

中山醫學大學生物醫學科學學系
碩士論文

Master Thesis, Department of Biomedical sciences,
Chung Shan Medical University

運用親和力蛋白質純化法找出與白色念珠菌 Cdc4 的
相關性蛋白質

Affinity purification of the *Candida albicans* Cdc4
associated proteins

指導教授：謝家慶 博士 (Jia-Ching Shieh, Ph. D.)

研究生：曾子玲 (Tzu-Ling Tseng)

中華民國九十七年七月

July, 2008

致謝

溫煦的陽光升起，台中的七月份是酷熱的，但早晨還算微涼，打開那被我貼上小熊維尼與酷炫 Avril Lavigne 貼紙並伴隨著我將近兩年的筆電，點播著我喜歡的音樂，看著筆電裡裝著滿滿成功與失敗的實驗數據，我不禁微笑了，心中也充滿著許多的感謝，此刻小小胖胖卻總愛拿著 pipetman 的小手，正敲打著這五年的大學附加碩士生活的點點滴滴.....感謝我親愛的謝家慶老師，在這四年裡，給予我一個自由發揮的舞台，讓我在這個舞台上開發自己的潛力與創意，完成一次又一次的大小 seminars，讓我受到挫折時，能有再站起來的勇氣，並挑戰每一次不可能的任務，且試著去完成它、做好它，讓我學習到好多好多的事情，不管是在實驗上或是生活上，老師謝謝您總是鼓勵著我、支持著我並適時的提醒與點醒我，小叮嚀真的很開心能當您的學生，因為在這可愛與溫馨的實驗室裡我學會了開朗、努力與永不放棄的精神。另外，我也要感謝我大學時的班導師陳威仁老師，給予我蛋白質質譜儀分析上的指導與支援，並勉勵我繼續深造與提醒我歸零的態度；謝謝我的實驗啟蒙老師林庭慧老師，可愛熱情的王淑紅老師，還有幫我順利完成五年一貫以來所需的大小程序的林玫伶老師，與生醫系上的所有老師們，謝謝您們這一路以來的陪伴與分享，讓我可以順利完成這一階段的成長。感謝楊昀良老師與李娟老師，在百忙之中抽空給予我論文以及口試上的指導，使這本論文更趨完整。謝謝第一個在實驗上帶我成長且一路開導與幫助我的宇哲學長，教我勇敢、獨立思考與穩重的威仲學長，總是讓我有點擔心卻常給予我暖暖笑聲與鼓勵的銘偉學長，伴我在星空下談心、給予我許多慰藉與 2006 年誠品跨年第一個新年所遇見的熱愛 snoopy 的如珊學姊，2007 年生日那天帶著充滿溫暖的禮物與祝福給我且總是很體貼的舒婷學姊，陪伴我熬過論文寫作低潮時的亭萱學姊，時常給予我實驗上幫助的鉦展學長，碩士班一路以來帶給我許多鼓勵與自信的嘉浩學長，和替我加油、陪伴我走到論文口試最後一刻的麗鈞學姊與麗婷。還有要謝謝一路以來的可愛好友兼飯友們：有時熱情、有時帥酷的簡蕙，活潑浪

漫的怡孜，可愛貼心總是會帶好吃名產回來分享的介玟，和偶爾插花與熱愛網球運動的瑞喜，謝謝你們讓忙碌碩士生涯的每一頓晚餐充滿著歡笑、輕鬆與甜美的回憶；謝謝實驗室裡一群可愛的學弟妹們：善解人意的珍瑋、認真的章豪、努力但有時迷迷糊糊的彥勳，總是為我著想的柏彥，酷炫的詩穎，歌唱冠軍的俊淵，還有可愛貼心的舒雅，謝謝你們讓這個實驗室充滿著許多的驚奇與開心。謝謝碩士這兩年來，喜歡帶我到處發現許多有趣的地方，告訴我許多有趣的資訊，和給阿噹好多好吃的糖果餅乾，並給予阿噹滿滿的溫暖與支持力量的蟒蛇台慶；也謝謝一起奮鬥、鼓舞的平日戰友們阿好姨琬玉、映廷、敬之、炯志、牧野、俊年、元霆、仁裕等，與互相勉勵支持的云容、麗君和菡霓。還有當我傷心難過時，不斷給予我勇氣、溫馨祝福的知心好友們婉慈、郁婷和佩穎等...，謝謝你們，真的很愛你們。

最後，將這本論文獻給我最親愛的家人，謝謝爸爸媽媽給予我百分百的鼓勵和源源不斷的勇氣來源，謝謝哥哥嫂嫂的照顧與支持，還有謝謝我那有點調皮卻懂事很多的貼心弟弟。謝謝您們，真的超級愛您們的！未來的我會加油的、會開心的、會努力的朝新的目標與夢想邁進，謝謝您們。.....耳邊輕快的音樂仍播放著，以最後一次的校稿與儲存動作，作為簡單結束這五年來學碩士的儀式，閉上眼睛，感受到心中有股暖暖的回憶，謝謝每一個在我身邊的大家，願我所愛的你們平安、健康與喜樂。

曾子玲 謹致於

中山醫學大學 生物醫學科學學系

中華民國九十七年七月

目錄

中文摘要	P.1
Abstract	P.3
序論	P.5
1. 白色念珠菌	P.5
1.1 白色念珠菌與疾病	P.5
1.2 白色念珠菌的生長形態與致病力	P.6
1.3 白色念珠菌的形態誘導	P.11
1.3.1 酵母菌、假性菌絲以及真性菌絲的形態誘導	P.11
1.3.2 White cells 與 Opaque cells 的形態誘導	P.14
1.3.3 厚膜孢子(Chlamydospores)的形態誘導	P.14
1.4 白色念珠菌的生物特性	P.17
2. SCF (Skp1-Cdc53/Cullin-F box) Complexes	P.19
2.1 The Ubiquitin System	P.19
2.2 SCF ^{Cdc4} 和其受質在出芽酵母菌中所扮演的角色及功能	P.22
3. <i>Candida albicans</i> Cdc4 (CaCdc4)	P.24
4. <i>Candida albicans</i> Cdc4 之相關蛋白質的研究	P.27
5. Affinity purification	P.29
6. 研究動機和主要發現	P.31
材料和方法	P.33
1. 所使用的大腸桿菌和白色念珠菌菌株	P.33
1.1 大腸桿菌菌株(<i>Escherichia coli</i>)	P.33
1.2 白色念珠菌菌株(<i>Candida albicans</i>)	P.33
2. 所使用的載體	P.33

3. 菌株品系的建構-----	P.35
3.1 大腸桿菌品系的建構-----	P.35
3.1.1 質體的建構-----	P.35
3.1.1.1 載體的製備-----	P.35
3.1.1.1.1 限制酶反應-----	P.35
3.1.1.1.2 鹼性去磷酸根作用(Alkaline Phosphatation)-----	P.39
3.1.1.2 嵌入DNA (Insert DNA)的製備-----	P.39
3.1.1.2.1 <i>Pfu</i> 聚合酶連鎖反應(<i>Pfu</i> PCR)-----	P.40
3.1.1.2.2 PCR產物之3'端的加A鹼基作用(A-Tailing)-----	P.41
3.1.1.2.3 TA 選殖(TA Cloning)-----	P.41
3.1.1.2.4 限制酶反應-----	P.43
3.1.1.3 接合反應(Ligation)-----	P.43
3.1.1.4 酒精沉澱-----	P.44
3.1.2 勝任細胞(Competent Cells)的製備-----	P.45
3.1.2.1 製備以氯化鈣化學方法處理的勝任細胞(Preparing Chemically CaCl ₂ Competent Cells)-----	P.45
3.1.2.2 製備電穿孔的勝任細胞(Preparing Electrocompetent Cells)-----	P.45
3.1.3 轉形(Transformation)-----	P.46
3.1.3.1 氯化鈣化學方法轉形實驗(CaCl ₂ Transformation)-----	P.46
3.1.3.2 電穿孔方法轉形實驗(Electroporation)-----	P.47
3.1.4 大腸桿菌菌落聚合酶連鎖反應(<i>E. coli</i> Colony PCR)-----	P.48
3.1.5 限制酶反應確認-----	P.49
3.1.6 核酸定序(DNA Sequencing)-----	P.49
3.2 白色念珠菌品系的建構-----	P.49
3.2.1 將進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗的DNA片段之準備-----	P.50
3.2.2 醋酸鋰酵母菌轉形實驗(LiAc Yeast Transformation)-----	P.50

3.2.3 複印(Replica)-----	P.52
3.2.4 酵母菌菌落聚合酶連鎖反應(Yeast Colony PCR)-----	P.53
4. 菌株的培養條件-----	P.53
4.1 大腸桿菌的培養條件-----	P.53
4.1.1 所使用的培養液、培養基以及藥品-----	P.53
4.1.1.1 所使用的培養液-----	P.53
4.1.1.2 所使用的培養基-----	P.54
4.1.1.3 所使用的藥品-----	P.54
4.1.2 一般大腸桿菌的培養-----	P.54
4.1.3 表現重組蛋白質之菌株的培養條件-----	P.54
4.2 白色念珠菌的培養條件-----	P.56
4.2.1 所使用的培養液、培養基以及藥品-----	P.56
4.2.1.1 所使用的培養液-----	P.56
4.2.1.2 所使用的培養基-----	P.56
4.2.1.3 所使用的藥品-----	P.57
4.2.2 一般白色念珠菌的培養-----	P.57
4.2.3 表現重組蛋白質之菌株的培養條件-----	P.57
4.2.4 誘導白色念珠菌之形態生成的培養條件-----	P.58
4.2.4.1 SC5314 之酵母菌和真性菌絲生長形態的誘導-----	P.58
4.2.4.2 TET-On系統菌株之酵母菌和真性菌絲生長形態的誘導-----	P.59
5. 蛋白質之萃取-----	P.60
5.1 大腸桿菌的蛋白質之萃取-----	P.60
5.2 白色念珠菌的蛋白質之萃取-----	P.60
5.2.1 少量白色念珠菌的蛋白質之萃取-----	P.60
5.2.2 大量白色念珠菌的蛋白質之萃取-----	P.61
6. 蛋白質之定量-----	P.62

7. 親和力蛋白質之純化(Affinity Purification)	P.63
7.1 利用大腸桿菌 BL21 表現重組蛋白質系統	P.63
7.1.1 製備含有 His-Tagged 重組蛋白質之 Nickel Resin	P.63
7.1.2 細胞外之蛋白質交互作用	P.64
7.1.3 His-Tagged 重組蛋白質和與其相關的蛋白質之純化	P.64
7.2 利用白色念珠菌表現重組蛋白質之系統	P.65
7.2.1 FLAG-Tagged 重組蛋白質和與其相關的蛋白質之純化	P.65
8. 所使用的抗體	P.66
9. SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)	P.66
10. 西方點墨法分析(Western Blotting)	P.67
11. 蛋白質之顯現(Protein Visualization)	P.69
11.1 銀染(Silver Staining)	P.69
11.2 Coomassie Blue Staining	P.69
結果	P.71
1. 運用親和力蛋白質純化法找出與白色念珠菌 Cdc4 的相關性蛋白質之策略與構 想	P.71
2. 建構不同表現量的 6xHis-FLAG-Tagged CaCdc4 重組蛋白質之白色念珠菌菌 株	P.75
2.1 CaCDC4-6HF-Sp (self promoter) 菌株的建構	P.75
2.2 CaCDC4-6HF-Ap (ACT1 promoter) 菌株的建構	P.81
2.3 TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF 菌株的建構	P.84
3. 觀察運用 TET-On System 以及 ACT1 Promoter 來分別大量與持續性表現 6xHis- FLAG-Tagged 重組蛋白質之情形以及各種重組蛋白質的表現情況	P.90
4. 建立最佳誘導 TET-CaCDC4-6HF 菌株表現 CaCdc4-6HF 重組蛋白質之條件	P.95

5. <i>CaCdc4</i> / <i>CaCdc4-F box</i> / <i>CaCdc4-WD40-6HF</i> 重組蛋白質會與 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel 相結合但是與 HIS-Select Nickel Affinity Gel 的結合效果並不理想 -----	P.95
6. 運用 <i>TET-CaCDC4</i> / <i>CaCDC4-F box</i> / <i>CaCDC4- WD40-6HF</i> 白色念珠菌菌株和親和力純化法找出與 <i>CaCdc4</i> 的相關性蛋白質-----	P.101
7. 建構以大腸桿菌 BL21 大量表現 6xHis-Tagged <i>CaCdc4</i> 重組蛋白質之 pET-29b(+)- <i>CaCDC4</i> 菌株-----	P.105
8. 建立最佳誘導攜帶 pET-29b(+)- <i>CaCDC4</i> 質體之大腸桿菌菌株 BL21 表現 <i>CaCdc4-6xHis</i> 重組蛋白質之條件-----	P.106
9. 利用 HIS-Select Nickel Affinity Gel 將大腸桿菌 BL21 所誘導大量表現的 <i>CaCdc4-6xHis</i> 進行純化並製備 <i>CaCdc4-6xHis-Ni-Resin</i> -----	P.109
10. <i>CaCdc4-6xHis-Ni-Resin</i> 與白色念珠菌 SC5314 之 Cell Lysates 進行細胞外蛋白質交互作用並運用親和力純化法找出與 <i>CaCdc4</i> 的相關性蛋白質-----	P.112
11. 藉由銀染呈現與 <i>CaCdc4</i> 相關的蛋白質分子量之 Pattern 來綜觀性分析於酵母菌和真性菌絲生長形態下細胞內與細胞外 <i>CaCdc4</i> 之相關性蛋白質-----	P.114
11.1 綜觀性比較與整合各個細胞內 Elution 的銀染結果-----	P.116
11.1.1 綜觀性分析與 <i>CaCdc4</i> 的 F box 和 WD40 domain 之相關性蛋白質分子量的銀染 Patterns-----	P.116
11.1.2 綜觀性分析與 <i>CaCdc4</i> 以及其 F box 和 WD40 domains 之相關性蛋白質分子量的銀染 Patterns-----	P.118
11.2 綜觀性比較與整合各個細胞內 Resin 的銀染結果-----	P.119
11.3 綜觀性分析運用細胞內和細胞外之蛋白質交互作用所找出與 <i>CaCdc4</i> 相關相關性蛋白質分子量的銀染 Patterns-----	P.121
討論-----	P.123
1. <i>CaCdc4</i> 於白色念珠菌中不為穩定存在的蛋白質-----	P.124

2. 藉由銀染所呈現的蛋白質分子量之 Patterns 來預測 <i>CaCdc4</i> 可能的機制與其相關性蛋白質-----	P.125
3. 無法建構出利用 <i>CaCDC4</i> 內生性 promoter 來啟動 <i>CaCdc4</i> 表現的 <i>CaCDC4-6HF-Sp</i> 菌株之探討-----	P.127
4. <i>CaCdc4-6HF</i> 重組蛋白質之 6xHis Epitope Tag 缺乏被抗體辨識以及 Ni Resin 純化的能力-----	P.128
5. 運用大腸桿菌 BL21 表現系統找到與 <i>CaCdc4</i> 相關性蛋白質的可能性與限制性-----	P.129
參考文獻-----	P.131
附錄-----	P.136
附錄一、藥品的製備-----	P.136
附錄二、藥品名稱與所購置之廠牌一覽表-----	P.145



表與圖次

表

表一、PCR 所使用之引子、作用條件及產物大小-----P.78

附圖

附圖一----- P.7

附圖二-----P.8

附圖三-----P.10

附圖四-----P.13

附圖五-----P.15

附圖六-----P.16

附圖七-----P.18

附圖八-----P.21

附圖九-----P.23

附圖十-----P.26

附圖十一-----P.34

附圖十二-----P.36

附圖十三-----P.37

附圖十四-----P.87

附圖十五-----P.89

圖

圖一、運用親和力蛋白質純化法找出與白色念珠菌 Cdc4 的相關性蛋白質之策略
與構想。-----P.73

圖二、建構不同表現量的 6xHis-FLAG-Tagged 重組蛋白質之白色念珠菌菌株。
-----P.74

圖三、CaCDC4-6HF-Sp (self promoter) 菌株的建構。-----P.77

圖四、利用 pCR2.1-TOPO 載體來保存 <i>CaCDC4-SFH-6HF</i> PCR-base integration cassette。	P.79
圖五、經過兩個世代的複印篩選，所得到可能為 <i>CaCDC4-6HF-Sp</i> 之 Ura ⁺ 轉形菌株。	P.80
圖六、 <i>CaCDC4-6HF-Ap</i> (<u>A</u> CT1 promoter) 菌株的建構。	P.82
圖七、p6HF-Act1- <i>CaCDC4</i> 質體的製備。	P.83
圖八、經過兩個世代的複印篩選，所得到可能為 <i>CaCDC4-6HF-Ap</i> 之 Ura ⁺ 轉形菌株。	P.85
圖九、利用酵母菌菌落聚合酶連鎖反應來確認所得到的 Ura ⁺ 轉形菌株為 <i>CaCDC4-6HF-Ap</i> 。	P.86
圖十、運用 TET-On System 來大量誘導 6xHis-FLAG-Tagged 重組蛋白質表現之原理與機制。	P.91
圖十一、以 Doxycycline 進行簡單的誘導 <i>TET-CaCDC4-6HF</i> 菌株表現 <i>CaCdc4-6HF</i> 重組蛋白質之測試。	P.92
圖十二、觀察運用 TET-On System 以及 <u>A</u> CT1 Promoter 所大量與持續性地表現 6xHis-FLAG-Tagged 重組蛋白質之情形以及各種重組蛋白質的表現情況。	P.94
圖十三、建立最佳誘導 <i>TET-CaCDC4-6HF</i> 菌株表現 <i>CaCdc4-6HF</i> 重組蛋白質之條件。	P.96
圖十四、 <i>CaCdc4-6HF</i> 重組蛋白質的 6xHis Epitope Tag 無法被 Anti-6xHis Tag 抗體所辨識。	P.98
圖十五、 <i>CaCdc4-F box-6HF</i> 與 <i>CaCdc4-WD40-6HF</i> 重組蛋白質的 6xHis Epitope Tag 可以被 Anti-6xHis Tag 抗體所辨識。	P.99
圖十六、 <i>CaCdc4-6HF</i> 重組蛋白質無法與 Nickel Resin 進行結合作用。	P.100
圖十七、同步誘導 <i>TET-CaCDC4-6HF</i> 菌株大量表現 <i>CaCdc4-6HF</i> 與酵母菌和真性菌絲形態的形成。	P.102

- 圖十八、以西方點墨法分析同時誘導 *CaCdc4-6HF* 的表現與酵母菌和真性菌絲形態形成之 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株並經過單一次親合力純化法的純化產物。-----P.103
- 圖十九、以西方點墨法分析已先誘導成酵母菌和真性菌絲形態形成後再誘導 6xHis-FLAG tagged 重組蛋白質表現之 *TET-CaCDC4-F box-6HF* 和 *TET-CaCDC4-WD40-6HF* 菌株並經過單一次親合力純化法的純化產物。-----P.104
- 圖二十、建立最佳誘導攜帶 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體之大腸桿菌菌株 BL21 表現 *CaCdc4-6xHis* 重組蛋白質之條件。-----P.107
- 圖二十一、建立最佳誘導攜帶 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體之大腸桿菌菌株 BL21 表現 *CaCdc4-6xHis* 重組蛋白質之條件。-----P.108
- 圖二十二、以 0.5 mM IPTG、25°C 處理 pET-29b(+)-*CaCDC4* 大腸桿菌菌株三個小時後，*CaCdc4-6xHis* 會在 cell lysates 的上清液與菌體殘骸的部份。-----P.110
- 圖二十三、利用 Nickel Affinity Gel 將大腸桿菌 BL21 所誘導大量表現的 *CaCdc4-6xHis* 進行純化並製備出 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin*。-----P.111
- 圖二十四、誘導白色念珠菌 SC5314 之酵母菌與真性菌絲生長形態的生成。-----P.113
- 圖二十五、*CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 與白色念珠菌 SC5314 之 Cell Lysates 進行細胞外蛋白質交互作用並運用親和力純化法找出與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質。-----P.115
- 圖二十六、以細胞內蛋白質交互作用及單一次親合力純化之 elution 部分以銀染 pattern 差異找出 *CaCdc4* 的相關性蛋白質-----P.117
- 圖二十七、運用細胞內蛋白質交互作用及單一次親合力純化之 resin 部分以銀染 pattern 差異找出與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質。-----P.120

中文摘要

白色念珠菌(*Candida albicans*)為人類的伺機性真菌病菌，是最常導致人類黏膜表皮層以及全身性感染之真菌。在免疫系統缺陷或低下的病人當中，白色念珠菌會造成嚴重的全身性感染，而導致病人的死亡。由於白色念珠菌在自然界中是以雙倍體的形式存在，且沒有完整的有性生殖之形式，所以這將提高了白色念珠菌在分子遺傳研究上的困難度。白色念珠菌是一種多形態的真菌，可以以酵母菌、假性菌絲，以及真性菌絲的形式生長。而這樣多樣性生長形式的轉換，與其致病力有關。出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) Cdc4 屬於 F box 蛋白質家族，是 Skp1-Cdc53/Cullin-F box (SCF) 泛素接合酶複合體的成員之一，在有絲分裂細胞週期 G1 到 S 時期的轉移上扮演著重要的角色，而此功能在演化上是高度保留的。白色念珠菌的 *CDC4* (*CaCDC4*)和出芽酵母菌的 *CDC4* (*ScCDC4*)雖具有結構上的同源性，但相較於 *ScCDC4* 於出芽酵母菌中為必要性的基因，*CaCDC4* 於白色念珠菌中並非必要的基因。此外，當 *CaCDC4* 失去或剔除時，會促使白色念珠菌菌絲形態的形成，暗示著透過 *CaCdc4* 泛素媒介蛋白質的降解機制與調控白色念珠菌的形態轉變可能是有關聯的。因此，為了證明此關聯性，在這次的研究當中，我致力於運用親和力蛋白質純化的方式，以抗原決定基標記的 *CaCdc4* 於純化 *CaCdc4* 的同時將其相關性的蛋白質純化出來。我分別以體外及體內的方式進行單次親和力的純化。在體外純化部份，抗原決定基所標記的 *CaCdc4* 於細菌大量表現並純化後，會與酵母菌或真性菌絲生長形式的細胞裂解液於體外進行蛋白質交互作用後，純化 *CaCdc4*，而其相關性蛋白質可隨之純化；而在體內純化部份，白色念珠菌品系誘發成酵母菌或真性菌絲，且於體內經四環素誘導表達抗原決定基所標記的全長 *CaCdc4*，以及其 F box 與 WD40 repeats 的蛋白質後，於親和力純化蛋白質時，將其相關的蛋白質一併純化。接著，利用 SDS-PAGE 分離純化之 *CaCdc4* 及相關性蛋白質，經由銀染分析，則體外及體內，酵母菌及真性菌絲生長形式，或不同 *CaCdc4* 結構域之間被純化出蛋白質的差異可以被顯

現出來。未來，將進一步以質譜儀分析此類蛋白質，分析其身分及對應基因，並經過特性分析，將可解析 *CaCDC4* 在形態生成上所扮演的角色。



Abstract

Candida albicans is an opportunistic fungal pathogen in humans, causing either systemic or mucosal infection. In immunocompromised patients, this organism can progress to severe systemic infection, leading to life-threatening circumstances. Because *Candida albicans* is a diploid genome organism without complete sexual cycle, the molecular genetic analysis of this organism has always been limited. *Candida albicans* is a polymorphic fungus with three major growth forms, the yeast form, pseudohyphal and hyphal forms. The morphological transition has been strongly associated with pathogenicity. *Saccharomyces cerevisiae* Cdc4 belonging to F box protein family, is a member of Skp1-Cdc53/Cullin-F box (SCF) ubiquitin E3 ligase. It plays an important role in progressing from G1 to S phase of the cell cycle, which is highly conserved throughout evolution. Whereas *ScCDC4* is an essential gene, *CaCDC4* is not essential. In addition, loss of *CaCDC4* causes hyperfilamentation of *Candida albicans*, suggesting that SCF^{CaCdc4} ubiquitin-mediated protein degradation mechanism is associated with *Candida albicans* morphogenesis. To verify such a mechanism, in the current study, I aimed to establish the method of affinity purification of epitope-tagged *CaCdc4* protein that allows co-purification of its associated proteins. Approaches of one step affinity purification by both *in vitro* and *in vivo* were adopted. In the *in vitro* approach, the epitope-tagged *CaCdc4* overexpressed in *E. coli* were purified and incubated with cell lysates of either yeast or hyphae, and the *CaCdc4* associated proteins were co-purified along with *CaCdc4*. In the *in vivo* approach, the epitope-tagged protein domains of either full-length *CaCdc4*, F box, or WD40 repeats, were doxycycline induced in *C. albicans* cells of either yeast or hyphae, and the proteins with their associated proteins were affinity purified. The purified proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by silver

staining. Differences of the purified proteins between *in vitro* and *in vivo*, between yeast and hyphae, and among domains of *CaCdc4* were identified. Further analysis of the identity of the proteins by mass spectrometry and characterization of their corresponding genes will facilitate elucidation of the role of *CaCdc4* in morphogenesis.



序論

1. 白色念珠菌

1.1 白色念珠菌與疾病

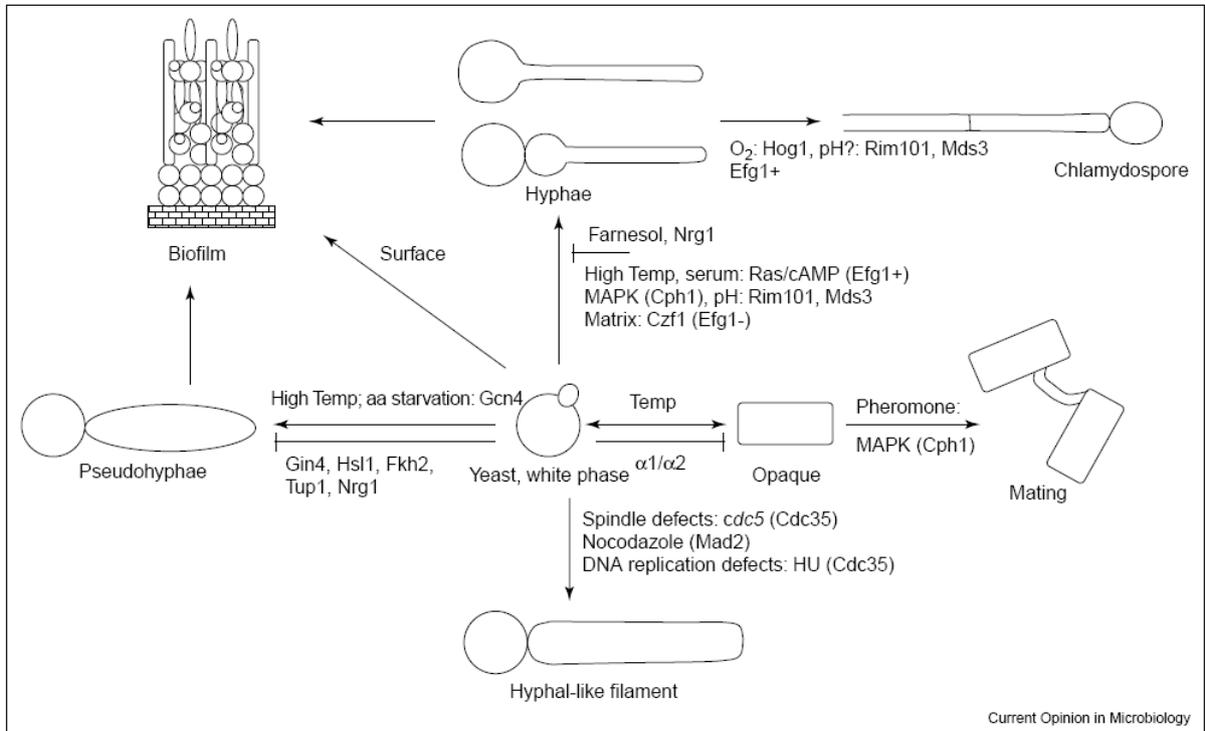
白色念珠菌(*Candida albicans*)是一種真菌，在許多的環境中皆可以被分離出來，如大氣中，土壤中等，但其主要的生長環境是以哺乳類動物為主，且以人類為最主要(Cannon et al., 2007)。白色念珠菌主要分佈在人體腸胃道和泌尿生殖道的黏膜表皮層上，是正常的共生菌種，但也是最常導致人類皮膚表層和全身性感染的真菌病菌。在免疫系統不足或是缺損的病人當中，像是患有後天免疫缺乏症候群(AIDS)的病人、接受化學治療的癌症病人，以及執行器官移植的病人等等，常常會造成嚴重的念珠菌症(candidiasis)以及致死的現象(Odds, 1994)。近數十年來，念珠菌類(*Candida species*)所造成的念珠菌菌血症(candidemia)之感染率在世界各個醫院中，皆有明顯逐年上升的趨勢，而其中又以白色念珠菌為最主要的感染病原(Beck-Sague and Jarvis, 1993; Cheng et al., 2005; Fridkin and Jarvis, 1996)。雖然近年來已有許多抗真菌類的藥物被發展出來，像是 fluorinated pyrimidine analogue 5-fluoro-cytosine (5-FC)、polyenes (如 amphotericin B 和 nystatin)、azole antifungals (如 triazole 和 fluconazole)，以及 echinocandins 等，都有很好的抑制真菌病菌之效果；但隨著藥物的濫用，真菌病菌的抗藥性也隨之產生，這對人類的健康將會帶來很嚴重的衝擊與危機(Cannon et al., 2007; Ghannoum and Rice, 1999)。另外，白色念珠菌以及其他的真菌病菌為真核生物，則意味著其所擁有的生物機制和人類細胞的生物機制會有許多相似之處，而這樣擁有相類似的生物機制，將複雜了抗真菌藥物的開發；但近年來，許多研究者發現許多小片段的胜肽鍊(如 NPF domain，其胺基酸序列為 VLTNENPFSDP)，可以作為攜帶者，將抗真菌藥物給專一性地送到真菌病菌中，以減少抗真菌藥物對人體所造成的傷害(Su et al., 2007)。白色念珠菌所造成的疾病，不僅僅會造成嚴重的死亡率，也會延長住院的時間，以及增

加龐大的醫療費用(Cheng et al., 2005)。因此，對於白色念珠菌致病機轉的探討，不僅是在醫療上或是經濟各層面上都顯得相當重要。

1.2 白色念珠菌的生長形態與致病力

白色念珠菌具有相當大的外表形可塑性，會因為外在環境的不同而有不同的生長形態(附圖一和二) (Whiteway and Oberholzer, 2004)。其生長形態主要具有三種形式，分別為酵母菌生長形式(yeast growth form)或稱出芽孢子(blastospore)，真性菌絲生長形式(hyphal growth form)，以及介於兩者之間的假性菌絲生長形式(pseudohyphal growth form) (附圖二 A B C) (Berman and Sudbery, 2002; Whiteway and Oberholzer, 2004)。酵母菌生長形式的細胞，其外表形是呈現圓形至卵圓狀，且可以以出芽生殖的方式來繁衍子代(Berman and Sudbery, 2002; Whiteway and Oberholzer, 2004)。相較於酵母菌形式，真性菌絲的形成，需要有生殖管(germ tube)的生成，而生殖管就像未分離母體的芽體一般，且隨著外在環境的需要，生殖管將會延長生長，以形成真性菌絲；真性菌絲為高度極性化的細胞，其外表形是呈現平滑且沒有收縮狀的菌絲體(附圖二 C)，而在菌絲體中會有隔膜(septae)將各個細胞給分隔開來(Berman and Sudbery, 2002; Whiteway and Oberholzer, 2004)。假性菌絲形式的細胞，其外表形就像是由許多較瘦長與橢圓狀的酵母菌細胞所構成的，且細胞彼此之間是互相連接的；相較於真性菌絲，其細胞與細胞之間會有收縮的現象，而且會有分支生長的情形(附圖二 B) (Berman and Sudbery, 2002; Whiteway and Oberholzer, 2004)。除了這三種主要的生長形態外，白色念珠菌還具有交配時期的 white cells 與 opaque cells，和當外在環境不佳時所形成的厚膜孢子(chlamydo spores)，以及由各種形態細胞所聚集和自身所產生的保護與黏著基質而構成的生物膜(biofilms) (附圖一) (Whiteway and Oberholzer, 2004)。White cells 為典型的酵母菌生長形式的細胞，而 opaque cells 的外形是不對稱、瘦長狀，且細胞的表面

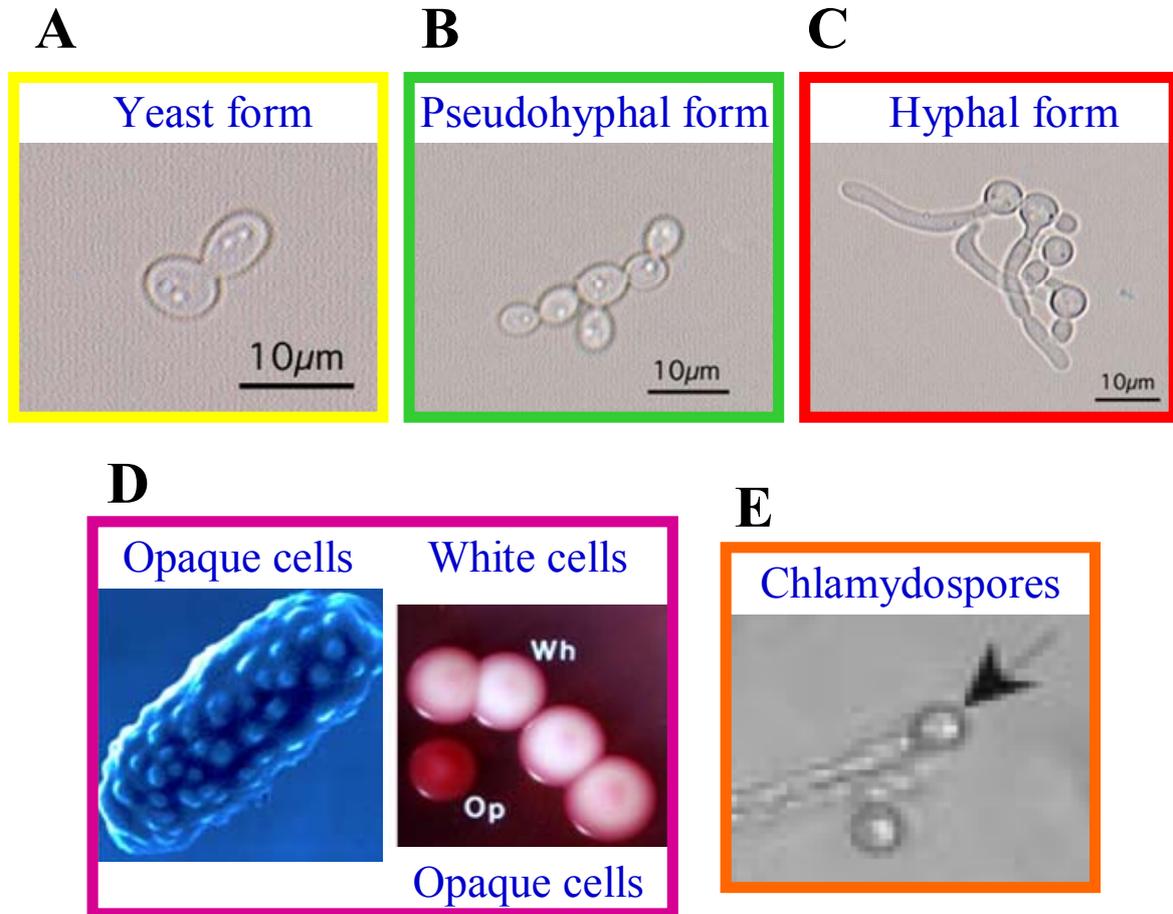
附圖一



白色念珠菌具有相當大的外表形可塑性，會因為外在環境的不同而誘導出不同的生長形態。其主要具有酵母菌、假性菌絲和真性菌絲三種生長形式；與交配有關的 white cells 與 opaque cells；和當外在環境不佳時，所形成的厚膜孢子；以及由各種形態細胞所聚集和自身所產生的保護與黏著基質而構成的生物膜。

資料來源：(Whiteway and Oberholzer, 2004)。

附圖二



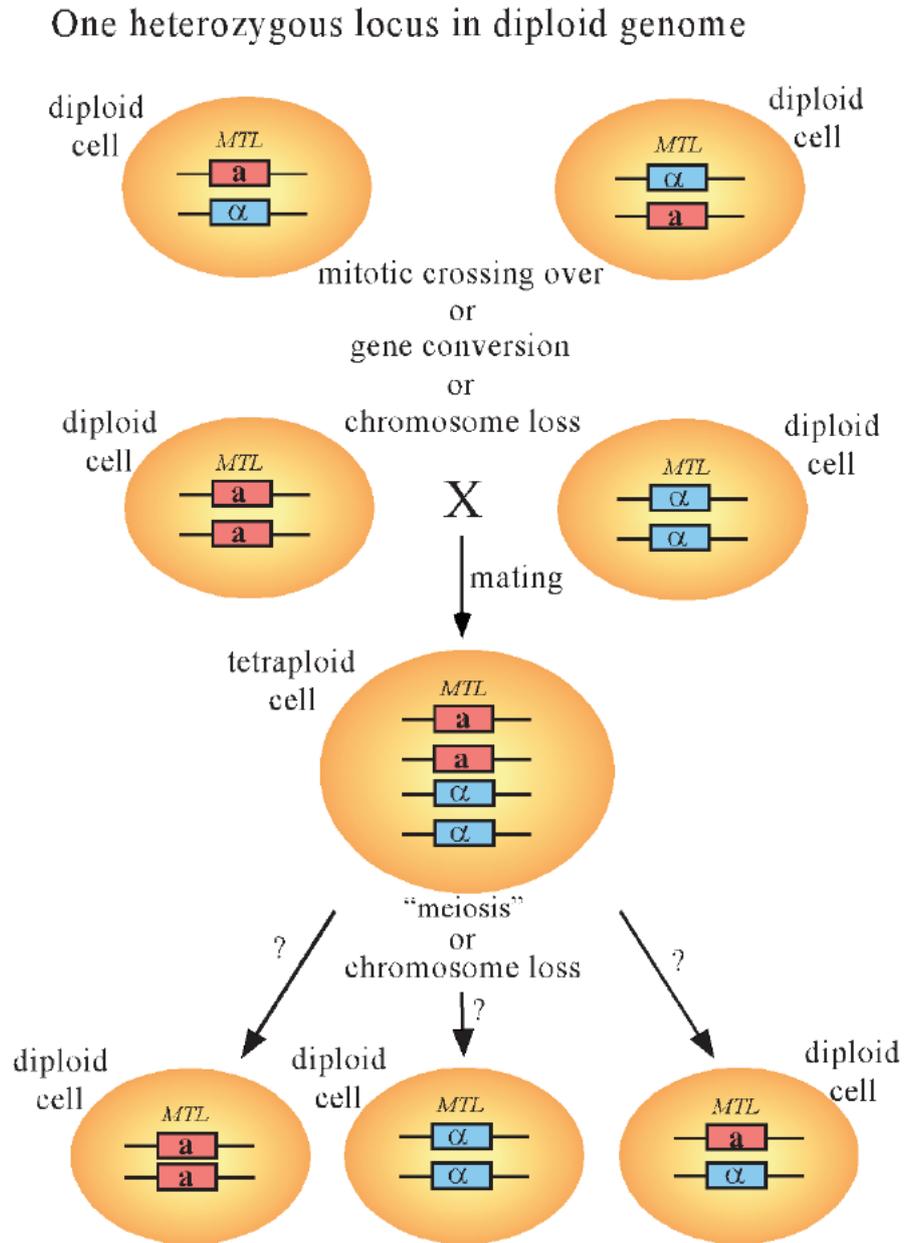
白色念珠菌是為多形態的真菌類：**A.** 酵母菌生長形式的細胞，其外表形是呈現圓形至卵圓狀，且可以以出芽生殖的方式來繁衍子代。**B.** 假性菌絲生長形式的細胞，像是由許多較瘦長與橢圓狀的酵母菌細胞所構成，且細胞彼此之間是互相連接的，並有收縮的現象，而且通常會以分支的形式進行生長。**C.** 真性菌絲為高度極性化的細胞，其外表形是呈現平滑狀，但沒有如假性菌絲般的收縮狀。**D.** Opaque cells 相較於 white cells 是較為瘦長，且細胞的表面是呈現粗糙與滿是凹坑狀；opaque cells 所形成的菌落顏色也較 white cells 來得深。**E.** 為厚膜孢子。

資料來源：**A.B.C.** 圖摘自 Wikipedia web site；**D.** 圖摘自 Broad institute-*Candida* Database web site；**E.** 圖來源為(Umeyama et al., 2006)。

是呈現粗糙與滿是凹坑狀(附圖二 D 的左圖) (Anderson et al., 1990; Whiteway and Oberholzer, 2004)；當白色念珠菌要進行交配時，其細胞會由 a/a 異型合子的 white cells，經由 mitotic crossing over、gene conversion 或是 chromosome loss 而轉變成 a/a 或是 α/α 同型合子的 opaque cells，接著 a/a 同型合子的 opaque cells 會和 α/α 同型合子的 opaque cells 互相吸引，進而交配成四倍體的接合子 (zygote)，但接下來四倍體的接合子是如何再形成二倍體的酵母菌形式的細胞，其機制目前還不是很清楚(附圖三) (Soll et al., 2003)。厚膜孢子(chlamydozoospores) 為另一種不同功能的白色念珠菌生長形式，當白色念珠菌所面臨的環境很嚴苛時，如乾燥與酷熱，其會形成厚膜孢子以幫助白色念珠菌渡過苛刻的時期 (Whiteway and Oberholzer, 2004) (Wikipedia)，且厚膜孢子是由真性菌絲或假性菌絲的支持細胞(suspensor cells)所發展而來的(Sonneborn et al., 1999)。微生物是否能長期存活，通常取決於其固著宿主細胞與形成生物膜的能力；而生物膜的形成將會表現出不一樣的功能與生物特徵(Lamfon et al., 2004)。不僅細菌所形成的生物膜會產生較高的毒性與抗藥性，在白色念珠菌中也發現其生物膜的形成也和抗藥性是有關係的(Baillie and Douglas, 2000; Lamfon et al., 2004)。

白色念珠菌多樣性的生長形態和其致病力是相關的(Whiteway and Oberholzer, 2004)。生物膜的形成可以提高白色念珠菌的毒性與抗藥性(Baillie and Douglas, 2000; Lamfon et al., 2004)；而隨著不同的感染環境，white cells或是opaque cells對於白色念珠菌毒性的產生，也是扮演著很重要的角色(Kvaal et al., 1999)。但許多有關白色念珠菌致病力的研究，主要會是以白色念珠菌由酵母菌的形式轉變為真性菌絲的能力為主(Whiteway and Oberholzer, 2004)，可能是因為菌絲形態的白色念珠菌容易侵入宿主的黏膜表皮層，進而導致疾病的發生所致(Lo et al., 1997; Rocha et al., 2001)。可是也有許多白色念珠菌的突變株，其仍然保有正常真性菌絲形成的功能，但其致病的能力反而是降低的(Gacser et al., 2007; Umeyama et al., 2005)。綜合這些的研究與文獻將告訴我們，白色念珠菌多樣性的生長形態和其致病力的關係是多方面的，不單單只有酵母菌轉變為

附圖三



當白色念珠菌要進行交配時，會由 *a/\alpha* 異型合子的 white cells，經由 mitotic crossing over、gene conversion 或是 chromosome loss 而轉變成 *a/a* 或是 α/α 同型合子的 opaque cells，以進而形成四倍體的接合子；但接下來四倍體的接合子是如何再形成二倍體的酵母菌形式的細胞，其機制目前還不是很清楚。

資料來源：(Soll et al., 2003)。

菌絲形態的能力；不同的環境與情況，所需要的生長形態是不一樣的，或許全身性的感染與散佈是需要靠酵母菌的生長形式，而或許即使白色念珠菌仍具有真性菌絲的形成能力，但如果缺乏了分泌蛋白質水解酶、或是缺乏了固著宿主細胞的能力等等，也都可能將會使白色念珠菌失去或是降低致病的能力(Gacser et al., 2007; Umeyama et al., 2005)。所以白色念珠菌的每一種生長形態，在不同的環境與功能需求下，都將會是致病力的關鍵。

1.3 白色念珠菌的形態誘導

白色念珠菌會因為外在環境的不同與基因的調控，而誘導出各式各樣不同的生長形態(Berman and Sudbery, 2002)。且已有許多的外在環境因子被證實出可以誘導特定形態的白色念珠菌形成(Berman and Sudbery, 2002; Sonneborn et al., 1999)，所以可以藉由這些外在環境因子來誘導特定的形態形成，進而可以對各種生長形態的機制做更深入的探討與研究。以下將對白色念珠菌各種生長形態的誘導所需的外在環境因子，以及目前已知的基因調控機制，做一個簡單的整理與介紹：

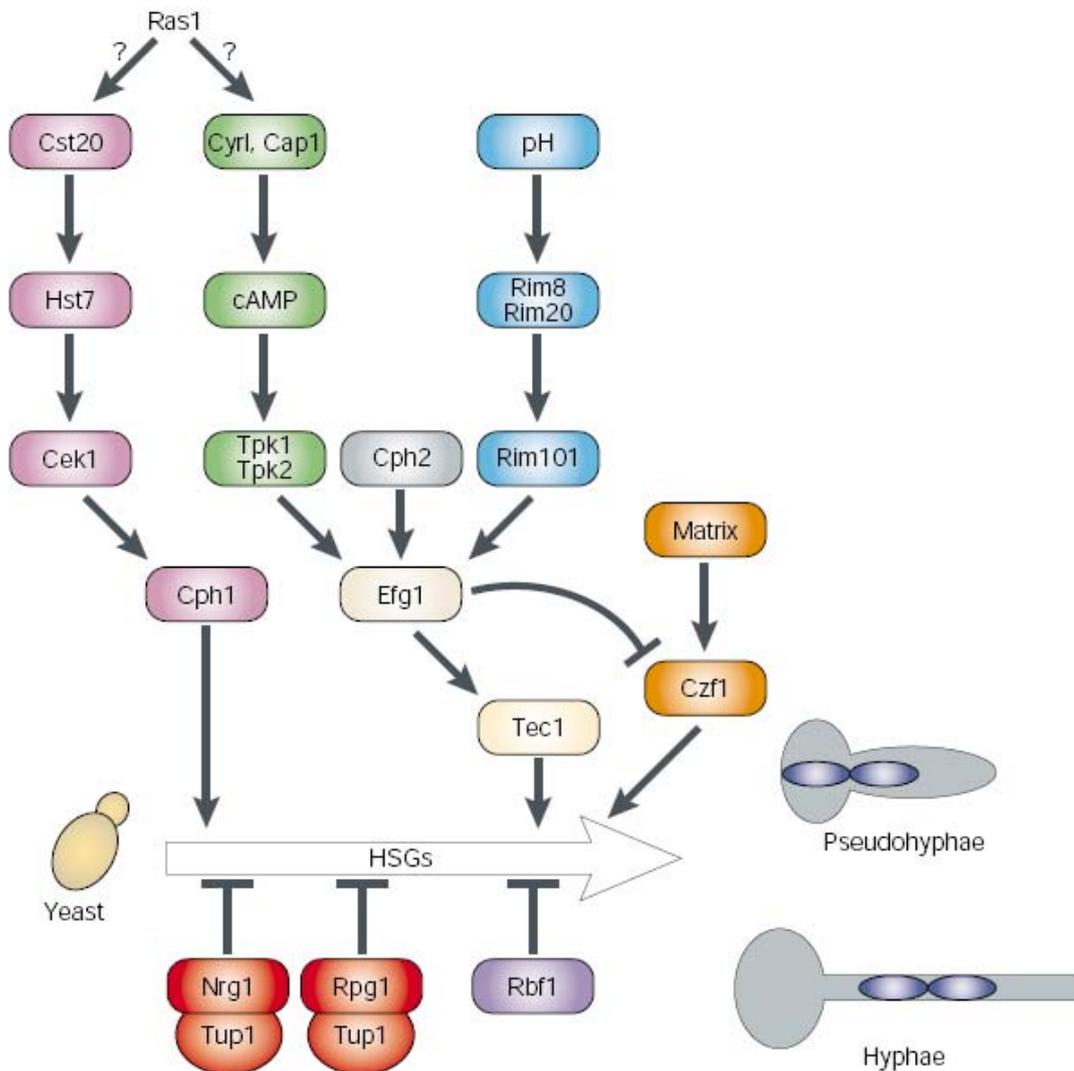
1.3.1 酵母菌、假性菌絲以及真性菌絲的形態誘導

誘導白色念珠菌酵母菌形態的形成，所需的外在環境因子與誘導條件有：細胞的密度需大於 10^6 cells ml⁻¹；在YPD的培養液下，其生長的溫度為30°C，而在Lee's培養液中，其生長的溫度為25°C；pH值需介於4.0~5.6之間(Berman and Sudbery, 2002; Kaneko et al., 2004; Su et al., 2007; Umeyama et al., 2006)。假性菌絲生長形態的誘導條件有：培養的溫度為35°C以及pH值需為6.0(Berman and Sudbery, 2002)；或是可以利用胺基酸的飢餓方式，如利用histidine的類似物3-aminotriazole (3AT) (Tripathi et al., 2002)，或是以synthetic low ammonia dextrose/SLAD media進行培養(Berman and Sudbery, 2002)，來誘導假

性菌絲的生成。真性菌絲形態生成的誘導條件有：可利用血清(serum)以及在溫度高於34°C的培養條件；或利用Lee's培養液，在37°C的培養環境中；或是於pH值為7.0~7.2，培養的溫度為37°C的條件下，來誘導白色念珠菌真性菌絲的形成(Berman and Sudbery, 2002; Kaneko et al., 2004; Su et al., 2007; Umeyama et al., 2006)。另外，還有其他的環境因子可以促使菌絲形態(filament)(由於此些誘導的條件並沒有專一性的僅誘導假性菌絲或真性菌絲形態，而是兩種菌絲形態都會被誘導，所以以菌絲形態來表示假性和真性菌絲)的生成：Spider培養液、巨噬細胞的吞噬作用、老鼠的腎臟器官、生長於瓊脂的基質上、生長於缺乏鐵元素或是缺氧(anoxia)的環境中，或是利用*n*-acetyl glucosamine來誘導菌絲形成的方式(Berman and Sudbery, 2002)。

HSGs (Hyphal-specific genes)是一群誘導白色念珠菌由酵母菌轉變成菌絲生長形態(假性或真性菌絲)的基因(Berman and Sudbery, 2002)。HSGs會藉由不同的訊息傳遞路徑來調控其基因的表現，以進而誘導菌絲形態的生成與否(附圖四)(Berman and Sudbery, 2002)。當外在環境營養缺乏(starvation)或是有血清(serum)的存在時，白色念珠菌會透過MAPK (mitogen-activated protein kinase)和Ras-cAMP路徑來活化HSGs，進而誘導菌絲形態的生成(Berman and Sudbery, 2002; Tripathi et al., 2002)。其中MAPK和Ras-cAMP路徑分別是透過Cph1和Efg1轉錄因子的活化；許多的研究也發現，*cph1/cph1*和*efg1/efg1*的白色念珠菌突變株，在許多的環境誘導下將失去了酵母菌轉變成真性菌絲的能力(Berman and Sudbery, 2002; Tripathi et al., 2002)。這將顯示大部分外在環境誘導菌絲生成的因子是透過MAPK和Ras-cAMP路徑(Berman and Sudbery, 2002; Tripathi et al., 2002)。另外還有屬於Ras-cAMP路徑的Prr2/CaRim101-dependent和Cph2訊息傳遞路徑，前者是透過周遭的pH值所調控；屬於MAPK路徑的Czf1訊息路徑，其是藉由固態培養基的生長環境，來誘導菌絲的生長；以及抑制菌絲形態生長的訊息傳遞路徑，Tup1-Nrg1-Rpg1和Rbf1路徑(Berman and Sudbery, 2002; Tripathi et al., 2002)。而藉由白色念珠

附圖四



HSGs (hyphal-specific genes)是一群誘導白色念珠菌由酵母菌轉變成菌絲生長形態的基因，會藉由不同的訊息傳遞路徑來調控其基因的表現，以進而誘導菌絲形態的生成與否。MAPK (粉紅色標示)、cAMP (綠色標示)、Cph2 (灰色標示)、Rim101 pH response(藍色標示)和 Czf1 matrix (橘色標示)訊息傳遞路徑等，是啟動白色念珠菌由酵母菌轉變成菌絲生長形態的路徑；而 Tup-Nrg1-Rpg1 (紅色標示)和 Rbf1 (紫色標示)訊息傳遞路徑，則是為抑制白色念珠菌菌絲形態生成的路徑。

資料來源：(Berman and Sudbery, 2002)。

菌對胺基酸飢餓的探討，也發現 Gcn4 在胺基酸缺乏的情形下，不但可以促進胺基酸的合成機制，也可以透過對 Ras-cAMP 路徑進行調控，以專一性地誘導假性菌絲的生成(Tripathi et al., 2002)。

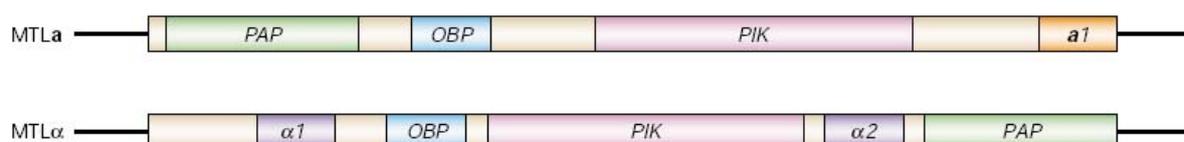
1.3.2 White cells 與 Opaque cells 的形態誘導

大部分的白色念珠菌菌株，如 CAI4 和 SC5314，其不具有 white cells 轉變為 opaque cells 的能力；只有少部份的白色念珠菌菌株，如 WO-1，具有較佳的轉變能力(Miller and Johnson, 2002)。當白色念珠菌轉變為 opaque cells 時，其進行交配的效率將是 white cells 的 10^6 倍(Miller and Johnson, 2002)。而這樣的 white cells 轉變為 opaque cells 的形態誘導，主要是透過 mating-type-like (*MTL*) locus 來調控(附圖五) (Berman and Sudbery, 2002; Miller and Johnson, 2002; Soll et al., 2003)。當白色念珠菌的 *MTL* locus 為 *MTLa/MTL α* 時，*MTLa* 上的 *a1* 基因會轉譯出 Mtl α 1 homeodomain 蛋白質，而 *MTL α* 上的 *a2* 基因會轉譯出 Mtl α 2 homeodomain 蛋白質，此兩種 homeodomain 蛋白質可能會藉由形成 Mtl α 1-Mtl α 2 heterodimer，進而去抑制 white cells 轉變成為 opaque cells 與交配的能力(附圖六) (Berman and Sudbery, 2002; Miller and Johnson, 2002; Soll et al., 2003)。而當白色念珠菌的 *MTL* locus 為 *MTLa/MTLa* 或是 *MTL α /MTL α* 時，前者由於缺乏 Mtl α 2 homeodomain 蛋白質，後者缺乏 Mtl α 1 homeodomain 蛋白質，皆無法形成 Mtl α 1-Mtl α 2 heterodimer，所以可以進行 white cells 轉變為 opaque cells 與交配的作用(附圖六) (Berman and Sudbery, 2002; Miller and Johnson, 2002; Soll et al., 2003)。

1.3.3 厚膜孢子(Chlamydospores)的形態誘導

厚膜孢子形態形成的誘導條件有：白色念珠菌需培養在低細胞密度與營養缺乏的培養液中，而此培養液可以選擇性的加入清潔劑，如 Tween 80，並

附圖五

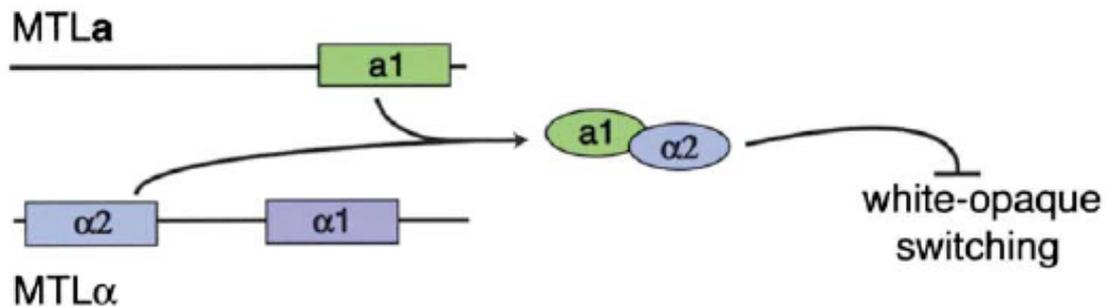


白色念珠菌 mating-type-like (*MTL*) loci 的結構。 *MTL α* 上的 *a1* 基因會轉譯出 Mtl $\alpha 1$ homeodomain 蛋白質，而 *MTL α* 上的 *a2* 基因會轉譯出 Mtl $\alpha 2$ homeodomain 蛋白質，與 *a1* 基因會轉譯出轉錄調節者 Mtl $\alpha 1$ 。每一種 *MTL* loci 皆會轉譯出 poly(A) polymerase (PAP)、phosphatidyl inositol kinase (PIK) 和序列與 oxysterol binding proteins (OBP) 相似的蛋白質。

資料來源：(Berman and Sudbery, 2002)。

附圖六

A



B

Cell Type	Behavior
a/α	no white-opaque switching no mating
a	white-opaque switching mates as an a
α	white-opaque switching mates as an α

透過 *MTL* locus 來調控白色念珠菌 white-opaque cells 的轉換，以及 *MTL* locus 在白色念珠菌的交配上所扮演的角色。**A.** 當白色念珠菌的 *MTL* locus 為 *MTLa/MTL α* 時，*MTLa* 上的 *a1* 基因會轉譯出 Mtl $\alpha 1$ homeodomain 蛋白質，而 *MTL α* 上的 $\alpha 2$ 基因會轉譯出 Mtl $\alpha 2$ homeodomain 蛋白質，此兩種 homeodomain 蛋白質可能會藉由形成 Mtl $\alpha 1$ -Mtl $\alpha 2$ heterdimer，進而去抑制 white cells 轉變成為 opaque cells 與交配的能力。**B.** 為 *MTL* locus 於白色念珠菌的交配上所扮演的角色。

資料來源：(Miller and Johnson, 2002)。

於 25°C~30°C 中培養幾天，即可有效的誘導厚膜孢子的形成(Joshi et al., 1993; Montazeri and Hedrick, 1984; Sonneborn et al., 1999)。或是將細胞培養在固態培養基上，與玻璃蓋玻片的下方，以於微氧的環境中誘導成厚膜孢子(Dalmau inoculation technique)。含有 cornmeal 的培養基可以誘導厚膜孢子的生成(Umeyama et al., 2006)。在 glucose 的存在下，會抑制厚膜孢子的形成，但氮源的缺乏與否並沒有很大的影響，所以需在缺乏 glucose 的環境下來誘導厚膜孢子的形成(Montazeri and Hedrick, 1984)。另外，光源也會抑制掉厚膜孢子的生成，所以在黑暗中可以有效的誘導厚膜孢子的生成(Montazeri and Hedrick, 1984)。

ISW2、*MDS3*、*RIM13*、*RIM101*、*SCH9* 和 *SUV3*，此六個基因是有效形成厚膜孢子所需的基因(Nobile et al., 2003)。當 *ISW2*、*SCH9* 和 *SUV3* 產生突變時，白色念珠菌將會完全失去形成厚膜孢子的能力；而當 *RIM13*、*RIM101* 和 *MDS3* 產生突變時，白色念珠菌將會延遲厚膜孢子的形成(Nobile et al., 2003)。另外，Ras-cAMP 訊息傳遞路徑的 Efg1 轉錄因子和 MAP kinase Hog1，也是白色念珠菌形成厚膜孢子所必須的，但其機制目前還不是很清楚(Montazeri and Hedrick, 1984; Nobile et al., 2003)。

1.4 白色念珠菌的生物特性

由於出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)在研究的領域中，已有完整的分析方法和深入的了解，且白色念珠菌和出芽酵母菌在子囊菌屬上的親緣關係相較於其他真菌類是很相近的，約在一億四千萬至八億四千一百萬年前分歧演化而成(附圖七)(Heckman et al., 2001)。所以對於白色念珠菌的研究，如細胞週期進行、訊息傳遞、交配、代謝作用，以及細胞壁合成之探討的角度和觀點，會基於出芽酵母菌的研究方法和已知的基因功能來進行探討與推論(Berman and Sudbery, 2002)。雖然有許多機制在這兩種生物中有許多的相似性，但仍有許多

附圖七

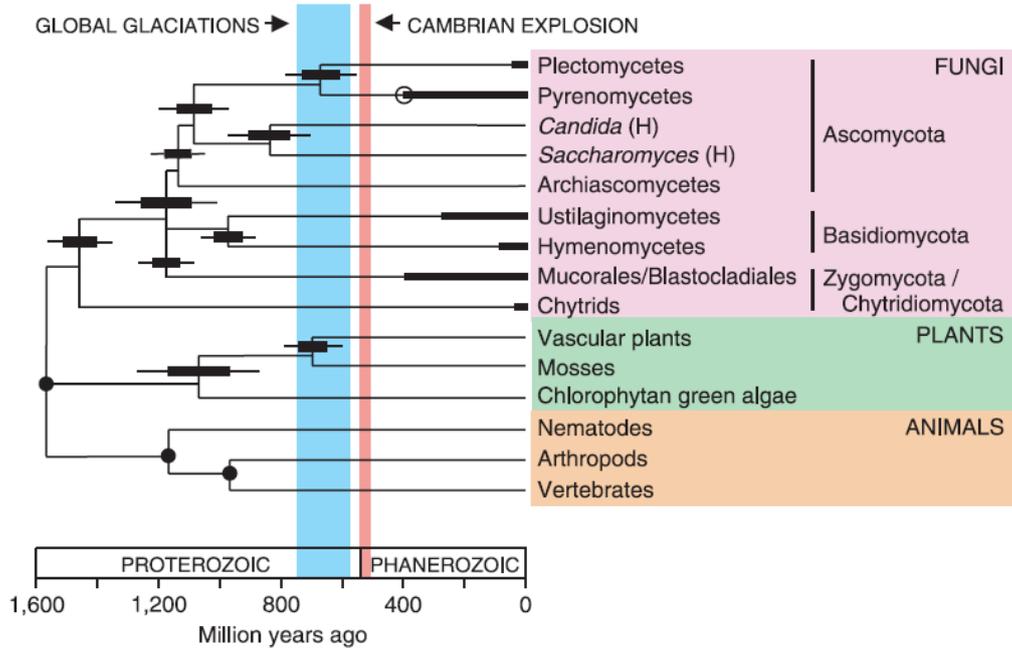


Fig. 3. Divergence time estimates for major groups of fungi, plants, and animals (Table 1). Thick horizontal bars at branch points are ± 1 SE; narrow bars delimit 95% confidence intervals; thick bars on branches denote fossil record of fungi; solid circles are calibration points; open circle is internal (fungal) fossil constraint. H, Hemiascomycetes. The branching order of three groups (Ascomycota, Basidiomycota, Mucorales/Blastocladales) is shown as unresolved for topological consistency. On the basis of branching order from other data (11, 12), glomalean fungi diverged after chytrids and before the basidiomycotan/ascomycotan divergence, ~1400 to 1200 Ma.

白色念珠菌和出芽酵母菌在子囊菌屬上的親緣關係相較於其他真菌類是很相近的，約在一億四千萬至八億四千一百萬年前分歧演化而成。

資料來源：(Heckman et al., 2001)。

相異處是白色念珠菌特有的生物特性，如白色念珠菌特有的真性菌絲和厚膜孢子生長形態等(Berman and Sudbery, 2002)。這些白色念珠菌的特異性，可以幫助其在哺乳類宿主上的生存、生長與散佈(Berman and Sudbery, 2002)。所以針對白色念珠菌的特異性，將會獨立出來討論，而比較少會以出芽酵母菌的觀點進行推測與探討(Berman and Sudbery, 2002)。除此之外，白色念珠菌的一些生物特性，也將提高了其對分子機制研究上的困難度。由於白色念珠菌在自然界中是以雙倍體的形式存在，且沒有完整的有性生殖以形成單倍體的配子；所以對於白色念珠菌在遺傳上的改造，會比出芽酵母菌來得繁複與困難(Berman and Sudbery, 2002)。另外，白色念珠菌的密碼子使用也有所不同，其 CUG 密碼子將轉譯為 serine 而不是通用的 leucine，這將導致許多基因標誌無法直接運用在白色念珠菌上，而需先經過修改方能使用，所以這也將提高白色念珠菌在分子機制研究上的困難度(Santos and Tuite, 1995)。但隨著 Stanford DNA Sequencing and Technology Center 和 Broad Institute of MIT and Harvard，分別完成了對白色念珠菌 SC5314 (Jones et al., 2004)和 WO-1 (*Candida* Database, Broad Insistute)的基因體定序，以及 *Candida albicans* Genome Information web site，和 European *Candida* Database (*Candida* DB) web site，以及 *Candida* Genome Database web site 的建立等，將提供許多新的資訊和幫助於白色念珠菌的研究上。

2. SCF (Skp1-Cdc53/Cullin-F box) Complexes

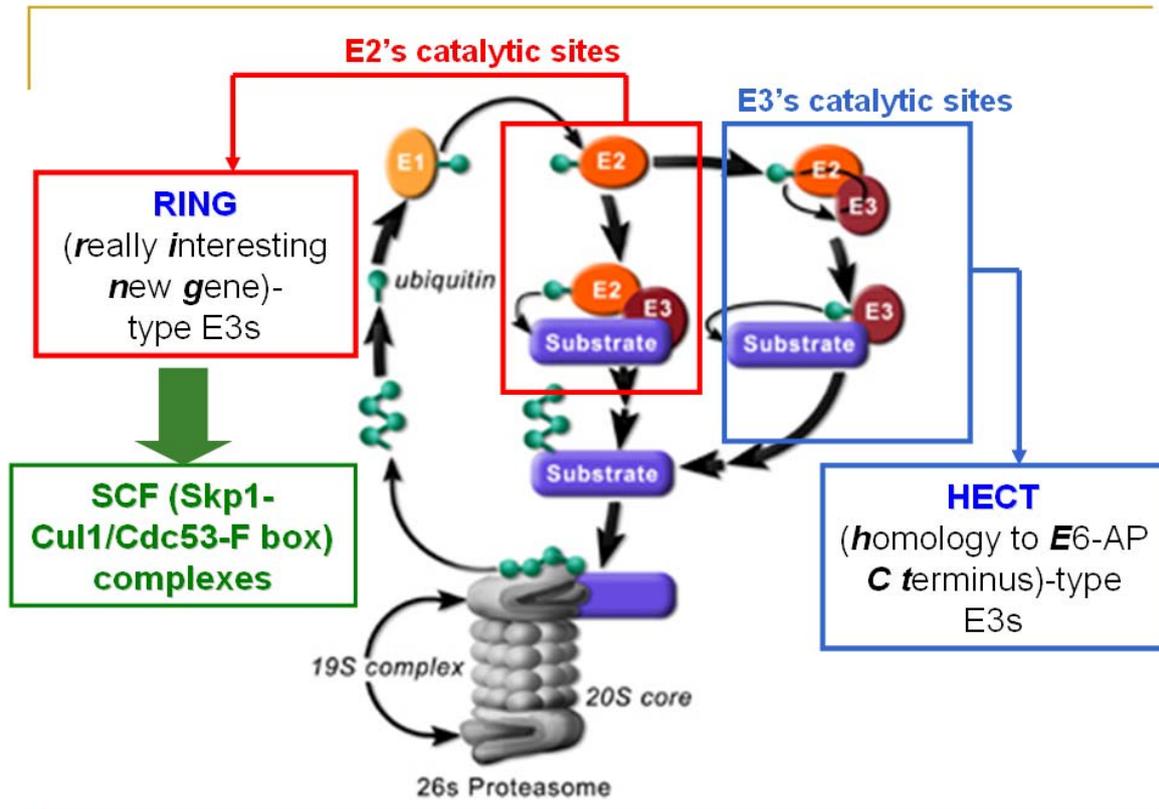
2.1 The Ubiquitin System

Ubiquitin 的蛋白質轉譯後修飾，在真核細胞中扮演著很重要的調控機制(Scaglione et al., 2007)。訊息的傳遞、細胞週期的進行、細胞的分化過程，以及面對外在環境壓力的反應機制等等，大部分都需要靠 ubiquitin system 來調節(Scaglione et al., 2007)。其修飾後的調節蛋白質主要具有兩種調節方式，為與蛋白質水解有關和與蛋白質水解無關的調控方式；前者是藉由對蛋白質的分解來

達到對細胞的調控，後者則是藉由 ubiquitin 的修飾來改變蛋白質本身的結構與活性，以達到對細胞的調節(Pickart and Eddins, 2004; Scaglione et al., 2007)。Ubiquitin 的轉移主要是透過 E1 (ubiquitin-activating enzyme)，E2 (ubiquitin-conjugating enzyme)和 E3 (ubiquitin ligase)來執行(Pickart and Eddins, 2004; Scaglione et al., 2007; Willems et al., 2004)。當 E3 和專一性的調節蛋白質結合後，ubiquitin 上的 glycine 76 殘基首先會藉由硫醇酯鍵(thiolester bond)的形成，以接合上 E1 的 cysteine 殘基，且這個過程是需要消耗 ATP。接著，E1 上的 ubiquitin 會轉移給 E2 上的 cysteine 殘基，同樣也是透過硫醇酯鍵(thiolester bond)的形成。最後，E2 會將 ubiquitin 轉移給專一性的調節蛋白質，透過其上的 lysine 殘基與 ubiquitin 上的 glycine 76 殘基所形成的異脛鍵(isopeptide bond)來進行鍵結，且經過多次的 ubiquitin 轉移，和多個 ubiquitin 經由 lysine 48 殘基與 glycine 76 殘基鍵結而成的 polyubiquitin chain，將專一性的受質給標定住，以進而被 26S proteasome 所辨識並進行分解，或是藉由蛋白質活性的改變，來對細胞進行調節作用(Pickart and Eddins, 2004; Scaglione et al., 2007; Willems et al., 2004)。

E3 ubiquitin ligases 可依照兩種特徵性的蛋白質 motif 而分為兩類，一為含有 HETC (homology to E6-AP C-terminus) domain 的 E3 ubiquitin ligases，另一為含有 RING (really interesting new gene) domain 的 E3 ubiquitin ligases (附圖八)(Pickart, 2001; Pickart and Eddins, 2004)。HETC-type E3s 本身就含有內生性的 ubiquitination 催化區位，其可透過 E2 將 ubiquitin 轉移給 E3，並直接由 E3 來執行專一性受質的 ubiquitination 作用；而 RING-type E3s，由於沒有內生性的 ubiquitination 催化區位，所以需由 E2 來進行專一性受質的 ubiquitination (附圖八)(Pickart, 2001; Pickart and Eddins, 2004)。SCF complexes 是屬於 RING-type E3 ubiquitin ligases 家族(Willems et al., 2004)。

附圖八



E3 ubiquitin ligases 可依照兩種特徵性的蛋白質 motif 而分為兩類，一為含有 HECT (homology to E6-AP C-terminus) domain 的 E3 ubiquitin ligases，另一為含有 RING (really interesting new gene) domain 的 E3 ubiquitin ligases。前者本身含有內生性的 ubiquitination 催化區位；而後者則不具有此內生性催化區位，所以直接是由 E2 來進行專一性受質的 ubiquitination。SCF complexes 是屬於 RING-type E3 ubiquitin ligases 家族。

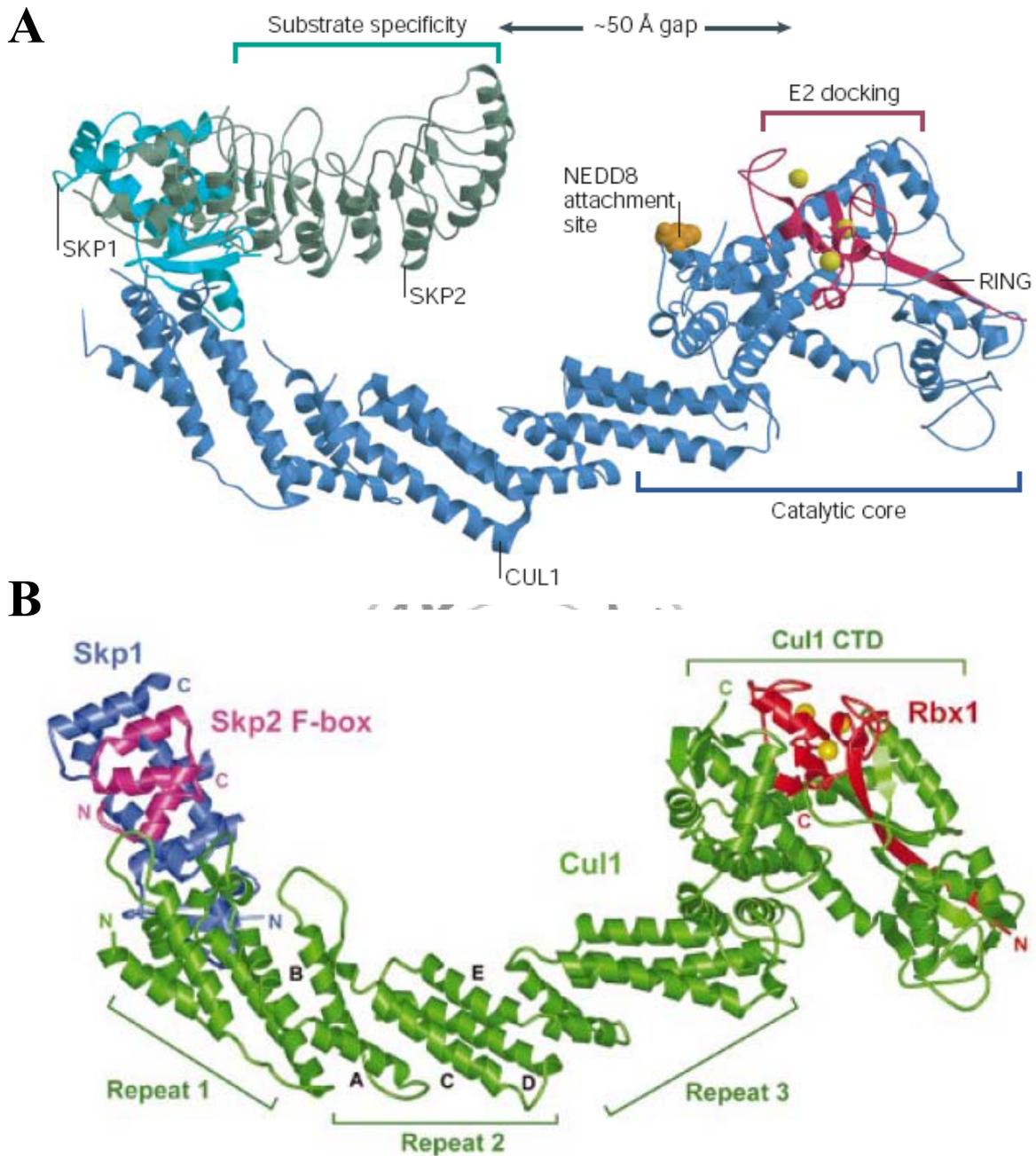
資料來源：(Image by MIT OCW. After W. Hilt, Universitat Stuttgart.)

2.2 SCF^{Cdc4} 和其受質在出芽酵母菌中所扮演的角色及功能

SCF (Skp1-Cdc53/Cullin-F box) complexes 為典型的 RING-type E3 ubiquitin ligases 家族。主要是由共有的一群蛋白質，Cdc53/ Cullin、Skp1 與 Rbx1/Roc1/Hrt1，和不同的 F box 蛋白質所構成(附圖九) (Dixon et al., 2003; Tang et al., 2007)。Cdc53/Cullin 為一種結構性蛋白質，是由一系列五個 helix bundle 重複三次(cullin repeat/CR 1-3)的 N 端 domain 和 C 端 globular domain 所構成的(附圖九 B) (Petroski and Deshaies, 2005; Tang et al., 2007; Zheng et al., 2002)。Skp1 為連接性蛋白質，其會和 Cdc53/Cullin N 端 domain 的 cullin repeat 1 (CR 1) 以及不同的 F box 蛋白質相結合，以形成受質專一性的結合區位(Petroski and Deshaies, 2005; Tang et al., 2007; Zheng et al., 2002)。Rbx1/Roc1/Hrt1 是具有 RING-H2 domain 的蛋白質，其會和 Cdc53/Cullin C 端的 globular domain 相結合，且 Rbx1/Roc1/Hrt1 上的 RING-H2 domain 會提供 E2 (Cdc34)一個入塢位置 (docking site)，以形成執行受質泛素化的催化區位(Petroski and Deshaies, 2005; Tang et al., 2007; Zheng et al., 2002)。SCF complexes 的專一性受質結合區位與執行受質泛素化的催化區位之間，會有 50~60 Å 的缺口 (gap)將此兩區位給分隔開來(Petroski and Deshaies, 2005; Tang et al., 2007)。此缺口的形成，可以提供一個空間以幫助容納在受質泛素化的過程中 polyubiquitin 的形成(Petroski and Deshaies, 2005; Tang et al., 2007)。由不同的 F box 蛋白質所組合而成的 SCF complexes，會辨識不同的受質，以進行不同功能的調節作用(Dixon et al., 2003; Tang et al., 2007; Willems et al., 2004)。F box 含有靠近 N 端的 F box motif，以及靠近 C 端的 leucine-rich repeats (LRRs)或是 WD40 repeats；F box motif 會和 Skp1 相結合，而 LRRs 或是 WD40 repeats 會辨識其專一性的受質(Tang et al., 2007; Willems et al., 2004)。

出芽酵母菌 SCF^{Cdc4}，此 complex 的 F box 為 Cdc4，其標定的受質有 cyclin-dependent kinase (CDK)的抑制者 Sic1 和 Far1、與 DNA 複製有關的蛋白

附圖九



Cul1-Rbx1-Skp1-F box^{Skp2} 四級結構圖。SCF (Skp1-Cdc53/Cullin-F box) complexes 為典型的 RING-type E3 ubiquitin ligases 家族，且主要是由共有的一群蛋白質，Cdc53/ Cullin、Skp1 與 Rbx1/Roc1/Hrt1，和不同的 F box 蛋白質所構成。

資料來源：A. (Petroski and Deshaies, 2005)；B. (Zheng et al., 2002)。

質 Cdc6，以及活化胺基酸合成的轉錄因子 Gcn4 等(Willems et al., 2004)。Sic1 為 B-type cyclin-Cdc28 的抑制者，在 G1 時期裡，是建立與維持 CDK-free window 的重要角色(Schwob et al., 1994)。當細胞週期進行至 G1 後期時，Cln1/2-Cdc28 kinases 會將 Sic1 進行磷酸化修飾，磷酸化後的 Sic1 將會被 SCF^{Cdc4} 所辨識，以進行泛素化並被 proteasome 給降解掉，則 B-type cyclin-Cdc28 便會帶領細胞進入 S 時期(Verma et al., 1997)。而在有絲分裂後期，Sic1 會再被表現出來，且 anti-CDK phosphatase Cdc14 會維持 Sic1 不被磷酸化，以穩定的存在於細胞中，進而幫助細胞完成與離開有絲分裂時期(Willems et al., 2004)。Far1 也是 CDK 的抑制者，但主要是受費洛蒙的調控(Gartner et al., 1998; Willems et al., 2004)。當出芽酵母菌要進行交配時，費洛蒙會啟動 MAPK 訊息傳遞路徑，以活化其上的 Fus3，則 Fus3 會磷酸化 Far1，使其抑制掉 Cln-Cdc28 磷酸化所造成的 SCF^{Cdc4} 泛素化之降解，而使細胞停滯在 G1 時期，以進行細胞交配。另外，Far1 將作為結構性蛋白質，與 Bem1、Cdc24、Cdc42 和 Step4 形成 complex，以促進交配時的極性生長，幫助細胞找到另一型態的配子(Butty et al., 1998)。Cdc6 是 pre-replication complexes (pre-RC)的成員之一，且與 DNA 複製的起始是有關係的(Diffley, 1996)。當細胞在 G1 後期與 S 時期時，Cdc6 會被 Cln-Cdc28 給磷酸化，並被 SCF^{Cdc4} 所辨識，以進行泛素化與蛋白質降解；此時，DNA 便可開始進行複製。而這樣的磷酸化 Cdc6 之降解，可以確保每一次的細胞週期只進行一次的 DNA 複製(Willems et al., 2004)。Gcn4 為促進胺基酸合成的轉錄因子；但在非營養缺乏的環境下，Gcn4 會被 SCF^{Cdc4} 進行泛素化降解(Willems et al., 2004)。

3. *Candida albicans* Cdc4 (CaCdc4)

SCF (Skp1-Cdc53/Cullin-F box) complexes 在真核生物當中具有高度的保留性，也是 E3 ubiquitin ligases 中最大的家族，藉由 ubiquitin system，其參與許多

調節蛋白質與訊息傳遞因子的調控(Dixon et al., 2003)。SCF^{Cdc4} (其 F box 為 Cdc4) 於哺乳類動物和酵母菌中，主要是調控細胞週期的運作與進行(Atir-Lande et al., 2005)。在哺乳類動物中，同源性的 Cdc4 將參與 cyclin E 和 proto-oncogene c-Myc 的降解，具有腫瘤抑制基因的功能(Atir-Lande et al., 2005; Tang et al., 2007)。而在出芽酵母菌中，*CDC4* 對於細胞的繁殖是很重要的，且為必要的基因；當出芽酵母菌的 *CDC4* 產生突變時，會造成細胞週期 G1 時期的停滯，和產生多個與瘦長的芽體(Hereford and Hartwell, 1974)。

藉由序列同源的關係，於白色念珠菌基因體的資料庫中，找到與出芽酵母菌 *CDC4* (*ScCDC4*) 相同源的白色念珠菌 *CDC4* (*CaCDC4*) 序列。*CaCDC4* 包含有 768 個密碼子的轉譯序列(即為 2307bp 長的 open reading frame)，且經由與 *ScCDC4* 的比對，預測出其所轉譯出的 *CaCdc4* 於 N 端將有一個 F box domain (胺基酸殘基 295~343)，而於 C 端將有八個 WD40 repeats domain (胺基酸殘基 404~762) (附圖十) (Atir-Lande et al., 2005; Shieh et al., 2005)。*CaCDC4* 可以挽救缺乏必要 *ScCDC4* 的出芽酵母菌突變株，但其形態上會比野生型的出芽酵母菌有較大與較長的芽體(Atir-Lande et al., 2005; Shieh et al., 2005)。由此可以推論 *CaCDC4* 和 *ScCDC4* 具有功能上的同源關係，且 *CaCdc4* 可能與 *ScCdc4* 一樣皆為 SCF complexes 的 F box 蛋白質，具有 E3 ubiquitin ligase 的功能；但其在細胞週期的調控功能上可能有部份的缺失與不足(Atir-Lande et al., 2005; Shieh et al., 2005)。相較於 *ScCDC4* 於出芽酵母中是必要的基因，*CaCDC4* 在白色念珠菌中並不為必要的基因(Atir-Lande et al., 2005; Shieh et al., 2005)。當 *CaCDC4* 於白色念珠菌中產生突變或是為 *Cacdc4*^{-/-} 時，其會促使白色念珠菌形成菌絲的生長型態(Shieh et al., 2005)，且主要是假性菌絲的生長形式(Atir-Lande et al., 2005)。但是 *Cacdc4*^{-/-} 的白色念珠菌突變株，在血清的誘導之下，會形成真性菌絲，且形成真性菌絲的能力比野生型的白色念珠菌來得好；以及在 *CaCDC4* knockdown (TET-off system) 的實驗中發現，隨著培養的時間增長，白色念珠菌才會有真性菌絲的產生，其延遲的真性菌絲之生成可能是需要額外的外在環境因子的誘導，如飢餓的

附圖十



CaCDC4 包含有 768 個密碼子的轉譯序列(即為 2307bp 長的 open reading frame)，且經由與 ScCDC4 的比對，預測出其所轉譯出的 CaCdc4 於 N 端將有一個 F box domain (a)，而於 C 端將有八個 WD40 repeats domain (b)。附圖十上所標示的 CaCdc4 (new)之胺基酸位置，是以 CaCDC4 ORF (open reading frame)的第一個轉譯起始點開始算起；而此附圖文獻上的 CaCDC4 則是以 CaCDC4 ORF 的第二個轉譯起始點開始標起；兩者之間相差八十四個胺基酸。

資料來源：(Shieh et al., 2005)。

狀態之下等(Atir-Lande et al., 2005)。由此可以推知，*CaCDC4* 在白色念珠菌中扮演著菌絲生成的負調節者(Atir-Lande et al., 2005; Shieh et al., 2005)，且 SCF^{CaCdc4} 似乎會調節外在形態生成因子對白色念珠菌的形態影響，而不是啟動這些訊號對白色念珠菌形態的形成(Atir-Lande et al., 2005)。另外，*Cacdc4*^{-/-}並不會造成白色念珠菌細胞週期 G1 時期的停滯，所以 SCF^{CaCdc4} 似乎和細胞週期的調控是沒有關係的，而主要的功能似乎和白色念珠菌的形態調控有關(Atir-Lande et al., 2005)。

4. *Candida albicans* Cdc4 之相關蛋白質的研究

Candida albicans Sol1 是目前已知和 *Candida albicans* Cdc4 有遺傳上的交互作用關係(Atir-Lande et al., 2005)。由於 Sic1 為出芽酵母菌 SCF^{Cdc4} 的受質並且已有很清楚的研究機制，當 Sic1 大量表現於出芽酵母菌中，會使其產生細胞週期 G1 時期的停滯(Feldman et al., 1997; Schwob et al., 1994); 而將 Sic1 大量表現於白色念珠菌中，會促使白色念珠菌有形態上的變化，主要會促使其產生菌絲的生長形式(Atir-Lande et al., 2005)。所以由此推知，於白色念珠菌中，若大量表現和穩定 Sic1 的同源蛋白質，可能會誘導菌絲形態的生成，且此 Sic1 的同源蛋白質有可能為 *CaCdc4* 的受質。但藉由序列的同源性，目前無法於白色念珠菌基因體的資料庫中找到與 Sic1 相同源的蛋白質(Atir-Lande et al., 2005); 取而代之是運用當大量表現 Sic1 於 *dbf2*^{ts} 的出芽酵母菌中，其可以挽救 *dbf2* 所造成的致死現象的方式(Donovan et al., 1994)，將白色念珠菌的 genomic library 分別置入 *dbf2*^{ts} 的出芽酵母菌突變株中，並大量表現白色念珠菌的基因，以此找到與出芽酵母菌 Sic1 於功能上相互同源的 Sol1 (Sic one-like) (Atir-Lande et al., 2005)。*CaSol1* 雖然和 *ScSic1* 在序列上的同源性不高，但 *CaSol1* 在 N 端上有許多重要的 CDK 標靶位置(S/T-P)是與 *ScSic1* 相似的(Atir-Lande et al., 2005)。當大量表現全長的 *CaSol1* 和截去 N 端部分的 *CaSol1* (*CaSol1* Δ N，較全長的 *CaSol1* 穩定)於出芽酵母中，*CaSol1* 會稍微影響到出芽酵母菌的生長，而 *CaSol1* Δ N 則會抑制掉出芽酵母菌

的生長，且兩者皆會促使較大與較長的芽體產生，而以後者的情況會較為嚴重；但兩者的大量表現，確不會像 *ScSic1* 一樣造成出芽酵母菌細胞週期 G1 時期的停滯 (Atir-Lande et al., 2005)。而在白色念珠菌中，*CaSol1* Δ N 與 *ScSic1* Δ N 的大量表現，皆會促使芽體的增長，其中又以 *CaSol1* Δ N 的大量表現所誘導的芽體較長；由於 *CaSol1* 與 *ScSic1* 在細胞中並不穩定，所以此兩者的大量表現，並沒有顯著的使白色念珠菌的芽體增長；但 *CaSol1* 和 *CaSol1* Δ N 的大量表現，卻不像 *ScSic1* 和 *ScSic1* Δ N 的大量表現會造成白色念珠菌細胞週期 G1 時期的停滯 (Atir-Lande et al., 2005)。由此可以推知 *CaSol1* 與 *ScSic1* 雖然具有功能上的同源關係，但是實際上只有部分的功能是相似的 (Atir-Lande et al., 2005)，*ScSic1* 主要和細胞週期的調控是有關係的，且可能主要作為 S 時期 kinase Clb5, Clb6/Cdc28 的抑制者；而 *CaSol1* 的功能則可能與真性菌絲形態的生成較有關係，且可能主要作為 Clb1,2/Cdc28 的抑制者，此 kinase 是負責芽體生成後，讓細胞由 apical 轉變為 isotropic 的生長形態 (Lew and Reed, 1993)。此外，在 *CaCDC4* knockdown (TET-off system) 的實驗中發現，隨著 *CaCdc4* 的不表現，*CaSol1* 愈能穩定存在於白色念珠菌中，這顯示 *CaSol1* 可能為 SCF^{CaCdc4} 的受質 (Atir-Lande et al., 2005)。

雖然 *CaSol1* 與白色念珠菌的形態形成有關，當大量表現時會促使白色念珠菌形成菌絲的形式；但是在 *Casol1*^{-/-} 的白色念珠菌突變株中，卻也發現會促使菌絲的生長，且在血清的誘導之下，*Casol1*^{-/-} 的白色念珠菌突變株，不但沒有缺乏形成生殖管 (germ tube) 的能力，其和野生型的外表型皆是相同的，都有真性菌絲的生成 (Atir-Lande et al., 2005)。另外，*CaCdc4* 是扮演著白色念珠菌菌絲形態生成的負調節者，且 *CaSol1* 可能為 SCF^{CaCdc4} 的受質，但是不管是在 *Cacdc4*^{-/-} (*CaSol1* 是穩定存在於細胞中的) 或是 *Casol1*^{-/-} *Cacdc4*^{-/-} 的白色念珠菌突變株中，都會有菌絲形態的生成 (Atir-Lande et al., 2005)。這些結果與現象顯示出，SCF^{CaCdc4} 和 *CaSol1* 之間的關係對於白色念珠菌菌絲形態生成的調控機制仍是一個難以理解的問題。是否 *CaCdc4* 在白色念珠菌中，並不是以 SCF complex 的形式來執行它的功能；且是否 *CaSol1* 並不是 *CaCdc4* 的受質，其彼此之間的關係

仍有許多的因子在調控著；或是 *CaCdc4* 有其真正能促使白色念珠菌菌絲形態生成的受質等等。這些都可以成為探討 *CaCDC4* 對於白色念珠菌形態形成的一個方向。另外，透過和出芽酵母菌 *Cdc4* 功能的同源比較研究，於白色念珠菌中，也探討了和 *CaCdc4* 可能的相關性蛋白質，如 *CaFar1*、*CaTec1*、*CaCln3* 等，但初步證實與 *CaCdc4* 並無功能上之關聯(Atir-Lande et al., 2005)。

5. Affinity purification

隨著許多物種的基因體計畫之完成，將更可以提供探索與分析基因之功能及其調節網絡的機會(Puig et al., 2001)。而藉由蛋白質體學的分析，如對基因調控網絡的分析、蛋白質的身分鑑定、轉譯後的修飾機制、蛋白質的表現量，以及鑑定蛋白質與蛋白質之間的交互作用等，將可以更了解生物體內複雜與精細的生物系統之整體變化(Puig et al., 2001)。且隨著質譜儀技術的增進，對於 biological complexes 的成員鑑定與分析，更提供了一個較快速與精確的分析方法，且只需要 sub-picomolar 的 biological complexes 樣本就可以進行成員的鑑定與分析(Honey et al., 2001)。雖然可以運用大規模之酵母菌雙雜合篩選(large-scale yeast two-hybrid screening)的方式，來鑑定蛋白質和蛋白質之間的交互作用，包括 biological complexes 的成員鑑定；但是由於此方式常會有偽陽性與偽陰性的結果，且缺乏化學計量學(stoichiometry)上的資訊，以及含有可試驗條件之限制，所以對於鑑定蛋白質之間的交互作用，將漸漸趨向使用質譜儀的分析方式(Puig et al., 2001)。雖然質譜儀的分析帶給蛋白質複合體的特徵鑑定很多的方便與精確性，但是蛋白質複合體的純化步驟，是目前進行鑑定中最重要之限制因子。且由於不同的蛋白質，都具有專一性的特性，即使可以依照其特有的性質來設計純化的方法，但卻無法設計出一種都能適合各種蛋白質的純化方式。所以，許多研究者希望可以藉由 affinity tag 來標定已知所想探討的蛋白質，並可藉由標準化的親和力純化步驟將其相關性的蛋白質給純化出來(Honey et al., 2001; Puig et al.,

2001)。除此之外，由於只經過一次親合力純化法(one-step affinity purification)所得到的蛋白質複合體，其通常會含有許多的非專一性背景值，進而會影響到質譜儀對蛋白質複合體的鑑定與分析；所以為了提高蛋白質複合體的純度，許多研究者將發展兩階段式的親和力純化法(tandem affinity purification/TAP) (Kaneko et al., 2004; Puig et al., 2001; Tagwerker et al., 2006)，和多階段式的親和力純化法(multiple affinity purification/MAFT) (Honey et al., 2001)，以提高對蛋白質複合體的質量，降低非專一性的背景值，進而提高對蛋白質鑑定、功能以及結構上之分析的準確度。

利用單一次親合力純化法所得到的蛋白質複合體，雖然會有較高的非專一性背景值，可是還是有許多研究是利用此方式來鑑定出蛋白質複合體的成員，如酵母菌的 anaphase-promoting complex (APC) (Zachariae et al., 1998)，和運用 RAW264.7 老鼠巨噬細胞所找到的 cerebral cavernous malformation signal complex (Hilder et al., 2007)等，前者是用 myc6 tag 標定 Cdc6，後者是用 FLAG tag 標定 OSM。兩階段式親和力純化法最典型的 TAP tag 為含有兩個 *Staphylococcus aureus* protein A (ProtA)的 IgG binding domain 和一個 calmodulin binding peptide (CBP)，且 ProtA 和 CBP 之間是由 TEV protease cleavage site 所分隔開來，並藉由 Protein A/IgG-agarose 和 CBP/calmodulin-bead affinities 進行兩階段式的純化，以得到所要的蛋白質複合體(Puig et al., 2001; Tagwerker et al., 2006)。另外的 tandem affinity tag 則有 S-tag 取代典型 TAP tag 之 CBP 部分的標籤，以及由多個 histidine 和 FLAG tag 或是多個 histidine 和 Myc tag 所組合而成的標籤(Tagwerker et al., 2006)。而利用兩階段式純化法所找到的蛋白質複合體有白色念珠菌的 septin protein complex (Kaneko et al., 2004)；和找到在白色念珠菌形成真性菌絲的過程中，cyclin-dependent kinase Cdc28 和 septin complex 之間的磷酸化調控關係(Sinha et al., 2007)；以及找到和 *CaTup1* complex 相互作用的新蛋白質 *CaTcc1* (Kaneko et al., 2006)等。多階段式親和力純化法所使用的 MAFT tag 包含由 calmodulin binding peptide (CBP)、六個 histidines (6x His)，以及三個 hemagglutinin (3x HA)所組成的

CHH tag (calmodulin, histidine, hemagglutinin)；而藉由此方式所找到的蛋白質複合體有出芽酵母菌的 Clb2-Cdc28 protein kinase complex (Honey et al., 2001)。

6. 研究動機和主要發現

由於 *CaCDC4* 在白色念珠菌中扮演著菌絲生成的負調節者 (Atir-Lande et al., 2005; Shieh et al., 2005)，且菌絲形態的生成通常與白色念珠菌的致病力是有關的 (Whiteway and Oberholzer, 2004)，所以對 *CaCDC4* 的功能解析是很重要的。*Cdc4* 在各個真核生物中，如酵母菌和人類等，為已知的 SCF complex 的 F box 蛋白質，具有 E3 ubiquitin ligase 與受質專一性的功能 (Tang et al., 2007; Willems et al., 2004)。以此推論，白色念珠菌的形態轉變可能是透過 ubiquitin-mediated protein 的降解機制來調控的。且 *Candida albicans* *Sol1* 是目前已知和 *Candida albicans* *Cdc4* 有遺傳上的交互作用關係，隨著 *CaCdc4* 表現量的降低，*CaSol1* 將會穩定存在於白色念珠菌中，所以 *CaSol1* 可能為 *CaCdc4* 的受質 (Atir-Lande et al., 2005)；但是不管是在 *Cacdc4*^{-/-} (*CaSol1* 是穩定存在於細胞中的)或是 *Casol1*^{-/-} *Cacdc4*^{-/-} 的白色念珠菌突變株中，都會有菌絲形態的生成 (Atir-Lande et al., 2005)。另外，*CaCdc4* 和 *CaSol1* 在白色念珠菌中的功能，主要是與菌絲形態的調控有關，卻不扮演著如出芽酵母菌 *Cdc4* 和 *Sic1* 在細胞週期 G1 至 S 時期的調控角色 (Atir-Lande et al., 2005)。所以 *CaCdc4* 在白色念珠菌中，是否是以 SCF complex 的形式來執行其功能，其是否為 SCF complex 的成員之一；而 *CaSol1* 是否為 *CaCdc4* 的受質，其彼此之間的關係是否有許多的因子在調控著，或是 *CaCdc4* 有其他與白色念珠菌形態生成有關的受質；且 *CaCdc4* 是否具有上游的調控者來調節其功能等等；這些是我所想要探討的議題。

因此在這次的研究當中，想藉由 6xHis-FLAG tag 來標定 *CaCdc4* 蛋白質，並分別利用 *CaCDC4* 內生性的 promoter、*ACT1* promoter，以及 TET-on system 來誘導 *CaCdc4*-6xHis-FLAG 重組蛋白質分別於酵母菌與真性菌絲形態的白色念珠

菌中表現；和藉由 6xHis-FLAG tag 來分別標定 *CaCdc4* 的 F box 和 WD40 片段，並於酵母菌與真性菌絲形態的白色念珠菌中，運用 TET-on system 來誘導 *CaCdc4*-F box -6xHis-FLAG 和 *CaCdc4*-WD40-6xHis-FLAG 重組蛋白質；以及藉由大腸桿菌 BL21 的表現系統，來大量表現 *CaCdc4*-6xHis 的重組蛋白質，並分別與酵母菌和真性菌絲形態的白色念珠菌之 cell lysates 進行細胞外的蛋白質交互作用的方式；並運用親和力純化法，希望可以分別在酵母菌和真性菌絲形態下的白色念珠菌，找到與 *CaCdc4* 相關性的蛋白質，且這些蛋白質可能在不同的生長形態下扮演著不同的功能；以及希望在不同的 *CaCdc4* domains 下，即 F box 和 WD40 domain，可以找到可能與 SCF complex 成員有關的蛋白質，以及專一性受質的部份。

目前已成功的運用 TET-on system 和大腸桿菌 BL21 的表現系統，於經過銀染後的 SDS-PAGE 膠片中，分別在酵母菌和真性菌絲形態下的白色念珠菌，觀察到 *CaCdc4* 可能共有與特有的相關性蛋白質；並且也在不同的 *CaCdc4* domain (F box 和 WD40 domain) 中，觀察到相異的 *CaCdc4* 相關性蛋白質。而這些 *CaCdc4* 相同與相異的相關性蛋白質必須要再進行質譜儀的身分鑑定與分析，雖然目前還沒有鑑定出來，但希望可以藉此找到與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質，並以此可以綜觀性的了解 *CaCdc4* 和菌絲生長之間的調控關係。

材料和方法

1. 所使用的大腸桿菌和白色念珠菌菌株

1.1 大腸桿菌菌株(*Escherichia coli*)

DH5 α

Φ 80 Δ lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*) U169, *phoA*

BL21 (DE3)

F^- , *ompT*, *hsdS_B* (r_B^- , m_B^-), *dcm*, *gal*, λ (DE3)

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*

TET-CaCDC4-6HF (parental strain: BWP17) 賴威仲學長所提供

ADH1/adh1::*P_{TET}-CDC4-6HF*

TET-CaCDC4-F box-6HF (parental strain: BWP17) 賴威仲學長所提供

ADH1/adh1::*P_{TET}-CDC4(241-392)-6HF*

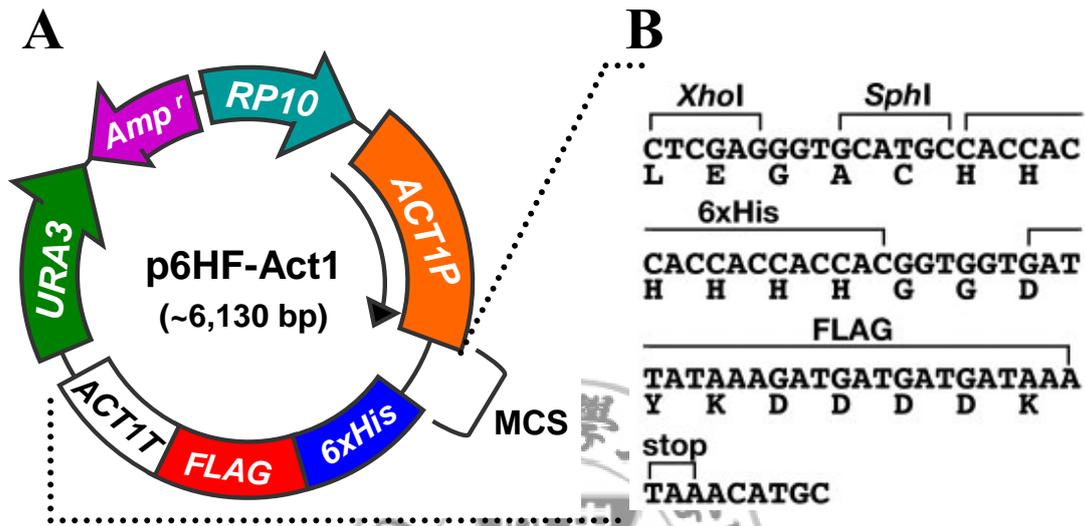
TET-CaCDC4-WD40-6HF (parental stain: BWP17) 賴威仲學長所提供

ADH1/adh1::*P_{TET}-CDC4(393-768)-6HF*

2. 所使用的載體

p6HF-ACT1 (Kaneko et al., 2004) (見附圖十一)

附圖十一



p6HF-Act1 載體之結構。A. p6HF-Act1 載體上含有 *RP10*、*ACT1* promoter (*ACT1P*)、MCS (multiple-cloning sites)、6xHis-FLAG epitope 的轉譯序列、*ACT1* terminator (*ACT1T*)，以及 *URA3* 與 ampicillin resistance 基因(*Amp^r*)。B. p6HF-Act1 載體的 MCS-tags 序列：包含有 *XhoI* 與 *SphI* 限制酶切點，以及 6xHis 與 FLAG epitopes 的轉譯序列。

pCR2.1-TOPO (Invitrogen) (見附圖十二)

pET-29b(+) (Novagen) (見附圖十三)

3. 菌株品系的建構

3.1 大腸桿菌品系的建構

3.1.1 質體的建構

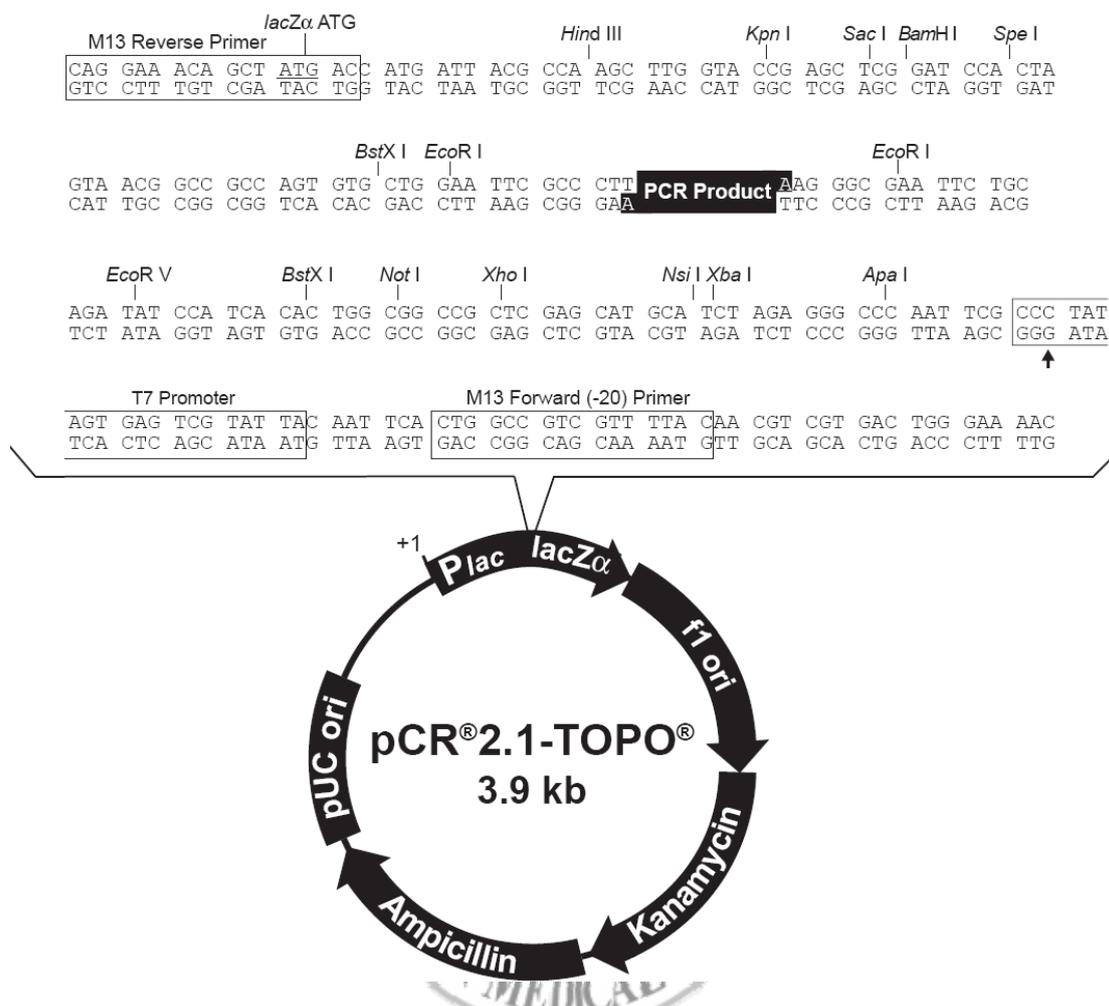
3.1.1.1 載體的製備

載體通常是藉由細菌可以保留質體的特性，以進行保存及放大。而帶有質體的細菌通常會保存在 -80°C 中，或是以固態培養基進行保存；當需要使用時，只需輕輕刮取少許的菌塊，或是自培養基上挑取單一顆菌落，種至 2 ml 的 LB 培養液和合適的抗生素中，於 37°C 培養至隔天。隔日，將此菌液的載體以 Gene-SpinTM MiniPrep Purification Kit-V² (Protech Technology) 抽出，且 2 ml 的菌量約回溶 30~40 μl 的二次水，便以進行限制酶反應，以及鹼性去磷酸根作用(alkaline phosphatation)。

3.1.1.1.1 限制酶反應

將上述 2 ml 的菌量所抽取出的載體(約 30~40 μl)，進行 50 μl 的限制酶反應[每種合適的限制酶各約取 10 units + 5 μl 10x buffer (依限制酶所適合的 buffer 而選取) + 0.5 μl 100x BSA (依限制酶的所需而定)，補二次水至 50 μl]，並依照限制酶所適合的反應溫度進行作用，通常作用三個小時之後，每種合適的限制酶再各補充 5 units，繼續三個小時的限制酶反應(有些限制酶的反應時間可能需要更久，像是 *NotI*，*SaI* 等效率較差的酵素，所以作用的時間，會依酵素的的不同而也有所不同)。接著，以 Gel-MTM Gel Extraction System (VIOGENE)，將限制酶反應完整的載體片段進行回收，

附圖十二



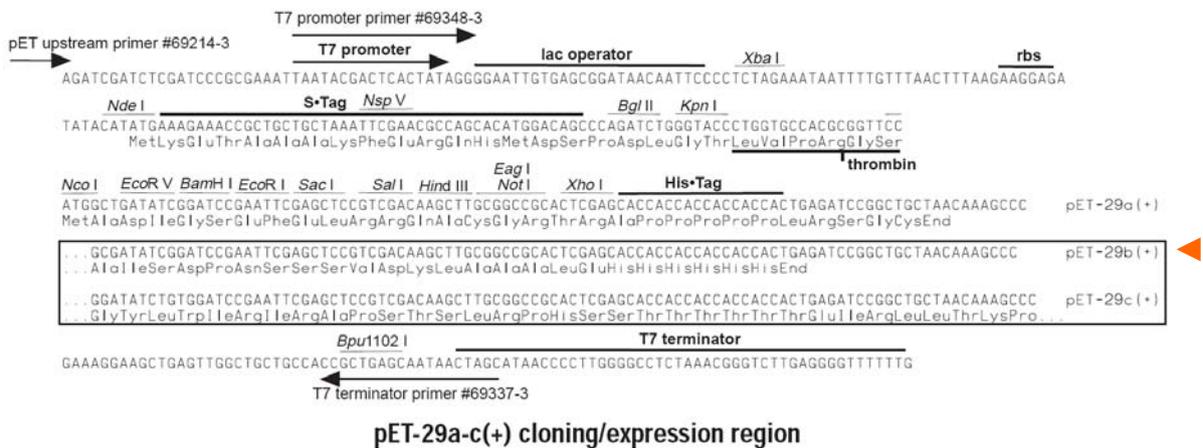
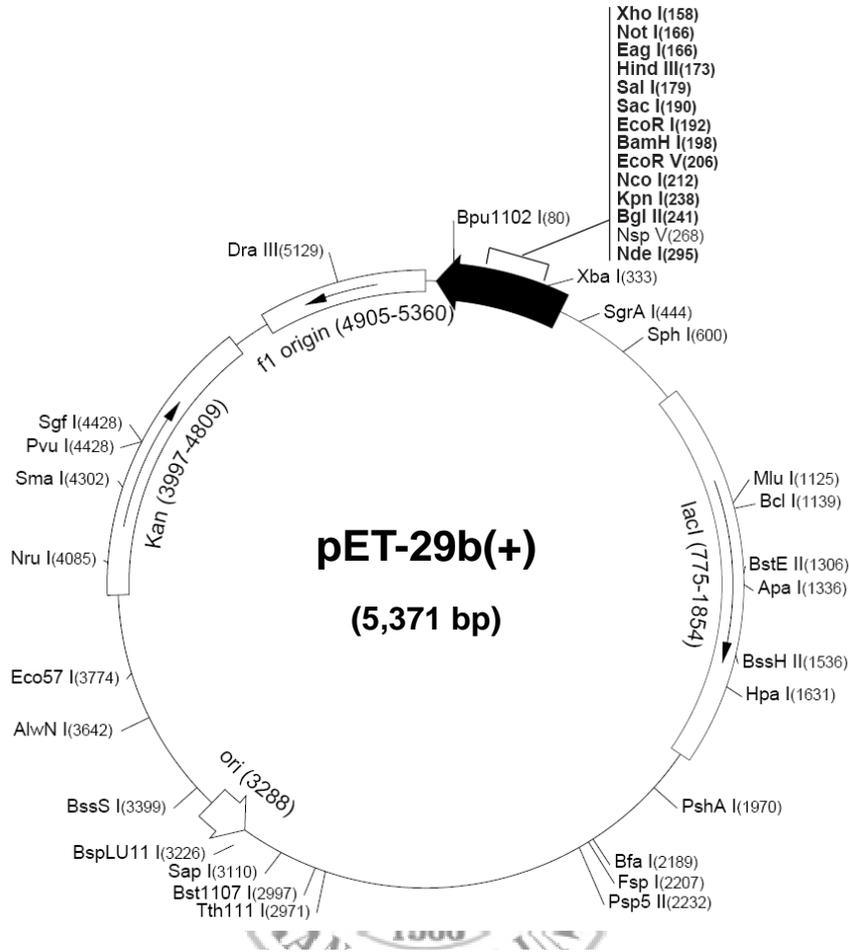
Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®] 3931 nucleotides

LacZ α fragment: bases 1-547
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-357
 T7 promoter/priming site: bases 364-383
 M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
 f1 origin: bases 548-985
 Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
 Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
 pUC origin: bases 3136-3809



pCR2.1-TOPO 載體之結構。pCR2.1-TOPO 載體上含有可以作為藍白篩選所用的 *LacZ α* ，以及 ampicillin 與 kanamycin resistance 基因等，可以做為保存 DNA 片段所用。

附圖十三



pET-29b(+) 載體之結構。pET-29b(+) 載體上含有 *lacI* 和 pET29b(+) cloning/expression 區域，此區域包含有 lac operator、MCS 以及 S·Tag 與 His·Tag 的轉譯序列，因此可以藉由 IPTG 來大量誘導 6xHis-tagged 重組蛋白質之表現。

所回收的載體片段，共以 40 μl 的二次水回溶，以方便接下來進行鹼性去磷酸根作用(alkaline phosphatation)。

由於離子濃度的環境，對於限制酶的作用效率是很重要的，不同的限制酶在不同的離子環境下，其作用的效率也各不相同(可以參考廠商的限制酶活性總表)，所以選擇合適的緩衝液，對於限制酶反應之效率是很重要的。若限制酶反應同時要使用兩個以上的酵素進行參與的話，則所選取的緩衝液必須要可以同時適用於各個不同的酵素，以達到最好的作用效率；或是先使用一種限制酶反應後，經 Gel-M™ Gel Extraction System (VIOGENE)或 PCR-M™ Clean Up System (VIOGENE)純化，再和另一種限制酶進行反應。

另外，酵素的使用量對於限制酶反應的效率也是很重要的，尤其是在一些較為罕見的限制酶上。酵素通常都有所謂的活性單位定義(unit definition)，以 *EcoRI* 為例：它的酵素活性單位的定義是，在 50 μl 的反應體積中，於 37°C，一個小時的時間，可以將 1 μg lambda DNA (為 48,502bp，且含有五個 *EcoRI* 切點)上的 *EcoRI* 切點作用完畢，而所需的酵素量定義為一個酵素的活性單位。即表示 1 unit 的 *EcoRI* 可以充分作用於 1 μg lambda DNA 上所有的 *EcoRI* 切點。由此，可以藉由限制酶作用於 DNA 片段上的總酵素切點，來計算出欲進行限制酶反應的 DNA 片段，其所需的酵素量，以 pET-29b(+) (總長為 5,371bp，且含有一個 *EcoRI* 切點)為例，則可以列出以下的方程式：

$$\begin{array}{ccc}
 \text{DNA 分子個數} & & \text{DNA 分子個數} \\
 \hline
 \frac{1 \mu\text{g}}{48,502 \times 330 \times 2} \times 6.02 \times 10^{23} \times 5 = & = & \frac{X \mu\text{g}}{5,371 \times 330 \times 2} \times 6.02 \times 10^{23} \times 1 \\
 \hline
 \text{總切點數} & & \text{總切點數}
 \end{array}$$

經由計算後得到 1 unit 的酵素可作用 X μg 欲反應的 DNA 片段，而若酵素

的濃度為 10 units/ μ l，則所需的酵素量為 X/10 μ l。

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

載體經限制酶反應處理完後，將進行鹼性去磷酸根作用，其主要的目的是將載體 5'端的磷酸根給去除掉，以防止在接合反應時，發生載體自黏(self ligation)的現象，而降低了質體建構的效率。本實驗中，所使用的去磷酸酶為 Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIAP) (Promega)。首先，先計算出所需使用的 CIAP 量，以每 1 μ g 1,000 bp 的 DNA 含有 3.03 pmol 的 DNA 末端，而每 1 pmol 的 DNA 末端則需要 0.01 units 的 CIAP 來做計算：假設經過限制酶處理後的載體，其含有 a μ g，且片段大小為 b bp，則 CIAP 所需的量 = $3.03 \times a \times (1,000/b) \times 0.01$ units。接著，將上述經過限制酶反應後的載體(40 μ l)，進行 50 μ l 的鹼性去磷酸根作用[所需的 CIAP 量(CIAP 使用前會先以緩衝液和二次水稀釋成一百倍，使原濃度為 10 units/ μ l，稀釋成 0.01 units/ μ l，以方便吸取)+ 5 μ l 10 x CIAP buffer，補二次水至 50 μ l]，於 37°C 中作用半個小時後，再補充一次 CIAP，繼續於 37°C 中作用半個小時；若經限制酶處理後的載體為 blunt end，則需要在 37°C 中作用十五分鐘後，換至 56°C 作用十五分鐘，再補充一次 CIAP，繼續於 37°C 中作用十五分鐘，56°C 十五分鐘。作用完後，再利用酒精沉澱，或是 PCR-M™ Clean Up System (VIOGENE)將載體純化，並約以 30 μ l 的二次水進行回溶即可。

3.1.1.2 嵌入 DNA (Insert DNA)的製備

嵌入 DNA 的來源通常有兩種，一種是所需的片段已保存或位在其他的載體上，直接藉由限制酶反應和膠體回收的純化，即可得到所要的嵌入 DNA 片段；另一種則是利用設計兩端帶有特定之限制酶切點的引子(primers)，和 *Pfu* DNA 聚合酶連鎖反應，將所要的嵌入 DNA 片段自白色念珠菌 genomic

DNA 或是某些特定的載體中夾出，並將此 DNA 片段利用 TA 選殖，將其保存在 pCR2.1-TOPO (invitrogen™)載體上，再以限制酶反應和膠體回收，得到所要的嵌入 DNA 片段。

另外，利用設計兩端帶有特定基因的短序列互換區域(short-flanking homology/SFH Regions)的引子，和 *Pfu* DNA 聚合酶連鎖反應，所製備出的 DNA 片段，也將會利用 pCR2.1-TOPO (invitrogen™)載體作為保存，但此 DNA 片段將不進行後續的接合反應和轉形實驗，而是直接進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗。並利用 SFH 區域，將此 DNA 片段嵌入白色念珠菌的基因體中。

3.1.1.2.1 *Pfu* 聚合酶連鎖反應(*Pfu* PCR)

Pfu DNA 聚合酶(*Pfu* DNA polymerase)具有 3'端向 5'端之外切酵素活性(3' to 5' exonuclease activity)，能校正 DNA 在 PCR 過程中所產生的錯誤。由於傳統的 Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)、Tth DNA 聚合酶(Tth DNA polymerase)，及其相關的產品如 AmpilTaq、KlenTaq 等，都不具有校正功能(proof reading)，且 Vent、Deep Vent、Tli、Pwo、UITma 等 DNA 聚合酶，雖然具有校正的功能，但其校正的能力並沒有 *Pfu* DNA 聚合酶來得好；即 *Pfu* DNA 聚合酶之錯誤率比 Taq DNA 聚合酶及其相關產品低 10 倍，比 Vent 和 Pwo 低 2~4 倍，比 UITma 低 30 倍(MDBio, Inc.)；所以本實驗中，將會使用 *Pfu* DNA 聚合酶(MDBio, Inc.)來製備嵌入 DNA。此外，因為 *Pfu* DNA 聚合酶具有 3'端向 5'端之外切酵素活性，可能會將聚合酶連鎖反應中的引子給分解掉，特別是在沒有 dNTP 之溶液的情況下；因此，*Pfu* DNA 聚合酶必須最後再加入反應液中，並於加入後立即進行聚合酶連鎖反應。另外，*Pfu* 聚合酶連鎖反應所產生的 DNA 片段為平端(blunt end)，不像 Taq DNA 聚合酶會有 3'端的 A 鹼基突出，所以 *Pfu* 聚合酶連鎖反應所產生的 DNA 片段不能直接進行 TA 選殖，必須經過 PCR 產物之 3'端的

加 A 鹼基作用(A-tailing)後，方可進行 TA 選殖。

首先設計一對適當的引子(可利用 MacVector™ 7.2 軟體來進行預測和設計)，其兩端可帶有特定的限制酶切點，或是兩端帶有特定基因的短序列互換區域(short-flanking homology/SFH Regions)等。並進行 50 µl 的 *Pfu* 聚合酶連鎖反應[約 10~100 ng 的 DNA template + 5 µl 的 10 x *Pfu* PCR buffer + 5 µl 的 2 mM dNTP + 0.1~0.5 µM primers + 2.5 units 的 *Pfu* DNA polymerase，補二次水至 50 µl]，將欲研究的基因片段於白色念珠菌之 genomic DNA 夾出，或是將某些特定的 DNA 片段於載體中夾出。待 *Pfu* 聚合酶連鎖反應完後，再利用 Gel-M™ Gel Extraction System (VIOGENE) 將 DNA 片段純化，並約以 30 µl 的二次水進行回溶，接著將此純化後的 DNA 片段進行 PCR 產物之 3'端的加 A 鹼基作用。

3.1.1.2.2 PCR 產物之 3'端的加 A 鹼基作用(A-Tailing)

將上述經過 *Pfu* 聚合酶連鎖反應[其引子兩端帶有特定的限制酶切點，或是兩端帶有特定基因的短序列互換區域(short-flanking homology/SFH Regions)等]，以及純化過後所產生的 DNA 片段(約 30 µl)，進行 3'端的加 A 鹼基作用。取 5 µl 的 10 x Taq PCR buffer，1 µl 的 10 mM dATP (最終的反應濃度需為 0.2 mM)，以及 2.5 units 的 Taq DNA 聚合酶 (MDBio, Inc.)，加入上述 *Pfu* 聚合酶連鎖反應之產物(約 30 µl)，並補水至 50 µl，混合均勻後，置於 72°C 中作用 10~15 分鐘。待 3'端的加 A 鹼基作用完畢後，再利用 PCR-M™ Clean Up System (VIOGENE)將 DNA 片段純化，並約以 30 µl 的二次水進行回溶即可。

3.1.1.2.3 TA 選殖(TA Cloning)

本實驗是利用 TOPO TA Cloning Kit (invitrogen™)來進行 TA 選殖。首

先將上述經 *Pfu* 聚合酶連鎖反應和 3' 端的加 A 鹼基作用處理後的 DNA 片段，取 0.5~4 μl 出來，加入 1 μl 的 salt solution，1 μl 的 pCR2.1-TOPO vector (由於此載體與 topoisomerase I 為共價鍵結，以形成 activated vector，所以在取用和保存上要小心，以免 topoisomerase I 失去活性，而降低了 TA 選殖的效率。且由於此 TOPO cloning 反應是藉由載體上的 topoisomerase I 來進行的，所以整個 TOPO cloning 反應中，不需加入接合酵素。另外，TOPO 載體的溶液顏色會呈現黃色至淡紅色，此為正常的現象)，並補水至 6 μl ，混合均勻後，置於室溫中進行 TOPO cloning 反應三十分鐘。待三十分鐘後，取 2 μl 的 TOPO cloning 反應液，加於一管的 one shot chemically competent *E. coli* (invitogenTM) 中，切記此過程中，不要混合樣本，以進行轉形作用，並置於冰上三十分鐘。三十分鐘後，將其置於 42°C 中熱休克三十秒，此過程中不需要搖晃樣本，緊接著再換置於冰上，並加入 250 μl 的 SOC 培養液，於 37°C 中培養一個小時，使細胞恢復[由於 one shot chemically competent *E. coli* (invitogenTM) 較昂貴，所以可以使用自製的勝任細胞，以進行轉形，詳見材料與方法 3.1.3 轉形(Transformation)]。接下來，直接取少部份的菌液(約 50 μl ~200 μl)，利用過火並且冷卻過的玻璃棒，或是滅過菌的玻璃珠，將菌液均勻地塗在含有適用的抗生素，以及 40 μl 的 40 mg/ml X-Gal 之 LB 固態培養基上(含有適用的抗生素之 LB 固態培養基，需先自 4°C 中拿出，並置於 37°C 培養箱中回溫約一個小時，待回溫後，再取 40 μl 的 40 mg/ml X-Gal 均勻地塗抹在培養基上，再置回 37°C 培養箱中，讓培養基充分地吸收 X-Gal 至少十五分鐘)，並於 37°C 培養箱中，進行藍白篩選至隔天。隔日，將所長出的白色菌落，以大腸桿菌菌落聚合酶連鎖反應，或是限制酶反應，以及定序分析[詳見材料與方法 3.1.4 大腸桿菌菌落聚合酶連鎖反應 (*E. coli* Colony PCR)，3.1.5 限制酶反應確認，以及 3.1.6 核酸定序 (DNA sequencing)]，來進一步確認篩選出的菌株是否含有所要的質體(其上含有所要的嵌入 DNA 片段)。待確定後，可將菌株做 -80°C 的保存

(每 800 μ l 菌液 + 200 μ l 100% glycerol)，以方便後續嵌入 DNA 的準備和轉形作用，或是將含有 SFH 區域的 DNA 片段直接進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗。

3.1.1.2.4 限制酶反應

嵌入 DNA 片段經由 pCR2.1-TOPO 載體保存並確認無誤後，將會使用合適的限制酶切下，再用 Gel-MTM Gel Extraction System (VIOGENE) 進行純化，以繼續後續的接合反應和轉形作用(其限制酶反應之步驟，詳見於 3.1.1.1 載體的製備之 3.1.1.1.1 限制酶反應)，或是直接進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗(其限制酶反應步驟，詳見於 3.2.1 將進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗的 DNA 片段之準備)。

3.1.1.3 接合反應(Ligation)

將製備好的載體和嵌入 DNA，各取 1~2 μ l 等體積的量，進行 DNA 膠體電泳，並利用數位化影像處理系統(Alpha Imager)計算出載體和嵌入 DNA 的 IDV (integrated density value) 值，而此載體和嵌入 DNA 的 IDV 值之比，即為其膠體電泳上的總 DNA 重量之比。將載體和嵌入 DNA 的 IDV 值各除以當時進行 DNA 膠體電泳所取的 DNA 體積量，進而所得到的載體和嵌入 DNA 的比值，便是其單位體積下的 DNA 之重量比。由於當初所取的 DNA 體積是相同的，所以載體和嵌入 DNA 的 IDV 值之比，即為其單位體積下的 DNA 之重量比。再將此載體和嵌入 DNA 的單位體積下的 DNA 重量之數值，各除以其 DNA 的片段大小，即可得到載體和嵌入 DNA 的單位體積下 DNA 之莫耳數比。通常載體和嵌入 DNA 的接合比例為 1 : 1~10 (此為莫耳數比)，但以 1 : 3 較常見，不過此比例會因為 DNA 的不同長度或是序列而有所差異。因此，藉由載體和嵌入 DNA 的單位體積下 DNA 之莫耳數比的

求出，進而可以依照想要的接合比例來計算出彼此各要取多少體積。接著，將欲進行接合反應的載體和嵌入 DNA，加入 1 μl 的 10x T4 DNA ligase reaction buffer (此緩衝液中含有 ATP，必須使其完全溶解並混合均勻，而看不到白色顆粒之後才可使用，若保存時間過久亦可再額外添加少許的 ATP)，1 μl 的 T4 DNA ligase (NEB)，補二次水至 10 μl ~15 μl ，置於 4°C 反應至隔天，或是於室溫中反應一至兩個小時。

3.1.1.4 酒精沉澱

酒精沉澱是一種沉澱 DNA 的方法。由於無水的乙醇會奪去 DNA 周圍的水分子，使 DNA 失水而易於聚合。且因無水乙醇的價格較為昂貴，所以會利用 95% 的乙醇或是異丙醇來取代，但會損失掉少部份的沉澱產物。藉由酒精沉澱的方式，可以將緩衝液和酵素的成份給去除掉，進而純化出 DNA 片段。通常在欲進行電穿孔方法轉形實驗的接合產物，會以此方式純化 DNA 片段，以防止接合產物中的離子影響電擊效果；或是有些酵素反應後的 DNA (其片段小於 100 bp 或是大於 10 kb) 不適用 PCR-MTM Clean Up System (VIOGENE) 進行純化時，也會以酒精沉澱的方式將 DNA 純化出。

將欲進行純化的 DNA 產物，加入酒精沉澱的反應液中，其含有 50 μl 3M NaAc pH 5.2，1 μl glycogen (可幫助小片段 DNA 的沉澱)，以及 350 μl 95% ethanol，並補二次水至 500 μl 。混合均勻後，置於 -20°C 中進行反應至隔天，或是於 -80°C 中反應一個小時。接著，以 13,000 rpm 離心十分鐘，去除上清液後，再加入 500 μl 70% ethanol，將試管上下顛倒，以讓 70% ethanol 可以充分清洗 DNA 的 pellets (此時 pellet 會呈現白色樣)，然後以 13,000 rpm 離心十分鐘，將上清液盡量去除乾淨，最後，將樣本置於空氣中使之乾燥後(乾燥後的 DNA pellet 會呈現透明狀)，即可利用 60°C 的二次水將 DNA pellets 充分溶解並保存。

3.1.2 勝任細胞(Competent Cells)的製備

比較常在使用的轉形方式，包括化學方法(CaCl_2 或是 MgCl_2 等)和電穿孔的方式，而在勝任細胞的製備上也有所不同，以下便將分這兩個部份來介紹：

3.1.2.1 製備以氯化鈣化學方法處理的勝任細胞(Preparing Chemically CaCl_2 Competent Cells)

首先從 -80°C 中，選取合適的大腸桿菌菌株(DH5 α 或是 BL21...等)，並輕輕地刮取少許的菌塊，或是於 4°C 的LB (Luria-Bertani)固態培養基上，挑取單一菌落，種至2 ml的LB培養液中，並置於 37°C 培養箱震盪培養至隔天。隔日，將此菌液吸取500 μl 置於新鮮的50 ml LB培養液中，繼續於 37°C 培養箱震盪培養約三至四個小時，直到OD595之值為0.5~0.6。待菌液的OD595之值到達0.5~0.6後，將菌液置於冰上約十五分鐘，接著於 4°C 中，以4,000 rpm離心十分鐘，然後去除上清液，並加入15 ml 4°C 的0.1 M CaCl_2 ，輕輕地沖洗細菌的 pellets，使其均勻的懸浮分佈在 CaCl_2 中，混合之後將之置於冰上三十分鐘，可利用冰水共存的方式以加強冷卻的效果。緊接著，於 4°C 中，以4,000 rpm離心十分鐘，去掉上清液，並加入3 ml 4°C 的0.1 M CaCl_2 / 10% glycerol (即含300 μl 的1 M CaCl_2 和300 μl 的100% glycerol)進行回溶，然後以200 μl 分裝成一管，成為一份轉形樣本所需的菌量，並置於 -80°C 中進行保存。

3.1.2.2 製備電穿孔的勝任細胞(Preparing Electrocompetent Cells)

首先從 -80°C 中，選取合適的大腸桿菌菌株(DH5 α 或是 BL21...等)，並輕輕地刮取少許的菌塊，或是於 4°C 的LB (Luria-Bertani)固態培養基上，挑取單一菌落，種至2 ml的LB培養液中，並置於 37°C 培養箱震盪培養至

隔天。然後再取出少量的隔夜培養之菌液，加進新鮮的 20 ml LB 培養液中，於 37°C 培養箱震盪培養至隔夜。隔日，將此 20 ml 隔夜培養的菌液，吸取 10 ml 置於新鮮的 1 L LB 培養液中，繼續於 37°C 培養箱震盪培養約三至四個小時，直到 OD595 之值為 0.5~0.6。接下來，將菌液置於冰上十五至三十分鐘，便以 4°C 5,000 rpm 離心十五分鐘，並除去上清液；再加入 1 L 4°C 的二次水，輕輕地清洗細菌的 pellets，使其均勻的懸浮分佈在二次水中，混合均勻後，於 4°C 中，以 5,000 rpm 離心十五分鐘，並去掉上清液；然後再加入 0.5 L 4°C 的二次水，清洗細菌的 pellets，再於 4°C 中，以 5,000 rpm 離心十五分鐘，並去掉上清液；最後，再以 40 ml 4°C 的 10% glycerol，輕微地沖洗細菌的 pellets，使其均勻的懸浮分佈在 10% glycerol 中(此時可以將菌液移至 50 ml 的離心管裡，以方便操作)，接著以 4°C 5,000 rpm 離心十五分鐘，倒掉上清液，並加入少許 4°C 的 10% glycerol 回溶細菌的 pellets，使其最後的體積為 2~3 ml。由於細胞的數量很多，所以可以先加入少許 4°C 的 10% glycerol 回溶，以避免體積超過，而最後細胞的濃度大約為 $1\sim3\times 10^{10}$ cells/ml，接下來每 40 μ l 分裝成一管，成為一份轉形樣本所需的菌量，並置於 -80°C 中進行保存。

3.1.3 轉形(Transformation)

3.1.3.1 氯化鈣化學方法轉形實驗(CaCl₂ Transformation)

首先於 -80°C 中，取出欲進行轉形的 CaCl₂ 勝任細胞(每份轉形樣本所需的菌量為 200 μ l)，並置於冰上，待 CaCl₂ 勝任細胞呈現冰水狀時，將適量的欲進行轉形之 DNA 加入進去，通常每份轉形樣本的 CaCl₂ 勝任細胞，不加入超過 4 μ l 的接合反應之產物，然後置於冰上三十分鐘，可使冰水共存，以加強冷卻的效果。接著，換置於 42°C 中，進行熱休克(heat shock)兩分鐘，可一邊反應一邊搖晃轉形樣本，使其受熱均勻；結束熱休克反應之後，迅速

地將轉形樣本置於冰水中搖晃約十秒鐘，再插在冰上兩分鐘，之後加入 1 ml 的 LB 或是 SOC 培養液，並於 37°C 培養箱中培養一個小時，讓細胞進行恢復。待一個小時後，以 3,000~4,000 rpm 離心五分鐘，再吸掉大部分的培養液，留下大約 100~200 μ l 的培養液，並將細菌的 pellet 混合均勻，使其均勻地懸浮分佈在剩餘的培養液中，然後利用過火並且冷卻過的玻璃棒，或是滅過菌的玻璃珠，將菌液均勻地塗在可以用來進行篩選的固態培養基上，並置於 37°C 中培養置隔日。

3.1.3.2 電穿孔方法轉形實驗(Electroporation)

於 -80°C 冰箱中，取出欲進行轉形的電穿孔勝任細胞(每份轉形樣本所需的菌量為 40 μ l)，並置於冰上，待電穿孔勝任細胞呈現冰水狀時，將適量的欲進行轉形之 DNA 加入進去，通常每份轉形樣本的電穿孔勝任細胞，不加入超過 4 μ l 的接合反應之產物，且此接合反應的產物，必須先經過酒精沉澱的處理，即去離子的步驟，以避免離子濃度太高而影響導電；若接合反應之產物沒有經過酒精沉澱的處理，則取量必須在 2 μ l 以下，方才不受影響。接著，將每份轉形樣本至於冰上一分鐘，再換置已預冷的 2 mm electroporation cuvette (Bio-Rad) 中，切記在換置的過程中，要避免氣泡的產生，以影響電擊的效果；如果有氣泡產生時，可以將 2 mm electroporation cuvette 以垂直的方向敲打其底部，將氣泡由液面下趕至液面上，進而去除掉氣泡。然後將已加入轉形樣本的 2 mm electroporation cuvette 固定於電極架上，接著是機器的設定，不同的機器與機型，其操作的方式可能將會有所不同，而本實驗中，所使用的電穿孔儀器為 Bio-Rad 的 MicroPulse system。其內有分為內建程式設定(細菌跟真菌)與手動設定，手動設定則是先按下 setting 鍵，選擇 manual，此時螢幕上會顯示電壓的數值，再以上下圖示鍵調整所需的電壓數，0.2~3 kV 皆可，而我們所使用的電壓條件為 2.5 kV；設

定好所需的電壓之後，便開始進行電擊，長按 pulse 鍵，螢幕將會顯示出 PLS，待主機發出嗶聲，表示動作完成，而此時螢幕上會顯示出時間參數與實際進行電擊的電壓數，通常電擊的時間為 4~5 milliseconds，若時間太短，可能是因為有氣泡的存在或是轉形樣本中的離子濃度太高所致。電擊完畢後，加入 1 ml 的 LB 或是 SOC 培養液於 cuvette 中，均勻混合轉形樣本後，再移至新的養菌管中，並於 37°C 中培養一個小時，使細胞恢復。待一個小時後，以 3,000~4,000 rpm 離心五分鐘，再吸掉大部分的培養液，留下大約 100~200 μ l 的培養液，並將細菌的 pellets 混合均勻，使其均勻地懸浮分佈在剩餘的培養液中，然後利用過火並且冷卻過的玻璃棒，或是滅過菌的玻璃珠，將菌液均勻地塗在可以用來進行篩選的固態培養基上，並置於 37°C 培養箱中培養置隔日。

3.1.4 大腸桿菌菌落聚合酶連鎖反應(*E. coli* Colony PCR)

大腸桿菌菌落聚合酶連鎖反應，是一種大量迅速初步篩選的方式，可方便選取出帶有成功選殖質體的菌落。做法是將經轉形實驗所長出的菌落挑起來置於 15 μ l 的 STE (10 mM Tris base, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 8.0) 緩衝液中，並將菌落混和均勻，使其均勻懸浮分佈在 STE 緩衝液中，接著再取 7 μ l 出來進行聚合酶連鎖反應，而剩餘的部份則加入少許的 LB 或是 SOC 培養液 (約 300 μ l)，置於 37°C 中培養。待聚合酶連鎖反應的結果出來後，將正確有反應的樣本取出，並加入 LB 培養液及合適的抗生素 (約 4 ml)，於 37°C 中培養隔夜，以作為隔日抽質體用，並進一步利用限制酶反應進行第二次確認，和作為 -80°C 保存所用 (每 800 μ l 菌液 + 200 μ l 100% glycerol，混合均勻後置於 -80°C 中保存)。若聚合酶連鎖反應未能直接跑膠確認時，可先將剩餘部份的菌液放於 4°C 保存。

3.1.5 限制酶反應確認

由於大腸桿菌菌落聚合酶連鎖反應適合進行快速的初步篩選之確認，所以仍會利用限制酶反應作進一步的確認；或是直接將轉型後所長出的菌落，利用限制酶反應確認，而不用大腸桿菌菌落聚合酶連鎖反應來確認。將菌落的質體利用 Gene-Spin™ MiniPrep Purification Kit-V² (Protech Technology) 抽出，2 ml 的菌量約回溶 30~50 µl 的二次水，並從中取出 1~2 µl 的質體出來，進行 10 µl 的限制酶反應[每種合適的限制酶各約取 3 units + 1 µl 10x buffer (依限制酶所適合的 buffer 而選取) + 0.1 µl 100x BSA (依限制酶的所需而定)，補二次水至 10 µl]，依限制酶所合適的溫度，作用一至兩個小時。待作用完畢後，跑膠確定，進而篩選出所要的菌株，將篩選出的菌株之剩餘菌液，加入 LB 培養液及合適的抗生素(約 4 ml)，於 37°C 中培養至隔天，然後一部分再抽質體，一部分作為 -80°C 保存所用(每 800 µl 菌液 + 200 µl 100% glycerol，混合均勻後至 -80°C 中保存)。

3.1.6 核酸定序(DNA Sequencing)

所建構的質體，經限制酶反應確認無誤後，將會送至基龍米克斯生物科技股份有限公司(Genomics) [此公司是採用 ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing with ABI 3730 system (applied biosystem)]，進行定序確認，以避免嵌入 DNA (insert DNA) 有突變的產生而影響其蛋白質的表現與功能。而定序的相關事宜，可至基龍米克斯(Genomics)的網頁 www.genedragon.com.tw 進行查詢。

3.2 白色念珠菌品系的建構

由於出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的醋酸鋰轉形實驗已有建構完整的流程與步驟，且具有不錯的轉形效率；而白色念珠菌的醋酸鋰轉形實驗是

基於出芽酵母菌的方法而來，但其轉形的效率卻不如出芽酵母菌來得好，每1 μg 的線性DNA約只能得到50~100個轉形白色念珠菌(Sanglard et al., 1996)。而若將熱休克的溫度從原本的42°C提高至44°C，並且將醋酸鋰處理細胞的時間由半個小時延長至隔夜，可提高白色念珠菌的轉形效率，每1 μg 的線性DNA約可以得到400~500個轉形白色念珠菌(Walther and Wendland, 2003)。故本研究中，所使用的醋酸鋰酵母菌轉形實驗，將會提高熱休克的溫度至44°C，以及延長醋酸鋰處理細胞的時間至隔天，希望可以提高白色念珠菌的轉形效率，進而得到所要的菌株。

3.2.1 將進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗的 DNA 片段之準備

首先從-80°C所保存的大腸桿菌菌株中，輕輕刮取少許的菌塊種於50 ml 的LB培養液(含有合適的抗生素)中，置於37°C培養箱震盪培養至隔天。隔日，以Gene-Spin™ MiniPrep Purification Kit-V² (Protech Technology)抽取質體，每5 ml的菌液量抽取成一管(由於每一個Gene-Spin的離心管柱，最多可以抽取5 ml的菌液量，所以為了達到最佳的效率，以每5 ml的菌液量抽取成一份質體)，共十管，每管質體各以50 μl 的二次水回溶；接著將每份抽取好的質體，加入合適與適量的限制酶(每份質體約加入10 units即可)與其作用六個小時或至隔天。六個小時或至隔日，以電泳分離線性DNA片段後，利用Gel-M™ Gel Extraction System (VIOGENE)回收出欲進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗的DNA片段，所回收的DNA片段共以150 μl 的二次水回溶，並以30 μl 的量(約含有1~5 μg 的DNA)作為一份欲進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗的DNA片段，因此共可以得到五份欲轉形的DNA片段。

3.2.2 醋酸鋰酵母菌轉形實驗(LiAc Yeast Transformation)

首先從-80°C所保存的白色念珠菌菌株中，取一點菌液於YPD固態培養

基上劃開，並至於 30°C 培養箱中，培養一至兩天，待其單一菌落長出。接著挑出單一菌落種於含有 2 ml YPD 液態培養液的養菌管中，於 30°C 中培養至隔日；而剩餘所劃開的菌落，可以保存在 4°C 裡，待下次轉形時使用。隔天，將此 2 ml 的菌液置於 50 ml 的 YPD 液態培養液裡，於 30°C 中培養至 OD600 之值約為 1.0 (大約需要三到四個小時的培養時間)。待 OD600 之值到達 1.0 後，將菌液分裝至 50 ml 的高速離心管中，共兩管，便以 3,000 rpm 離心五分鐘。接下來，將上清液去除，並每管加入 10 ml 的無菌二次水清洗一次，再離心 3,000 rpm 五分鐘，然後將上清液去除，每管 pellets 各加入 1.5 ml 的 1x TE/LiAc (300 μ l 10x TE + 300 μ l 10x LiAc + 2.4 ml d_2H_2O) 回溶，並使其均勻懸浮。接著將此已經醋酸鋰處理過的白色念珠菌菌株，以 100 μ l 分裝成一管，成為一份的轉形樣本。取 1~5 μ g 欲轉形的 DNA 片段(上述 3.2.1 將進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗的 DNA 片段之準備實驗中，所得到的每一份 30 μ l 欲轉形之 DNA 片段)，加入於 10 μ l 10 mg/ml 的單股鮭魚精子 DNA/salmon sperm DNA (使用前先分裝欲轉形的數量於 PCR 試管當中，每份轉形樣本需 100 μ g，於 PCR 機器中以 95°C 十分鐘，4°C 十分鐘，4°C ∞ 處理，使其 denature 成單股形式，並於 4°C 中保持其單股的形式)當中，稍微混合均勻，至於冰上，待酵母菌轉形所用。而相對於酵母菌來說，必須靠單股的鮭魚精子 DNA 作為攜帶者，將欲轉型的 DNA 送入酵母菌中。配製 40% PEG3350 / 1x TE / 1x LiAc，每份轉形樣本需 600 μ l (480 μ l 50% PEG3350 + 60 μ l 10 xTE + 60 μ l 10x LiAc)。待經醋酸鋰處理過的白色念珠菌菌株，欲轉形的 DNA 和單股鮭魚精子 DNA 混合液，以及 40% PEG3350 / 1x TE / 1x LiAc 溶液準備好後，將一份的欲轉形之 DNA 和單股鮭魚精子 DNA 混合液，加進一份的經醋酸鋰處理過的白色念珠菌菌株，接著再將一份的 40% PEG3350 / 1x TE / 1x LiAc 溶液置入進去，稍微震盪一下，放於 30°C 培養箱中震盪培養至隔夜。隔天，將其換至 44°C 熱休克十五分鐘，結束之後再快速離心五秒鐘，將上清液去除掉，接著再快速離心五秒鐘，去除剩餘的 PEG 等物質，而留下菌體；最後加入 150 μ l

~200 μ l 的二次水(或是 SD + Arg + His 的液態培養液)回溶，並利用過火和冷卻過的玻璃棒，或是滅過菌的玻璃珠，將菌液塗於可篩選用之固態培養基上，然後置於 30°C 培養箱中培養四到五天。

3.2.3 複印(Replica)

將醋酸鋰酵母菌轉形成成功的菌落，分別於 YPD 固態培養基上劃開，並至於 30°C 培養箱中培養一到兩天，以作為簡單的保存與後續分析菌株基因型的正確性所用。待於 YPD 固態培養基上劃開的菌落長出後，將進行兩個世代的複印，以篩選出穩定態之基因型的菌株。取兩張滅過菌的濾紙平放於圓木柱上，並以橡皮筋將濾紙固定於上，接著將上述的 YPD 固態培養基倒蓋在圓木柱上，將培養基固定好，並垂直輕拍固態培養基的背面，使 YPD 固態培養基上的菌落均勻地沾粘在濾紙上，再輕緩地將培養基拿起。接下來，將可篩選用的固態培養基覆蓋在已沾有菌落的濾紙上，垂直輕拍固態培養基的背面，並施力均勻地把菌落複印到培養基上，再以垂直的方向快速地將培養基拉起；接著再換新的 YPD 固態培養基，以同樣的方式將菌落複印於上；再將原本的 YPD 固態培養基，沾有菌落的可篩選用之培養基，以及新複印的 YPD 固態培養基置於 30°C 培養箱中培養一到兩天。此沾有菌落的可篩選用之培養基，以及原本的 YPD 培養基為第一個世代的複印；而新複印的 YPD 固態培養基為第二個世代的複印，待其菌落長出後，再以上述相同的方法，將菌落複印至新的可篩選用的培養基上，並將此兩培養基置於 30°C 培養箱中培養一到兩天，以完成第二個世代的複印。觀察第一世代和第二世代複印中的可篩選用之培養基其菌落的生存情形，並篩選出在第一世代和第二世代複印中皆能生存下來的菌株，這些菌株的基因型態是穩定存在的，也較有可能是所要的轉形白色念珠菌菌株，以此將近一步的運用酵母菌菌落聚合酶連鎖反應或是南方點墨法(Southern blotting)，來分析複印所篩選出的菌株之基因型態是否

為本研究中所要的(第一世代和第二世代複印中的 YPD 固態培養基，可作為簡易與暫時性的菌落保存，以及提供後續分析基因型態的正確性所用)。

3.2.4 酵母菌菌落聚合酶連鎖反應(Yeast Colony PCR)

醋酸鋰酵母菌轉形實驗所長出的菌落，經過初步的兩個世代之複印篩選，所得到基因型態穩定的菌株，將近一步運用酵母菌菌落聚合酶連鎖反應來驗證是否為所要的轉形菌株。利用 200 μl 的微量吸管刮取適量的菌落於 30 μl 的 0.08% NaOH 中(其加入的菌量足以讓澄清的液體變為白色的混濁即可)，混合均勻後，以 95°C 十五分鐘加熱處理，使其細胞破裂，然後稍微快速離心，讓細胞殘骸離下，接著將上清液(即 DNA 的所在)吸取至新的離心管中，作為-20°C 保存和酵母菌菌落聚合酶連鎖反應。由於 NaOH 會影響聚合酶連鎖反應，所以在進行酵母菌聚合酶連鎖反應時，不宜加入太多經 NaOH 處理所釋出的 crude DNA，每 25 μl 的聚合酶連鎖反應，至多加入 2 μl 的 crude DNA，以此方法來驗證轉形的白色念珠菌菌株是否為本研究所要的。

4. 菌株的培養條件

4.1 大腸桿菌的培養條件

4.1.1 所使用的培養液、培養基以及藥品

4.1.1.1 所使用的培養液

本實驗中所使用的大腸桿菌之培養液有 Luria-Bertani (LB)培養液[1% Tryptone (Bacto™), 1% NaCl (USB), 0.5% Yeast Extract (Bacto™), pH7.2~7.4]、含有 50~100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin 抗生素之 LB 培養液、含有 25~50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin 抗生素之 LB 培養液、SOB 培養液[2% Tryptone (Bacto™), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.2~7.4]，以及 SOC 培養液(980 ml SOB 培養液+

10 ml 2M MgSO₄ · 7H₂O + 10 ml 2M glucose)。

4.1.1.2 所使用的培養基

所使用的大腸桿菌培養基有 LB 培養基[1% Tryptone (Bacto™), 1% NaCl (USB), 0.5% Yeast Extract (Bacto™), 1.5% Agar (Bacto™), pH 7.2~7.4]、含有 50~100 µg/ml ampicillin 抗生素之 LB 培養基，以及含有 25~50 µg/ml kanamycin 抗生素之 LB 培養基。

4.1.1.3 所使用的藥品

所使用的藥品有進行藍白篩選的 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)，每盤固態培養基需 40 µl 的 40 mg/ml X-Gal；和誘導重組蛋白質大量表現的 IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)，貯存的濃度配製為 1M。

4.1.2 一般大腸桿菌的培養

一般大腸桿菌的培養，會以 LB 的培養液或是培養基進行培養；若大腸桿菌帶有質體時，會依照質體上所帶有的抗生素基因，而選擇含有合適的抗生素之 LB 培養液或是培養基來培養。在轉形實驗中，則會以 LB 或是 SOC 培養液培養，使細菌恢復；而在 TA 轉殖中，會使用含有 X-Gal 的固態培養基，進行藍白篩選。此部份，已於 3.1 大腸桿菌品系的建構的各項中有詳細的敘述。

4.1.3 表現重組蛋白質之菌株的培養條件

由於 pET 系列的載體(Novagen)含有 *lacI* 的轉譯序列和 pET

cloning/expression 區域，且 pET cloning/expression 區域內含有 lac 操作子(lac operator)，multiple cloning sites (MCS)，以及許多 Tag 的轉譯序列(如 S·Tag、Trx·Tag、His·Tag... 等的轉譯序列)；所以可以利用 IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)，以及在大腸桿菌 BL21 的系統下，來誘導所要之重組蛋白質的大量表現。而本實驗所使用的 pET 系列的載體為 pET-29b(+)，並且將會利用 His·Tag 的轉譯序列來製備所要的 6xHis-Tagged CaCdc4 重組蛋白質。

重組蛋白質的表現，會因為所欲研究的蛋白質不同，而其所需的誘導溫度、時間，以及 IPTG 之濃度也會有所不同，所以將會先測試重組蛋白質在各個誘導條件下的表現情形，以進而找出最佳的誘導條件。首先將帶有表現重組蛋白質之載體的大腸桿菌菌株 BL21 接種到三管 2~3 ml 含有合適抗生素之 LB 培養液中，於 37°C 培養至隔天。隔日，各取 2 ml 的菌液加入 500 ml 含有合適抗生素之 LB 培養液中，於 37°C 以 200 rpm 搖晃培養至 OD595 之值為 0.6~0.8 (大約需要兩個小時的培養)。待 OD 值到達時，將菌液以每 3 ml 分裝成一管，並加入不同的 IPTG 濃度(0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM)，於不同的溫度(25, 30, 37°C)和時間點(0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 hrs)誘導重組蛋白質的表現。將在不同溫度與時間點下所收的菌液，各取 500 μ l 出來，於 4°C 中以 13,000 rpm 離心一分鐘，去除上清液，加入 1x SDS sample buffer (20 mM Tris-HCl pH 6.8, 1.4% SDS, 4% glycerol, 0.02% bromophenol blue)於菌體中，於 95°C 加熱五至十分鐘，接著各取 20 μ l 跑 SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)，並以 coomassie blue 染色，和西方點墨法分析(western Blotting)，以找出最佳誘導重組蛋白質的條件。

經過測試後，以 0.5 mM 之 IPTG 於 25°C 下誘導 6xHis-tagged CaCdc4 重組蛋白質三個小時的條件為最適當。誘導 30 ml 的菌液表現後，將全部的菌液以 4°C，3,000~4,000 rpm 離心五到十分鐘，去除上清液後，再加入 10 ml 的 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄,

pH7.5)清洗菌體，混合均勻後，以每 1 ml 分裝成一管，共十管，再以 4°C，13,000 rpm 離心一分鐘，將上清液去除乾淨，並將菌體保存於-80°C 中，或立即進行重組蛋白質之萃取與純化，以將作為一份細胞外之蛋白質交互作用以及 His-tagged 重組蛋白質和與其相關的蛋白質之純化的樣本。

4.2 白色念珠菌的培養條件

4.2.1 所使用的培養液、培養基以及藥品

4.2.1.1 所使用的培養液

本實驗所使用的白色念珠菌培養液有 YPD 培養液[2% Peptone (Bacto™), 1% Yeast Extract (Bacto™), 2% Glucose (ZYMESET), pH 5.4~5.6]、YPD+10% serum 培養液[2% Peptone (Bacto™), 1% Yeast Extract (Bacto™), 2% Glucose (ZYMESET), 10% serum, pH 7.2]、SC-ura 培養液[0.67% Yeast nitrogen base without amino acid (Sigma), 0.192% Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil (Sigma), 2% Glucose (ZYMESET)]，以及 SD+Arg+His 培養液[0.67% Yeast nitrogen base without amino acid (Sigma), 0.36mM Arginine (Sigma), 0.5mM Histidine (Sigma), 2% Glucose (ZYMESET)]。

4.2.1.2 所使用的培養基

所使用的白色念珠菌培養基有 YPD 培養基[2% Peptone (Bacto™), 1% Yeast Extract (Bacto™), 2% Glucose (ZYMESET), 2% Agar (Bacto™), pH 5.4~5.6]和 SC-ura 培養基[0.67% Yeast nitrogen base without amino acid (Sigma), 0.192% Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil (Sigma), 2% Glucose (ZYMESET), 2% Agar (Bacto™)]。

4.2.1.3 所使用的藥品

所使用的藥品為誘導重組蛋白質之表現的 doxycycline (Sigma)，其貯存的濃度配製為 40~50 mg/ml。

4.2.2 一般白色念珠菌的培養

一般白色念珠菌的培養，會以 YPD 培養基或是培養液進行培養；而在進行篩選的過程中，會依照菌株是否帶有外來營養基因而恢復本身營養缺陷型的外表形，來選擇合適的營養缺陷之培養液或是培養基(本實驗中所使用的為 SC-ura 培養基和培養液)。在醋酸鋰酵母菌轉形實驗中，會以二次水或是 SD + Arg + His 培養液進行回溶菌體。此部份，已於 3.2 白色念珠菌品系的建構的各項中有詳細的敘述。

4.2.3 表現重組蛋白質之菌株的培養條件

本實驗是利用 TET-on 系統來誘導所欲研究的重組蛋白質於白色念珠菌中大量表現。pTET25M (見 P.87 附圖十四)載體含有 *ADHI* promoter，*Candida albicans* reverse Tet-dependent transactivator (*CarTA*)的轉譯序列，以及 *tet* 操作子(*tet* operator)。由於 *ADHI* promoter 可以持續性地表現 *CarTA*，而當 *CarTA* 和 doxycyclin 相結合時，便可以與 *tet* 操作子相結合，以啟動下游基因的表現；所以將欲研究的重組蛋白質之轉譯序列置於 *tet* 操作子的下游，以製備出 pTET25M-欲研究的重組蛋白質之轉譯序列的質體，並將此質體嵌入白色念珠菌 BWP17 的 *ADHI* 基因座上，即可利用 doxycyclin 來誘導所要的重組蛋白之大量表現(見 P.91 圖十) (Park and Morschhauser, 2005)。

重組蛋白質的表現，會因為所欲研究的蛋白質不同，而其所需的誘導時間也會有所不同，所以將會先測試重組蛋白質在各個誘導時間下的表現情

形，以進而找出最佳的誘導條件。首先將帶有表現重組蛋白質之基因的白色念珠菌菌株，以及 BWP17 (以作為對照組)，各接種於 3 ml 的 YPD 培養液中，於 30°C 培養至隔天。隔日，將此 3 ml 的菌液各加入於 50 ml 的 YPD 培養液中，並於 30°C 以 200 rpm 搖晃培養至 OD600 為 0.6~0.8 之間(大約需要二至三個小時的培養)。待 OD 值到達時，將各 50 ml 的菌液以每 3 ml 分裝成一管，且每兩管菌液為一組，其中一管加入 40~50 µg/ml 的 doxycycline，而另一管並不加入 doxycycline，以作為對照組；接著將每組菌液置於 30°C 中培養，並於各個的時間點(0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 hrs 以及 O/N)收取各組菌液，然後將所收取的菌液，以 4°C、13,000 rpm 離心一分鐘，去除上清液後，每管再加入 1 ml 的 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.5)清洗菌體，再以 4°C、13,000 rpm 離心一分鐘，將上清液去除乾淨，並將菌體保存於-80°C 中，待進行白色念珠菌蛋白質之萃取，與西方點墨法分析 (western blotting)，以找出最佳誘導重組蛋白質的條件。

經過測試後，以 40~50 µg/ml 的 doxycycline 於 30°C 下誘導 6xHis-FLAG-tagged CaCdc4 重組蛋白質六個小時的條件為最適當。誘導 200 ml 的菌液表現後(需做兩次的事先培養，第一次先培養 4 ml 的菌液至隔天，再取 1 ml 的菌液出來，進行 20 ml 的事先培養至隔天，接著再取 15 ml 的菌液加入 200 ml 的 YPD 中，以進行重組蛋白質的誘導)，將全部的菌液以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五到十分鐘，去除上清液後，以 1x PBS 清洗菌體兩次，再以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五到十分鐘，將上清液去除乾淨，並將菌體保存於-80°C 中，或立即進行重組蛋白質之萃取與親和力蛋白質之實驗。

4.2.4 誘導白色念珠菌之形態生成的培養條件

4.2.4.1 SC5314 之酵母菌和真性菌絲生長形態的誘導

取單一顆 SC5314 的菌落接種於 4 ml 的 YPD 培養液，並於 30°C 培養至

隔天。隔日，再將此 4 ml 的菌液，各取 2 ml 出來分別加入 30 ml 的 YPD 培養液(pH 5.4~5.6)中，於 30°C 培養箱，200 rpm 搖晃培養兩個小時，以誘導酵母菌生長形態的形成；以及 30 ml 的 YPD + 10% serum 培養液(pH 7.2)中，於 37°C 培養箱，200 rpm 搖晃培養兩個小時，以誘導真性菌絲生長形態的生成。待兩個小時後，將兩種誘導形態的菌液分別以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五到十分鐘，去除上清液後，以 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.5)清洗菌體一次，再以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五到十分鐘，將上清液去除乾淨，並將菌體保存於 -80°C 中，或立即進行重組蛋白質之萃取與親和力蛋白質之實驗。另外，在誘導 SC5314 形成酵母菌生長形態，和形成真性菌絲生長形態之前和之後，可以取少量的菌液出來，以 Nikon 50i 三眼相位差顯微鏡觀察其形態是否大部分為酵母菌的生長形態，和真性菌絲的生長形態。

4.2.4.2 TET-On 系統菌株之酵母菌和真性菌絲生長形態的誘導

本研究中，TET-on 系統的誘導重組蛋白質之表現，與酵母菌生長形態的誘導為同步進行；或是先誘導形態的形成，再進行重組蛋白質的誘導：前者是將經由兩次事先培養後的菌液，再轉換至 200 ml 的 YPD 培養液中(詳見 4.2.3 表現重組蛋白質之菌株的培養條件)，共兩份，經過 1.5~2 小時的細胞恢復後，皆直接以 40~50 µg/ml 的 doxycycline 來誘導重組蛋白質的表現，且同時將其中一份菌液於 YPD 培養液(pH 5.4~5.6)，30°C 的環境下，誘導酵母菌生長形態的形成；而另一份菌液則於 YPD + 10% serum 培養液(pH 7.2)，37°C 的環境下，誘導真性菌絲生長形態的形成。後者是將經由兩次事先培養後的菌液，再分別轉換至 200 ml 的 YPD 培養液(pH 5.4~5.6)和 YPD + 10% serum 培養液(pH 7.2)，並分別於 30°C 和 37°C 的環境下，處理菌株兩個小時，以分別誘導酵母菌生長形態與真性菌絲生長形態的形成；接

著，再以以 40~50 $\mu\text{g/ml}$ 的 doxycycline 來誘導重組蛋白質的表現。待六個小時誘導重組蛋白質之表現結束後，將全部的菌液以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五到十分鐘，去除上清液後，以 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.5) 清洗菌體兩次，再以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五到十分鐘，將上清液去除乾淨，並將菌體保存於 -80°C 中，或立即進行重組蛋白質之萃取與親和力蛋白質之實驗。

5. 蛋白質之萃取

5.1 大腸桿菌的蛋白質之萃取

將經由 IPTG 所誘導的重組蛋白質之菌體(詳見 4.1.3 表現重組蛋白質之菌株的培養條件)，每 3 ml 的菌體各加入 200 μl 的 *E. coli* cell lysis buffer [1x PBS, 5% glycerol, 1 mM sodium EDTA, 1 mM sodium EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1x complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), 1mM PMSF, 1% Triton-X-100]，共十管，並輕輕地將菌體和 *E. coli* cell lysis buffer 混合均勻，接著置於超音波細胞粉碎機(Sonicator XL2020)上，以十分鐘 total press time、二十秒 pulse “on” time、三十秒 pulse “off” time，以及 8~9 強度之超音波，將細胞打破。然後以 4°C、12,000 rpm 離心十分鐘，將上清液收集起來，並取出 100~200 μl 的 cell lysates 作為蛋白質定量和西方點墨法分析所用，而剩餘的 cell lysates 將進行 His-tagged 重組蛋白質之純化。

5.2 白色念珠菌的蛋白質之萃取

5.2.1 少量白色念珠菌的蛋白質之萃取

將所培養的菌液以 4°C、13,000 rpm 離心一分鐘，去除上清液，並收集菌體，以每 3 ml~5 ml 隔夜培養的菌液量收集成一管。各管的菌體再以 1 ml 1x

PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.5)清洗一至兩次，將殘餘的培養液給清洗掉，以 4°C、13,000 rpm 離心一分鐘後，去除上清液。接著每管菌體各加入 200 µl 的經過酸處理的玻璃珠[Glass beads, acid washed (Sigma)]以及 300~500 µl lysis buffer for *Candida albicans* [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5% Triton-X-100, 0.1% Tween 20, 0.5% NP40, 2 mM sodium ortho-vanadate, 2 mM PMSF, 1x protease inhibitor cocktail for fungal and yeast cells (Sigma), 10% glycerol, 10 mM β-mercaptoethanol (Sigma)]，但如果是需要進行親合力蛋白質純化的樣本，且親合力 resin 中的抗體會受到 lysis buffer 裡的清潔劑 Triton-X-100 和 Tween 20 影響時，則需使用 NP40 lysis buffer [50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1x protease inhibitor cocktail for fungal and yeast cells (Sigma), 2 mM PMSF]。以激烈震盪的方式，震盪一分鐘與置於冰上三十秒，共五次的處理，將白色念珠菌的細胞打破。接著，將每一管 cell lysates 的 1.5 ml 離心管倒置，並以酒精燈燒紅的針頭穿刺於離心管底部，然後將穿刺過後的離心管置入新的 1.5 ml 離心管中，迅速的離心，將 cell lysates 離置新的 1.5 ml 離心管中，而與玻璃珠分隔開來。接下來，以 4°C、13,000 rpm 離心十分鐘，將細胞的殘骸物與 cell lysates 分隔開來，將上清液收集起來並可進行後續的蛋白質分析。

5.2.2 大量白色念珠菌的蛋白質之萃取

將所大量培養的菌液，裝入 50 ml 的高速離心管中，接著以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五分鐘，去除上清液，並收集菌體，以每 200 ml 的菌液量收集成一管。各管的菌體再以 10 ml 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.5)清洗一至兩次，將殘餘的培養液給清洗掉，以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五分鐘後，去除上清液。接著每管菌體各加入 1 ml 的經過酸處理的玻璃珠[Glass beads, acid washed (Sigma)]以及

5 ml lysis buffer for *Candida albicans* [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5% Triton-X-100, 0.1% Tween 20, 0.5% NP40, 2 mM sodium ortho-vanadate, 2 mM PMSF, 1x protease inhibitor cocktail for fungal and yeast cells (Sigma), 10% glycerol, 10 mM β -mercaptoethanol (Sigma)], 但如果是需要進行親合力蛋白質純化的樣本，且親合力 resin 中的抗體會受到 lysis buffer 裡的清潔劑 Triton-X-100 和 Tween 20 影響時，則需使用 NP40 lysis buffer [50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 1% NP40, 1x protease inhibitor cocktail for fungal and yeast cells (Sigma), 2 mM PMSF]。以激烈震盪的方式，震盪一分鐘與置於冰上三十秒，共五次的處理，將白色念珠菌的細胞打破。接著，再以 4°C、3,000~4,000 rpm 離心五分鐘，將 cell lysates 與玻璃珠和細胞殘骸物分隔開來，並吸取上清液於新的 1.5 ml 離心管中，然後再以 4°C、13,000 rpm 離心十分鐘，將上清液收集起來並可進行後續的蛋白質分析。

6. 蛋白質之定量

本實驗是利用 Bio-Rad Protein Assay (catalog number 500-0006) 試劑來測量蛋白質濃度。首先利用 10 mg/ml 的 BSA (NEB) 來配置標準蛋白質溶液，取 300 μl 的 10 mg/ml BSA 溶於 2700 μl 的 1xPBS 中，將其濃度稀釋成 1.0 mg/ml，接下來依照下表來配置一系列的標準蛋白質溶液：

標準蛋白質濃度(mg/ml)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
所需 1.0 mg/ml BSA 的體積(μl)	100	200	400	600	800	-
所需 1x PBS 的體積(μl)	900	800	600	400	200	-
總體積(ml)	1	1	1	1	1	0.9

取 1x PBS (以此為 0 mg/ml) 以及上述所配置好的標準蛋白質溶液(0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml) 各 10 μl 出來，加入於九十六孔盤中(剩餘的標準蛋白質溶

液可以保存在-20°C中，待下次使用)，再加入已稀釋成1/5之Bio-Rad Protein Assay試劑200 µl(需做二重複)，過程中需避免氣泡的產生，如有氣泡產生，可以用注射針頭將其戳破，於室溫中反應五分鐘。接著利用全波長酵素免疫分析儀測定出OD570的數值，並以此繪出標準曲線，其CV值需小於10，R²值要大於0.95。將以1x PBS稀釋成十倍的欲定量之蛋白質樣本，同樣取出10 µl出來，加入200 µl的1/5x Bio-Rad Protein Assay試劑中(需做二重複)，測出OD570之值，其CV值需小於10，並利用標準曲線計算出蛋白質的濃度。

7. 親和力蛋白質之純化(Affinity Purification)

7.1 利用大腸桿菌 BL21 表現重組蛋白質系統

7.1.1 製備含有 His-Tagged 重組蛋白質之 Nickel Resin

將經過 IPTG 誘導重組蛋白質表現的大腸桿菌之 cell lysates，以每 1 ml 分裝成一份，共兩份，以進行製備含有 His-tagged 重組蛋白質之 nickel resin。首先將 HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) 輕微地震盪，以將 nickel resin 混合均勻，並各取 50 µl 的混合液於新的 1.5 ml 離心管中 [HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) 是以 30% 的 ethanol 進行保存，且其 nickel resin 的濃度為 50%，因此所取的 50 µl 的 HIS-Select Nickel Affinity Gel，實際上約只含有 25 µl 的 nickel resin]，共兩管。然後以 4 °C、5,000 ×g 離心三十秒至一分鐘，將保存 nickel resin 的 ethanol 給去除掉。接著各管再加入 200 µl 不含 imidazole 的 equilibration buffer (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl)，輕微地震盪混合均勻，以進行 nickel resin 的平衡作用，再以 4 °C、5,000 ×g 離心三十秒至一分鐘，去掉上清液。接下來，各管 nickel resin 各加入 1 ml 上述經過 IPTG 誘導重組蛋白質表現之大腸桿菌的 cell lysates，置於 4 °C 中，進行一至兩個小時的 His-tagged 重組蛋白質與 nickel resin 之結合作用。然後再以 4 °C、5,000 ×g 離心三十秒至一分鐘，並去除上清液，再各以 0.5 ml 的 wash buffer (50 mM

NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl)清洗兩次(而在第一次清洗時,就將 His-tagged 重組蛋白質-Ni-resin 分裝成四等分,其中一份將作為對照組所用,剩餘的三等分將進行後續的細胞外蛋白質之交互作用,所以平均一份的細胞外蛋白質交互作用,是以 7.5 ml 的大腸桿菌表現系統之菌液所抽取出的 cell lysates 進行的),每次以 4°C、5,000 ×g 離心三十秒至一分鐘,並去除上清液,便完成了製備含有 His-tagged 重組蛋白質之 nickel Resin。

7.1.2 細胞外之蛋白質交互作用

將所誘導成酵母菌與真性菌絲形態的白色念珠菌 SC5314,各以 15 ml 的菌液量,進行白色念珠菌的蛋白質之萃取,而所抽取的 cell lysates (約 1.5 ml) 將與上述所製備好的含有 His-tagged 重組蛋白質之 nickel Resin,於 4°C 的環境下,進行細胞外的蛋白質交互作用至隔天。而其中一份的 His-tagged 重組蛋白質-Ni-resin 將會和 1 ml 的 NP40 lysis buffer 進行作用,以作為 His-tagged 重組蛋白質-Ni-resin 的背景值。

7.1.3 His-Tagged 重組蛋白質和與其相關的蛋白質之純化

接著,將進行與 His-tagged 重組蛋白質的相關性蛋白質之純化,以 wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl)清洗完成細胞外蛋白質交互作用的 His-tagged 重組蛋白質-Ni-resin 兩次,以及以含有 250 mM imidazole 的 elution buffer (250 mM imidazole, 50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl)進行兩次 elution 的動作,且每一次的清洗與 elution 後,皆以 4°C、5,000 ×g 離心三十秒至一分鐘,並將上清液移除。最後,再將純化過程中的產物, input、flow through/F、wash 1/W1、wash 2/W2、elute 1/E1、elute 2/E2 和 resin/R 部份,加入 5x SDS sample buffer (0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 7% SDS, 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue) (resin/R 部分則以 1x SDS sample buffer 處理),於 95°C 加熱五至十分鐘,以進

行西方點墨法與銀染的分析。並將 elution 或是 resin 的部分以蛋白質分子量 patterns 的比較，找到可能的 His-tagged 重組蛋白質的相關性蛋白質，以便於之後以質譜儀來鑑定其蛋白質身分。

7.2 利用白色念珠菌表現重組蛋白質之系統

7.2.1 FLAG-Tagged 重組蛋白質和與其相關的蛋白質之純化

我以每 200 ml 經過 40~50 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 誘導重組蛋白質表現，以及形態誘導的菌液量，所抽取出的 cell lysates (約有 1 mg 的蛋白質量)，進行一份的 FLAG-tagged 重組蛋白質和與其相關的蛋白質之純化。首先將 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel (Sigma) 輕微地震盪，使 resin 均勻地混合於保存溶液中 [Anti-FLAG-M2 Affinity Gel (Sigma) 是以 50% glycerol, 10 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 7.4 以及 0.02% (w/v) sodium azide 進行保存，且其 resin 的濃度為 50%，因此所取的 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel 混合液的量，實際上約只含有一半的 resin 量]，接著取適量的 resin 出來於新的 1.5 ml 離心管中 (上述每 200 ml 的菌液量所抽取出的蛋白質，以 50 μl 的 resin 量進行純化)，並以 4°C、5,000~8,200 $\times\text{g}$ 離心三十秒至一分鐘，靜置 resin 一至兩分鐘，使其沉降下來，然後再將上清液去除掉。再以 0.5 ml 1x TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) 清洗 resin 兩次，並以 4°C、5,000~8,200 $\times\text{g}$ 離心三十秒至一分鐘後，去除上清液。為了要去除沒有與 gel 相結合的 anti-FLAG 抗體，所以將會以 0.5 ml 0.1 M glycine-HCl, pH 3.5 進行 resin 的清洗 (切記：不要將 resin 置於 glycine-HCl 超過二十分鐘)，然後再以 0.5 ml 1x TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) 清洗 resin 三次，而此步驟是可以選擇性來操作的。

接著，將 cell lysates 自各個菌株中抽取出來，再分別與清洗好的 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel，於 4°C 的環境下，進行兩個小時或至隔日的結合

作用。然後，於 4°C 下，以含有 150 mM NaCl 的 1x TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) 清洗完成結合作用的 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel 三次，每次十五分鐘，清洗完後，皆以 4°C、5,000~8,200 ×g 離心三十秒至一分鐘，去除上清液。再以含有 300 mM NaCl 的 1x TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl) 清洗兩次，每次十五分鐘，清洗完後，皆以 4°C、5,000~8,200 ×g 離心三十秒至一分鐘，去除上清液。接下來，再以 100 µl 的 150 ng/µl 3x FLAG peptides (Sigma)，進行一份的 FLAG-tagged 重組蛋白質和與其相關的蛋白質之 elution 的動作，此過程需於 4°C 中進行三十分鐘的反應。最後，將純化過程中的 input、elute/E 和 resin/R 部份，加入 5x SDS sample buffer (resin/R 部分則以 1x SDS sample buffer 處理)，於 95°C 加熱五至十分鐘，以進行西方點墨法和銀染分析。並將 elution 或是 resin 的部分以蛋白質分子量 patterns 的比較，找到可能的 His-tagged 重組蛋白質的相關性蛋白質，以便於之後以質譜儀來鑑定其蛋白質身分。

8. 所使用的抗體

本實驗中所使用的一級抗體有 ANTI-FLAG Polyclonal Developed in Rabbit, Affinity Isolated Antibody (Sigma)、Rabbit anti-6xHis Tag Polyclonal Antibody (濁水溪)，以及 Anti-6xHis Tag Mouse monoclonal (濁水溪)，所使用的稀釋倍數為 1:1,000~1:2,000。而所使用的二級抗體有 ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated (PIERCE) 和 goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz)，所使用的稀釋倍數為 1:10,000~1:20,000。

9. SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)

本實驗所使用的電泳裝置為 Bio-Rad 的產品。首先準備一組鑄膠器，並以二次水、95%酒精及拭淨紙將鑄膠玻璃片擦拭乾淨，將擦拭乾淨的鑄膠玻璃片置入

於三明治架中組裝好後，垂直架於鑄膠器中；可以利用二次水或是酒精來測試鑄膠裝置是否有架設好，以防止接下來所配製的膠體溶液會漏出。接下來準備含有 SDS (sodium dodecyl sulfate) 之 10% 聚丙烯醯胺分離膠體溶液，每片分離膠體 (separating gel) 需 4 ml d_2H_2O ，3.3 ml acrylamide (acrylamide/bis 29:1)，2.5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8，100 μ l 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)，100 μ l 10% APS (ammonium persulfate)，8 μ l TEMED (tetramethylenediamine)。將上述的試劑均勻混和後，加入於已架設好的鑄膠玻璃片至八成高，再小心翼翼地加上一層 95% 酒精，靜置二十分鐘。待膠體凝固後，去除上層 95% 酒精，加入聚焦膠體溶液至滿，每片聚焦膠體 (stacking gel) 需 3.4 ml d_2H_2O ，830 μ l acrylamide (acrylamide/bis 29:1)，630 μ l 1.0 M Tris-HCl pH 6.8，50 μ l 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)，50 μ l 10% APS (ammonium persulfate)，10 μ l TEMED (tetramethylenediamine)，並插入樣品齒槽模 (comb)，靜置二十分鐘。待膠體凝固後，將樣品齒槽模取下，並以二次水清洗樣本槽 (well)，即可進行電泳；若不立刻使用，可把整個膠片組合用 1x running buffer (19.2 mM glycine, 0.1% SDS, 2.5 mM Tris base) 沾濕的擦手紙包好，浸泡於 1x running buffer 中，勿使其乾掉，在 4°C 中約可保存一個禮拜。架設膠片組合至電泳槽中，取 1x running buffer 加於正負極槽內，將欲電泳之蛋白質與 SDS sample buffer 混和後，於 100°C 中加熱十分鐘，放冷後注入樣本槽，並注入蛋白質標準溶液以為蛋白質分子量的對照，固定電壓於 80 V 三十分鐘，進行蛋白質分子聚焦作用；接下來固定電壓於 100 V，進行蛋白質分子分離作用，待染劑泳動至膠片底部時，終止電泳，取出膠片即可進行蛋白質顯現 (protein visualization)，即銀染 (silver staining) 或 coomassie blue 染色，抑或是進行西方點墨法分析 (western blotting)。

10. 西方點墨法分析 (Western Blotting)

SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 完成後，將膠片組合取出，並以二次

水稍微沖洗一下，取出膠片後浸泡於 1x semi-dry transfer buffer [48 mM Tris base, 39 mM glycine, 0.37% (vol/vol) SDS, 20% methanol] 中。準備比膠片稍大之 Whatman 3MM Chromatography 濾紙，以及與膠片等大之 PVDF 轉印膜(使用前先以適量的甲醇浸泡五分鐘，接著再以二次水洗去甲醇)，分別浸泡於 1x semi-dry transfer buffer 中。以 1x semi-dry transfer buffer 潤濕半乾式蛋白質轉漬裝置 (Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) 之電極板，接著從正極至負極的電極板方向依序將三張 Whatman 3MM Chromatography 濾紙、一張 PVDF 轉印膜、待分析之膠片，以及三張 Whatman 3MM Chromatography 濾紙置入於半乾式蛋白質轉漬裝置中，而組裝的過程中需將氣泡趕出。固定電壓 25 V (伏特數不得超過 25)，電流 150 mA 進行八十分鐘的蛋白質轉漬。轉印完之 PVDF 轉印膜以 1x TBS (2.5 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7.4) 稍微清洗一下，接下來加入 blocking solution (5% 安佳脫脂奶粉，以 1x TBS 配置) 於室溫中作用一個小時後，倒去 blocking solution，並以 1x TBST (2.5 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0.3% Tween 20, pH 7.4) 清洗三次，每次五分鐘；清洗完後，加入以 blocking solution (3% 安佳脫脂奶粉，以 1x TBS 配置) 稀釋之一級抗體於室溫中作用一個小時，或是在 4°C 的環境下作用至隔夜。一個小時後或隔日，將稀釋之一級抗體回收待下次分析使用或是去除，以 1x TBST 清洗 PVDF 轉印膜三次，每次五分鐘，再加入以 blocking solution (3% 安佳脫脂奶粉，以 1x TBS 配置) 稀釋的 HRP-conjugated 二級抗體，於室溫中作用一至兩個小時，作用完畢後，將稀釋的 HRP-conjugated 二級抗體回收待下次分析使用或是去除，以 1x TBST 清洗三次，每次五分鐘。接下來以 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (PIERCE) 呈色，將等體積的受質 I 和受質 II 混合均勻後，加入 PVDF 轉印膜上於室溫避光處反應五分鐘且予之呈色。接著以冷光螢光數位分析系統進行冷光偵測，並且以富士的 ImageGauge 3.46 和 L Process v1.96 軟體進行標的蛋白質的量化與分析。

11. 蛋白質之顯現(Protein Visualization)

11.1 銀染(Silver Staining) (Blum et al., 1987)

經過 SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳之膠片，稍微以二次水清洗一下，接著將其浸泡於 Solution A (50% methanol, 25% glacial acetic acid) 中，進行兩個小時的固定作用。兩個小時後，將膠片至於 Solution B (30% methanol) 中浸泡十五分鐘，接下來用二次水清洗膠片三次，每次五分鐘；清洗完後的膠片再浸泡於 Solution C (0.8 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 兩分鐘。兩分鐘後再以二次水清洗膠片三次，每次三十秒；接著將膠片至於 Solution D (0.2% AgNO_3) 中，進行二十五分鐘的銀染作用，此過程需要避光。銀染作用完畢後，用二次水清洗膠片兩次，每次三十秒；接著將膠片浸泡於 Solution E (0.28 M Na_2CO_3 , 0.185% formaldehyde and 0.016 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 中，進行呈色作用，約四到八分鐘(呈色的時間還是以自己的經驗為主)，緊接著快速地用二次水清洗膠片(此步驟可以省略)，再加入 Solution F (0.042 M $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 以終止呈色反應。

由於銀染的敏感度高，可以達到 0.3~10 ng 的蛋白質偵測量(Switzer et al., 1979)，是 coomassie blue staining 的一百倍(ExpASY Proteomics Server)，所以執行銀染的整個過程中，所使用到的物品都要用清潔劑清洗乾淨，而上述的 Solution A~F 要現配使用較好。另外，由於 AgNO_3 為重金屬物質，所以其所配製的溶液，需要回收至廢液桶中，交由環安中心處理，以防止不必要的環境污染。

11.2 Coomassie Blue Staining

經過 SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳之膠片，稍微以二次水清洗一下，接著將其浸泡於 staining buffer (每 100 ml 的 staining buffer 含有 0.25 g coomassie brilliant blue R-250, 10 ml glacial acetic acid, 45 ml methanol, 和 45 ml $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$) 中，進行二十分鐘的染色作用，如果是使用重覆使用的 staining buffer 時，可能需要作用

久一點的時間，直到整片膠片呈現藍色即可。接著，以 destaining buffer (25% methanol, 10% acetic acid, 65% d₂H₂O)進行退染作用，每次十五分鐘，大約三次即可將背景值褪除乾淨，需將膠片的背景值褪到呈現透明色較好。最後將膠片以二次水清洗一下，即可利用二次水進行保存，或是將膠片以玻璃紙進行乾膠保存。



結果

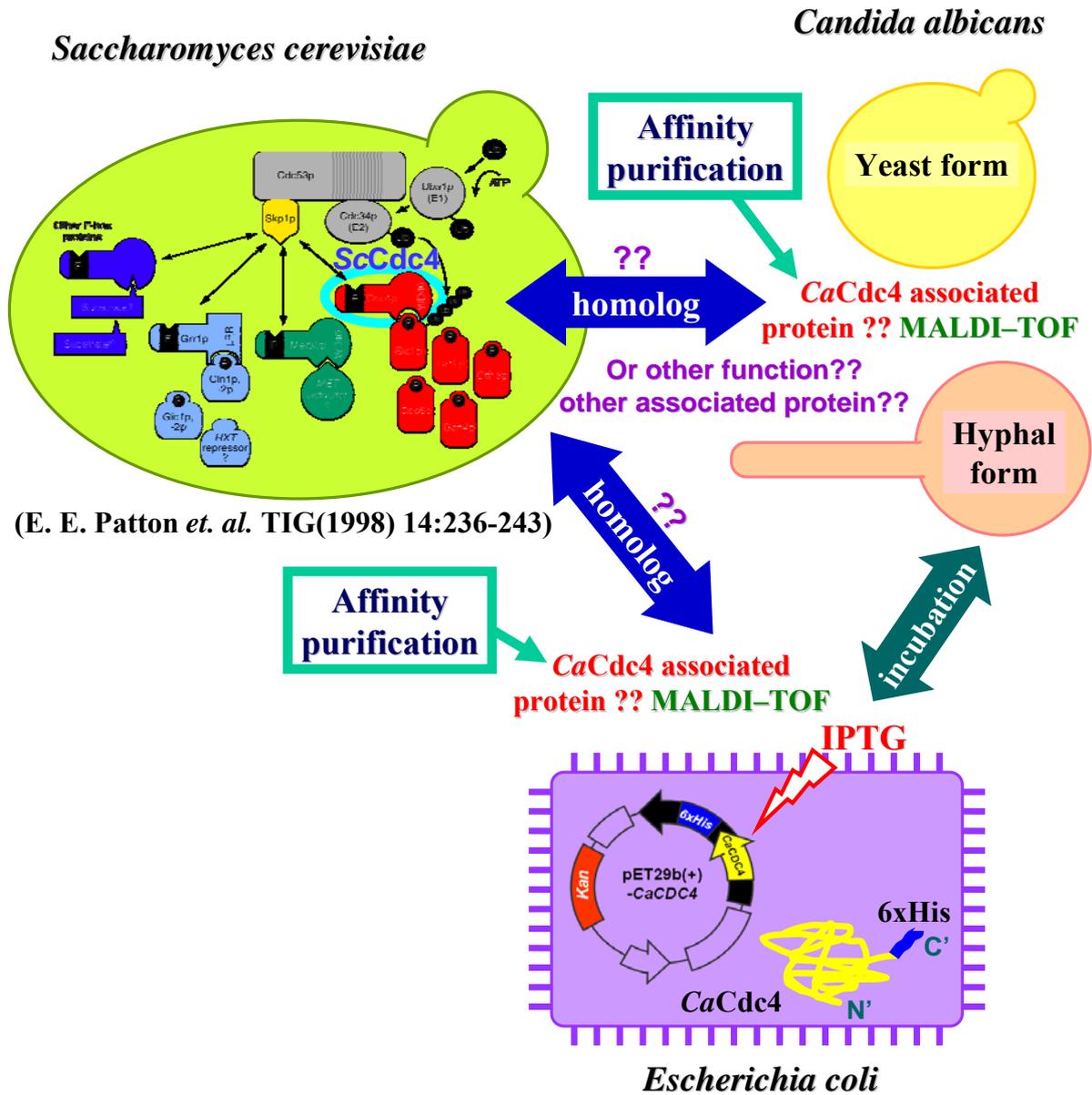
1. 運用親和力蛋白質純化法找出與白色念珠菌 Cdc4 的相關性蛋白質之策略與構想

由於在出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)中，對於其 Cdc4 的功能以及相關性的蛋白質已有很清楚的研究與認識，且白色念珠菌(*Candida albicans*)和出芽酵母菌在同屬的親緣關係上較其他真菌類物種是很相近的(Heckman et al., 2001)，所以對於白色念珠菌的研究，將會基於出芽酵母菌的研究方法和已知的基因功能來進行探討與推論(Berman and Sudbery, 2002)。但相較於出芽酵母菌 *CDC4* (*ScCDC4*)，白色念珠菌的 *CDC4* (*CaCDC4*)並非必要的基因，且 *CaCdc4* 在白色念珠菌中，與 *ScCdc4* 在出芽時細胞週期扮演重要角色不同，而是與菌絲形態的生成有關(Atir-Lande et al., 2005; Shieh et al., 2005)。所以 *CaCdc4* 在白色念珠菌中，是否是以 SCF complex 的形式來執行其功能，其是否為 SCF complex 的成員之一；而雖然已有研究證實 *CaSol1* 和 *CaCdc4* 有遺傳上的交互作用關係，且可能為 *CaCdc4* 的受質(Atir-Lande et al., 2005)，但 *CaSol1* 是否和 *CaCdc4* 有直接的交互作用關係，或是彼此之間的關係是由許多的因子在調控著，而 *CaCdc4* 是否除了 *CaSol1* 還有其他與白色念珠菌形態生成有關的受質，或是其他功能上的相關受質；另外 *CaCdc4* 是否具有上游的調控者來調節其功能等；這些是我想要探討的議題。

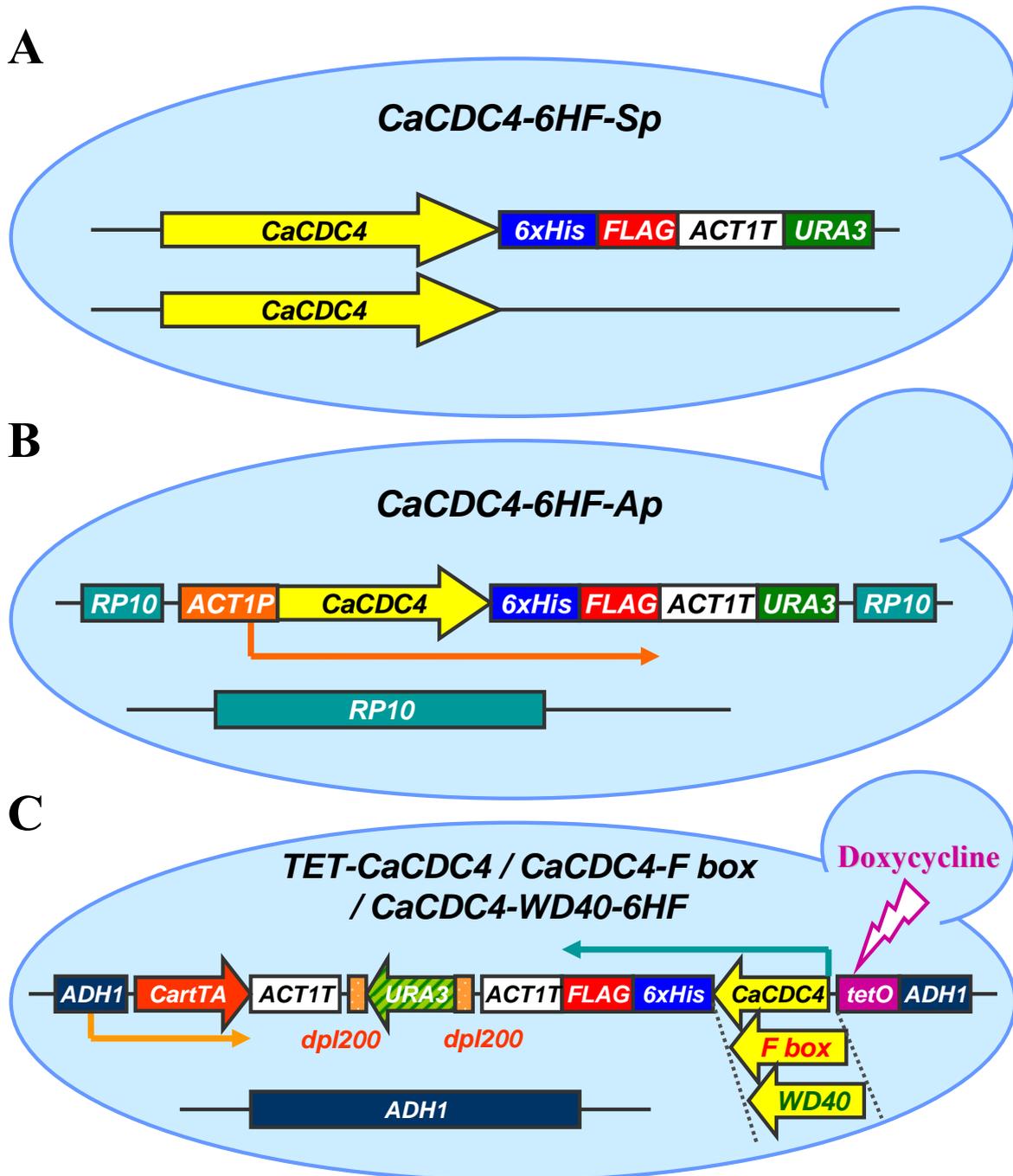
因此，在這次的研究當中，想藉由 6xHis-FLAG tag 來分別標定 *CaCdc4*，和 *CaCdc4* 的 F box 以及 WD40 domain 的部份，並運用親和力蛋白質純化法，直接分別於酵母菌和真性菌絲生長形態的白色念珠菌中所表現的 6xHis-FLAG-tag 之重組蛋白質和其相關性的蛋白質給純化出來，並利用 SDS-PAGE 和銀染(silver staining)的方式，將 *CaCdc4* 和 *CaCdc4* 的 F box 以及 WD40 domain 的部份，與其相關性的蛋白質給呈現出來，然後運用 MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) -TOF (time-of-flight) 質譜儀技術來鑑定出與 *CaCdc4* 的相關

性蛋白質(圖一)。另外，也藉由大腸桿菌 BL21 的表現系統，來大量表現以 6xHis tag 所標定的 *CaCdc4* 重組蛋白質，並將此 *CaCdc4*-6xHis 重組蛋白質分別與酵母菌和真性菌絲生長形態的白色念珠菌之 cell lysates 進行細胞外的蛋白質交互作用，同樣也將運用親和力蛋白質純化法、SDS-PAGE 和銀染，以及 MALDI-TOF 質譜儀技術來鑑定出與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質(圖一)。而這些與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質是否與 *ScCdc4* 的相關性蛋白質具有同源性的關係，或是有別的作用與功能，以及可能擁有不同的相關性蛋白質等，將也會是我們所想要研究的方向與議題(圖一)。

為了希望可以達成上述的研究目標，首先必需建構出能夠表現 *CaCdc4*-6xHis-FLAG 重組蛋白質的白色念珠菌菌株來。但由於並不清楚 *CaCdc4* 在白色念珠菌細胞內的實際表現量以及其穩定度會是如何；且當在持續性地表現 *CaCdc4* 的情況下，是否會對細胞造成傷害；以及希望可以得到大量表現的 *CaCdc4*-6xHis-FLAG 重組蛋白質，以方便後續的純化與分析。所以分別利用 *CaCDC4* 內生性的 promoter、*ACT1* promoter (為能持續性地表現下游基因的 promoter)，以及 TET-on system 來誘導 *CaCdc4*-6xHis-FLAG 重組蛋白質分別於酵母菌與真性菌絲生長形態的白色念珠菌中表現(見圖二)：利用 *CaCDC4* 內生性的 promoter 所建構出的 *CaCDC4*-6HF-*Sp* (*Sp*: self promoter)白色念珠菌菌株(圖二 A)，最能夠接近 *CaCdc4* 在白色念珠菌內的真實情況，與所純化下來的 *CaCdc4* 相關性蛋白質，也會是最接近真實的情形。但如果 *CaCdc4* 本身在白色念珠菌的表現量很低時，且其表現量不足以進行後續的純化與分析，則可利用 *ACT1* promoter 所建構出的 *CaCDC4*-6HF-*Ap* (*Ap*: *ACT1* promoter)白色念珠菌菌株(圖二 B)；*ACT1* promoter 為可以持續性地表現 *CaCdc4*-6xHis-FLAG 重組蛋白質的 promoter，所以希望可以藉由此菌株的建構，來解決可能會因為 *CaCdc4* 於白色念珠菌中表現量低所帶來的困擾。可是持續性地表現 *CaCdc4* 會不會對白色念珠菌造成毒性，或是 *CaCdc4* 本身並不為穩定性的蛋白質，且白色念珠菌會不會有一些反應機制，而陸陸續續將持續表現的 *CaCdc4* 給分解掉，而導致最後的蛋白



圖一、運用親和力蛋白質純化法找出與白色念珠菌 Cdc4 的相關性蛋白質之策略與構想。由於對於出芽酵母菌 Cdc4 的功能以及其相關性的蛋白質已有很清楚的研究與認識，對於白色念珠菌的研究可藉其與出芽酵母菌基因同源性而類推。所以希望藉由親和力蛋白質純化法，分別於白色念珠菌的酵母菌和真性菌絲生長形態下，以及利用大腸桿菌 BL21 的表現系統與細胞外的蛋白質交互作用，來找到與 CaCdc4 的相關性蛋白質，並運用 MALDI-TOF 質譜儀技術進行蛋白質身分鑑定。



圖二、建構不同表現量的 6xHis-FLAG-Tagged 重組蛋白質之白色念珠菌菌株。
 A. *CaCDC4-6HF-Sp* (self promoter) 菌株，是以 *CaCDC4* 內生性的 promoter 來啟動 *CaCdc4-6HF* 的表現。
 B. *CaCDC4-6HF-Ap* (*ACT1* promoter) 菌株，是以 *ACT1* promoter 來持續性地表現 *CaCdc4-6HF*。
 C. *TET-CaCDC4/CaCDC4-F box/CaCDC4-WD40-6HF*，是以 doxycycline 來誘導 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質的表現。

質量不足以進行純化與分析；所以為了解決這樣的可能性，也會利用 TET-on system 的方式來建構白色念珠菌菌株 *TET-CaCDC4-6HF* (圖二 C)，利用 doxycycline 來誘導 *CaCdc4-6xHis-FLAG* 的大量表現，當需要時才讓白色念珠菌大量表現蛋白質，且此為立即性的大量表現反應，因此白色念珠菌可能沒有辦法立即的把 *CaCdc4* 給分解掉，或是可以降低因 *CaCdc4* 持續性的表現所造成的細胞傷害。另外，也會運用 TET-on system 所建構的 *TET-CaCDC4-F box-6HF* 和 *TET-CaCDC4-WD40-6HF* 白色念珠菌菌株(圖二 C)，來分別討論 *CaCdc4* 的 F box domain 部份會不會找到與 SCF complex 的成員有相關性結合的蛋白質，以及在 *CaCdc4* 的 WD40 domain 部份會不會找到相關性的受質等等，且也希望可以藉此白色念珠菌菌株來解決 *CaCdc4* 本身可能不穩定的情況。最後，也會運用大腸桿菌 BL21 的蛋白質表現系統，利用建構得到的 pET-29b(+)-*CaCDC4* 於大腸桿菌菌株表現 *CaCdc4-6xHis*，經純化後，希望可以藉由細胞外蛋白質交互作用來找到與 *CaCdc4* 相關性的蛋白質，且藉由原核生物的表現系統，希望可以減少與降低可能因真核生物的轉譯後修飾所造成 *CaCdc4* 不穩定的情形，以進而找出與 *CaCdc4* 較有可能的相關性蛋白質。

2. 建構不同表現量的 6xHis-FLAG-Tagged *CaCdc4* 重組蛋白質之白色念珠菌菌株

2.1 *CaCDC4-6HF-Sp* (self promoter) 菌株的建構

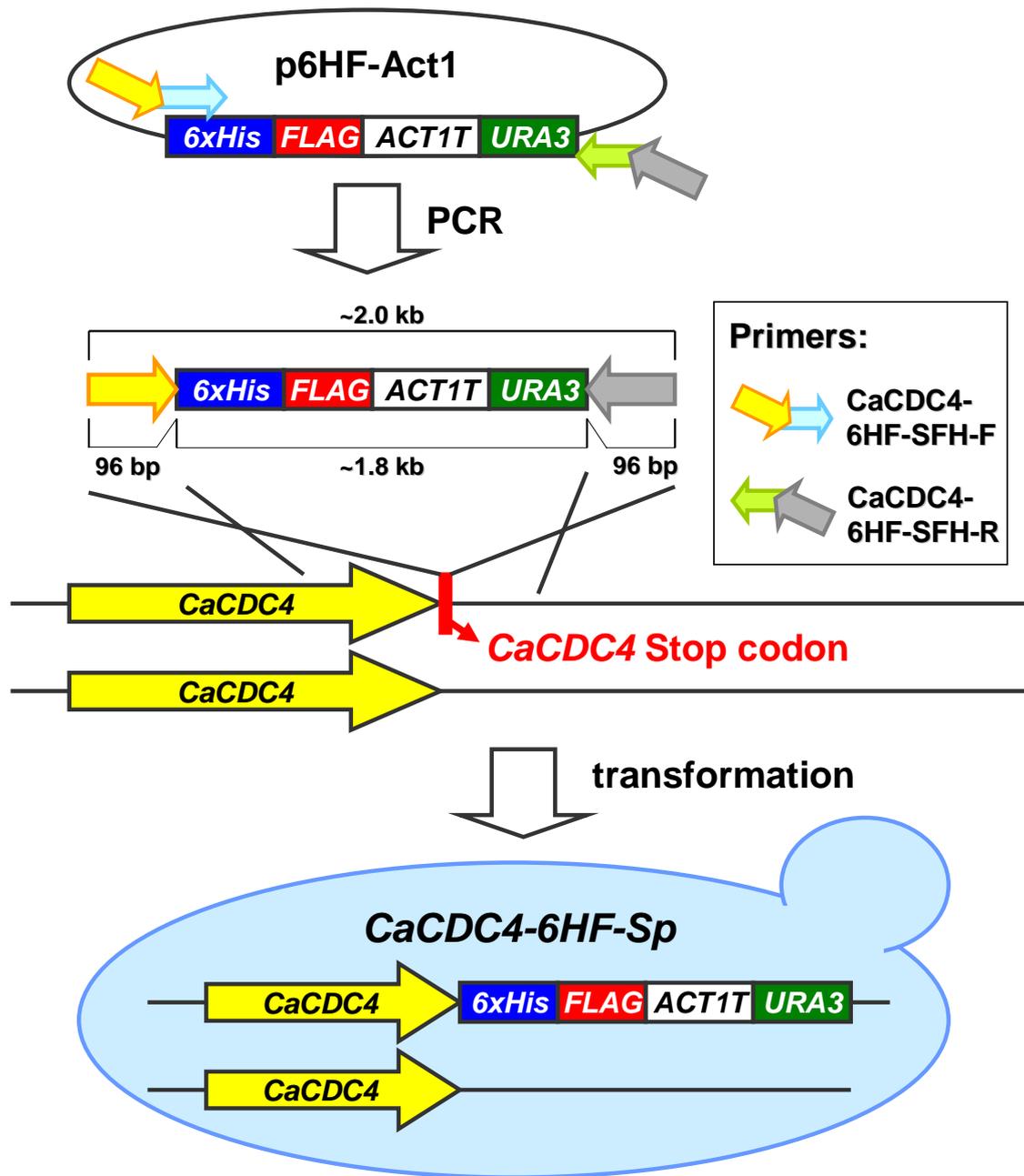
這次運用 p6HF-Act1 載體和 PCR 的方式(Kaneko et al., 2004)製備出含有 6xHis-FLAG epitope 的轉譯序列、*ACT1* terminator (*ACTIT*)、*URA3* selection marker，以及 *CaCDC4* 轉錄終點的上游和下游各 96bp (不包含轉錄終點之密碼子)的 short-flanking homology (SFH)序列之 *CaCDC4-SFH-6HF* (6xHis-FLAG tag) PCR-base integration cassette (~2.0 kb)，並進而利用醋酸鋰酵母菌轉形實驗(LiAc yeast transformation) 製備出以 *CaCDC4* 自身的 promoter 來啟動

6xHis-FLAG-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質之表現的 *CaCDC4-6HF-Sp* (Sp: *self promoter*) 白色念珠菌菌株(圖三)。

p6HF-Act1 載體上含有 *RP10*、*ACT1* promoter (*ACT1P*)、MCS (multi-cloning sites)、6xHis-FLAG epitope 的轉譯序列、*ACT1* terminator (*ACT1T*)，以及 *URA3* 與 Ampicillin selection marker (見 P.34 附圖十一)。設計一對長序列的引子，*CaCDC4-6HF-SFH-F* (forward)和 *CaCDC4-6HF-SFH-R* (reverse) (圖三和表一)：*CaCDC4-6HF-SFH-F* 含有 *CaCDC4* 轉錄終點的上游 96bp 之 SFH 序列(不包含轉錄終點之密碼子)，與 p6HF-Act1 載體上的 MCS 以及一部份 6xHis epitope 的轉譯序列；而 *CaCDC4-6HF-SFH-R* 則含有 *CaCDC4* 轉錄終點的下游 96bp 之 SFH 序列(同樣也不包含轉錄終點之密碼子)，和 p6HF-Act1 載體上 *URA3* selection marker 轉錄終點的下游序列。利用此對長序列的引子與 *Taq* 聚合酶連鎖反應，將含有 6xHis-FLAG epitope 的轉譯序列、*ACT1* terminator (*ACT1T*)、*URA3* selection marker，以及 *CaCDC4* 轉錄終點的上游和下游各 96bp (不包含轉錄終點之密碼子)的 SFH 序列之 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette (~2.0 kb)給製備出來，並以 pCR2.1-TOPO 載體進行保存(圖四)，和以 DNA 定序確認此 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette 的序列是正確無誤的。

接著再以 *BstXI* 限制酶來製備出欲進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗的 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette (圖四)，將此製備好的 PCR cassette 進行醋酸鋰酵母菌的轉形實驗，藉由 *CaCDC4-SFH* 的序列進行同源互換，將 6xHis-FLAG epitope 的轉譯序列、*ACT1* terminator (*ACT1T*)、*URA3* selection marker 置於 *CaCDC4* 的下游，並經由 SC-ura 的固態培養基之篩選，以得到以 *CaCDC4* 自身的 promoter 來啟動 6xHis-FLAG-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質之表現的 *CaCDC4-6HF-Sp* 白色念珠菌菌株(圖三)。

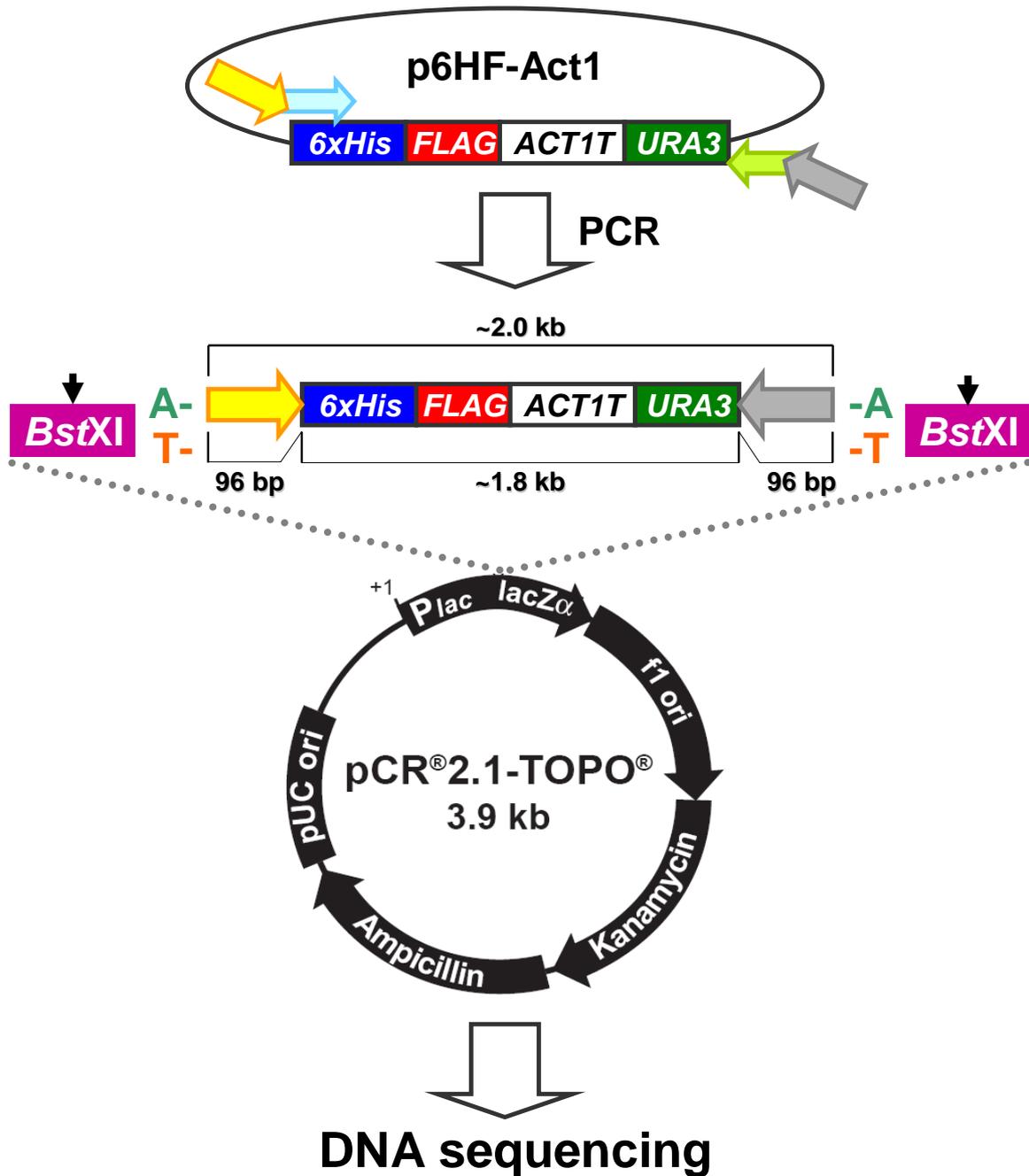
目前雖然有挑到許多 Ura⁺的轉形菌株，且也經過兩個世代的複印篩選，挑到可能的 *CaCDC4-SFH-6HF* 白色念珠菌菌株(圖五)，但在酵母菌菌落聚合酶連



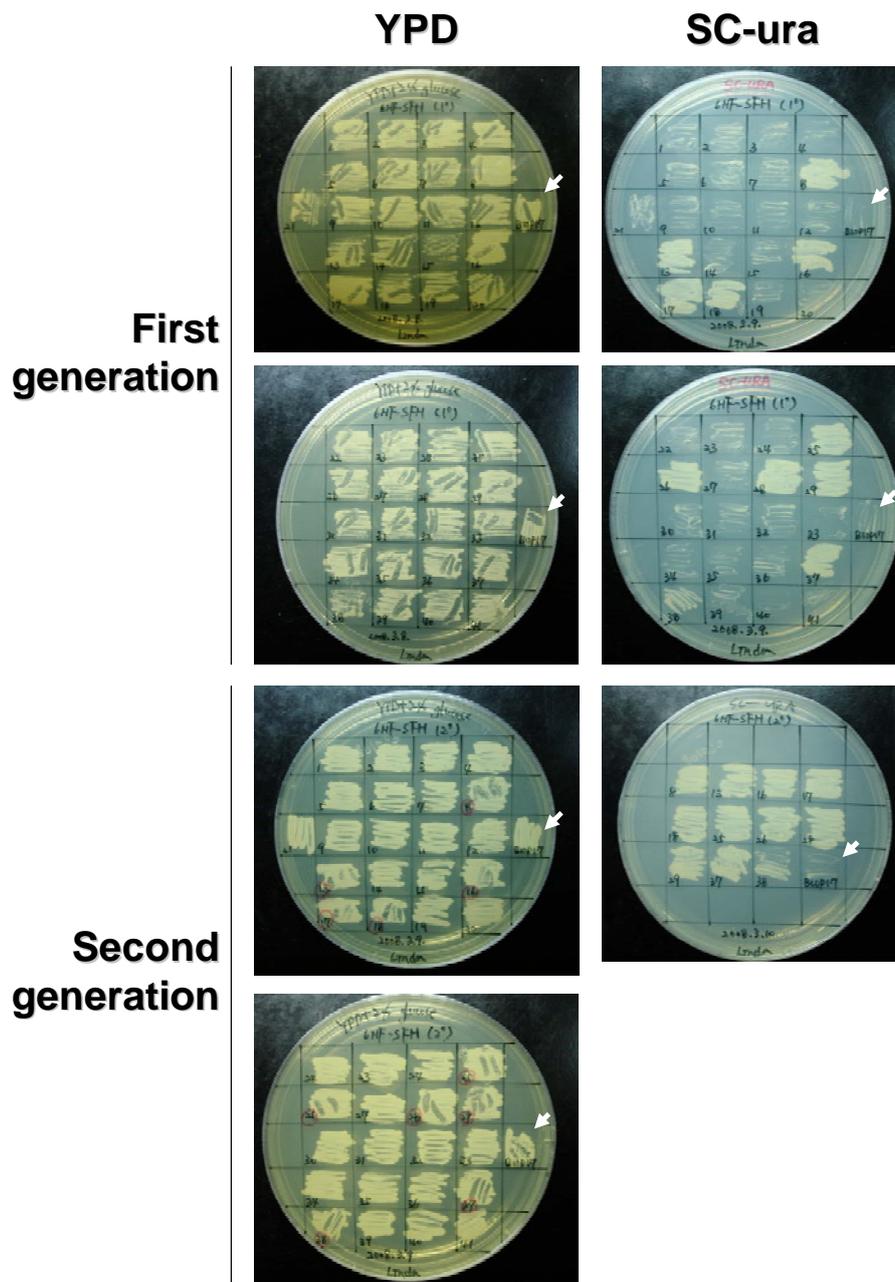
圖三、*CaCDC4-6HF-Sp* (self promoter) 菌株的建構。設計一對長序列的引子，*CaCDC4-6HF-SFH-F* 和 *CaCDC4-6HF-SFH-R*，以 *p6HF-Act1* 載體為模板，並利用 PCR 的方式來製備出含有 6xHis-FLAG tag 轉譯序列、*ACT1T*、*URA3*，以及不包含 *CaCDC4* 轉錄終點之上游與下游各 96bp 的 short-flanking homology (SFH) 序列之 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette (~2.0 kb)，接著以醋酸鋰酵母菌轉形實驗來製備出 *CaCDC4-6HF-Sp* 白色念珠菌菌株。

表一、PCR 所使用之引子、作用條件及產物大小

Name of Primer	Primer Sequence	PCR Condition	Size of PCR Product
CaCDC4-6HF-SFH-F	5'-TAC AAA AGA TGT GTC GCA GCT GTT CAA AGA ATT ATT AAT GAA GAT GAA GGT GAA ACG TTT ATT GAG ATT CTA GAT TTC AGT CAA CCA CTT TTA CAG <u>ctc gag ggt gca tgc cac</u> -3'	94°C 5', (94°C 30'', 55°C 30'', 72°C 3') × 35 cycles, 72°C 10', 4°C hold	~2,000 bp
CaCDC4-6HF-SFH-R	5'-ACT ACT CAT AAT AAA ACT TAT AAA GGA GAG CTA AAA ACA AAA AAA AAA AAC AAA AAA CAA AGA AAA ATA ACA AAA TTC ATA GAA CTA ATT TAG TAC <u>gag cgg ata aca att tca cac agg</u> -3'		
RP10(UP)-detect-F	5'-TAG TGT GTG TGT TCC AAG TCC CAG -3'	94°C 4', (94°C 30'', 52.2°C 1', 72°C 1') × 35 cycles, 72°C 7', 4°C hold	~1,374 bp
ACT1P-detect-R	5'-ACA GAT AAG TTT CAG GTT TGC CAG-3'		
iCDC4-F-2	5'-GGC AAG TTA GAT TTG ATT ACA-3'	94°C 4', (94°C 30'', 55°C 1', 72°C 1') × 35 cycles, 72°C 7', 4°C hold	~554 bp
ACT1T-3'	5'-ATT TTA TGA TGG AAT GAA TGG-3'		



圖四、利用 pCR2.1-TOPO 載體來保存 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette。將 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette (~2.0 kb) 以 pCR2.1-TOPO 載體進行保存，並以 DNA 定序確認此 PCR cassette 的序列是正確無誤的，接著即可以利用 pCR2.1-TOPO 載體上的 *BstXI* 限制酶切點來製備出 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette，以進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗。



圖五、經過兩個世代的複印篩選，所得到可能為 *CaCDC4-6HF-Sp* 之 Ura⁺轉形菌株。經由醋酸鋰酵母菌轉形實驗所得到的菌落，再以 YPD 和 SC-ura 固態培養基進行兩個世代的複印篩選，以篩選出基因型態穩定存在的 Ura⁺轉形菌株，由此次醋酸鋰酵母菌轉形實驗所得到的四十一個菌落中，共有十一個菌落的基因型態為穩定存在的 Ura⁺轉形菌株。白色箭頭為 BWP17，以作為對照組。

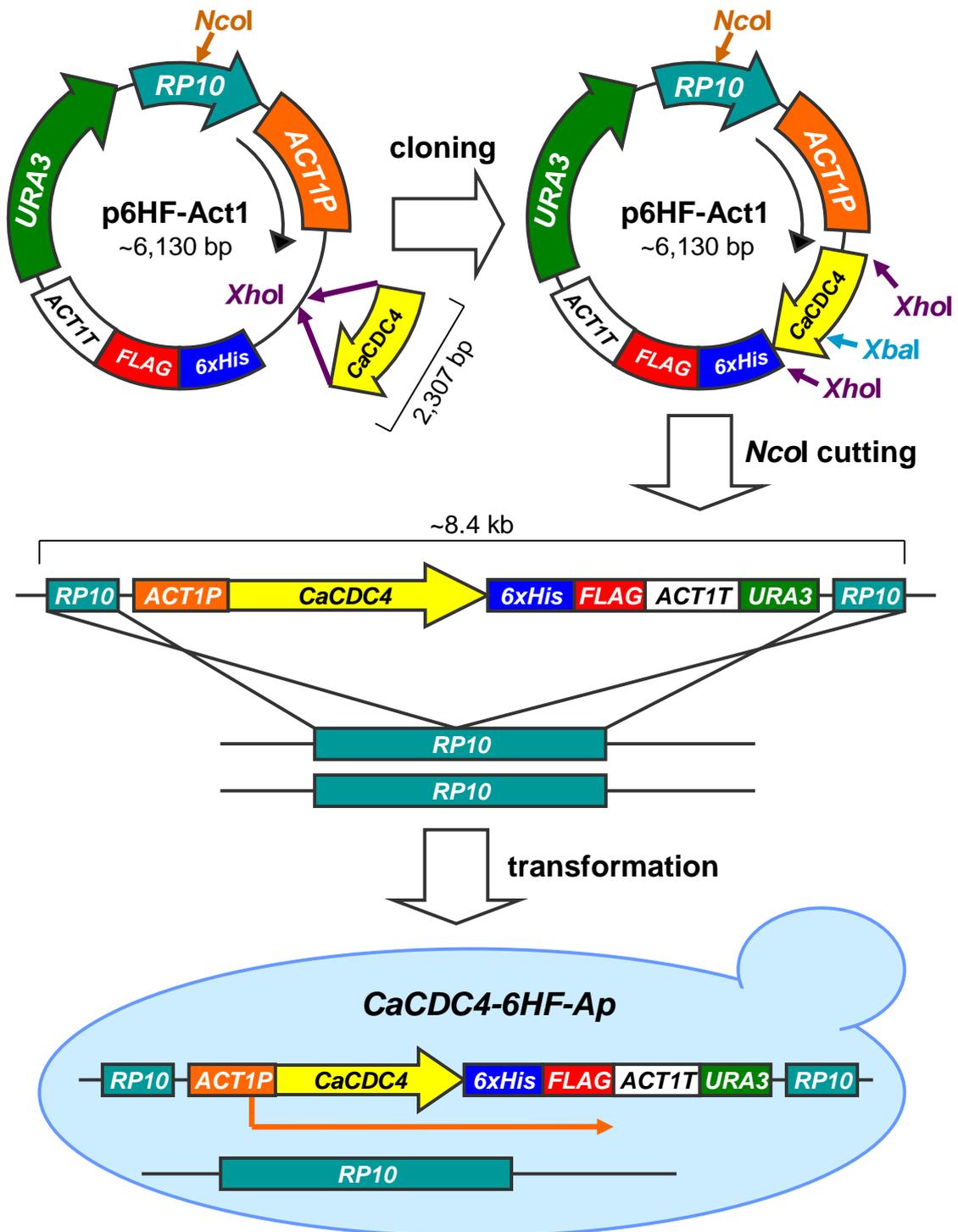
鎖反應確認下，並沒有從這些 Ura⁺的轉形菌株中得到所要的 *CaCDC4-SFH-6HF* 白色念珠菌菌株，所以目前並沒有建構出 *CaCDC4-SFH-6HF* 白色念珠菌菌株。

2.2 *CaCDC4-6HF-Ap (ACT1 promoter)* 菌株的建構

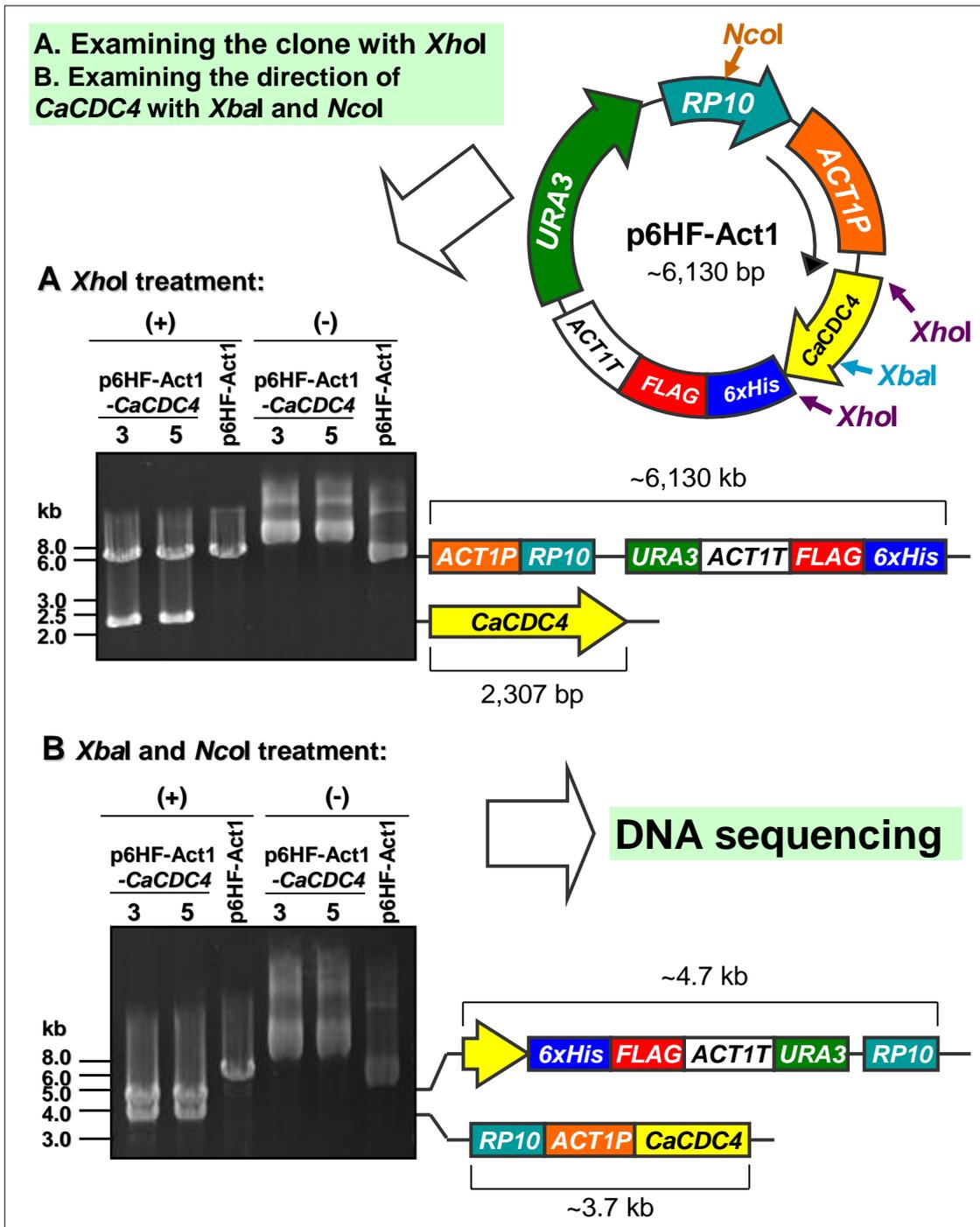
在這次白色念珠菌菌株的建構中，首先製備出 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體 (~8.4 kb)，接著再利用 p6HF-Act1 載體上的 *RP10* 基因 (大約在此基因的中間位置有單一個 *NcoI* 限制酶切點)，以 *NcoI* 限制酶處理，將此 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體切成線狀的 DNA 片段 (~8.4 kb)，且此 DNA 片段的兩端各為 *NcoI* 限制酶切點前與後的 *RP10* 序列，再將此片段進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗，則此片段將會置入 *RP10* 上，以製備出利用 *ACT1* promoter 來持續啟動 6xHis-FLAG-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質表現的 *CaCDC4-6HF-Ap* (Ap: *ACT1* promoter) 白色念珠菌菌株 (圖六)。

將 *CaCDC4* open reading frame (ORF) (*CaCDC4* 的 ORF 序列是由 *Candida* Genome Database 而來) 自己製備且經定序確認好的 pCR2.1-TOPO-*CaCDC4* 質體，利用 *XhoI* 限制酶將此 *CaCDC4* 片段置入 p6HF-Act1 載體上的 MCS 之 *XhoI* 限制酶切點內，以製備出 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體 (~8.4 kb) (圖六上)。然後再利用限制酶反應來確認所製備出的 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體是正確的 (圖七)：當利用 *XhoI* 限制酶反應時，編號 3 和 5 的 p6HF-Act1-*CaCDC4* 有釋出 *CaCDC4* 片段大小的 band (2,307 bp) (圖七 A)；且由於是利用相同的 *XhoI* 限制酶切點進行 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體的建構，所以會運用 *RP10* 上的 *NcoI* 與靠近 *CaCDC4* 之 5 端的 *XbaI* 限制酶切點來確定 *CaCDC4* 的方向性，以此確定出編號 3 和 5 的 *CaCDC4* 在 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體上為正確的方向性 (圖七 B)；最後再以 DNA 定序來確認此 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體是正確無誤的。

將此經過 *NcoI* 限制酶反應的 p6HF-Act1-*CaCDC4* DNA 片段 (~8.4 kb，其上含有 *ACT1* promoter，以及緊接在 *ACT1* promoter 之下游的 *CaCDC4*、



圖六、*CaCDC4-6HF-Ap* (*ACT1* promoter) 菌株的建構。首先建構出 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體，接著利用 *RP10* 上的 *NcoI* 限制酶切點，將 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體製備成線狀的 DNA 片段(~8.4 kb)，並將此片段進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗，而此片段便會置於 *RP10* 基因座上，以建構出 *CaCDC4-6HF-Ap* 白色念珠菌菌株。



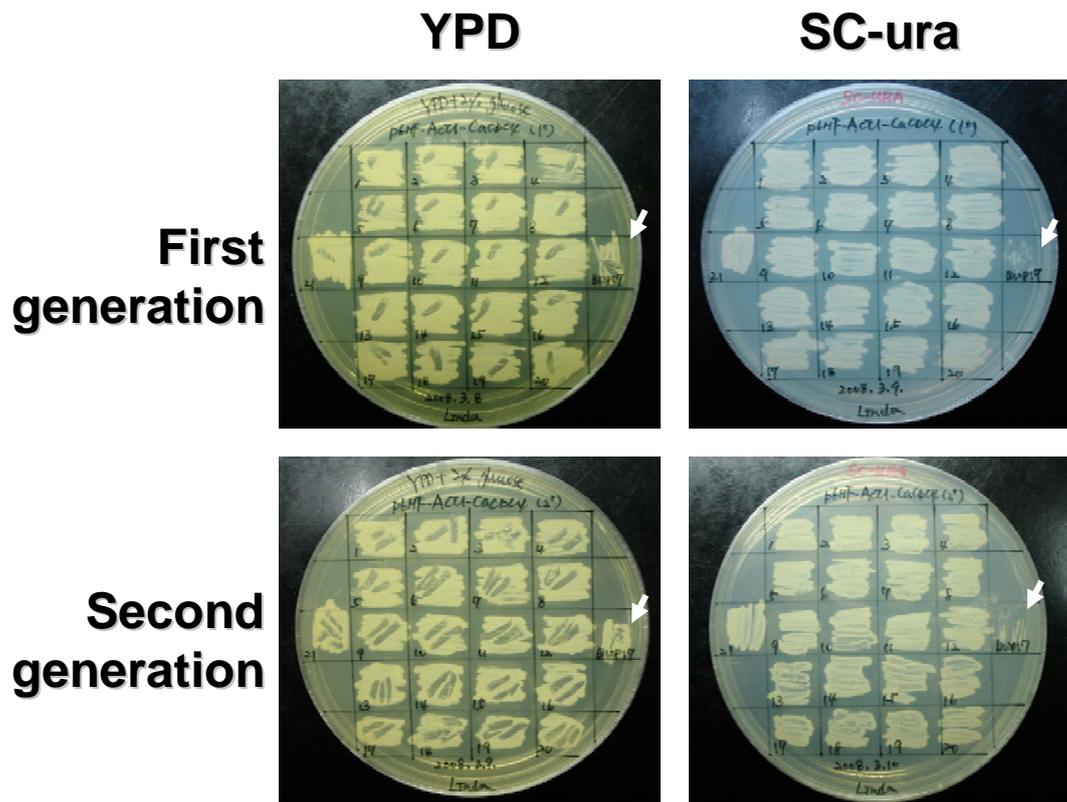
圖七、p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體的製備。利用 *XhoI* 限制酶切點，將 *CaCDC4* 置於 p6HF-Act1 載體上，以得到 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體(~8.4 kb)。A. 利用 *XhoI* 限制酶反應時，編號 3 和 5 的質體上有 *CaCDC4* 的片段(2,307 bp)。B. 利用 *XbaI* 和 *NcoI* 限制酶處理時，編號 3 和 5 的 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體，其 *CaCDC4* 的方向是正確的。所得到的 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體也經過 DNA 定序確認無誤。(+)：表示有進行限制酶反應；(-)：為沒有進行限制酶反應，以作為對照組。

6xHis-FLAG epitope、*ACT1* terminator，和 *URA3* selection marker 序列，而兩端則含有 *NcoI* 限制酶切點前與後的 *RP10* 序列)，進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗，並利用此 DNA 片段的兩端 *NcoI* 限制酶切點前與後的 *RP10* 序列進行同源互換，以將此 DNA 片段置入 *RP10* 的基因座上，且經由 SC-ura 的固態培養基與兩個世代的複印篩選，挑到許多 Ura⁺ 的轉形菌株(圖八)。

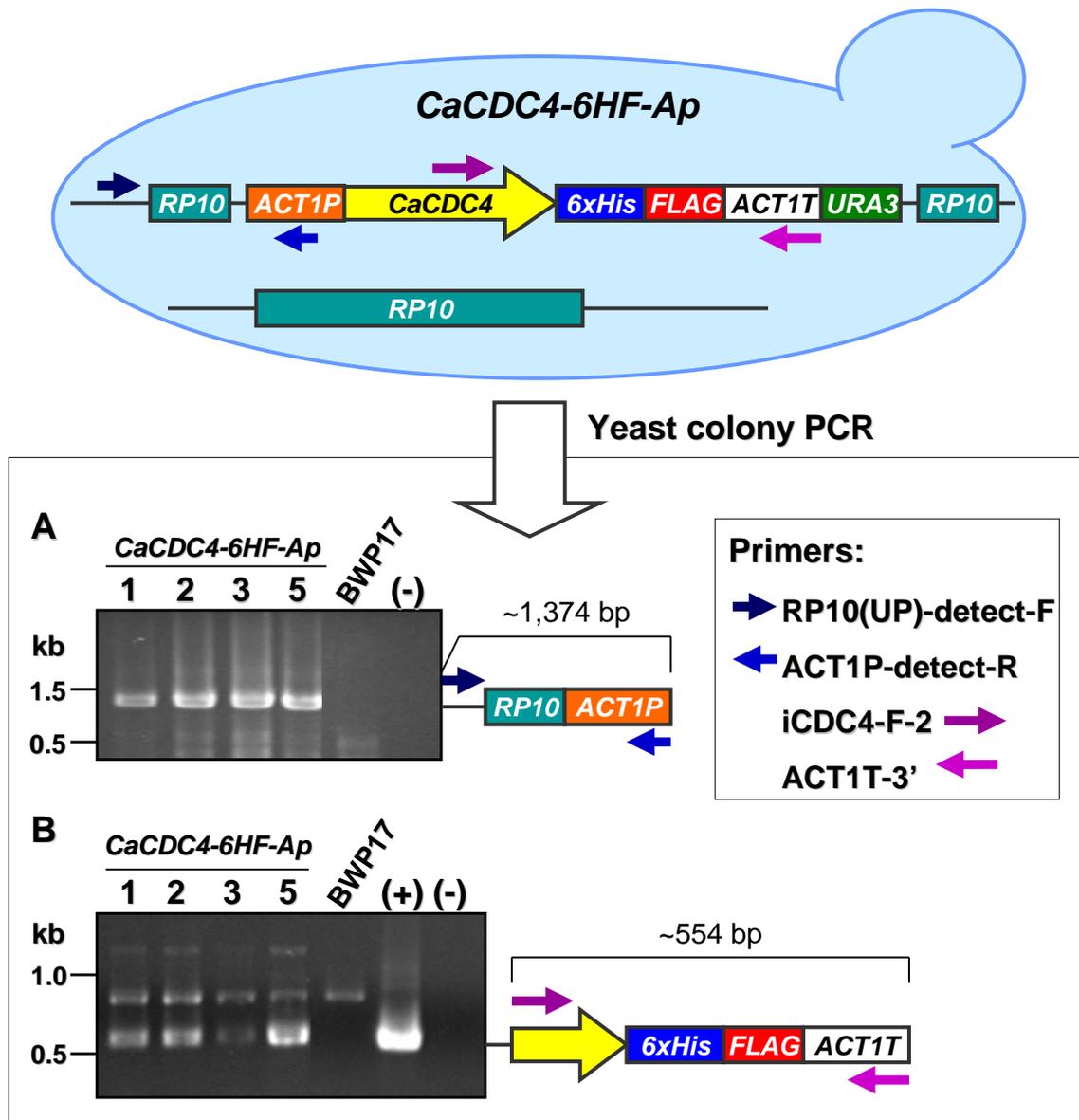
接著將這些篩選出的 Ura⁺ 的轉形菌株進行酵母菌菌落聚合酶連鎖反應確認(圖九)：利用 RP10 (UP)-detect-F (此引子的序列位於 *RP10* 的上游 1000bp 區域，以表示 genome 上的位置)和 ACT1P-detect-R (此引子的序列位於 *ACT1* promoter 上，以表示外來質體上的位置)此對引子(見 P.78 表一)，來確認所篩選出的 Ura⁺ 轉形菌株，其 p6HF-Act1-*CaCDC4* DNA 片段是否嵌入於 *RP10* 基因坐上(圖九 A)；而 iCDC4-F-2 和 ACT1T-3' 此對引子(見 P.78 表一)，則是用來確認 6xHis-FLAG epitope 是否緊接於 *CaCDC4* 的下游(圖九 B)。因此，經由酵母菌菌落聚合酶連鎖反應確認，所得到的編號 1、2、3 和 5 Ura⁺ 轉形菌株為以 *ACT1* promoter 來持續啟動 6xHis-FLAG-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質之表現的 *CaCDC4-6HF-Ap* 白色念珠菌菌株(一共有十二個 Ura⁺ 轉形菌株有被酵母菌菌落聚合酶連鎖反應確認出為 *CaCDC4-6HF-Ap* 菌株，但在此只有顯示出編號 1、2、3 和 5 Ura⁺ 轉形菌株的結果)。

2.3 TET-*CaCDC4* / *CaCDC4-F box* / *CaCDC4-WD40-6HF* 菌株的建構

運用 TET-on system 來誘導一系列 6xHis-FLAG-tagged *CaCdc4* 和其 F box 與 WD40 domain 重組蛋白質表現的白色念珠菌菌株，是利用 pTET25M (M: modify)載體所建構而成的。pTET25 載體(附圖十四) (Park and Morschhauser, 2005)上含有可以轉譯出 *CartTA* (*Candida albicans* reverse tetracycline dependent transactivator)的部份：*ADHI* promoter (*ADHIP* 為可以持續表現下游基因的 promoter)、*CartTA* 和 *ACT1* terminator (*ACT1T*)；和含有利用 *tet* operator 來啟動

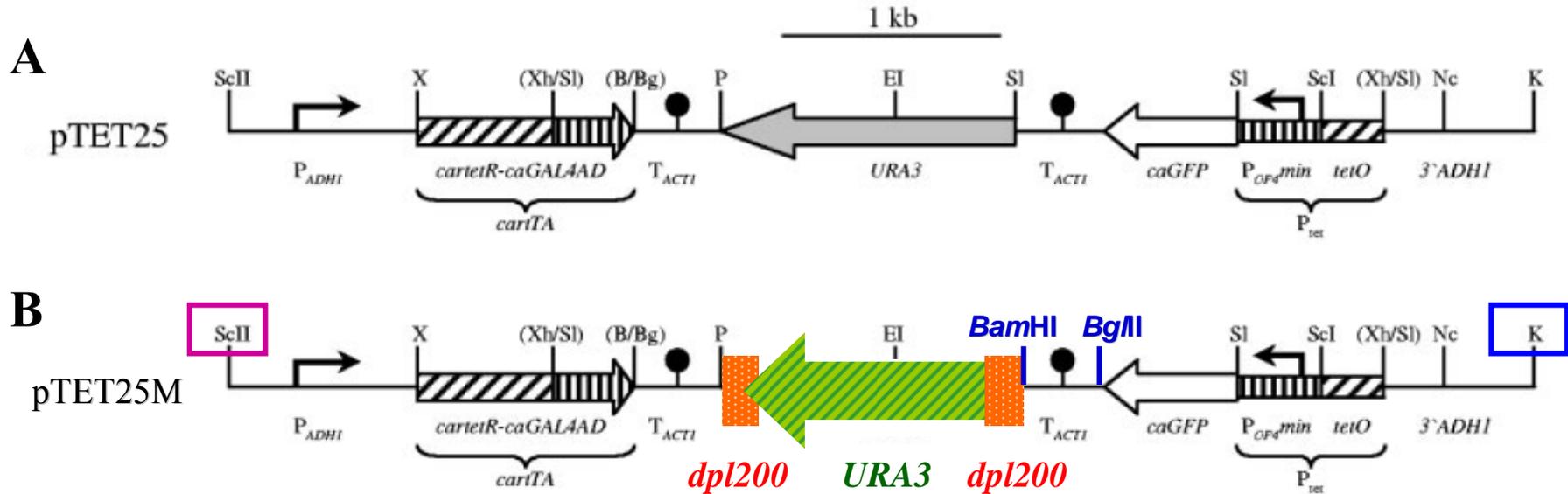


圖八、經過兩個世代的複印篩選，所得到可能為 *CaCDC4-6HF-Ap* 之 Ura⁺轉形菌株。經由醋酸鋰酵母菌轉形實驗所得到的菌落，再以 YPD 和 SC-ura 固態培養基進行兩個世代的複印篩選，以篩選出基因型態穩定存在的 Ura⁺轉形菌株，由此次醋酸鋰酵母菌轉形實驗所得到的二十一個菌落中，皆為基因型態為穩定存在的 Ura⁺轉形菌株。白色箭頭為 BWP17，以作為對照組。



圖九、利用酵母菌菌落聚合酶連鎖反應來確認所得到的 Ura⁺轉形菌株為 *CaCDC4-6HF-Ap*。A. 利用 RP10 (UP)-detect-F 和 ACT1P- detect-R 此對引子，來確認所篩選出的 Ura⁺轉形菌株，其 p6HF-Act1-*CaCDC4* DNA 片段為嵌入於 *RP10* 基因座上。B. 利用 iCDC4-F-2 和 ACT1T-3' 此對引子，來確認 6xHis-FLAG-tag 為緊接於 *CaCDC4* 的下游。(+)：是以 p6HF-Act1-*CaCDC4* 質體為 colony PCR 反應的模板 DNA，作為正對照組；(-)：則是以 d₂H₂O，作為負對照組。

附圖十四



pTET25 和 pTET25M 載體之結構。 A. pTET25 載體上含有可以持續轉譯出 *CartTA* 的部份：*ADHIP*、*CartTA* 和 *ACTIT*；和含有利用 *tet* operator 來啟動 *CaGFP* 表現的部份：*tetO*、*CaGFP* 和 *ACTIT*；以及 *URA3* 和 *3'ADHI* 序列。B. pTET25M (modify)載體是由賴威仲學長運用 pTET25 載體所改造而成，兩者的載體結構皆是相同的，除了 pTET25M 的 *URA3* 兩端各含有 *dpl200* 序列，可以利用 5-FOA 處理將其去除掉，使 *URA3* 為開放式的篩選 marker；另外，pTET25M 上也多了一個 *BglII*，以及以 *BamHI* 取代原本在 pTET25 *URA3* 基因上的 *SalI* 限制酶切點，以方便進行後續基因的改造工作。

CaGFP 表現的部份：*tetO* (*tet* operator)、*CaGFP* 和 *ACT1T*；以及 *URA3* selection marker 和 3' *ADH1* 序列。而 pTET25M (M: modify) 載體(附圖十四)是由本實驗室賴威仲學長將 pTET25 載體修飾與改造而成，其上的 *URA3* selection marker 兩端各含有 *dpl200* 序列，可以利用 5-fluoroorotic acid (5-FOA) 將其去除掉[由於 *URA3* 會轉譯出 orotidine-5'-phosphate decarboxylase，此酵素為 uracil 的合成過程中所必須的，但當有 5-FOA 的存在下，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⁺ 的轉形菌株在含有 5-FOA 的環境下，為了要生存下去，將會利用 *URA3* 兩側的同源序列進行同源互換(此為 *dpl200*)，以將 *URA3* 給去除掉，而形成 ura⁻ 的轉形菌株]，則 *URA3* 將可以再作為 selection marker 用；另外，pTET25M 上也多了一個 *Bgl*III，以及以 *Bam*HI 取代原本在 pTET25 *URA3* 基因上的 *Sal*I 限制酶切點，以方便進行後續基因的改造工作。

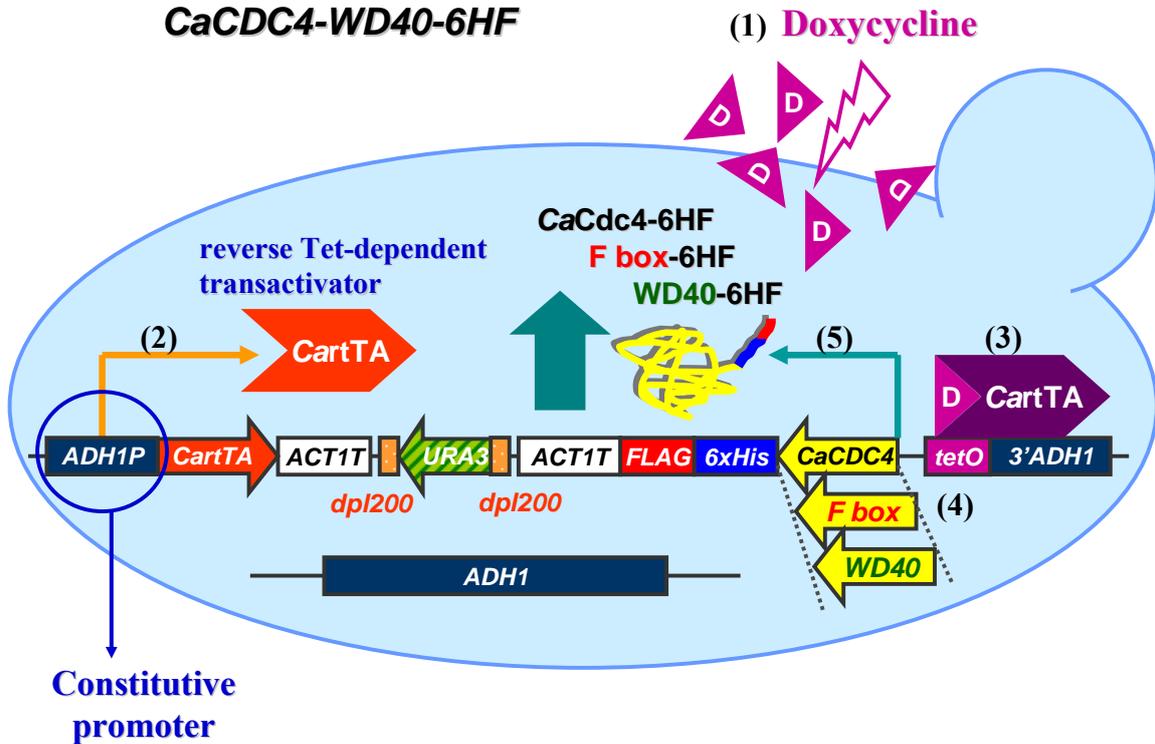
TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF 菌株的建構，是由本實驗室賴威仲學長所製備完成的(附圖十五)；首先必須先分別製備出 pTET25M-*CaCDC4-6HF*、pTET25M-*CaCDC4-F box-6HF* 和 pTET25M-*CaCDC4-WD40-6HF* 質體；接著，再分別利用 *Kpn*I 與 *Sac*II 限制酶反應將含有可以轉譯出 *CartTA* 的部份：*ADH1P*、*CartTA* 和 *ACT1T*；和含有利用 *tet* operator 來分別啟動 6xHis-FLAG-tagged *CaCdc4* 和其 F box 與 WD40 domain 重組蛋白質表現的部份：*tetO* (*tet* operator)、*CaCDC4-6HF / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40* 和 *ACT1T*；以及 *URA3* selection marker 和 3' *ADH1* 序列的 DNA 片段給製備出來，以進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗，並利用 *ADH1P* 與 3' *ADH1* 序列進行同源互換，而將此 DNA 片段置入 *ADH1* 的基因座上，進而得到可以以 TET-on system 來大量誘導 6xHis-FLAG-tagged *CaCdc4 / CaCdc4-F box / CaCdc4-WD40* 重組蛋白質之表現的白色念珠菌菌株。

3. 觀察運用 TET-On System 以及 *ACT1* Promoter 來分別大量與持續性表現 6xHis-FLAG-Tagged 重組蛋白質之情形以及各種重組蛋白質的表現情況

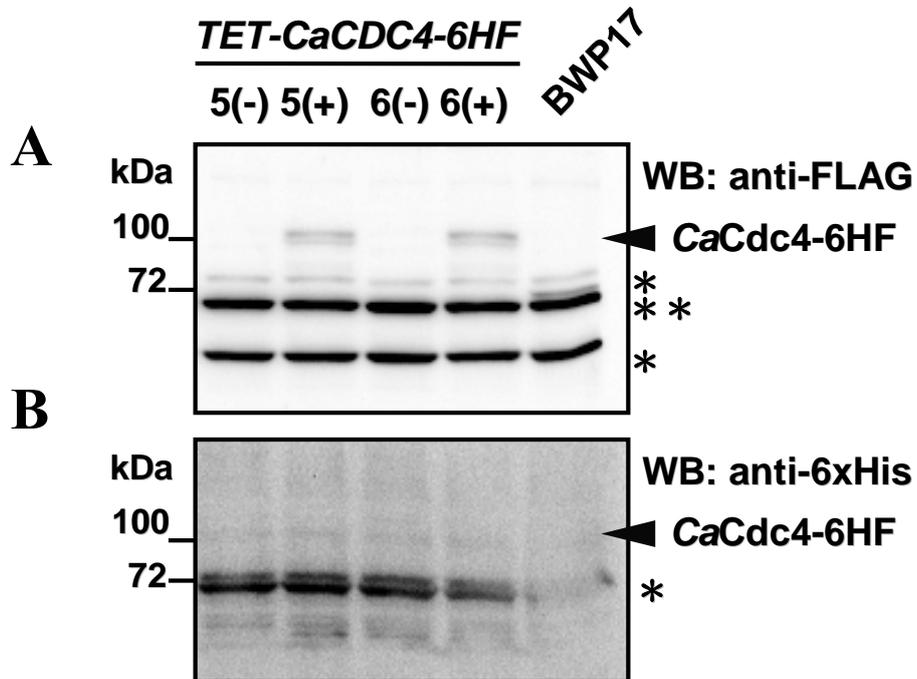
上述所建構好的 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40 -6HF* 白色念珠菌菌株，將會利用 TET-on system 來大量誘導 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質之表現。*ADHI* promoter 會持續性地啟動 *CartTA* (*Candida albicans* reverse tetracycline dependent transactivator)的表現，但此時 *CartTA* 並不具有活性，且無法和 *tet* operator 相結合以啟動 *CaCdc4-6HF / CaCdc4-F box-6HF / CaCdc4-WD40-6HF* 重組蛋白質的大量表現；但是當這些菌株在含有 doxycycline 的環境下時，doxycycline 會與 *CartTA* 相結合，以使 *CartTA* 具有活性而能和 *tet* operator 相結合，進而誘導 *CaCdc4-6HF / CaCdc4-F box-6HF / CaCdc4-WD40-6HF* 重組蛋白質的大量表現(圖十)。

所以我將挑選編號 5 和 6 號的 *TET-CaCDC4-6HF* 白色念珠菌菌株，進行簡單的 doxycycline 誘導 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質表現之測試，以確認此菌株的建構是成功的。直接將編號 5 和 6 號的 *TET-CaCDC4-6HF* 白色念珠菌菌株以含有 40 µg/ml doxycycline 的 YPD 培養液，培養與誘導 6xHis-FLAG-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質的表現至隔日，接著再將菌株的 cell lysates 萃取出來並進行西方點墨法分析(western blotting)，且由於是利用兩個 epitope tags，6xHis 以及 FLAG tag，來標記 *CaCdc4*，所以將會分別以 anti-FLAG tag (Sigma)和 anti-6xHis tag (濁水溪)抗體來進行偵測與分析：由圖十一 A anti-FLAG tag 的西方點墨法分析中可以發現，當加入 doxycycline 時，*CaCdc4-6HF* 重組蛋白質的確有被誘導出來，所以可以確認編號 5 和 6 號的 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株建構是成功的，而後續的實驗將會挑選編號 5 號的 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株來進行。但是在 anti-6xHis tag 的西方點墨法分析中，卻沒有偵測到如同 anti-FLAG tag 的結果，反而是 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質的表現無法被 anti-6xHis 抗體所辨識(圖十一 B)。

**TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box /
CaCDC4-WD40-6HF**

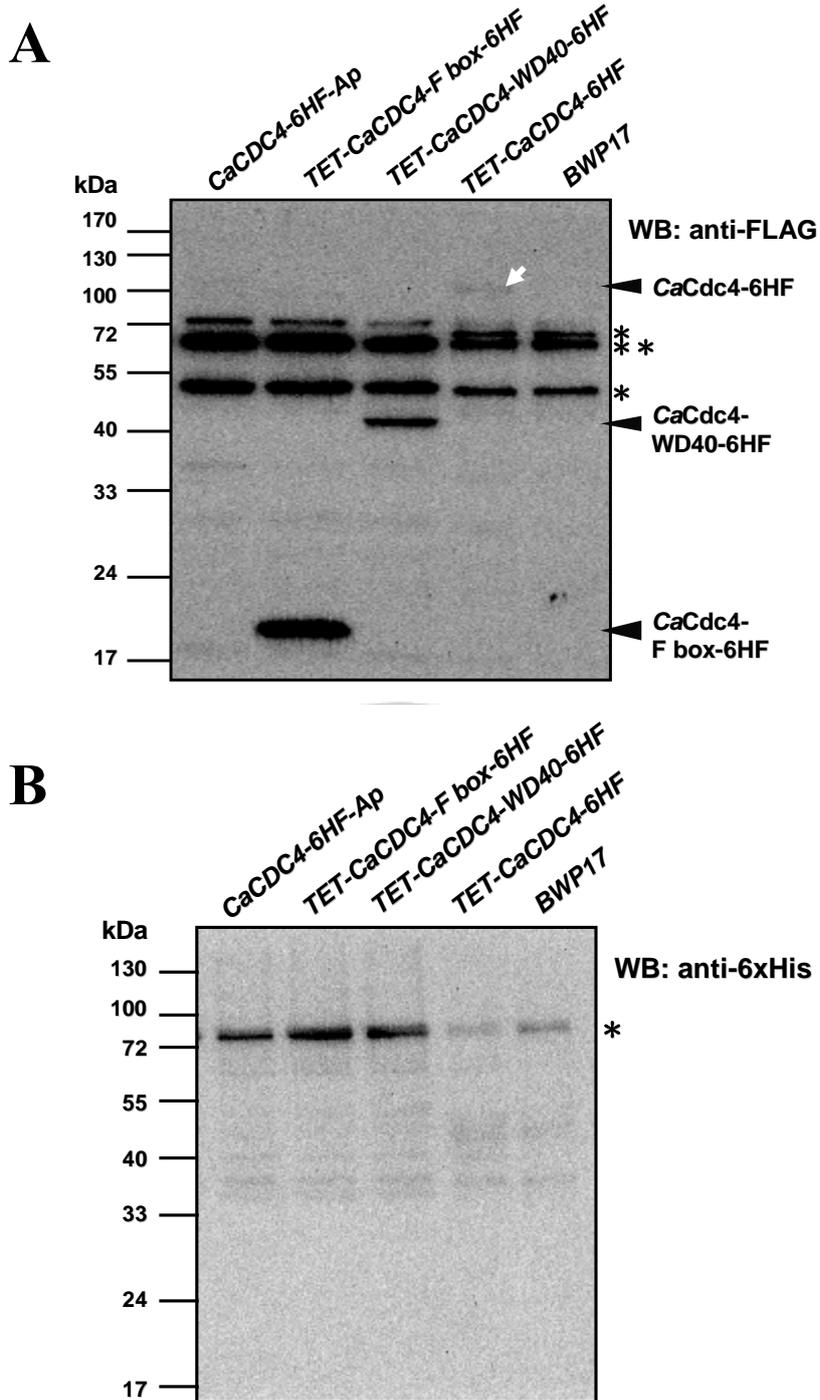


圖十、運用 TET-On System 來大量誘導 6xHis-FLAG-Tagged 重組蛋白質表現之原理與機制。當 *TET-CaCDC4/CaCDC4-F box/CaCDC4 -WD40-6HF* 菌株在含有 doxycycline 的環境下時(1)，doxycycline 會與持續表現且本身不具有活性的 *CartTA* (2)相結合(3)，以使其具有活性而能與 *tet operator* 相結合(4)，以進而啟動誘導 *CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 和 *CaCdc4-WD40-6HF* 重組蛋白質大量表現的機制(5)。



圖十一、以 Doxycycline 進行簡單的誘導 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株表現 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質之測試。直接以含有 40 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 的 YPD 培養液，培養與誘導編號 5 和 6 號的 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株表現 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質至隔日，接著再抽取出菌株的 cell lysates 以進行西方點墨法分析。**A.** 利用 anti-FLAG tag 抗體進行偵測。**B.** 利用 anti-6xHis tag 抗體進行偵測。(-):表示沒有 doxycycline 處理，(+)則是有 doxycycline 處理；BWP17 為對照組。另外，*和**皆表示非專一性的 bands，而其中以**作為 loading control。

接下來，我也運用西方點墨法分析，來分別觀察 *CaCDC4-6HF-Ap* 菌株持續表現 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質，以及利用 doxycycline 所分別誘導 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF* 菌株表現 *CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 及 *CaCdc4-WD40-6HF* 重組蛋白質的情形。將 *CaCDC4-6HF-Ap* 菌株以 YPD 培養液，和 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF* 菌株以含有 40 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 的 YPD 培養液，培養與持續性啟動及誘導 6xHis-FLAG-tagged 之重組蛋白質的表現至隔日，接著再將各個菌株的 cell lysates 拿來進行西方點墨法分析：由圖十二 A 的 anti-FLAG tag 的西方點墨法分析中可以發現，在 *CaCDC4-6HF-Ap* 菌株中，幾乎觀察不到 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質的表現；而在 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF* 菌株中，分別有觀察到 *CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 以及 *CaCdc4-WD40-6HF* 重組蛋白質的表現，但以 *CaCdc4-F box-6HF* 的表現量為最明顯，其次為 *CaCdc4-WD40-6HF*，而 *CaCdc4-6HF* 雖然有偵測到蛋白質的表現，可是其西方點墨法的訊號卻很弱。由此可以推論，*CaCdc4* 在白色念珠菌中可能並不為穩定存在的蛋白質：當 *CaCdc4-6HF* 持續性地在白色念珠菌(*CaCDC4-6HF-Ap*)中表現時，其細胞內可能會有一些反應機制將這些多餘存在的 *CaCdc4-6HF* 給分解掉，所以在西方點墨法的分析中，觀察不到明顯的 *CaCdc4-6HF* 之訊號；但是在 TET-on system 的情況下(*TET-CaCDC4-6HF*)，由於 *CaCdc4-6HF* 被立即地大量誘導出，而細胞內可能沒有辦法立刻將多餘表現的 *CaCdc4-6HF* 給分解掉，所以在西方點墨法分析中，仍可以觀察到微弱的 *CaCdc4-6HF* 之訊號。且由 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF* 菌株之西方點墨法分析的結果(圖十二 A)中，可以推論 *CaCdc4* 的非 F box 區域可能會是影響 *CaCdc4* 穩定性的關鍵，當 WD40 domain 存在時，可能會使 *CaCdc4* 不穩定存在於白色念珠菌中，而這些的推論必須要再經過實驗的證實與推論。然而在 anti-6xHis tag 的西方點墨法分析中，卻仍然沒有偵測到 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質的表現(圖十二 B)。由以上的觀察結果，我將會選擇以 TET-on system 來誘導 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質大量表現之



圖十二、觀察運用 TET-On System 以及 *ACT1* Promoter 所大量與持續性地表現 6xHis-FLAG-Tagged 重組蛋白質之情形以及各種重組蛋白質的表現情況。A. 以 anti-FLAG tag 抗體進行偵測，箭頭表示仍有訊號出現。B. 以 anti-6xHis tag 抗體進行偵測。BWP17 為對照組；*和**皆表示非專一性的 bands，而其中以**作為 loading control。

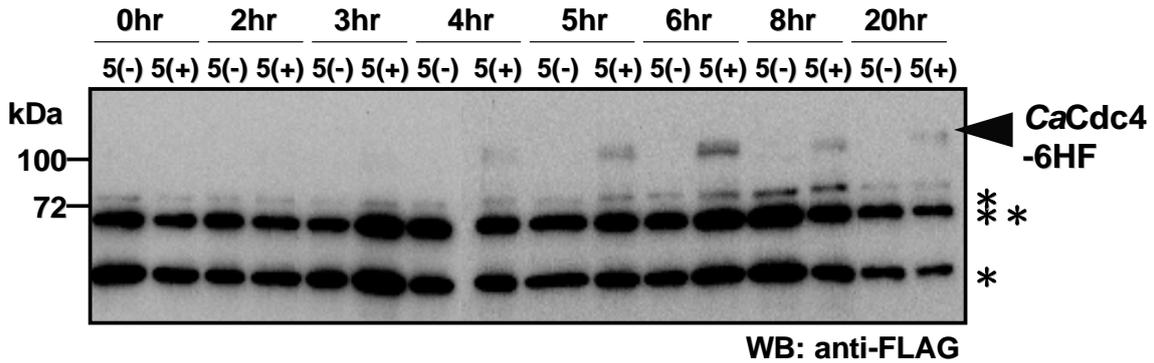
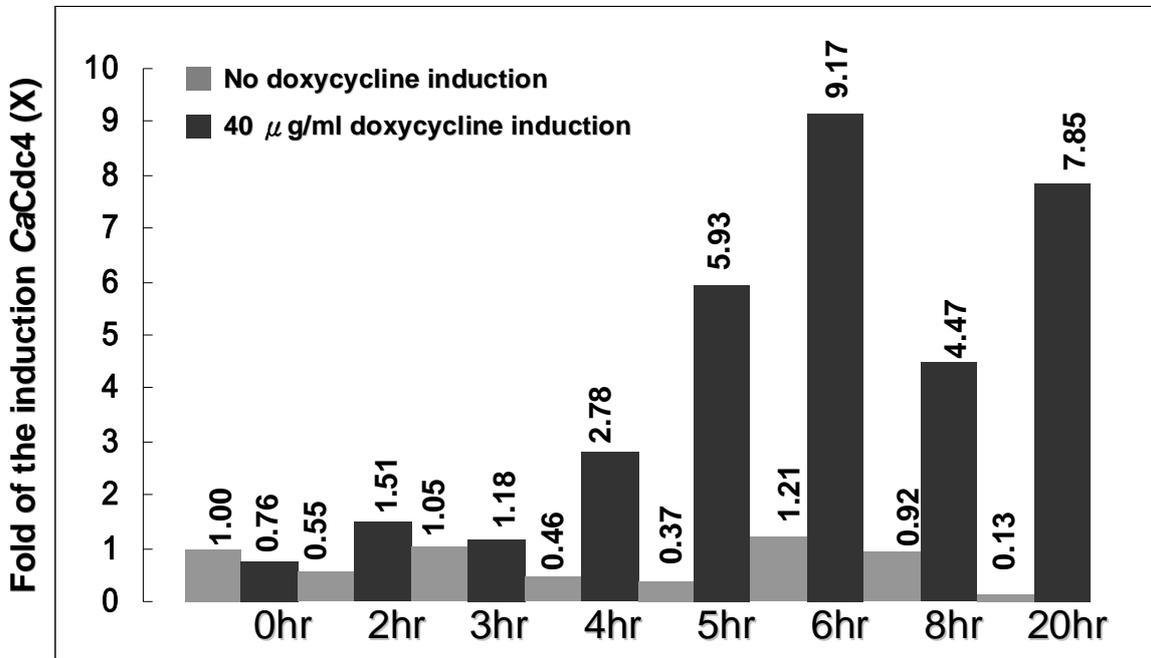
TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF 白色念珠菌菌株，來進行後續的運用親和力蛋白質純化法找出與 *CaCdc4* 相關性的蛋白質之實驗。

4. 建立最佳誘導 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株表現 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質之條件

由於在以 40 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 分別誘導 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF* 白色念珠菌菌株至隔日的 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質的表現結果中，發現 *CaCdc4-6HF* 的表現量明顯比 *CaCdc4-F box-6HF* 和 *CaCdc4-WD40-6HF* 來得少與微弱，且也希望藉由得到較多的 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質，以方便進行後續的親和力蛋白質純化和與 *CaCdc4* 相關性蛋白質的分析；所以接下來將會以 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 doxycycline 分別處理 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株不同的時間，並於各個時間點將細胞收集起來，然後再萃取出各個時間點的 cell lysates，以進行 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質於 40 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 不同時間誘導下之表現量分析：由圖十三發現，當以 40 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 處理 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株六個小時時，*CaCdc4-6HF* 的表現量是沒有經過 doxycycline 處理的表現量 9.17 倍，且也是各個時間點中表現量最多的。所以之後的實驗將會以 40 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 處理 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株六個小時的條件來誘導 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質的大量表現。

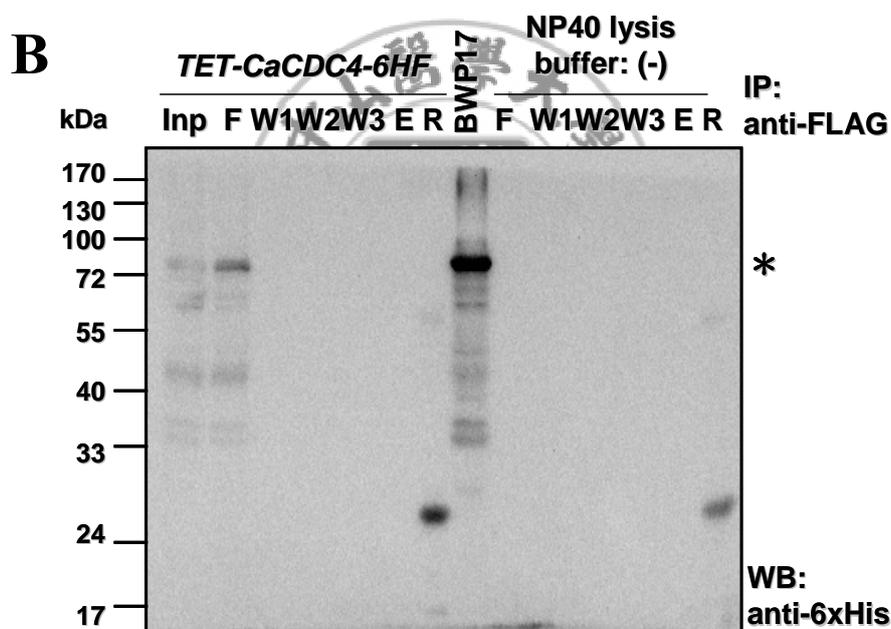
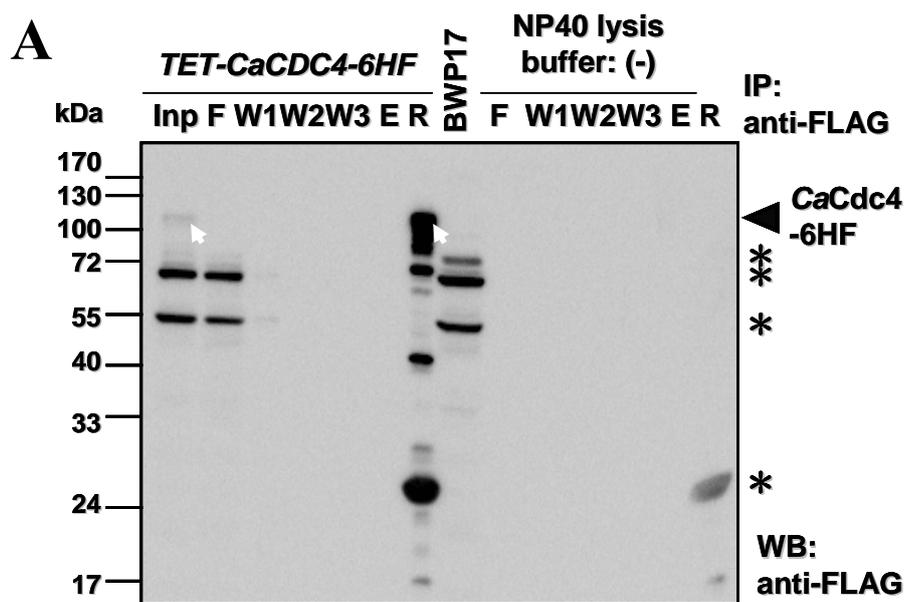
5. *CaCdc4 / CaCdc4-F box / CaCdc4-WD40-6HF* 重組蛋白質會與 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel 相結合但是與 HIS-Select Nickel Affinity Gel 的結合效果並不理想

原本的實驗設計與構想，是想藉由兩種連續的 epitope tag，6xHis-FLAG tag，來標記 *CaCdc4* 和其 F box 以及 WD40 domain 的部分，並運用兩階段式的親和力

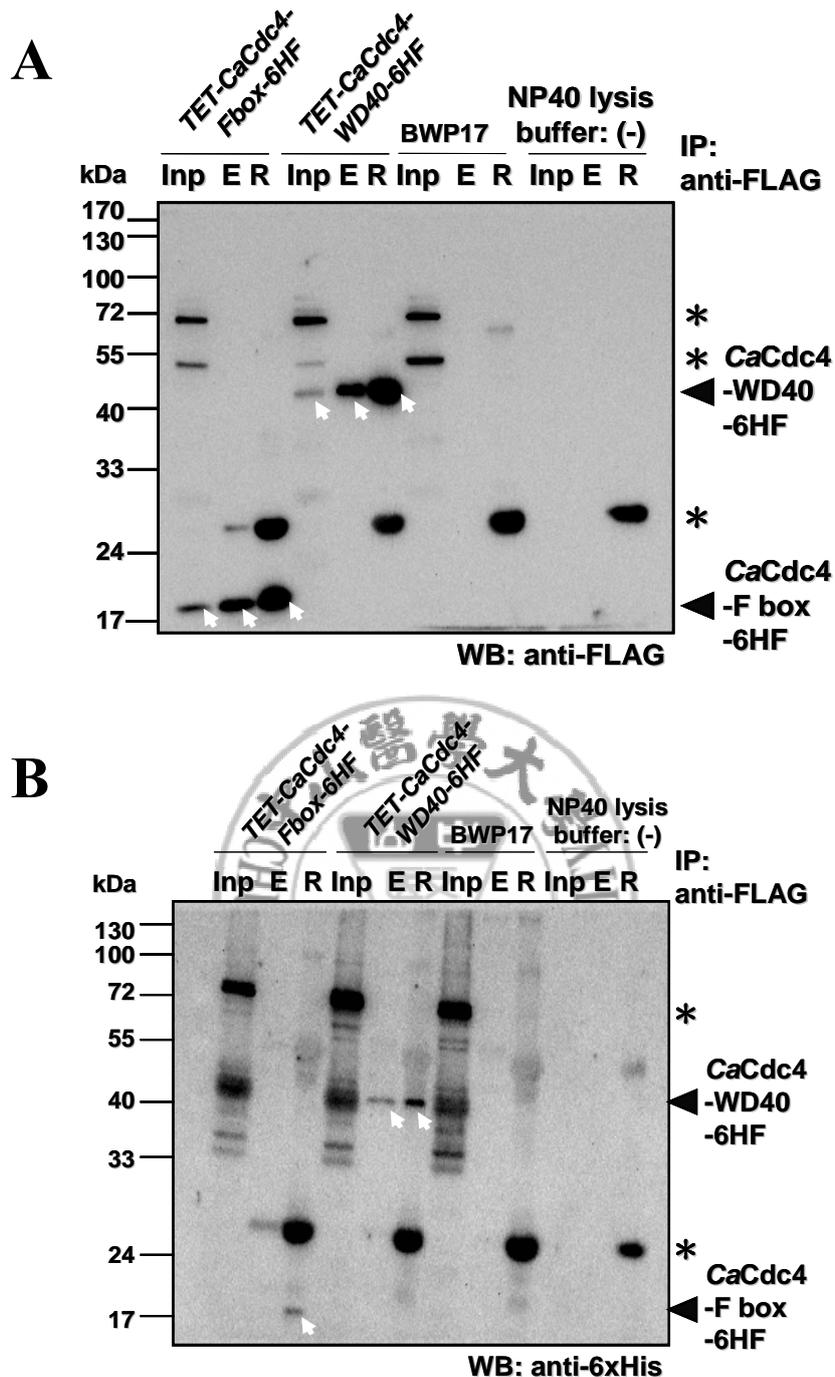
A**B**

圖十三、建立最佳誘導 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株表現 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質之條件。A. 以 40 μ g/ml doxycycline 處理編號 5 號的 *TET- CaCDC4-6HF* 菌株於不同時間點的誘導情形。(-)表示沒有 doxycycline 處理，(+)則是有 doxycycline 處理，*和**皆表示非專一性的 bands，而其中以**作為 loading control。B. 為 A 圖的量化結果，其中以沒有經過 doxycycline 處理，且於 0hr 的 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質之表現量為 1 倍。

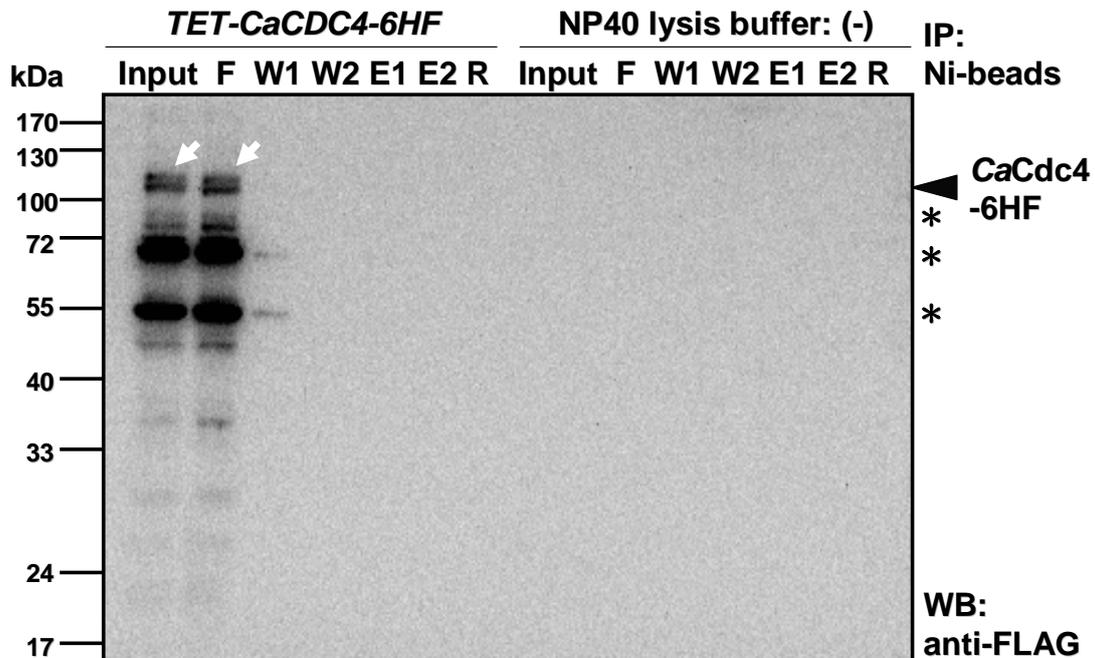
純化法(tandem affinity purification/TAP)將 *CaCdc4* 以及其相關性的蛋白質給純化出來，並予以後續的質譜儀分析；且利用兩階段式親和力純化法所得到的蛋白質複合體，其純度會較只經過單一次親和力純化法(one-step affinity purification)所得到的蛋白質複合體來得更純，而且非專一性的背景值也將較為減少，以提高後續蛋白質鑑定的準確度(Puig et al., 2001)。但是，在先前的觀察各種重組蛋白質的表現情況之結果中，卻發現 *CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 和 *CaCdc4-WD40-6HF* 的 6xHis epitope tag 無法被 anti-6xHis-tag 抗體所辨識(見 P.92 圖十一和 P.94 圖十二)。所以接下來將分別測試 *CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 和 *CaCdc4-WD40-6HF* 是否可以被 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel (Sigma)所純化下來，且是否會因為透過純化後，6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質濃度的提高，而可以被 anti-6xHis-tag 抗體所辨識，以及 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質是否可以被 HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma)所純化出來；由圖十四 A 和圖十五 A 可以得知，*CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 和 *CaCdc4-WD40-6HF* 皆可以被 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel 所純化下來，但是所純化下來的 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質中，只有 *CaCdc4-WD40-6HF* 有較明顯可以被 anti-6xHis-tag 抗體所辨識，而 *CaCdc4-F box-6HF* 只有在 resin (R)的部分有被 anti-6xHis-tag 抗體偵測到較微弱的訊號，*CaCdc4-6HF* 則沒有辦法被 anti-6xHis-tag 抗體所辨識(圖十四 B 和圖十五 B)。另外，*CaCdc4-6HF* 在運用 HIS-Select Nickel Affinity Gel 進行純化測試時，其無法和 nickel gel 進行結合作用，皆被流逝掉了(圖十六)。由於，在這次的研究當中，我想觀察 *CaCdc4* 和其 F box 以及 WD40 domain 的部分，分別在酵母菌和真性菌絲生長型式的白色念珠菌中，其所純化出的相關性蛋白質彼此之間有沒有相似與不同的相關性蛋白質出現，且 *CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 和 *CaCdc4-WD40-6HF* 對於 anti-6xHis-tag 抗體偵測以及 nickel gel 的純化之效果並不是很理想，所以爾後是運用 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel 進行單一次親和力純化法，來純化出 *CaCdc4* 的相關性蛋白質。



圖十四、CaCdc4-6HF 重組蛋白質的 6xHis Epitope Tag 無法被 Anti-6xHis Tag 抗體所辨識。經過 anti-FLAG-M2 affinity gel 所純化出的產物，以西方點墨法進行分析。A. 以 anti-FLAG 抗體偵測。B. 以 anti-6xHis 抗體偵測。Inp: input, F: flow through, W1~W3: 以 1x TBS 清洗三次, E: 是以 0.1 M glycine-HCl, pH 3.5 進行 elution, R: resin。BWP17 與以 NP40 lysis buffer 進行純化的產物，皆為對照組；* 表示非專一性的 bands；箭頭則表示所要觀察的位置。



圖十五、CaCdc4-F box-6HF 與 CaCdc4-WD40-6HF 重組蛋白質的 6xHis Epitope Tag 可以被 Anti-6xHis Tag 抗體所辨識。經過 anti-FLAG-M2 affinity gel 所純化出的產物，以西方點墨法進行分析。**A.** 以 anti-FLAG 抗體偵測。**B.** 以 anti-6xHis 抗體偵測。Inp: input, E: 是以 150 ng/ μ l 3xFLAG peptides (Sigma)進行 elution, R: resin。以 BWP17 與 NP40 lysis buffer 進行純化的產物，皆為對照組；* 表示非專一性的 bands；箭頭則表示所要觀察的位置。



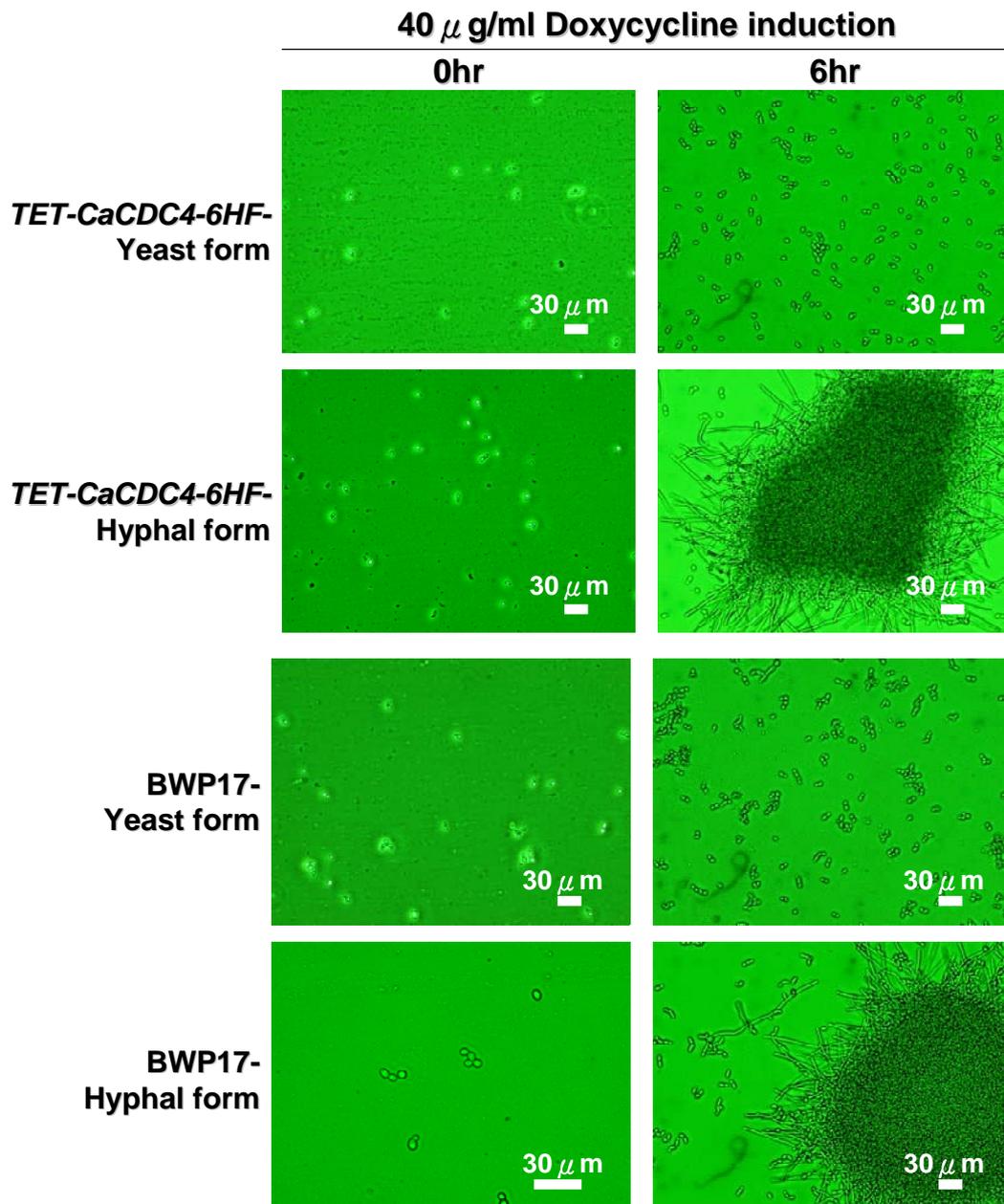
圖十六、*CaCdc4-6HF* 重組蛋白質無法與 Nickel Resin 進行結合作用。以 doxycycline 誘導 *TET-CaCdc4-6HF* 菌株表現 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白後，利用 HIS-Select nickel affinity gel (Sigma) 進行純化，並把純化過程中的產物，以西方點墨法進行分析。F: flow through, W1~W2: 以不含有 imidazole 的 Wash buffer 清洗兩次，E: 是以含有 250 mM imidazole 的 Elution buffer 進行 elution, R: resin。以 NP40 lysis buffer 進行純化的產物，作為負對照組；* 表示非專一性的 bands；箭頭則表示所要觀察的位置。

6. 運用 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4- WD40-6HF* 白色念珠菌菌株和親和力純化法找出與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質

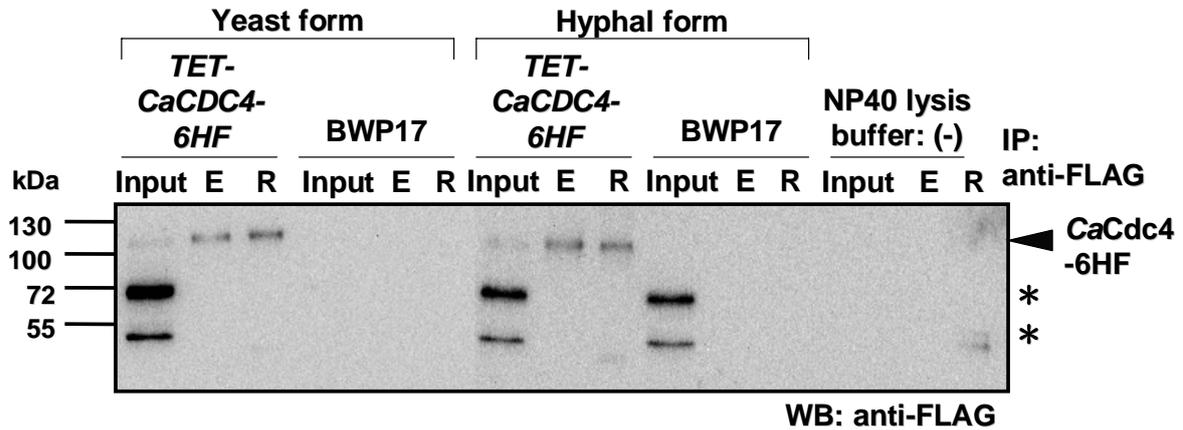
將 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4- WD40-6HF* 白色念珠菌菌株，分別用 40 µg/ml 的 doxycycline 處理六個小時，以誘導 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質的大量表現，並且分別於酵母菌與真性菌絲生長形態的環境下來進行 *CaCdc4 / CaCdc4-F box / CaCdc4- WD40-6HF* 的大量表現，希望藉由 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel (Sigma) 純化出與 *CaCdc4* 相關的蛋白質。

在這次的研究中，*TET-CaCDC4-6HF* 和 *TET-CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF* 菌株，在 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質的誘導，以及酵母菌和真性菌絲的形態誘導之順序是不同的：*TET-CaCDC4-6HF* 菌株在 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質的誘導，和酵母菌與真性菌絲形態的誘導是同時間的，即直接以含有 40 µg/ml doxycycline 的 YPD (pH 5.4~5.6) 培養液，及含有 40 µg/ml doxycycline 的 YPD+10% serum (pH 7.2) 培養液，來誘導經隔夜培養的菌液六個小時(圖十七)；而在 *TET-CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF* 菌株中，是先以 YPD (pH 5.4~5.6) 和 YPD+10% serum (pH 7.2) 培養液，來誘導酵母菌以及真性菌絲形態的形成，接著再加入 40 µg/ml doxycycline 來大量誘導 *CaCdc4-F box / CaCdc4-WD40-6HF* 的表現(data not shown)。

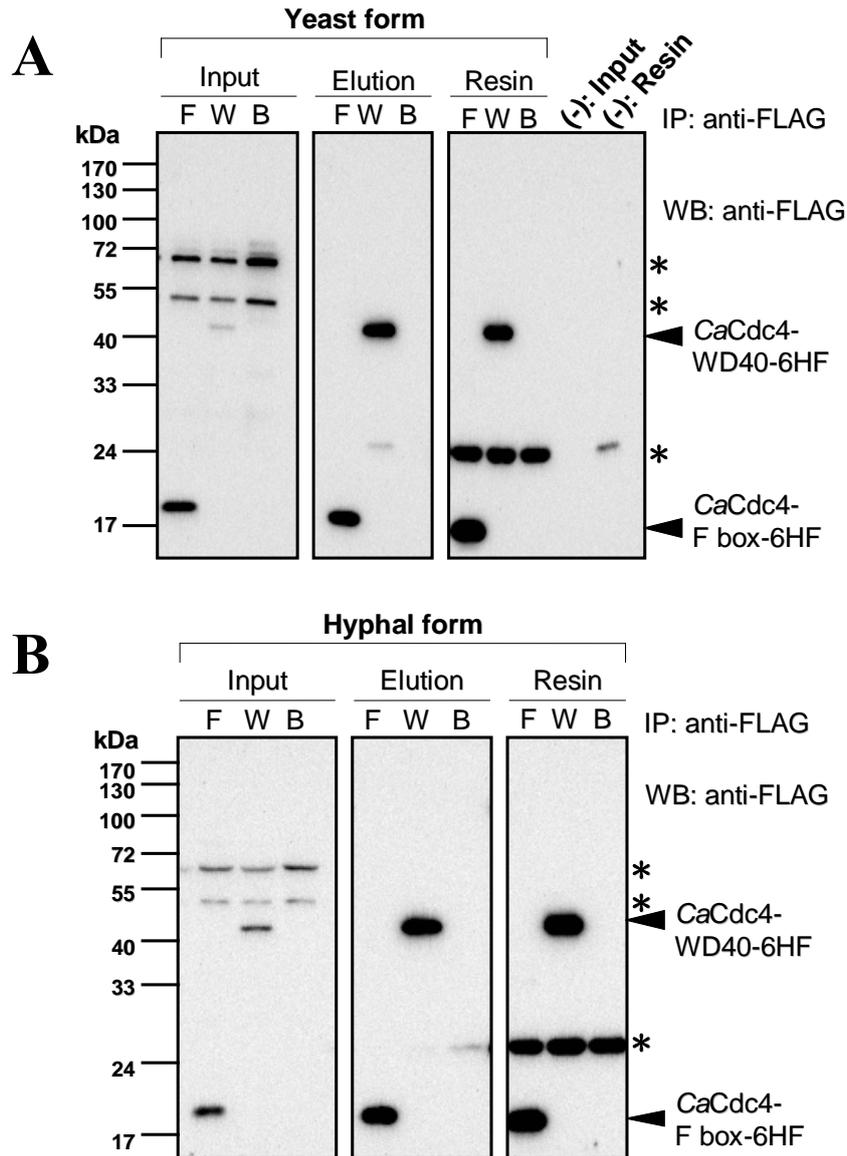
接著，將 cell lysates 自各個菌株中抽取出來，再分別與 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel 進行結合，並以含有 150 mM NaCl 的 1x TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) 清洗完成結合作用的 Anti-FLAG-M2 Affinity Gel 三次，含有 150 mM NaCl 的 1x TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl) 清洗兩次，然後再以 150 ng/µl 3x FLAG peptides (Sigma) 進行 elution 的動作，最後，將純化過程中的 input、elute/E 和 resin/R 部份，以西方點墨法(圖十八和圖十九)和銀染(見 P.117 圖二十六 A 與 B，和 P.120 圖二十七)進行分析：由圖二十六 A 與 B 可以觀察到，elution 部分的銀染結果中，分別以 *CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 和



圖十七、同步誘導 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株大量表現 *CaCdc4-6HF* 與酵母菌和真性菌絲形態的形成。直接以含有 40 μ g/ml doxycycline 的 YPD (pH 5.4~5.6)和 YPD+10% serum (pH 7.2)培養液，來處理經隔夜培養的 *TET-CaCDC4-6HF* 菌液六個小時，以同步誘導菌株大量表現 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質與酵母菌和真性菌絲形態的形成。BWP17 作為對照組。



圖十八、以西方點墨法分析同時誘導 *CaCdc4-6HF* 的表現與酵母菌和真性菌絲形態形成之 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株並經過單一次親合力純化法的純化產物。將 cell lysates 從已經過 doxycycline 與生長形態誘導的 *TET-CaCDC4-6HF* 菌株中抽取出來，再利用 anti-FLAG-M2 affinity gel 進行純化，以含有 150 mM 和 300 mM NaCl 的 1x TBS 各清洗三次與兩次，每次十五分鐘，然後再以 150 ng/ μ l 3x FLAG peptides 進行 elution，最後將純化過程中的 input、elute/E 和 resin/R 部分，以西方點墨法進行分析，而銀染的分析於 P.117 圖二十六 A 和 P.120 圖二十七 A。以 BWP17 和 NP40 lysis buffer 進行純化的產物，作為對照組；* 表示非專一性的 bands；箭頭則表示所要觀察的位置。



圖十九、以西方點墨法分析已先誘導成酵母菌和真性菌絲形態形成後再誘導 6xHis-FLAG tagged 重組蛋白質表現之 *TET-CaCDC4-F box-6HF* 和 *TET-CaCDC4-WD40-6HF* 菌株並經過單一次親合力純化法的純化產物。將 cell lysates 從經過 doxycycline 與生長形態誘導的 *TET-CaCDC4-F box-6HF* (F 表示)與 *TET-CaCDC4-WD 40-6HF* (W 表示)菌株中抽取出來，再利用 anti-FLAG-M2 affinity gel 進行純化，並將純化過程中的 input、elution 和 resin 部分，以西方點墨法進行分析，而銀染的分析於 P.117 圖二十六 B 和 P.120 圖二十七 B。以 BWP17 (B)和 NP40 lysis buffer (-)進行純化的產物，作為對照組；*表示非專一性的 bands；箭頭則表示所要觀察的位置。

CaCdc4-WD40-6HF 所找到的相關性蛋白質，會有共同與差異性的 patterns；但在 resin 的部份(見 P.120 圖二十七)，各個 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質所找到的 *CaCdc4* 相關性蛋白質之分子量 patterns 較沒有明顯的差異存在。而將於最後的結果整理中，進一步地把這次研究中的所有銀染結果圖，做一個綜觀性的分析與總整理。

7. 建構以大腸桿菌 BL21 大量表現 6xHis-Tagged *CaCdc4* 重組蛋白質之 pET-29b(+)-*CaCDC4* 菌株

在這次以大腸桿菌 BL21 大量表現 *CaCdc4*-6xHis 重組蛋白質的菌株建構中，是以 pET-29b(+)載體(Novagen)和 *CaCDC4* open reading frame (ORF) (*CaCDC4* 的 ORF 序列是由 *Candida* Genome Database 而來)進行 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體的製備。接著，再將此質體轉形至大腸桿菌 BL21 中，並且由於 pET-29b(+)載體上含有 *lacI* 的轉譯序列和 pET-29b(+) cloning/expression 區域，而 pET-29b(+) cloning/expression 區域內含有 lac 操作子(lac operator)，Multiple Cloning Sites (MCS)，以及 S·Tag 和 His·Tag 的轉譯序列(見 P.37 附圖十三)；所以可以藉由 IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)來大量誘導 6xHis-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質的表現。

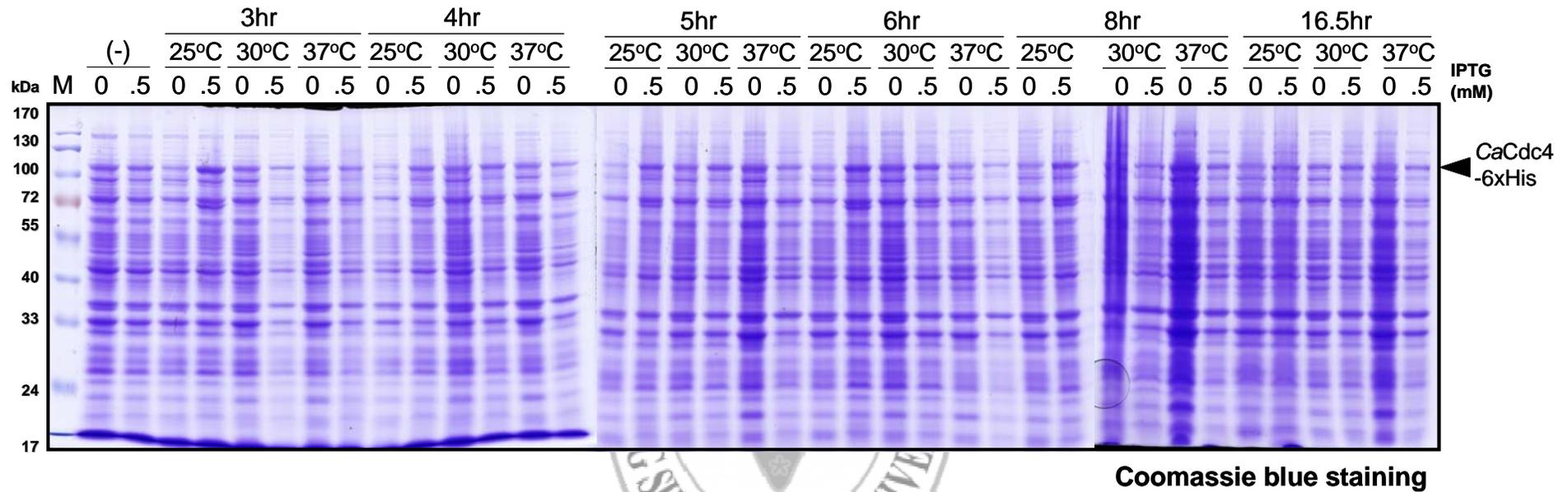
首先將 *CaCDC4* ORF 從已製備且經定序確認好的 pCR2.1-TOPO-*CaCDC4* 質體，利用 *XhoI* 限制酶將此 *CaCDC4* 片段置入 pET-29b(+)載體上的 MCS 之 *XhoI* 限制酶切點內，以製備出 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體。然後再利用限制酶反應來確認所製備出的 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體是正確的：當利用 *XhoI* 限制酶反應時，編號(7)-5 和(7)-W3 的 pET-29b(+)-*CaCDC4* 有釋出 *CaCDC4* 片段大小的 band (2,307 bp) (data not shown)；且由於是利用相同的 *XhoI* 限制酶切點進行 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體在建構，所以將會運用 pET-29b(+)載體上的 *EcoR1* 與位於 *CaCDC4* 之第 1648 bp 位置上的 *EcoR1* 限制酶切點來確定 *CaCDC4* 的方向

性，以此確定出編號(7)-5 和(7)-W3 的 *CaCDC4* 在 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體上為正確的方向性(data not shown);最後再以 DNA 定序來確認此 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體是正確無誤的。然後，將此製備好的 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體進行大腸桿菌 BL21 的轉形實驗，以得到可以運用 IPTG 來大量誘導 6xHis-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質之表現的 pET-29b(+)-*CaCDC4* 大腸桿菌菌株。

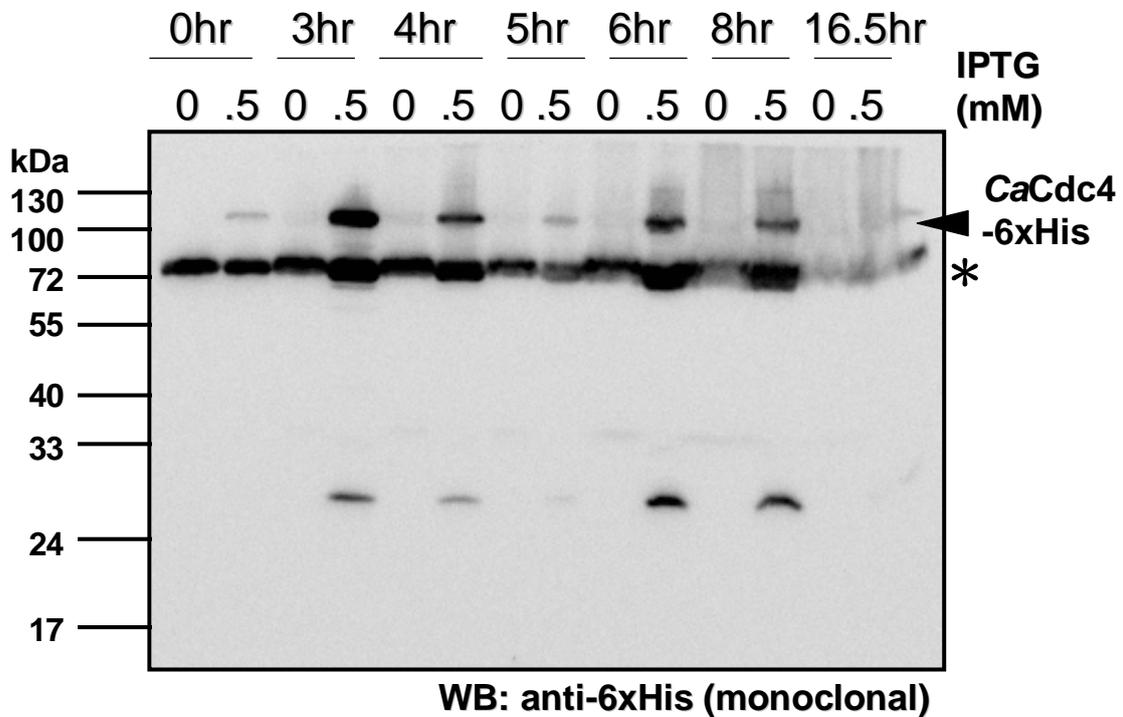
8. 建立最佳誘導攜帶 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體之大腸桿菌菌株 BL21 表現 *CaCdc4*-6xHis 重組蛋白質之條件

pET-29b(+)-*CaCDC4* 菌株建構好之後，接下來將會以各種不同的環境情況下，來測試出 *CaCdc4*-6xHis 最佳的誘導表現條件。將 pET-29b(+)-*CaCDC4* 菌株以 0.5 mM IPTG 分別於 25°C、30°C 和 37°C 的溫度下，以及 3、4、5、6、8、16.5 小時的處理時間，來誘導 *CaCdc4*-6xHis 重組蛋白質的表現，接著於不同的時間點將菌體收集後，直接以 1x SDS sample buffer 處理，並進行 SDS-PAGE、coomassie blue staining 和西方點墨法分析，並希望藉由 coomassie blue 與西方點墨法的分析，以找出最佳誘導 *CaCdc4*-6xHis 大量表現之條件：由圖二十可以觀察到，在 25°C 下的每一個誘導時間點，*CaCdc4*-6xHis bands 的深度皆較沒有加入 IPTG 誘導之對照組的深度有明顯地增加；但是 *CaCdc4*-6xHis 在 30°C 和 37°C 下的每一個誘導時間點之 bands 的深度，和沒有加入 IPTG 誘導之對照組的深度相比，卻反而有降低的情形。而也利用西方點墨法分析來觀察 *CaCdc4*-6xHis 於 25°C 下的每一個誘導時間點之表現量的情形，發現以三個小時的誘導時間，*CaCdc4*-6xHis 就有很好的表現量(圖二十一)。所以在運用大腸桿菌 BL21 的系統來大量誘導 6xHis-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質之表現的策略上，之後是以 0.5 mM IPTG、於 25°C 下，處理 pET-29b(+)-*CaCDC4* 大腸桿菌菌株三個小時的條件，來大量誘導 *CaCdc4*-6xHis 的表現。

接下來，想要更進一步地確認，當以 0.5 mM IPTG、於 25°C 下，處理



圖二十、建立最佳誘導攜帶 pET-29b(+)-CaCDC4 質體之大腸桿菌菌株 BL21 表現 CaCdc4-6xHis 重組蛋白質之條件。將帶有 pET-29b(+)-CaCDC4 質體之大腸桿菌菌株，以 0.5 mM IPTG 分別於 25°C、30°C 和 37°C 的溫度，以及 3、4、5、6、8 和 16.5 小時的處理，來誘導 CaCdc4-6xHis 重組蛋白質的表現，接著將菌體收集後，直接以 1x SDS sample buffer 處理，並進行 SDS-PAGE 和 coomassie blue staining。0 表示沒有經過 IPTG 處理，.5 則是以 0.5 mM IPTG 處理；(-)表示以零個小時處理，以作為負對照組；箭頭則表示所要觀察的位置。

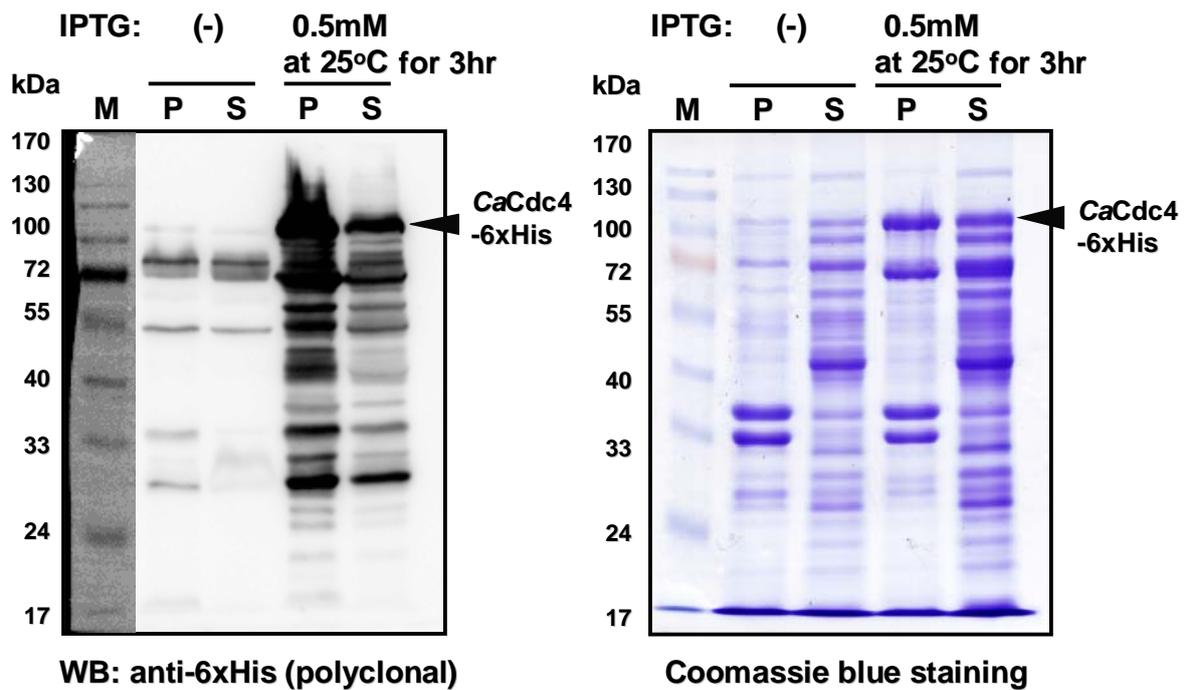


圖二十一、建立最佳誘導攜帶 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體之大腸桿菌菌株 BL21 表現 *CaCdc4-6xHis* 重組蛋白質之條件。將以 0.5 mM IPTG 於 25°C 的溫度下，所處理帶有 pET-29b(+)-*CaCDC4* 質體之大腸桿菌菌株 3、4、5、6、8 和 16.5 小時的菌體，直接以 1x SDS sample buffer 處理，並進行 SDS-PAGE 和西方點墨法分析，以找出最佳誘導 *CaCdc4-6xHis* 重組蛋白質的時間。0 表示沒有經過 IPTG 處理，.5 則是以 0.5 mM IPTG 處理；* 表示非專一性的 bands；箭頭則表示所要觀察的位置。

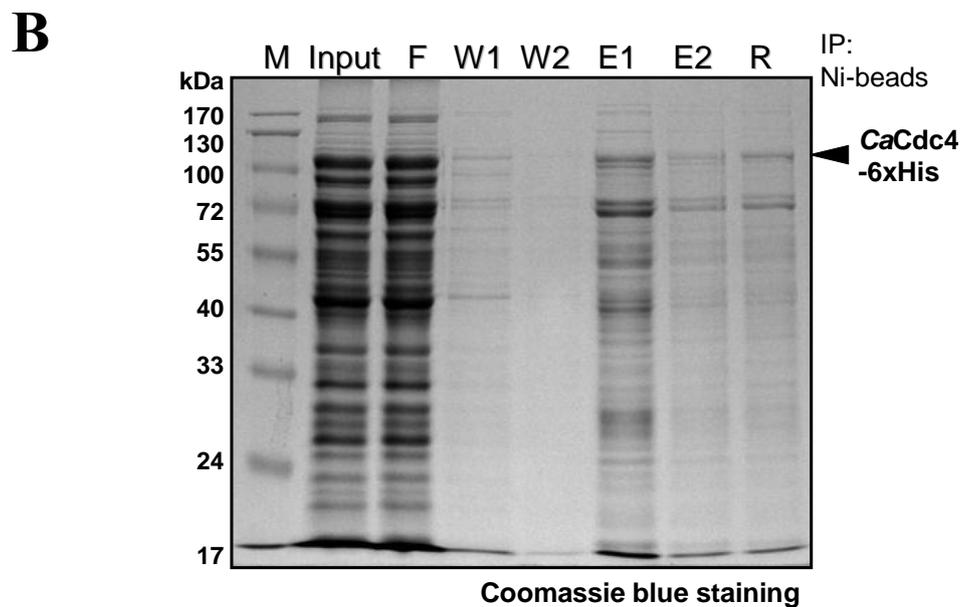
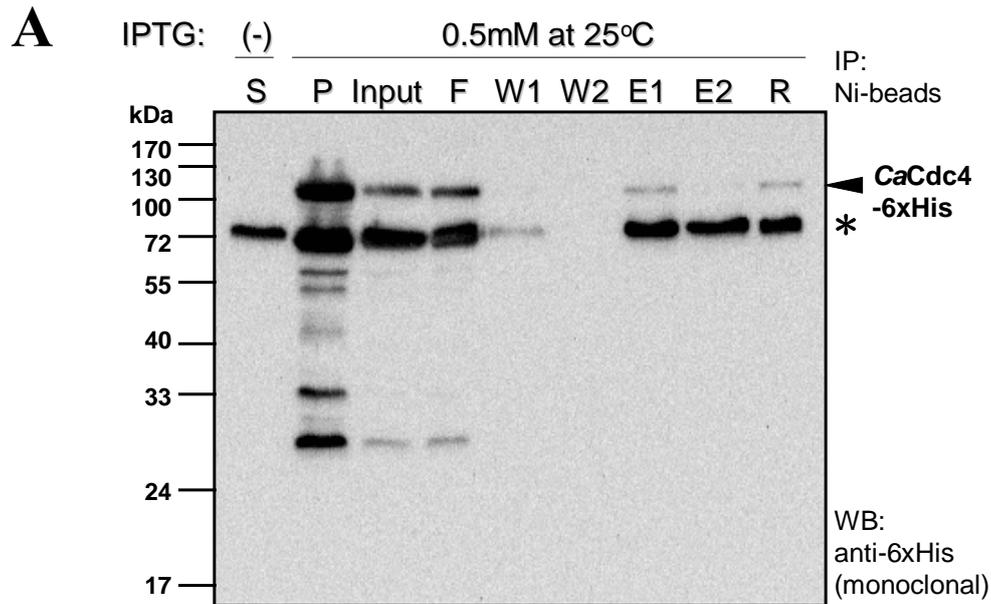
pET-29b(+)-*CaCDC4* 大腸桿菌菌株三個小時後，*CaCdc4-6xHis* 是否會在 cell lysates 的上清液部份，而得以方便後續的純化與實驗：由圖二十二可以更確認，於 25°C 下、以 0.5 mM IPTG 處理大腸桿菌 pET-29b(+)-*CaCDC4* 菌株三個小時，為最佳誘導 *CaCdc4-6xHis* 大量表現之條件。且 *CaCdc4-6xHis* 皆會在 cell lysates 的上清液與 pellets 的部份，所以我可以直接取上清液的部份來進行後續的純化與實驗。

9. 利用 HIS-Select Nickel Affinity Gel 將大腸桿菌 BL21 所誘導大量表現的 *CaCdc4-6xHis* 進行純化並製備 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin*

誘導 6xHis-tagged *CaCdc4* 重組蛋白質大量表現的條件測試出來後，接著想藉由 HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) 來製備出 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin*，方能進行後續的細胞外蛋白質交互作用，即利用 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 和白色念珠菌 SC5314 的 cell lysates 均勻混合在一起，並希望藉由 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 找到與 *CaCdc4* 相關性的蛋白質。所以，必須先測試 *CaCdc4-6xHis* 是否會與 HIS-Select Nickel Affinity Gel 相結合，以及其純化的效果會是如何；因此，首先將抽取出經過 IPTG 誘導的 pET-29b(+)-*CaCDC4* 菌株之 20 ml 菌液量的蛋白質，約以 25 μ l 的 HIS-Select Nickel Affinity Gel 進行一至兩小時的結合作用，再以 Wash buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl) 清洗兩次，以及以含有 250 mM imidazole 的 Elution buffer (250 mM imidazole, 50 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl) 進行兩次 elution 的動作，再將所有純化過程中的產物(input、flow through/F、wash 1/W1、wash 2/W2、elute 1/E1、elute 2/E2 和 resin/R 部份)進行 coomassie blue 與西方點墨法的分析：由圖二十三可以得知 *CaCdc4-6xHis* 是可以與 HIS-Select Nickel Affinity Gel 相結合的；且在整個純化的過程中，可以發現經過一次的 Wash buffer 清洗後，大部分的非專一性蛋白質都被清洗掉了，而再經過第二次的 Wash buffer 清洗就已經較觀察不到非專一性蛋白質的呈現了，但是在 elution 的部份，



圖二十二、以 0.5 mM IPTG、25°C 處理 pET-29b(+)-*CaCDC4* 大腸桿菌菌株三個小時後，*CaCdc4-6xHis* 會在 cell lysates 的上清液與菌體殘骸的部份。P (pellets) 表示 cell lysates 的菌體殘骸部份，S (supernatant) 表示 cell lysates 的上清液部份；(-) 表示 pET-29b(+)-*CaCDC4* 大腸桿菌菌株沒有以 IPTG 進行誘導，作為負對照組；箭頭則表示所要觀察的位置。



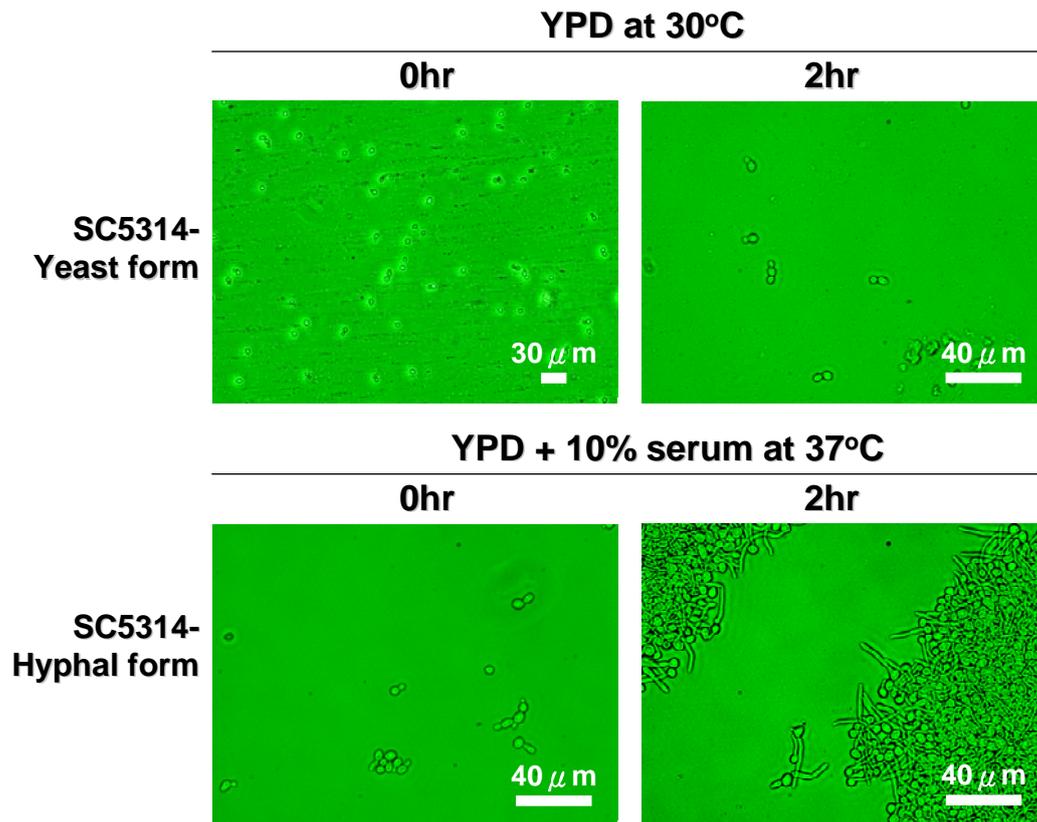
圖二十三、利用 Nickel Affinity Gel 將大腸桿菌 BL21 所誘導大量表現的 *CaCdc4-6xHis* 進行純化並製備出 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin*。將純化過程中的產物 input, F: flow through, 以不含 imidazole 的 Wash buffer 所清洗而得的 W1 和 W2, 經含有 250 mM imidazole 的 Elution buffer elute 而得的 E1 和 E2, 以及 R: resin 部分, 分別以 **A**. 西方點墨法與 **B**. Coomassie blue staining 進行分析。S 與 P 分別表示 cell lysates 的上清液與菌體殘骸的部份; (-) 表示沒有以 IPTG 進行誘導, 作為負對照組; * 表示非專一性的 bands; 箭頭則表示所要觀察的位置。

雖然有將 *CaCdc4-6xHis* 給純化下來，可是也發現到有許多非專一性的蛋白質也被 elute 下來，然而仍有一部分的 *CaCdc4-6xHis* 會與 resin 相結合，但也發現 resin 的部份也有許多的非專一性蛋白質存在著。在未來將更進一步藉由更嚴苛的清洗條件，如提高鹽濃度或是一系列含有不同 imidazole 濃度的 wash buffer 等，來找出更好的純化條件；但是我還是試著藉由上述的純化方式，來製備出 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin*，然後將藉由排除本身 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 經銀染所呈現的蛋白質分子量之 pattern，進而找出與 *CaCdc4* 相關性的蛋白質。

10. *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 與白色念珠菌 SC5314 之 Cell Lysates 進行細胞外蛋白質交互作用並運用親和力純化法找出與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質

將製備好的 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 分別與白色念珠菌 SC5314 之酵母菌生長形式的 cell lysates 和真性菌絲生長形式的 cell lysates，於 4 °C 的環境下，進行細胞外的蛋白質交互作用。再以親和力純化法，分別找出於白色念珠菌 SC5314 之酵母菌和真性菌絲的生長形式下，*CaCdc4* 的相關性蛋白質。

所以，首先將誘導白色念珠菌 SC5314 的酵母菌和真性菌絲生長形態的形成，由圖二十四可以觀察白色念珠菌 SC5314 經過誘導後的形態變化：當分別以 pH 5.4~5.6 的 YPD 培養液於 30°C，和 pH 7.2 的 YPD+10% serum 培養液於 37°C，來誘導經過隔夜培養的 SC5314 兩個小時後，白色念珠菌 SC5314 於前者的誘導環境下仍為酵母菌的生長形式，而於後者的誘導環境下，白色念珠菌 SC5314 會形成真性菌絲的形態。且在菌液的觀察中也發現到，酵母菌生長形態的 SC5314 是呈現黃白色混濁且均勻的菌液；而相較之下，真性菌絲生長形態的 SC5314 是呈現黃白色顆粒狀的菌液。接著，萃取白色念珠菌酵母菌與真性菌絲形態的 cell lysates，並分別與製備好的 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 於 4°C 中進行細胞外的蛋白質交互作用至隔天。

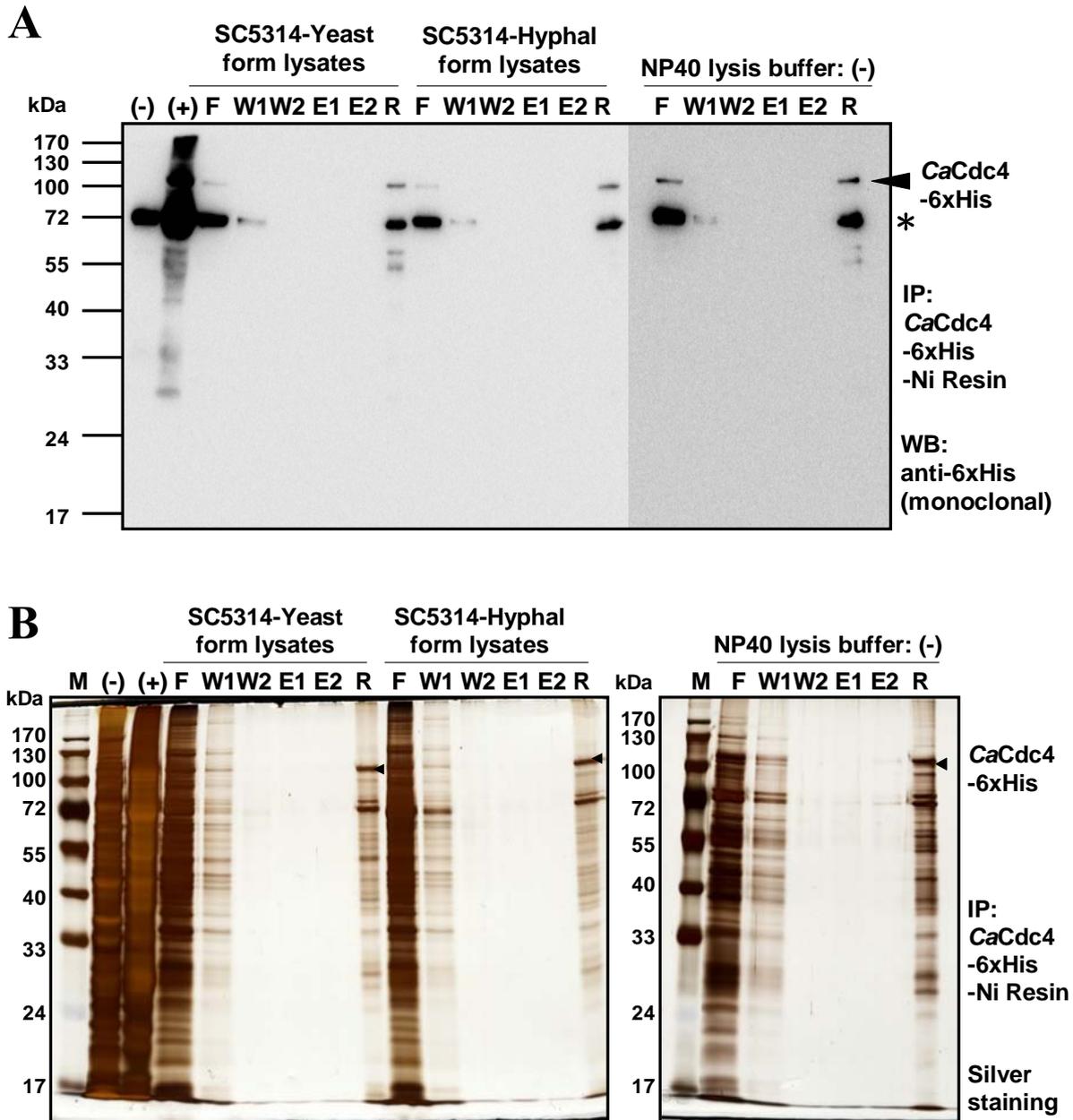


圖二十四、誘導白色念珠菌 SC5314 之酵母菌與真性菌絲生長形態的生成。以 pH 5.4~5.6 的 YPD 培養液於 30°C，和 pH 7.2 的 YPD+10% serum 培養液於 37°C 的環境，來分別誘導經過隔夜培養的 SC5314 兩個小時，使其分別形成酵母菌生長形態與真性菌絲生長形態的白色念珠菌。

接著，進行與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質之純化，以 Wash buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl)清洗完成細胞外蛋白質交互作用的 *CaCdc4*-6xHis-Ni-Resin 兩次，以及以含有 250 mM imidazole 的 Elution buffer (250 mM imidazole, 50 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl)進行兩次 elution 的動作，再將所有純化過程中的產物 (input、flow through/F、wash 1/W1、wash 2/W2、elute 1/E1、elute 2/E2 和 resin/R 部份)進行西方點墨法與銀染的分析：由圖二十五可以觀察在整個純化與 *CaCdc4* 相關性蛋白質的過程中，經過一次的清洗過程後，大部分的非專一性蛋白質都被去除了，但在 elution 的部份卻沒有蛋白質被 elute 出來，而是都留在 resin 上面；並且觀察 resin 上由銀染所呈現的蛋白質分子量之 pattern，可以發現在酵母菌和真性菌絲形態上，除了 *CaCdc4*-6xHis-Ni-Resin 的蛋白質分子量之 pattern 外，還有許多是兩者都擁有，以及個別所有的蛋白質分子量之 pattern。在下一個結果整理中，會進一步地把這次研究中的所有銀染結果圖，做一個綜觀性的分析與總整理。

11. 藉由銀染呈現與 *CaCdc4* 相關的蛋白質分子量之 Pattern 來綜觀性分析於酵母菌和真性菌絲生長形態下細胞內與細胞外 *CaCdc4* 之相關性蛋白質

在這個部份中，想藉由上述各個於酵母菌和真性菌絲的生長形態下，與細胞內和細胞外蛋白質交互作用的情況下(前者即利用 TET-on system 來誘導白色念珠菌菌株 *TET-CaCDC4* / *CaCDC4-F box* / *CaCDC4-WD40-6HF* 表現 *CaCdc4*-6HF、*CaCdc4*-F box-6HF 和 *CaCdc4*-WD40-6HF，並直接以此些重組蛋白質於細胞內找到與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質；而後者是利用大腸桿菌 BL21 表現系統所表現的 *CaCdc4*-6xHis，並於細胞外和 SC5314 之 cell lysates 進行蛋白質交互作用，以此找到與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質)，來綜觀性分析各個運用銀染所呈現與 *CaCdc4* 相關之蛋白質分子量的 pattern 結果。所以，會試著相互比較與整



圖二十五、CaCdc4-6xHis-Ni-Resin 與白色念珠菌 SC5314 之 Cell Lysates 進行細胞外蛋白質交互作用並運用親和力純化法找出與 CaCdc4 的相關性蛋白質。將純化過程中的產物 F: flow through, W1~2: wash 1~2, E1~2: elute 1~2, 以及 R: resin 部分, 分別以 A. 西方點墨法與 B. Silver staining 進行分析。(-)表示沒有以 IPTG 進行誘導 pET-29b(+)-CaCDC4 大腸桿菌菌株, (+)則表示有經過 IPTG 誘導, 並以此所表現的 CaCdc4-6xHis 製備出 CaCdc4-6xHis-Ni-resin; *表示非專一性的 bands; 箭頭則表示所要觀察的位置。

合各個細胞內 elution 與 resin 的部分，以及細胞內外的銀染結果：

11.1 綜觀性比較與整合各個細胞內 Elution 的銀染結果

11.1.1 綜觀性分析與 *CaCdc4* 的 F box 和 WD40 domain 之相關性蛋白質分子量的銀染 Patterns

首先將先觀察於酵母菌的生長形態下，分別利用 *CaCdc4*-F box-6HF 和 *CaCdc4*-WD40-6HF 所找到的相關性蛋白質之銀染結果，且將把銀染的 SDS-PAGE 跑膠圖分為 A、B、C 和 D 四個部分來做比較與分析：由圖二十六 B 之 A 部分可以發現，利用 *CaCdc4*-F box-6HF 和 *CaCdc4*-WD40-6HF 所找到的相關性蛋白質(以下將分別簡稱 F 組和 W 組)，雖然可以在以 BWP17 為背景值中(以下將簡稱 B 組)找到相對應的 bands，可是 band (1)和(2)於 W 組中有觀察到，而 F 組中則沒有；另外，band (3)只有在 B 組中有出現，F 與 W 組則沒有。圖二十六 B 之 B 部分，相較於對照組 B 組的 band (6)，F 組的 band (4)雖然深度較淺，但也比 W 組的 band (5)來得深；此外也同樣對照於 B 組的 band (10)，可以觀察到 F 組的 band (8)較呈現微弱的 smear 情形，且於 smear 上的 band (7)則是 F 組所特有的，而於 W 組的 band (9)則較 band (10)明顯。圖二十六 B 之 C 部份，分子量介於 40~50 kDa 之間的 a 與 b，以及介於接近 33 kDa 的 e 與 f，其蛋白質的表現深度在 F 組是為最淡的，而 W 和 B 組則是較為明顯的；靠近分子量 40 kDa 的 c，其蛋白質只有在 W 和 B 組中有發現，而 F 組則是沒有的；分子量介於 33~40 kDa 的 d 上，在 F、W 和 B 組中皆有觀察到蛋白質存在，只是在 F 組上的 band (12)較呈現微弱的 smear 情形，且在其上的 band (11)為 F 組特有的；而 band (13)與 smear (14)則是 W 組特有的。圖二十六 B 之 D 部分，相較於對照組 B 組 band (17)，F 組的 band (15)較微弱，而 W 組的 band (16)則更為明顯；接近 24 kDa 的分子量 g 和 h，以及介於 17~24 kDa 之間的 i，在 F、W 和 B 組中皆有觀察到蛋白質存在，只是 F 組較 W 組

明顯；位於接近分子量 17 kDa 的 j，W 和 B 組有發現到蛋白質，但是 F 組則是沒有的；最後可以觀察到 band (20) 是 F 組特有的。

接下來，我則以於酵母菌的生長形態下，分別利用 *CaCdc4*-F box-6HF 和 *CaCdc4*-WD40-6HF 所找到的相關性蛋白質之銀染結果，為主要的對照組，以於真性菌絲的生長型態下，找出與酵母菌組中不同的 *CaCdc4*-F box 和 *CaCdc4*-WD40-6HF 之相關性蛋白質：由圖二十六 B 之真性菌絲組的 A 部份，可以觀察到 F 與 W 組的蛋白質 patterns 和在酵母菌組中的形式是相同的，除了 F 組的 band (21) 和 W 組的 band (22) 為真性菌絲組中才有發現的，雖然仍可以在 B 組對照組中找到相對應的 band。於圖二十六 B 之真性菌絲組的 B 部份可以觀察到很有趣的變化現象，於酵母菌 F 組中可以觀察到的 band (4) 與 (7)，卻在真性菌絲組中消失了，且原本於酵母菌中較為模糊的 smear (8)，卻於真性菌絲中明顯的存在，此為 band (23)；而在真性菌絲 W 組中的 band (24) 和酵母菌組中的 band (9) 一樣，仍是存在著；另外，在靠近分子量 55 kDa 的 k 上，雖然於 B 組中可以找到相對應的 band，可是此位置上的蛋白質卻只有在真性菌絲組中有出現，酵母菌組中則沒有。圖二十六 B 之真性菌絲組的 C 部份，和酵母菌組的 C 部分不一樣之處為原本位於分子量 a 和 c 上的 bands 是沒有觀察到的；而最大明顯的不同是 W 組中的 band (25) 較酵母菌組的明顯。圖二十六 B 之真性菌絲組的 D 部份，可以觀察到原本在酵母菌 F 組中較明顯的 band (15)，在菌絲組中相對應的 band (26) 反而變得較不明顯了，且原本於酵母菌 W 和 B 組中的 band (18) 和 (19)，在真性菌絲組中反而消失了。

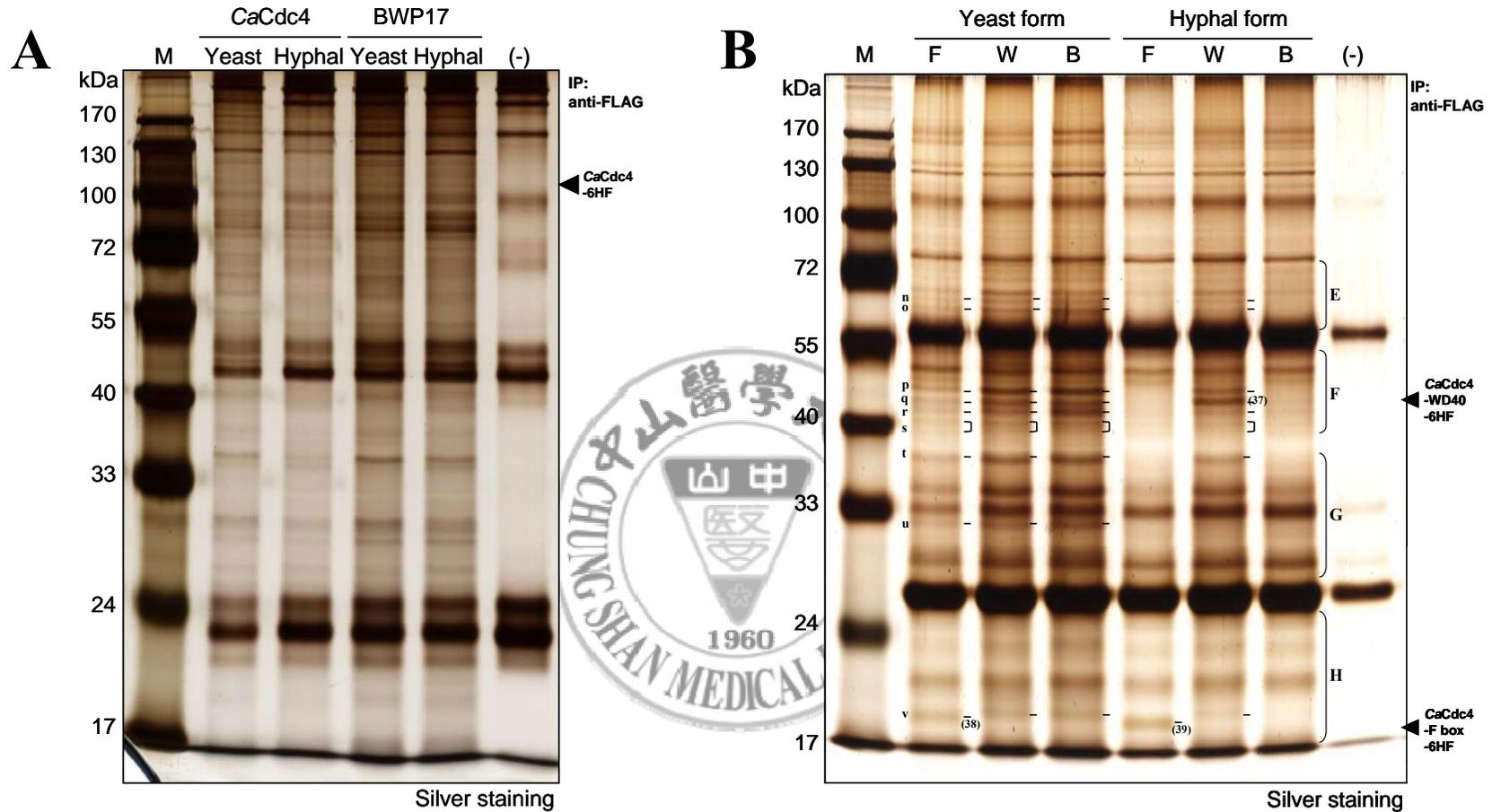
11.1.2 綜觀性分析與 *CaCdc4* 以及其 F box 和 WD40 domains 之相關性蛋白質分子量的銀染 Patterns

全長的 *CaCdc4* 於白色念珠菌中，為不穩定存在的蛋白質，而相較之下，把 *CaCdc4* 分成兩部分的 domains，F box 以及 WD40，則是較為穩定存在於

白色念珠菌中的形式。由於全長的 *CaCdc4* 是不穩定存在於細胞中的，所以在尋找與其相關性的蛋白質中，可能會因為蛋白質的不穩定而遺失了可能的相關性蛋白質；但也有可能會因為 F box 和 WD40 domains 的構形產生改變，或是缺乏轉譯後修飾的調節，而所找到的相關性蛋白質並不為與 *CaCdc4* 相關的蛋白質。因此，接下來，想藉由利用 *CaCdc4*-6HF 所找到的相關性蛋白質(以下將簡稱 *CaCdc4* 組)，與以 *CaCdc4*-F box-6HF 和 *CaCdc4*-WD40-6HF 所找到的相關性蛋白質之銀染結果相互比較，希望可以找到相同或是相異的部份：由圖二十六 A 之 A 部分，可以發現酵母菌與真性菌絲 *CaCdc4* 組的蛋白質分子量之 patterns，會和相對應的 F 與 W 組不同。而令我覺得有趣的部份是在圖二十六 A 之 B 部份中，*CaCdc4* 組的 band (27)、(28)和(29)，分別和 F 組的 band (7)、(8)和(23)是有相同的變化結果；和在圖二十六 A 之 C 部份中，*CaCdc4* 組中的 band (30)與(31)，也和 F 組中位於分子量 b 的 bands 具有相同的變化；以及在圖二十六 A 之 D 部份中，*CaCdc4* 組的 band (32)和(33)，與(34)和(35)，分別和 F 組 l 與 g 分子量之相對應 bands 有相類似的變化結果。另外，和 W 組位於分子量 j 的 band (18)以及其於真性菌絲組相對應的位置，也可以在 *CaCdc4* 組中找到相似的變化 pattern，即位於圖二十六 A 之 D 部份分子量 m 酵母菌組中的 band (36)，以及相對應真性菌絲組的位置。

11.2 綜觀性比較與整合各個細胞內 Resin 的銀染結果

由於在 resin 的銀染結果中，以 *CaCdc4*-6HF 所找到的相關性蛋白質之分子量 pattern，其與以 BWP17 為背景值之 pattern 並沒有顯著的差異(圖二十七 A)；而在以 *CaCdc4*-F box-6HF 和 *CaCdc4*-WD40-6HF 所找到的相關性蛋白質之分子量 patterns，雖然大部分和 B 組是相同的，但是仍有一些差異的地方。所以，接下來將會以 F 和 W 組的 resin 銀染之結果，為主要的觀察對象。將會分別以 E、F、G 和 H 四個部分來做比較與分析：由圖二十七 B 之 E 部分可以觀察到，



圖二十七、運用細胞內蛋白質交互作用及單一次親合力純化之 resin 部分以銀染 pattern 差異找出與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質。將 cell lysates 直接從已經過 doxycycline 與酵母菌和真性菌絲生長形態誘導的 A. *TET-CaCDC4-6HF* 和 B. *TET-CaCDC4-F box/CaCDC4-WD40-6HF* 菌株中抽取出來，再利用 anti-FLAG-M2 affinity gel 進行純化，最後將純化過程中的 resin 部分，以銀染的方式進行蛋白質的呈現。B 是以 BWP17 作為對照組，(-)則是以 NP40 lysis buffer 作為負對照組。

分子量位於 n 和 o 的 bands，雖然在酵母菌 B 組中，可以找到與 F 和 W 組相對應的 bands；但是於真性菌絲組中，只有 W 組仍然是有 bands 的。圖二十七 B 之 F 部分包含有分子量 p、q、r 與 s 位置上的蛋白質，而在酵母菌組中，皆有 F 部分的蛋白質；但在真性菌絲中，只有 W 組仍是保有 F 區域的蛋白質；且位於分子量 p 上的 bands，其於酵母菌和真性菌絲組中的變化，是與 elution 中位於相同分子量之 bands 的變化(圖二十六 B 之 a)相同的，而 q 也與 elution 中位於相同分子量之 bands 的變化(圖二十六 B 之 b)是相同的，且 band (37)和 elution 中 band (25) (圖二十六 B)具有相呼應的情況。圖二十七 B 之 G 部分，位於分子量 t 上的蛋白質，其於酵母菌和真性菌絲組的變化，與 elution 中位於相同分子量之 bands (圖二十六 B 之 d)的變化是相同的，皆於真性菌絲 W 組有較明顯的 band 存在；另外，酵母菌組中，位於分子量 u 上的蛋白質是有明顯的 bands，但在真性菌絲組則是沒有的。圖二十七 B 之 H 部分，位於分子量 v 上的蛋白質，其於酵母菌和真性菌絲組的變化，與 elution 中位於相同分子量之 bands (圖二十六 B 之 j)的變化是相同的；且 bands (38)和(39)與 elution 中 band (20)的變化是同樣的。

11.3 綜觀性分析運用細胞內和細胞外之蛋白質交互作用所找出與 *CaCdc4* 相關相關性蛋白質分子量的銀染 Patterns

最後，想藉由綜觀性分析與比較運用 TET-on system 來誘導白色念珠菌菌株 *TET-CaCDC4* / *CaCDC4-F box* / *CaCDC4-WD40-6HF* 表現 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質，並直接以此些重組蛋白質於細胞內找到與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質，和利用大腸桿菌 BL21 表現系統所表現的 *CaCdc4-6xHis*，並於細胞外和 SC5314 之 cell lysates 進行蛋白質交互作用，以此所找到與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質，其銀染的結果是否有相類似或不同的 pattern 出現。雖然在利用細胞外蛋白質交互作用中，找到於酵母菌和真性菌絲

形態上，除了 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 的蛋白質分子量之 pattern 外，還有許多是兩者都擁有，以及個別所有的蛋白質分子量之 pattern；但是，當我將這些可能為 *CaCdc4* 的相關性蛋白質，回去對應運用細胞內的方式所找到與 *CaCdc4* 相關的蛋白質之銀染結果時，卻對應不到相同的分子量[如圖二十六 C 之 band (40)~(43)]，即使有對應到相同位置的 bands，但其於酵母菌和真性菌絲的變化上卻是不相同的(如圖二十六 C 之位於分子量 u 的 bands 之變化，相較於圖二十六 B 之分子量 c 上的 bands)。



討論

在這次的研究中，以成功的運用 TET-on system 所建構的白色念珠菌菌株，*TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF*，與大腸桿菌 BL21 的表現系統，來分別大量表現 epitope-tagged *CaCdc4*，以及其 F box 與 WD40 domains 的重組蛋白質，前者為 *CaCdc4-6HF*、*CaCdc4-F box-6HF* 和 *CaCdc4-WD40-6HF*，後者為 *CaCdc4-6xHis* 重組蛋白質；並分別直接於白色念珠菌細胞內和細胞外，以及在酵母菌與真性菌絲的生長型態下，來進行與 *CaCdc4 / CaCdc4-F box / CaCdc4-WD40-6HF* 和 *CaCdc4-6xHis* 重組蛋白質的相結合作用，而也分別運用 anti-FLAG-M2 affinity gel 進行單一次的親和力純化法，和以製備 *CaCdc4-6xHis-Ni-Resin* 的方式，於經過銀染呈現蛋白質的 SDS-PAGE 膠片中，觀察到相異與相同的蛋白質分子量之 patterns。然而這些相異與相同的 patterns 必須以質譜儀的分析，來進行身份鑑定，雖然目前還沒有鑑定出來，但在未來的工作上，會將其分析完畢，並希望可以藉此找到於酵母菌和真性菌絲形態下與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質，並能以此綜觀性的了解 *CaCdc4* 和菌絲生長之間的調控關係。

雖然在這次的研究中，並沒有完成蛋白質身份鑑定的分析，但是藉由這次的研究結果，我發現 *CaCdc4* 於白色念珠菌中，並非穩定存在的蛋白質；且由觀察與比較各個銀染所呈現的蛋白質分子量之 patterns，可以發現 *CaCdc4* 的 F box 與 WD40 domains 分別在酵母菌和真性菌絲的生長形態下，可能會與不同的相關性蛋白質結合，且兩 domains 的相關性蛋白質也將有所不同。因此，接下來，將會藉由實驗的結果，來討論 *CaCdc4* 於白色念珠菌中的穩定性，以及藉由已知於出芽酵母菌中，*ScCdc4* 的相關性蛋白質之分子量，來預測可能會與 *CaCdc4* 相關的蛋白質。另外，也將分別討論與檢討為何無法建構出利用 *CaCDC4* 內生性 promoter 來啟動 *CaCdc4* 表現的 *CaCDC4-6HF-Sp* (Sp: self promoter) 白色念珠菌菌株；和利用連續兩種 tag，6xHis-FLAG tag 來標定 *CaCdc4* 時，6xHis epitope tag

無法被 anti-6xHis tag 抗體所辨識，且也無法與 HIS-Select Nickel Affinity Gel 相結合，以致使無法利用兩階段式親和力純化法(tandem affinity purification / TAP)來進行純化。最後，也將會討論利用大腸桿菌系統的方式，所找到與 *CaCdc4* 相關性蛋白質的可能性與限制性。

1. *CaCdc4* 於白色念珠菌中為不穩定存在的蛋白質

我們藉由觀察運用 TET-on system 以及 *ACT1* promoter 來分別大量與持續性表現 6xHis-FLAG-tagged 重組蛋白質的情形，以及各種重組蛋白質，即 6xHis-FLAG-tagged 全長的 *CaCdc4*，和其 F box 與 WD40 domains，於白色念珠菌的表現情況之結果(見 P.94 圖十二)中發現，*CaCdc4* 並不為穩定存在於白色念珠菌中的蛋白質。當 *CaCdc4* 在白色念珠菌中持續性地表現時(*CaCDC4-6HF-Ap*)，其細胞內可能會有一些反應機制而將這些多餘的 *CaCdc4* 給分解掉，但是在 TET-on system 的情況下(*TET-CaCDC4-6HF*)，由於 *CaCdc4* 被立即地大量誘導出，而細胞內可能沒有辦法立刻將多餘表現的 *CaCdc4* 給分解掉，所以在西方點墨法分析中，前者觀察不到明顯的 *CaCdc4* 訊號，而後者仍可以觀察到微弱的 *CaCdc4* 訊號。且由 *TET-CaCDC4* / *CaCDC4-F box* / *CaCDC4-WD40-6HF* 菌株之西方點墨法分析的結果中，可以推論 *CaCdc4* 的非 F box 區域(包括 N terminus，WD40 domain)可能會是影響 *CaCdc4* 穩定性的關鍵，當 WD40 domain 存在時，可能會使 *CaCdc4* 不穩定存在於白色念珠菌中。

然而，我們也由過去的文獻(Zhou and Howley, 1998)當中發現，在出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)中，其 SCF complexes：SCF^{Cdc4}、SCF^{Grr1} 和 SCF^{Met30} 的 F box 蛋白質：Cdc4、Grr1 和 Met30，不是穩定存在的蛋白質，而是內生性短暫存在的蛋白質(intrinsically short-lived proteins)。藉由探討蛋白質於細胞中的半衰期研究，發現 SCF complex 的結構蛋白質 Cdc53 和 Skp1 的半衰期時間為 >60 分鐘，是為穩定存在於出芽酵母菌中的蛋白質；而 F box 蛋白質中，Cdc4 的半

衰期時間為 15 分鐘(和其受質 Sic1 是相似的), Grr1 則為 30 分鐘, 兩者相對為不穩定存在於酵母菌中的蛋白質。且也由探討 Cdc4 於各個細胞週期的穩定度中發現, Cdc4 在整個細胞週期的過程中, 皆會快速地被分解掉, 因此可以得知完整的 SCF^{Cdc4} complex 是暫時性地存在於細胞中以執行功能的(Zhou and Howley, 1998)。F box 蛋白質, Cdc4 與 Grr1, 是透過自身的泛素化(autoubiquitination)後, 以進入 ubiquitin-proteasome pathway 進而被 26S proteasome 給分解掉。而這樣的 F box 蛋白質的不穩定之情形, 可以幫助 SCF complexes 快速地置換將認識不同種類受質的 F box 蛋白質, 以幫助細胞可以於不同時期的細胞週期, 與不同的生理狀態下, 快速地做出反應(Zhou and Howley, 1998)。

而將出芽酵母菌已知的 SCF^{Cdc4} complex 之 F box 蛋白質 Cdc4 的觀念, 帶入到白色念珠菌 Cdc4 中, 可以發現 CaCdc4 同樣也和 ScCdc4 為內生性短暫存在的蛋白質(intrinsically short-lived proteins)。但是在近年的文獻(Atir-Lande et al., 2005)中發現, CaCdc4 是穩定存在於白色念珠菌中的, 此結果與我們所發現的結果是相反的; 且也發現 CaCdc4 於白色念珠菌中的功能主要是為菌絲形態生成的抑制者(Atir-Lande et al., 2005; Shieh et al., 2005), 而與細胞週期的調控較沒有關係(Atir-Lande et al., 2005)。因此, 在未來的研究方向中, 將藉由蛋白質於細胞中的半衰期研究, 來更進一步探討 CaCdc4 於白色念珠菌的穩定性在不同型態下會是如何, 且 CaCdc4 是否與 ScCdc4 一樣是由 SCF complex 的方式來執行其功能, 若不是則 CaCdc4 是如何來調控白色念珠菌的形態生成之效果。

2. 藉由銀染所呈現的蛋白質分子量之 Patterns 來預測 CaCdc4 可能的機制與其相關性蛋白質

我利用 6xHis-FLAG-tagged CaCdc4 以及其 F box 和 WD40 domains 的重組蛋白質所找到的與 CaCdc4 相關的蛋白質之銀染結果, 來探討與推測 CaCdc4 的機制。假設 CaCdc4 於白色念珠菌中, 是以 SCF complex 的機制來執行其功能的,

且由出芽酵母菌與哺乳類動物的研究當中，我們得知 Cdc4 為一種 F box 蛋白質，其含有靠近 N 端的 F box motif，以及靠近 C 端 WD40 repeats (見 P.26 附圖十)，F box motif 主要會和 SCF complex 中的連接性蛋白質 Skp1 相結合，而 WD40 repeats 則是會與專一性的受質相結合。所以，如果將 *CaCdc4* 的 F box 與 WD40 domains 分開時，則 *CaCdc4* 的 F box motif 所找到的相關性蛋白質之銀染 patterns，不管是在酵母菌或是真性菌絲的生長形態下，理論上將會是相同的，是由於 F box motif 主要會是與 SCF complex 的結構性蛋白質相連結有關；而 *CaCdc4* 的 WD40 repeats 所找到的相關性蛋白質之銀染 patterns，則分別在酵母菌與真性菌絲的生長形態下，理論上將會是有所不同的，因為 WD 40 repeats 是和受質的專一性有關，且 *CaCdc4* 於白色念珠菌中的功能主要是與形態的生成有關。可是在 P.117 圖二十六 B 之 B 部份中，卻發現 *CaCdc4* 的 F box motif 於酵母菌和真性菌絲的生長形態下，其相關性蛋白質之分子量銀染 patterns 有很明顯的不同；而 *CaCdc4* 的 WD40 repeats 則於酵母菌和真性菌絲下，並沒有很大的差異性，除了 band (25) 在真性菌絲的情況下有較酵母菌的情形下更為明顯。由這個結果，似乎暗示著 *CaCdc4* 可能不是以 SCF complex 的形式來執行其功能，或是 *CaCdc4* 是以 SCF complex 來執行其功能，但是 *CaCdc4* 可能具有上游的調控者來調節其在酵母菌和真性菌絲生長形態下的功能。

接下來，我試著藉由已知與出芽酵母菌 Cdc4 的相關性蛋白質，於 *Candida* Genome Databases (CGD) 找到於白色念珠菌中所相對應的蛋白質，包含有相對應 SCF^{ScCdc4} complex 的成員：*CaCdc53*、*CaSkp1*、*CaHrt1* 和 *CaCdc34*，以及 *CaCdc4* 可能的專一性受質：*CaSol1*、*CaGcn4* 和 *CaCdc6*。然後，再藉由 ExPASy Proteomics Server 來預測出各個與出芽酵母菌相對應的蛋白質之分子量，以希望可以藉由蛋白質的分子量於各個銀染結果的 patterns 中，預測出 *CaCdc4* 可能的相關性蛋白質。由 ExPASy Proteomics Server 所預測出的各個蛋白質之分子量為：*CaCdc53* 的分子量為 87.14211kDa，*CaSkp1* 為 19.05963kDa，*CaHrt1* 為 14.22609kDa，*CaCdc34* 為 28.01341kDa，*CaSol1* 為 26.68649kDa，*CaGcn4* 為 35.31719kDa，以

及 *CaCdc6* 的分子量約為 55kDa。接著，於各個銀染的蛋白質分子量之 patterns 中，利用分子量的比對，試著預測出 *CaCdc4* 可能的相關性蛋白質：由 *CaCdc4-6xHis-Ni-resin* 於細胞外蛋白質之交互作用所找到與 *CaCdc4* 相關性蛋白質之銀染結果中(P.117 圖二十六 C)，分別有對應到 *CaGcn4* [band (44)和(45)]與 *CaCdc34* [band (46)和(47)]以及 *CaSkp1* [band (48)和(49)]的分子量；但是在以細胞內蛋白質交互作用中的各個銀染結果中(P.117 圖二十六 A B 和 P.120 圖二十七)，並沒有對應到所預測的蛋白質，即使有，但是其背景值也會有相對應的 bands。所以由分子量的比對結果，我將預測 *CaCdc4* 的相關性蛋白質，可能含有 SCF complex 的成員以及其受質 *CaGcn4*。除此之外，*CaCdc4* 的相關性蛋白質可能還含有上游的調控者等等。

3. 無法建構出利用 *CaCDC4* 內生性 promoter 來啟動 *CaCdc4* 表現的 *CaCDC4-6HF-Sp* 菌株之探討

在建構以 *CaCDC4* 內生性 promoter 來啟動 *CaCdc4* 表現的 *CaCDC4-6HF-Sp* (Sp: self promoter)白色念珠菌菌株中，雖然目前有挑到許多 Ura⁺的轉形菌株，且也經過兩個世代的複印篩選，挑到較有可能為 *CaCDC4-6HF-Sp* 菌株的菌落，但是在酵母菌菌落聚合酶連鎖反應確認下，卻沒有從這些 Ura⁺的轉形菌株中得到所要的 *CaCDC4-6HF-Sp* 菌株，因此目前並沒有建構出 *CaCDC4-6HF-Sp* 白色念珠菌菌株。而由今年於白色念珠菌 *VPS1* 的研究之文獻(Bernardo et al., 2008)中，可以得知研究者們無法成功建構出 *Cavps1* Δ null mutant，且也發現 *CaVPS1* 對於白色念珠菌而言並非必要的基因，然而研究者們想要探討當白色念珠菌缺乏 *CaVPS1* 時，其對於白色念珠菌蛋白質水解酶的分泌、菌絲以及生物膜的形成之影響會是如何，所以取而運用 tetracycline-regulated condition mutant, tetR-*VPS1* 菌株的建構。研究者們也提出無法成功建構出 *Cavps1* Δ null mutant 的原因與可能性：當將第一個等位基因 *CaVPS1* 給剔除掉時，是很容易可以得到異型合子

Cavps1^{+/-}的突變株，但是要將第二個等位基因 *CaVPS1* 給同時剔除時，所得到的菌落經由基因形態的分析，卻都不是同型合子 *Cavps1*^{-/-}的突變株。而這可能是因為等位基因專一性地降低同源互換的機率，或是 *Cavps1* Δ null mutant 會降低白色念珠菌的生存能力(fitness)所造成的。

雖然，我所建構的白色念珠菌菌株並非如 *Cavps1* Δ null mutant 將兩個等位基因給剔除掉，而是希望藉由 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette，將 6xHis-FLAG-tag 置入 *CaCDC4* 的下游，以得到可以運用 *CaCDC4* 自身的 promoter 來啟動 *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質表現的 *CaCDC4-6HF-Sp* 菌株。但同樣的是，我們也可以篩選出 Ura⁺的轉形菌株，可是經由基因型態的分析卻都不是所要的 *CaCDC4-6HF-Sp* 菌株。然而以 *SFH-6HF* PCR-base integration cassette 的方式，製備出運用欲研究之基因自身的 promoter 來啟動 6His-FLAG-tagged 重組蛋白質表現的白色念珠菌菌株，在 *CaCDC11* 和一系列與 septin complex 有關的白色念珠菌基因上，是可以成功建構成的(Kaneko et al., 2004)。所以或許無法成功建構出 *CaCDC4-6HF-Sp* 菌株的原因，可能也是由於 *CaCDC4* 等位基因專一性地使同源互換機率降低所造成的結果！而之所以仍可以得到 Ura⁺的轉形菌株，我們推測可能是因為白色念珠菌為了能在缺乏 uridine 的環境下生存，所以必須將 *CaURA3* 給置換進基因體中，但是由於 *CaCDC4* 等位基因與 *CaCDC4-SFH-6HF* PCR-base integration cassette 的專一性同源互換機率極低，而 *CaURA3* 則透過其他的互換機制以嵌入白色念珠菌基因體中，進而得到仍為 Ura⁺但不為 *CaCDC4-6HF-Sp* 菌株。

4. *CaCdc4-6HF* 重組蛋白質之 6xHis Epitope Tag 缺乏被抗體辨識以及 Ni Resin 純化的能力

利用連續兩種 tag，6xHis-FLAG tag 來標定 *CaCdc4* 時，6xHis epitope tag 無法被 anti-6xHis tag 抗體所辨識，且也無法與 HIS-Select Nickel Affinity Gel 相結

合，以致於無法利用兩階段式親和力純化法(tandem affinity purification / TAP)來進行純化。而在 *CaCdc4*-F box-6HF 與 *CaCdc4*-WD40-6HF 重組蛋白質中，6xHis epitope tag 同樣也無法被 anti-6xHis tag 抗體所辨識。可是在經過 anti-FLAG-M2 affinity gel 的純化與濃縮之後，*CaCdc4*-F box-6HF 和 *CaCdc4*-WD40-6HF 是可以被 anti-6xHis tag 抗體所辨識，雖然其西方點墨法的訊號不如 anti-FLAG tag 抗體來得明顯；但相較之下，*CaCdc4*-6HF 即使經過了 anti-FLAG-M2 affinity gel 的純化與濃縮後，仍然無法被 anti-6xHis tag 抗體所辨識。且由於 FLAG tag 是緊鄰著 6xHis tag 之後，且兩個 tags 之間只有兩個胺基酸的空間，由此我們推論出或許 FLAG tag 會影響 6xHis tag 被 anti-6xHis tag 抗體辨識的能力，和與 Ni resin 相結合的能力。可是此 6xHis-FLAG tag 於白色念珠菌 septin complex 的研究中，卻沒有此現象發生(Kaneko et al., 2004)。所以或許是因為 *CaCdc4* 以及其 F box 與 WD40 domains 的構型，會影響到 6xHis tag 暴露在重組蛋白質結構外的能力，以及影響 6xHis tag 在一級結構中被抗體辨識的能力。

5. 運用大腸桿菌 BL21 表現系統找到與 *CaCdc4* 相關性蛋白質的可能性與限制性

由於原核生物系統並沒有轉譯後修飾的功能，且有些真核生物的蛋白質經過轉譯後修飾後，其蛋白質的穩定度將會下降。所以透過原核生物的表現系統，來大量表現欲研究的蛋白質 *CaCdc4*，以希望可以減少與降低可能會因為直接在真核生物的轉譯後修飾所造成 *CaCdc4* 不穩定的情形，進而降低了 *CaCdc4* 與其相關性蛋白質的結合機率，並且希望可以藉由細胞外蛋白質交互作用來找到與 *CaCdc4* 相關性的蛋白質。而由這次的研究中，我們利用此方式於酵母菌和真性菌絲的 cell lysates 中，找到了許多除了 *CaCdc4*-6xHis-Ni-resin 銀染背景值之外的 bands，然而這些 bands 卻是在以白色念珠菌細胞內所找到的 patterns 是沒有相對應到的。因此，藉由此方式可能將會找到更多以細胞內的方式所找不到的 *CaCdc4*

相關性蛋白質。

但是相對地，或許 *CaCdc4* 須要透過轉譯後修飾，才具有與相關性蛋白質結合的能力，且是否 *CaCdc4* 於原核生物表現系統中，其蛋白質結構的形成會是錯誤的，而導致所找到的相關性蛋白質根本就會是錯誤的問題等，這也是利用大腸桿菌 BL21 表現系統來大量表現 *CaCdc4-6xHis* 重組蛋白質，並以細胞外的蛋白質交互作用之方式來找到與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質之限制。

總結上述的實驗結果與討論，我發現 *CaCdc4* 於白色念珠菌中，不是穩定存在的蛋白質，且 *CaCdc4* 的非 F box 區域可能將會是造成 *CaCdc4* 不穩定存在的關鍵。然而，目前已成功的運用 TET-on system 所建構的 *TET-CaCDC4 / CaCDC4-F box / CaCDC4-WD40-6HF* 白色念珠菌菌株，以及大腸桿菌 BL21 的表現系統，分別於酵母菌和真性菌絲生長的形式下，與於細胞內和細胞外，進行蛋白質交互作用，並分別運用單一次親合力純化法(one-step affinity purification)，於經過銀染後所呈現的蛋白質之分子量 patterns 中，觀察到相異與相同的蛋白質分子量之 patterns。然而這些相異與相同的 patterns 必須以質譜儀的分析，來進行身份的鑑定。雖然目前還沒有鑑定出來，但希望在未來的工作上，能將其分析完畢，以希望可以藉此找到於酵母菌和真性菌絲形態下與 *CaCdc4* 的相關性蛋白質，並能以此綜觀性的了解 *CaCdc4* 和菌絲生長之間的調控關係。而在未來，我們也將會對 *CaCdc4* 於白色念珠菌中的穩定度，進行進一步的探討，也將更進一步運用兩階段式親和力純化法，來找出與 *CaCdc4* 的 F box 及 WD40 domains 的相關蛋白質，並將利用二維電泳技術(two-dimentional gel electrophoresis)進行分析，以希望可以藉此更了解 *CaCdc4* 於白色念珠菌中的功能與機制。

參考文獻

- Anderson, J., Mihalik, R., and Soll, D.R.** (1990). Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *J Bacteriol* *172*, 224-235.
- Atir-Lande, A., Gildor, T., and Kornitzer, D.** (2005). Role for the SCFCDC4 ubiquitin ligase in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell* *16*, 2772-2785.
- Baillie, G.S., and Douglas, L.J.** (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* *46*, 397-403.
- 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. *J Infect Dis* *167*, 1247-1251.
- Berman, J., and Sudbery, P.E.** (2002). *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* *3*, 918-930.
- Bernardo, S.M., Khalique, Z., Kot, J., Jones, J.K., and Lee, S.A.** (2008). *Candida albicans* VPS1 contributes to protease secretion, filamentation, and biofilm formation. *Fungal Genet Biol* *45*, 861-877.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* *8*: 93-99.
- Butty, A.C., Pryciak, P.M., Huang, L.S., Herskowitz, I., and Peter, M.** (1998). The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* *282*, 1511-1516.
- 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.
- 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., et al.** (2005). Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infect Dis* *5*, 22.
- Diffley, J.F.** (1996). Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev* *10*, 2819-2830.
- Dixon, C., Brunson, L.E., Roy, M.M., Smothers, D., Sehorn, M.G., and Mathias, N.** (2003). Overproduction of polypeptides corresponding to the amino terminus of the F-box proteins Cdc4p and Met30p inhibits ubiquitin ligase activities of their SCF complexes. *Eukaryot Cell* *2*, 123-133.
- Donovan, J.D., Toyn, J.H., Johnson, A.L., and Johnston, L.H.** (1994). P40SDB25, a putative CDK inhibitor, has a role in the M/G1 transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* *8*, 1640-1653.
- Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B., and Deshaies, R.J.** (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK

inhibitor Sic1p. *Cell* 91, 221-230.

Fridkin, S.K., and Jarvis, W.R. (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9, 499-511.

Gacser, A., Stehr, F., Kroger, C., Kredics, L., Schafer, W., and Nosanchuk, J.D. (2007). Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* 75, 4710-4718.

Gartner, A., Jovanovic, A., Jeoung, D.I., Bourlat, S., Cross, F.R., and Ammerer, G. (1998). Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, in vivo. *Mol Cell Biol* 18, 3681-3691.

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.

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 plants. *Science* 293, 1129-1133.

Hereford, L.M., and Hartwell, J.H. (1974). Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis. *J Mol Biol* 85, 445-461.

Hilder, T.L., Malone, M.H., Bencharit, S., Colicelli, J., Haystead, T.A., Johnson, G.L., and Wu, C.C. (2007). Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *J Proteome Res* 6, 4343-4355.

Honey, S., Schneider, B.L., Schieltz, D.M., Yates, J.R., and Futcher, B. (2001). A novel multiple affinity purification tag and its use in identification of proteins associated with a cyclin-CDK complex. *Nucleic Acids Res* 29, E24.

Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., et al. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7329-7334.

Joshi, K.R., Solanki, A., and Prakash, P. (1993). Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. *Indian J Pathol Microbiol* 36, 48-52.

Kaneko, A., Umeyama, T., Hanaoka, N., Monk, B.C., Uehara, Y., and Niimi, M. (2004). Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast* 21, 1025-1033.

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

Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., and Soll, D.R. (1999). Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect*

Immun 67, 6652-6662.

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

Lew, D.J., and Reed, S.I. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* 120, 1305-1320.

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

Miller, M.G., and Johnson, A.D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110, 293-302.

Montazeri, M., and Hedrick, H.G. (1984). Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. *Appl Environ Microbiol* 47, 1341-1342.

Nobile, C.J., Bruno, V.M., Richard, M.L., Davis, D.A., and Mitchell, A.P. (2003). Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 149, 3629-3637.

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

Park, Y.N., and Morschhauser, J. (2005). Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 4, 1328-1342.

Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 9-20.

Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.

Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55-72.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.

Rocha, C.R., Schropel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Leberer, E. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 12, 3631-3643.

Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M., and Bille, J. (1996). Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 2300-2305.

Santos, M.A., and Tuite, M.F. (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 23, 1481-1486.

Scaglione, K.M., Bansal, P.K., Deffenbaugh, A.E., Kiss, A., Moore, J.M., Korolev, S., Cocklin, R., Goebel, M., Kitagawa, K., and Skowyra, D. (2007). SCF E3-mediated

autoubiquitination negatively regulates activity of Cdc34 E2 but plays a nonessential role in the catalytic cycle in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 27, 5860-5870.

Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M.D., and Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79, 233-244.

Shieh, J.C., White, A., Cheng, Y.C., and Rosamond, J. (2005). Identification and functional characterization of *Candida albicans* CDC4. *J Biomed Sci* 12, 913-924.

Sinha, I., Wang, Y.M., Philp, R., Li, C.R., Yap, W.H., and Wang, Y. (2007). Cyclin-dependent kinases control septin phosphorylation in *Candida albicans* hyphal development. *Dev Cell* 13, 421-432.

Soll, D.R., Lockhart, S.R., and Zhao, R. (2003). Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2, 390-397.

Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., and Ernst, J.F. (1999). Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67, 5514-5517.

Su, Z., Li, H., Li, Y., and Ni, F. (2007). Inhibition of the pathogenically related morphologic transition in *Candida albicans* by disrupting Cdc42 binding to its effectors. *Chem Biol* 14, 1273-1282.

Switzer, R.C., 3rd, Merrill, C.R., and Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 98, 231-237.

Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L., and Kaiser, P. (2006). A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. *Mol Cell Proteomics* 5, 737-748.

Tang, X., Orlicky, S., Lin, Z., Willems, A., Neculai, D., Ceccarelli, D., Mercurio, F., Shilton, B.H., Sicheri, F., and Tyers, M. (2007). Suprafacial orientation of the SCFCdc4 dimer accommodates multiple geometries for substrate ubiquitination. *Cell* 129, 1165-1176.

Tripathi, G., Wiltshire, C., Macaskill, S., Tournu, H., Budge, S., and Brown, A.J. (2002). Gen4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J* 21, 5448-5456.

Umeyama, T., Kaneko, A., Nagai, Y., Hanaoka, N., Tanabe, K., Takano, Y., Niimi, M., and Uehara, Y. (2005). *Candida albicans* protein kinase CaHsl1p regulates cell elongation and virulence. *Mol Microbiol* 55, 381-395.

Umeyama, T., Kaneko, A., Watanabe, H., Hirai, A., Uehara, Y., Niimi, M., and Azuma, M. (2006). Deletion of the CaBIG1 gene reduces beta-1,6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in *Candida albicans*. *Infect Immun* 74, 2373-2381.

Verma, R., Annan, R.S., Huddleston, M.J., Carr, S.A., Reynard, G., and Deshaies, R.J. (1997). Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science* 278, 455-460.

Walther, A., and Wendland, J. (2003). An improved transformation protocol for the human

fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet* 42, 339-343.

Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004). *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 7, 350-357.

Willems, A.R., Schwab, M., and Tyers, M. (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695, 133-170.

Zachariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P.D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M.J., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* 279, 1216-1219.

Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., et al. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709.

Zhou, P., and Howley, P.M. (1998). Ubiquitination and degradation of the substrate recognition subunits of SCF ubiquitin-protein ligases. *Mol Cell* 2, 571-580.



附錄

附錄一、藥品的製備

DNA Electrophoresis	
Solution	Method of Preparation
0.5 M EDTA, pH 8.0 (1 L)	186.1 g Disodium <u>E</u> thylene <u>D</u> iamide Tertacetate 2H ₂ O (F.W. 327.24) 800 ml d ₂ H ₂ O -Adjust pH to 8.0 with NaOH. -Add d ₂ H ₂ O to 1 L.
50x TAE (1 L)	242 g Tris base (F.W.121.14) 57.1 g Acetic acid (F.W. 61.83) 100 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 -Add d ₂ H ₂ O to 1 L.
10x TBE (1 L)	108 g Tris base (F.W.121.14) 55 g Boric acid (F.W 60.05) 40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 -Add d ₂ H ₂ O to 1 L.
6x DNA loading dye	30% Glycerol 7.5 mM Tris-HCl, pH 8.0 36 mM EDTA, pH 8.0 0.006% Bromophenol blue 0.006% Xylene cyanol
Ethidium bromide /EtBr (0.5 µg/ml)	20 µl EtBr (10 mg/ml) 400 ml d ₂ H ₂ O -Store in the dark.
Medium for <i>E. coli</i>	
Solution	Method of Preparation
Luria-Bertani medium (LB broth) (1 L)	10 g Tryptone 5 g Yeast extract 10 g NaCl (F.W.58.44) -Adjust pH to 7.2~7.4. -Add d ₂ H ₂ O to 1 L. -Autoclave for 20 mins.
LB broth plate (1 L)	10 g Tryptone 5 g Yeast extract 10 g NaCl (F.W.58.44)

	<p>15 g Agar</p> <p>-Adjust pH to 7.2~7.4.</p> <p>-Add d₂H₂O to 1 L.</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p>
LB/Ampicillin plate (1 L)	<p>10 g Tryptone</p> <p>5 g Yeast extract</p> <p>10 g NaCl (F.W.58.44)</p> <p>15 g Agar</p> <p>-Adjust pH to 7.2~7.4.</p> <p>-Add d₂H₂O to 1 L.</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p> <p>-When the temperature of medium was lowered to 45 °C, add the ampicillin to 50~100 µg/ml final concentration.</p>
LB/Kanamycin plate (1 L)	<p>10 g Tryptone</p> <p>5 g Yeast extract</p> <p>10 g NaCl (F.W.58.44)</p> <p>15 g Agar</p> <p>-Adjust pH to 7.2~7.4.</p> <p>-Add d₂H₂O to 1 L.</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p> <p>-When the temperature of medium was lowered to 45 °C, add the kanamycin to 25~50 µg/ml final concentration.</p>
SOB medium (1 L)	<p>20 g Tryptone</p> <p>5 g Yeast extract</p> <p>0.584 g NaCl (F.W.58.44)</p> <p>0.186 g KCl (F.W.74.55)</p> <p>-Adjust pH to 7.2~7.4.</p> <p>-Add d₂H₂O to 1 L.</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p>
SOC medium (1 L)	<p>980 ml SOB medium</p> <p>10 ml 2 mM MgSO₄ · 7H₂O (F.W.246.48)</p> <p>10 ml 2 M Glucose (F.W.180.2)</p>
Medium for <i>Candida albicans</i>	
Solution	Method of Preparation
20% Glucose (0.5 L)	100 g Glucose (F.W.180.2)

	<p>-Add d₂H₂O to 0.5 L. -Filter sterilize with 0.22 μm filter.</p>
YPD medium, pH5.4~5.6 (1 L)	<p>20 g Peptone 10 g Yeast extract -Adjust pH to 5.4~5.6. -Add d₂H₂O to 900 ml. -Autoclave for 20 mins. -When the temperature of medium was lowered to 45 °C, add the 100 ml sterile 20% glucose to 2% final concentration.</p>
YPD plate (1 L)	<p>20 g Peptone 10 g Yeast extract -Adjust pH to 5.4~5.6. -Add d₂H₂O to 900 ml. 20 g Agar -Autoclave for 20 mins. -When the temperature of medium was lowered to 45 °C, add the 100 ml sterile 20% glucose to 2% final concentration.</p>
YPD+10% Serum medium, pH 7.2 (1 L)	<p>20 g Peptone 10 g Yeast extract -Adjust pH to 7.2. -Add d₂H₂O to 800 ml. -Autoclave for 20 mins. 100 ml 20% Glucose (sterile) 100 ml Serum</p>
SC-ura medium (1 L)	<p>6.7 g Yeast nitrogen base without amino acid 1.92 g Yeast synthetic drop-out media supplement without urcil -Add d₂H₂O to 900 ml. -Autoclave for 20 mins 100 ml 20% Glucose (sterile)</p>
SC-ura plate (1 L)	<p>6.7 g Yeast nitrogen base without amino acid 1.92 g Yeast synthetic drop-out media supplement without urcil -Add d₂H₂O to 900 ml.</p>

	<p>20 g Agar</p> <p>-Autoclave for 20 mins</p> <p>100 ml 20% Glucose (sterile)</p>
CaCl₂ Transformation and <i>E. coli</i> Colony PCR	
Solution	Method of Preparation
1 M CaCl ₂ (200 ml)	<p>54 g CaCl₂ · 2H₂O (F.W.219.08)</p> <p>-Add d₂H₂O to 200 ml.</p> <p>-Autoclave or filter sterile.</p> <p>-Store at 4 °C.</p>
STE buffer (100 ml)	<p>0.1211 g Tris base (F.W.121.14)</p> <p>0.0372 g EDTA (F.W. 327.24)</p> <p>0.5884 g NaCl (F.W. 58.44)</p> <p>-Adjust pH to 8.0.</p> <p>-Add d₂H₂O to 100 ml.</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p>
LiAc Yeast Transformation and Yeast Colony PCR	
Solution	Method of Preparation
10x TE buffer, pH 7.5 (100 ml)	<p>10 ml 1 M Tris-HCl</p> <p>2 ml 0.5 M EDTA</p> <p>-Adjust pH to 7.5.</p> <p>-Add d₂H₂O to 100 ml..</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p>
10x LiAc (1 M) (100 ml)	<p>10.2 g LiAc (F.W.102.02)</p> <p>-Adjust pH to 7.5.</p> <p>-Add d₂H₂O to 100 ml.</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p>
50% PEG3350 (100 ml)	<p>50 g PEG3350</p> <p>-Add d₂H₂O to 100 ml.</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p>
0.1% NaOH (100 ml)	<p>0.01 g NaOH (F.W.40.00)</p> <p>-Add d₂H₂O to 100 ml.</p>
Induction of epitope tagged protein	
Solution	Method of Preparation
1 M IPTG (F.W.283.3) (1 ml)	<p>283.3 mg IPTG</p> <p>-Add d₂H₂O to 1 ml.</p> <p>-Store at -20 °C .</p>
40 mg/ml Doxycycline (F.W.1025.89)	<p>40 mg Doxycycline in isopropanol</p> <p>-Bring the volume to 1 ml with</p>

	isopropanol. -Filter sterilize with 0.22 µm filter. -Store at -20 °C in dark.
Extraction of cell lysates	
Solution	Method of Preparation
10x PBS (500 ml)	40 g NaCl (F.W.58.44) 1 g KCl (F.W.74.56) 7.2 g Na ₂ HPO ₄ (F.W.141.96) 1.2 g KH ₂ PO ₄ (F.W.136.09) -Adjust pH to 7.5. -Add d ₂ H ₂ O to 500 ml. -Autoclave for 20 mins.
Lysis buffer for <i>E. coli</i>	1x PBS 5% Glycerol 1 mM Sodium EDTA (F.W. 327.24) 1 mM Sodium EGTA (F.W. 380.35) 1 mM Dithiothreitol/DTT (F.W. 154.25) 1x Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail 1 mM PMSF (F.W. 174.19) 1% Triton-X-100 Freshly prepare.
Lysis buffer for <i>Candida albicans</i>	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 250 mM NaCl (F.W.58.44) 50 mM NaF (F.W.42) 0.5% Triton-X-100 0.1% Tween 20 0.5% NP40 10% Glycerol -Store at 4 °C in dark. 2 mM Sodium ortho-vanadate (F.W.183.91) 2 mM PMSF (F.W. 174.19) 1x Protease cocktail inhibitor 10 mM β-mercaptoethanol (F.W. 78.13) -Freshly add to use.
NP40 lysis buffer (100 ml)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 150 mM NaCl

	<p>1% NP40</p> <p>-Add d₂H₂O to 100 ml.</p> <p>-Store at 4 °C in dark.</p> <p>2 mM PMSF (F.W. 174.19)</p> <p>1x Protease cocktail inhibitor</p> <p>-Freshly add to use.</p>
10 mM Sodium ortho-vanadate, pH 10 (F.W.183.91) (100 ml)	<p>184 mg Sodium ortho-vanadate</p> <p>-Boling and adjust pH to 10, until the yellow color is changed to colorless.</p> <p>-Add d₂H₂O to 100 ml.</p> <p>-Aliquot and store at -20 °C in dark.</p>
200 mM PMSF (F.W. 174.19) (1 ml)	<p>34.8 mg PMSF in isopropanol</p> <p>-Bring the volume to 1 ml with isopropanol.</p> <p>-Aliquot and store at -20 °C in dark.</p>
5x SDS sample buffer (10 ml)	<p>1 ml 1 M Tris-HCl, pH 6.8</p> <p>3.5 ml 20% SDS</p> <p>2 ml Glycerol</p> <p>0.01 g Bromophenol blue</p> <p>-Add d₂H₂O to 10 ml.</p> <p>-Aliquot and store at 20 °C .</p> <p>Freshly add 50 µl β-ME to per 1 ml above mixture.</p>
Affinity Purification	
HIS-Select Nickel Affinity Gel	
Solution	Method of Preparation
1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 (F.W.137.99) (200 ml)	<p>27.6 g NaH₂PO₄</p> <p>-Adjust pH to 8.0.</p> <p>-Add d₂H₂O to 200 ml..</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p>
1 M NaCl (F.W. 58.44) (200 ml)	<p>11.69 g NaCl</p> <p>-Add d₂H₂O to 200 ml..</p> <p>-Autoclave for 20 mins.</p>
1 M Imidazole (F.W. 68.08) (200 ml)	<p>13.62 g Imidazole</p> <p>-Add d₂H₂O to 200 ml.</p>
Equilibration and Wash buffer (50 ml)	<p>2.5 ml 1 M NaH₂PO₄, pH 8.0</p> <p>15 ml 1 M NaCl</p> <p>-Add d₂H₂O to 50 ml.</p>

Elution buffer (50 ml)	2.5 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 15 ml 1 M NaCl 12.5 ml 1 M imidazole -Add d ₂ H ₂ O to 50 ml.
Anti-FLAG-M2 affinity Gel	
Solution	Method of Preparation
1 M NaCl (F.W. 58.44) (200 ml)	11.69 g NaCl -Add d ₂ H ₂ O to 200 ml. -Autoclave for 20 mins.
0.5 M Tris-HCl, pH 7.5 (200 ml)	12.114 g Tris base (F.W.121.14) -Adjust pH to 7.5. -Add d ₂ H ₂ O to 200 ml. -Autoclave for 20 mins.
1x TBS (1 L)	100 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5 150 ml 1 M NaCl -Add d ₂ H ₂ O to 1 L.
0.1 M Glycine HCl, pH 3.5 (1 L)	7.507 g Glycine (F.W. 75.07) -Adjust pH to 3.5. -Add d ₂ H ₂ O to 1 L. -Filter sterilize with 0.22 µm filter.
5 mg/ml 3x FLAG peptides	4 mg 3x FLAG peptides in 800 µl 1xTBS -Aliquot and store at -20 °C.
150 ng/µl 3x FLAG peptides	3 µl 5 mg/ml 3x FLAG peptides in 100 µl 1x TBS -Freshly prepare.
SDS-PAGE and Western Blotting	
Solution	Method of Preparation
30 % Acrylamide (40 ml)	30 ml 40% Acrylamide (acrylamide/bis 29:1) 10 ml d ₂ H ₂ O
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (1 L)	181.71 g Tris base (F.W. 121.14) -Adjust pH to 8.8. -Add d ₂ H ₂ O to 1 L. -Autoclave for 20 mins.
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8 (1 L)	121.14 g Tris base (F.W. 121.14) -Adjust pH to 6.8. -Add d ₂ H ₂ O to 1 L. -Autoclave for 20 mins.

10% SDS (0.5 L)	50 g Sodium dodecyl sulfate -Add d ₂ H ₂ O to 0.5 L.
10% APS	0.1 g Ammonium persulfate in 1 ml d ₂ H ₂ O -Freshly prepare.
Separating/Resolution/Running gel	4 ml d ₂ H ₂ O 3.3 ml 30% Acylamide 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 100 µl 10% SDS 100 µl 10% APS 8 µl TEMED
Stacking gel	3.4 ml d ₂ H ₂ O 830 µl 30% Acylamide 630 µl 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 50 µl 10% SDS 50 µl 10% APS 10 µl TEMED
5x Running buffer (1 L)	72 g Glycine (F.W. 75.07) 5 g SDS 15.15 g Tris base (F.W. 121.14) -Add d ₂ H ₂ O to 1 L.
1x Semi-dry transfer buffer (0.5 L)	2.9 g Tris base (F.W. 121.14) (final conc. 48 mM) 1.45 g Glycine (F.W. 75.07) (final conc. 39 mM) 0.189 g SDS (final conc. 0.37% (vol/vol)) 100 ml Methanol (final conc. 20%) -Add d ₂ H ₂ O to 0.5 L. -Store at 4 °C.
10x TBS (1 L)	30.29 g Tris base (F.W. 121.14) 87.66 g NaCl (F.W. 58.44) -Adjust pH to 7.4. -Add d ₂ H ₂ O to 1 L.
1x TBST (0.5 L)	50 ml 10x TBS 1.5 ml Tween-20 -Add d ₂ H ₂ O to 0.5 L.

Blocking buffer	5% 安佳脫脂奶粉 in 1x TBS
Protein Visualization	
Silver staining	
Solution	Method of Preparation
Solution A (200 ml)	100 ml Methanol 50 ml Acetic acid -Add d ₂ H ₂ O to 200 ml.
Solution B (200 ml)	60 ml Methanol -Add d ₂ H ₂ O to 200 ml.
Solution C (200 ml)	40 mg Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O (F.W. 284.19) -Add d ₂ H ₂ O to 200 ml.
Solution D (200 ml)	0.4 g AgNO ₃ (F.W. 169.88) -Add d ₂ H ₂ O to 200 ml.
Solution E (200 ml)	5.93 g Na ₂ CO ₃ (F.W. 105.99) 100 μl 37% Formaldehyde 4 ml Solution C -Add d ₂ H ₂ O to 200 ml.
Solution F (200 ml)	6.26 g Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (F.W. 327.24) -Add d ₂ H ₂ O to 200 ml.
Coomassie blue staining	
Solution	Method of Preparation
Staining buffer (100 ml)	0.25 g Coomassie brilliant blue R-250 10 ml Glacial acetic acid 45 ml Methanol -Add d ₂ H ₂ O to 100 ml.
Destaining buffer	25% Methanol 10% Acetic acid 65% d ₂ H ₂ O

附錄二、藥品名稱與所購置之廠牌一覽表

藥品名稱	廠牌
40% Acrylamide (29:1)	USB
AgNO ₃ (F.W. 169.88)	聯工化學試藥
Agrose	MDBio, Inc.
Ammonium persulfate/APS	USB
Ampicillin	AMRESCO
Boric acid (F.W 60.05)	Sigma
Bromophenol blue	Sigma
CaCl ₂ · 2H ₂ O (F.W.219.08)	Sigma
Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail	Roche
Coomassie brilliant blue R-250	AMRESCO
Dithiothreitol/DTT (F.W. 154.25)	Promega
Doxycycline (F.W.1025.89)	Sigma
Disodium Ethylene Diamide Tertacetate 2H ₂ O/EDTA (F.W. 327.24)	USB
EGTA (F.W. 380.35)	Sigma
Ethidium Bromide (10mg/ml)	amresco
37% Formaldehyde	Sigma
3xFLAG peptides	Sigma
Glacial acetic acid	JT.Baker
Glucose (F.W.180.2)	Several
Glycerol	JT.Baker
Imidazole (F.W. 68.08)	Fluka-Garantile
Isopropanol	Fluka
KCl (F.W.74.55)	MERK
KH ₂ PO ₄ (F.W.136.09)	MERK
LiAc (F.W.102.02)	Sigma
β-mercaptoethanol (F.W. 78.13)	Sigma
MgSO ₄ · 7H ₂ O (F.W.246.48)	JT.Baker
NaCl (F.W.58.44)	USB
Na ₂ CO ₃ (F.W. 105.99)	SHOWA
NaF (F.W.42)	Riedel-de Haen
NaH ₂ PO ₄	MERK
Na ₂ HPO ₄ (F.W.141.96)	MERK

Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O (F.W. 284.19)	SHOWA
NaOH (F.W.40.00)	Riedel-de Haen
NP40	Roche
PEG3350	Sigma
Peptone	BD
PMSF (F.W. 174.19)	Sigma
Protease cocktail inhibitor	Sigma
Serum	Biological industries
<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate/SDS	AMRESCO
Sodium ortho-vanadate (F.W.183.91)	Sigma
TEMED	AMRESCO
Tris base (F.W.121.14)	JT.Baker
Triton-X-100	USB
Tryptone	BD
Tween 20	Sigma
Yeast extract	BD
Yeast nitrogen base without amino acid	Sigma
Yeast synthetic drop-out media supplement without ureil	Sigma

