

臺北醫學大學 醫學院 醫學科學研究所

碩士論文

Taipei Medical University

College of Medicine

Graduate Institute of Medical Sciences

Master Thesis

白色念珠菌同型合子 (Homozygote) 之營養要求菌株  
之誘導與有性器官之觀察

Mutgenesis of auxotrophic homozygous strains  
and observation of sexual organ on *Candida albicans*

鍾欣蓉

Chung, Hsin-Jung

指導教授：蘇慶華 博士

Advisor: Su, Ching-Hua, ph. D

中 華 民 國 九 十 八 年 七 月

July 2009

## 謝 誌

終於到了寫謝誌的這一天，這一天的到來，代表著碩士生涯將畫下句點。想起兩年前，懵懵懂懂的我，才剛進入這個溫暖的大家庭，如今已能獨立思考與獨自操作實驗。無論是心靈上的成長，或是知識與技術上的增進，這種種的蛻變，要感謝許多陪伴過我、幫助過我的人。最要感謝的莫過於我的指導教授蘇慶華老師，謝謝老師在研究上給我的支援和實驗上的指導，而老師做人處事的態度、對學生的關懷與愛心，更深深的影響了我；感謝李清福老師、許瑞祥老師、許元勳老師和商惠芳老師在我口試的時候給我的指教及對我論文的肯定；感謝蘇正堯老師在實驗過程中的幫助與指導；感謝北醫所有老師的提攜指教。

感謝在實驗室的生活，與我朝夕相處的大家。感謝明莉學姊帶領我作實驗，並無時無刻給予我關懷；感謝瑋寧學姊和君婷學姊總在我最無助、沮喪的時候伸出援手、安撫我的心；感謝芳陌學長的幽默逗趣，並給我實驗上的建議；感謝歐聰億醫師和陳朝澧醫師對於我口頭報告時口條的指教；感謝總是炒熱氣氛的漢禎；感謝和我同甘共苦的家瑜；感謝我無緣的同窗怡君；感謝君仲學長、耀正學長、玲儀學姊、雅柏學姊、Joy學姊、Pippin學長所帶給我的歡樂。感謝元珊、珮婷、沛蓉、奕如、瑋庭、鈞惠、韶麒、詠翔、子義和雍霖，就算你們不在我身邊，也總能在我需要的時候，給我我所需要的關懷；感謝昱志對我的照顧和關心，謝謝你總是張開雙手給我最需要的溫暖，給我堅持到底的勇氣。謝謝你們，因為你們，我才能有勇氣完成我的學位論文。

最後要感謝我的家人，感謝爸爸對家的付出，讓我不必為金錢擔憂；感謝媽媽對我的愛，感謝您為我們不畏苦痛、奮戰到底的決心；感謝總是和我吵吵鬧鬧的姊姊和弟弟，謝謝你們總在我徬徨無助的時候，給我最高心的安慰，我最愛你們了。

這兩年來發生了許許多多的事，因為有大家，我才能繼續的勇敢向前，也因為有大家，我才能漸漸的長大。往後的路上，我知道會有越來越多的挑戰與越來越多的衝擊，但我知道我會有勇氣向前，因為你們是我最大的靠山。

鍾欣蓉 謹誌 2009年7月



## 中文摘要

白色念珠菌被認為是絕對二倍體的酵母菌，其有性器官和減數分裂至目前為止尚未被發現，然而卻發現其可藉由二倍體間的交配完成擬有性世代 (parasexual cycle)。本實驗室先前的研究中指出在 Azole 類藥物 (Fluconazole)、Terbinafine 的壓力刺激下，同型合子 (Homozygote) 的 opaque phase 以高機率發生於 PDA/phloxine B 的抑制圈內，並分離出不同性別之同型合子菌株。這暗示著白色念珠菌可能在 Fluconazole 處理的環境下進行減數分裂。本研究利用二倍體和單倍體染色體的不同，照射紫外線 (UV) 後存活率不同，可初步判別 a type 菌株的倍數體。此外，也以 UV 照射和複印法 (Replica) 篩選出同對 histidine 具營養要求性的單倍體營養要求突變菌株共 23 株，其中包括 a type SW08 14 株；a type 4F 7 株；a type GB2 2 株，經由 9 種含 4~5 種不同胺基酸或含氮鹼基的培養基交叉篩選，發現所有的菌株均對 histidine 具營養要求性。另外，在形態上以 DAPI 染色由共軛焦顯微鏡發現經由 Fluconazole 處理並給予麥角固醇 (Ergosterol) 之培養基的抑制圈內，白色念珠菌會產生類似豆莢型 (peapod) 且多核之類子囊結構；含有 0.1% Squalene 的 PDA/Phloxine B 培養基中，更可發現包裹類子囊孢子 (ascospore-like) 之成熟類子囊 (ascus-like) 結構。同時，以掃描式電子顯微鏡觀察可發現塌陷、扁平的破裂類子囊。這些形態證據顯示 Peapod 極有可能是白色念珠菌的有性器官—子囊 (ascus)，但仍需藉由其他遺傳學與分子生物學的證據佐證。

關鍵詞：白色念珠菌、營養要求菌株、有性器官、鯊鯊烯、麥角固醇

## Abstract

*Candida albicans* is considered as an obligate diploid budding yeast and the meiosis and the following formation of sexual organs is not been found however a parasexual cycle to provide genetic variation is confirmed. Our previous study showed antifungal agents such as azoles and terbinafine enhanced a high frequency of homozygosity in the sub-MIC zone on PDA-phloxine B medium and homozygous strains with different mating types were isolated. This result indicated that the possibility of meiosis might exist in fluconazole treated system. In the present study, the homozygous strains of different gender isolated from fluconazole treatment were subjected for mutagenesis by UV radiation for the selection of auxotrophic mutant and the killing curve of each strain was measured in the same time for the determination of ploidy. All the **a** type strains showed a more susceptible to UV radiation with a steeper curve of survival rate with higher tendency to be haploid strains. For the screening of auxotrophic mutants, replica technique was employed and totally 23 strains were selected in which 14 strains were from SW08 (**a** type), 7 from 4F (**a** type) and 2 from GB2 ( $\alpha$  type). The nutrient deficiency of each auxotrophic mutant was determined by cross-plating on 9 media containing 4-5 amino acids or nucleotides. The results indicated that all the strains were in histidine requirement. In the meantime, a peapod shape, multi-nuclei, ascus-like cell structure was found in the cloudy zone during fluconazole with ergosterol supplement to *C. albicans* under DAPI/confocal microscopy. Furthermore, the ascus-like structure was found in 0.1% squalene PDA-phloxine B

medium. Collapsed ascus-like cells also found in 0.1% squalene PDA-phloxine B medium under scanning electron microscopy (SEM). It suggested the peapod shaped structure might be the sexual organ of *C. albicans*. However, more other evidences of genetics and the molecular biology are required to support this hypothesis.

Keywords: *Candida albicans*, auxitrophic strain, sexual organ, squalene, ergosterol



## 目 錄

謝誌	I
中文摘要	III
英文摘要	IV
目錄	VI
圖表目次	X
壹、緒論	1
第一章 白色念珠菌	1
1-1 真菌之生物分類	1
1-2 白色念珠菌與人類之相關性	2
第二章 白色念珠菌的相關研究	3
2-1 白色念珠菌的轉換特性	3
2-1.1 酵母菌型和菌絲型間之轉換 (Yeast-hyphal transition)	3
2-1.2 表現型之轉換 (Phenotypic switching)	3
2-2 白色念珠菌的同型合子化 (Homozygosis)	4
2-3 W/O 表現型之轉換 (White-opaque switching)	5
2-4 白色念珠菌的交配系統 (Mating system)	6
2-4.1 麵包酵母菌的性別基因	6
2-4.2 白色念珠菌的性別基因	6
2-5 白色念珠菌的交配 (Mating)	7
2-6 白色念珠菌的擬有性世代 (Parasexual cycle)	8
第三章 抗真菌藥物	9
3-1 Terbinafine	9
3-2 Fluconazole	10

第四章 真菌的有性器官	11
4-1 子囊菌	11
4-2 擔子菌	11
4-3 接合菌	12
第五章 本實驗室先前研究	13
第六章 研究動機與目的	15
貳、實驗架構	16
參、材料與方法	21
1. 材料	21
2. 設備	30
3. 實驗方法	31
第一章 白色念珠菌倍數體測定與營養要求菌株篩選	31
3-1.1 存活率分析	31
3-1.2 複印法 (Replica) 篩選單倍體營養要求性菌落	32
3-1.3 確認單倍體營養要求性菌株的營養缺陷	32
3-1.4 不同單倍體營養要求性菌株之交配	33
3-1.5 流式細胞儀分析 (Flow cytometry)	33
第二章 白色念珠菌形態觀察	34
3-2.1 光學顯微鏡觀察 Fluconazole 壓力下白色念珠菌之細胞形態	34
3-2.2 觀察 Fluconazole 壓力下 Ergosterol 對白色念珠菌巨觀形態之影響	35
3-2.2.1 解剖顯微鏡觀察菌落形態	35
3-2.2.2 觀察特殊菌落形態之相關性	36



3-2.3 觀察 Fluconazole 壓力下 Ergosterol 對白色念珠菌抑制圈內與抑制圈外之影響	37
3-2.4 觀察 Fluconazole 壓力下不同濃度 Ergosterol 對白色念珠菌抑制圈內與抑制圈外之影響	38
3-2.4.1 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之菌落形態	38
3-2.4.2 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態	38
3-2.4.3 共軛焦顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態	38
3-2.5 觀察 Fluconazole 壓力下 Squalene 對白色念珠菌抑制圈內與抑制圈外之影響	39
3-2.5.1 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態	39
3-2.5.2 共軛焦顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態	39
3-2.5.3 掃描式電子顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態	40
肆、實驗結果	41
第一章 白色念珠菌倍數體測定與營養要求菌株篩選	41
4-1.1 存活率分析	41
4-1.2 複印法 (Replica) 篩選單倍體營養要求性菌落	46
4-1.3 確認單倍體營養要求性菌株的營養缺陷	50
第二章 白色念珠菌形態觀察	52
4-2.1 光學顯微鏡觀察 Fluconazole 壓力下白色念珠菌之細胞形態	52
4-2.2 觀察 Fluconazole 壓力下 Ergosterol 對白色念珠菌巨觀形態之影響	54
4-2.2.1 解剖顯微鏡觀察菌落形態	54
4-2.2.2 觀察特殊菌落形態之相關性	57

4-2.3 觀察 Fluconazole 壓力下 Ergosterol 對白色念珠菌抑制圈內與抑制圈外之影響	63
4-2.4 觀察 Fluconazole 壓力下不同濃度 Ergosterol 對白色念珠菌抑制圈內與抑制圈外之影響	68
4-2.4.1 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之菌落形態	68
4-2.4.2 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態	72
4-2.4.3 共軛焦顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態	74
4-2.5 鯊鯊烯 (Squalene) 對白色念珠菌之影響	85
4-2.5.1 光學顯微鏡觀察白色念珠菌之細胞形態	85
4-2.5.2 共軛焦顯微鏡觀察白色念珠菌之細胞形態	87
4-2.5.3 掃描式電子顯微鏡觀察白色念珠菌之細胞形態	95
伍、討論	99
陸、結論	106
柒、未來工作	107
捌、參考文獻	108

## 圖表目次

Figure 4-1 UV 照射下麵包酵母菌二倍體與其衍生菌株之存活率分析	43
Figure 4-2 UV 照射下白色念珠菌標準菌株之存活率分析	44
Figure 4-3 UV 照射下白色念珠菌 SC5314 與其衍生菌株之存活率分析	45
Figure 4-4A 複印法 (Replica) 篩選 SW08 營養要求菌株	47
Figure 4-4B 複印法 (Replica) 篩選 4F 營養要求菌株	48
Figure 4-4C 複印法 (Replica) 篩選 GB2 營養要求菌株	49
Table 4-1 限制培養基#1~#9之營養成分列表	51
Table 4-2 營養要求菌株之營養要求列表	51
Figure 4-5 光學顯微鏡觀察 Fluconazole 壓力下白色念珠菌的細胞形態	53
Figure 4-6 抗生素感受性試驗	55
Figure 4-7 抗生素感受性試驗分區示意圖	55
Figure 4-8 以解剖顯微鏡觀察於 YEPD/PB 培養基上進行之抗生素感受性試驗	56
Figure 4-9 以解剖顯微鏡觀察於 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基上進行之抗生素感受性試驗	56
Figure 4-10 Fluconazole 藥物處理後於 YEPD/PB 培養基中菌落形態比例	59
Figure 4-11 Fluconazole 藥物處理後於 YEPD/PB/0.1% Ergosterol 培養基中菌落形態之比例	60
Figure 4-12 Fluconazole 藥物處理後於 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基中菌落形態之比例	61
Figure 4-13 Fluconazole 藥物處理後於含 Ergosterol 培養基中白色念珠菌的形態多型性	62

Figure 4-14	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB 培養基抑制圈外的細胞形態	64
Figure 4-15	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB 培養基抑制圈內的細胞形態	65
Figure 4-16	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態	66
Figure 4-17	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態	67
Figure 4-18	以光學顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB 培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態	69
Figure 4-19	以光學顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.05% Ergosterol 培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態	69
Figure 4-20	以光學顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.1% Ergosterol 培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態	70
Figure 4-21	以光學顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.15% Ergosterol 培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態	70
Figure 4-22	以光學顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態	71
Figure 4-23	Fluconazole 藥物壓力下於 18 小時內 (第 1 天) 以光學顯微鏡觀察含不同濃度 Ergosterol 的 YEPD/PB 培養基抑制圈內、外之細胞形態	73

Figure 4-24	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB 培養基抑制圈外的細胞形態	75
Figure 4-25	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB 培養基抑制圈內的細胞形態	76
Figure 4-26	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.05% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態	77
Figure 4-27	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.05% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態	78
Figure 4-28	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.1% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態	79
Figure 4-29	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.1% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態	80
Figure 4-30	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.15% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態	81
Figure 4-31	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.15% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態	82
Figure 4-32	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態	83
Figure 4-33	以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態	84
Figure 4-34	以光學顯微鏡觀察 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中 的細胞型態	86
Figure 4-35	以共軛焦顯微鏡觀察 18 小時內 (第 1 天) YEPD/PB/0.1% Tween80 培養基中的細胞形態	88

Figure 4-36	以共軛焦顯微鏡觀察第 2 天 YEPD/PB/0.1% Tween80 培養基中的細胞形態	88
Figure 4-37	以共軛焦顯微鏡觀察第 7 天 YEPD/PB/0.1% Tween80 培養基中的細胞形態	88
Figure 4-38	以共軛焦顯微鏡觀察 18 小時內 (第 1 天) YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中的細胞形態	89
Figure 4-39	以共軛焦顯微鏡觀察第 2 天 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中的細胞形態	90
Figure 4-40	以共軛焦顯微鏡觀察第 7 天 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中的細胞形態	91
Figure 4-41	以共軛焦顯微鏡觀察第 14 天 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中的細胞形態	92
Figure 4-42	以共軛焦顯微鏡觀察第 21 天 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中的細胞形態	93
Figure 4-43	以共軛焦顯微鏡觀察第 28 天 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中的細胞形態	94
Figure 4-44	YEPD/PB/0.1% Tween 80 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察酵母菌型之細胞形態	96
Figure 4-45	YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察酵母菌型之細胞形態	96
Figure 4-46	YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察長橢圓球狀之細胞形態	96
Figure 4-47	YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察豆莢型之細胞形態	97

Figure 4-48 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察膨大豆莢型之細胞形態	97
Figure 4-49 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察類子囊之細胞形態	97
Figure 4-50 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察凹陷類子囊與類子囊孢子之細胞形態	98
Figure 4-51 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中觀察白色念珠菌 Peapod 的形成與成熟過程	105



# 壹、緒論

## 第一章 白色念珠菌

### 1-1 真菌之生物分類

真菌的分類和其他生物一樣，以界、門、綱、目、科、屬、種來區分。過去依照真菌的細胞構造和有性孢子形態來分門別類。將真菌分為三個真菌門 (Mycota)：黏菌門 (Gymnomycota)、鞭毛菌門 (Mastigomycota) 和無鞭毛菌門 (Amastigomycota) (陳振陽等, 2001)。

黏菌門在某一階段會缺乏細胞壁，形成阿米巴的細胞形態；鞭毛菌門具有游走孢子 (zoospore or motile cell)，主要為水生真菌，此二種真菌對人類的影響較不大。無鞭毛菌門和人類的關係較為密切，他們可用於工業、作為食物或藥品、農業栽培等，也可能造成食物發霉、產生毒素或造成人類疾病 (陳振陽等, 2001)。

無鞭毛菌門又依照有性世代的有無以及有性器官的形態，可再細分成四個亞門。有性世代尚未確立的菌種，則歸在不完全菌亞門 (Deuteromycotina)，大部分的致病菌多屬此門。依有性器官的不同形態，分為接合菌亞門 (Zygomycotina)、子囊菌亞門 (Ascomycotina)、擔子菌亞門 (Basidiomycotina) (陳振陽等, 2001)。

雖然白色念珠菌與其他念珠菌屬 (*Candida*) 菌種在生物分類學上的分類相似，但因白色念珠菌尚未被證實能經有性生殖 (sexual cycle) 的減數分裂 (meiosis) 產生單倍體 (haploid) 細胞，因此暫時被隸屬於真菌界 (Kingdom Myceteae) 無鞭毛菌門的不完全菌亞門。



近年來常以基因序列作為分類依據，技巧也逐漸成熟，Hibbett 等人利用基因分析，將所有真菌的分類重整改組。目前此系統以普遍被 ITCF 等組織所接受。其中擔子菌與子囊菌各獨立一門，位於雙核亞界 (Dykaria) 之下。而念珠菌屬則歸類於子囊菌門中麵包酵母亞門 (Saccharomycotina) 中的麵包酵母綱 (Saccharomycetes) 中 (Hibbett et al., 2007)，但其有性世代仍屬不明。

## 1-2 白色念珠菌與人類之相關性

念珠菌屬 (*Candida*) 為一種酵母菌屬，此屬的許多菌種常內共生於動物宿主中，包含人類。有些內共生的念珠菌屬之菌種可能會導致疾病，臨床上最常造成人體感染的菌種為白色念珠菌 (*Candida albicans*) (Hsueh et al., 2002)。白色念珠菌是人體正常菌叢之一，至少在 70% 以上的健康人體內存在，通常存在於腸胃道、呼吸道、陰道、口腔等黏膜組織 (Ruhnke and Maschmeyer, 2002)。白色念珠菌是一種伺機性病原菌，在健康個體中，其生長會受到其他菌叢的抑制，然而當菌叢平衡遭受破壞或個體免疫力低下時，便可能造成黏膜感染，嚴重時，會散佈至身體的重要器官，造成系統性感染，危及生命 (Bennett and Johnson, 2005)。

## 第二章 白色念珠菌的相關研究

### 2-1 白色念珠菌的轉換特性

白色念珠菌具有一些轉換特性，包含酵母菌型和菌絲型間之轉換 (Yeast-hyphal transition) 與表現型之轉換 (Phenotypic switching)，這些轉換特性使得白色念珠菌能適應瞬息萬變的外在環境，甚至是形成其寄生的助力。

#### 2-1.1 酵母菌型和菌絲型間之轉換 (Yeast-hyphal transition)

已知白色念珠菌具有四種形態：酵母菌型 (yeast form)、假菌絲型 (pseudohyphae)、菌絲型 (hyphae) 和厚膜孢子 (chlamydozoospores)，外在環境條件會影響形態的轉換，可由單細胞酵母轉變為多細胞菌絲 (yeast-hyphal transition) (Bennett and Johnson, 2005)，此形態經常被作為其是否具致病能力之形態特徵 (Ernst, 2000; Lo et al., 1997; Odds, 1994; Slutsky et al., 1985)。

#### 2-1.2 表現型之轉換 (Phenotypic switching)

白色念珠菌可進行表現型之轉換 (phenotypic switching)，即 white-opaque switching。其藉由可逆性的改變成相異的表現型 (phenotype)，其可使細胞的形態 (morphology) 或生理 (physiology) 產生改變 (Soll, 1997, 2002; Soll et al., 1993)。

## 2-2 白色念珠菌的同型合子化 (Homozygosis)

白色念珠菌的某些基因在white phase和opaque phase會有不同的表現，科學家至今仍在尋找其機制 (Zordan et al., 2007)。在自然的環境下，大於99%的白色念珠菌是異型合子 (heterozygote) 的  $a/\alpha$  cell ( $a/\alpha$ ) (Anderson and Soll, 1987; Slutsky et al., 1987)，而此種型態的菌株無法進行white-opaque switching，必需經由同型合子化 (homozygosis) 的過程，形成同型合子 (homozygote) 的  $a$  cell ( $a/a$ ) 或  $\alpha$  cell ( $\alpha/\alpha$ )，並轉換成 opaque phase，才能進行交配作用 (Lockhart et al., 2005)。雖然白色念珠菌的交配和麵包酵母菌很相似，但麵包酵母菌並非經由white-opaque switching轉換交配型，而是經由包含相對交配型基因的基因座與含有沉默基因 (silent gene) 的 silent  $MATa$  locus (HML) 或 silent  $MAT\alpha$  locus (HMR) 進行特定點重組 (site-specific recombination)，造成交配型的轉換後才進行交配 (Haber, 1998)。

### 2-3 W/O 表現型之轉換 (White-opaque switching)

White phase 的菌落 (colony) 為圓頂形 (dome)，其細胞在光學顯微鏡下呈現圓形、白色，在電子顯微鏡下也是呈現一顆顆圓形的細胞，其基因型為異型合子 (heterozygous) 的 *MTL a/α*，或是同型合子 (homozygous) 的 *MTL a/a* 或 *MTL α/α*。Opaque phase 的菌落為扁平 (flat) 狀，其細胞在光學顯微鏡下呈現長型、灰白色，在電子顯微鏡下是呈現一顆顆橢圓球狀的細胞，其基因型為同型合子的 *MTL a/a* 或 *MTL α/α* (Slutsky et al., 1987)。Hicks 於 1987 年指出，在培養基中加入染劑 Phloxine B，可以使 opaque phase 的菌株呈現紅色，而 white phase 的菌株仍然呈現白色，以易區別被辨認 (Anderson and Soll, 1987; Hicks, 1987)。

W/O 表現型的轉換只存在於白色念珠菌中，是其他細菌或是真菌中所沒有的轉換系統，其為自發性 (spontaneous)、可回復性 (reversible) 的轉換，且與個別的 white phase 或 opaque phase 特定基因有關。無論是 white 或是 opaque，唯有同型合子才具有轉換的能力，且轉換的頻率非常低，約為  $10^{-4}$ 。而異型合子的 white cell 無法進行 white-opaque switching (Lockhart et al., 2003; Rikkerink et al., 1988)。

## 2-4 白色念珠菌的交配系統 (Mating system)

近百年來，白色念珠菌被認為是不具有有性世代的真菌，直到1970至1980年代，白色念珠菌的二倍體被發現，但仍未觀察到其生殖週期 (sexual reproductive cycle) (Olaiya and Sogin, 1979; Riggsby et al., 1982; Roberts et al., 2000)。然而在1990年代中期，發現麵包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中一些已知功能與交配 (mating) 或減數分裂 (meiosis) 相關的基因，其與白色念珠菌具有同源性 (homology) (Diener and Fink, 1996; Leberer et al., 1996; Tzung et al., 2001)。

### 2-4.1 麵包酵母菌的性別基因

麵包酵母菌的生活史已研究相當透徹，其以不同性別基因型的單倍體細胞 (a 或  $\alpha$ ) 進行交配而形成二倍體 (a/ $\alpha$ ) 細胞，而控制 sexual mating 的基因座稱為 *MAT* (mating type) locus，其由一對等偶基因 (alleles) 所組成，分別為 *MATa* 和 *MAT $\alpha$* ，可以轉譯出三種轉錄因子 (transcriptional regulator)，分別是 a1、 $\alpha$ 1 和  $\alpha$ 2 (Astell et al., 1981; Herskowitz, 1989; Hiscock and Kues, 1999)。

### 2-4.2 白色念珠菌的性別基因

1999年，Johnson 等人發現白色念珠菌具有和麵包酵母菌類似的性別基因座，稱 *MTL* (mating type-like) locus (Diener and Fink, 1996; Hull and Johnson, 1999)，亦由一對對偶基因所構成，分別為 *MTLa* 和 *MTL $\alpha$* 。*MTLa* 可以轉譯出 a1 和 a2 兩種轉錄因子，*MTL $\alpha$*  可以轉譯出  $\alpha$ 1 和  $\alpha$ 2 兩種轉錄因子。此外，白色念珠菌的 mating locus 較麵包酵母菌多了三對基因，分別為 *PAP*、*PIK* 和 *OBP*，其個別可轉譯出 poly(A) 聚合酶 (poly(A) polymerase)、磷酸肌醇激酶 (phosphoinositol kinase) 和氧類固醇結合蛋

白 (oxysterol binding protein) (Bennett and Johnson, 2005; Tsong et al., 2003)。

## 2-5 白色念珠菌的交配 (Mating)

在自然的環境下，大於 99% 的白色念珠菌是異型合子 (heterozygote) 的  $a/\alpha$  cell ( $a/\alpha$ ) (Anderson and Soll, 1987; Slutsky et al., 1987)，必需經由同型合子化 (homozygosis) 的過程，形成同型合子 (homozygote) 的  $a$  cell ( $a/a$ ) 或  $\alpha$  cell ( $\alpha/\alpha$ )，才能進行交配作用 (Lockhart et al., 2005)。不同於麵包酵母菌，白色念珠菌的交配為二倍體和二倍體間的交配。以性別為  $a/a$  和  $\alpha/\alpha$  的白色念珠菌細胞進行交配，其會先轉換成 opaque phase 的細胞再進行交配。兩個不同性別細胞彼此分泌費洛蒙 (pheromone) 觸發 shmoo (即一種細胞相互接近的突出構造) 的產生，突起處再互相延伸，細胞核漸漸移動 (migrate) 至突起處，接著兩個細胞突起處相連結，形成接合管 (conjugation tube)，兩個細胞核互相靠近，之後融合 (fusion)，接合管漸漸膨大 (swelling)，最後進行出芽 (bud)，形成子細胞 (daughter cell) (Lachke et al., 2003; Lockhart et al., 2003)。

## 2-6 白色念珠菌的擬有性世代 (Parasexual cycle)

白色念珠菌二倍體的 a cell ( $a/a$ ) 或  $\alpha$  cell ( $\alpha/\alpha$ ) 需先轉換成 opaque phase 才可進行交配。不同性別的 opaque cell 交配之後會產生一個單核 (monomer) 的四倍體 (tetraploid)  $a/\alpha$  cell ( $a/a/\alpha/\alpha$ )。四倍體細胞會再變回二倍體細胞，但轉變的原因仍不明確，可能有染色體的喪失 (chromosome loss) 或是減數分裂 (meiosis) 的發生，此現象稱為白色念珠菌的擬有性世代 (parasexual cycle) (Bennett and Johnson, 2003; Johnson, 2003)。

白色念珠菌尚未被證實能經有性生殖的減數分裂產生單倍體細胞。若能證實其單倍體和有性器官存在，並證實減數分裂的發生，則能真正確立白色念珠菌的分類地位。此外，在 Fluconazole 的壓力刺激下，若能誘導有性生殖的發生，便意味其中還有一些和藥物相關的機制，對於臨床上抗藥性的研究深具意義。

### 第三章 抗真菌藥物

目前市面上的抗真菌藥物，依作用位置的不同可分為三類：作用於細胞壁（如 Echinocandins、Nikkomycin）、細胞膜（如 Fluconazole、Terbinafine）、細胞核（如 Benomyl、Flucytosine、Griseofulvin）。本論文主要針對抑制細胞膜主要成分麥角固醇 (ergosterol) 生合成之抗真菌藥物作進一步之探討。

#### 3-1 Terbinafine

Terbinafine 俗稱 Lamisil，為 Allylamine 類藥物，主要作用為抑制麥角固醇生合成途徑上的酵素 Squalene epoxidase，其作用為催化鯊鯊烯 (Squalene) 轉變成羊毛脂固醇 (Lanosterol)。Squalene 是一種天然的油脂，可由鯊魚肝油、米糠、小麥胚芽和橄欖等提煉而來，其在及低溫的環境下仍以液態的形式存在。另外，人類皮膚的脂肪細胞中也含有不少的 Squalene，可與體內的三酸甘油酯在皮膚上形成保護膜，防止水分流失 (Boughton et al., 1957)。而 Terbinafine 會造成麥角固醇減少或 Squalene 累積，影響細胞膜的結構和功能。白色念珠菌的細胞膜是以麥角固醇為主要成分，而麥角固醇需由 Lanosterol 來合成，所以在 Terbinafine 的藥物壓力下會造成白色念珠菌細胞膜和結構上的破壞，影響白色念珠菌的生長 (Georgopapadakou and Bertasso, 1992; Ryder, 1988)。



### 3-2 Fluconazole

麥角固醇是白色念珠菌細胞膜的主要成分。而屬於 Azole 類藥物的 Fluconazole 會抑制麥角固醇生合成中的 Cytochrome P450 系統之酵素 14 $\alpha$ -demethylase，使得麥角固醇的合成受到抑制，進而干擾細胞膜中 ergosterol 的功能，為臨床上第一線用藥 (Kelly et al., 1997)。由於 Fluconazole 作用機制為抑菌而非殺菌，在藥物的選擇性壓力下，具有抗藥性的菌株逐漸增加 (Rex et al., 1995; White et al., 1997)。



## 第四章 真菌的有性器官 (陳振陽等, 2001)

過去真菌的分類學是依據是否具有有性世代來分類，在無鞭毛菌門 (Amastigomycota) 下，不具有有性世代的真菌，被歸類在不完全菌亞門，而具有有性世代的真菌，又依其有性器官形態不同，又可將菌絲無隔板的分類於接合菌亞門，菌絲具有規則性隔板的真菌，再依有性孢子生長的位置，分為子囊菌亞門和擔子菌亞門。擔子菌的有性孢子著生於囊外；子囊菌的有性孢子著生於囊內。

### 4-1 子囊菌

二倍體的子囊菌平時是以出芽生殖的方式進行分裂，增加細胞數。當環境惡劣時，便會藉由減數分裂，產生子代。子囊菌會產生子囊 (ascus)，即在細胞壁中包裹孢子的構造。子囊菌會在子囊中進行減數分裂，產生子囊孢子，當子囊壁破裂，單倍體的孢子會由子囊釋出，再藉由交配，重新回到二倍體細胞。如麵包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

### 4-2 擔子菌

擔子菌的單倍體細胞經由細胞融合之後，形成菌絲體，此時菌絲體中還有雙核 (dikaryon)。菌絲體的尾端會有突起的擔子 (basidium)，兩個細胞核會在突起的擔子處進行細胞核融合，形成二倍體。之後，經過減數分裂，在擔子外產生擔孢子 (basidiospores)。當然，擔子菌也可藉由無性的出芽生殖獲得單倍體細胞。如新型隱球菌 (*Cryptococcus neoformans*)。

### 4-3 接合菌

接合菌菌絲體粗大而無隔板，只有在形成生殖細胞時才會出現隔板。無性生殖的孢子是在囊孢內形成，當兩個不同性別的菌絲相遇時會形成厚壁的接合孢子。有性生殖則是由兩個配子囊（gametangia）融合成接合囊孢（zygosporangium），接合囊孢內隨後產生厚壁的接合孢子（zygospores）。囊孢成熟後釋放出囊孢子，囊孢的基部常可見假根（rhizoid）的構造。如根霉菌屬（*Rhizopus*）。



## 第五章 本實驗室先前研究

Hicks 於 1987 年指出，在培養基中加入染劑 Phloxine B，可以使 opaque phase 的菌株呈現紅色，而 white phase 的菌株仍然呈現白色，以此便較容易區別兩者之差異 (Anderson and Soll, 1987; Hicks, 1987)。

2007 年，本實驗室歐聰億進行 Amphotericin B 及 Fluconazole 之抗藥性研究，發現在 Fluconazole 的壓力條件下會有形態的改變。將 Fluconazole 具有抗藥性的 *C.albicans* (CaF) 及標準菌株 *C. albicans* ATCC 22816 (CaW)，培養在含有 Phloxine B 的 Lee's medium 中，發現在 Fluconazole 的敏感性試驗 (E-test) 中，有較高的比例可產生紅色的 opaque 菌落 (表 1)。先前研究發現 white-opaque switching 的發生機率約為  $10^{-4}$ 。而在歐的研究中發現，抑制圈外產生 opaque 的機率約為  $10^{-2} \sim 10^{-3}$ ，而抑制圈內產生 opaque 的機率約為  $10^{-1}$ 。高頻率之同型合子化 (Homozygosis) 是否意味著在 Fluconazole 藥物壓力下，*C.albicans* 有性世代產生。因為只有進行減數分裂，才有可能產生如此高的機率 (Lockhart et al., 2003; Rikkerink et al., 1988; 歐聰億, 2007)。

2008 年，本實驗室鄭瑋寧將白色念珠菌 14053、C1、C2、CaW 以 Terbinafine 和 Fluconazole 處理後，經流式細胞儀 (Flow Cytometry) 和聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 檢測性別基因，結果顯示確有同型合子的存在 (鄭瑋寧, 2008)。

同時，本實驗室周明莉將白色念珠菌 14053、C1、C2、CaW，經由 Terbinafine 處理 1~2 週後，後利用 DAPI 將細胞核定位，以共軛焦顯微鏡 (Confocal Microscopy) 觀察，發現四核期 (four-nuclei phase)，暗示可能有有性世代的存在 (周明莉, 2008)。

表 1 Frequency of Opaque colonies in this study (歐聰億, 2007)

