

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 利用SET1缺失和JHD2表達調控的菌株來研究白色念珠菌中的組蛋白H3K4甲基化和相關的性狀
------------	--

執行計畫學生：黃于軒

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-095-B

研究期間：107年07月01日至108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 108年03月25日

(一) 摘要

白色念珠菌(*Candida albicans*) 是一種伺機性感染的真菌，正常情況下存在於動物黏膜與皮膚，其多型性生長被認為與致病力相關，菌絲型態的生長對於侵入宿主及破壞組織扮演重要角色。

本次計畫透過 *CaSET1* 基因剔除株中，建立 *CaJHD2* 的四環黴素誘導關閉系統 (Tet-off)，藉此系統開啟及關閉來模擬 *CaSET1* 和 *CaJHD2* 雙剔除及 *CaSET1* 剔除而 *CaJHD2* 過量表現分析 H3K4 甲基化的變化，並藉分析相關致病力外表型及識別與之相關的標靶基因表現變化，釐清彼此功能交互作用的方式。

(二) 研究動機與研究問題

白色念珠菌是一種多型態生長的伺機性真菌，屬於人體內的一種共生菌，於表皮、口腔、陰道、腸胃道黏膜層等地方皆有白色念珠菌的蹤跡。當個體生理發生變化時，白色念珠菌轉為病原菌，使個體產生局部或系統性的感染，易受感染者如：愛滋病患者、糖尿病患者、以及長期接受抗生素治療者等，嚴重時甚至會造成死亡 ((Fortun et al., 2012; Mishra et al., 2007; Pappas et al., 2009)。由於真菌和人類都是真核細胞，皆有共同的細胞標靶，在治療方面有一定的困難，再加上近年抗真菌藥物的濫用，使得有抗藥性的菌株出現，因此尋找其他藥物治療極為重要。(De Backer and Van Dijck, 2003; Georgopadakou and Walsh, 1994; Ghannoum and Rice, 1999)。

白色念珠菌的伺機性感染特性被認為與其多型態轉換有關，或許是因為受外界環境刺激，導致生長型態的改變及增加致病能力。與形態生成及致病力有關的基因為 *CaNOT4*，也就是剔除 *CaNOT4* 基因的白色念珠菌，其在菌絲誘導條件下生長的菌絲型態會相較短且扭曲，影響型態轉換能力進而影響致病力 (Krueger et al., 2004)，由於多數文獻對於白色念珠菌的研究不夠完整，因此會以親緣關係最接近且基因已解碼完成的出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)做

為參考，在出芽酵母菌中 *ScNot4* 可以泛素化 *ScJhd2* 使其降解，*ScJhd2* 是組蛋白 H3K4 去甲基酶 (demethylase)，能夠去除在組蛋白 H3 賴氨酸 4 (H3K4) 上的甲基化，在出芽酵母菌組蛋白的修飾上扮演重要的角色 (Klose et al., 2006; Klose and Zhang, 2007; Liang et al., 2007) 與 *ScJhd2* 相反的 *ScSet1* 則是在 H3K4 加甲基 (Mersman et al., 2009)

在許多低等真核生物或是人類身上都可以找到 *JHD2* 的同源基因 (Klose et al., 2006)，白色念珠菌 *CaJhd2* 去甲基酶先前在實驗室有研究過，是透過 *CaCdc4* 親和力純化過程被鑑定而發現 (Tseng et al., 2010)，而 *CaSET1* 功能在白色念珠菌已被證實具備 H3K4 甲基轉移能力且與發病機制及侵入性念珠菌症有關 (Raman et al., 2006)，但對於 *CaJHD2* 與 *CaSET1* 之間的關係並不清楚，目前沒有其他文獻研究過兩者之間的關係，因此首要工作是建構出特有的品系，品系建構後，有利做後續的分析，像是與致病力有關的型態形成、吸附力、生物膜形成及抗真菌藥物。特有的品系是指利用先前實驗室已建立的四環黴素誘導關閉系統(Tet-off) (Lai et al., 2016)，建構出能夠藉由去氧羥四環 doxycycline (Dox) 去誘導 *CaJHD2* 的關閉來達到近似於 *CaJHD2* 與 *CaSET1* 雙基因剔除株的結果，而開啟時，有單一 *CaSET1* 基因剔除但另一基因 *CaJHD2* 過量表現的 *CaSET1* *-/-* *CaJHD2* Tet-Off/*-*品系。

(三) 文獻回顧與探討

白色念珠菌可為三種型態，分別是酵母菌型(Yeast form)的出芽孢子型態，假性菌絲型態(Pseudohyphal form)，及出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)所沒有的真性菌絲型態(Hyphal form)。多數白色念珠菌的菌落看起來為白色、光滑圓頂狀，真假菌絲生長方式皆具極性，兩者主要的差別在於菌絲生長型態，假性菌絲外型是呈現橢圓狀，而真性菌絲則是細長型的結構，可入侵上皮細胞引起組織損傷，或者是黏附於醫療器材上，與致病性最為相關。(Sudbery et al., 2004)

組蛋白修飾會受到環境的刺激而改變，組蛋白修飾會影響染色質與核小體之

間的距離，彼此越靠近使得轉錄因子無法附著在染色質上，無法進行轉錄作用沒有 mRNA 產出就沒有蛋白質產生，無法作用到下游基因，染色體纏繞越緊密，則可能使基因處在靜默狀態(Silent) (Rando and Winston, 2012)。

一段 DNA 纏繞八聚體組蛋白(Histone)能組成核小體(Nucleosome)，八聚體蛋白分別為:H2A、H2B、H3、H4 各兩顆，而 H1 是負責連接兩個核小體之間的 DNA，核小體與染色質纏繞可形成染色體。組蛋白 H3 有著一個主要的球狀結構與長的 N 端尾巴，它的 N 端尾巴能進行多種影響細胞運作的表觀遺傳修飾，常見的修飾有甲基化(Methylation)、磷酸化(Phosphorylation)、乙烯化(Acetylation)、泛素化(Ubiquitylation)等)(Smith and Shilatifard, 2010)。

有關白色念珠菌組蛋白修飾作用的研究相當缺乏，目前已知的組蛋白 H3 第四賴氨酸之甲基修飾研究為 *CaSET1*，此基因在多種生物中扮演甲基轉移酶角色，而剔除 *CaSET1*，造成超菌絲生長，亦能降低念珠菌對小鼠的感染能力 (Raman et al., 2006)。

JmjC domain containing demethylase-2 (Jhd2) 為高度保留基因，不僅存在於真核生物也發現於人類身上的同源基因，Jhd2 在出芽酵母菌 histone 的修飾上扮演重要的角色，透過 H3K4 之三甲基修飾，影響下游特定基因群之表現，出芽酵母菌 *ScJhd2* 對 histone 去甲基化的能力是經由 *ScNot4* 多次泛素化來調控 (Mersman et al., 2009)。

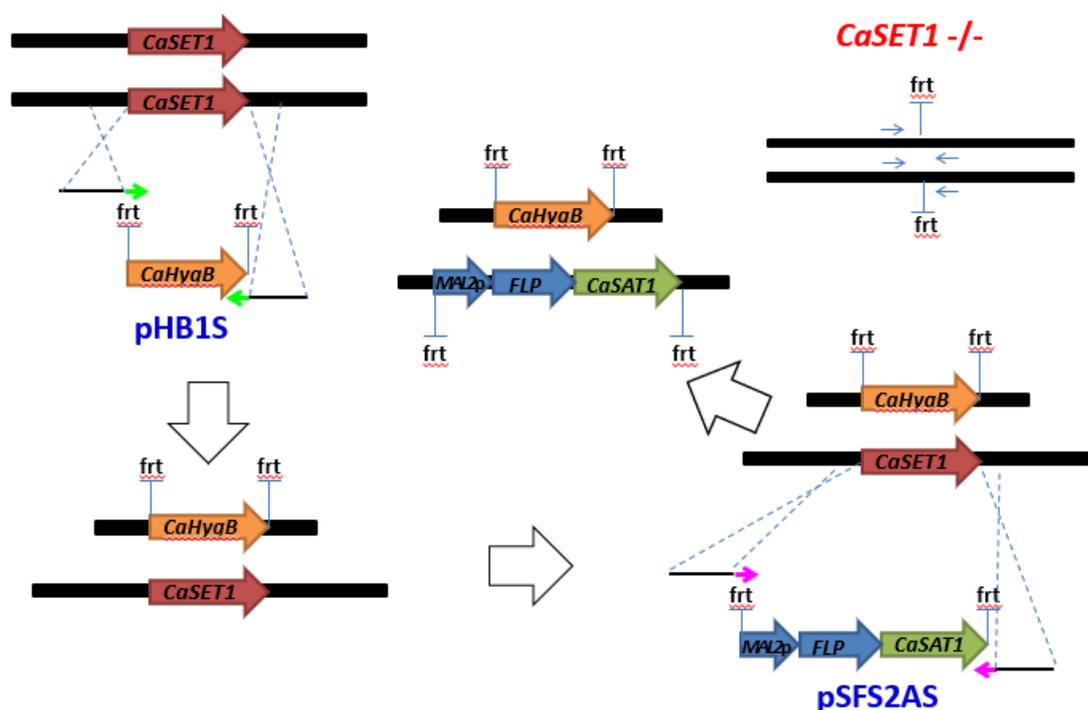
(四) 研究方法及步驟

本計畫透過下述方法探討白色念珠菌 *CaSET1* 缺失而 *CaJHD2* 表達可誘導開啟或關閉下是否能夠透過改變 H3K4 甲基修飾而影響基因表達，進而改變形態生成及致病力。

1. 於野生型的白色念珠菌中，建構 *CaSET1* 缺失的菌株

利用野生型的白色念珠菌 SC5314，首先會以一對能互補涵蓋 *CaSET1* 基因蛋白質編碼區起始密碼子鄰接上游兩段 60 個及質體(pHB1S，如圖一)cassette 專

一上下游 20 個核苷酸序列的長引子，以 polymerase chain reaction (PCR) 將質體 pHB1S 中含有抗生素篩選標記基因 *CaHygB* 的 cassette 擴增為含有 *CaSET1* 上游兩段核苷酸同源序列之 cassette，經由電穿孔的方式，將 cassette 轉殖入野生型的白色念珠菌 SC5314，篩選出具有 *CaHygB* 抗性的菌落之菌株。接著，以一對能互補涵蓋 *CaSET1* 基因蛋白質編碼區起始密碼子及終止密碼子上下游兩段 60 個及 deletion 質體 (pSFS2AS，如圖一) cassette 專一上下游 20 個核苷酸序列的長引子以 PCR 方式將 pSFS2AS 中含有抗生素篩選標記基因 *CaSAT1* 的 *SAT1*-flipper cassette 擴增為含有 *CaSET1* 上游兩段同源序列之 cassette，並利用電穿孔將 *SAT1*-flipper cassette 轉殖至含 *CaHygB* 的 SC5314 菌株，與 *CaSET1* 另一個等位基因進行同源互換。因 *SAT1*-flipper cassette 能使菌體具有抵抗抗生素 Nourseothricin (Nou) 的能力，故篩選出具有 Nou 抗性菌落，此菌落菌株也同時具有 *CaHygB* 及 Nou 抗性。

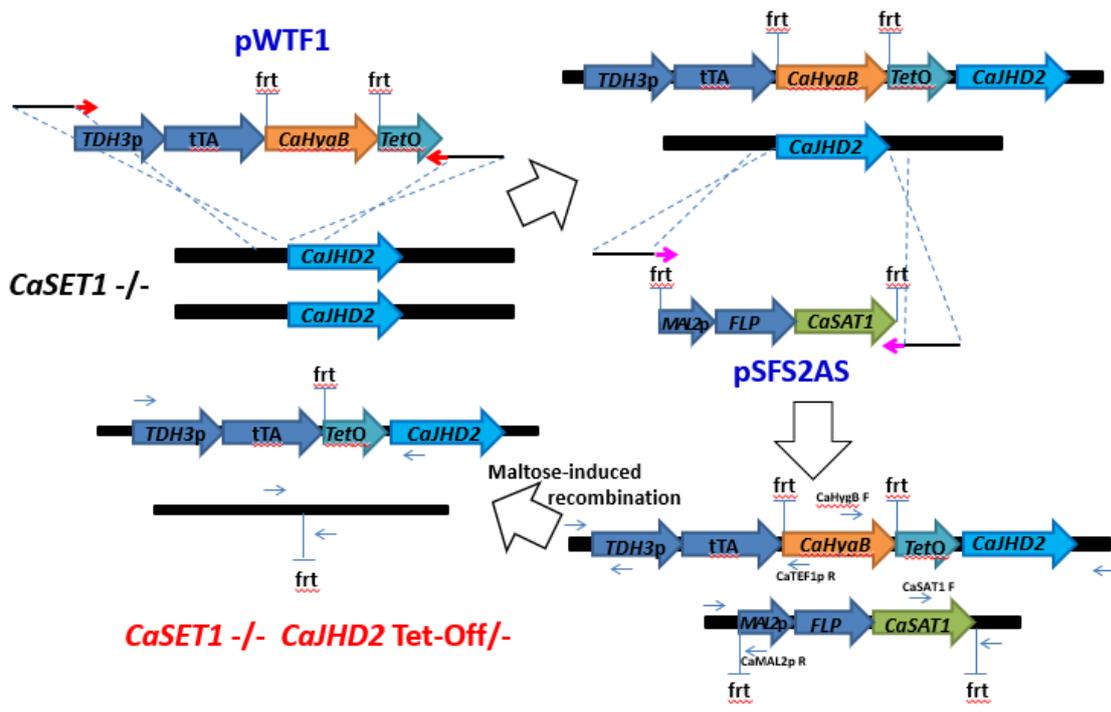


圖一

最後，由於 *SAT1*-flipper cassette 具有 *CaMAL2p* 啟動子能夠調控 FLP 重組酶，因此以 maltose 啟動 FLP 重組酶辨認 *CaHygB* 及 *SAT1*-flipper cassette 兩側的 *frt* 序列，透過重組將抗生素篩選標記基因從基因座上移除，即得到 *CaSET1* 基因剔除的品系。

2. 於 *CaSET1* 基因剔除品系中建構 *CaJHD2* 的四環黴素誘導關閉系統 (Tet-off)

利用上個實驗所構築之 *CaSET1* 基因剔除株，以四環黴素誘導關閉 (Tet-off) 及剔除系統將其 *CaJHD2* 的一條基因剔除，而將另一條等位 *CaJHD2* 置於 Tet-off 調控得到 *CaSET1* $-/-$ *CaJHD2* Tet-Off $-/-$ 品系。先以一對能互補涵蓋 *CaJHD2* 基因蛋白質編碼區起始密碼子鄰接上游兩段 60 個及 Tet-off 質體 (pWTF1, 如圖二) cassette 專一上下游 20 個核苷酸序列的長引子，以 PCR 將質體 pWTF1 中含有抗生素篩選標記基因 *CaHygB* 的 Tet-off cassette 擴增為含有 *CaJHD2* 上游兩段核苷酸同源序列之 cassette，經由電穿孔的方式，將 Tet-off cassette 轉殖入白色念珠菌 *CaSET1* 基因剔除株，篩選出具有 *CaHygB* 抗性的菌落之菌株 (Tet-off-*CaJHD2*)。



圖二

接著，以一對能互補涵蓋 *CaJHD2* 基因蛋白質編碼區起始密碼子及終止密碼子上下游兩段 60 個及 deletion 質體 (pSFS2AS, 如圖二) cassette 專一上下游 20 個核苷酸序列的長引子以 PCR 方式將 pSFS2AS 中含有抗生素篩選標記基因 *CaSAT1* 的 *SAT1*-flipper cassette 擴增為含有 *CaJHD2* 上游兩段同源序列之 cassette，並利用電穿孔將 *SAT1*-flipper cassette 轉殖至含 Tet-off-*CaJHD2* 的菌

株，與 *CaJHD2* 另一個等位基因進行同源互換。因 *SAT1-flipper cassette* 能使菌體具有抵抗抗生素 Nourseothricin (Nou) 的能力，故篩選出具有 Nou 抗性菌落，此菌落菌株也同時具有 *CaHygB* 及 Nou 抗性，再以菌落 PCR 確認 Tet-off cassette 嵌入 *CaJHD2* 的其中一個基因座上游且 *SAT1-flipper cassette* 嵌入 *CaJHD2* 的另一個等位基因座的菌株。最後，由於 *SAT1-flipper cassette* 具有 *CaMAL2p* 啟動子能夠調控 FLP 重組酶，因此以 maltose 啟動 FLP 重組酶辨認 *CaHygB* 及 *SAT1-flipper cassette* 兩側的 *frt* 序列，透過重組將抗生素篩選標記基因從基因座上移除，即得到 *CaSET1* *-/-* *CaJHD2* Tet-Off/*-* 品系。

3. 觀察 *CaSET1* 缺失與 *CaJHD2* 表達受抑制分析 H3K4 甲基化的影響

在已建構完成的 *CaSET1* *-/-* *CaJHD2* Tet-Off/*-* 品系中，加入 Dox 抑制 *CaJHD2* 的表現，達到近似於 *CaJHD2* *CaSET1* 雙基因剔除的條件，再抽取其組蛋白，進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)，再透過西方墨點法 (Western Blotting) 利用抗體 Anti-Histone H3 lysin 4 mono-, di-, tri-methylation 分別偵測組蛋白 H3K4 的單、雙、三甲基，觀察在 *CaSET1* 缺失與 *CaJHD2* 表達受抑制時，組蛋白 3 第四賴氨酸之甲基修飾的情形。

4. 觀察 *CaSET1* 缺失但 *CaJHD2* 過量表現對 H3K4 甲基化的影響

利用 *CaSET1* *-/-* *CaJHD2* Tet-Off/*-* 品系，在不加 Dox 條件下，形成 *CaSET1* 缺失但 *CaJHD2* 過量表達，再抽取其組蛋白，進行 SDS-PAGE 並透過西方墨點法以 Anti-Histone H3 lysin 4 mono-, di-, tri-methylation 分別偵測組蛋白 H3K4 的單、雙、三甲基，觀察在 *CaJHD2* 缺失下而 *CaSET1* 過量表達對組蛋白 3 第四賴氨酸之甲基化修飾的情形。

5. 比較 *CaSET1* *-/-* *CaJHD2* Tet-Off/*-* 品系與野生型的外表型

CaSET1 *-/-* *CaJHD2* Tet-Off/*-* 品系在有或無 Dox 誘導下與進行野生型白色念珠菌品系 SC5314 進行以下致病力特性分析。

a. 芽管形成試驗 (Germ tube formation assay)

C. albicans 細胞以 YPD 培養液培養至指數期，再分別培養於含有 10% bovine serum 的 RPMI 1640 (RPMI 1640 broth/ MOPS/ glucose) 培養液中誘導 1 小時之菌絲生成初期，並於顯微鏡下觀察 *C. albicans* 細胞菌絲初始態芽管 (germ tube) 的長度。

b. 細胞表面疏水性測試 (Cell Surface Hydrophobicity assay)

C. albicans 細胞以 YPD 培養液培養至指數期，將之以 PBS 清洗後，回溶於 PBS 再加入疏水性之碳氫化合物十六烷 (n-hexadecane) 均勻混和，利用分光光度計測量其 600 nm 吸光度決定測定疏水層(十六烷)下親水層 (PBS) 內細胞數目，藉以決定 *C. albicans* 細胞表面疏水性的狀態。

c. 鈣離子依賴絮凝分析(Ca²⁺-dependent flocculation assay)

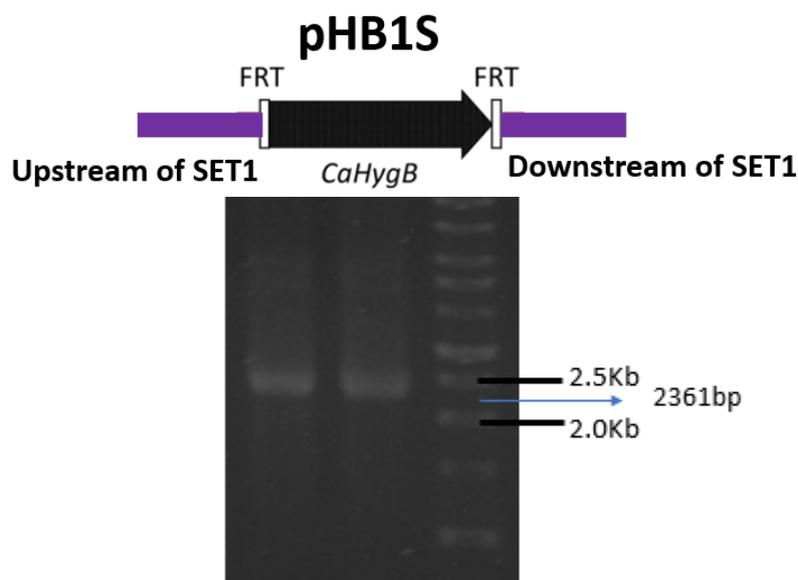
C. albicans 細胞以 YPD 培養液培養至指數期，清除培養液後分別溶於 deflocculation buffer (citrate/ EDTA) 中，再加入 CaCl₂ 誘導細胞產生絮凝現象 (Flocculation) 導致沉澱，並每隔一段時間利用分光光度計測量其 600 nm 吸光度，觀察 *C. albicans* 細胞鈣離子依賴絮凝現象的影響。

d. 黏附試驗(Adhesion assay- Fibronectin)

C. albicans 細胞以 YPD 培養液培養至指數期，清除培養液後分別溶入 RPMI 1640 培養液中，加入 0.0001% 的 Fibronectin 使之與菌的表面結合，將 *C. albicans* 細胞以離心收集，再透過西方墨點法，利用 anti-fibronectin 偵測黏附於 *C. albicans* 表面的 Fibronectin，可決定 *C. albicans* 細胞表面黏附 Fibronectin 的能力。

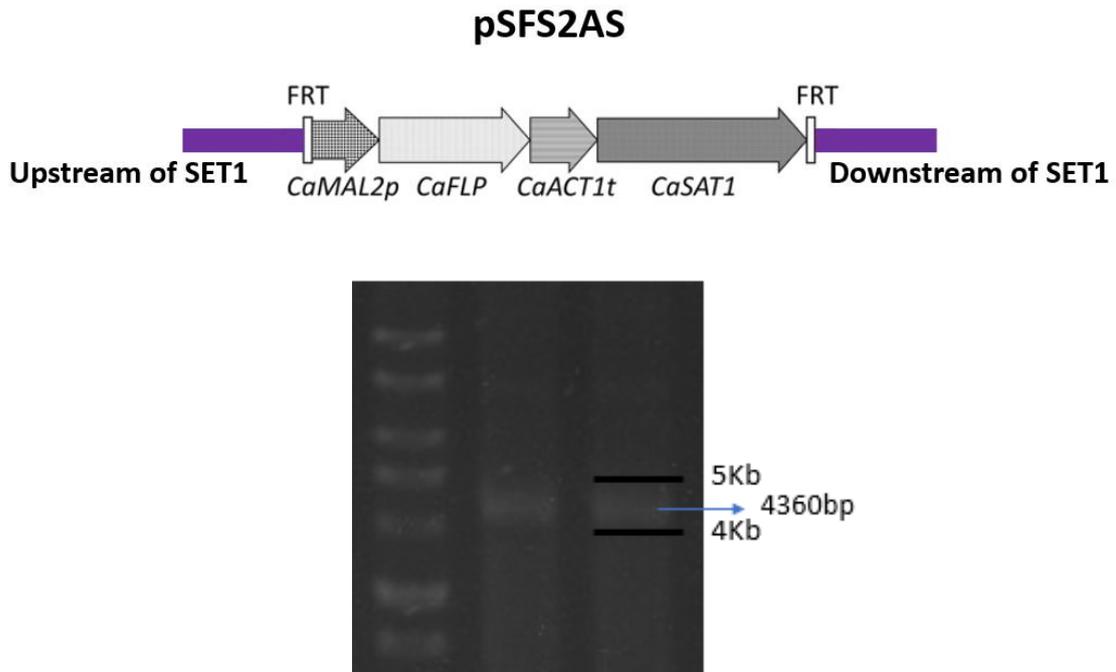
(五) 實驗結果與討論

1. 將質體 pHB1S 與 CaSET1 上下游兩段核苷酸同源序列以 PCR 擴增方式取得 cassette 1



pHB1S-CaSET1 cassette 的擴增，模板為 pHB1S，引子以 SET1S1F 和 SET1S2R 經 PCR 反應，cassette 1 大小為 2361bp，用 1% DNA 電泳膠圖確認位置大小。(PCR 條件設定詳見附錄)

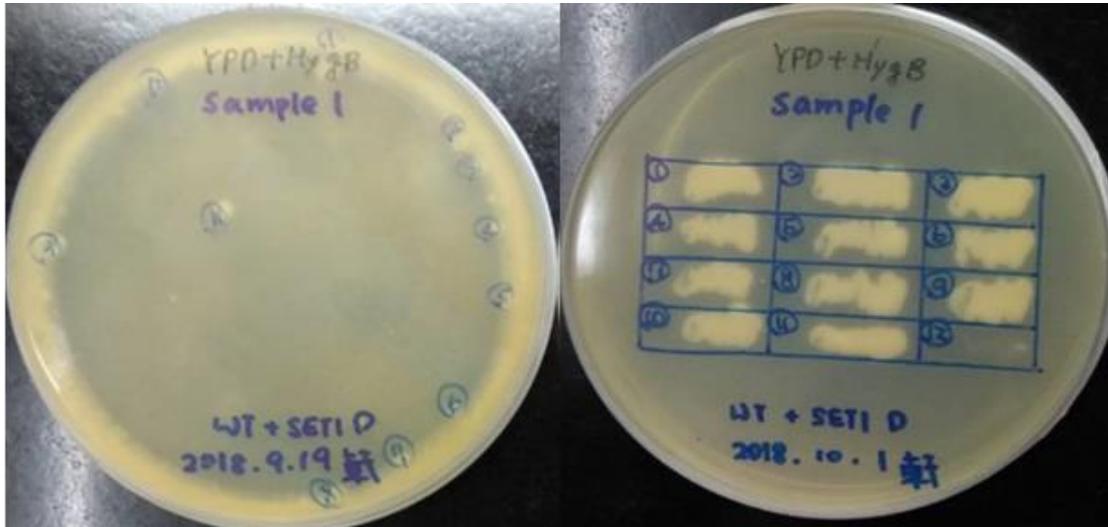
2. 將質體 pSFS2AS 與 CaSET1 上下游兩段核苷酸同源序列以 PCR 擴增方式取得 cassette 2



pSFS2AS-CaSET1 cassette 的擴增，模板為 pHB1S，引子以 SET1S1F 和 SET1S2R 經 PCR 反應，cassette 2 大小為 4360bp，用 1% DNA 電泳膠圖確認位置大小。(PCR 條件設定詳見附錄)

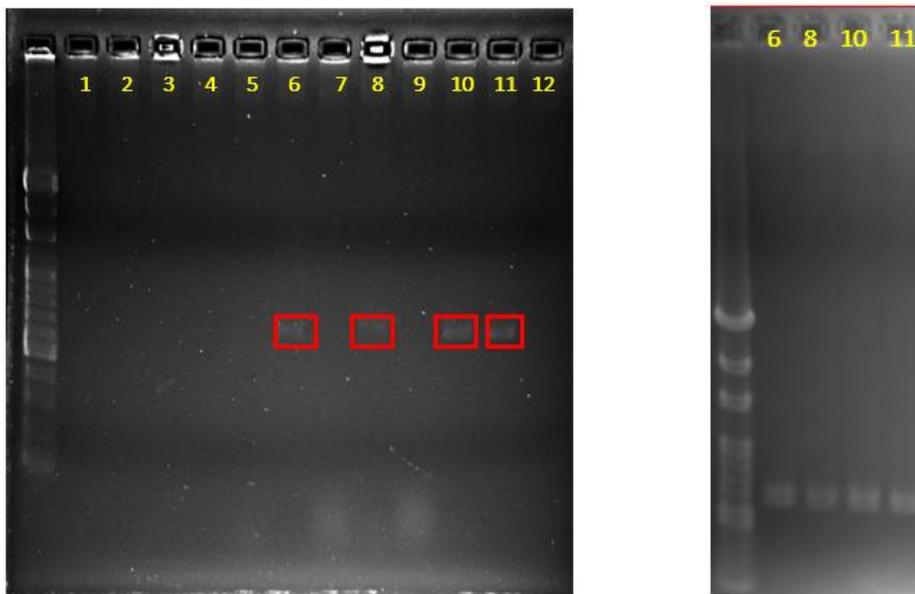
3. 以電穿孔方式將 cassette 1 (pHB1S-CaSET1)送入 SC5314(wide type)中

電穿孔是將白色念珠菌 SC5314 置於高電壓 1800 mV 下，在極短的時間內給予電擊，使得細胞膜結構的改變，產生微小的孔洞讓 pHB1S-CaSET1 進入細胞中。



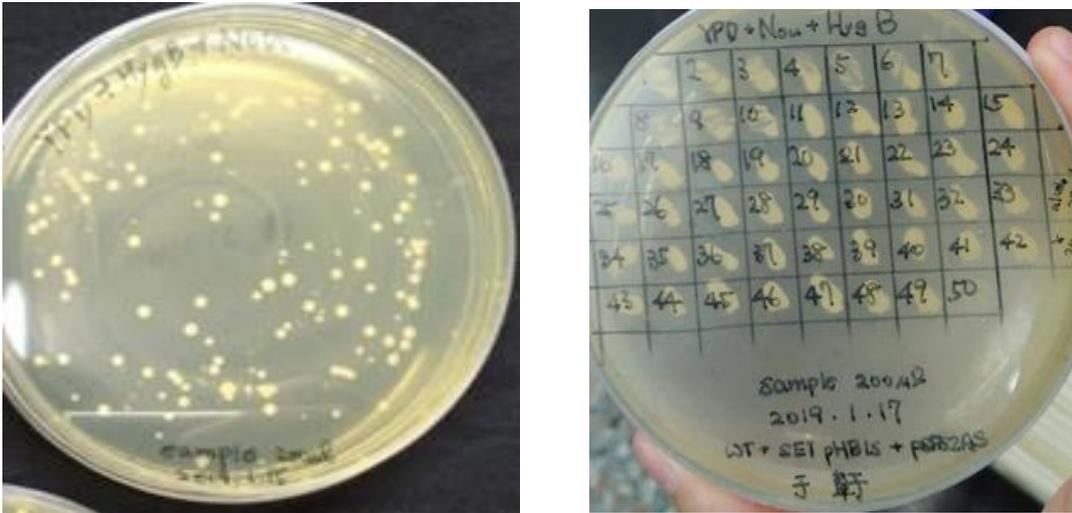
因 pHB1S-CaSET1 cassette 中具有抗 hygB 抗生素基因，因此要確認 cassette 是否成功送入野生型白色念珠菌之中，可以利用含有抗生素的培養盤上進行篩選。

4. 利用 Yeast colony PCR 確認基因座組成狀況



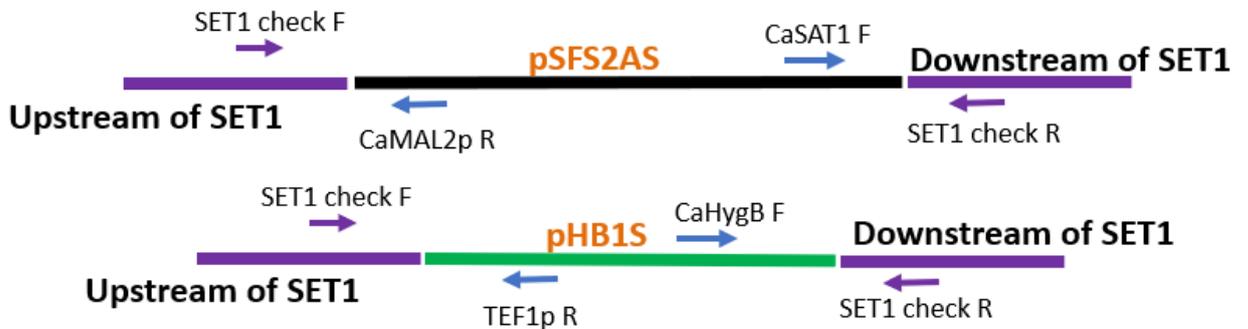
選取 Yeast colony，共挑出 12 個單一菌落，加 0.1% NaOH(25 mM)於 95°C 作用 15min 後離心，取接近 pellet 的液體作為 template 以 CaHygB F 和 SET1 check R 進行 PCR，初步確認所選的第 6、8、10、11 colony 大小符合預期，得到 pHB1S/SET1 菌株。(PCR 條件設定詳見附錄)

5. 再以電穿孔方式將 cassette 2 (pSFS2AS-CaSET1)送入 *pHB1S/SET1* 菌株



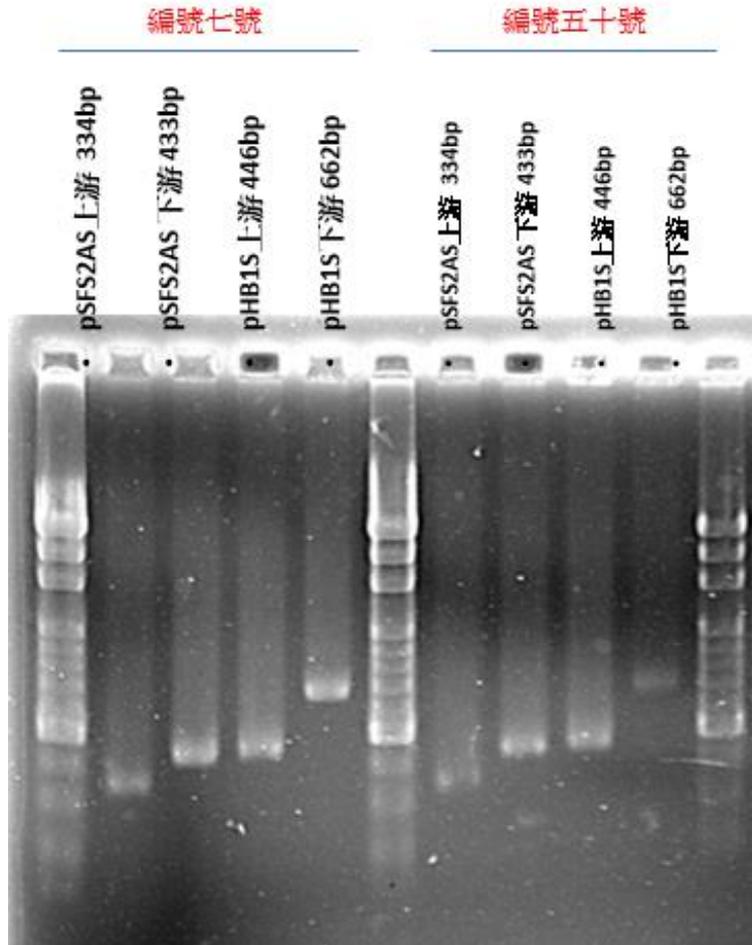
因 pSFS2AS-CaSET1 cassette 中具有抗 Nou 抗生素的基因，因此要確認 cassette 是否成功送入 *pHB1S/SET1* 菌株中，可利用含有雙抗生素的培養盤上進行篩選。

6. 利用 Yeast colony PCR 確認基因座組成狀況



基因結構。以電穿孔利用同源互換的原理送入以 SC5314 野生菌株為親本用 pSFS2AS 剔除一條 SET1 對偶基因，另一條則用 pHB1S 剔除另一條 SET1 對偶基因，箭頭標示 primer 使用位置(primer 序列見附錄)。

為確認兩個 cassette 成功插入之狀況，分別以四對設計之引子來進行



第一組 primers 為 SET1 check F 和 CaMAL2p R，位於 pSFS2AS 的上游片段，因此若 cassette 1 正確插入 SET1 基因會得到 344bp 片段。

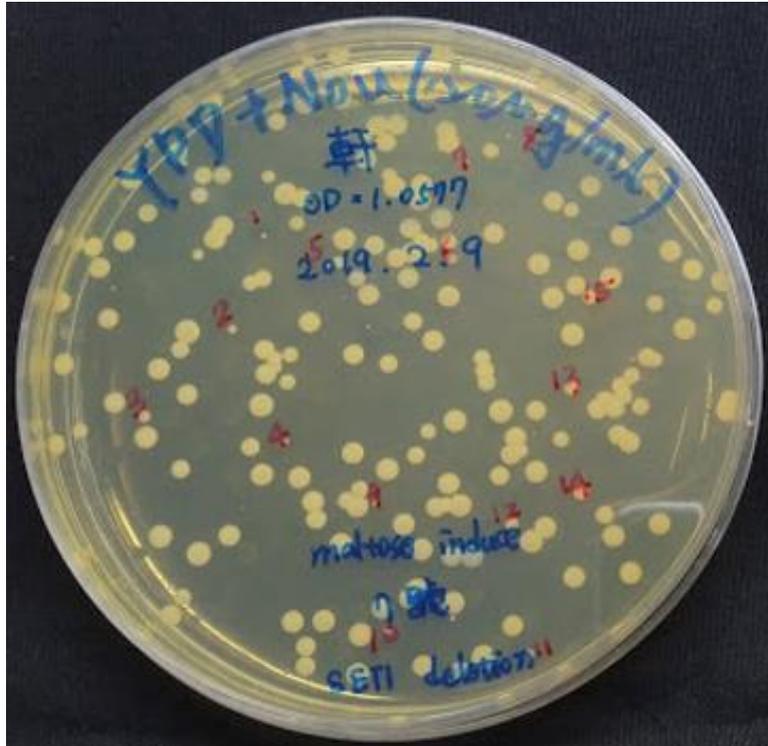
第二組使用一對位於 pSFS2AS 下游的 primers 分別是 CaSAT1 F、SET1 check R，做為 double check 夾出大小為 433bp。

第三組 primers 為 SET1 check F、CaTEF1p R 位於 pHB1S 的上游片段，因此若 cassette 2 正確插入另一 allele 的 SET1 基因會得到 446 片段。

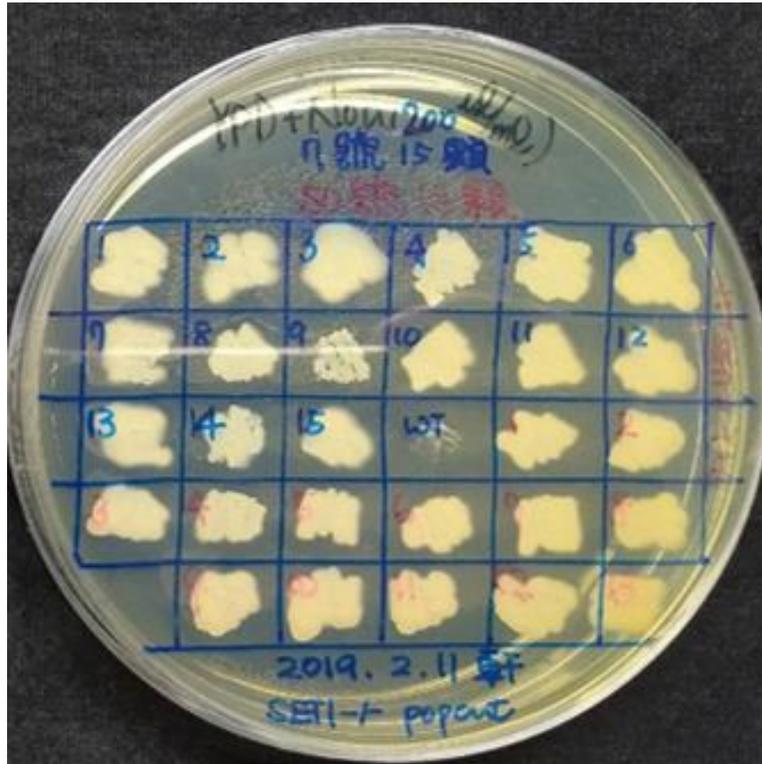
第四組使用一對位於 pHB1S 下游的 primers 分別是 CaHygB F、SET1 check R，做為 double check 夾出大小為 662bp。

7. 確認後進行 Maltose induce 將特定基因片段移除

Maltose induce 是用麥芽糖取代葡萄糖成為已改造菌株之碳源，於 30 °C、200 rpm 的菌液震盪培養兩天，誘導 MAL2p 活化，進行 FLP/frt 系統重組，剔除 frt 序列區間片段，取少量菌液塗抹至低濃度抗生素盤。



從圖中得知經過 20%的 maltose 誘導後，可看到培養在 YPD + Nov (20ug/ml)的抗生素盤中有大小差別的菌落，小顆菌落表示此菌的生長受到限制，因此挑選小顆的菌落做 colony PCR 看 *SET1* 基因是否被剔除。



經篩選後挑出數顆單一菌落，重新塗抹至新的正常濃度抗生素盤培養兩天，此菌株在正常情況下是無法存活在正常濃度(200ug/ml)換句話說，當低濃度 Nou 培養基選殖完成後，該菌落中已經沒有 SAT1 可抗 Nou 也就是 SET1^{-/-}，因此沒有抗抗生素的能力，該圖表每個菌落在正常濃度下仍可能存活，無法順利將基因剔除。

討論與未來工作:

為了瞭解 SET1 與 JHD2 兩者之間組蛋白 H3K4 的甲基化情況，得建構出特有品系，以便更往後實驗的觀察，由於在 maltose induce 嘗試多次，像是選擇用更高濃度的 Nou 抗生素盤篩選抑或是多次誘導，仍可見該品系存活在含有抗生素盤上，但無法存活在含有 Hygromycin B 抗生素盤。利用 maltose induce 的 FLP/ft 重組系統剔除基因無法順利成功的考慮原因為 maltose 誘導不完全，因此多增加一次的兩天 maltose induce，便試著從培養盤上挑取單一菌落進行第二次誘導，以同樣方式先取少量菌液在低濃度的 Nou 抗生素盤上培養兩天後，挑取小顆菌落畫至高濃度 Nou 抗生素盤，但仍然皆可活在高濃度 Nou 抗生素盤。

如何改善 FLP/ft 重組系統剔除基因？多再嘗試培養的時間和麥芽糖濃度等因素，並多增加可挑取的小菌落進行篩選，假如篩選成功再設計專一引子進行聚合酶連鎖反應看基因組成。

完成品系建構後，以西方墨點法、芽管形成試驗、細胞表面疏水性測試、鈣離子依賴性絮凝測試以及黏附試驗等外表型分析實驗，深入探討 CaSET1 和 CaJHD2 對於白色念珠菌毒力以及外表型態的影響。

(六) 參考文獻

- De Backer, M.D., and Van Dijck, P. (2003). Progress in functional genomics approaches to antifungal drug target discovery. *Trends Microbiol* 11, 470-478.
- Fortun, J., Martin-Davila, P., Gomez-Garcia de la Pedrosa, E., Pintado, V., Cobo, J., Fresco, G., Meije, Y., Ros, L., Alvarez, M.E., Luengo, J., *et al.* (2012). Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect* 65, 64-70.
- Georgopapadakou, N.H., and Walsh, T.J. (1994). Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* 264, 371-373.
- Ghannoum, M.A., and Rice, L.B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12, 501-517.
- Klose, R.J., Kallin, E.M., and Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7, 715-727.
- Klose, R.J., and Zhang, Y. (2007). Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 307-318.
- Krueger, K.E., Ghosh, A.K., Krom, B.P., and Cihlar, R.L. (2004). Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*. *Microbiology* 150, 229-240.
- Lai, W.C., Sun, H.F., Lin, P.H., Ho Lin, H.L., and Shieh, J.C. (2016). A new rapid and efficient system with dominant selection developed to inactivate and conditionally express genes in *Candida albicans*. *Curr Genet* 62, 213-235.
- Liang, G., Klose, R.J., Gardner, K.E., and Zhang, Y. (2007). Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nat Struct Mol Biol* 14, 243-245.
- Mersman, D.P., Du, H.N., Fingerman, I.M., South, P.F., and Briggs, S.D. (2009). Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression. *Genes Dev* 23, 951-962.
- Mishra, N.N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D.K., and Singh, R. (2007). Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54, 201-235.
- Pappas, P.G., Kauffman, C.A., Andes, D., Benjamin, D.K., Jr., Calandra, T.F., Edwards, J.E., Jr., Filler, S.G., Fisher, J.F., Kullberg, B.J., Ostrosky-Zeichner, L., *et al.* (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48, 503-535.
- Raman, S.B., Nguyen, M.H., Zhang, Z., Cheng, S., Jia, H.Y., Weisner, N., Iczkowski, K., and Clancy, C.J. (2006). *Candida albicans* SET1 encodes a histone 3 lysine 4 methyltransferase that contributes to the pathogenesis of invasive candidiasis. *Mol Microbiol* 60, 697-709.
- Rando, O.J., and Winston, F. (2012). Chromatin and transcription in yeast. *Genetics* 190, 351-387.

Smith, E., and Shilatifard, A. (2010). The chromatin signaling pathway: diverse mechanisms of recruitment of histone-modifying enzymes and varied biological outcomes. *Mol Cell* 40, 689-701.

Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12, 317-324.

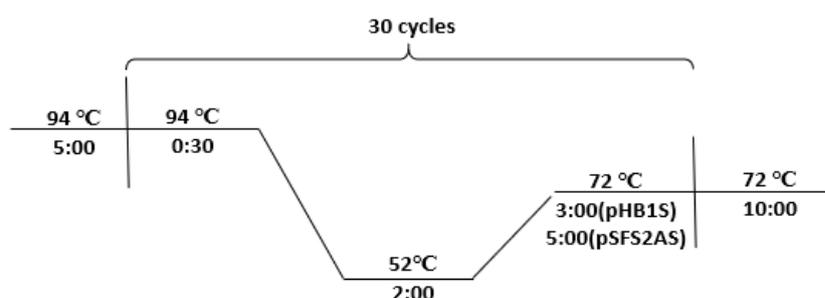
(七) 附錄

primer	Sequence (5' to 3')
SET1S1F	ATTTTATTTAACGTATAACAAATAAAAACAAGAAGCTTGTAATCAAA CATACACCTTGCTGGTACCGAAGCTTCGTAC
SET1S2R	ACATCAGAATTATCTGACAATACTAAATTCACCACTTGATTTATCAC ACGTTTATGCAAAGAGCTCTGATATCATCGA
SET1 check F	TTGGACGTTGACTACTACAG
SET1 check R	CCACT TGATT TATCA CACGT
CaHygB F	TTAGATCAGGTGCTGGTACT
CaSAT1 F	GCTCCTTGGCATAACGATTAG
CaTEF1p R	GGTATTTGGCTTTCGGTAT
CaMAL2p R	CAGACAGTCGAGTTAGACAG

PCR 設定之條件

1. 長引子 cassette

Template(100ng/L)	0.5
5X HIFI buffer	5
2mM dNTP	2.5
Primer-F	1
Primer-R	1
Polymerase (HIFI)	0.5
d2H ₂ O	15.5
total	25(μl)



2. Yeast colony PCR

Template	3
10X Taq buffer	2.5
2mM dNTP	2.5
Primer-F	1
Primer-R	1
Polymerase (Taq)	0.3
d2H ₂ O	14.7
total	25(μl)

