p 之結果

圖中 Query 為 Cdr3p 序列；Subject 為 Cdr1p 序列。

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [Graphics](#) [Multiple alignment](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product	406	477	99%	2e-132	49%	12527

[Download](#) [Graphics](#) Sort by: [E value](#)

unnamed protein product
Sequence ID: lcl|12527 Length: 1499 Number of Matches: 4

Range 1: 1114 to 1495 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
406 bits(1044)	2e-132	Compositional matrix adjust.	191/386(49%)	260/386(67%)	5/386(1%)

	Query	Score	Subject	Score
	1	MLGVIGAAPGTQANQDYFETWRNSPEYRAVQNELHRLHEEMPGLASGEKEPDNTQAYAAAF	60	
	1114	ML V+GAAPG+ A QDYFE WRNS EY+AV+ E++R+E + +P+ YAA	1173	
	61	WKQYIFVVHRLFQQYWRTPSYIYSKFAMAVLCSLFNGFTYYKQNSMQGLKNQMLSIFSM	120	
	1174	WKQY+ V R Q WR+P YIYSK + + SLF GF+++KS+N++QGL++QML++F	1233	
	121	FVVLTTLAQQYIPLFVVTORDLYEARERPSKTFWSLAFIAAQITAEIPYQVLAATVSFFSW	180	
	1234	FV TT Q +P FV R +YE RE PS+TFSW AFIA QIT+EIP+Q++ T+S+F W	1293	
	181	YYPVGLYRNAVYSYSGAVTHRGVLMWLIMTLMFIYSSTLAQFCISWNQLADYANWISLLT	240	
	1294	YYPVGLY NA + +V RGVLMW+++T ++Y+ST+ Q IS N+L D AAN + L T	1353	
	241	ISMIFCGVIATKDSMPKFWVFLYRCTPLTYLTSAMMSIGLGSFVKCAPTEILTFFPQTP	300	
	1354	+ ++FCGV+A + +P FW+F+YRC P TYL A++S GL ++ V CAP E++T P P	1411	
	301	GVQKQDYMGAYISYAGGYL-LNPEATDNCKFCIMDKTNQFLDFMNISIHNFGRDTGIFI	359	
	1412	+ C ++G Y AGGY N + T C C +D TNQFL+ +N R+ GIF+	1469	
	360	VFIVFNMAATVFSYWLFRVPKGNREK	385	
	1470	FI N+ T+F YWL RVPKGNREK	1495	

附圖五：利用 NCBI blast 比對 Cdr3p 及 Cdr2p 之結果

圖中 Query 為 Cdr3p 序列；Subject 為 Cdr2p 序列。

簡歷

陳映如 Ying-Ru Chen

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 生物科技系暨研究所	2010~2013
大學	私立中原大學 生物科技學系	2006~2010
高中	國立新店高中	2003~2006

個人經歷

年度	類別	經歷
2008~2010	專題	題目：利用光敏劑口塗劑型運用在倉鼠口腔癌動物模式之前臨床研究探討
		題目：應用牛樟芝於癌症治療研究初探
2010~2013	碩士班論文	論文題目：探討剔除白色念珠菌 <i>CaCDR3</i> 、 <i>CaHGT1</i> 及 <i>CaHGT7</i> 對白色念珠菌型態變化及藥物感受性之影響