Strains	CaF <sup>1</sup>			CaW <sup>2</sup>		
	Untreated	Fluconazole		Untreated	Fluconazole	
		Out <sup>3</sup>	In <sup>4</sup>		Out <sup>3</sup>	In <sup>4</sup>
Red	1	3.5	8	8	16	161
Pink/White	2000	2000	2000	2000	754	908
Freq. of homozygote	$5 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-3}$	$2.12 \times 10^{-2}$	$1.51 \times 10^{-1}$

<sup>1</sup> CaF: Clinic strain, provided by Infection Control Department, Taipei Municipal WanFang Hospital  
Managed from Taipei Medical University;

<sup>2</sup> CaW: ATCC 90029, purchased from Food Industry Research and Development Institute

<sup>3</sup> Out: Outside of inhibition zone

<sup>4</sup> In: Inside of inhibition zone

## 第六章 研究動機與目的

在 Fluconazole、Terbinafine 的壓力刺激下，opaque phase 以較高的機率發生，暗示著白色念珠菌是否在為抵抗外在壓力而產生某種機轉。本實驗室先前研究中發現白色念珠菌在此二種藥物壓力下，產生高頻率之同型合子化，並於形態上發現其具有四核期存在 (周明莉, 2008; 歐聰億, 2007; 鄭瑋寧, 2008)。因此期望能藉由本研究提出更有利的證據，證實白色念珠菌出現減數分裂之可能性，並觀察其是否具有有性器官。



## 貳、 實驗架構

本研究分為二大部分。(圖 1、圖 2)

第一部分、藉由二倍體和單倍體染色體的不同，以紫外光 (UV) 照射後之生存曲線分析由顯微操作器分離出之菌株的倍數體，並篩選出營養要求 (auxotrophic) 菌株，藉由不同性別、不同營養要求菌株的成功交配前、後之倍數體變化，證明白色念珠菌可經由單倍體完成有性世代。

第二部分、尋找白色念珠菌的有性器官。而酵母菌分類中，可分成子囊菌或擔子菌。在先前本實驗室的研究中曾找到類似擔孢子的結構，其外型有如犬類之腳印，故命名為 Snoopy (周明莉, 2008)。然而，藉由四分子分析，發現由類似擔孢子所繁衍之後代，其形態及性別基因均未有任何改變，足見 Snoopy 並非白色念珠菌的有性器官 (鄭瑋寧, 2008)。因此，轉向尋找白色念珠菌的子囊結構。由於白色念珠菌需經遺傳基因上的轉換 (genetic changing)，即同型合子化的轉換過程，再經由表觀遺傳上的轉換 (epigenetic switching)，轉換成 opaque phase，方能進行交配，這將是尋找其有性世代之關鍵。

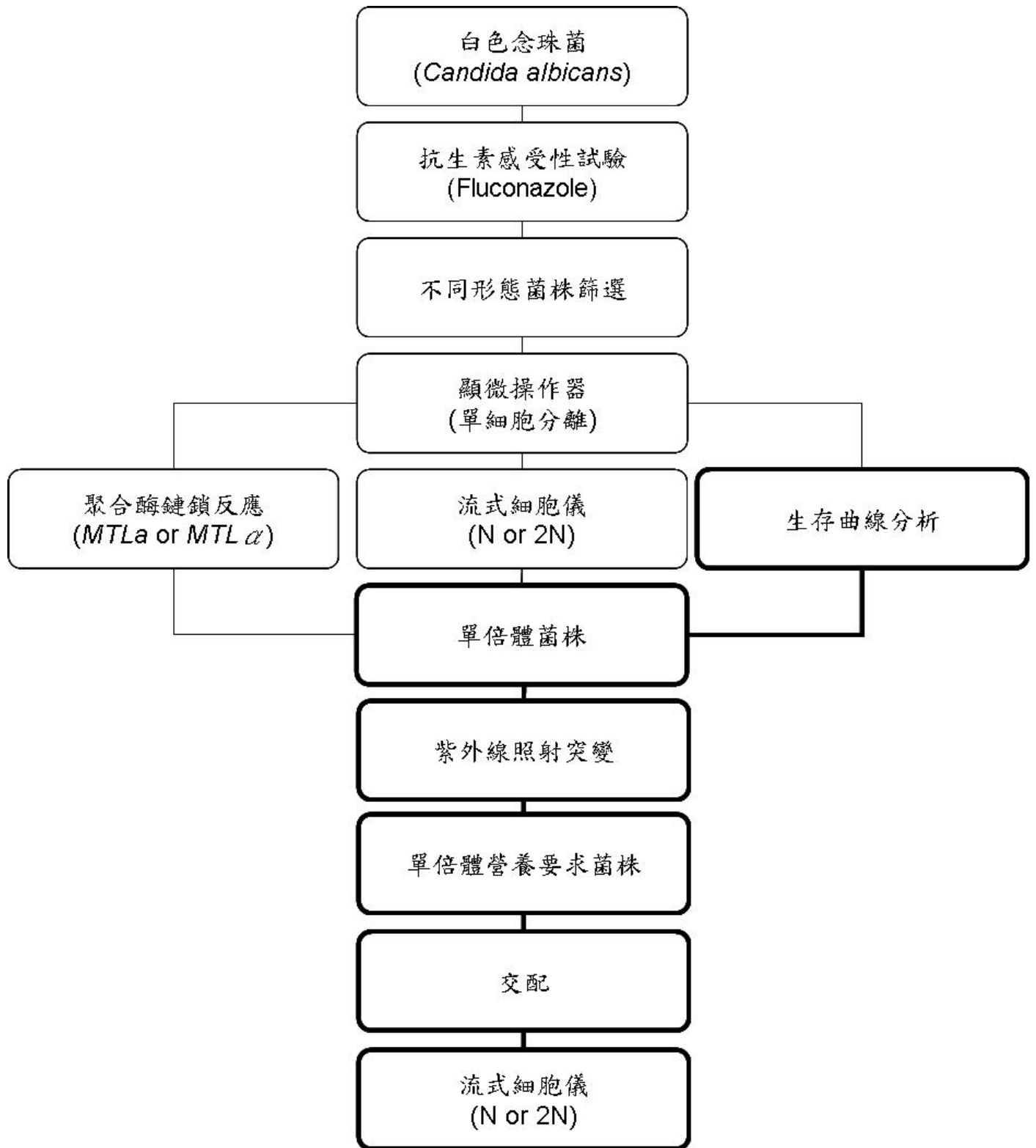
Anderson 等人於 1987 年所發表之實驗系統，在含有 Phloxine B 的 Lee's medium 中發現白色念珠菌 opaque phase 的菌落會呈現粉紅色，而這些同型合子化的菌落確認為二倍體的 *MTLa* ( $\alpha1/\alpha1$ ) 或 *MTL $\alpha$*  ( $\alpha1\alpha2/\alpha1\alpha2$ )，其細胞形態不同於 white phase 的橢圓球狀結構，為較長型的結構，而此系統將 white-opaque switching 的轉換機率由  $10^{-4}$  提升至  $10^{-3}$  (Anderson and Soll, 1987; Slutsky et al., 1987; Soll, 2004)。於本實驗室先前研究中發現白色念珠菌在 Fluconazole、Terbinafine 的壓力刺激下，含有 Phloxine B 的 Lee's medium 或 PDA 中，於抑制圈內產生紅色

菌落，將單一紅色菌落再藉由塗盤篩選與 PCR 分析，發現為高頻率（機率為  $10^{-1}$ ）同型合子化之 opaque 菌落，分析其交配基因型發現，其包含 a1、a1 $\alpha$ 2、a1/ $\alpha$ 1 和 a1/ $\alpha$ 2 四種情況（歐聰億，2007；鄭瑋寧，2008），除此之外，也發現其細胞含有一種以上之形態，大致可分為 fat cell、long cell 和 mycelium cell（圖 3），因此推測混雜菌株中 a cell 可能與  $\alpha$  cell 進行交配，回到 a/ $\alpha$  cell 的細胞，便造成 a/ $\alpha$  cell 與較多仍未完全進行交配的 a cell 或  $\alpha$  cell 混合生長的情況，也暗示混雜菌落可能為減數分裂之產物。由於屬於 Azole 類藥物的 Fluconazole 會抑制麥角固醇 (Ergosterol) 生合成中 Cytochrome P450 系統的酵素 14 $\alpha$ -demethylase，使得 Ergosterol 的合成受到抑制 (Kelly et al., 1997)，也間接造成鯨鯊烯 (Squalene) 的累積，因此於培養基中加入 Squalene，觀察其對白色念珠菌之影響。本實驗室以此三系統進行研究。（圖 4）

而本研究的部份除了觀察受 Fluconazole 藥物處理之系統中探討白色念珠菌可能之有性器官細胞形態外，並探討於 Fluconazole 藥物壓力下，Ergosterol 對細胞形態之影響，除此之外，也將探討 Squalene 對白色念珠菌細胞形態之影響。



# 第一部分、白色念珠菌倍數體測定與營養要求菌株篩選



(粗框部分為本研究部分)

圖 1 實驗架構圖之白色念珠菌倍數體測定與營養要求菌株篩選

## 第二部分、白色念珠菌形態觀察

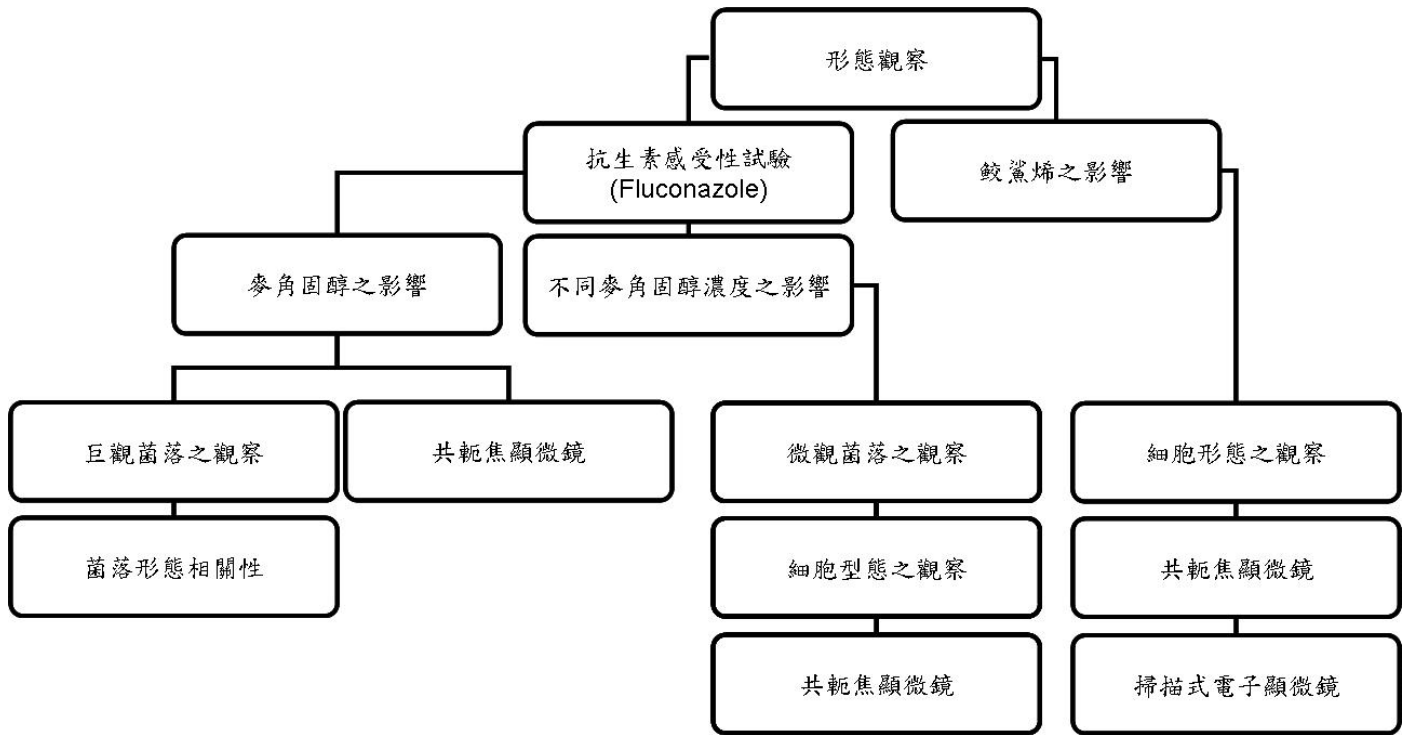


圖 2 實驗架構圖之白色念珠菌形態觀察

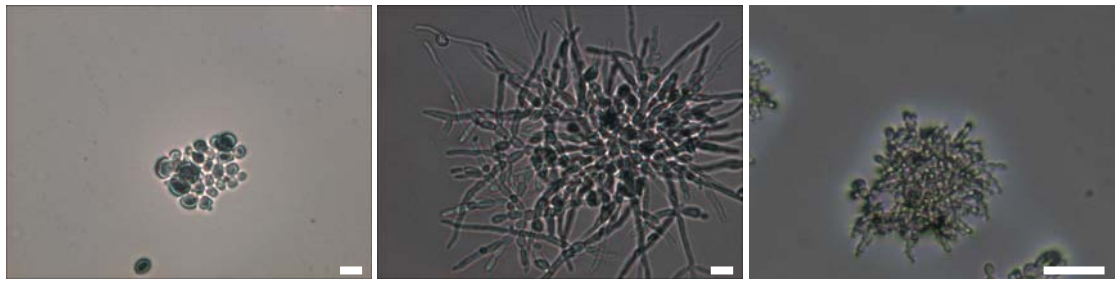


圖 3 在 Fluconazole 或 Terbinafine 壓力下產生不同於一般酵母菌型的細胞形態  
 右圖為細胞形態較圓胖的 fat cell；中圖為具有長菌絲形態的 mycelium  
 cell；左圖為細胞形態較長型的 long cell；橫標代表之長度為 10 µm

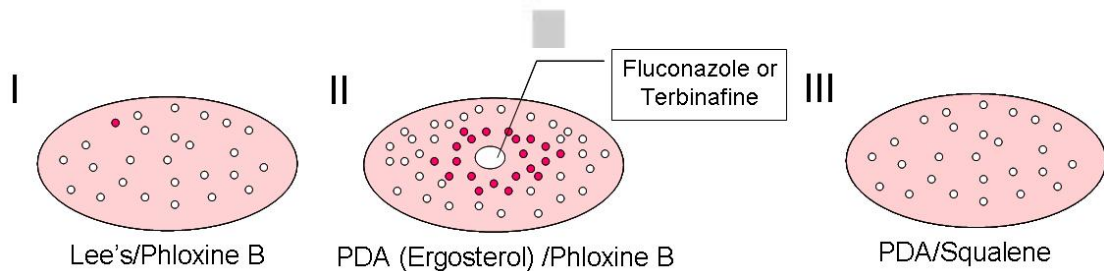


圖 4 白色念珠菌之同型合子化 (Homozygosis) 之三種途徑

系統 I 為 Anderson 等人於 1987 年發表之實驗系統，為含有 Phloxine B 的 Lee's medium (Anderson and Soll, 1987)；系統 II 為本實驗室提出之實驗系統，為 Fluconazole 或 Terbinafine 藥物壓力下之含有 Phloxine B 或可加入 Ergosterol 的 PDA medium；系統 III 為含有 Squalene 之 PDA medium

## 參、 材料與方法

### 1. 材料

#### (1) 菌種

實驗所用之菌種中，白色念珠菌 (*C.albicans*) 菌種 CaW 購自食品工業發展研究所生物資源保存中心；SC5314 購自美國菌種中心，此菌種之基因密碼已被美國史丹佛大學解開，基因庫已建立，為國際常用之標準菌株 (Jones et al., 2004)；ATCC 14053 由臺北市立萬芳醫院感染科提供；C1 和 C2 分讓自國立新竹教育大學李清福老師。二倍體麵包酵母菌 (*S.cerevisiae*) 為市售烘焙酵母，BCRC 51893 (a  $ade_1^+$ ,  $ade_2^-$ ,  $ade_5^-$ ) 和 BCRC 20496 ( $\alpha$   $ade_1^-$ ,  $ade_2^+$ ,  $ade_5^+$ ) 臺北醫學大學葉必立老師。(表 2)

由蘇慶華老師藉以顯微操作器，歷經多次重複篩選，將 SC5314 於 Fluconazole 藥物處理 24~48 小時之 PDA/PB 培養基中挑選細胞形態為 hyphae tip cell 之菌株，經 PCR 與流式細胞儀確認為單倍體，其中 GB2 之交配基因型為  $\alpha 1\alpha 2$ ，而 4A 和 4F 之交配基因型為 a1。SC5314 於 Terbinafine 藥物處理數天之 PDA/PB 培養基中挑選出細胞形態為 swollen cell，經 PCR 與流式細胞儀確認 SW08 為單倍體，交配基因型為 a1。SC5314 於 Fluconazole 藥物處理 24~48 小時之 PDA/PB 培養基中挑選細胞形態為 long cell 之菌株，經 PCR 與流式細胞儀確認 LN07 為單倍體，交配基因型為  $\alpha 1\alpha 2$ 。(表 3)

表 2 本研究所使用之菌種

Number	Species/Strain	Code	Mating Type
1	<i>Candida albicans</i> ATCC 90029 <sup>a</sup>	CaW	a/α
2	<i>Candida albicans</i> MYA-2876 <sup>b</sup>	SC5314	a/α
3	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053 <sup>c</sup>	14053	a/α
4	<i>Candida albicans</i> BCRC 20512 <sup>d</sup>	C1	a/α
5	<i>Candida albicans</i> SJ2S08 <sup>d</sup>	C2	a/α
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>e</sup>	S2N	a/α
7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BCRC 51893 <sup>f</sup>	51893	a
8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BCRC 20496 <sup>f</sup>	20496	α

<sup>a</sup> 購自食品工業發展研究所生物資源保存中心、<sup>b</sup> 購自美國菌種保存中心、  
<sup>c</sup> 分讓自臺北市立萬芳醫院感染科、<sup>d</sup> 分讓自國立新竹教育大學李清福老師、  
<sup>e</sup> 市售烘焙用酵母、<sup>f</sup> 臺北醫學大學葉必立老師提供

表 3 本實驗室挑出之疑似單倍體菌株

Number	Species/Strain	Code	Mating Type
1	<i>Candida albicans</i> SC5314-GB2 <sup>a</sup>	GB2	α1α2
2	<i>Candida albicans</i> SC5314-4A <sup>a</sup>	4A	a1
3	<i>Candida albicans</i> SC5314-4F <sup>a</sup>	4F	a1
4	<i>Candida albicans</i> SC5314-SW08 <sup>b</sup>	SW08	a1
5	<i>Candida albicans</i> SC5314-LN07 <sup>c</sup>	LN07	α1α2
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S1	S1	-
7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S2	S2	-

<sup>a</sup> 受 Fluconazole 藥物處理 24~48 小時後由顯微操作器分離出形態為 hyphae tip cell 之菌株

<sup>b</sup> 受 Terbinafine 藥物處理數天後由顯微操作器分離出形態為 swollen cell 之菌株

<sup>c</sup> 受 Fluconazole 藥物處理 24~48 小時後由顯微操作器分離出形態為 long cell 之菌株

## (2) 培養基與菌種保存

PDA 平板培養基與 PDB 液態培養基作為一般繼代培養之使用；PDA/PB 平板培養基（薄型）作為顯微操作器挑選菌株之使用；YEPD、MM、#1 MM、#2 MM、#3 MM、#4 MM、#5 MM、#6 MM、#7 MM、#8 MM 和#9 MM 作為營養要求菌株篩選之使用；YEPD/PB、YEPD/PB/0.05% Ergosterol、YEPD/PB/0.1% Ergosterol、YEPD/PB/0.15% Ergosterol 和 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 作為抗生素感受性試驗與形態觀察之使用；YEPD/PB/0.1% Squalene 和 YEPD/PB/0.1% Tween 80 作為形態觀察之使用。（表 4A、4B、4C、4D、4E）

以無菌水保存之菌種，可於室溫下或 4°C 保存半年；以 20% Glycerol 保存之菌種，可於-80°C 保存一年以上。

表 4A 使用的培養基

Culture medium	Ingredient	Amount
PDA	Potato dextrin agar	1.95%
	Agar	0.5%
PDA/Phloxine B (PB) (PDAP)	Potato dextrin agar	1.95%
	Agar	0.5%
	Phloxine B	0.0005%
PDA/PB/0.1% Squalene	Potato dextrin agar	1.95%
	Agar	0.5%
	Phloxine B	0.0005%
	Squalene	0.1%
	Tween 80	0.1%
PDA/PB/0.1% Tween 80	Potato dextrin agar	1.95%
	Agar	0.5%
	Phloxine B	0.0005%
	Tween 80	0.1%
PDB	PDB	2.4%
YEPD	Yeast extract	1%
	Peptone	2%
	Glucose	2%
	Agar	2%
YEPD/PB	Yeast extract	1%
	Peptone	2%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Phloxine B	0.0005%

表 4B 使用的培养基

Culture medium	Ingredient	Amount
YEPD/PB/0.05% Ergosterol	Yeast extract	1%
	Peptone	2%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Phloxine B	0.0005%
	Ergosterol	0.05%
YEPD/PB/0.1% Ergosterol	Yeast extract	1%
	Peptone	2%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Phloxine B	0.0005%
	Ergosterol	0.1%
YEPD/PB/0.15% Ergosterol	Yeast extract	1%
	Peptone	2%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Phloxine B	0.0005%
	Ergosterol	0.15%
YEPD/PB/0.2% Ergosterol	Yeast extract	1%
	Peptone	2%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Phloxine B	0.0005%
	Ergosterol	0.2%



表 4C 使用的培養基

Culture medium	Ingredient	Amount
MM (minimal medium)	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
#1 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Adenine	0.002%
	Histidine	0.002%
	Phenylalanine	0.005%
	Glutamic acid	0.01%
#2 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Guanine	0.002%
	Leucine	0.003%
	Tyrosine	0.003%
	Serine	0.04%
#3 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Cysteine	0.002%
	Isoleucine	0.003%
	Tryptophan	0.002%
	Alanine	0.002%

表 4D 使用的培養基

Culture medium	Ingredient	Amount
#4 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Methione	0.002%
	Valine	0.015%
	Threonine	0.02%
	Aspartic acid	0.01%
#5 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Uracil	0.002%
	Lysine	0.003%
	Proline	0.002%
	Argine	0.002%
#6 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Adenine	0.002%
	Guanine	0.002%
	Cysteine	0.002%
	Methionine	0.002%
	Uracil	0.002%

表 4E 使用的培养基

Culture medium	Ingredient	Amount
#7 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Histidine	0.002%
	Leucine	0.003%
	Isoleucine	0.003%
	Valine	0.015%
	Lysine	0.003%
#8 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Phenylalanine	0.005%
	Tyrosine	0.003%
	Tryptophan	0.002%
	Threonine	0.02%
	Proline	0.002%
#9 MM	Nitrogen base without amino acid	0.67%
	Glucose	2%
	Agar	2%
	Glutamic acid	0.01%
	Serine	0.04%
	Alanine	0.002%
	Aspartic acid	0.01%
	Arginine	0.002%

### (3)化學試劑

實驗使用之 Ethanol、Phloxine B、Glutaldehyde、Squalene、Adenine、Guanine、Cysteine、Methionine、Uracil、Histidine、Leucine、Isoleucine、Valine、Lysine、Phenylalanine、Tyrosine、Tryptophan、Threonine、Proline、Glutamic acid、Serine、Alanine、Aspartic acid、Arginine 等購自德國 Sigma 公司。Polyoxyethylene sorbitan Monooleate (Tween 80)、Triton X-100 和 Glycerol 等購自歐洲 J. T. Baker 公司。Agar, bacteriological 購自美國 Neogen 公司。膠囊 Fluconazole 購自台灣 Pfizer 公司。細胞核螢光染劑 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 和 Phosphate buffered saline (PBS) 等購自美國 Invitrogen 公司。載玻片、蓋玻片和直徑 8mm 之紙錠 (paper disc) 等購自台灣 Bioman 公司。

## 2. 設備

實驗使用之設備有震盪培養器 (Model-721, HOTECH)、高溫高壓滅菌機 (TOMIN)、無菌操作台 (THM-220, Tsao Hsin enterprise, Taiwan)、水浴槽 (WB-24, SHIN KWANG)、烘箱 (NDO-601SD, ELELA)、離心機 (KN-70, Kubota)、光學顯微鏡 (DM 2500, Leica, Germany)、超音波震盪機 (511R-DTH, BRANSON, USA)、流式細胞儀 (FACSCalibur™)、雷射共軛焦顯微鏡 (TCS SP5, Leica, Germany)、解剖顯微鏡 (SM 2800, Nikon, Japan)、顯微操作器 (OLYMPUS, Japan)、掃描式電子顯微鏡 (H-600, Hitach, Japan)。



### 3. 實驗方法

#### 第一章 白色念珠菌倍數體測定與營養要求菌株篩選

##### 3-1.1 存活率分析

1. 將菌種以接種環接於 PDB 液體培養基中，於室溫下震盪培養 16~18 小時，使其生長至對數生長期。
2. 取 1 ml 菌液，離心去除上清液，加入無菌水 1 ml，震盪均勻。
3. 以血球計數器計數，並以連續稀釋法 (serial dilution)，將菌液濃度調整至  $10^4$  cells/ml。
4. 以微量吸管吸取 0.1 ml 之菌液，滴在 YEPD 培養基上。將三角玻棒先置於 95% 酒精中，取出過火，使酒精燃盡，稍待片刻待玻棒冷卻後，右手持玻棒混勻菌液，左手則旋轉 YEPD 培養基，將菌液均勻分布。
5. 再以 UV 光 (距離 37 cm) 分別照射 0、30、60、90、120、150、180、210、240 秒，避光至少 1 小時後，室溫培養，3~4 天後計算菌落數，製圖比較致死曲線 (killing curve)，並找出 5 ~10% 存活率 (survival rate) 的時間點，此時的突變機率較高，為  $10^{-3}$ 。

### 3-1.2 複印法 (Replica) 篩選單倍體營養要求菌株

1. 以存活率分析確定 5~10% 存活率的時間點後，以相同的方式，以本實驗室挑選的菌株進行實驗。將菌落數控制在 100~200 cfu/plate，室溫下培養於完全培養基 (complete medium) YEPD 上。
2. 照射 UV 光 3~4 天後，以絲絨布包裹大小與培養皿大小相符的印章，完全貼附在 YEPD 上並輕壓。注意不要吸附水分。
3. 再以蓋章的方式，將印章輕壓在不含有任何胺基酸的限制培養基 (minimal medium, MM) 上，並做好標記，於室溫培養 3~4 天，待菌落生長後，篩選營養要求性菌株，即在限制培養基上不生長的菌株。
4. 將疑似具營養要求性的菌株分別接至 YEPD 培養基和 MM 培養基上，確認是否真為營養要求菌株。

### 3-1.3 確認單倍體營養要求菌株的營養缺陷

1. 將營養要求菌株以接種針接至含不同胺基酸的限制培養基 #1 MM、#2 MM、#3 MM、#4 MM、#5 MM、#6 MM、#7 MM、#8 MM、#9 MM 中培養。
2. 於室溫培養 1 週後觀察菌株的生長狀況，以確認菌株的營養缺陷。

### 3-1.4 不同單倍體營養要求菌株之交配

1. 利用交叉接種的方式，以接種環取不同性別、具有相對不同營養缺陷的單倍體營養要求菌株，分別於完全培養基 YEPD、限制培養基 MM 和含有兩者均具需求之胺基酸的限制培養基以畫直線的方式接種，並將兩菌株之接種軌跡形成垂直交叉。
2. 標示菌株接種方向。
3. 於室溫培養 1 週後觀察菌株的生長狀況，在限制培養基上能生長的即為交配後的菌株。

### 3-1.5 流式細胞儀分析 (Flow cytometry)

1. 將培養24小時內的菌株，用接種環挖取接於PBS溶液中。
2. 以血球計數器調整菌液濃度值到 $10^5$  cells/ml，置於1.5 ml離心管中。
3. 以轉速3600 rpm離心五分鐘後，將上清液倒出（不必倒乾，留約20~30  $\mu$ l的量）。
4. 打散殘餘溶液中的菌體，加入 $-20^{\circ}\text{C}$ 的70% EtOH，放在 $4^{\circ}\text{C}$ 保存24小時。
5. 再同樣以轉速3600離心五分鐘後將上清液倒出（不必倒乾，留約20~30 $\mu$ l的量）。
6. 打散殘餘溶液中的菌體，以PBS清洗菌體2~3次。
7. 加入濃度為0.1 mg/ml的RNase A 500  $\mu$ l，於 $37^{\circ}\text{C}$ 下反應30分鐘。
8. 待反應結束後，避光加入PI 50  $\mu$ l，靜置15分鐘。
9. 前處理結束後，便可上機分析。先利用顆粒性及大小，調整可以區分出細胞，再調整FL2接收器的參數，最後使用Cell Quest軟體。



## 第二章 白色念珠菌形態觀察

### 3-2.1 光學顯微鏡觀察 Fluconazole 壓力下白色念珠菌之細胞形態

1. 首先進行抗生素感受性試驗 (Antibiotic susceptibility test)。將培養於 PDA 之白色念珠菌標準菌株 SC5314 取出，用接種環接於無菌水中，震盪均勻。
2. 以血球計數器計數，並以連續稀釋法，將菌液濃度調整至  $10^5 \sim 10^7$  cells/ml。
3. 以微量吸管吸取 0.1 ml 之菌液，滴在 YEPD/PB 培養基上。將三角玻棒先置於 95% 酒精中，取出過火，使酒精燃盡，稍待片刻待玻棒冷卻後，右手持玻棒混勻菌液，左手則旋轉培養基，將菌液均勻分布。
4. 在室溫放置 5~10 分鐘後，等待水氣消失後，用鑷子將 Fluconazole 藥物紙錠 (濃度 200  $\mu\text{g/ml}$ , 35 $\mu\text{l}$ )，擺放置培養基中，在室溫下培養 2~3 天。
5. 以光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外的細胞形態。

## 3-2.2 觀察 Fluconazole 壓力下 Ergosterol 對白色念珠菌巨觀形態之影響

### 3-2.2.1 解剖顯微鏡觀察菌落形態

1. 首先進行抗生素感受性試驗。將培養於 PDA 之白色念珠菌標準菌株 SC5314 取出，用接種環接於無菌水中，震盪均勻。
2. 以血球計數器計數，並以連續稀釋法，將菌液濃度調整至  $10^5 \sim 10^7$  cells/ml。
3. 以微量吸管吸取 0.1 ml 之菌液，滴在 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 或 YEPD/PB 培養基上。將三角玻棒先置於 95%酒精中，取出過火，使酒精燃盡，稍待片刻待玻棒冷卻後，右手持玻棒混勻菌液，左手則旋轉培養基，將菌液均勻分布。
4. 在室溫放置 5~10 分鐘後，等待水氣消失後，用鑷子將 Fluconazole 藥物紙錠（濃度 200  $\mu\text{g/ml}$ , 35 $\mu\text{l}$ ），擺放置培養基中，在室溫下培養 3~4 天。
5. 將結果分成 P1、P2、P3 和 Control 四區，以解剖顯微鏡觀察菌落形態。

### 3-2.2.2 觀察特殊菌落形態之相關性

1. 將在有 Fluconazole 壓力下，於 YEPD/PB 和 YEPD/PB/Ergosterol (0.1%和0.2%) 培養的白色念珠菌分為P1、P2、P3和Control四區。
2. 在解剖顯微鏡下，挑取各區菌落置於 1 ml 無菌水中。以血球計數器計數，並以連續稀釋法，將菌液濃度調整至  $10^4$  cells/ml。
3. 以微量吸管吸取 0.1 ml 之菌液，滴在 YEPD/PB 培養基上。將三角玻棒先置於 95%酒精中，取出過火，使酒精燃盡，稍待片刻待玻棒冷卻後，右手持玻棒混勻菌液，左手則旋轉培養基，將菌液均勻分布。
4. 於室溫培養 3~4 天後，觀察菌落形態，並計數求其比例。隔週觀察，為期 4 週。



### 3-2.3 觀察Fluconazole壓力下Ergosterol對白色念珠菌抑制圈內與抑制圈外之影響

1. 準備長方形載玻片，在載玻片上面以Blocking marker筆畫一個約一元硬幣大小的圓。再於圓中滴入約100 $\mu$ l的無菌水。
2. 在解剖顯微鏡下觀察，利用接種針挑取YEPD/PB和YEPD/PB/0.2% Ergosterol抑制圈內、外的菌，將針上的白色念珠菌輕輕的放到已加100 $\mu$ l的無菌水的玻片上，以劃圓圈的方式使菌可以均勻分布在Blocking圈中，而且要注意濃度不可以太稀或是太濃。
3. 等約30~40分鐘待載玻片上面的菌液變乾。
4. 待菌液乾後，加入150 $\mu$ l的4% Formaldehyde再靜置15~20分鐘。
5. 將靜置後的玻片，以PBS清洗3次，再利用拭鏡紙將Blocking圈以外之的水漬擦乾淨。
6. 將擦乾後的玻片平放入已經鋪好濕紙巾的微波盒中。在Blocking圈中加入150 $\mu$ l的Blocking Buffer (Blocking Buffer內利用PBS為溶劑再加入含有3% BSA、0.2% Triton-X100、0.1% Tween 80)，再將微波盒用保鮮膜包住後放入4 $^{\circ}$ C冰箱中overnight。
7. 第二天將冰箱中的玻片拿出來，以PBS清洗3次，再利用拭鏡紙將Blocking圈以外之的水漬擦乾淨。
8. 在避光的情況下，將擦乾後的玻片加入5 ng/ml的DAPI (溶劑為PBS) 約150 $\mu$ l，靜置30~40分鐘。
9. 將靜置後的玻片，以PBS清洗3次，再利用拭鏡紙將Blocking圈以外之的水漬擦乾淨。
10. 在避光的情況下，將擦乾後的玻片加入50 $\mu$ l 20% Glycerol的mounting solution，在蓋上蓋玻片，以透明指甲油封片。
11. 以雷射共軛焦顯微鏡觀察。

### **3-2.4 觀察Fluconazole壓力下不同濃度Ergosterol對白色念珠菌**

#### **抑制圈內與抑制圈外的影響**

##### **3-2.4.1 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之菌落形態**

1. 於YEPD/PB和YEPD/PB/Ergosterol (0.05%、0.1%、0.15%和0.2%) 的培養基上進行抗生素敏感性試驗 (受Fluconazole藥物處理), 於室溫下培養。
2. 在18小時內 (第1天) 與第2和7天以光學顯微鏡 (10×10) 觀察抑制圈內和抑制圈外的菌落形態。

##### **3-2.4.2 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態**

1. 於YEPD/PB和YEPD/PB/Ergosterol (0.05%、0.1%、0.15%和0.2%) 的培養基上進行抗生素敏感性試驗 (受Fluconazole藥物處理), 於室溫下培養。
2. 在18小時內 (第1天), 於解剖顯微鏡下, 挑取抑制圈內與抑制圈外的白色念珠菌, 於滴有無菌水的載玻片上塗開。
3. 以光學顯微鏡 (10×10) 觀察抑制圈內和抑制圈外的細胞形態。

##### **3-2.4.3 共軛焦顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態**

1. 於YEPD/PB和YEPD/PB/Ergosterol (0.05%、0.1%、0.15%和0.2%) 的培養基上進行抗生素敏感性試驗 (受Fluconazole藥物處理), 於室溫下培養。
2. 在18小時內與第7、14、21和28天, 以共軛焦顯微鏡觀察 (50 ng/ml DAPI染色) 抑制圈內與抑制圈外的細胞形態。

### **3-2.5 觀察Fluconazole壓力下Squalene對白色念珠菌抑制圈內與抑制圈外之影響**

#### **3-2.5.1 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態**

1. 將SC5314於Fluconazole壓力下的PDA/PB/0.1% Squalene的培養基中於室溫下培養。
2. 在第1、2、7、14、21和28天，於解剖顯微鏡下，挑取抑制圈內與抑制圈外的白色念珠菌，於滴有無菌水的載玻片上塗開。
3. 以光學顯微鏡 (10×10) 觀察抑制圈內和抑制圈外的細胞形態。

#### **3-2.5.2 共軛焦顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態**

1. 將SC5314於Fluconazole壓力下的PDA/PB/0.1% Squalene的培養基中於室溫下培養。
2. 在第1、2、7、14、21和28天，以共軛焦顯微鏡觀察 (50 ng/ml DAPI 染色) 抑制圈內與抑制圈外的細胞形態。

### 3-2.5.3 掃描式電子顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態

1. 前處理：準備直徑1公分的圓形載玻片及12 Well的Plate，在12 Well的Plate上面註明培養天數。直徑1公分的圓形載玻片需先經過0.1% Tween 80溶液的浸泡，在超音波震盪機上震盪30分鐘後，用70%的酒精清洗，再以拭鏡紙將圓形載玻片上面的水漬擦乾。在圓形載玻片上面滴入約20 $\mu$ l的ddH<sub>2</sub>O。
2. 將SC5314於Fluconazole壓力下的PDA/PB/0.1% Squalene的培養基中培養，於第1、2、7、14、21和28天利用無菌的細針取菌，將細針上的菌輕放入已加入20 $\mu$ l的ddH<sub>2</sub>O的玻片上，以劃圓的方式使菌均勻分散於玻片，而且要注意濃度不可以太稀或是太濃。
3. 待30~40分鐘載玻片上的菌液變乾。
4. 將圓形玻片置入12 Well的Plate，加入1 ml的Glutaldehyde，靜置30分鐘。
5. 將靜置過後12 Well Plate中的Glutaldehyde倒掉，以ddH<sub>2</sub>O清洗3次，每次5分鐘。
6. 加入1 ml OsO<sub>4</sub>到12 Well的Plate中，靜置30分鐘。
7. 將靜置過後12 Well Plate中的OsO<sub>4</sub>倒掉，以ddH<sub>2</sub>O清洗3次，每次5分鐘。
8. 清洗完之後進行脫水的步驟，以35%、45%、60%、75%、80%、95%、100%酒精，分別各5分鐘逐次以不同濃度酒精置換。
9. 待100%酒精脫水完，即將酒精倒掉，讓圓形玻片上面的酒精自然揮發，即可送至電子顯微鏡室進行coating。
10. 以掃描式電子顯微鏡觀察。

## 肆、 實驗結果

### 第一章 白色念珠菌倍數體測定與營養要求菌株篩選

#### 4-1.1 存活率分析

同一菌株之二倍體和單倍體的染色體套數不同，受到紫外線照射後，兩者的存活率不同，可以此來作為倍數體之確認 (Olaiya and Sogin, 1979)。另外，存活率達 5~10%時，篩選到菌種突變的機率較大，可藉此作為挑選營養要求菌株之前製步驟。本實驗已重複三次以上，均得到相似的結果。

以麵包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 與其衍生菌株作為實驗條件的對照，將白色念珠菌標準菌株 (SC5314、ATCC14053、CaW、C1 和 C2) 照射紫外線後，計算其存活率，並以此作致死曲線 (killing curve)。(Figure 4-1、4-2)

存活率之計算方式如下：

$$\text{存活率 (survival rate, \%)} = \frac{\text{照射紫外線後各時間點之菌落數}}{\text{未照射紫外線之菌落數}} \times 100\%$$

由麵包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的二倍體 (S2N) 與單倍體 (BCRC51893、BCRC20496) 及由本實驗室所分出的疑似單倍體 (S1、S2) 的致死曲線，可明顯看出二倍體的 S2N 的致死曲線較 BCRC51893、BCRC20496 來得平緩，且可藉以證實 S1、S2 為單倍體。



由白色念珠菌標準菌株 (SC5314、ATCC14053、CaW、C1 和 C2) 的致死曲線中可發現雖然這五株菌均為白色念珠菌，但致死曲線並不大一致。而由於 SC5314 的基因密碼已被美國史丹佛大學解開，為國際標準菌株，因此之後便以 SC5314 作為後續研究之標準菌株 (Jones et al., 2004)。

SC5314 經 Fluconazole 藥物處理後，由顯微操作器挑出之 a type 的疑似單倍體菌株 SW08、4A 和 4F 及  $\alpha$  type 的疑似單倍體菌株 GB2 和 LN07，以 UV 照射二倍體的 SC5314 與這些疑似單倍體菌株，並繪製致死曲線，結果發現二倍體 SC5314 之致死曲線較疑似單倍體 SW08、4A 和 4F 來得平緩，顯示 a type 的 SW08、4A 和 4F 可能為單倍體。然而 GB2、LN07 卻有相反的結果。另外，SW08 和 4F 照射紫外光後，存活率 5~10% 的時間均約為 90 秒；4A 照射紫外光後，存活率 5~10% 的時間均約為 120 秒。GB2、LN07 的致死曲線較標準菌株 SC5314 來得平緩。存活率 5~10% 的時間均約在 130 秒左右。(Figure 4-3)

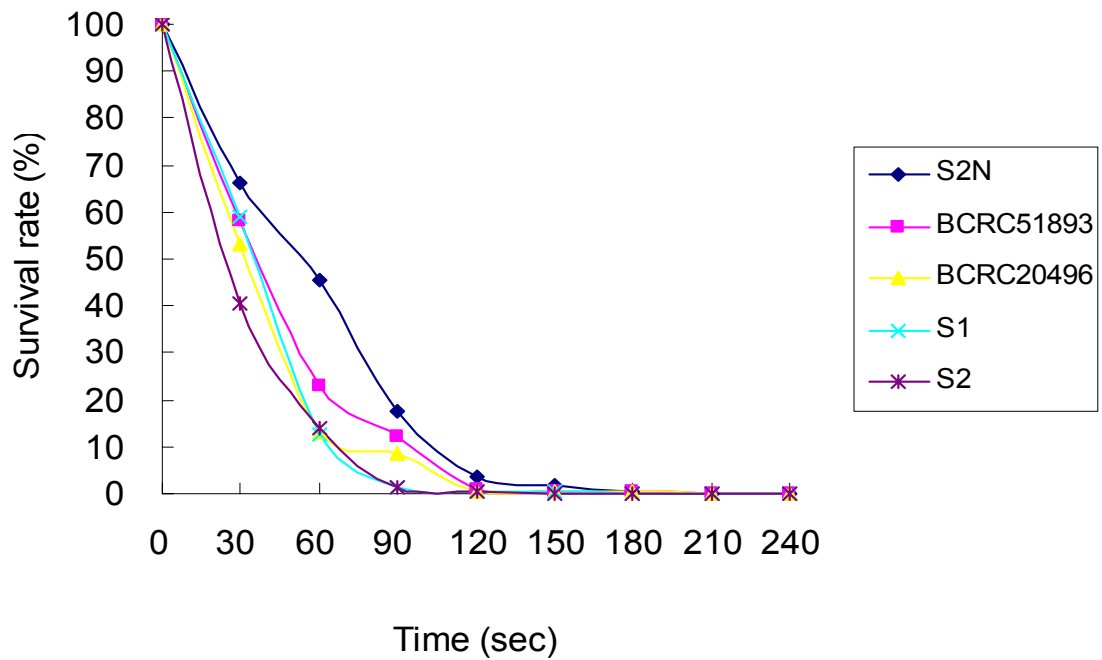


Figure 4-1 UV 照射下麵包酵母菌二倍體與其衍生菌株之存活率分析  
 以紫外光照射二倍體麵包酵母菌 S2N 所繪出之致死曲線較單倍體的 BCRC51893、BCRC20496 來的平緩，且可藉以證實藉由顯微操作器分離出之 S1、S2 為單倍體，並可以此作為實驗條件之對照組

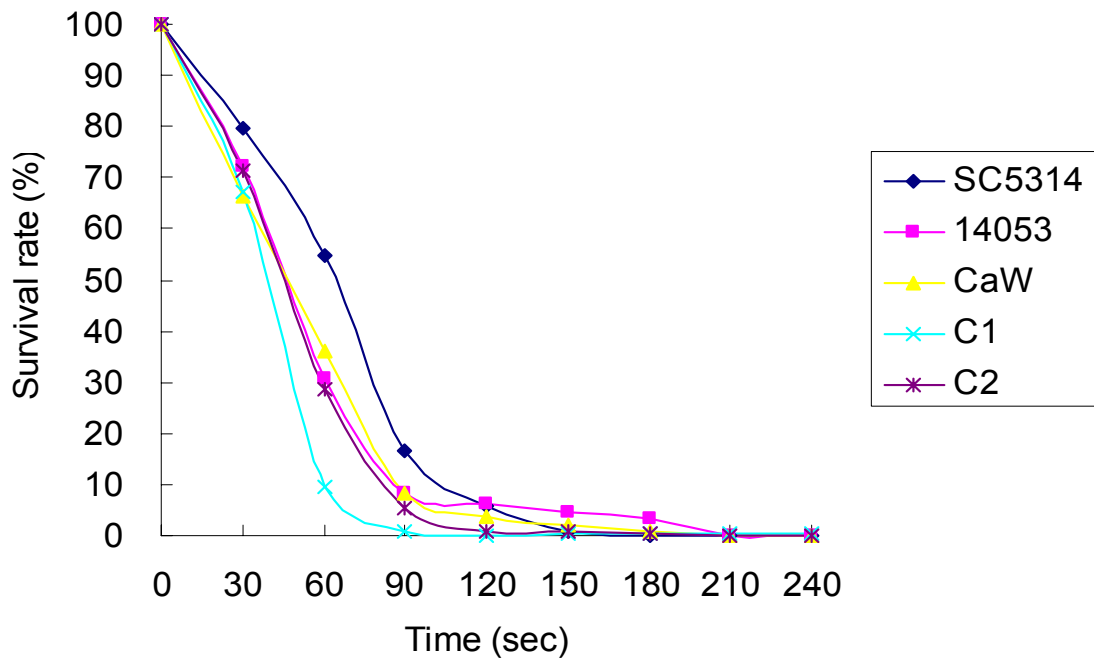


Figure 4-2 UV 照射下白色念珠菌標準菌株之存活率分析

由白色念珠菌標準菌株 (SC5314、ATCC14053、CaW、C1 和 C2) 的致死曲線中可發現雖然這五株菌均為白色念珠菌，但致死曲線並不大一致，而因 SC5314 之基因密碼已解開，為國際標準菌株，因此之後之實驗以 SC5314 作為二倍體菌株之比較標準

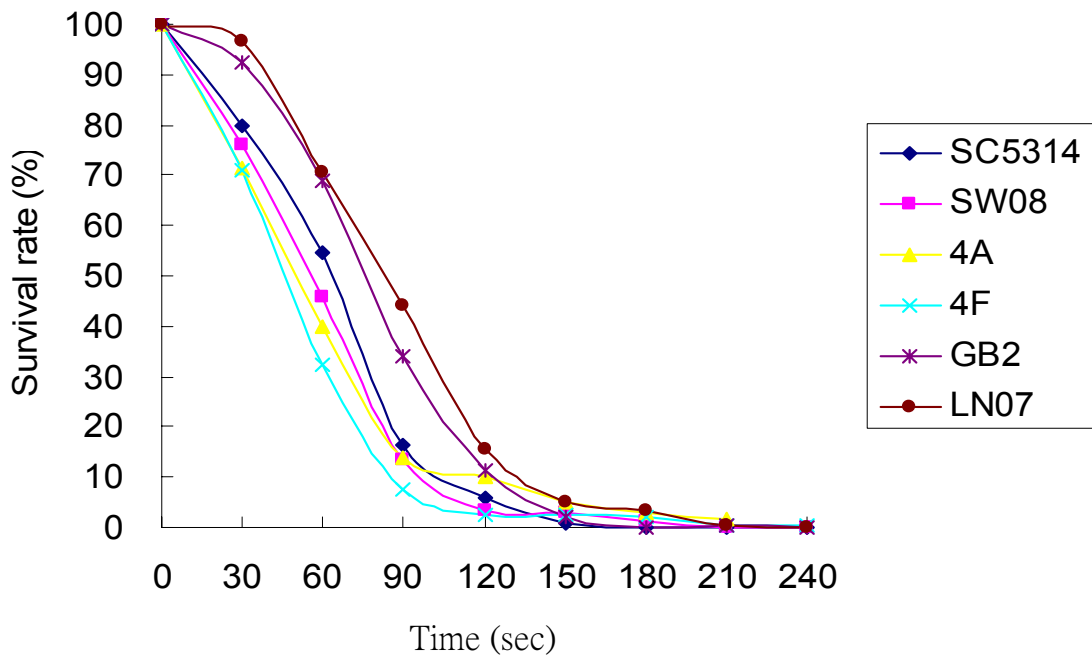


Figure 4-3 UV 照射下白色念珠菌 SC5314 與其衍生菌株之存活率分析  
 經 Fluconazole 藥物處理後，由顯微操作器挑出之 a type 疑似單倍體菌株 SW08、4A 和 4F 經 UV 照射後之致死曲線較二倍體 SC5314 來得陡峭，顯示其可能為單倍體； $\alpha$  type 疑似單倍體菌株 GB2 和 LN07 經 UV 照射後之致死曲線較二倍體 SC5314 來得平緩

#### 4-1.2 複印法 (Replica) 篩選單倍體營養要求菌株

由本實驗室鄭瑋寧進行 PCR 分析白色念珠菌之性別，結果顯示 SW08、4A、4F 均為 a type，GB2、LN07 為  $\alpha$  type。a type 隨機選用 SW08 和 4F 進行營養要求菌株之篩選； $\alpha$  type 則以 GB2 進行實驗。

實驗結果，SW08 共篩選到 14 株營養要求菌株 (SW08-R1-1、SW08-R1-2、SW08-R1-5、SW08-R1-8、SW08-R2-9、SW08-R2-10、SW08-R2-11、SW08-R2-12、SW08-R2-13、SW08-R2-14、SW08-R2-15、SW08-R2-16)，4F 共篩選到 7 株 (4F-R1-1、4F-R3-2、4F-R8-3、4F-R9-4、4F-R10-5、4F-R11-6、4F-R7-7)，GB2 篩選到 2 株 (GB2-R1-1、GB2-R9-7)，之後將以這些菌株進行後續實驗。這些菌株都經過三次以上的確認，確認其在完全培養基 YEPD 上得以生長，但在不含任何胺基酸之限制培養基 MM 上無法生長。(Figure 4-4A、4-4B、4-4C)

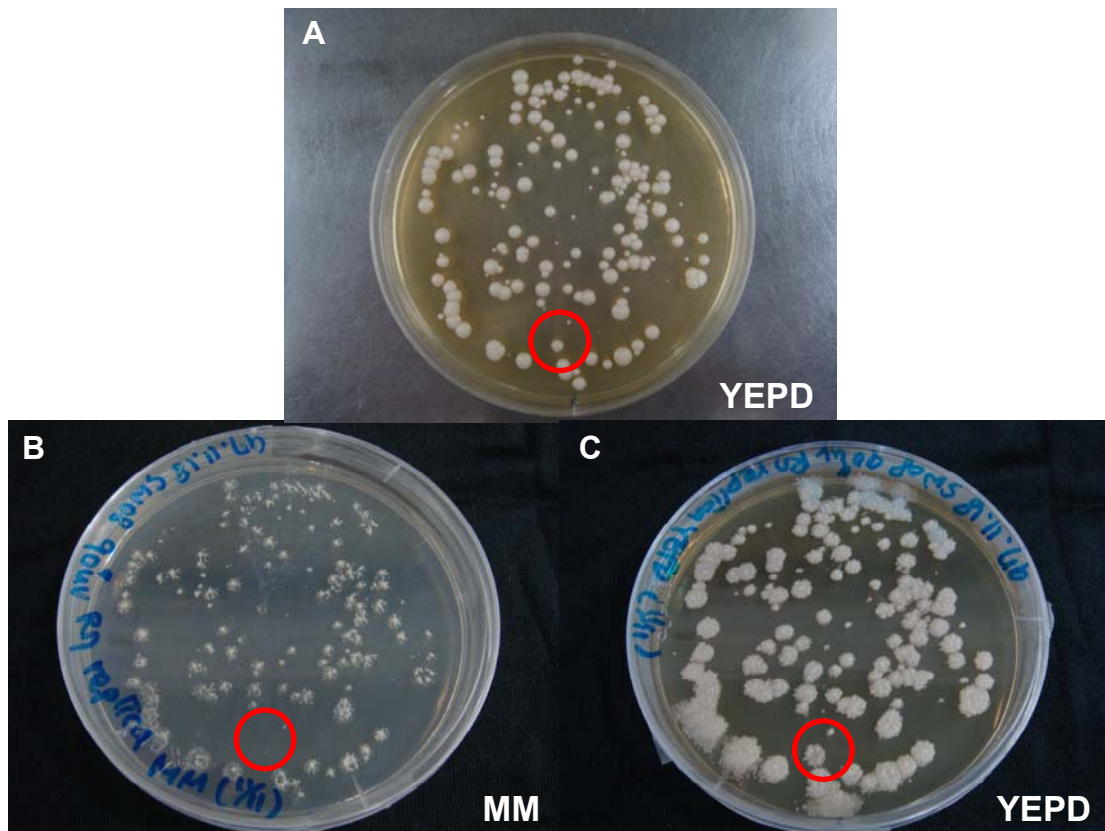


Figure 4-4A 複印法 (Replica) 篩選 SW08 營養要求菌株

紅色圓圈內之菌落為營養要求菌株，圖 A 為經由 UV 照射 90 秒後生長之菌落，以複印法蓋至不含任何胺基酸之限制培養基 MM (圖 B) 與完全培養基 YEPE (圖 C)，發現其可再完全培養基 YEPE 上生長，但無法於限制培養基 MM 上生長

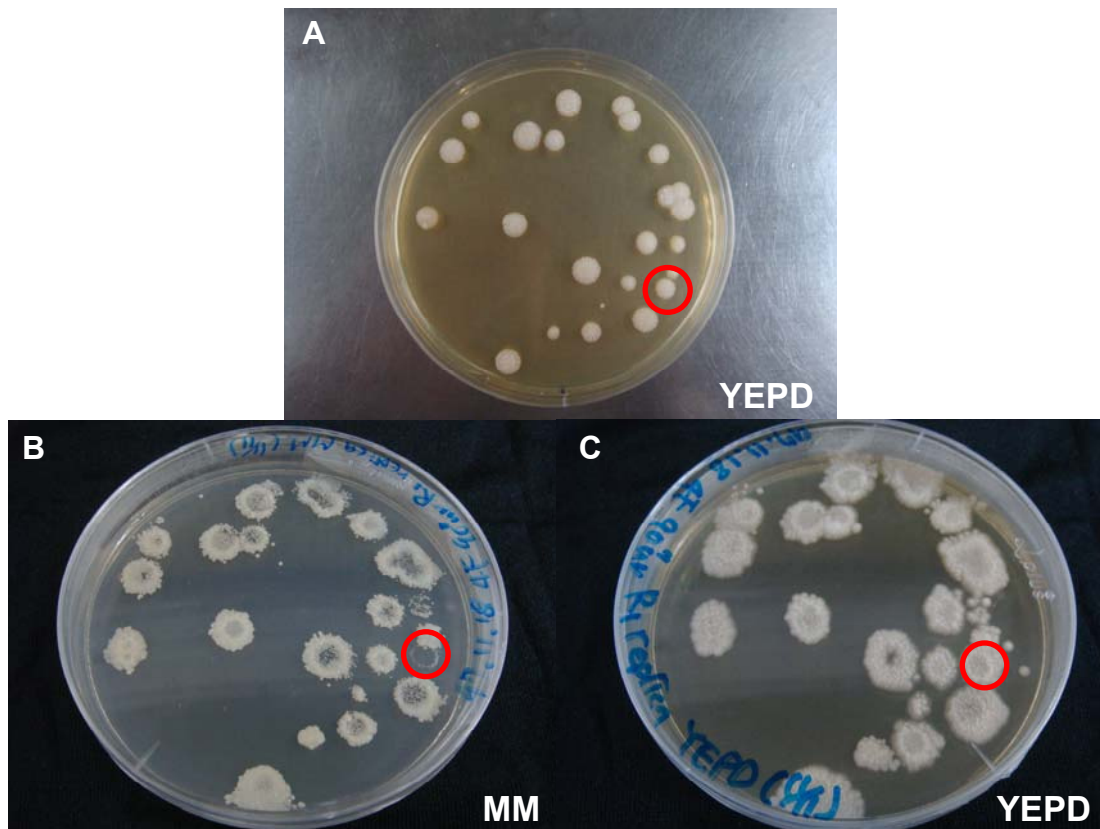


Figure 4-4B 複印法 (Replica) 篩選 4F 營養要求菌株

紅色圓圈內之菌落為營養要求菌株，圖 A 為經由 UV 照射 90 秒後生長之菌落，以複印法蓋至不含任何胺基酸之限制培養基 MM (圖 B) 與完全培養基 YEPE (圖 C)，發現其可再完全培養基 YEPE 上生長，但無法於限制培養基 MM 上生長

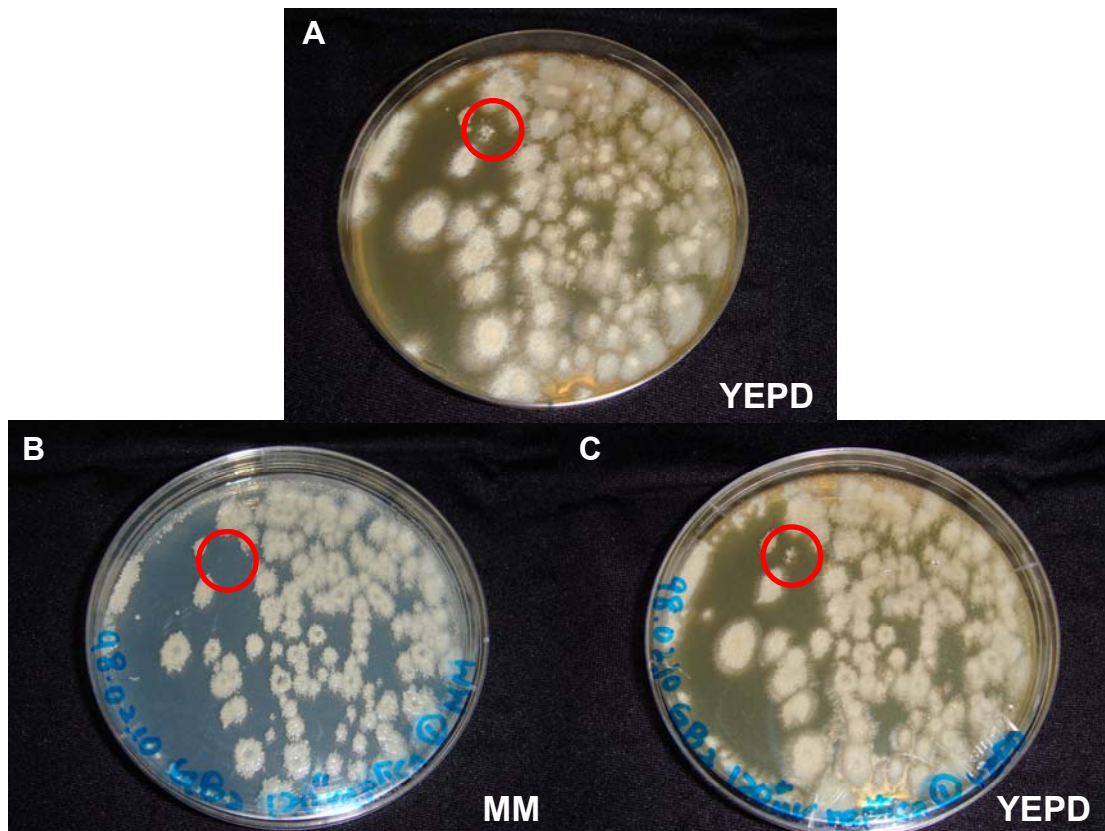


Figure 4-4C 複印法 (Replica) 篩選 GB2 營養要求菌株

紅色圓圈內之菌落為營養要求菌株，圖 A 為經由 UV 照射 130 秒後生長之菌落，以複印法蓋至不含任何胺基酸之限制培養基 MM (圖 B) 與完全培養基 YEPE (圖 C)，發現其可再完全培養基 YEPE 上生長，但無法於限制培養基 MM 上生長



### 4-1.3 確認單倍體營養要求菌株的營養缺陷

經由 9 種個別含有 4~5 種胺基酸或含氮鹼基之限制培養基的篩選，可得知營養要求菌株對 20 種胺基酸或含氮鹼基的營養要求性。舉例說明，若菌株在限制培養基#1 MM 和#6 MM 均可生長，則表示此菌株對 adenine 具營養要求性，以此類推。(Table 4-1)

實驗結果發現 a type 的 SW08 和 4F 與  $\alpha$  type 的 GB2 所衍生之所有營養要求菌株均對 histidine 具營養要求性。(Table 4-2)

由於無法獲得不同營養要求性之菌株，因此無法藉由交配實驗來證明白色念珠菌可經由單倍體間的交配並互補後，形成無營養缺陷之二倍體。



Table 4-1 限制培養基#1~#9 之營養成分列表

	#1	#2	#3	#4	#5
#6	Adenine	Guanine	Cycsteine	Methionine	uracil
#7	Histidine	Leucine	Isoleucine	Valine	lysine
#8	phenylalanine	Tyrosine	tryptophan	Threonoine	proline
#9	Glutamic	serine	Alanine	Aspartic	arginine

Table 4-2 營養要求菌株之營養要求列表

Strains	Mating Type	Phenotype
SW08		
R1-1	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R1-2	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R1-5	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R1-8	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R2-9	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R2-10	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R2-11	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R2-12	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R2-13	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R2-14	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R2-15	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R2-16	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
4F		
R1-1	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R3-2	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R7-7	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R8-3	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R9-4	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R10-5	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
R11-6	a1	<i>his</i> <sup>-</sup>
GB2		
R1-1	$\alpha 1\alpha 2$	<i>His</i> <sup>-</sup>
R9-7	$\alpha 1\alpha 2$	<i>His</i> <sup>-</sup>

## 第二章 白色念珠菌形態觀察

### 4-2.1 光學顯微鏡觀察 Fluconazole 壓力下白色念珠菌之細胞形態

在 Fluconazole 藥物處理 18 小時後於抑制圈內可以發現不同於一般所觀察到的細胞形態。(Figure 4-5)

白色念珠菌標準菌株 SC5314 受 Fluconazole 藥物處理後抑制圈外的細胞形態為普遍常見的橢圓球狀的酵母菌型 (yeast form)，而抑制圈內則是具有形似豆莢形狀、類似子囊 (ascus) 的細胞結構，將此結構命名為 Peapod。Peapod 的內部具有為數不等的顆粒狀結構。在 Fluconazole 藥物處理後 2~3 天，將 Peapod 取出培養，結果發現這些 Peapod 並沒有發芽生長，不具有存活的能力。因此懷疑 Fluconazole 雖能誘使 Peapod 形成，也能造成 Peapod 死亡。

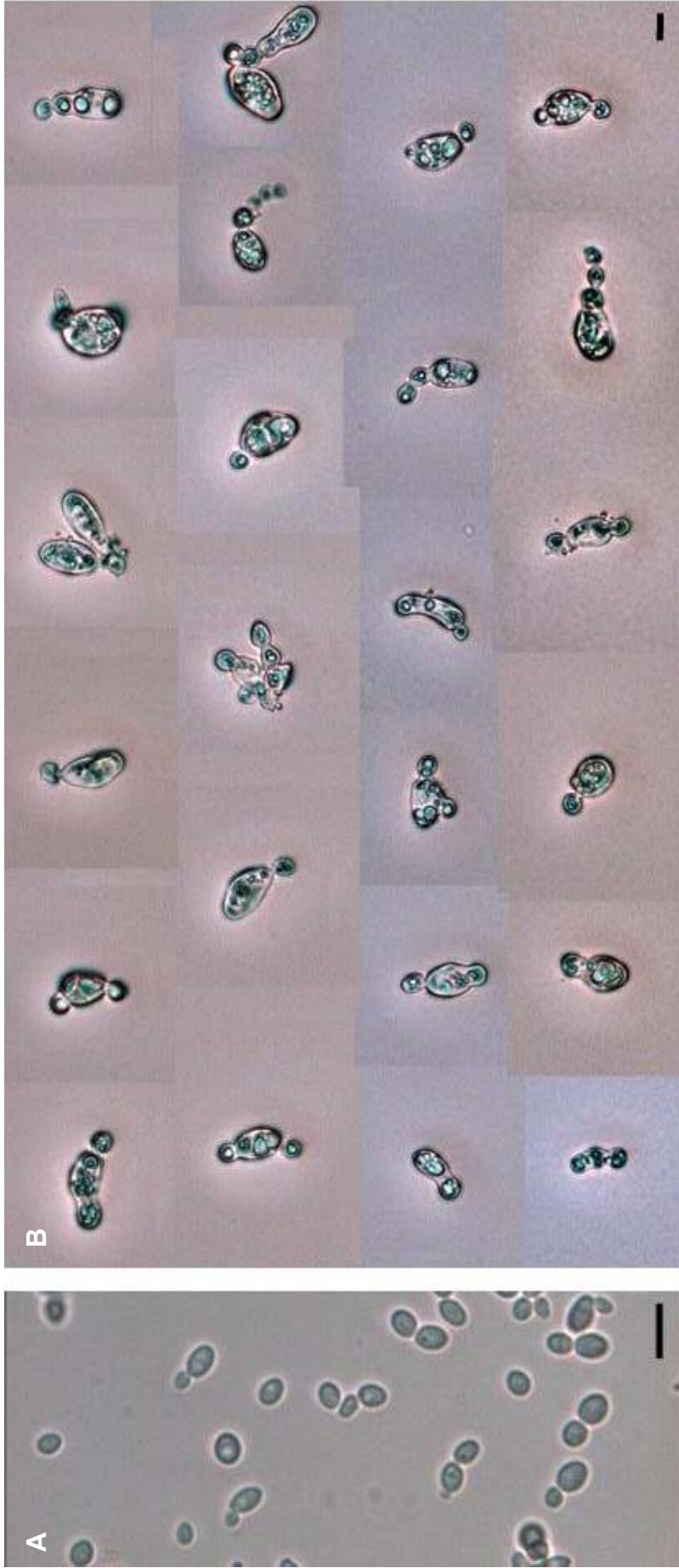


Figure 4-5 光學顯微鏡觀察 Fluconazole 壓力下白色念珠菌的細胞形態

圖 A 為 Fluconazole 藥物處理後的白色念珠菌標準菌株 SC5314 抑制圈外的細胞形態，為一般常見的酵母菌型；

圖 B 為抑制圈內的細胞形態，為具有為數不一顆粒的豆莢狀結構。橫標代表之長度為 10  $\mu\text{m}$

## 4-2.2 觀察 Fluconazole 壓力下 Ergosterol 對白色念珠菌巨觀形態之影響

屬於 Azole 類藥物的 Fluconazole 會抑制麥角固醇 (Ergosterol) 生合成中 Cytochrome P450 系統的酵素 14 $\alpha$ -demethylase，使得 Ergosterol 的合成受到抑制。因此在培養基中加入 Ergosterol，觀察是否能使在 Fluconazole 藥物壓力下所產生的 Peapod 存活、發芽。

### 4-2.2.1 解剖顯微鏡觀察菌落形態

在 YEPD/PB 和 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基進行抗生素感受性試驗。此二種培養基進行 Fluconazole 的抗生素感受性試驗後，均可產生明顯的抑制圈，抑制圈內和抑制圈上的菌落顏色為較深的酒紅色，抑制圈邊緣為顏色較淺的粉紅色，甚至為白色，離加藥紙錠 (paper disc) 距離越遠，顏色越淡。(Figure 4-6)

將整個培養基分成四個區域，抑制圈內部為 P1，抑制圈上為 P2，抑制圈外連接最淺顏色菌落區的粉紅菌落區為 P3，顏色最淺的最外圍菌落區為 Control。(Figure 4-7)

以解剖顯微鏡觀察發現，無論是 YEPD/PB 或是 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基，P1 區的菌落呈現較扁平、不規則的形態；P2 區的菌落較立體、成規則的圓形；P3 區和 Control 區的菌落形態較類似，只有顏色的差異。抑制圈內 (含抑制圈上) 的 P1 和 P2 菌落較小，而抑制圈外的 P3 和 P4 菌落較大。(Figure 4-8、4-9)

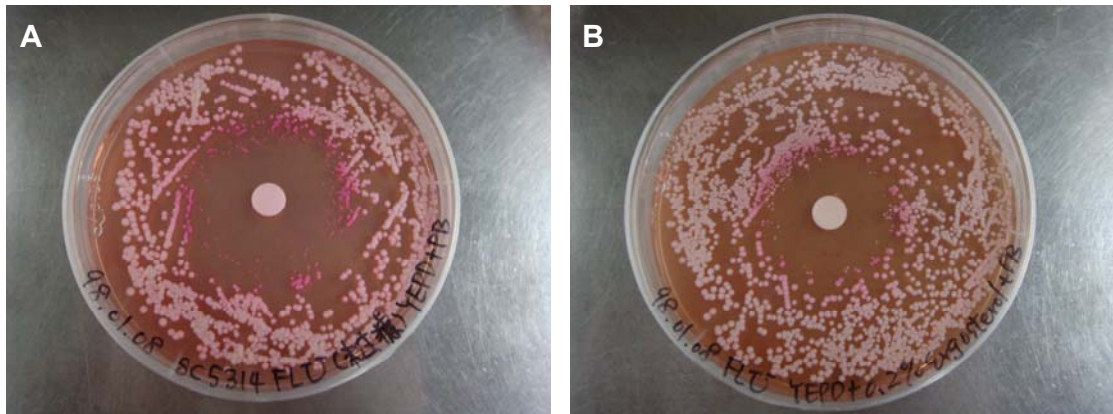


Figure 4-6 抗生素感受性試驗

圖 A 的培養基為 YEPD/PB；圖 B 為 YEPD/PB/0.2% Ergosterol。以此二種培養基進行 Fluconazole 抗生素感受性試驗後，均可產生明顯的抑制圈，抑制圈內和抑制圈上的菌落顏色為較深的酒紅色，抑制圈邊緣為顏色較淺的粉紅色，甚至為白色，離加藥紙錠 (paper disc) 距離越遠，顏色越淡

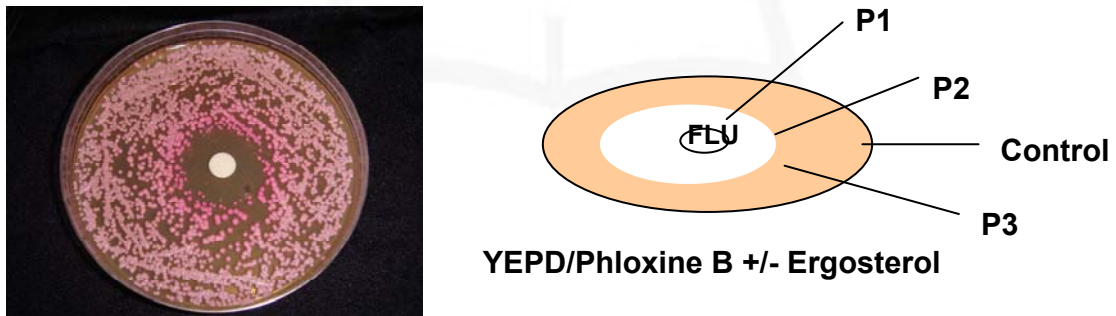


Figure 4-7 抗生素感受性試驗分區示意圖

將整個培養基分成四個區域，抑制圈內部為 P1，抑制圈上為 P2，抑制圈外連接最淺顏色菌落區的粉紅菌落區為 P3，顏色最淺的最外圍菌落區為 Control

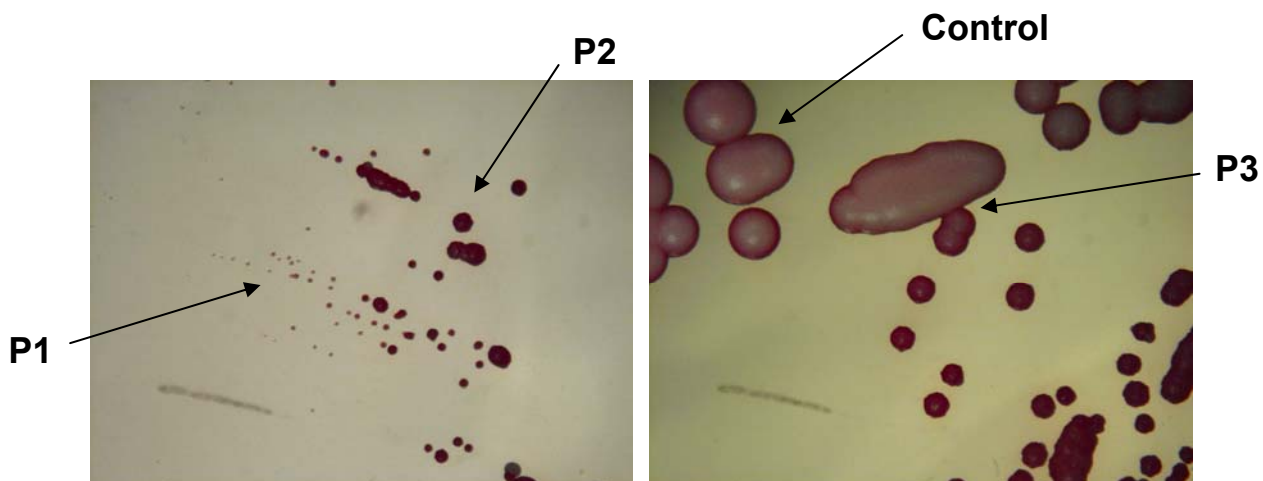


Figure 4-8 以解剖顯微鏡觀察於 YEPD/PB 培養基上進行之抗生素感受性試驗

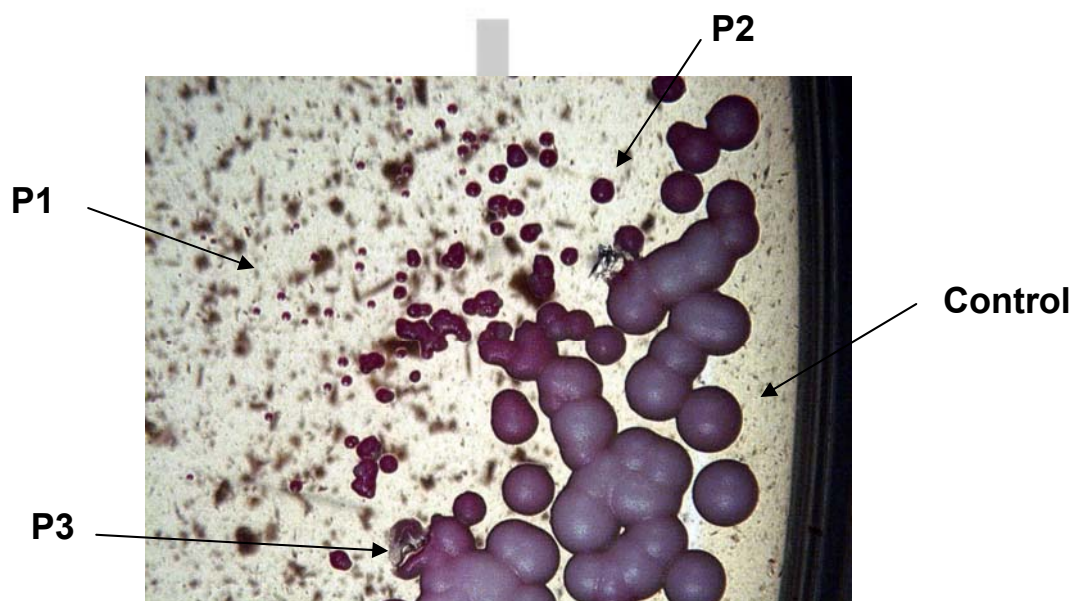


Figure 4-9 以解剖顯微鏡觀察於 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基上進行之  
 抗生素感受性試驗

無論培養基中是否含有 Ergosterol，菌落的形態相似。P1 區菌落呈現較扁平、不規則的形態；P2 區菌落較立體、成規則的圓形；P3 區和 Control 區的菌落形態較類似，只有顏色的差異。抑制圈內（含抑制圈上）的 P1 和 P2 菌落較小，而抑制圈外的 P3 和 P4 菌落較大

#### 4-2.2.2 觀察特殊菌落形態之相關性

由於無法獲得具有存活力的Peapod，因此只能藉由其生成之結果回推Flucnazole造成菌落形態不同與Peapod出現機率之相關性。在Fluconazole藥物處理後，塗盤 (plating) 於YEPD/PB、YEPD/PB/0.1% Ergosterol和YEPD/PB/0.2% Ergosterol培養基中，比較四個區域P1、P2、P3和Control的菌落形態，結果發現在YEPD/PB培養基中，大部分的菌落為形態正常，較大的菌落，而P1、P2偶有形態變異的小菌落出現，但出現比例非常低。(Figure 4-10)

而在YEPD/PB/0.1% Ergosterol的培養基中，雖然大部分仍是形態正常較大的菌落，但在第2週的P1形態變異的小菌落之比例遠高於正常較大的菌落。在YEPD/PB/0.2% Ergosterol培養基中，不論週數，P1或P2形態變異的小菌落比例大幅增加，甚至高於正常較大的菌落。(Figure 4-11、4-12)

實驗結果顯示，在Peapod存在的抑制圈內 (P1、P2) 中，形態變異的小菌落比例較抑制圈外 (P3、Control) 高。此外，也發現在含有Ergosterol的培養基上塗盤後生長的菌落形態呈現多樣性，除了有正常較大的菌落和形態變異的小菌落外，還有具多重菌絲的 (hyper-filamentous) 菌落形態。(Figure 4-13)



統整以上結果，白色念珠菌標準菌株SC5314受Fluconazole藥物處理後之抑制圈內可找到Peapod的存在 (Figure 4-5)。無論是否含有Ergosterol，將Fluconazole處理之培養基分成P1、P2、P3和Control四個部份，則可發現抑制圈內 (含抑制圈上) 的P1和P2菌落較小，而抑制圈外的P3和P4菌落較大 (Figure 4-8、4-9)。另將其塗盤至含有不同Ergosterol濃度的培養基中，發現在Peapod存在的抑制圈 (P1、P2)，菌落形態呈現多樣性，間接證明Peapod可能是白色念珠菌減數分裂後所造成的結果，而Peapod可能是*C. albicans*的有性器官。(Figure 4-10、4-11、4-12、4-13)



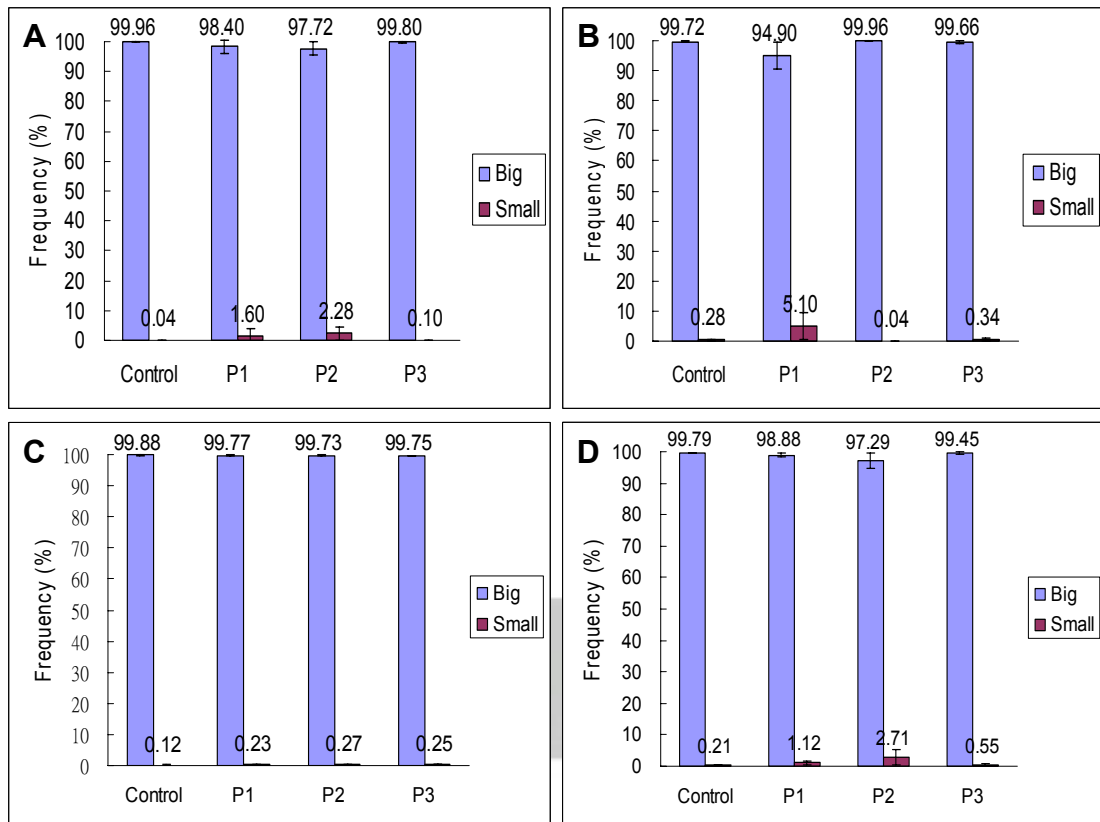


Figure 4-10 Fluconazole 藥物處理後於 YEPD/PB 培養基中菌落形態比例  
圖 A、B、C、D 分別代表第 1、2、3、4 週。在 YEPD/PB 培養基中，大部分的菌落為形態正常的較大菌落，而 P1、P2 偶有形態變異的小菌落出現，但出現比例非常低

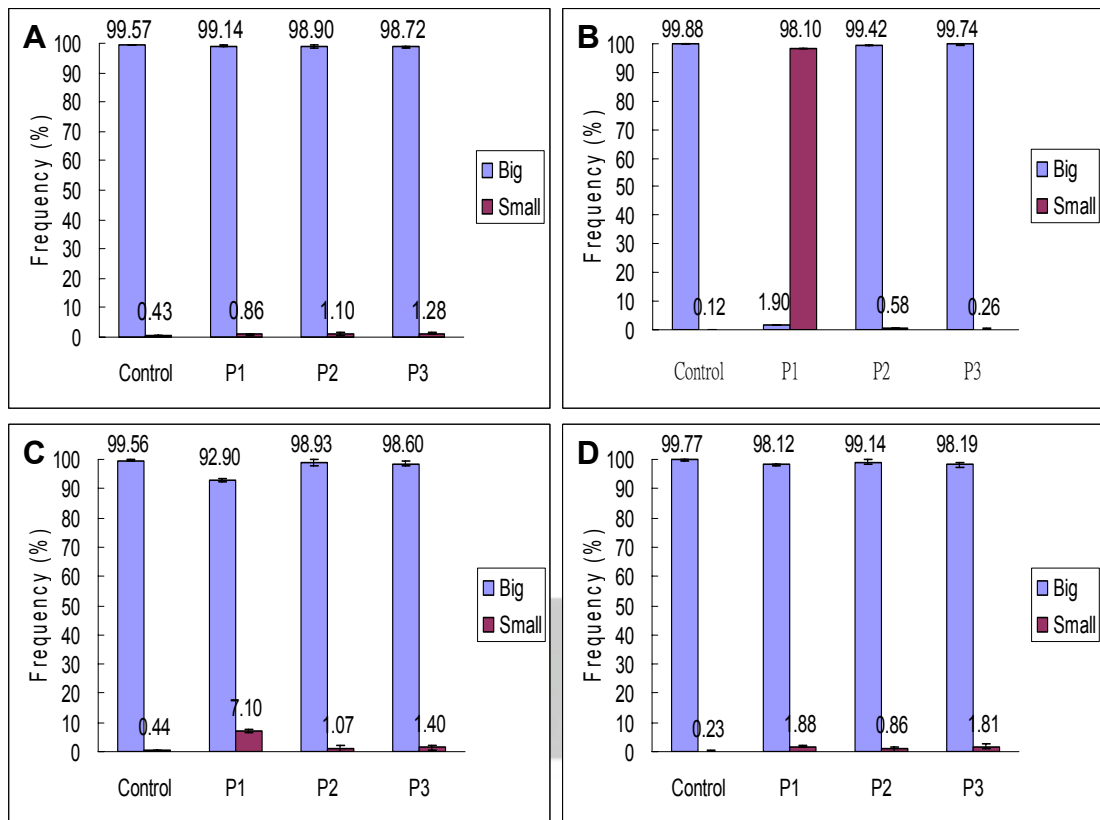


Figure 4-11 Fluconazole 藥物處理後於 YEPD/PB/0.1% Ergosterol 培養基  
中菌落形態之比例

圖 A、B、C、D 分別代表第 1、2、3、4 週。YEPD/PB/0.1% Ergosterol 培養基中，雖然大部分仍是形態正常的較大菌落，但在第 2 週的 P1 形態變異的小菌落之比例遠高於形態正常的較大菌落

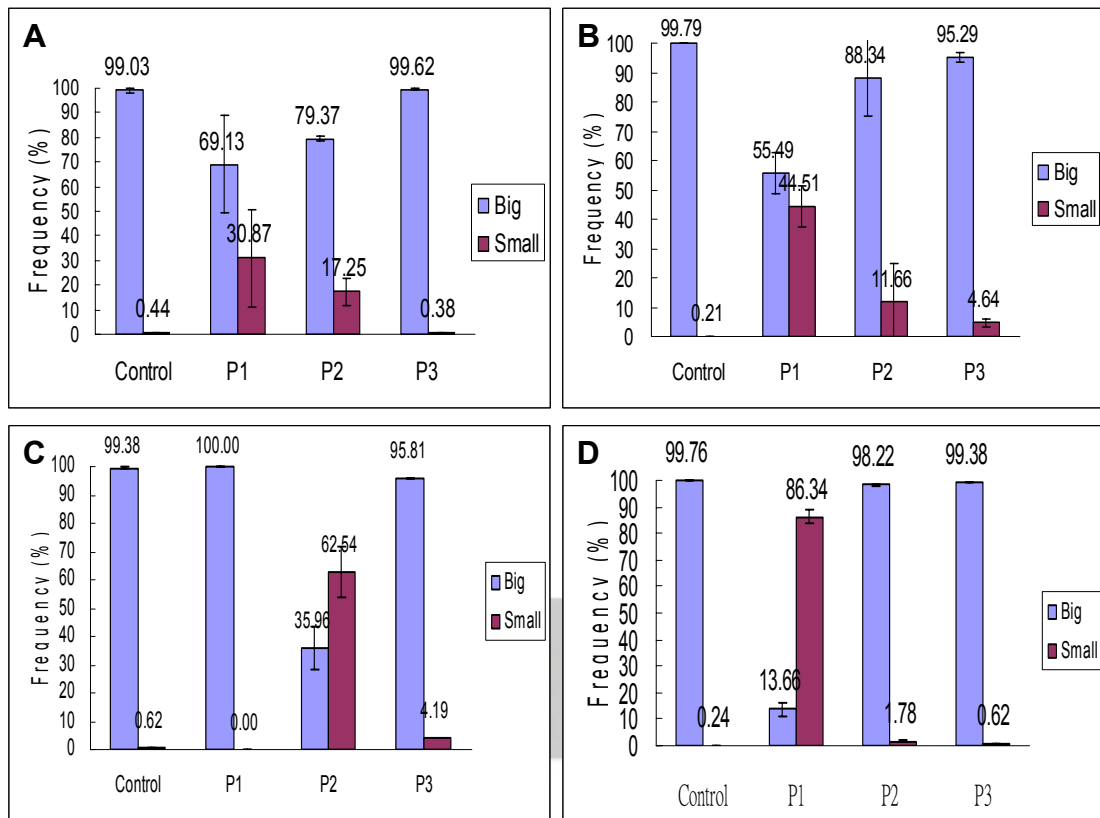


Figure 4-12 Fluconazole 藥物處理後於 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基中菌落形態之比例

圖A、B、C、D分別代表第1、2、3、4週。在YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基中，不論週數，P1或P2的形態變異的小菌落大幅比例增加，甚至高於大菌落

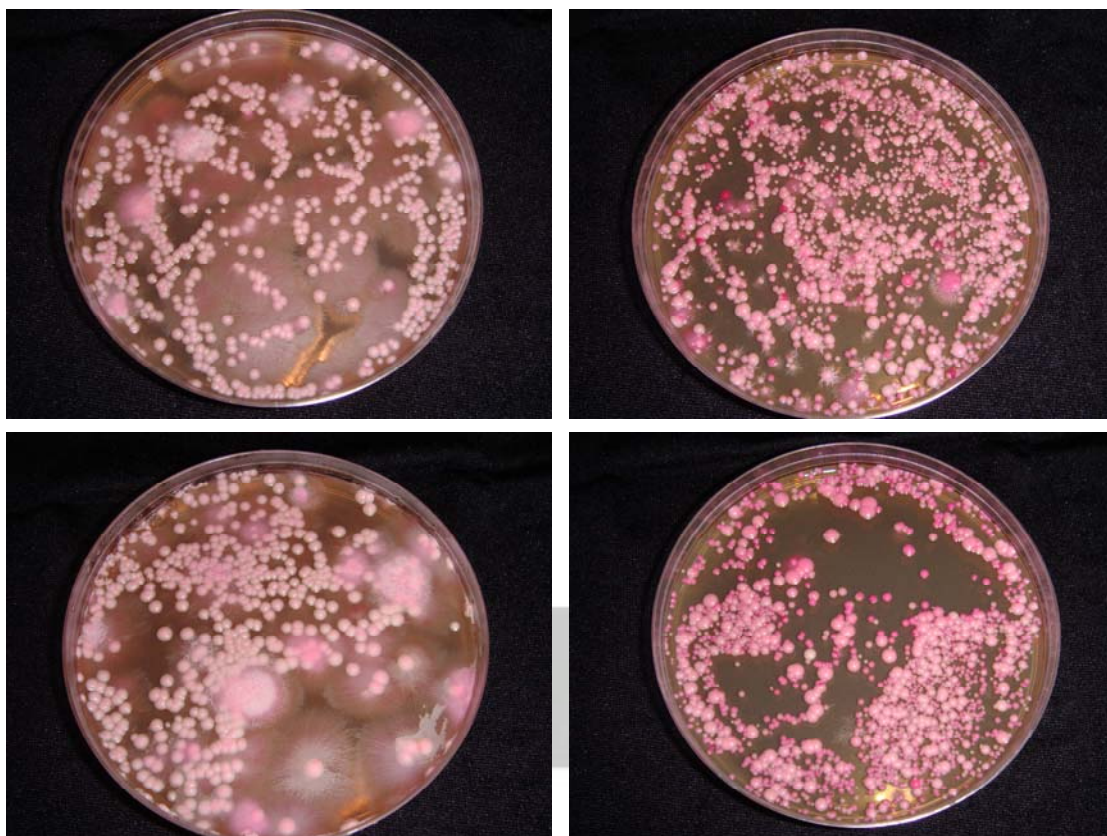


Figure 4-13 Fluconazole 藥物處理後於含 Ergosterol 培養基中白色念珠菌的形態多型性

在含有 Ergosterol 的培養基上塗盤後生長的菌落形態呈現多樣性，除了有正常較大的菌落和形態變異的小菌落外，還有具多重菌絲的 (hyper-filamentous) 菌落形態

### 4-2.3 觀察Fluconazole壓力下Ergosterol對白色念珠菌抑制圈內與抑制圈外之影響

在 Fluconazole 壓力下，以共軛焦顯微鏡觀察於 YEPD/PB 和 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基中抑制圈圈內、外的細胞形態，利用 5 ng/ml DAPI 作細胞核定位，觀察細胞核的變化。

結果發現，在 YEPD/PB 培養基中，抑制圈外的細胞呈現一般的 yeast form、橢圓球狀形態。抑制圈內大部分的細胞也呈現 yeast form，在極少的情況下會出類似豆莢形狀的 Peapod，且大部分出現的 Peapod 呈現空洞無核的情況。(Figure 4-14、4-15)

在 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基中，抑制圈外的細胞亦呈現一般的 yeast form。然而，抑制圈內大部分的細胞都呈現類似豆莢形狀的 Peapod，且呈現多核的情況，並帶有為數不等的顆粒狀結構。(Figure 4-16、4-17)

實驗中發現以 5 ng/ml DAPI 染色的 Peapod，細胞核的螢光強度普遍較酵母菌型的細胞弱，因此之後的共軛焦顯微鏡之觀察，標定細胞核所用的 DAPI 濃度提高至 50 ng/ml。

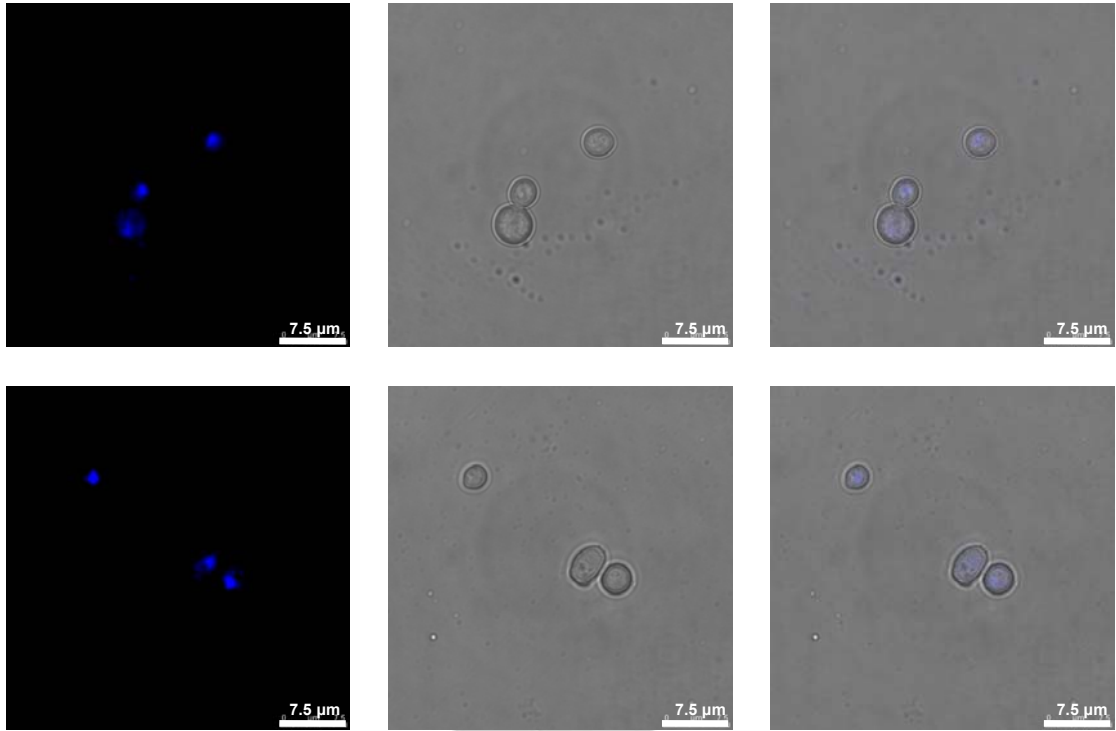


Figure 4-14 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB 培養基抑制圈外的細胞形態

Fluconazole 藥物壓力之下，YEPD/PB 培養基抑制圈外的細胞呈現一般的 yeast form、橢圓球狀形態

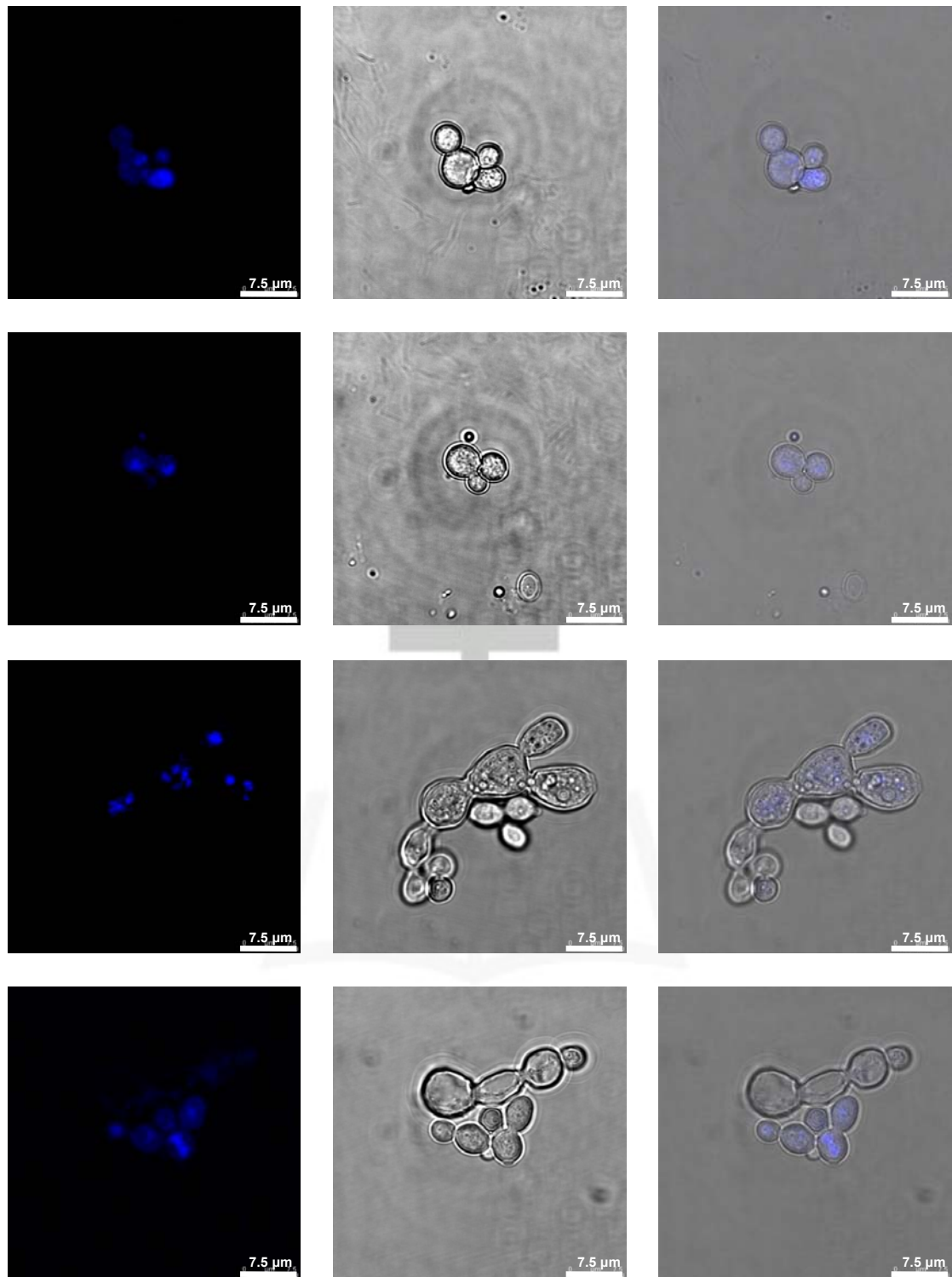


Figure 4-15 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB 培養基抑制圈內的細胞形態

YEPD/PB 抑制圈內大部分的細胞呈現 yeast form，在極少的情況下會出現類似豆莢形狀的 Peapod，且大部分 Peapod 呈現空洞無核的情況



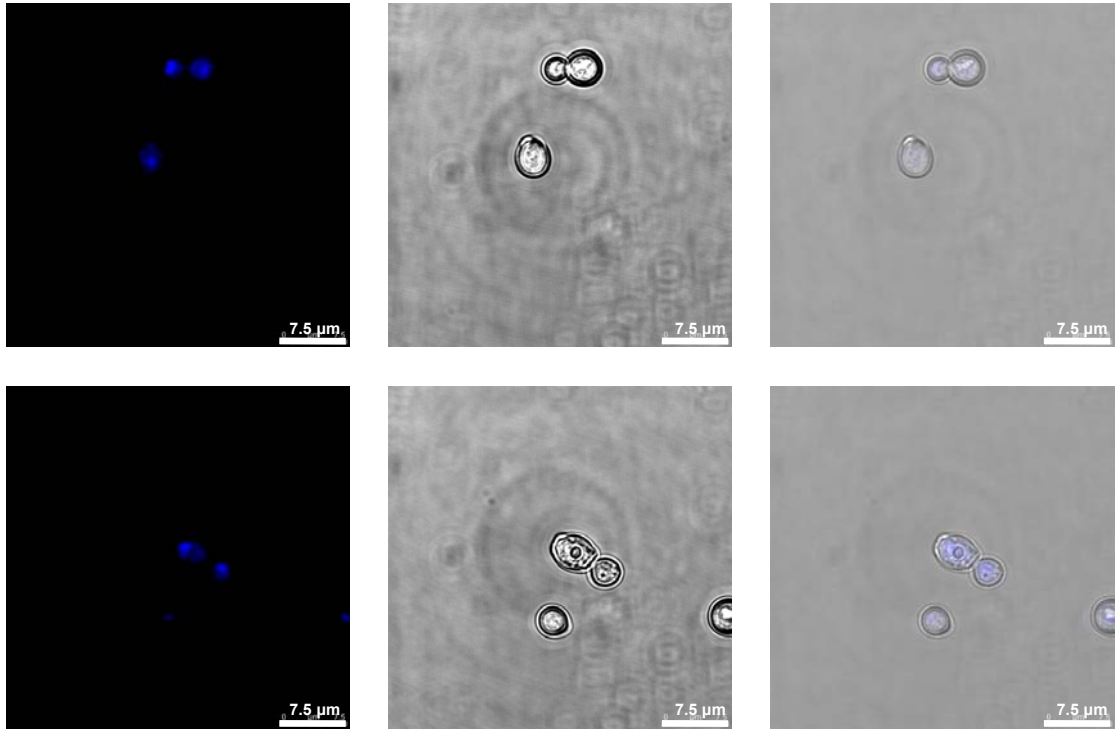


Figure 4-16 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下  
YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態  
Fluconazole 藥物壓力下，YEPD/PB 0.2% Ergosterol 培養基抑制圈外的  
細胞呈現一般的 yeast form、橢圓球狀形態

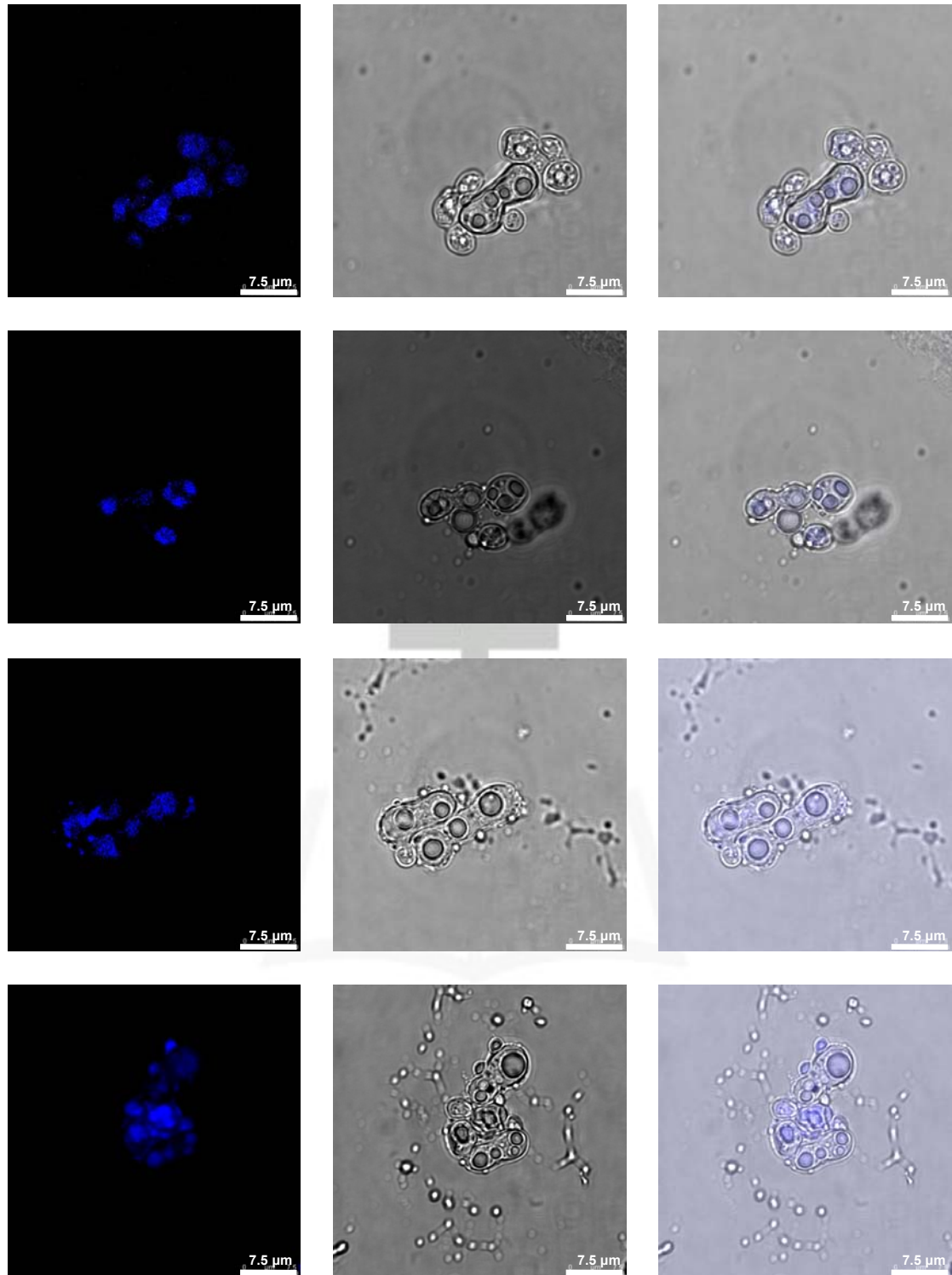


Figure 4-17 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態  
 Fluconazole 藥物壓力下，YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈內大部分的細胞呈現類似豆莢且多核的 Peapod，且帶有為數不等的顆粒結構

## 4-2.4 觀察Fluconazole壓力下不同濃度Ergosterol對白色念珠菌

### 抑制圈內與抑制圈外之影響

含有0.2% Ergosterol的培養基中可以找到許多Peapod，且呈現多核的現象，因此為了找出最有利於Peapod生長的條件，在Fluconazole藥物刺激下，觀察不同濃度的Ergosterol對Peapod形成的影響。

#### 4-2.4.1 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之菌落形態

於含有不同濃度Ergosterol (0%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%) 的 YEPD/PB培養基中進行Fluconazole的抗生素感受性試驗，以光學顯微鏡於18小時之內 (第1天)、第2天與第7天觀察菌落形態，結果發現無論Ergosterol的濃度高低，在18小時之內 (第1天) 便可以在抑制圈內明顯的發現Peapod的蹤跡，其生長速度較抑制圈外yeast form的*C. albicans*來得緩慢許多，且菌落形態較不規則，反觀抑制圈外的菌落形態則為規則的圓形。(Figure 4-18、4-19、4-20、4-21、4-22)

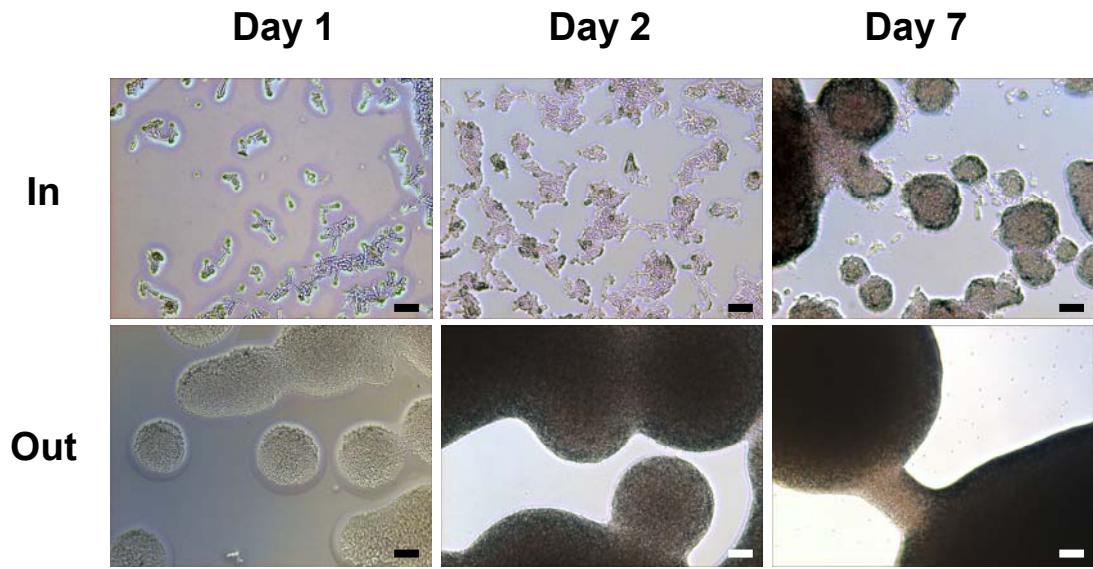


Figure 4-18 以光學顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB 培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態

In 表示為抑制圈內；Out 表示為抑制圈外。橫標代表之長度為 50  $\mu\text{m}$

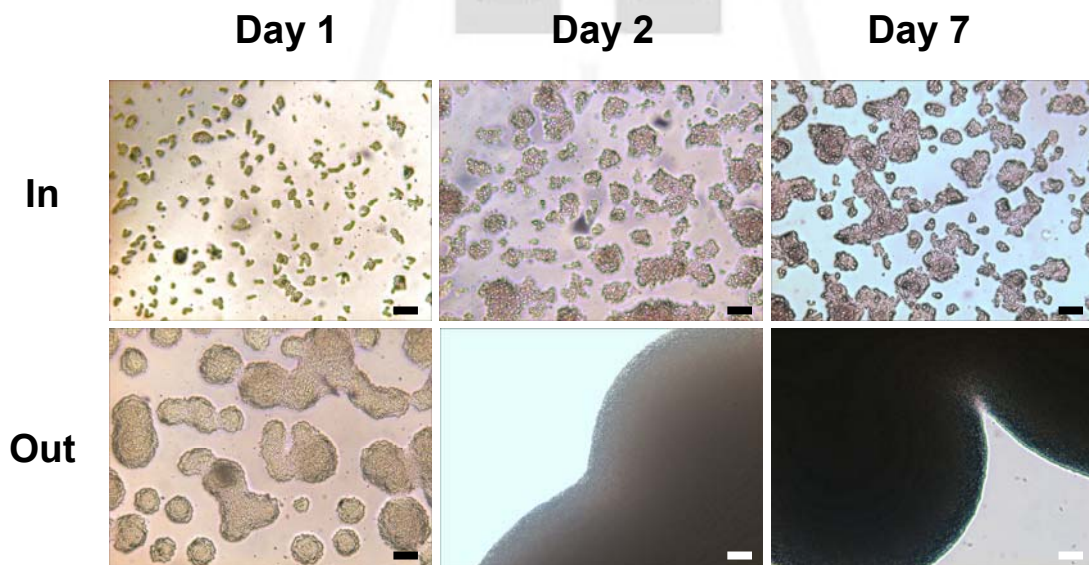


Figure 4-19 以光學顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.05% Ergosterol 培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態

In 表示為抑制圈內；Out 表示為抑制圈外。橫標代表之長度為 50  $\mu\text{m}$

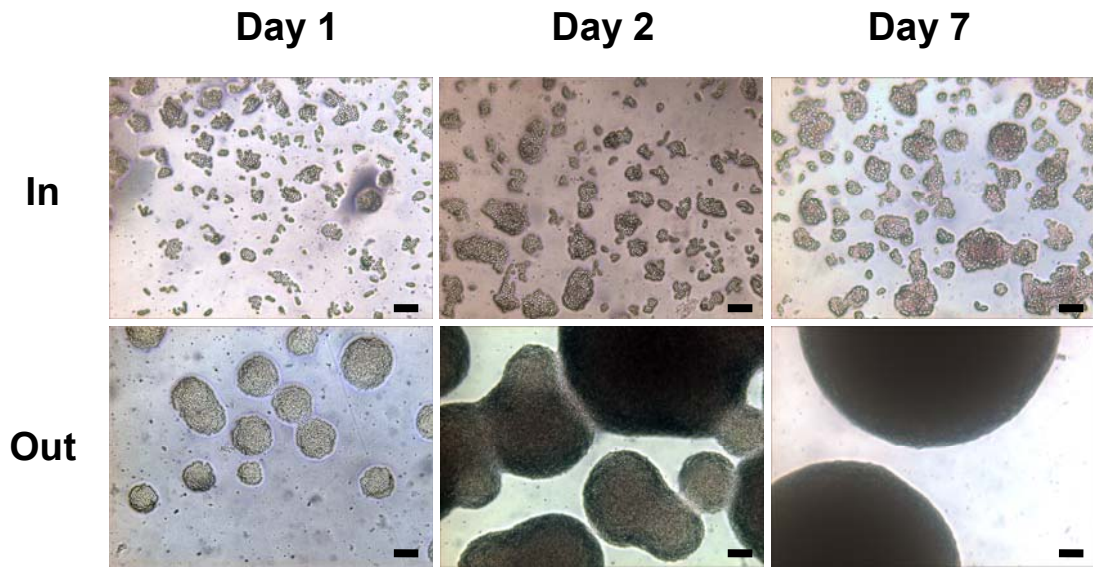


Figure 4-20 以光學顯微鏡觀察Fluconazole藥物壓力下YEPD/PB/0.1%  
Ergosterol培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態

In 表示為抑制圈內；Out 表示為抑制圈外。橫標代表之長度為 50  $\mu\text{m}$

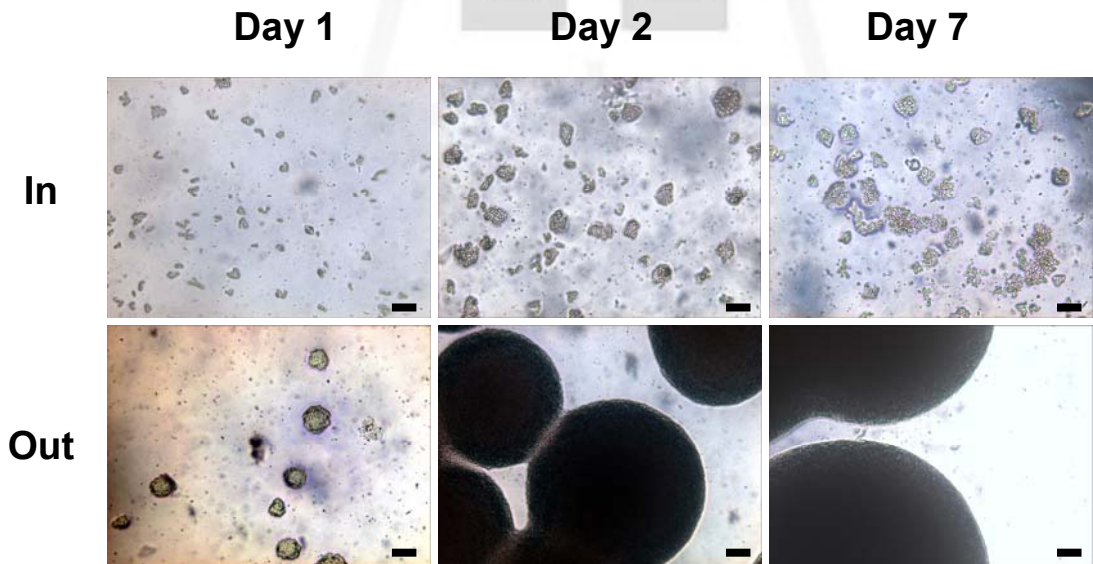


Figure 4-21 以光學顯微鏡觀察Fluconazole藥物壓力下YEPD/PB/0.15%  
Ergosterol培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態

In 表示為抑制圈內；Out 表示為抑制圈外。橫標代表之長度為 50  $\mu\text{m}$

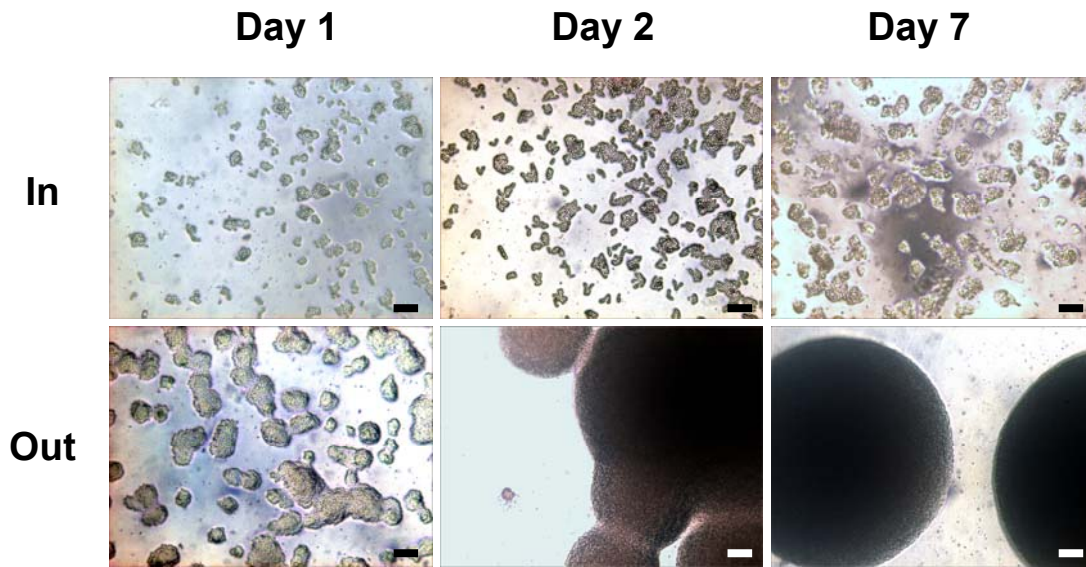


Figure 4-22 以光學顯微鏡觀察Fluconazole藥物壓力下YEPD/PB/0.2% Ergosterol培養基抑制圈內與抑制圈外的菌落形態

In 表示為抑制圈內；Out 表示為抑制圈外。橫標代表之長度為 50  $\mu\text{m}$

Fluconazole 藥物壓力下，於 18 小時內 (第 1 天)、第 2 天與第 7 天觀察菌落型態，結果發現無論培養基中 Ergosterol 濃度的高低，在 18 小時之內 (第 1 天) 便可以在抑制圈內明顯的發現 Peapod 的蹤跡，其生長速度較抑制圈外 yeast form 的 *C. albicans* 來得緩慢許多，且菌落型態較不規則，反觀抑制圈外的菌落型態則為規則的圓形

#### 4-2.4.2 光學顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態

於含有不同濃度Ergosterol (0%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%) 的 YEPD/PB培養基中進行Fluconazole的抗生素感受性試驗，以光學顯微鏡觀察細胞形態，結果發現無論Ergosterol的濃度高低，在18小時之內 (第1天) 便可以在抑制圈內明顯的發現Peapod的蹤跡，而抑制圈內的細胞仍是一般普遍常見的酵母菌型。(Figure 4-23)



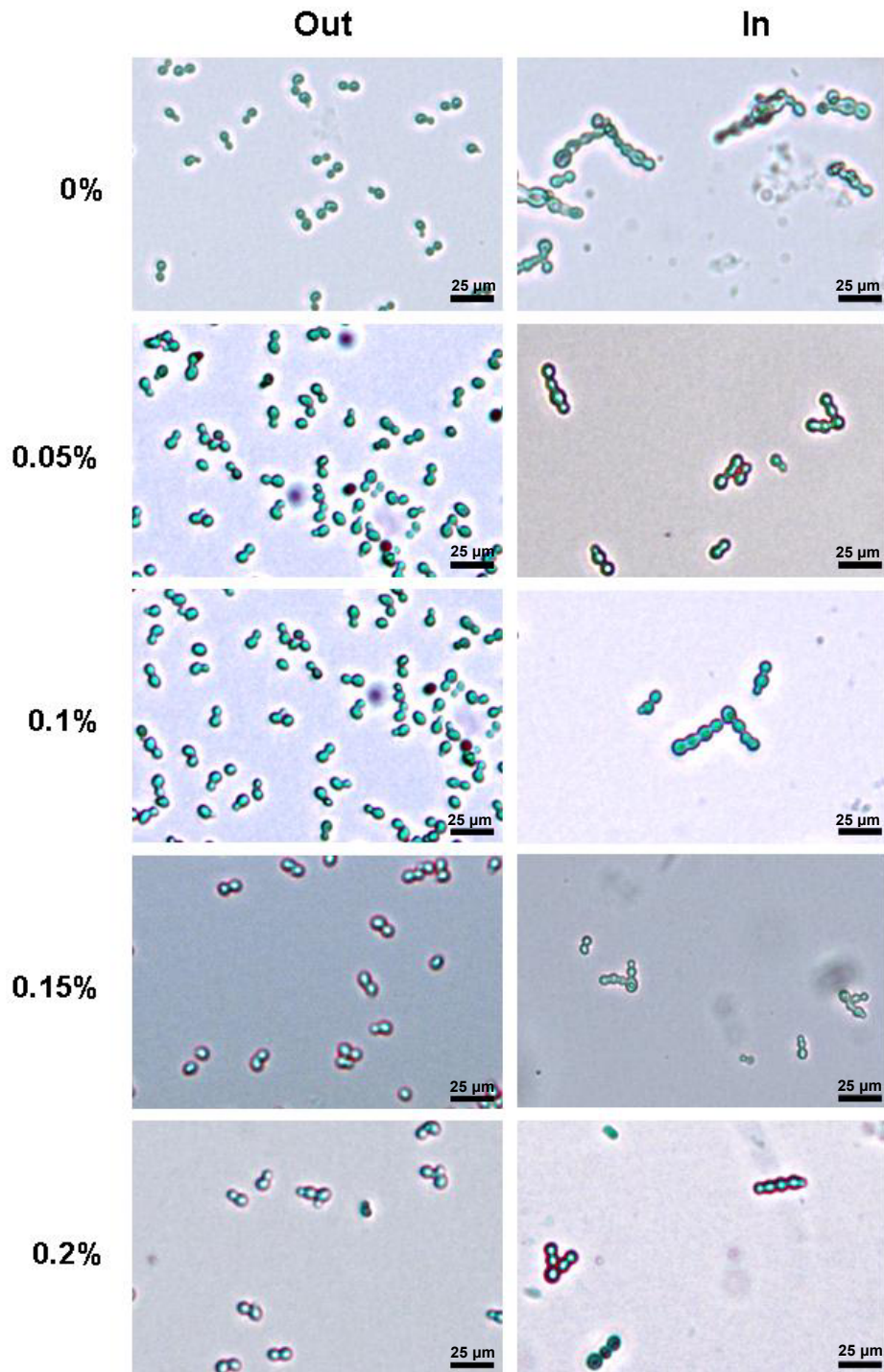


Figure 4-23 Fluconazole 藥物壓力下於18小時內 (第1天) 以光學顯微鏡觀察含不同濃度Ergosterol的YEPD/PB培養基抑制圈內、外之細胞形態

Fluconazole 藥物壓力下，無論 Ergosterol 濃度高低，於 18 小時內 (第 1 天) 便可於抑制圈內發現 Peapod 存在，抑制圈外均為橢圓球狀的酵母菌型



#### 4-2.4.3 共軛焦顯微鏡觀察抑制圈內與抑制圈外之細胞形態

由菌落和細胞的形態觀察無法得知其是否具有存活力，因此，在 Fluconazole 壓力下，於 18 小時內（第 1 天）及第 7、14、21、28 天以共軛焦顯微鏡觀察 YEPD/PB 和含不同濃度 Ergosterol 的 YEPD/PB 培養基中抑制圈內、外的細胞形態，利用 50 ng/ml DAPI 作細胞核定位，觀察細胞核的變化。

在 YEPD/PB 培養基中，抑制圈外的細胞無論生長天數，均呈現一般的 yeast form、橢圓球狀的細胞形態。(Figure 4-24)

在 YEPD/PB 培養基中，在 18 小時內（第 1 天）於抑制圈內可以發現具有多核的 Peapod 存在，而在第 7、14、21、28 天大多數的細胞為只含有一個細胞核的 yeast form，但也可以發現很多空洞無核的 Peapod 存在。(Figure 4-25)

在含有不同濃度 Ergosterol 的 YEPD/PB 培養基中，不論 Ergosterol 的濃度和生長天數，抑制圈外的細胞呈現一般的 yeast form。然而，不論 Ergosterol 的濃度高低，18 小時內（第 1 天）和第 7、14、21、28 天在抑制圈內均可以找到大量的 Peapod，且呈現多核的情況，但在形態上並沒有發現更進一步的發展變化。(Figure 4-26、4-27、4-28、4-29、4-30、4-31、4-32、4-33)

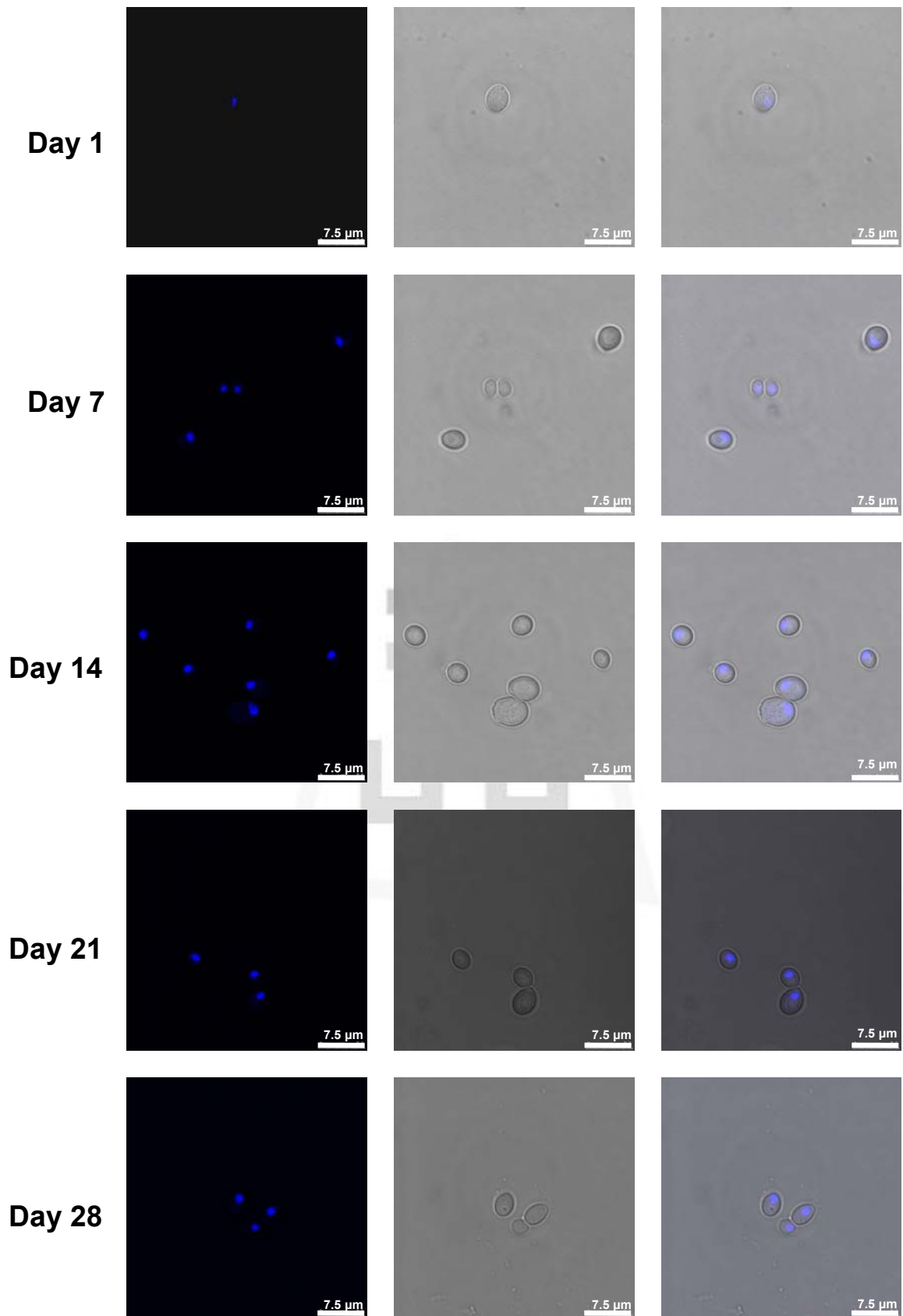


Figure 4-24 以共軛焦顯微鏡觀察Fluconazole藥物壓力下YEPD/PB培養基抑制圈外的細胞形態

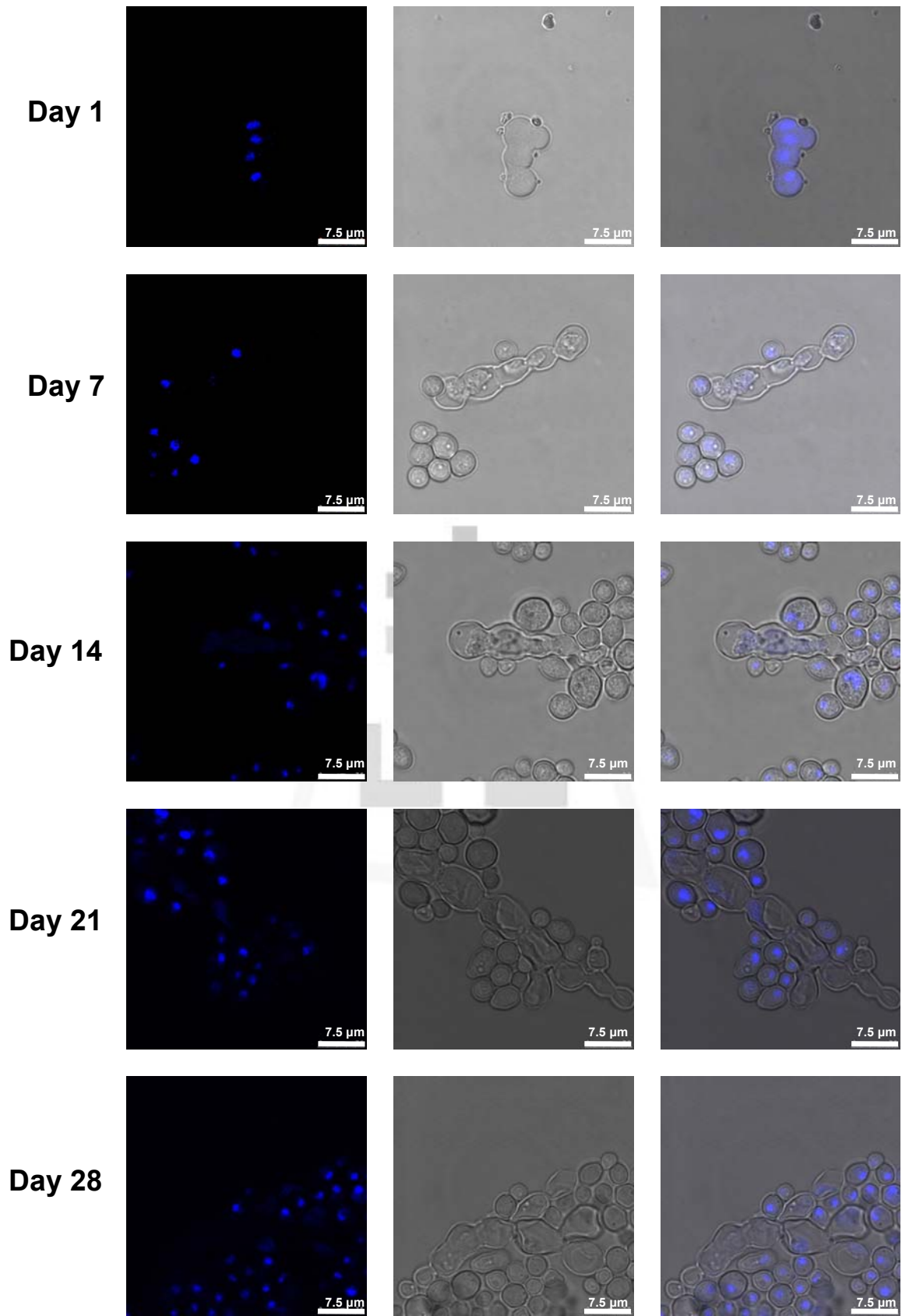


Figure 4-25 以共軛焦顯微鏡觀察Fluconazole藥物壓力下YEPD/PB培養基抑制圈內的細胞形態

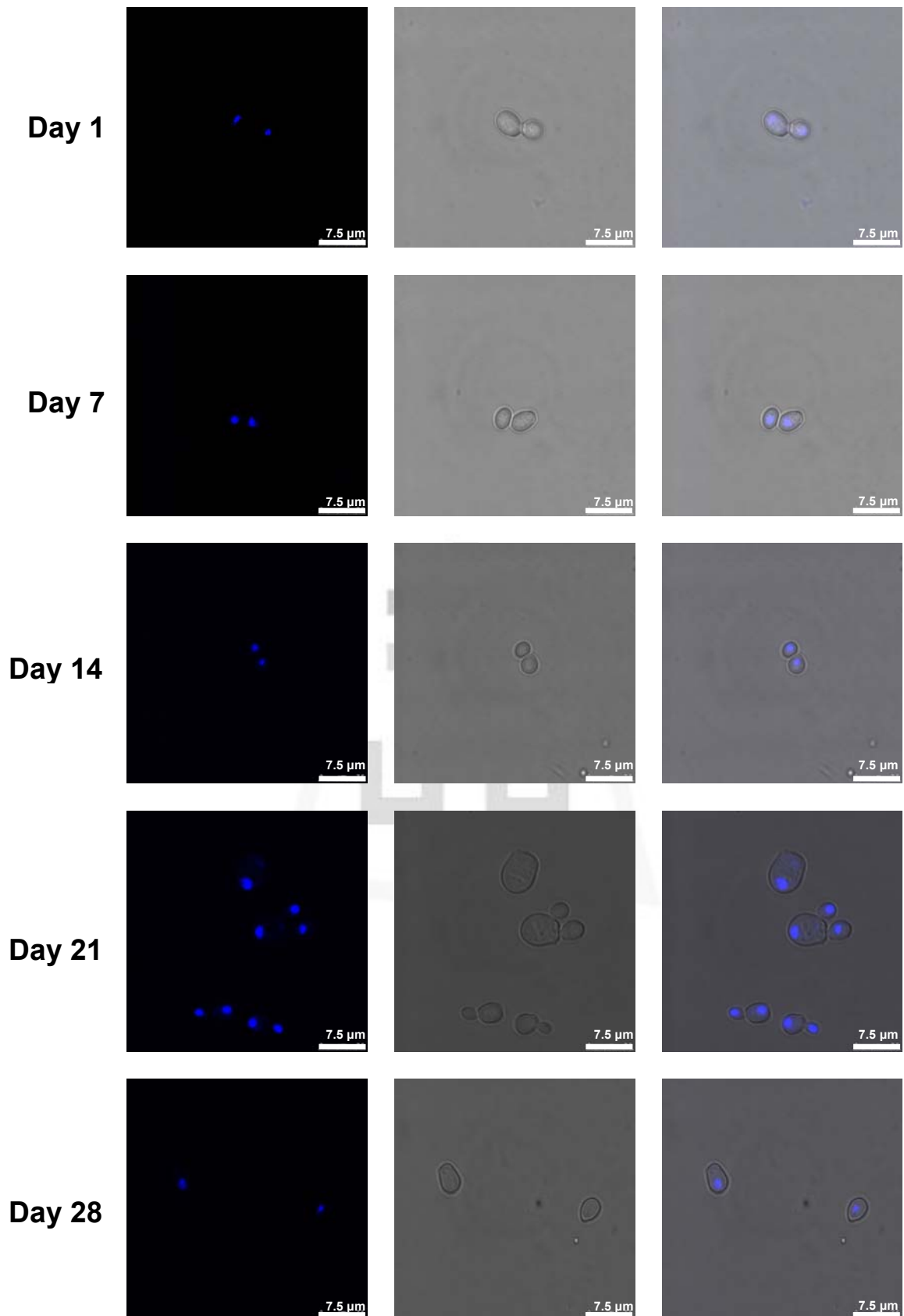


Figure 4-26 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.05% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態

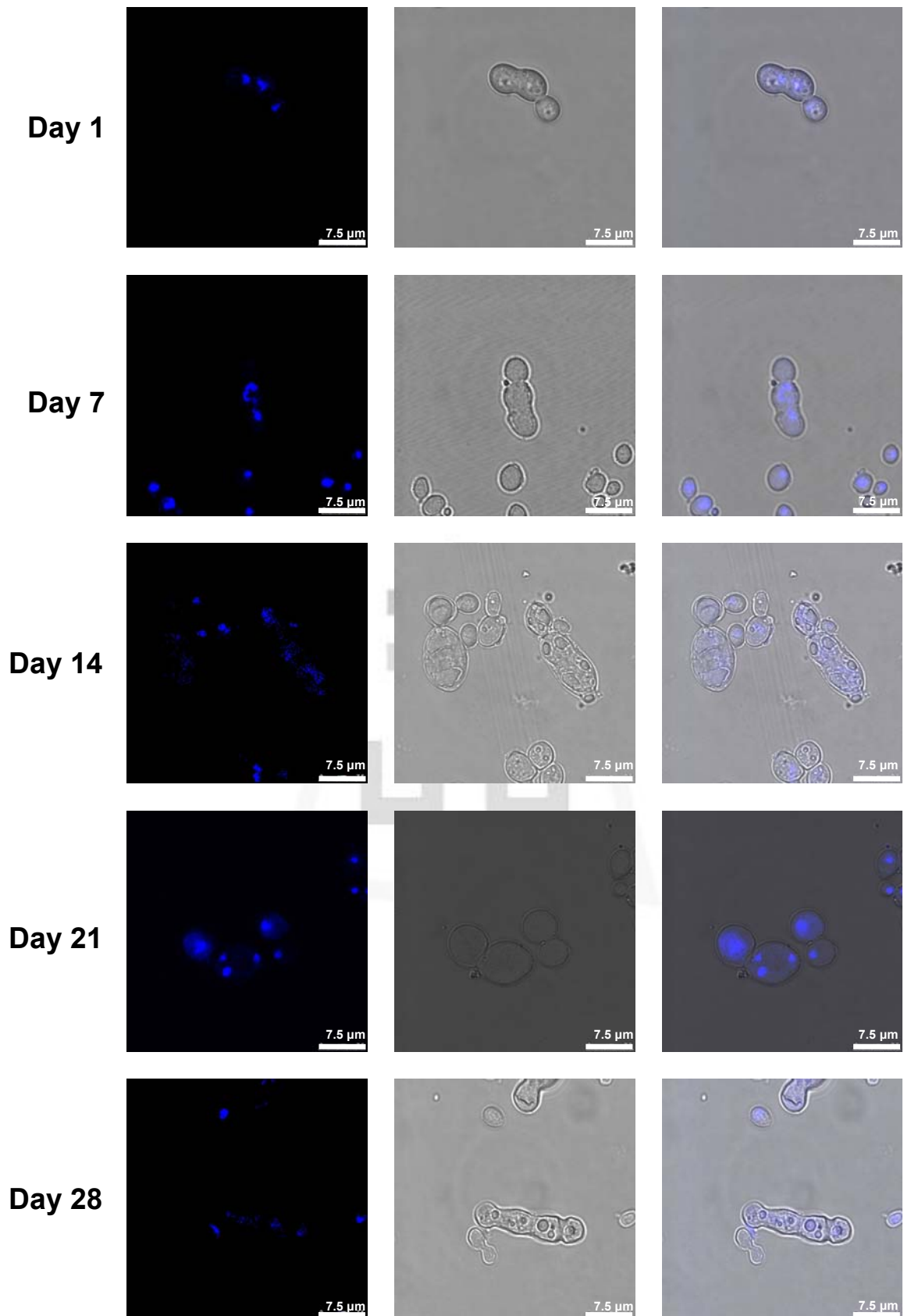


Figure 4-27 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.05% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態

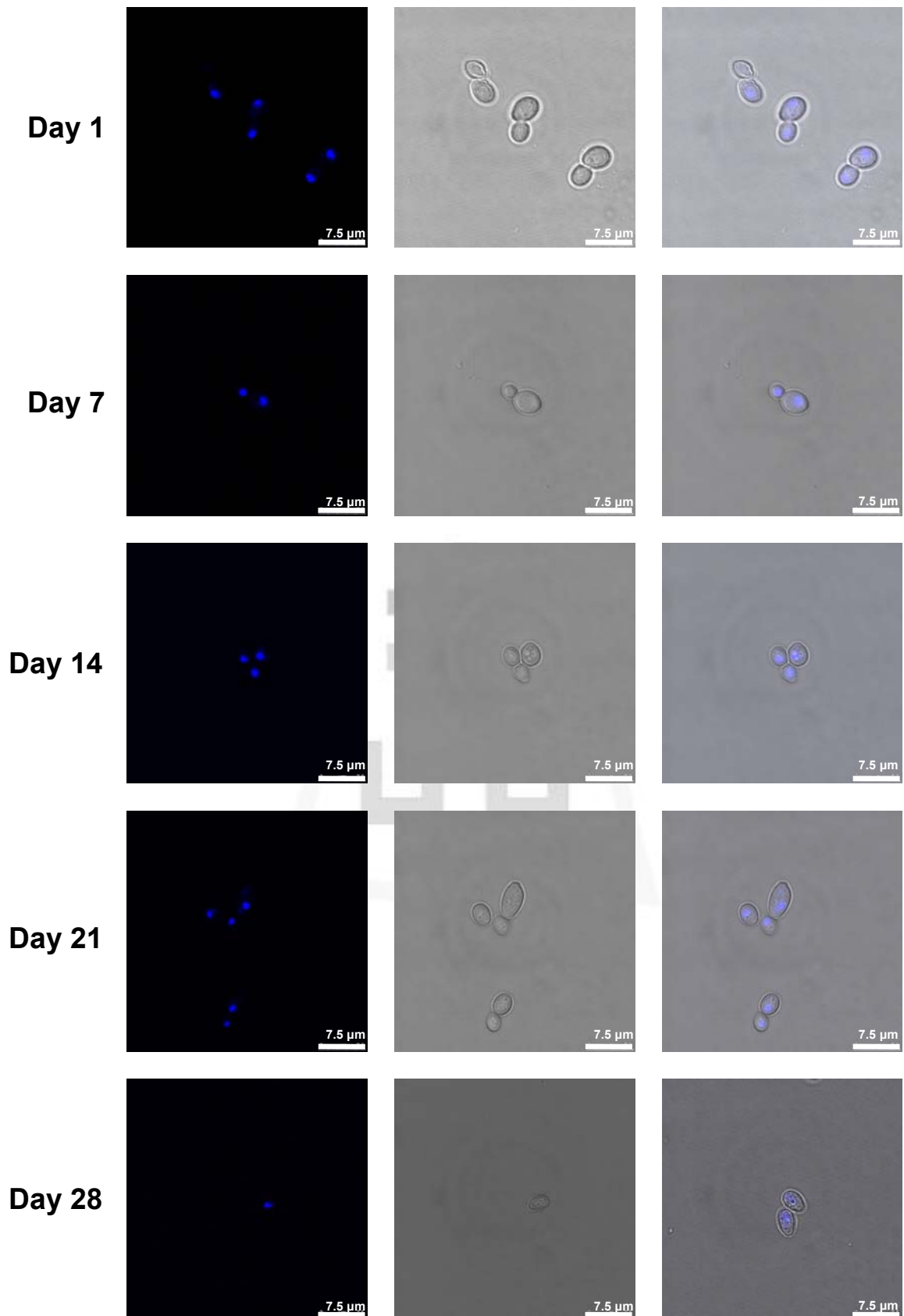


Figure 4-28 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.1% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態

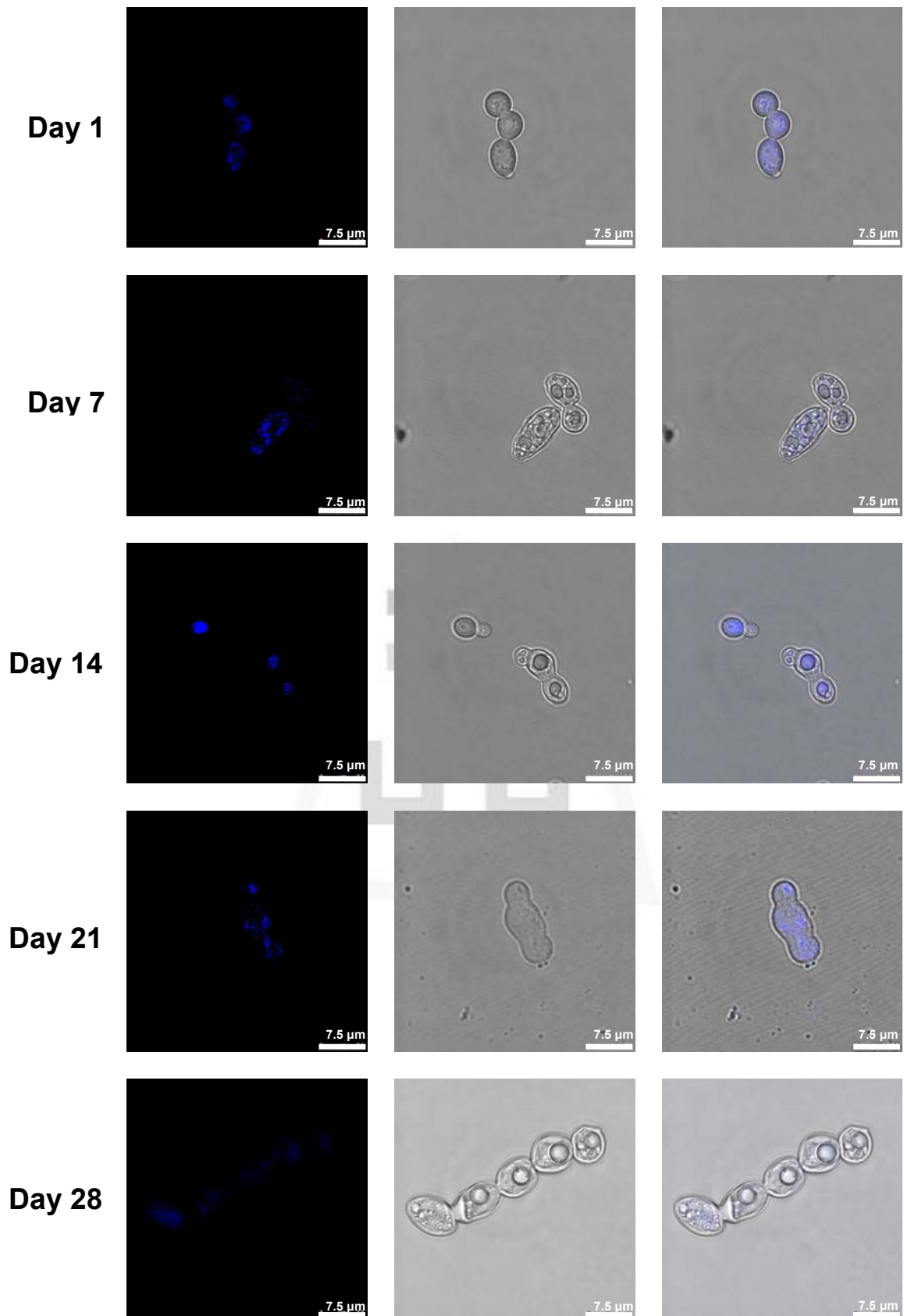


Figure 4-29 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.1% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態

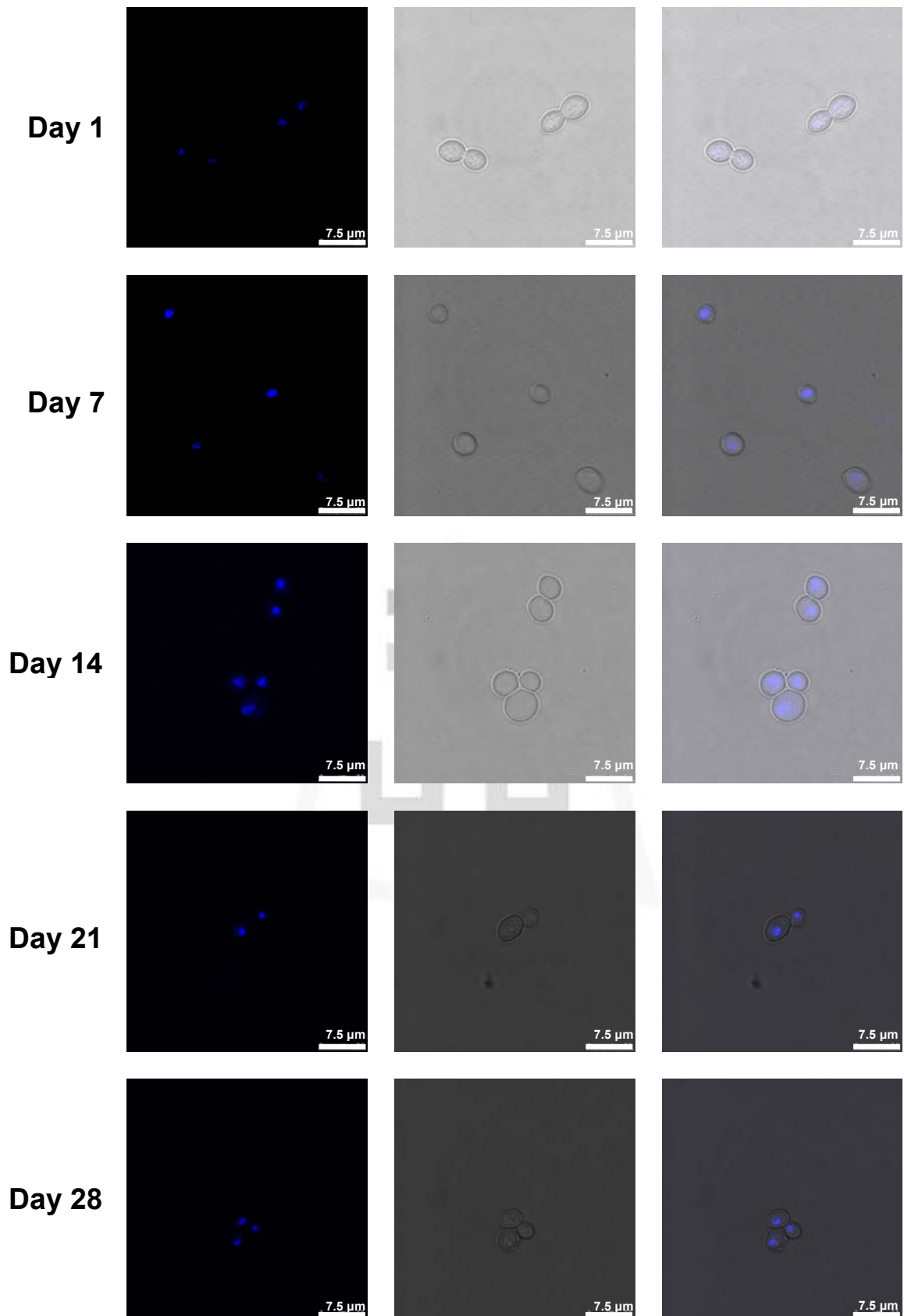


Figure 4-30 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.15% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態



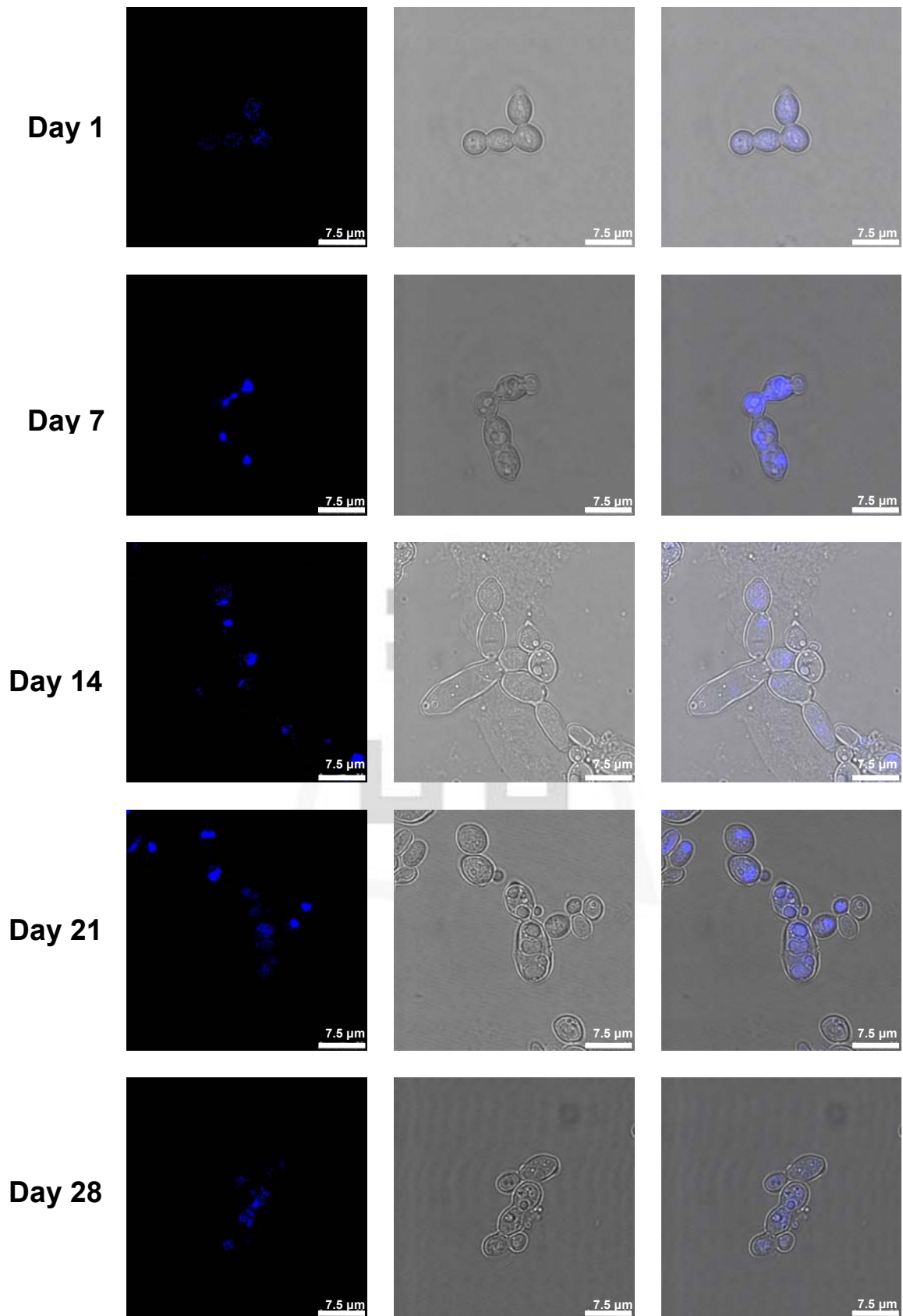


Figure 4-31 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.15% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態

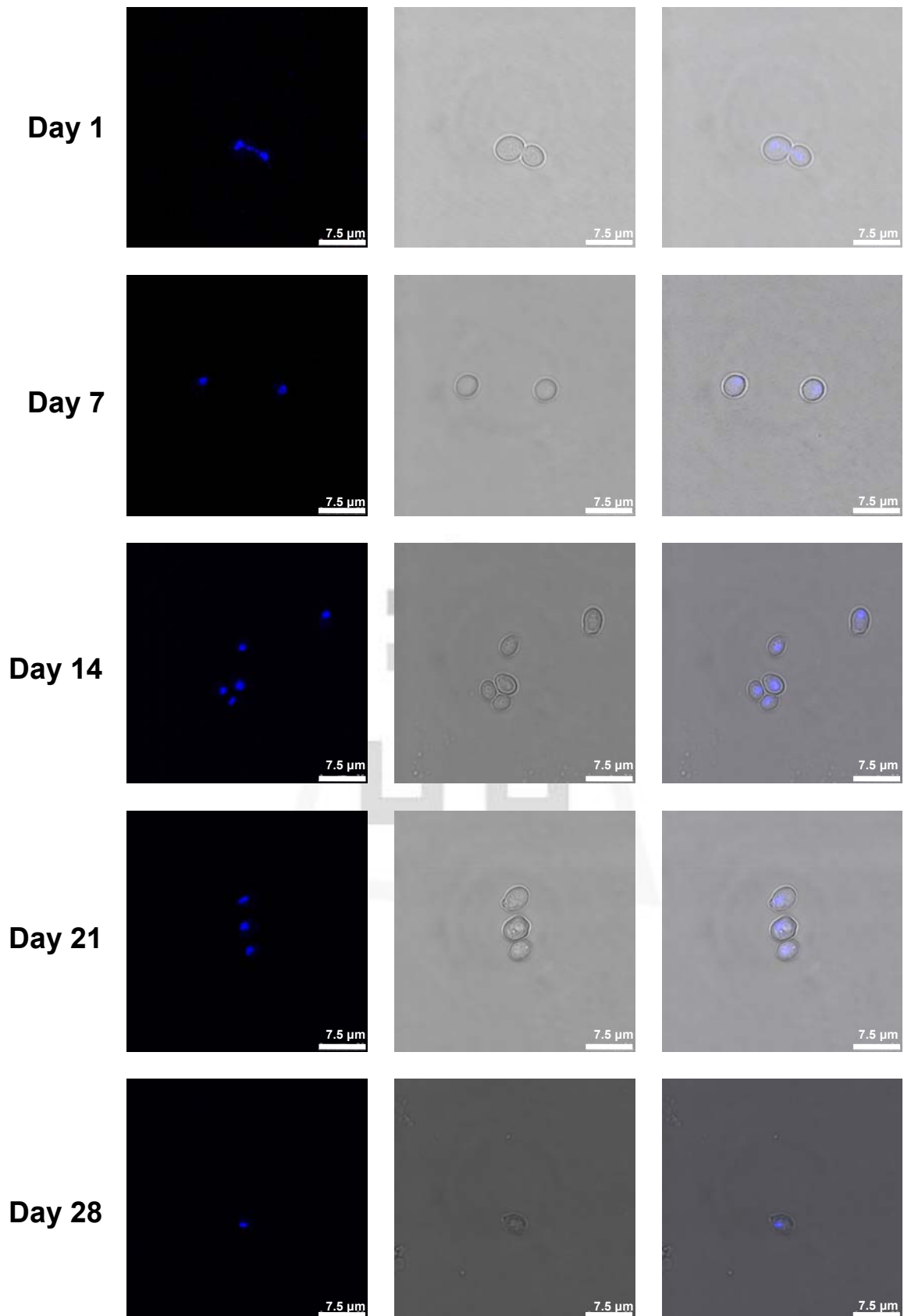


Figure 4-32 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈外的細胞形態

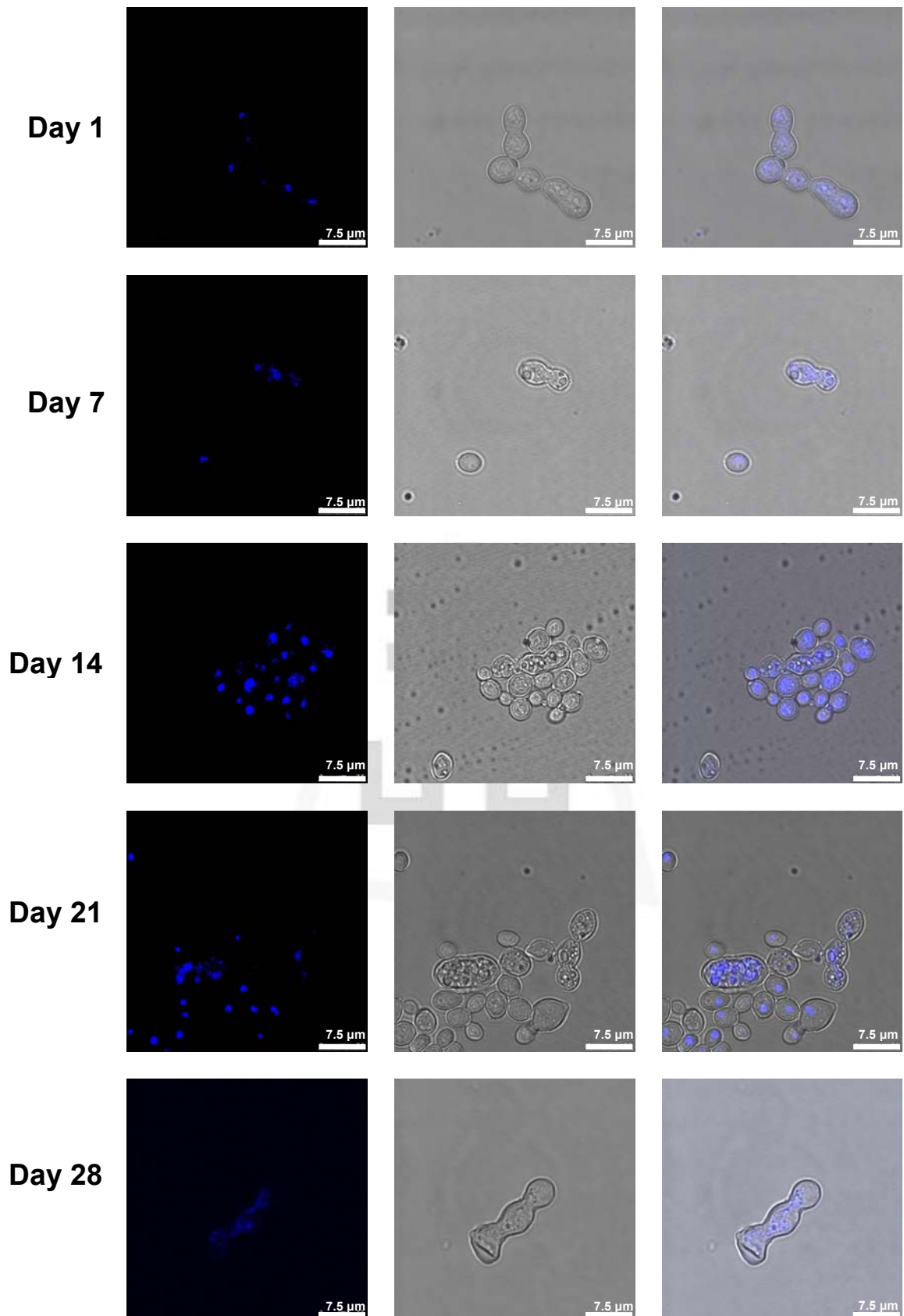


Figure 4-33 以共軛焦顯微鏡觀察 Fluconazole 藥物壓力下 YEPD/PB/0.2% Ergosterol 培養基抑制圈內的細胞形態

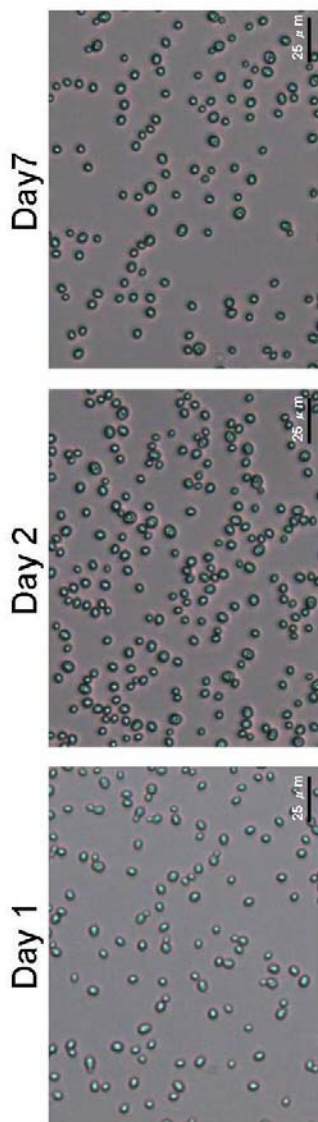
#### 4-2.5 鮫鯊烯 (Squalene) 對白色念珠菌之影響

雖然在鄭瑋寧的 PCR 結果證實白色念珠菌卻有性別分離的情況，而在廖家瑜的結果中也確有單倍體的產生，但由加有 Ergosterol 培養基中分離出 300 多個 Peapods 進行培養，Peapod 仍無法順利存活，因此 Ergosterol 並無法對 Peapod 給予救援。

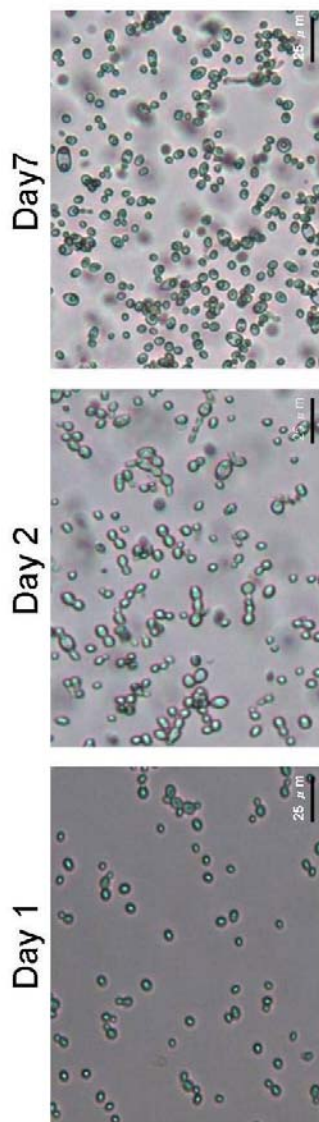
Fluconazole 能抑制麥角固醇 (Ergosterol) 的生合成，間接造成羊毛脂固醇 (Lanosterol) 和鮫鯊烯 (Squalene) 的累積。而 Squalene 是自然界存在的物質，因此在 *C. albicans* 於含有 0.1% Squalene (以等量 Tween 80 分散均勻) 的 PDA/PB 中培養，觀察是否能在擬自然的環境下誘使 Peapod 的形成。

##### 4-2.5.1 光學顯微鏡觀察白色念珠菌之細胞形態

以光學顯微鏡觀察於 PDA/PB/0.1% Squalene (以等量 Tween 80 分散均勻) 中生長之白色念珠菌的細胞形態，結果發現在不含有 Squalene，只含有 0.1% Tween80 的培養基中，細胞都呈現橢圓球狀的酵母菌型。而含有 0.1% Squalene 的培養基中，在 18 小時內 (第 1 天)，細胞仍呈現一般普遍常見的橢圓球狀，但至第 2 天時，細胞形態開始出現變化，有許多 Peapod 和長橢圓球狀帶有兩個小顆粒 (類似豬鼻子) 的細胞產生；第 7、14 天時類似豬鼻子的構造中的小顆粒變大，且距離也漸拉開，但仍可發現有許多 Peapod 存在；第 21 天時發現了膨大的 Peapod；而第 28 天則和其他觀察天中發現的細胞形態差不多。(Figure 4-34)



0.1% Tween 80



0.1% Squalene

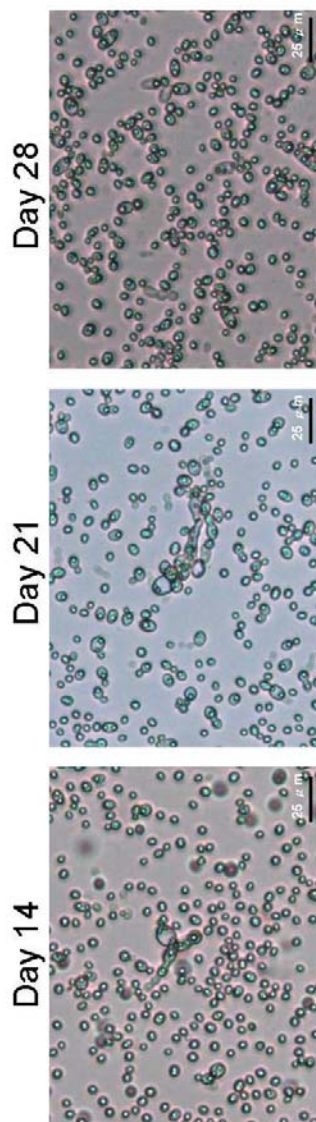


Figure 4-34 以光學顯微鏡觀察YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中的細胞型態

在 YEPD/PB/0.1% Tween 80 培養基中，第 1、2、7 天的細胞型態均為酵母菌型；YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中，第 1 天的細胞型態為酵母菌型，然而第 2 天開始細胞形態開始出現變化，有許多 Peapod 和長橢圓球狀帶有兩個小顆粒（類似豬鼻子）的細胞產生；第 7、14 天時類似豬鼻子的構造中的小顆粒變大，且距離也漸拉開，但仍可發現有許多 Peapod 存在；第 21 天時發現了膨大的 Peapod；而第 28 天則和其他觀察天中發現的細胞形態差不多

#### 4-2.5.2 共軛焦顯微鏡觀察白色念珠菌之細胞形態

在 18 小時內 (第 1 天) 及第 7、14、21、28 天以共軛焦顯微鏡觀察 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中細胞形態，利用 50 ng/ml DAPI 作細胞核定位，觀察細胞核的變化。

結果發現在不含有 Squalene，只含有 0.1% Tween80 的培養基中，細胞都呈現橢圓球狀的酵母菌型，且只含有一個細胞核。(Figure 4-35、4-36、4-37)

而含有 0.1% Squalene 的培養基中，在 18 小時內 (第 1 天)，細胞仍呈現一般普遍常見的橢圓球狀，但卻有雙核的存在，而在很少的機會下可以發現到 Peapod 的蹤跡；第 2 天，細胞形態開始出現變化，有許多 Peapod 和長橢圓球狀帶有兩個小顆粒 (類似豬鼻子) 的細胞產生，且呈現多核存在的現象；第 7、14 天，類似豬鼻子的構造中的小顆粒變大，且距離也漸拉開，除此之外，也有許多 Peapod 存在，且細胞均有膨大的現象，而細胞仍呈現多核的現象；第 21 天發現了膨大的 Peapod，有一端較大的 head cell 和一端較小的 tail cell，其中包裹著數個橢圓球狀的類子囊孢子細胞；第 28 天時發現有部份 Peapod 中的橢圓球狀細胞釋出，而釋出細胞的 Peapod 呈現空洞無核的狀態。(Figure 4-38、4-39、4-40、4-41、4-42、4-43)

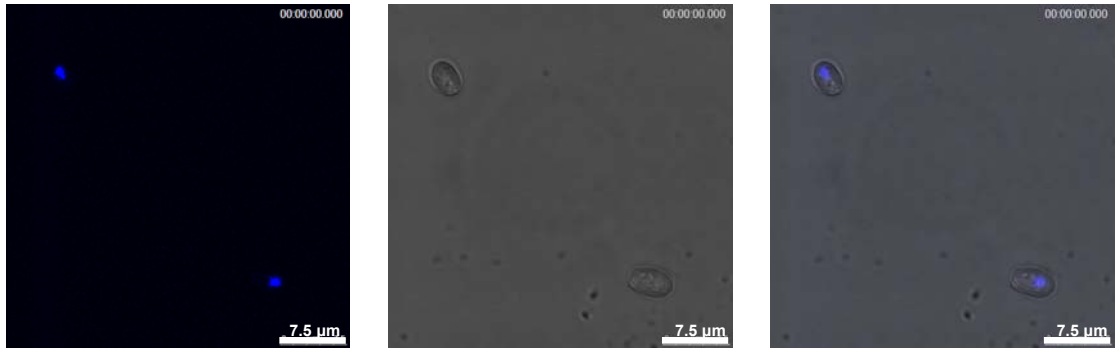


Figure 4-35 以共軛焦顯微鏡觀察18小時內（第1天）YEPD/PB/0.1% Tween80培養基中的細胞形態

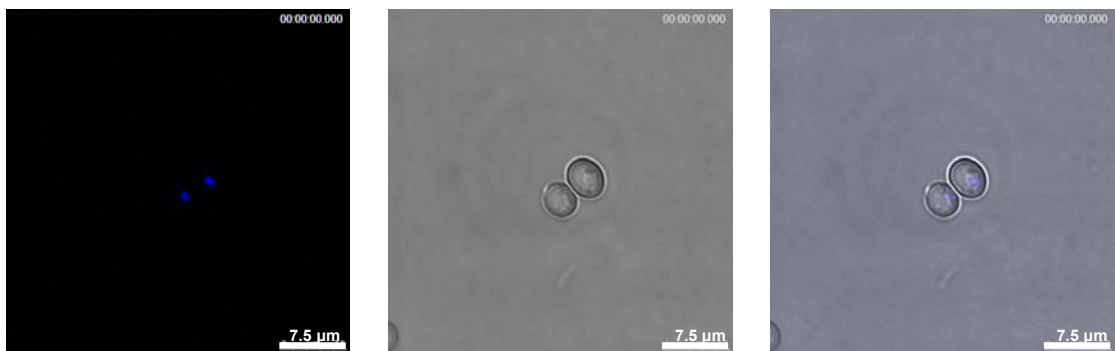


Figure 4-36 以共軛焦顯微鏡觀察第2天YEPD/PB/0.1% Tween80培養基中的細胞形態

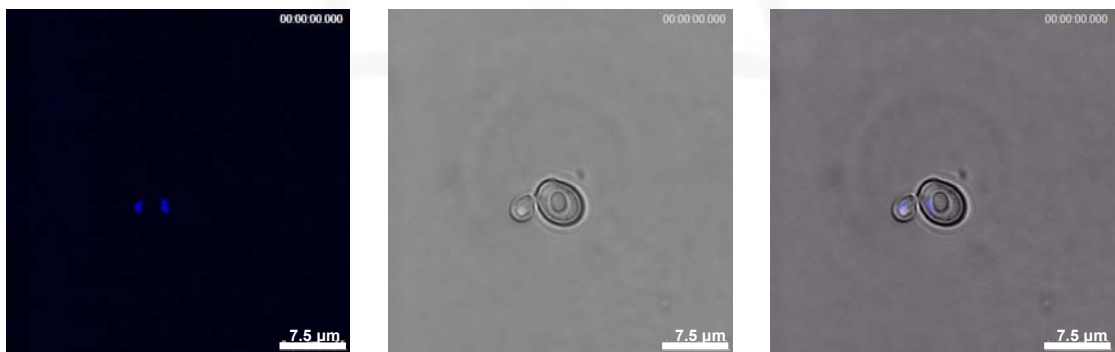


Figure 4-37 以共軛焦顯微鏡觀察第7天YEPD/PB/0.1% Tween80培養基中的細胞形態

在不含有Squalene，只含有0.1% Tween80的YEPD/PB培養基中，細胞都呈現橢圓球狀的酵母菌型，且只含有一個細胞核

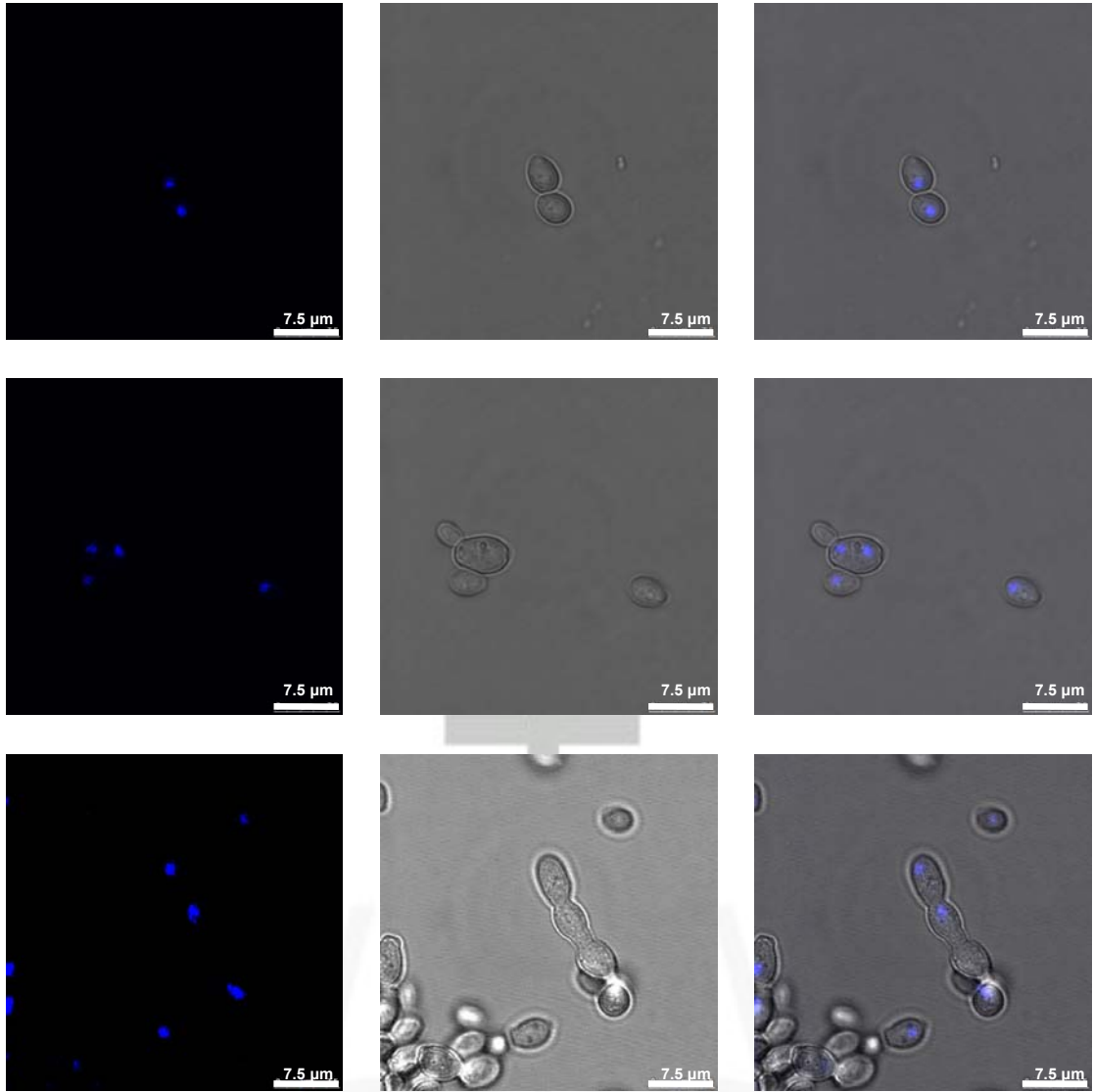


Figure 4-38 以共軛焦顯微鏡觀察18小時內（第1天）YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中的細胞形態

在含有0.1% Squalene的YEPD/PB培養基中，在18小時內（第1天），細胞仍呈現一般普遍常見的橢圓球狀，但卻有雙核的存在，而在很少的機會下可以發現到Peapod的蹤跡



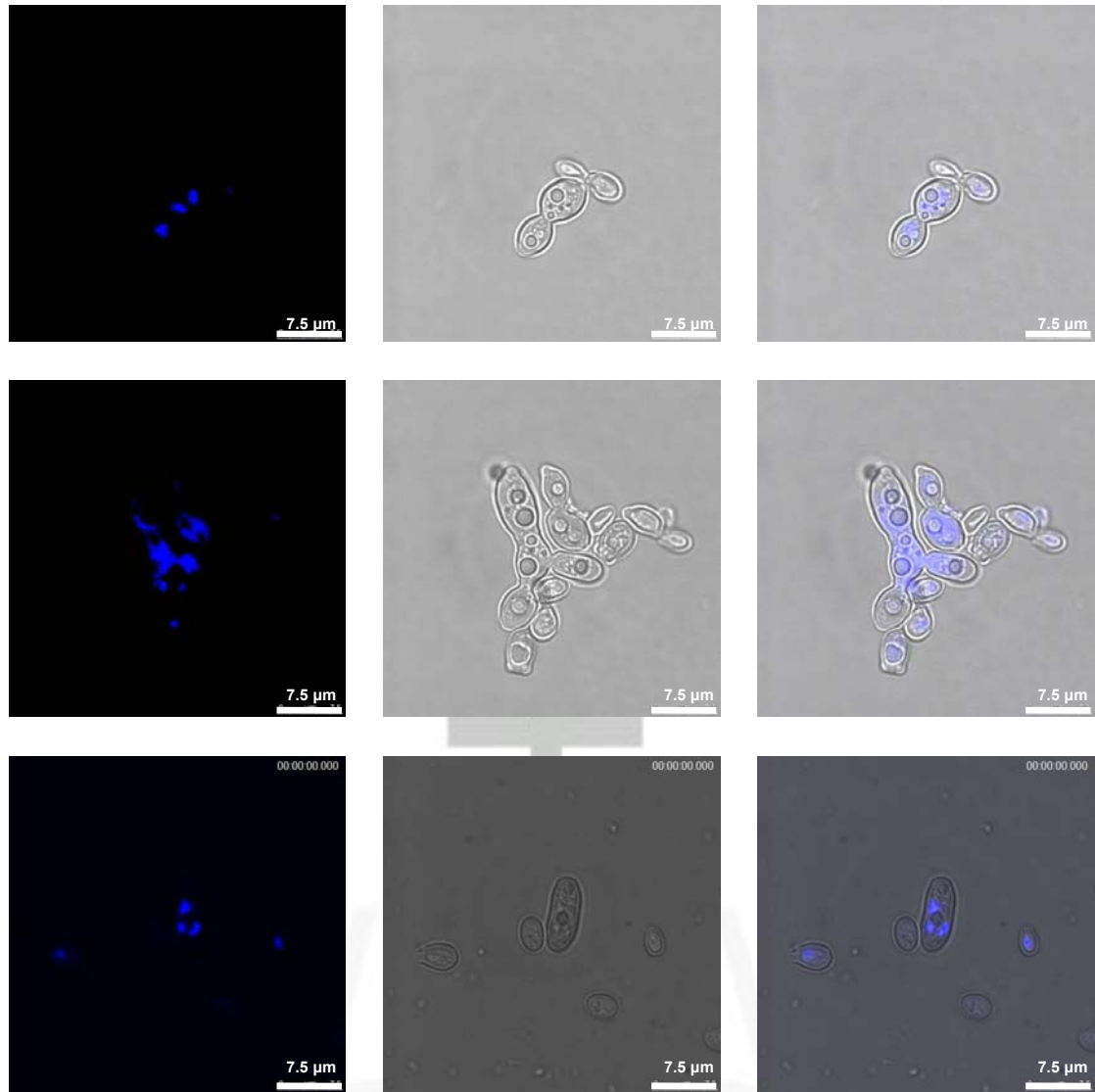


Figure 4-39 以共軛焦顯微鏡觀察第2天YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中的細胞形態

在YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中，於第2天細胞形態開始出現變化，有許多Peapod和長橢圓球狀帶有兩個小顆粒（類似豬鼻子）的細胞產生，且呈現多核存在的現象

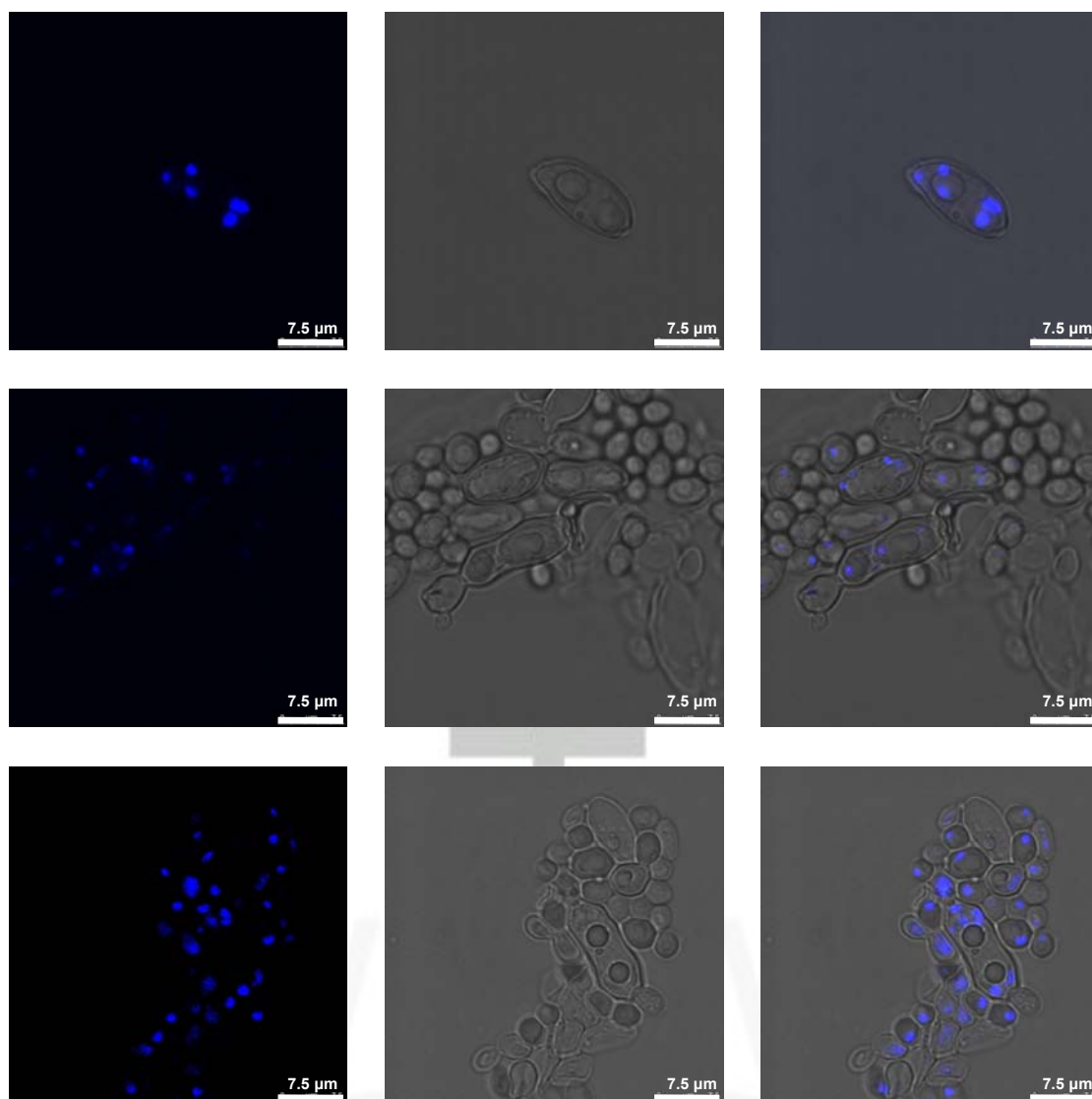


Figure 4-40 以共軛焦顯微鏡觀察第7天YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中的細胞形態

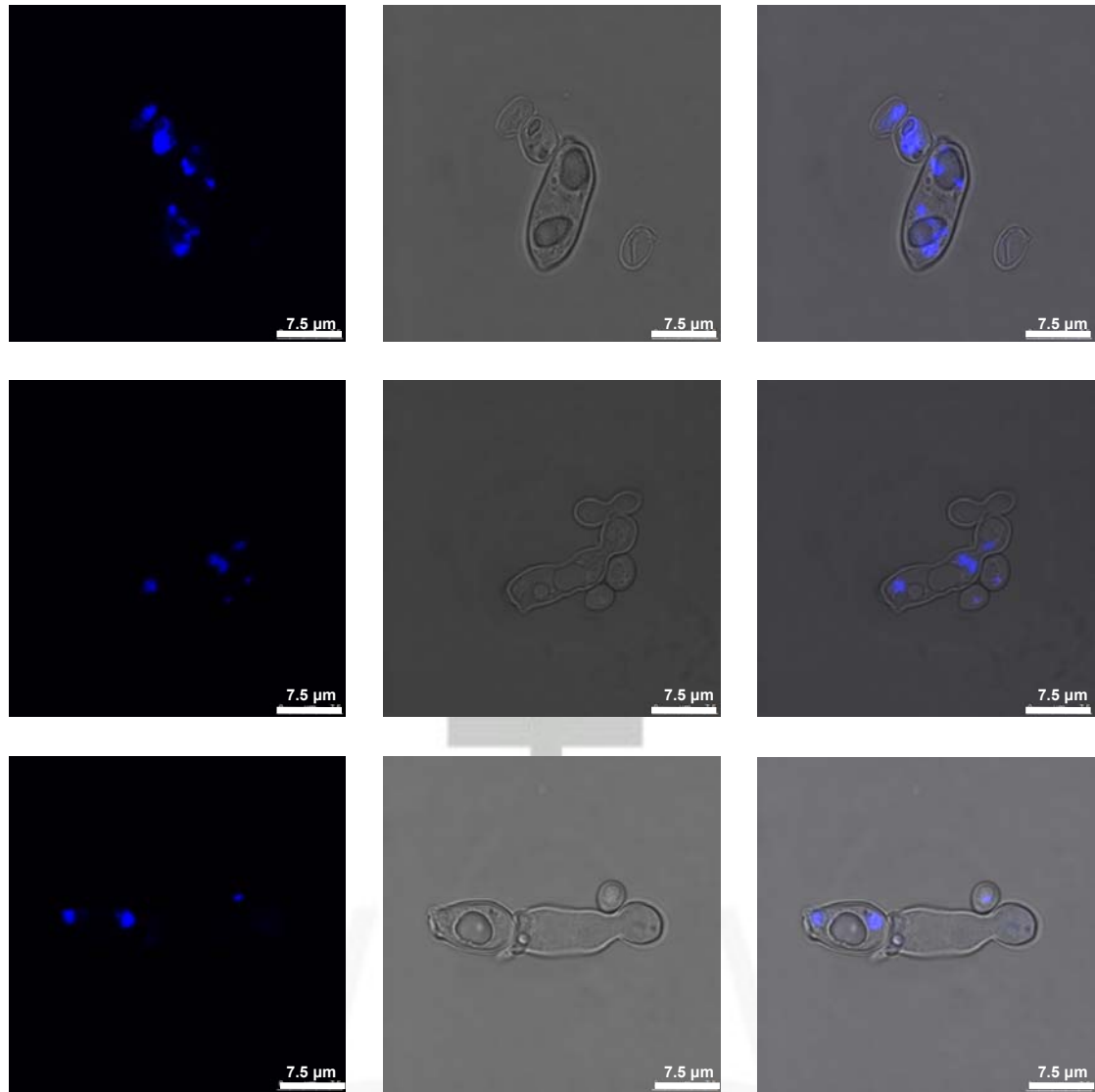


Figure 4-41 以共軛焦顯微鏡觀察第14天YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中的細胞形態

在YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中，到了第7、14天，類似豬鼻子的構造中的小顆粒變大，且距離也漸拉開，除此之外，也有許多Peapod存在，且細胞均有膨大的現象，而細胞仍呈現多核的現象

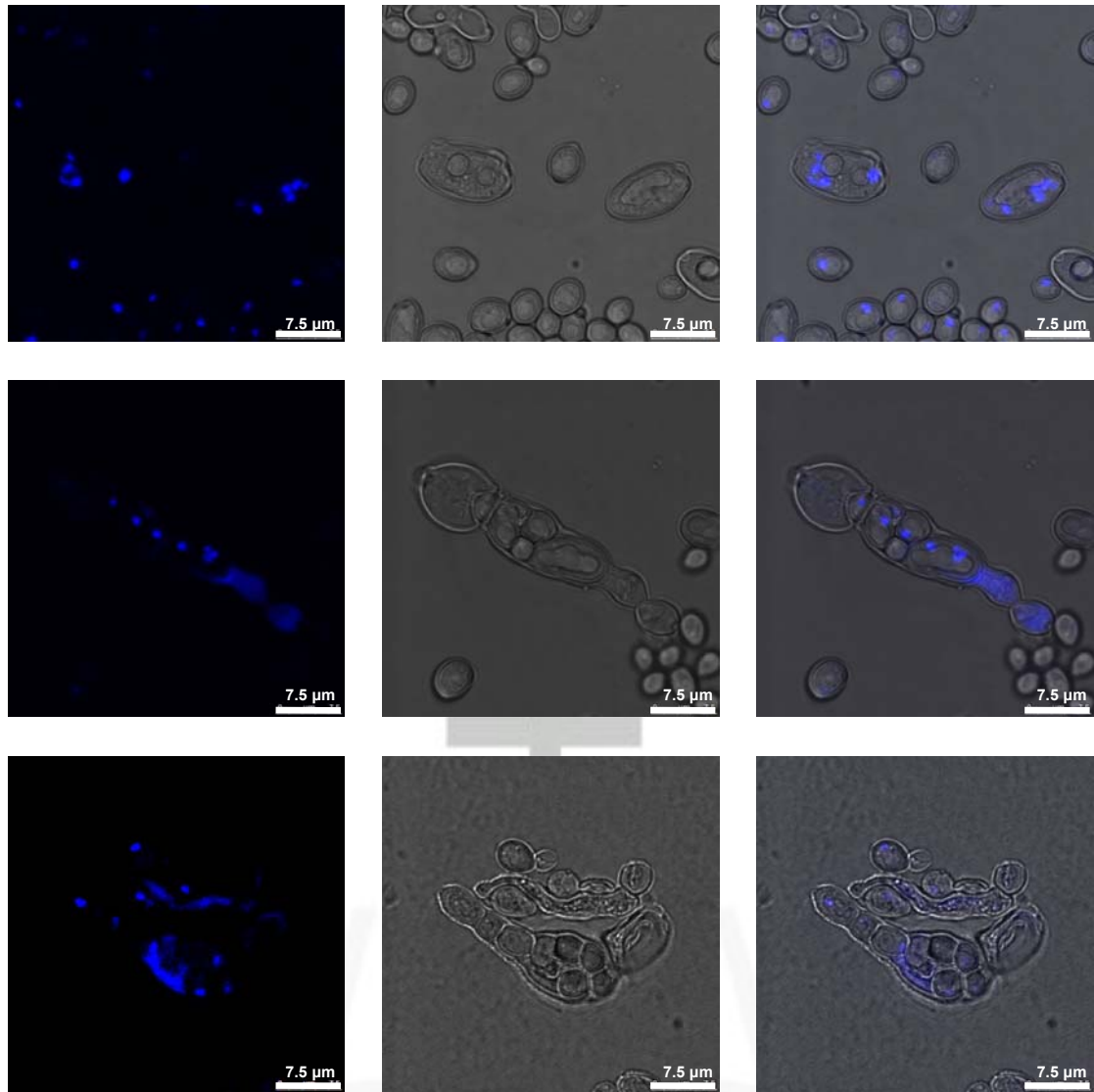


Figure 4-42 以共軛焦顯微鏡觀察第21天YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中的細胞形態

在YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中，第21天發現了膨大的Peapod，有一端較大的head cell和一端較小的tail cell，其中包裹著數個橢圓球狀的類子囊孢子細胞

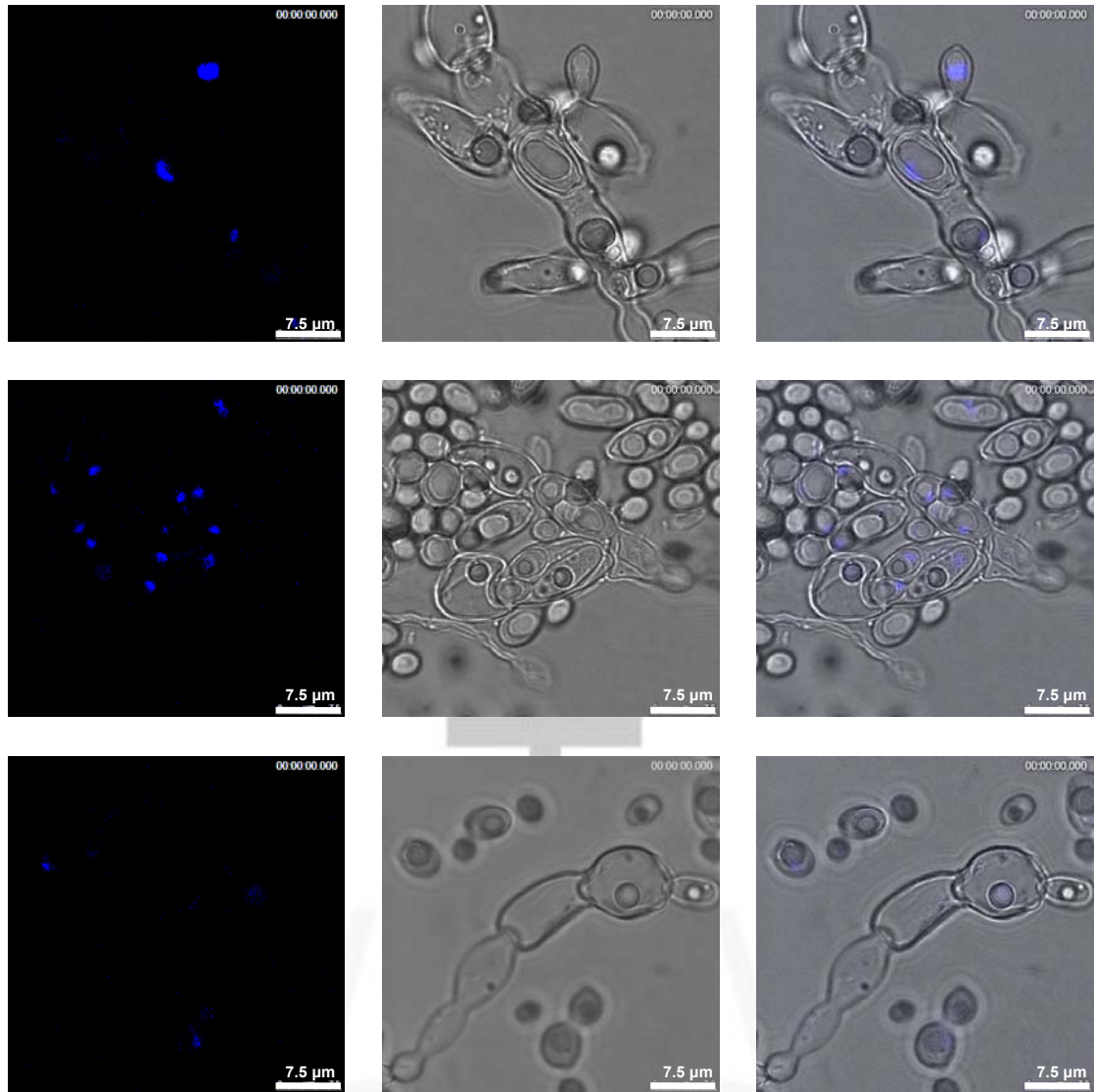


Figure 4-43 以共軛焦顯微鏡觀察第28天YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中的細胞形態

在YEPD/PB/0.1% Squalene培養基中，第28天時發現有部份Peapod中的橢圓球狀細胞釋出，而釋出細胞的Peapod呈現空洞無核的狀態

#### 4-2.5.3 掃描式電子顯微鏡觀察白色念珠菌之細胞形態

以掃描式電子顯微鏡觀察 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中 *C. albicans* 外表形態的變化。

在不含有 Squalene 的組別，細胞呈現橢圓球狀；而含有 Squalene 的組別，可以發現細胞有一連串的變化。剛開始細胞為一般常見的橢圓球狀結構，之後開始出現拉長、膨大的長橢圓球狀細胞，甚至是豆莢狀結構，接著可看到膨大拉長的細胞及成熟的類子囊結構，也可發現塌陷、扁平的破裂類子囊，其中還帶有 1~2 顆類子囊孢子，也可在其附近發現一群被絲狀物牽引在一起的細胞，這些細胞可能是由類子囊釋出的類子囊孢子，其被類似多醣的結構牽連在一起。(Figure 4-44、4-45、4-46、4-47、4-48、4-49、4-50)

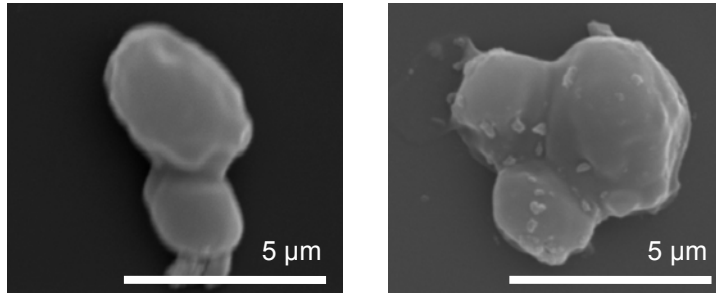


Figure 4-44 YEPD/PB/0.1% Tween 80 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察酵母菌型之細胞形態

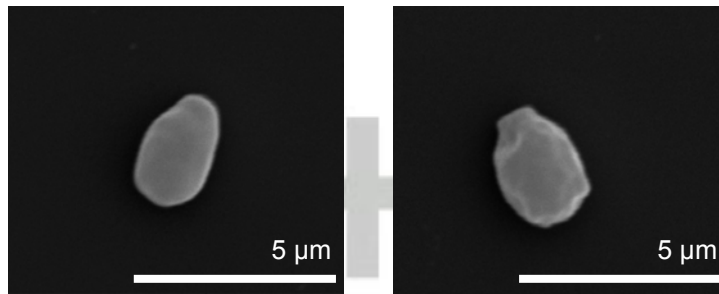


Figure 4-45 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察酵母菌型之細胞形態

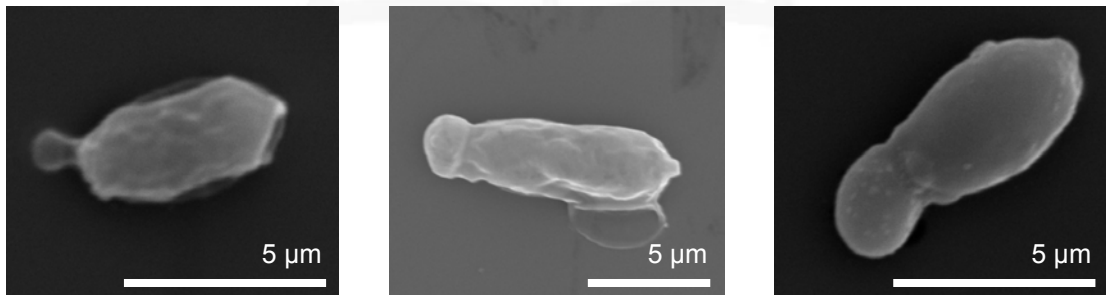


Figure 4-46 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察長橢圓球狀之細胞形態

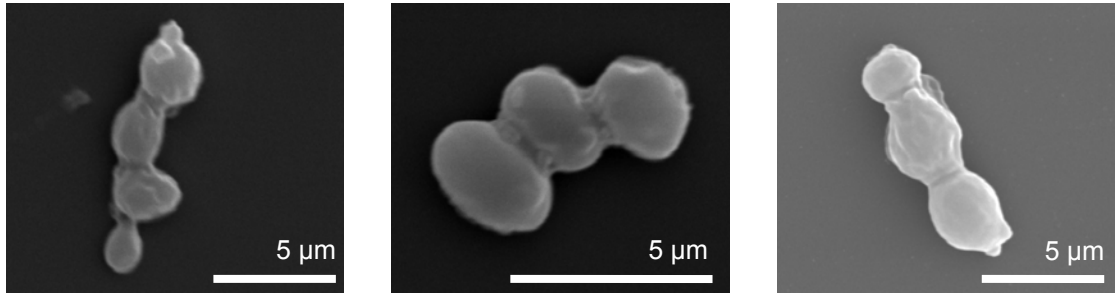


Figure 4-47 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察  
豆莢型之細胞形態

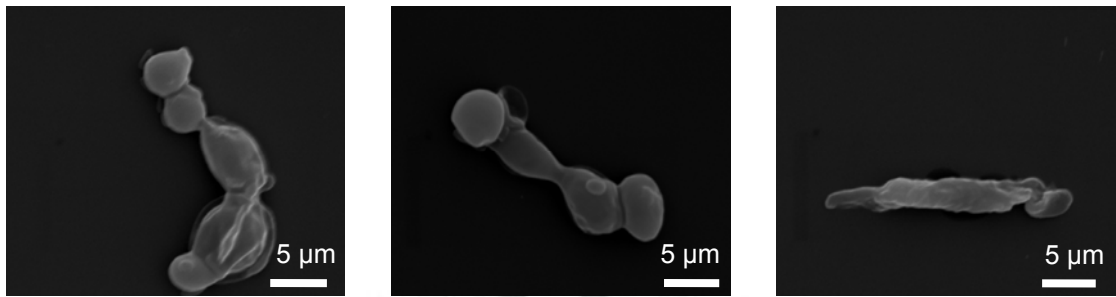


Figure 4-48 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察  
膨大豆莢型之細胞形態

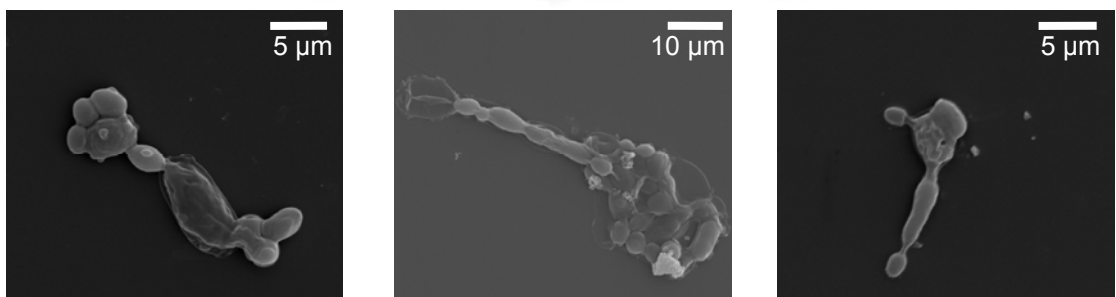


Figure 4-49 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察  
類子囊之細胞形態



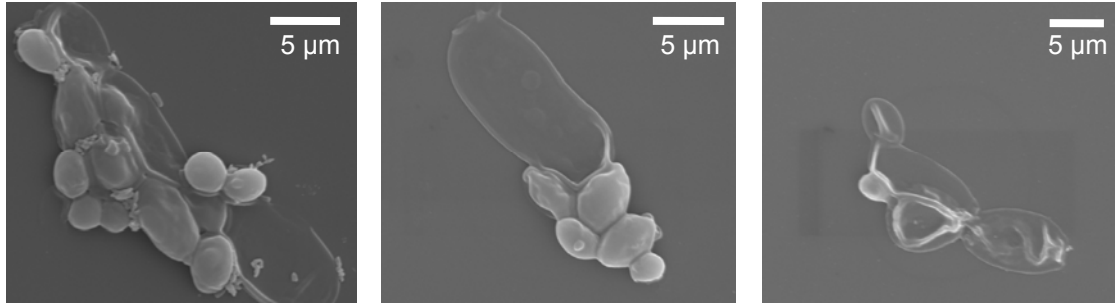


Figure 4-50 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中以掃描式電子顯微鏡觀察  
凹陷類子囊與類子囊孢子之細胞形態



## 伍、 討論

白色念珠菌 (*C. albicans*) 是臨床上最常造成人體感染且為致死率最高的真菌 (Hsueh et al., 2002)。70%的健康人體上有白色念珠菌的存在，通常存在於人體的黏膜或皮膚組織，例如：表面皮膚、陰道、腸胃道以及口腔內黏膜組織等等 (Ruhnke and Maschmeyer, 2002)。在正常情況下，白色念珠菌存在的量不多，在免疫系統正常運作的清況下，可與人體中其他正常菌叢保持平衡，使人體不受白色念珠菌的侵害。但是白色念珠菌亦是一種造成伺機性感染最常見的真菌，當人體免疫力下降、真菌菌量數目增加或受藥物副作用的影響，導致體內菌叢生態改變，原本位於人體黏膜或皮膚上的白色念珠菌便會轉為致病菌攻擊宿主，甚至引發全身性菌血症 (Candidemia) (Calderone and Fonzi, 2001)。目前白色念珠菌為院內真菌血液感染第一名，其死亡率高達 40% (Chen et al., 1997; Wenzel and Gennings, 2005)。因此早期對白色念珠菌的研究大多針對其抗藥性 (Albertson et al., 1996; Chen et al., 2003; Hitchcock et al., 1987)。

目前為止，白色念珠菌被認為是絕對二倍體 (obligate diploid) (Graser et al., 1996; Pujol et al., 1993; Taylor et al., 1999)，只具有擬有性世代 (parasexual cycle) (Bennett and Johnson, 2003; Johnson, 2003)。由於其有性世代和單倍體尚未被發現，因此造成研究上的困難。若要進行基因方面的研究，往往需要藉由 double knockout 的實驗技術來達成 (Ramage et al., 2002)，也無法藉由孟德爾定律 (Mendelian Segregation Study) 了解基因間的相關性。因此尋找白色念珠菌的有性世代和單倍體就變得相當重要 (Bennett and Johnson, 2005)。

白色念珠菌具有和麵包酵母菌類似的性別基因座，稱為 *MTL* (mating type-like) locus (Diener and Fink, 1996; Hull and Johnson,

1999)，由一對對偶基因 *MTLa* 和 *MTL $\alpha$*  所組成。在自然的環境下，大於 99% 的白色念珠菌是異型合子 (heterozygote) 的 *a/a* cell (*a/a*) (Anderson and Soll, 1987; Slutsky et al., 1987)，必需經由同型合子化 (homozygosis) 的過程，形成同型合子 (homozygote) 的 *a* cell (*a/a*) 或  $\alpha$  cell ( $\alpha/\alpha$ )，並轉換成 opaque phase，才能進行交配作用 (Lockhart et al., 2005)。藉由二倍體間的交配，形成四倍體的 *a/a* cell (*a/a/a/a*)，最後再轉變回二倍體細胞。轉變的原因目前仍不明確，可能為染色體喪失 (chromosome loss) 或是減數分裂 (meiosis) 所造成，此現象稱為白色念珠菌的擬有性世代 (parasexual cycle) (Johnson, 2003)。

然而，於 2007 年歐聰億發現白色念珠菌在 Azole 類藥物刺激下，會造成白色念珠菌的抑制圈內高頻率的發生 white-opaque switching，較先前研究中所發現的轉換機率高出許多。大量 homozygote 的產生，暗示著白色念珠菌可能在此藥物壓力下進行減數分裂 (歐聰億, 2007)。

性別分離的單倍體和有性器官是證明白色念珠菌能經由減數分裂完成有性世代的最直接證據。於是在 2008 年，鄭瑋寧將 Fluconazole 和 Terbinafine 藥物處理後之抑制圈內的 opaque 菌落挑出，經過塗盤篩選後，藉由 PCR 分析其基因型，結果發現只有 10% 的機率可以挑選到同型合子的菌株，即表示所挑選到的仍是混合的菌株 (鄭瑋寧, 2008)。

蘇慶華老師不斷的藉由顯微操作器挑選菌株，結果在 Fluconazole 藥物處理 24~48 小時後的 SC5314 中，挑選出形態為 hyphae tip cell 的菌株 SC5314-4A、SC5314-4F 和 SC5314-GB2，藉由鄭瑋寧、張芳陌由 PCR 分析後發現其基因型分別為 *a1*、*a1* 和  $\alpha1\alpha2$ ；受 Terbinafine 藥物處理數天後的 SC5314 中，挑選出形態為 swollen cell 的菌株 SC5314-SW08，基因型為 *a1*；在 Fluconazole 藥物處理 24~48 小時後的 SC5314 中，挑

選出形態為 long cell 的菌株 SC5314-LN07，其基因型為  $\alpha 1\alpha 2$ 。以這些同型合子的菌株進行倍數體測定與營養要求菌株之篩選。以 UV 照射的結果發現二倍體的標準菌株 SC5314 的致死曲線較 a type 的菌株 SW08、4A、4F 來得平緩，顯示這三個菌株可能為單倍體； $\alpha$  type 的 GB2 和 LN07 的致死曲線卻較二倍體的 SC314 來得平緩，顯示此二菌株可能並不是單倍體。然而，這些菌株藉由廖家瑜以流式細胞儀確認後，均為單倍體。因此藉由致死曲線似乎只能初步判別白色念珠菌 a type 菌株的倍數體，雖然研究上可以此方式來判定麵包酵母菌的倍數體 (Olaiya and Sogin, 1979)。隨機以 a type 的菌株 SW08 和 4F 以及  $\alpha$  type 的 GB2 進行營養要求菌株之篩選，結果發現所有的菌株均對 histidine 具有營養要求性，似乎以 UV 照射容易造成 histidine 的生合成途徑受到抑制。因為所有營養要求菌株均對同一種營養素具有營養要求性，因此無法進行之後的交配實驗。

經由減數分裂完成有性世代最直接的證據就是找到其有性器官。而酵母菌分類中，可分成子囊菌或擔子菌。白色念珠菌與麵包酵母菌同屬於酵母菌 (yeast)，多項基因學的研究也認為白色念珠菌與麵包酵母菌具有同源性 (Boone et al., 1991; Colthurst et al., 1992; Diener and Fink, 1996; Goldberg et al., 1993; Hull and Johnson, 1999; Klig et al., 1991; Sadhu et al., 1992)。而麵包酵母菌屬於子囊菌，其會產生子囊 (ascus)，並於其中進行減數分裂產生子囊孢子 (ascospore)，並將孢子包裹於其中。而在歐聰億的研究中，也曾在 PDA/PB 培養基中觀察到如豆莢型之類未成熟子囊形態之細胞，但其於培養後並無進一步的發展 (歐聰億, 2007)。然而，周明莉發現在 Fluconazole 和 Terbinafine 藥物處理後之抑制圈周圍有不同於以往、類似擔孢子的細胞形態，一個大的母細胞周圍帶有 2~4 個較小的子細胞，外型有如犬類之腳印，故命名為 Snooply，同時也發現四核期的存在 (周明莉, 2008)。蘇慶華老師藉由顯微操作器，將這些細胞分離並培

養，結果發現母細胞無法生長，但子細胞都可順利生長。藉由鄭瑋寧以 PCR 分析子細胞的性別基因，結果卻發現其均為異型合子，足見 Snoopy 並非白色念珠菌的有性器官 (鄭瑋寧, 2008)。

在本研究中發現於 Fluconazole 藥物處理 18 小時後可於抑制圈內發現不同於一般所觀察到的細胞形態，為內部具有為數不等顆粒狀結構的豆莢形狀類似子囊 (ascus) 的細胞結構，命名為 Peapod，而類似的結構也曾被本實驗室歐聰億及其他研究團隊發現 (Nishiyama et al., 2001; 歐聰億, 2007)。(Figure 4-5)

在 Fluconazole 藥物處理後 2~3 天，以顯微操作器將 Peapod 挑出培養，結果其生長停滯，未有發芽的現象。由於屬於 Azole 類藥物的 Fluconazole 會抑制麥角固醇 (Ergosterol) 生合成中 Cytochrome P450 系統的酵素 14 $\alpha$ -demethylase，使得 Ergosterol 的合成受到抑制。因此在培養基中加入 Ergosterol，觀察是否能使在 Fluconazole 藥物壓力下所產生的 Peapod 能存活、發芽。Fluconazole 藥物壓力下之 YEPD/PB 與 YEPD/PB/ Ergosterol 所造成 Peapod 的巨觀菌落形態或藉由光學顯微鏡觀察之微觀菌落形態均可發現 Peapod 菌落的生長速率較一般菌落形態來得慢。另外，藉由將盤內分成四區 P1、P2、P3 和 Control 進行塗盤，結果發現在含有 Ergosterol 的組別於抑制圈內 (含抑制圈上) 之 P1、P2，亦即 Peapod 出現之區域，其塗盤後生長之菌落形態成多樣性，具有遺傳分離的現象，間接證明 Peapod 可能為白色念珠菌的有性器官——子囊。

以共軛焦顯微鏡觀察 5 ng/ml DAPI 染色的結果確實證實在 Fluconazole 壓力下加有 Ergosterol 的培養基中，發現具有多核的 Peapod 存在，但螢光的強度卻較一般普遍常見的酵母菌型弱很多。因此以 50 ng/ml DAPI 觀察不同濃度的 Ergosterol 對 Peapod 影響，結果發現，在

Fluconazole 的壓力下，無論 Ergosterol 濃度的高低，只要培養基中含有 Ergosterol，便可尋找到 Peapod 的蹤跡，多核的現象也一再的發現，且螢光的強度也明顯提升許多。在 Fluconazole 藥物處理下，Peapod 螢光強度較弱，推測原因可能是 Fluconazole 造成白色念珠菌細胞壁的形態、成分和密度改變所造成的結果 (Herrera-Arellano et al., 2007)。

雖然在 Fluconazole 壓力下加有 Ergosterol 的培養基中，於 18 小時內便可發現具有多核的 Peapod 存在，但以顯微操作器挑出 300 個以上的 Peapod 進行培養，仍然不見其存活、發芽的現象。然而，的確在 Fluconazole 壓力所造成的抑制圈中分離生長形態不同的菌株，依形態的不同可分為圓胖的 fat cell、較長的 long cell 與具有許多長型菌絲的 mycelium (hypha tip) cell，且也發現其帶有的交配基因型包括 a1、 $\alpha$ 1 $\alpha$ 2、a1 $\alpha$ 1 和 a1 $\alpha$ 2 四種情況 (歐聰億, 2007; 鄭瑋寧, 2008)。這些細胞經由本實驗室廖家瑜以流式細胞儀分析得到單倍體圖形，但其是否真為單倍體或其是否經由減數分裂後由 Peapod 釋出，則仍需更進一步的探討。

Fluconazole 抑制麥角固醇 (Ergosterol) 的生合成，間接造成羊毛脂固醇 (Lanosterol) 和鯊鯊烯 (Squalene) 的累積。因此在 *C. albicans* 於含有 0.1% Squalene (以等量 Tween 80 分散均勻) 的 PDA/PB 中培養，觀察是否能有 Peapod 的形成。結果發現在培養 18 小時內 (第 1 天) 細胞仍然呈現普遍常見的橢圓球狀結構，但卻有雙核的存在，而在很少的機會下可以發現到 Peapod 的蹤跡。然而，第 2 天，細胞形態開始出現變化，有許多 Peapod 和長橢圓球狀帶有兩個小顆粒 (類似豬鼻子) 的細胞產生，且呈現多核存在的現象。此時的顆粒狀結構並不具有包覆結構存在。第 7、14 天時類似豬鼻子的構造中的小顆粒變大，且距離也漸拉開，除此之外，也有許多 Peapod 存在，且細胞均有膨大的現象，而細胞仍呈現多

核的現象。而其中的顆粒狀結構漸漸的形成包覆結構。第 21 天時發現了膨大的類子囊 Peapod，有一端較大的 head cell 和一端較小的 tail cell，其中包裹著 2~16 個為數不等的橢圓球狀的類子囊孢子細胞。第 28 天時發現有部份 Peapod 中的橢圓球狀細胞釋出，而釋出細胞的 Peapod 呈現空洞無核。(Figure 5-1)

藉以掃描式電子顯微鏡觀察於含 0.1% Squalene 的培養基中生長之白色念珠菌，剛開始細胞為一般常見的橢圓球狀結構，然後開始出現拉長、膨大的長橢圓球狀細胞，甚至是豆莢狀結構，接著可看到膨大拉長的細胞及成熟的類子囊結構，也可發現塌陷、扁平的破裂類子囊，其中還帶有 1~2 顆類子囊孢子，也可在其附近發現一群被絲狀物牽引在一起的細胞，這些細胞可能是由類子囊釋出的類子囊孢子，其被類似多醣的結構牽連在一起。這些類子囊孢子的橢圓球狀細胞仍需進一步確定其倍數體與交配基因型。

在 Fluconazole 藥物壓力下，含有 Ergosterol 的培養基可以找到具有多核的 Peapod，但其卻未能再繼續發展成成熟的 Peapod，可能是因為部份 Ergosterol 轉換成 Squalene，促使 Peapod 形成，但在 Fluconazole 的環境下，受到藥物的抑制，而使得 Peapod 無法成熟。

所有形態的證據足以判定 Peapod 極有可能為白色念珠菌的有性器官—子囊 (ascus)，而膨大的 Peapod 中包裹的為數不等的橢圓球狀細胞則可能為子囊孢子 (ascospore)，但仍需藉由其他遺傳學與分子生物學的證據佐證。

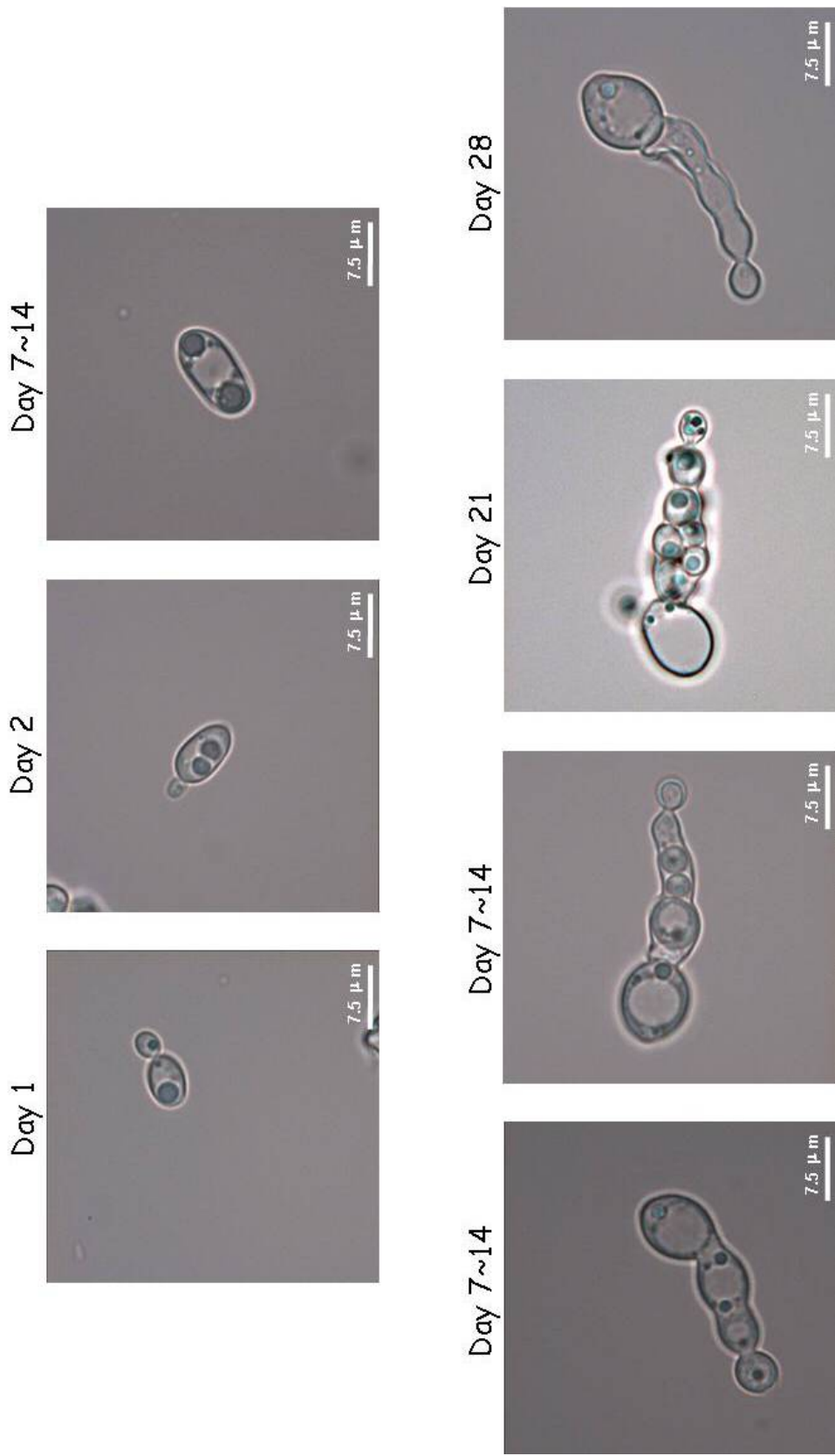


Figure 4-51 YEPD/PB/0.1% Squalene 培養基中觀察白色念珠菌 Peapod 的形成與成熟過程

第 1 天白色念珠菌呈現普遍常見的 budding yeast 的細胞形態；第 2 天開始出現帶有兩個顆粒狀結構的長橢圓球狀細胞（類似豬鼻子），此時的顆粒並不具有包覆結構存在；第 7~14 天類似豬鼻子的細胞開始拉長、膨大，甚至形成 Peapod 的結構，而顆粒狀結構漸漸形成包覆結構；第 21 天形成成熟的類子囊結構，其中包含 2~16 個為數不等的橢圓球狀類子囊孢子；第 28 天類子囊孢子釋出，留下空囊



## 陸、 結論

白色念珠菌被認為是絕對二倍體 (obligate diploid) (Graser et al., 1996; Pujol et al., 1993; Taylor et al., 1999)，具有和麵包酵母菌類似的性別基因座 (Diener and Fink, 1996; Hull and Johnson, 1999)，雖然性別基因被找到，但仍未發現其具有有性世代，卻發現其可藉由二倍體間的交配，完成擬有性世代 (parasexual cycle) (Bennett and Johnson, 2003; Johnson, 2003)。許多科學家相信白色念珠菌具有有性世代，而找到白色念珠菌的有性器官是證明其具有有性世代的最直接證據。由於白色念珠菌與麵包酵母菌同屬於酵母菌 (yeast)，多項基因學的研究也認為白色念珠菌與麵包酵母菌具有同源性 (Boone et al., 1991; Colthurst et al., 1992; Diener and Fink, 1996; Goldberg et al., 1993; Hull and Johnson, 1999; Klig et al., 1991; Sadhu et al., 1992)，因此科學家也相信白色念珠菌也與麵包酵母菌同為子囊菌，甚至藉由基因分析的結果將其分類於子囊菌門 (Ascomycota) 中 (Hibbett et al., 2007; Nishiyama et al., 2001; 歐聰億, 2007)，但其有性世代仍屬不明。

本研究在 Fluconazole 藥物處理之培養基與含有 Squalene 的培養基中發現形態上不同於以往白色念珠菌酵母菌型的細胞結構—Peapod，成熟的 Peapod 內部包裹著為數不一的酵母菌型細胞，極有可能為子囊與子囊孢子，為白色念珠菌具有有性世代提出極為有利的形態證據。要證明白色念珠菌能經由減數分裂的過程完成有性世代，需要靠遺傳學與分子生物學上更多有利證據證明，若多方證據證實白色念珠菌為子囊菌，則為最早發現其有性世代之研究。而為何 Squalene 的累積會造成白色念珠菌子囊形成，仍需更進一步探討。

## 柒、 未來研究工作

目前已能由含有 Squalene 的培養基中大量找出包裹類子囊孢子的類子囊結構 Peapod。未來工作應分離出類子囊中的類子囊孢子，培養後觀察其形態上的變化，以 PCR 分析其性別基因，並以流式細胞儀測定其倍數體。另以螢光原位雜交 (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) 觀察白色念珠菌如何在類子囊中進行減數分裂，同時，也需觀察其他白色念珠菌菌種是否也會產生類似的細胞形態。另一方面，單倍體交配的部份，則是期待能篩選出不同營養要求性之營養要求菌株，才能進行交配，以單倍體與單倍體之交配，以流式細胞儀測定倍數體是否由單倍轉為二倍，證明白色念珠菌可完成有性世代。

## 捌、 參考文獻

周明莉 (2008). 白色念珠菌在 Fluconazole 和 Terbinafine 的壓力下所造成型態改變之探討. 醫學科學研究所 (臺北醫學大學), pp. 83.

陳振陽等 (2001). 最新微生物學 (台北市, 匯華圖書出版股份有限公司), PP. 568.

歐聰億 (2007). 抗真菌藥 Fluconazole 對白色念珠菌臨床菌株形態學影響之探討. 醫學研究所 (臺北醫學大學), pp. 62.

鄭瑋寧 (2008). 白色念珠菌在 Fluconazole 和 Terbinafine 的壓力下所造成遺傳改變之探討. 生醫材料暨工程研究所 (臺北醫學大學), pp. 75.

Albertson, G.D., Niimi, M., Cannon, R.D., and Jenkinson, H.F. (1996). Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 2835-2841.

Anderson, J.M., and Soll, D.R. (1987). Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 169, 5579-5588.

Astell, C.R., Ahlstrom-Jonasson, L., Smith, M., Tatchell, K., Nasmyth, K.A., and Hall, B.D. (1981). The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 27, 15-23.

Bennett, R.J., and Johnson, A.D. (2003). Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* 22, 2505-2515.

Bennett, R.J., and Johnson, A.D. (2005). Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* 59, 233-255.

Boone, C., Sdicu, A., Laroche, M., and Bussey, H. (1991). Isolation from *Candida albicans* of a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* KRE1 gene, which is involved in cell wall beta-glucan synthesis. *J Bacteriol* 173, 6859-6864.

Boughton, B., Mackenna, R.M., Wheatley, V.R., and Wormall, A. (1957). Studies of sebum. VIII. Observations on the squalene and cholesterol content and the possible functions of squalene in human sebum. *Biochem J* 66, 32-38.

Calderone, R.A., and Fonzi, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9, 327-335.

Chen, Y.C., Chang, S.C., Luh, K.T., and Hsieh, W.C. (2003). Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother* 52, 71-77.

Chen, Y.C., Chang, S.C., Sun, C.C., Yang, L.S., Hsieh, W.C., and Luh, K.T. (1997). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18, 369-375.

Colthurst, D.R., Schauder, B.S., Hayes, M.V., and Tuite, M.F. (1992). Elongation factor 3 (EF-3) from *Candida albicans* shows both structural and functional similarity to EF-3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol*

Microbiol 6, 1025-1033.

Diener, A.C., and Fink, G.R. (1996). DLH1 is a functional *Candida albicans* homologue of the meiosis-specific gene DMC1. *Genetics* 143, 769-776.

Ernst, J.F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146 ( Pt 8), 1763-1774.

Georgopapadakou, N.H., and Bertasso, A. (1992). Effects of squalene epoxidase inhibitors on *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 1779-1781.

Goldberg, D., Marbach, I., Gross, E., Levitzki, A., and Simchen, G. (1993). A *Candida albicans* homolog of CDC25 is functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 213, 195-204.

Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, T.G., and Vilgalys, R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12473-12477.

Haber, J.E. (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 32, 561-599.

Herrera-Arellano, A., Martinez-Rivera Mde, L., Hernandez-Cruz, M., Lopez-Villegas, E.O., Rodriguez-Tovar, A.V., Alvarez, L.,

Marquina-Bahena, S., Navarro-Garcia, V.M., and Tortoriello, J. (2007). Mycological and electron microscopic study of *Solanum chrysotrichum* saponin SC-2 antifungal activity on *Candida* species of medical significance. *Planta Med* 73, 1568-1573.

Herskowitz, I. (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* 342, 749-757.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lucking, R., *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111, 509-547.

Hicks, J.B. (1987). Developmental genetics: mechanisms of differentiation. *Nature* 326, 444-445.

Hiscock, S.J., and Kues, U. (1999). Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. *Int Rev Cytol* 193, 165-295.

Hitchcock, C.A., Barrett-Bee, K.J., and Russell, N.J. (1987). The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 25, 29-37.

Hsueh, P.R., Teng, L.J., Yang, P.C., Ho, S.W., and Luh, K.T. (2002). Emergence of nosocomial candidemia at a teaching hospital in Taiwan from 1981 to 2000: increased susceptibility of *Candida* species to fluconazole. *Microb Drug Resist* 8, 311-319.

Hull, C.M., and Johnson, A.D. (1999). Identification of a mating type-like

locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285, 1271-1275.

Johnson, A. (2003). The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol* 1, 106-116.

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.

Kelly, S.L., Lamb, D.C., Baldwin, B.C., Corran, A.J., and Kelly, D.E. (1997). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J Biol Chem* 272, 9986-9988.

Klig, L.S., Antonsson, B., Schmid, E., and Friedli, L. (1991). Inositol biosynthesis: *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* genes share common regulation. *Yeast* 7, 325-336.

Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J., and Soll, D.R. (2003). Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun* 71, 4970-4976.

Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A., Brown, A.J., and Thomas, D.Y. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13217-13222.

Lo, W.S., Raitses, E.I., and Dranginis, A.M. (1997). Development of pseudohyphae by embedded haploid and diploid yeast. *Curr Genet* 32, 197-202.

Lockhart, S.R., Daniels, K.J., Zhao, R., Wessels, D., and Soll, D.R. (2003). Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2, 49-61.

Lockhart, S.R., Wu, W., Radke, J.B., Zhao, R., and Soll, D.R. (2005). Increased virulence and competitive advantage of *a/alpha* over *a/a* or *alpha/alpha* offspring conserves the mating system of *Candida albicans*. *Genetics* 169, 1883-1890.

Nishiyama, Y., Nakaoka, C., Hiratani, T., Abe, S., Uchida, K., and Yamaguchi, H. (2001). Synergy of lysozyme and itraconazole on the morphology of *Candida albicans*. *J Electron Microsc (Tokyo)* 50, 41-49.

Odds, F.C. (1994). *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. *J Med Vet Mycol* 32 *Suppl* 1, 1-8.

Olaiya, A.F., and Sogin, S.J. (1979). Ploidy determination of *Canadida albicans*. *J Bacteriol* 140, 1043-1049.

Pujol, C., Reynes, J., Renaud, F., Raymond, M., Tibayrenc, M., Ayala, F.J., Janbon, F., Mallie, M., and Bastide, J.M. (1993). The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9456-9459.



Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T.F., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L. (2002). Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 49, 973-980.

Rex, J.H., Rinaldi, M.G., and Pfaller, M.A. (1995). Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1-8.

Riggsby, W.S., Torres-Bauza, L.J., Wills, J.W., and Townes, T.M. (1982). DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 2, 853-862.

Rikkerink, E.H., Magee, B.B., and Magee, P.T. (1988). Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 170, 895-899.

Roberts, C.J., Nelson, B., Marton, M.J., Stoughton, R., Meyer, M.R., Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H., Walker, W.L., Hughes, T.R., *et al.* (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* 287, 873-880.

Ruhnke, M., and Maschmeyer, G. (2002). Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer -- review of the literature. *Eur J Med Res* 7, 227-235.

Ryder, N.S. (1988). Mechanism of action and biochemical selectivity of allylamine antimycotic agents. *Ann N Y Acad Sci* 544, 208-220.

Sadhu, C., Hoekstra, D., McEachern, M.J., Reed, S.I., and Hicks, J.B.

(1992). A G-protein alpha subunit from asexual *Candida albicans* functions in the mating signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by the a1-alpha 2 repressor. *Mol Cell Biol* 12, 1977-1985.

Slutsky, B., Buffo, J., and Soll, D.R. (1985). High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 230, 666-669.

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., and Soll, D.R. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 169, 189-197.

Soll, D.R. (1997). