

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 : 探討白色念珠菌 CDC7 與 DBF4 基因產物具功能性的交互 *
* 名 稱 : 作用而調節型態形成 *
* ***** *

執行計畫學生： 王俊淵
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-044-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 謝家慶

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

中華民國 99年03月30日

● 探討白色念珠菌 *CDC7* 與 *DBF4* 基因產物具功能性的交互作用

而調節型態形成

摘要

白色念珠菌(*Candida albicans*)是一種伺機性真菌，由嬰兒期就存在在我們人體的表面皮膚、腸道、以及口腔內，正常情況下，其存在的量不多，而且與其他人體的各種正常細菌保持平衡。當免疫抑制、年幼或年老時，此菌常常會入侵。而長期或不當抗生素治療干擾微生物菌叢，則是最可能引起念珠菌症的原因。

而目前常使用對抗白色念珠菌的抗真菌藥物有 Amphotericin B 與 azoles，由於白色念珠菌與人體細胞皆為真核生物，因此這些藥物的 cellular targets 也會傷害人體正常的細胞，會對人體造成相當程度的副作用，且近年來發現白色念珠菌對於 azoles 藥物之抗藥性日漸增加，因此我們透過對白色念珠菌的了解，希望未來能尋求有效預防或控制白色念珠菌感染之方法。

由於出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)與白色念珠菌擁有許多同源基因，而在過去之研究中，對出芽酵母菌之研究較白色念珠菌透徹且完整，故我們對白色念珠菌基因之研究，都是先透過出芽酵母菌之同源基因進行推測再著手研究。過去許多文獻指出在出芽酵母菌中，Dbf4藉由活化 Cdc7 kinase促使細胞進入S phase，進而進行DNA的複製作用，並參與DNA之修補作用，其他物種的*CDC7*與*DBF4*的同源基因產物也被發現具有相同功能，顯示其功能的高度保留性。而早期研究指出，在白色念珠菌之細胞週期之G1 phase轉換至S phase時期為決定細胞型態轉變之重要時期，在此轉變時期中，白色念珠菌細胞將可能由yeast form轉變成具致病性之pseudohypha或hypha form。然而實驗室先前的研究卻顯示白色念珠菌*DBF4* (*CaDBF4*) 與*CDC7* (*CaCDC7*) 皆扮演菌絲形成之負調節者的角色，透過此兩基因對白色念珠菌之型態調節的正相關性，可推測白色念珠菌*CDC7* 及*DBF4*基因產物彼此作用而進行調控，故本研究主要在探討白色念珠菌中

Dbf4與Cdc7是否有直接交互作用，以確認兩者共同調節型態形成。

本研究主要透過將白色念珠菌中之*DBF4*與*CDC7*基因分別接上不同之螢光蛋白基因，並利用白色念珠菌適用之Tet on系統進行螢光基因與目標基因之融合蛋白表現，透過觀察螢光顏色重疊與否可得知白色念珠菌所表現的Dbf4與Cdc7蛋白在白色念珠菌之細胞中所在位置及此兩基因產物彼此是否會進行交互作用。此外，透過取得白色念珠菌中之*DBF4*與*CDC7*基因，將其進行構築在出芽酵母菌之yeast two-hybrid系統下操作，利用此方式可得知白色念珠菌中的Dbf4與Cdc7是否會進行交互作用，此結果將可與螢光蛋白之實驗相互比對驗證。由yeast two-hybrid實驗結果發現，白色念珠菌之*DBF4*及*CDC7*基因產物彼此具有交互作用之特性，而螢光融合蛋白質表現系統，雖預期將符合yeast two-hybrid結果，仍待完成更進一步的實驗方得以進一步確認。

第一章、序論

1. 白色念珠菌

1.1 白色念珠菌與疾病

白色念珠菌(*Candida albicans*) 是一種伺機性真菌，由嬰兒期就存在於我們人體的表面皮膚、腸道、以及口腔內，正常情況下，其存在的量不多，而且與其他人體的各種正常細菌保持平衡。而在免疫抑制患者，例如癌正接受化療患者、後天免疫缺乏症候群患者，與在年幼或老年人，常常會導致念珠菌的感染，嚴重者還會有致死的現象(Odds,1994)。而長期或不當抗生素治療干擾微生物菌叢，則是最可能引起念珠菌症的原因。

近年來因真菌感染所造成疾病之案例有逐漸增加的趨勢，且其中念珠菌類所造成之念珠菌菌血症在世界各大醫院之院內感染統計中更有明顯上升的狀況，而白色念珠菌又為念珠菌菌血症之主要感染原(Beck-Sague and Jarvis, 1993; Cheng et al., 2005; Fridkin and Jarvis, 1996)。而目前常使用對抗白色念珠菌的抗真菌藥物有 polyenes(如 amphotericin B 與 nystatin)、azole antifungals(如 triazole 與 fluconazole)，由於白色念珠菌與哺乳動物細胞皆為真核生物，因此這些藥物的 cellular targets 也會傷害人體正常的細胞，會對人體造成相當程度的副作用，且隨著抗真菌藥物濫用，造成真菌病菌的抗藥性亦逐漸上升，如此將逐漸造成人類醫療的困難與衝擊(Cannon et al.,2007;Ghannoum and Rice,1999)，故對其有透徹的了解以尋找更理想的抗白色念珠菌方法是當務之急。

1.2 白色念珠菌之生物特性

在過去的研究中，針對出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)之研究以相當透徹，並且已有各方面之功能性的深入瞭解，且由於出芽酵母菌與白

色念珠菌演化上之親緣關係相當接近 (Heckman et al.,2001),故在進行白色念珠菌各種研究,例如細胞週期、訊息傳遞、生長形式之基因調控,大多以出芽酵母菌已知之研究結果為出發點再進行針對白色念珠菌相關研究之假設與推論(Berman and Sudbery, 2002)。然而儘管此兩物種之親緣演化關係如此接近,但仍有部分特色非兩物種共同擁有,例如出芽酵母菌之生長形式僅分為yeast形式及pseudohyphae形式,然而白色念珠菌則多了true hyphae之生長形式,這些不同的生長形式有助於白色念珠菌可以在哺乳類宿主上進行生長及全身擴散性感染(Berman and Sudbery, 2002)。除此之外,白色念珠菌更具有其他與出芽酵母菌不同之生物特性,並且此特性造成白色念珠菌研究困難及實驗步驟繁瑣。白色念珠菌在自然界中是以雙倍體存在,其具有分別存在於同源染色體之等位對偶基因,且其缺乏完整有性生殖之細胞週期,所以若要針對白色念珠菌進行遺傳上的改造,會較出芽酵母菌之實驗操作更困難且更複雜。此外,白色念珠菌之密碼子的使用亦與其他物種不同,在一般物種中密碼子與胺基酸的配對大多符合Crick等人所整理完成之遺傳密碼與特定胺基酸配對之規則(Osawa et al., 1992),而白色念珠菌較獨特之部分為其CUG密碼子並非轉譯成白氨酸(Leucine)而是絲氨酸(Serine)(Kawaguchi et al., 1989),之後亦有研究指出絲氨酸之tRNAs可解碼白胺酸密碼子(Cutfield et al., 2000; Perreau et al., 1999),以上白色念珠菌所獨有之特點皆造成其研究上操作的困難。

1.3 白色念珠菌之型態及致病性

白色念珠菌之外表形可因外在環境條件不同而有不同的生長型態(Whiteway and Oberholzer, 2004),而其生長型態主要分成以下幾種:酵母菌之芽胞生長型態(yeast form)、真性菌絲生長型態(True hyphal form)及假性菌絲(pseudohyphal form)(Sudbery et al.,2004);與交配有關的 White cells

及 opaque cells; 及當生存環境條件不佳時會自我聚集產生具保護能力的生物膜。而其各種外表行之轉變與其致病能力有極大相關(Whiteway and Oberholzer,2004)，當白色念珠菌呈現酵母菌之芽胞生長形(yeast form)則易於全身系統性感染的散佈，而大部分研究白色念珠菌之致病力，主要以白色念珠菌由酵母菌芽胞生長型態轉變為真菌絲之能力為主，因芽孢型態轉變為菌絲型態時，則其入侵宿主細胞及黏膜表皮層能力上升，進而導致疾病的發生(Lo et al.,1997;Rocha et al.,2001)。其生物膜之形成，將有利於白色念珠菌在惡劣環境，如有抗真菌藥物之環境下生存(Baillie and Dougues,2000;Lamfon et al.,2004)。

1.4 *DBF4*基因與*CDC7*基因之相關性

DNA 複製作用在各物種皆相當重要，各物種在成長過程中，透過不斷的細胞分裂增生與組織分化之種種演變，而逐漸形成完整個體，而當成長過程中之細胞分裂增生進行的同時，亦伴隨著 DNA 之複製作用，故控制 DNA 複製之調控機制在各物種皆高度保留，而在過去許多研究指出，在其他許多物種中 *CDC7* 及 *DBF4* 之基因產物與細胞週期之運作相關，*DBF4* 之基因產物主要透過與 *CDC7* 基因產物進行結合，並且調控 Cdc7 kinase 促使 DNA 進行複製與合成，進而促使細胞之細胞週期由 G1 phase 進入 S phase。

根據與白色念珠菌有較高同源關係的出芽母菌之過去研究得知 *CDC7* 與 *DBF4* 為控制細胞有絲分裂 G1/S transition 的重要基因(Kitada et al., 1992; Ohtoshi et al.,1997)，Cdc7 之主要扮演蛋白激酶的角色，且會受到 Dbf4 之調控，此兩種基因產物會彼此結合形成 DDK (Dbf4 dependent kinase)，此 Cdc7-Dbf4 kinase 會促使 DNA 之合成作用的進行，並為 DNA 修補及減數分裂中的基因重組所需，且為影響出芽酵母菌生存與否之必要基因

(Patterson M et al.,1986 ; Bahman M et al.,1988)。在DNA開始複製之前所形成的複合物稱為pre-RC (pre-replication complex)，之後稱 post-RC (post-replication complex)，其前後之區分主要是由MCM (minichromosome maintenance proteins) complex 是否停留在複製啟始位作為區分，ORC(origin-recognition complex)與MCM10 在細胞週期過程中皆持續鍵結在複製啟始位上，作為複製過程中各種蛋白進行交互作用的基礎。在DNA進行複製前，即在G1 phase，Cdc6 與Cdt1會結合到複製啟始位，即進入pre-RC階段，接著Cdc6與Cdt1會幫助MCM2-MCM7與MCM10鍵結，當MCM complex鍵結完成後，Cdc7-Dbf4 kinase會在G1 phase與MCM complex鍵結，在進入S phase之同時Cdc6會離開複製啟始位，且Cdc7-Dbf4 kinase會磷酸化MCM complex，此作用會促使MCM complex之結構改變，令MCM complex 活化而具有helicase之活性，接著Cdc7-Dbf4 kinase 與Cdt1會離開複製啟始複合物，Cdc45會與MCM complex結合並作用，並促使DNA複製 (Lei M and Tye BK., 2001)。

1.5 研究動機及主要發現

由於出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)之過去研究背景完整，並具有單倍體之特性，演化上的親源關係與白色念珠菌較為相近，且此兩物種擁有許多高度同源之基因，故在進行白色念珠菌之各種基因功能之探究前，大多會依出芽酵母菌已知之資訊進行推測，進而透過實驗加以證實。而過去研究指出出芽酵母菌之細胞週期中，G1/S phase轉換期為其細胞型態轉變之主要時期 (Sherlock and Rosamond, 1993)，且過去亦有研究指出，白色念珠菌在G1/S phase轉換期間為決定其轉變成致病型之主要時期，因此透過深入探討白色念珠菌其細胞週期之G1/S phase轉換期內部調控機制，望可得知決定其致病與否之機制。

由過去研究得知，在出芽酵母菌及其他許多物種中，其細胞週期之G1 phase至S phase階段皆有Cdc7與Dbf4共同參予，促進其細胞週期的運作，以達到細胞增生與生存之目的，而Cdc7本身為具有kinase之功能，但必須經過活化才具有磷酸化受質之活性，而Dbf4則扮演調節與活化Cdc7 kinase活性之角色，Dbf4會與Cdc7 kinase結合形成DDK (Dbf4 dependent kinase)，進而促使DNA進行複製作用，此外此複合體亦為DNA 修補、及孢子生成所需，由此可得知此複合體之作用對於其他物種而言不可或缺。然而令人意外的是，實驗室之前研究卻證明白色念珠菌之Dbf4及Cdc7具有菌絲生成的遏止角色。因此本研究乃透過實驗觀察*DBF4*與*CDC7*之基因產物是否具有交互作用現象為主要目標，以確認Dbf4仍扮演Cdc7 kinase依賴之調節次單元角色，進而達成遏止菌絲生成之目的。

主要透過兩種方式進行實驗確認，分別為在白色念珠菌體內促Tet-on系統表現目標基因與螢光蛋白基因，進而形成融合蛋白質，而利用螢光顯微鏡進行觀察此*CaDBF4*與*CaCDC7*之基因產物所在位置，另一方式為透過yeast two-hybrid方式，得知此*CaDBF4*與*CaCDC7*之基因產物是否會進行交互作用。

經yeast two-hybrid實驗結果得知，*CaDbf4*及*CaCdc7*會彼此交互作用，並促使Gal4之activation domain與DNA binding domain產生連結，進而促使Gal4扮演轉錄因子，活化調控*HIS3*報導基因之驅動子，令出芽酵母菌可自行合成histidine此必須胺基酸而可存活於缺乏histidine之培養基中。而Tet-on系統活化螢光融合蛋白質表現之實驗，*CaDBF4*—CFP與*CaCDC7*—YFP所表現之融合蛋白經螢光顯微鏡觀察，確認同一白色念珠菌菌株，可同時表達CFP與YFP之螢光蛋白質，而必需透過更高倍數之觀察，才可確認*CaDBF4*—CFP與*CaCDC7*—YFP之表現在細胞中是否位在一個位置，進而得知*CaDbf4*與*CaCdc7*是否具有交互作用現象，以確認白色念珠菌是否與其他物種相同，擁有高度保留之*CaDbf4*與*CaCdc7*交互作用

特性。

第二章、材料與方法

1. 所使用之大腸桿菌、白色念珠菌及出芽酵母菌菌株

1.1 大腸桿菌菌株(*Escherichia coli*)

DH5 α

[Φ 80dlacZ Δ M15,*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17*(r_k^- , m_k^+)
supE44, relA1, deoR, \Delta(lacZYA-argF)U169, phoA]

1.2 白色念珠菌菌株(*Candida albicans*)

SC5314

[Wild type]

BWP17

[*ura3* Δ ::*imm434/ura3* Δ ::*imm434* *his1*::*hisG/his1*::*hisG*
arg4::*hisG/arg4*::*hisG*]

1.3 出芽酵母菌菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)

AH109 (*Mat a*)

[*trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4* Δ , *gal80* Δ ,
LYS::*GAL1 UAS-GAL1 TATA-HIS3, GAL2 UAS-GAL2 TATA-ADE2,*
URA3::*MEL1 UAS-MEL1 TATA-LacZ*]

Y187 (*Mat a*)

[*trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, ade2-101, met-*, *gal4* Δ ,
gal80 Δ , *URA3*::*GAL1 UAS-GAL1 TATA-LacZ*]

2. 所使用之載體

pCR 2.1-TOPO (invitrogen)

pGEM-T Easy

pTET25 (Park and Morschhäuser, 2005)

pTET25M-NC(Lai, W. C. , unpublished results)

pACT2

pGBKT7

3. 白色念珠菌、大腸桿菌及出芽酵母菌品系之建構

3.1 大腸桿菌各品系建構

3.1.1 質體建構

3.1.1.1 載體製備

攜有質體之細菌通常會儲存於含有LB及甘油(抗凍劑)之環境，並放置於-80°C 冷凍，若須此質體進行實驗，則只需取少許菌塊回養於含有適合抗生素之LB培養液中，培養於37°C 之環境16~18小時後即可利用 plasmid purification kit 抽取質體，接著依實驗目的對質體進行後續步驟。

3.1.1.1.1 限制酶作用

限制酶主要功能為針對目標DNA片段中之特定序列進行切割，以利不同DNA片段之接合作用(Ligation)，而限制酶反應時通常需要有目標DNA、限制酶、限制酶所需緩衝液，牛血清白蛋白及二次去離子水，而不同的限制酶在不同的緩衝液裡反應的效率也各有不同，須依實驗目的與作用環境進行調整，且不同限制酶之有效作用時間與溫度亦列入考慮，如此才能提供限制酶最完善之作用環境。

3.1.1.1.2 鹼性去磷酸根作用(Alkaline Phosphatation)

載體經限制酶作用後，透過利用鹼性去磷酸根方式將載體5'端之磷酸根去除，經此步驟作用後之載體，可以防止在後續實驗之接合反應(Ligation)時發生載體限制酶作用端自黏(self ligation)現象，透過此方式將可提高成功接合反應之效率。此反應主要作用之酵素為牛腸道鹼性磷酸酶(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP)，此外需有欲進行去磷酸根之載體DNA、鹼性磷酸酶反應所需緩衝液及去離子二次

水，而反應條件依不同廠牌而異

3.1.1.2 嵌入 DNA(Insert DNA)之製備

嵌入DNA (insert DNA)之來源主要分成兩種，一為原本位在其他質體上，必須經過限制酶作用與膠體純化方式才可獲得此嵌入DNA片段，另一為透過利用帶有限制酶切為點之引子(primer)對目標DNA片段進行放大後，在透過限制酶作用後經膠體純化或PCR clean up方式進行嵌入DNA之純化。

3.1.1.2.1 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

DNA聚合酶之種類較多，其中我們在建構大腸桿菌品系時，較常使用pfu DNA polymerase(pfu DNA聚合酶)，而進行各種品系建構確認時大多利用Taq DNA polymerase(Taq DNA聚合酶)。其中pfu DNA聚合酶具有3'向5'端之外切酵素活性(3' to 5' exonuclease activity)，可以校正DNA合成過程所產生之錯誤，透過此方式將可有助於製備嵌入DNA時有較高之正確率，而Taq DNA聚合酶則不具有DNA校正功能(proof reading)。

3.1.1.2.2 Taq DNA 聚合酶進行PCR產物3'端加A鹼基作用

經過pfu DNA polymerase進行PCR後之產物為上下游分別帶有酵素切點之平滑端(blunt end)或兩端帶有特定基因之短序列互換區(short-flanking homology)之平滑端DNA片段，若欲進行後續步驟之TA Cloning(TA選殖)操作，則必須另此上下游為平滑端之DNA片段進行3'端加A鹼基作用(A-tailing)，此產物之後必須進行後續實驗步驟，故必須將此作用產物進行PCR clean up方式將DNA進行純化，才有利於後續實驗之利用。

3.1.1.2.3 TA cloning

TA cloning (TA選殖)可提供我們快速且便利將嵌入DNA接入載體中之方法，當實驗中透過PCR方式大量放大帶有限制酶切點之嵌入

DNA後，可透過TA選殖方式將嵌入DNA與載體接合可進行嵌入DNA之定序與保存。

3.1.1.2.4 限制酶反應

要進行將嵌入DNA與實驗所需之載體接合時，必須透過限制酶作用後才可由TA cloning之質體中取下嵌入DNA。進行此步驟前必須先將帶有此質體之細菌進行培養16~18小時，有利於嵌入DNA隨著TA載體進行大量複製，之後透過質體抽取純化方式將帶有嵌入DNA之質體進行純化，得此質體後透過可對嵌入DNA兩端所帶有之限制酶切點進行作用之限制酶對此質體進行作用，作用後透過膠體純化方式將嵌入DNA進行純化與回收，即可獲得可與載體進行接合反應之嵌入DNA。

3.1.1.3 接合反應(ligation)

將製備完成之目標載體與嵌入DNA各取少量體積進行膠體電泳，接著透過數位元化影像分析系統(Alpha Imager)分別計算出載體與嵌入DNA之IDV數值(integrated density value)，此載體及嵌入DNA之IDV數值比即為彼此之DNA重量比，接著將載體與嵌入DNA之IDV值分別除上當時進行膠體電泳時分別取之體積，則可得單位體積下所含有DNA之重量比。接著將載體與嵌入DNA單位體積下之DNA重量數值除上各別之DNA片段大小，即可獲得載體與嵌入DNA單位體積下DNA之莫耳數比。各種載體與嵌入DNA之不同莫耳數比接合效率不同，故需視不同實驗內容決定莫耳數比。

3.1.2 勝任細胞之製備(Competent Cells)

3.1.2.1 氯化鈣化學法製備勝任細胞(CaCl₂ Competent cell)

首先吸取少許大腸桿菌*Escherichia coli* -80°C的保存菌液或從4°C培養基上挑取單一菌落放入2ml LB broth，37 °C震盪培養隔夜，然後取500 μ l 的隔夜菌液放入50ml LB broth 中，繼續37 °C震盪培養約3小時，直到O.D.595 值約為0.5~0.6，再置於冰上15 分鐘，接著4 °C離

心4000 rpm 10 分鐘，離心完倒掉LB broth 並加入15ml 4 °C的0.1M CaCl₂，然後輕微沖洗細菌pellet 使其均勻分佈於CaCl₂ 中，混合之後將其插冰上30 分鐘，緊接著4 °C離心4000rpm 10 分鐘，離心完倒掉CaCl₂ 並加入3ml 4°C的0.1M CaCl₂ / 0.1%甘油，最後將其分裝於1.5ml 的微量離心管中便可以保存於-80 °C 冰箱。

3.1.3 轉型作用(transformation)

3.1.3.1 氯化鈣化學法轉形作用

首先取出適量DNA 放入200µl CaCl₂ 勝任細胞中，然後置於冰上 30 分鐘，接著於42 °C 熱休克 (heat shock) 兩分鐘，一邊反應一邊搖晃此其受熱均勻，結束之後先在冰水中搖晃約10 秒，再插在冰上2 分鐘，加入1ml 的SOC 並於37°C培養1 小時讓細胞恢復，接著離心 3000-4000rpm 5 分鐘，再倒掉大部分培養液，留下大約100-150µl，並將pellet 懸浮混合均勻，最後利用玻璃棒或是玻璃珠塗於可以用來篩選的固態培養基上，置於 37°C培養隔夜。

3.1.4 *Escherichia coli* colony PCR

將培養基菌落挑起後與15µl之STE或d₂H₂O進行混合均勻，從15µl混合液中取出7µl進行PCR反應，而PCR反應所使之條件除了範本DNA增加為7µl其他皆不變，引子亦可以當時放大嵌入DNA之引子進行使用，而餘之8µl則可外加LB細菌培養基於37°C進行培養，若經PCR確認該菌內的確帶有嵌入DNA之片段，則可將所剩之菌液再加入適量LB培養基與抗生素進行培養16~18hr，之後可透過質體抽取及限制酶作用確認大小，則可得知該質體建構是否完成。

3.1.5 限制酶作用結果確認

經*E. coli* colony PCR初步確認正確之菌落，經重新回養16~18hr後透過質體抽取方式取得該菌所帶有之質體，接著透過利用當時設計嵌入DNA兩端所帶有之限制酶切點所屬之限制酶對該抽取之質體進行作用，

限制酶作用1~2hr後經由DNA膠體電泳方式進行載體與嵌入DNA之大小確認，若經膠體電泳所得之兩DNA片段大小符合質體建構時載體與嵌入DNA之大小，則可確認此質體建構正確無誤。

3.2 白色念珠菌及出芽酵母菌品系建構

3.2.1 酵母菌之醋酸鋰轉型實驗

首先從固態培養基或是 -80°C 保存的菌液挑取一點，置於放有約2ml 液態培養液 (YPD or SC) 的養菌管中，置於 30°C 培養隔夜，然後在此菌液取一部分放於含有50ml 培養液的錐形瓶中，於 30°C 培養隔夜，使之達到O.D.595 值約0.5~0.6 (log phase)，O.D.595 值到達之後便離心3000 rpm 5 分鐘，將上清液去除，接著利用10ml 無菌二次水清洗一次，再離心3000 rpm 5分鐘並倒掉上清液，每管pellets各加入1.5ml之1x TE/LiAc(300 μl 10xTE + 300 μl 10x LiAc + 2.4ml $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$)進行回溶，並令其懸浮均勻，接著將經醋酸鋰作用完全之念珠菌進行分裝，分裝方式以100 μl 分裝一管。取1~5 μg 愈轉型之現狀或環狀DNA加入10 μl 10 mg/ml之單股鮭魚精子 DNA/salmon sperm DNA (此鮭魚卵精子使用前必須先分裝欲轉型的數量於PCR試管中，每份轉型樣本需要100 μg 之salmon sperm DNA，於PCR機器中進行 95°C 十分鐘令雙股salmon sperm DNA進行denature成單股形式，接著於 4°C ∞ 分鐘處理以保持其維持單股型態)中，將其稍為混勻後置於 4°C 之冰上，靜待念珠菌轉型時所用。配製40% PEG3350 / 1xTE / 1xLiAc，每份轉型樣本需700 μl (560 μl 50% PEG.3350 + 70 μl 10x TE + 70 μl 10x LiAc)。已先經過醋酸鋰處理過之念珠菌，欲轉型之DNA與單股鮭魚精子DNA混合液，及40% PEG3350 / 1xTE / 1xLiAc 溶液準備好後，將一份欲轉型之DNA與單股鮭魚精子DNA混合液，加進一份經醋酸鋰處理過之念珠菌，緊接著將40% PEG3350 / 1xTE / 1xLiAc 溶液與配置後之混合液混勻，將此混合液放置於 30°C 培養箱搖晃震盪培養16~18 小時。隔天將其置於 44°C 熱休克15分鐘，熱休克作用完後，

將菌液進行快速離心，將上清液去除（盡量完整去除），所離心下之菌塊再加入100~200之無菌二次清水進行回溶，接著將菌液均勻塗抹於可篩選用之固態培養基上，置於30°C培養箱進行培養2~3天。

3.2.2 酵母菌菌落聚合酶連鎖反應(Yeast Colony PCR)

當白色念珠菌經轉型作用後，若成功於篩選用之培養基生長則進行 Yeast colony PCR之確認，確認是否該DNA片段有成功送入念珠菌中。須先配置首先配製 30 μ l 0.8% NaOH，再挑取一顆菌落於其中並 vortex 使其混合均勻，之後加熱95°C 15 分鐘，然後快速離心1 分鐘，將細胞殘骸離下，上清液中即有，最後即可取上清液進行PCR 反應，由於NaOH 亦會影響PCR 反應，故每25 μ l之聚合酶連鎖反應，最多加入2 μ l之DNA上清液。

4. 菌株培養條件

4.1 大腸桿菌菌株培養

4.1.1 使用之培養基、培養液及藥品

4.1.1.1 使用之培養基及培養液

在進行各種質體建構過程中，必須透過不同成分之培養基進行篩選與培養，故培養基之成分與種類也相當重要。而本實驗主要使用之大腸桿菌培養液有Luria-Bertanti (LB)培養液(1% Tryptone , 1% NaCl , 0.5% Yeast Extract , pH7.2 ~ 7.4)、含有50 μ g/ml ampicillin 之LB培養液、含有50 μ g/ml kanamycin 之LB培養液及SOC培養液(2% Tryptone , 10 mM NaCl, 2.5mM KCl, pH7.2~7.4, 10ml 2M MgSO₄ · 7H₂O, 10ml 2M glucose)。所使用之培養基主要為LB培養基、含有50 μ g/ml ampicillin 之LB培養基、含有50 μ g/ml kanamycin 之LB培養基。

4.2 白色念珠菌及出芽酵母菌菌株培養

4.2.1 使用之培養基、培養液及藥品

4.2.1.1 使用之培養基及培養液

實驗過程中進行白色念珠菌及出芽酵母菌之培養，所使用之培養液有YPD培養液(2% Peptone, 1% Yeast Extract, 2% Glucose, pH 5.4~5.6)、SC-Ura培養液(0.67% Yeast nitrogen base without amino acid, 0.192% Yeast synthetic drop-out media supplement without Uracil, 2% Glucose)、SC-Trp培養液(6.7g/L Yeast nitrogen base without amino acid, 2g/L Yeast synthetic drop-out media supplement without leucine, tryptophan, and histidine, 80mg/L histidine, 2% glucose)、SC-Leu培養液(6.7g/L Yeast nitrogen base without amino acid, 2g/L Yeast synthetic drop-out media supplement without leucine, typtophan, and histidine, 80mg/L tryptophan, 80mg/L histidine, 2% Glucose)及SC-Leu-Trp培養液(6.7g/L Yeast nitrogen base without amino acid, 2g/L Yeast synthetic drop-out media supplement without leucine, tryptophan and histidine, 80mg/L histidine, 2% Glucose)。而所使用之培養基為YPD、SC-Ura、SC-Leu、SC-Trp、SC-Leu-Trp及SC-Leu-Trp-His 培養基。

4.2.1.2 使用之藥品

白色念珠菌培養時所使用之藥品為誘導重組蛋白質表現之doxycycline。出芽酵母菌培養時所使用之藥品為抑制histidine合成路徑中所必須之imidazoleglycerol-phosphate dehydratase酵素之化學物質，3-amino-1,2,4-triazole。

4.2.2 表現重組蛋白質之白色念珠菌菌株的培養條件

令白色念珠菌表現螢光重組蛋白，主要是利用Tet-on系統進行誘導欲研究之螢光重組蛋白，令該螢光重組蛋白於白色念珠菌中大量表現，而有利於螢光觀察。此Tet-on系統主要建構於pTET25M載體上，此載體主要含有ADHI promoter(P_{ADHI})，*Candida albicans* reverse Tetracycline-dependent transactivator(*CartTA*)轉譯序列，及Tet operator(Tet操作子)。

其中*ADHI* promotor主要特色為其可持續性的表現其下游基因，因此其可持續表現皆於其下游之*CartTA*，而當*CartTA*與環境中人為添加之Doxycycline結合時，此*CartTA*則可與Tet operator 結合，進而啟動下游基因表現；故若將欲研究之重組蛋白質之轉譯序列接於pTET25M中之tet operator下游，並將此建構完成之質體，利用LiAC transformation方式入白色念珠菌中，並透過利用*ADHI*同源序列進行同源互換以嵌入白色念珠菌BWP17菌種之*ADHI* 基因座上，即可利用doxycycline進行誘導目標重組蛋白質之大量表現。

透過Tet-on system進行重組蛋白表現，會因為欲研究之重組蛋白不同，而其所須的誘導時間也會有所不同，故進行Tet-on system表現重組蛋白前，會先測試重組蛋白質在各個誘導時間下之表現情形與表現量，進而找出之後實驗之最佳誘導時間。

將帶有Tet-on系統表現重組蛋白質之基因的白色念珠菌菌種，接種於2ml YPD培養液(1.8ml YPD + 0.2ml 20% glucose)中，並將此菌培養於30°C 培養箱至隔天，接著由2ml之菌液中取約0.5~1 ml菌液加入50ml YPD培養液(45ml YPD + 5ml 20% glucose)中，培養於30°C 且以200 rpm進行搖晃旋轉培養，培養2~ 4小時至菌量為OD600為0.6~0.8之間時將50ml菌以每3ml分裝成一管，每兩支養菌管為一組，一組加入40~50µg/ml之doxycycline，而另一管不加入doxycycline當做本實驗之對照組，將此兩組菌液置於30°C 培養環境進行培養，並於各個時間點(0、2、4、6、8、10、12及24hr)收取各組不同時間點之菌液，進行螢光重組蛋白表現強弱，接著需將每個時間點所收取之菌液以13000rpm離心一分鐘，將上清液去除後每管再加入1ml 1X PBS(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH 7.5)，清洗菌體，接著在用13000rpm離心一分鐘，再將上清液去除後，將離心後所得之菌體進行保存於-80°C，靜待白色念珠菌重組蛋白抽取，以及透過利用西方點墨法，進而找出Tet-On

系統誘導螢光重組蛋白之最佳時間與條件。

經過各種時間點測試後，發現以40~50 μ g/ml之doxycycline於30 $^{\circ}$ C環境下誘導螢光重組蛋白第8個小時最為適當，之後進行螢光觀察時，皆都會以此時間點進行螢光重組蛋白表現之觀察。

4.2.3 出芽酵母菌各品系菌株培養條件

Yeast two-hybrid系統運作主要建構於出芽酵母菌中，本實驗主要透過利用Yeast two-hybrid原理及操作方式進行觀察白色念珠菌之Cdc7與Dbf4是否具有交互作用之現象。將白色念珠菌之*DBF4*與*CDC7*基因分別接入帶有GAL4 activation domain及LEU2 marker之pACT2載體及帶有GA4 DNA binding domain及*TRP1* marker之pGBKT7載體，將此兩載體分別送入AH109及Y187此兩不同型之出芽酵母菌，透過出芽酵母菌培養之營養缺乏篩選方式，確認建構完成之兩質體接成功送入兩單倍體之出芽酵母菌種中，接著令單倍體之出芽酵母菌進行雜合，將此兩帶有質體之單倍體出芽酵母菌分接種於2ml SC-leu(1.8ml SC-leu + 0.2ml 20% glucose)與2ml SC-Trp(1.8ml SC-leu + 0.2ml 20% glucose)中進行培養至隔天，接著將此兩菌種進行重新回養於與昨天相同條件之培養中，培養2hr後進行OD600之菌量測試，藉由參考菌量測試之結果進行吸取OD600為0.1之菌液體積，將此兩菌種之菌液進行離心13000 rpm，將上清液去除後，利用100 μ l YPD+20% glucose培養液進行菌塊混合，將此菌株混合液均勻塗抹於YPD+20%glucose之培養基上，進行培養4.5hr後，直接從培養基上加入1.5ml SC-Leu-Trp之培養液，在利用抹菌棒將所有生長於培養基上之菌落刮落，回收於1.5ml離心管中，接著將回收之菌液體進行13000rpm離心，將部分上清液去除後留下約200 μ l之培養液與離心後之菌塊混勻，接著取混勻之菌液100 μ l均勻塗抹於SC-Leu-Trp+20%Glucose，此外由於本實驗所使用之yeast two -hybrid系統主要使用之報導基因為*HIS3*，此基因產物為histidine合成路徑中所必須之酵素，因此為了探討白色念珠菌之

Cdc7與Dbf4是否具有交互作用，進而促使Gal4 transcription factor活化報導基因之表現，將混合之菌液取100µl均勻塗抹於SC-Leu-Trp-His + 20%Glucose培養基，將此兩種培養基接置於30°C培養，以確認白色念珠菌之Cdc7與Dbf4是否具有交互作用之現象。

確認白色念珠菌之Cdc7與Db4確實有交互作用後，接著探討此兩基因產物交互作用之強度，所利用之方式主要透過在經雜合成功之出芽酵母菌養環境中添加化學物質(3-amino-1,2,4-triazole)，進行抑制*HIS3*基因之表現，因此此化學物質之功能為與Gal4-AD-*Ca*Dbf4及Gal4-BD - *Ca*Cdc7功能互為拮抗，可透過此方式進行觀察白色念珠菌之Dbf4與Cdc7交互作用強度。

第三章、結果

1. 酵母菌雙雜合系統 (Yeast two-hybrid) 建構

酵母菌雙雜合系統有助於確認兩目標基因(X gene and Y gene)產物是否具有交互作用關係存在，其主要實驗原理為將X gene與DNA-binding domain (BD)的基因fusion於表現載體中，將Y gene與 Activating domain (AD)的基因fusion於另一表現載體中。將這兩個表現載體轉形至酵母菌內，便能表現出兩個雜交體蛋白 (hybrid protein)，一為X protein－BD hybrid protein；另一為Y protein－AD hybrid protein (故稱為two-hybrid system)，若 X與Y具有交互作用關係，則可藉XY蛋白結構的連結進而活化下游reporter gene (如*HIS3* gene) 的表現。若不具reporter gene的活性，表示X與Y不具交互作用之現象，因此無法活化下游報導基因之表現。而本研究即以白色念珠菌之*CDC7*與*DBF4*為研究對象進行實驗。

2.1 質體建構

2.1.1 建構pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4*質體

本質體之建構中之主要基因為白色念珠菌之*DBF4*基因，而此基因主要來自於白色念珠菌之BWP17菌株，取得方式主要透過設計一對引子對經酵母菌genomic DNA抽取方式所取得之白色念珠菌基因組DNA進行PCR聚合酶連鎖反應放大*CaDBF4*基因，其Forward primer除了具有專一性會辨認*DBF4*序列之數個核苷酸片段外，還具有之後有利於與載體(pACT2)進行接合之限制酶切點*Xma*I，Reverse primer具有有利與載體接合之限制酶切點*Xho*I，經過聚合酶連鎖反應後可得到*CaDBF4*其兩端分別帶有*Xma*I與*Xho*I限制酶切點，將此帶有限制酶切點之*CaDBF4*利用TA Cloning方式接入pGEM-T Easy 載體中進行保存經由大腸桿菌進行大量複製此帶有*CaDBF4*基因之pGEM質體，透過*Xma*I與*Xho*I限制酶作用後經由膠體純化方式將*CaDBF4*基因進行回收純化，嵌入DNA

製備完成(圖三)。

pACT2載體上含有ampicillin resistant gene(Amp^r)、*LEU2* selection marker(*LEU2*)、*ADH1* promoter(P_{ADH1})、GAL4 activation domain(GAL4 AD)、MCS(multiple-cloning sites)及*ADH1* terminator(T_{ADH1})，此質體為 shuttle vector且其含有分別可在細菌與酵母菌中篩選之基因，即 ampicillin resistant gene、*LEU2* gene，而在*ADH1*Promoter與*ADH1* terminator間則帶有GAL4 AD且下游緊接著MCS，可提供帶有不同限制酶切點之嵌入DNA (insert DNA)接入此載體。此pACT2載體經由大腸桿菌進行大量複製後，透過質體抽取純化方式可獲得pACT2質體，接著透過利用與嵌入DNA(*CaDBF4*)兩端所帶有之限制酶切點相同之限制酶進行作用，將pACT2利用*XmaI*與*XhoI*作用完成後，由於經限制酶作用後並不會分離出不必要之DNA片段，pACT2只會由原本之環狀轉變成線性結構，故採取PCR clean up方式進行載體純化。當*CaDBF4*(insert DNA)與pACT2(vector)皆經特定限制酶作用且純化後，透過不同比例進行接合反應(ligation)，將*CaDBF4*利用與pACT2載體MCS中所含有之*XmaI*及*XhoI*限制酶切點進行接合，接著透過大腸桿菌轉型作用(transformation)將 ligation產物送入大腸桿菌，經由ampicillin之抗生素篩選，及限制酶作用後可確認pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4*質體建構完成(圖四、圖六)。

2.1.2 建構pGBKT7-Gal4 BD-*CaCDC7*質體

此質體之建構方式與pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4*類似，而此質體之建構主要之嵌入DNA為白色念珠菌之*CDC7*基因，透過利用具有對*CaCDC7*專一性之引子以BWP17 genomic DNA中之*CaCDC7*基因為模板進行聚合酶連鎖反應，進而產生大量白色念珠菌之*CaCDC7*基因編碼區，而進行聚合酶連鎖反應所使用之引子皆對*CaCDC7*基因序列具有專一性，此外forward primer還帶有*NcoI*限制酶切點，而reverse primer帶有

*PstI*限制酶切點，因此經由限制酶連鎖反應將*CaCDC7*基因進行放大後，可得到兩端帶有*NcoI*與*PstI*限制酶切點之*CaCDC7*基因序列，透過利用PCR clean up方式將*CaCDC7*基因片段進行回收，接著利用左右兩端限制酶切點進行作用之酵素*NcoI*與*PstI*對該基因片段進行作用，再透過PCR clean up純化方式可獲得經限制酶作用之*CaCDC7*基因序列，此即為將與pGBKT7載體進行接合反應之嵌入DNA(insert DNA)(圖五)。

pGBKT7載體上含有kanamycin resistant gene(Kana^r)、*TRP1* selection marker(*TRP1*)、*ADHI* promoter(*P_{ADHI}*)、GAL4 DNA binding domain、MCS及*ADHI* terminator(*T_{ADHI}*)，此載體所含有之kanamycin resistant gene有利於帶有此載體之系菌可在有Kanamycin抗生素環境下生長，而*TRP1*基因之產物則為tryptophan胺基酸合成所必須，因此有利於帶有此質體之酵母菌可在缺乏tryptophan環境下生長，而GAL4 BD下游之MCS有利於帶不同限制酶切點之insert DNA接入此載體。透過帶有此載體之大腸桿菌隨著其複製而產生大量 pGBKT7載體，接著透過利用與*CaCDC7*兩端之限制酶切點相同之酵素*NcoI*與*PstI*進行作用後，透過PCR clean up方式將作用產物進行回收，再與*CaCDC7*透過不同比例進行接合反應，經培養基篩選與限制酶作用後確認，pGBKT7-Gal4 BD- *CaCDC7*建構完成(圖五、圖六)。

2.2 出芽酵母菌菌株建構

2.2.1 建構AH109--pACT2-GAL4 AD-CaDBF4出芽酵母菌菌株

以上兩種不同質體建構完成後，接著必須將兩質體分別送入不同株出芽酵母菌中，送入之質體可單獨存在出芽酵母菌中，由於pACT2及pGBKT7質體上皆帶有分別可供大腸桿菌辨認之DNA複製起始點(col E1 ori、pUC ori)與供出芽酵母菌辨認之DNA複製起始點(2 μ ori)，因此此兩質體可在出芽酵母菌中進行複製，而不會因為隨著出芽酵母菌進行細胞分裂而質體含量逐漸被稀釋，最後導致無質體存在出芽酵母菌中。

pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4*質體建構完成後，將此質體於大腸桿菌中進行大量複製，接著透過質體抽取純化方式獲得大量質體，再利用出芽酵母菌之LiAc transformation方式將pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4*質體轉殖入AH109 (*Mat a*)之出芽酵母菌中，由於AH109出芽酵母菌經過營養缺陷之改造，將其合成某些必須胺基酸的基因進行突變，例如*trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*基因，導致其無法自行製造某些必須胺基酸，例如: tryptophan、leucine、uracil 及histidine，因此可以透過培養基之胺基酸營養缺乏方式進行出芽酵母菌菌株篩選(圖七-B.)，而由於pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4*質體上帶有*LEU2*基因，此基因所表現之基因產物為Beta-isopropylmalate dehydrogenase，此酵素為leucine胺基酸生化合成路徑中第三步驟所需之酵素，因此若成功將pACT2-GAL AD-*CaDBF4*質體送入AH109出芽酵母菌株中，則可令此AH109菌株由質體獲得*LEU2*基因，而可自行產生Beta-isopropylmalate dehydrogenase，進而可自行製造leucine胺基酸，故此酵母菌可在缺乏leucine之培養環境下進行生長。經LiAc transformation操作後，發現確實有菌落於SC-leu之缺乏leucine培養基上長出，接著透過利用yeast colony PCR確認此質體確實送入AH109出芽酵母菌中，此AH109--pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4*出芽酵母菌菌株建構完成(圖八)。

2.2.2 建構Y187-pGBKT7-GAL BD-*CaCDC7*出芽酵母菌菌株

pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7*質體建構完成後，透過利用大腸桿菌將此質體進行大量複製，接著利用質體抽取純化方法將此質體進行回收，再利用出芽酵母菌LiAc transformation方法將pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7*質體轉殖送入Y187(*Mat a*)株中，由於Y187之出芽酵母菌菌株經營養缺乏之改造，其合成tryptophan、leucine、uracil、histidine、adenine及methionine等必需胺基酸之必要基因*trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*皆遭到突變或剔除，因此可透過培養基之胺基酸營養

缺乏方式進行出芽酵母菌菌株篩選(圖七-A)。由於pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7*質體上帶有*TRP1*基因，而此基因表達之基因產物為Phosphoribosylanthranilate isomerase，此酵素為tryptophan合成路徑中第三步驟產物轉換所需酵素，因此若成功將pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7*質體送入Y187出芽酵母菌株中，則此Y187菌株則可由質體獲得*TRP1*基因，令其可以自行合成Phosphoribosylanthranilate isomerase酵素，而有利於自行合成tryptophan之必需胺基酸，因此可令帶有pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7*質體之Y187酵母菌菌株可在缺乏tryptophan胺基酸培養環境下進行生長。而將此質體經LiAc transformation方式送入Y187出芽酵母菌中後發現有菌落於缺乏tryptophan胺基酸之培養基上生長，而進一步利用出芽酵母菌之yeast colony PCR方式確認pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7*質體的確已送入Y187出芽酵母菌中，確認Y187-pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7*出芽酵母菌菌株建構完成(圖九)。

2.2.3 建構AH109- *pACT2-GAL4 AD-CaDBF4*與Y187-*pGBKT7-GAL4 BD-CaCDC7*進行mating後之雙倍體出芽酵母菌菌株

當完成AH109--*pACT2-GAL4 AD-CaDBF4*與Y187--*pGBKT7-GAL4 BD-CaCDC7*之出芽酵母菌菌株建構完成後，由於必需進一步實驗觀察白色念珠菌之*CDC7*與*DBF4*基因產物是否具有交互作用現象，因此將此兩出芽酵母菌菌株AH109及Y187透過利用mating之方式令此兩單倍體之出芽酵母菌轉變成雙倍體之出芽酵母菌，進而可令兩質體上之*CaCDC7*與*CaDBF4*基因可於同一株出芽酵母菌中進行表達，接著可透過觀察報導基因之表達與否，進而確認白色念珠菌之Cdc7與Dbf4是否具有交互作用現象(圖十)。令皆為單倍體出芽酵母菌之AH109與Y187菌株，透過如第二章之4.2.3出芽酵母菌各品系菌株培養條件內容中所提到的實驗操作方式進行mating，而將mating後之菌液均勻塗抹於同時缺乏兩種胺基酸tryptophan、leucine之培養基(SC-leu-trp)中進行測試其成長能力，由

此可得知分別帶有不同質體之不同酵母菌菌株，是否成功完成mating步驟，由實驗結果可以發現此兩菌株確實已完成mating動作，確認*AH109-pACT2-GAL4 AD-CaDBF4*與*Y187-pGBKT7-GAL4 BD-CaCDC7*進行mating後之雙倍體出芽酵母菌菌株建構完成(圖十一)。

2.3 功能性分析

2.3.1 白色念珠菌Cdc7與Dbf4之交互作用

當*AH109-pACT2-GAL4 AD-CaDBF4*與*Y187-pGBKT7-GAL4 BD-CaCDC7*兩菌株mating完成後，即可透過報導基因表現與否進行確認白色念珠菌之*CDC7*與*DBF4*基因產物是否具有交互作用現象，而此兩出芽酵母菌株進行mating後可使用之報導基因有*HIS3*、*ADE2*及*LacZ*等等而本實驗主要利用之報導基因為*HIS3* reporter gene，而此報導基因上游主要帶有*GAL4 UAS*(Upstream Activation Sequence)及*GAL4 TATA*(TATA box)，若白色念珠菌之*Cdc7*與*Dbf4*具有交互作用現象，則可促使*Gal4*具有轉錄因子活性，進而活化下游報導基因*HIS3*進行表現，而此基因表達產物為histidine生化合成路徑第六步驟所需Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase酵素。在建構*pACT2-GAL4 AD-CaDBF4*與*pGBKT7-GAL4 BD-CaCDC7*質體時*CaDBF4*與*CaCDC7*基因接入載體時皆透過適當之閱讀框架設計，因此當其質體上之*ADHI* promoter不斷活化下游基因表現時，則可分別表現出*Gal4 AD-CaDbf4*重組蛋白與*Gal4 BD-CaCdc7*重組蛋白，而當*CaCdc7*與*CaDbf4*具有交互作用現象，則*CaCdc7*與*CaDbf4*會彼此結合，進而促使*Gal4*具有轉錄因子活性，*Gal4*會扮演轉錄因子角色去接於*HIS3*上游之調控序列(*GAL4 UAS*、*TATA box*)，進而活化下游基因表現Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase酵素，因此此酵母菌可於缺乏histidine之培養環境下進行生長。經由yeast two-hybrid實驗結果確認及比對過後確認白色念珠菌之*Dbf4*與*Cdc7*確實具有交互作用現象(圖十)。

2.3.2 利用3-amino-1,2,4-triazole測試白色念珠菌之Cdc7與Dbf4交互作用強度

經由營養缺乏之培養基(SC-Leu-Trp-His)進行測試並確認yeast two-hybrid系統中之白色念珠菌之Dbf4與Cdc7具有交互作用之現象，接著想要更進一步透過yeast two-hybrid系統之應用，進而得知白色念珠菌Dbf4與Cdc7交互作用強度。本實驗主要透過利用3-amino-1,2,4-triazole(一般簡稱3-AT)化合物進行交互作用強度測定。由前文2.3.1之內容已提及本yeast two-hybrid system所使用之報導基因為*HIS3*基因，而此基因所表達之基因產物為imidazoleglycerol-phosphate dehydratase酵素，而此酵素主要角色為扮演histidine合成路徑中第六步驟產物轉換時之必要酵素，因此當CaCdc7與CaDbf4進行交互作用時，則有助於出芽酵母菌可在缺乏histidine培養環境下進行生長，而3-amino-1,2,4-triazole主要功能為*HIS3*基因產物的競爭抑制劑，此功能與當CaDbf4與CaCdc7交互作用進而令Gal4扮演具活性之轉錄因子之功能相反，因此此化合物可扮演拮抗劑之角色，透過此拮抗劑(3-amino-1,2,4-triazole)不同濃度稀釋倍數，與不同濃度之mating完成的出芽酵母菌菌株進行反應，將可隨imidazoleglycerol-phosphate dehydratase表現量不同，進而影響出芽酵母菌之生長速率與生長能力，進而可以得知白色念珠菌之Dbf4與Cdc7交互作用強度。

本實驗主要操作方式為配製含有各種不同濃度之3-amino-1,2,4-triazole的SC-Leu-Trp-His營養缺乏培養基，分別為0mM、1.25mM、2.5mM、5mM、10mM、20mM、25mM及100mM之3-AT濃度，並且將出芽酵母菌分別利用10倍稀釋與5倍稀釋的方式進行菌液稀釋，將各稀釋濃度之菌液體滴於各種3-AT濃度之營養缺乏培養基上，經過一至兩天培養後則發現，出芽酵母菌確實隨著培養基中所添加的3-amino-1,2,4-triazole濃度增加而生長能力逐漸下降，其中在3-AT濃度為25mM時出芽酵母菌生長能

力明顯下降，而在3-AT濃度為100mM時仍可些微生長，因此由此實驗可得知白色念珠菌之Cdc7與Dbf4有極強交互作用，顯示白色念珠菌可能亦與其他物種相同，皆高度保留Cdc7與Dbf4交互作用(圖十二)。

3. 白色念珠菌Tet-on系統表達螢光重組蛋白

建構此系統主要目的是為了希望可透過螢光觀察的方式，進而推測兩目標基因產物是否有交互作用現象，由於透過將不同的目標基因分別與不同螢光蛋白基因進行連結，當透過Tet-on系統大量表達此螢光重組蛋白時，藉由螢光顯微鏡進行觀察此兩螢光是否重疊於同一位置，進而推測此兩目標蛋白是否具有交互作用現象，而適用於白色念珠菌之Tet-on系統，主要透過對帶有Tet-on系統且適用於白色念珠菌之pTET25M-NC質體加以進行改造與重新建構，進而衍生出可透過此質體上所帶有之Tet-on系統進行螢光重組蛋白之表達。

3.1 質體建構

3.1.1 建構pTET25M-NC-CFP及pTET25M-NC-YFP質體

經由綠螢光蛋白(GFP, green fluorescent protein)基因透過點突變(site-directed mutagenesis)而改造出之黃螢光蛋白(yellow fluorescent protein)基因及藍紫螢光蛋白(cyan fluorescent protein)基因，此三種螢光蛋白基因再經CTG-codon optimize改造過後皆適用於白色念珠菌，而YFP與CFP螢光蛋白基因原本位在兩種質體上，分別為pMG1801(CFP)及pMG1656(YFP)質體上(Gerami-Nejad M et al., 2001)，因此在建構pTET25M-NC-CFP及pTET25M-NC-YFP質體時必須先透過聚合酶連鎖反應分別放大CFP與YFP基因，由於此兩種基因序列差別不大，因此可透過利用相同引子進行連鎖反應，引子設計為含有對CFP及YFP基因序列具有專一性，且分別帶有*BspEI*及*NotI*之限制酶切點，利用此對引子分別對pMG1801中之CFP及pMG1656中之YFP進行連鎖反應後可獲得帶有

*BspEI*與*NotI*限制酶切點之YFP與CFP，接著透過TA-cloning方式分別將CFP與YFP接入pCR 2.1-TOPO vector中，經由定序確認該基因DNA序列皆正確無誤，將完成TA-cloning操作之質體透過大腸桿菌進行大量複製並利用質體純化方式回收質體，將回收之質體透過限制酶作用後利用膠體純化方法回收YFP與CFP基因片段，嵌入DNA製備完成。

pTET25M-NC載體是實驗室賴威仲學長利用期刊(Yang-Nim P et al., 2005)中之pTET25質體所改造而成，而質體原本是由pbluescript質體改造而來，故此質體上帶有ampicillin resistant gene，且含有可轉譯出CartTA(*Candida albicans* reverse tetracycline dependent transactivator)的部份:*ADHI* promoter(P_{ADHI} 為可持續表現下游基因之promoter)、CartTA與ACT1 terminator (T_{ACT1})；及含有利用tet operator來啟動CaGFP表現的部份: tet operator、CaGFP與 *ACT1T*以及*URA3* selection marker及3' *ADHI* 序列。由於建構pTET25M-NC-CFP及pTET25M-NC-YFP質體主要目的為將CFP與YFP分別置入tet operator下游，因此透過與嵌入DNA所帶有相同之限制酶切點*BspEI*及*NotI*的限制酶對質體進行作用，將原本存在於pTET25M-NC中tet Operator下游之CaGFP基因移除，透過膠體回收方式純化CaGFP以外之載體部分回收，載體製備完成。將嵌入DNA(CFP與YFP)與載體DNA透過適當比例分別進行接合反應，透過利用*BspEI*及*NotI*之限制酶切點進行接合，透過transformation至大腸桿菌篩選後，將質體取出透過限制酶作用測試，確認pTET25M-NC-CFP及pTET25M-NC-YFP質體皆建構完成(圖十三、圖十五)。

3.1.2 建構pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7*

建構可表達螢光重組蛋白之Tet-on系統主要目的為希望透過建構出*CaDBF4*與*CaCDC7*基因分別接有不同螢光蛋白基因，透過Tet-on系統過度表達*CaDbf4*與*CaCdc7*分別接有不同螢光蛋白之重組蛋白的表現，因此在pTET25M-NC-YFP質體皆建構完成後必須再將白色念珠菌*CDC7*基

因接入pTET25M-NC-YFP質體中，並且須與YFP之基因序列相接且有適當之閱讀框架，才可令Tet-on系統大量表現CaCdc7-YFP重組蛋白。而CaCDC7基因取得主要透過以白色念珠菌BWP17菌株之genomic DNA為模板進行聚合酶鏈鎖反應而取得，引子對設計為含有對CaCDC7專一性之序列及分別帶有EcoRV及NheI限制酶切點，利用聚合酶連鎖反應進行放大CaCDC7基因後，獲得大量CaCDC7基因片段且左右皆帶有EcoRV與NheI限制酶切點，透過TA-cloning方式將基因片段接入pGEM-T Easy之載體中進行保存，並透過定序確認基因序列正確無誤後，將此質體利用大腸桿菌進行大量複製後，以質體抽取純化方式獲得大量質體後，利用EcoRV與NheI限制酶對該質體進行作用，接著利用膠體純化方式回收CaCDC7基因片段，則嵌入DNA製備完成。載體DNA-pTET25M-NC-YFP之YFP N-terminal與C-terminal之位置具有MCS，透過大腸桿菌將此載體放大後，利用位在YFP之N-terminal的EcoRV與NheI限制酶切點透過限制酶進行切割作用，接著透過PCR clean up純化方式將載體DNA進行回收，則載體DNA製備完成。將嵌入DNA與載體DNA透過適當比例進行接合後，利用transformartion方式送入大腸桿菌中透過培養基之篩選與將質體抽出進行限制酶測試，確認pTET25M-NC-YFP-CaCDC7建構完成(圖十四)。

3.1.3 建構pTET25M2-CFP-CaDBF4質體

由於pTET25M-NC-YFP-CaCDC7之Tet-on系統主要透過此系統所帶有之ADHI基因同源序列，利用同源互換(homologous recombination)方式將此Tet-on系統嵌入ADHI之基因座上，因此在此白色念珠菌菌株中，有一ADHI之等位基因以遭剔除，僅剩另一ADHI等位基因進行表現，以維持白色念珠菌之常生理運作，但為了觀察同一菌株中CaCdc7-YFP與CaDbf4-CFP之螢光重組蛋所表達之不同螢光重疊與否，故帶有CaDBF4及CFP基因之Tet-on系統則必須透過利用另一組等位基因將此系統透過

同源互換方式嵌入白色念珠菌之genomic DNA中，以免因兩個*ADH1*基因座皆遭剔除，而影響白色念珠菌之存活能力，或嚴重改變白色念珠菌原本正常生理運作，而造成實驗結果上的誤差，因此在建構帶有*CaDBF4*-CFP基因之完整Tet-on系統前，必須先將pTET25M-NC-CFP質體進行改造，將此Tet-on系統改造成類似pTET40質體所帶有之Tet-on系統，本系統所帶有之白色念珠菌基因組同源序列為*OP4*基因而非pTET25M質體所帶有之*ADH1*基因，因此可透過分別位在兩不同基因坐上之Tet-on系統表答不同之螢光重組蛋白，且較不影響白色念珠菌之基本生理運作。將pTET25M-NC-CFP及pTET40之質體，透過大腸桿菌進行放大後利用質體純化方式獲得兩質體 DNA，接著主要透過將pTET25M-NC-CFP之特定DNA片段置與pTET40之特定片段進行交換，建構出類似pTET25M-NC-CFP之DNA結構，其不同處僅為同源互換基因序列之改變。透過利用*EcoRI*及*SalI*限制酶分別對pTET25M-NC-CFP及pTET40之質體進行限制酶切割作用，透過膠體回收方式純化pTET25M-NC-CFP經限制酶作用所釋出約2500bp大小的部分，此部份含有*URA3*基因上游且上游帶有*dpl200*與CFP基因片段，另外並純化pTET40經限制酶作用後約7000bp大小之DNA片段，進而去除*URA3*部分上游基因及GFP基因序列，接著將兩種膠體回收產物透過適當之比例進行接合反應，將接合反應之產物利用transformation方式送入大腸桿菌中進行大量複製，經由培養機篩選方式與多種限制酶切割方式，確認質體改造完成，且將此帶有*OP4*同源序列改造完成之質體稱為pTET25M2-CFP(圖十六)。

接著必須將白色念珠菌之*CaDBF4*基因皆入pTET25M2-CFP質體中CFP基因之上游，而白色念珠菌之*DBF4*基因主要透過以BWP17菌株之genomic DNA為模版進行聚合酶連鎖反應所取得，而引子設計主要含有對*CaDBF4*，具有專一性之序列，及分別帶有*EcoRV*與*NheI*限制酶切點，透過聚合酶連鎖反應將白色念珠菌帶有酵素切點之*DBF4*基因進行放大

利用 PCR clean up 方式將聚合酶連鎖反應所得之大量 *CaDBF4* 基因，接著將此 DNA 片段透過利用 *EcoRV* 與 *NheI* 限制酶進行作用後，利用 PCR Clean up 進行純化，則嵌入 DNA 製備完成。

透過大腸桿菌將 pTET25M2-CFP 進行大兩表現後，透過質體萃取純化方式獲得 pTET25M2-CFP 質體，接著透 *EcoRV* 與 *NheI* 限制酶 pTET25M2-CFP 質體進行限制酶作用後，利用 PCR clean up 方式將 pTET25M2-CFP 進行純化，則載體 DNA 製備完成。接著將嵌入 DNA 與載體 DNA 進行接合作用，利用 transformation 方式將質體送入大腸桿菌中，透過培養基篩選及 PCR，與限制酶作用方式進行確認 pTET25M2-CFP-*CaDBF4* 質體建構完成(圖十七)。

3.2 白色念珠菌菌株建構

3.2.1 建構 *pTET25M-NC-YFP-CaCDC7* 白色念珠菌菌株

pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 質體建構完成後，透過大腸桿菌進行大量複製，接著利用限制酶 *KpnI* 與 *SacII* 對 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* Tet-on 系統之 *ADHI* 同源序列外圍進行限制酶切割反應，將完整 Tet-on 系統切下，並透過膠體純化方式進行回收，形成線型 DNA 狀態後更有利於 *ADHI* 同源互換之成功機率，將回收之 Tet-on 系統之 DNA 片段透過 LiAc transformation 方式送入白色念珠菌 BWP17 菌株中，由於白色念珠菌之 BWP17 菌株和成 uridine、hitidine 及 arginine 之必要基因 *URA3*、*HIS1* 及 *ARG4* 皆遭受突變，因此 BWP17 菌株並無法在缺乏這三種養分之一之環境下生長，而 Tet-on 系統之 DNA 片段中即含有 *URA3* 基因，令帶有 Tet-on 系統之 BWP17 菌株可在缺乏 uridine 之環境(SC-ura)下生長，透過培養基之篩選與 yeast colony PCR 確認 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 白色念珠菌菌株建構完成(圖十八)。

3.2.2 建構 *pTET25M-NC-YFP-CaCDC7* 去除 *URA3* selection marker

白色念珠菌菌株

pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 之質體上之 *URA3* selection marker 兩端各帶有 dpl200 序列，可利用 5-fluoroorotic acid(5-FOA)將 *URA3* 基因剔除(由於 *URA3* 會轉譯出 orotidine-5-phosphate decarboxylase)，此酵素為 Uracil 合成過程中所必須之酵素，但當有 5-FOA 存在下，orotidine-5-phosphate decarboxylase 會將 5-FOA 代謝成對白色念珠菌有毒的產物 5-fluorouracil；因此 Ura⁺之轉型菌株在含有 5-FOA 環境下，為了生存下去，將會利用 *URA3* 兩側的同原序列進行同源互換(此為 dpl200)，進而將 *URA3* 基因去除，進而行成 Ura⁻之轉型菌株)，則 *URA3* 將可再作為 Selection marker 使用，因此利用將 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 培養於含有 5-FOA 成分之環境下，若可在此培養環境進行生長，則表示此菌株可能已將 *URA3* 基因剔除，因此可再透過 yeast colony PCR 進行確認。

3.2.3 建構 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7*(經 5FOA 作用)/ pTET25M2-CFP-*CaDBF4* 白色念珠菌菌株

當建構完成帶有缺乏 *URA3* 基因之 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 的 Tet-on 系統之白色念珠菌菌株後，接著再以此菌株為基礎，利用 *KpnI* 與 *SacII* 之限制酶將 pTET25M2-CFP-*CaDBF4* 質體上之 Tet-on 系統切下透過膠體純化方式將此 DNA 片段進行回收，接著將其送入白色念珠菌中，且利用此 Tet-on 系統所帶有之 *OP4* 基因同原序列，將此 Tet-on 系統嵌入白色念珠菌 genomic DNA 之 *OP4* 基因座上，由於 pTET25M2-CFP-*CaDBF4* 之 Tet-on 系統中帶有 *URA3* selection marker，因此可透過將菌株培養於缺乏 uridine 之環境(SC-Ura)下進行篩選，並透過 yeast colony PCR 方式更進一步確認此帶有 *CaDBF4*-CFP 基因之 Tet-on 系統已成功嵌入白色念珠菌之 *OP4* 基因座上，確認 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* (經 5-FOA 作用)/ pTET25M2-CFP-*CaDBF4* 白色念珠菌菌株建構完成(圖十九、圖二十)。

3.3 功能性分析

3.3.1 利用 doxycycline 誘導 Tet-on 系統大量表現 *CaCdc7*-YFP 及 *CaDbf4*-CFP 重組蛋白

上述所建構好之 *pTET25M-NC-YFP-CaCDC7(5-FOA 作用)/pTET25M2-CFP-CaDBF4* 白色念珠菌菌株，將會利用 Tet-on 系統大量誘導 *CaCdc7*-YFP 及 *CaDbf4*-CFP 重組蛋白表現。*pTET25M-NC-YFP-CaCDC7* 之 Tet-on 系統帶有 *ADHI* 基因同源序列，其中一同源序列為 *ADHI* Promoter 而在一般狀況下 *ADHI* promoter 會持續性的啟動 *CartTA* (*Candida albicans* reverse tetracycline dependent transactivator) 之表現，但在一般狀況下 *CartTA* 並無法與 Tet-on 系統上之 tet operator 相結合，因此無法啟動 *CaCdc7*-YFP 及 *CaDbf4*-CFP 重組蛋白表現，但是當這些菌株存在於含有 doxycycline 之培養環境下時，doxycycline 會與 *CartTA* 結合，已使得 *CartTA* 具有可與 tet operator 相結合之能力，進而誘導 *CaCdc7*-YFP 及 *CaDbf4*-CFP 重組蛋白質的大量表現(圖二十一)。

3.3.2 利用正立螢光顯微鏡進行 *CaCdc7*-YFP 及 *CaDbf4*-CFP 螢光重組蛋白之表現

將帶有上述兩種不同之 Tet-on 系統的白色念珠菌菌株，進行培養 16~18 小時，進行回養至 OD600 值為 0.6 時，加入 40~50 μ g/ml 之 doxycycline 進行誘導 Tet-on 系統大量表現重組蛋白，加入 doxycycline 後再培養四個小時後進行螢光顯微鏡觀察 Tet-on 系統表現狀況，其主要觀察 *CaCdc7*-YFP 之 YFP 所釋放出來之螢光，及 *CaDbf4*-CFP 之 CFP 所釋放出來之螢光，而 YFP 之 excitation peak 波長約為 514nm，而 emission peak 波長約為 527nm，CFP 之 excitation peak 波長約為 433nm 而 emission peak 波長約為 478nm。而本螢光觀察實驗主要利用 BP436、FT460、LP470 之濾鏡組進行觀察之 cyan fluorescent，利用 BP450-490、FT510、LP520 之濾鏡組進行觀察 YFP 之 yellow fluorescent，皆可觀察到同一株白色念

珠菌中可透過 doxycycline 誘導後經 Tet-on 系統表現 *CaCdc7*-YFP 與 *CaDbf4*-CFP 之螢光重組蛋白，至於 *CaCdc7*-YFP 與 *CaDbf4*-CFP 所釋放出來之螢光在細胞內之位置是否重疊，則需利用更高倍率鏡頭或共軛焦顯微鏡進行觀察才可得知，而本實驗觀察仍正在進行中(圖二十四)。

第四章、討論及結語

1. 利用yeast two-hybrid system確認白色念珠菌之CaCdc7與CaDbf4具有交互作用現象

建構pACT2-GAL4 AD-CaDBF4及pGBKT7-GAL4 BD-CaCDC7兩種出芽酵母菌，經由培養基篩選確認帶有pACT2-GAL4 AD-CaDBF4質體之出芽酵母菌可生長於缺乏leucine胺基酸之培養環境中，而帶有pGBKT7-GAL4 BD-CaCDC7質體之出芽酵母菌可生長於缺乏tryptophan胺基酸之生長環境中，因此可確認此兩種株芽酵母菌建構無誤，接著將兩種出芽酵母菌菌株進行mating後發現此接合後支出芽酵母菌菌株可生長於同時缺乏leucine及tryptophan胺基酸環境下生長，可確認此兩出芽酵母菌菌株確實有完成接合步驟，而令原本單倍體之出芽酵母菌形成雙倍體之模式，而為了觀察CaDbf4與CaCdc7是否具有交互作用之現象，將接合後支出芽酵母菌菌株培養於同時缺乏leucine、tryptophan、histidine以進行確認，發現接合後之出芽酵母菌可進行生長，故可得知由於CaCdc7與CaDbf4在出芽酵母菌中進行交互作用，進而活化報導基因HIS3表達imidazoleglycerol-phosphate dehydratase酵素，促使原本不具有合成histidine能力之出芽酵母菌，獲得表達histidine之能力，因此可於缺乏histidine之環境下生長，以上之實驗皆有作對照組即以空的質體 pACT2-AD與pGBKT7-BD進行上述實驗測試，發現雖然在此兩不同出芽酵母菌菌株進行接合後可於同時缺乏leucine及tryptophan環境下生長，但當將其培養於同時缺乏leucine、tryptophan及histidine環境下，則無法進行生長，因此可以更確定接合後之出芽酵母菌主要由於CaCdc7與CaDbf4進行交互作用，而有助於出芽酵母菌可於缺乏histidine環境下生長。但由白色念珠菌背景已知，白色念珠菌之CTG(或CUG)主要轉譯成serine而非一般的leucine，而CaDBF4含有3個CTG codon，CaCDC7含有個CTG codon，因此透過yeast two-hybrid

進行白色念珠菌 *CaDbf4* 與 *CaCdc7* 之蛋白質表現，可能會與白色念珠菌本身所表達之蛋白狀況不同，若必須更精確的確認白色念珠菌之 *CaCdc7* 與 *CaDbf4* 之交互作用，則可藉由其他方式，例如：免疫沉澱法 (Immunoprecipitation, IP)、或後續之白色念珠菌螢光蛋白觀察分析。

2. 利用 Tet-on system 表達螢光重組蛋白，以確認白色念珠菌之 *CaCdc7* 與 *CaDbf4* 具有交互作用現象

建構完成 *pTET25M-NC-YFP-CaCDC7* / *pTET25M2-CFP-CaDBF4* 白色念珠菌菌株後，透過分別適合 YFP 與 CFP 之螢光波長與螢光濾鏡組進行個別螢光觀察，可初步確認建構完成之白色念珠菌菌種可透過 doxycycline 進行誘導 Tet-on 系統表達 *CaCdc7*-YFP 與 *CaDbf4*-CFP 螢光重組蛋白，而由於顯微鏡觀察放大倍率之影響，無法更清楚觀察到白色念珠菌之細胞內不同螢光分布情形，而可進一步以白色念珠菌系統確認其 *DBF4* 與 *CDC7* 之基因產物具有交互作用之特性。而此建構完成之白色念珠菌菌株，其所帶有之 *pTET25M-NC-YFP-CaCDC7* 之 Tet-on 系統主要利用不斷表現之 *ADHI* promoter 活下游表達 *CartTA* 進而與外界之 doxycycline 結合後而具有與 tet operator 結合之能力，進而活化螢光重組蛋白表現，而 *pTET25M2-CFP-CaDBF4* 之 Tet-on 系統缺乏持續表現之 promoter，因此 Tet-on 系統主要利用 *OP4* 基因座進行同源互換嵌入白色念珠菌基因體中，而 *OP4* 之基因主要在 opaque 細胞中才會表現，而本實驗所使用之 BWP17 主要為 White 細胞，因此在 BWP17 細胞中皆不會持續性的表現，故此 Tet-on 系統之 *CartTA* 主要仰賴 *pTET25M-NC-YFP-CaCDC7* 所表達之 *CartTA*，細胞中只要有 *CartTA* 表達，經 doxycycline 誘導後皆可與不同 Tet-on 系統之 tet operator 結合，進而促使不同系統之螢光重組蛋白表現，而可達到相同目的。因此為了更確認白色念珠菌之 *CaCdc7* 與 *CaDbf4* 是否具有交互作用，將會利用更高放大倍率或共軛焦之螢光顯微鏡觀察，期望可與我們

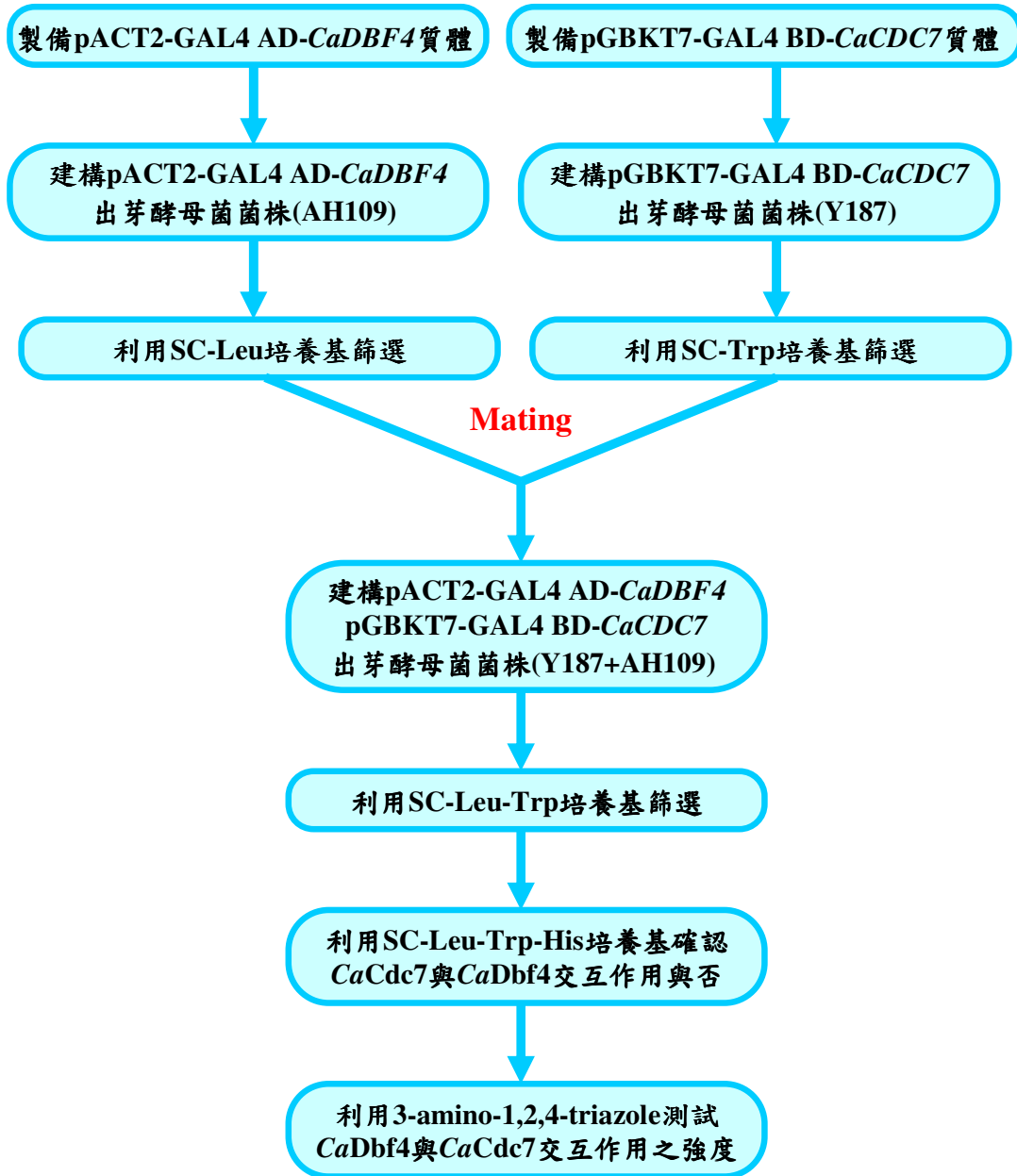
預測之結果相同。

3. 結語及未來展望

由 yeast two-hybrid 系統與 Tet-on 系統之建構與分析，逐漸確認白色念珠菌之 *CaCdc7* 與 *CaDbf4* 與其他物種相同亦具有交互作用之現象，而過去文獻指出，在其他物種中已知的 *DBF4* 基因產物具有三個功能高度保留之 motif: motif-N (與 Repair and DNA damage/replication checkpoint 相關)、Motif-M (與 activation of the Cdc7 kinase 相關)及 motif-C (與 interaction with Cdc7 相關)，而主要利用其 motif-M 與 motif-C 與 Cdc7 kinase 進行交互作用因此希望之後可以透過 yeast two-hybrid 系統確認白色念珠菌中 *CaCdc7* 與 *CaDbf4* 是否也是利用此 motif-M 與 motif-C 進行交互作用，以更確定白色念珠菌之 *CaCdc7* 與 *CaDbf4* 交互作用的高度保留性。除了確認此兩種蛋白具有交互作用現象，亦會利用 yeast two-hybrid 系統進行偵測與 *CaDbf4* 具有交互作用的其他蛋白質，以徹底了解其在白色念珠菌中所扮演的真正角色。最後，我們希望能透過這一系列的研究幫助了解白色念珠菌之生長與生理特色，期望可透過對白色念珠菌的深入了解，進而解開此伺機性致病菌之致病機轉，進而有效的控制其對人體所造成之傷害，讓我們在此巨大威脅中找到一線生機。

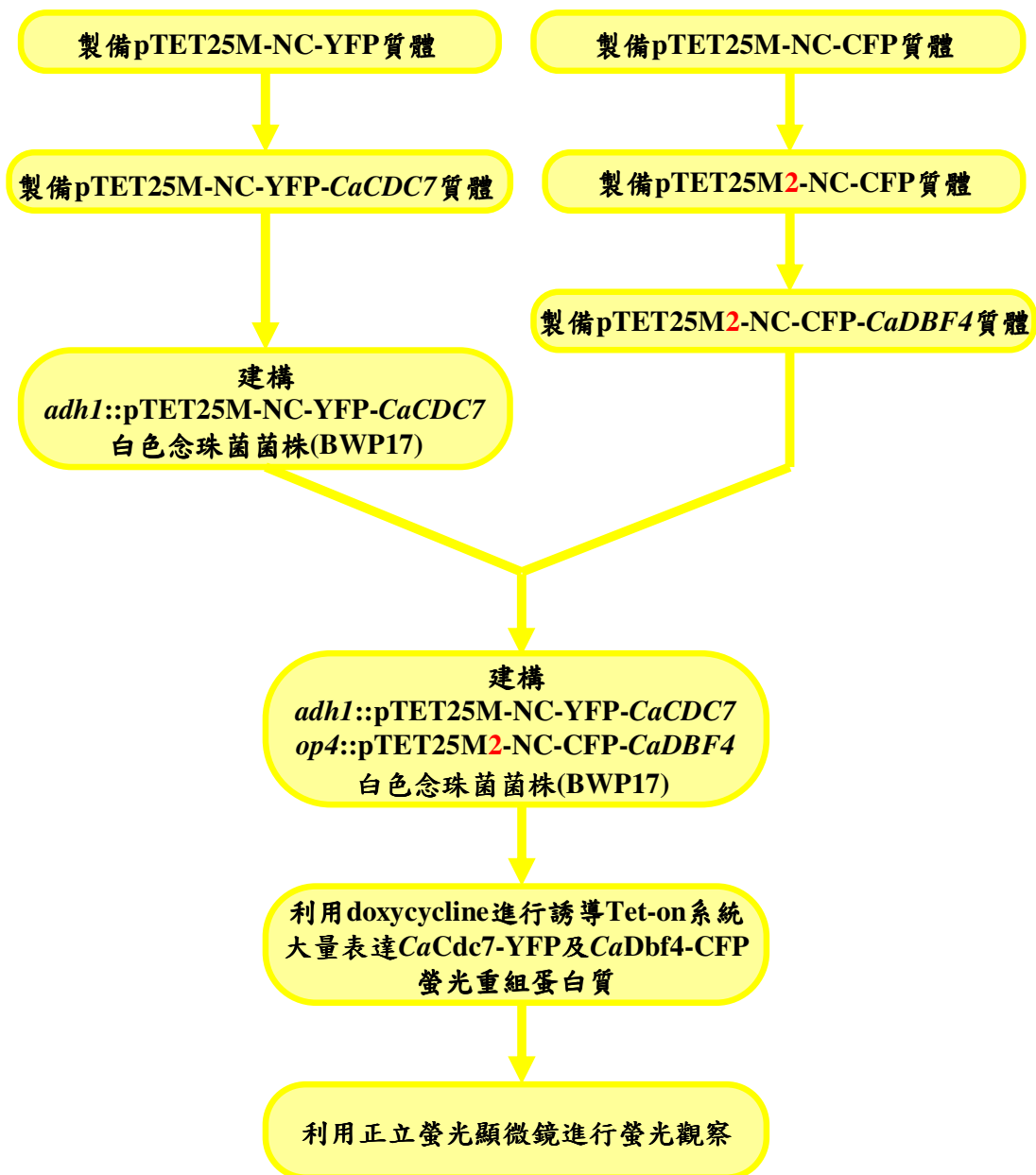
第五章、圖表

Yeast Two-Hybrid System

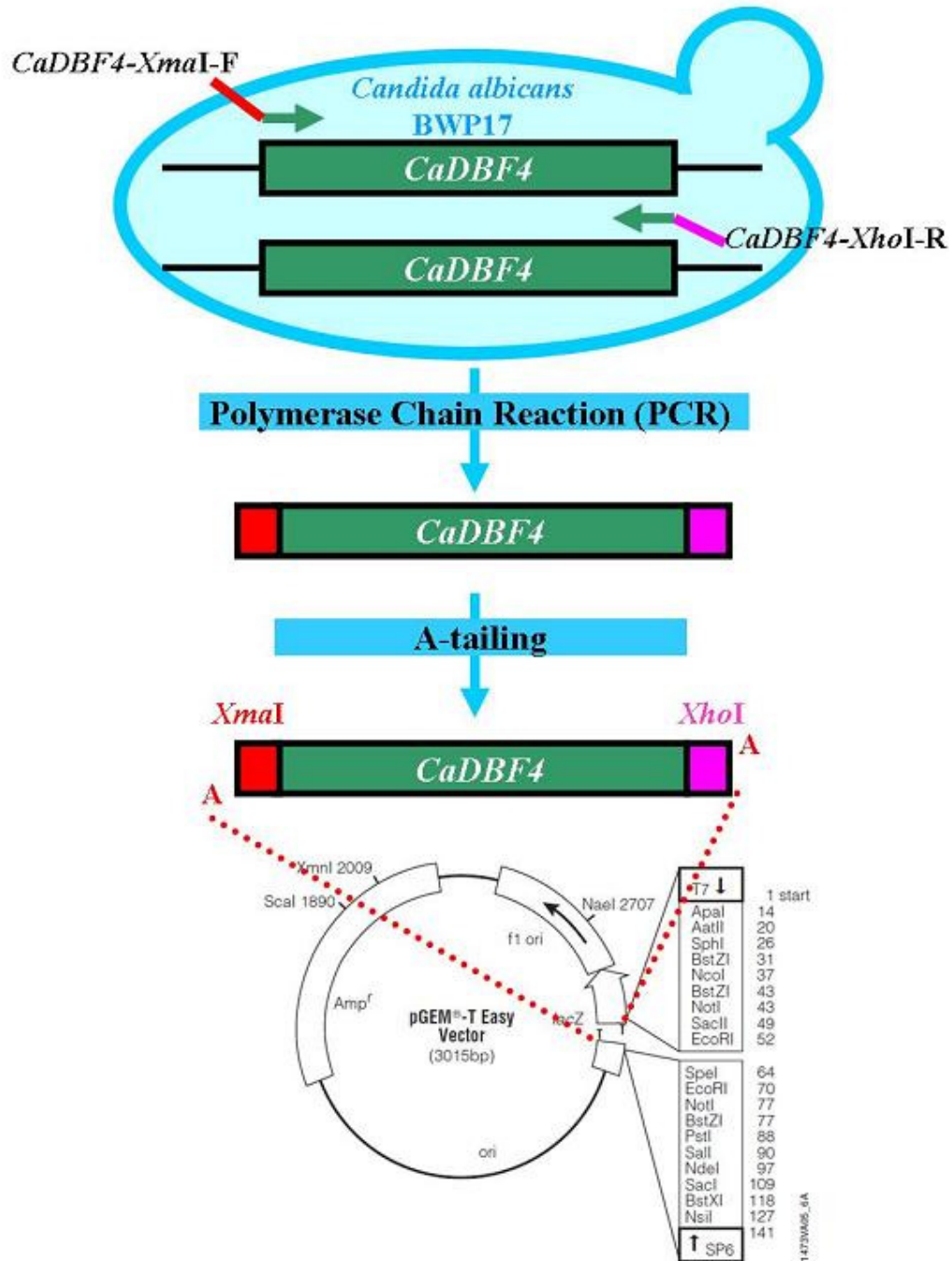


圖一、利用 yeast two-hybrid system 觀察白色念珠菌之 *Cdc7* 與 *Dbf4* 是否會進行交互作用之操作與建構流程。

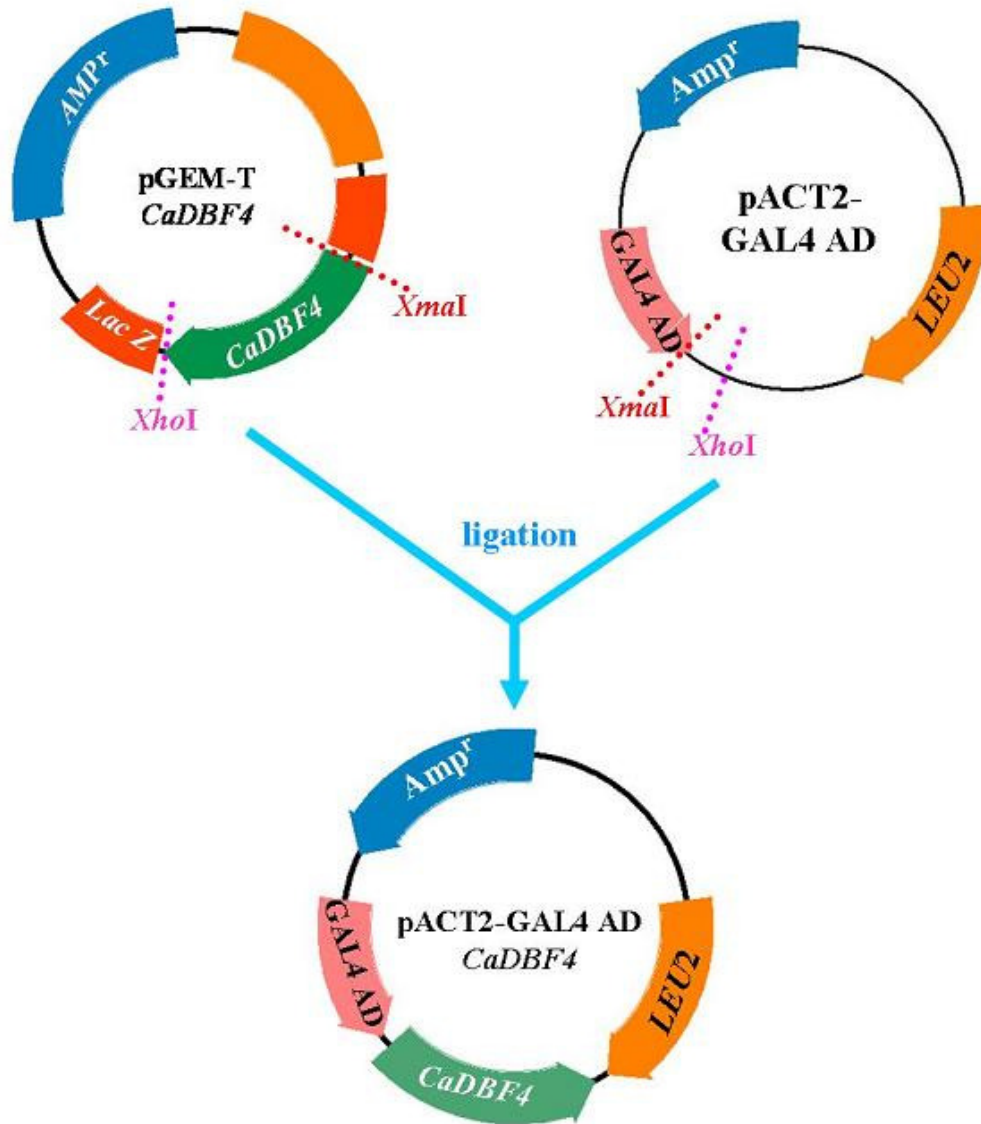
Tet-on System



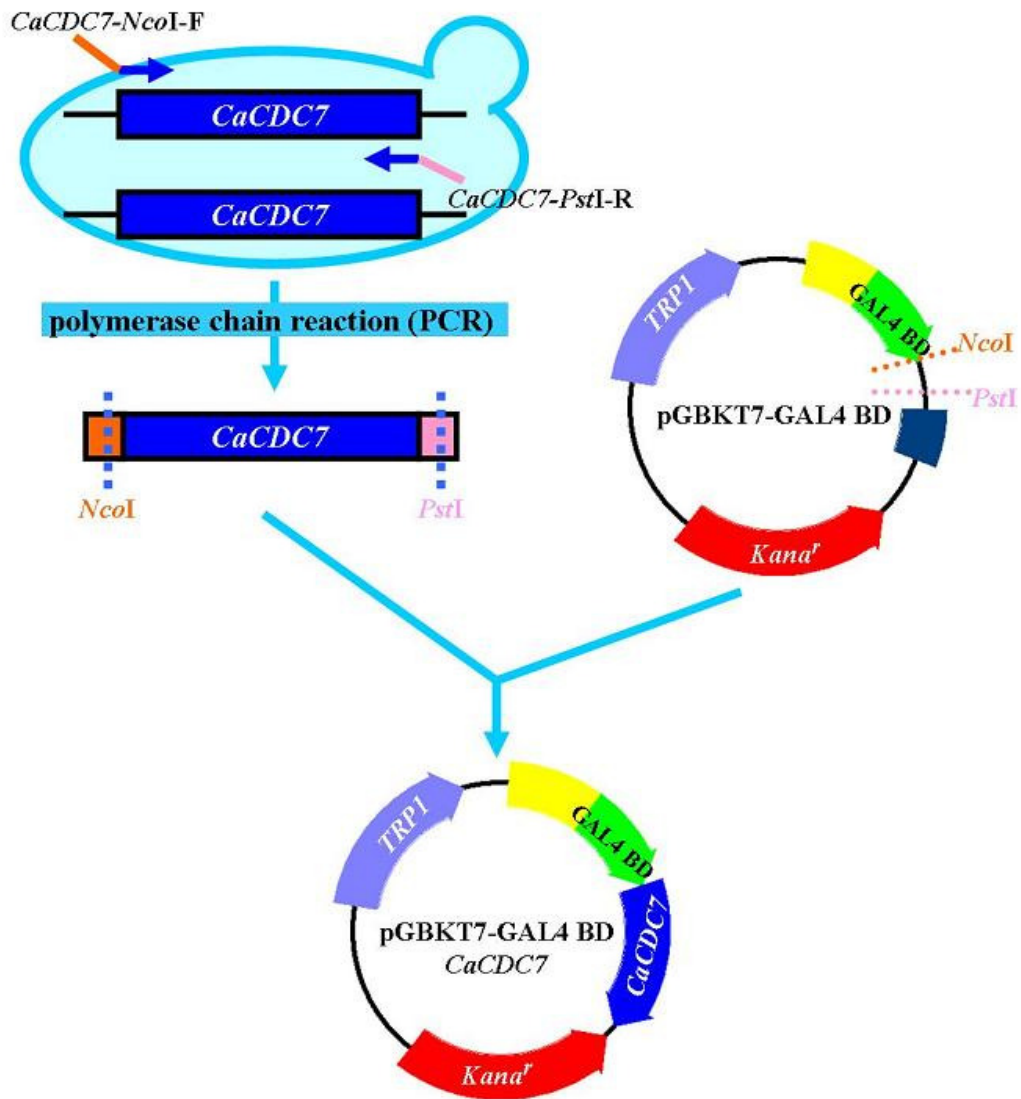
圖二、利用 Tet-on 系統進行大量表達 *CaCdc7*-YFP 及 *CaDbf4*-CFP 螢光重組蛋白質，並利用正立螢光顯微鏡進行螢光重組蛋白質表現觀察之操作與建構流程。



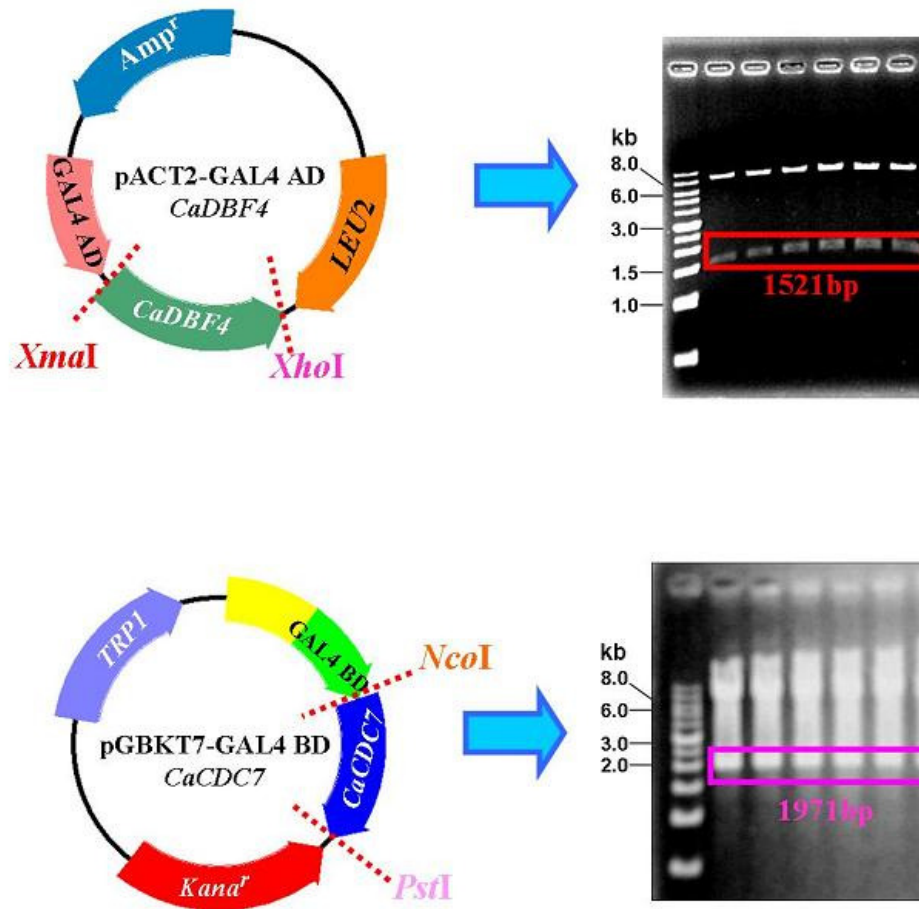
圖三、利用 pGEM-T Easy Vector 進行保存由 *Candida albicans* BWP17 菌株之 genomic DNA 進行 PCR 所取得帶有 *XmaI* 及 *XhoI* 限制酶切點之 *CaDBF4* 基因。



圖四、將接入 pGEM-T Easy Vector 之 *CaDBF4* 利用限制酶 *XmaI* 與 *XhoI* 作用後，由質體釋出為嵌入 DNA；而 pACT2-GAL4 AD 質體亦透過限制酶 *XmaI* 與 *XhoI* 作用而成為載體 DNA。將載體 DNA pACT2-GAL4 AD 與嵌入 DNA *CaDBF4* 進行 ligation 後，利用 *E.coli* 選殖系統挑選建構成功之 pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4* 質體。



圖五、以 BWP17 菌株之 genomic DNA 為模版進行 PCR 放大 *CaCDC7* 後，直接利用限制酶 *PstI* 與 *NcoI* 對 PCR 產物 *CaCDC7* 及 pGBKT7-GAL4 BD 載體進行作用，接著再將 *CaCDC7* 與 pGBKT7-GAL4 BD 載體進行接合反應，利用 *E.coli* 選殖系統挑選建構成功之 pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7* 質體。



圖六、圖 A.表示將 pACT2-GAL4 AD 與嵌入 DNA *CaDBF4* 進行 ligation 後，利用 *E.coli* 選殖方式以限制酶 *XmaI* 及 *XhoI* 對挑選之質體進行作用分別得到 8.1Kb 之載體片段大小與 1521bp 之 *DBF4* 基因大小，以確認 pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4* 質體製備完成。

圖 B.表示將 *CaCDC7* 與 pGBKT7-GAL4 BD 載體進行接合反應後，利用 *E.coli* 選殖方式以限制酶 *PstI* 及 *NcoI* 對挑選質體進行作用得到 7.3kb 之載體片段大小與 1971pb 之 *CDC7* 基因片段大小，以確認 pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7* 質體製備完成。

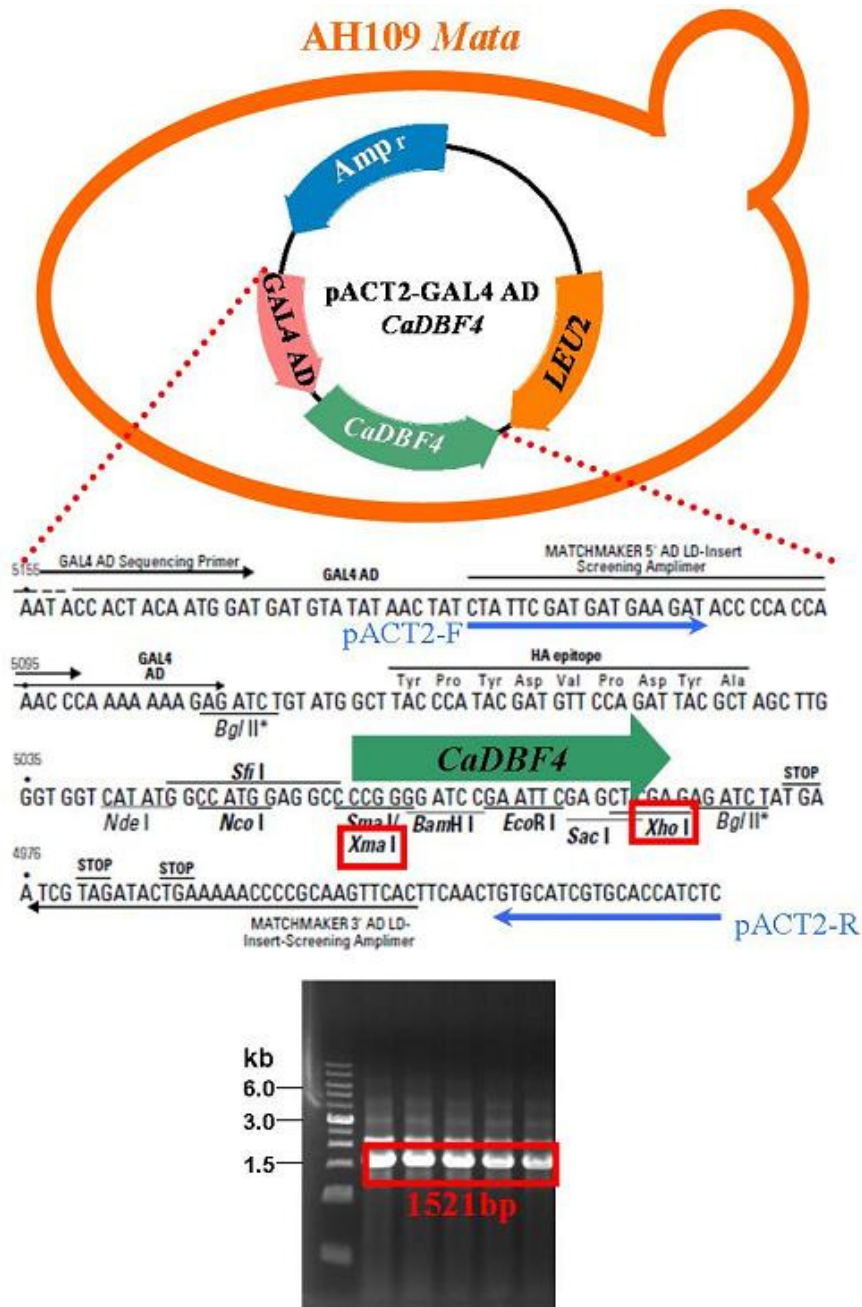
A.



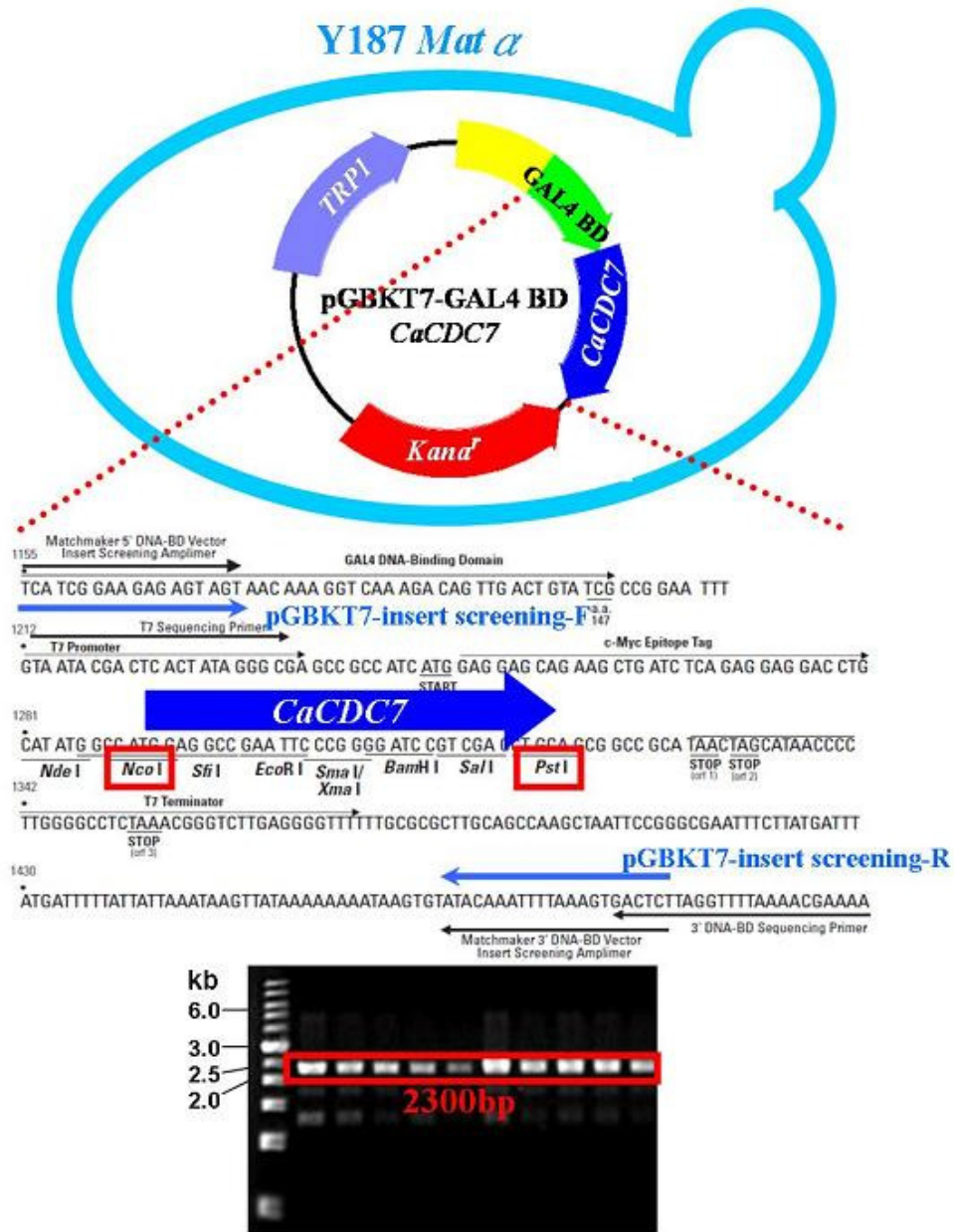
B.



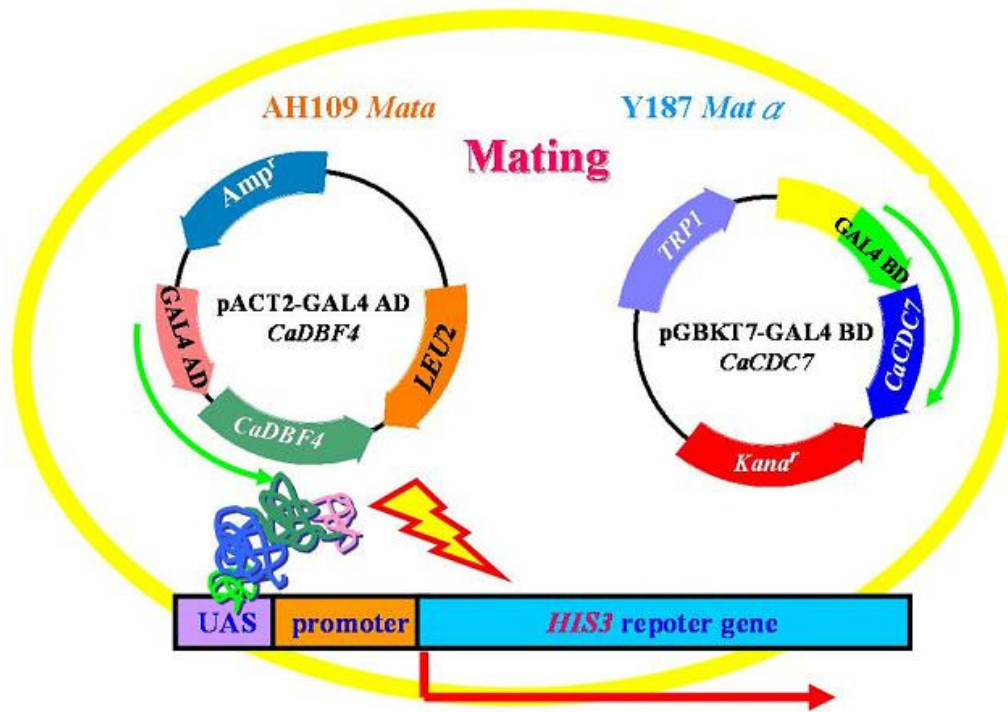
圖七、yeast two-hybrid system 建構主要利用圖上兩種出芽酵母菌菌株，分別為 Y187 (*Mat α*)及 AH109 (*Mat a*)，其中 Y187 菌株主要特色為合成 tryptophan、leucine、uracil、histidine、adenine 及 Methionine 等胺基酸之基因遭受突變或是剔除，且內生性之 Gal4 與會抑制 Gal4 作用之 Gal80 亦被剔除，並含有 *LacZ* 之報導基因。而 AH109 菌株主要特色為合成 tryptophan、leucine、uracil 及 histidine 等胺基酸之基因皆被突變，且內生性之 Gal4 與會抑制 Gal4 作用之 Gal80 亦被剔除，並含有 *HIS3*、*LacZ* 與 *ADE2* 之報導基因。



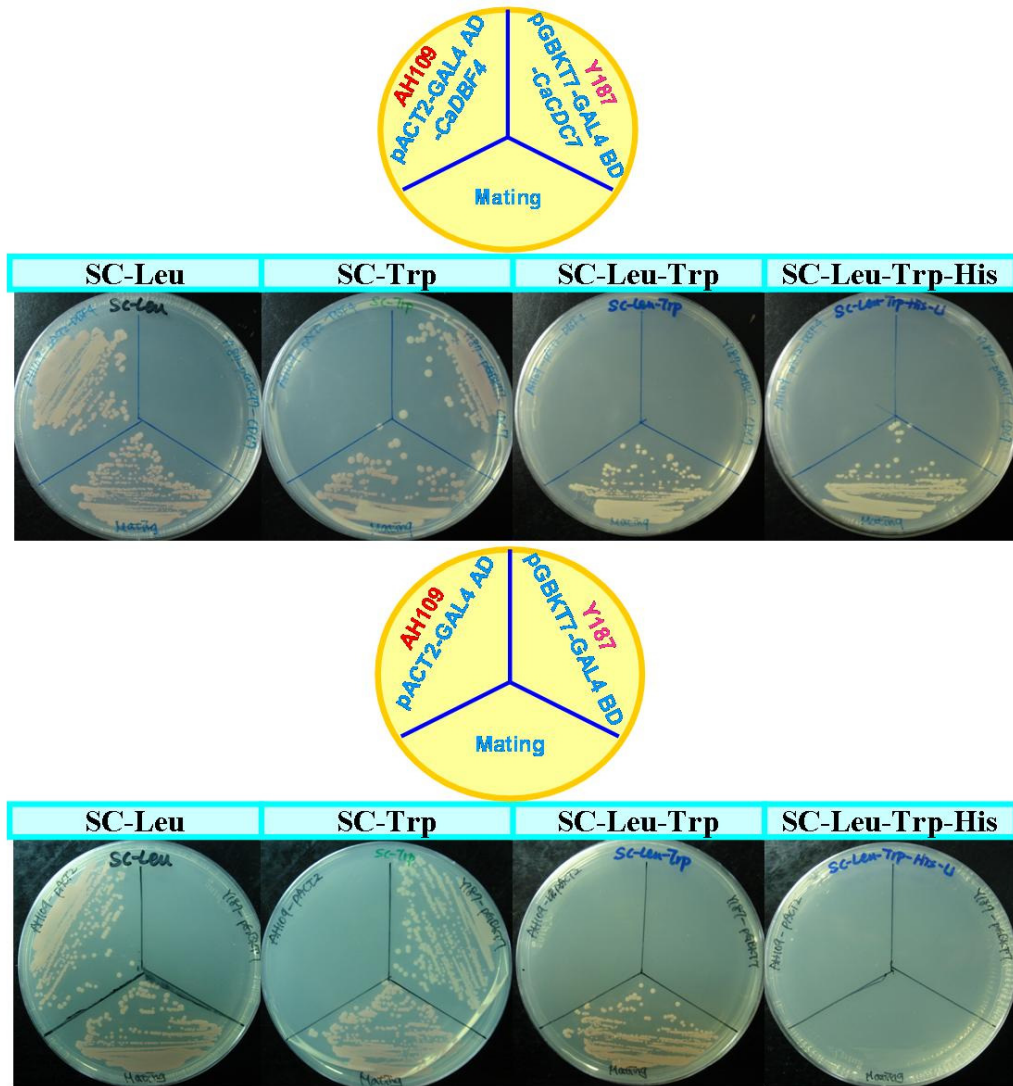
圖八、將建構完成之 pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4* 質體送入出芽酵母菌 AH109 菌株中，利用 pACT2-F 與 pACT2-R 引子對出芽酵母菌進行 yeast colony PCR 得到 1521bp 大小之片段，以確認 AH109-pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4* 出芽酵母菌菌株建構完成。



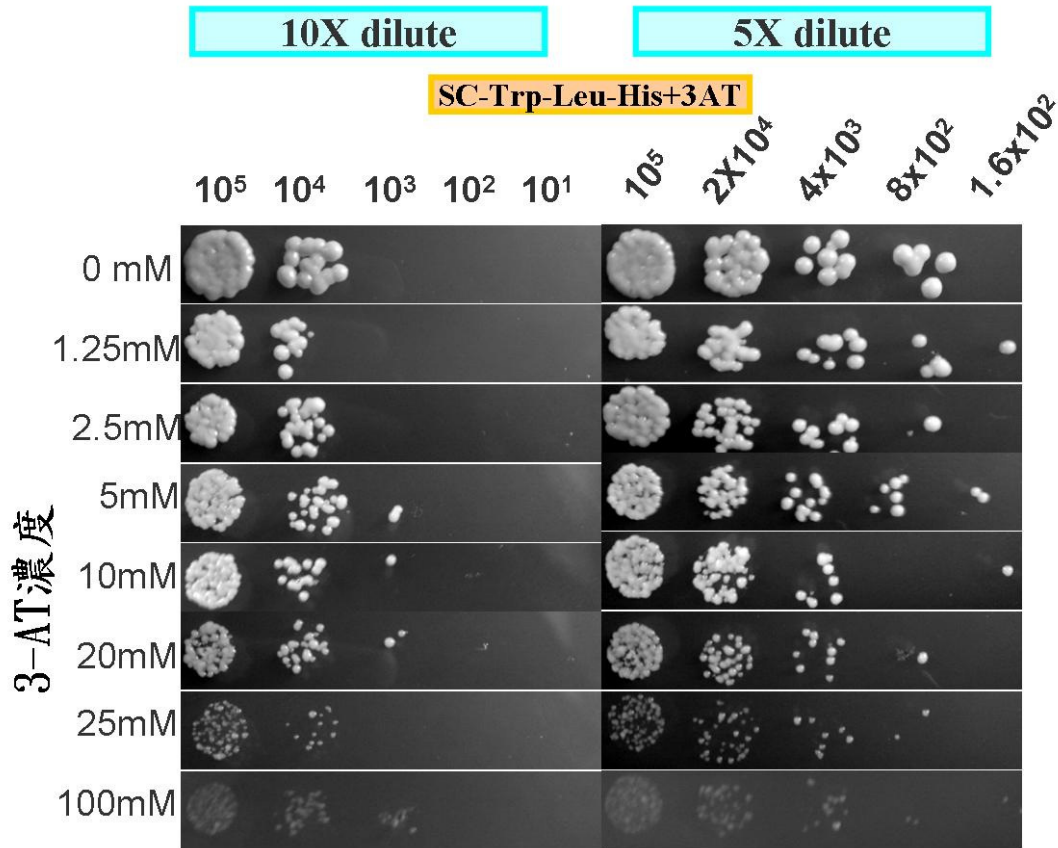
圖九、將建構完成之 pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7* 質體送入出芽酵母菌 Y187 菌株中，利用 pGBKT7-insert screening-F 與 pGBKT7-insert screening-R 引子對出芽酵母菌進行 yeast colony PCR 得到 2300bp 大小之片段，以確認 Y187- pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7* 出芽酵母菌菌株建構完成。



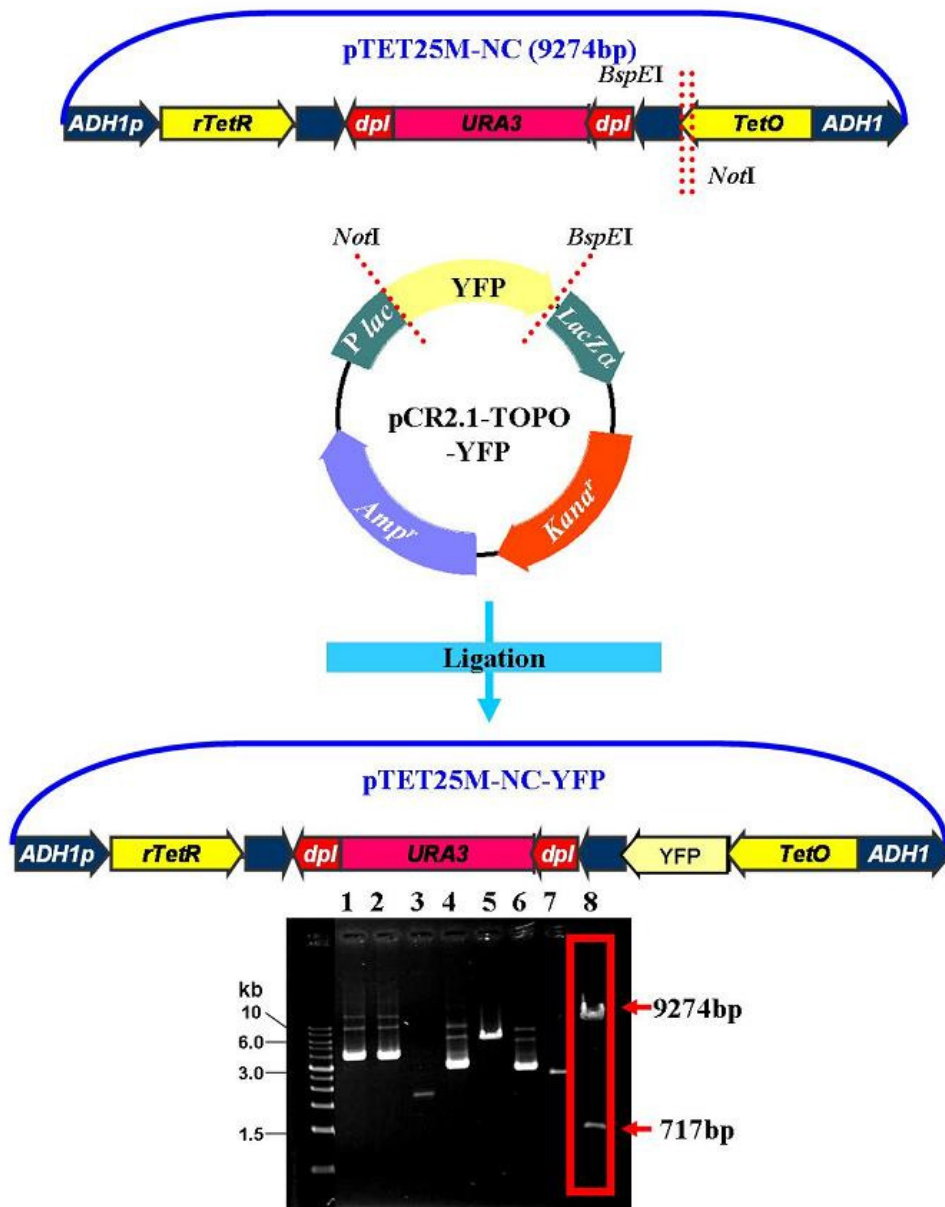
圖十、將建構完成之 Y187- pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7* 與 AH109- pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4* 出芽酵母菌菌株進行 mating，令原為單倍體之出芽酵母菌形成雙倍體之形式，而出芽酵母菌中 pGBKT7-GAL4 BD-*CaCDC7* 與 pACT2-GAL4 AD-*CaDBF4* 質體上有持續表現之 *ADHI* promoter，因此分別可啟動 GAL4 AD-*CaDbf4* 與 GAL4 BD-*CaCdc7* 之重組蛋白質表現，若白色念珠菌之 *CaDbf4* 與 *CaCdc7* 會進行交互作用，則可促使 Gal4 具有轉錄因子之活性，進而活化下游 *HIS3* 報導基因之表現，使此雙倍體之出芽酵母菌菌株可生長於缺乏 histidine 胺基酸之環境。



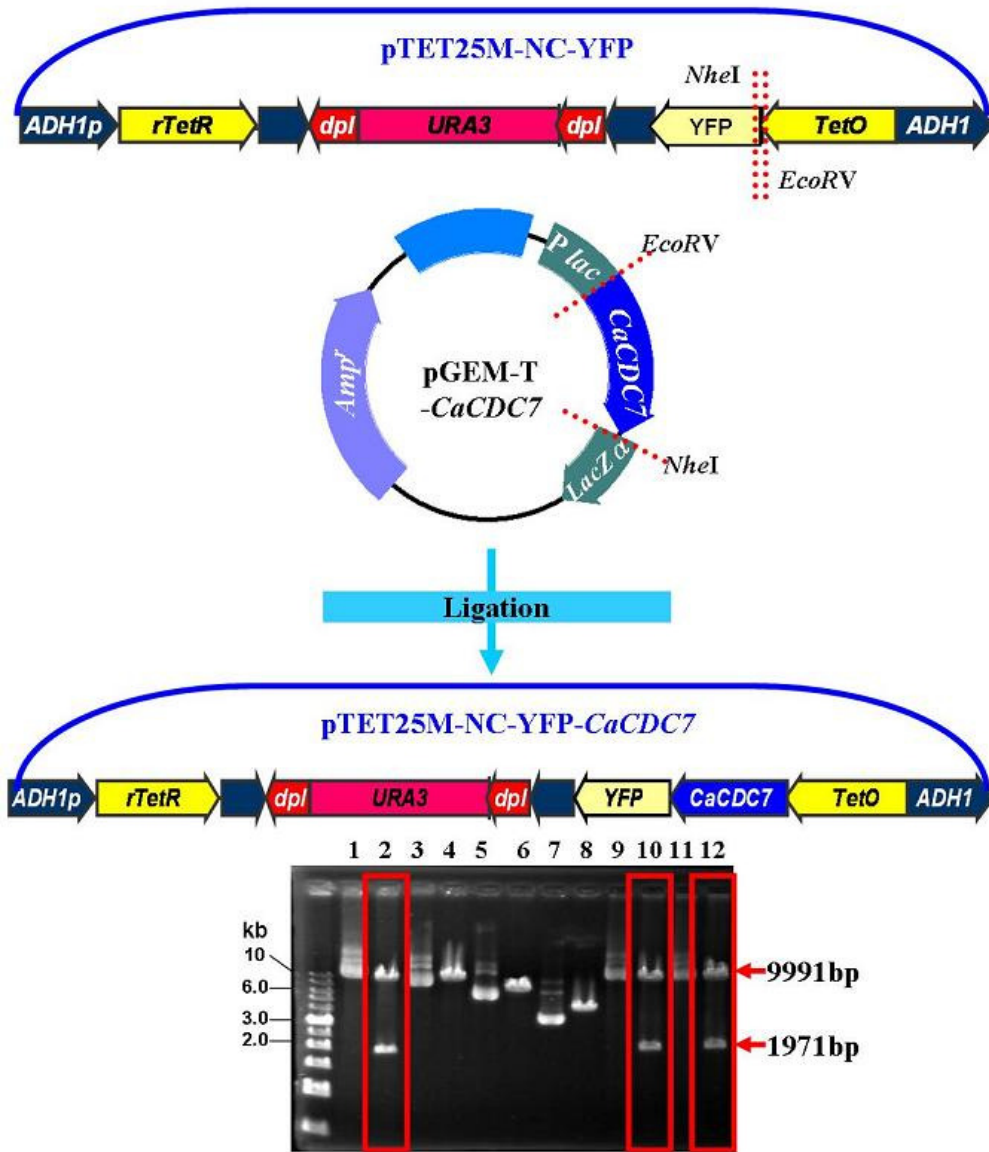
圖十一、利用各種胺基酸缺乏之培養基：SC-Leu、SC-Trp、SC-Leu-Trp 及 SC-Leu-Trp-His 培養基，進行 AH109-pACT2-GAL4 AD-CaDBF4 和 Y187-pGBKT7-GAL4 BD-CaCDC7 出芽酵母菌菌株之篩選與蛋白質交互作用之分析，且藉由與控制組(即送入 pACT2-GAL4 AD 與 pGBKT7-GAL4 BD 空質體)之比較，更確認白色念珠菌之 Dbf4 與 Cdc7 具有交互作用之現象。



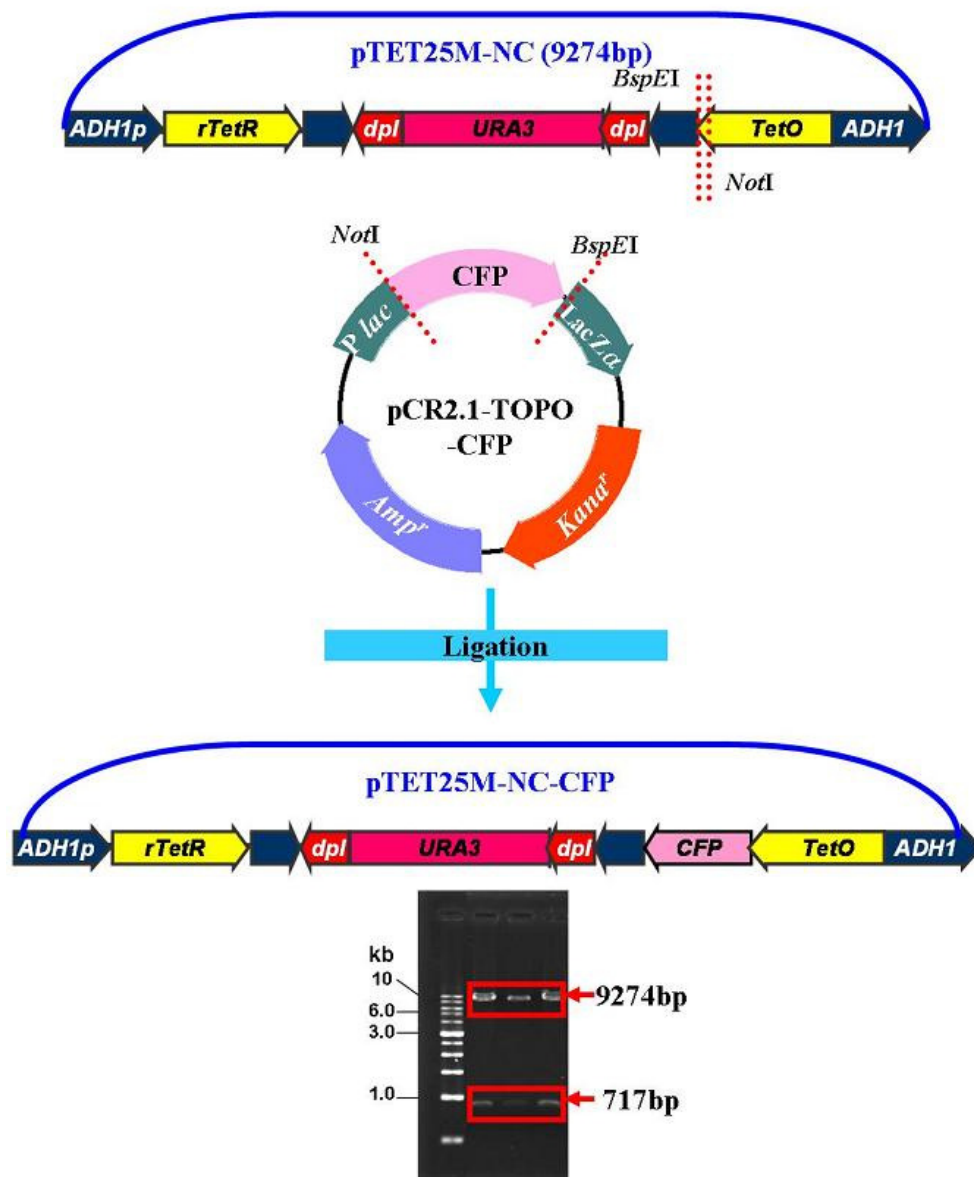
圖十二、3- amino-1,2,4-triazole (3-AT)主要可抑制報導基因 *HIS3* 表達出 Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase，因此會導致菌株無法於缺乏 histidine 胺基酸環境中進行生長，所以可利用外加 3- amino-1,2,4-triazole 化學物質進行測試白色念珠菌之 *CaDbf4* 與 *CaCdc7* 之交互作用的強度，由結果發現隨著 3-amino-1,2,4-triazole 濃度上升，而酵母菌的生長能力會越低，且約於含有 25mM 3-AT 之濃度下的生長狀況有明顯地下降，其足夠證明白色念珠菌之 *CaDbf4* 與 *CaCdc7* 具有極強交互作用之關係。



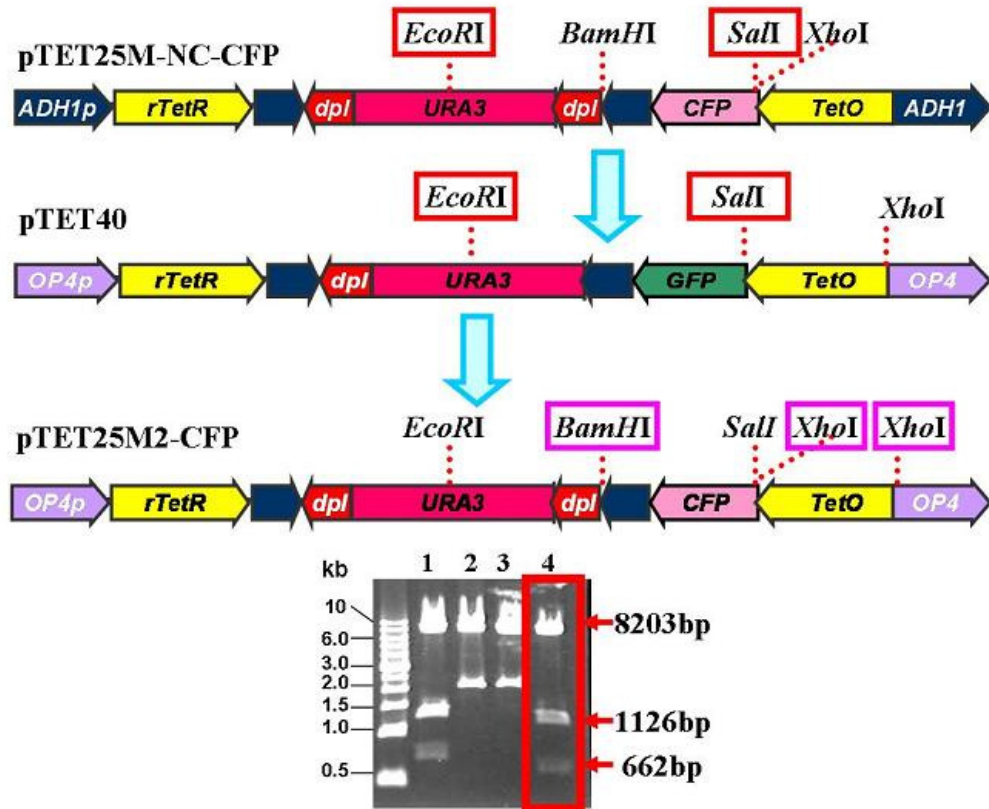
圖十三、將建構於 pCR2.1-TOPO 中之 YFP 利用限制酶 *BspEI* 與 *NotI* 作用釋出，且利用此兩限制酶對 pTET25M-NC 質體進行作用，接著將經限制酶作用之 YFP 與 pTET25-NC 進行接合反應(ligation)形成 pTET25M-NC-YFP 質體，並且透過限制酶 *BspEI* 與 *NotI* 對質體進行作用得到 9274bp 之載體大小與 717bp 之 YFP 基因大小，以確認 pTET25M-NC-YFP 質體製備完成(lane 8)。



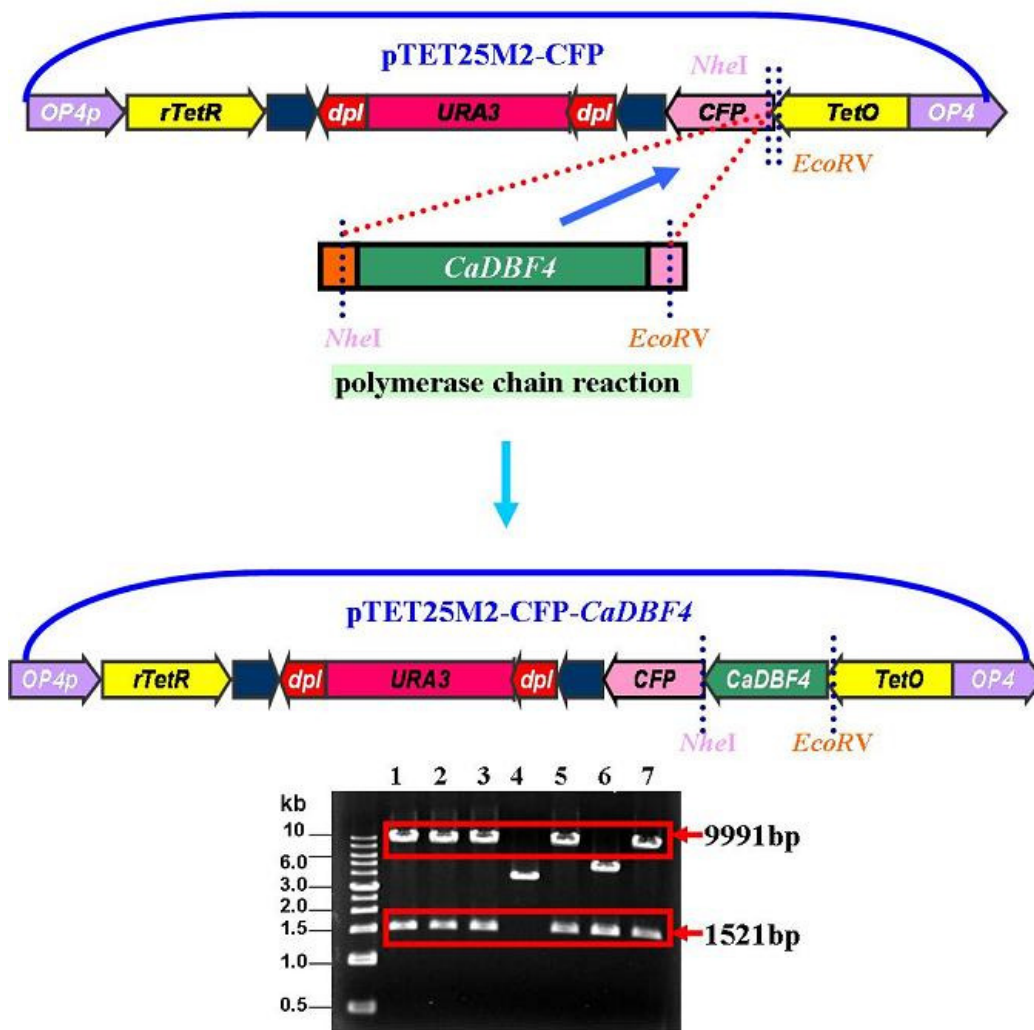
圖十四、將建構於 pGEM-T Easy 中之 *CaCDC7* 利用限制酶 *EcoRV* 與 *NheI* 進行作用，且利用此兩限制酶對 pTET25M-NC-YFP 質體進行作用，接著將經限制酶作用之 *CaCDC7* 與 pTET25-NC-CFP 進行接合反應(ligation)形成 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 質體，並且透過限制酶 *EcoRV* 與 *NheI* 對質體進行作用得到 9991 bp 之載體大小與 1971 bp 之 *CDC7* 基因大小，以確認 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 質體建構完成(lane2,10,11)。



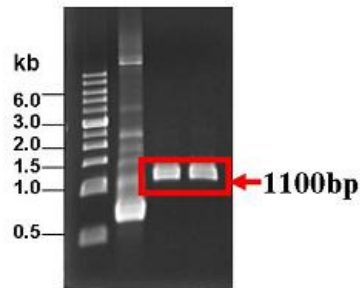
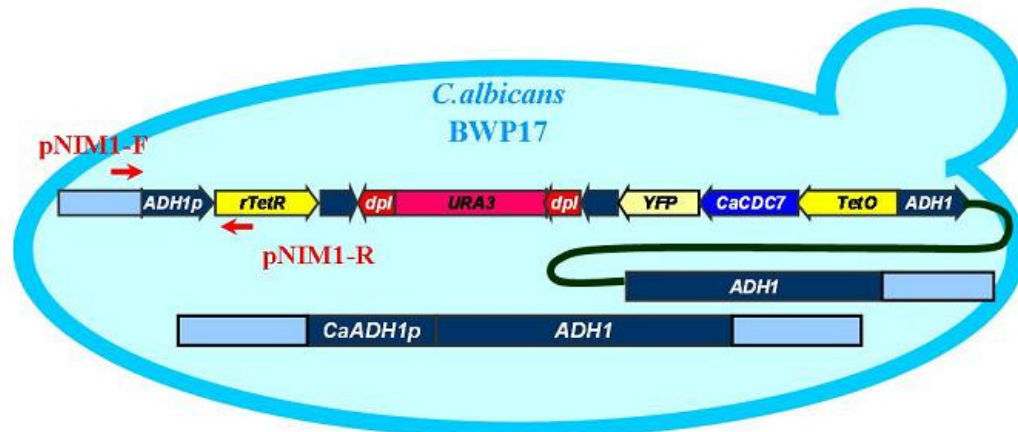
圖十五、將建構於 pCR2.1-TOPO 中之 CFP 利用限制酶 *BspEI* 與 *NotI* 進行作用，且利用此兩限制酶對 pTET25M-NC 質體進行作用，接著將經限制酶作用之 CFP 與 pTET25-NC 進行接合反應(ligation)形成 pTET25M-NC-CFP 質體，並且透過限制酶 *BspEI* 與 *NotI* 對質體進行作用分別得到 9274 bp 之載體大小與 717 bp 之 CFP 基因大小，以確認 pTET25M-NC-CFP 質體建構完成。



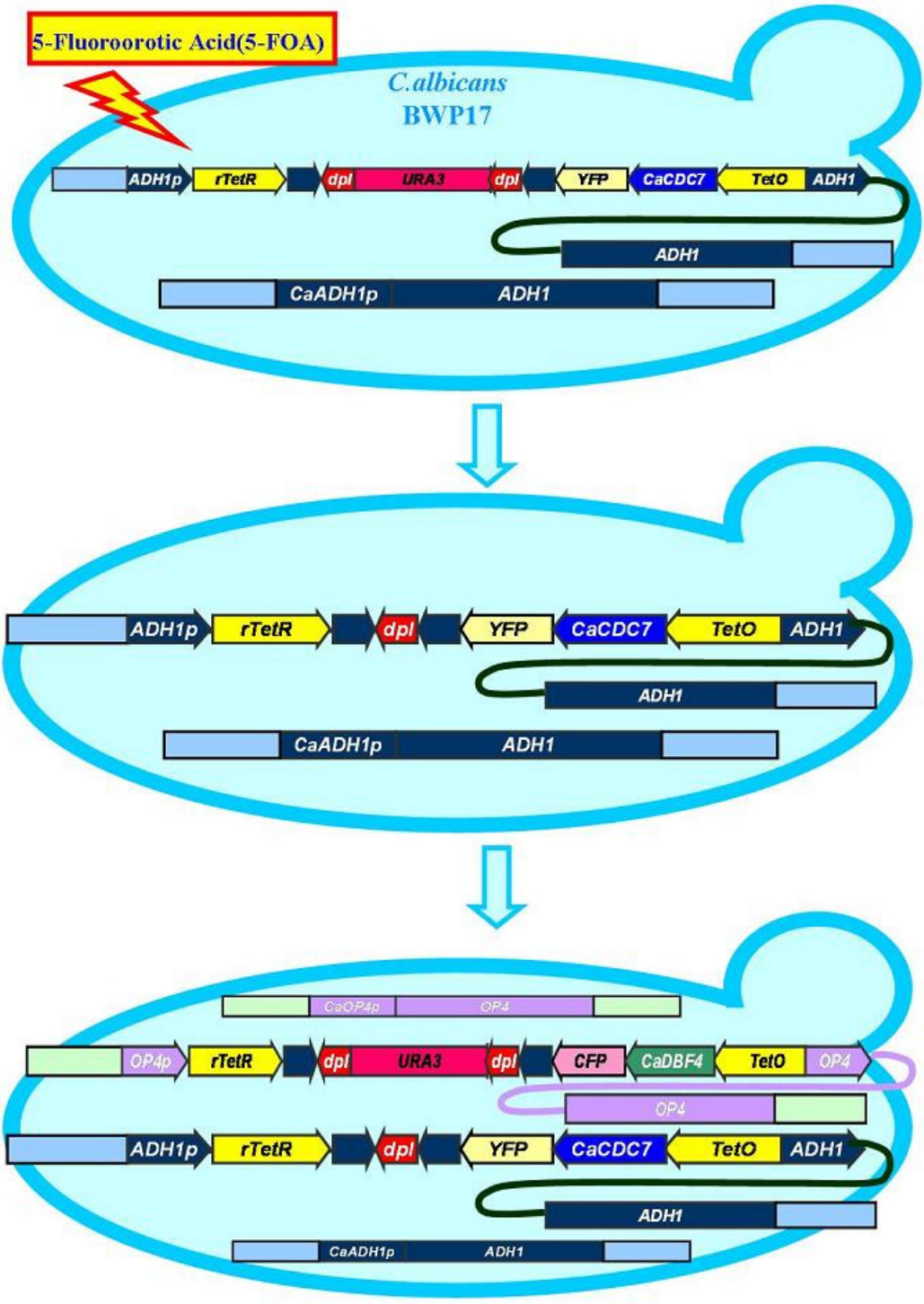
圖十六、將建構完成之 pTET25M-NC-CFP 質體與 pTET40 質體利用 *EcoRI* 與 *SalI* 限制酶進行作用，將 pTET25M-NC-CFP 質體上之 *URA3* 基因的上游部分與 *dpl200* 及 *CFP* 之 DNA 片段接入 pTET40 質體中，利用 *BamHI* 與 *XhoI* 限制酶對質體進行作用可分別得到 8203bp、1126bp 與 662bp 之預期片段大小，以確認 pTET25M2-CFP 質體建構完成(lane 4)，令原本利用 *ADHI* 基因座之 Tet-on 系統轉變成可利用 *OP4* 之基因座進行同源互換。

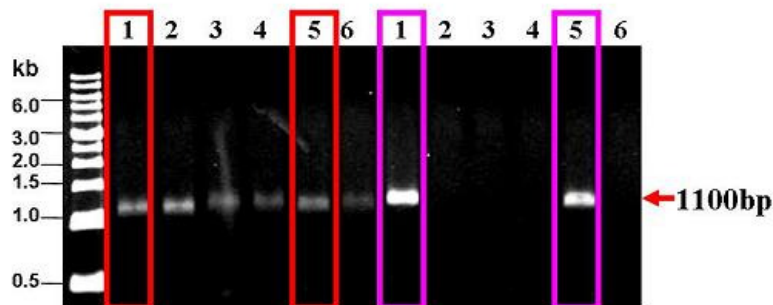
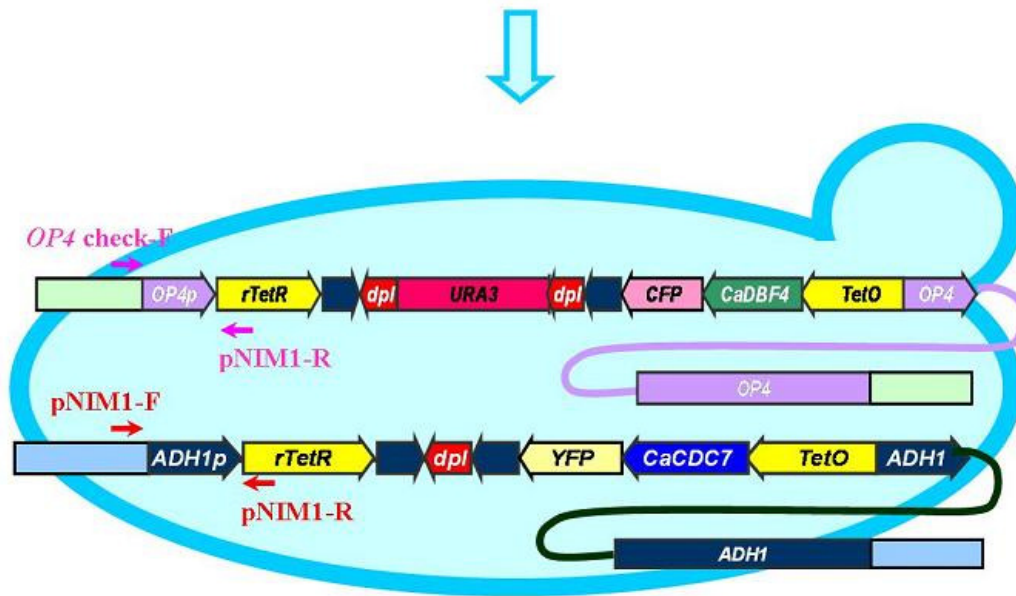


圖十七、運用 PCR 方式獲得大量帶有 *EcoRV* 與 *NheI* 限制酶切點之 *CaDBF4* 基因片段，利用 *EcoRV* 及 *NheI* 限制酶對以建構好之 pTET25M2-CFP 與經 PCR 放大之 *CaDBF4* 進行作用，接著將 *CaDBF4* 基因接入 pTET25M2-CFP 質體中，在透過 *EcoRV* 與 *NheI* 對質體進行限制酶作用後可分成 9991 bp 之 pTET25M-CFP 之載體大小與 1521 bp 之 DBF4 基因大小，即可確認 pTET25M2-CFP-*CaDBF4* 質體建構正確 (lane 1,2,3,5,7)。

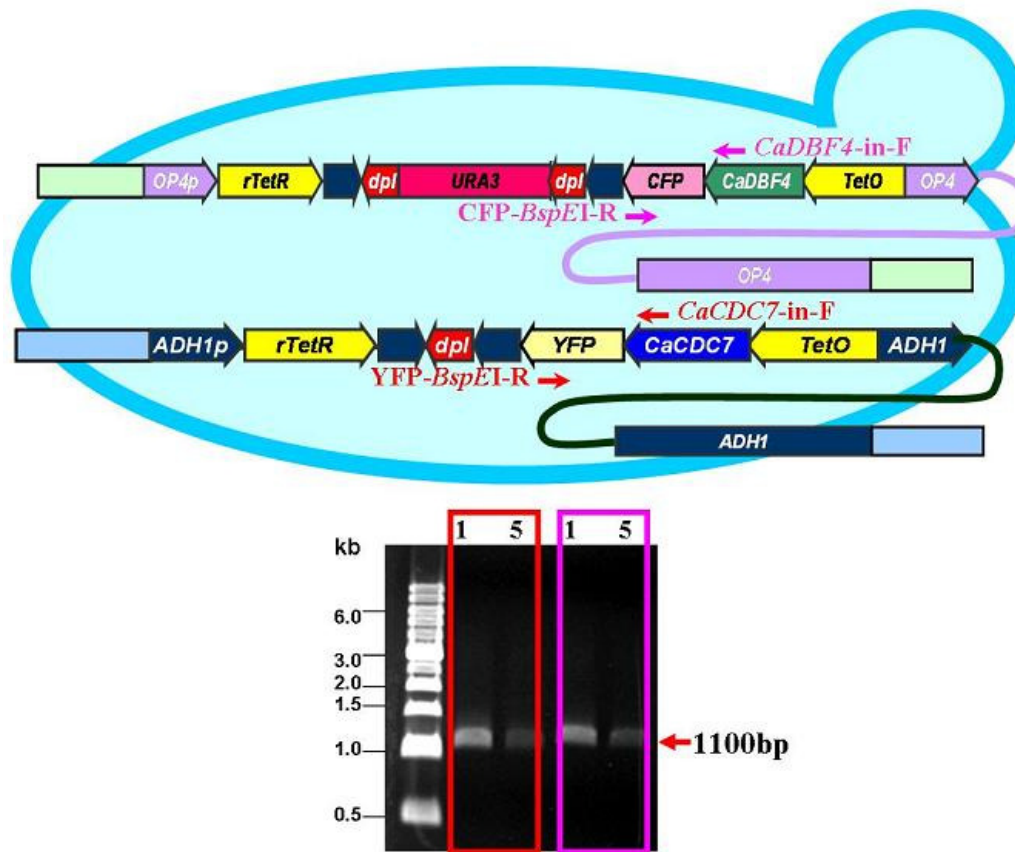


圖十八、將建構好之 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 之 Tet-on 系統利用同源互換方式，將帶有 *CaCDC7*-YFP 之 Tet-on 系統置入白色念珠菌 BWP17 菌株基因組中之 *ADH1* 基因座上，且利用分別位在 *ADH1* 基因上游之 pNIM1-F 引子及 *CartTA* 上之 pNIM1-R 引子進行 yeast colony PCR 放大出 1100 bp 之 DNA 大小，確認 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 白色念珠菌菌株建構完成(lane 3,4)。

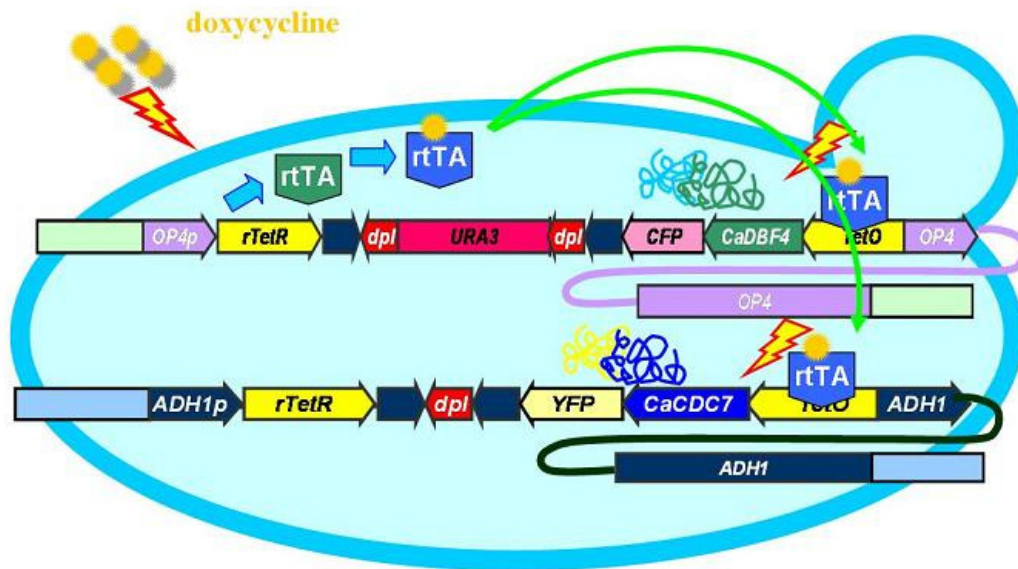




圖十九、將建構完成之 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 白色念珠菌菌株，利用 5-FOA 促此菌株將其所帶有之 *URA3* selection maker 剔除，而有利於第二個 pTET25M2-CFP-*CaDBF4* 之 Tet-on 系統送入同一菌株時，可再次利用 *URA3* 基因進行篩選，接著分別利用 pNIM1-F、pNIM1-R 與 *OP4* check-F、pNIM1-R 兩對引子經 yeast colony PCR 放大出 1100 bp 之 DNA 片段可得知第 1 與 5 號菌株同時擁有 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 與 pTET25M2-CFP-*CaDBF4* 之 Tet-on 系統。



圖二十、將已確認帶有 pTET25M-NC-YFP-*CaCDC7* 與 pTET25M2-CFP-*CaDBF4* Tet-on 系統之白色念珠菌菌株，再次分別利用 *CaDBF4*-in-F、CFP-*BspEI*-R 與 *CaCDC7*-in-F、CFP-*BspEI*-R 兩對引子分別確認 *CaCDC7*-YFP 與 *CaDBF4*-CFP 之 DNA 重組片段存在與否，由結果可得知第 1 號與第 5 號之菌株皆可被 PCR 放大出 1100bp 大小之片段，由此可知此兩重組片段存在。

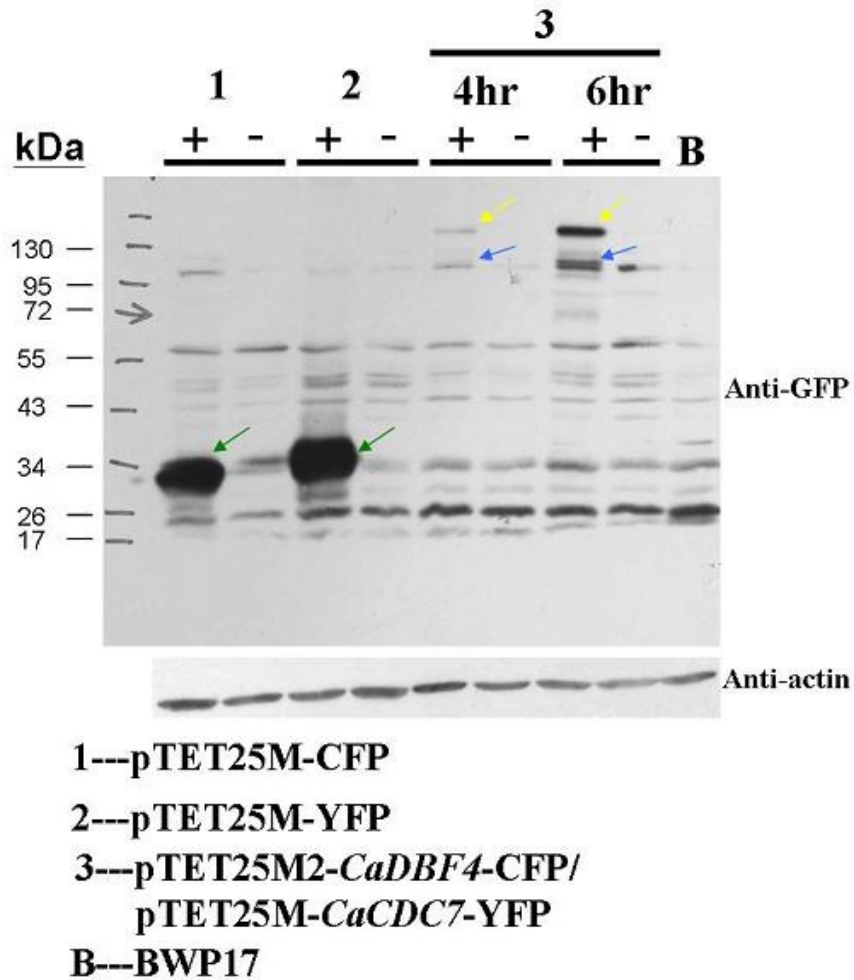


圖二十一、將建構完成之 *adh1::pTET25M-NC-YFP-CaCDC7/*
op4::pTET25M2-CFP-CaDBF4 白色念珠菌菌株，透過環境外加
doxycycline 之培養環境下，doxycycline 會與 *CartTA* 結合，以使得
CartTA 具有可與 tet operator 相結合之能力，進而誘導 *CaCdc7-YFP*
及 *CaDbf4-CFP* 重組蛋白質的大量表現。

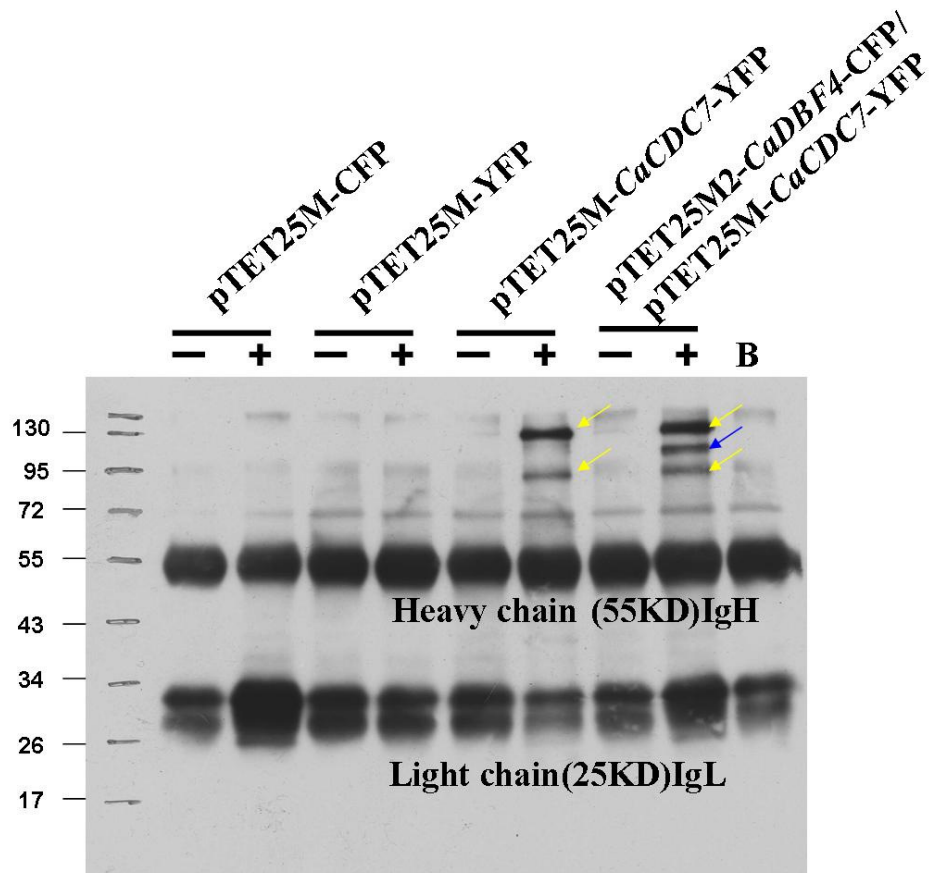
CaCdc7-YFP(97.9kDa)

CaDbf4-CFP(81.4kDa)

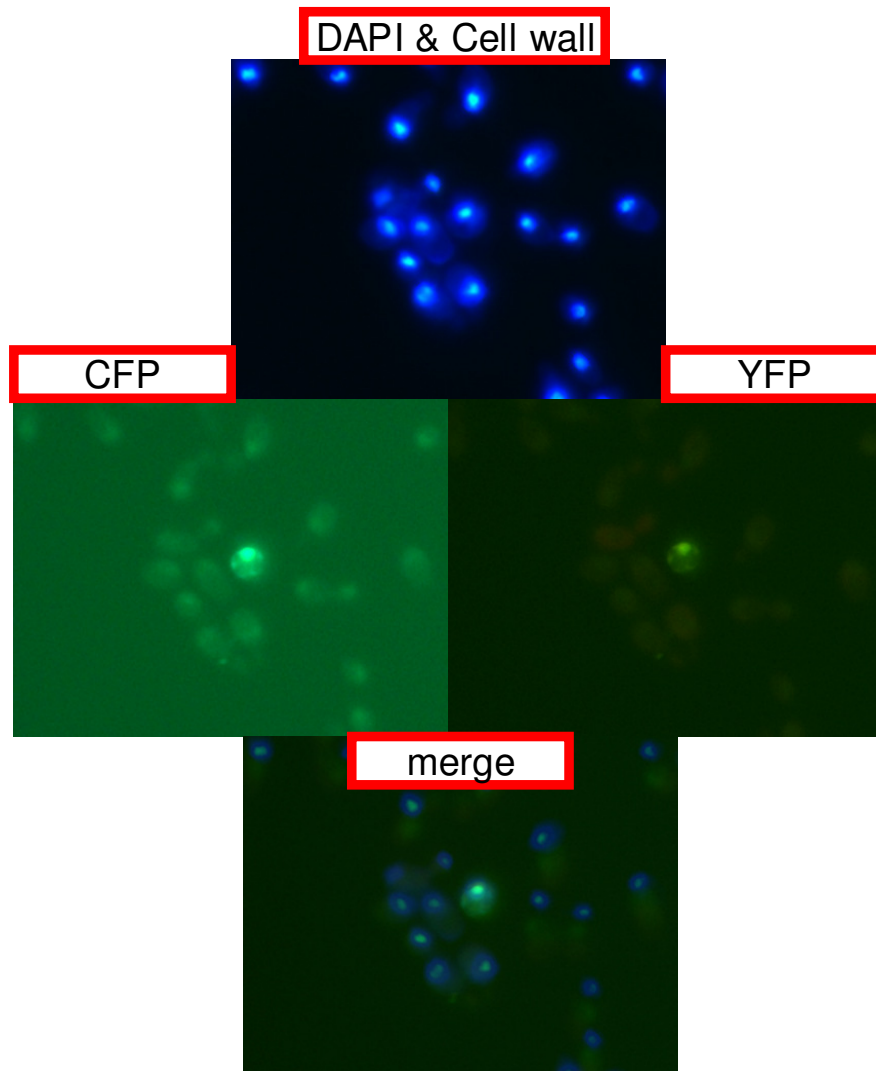
CFP or YFP (25.6kDa)



圖二十二、將帶有各種不同tet-on系統之白色念珠菌菌株進行蛋白抽取並利用western blot方法確認CFP、YFP等螢光蛋白皆有表達及*CaDbf4*-CFP與*CaCdc7*-YFP等螢光融合蛋白皆有表現。



圖二十三、利用蛋白免疫沈澱法更可進一步得知CaDbf4-CFP之螢光融合蛋白在pTET25M2-CaDBF4-CFP/pTET25M-CaCDC7-YFP菌株中經Doxycycline誘導後確實有表現。



圖二十四、將白色念珠菌之細胞壁與細胞核進行染色後，與經 doxycycline 誘導表現之 CaCdc7-YFP 與 CaDbf4-CFP 融合蛋白利用螢光顯微鏡進行觀察，可得知此兩融合蛋白主要分布於細胞核之位置，而是否有交互作用須經後續實驗確認。

第六章、參考文獻

- Beck-Sague, C. ,and Jarvis W.R.**(1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System.
- Berman J,Sudbery PE.**(2002). *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3(12):918-30.
- Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani S, Giannini D, Arzeni D, Di Cesare S, Di Francesco LF, Fortuna M, Giacometti A, Carle F, Mazzei T, Scalise G.**(2000). Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.*;44(9):2435-41.
- Baillie, G.S., and Douglas, L.J.** (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and theirPossible role in biofilm resistance to antifungal agent. *J Antimicrob Chemother* 46,397-403.
- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M. ,and Monk, B.C.** (2007). *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology* 153,3211-3217.
- Cutfield, J.F., Sullivan, P.A. and Cutfield, S.M.** (2000) Minor structural consequences of alternative CUG cofon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. *Protein Eng*, 13, 735-738.
- Cheng, M.F., Yang, Y.L., Yao, T.J., Lin, C.Y., Liu, J.S., Tang, R.B., Yu, K.W., Fan, Y.H., Hsieh, K.S., Ho, M., Lo, H.J.**(2005). Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species .*BMC Infect Dis* 5,22.
- Fridkin , S.K. ,and Jarvis, W.R.**(1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections.*Clin Microbiol Rev* 9.499-511.
- Ghannoum MA ,Rice LB.**(1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12(4):501-17.
- Gerami-Nejad M, Berman J, Gale CA.**(2001). Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. *Yeast*. 2001 Jun 30;18(9):859-64.
- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., and Hedges,S.B.**(2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plant. *Science*293,1129-1133.
- Kitada K ,Johnston LH ,Sugino T ,Sugino A.**(1992). Temperature-sensitive *cdc7* mutations of *Saccharomyces cerevisiae* are suppressed by the *DBF4* gene, which is required for the G1/S cell cycle transition.*Genetics* 131(1):21-9

Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J. and Iwasaki, S.(1989)
The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast forms of *Candida albicans*.
Sabouraudia, 13, 148-153.

Lei M, Tye BK.(2001). Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex.*J Cell Sci* 114(Pt 8):1447-54

Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cassiapuoti, A., and Fink, G.R (1997). Nanofilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.

Lamfon, H., Porter, S.R., McCullough, M., and Pratten, J.(2004). Susceptibility of *Candida albicans* biofilm grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother* 53,383-385.

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

Masai H, Taniyama C ,Ogino K, Matsui E ,Kakusho N, Matsumoto S, Kim J M ,Ishii A ,Tanaka T ,Kobayashi T ,Tamai K ,Ohtani K ,Arai K.(2006) Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem.*;281(51):39249-61. Epub 2006 Oct 17.

Maryam Gerami-Nejad, Judith Berman and Cheryl A. Gale(2001). Cassettes for PCR-mediate construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusion in *Candida albicans*. *Yeast* 2001:18: 859-864 DOI:10.1002/yea.738

Ohtoshi A ,Miyake T ,Arai K ,Masai H.(1997). Analyses of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc7 kinase point mutants: dominant-negative inhibition of DNA replication on overexpression of kinase-negative Cdc7 proteins. *Mol Gen Genet* 254(5):562-70.

Odds, F.C. (1994) Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol*,31,S2-5.

Osman A.(2004) Yeast two-hybrid assay for studying protein-protein interactions.

Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K. and Muto, A. (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol Rev*, 56, 229-264.

Park YN, Morschhäuser J.(2005). Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2005 Aug;4(8):1328-42.

Perreau, V.M., Keith, G., Holmesm, W.M., Przykorska, A., Santos, M.A. and Tuite, M.F. (1999) The *Candida albicans* CUG-decoding ser-tRNA has an atypical anticodon stem-loop structure. *J Mol Biol*, 293,1039-1053.

Patterson M, Sclafani RA, Fangman WL, Rosamond J.(1986).Molecular characterization of cell cycle gene CDC7 from *Saccharomyces cerevisiae*.

Rocha, C.R., Schroppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Raylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Leberer, E. (2001). Signaling through adenyly

cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Mol Biol Cell 12,3631-3643.

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

Sheu YJ, Stillman B.(2006). Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. Mol Cell:24(1):101-13.

Sherlock, G. and Rosamond, J. (1993) Starting to cycle:G1controls regulating cell division in budding yeast. J Gen Microbiol, 139 (Pt 11), 2531-2541.

Whiteway M, Oberholzer U.(2004). *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol. 2004 Aug;7(4):350-7.

Yang-Nim Park, Joachim Morschhauser.(2005) Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. EUKARYOTIC CELL, Aug. 2005 p. 1328-1342