

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 : 探討白色念珠菌之 CaCDC7 激酶負調控菌絲形成的新
* 名 稱 : 新角色
* *****

執行計畫學生： 楊舒雅
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-045-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

摘要

白色念珠菌(*Candida albicans*)屬於真核生物之中真菌界中的酵母菌屬，本身是一伺機性病原菌，主要感染哺乳生物，在普遍存在於生物體的黏膜表面，當生物免疫力降低的時候才會致病。白色念珠菌細胞生長形式大部分時間以 yeast form 存在，而當受到外在環境或誘導因子的刺激之後，細胞的形態才會轉變為菌絲形式。

在過去的研究中發現，Cdc7 功能在於利用本身的 serine/threonine 激酶活性調節細胞週期的 G1/S phase transition，並且此功能在其他許多真核生物中具有高度保留性。在細胞週期的 G1 phase 末期，Cdc7 蛋白質會受到另一調節蛋白質 Dbf4 的調節並與其結合成為 DDK(Db4-dependent-kinase)，進而磷酸化下游 MCM complex，執行 DNA 解旋酶的功能，促使細胞週期進入 S phase 進行 DNA 的複製，其功能在已知物種之同源基因為必要基因。然而在白色念珠菌當中，當 *Candida albicans CDC7 (CaCDC7)* 在細胞中的表現量被削弱(knock-down)之後，卻發現細胞的形態會由 yeast form 轉變成為菌絲形，所以我們想建立 *CaCDC7* 完全剔除品系 (null mutant) 以確定 *CaCDC7* 抑制菌絲生成的角色。同時我們也要問在白色念珠菌中，*CaCDC7* 扮演抑制菌絲生成的角色，是否也是依賴本身高度保留的 serine/threonine 激酶活性。

因此本實驗設計為，在 *CaCDC7* 基因上以定點突變方式針對激酶催化活性位與接受上游磷酸化位點製造外源性突變蛋白質激酶，使激酶活性缺失(loss of function)，並送入內生性 *CaCDC7* 不表現的白色念珠菌品系中表現。如果表現外源性野生型 *CaCDC7* 的細胞，推測細胞型態應由菌絲形回復成芽孢形(yeast form)，但若 *C. albicans* 外源性表現之經點突變過的 *CaCdc7* 突變激酶，則細胞型態仍然維持以菌絲形式生長，則可確認，在白色念珠菌 *CaCDC7* 的激酶活性確實為抑制菌絲生成所需。

壹、序論

一、白色念珠菌

1. 白色念珠菌與疾病

白色念珠 (*Candida albicans*) 為一種能普遍在環境中被分離出的真菌，在一般正常免疫力的人體中數量很少，並不易引起疾病，但因常寄生在人體皮膚、口腔、消化道及生殖道和泌尿道黏膜表皮上，故當人體免疫力低下，或體內正常菌群相互制約作用失調時，白色念珠菌便會大量生長繁殖，形成伺機性感染。由於白色念珠菌感染好發於免疫低下(或稱免疫妥協immunocompromised)的病人身上，像是愛滋病病患或是器官移植病人，皆常因白色念珠菌的伺機性感染而引起鵝口瘡，或全身性菌血症，嚴重甚至導致死亡。另外，懷孕、糖尿病、服用抗生素和服用降低身體免疫力的人，感染念珠菌症的風險也會有增加的現象。

因此，早在二十世紀之前，科學家便已積極展開抗真菌藥物的研究，到了近年許多抗真菌藥物紛紛推陳出新，包括amphotericin B、Fluconazole、Liposomal B、Voriconazole、Caspofungin 等等，都收到不錯抑制真菌的效果，也紓解了不少醫院裡真菌感染的醫療壓力。然而，隨著抗真菌藥物的濫用，卻使得真菌對現有的抗真菌藥物逐漸產生抗性(Barchiesi et al., 2000)，在近年的研究便指出，某些真菌具有抵抗抗真菌藥物的能力，能夠成功防止真菌細胞體受到藥物的破壞，例如某些真菌所含有的一種efflux pump，便能將抗真菌藥物打出真菌細胞外，達成對抗抗真菌藥物的目的，進而保護真菌本身，根據最新統計，已有70%的白色念珠菌品系對amphotericin B 產生抗藥性。上述及其他種種真菌的抗藥性問題日漸浮出檯面，於抗真菌藥物的使用上，也形成一定程度的醫療阻礙。

另外，在許多院內感染的微生物種類中，其中白色念珠菌是院內感染最常見的菌株(Beck-Sague and Jarvis, 1993; Cheng et al.,2005; Fridkin and Jarvis, 1996) ，因為白色念珠菌不只容易污染潮溼的醫療器材(例

如插管)，暴露在空氣中的真菌，對於抵抗力較差的病人更造成威脅。根據中國醫學大學附設醫院何茂旺醫師的統計指出，台灣地區相對於世界其他國家而言，人民容易受到念珠菌感染的比率僅次於巴西，其中台灣各大醫院最常造成院內念珠菌血症的菌株，又以白色念珠菌為首，並且病患感染白色念珠菌血症的死亡率比感染其他細菌菌血症死亡率更高。因此，我們希望能幫助了解白色念珠菌如何傳染，將助於白色念珠菌感染的控制，以預防此問題的擴大。

2. 白色念珠菌的特質與研究限制

白色念珠菌為真菌中極少數基因只以雙倍體存在的菌種，因其存在分別有兩個對偶基因，故對於白色念珠菌基因的遺傳操作上較具難度，例如在探討某些特定基因的功能上，則必須同時剔除兩個對偶基因。

再則白色念珠菌密碼子的使用上，異於一般遺傳編碼規則（粒線體內特殊的胺基酸編碼例外），像是密碼子 CUG 並非轉譯成 leucine 而是 serine，對於白色念珠菌遺傳研究的操控上更加深其難度。

也因白色念珠菌不同於大部分真核生物，它並沒有明顯的世代交替，即缺乏完整的有性生殖，故目前對於其有性生殖過程的機轉仍一知半解。

3. 白色念珠菌的生長特性與型態

白色念珠菌屬於真菌界（*Fungi*）—半知菌亞門—芽孢菌（*Endomycetes*）—隱球酵母目（*Saccharomycetales*）—隱球酵母科—念珠菌屬（*Candida* 或 *Monilia*）—假絲酵母種（孕育保健網）。

Candida albicans 為一種酵母菌，其型態有芽孢形式（yeast form）、真菌絲（true hyphae）和假菌絲（pseudohyphae），並能形成分生孢子（blastoconidia）。白色念珠菌屬於絕對好氧性，可在相當廣泛 pH 值和溫度下生長於普通培養基。在 25°C 經 24-48 小時，可長成圓形、具光

澤、奶油樣白色菌落，而其菌絲的產生受環境影響；生長於有氧環境，並可以利用發酵形式來利用醣類，故在菌種的鑑別上也可根據其發酵或同化醣類來做為不同菌株的區別（ICD-9 112；ICD-10 B37 第四十六章念珠菌症 -蔡睦宗/許清曉/孔祥琪陳宜君著）。

白色念珠菌通常以芽孢形式 (yeast form)、真菌絲形式 (true hyphal form) 與假菌絲形式 (pseudohyphal form) 三種形式存在於一般環境中，其中大部分時間又以芽孢形式存在，故其致病力也與芽孢型-菌絲型之間的轉變有相當大的關連性。

二、*CDC7* 基因

Saccharomyces cerevisiae CDC7 (*ScCDC7*) 在細胞週期中所扮演的角色，於大部分真核生物中，小至出芽酵母菌大至人類細胞中，都具有高度的保留性，也由於白色念珠菌與出芽酵母菌的親緣關係相當接近，便以出芽酵母菌中的 *CDC7* (*ScCDC7*) 所扮演的角色作為參考依據。

藉由比對 *ScCdc7* 蛋白質與測定其激酶活性，得知 *Cdc7* 在出芽酵母菌中屬於 serine/threonine 蛋白質激酶家族成員之一，其蛋白質序列、結構與功能在大多數真核生物中亦具有高度保留性。又已知在出芽酵母菌中，*ScCDC7* 負責細胞週期中活化 DNA 的複製起始，利用其本身的激酶活性扮演著催化次單元的角色，與另一調節次單元 *Saccharomyces cerevisiae DBF4* (*ScDBF4*) 同磷酸化以活化其下游 MCM complex (minichromosome maintenance proteins，為一解旋酶)，促使 DNA 解旋酶的結構改變而活化 (Masai and Arai, 2002)，以啟動 DNA 的複製工作 (Kitada et al., 1992；Ohtoshi et al., 1997)。最近的研究更發現 *ScCDC7* 所具有的磷酸化活性能促使複製前的複合物 pre-replication complex (Pre-RC) 重新聚集 assembly 使細胞從靜止期 quiescence 其重新返回 re-entering 細胞週期。(Chuang LC et al., 2009)

三、DDK 中 *CDC7* 與 *DBF4* 的關係

在過去文獻中指出，*CDC7* 與 *DBF4* 活化細胞週期 DNA 複製的起始之 MCM complex 的機制，於大部分真核生物都具有高度的保留性，也由於白色念珠菌與出芽酵母菌的親緣關係相當接近，便以出芽酵母菌中所扮演的角色作為參考依據。在出芽酵母菌中，*ScCDC7* 會與 *ScDBF4* 結合成為 DDK (*DBF4*-dependent kinase)，因而具有激酶活性，進而磷酸化 DNA 複製起始所需的 pre-replication complex (pre-RC)，MCM (minichromosome maintenance proteins) complex2-7，以啟動細胞週期 DNA 的複製。

於 DNA 複製前的 G1 phase，Cdc6、Cdt1、MCM10 等蛋白質會和 ORC(origin-recognition complex)會結合到複製起始位作準備，並且 Cdc6、Cdt1 會幫助解旋酶複合體 MCM complex2-7 與 MCM10 結合，一旦 MCM complex 結合完成後，Cdc6 便會脫離複製起始位。隨著細胞週期進入 S phase，Cdc/Dbf4 complex 會對 MCM complex 進行磷酸化而改變 MCM complex 結構，以活化解旋酶，促使雙股 DNA 的解螺旋作用。等到 MCM complex 把 DNA 解開後也會與 Cdt1 一起離開複製起始位，接著再由另一蛋白質 Cdc45 活化 MCM complex，開始 DNA 的複製作用 (Ming Lei and Bik K.Tye.,2001)。然而，近年來也發現 DDK 與細胞週期減數分裂時的基因重組、出芽酵母菌的孢子形成、以及 DNA 修補等功能有關。

貳、研究動機與策略（圖一研究策略）

一、針對白色念珠菌 *CaCDC7* 進行功能分析

根據前人研究得知，出芽酵母菌與白色念珠菌擁有許多功能類似的同源基因，且目前對於出芽酵母菌的研究較為透徹，因此我們能以出芽酵母菌 *CDC7* (*ScCDC7*) 的研究來推測白色念珠菌 *CaCDC7* 的功能，且已知 *ScCDC7* 高度保留的功能，在於利用本身 serine/threonine 蛋白質激酶活性調控細胞週期。然而在之前實驗室的研究結果中卻發現，當 *CaCDC7* 的兩個對偶基因分別在 *MET3* 或 *MAL2* promoter 控制之下，若培養環境中分別加入 2.5mM methionine / cysteine 或 2% maltose 以遏止 promoter 啟動，使內生性 *CaCDC7* 皆不表現時，白色念珠菌細胞竟仍會生長，同時還導致菌絲的形成，顯示 *CaCDC7* 為非必要基因，此與出芽酵母菌 *ScCDC7* 為必要基因，兩者有極大不同，同時也顯示 *CaCDC7* 是菌絲生成的負調節者。

因此我們設定的假說為 *CDC7* 在白色念珠菌當中，是利用其高度保留的 serine/threonine 蛋白質激酶活性(調控細胞週期，並推測 *CaCDC7*) 調控菌絲生成(其活性亦需要本身的 serine/threonine 蛋白質激酶活性)，所以本實驗將利用定點突變方式，在白色念珠菌中表現 *CaCdc7* 激酶活性缺失的突變蛋白質，來幫助我們了解 *CaCdc7* 激酶活性缺失是否會造成 *CaCDC7* 基因的功能喪失 (loss of function)，進而導致菌絲的形成。

參、材料與方法

一、材料

1. 大腸桿菌菌種

DH5 α [f80dlacZDM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, relA1, deoR, D(lacZrA-argF)U169]

2. 白色念珠菌品系對照表

BWP17 (parental strain)	[<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>his1::hisG/his1::hisG arg4::hisg/arg4::hisG</i>]
CaCDC7 MET3/-::ura3	[<i>MET3-CaCDC7/ Cacdc7::ura3</i>]
CaCDC7 +/- :: dpl200	[<i>CaCDC7/ Cacdc7::dpl200</i>]
CaCDC7 MET3/-::dpl200	[<i>MET3-CaCDC7/ Cacdc7::dpl200</i>]
CaCDC7 MET3/-::dpl200 tet-on-WT-CaCDC7	[<i>MET3-CaCDC7/ Cacdc7::dpl200</i> <i>adh1 ::tet-on WT-CaCDC7</i>]
CaCDC7 MET3/-::dpl200 tet-on-WT-CaCDC7	[<i>MET3-CaCDC7/ Cacdc7::dpl200</i> <i>adh1 ::tet-on T436A</i>]

3. 大腸桿菌質體

pTET25M-CaCDC10-HS 由實驗室賴威仲學長所構築

pTET25M-GFP-NC 由實驗室賴威仲學長所構築

MET-CaCDC7 由實驗室吳章豪、張珍瑋學長、姊所構築

pFA-HIS1-MET3 由實驗室吳章豪、張珍瑋學長、姊所構築

pGEM-T-EASY Vector (Promega)

pCR2.1 TOPO Vector (Invitrogen)

4. 所使用到的 kit

(1)PCR clean-up kit	Geneaid Gel/PCR DNA fragments Extraction kit
(2)Gel extraction kit	Geneaid Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit
(3)Plasmid purification kit	Gene-Spin™ MiniPrep Purification Kit V ²
(4)Yeast DNA purification kit	MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit
(5)Yeast RNA purification kit	MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit
(6)RT enzyme	SuperScript III Reverse transcriptase
(7)Mutagenesis kit	QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit

5. 使用到的培養液

Luria-Bertani medium (LB broth) +Ampicillin、SOC medium、YPD medium、SC-Ura medium、SC-his medium、SD+arg+his medium、SD+arg+his+uri+ 2.5mM met/cys (SD+R+H+U+2.5mM met/cys) medium。

6. 使用到的培養基

Luria-Bertani medium(LB) +Ampicillin plate、Luria-Bertani medium (LB) + kanamycin plate、YPD plate、SC-ura plate、SD+arg+his(SD+R+H) plate、SD+arg(SD+R) plate、SD+arg+his+uri+2.5Mm met/cys plate。

7. 使用到的藥品

agarose(洋菜膠)、Tris-base、EDTA、Sodium Chloride(NaCl)、Ethidium Bromide(EtBr)、Sodium acetic acid(NaAc)、ethanol、Lithium acetic acid (LiAc)、PEG3350、SDS、glucose、maltose、CaCl₂、sorbitol、isopropanol、NaOH、HCl、Typtone、Peptene、Yeast extract、yeast nitrogen base without

amino acid、yeast synthetic drop-out media supplement without uracil、yeast synthetic drop-out media supplement without histidine、arginine、histidine、hydrochloride(HCl)、uracil、methionine、cysteine、uridine。

二、方法

1.反轉錄作用暨聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

前二天培養白色念珠菌 (pre-culture) 至前一天重新回養到新的培養液 4mL，培養約24小時後，稀釋測定各種菌液 OD 值後，個別計算並取出 2 OD 菌液所需的菌液體積，離心5分鐘，接著按照 MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit 步驟進行標準純化 RNA 流程，抽出白色念珠菌 RNA 後，測定 RNA 濃度，計算並取出約 2ug 的RNA 並配置 RNA 混合溶液，置於 PCR 機器 65°C 作用5分鐘，以破壞 RNA 的二級結構，並立即置於冰上3分鐘避免 RNA 恢復其結構。溶液配置如下：

RNA	2ug 之體積
Oligo-dT	1ul
10mM dNTP	1ul
DEPC d ₂ H ₂ O	補至13ul
Total	13ul

接著於上述配置之RNA混合溶液中再配置成反轉錄酵素作用溶液，內含抗氧化作用之DTT與5X Firststrand buffer，並加入SuperScript III Reverse transcriptase 反轉錄酵素。設定PCR 機器於50°C 反應60分鐘，將 mRNA 轉成 cDNA，接著於72°C 中止酵素作用15分鐘即完成反應。配置反轉錄酵素作用溶液如下：

RNA 混合溶液	13ul
5X Firststrand buffer	4ul
DTT	2ul
RT酵素	1ul
<hr/>	
Total	20ul

2. 限制酶反應確認

「大腸桿菌菌落聚合酶鏈鎖反應」通常配合「限制酶反應」，以確認樣品的正確性。做完限制酶反應後，用膠體分離 DNA，再以 gel extraction kit 從膠體回收所需 DNA 片段回收，(儘量減少回收膠體積，以避免收到沒切到之原環狀質體) 限制酶的選擇可配合當初 DNA 片段兩端的切點 (分離出載體跟 DNA 片段兩個部分)，也可以在載體和 DNA 片段上分別找一切點使用來進一步確認 DNA 片段被接入。

3. 酵母菌轉殖 (Yeast transformation)

取一些菌置於放有約 2ml 液態培養液(YPD or SC)的養菌管中，以 30°C 培養隔夜，取一部分放入含有 50ml 培養液(YPD or SC)的錐形瓶中，以 30°C 培養隔夜，使之達到 O.D.₅₉₅ 值約 0.5~0.6 (log phase) (每一組轉形樣本需 5ml)，離心 3000rpm 5 分鐘後倒掉上清液，再用 10ml 無菌水洗一次，離心 3000rpm 5 分鐘並倒掉上清液，加入 875μl 1XTE/LiAc，使之均勻懸浮，再以每管 87.5μl 分裝，將預先處理好 (每管需 10μl 鮭魚精子 DNA，denature 95°C 10 分鐘，插在冰上至少 10 分鐘，再加入 1.25μl 10XTE & 1.25μl 10XLiAc/每份量) 的鮭魚精子 DNA 以每管 12.5μl 的量加入 (鮭魚精子 DNA 當做一個攜帶者，使線狀質體或 DNA 較易被酵母菌吞入)，接下來將欲轉殖的 DNA(線狀質體或是 DNA)以約 1~5μg 的量加入，再配製 700μl 40% PEG3350 / 1XTE / 1XLiAc，放入並混合均勻，在 30°C 震盪培養 30 分鐘，再換到 42°C 熱休克 15 分鐘，結束後快速離心 5 秒並去除上清液，再快速離心 5 秒，

吸掉殘留 PEG 等物質而剩餘菌體，最後加入 150~200 μ l 二次水回溶，以玻璃棒或玻璃珠塗於可篩選菌株的固態培養基上，於 30 $^{\circ}$ C 培養 2~3 天。

4. 酵母菌菌落聚合酶連鎖反應 (Yeast colony PCR)

挑取一顆菌落到 30 μ l 0.8% NaOH 裡並 vortex 使其混合均勻，加熱 95 $^{\circ}$ C 15 分鐘，快速離心 1 分鐘將細胞殘骸離下，直接取上清液進行 PCR 反應，由於 NaOH 亦會影響 PCR 反應，故最多取 5 μ l 上清液。

5. 酵母菌基因組 DNA 的抽取

由於酵母菌菌落聚合酶連鎖反應並非十分穩定（在會插入基因組而非以質體型態單獨在酵母菌體內複製的情形進行酵母菌菌落聚合酶連鎖反應尤為困難，我們所研究的白色念珠菌便是），因此有時會利用基因組 DNA 的抽取配合 PCR 或南方點墨法來再次確認品系。

抽取的流程如下：挑一些菌加入有約 2ml 培養液 (YPD or SC) 的養菌管中，於 30 $^{\circ}$ C 培養隔夜，從隔夜菌液取一部分放入含有 100ml 培養液 (YPD or SC) 的錐形瓶中，於 30 $^{\circ}$ C 培養隔夜，使之達到 log phase 後離心 5000rpm 5 分鐘，倒掉上清液，加入 10ml 1M sorbitol 和 0.1ml 50mg/ml zymolyase (我們用 lyticase)，置於 37 $^{\circ}$ C 1 小時，直到形成原生質球 (Spheroplas：細胞壁被除掉的細菌或者酵母細胞) 為止，再離心 5000rpm 5 分鐘，倒掉上清液並加入 10ml 1M sorbitol 清洗一次，小心混和使細胞均勻懸浮，離心 5000rpm 5 分鐘，到掉上清液，加入 10ml 5mM tris (pH7.4)、20mM EDTA，以及 1ml 10% SDS，混合均勻後置於 65 $^{\circ}$ C 30 分鐘，再加入 4ml 5M KAc (potassium acetate) 並置於冰上 1 小時，再離心 10000rpm 5 分鐘，取上清液到新的離心管中，並加入等體積的異丙醇，置於室溫至少 5 分鐘，離心 5000rpm 1 分鐘，到掉上清液，並使之乾燥，在其完全乾燥後加入 3ml TE buffer 回溶，再加入

15 μ l 5mg/ml pancreatic RNase，置於 37°C 30 分鐘，然後加入 0.3ml 3M NaAc (sodium acetate)，混合均勻後再加入 2ml 異丙醇，置於室溫至少 5 分鐘，離心 5000rpm 1 分鐘，去除上清液，並使之乾燥，最後加入 1-2ml TE 回溶，然後可以保存於 -20°C 中。

6. 菌絲誘導的培養

以 SD+R+H+Uri+2% glucose 培養液 2mL 培養白色念珠菌不同品系，個別挑起 1 個月內劃開(在 SD+R+H+Uri+2% glucose plate)之單一菌落，30°C 培養至隔夜(約 16hr)，隔日將菌液回養起始濃度為 OD=0.1 於 SD+R+H+Uri+2.5 Mm met/cys +2% glucose 培養液中，養至 8 小時觀察各品系白色念珠菌型態生長情況，並於之後在實驗組加入 40 μ m/mL doxycycline，接著 30°C 培養至 24hr，觀察各品系白色念珠菌型態生長情況。並個別更換相同條件培養液，再以相同培養條件培養至 32hr，並觀察各品系白色念珠菌型態生長情況。

7. 菌絲誘導的觀察

使用顯微鏡目鏡 10x、40x 的物鏡於明視野 (A) 下觀察均質菌液中白色念珠菌型態。

肆、結果

一、運用 deletion cassette 剔除白色念珠菌 *CaCDC7*

從實驗室之前的研究結果發現，白色念珠菌 *CDC7* 的功能，似乎不同於在其他真核生物中具有高度保留性的 DNA 複製起始功能，而是扮演菌絲形成的負調節者。由於先前學長姊的實驗尚未得到 *CaCDC7* 兩個對偶基因都剔除的品系，只將一個 *CaCDC7* 基因以 *URA3* 剔除，另一個對偶基因受到 *MET3* promoter 的調控 (*CaCDC7 MET3/-::ura3*)，且

此品系在 *MET3* promoter 遏止下仍可能有極少而基礎的 *CaCDC7* 蛋白產物表現，所以本實驗還必須完成 *CDC7* 兩個對偶基因的剔除，確定當 *CaCDC7* 完全不表現其蛋白產物時，會造成細胞菌絲的形成，以便確認 *CaCDC7* 調控細胞型態的特殊角色。

白色念珠菌 *CaCDC7* 由之前實驗室學長姊建構出的品系有 *CaCDC7* +/- ::*ura3*(以 *URA3* 剔除一個對偶基因)，*CaCDC7* +/- ::*dpl200*(從 *CaCDC7* +/- ::*ura3* 中移除 *URA3* marker)，*CaCDC7 MET3*/- ::*ura3*(*CaCDC7* +/- ::*ura3* 中另一 *CaCDC7* 對偶基因受到 *MET3* promoter 的調控)等，唯獨尚未得到 *CaCDC7* 基因的完全剔除品系，因此我使用不同實驗策略進行 *CaCDC7* null mutation。當中選擇 *CaHIS1* 當作剔除品系的 selection marker，並希望在 *CaHIS1* 基因兩端分別構築 *CaCDC7* 上下游的同源序列，作為剔除用 cassette。

1. 製備 pGEM-CaCDC7-CaHIS1 質體

設計分別帶有 *EcoRV* 與 *NheI* 的 primers 在 *CaCDC7* 編碼區內分別與基因之 5'、3' 端約 20 bp 序列互補黏合，以白色念珠菌 BWP17 基因組為模板，經過 PCR 放大出 *CaCDC7*，進行 TA cloning，將 *CaCDC7* 基因接入 pGEM-T-EASY vector 中，製備出 pGEM-*CaCDC7* 質體 (圖二)。另外，使用帶有 *BstBI* 與 *PacI* 切點序列的 primers，以實驗室前人所建構的 pFA-His1-Met3 質體為模板，藉由 PCR 放大出白色念珠菌 *HIS1* 基因(*CaHIS1*)，接著將 pGEM-*CaCDC7* 質體經由大腸桿菌的放大後並抽取之，並於 *CaCDC7* 基因內的 *BstBI* 與 *PacI* 切點，利用 *BstBI* 與 *PacI* 限制酶酵素移除第 300~1070 位置約 700 個核苷酸，藉此將此段 *CaCDC7* 序列置換成 *CaHIS1*，以製備出 *CaHIS1* 基因前後分別帶有 *CaCDC7* 基因上游、下游非編碼區約 235 bp 和 403 bp 之 pGEM-*CaCDC7*-*CaHIS1* 質體 (圖三)。

2. 製備白色念珠菌 *Cacdc7* homozygous null mutant 品系

使用限制酶酵素 *NotI*，將此一 *CaCDC7-CaHIS1* 重組 cassette 從 TA-*CaCDC7-CaHIS1* 質體中切出（圖三）。將建構出的重組 cassette 經酵母菌轉殖方式送入由實驗室前人所建構出的白色念珠菌品系 *CaCDC7* +/-:*dpl200* 當中，並利用 *CaHIS1* 前後分別帶有的 235 bp 與 403 bp *CaCDC7* 核苷酸序列在白色念珠菌 *CaCDC7* 基因座位置作同源互換，以剔除此品系中僅存的 *CaCDC7* 對偶基因，希望得到 *Cacdc7* homozygous null mutant 白色念珠菌品系（圖四）。

3. 檢測白色念珠菌 *CaCDC7* null mutant 品系建構成功與否（圖五）

(1) 確認重組 cassette 轉殖進入白色念珠菌中：設計一對 primer 黏合於上述方法置備出的重組 cassette 序列中 *HIS1* 基因內部區域 (*CaHIS1-F*) 與 *CaCDC7* 編碼區內 (*CaCDC7-BspEI-R*)，經能 PCR 放大出約 700 bp 大小的 DNA 片段，以此確定重組 cassette 有轉殖進入到白色念珠菌細胞當中（圖五--1）。

(2) 確認所剩的一個 *CaCDC7* 是否被成功剔除：利用一對 primer 分別一條設計在重組 cassette *HIS1* 基因內部 (*CaHis-F*)，而另一條設計在白色念珠菌基因組上 *CaCDC7* 基因下游非編碼區內 (*CaCDC7-XbaI-R*)，經過 yeast colony PCR 若能放大出 1672 bp 大小的 DNA 片段，則表示重組 cassette 與 *CaCDC7* locus 互換成功。然而實驗結果卻一直沒有 PCR 出 1672 bp 大小的片段，因此仍未得到白色念珠菌 *CaCDC7* null mutant 品系（圖五-2），此結果也顯示不能完全排除 *CaCDC7* 為必要基因。

二、*CaCDC7* 功能分析: 探討 *CaCdc7* 激酶活性是否為白色念珠菌菌絲生成的負調節功能所需

經過蛋白質序列比對的結果發現，白色念珠菌 *CaCDC7* 也具相似於其他真核生物高度保留的激酶次單元結構，其激酶活性類似多數真核生物中的 Cdc7，因此，我們感興趣的是，是否 *CDC7* 在白色念珠菌中調節菌絲形成的角色，與其序列分析結果之高度保留的激酶活性有關。

在實驗設計的構想上(圖六構想)，我希望能透過白色念珠菌基因組中內生性 *CaCDC7* 表現的情況下，送入一帶有外源性突變 *CaCDC7* 之質體，並藉由人為調節方式，大量表現(overexpression)外源性之突變 *CaCdc7* 蛋白質激酶，藉此觀察 *CaCdc7* 突變激酶對白色念珠菌型態的影響。

1. 建構白色念珠菌品系 *CaCDC7 MET3/-::dpl200*

從實驗室前人的研究發現，在白色念珠菌 *CaCDC7 MET3/-::ura3* 品系中遏止 *CaCDC7* 表現，將使細胞有菌絲的生成(NSC-2815-C-040-026-B)，由此可推測兩 *CaCDC7* 對偶基因皆被剔除的白色念珠菌品系也會有菌絲的生成，然而，又得知將質體 DNA 轉殖送入有菌絲生成的白色念珠菌細胞之轉殖效率比轉殖送入 yeast form 的白色念珠菌低很多，且有如何得到單一選植株的問題，因此欲轉殖 DNA 還必須使用到可調控 *CaCDC7* 表現的 *C. albicans* 品系，並於內生性 *CaCDC7* 正常表現下(此時 *C. albicans* 呈現圓形 yeast form)進行 DNA 的轉殖作用，再經人為調節，關閉內生性 *CaCDC7* 表現，並誘導外源性突變 *CaCDC7* 大量表現。因此在實驗一開始，我選用實驗室學長姊所建構之一白色念珠菌品系 *CaCDC7 MET3/-::ura3*，此白色念珠菌品系表示之意義為一內生性 *CaCDC7* 對偶基因被 *URA3* 基因所剔除，同時另一內生性 *CaCDC7* 對偶基因在人為可操控型之 *MET3* promoter 下被控制表現。然而，為了之後在此品系中重複使用外源送入之質體上的 *URA3* 作為 selection marker，需要將此品系中用以剔除其中 *CaCDC7* 的 *URA3* marker，經 5-FOA(5-fluoroorotic acid)的選殖作用移除(pop-out)，以製備

CaCDC7 MET3/-::dpl200 作為本實驗所使用的白色念珠菌品系。

(1) 以 yeast colony PCR 檢測 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系

將 *CaCDC7 MET3/-::ura3* 品系中的 *URA3* marker，經 5-FOA 的選擇作用移除(pop-out)，以製備 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 白色念珠菌品系。並設計 primers 位置在 *CaCDC7* 上游及下游非編碼區，目的在於確認此品系一個 *CaCDC7* 對偶基因中原本存在的 *URA3* 已被 pop-out。藉由 yeast colony PCR 方式，放大出約 1117 bp 與 5507 bp 的 DNA 片段，但由於 5507 bp 片段超出一般使用的 Taq 聚合酶醱素合成長度的限制(約 2 kb~3 kb)，因此通常在 yeast colony PCR 中不會被放大出來。當中以 BWP17 作為負對照組，使用上述引子經 yeast colony PCR，會放大出 2880 bp。而以白色念珠菌 *CaCDC7 +/-::dpl200* 作為正對照組，能在受到剔除的對偶基因中放大出 1117 bp。其中在 3 號分離株中，有較明顯放大出 1117 bp 的 DNA 片段，因此選擇 3 號分離株做以下的南方點墨法，以確認其為 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系 (圖七)。

(2) 藉由南方點墨法(Southern blotting) 確認 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系

依照 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit 流程，抽取酵母菌基因組 DNA，抽出白色念珠菌品系 *CaCDC7 MET3/-::ura3* 與 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 基因組 DNA，使用 *HindIII* 與 *PacI* 兩種醱素分別對此兩種白色念珠菌品系基因組 DNA 作切割，並將探針(probe)設計在 *CaCDC7* 基因上游的非編碼區，藉由南方點墨法標準操作程序來檢測此兩種品系之基因組 DNA 結構，由(圖八)可確認 *URA3* marker 已從 *CaCDC7* 基因中移除，且另一對偶基因在 *MET3* promoter 之調控下。

(3) 以 RT-PCR (reverse-transcription PCR) 確認 *MET3* promoter

驅動下的內生性 *CaCDC7* 之 mRNA 表現量

為了送入外源性 *CaCDC7* 到白色珠菌細胞表現，必須先以人為方式調節遏止內生性 *CaCDC7* 表達，因此使用可調控之 *MET3* promoter 遏止內生性 *CaCDC7* 表現，並且必須先確認內生性 *CaCDC7* 經 *MET3* promoter 調節關閉下，其 mRNA 的表現量被遏止。

以兩種培養液 SD+arg+uri+his 與 SD+arg+uri+his+2.5 mM cys/met 培養三種白色念珠菌品系，分別為 BWP17、*CaCDC7 +/-::dpl200*、*CaCDC7 MET3/-::dpl200*。其中一種培養液所含有 2.5mM methionine/cysteine (met/cys) 之成份能在 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系中誘導 *MET3* promoter 的關閉，進而遏止其下游內生性 *CaCDC7* 表現。接著依 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit 之標準流程將此六種白色念珠菌之 RNA 抽取出來後，並使用反轉錄酵素將 mRNA 反轉錄成 cDNA，然後設計 primers 黏於 *CaCDC7* 序列後半部分，分別為 *CaCDC7-interminal-F-2* 與 *CaCDC7-SpeI-R*，藉由 PCR 放大出約 365 bp 的片段。再將 RT-PCR 結果經由洋菜膠電泳分離後，可看到不同的白色念珠菌品系所代表的 *CaCDC7* cDNA 因 mRNA 的表現不同而有所差異，並以 BWP17 之 cDNA 亮度當作 1，同時均一化各品系 actin 之 cDNA 亮度後，計算出各種白色念珠菌 *CaCDC7* 之 cDNA 相對於 BWP17 cDNA 的亮度比。

於(圖九)中可看到，當培養液不加 2.5 mM met/cys 時，BWP17 中表現兩份 *CaCDC7* 的 mRNA 量是 *CaCDC7 +/-::dpl200* 品系中表現的 1.5 倍；且在此培養條件下，*CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系中的 *MET3* promoter 保持開啟，於 *MET3* promoter 驅使下所表現一份 *CaCDC7* 之 mRNA 量又為表現兩份 mRNA 量的 1.8 倍；當環境中加入 2.5mM cys/met，關閉 *MET3* promoter 時，*CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系之 *CaCDC7* 之 mRNA 表現量比起其他品系的確降低許多，證實此品系確實具備該有的特性。

2. 取得點突變 *CaCDC7*

為了在白色念珠菌基因座以外表現外源性 *CaCdc7* 突變激酶，經過 *CDC7* 蛋白質序列分析比對，並參考過去出芽酵母菌相關點突變研究，我選擇了其中兩個高度保留位點與激酶活性極相關的位點，使用「定點突變方式」(Site-directed mutagenesis) 在大腸桿菌中製備點突變 *CaCDC7*，以下詳述此二點突變位點：

CaCDC7(K232R): 此突變點位於 *CaCDC7* 基因編碼區第 694~696 位置的核苷酸 AAA 突變後為 AGA，對應其轉譯出的蛋白質是第 232 個胺基酸 lysine 變為 arginine，破壞 *CaCdc7* 激酶活性位點，使其無法活化下游蛋白質，故此作用在於製造一 kinase dead *CaCdc7* 突變激酶。

CaCDC7(T436A): 此突變點位於 *CaCDC7* 基因編碼區第 1306~1308 位置的核苷酸 ACT 突變後為 GCT，對應編碼第 436 個胺基酸 threonine 變為 alanine，破壞 *CaCdc7* 的 ATP-binding site，使其無法接受上游激酶磷酸化而調節活化(圖十)。

3. 分別建構帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 的 Tet-on 質體

為了在白色念珠菌基因組的 *CaCDC7* 之外表現外源性 *CaCDC7*，我選擇以 Tet-on 系統來表現之，其因乃在於位在 Tet-on 質體上的 Tet-on 系統片段之前、後各帶有基因組的 *ADHI* 基因座的同源序列，使 Tet-on 系統片段能藉由同源互換方式嵌入白色念珠菌基因組中，並能在不同於 *CaCDC7* 基因座的 *ADHI* locus 額外表現外源性 *CaCDC7*。

經上述點突變方式取得點突變 *CaCDC7* 之後，設計帶有 *NotI* 與 *BglIII* 切點序列的引子，在基因編碼區的前、後端與基因互補黏合，使用 PCR 放大 *CaCDC7(K232R)* 和 *CaCDC7(T436A)* 兩點突變 *CaCDC7* 基因，再以相對應的限制酶作用，藉由接合反應(ligation)，將基因接入 Tet-on 質

體 pTET25M-HS (由實驗室威仲學長所提供)當中(圖十一-1、2)，並將 *CaCDC7* 基因之上、下游與 Tet-on 質體本身所帶有的 6xHis 和 Strep epitope tag 做連接，接著將建構完成帶有點突變 *CaCDC7* 基因的 Tet-on 質體轉形到大腸桿菌中大量複製。當中，為了表現出具有正確閱讀框架之帶有 tag 之外源性 *CaCDC7* 融合蛋白質(利於後續偵測外源性 *CaCDC7* 的蛋白質產物)，所設計在基因後端黏合的 reverse primer 序列中並不含有終止密碼子 TAG。此外，為了和突變組做白色念珠菌型態觀察的對照，同時也構築帶有野生型(wild type) *CaCDC7*(WT-*CaCDC7*)的 Tet-on 質體後(圖十一-3)；另外，為了使後續蛋白質偵測有一控制組，也在另一完全不具有 *CaCDC7* 基因之 Tet-on 質體 pTET25M-GFP-NC (由威仲學長提供)，作為 Tet-on 質體的控制組，以排除 Tet-on 系統對白色念珠菌型態生成的影響(圖十一-4)。

4. 建構帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 系統之白色念珠菌品系

利用帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 質體中的 *ADHI* 序列兩端 *KpnI* 與 *SacII* 切點，使用相對應的限制酶酵素切出 Tet-on 系統片段，並利用 Tet-on 系統兩端的 *ADHI* 同源序列，在白色念珠菌品系 *CaCDC7 MET3-::dpl200* 基因組之 *ADHI* 基因作同源互換，藉此能把帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 系統片段嵌入 *C. albicans* 之 genomic DNA 中，因所使用的白色念珠菌之 parental strain 即為 *his⁻*、*arg⁻*、*ura3⁻* 品系，故可利用 Tet-on 系統上所帶有的 *URA3* 與 *MET3 promoter* 上游之 *HIS1* 當作營養篩選 markers，所以只有當 Tet-on 系統有成功送入且 *MET3 promoter* 存在的白色念珠菌細胞才會在 SD+arg 的培養基中長出。把生長出的白色念珠菌菌落挑起，並設計一條 primer 位於白色念珠菌基因組的 *ADHI promoter* 上(pNIMI-inte-F)，且另一條位

於 Tet-on 系統中 *rTetR* 序列上(pNIMI-inte-R)，經過酵母菌菌落聚合酶鏈鎖反應(yeast colony PCR)，放大出的 DNA 片段大小約 1079 bp，以確認帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 系統有成功嵌入白色念珠菌基因組中 *ADH1* locus，當中(圖十二-2)為帶有野生型 *CaCDC7*、(圖十二-3)為帶有點突變基因 *CaCDC7(T436A)*之 Tet-on 系統之白色念珠菌品系。

5. 在白色念珠菌內生性 *CaCDC7* 表現關閉時，藉由 Tet-on 系統表現外源性野生型及突變型 *CaCDC7*，並觀察白色念珠菌的型態轉變

在建構白色念珠菌帶有外源性點突變或野生型 *CaCDC7* 的品系後，先加入 doxycycline 誘導 Tet-on 系統表現外源點突變或野生型 *CaCDC7*，之後再利用 2.5 mM met/cys 關閉 *MET3* promoter 而遏止內生性 *CaCDC7* 表達，使細胞中大多數 *CaCdc7* 蛋白質激酶產物由外源性 Tet-on 系統表現之 *CaCDC7* 所貢獻。由於 met/cys 和 doxycycline 分別誘導白色念珠菌中的 *MET3* promoter 與 Tet-on 系統之敏感度和作用時效不同，因此可依兩者加入順序先後的差異，觀察對不同品系白色念珠菌細胞型態的影響。

(1) 利用 2.5 mM met/cys 誘導 *MET3* promoter 關閉下游內生性 *CaCDC7* 表現：於 SD+arg+uri+his 培養條件中加入 2.5 mM met/cys，誘導關閉 *MET3* promoter，驅使下游內生性 *CaCDC7* 表現量降低(圖九)，並在(圖十四)中可以看到，白色念珠菌 *MET3/-::dpl200* 品系之細胞型態會隨 2.5 mM met/cys 誘導時間增加而菌絲生長程度。

(2) 藉由 doxycycline 的誘導，使白色念珠菌於 Tet-on 系統中大量

表達 (overexpression) 外源 *CaCDC7* : 由於 Tet-on 系統之 *reverse Tet repressor (rTetR)* 基因經上游常表現型(constitutive) *ADH1 promoter* 驅使而表現出 rtTA 蛋白質能與培養環境中所加入的 doxycycline 結合，並一同結合到 Tet-on 系統的 *Tet operator(TetO)* 上，以啟動下游 *CaCDC7* 基因表現外源性 *CaCdc7* 蛋白質(圖十三示意圖)。

(3)使內生性 *CaCDC7* 受到 *MET3 promoter* 遏止的情形下，以 doxycycline 誘發白色念珠菌大量表現外源性野生型 *CaCDC7* : 當培養環境中先加入 2.5 mM cys/met，細胞中的 *MET3 promoter* 因感受到 met/cys，而誘導關閉下游內生性 *CaCDC7* 表現，此時細胞呈菌絲形(filamentous form)生長，若再加入 doxycycline 大量表現外源野生型 *CaCDC7* 表達正常激酶，白色念珠菌應由菌絲形生長轉變成 yeast form。然而我們由(圖十四)中發現野生型 *CaCDC7* 的菌絲轉變並不如預期，雖然在加入 doxycycline 後細胞成芽苞形，但一開始卻在 2.5 mM cys/met 的環境中不呈現菌絲型。這部分實驗仍須經反面再做確認，也就是，先加入 doxycycline 誘導外源性 *CaCDC7* 表現正常 *CaCdc7* 激酶，再使用 2.5 mM met/cys 關閉內生性 *CaCDC7*，因此時仍有外源性野生型 *CaCDC7* 表達正常激酶，則白色念珠菌仍會維持芽孢形(yeast form)。

(4)使內生性 *CaCDC7* 受到 *MET3 promoter* 遏止的情形下，以 doxycycline 誘發白色念珠菌大量表現外源性點突變 *CaCDC7(T436A 或 K232R)* : 當培養環境中先加入 2.5 mM cys/met，白色念珠菌細胞中的 *MET3 promoter* 會因感受到 met/cys，而誘導關閉下游內生性 *CaCDC7* 表達，細胞呈菌絲型態生長。若此時再加入

doxycycline 誘導外源 *CaCdc7* 突變激酶大量表現時，白色念珠菌應維持菌絲型 (圖十四)。反之，我們亦預期若先加入 doxycycline 誘導外源性 *CaCDC7* 表現喪失激酶活性的突變激酶，此時因仍有內生性正常的 *CaCdc7* 激酶表現，所以細胞仍維持 yeast form，若再加入 2.5 mM met/cys 關閉內生性 *CaCDC7*，則白色念珠菌會從芽孢型(yeast form) 轉變為菌絲型 (filamentous form) 生長。

由以上我們的觀察結果，野生型 *CaCDC7* 菌絲的誘導結果並不如先前所預測，必須做一步的確認才可確定 *CaCdc7* 激酶活性是否為功能所需，以證明 *CaCDC7* 為白色念珠菌菌絲生成之負調節者。

6. 藉由西方點墨法 (Western blotting)，對 *C. albicans* 不同品系之 *CaCdc7* 蛋白質表現量作偵測，以確認 *CaCdc7* 蛋白質的表現

收集白色念珠菌 BWP17、*CaCDC7 MET3/-::dpl200* 作為品系的控制組與加入 40 μ g/mL doxycycline 誘導 *CaCDC7 MET3/-::dpl200 tet-on-WT CaCDC7* 六小時、十二小時、二十四小時，另外一組為不加 doxycycline 之藥物控制組，同樣收取 *CaCDC7 MET3/-::dpl200 tet-on-WT CaCDC7* 培養六小時、十二小時、二十四小時之菌液，將收集完成之菌液進行西方點墨法，以 anti-6xHis 及 anti-Strep antibodies 分別偵測 *CaCdc7* 蛋白質，已知欲偵測之 target protein 為 6xHis-*CaCdc7*-Strep，其大小在 74.5kDa 位置；然而，結果並不如預期，我們不僅沒有在該位置偵測到其蛋白質，反而在 72 kDa 的位置出現明顯的訊號、次強訊號位則為 95 kDa 位置；並且，從數據中的蛋白質表現量多寡，也看不出加藥 (doxycycline) 與否的差異，因此我們推測為雜訊，並未偵測到真正的 *CaCdc7* 蛋白質(圖十五-1、2)。

伍、綜合討論與未來工作

一、運用 deletion cassette 剔除 *CaCDC7* 白色念珠菌

將長出的菌落經 colony PCR 確認時，總是無法從 *CaCDC7* 基因座中得放大出 deletion cassette，也就是人為建構的 deletion cassette 無法到達正確位置，剔除此品系中剩下的一條 *CaCDC7* 對偶基因，因此懷疑 *HIS1* marker 在 BWP17 parental strain 中可能有殘留，使得 deletion cassette 中所用的 *HIS1* 可能也同源互換到基因組之 *HIS1* 基因座當中，競爭掉 deletion cassette 兩端 *CaCDC7* 同源序列互換到基因組 *CaCDC7* locus 的可能，也降低 deletion cassette 換到目標位置的機會；然而 deletion cassette 轉殖到白色念珠菌的過程中我發現，若設計一對引子皆位於 deletion cassette 序列上，進行 colony PCR，可知 deletion cassette 確實是有成功轉殖到白色念珠菌當中，只是同源互換的真正位置因得不到 positive colony PCR 結果，而始終無法知道。同時我們對於一直以來得不到 *CaCDC7* $-/-$ 剔除品系也作出初步猜測，認為 *CaCDC7* 也許對白色念珠菌而言，有某種程度上的需要，甚至是不可或缺的必要基因。

對於未來希望可以另外一種以真菌抗生素剔除系統 FLP flipper 來剔除白色念珠菌原始野生型品系 SC5314 中的 *CaCDC7* 對偶基因，取代原本於 BWP17 品系中所使用的營養篩選機制，以解決 *URA3* 篩選 marker 會部分存在於白色念珠菌基因組中，造成基因不穩定、引發型態變化、甚至 *URA3* 在不同基因座會有表現量不同甚或完全不表現的情況 (García MG and O'Connor JE, 2001；Chibana H and Uno J, 2005) 等問題。

二、探討 *CaCdc7* 激酶活性是否為白色念珠菌型態生成的負調節者

本實驗主要使用 doxycycline 誘導 Tet-on 系統表現外源性點突變 *CaCdc7* 突變激酶，過程中除了先確定內生性 *CaCDC7* 表現能有效受到 *MET3* promoter 遏止外，還要確定外源性 *CaCDC7* 藉由 Tet-on 系統所誘導表現的時間點。於本實驗中已完成 *MET3* promoter 調節內生性 *CaCDC7* 表現，對於 doxycycline 誘導 Tet-on 系統表現的劑量、時間測

試和 2.5 mM met/cys 誘導菌絲生成的交互調節，在實驗結果中嘗試最佳化的條件，即 doxycycline 加入於前一天培養隔夜所回養 OD>0.5 的新鮮菌液，而 2.5 mM met/cys 則必須於前一天培養隔夜所回養新鮮菌液 OD<0.2 加入，因為兩種物質欲同時最佳化誘導白色念珠菌有其限制，所以較可行的方法為在低菌量時先加入 2.5 mM met/cys，再養至一定程度的菌量後才加入 doxycycline。另外，菌絲誘導的實驗過程中，於 2.5 mM met/cys 加入後即更換少量菌液至相同條件的培養液(圖十四-5、6)，是為了免除白色念珠菌在菌絲生長過程耗盡培養液中 met/cys，而削弱菌絲生成能力之疑慮。

在蛋白質偵測上，目前藉由西方點墨法 (Western blotting)，分別使用 anti-Strep 與 anti-6xHis antibodies 對 *C. albicans* 不同品系之 CaCdc7 蛋白質表現量作系統性偵測，欲確認 CaCdc7 蛋白質的表現，卻無法偵測到正確大小的蛋白質訊號，因此我們推測以上兩種抗體在這些變化 CaCDC7 結構下之 *C. albicans* 品系中無法專一性辨識，另一可能性為 Tet-on 系統表現下 CaCdc7 極度過量表現反而使 CaCdc7 迅速降解而無法被偵測到。未來希望找尋能偵測念珠菌相近物種 Cdc7 之 anti-Cdc7 antibody；或設計實驗以生物體免疫方式，直接製造白色念珠菌 anti-CaCdc7 antibody，以解決蛋白質偵測物種專一性的問題。另一方面，若是因過量表現而降解則可嘗試以 *ACT1* 啟動子驅動 CaCDC7 為外源性 CaCDC7 或可排除極度過量表現 CaCdc7 而造成可能自身降解的問題。

解決以上抗體與菌絲觀察的問題，並確認最後結果與預期相符，則可確立 CaCDC7 蛋白質激酶活性扮演白色念珠菌菌絲生成的負調控角色，因此日後實驗方向將使用體外磷酸化分析 (*In vitro* phosphorylation assay)，進一步確定白色念珠菌 CaCdc7 所具有的蛋白質激酶活性。同時，也會針對白色念珠菌 CaCdc7 蛋白質使用酵母菌雙雜合法進行抓取相關蛋白 (associated protein) 的實驗。反之，若觀察白色念珠菌的結

果不如我們所預期，或許顯示 *CaCdc7* 激酶活性與型態形成無關。如此則決定 *CaCdc7* 非激酶活性區域與與型態形成關係極為關鍵，另外 *CaCdc7* 激酶活性是否仍與高度保留之細胞週期調控有關便值得我們深入探討。

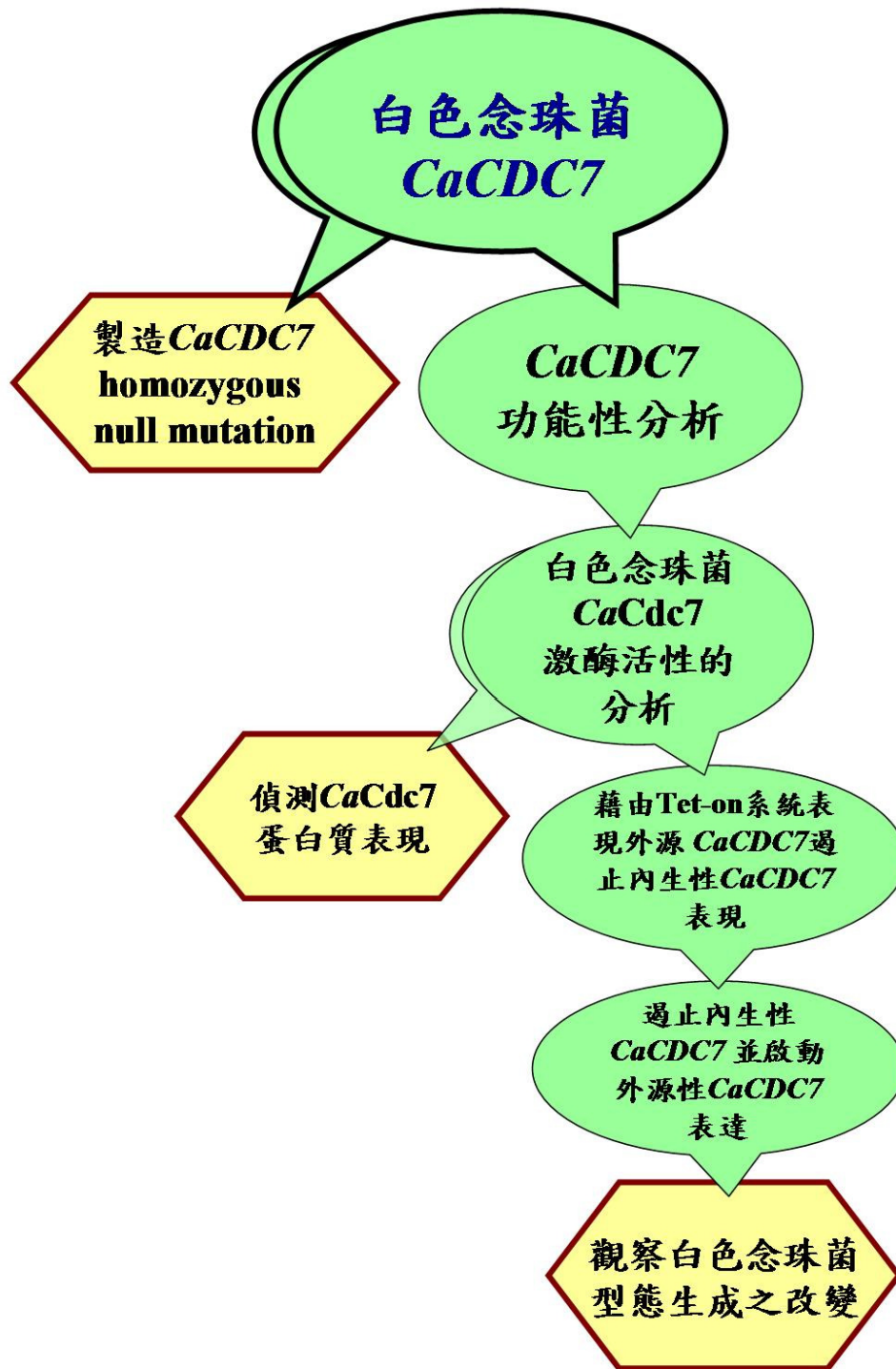
陸、參考文獻

- Backen, A.C., Broadbent, I.D., Fetherston, R.W., Rosamond, J.D., Schnell, N.F., Stark, M.J.** (2000). Evaluation of the CaMAL2 promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*. *Yeast* 16(12):1121-9.
- Bahman, M., Buck, V., White, A., Rosamond, J.** (1988). Characterisation of the CDC7 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* as a protein kinase needed for the initiation of mitotic DNA synthesis. *Biochim Biophys Acta* 951(2-3):335-43.
- Barchiesi, F., Schimizzi, A.M., Caselli, F., Novelli, A., Fallani, S., Giannini, D., Arzeni, D., DiCesare, S., Di Francesco, L.F., 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.
- Beck-Sagué. C, Jarvis, W.R.** (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis.* 167(5):1247-51.
- Beggs, J.D.** (1978). Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature(London)* 275(5676):104-9.
- Berman, J., Sudbery, P.E.** (2002). *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3(12):918-30.
- Buck, V., White, A., Rosamond, J.** (1991). CDC7 protein kinase activity is required for mitosis and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 227(3):452-7.
- 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):3211-7.

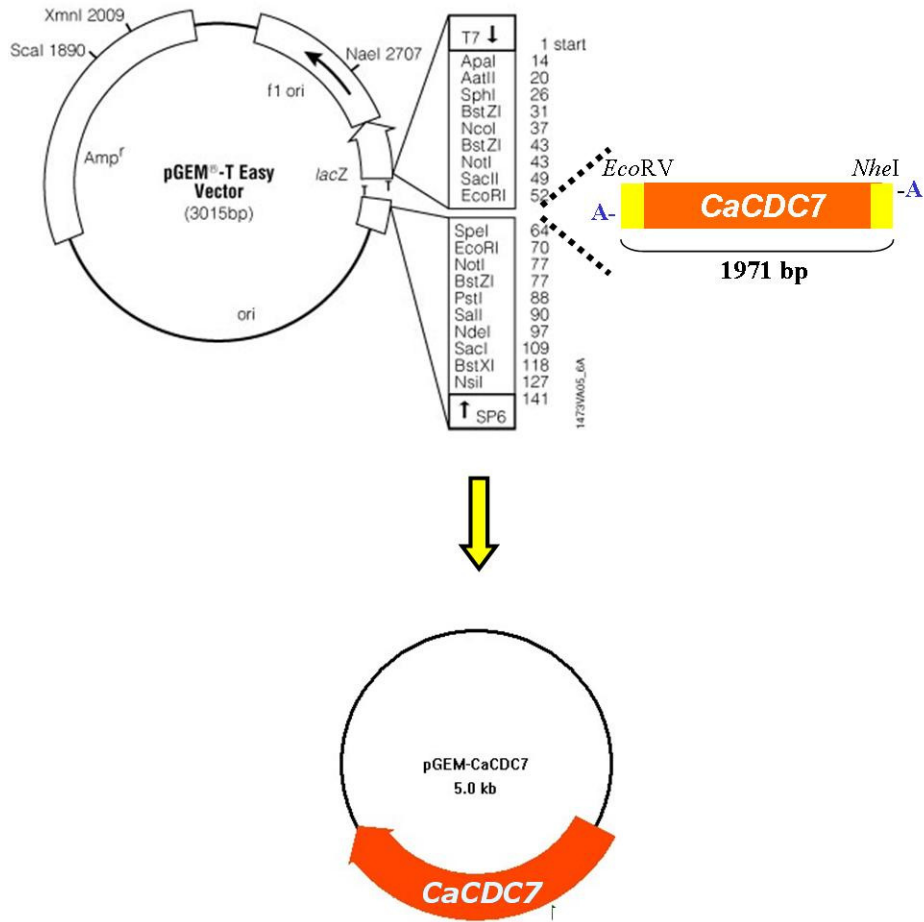
- Chibana H, Uno J, Cho T, Mikami Y.** (2005). Mutation in IRO1 tightly linked with URA3 gene reduces virulence of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol.* 49(10):937-9.
- Cheng, M.F., Yang, Y.L., Yao, T.J., Lin, C.Y., Liu, J.S., Tang, R.B., Yu, K.W., Fan, Y.H., Hsieh, K.S., Ho, M. and Lo, H.J. (2005).** Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infect Dis.* 5(1):22.
- Chuang L.C., Teixeira, L.K., Wohlschlegel J.A., Henze M., Yates J.R., Méndez J., Reed S.I.** (2009) .Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 promotes pre-replication complex assembly during cell-cycle re-entry. *Mol Cell.* Jul 31;35(2):206-16.
- Cutfield, J.F., Sullivan, P.A. and Cutfield, S.M. (2000).** Minor structural consequences of alternative CUG codon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. *Protein Engineering*, Vol. 13, No. 10, 735-738.
- Fraser, V.J., Jones, M., Dunkel, J., Storfer, S., Medoff, G., Dunagan, W.C.** (1992). Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis.* 15(3):414-21.
- Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R.**(1996). Epidemiology of nosocomial fungal infection *Clin Microbiol Rev* 9,499-511.
- García MG, O'Connor JE, García LL, Martínez SI, Herrero E, del Castillo Agudo L.** (2001). Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to URA3, coding for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae* aft1 mutation. *Yeast.* 18(4):301-11.
- Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., Herrero, E.** (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13(9):837-48.
- Gossen M, Bujard H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(12):5547-51.
- Kitada, K., Johnston, L.H., 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.
- Krupa, A., Preethi, G., and Srinivasan, N.** (2004). Structural Modes of Stabilization of Permissive Phosphorylation Sites in Protein Kinases: Distinct Strategies in Ser/Thr Tyr Kinases. *J Mol Biol.* 339(5):1025-39.

- Lei, M., Tye, B.K.** (2001). Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 114(Pt 8):1447-54.
- Masai, H., Arai, K.** (2002). Cdc7 kinase complex: a key regulator in the initiation of DNA replication. *J Cell Physiol.* 190(3):287-96.
- Odds, F.C.** (1994). Pathogenesis of Candida infections. *J Am Acad Dermatol* 31(3 Pt 2):S2-5.
- Ogi, H., Wang, C.Z., Nakai, W., Kawasaki, Y., Masumoto, H.** (2008). The role of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc7-Dbf4 complex in the replication checkpoint. *Gene.* 414(1-2):32-40.
- Patterson, M., Sclafani, R.A., Fangman, W.L., Rosamond, J.** (1986). Molecular characterization of cell cycle gene CDC7 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6(5):1590-8.
- Su, Z., Li, H., Li, Y., Ni, F.** (2007). Inhibition of the pathogenically related morphologic transition in *Candida albicans* by disrupting Cdc42 binding to its effectors. *Chem Biol.* 14(11):1273-82.
- Whiteway, M., and Oberholzer, U.** (2004). *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol.* 7(4):350-7.
- 蔡睦宗/許清曉/孔祥琪陳宜君著。** ICD-9 112 ; ICD-10 B37 第四十六章念珠菌症。

柒、圖表

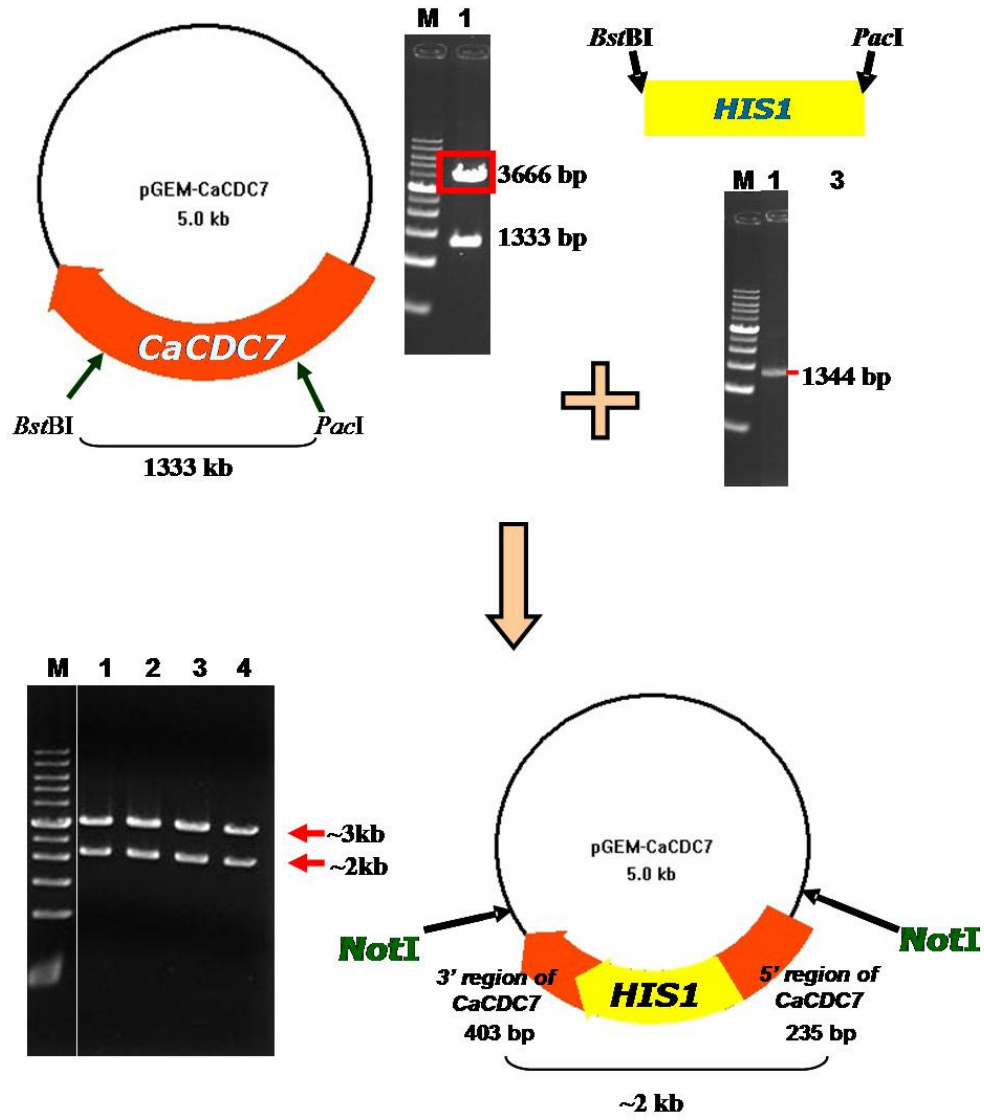


圖一、白色念珠菌 *CaCDC7* 實驗策略之流程圖



圖二、pGEM-CaCDC7 質體的製備

設計分別帶有 *EcoRV* 與 *NheI* 的 primers 在 *CaCDC7* 編碼區內分別與基因最 5'、3' 端約 20 bp 序列互補黏合，以 BWP17 基因組為模板，經過 PCR 放大出 *CaCDC7*，進行 TA cloning，將 *CaCDC7* 基因接入 pGEM-T-EASY vector 中(附錄七)，製備出 pGEM-CaCDC7 質體。



*左上膠圖:

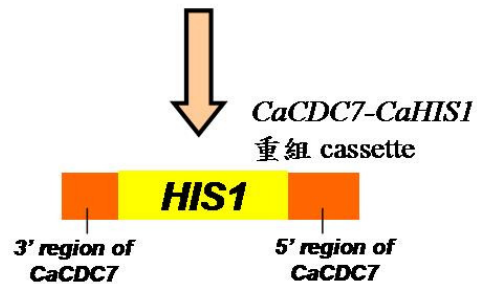
Lane1: 經 *Bst*BI 與 *Pac*I 限制酶作用後之 pGEM-CaCDC7 質體
(回收 3666 bp 片段)

*右上膠圖:

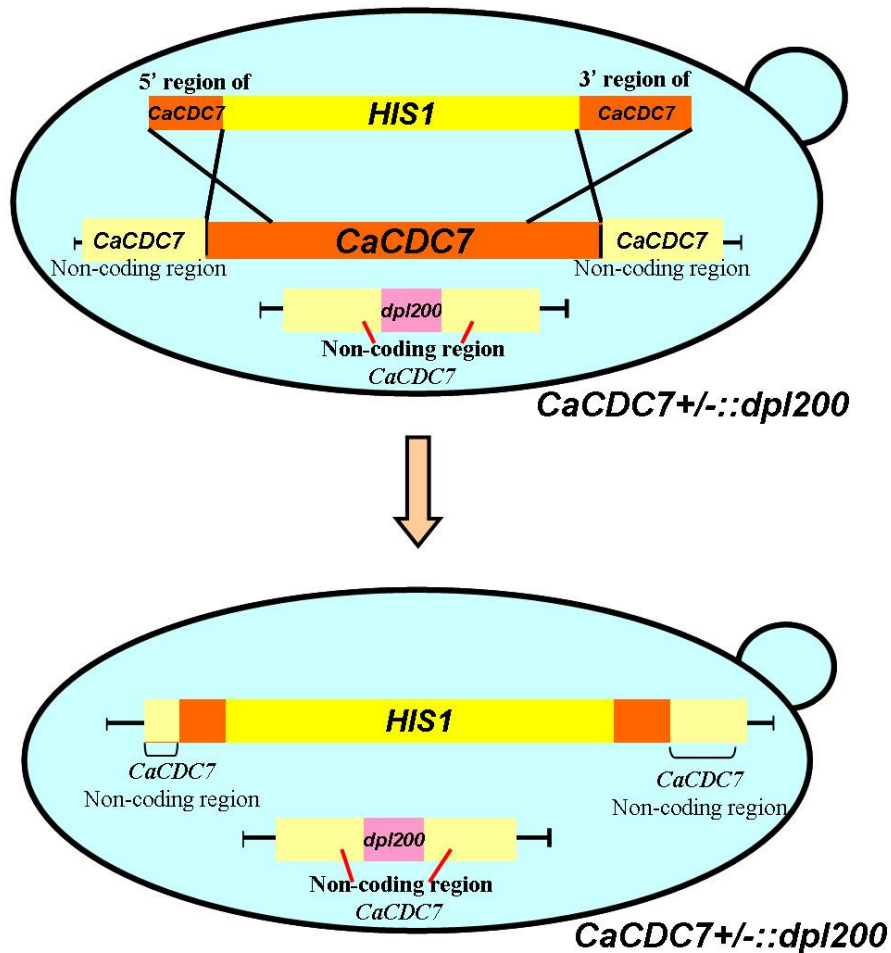
Lane1: 藉由 PCR 放大帶有 *Bst*BI 與 *Pac*I 酵素切點，並經 *Bst*BI 與 *Pac*I 限制酶作用後的 *HIS1* 基因

*左下膠圖:

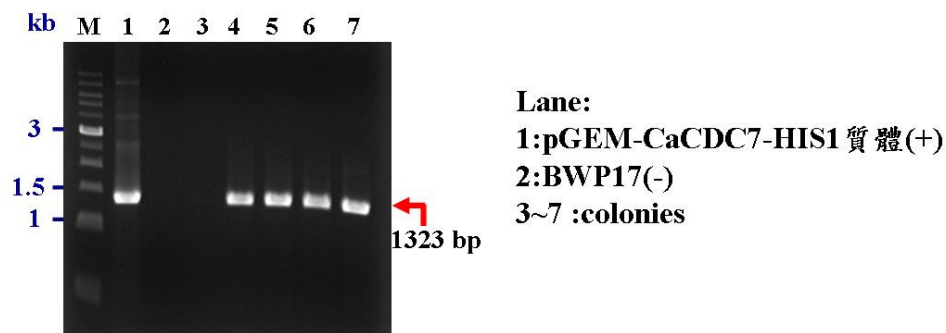
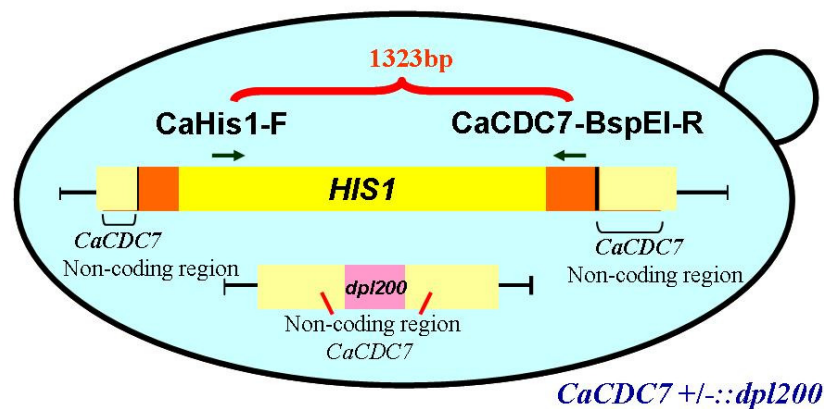
Lane1~4: 經 *Not*I 限制酶作用後之 pGEM-CaCDC7-HIS1 質體



圖三、pGEM-CaCDC7-CaHIS1 質體的製備與 *CaCDC7-CaHIS1* 重組 cassette 的取得

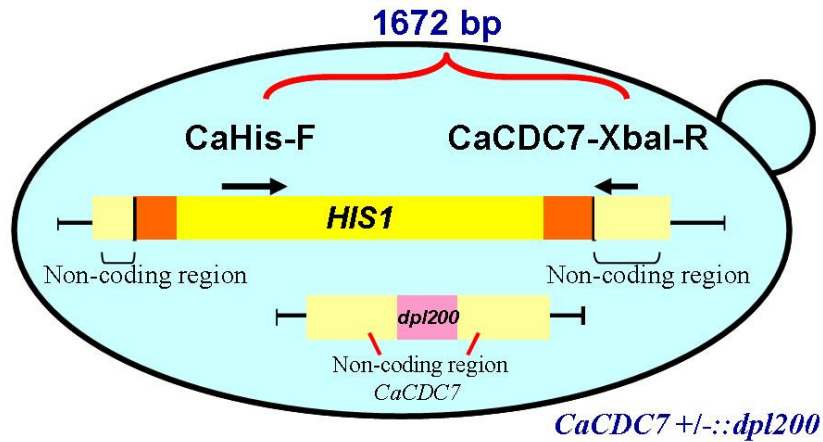


圖四、*CaCDC7-CaHIS1* cassette 與 *CaCDC7* locus 進行同源互換
 將建構出的重組 cassette 經酵母菌轉殖方式送入由實驗室前人所建構出的白色念珠菌品系 *CaCDC7 +/-::dpl200* 當中，並利用 *CaHIS1* 前後分別帶有的 5' 與 3' 部分之 *CaCDC7* 核苷酸序列與白色念珠菌 *CaCDC7* 基因座位置進行同源互換，以剔除此品系中僅存的 *CaCDC7* 對偶基因，希望得到 null mutant *CaCDC7* 白色念珠菌品系（圖四）。



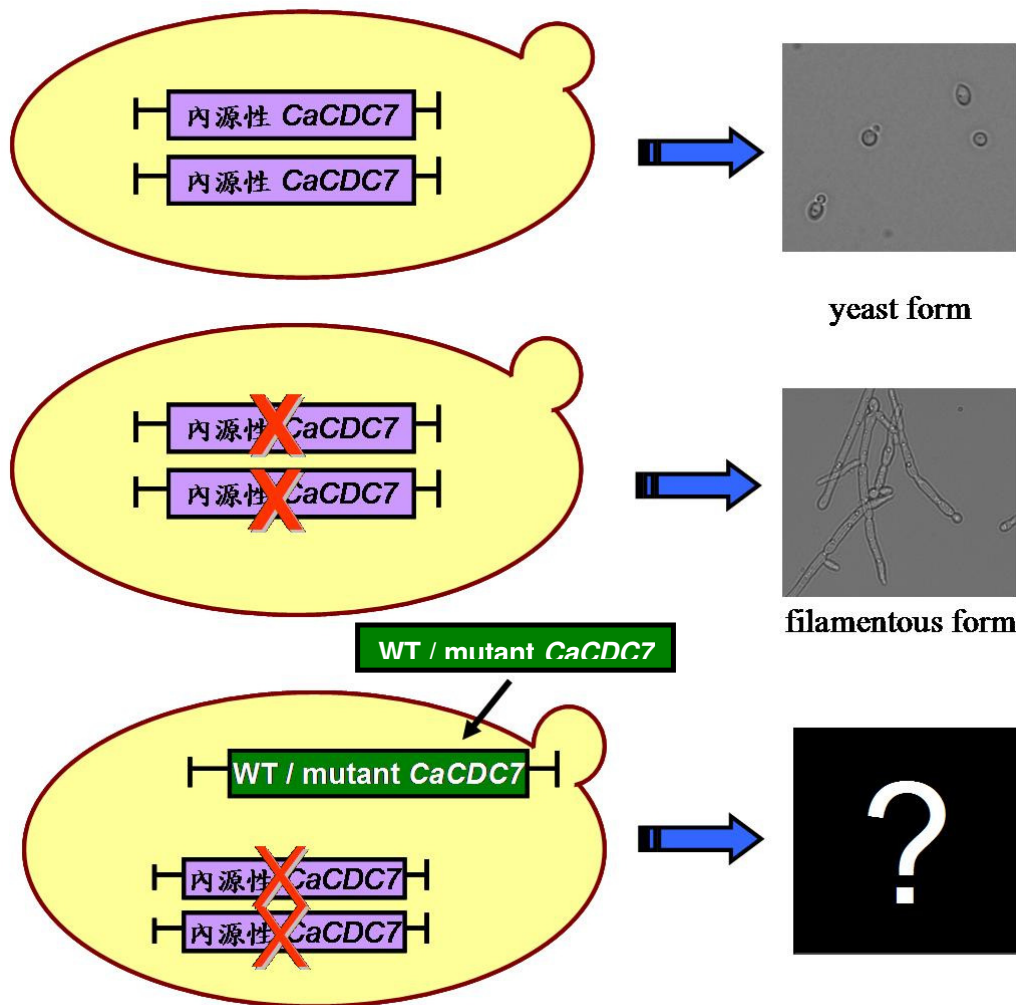
圖五、1. 確認重組 *CaCDC7-HIS1* cassette 轉殖送入白色念珠菌中

設計一對 primers 黏合於上述方法置備出的重組 cassette 序列中 *HIS1* 基因內部區域(CaHIS1-F)與 *CaCDC7* 編碼區內(CaCDC7-BspEI-R)，經 yeast colony PCR 方式放大出約 1323 bp 大小的 DNA 片段，確定重組 cassette 有轉殖進入白色念珠菌細胞中(lane 4~7)。



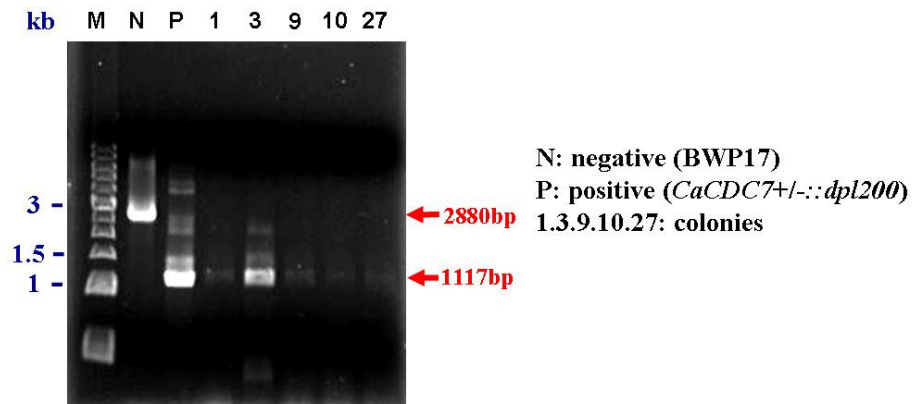
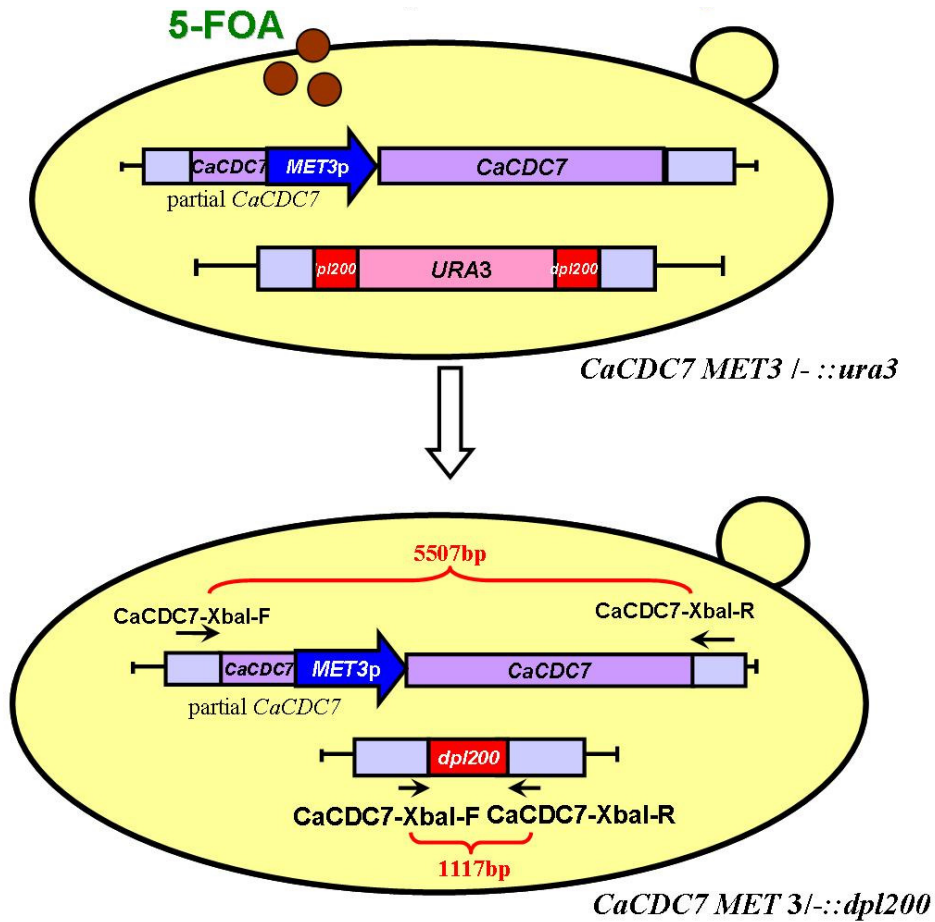
2. 確認所剩的一個 *CaCDC7* 是否被成功剔除

為了確認白色念珠菌 *CaCDC7 +/-::dpl200* 品系中所剩的一個對偶基因是否成功被外來送入的 *CaCDC7-HIS1* cassette 所剔除。因此利用一對 primer 分別設計在重組 cassette *HIS1* 基因內部(**CaHis-F**)，而另一條設計在白色念珠菌基因組上 *CaCDC7* 基因下游非編碼區內(**CaCDC7-XbaI-R**)，經過 yeast colony PCR 方式，若能放大出 1672 bp 大小的 DNA 片段，則表示重組 cassette 與 *CaCDC7* 基因組中的一個對偶基因互換成功。但是到目前為止，尚未得到 1672 bp 的片段，可見 *CaCDC7-HIS1* cassette 一直都沒有嵌到 *CaCDC7* 基因座當中，故至今仍未得到白色念珠菌 homozygous null mutant *CaCDC7* 品系。



圖六、實驗構想:於內生性 *CaCDC7* 遏止下表現外源性 *CaCdc7* 突變激酶，將使白色念珠菌型態仍呈菌絲型

當內源性 *CaCDC7* 表現正常蛋白質激酶時，白色念珠菌細胞呈現 yeast form，但當遏止內生性 *CaCDC7* 表達時，其型態轉變為 filamentous form。若內生性 *CaCDC7* 表現遏止時，外源送入野生型 *CaCDC7* 表現正常蛋白質激酶，應能使白色念珠菌菌絲型態變回 yeast form。因此本實驗主要探討的是，在內生性 *CaCDC7* 表現遏止的情況下，外源送入野生型(wild type) *CaCDC7* 是否會使白色念珠菌從菌絲形式生長轉變為為 yeast form。而若於遏止內生性 *CaCDC7* 表現下，送入外源性的突變 *CaCDC7*，將因其表現喪失激酶活性之 *CaCdc7* 蛋白質激酶，而使白色念珠菌型態仍然維持菌絲型。

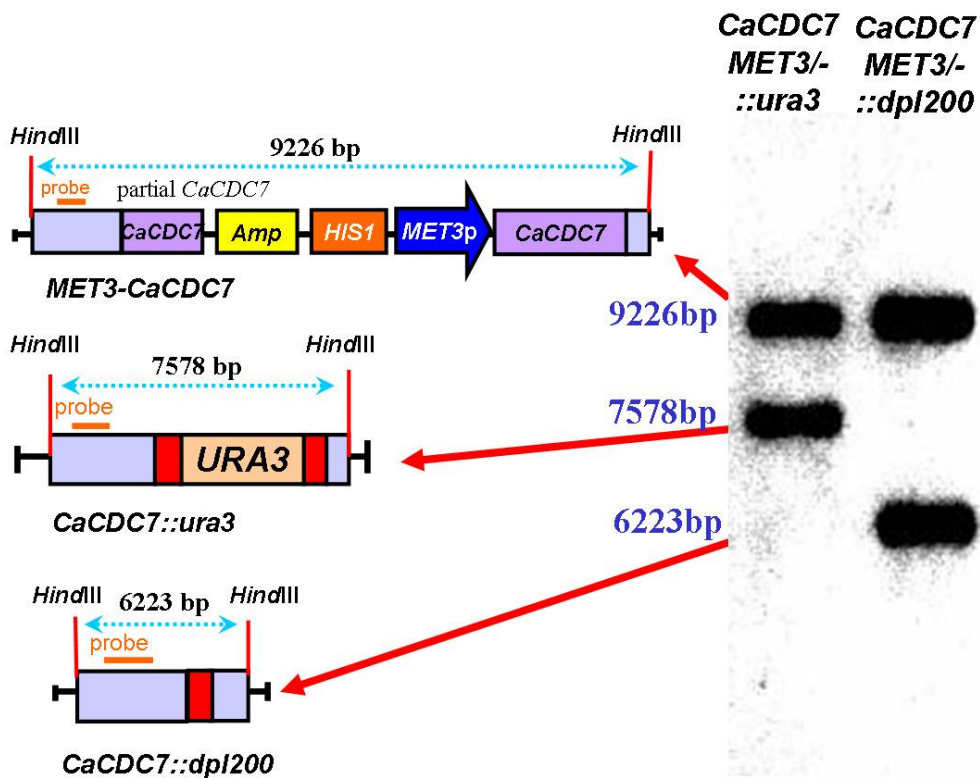


圖七、確認 *CaCDC7 MET3*⁻::*dpl200* 品系的建構

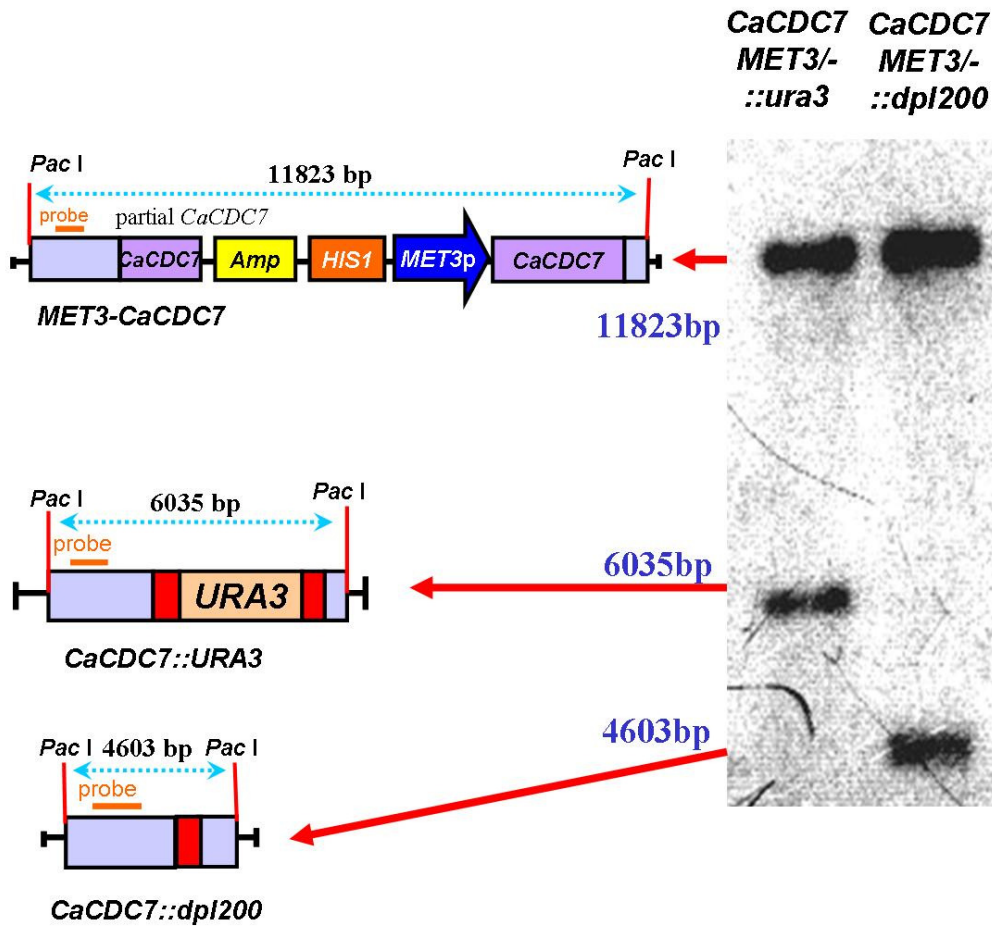
將 *CaCDC7 MET3*⁻::*ura3* 品系中的 *URA3* marker，經 5-FOA (5-fluoroorotic acid) 的選殖作用移除 (pop-out)，製備成 *CaCDC7 MET3*⁻::*dpl200* 白色念珠菌品系。並設計 primers 分別位在 *CaCDC7* 上游及下游非編碼區，目的在於確認此品系一個 *CaCDC7* 對偶基因中原本存在的 *URA3* 已被移除。藉由 yeast colony PCR 方式，放大出約 1117 bp 與 5507 bp 的 DNA 片段，但由

於 5507 bp 片段超出一般使用的 Taq 聚合酶合成限制(約 2 kb~3 kb)，因此無法於 yeast colony PCR 中放大出來。當中以 BWP17 作為負對照組，使用上述引子經 yeast colony PCR 方式放大出 2880 bp。而以白色念珠菌 *CaCDC7 +/-::dpl200* 作為正對照組，能在受到剔除的對偶基因上放大出 1117 bp。其中在 3 號分離株中，有較明顯放大出 1117 bp 的 DNA 片段，因此選擇 3 號分離株做以下的南方點墨法，以確認其為 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系。

1. 以 *Hind*III 作用

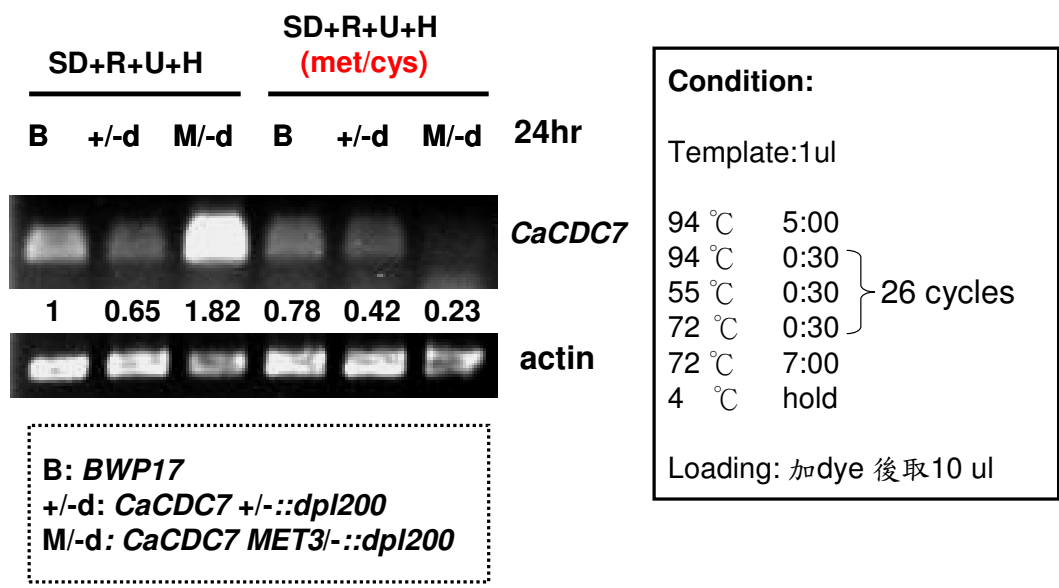


2. 以 *PacI* 作用



圖八、1.2. 以南方點墨法 (Southern blotting) 確認 *CaCDC7 MET3*⁻*::dpl200* 品系

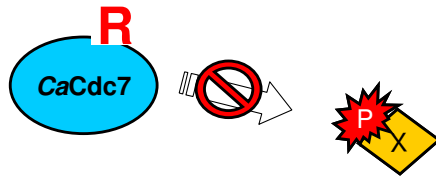
使用 *HindIII*(1) 與 *PacI*(2) 兩種酵素分別對 *CaCDC7 MET3*⁻*::ura3* 與 *CaCDC7 MET3*⁻*::dpl200* 白色念珠菌品系之基因組 DNA 基因組 DNA 作切割，並將探針 (probe) 設計在 *CaCDC7* 基因序列上游的非編碼區，藉由南方點墨法來檢測此兩種品系之 DNA 結構，已確認 *URA3* 從 *CaCDC7* 基因中移除。



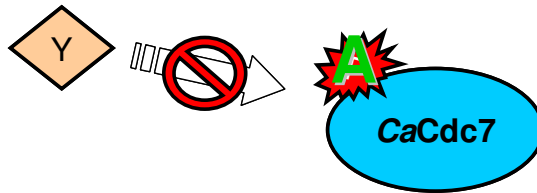
圖九、利用 RT-PCR (Reverse transcription PCR) 確認 *MET3* promoter 驅動與被 2.5 mM met/cys 抑制下之內生性 *CaCDC7* mRNA 表現量

將白色念珠菌各品系 *CaCDC7* 之 mRNA 轉成 cDNA 後，利用引子黏合於 *CaCDC7* 編碼區內，藉 PCR 放大之，並以洋菜膠電泳分離 DNA，再將亮度以 SD+arg+uri+his 培養環境中 **BWP17** 之 Cdna 亮度當做 1，並均一化各品系 actin 後，計算各品系 *CaCDC7* 之與 **BWP17** cDNA 亮度之比。當培養液不加 2.5 mM met/cys 時，可看到 **BWP17** 中表現兩份 *CaCDC7* 的 mRNA 量是 *CaCDC7 +/-::dpl200* 品系中表現一份的 1.5 倍；且在此培養環境下，*CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系中的 *MET3* promoter 保持開啟，而 *MET3* promoter 驅使下表現一份 *CaCDC7* 之 mRNA 量又為表現兩份 mRNA 量的 1.8 倍；當環境中加入 2.5 mM met/cys，關閉 *MET3* promoter 時，*CaCDC7 MET3/-::dpl200* 品系之 *CaCDC7* 之 mRNA 表現量比起其他品系的確降低許多。

1. *CaCDC7*(K232R)



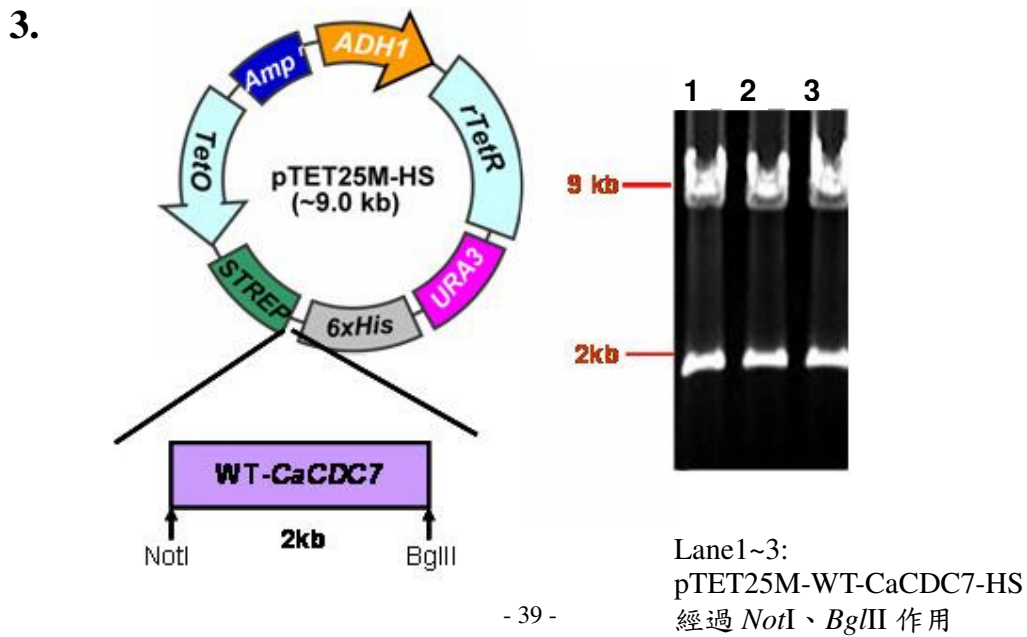
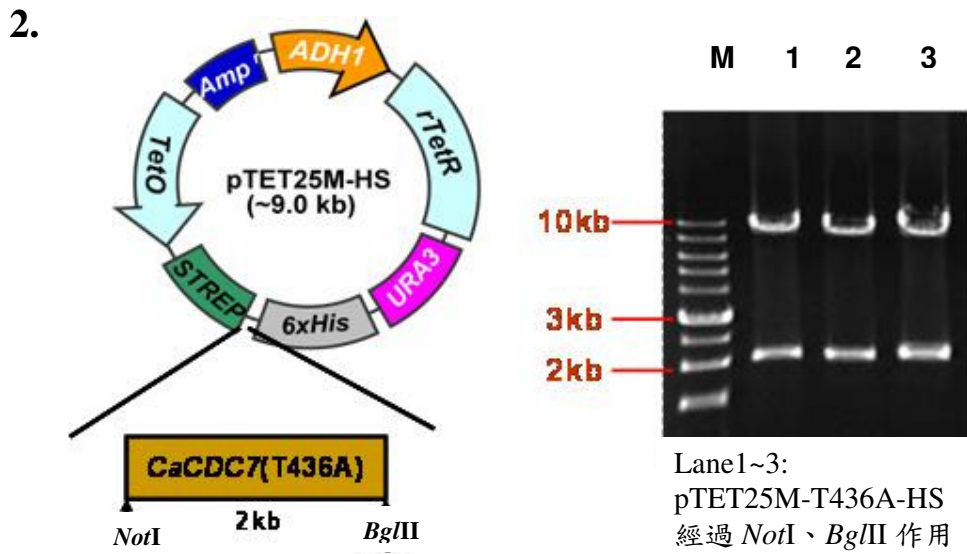
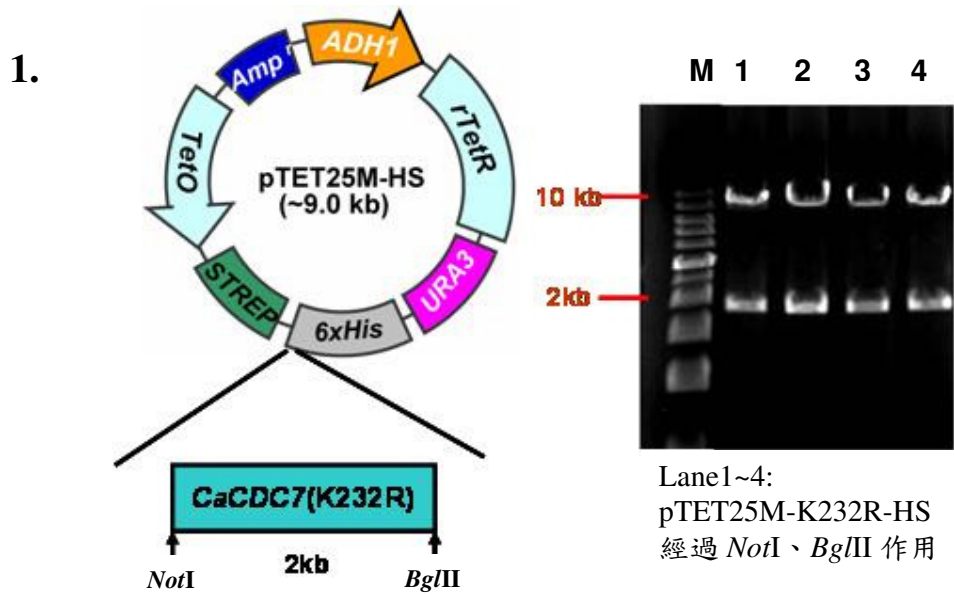
2. *CaCDC7* (T436A)



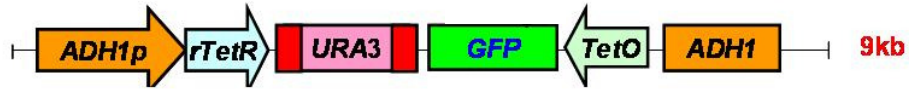
圖十、點突變 *CaCDC7*

1.此突變點位於 *CaCDC7* 基因編碼區第 694~696 位置的核苷酸 AAA 突變後為 AGA，對應其轉譯出的蛋白質是第 232 個胺基酸 lysine 變為 arginine，破壞 *CaCdc7* 激酶活性位點，使其無法活化下游蛋白質，故此作用在於製造一 kinase dead *CaCdc7* 突變激酶。

2.此突變點位於 *CaCDC7* 基因 coding region 第 1306~1308 位置的核苷酸 ACT 突變後為 GCT，對應編碼第 436 個胺基酸 threonine 突變為 alanine，破壞 *CaCdc7* 的 ATP-binding site，使其無法受上游激酶磷酸化而調節活化。



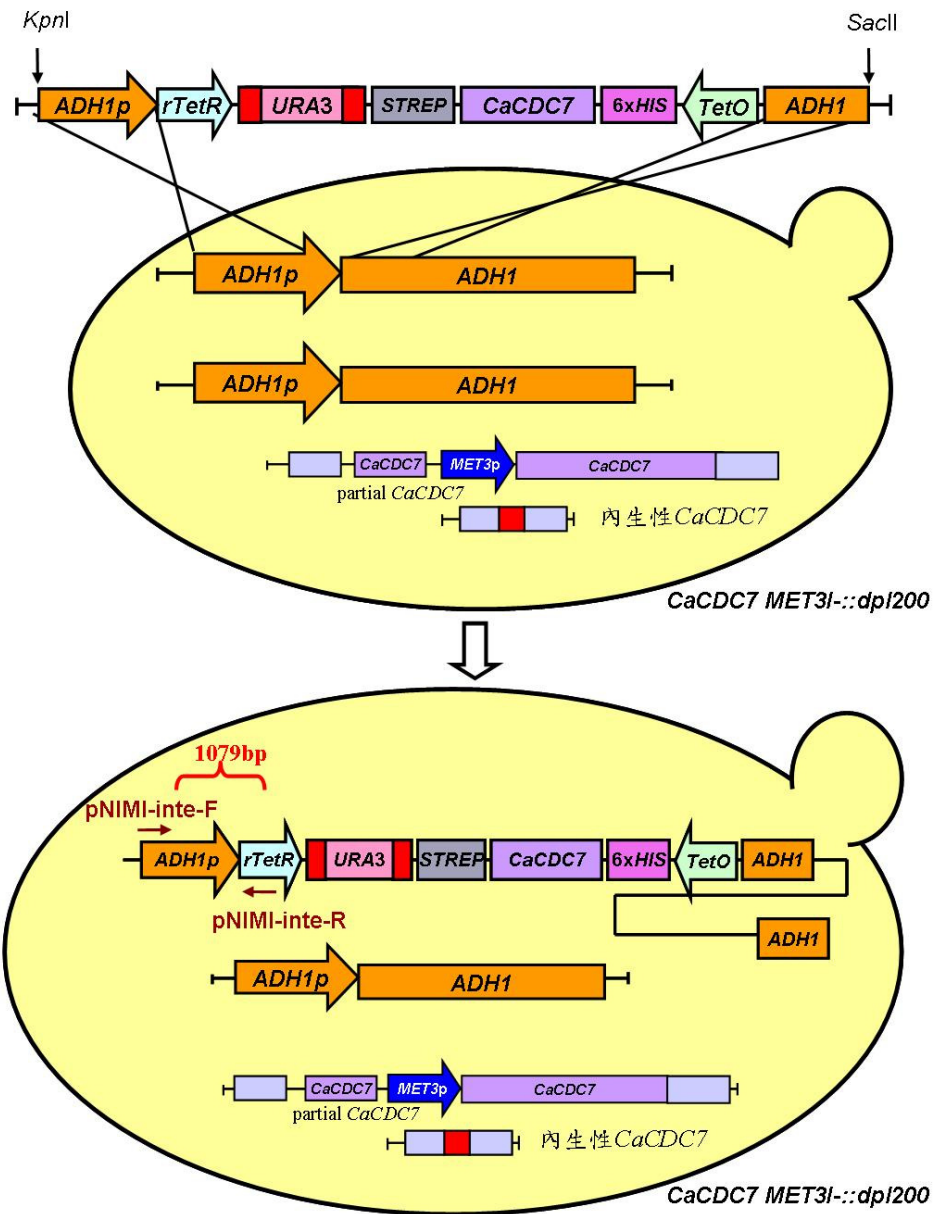
4.



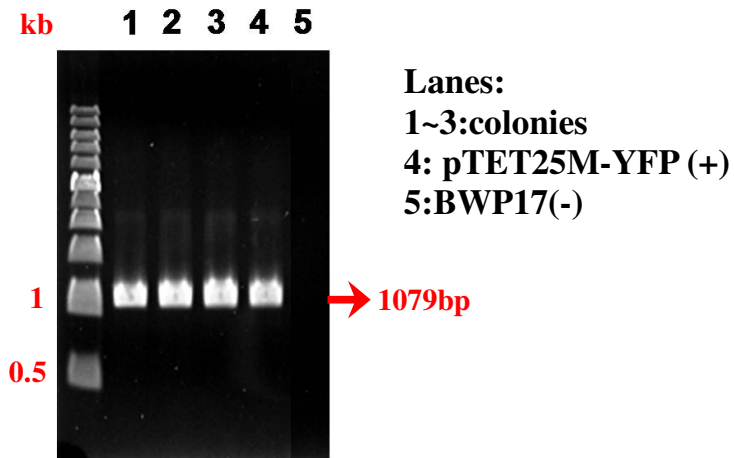
圖十一、建構帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 質體

設計帶有 *NotI* 與 *BglII* 切點序列的引子，在基因編碼區的前、後端與基因互補黏合，使用 PCR 放大 *CaCDC7*(K232R)和 *CaCDC7*(T436A)兩點突變 *CaCDC7* 基因，再以相對應的限制酶作用，藉由接合反應(ligation)，將基因接入 Tet-on 質體 pTET25M-HS (由實驗室威仲學長所提供)當中(1、2)，並將 *CaCDC7* 基因上、下游與 Tet-on 質體本身所帶有的 6xHis 和 Strep epitope tag 做連接，接著將建構完成帶有點突變 *CaCDC7* 基因的 Tet-on 質體轉殖到大腸桿菌中大量複製。當中，為了表現出具有正確閱讀框架之帶有 epitope tag 之外源性 *CaCDC7* 融合蛋白質(利於後續偵測外源性 *CaCDC7* 的蛋白質產物)，所設計在基因後端黏合的 reverse primer 序列中並不含有終止密碼子 TAG。此外，為了和突變組做白色念珠菌型態觀察的對照，同時也構築帶有野生型(wild type)*CaCDC7*(WT-*CaCDC7*)的 Tet-on 質體後(3)；另外，為了在菌絲觀察實驗中排除 Tet-on 質體對白色念珠菌型態的影響而構築一控制組，其完全不具有 *CaCDC7* 基因，是為質體 pTET25M-GFP-NC (由實驗室威仲學長所提供) (4)。

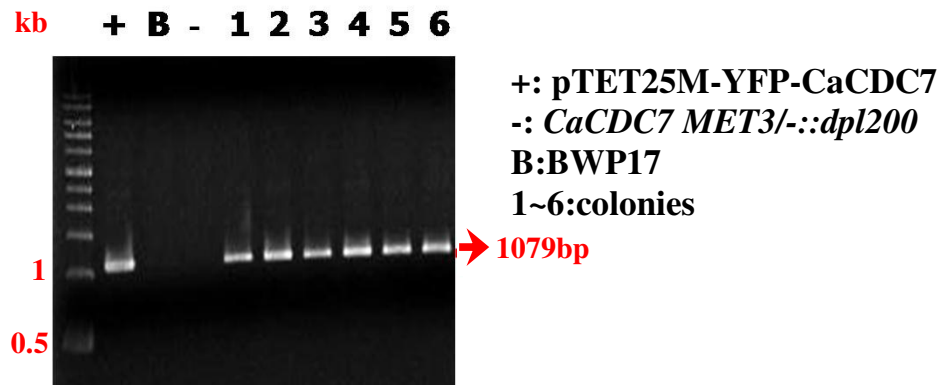
1.



2.



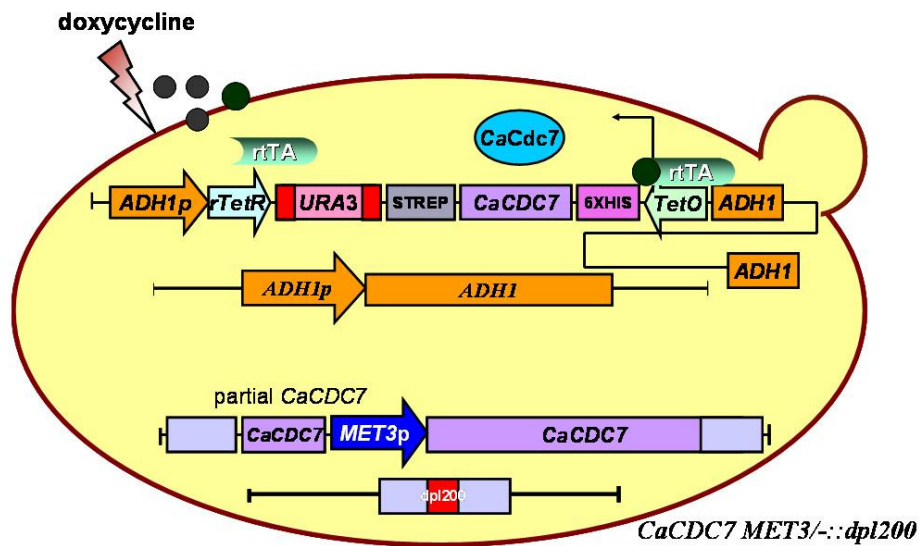
3.



圖十二、建構帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 系統之白色念珠菌品系

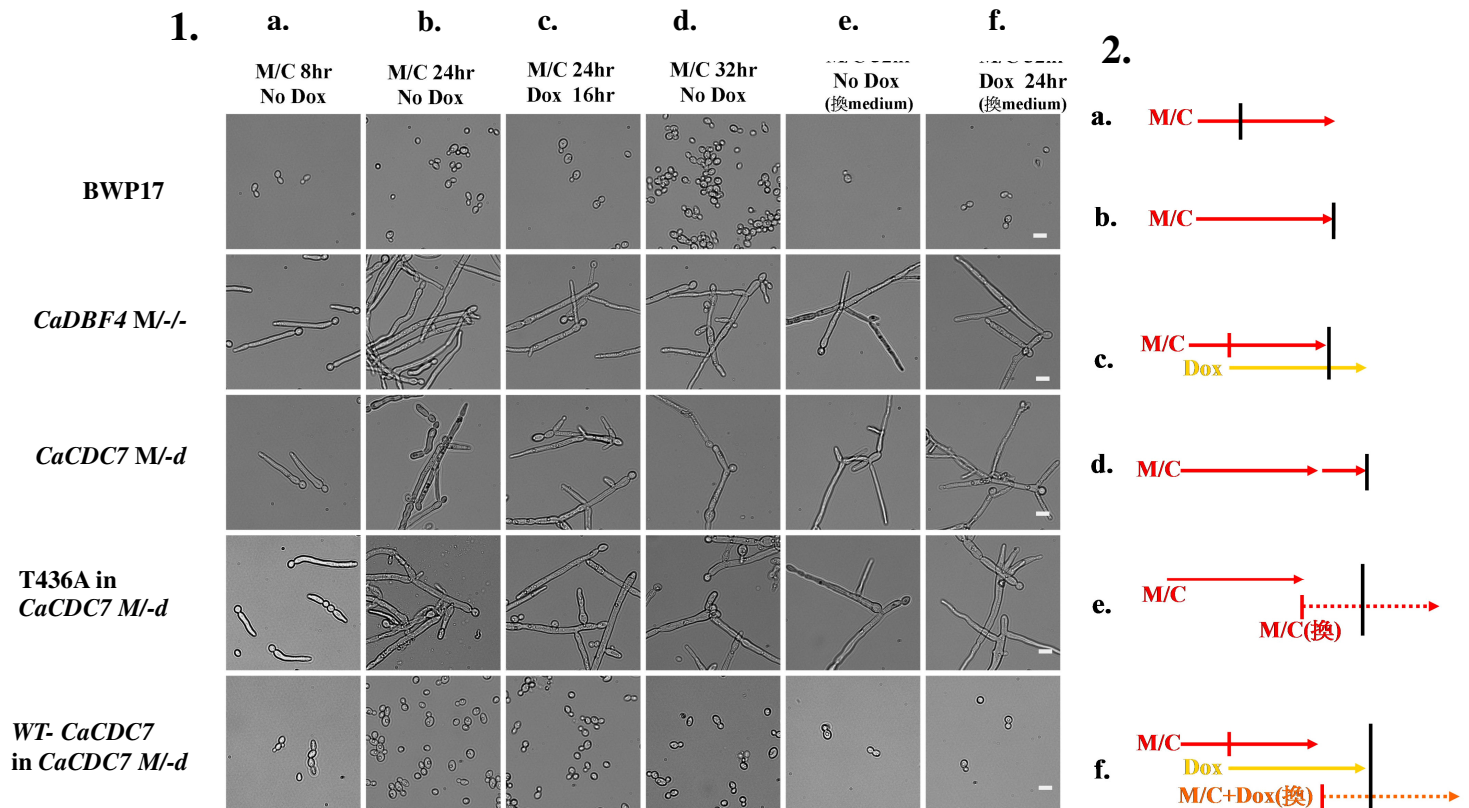
利用帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 質體中的 *ADH1* 序列兩端 *KpnI* 與 *SacII* 切點，使用相對應的限制酶酵素切出 Tet-on 系統片段，並利用 Tet-on 系統兩端的 *ADH1* 同源序列，在白色念珠菌品系 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 基因組中 *ADH1* 基因作同源互換，藉此能把帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 系統片段嵌入 *C. albicans* 之 genomic DNA 中，並且利用 Tet-on 系統上所帶有的 *URA3* 與 *MET3* promoter 上游之 *HIS1* 當作營養篩選 markers，故只有當 Tet-on 系統有成功送入的白色念珠菌細胞才會在 SD+arg 的培養基中存活長出。把長出的白色念珠菌菌落挑出，設計一條 primer 位

於白色念珠菌基因組的 *ADHI* promoter 上(pNIMI-inte-F)，且另一條位於 Tet-on 系統中 *rTetR* 序列上(pNIMI-inte-R)，經過酵母菌菌落聚合酶鏈鎖反應(yeast colony PCR)，放大出的 DNA 片段大小約 1079 bp，確認帶有點突變及野生型 *CaCDC7* 之 Tet-on 系統有成功嵌入白色念珠菌基因組中 *ADHI* locus(1)，當中(2)為帶有野生型 *CaCDC7*，lane1~3 為從 SD+R 的 plate 中挑出的菌落。由於 lane4 為 pTET25M-YFP 質體已帶有 Tet-on 片段，以此對 primers 做 Tet-on 系統的確證，會放大出 1079 bp 的片段，故可當作 positive control，而由於 BWP17 本身不帶有 Tet-on 系統，故其基因組使用此對 primers 並無法放大出訊號，可作為 negative control。(3)為帶有點突變基因 *CaCDC7*(T436A)之 Tet-on 系統之白色念珠菌品系，圖上顯示 1~6 為從 SD+R 的 plate 中挑出的菌落，其中-表示 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 基因組，其本身未帶有 Tet-on 系統，故也可作為 negative control。



圖十三、藉由 Tet-on 系統表達 *CaCDC7* 之示意圖

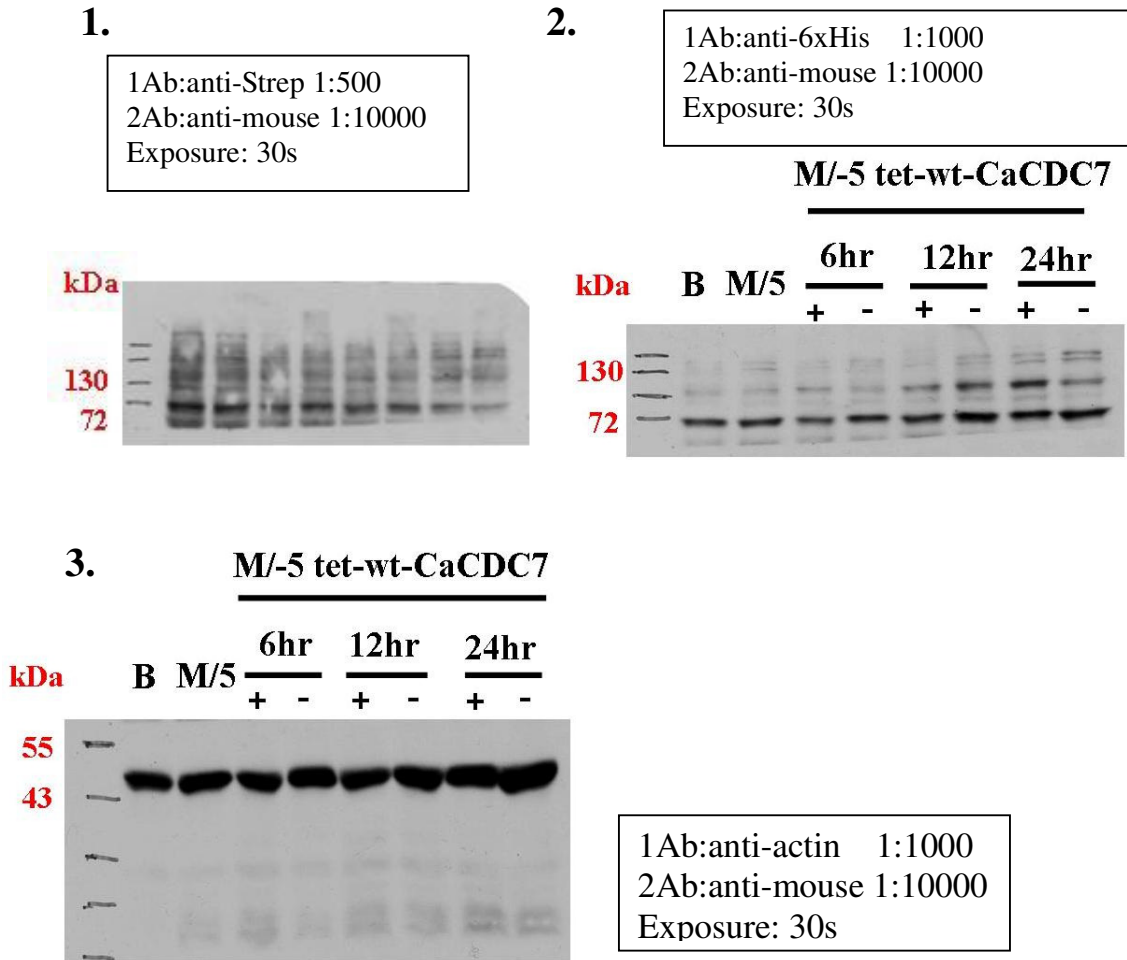
由於 Tet-on 系統之 reverse Tet repressor (*rTetR*)基因經上游常表現型(constitutive) *ADHI* promoter 驅使而表現出 rTA 蛋白質，與培養時所外加的 doxycycline 結合，並一同結合到 Tet-on 系統的 Tet operator(*TetO*)上，以啟動下游 *CaCDC7* 基因的。



圖十四、Tet-on 系統表現外源性野生型及突變型 *CaCDC7*，並觀察白色念珠菌的型態轉變

(1)為白色念珠菌型態觀察，(2)為 a~f 五種培養條件示意圖，黑色實線表觀察時間點，紅實線為 2.5mM met/cys (M/C)誘導，黃虛線為 doxycycline(Dox)誘導，橘線為同時存在 M/C 與 Dox，且經更換至相同成分之培養液。

BWP17 為白色念珠菌 yeast form 的控制組(a~g)。***CaCDC7 M/-d*** 表示 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 之白色念珠菌品系，為圖中其他幾種品系之 parental strain，當作菌絲型(filamentous form)的控制組(a~f)；***CaDBF4 M/-*** 表示另一與 *CaCDC7* 極相關之基因 *CaDBF4* 於 BWP17 中受 *URA3*、*ARG4* 剔除和在 *MET3* promoter 下受調控(由實驗室簡廷學長的實驗結果發現，此 *CaDBF4* 品系白色念珠菌會在 M/C 環境中有菌絲的產生)，可作為 M/C 菌絲誘導操作的控制組(a~f)。而 **T436A in *CaCDC7 M/-d*** 和 **WT- *CaCDC7* in *CaCDC7 M/-d*** 分別表示位於 Tet-on 系統上的 *T436A* 和 WT- *CaCDC7* 各存在於 *CaCDC7 MET3/-::dpl200* 白色念珠菌品系中。誘導過程中可看到 **T436A in *CaCDC7 M/-d*** 在 M/C 的誘導下會漸漸形成菌絲(a、b、d)，在加入 Dox 後無法回復白色念珠菌的形式(c)，經更換至相同條件的 medium 中依然無法使 *C.albicans* 的菌絲形態恢復成芽苞形，證明點突變之 *CaCDC7* 基因 *T436A* 無法回復白色念菌菌絲型態 (e~f)。而 **WT- *CaCDC7* in *CaCDC7 M/-d*** 在 Dox 的誘導下呈現了圓形的芽苞形(c、f)，但在一開始 M/C 的誘導下卻沒有形成菌絲形(a、b、d、e)，此一結果與預期不符，須進一步確認。



圖十五、利用西方點墨法偵測目標蛋白質

收集白色念珠菌 *BWP17-CaCDC7 MET3/-::dpl200* 作為品系的控制組與加入 40 μ g/mL doxycycline 分別誘導 *CaCDC7 MET3/-::dpl200 tet-on-WT CaCDC7* 六小時、十二小時、二十四小時菌液(標示為+), 另外一組為不加 doxycycline 之藥物控制組(標示為-), 接著進行西方點墨法, 以 anti-6xHis(1) 及 anti-Strep antibodies(2)分別偵測 *CaCdc7* 蛋白質; 然而, 結果並不如預期, 我們不僅沒有在該位置偵測到其蛋白質(74.5kDa), 反而在 72kDa 位置出現明顯的訊號、次強訊號位則為 95kDa 位置; 並且, 從數據中的蛋白質表現量多寡, 也看不出加藥(doxycycline)與否的差異, 因此我們推測並非專一性 *CaCdc7* 蛋白質。(3)為選擇 actin 作為 loading control。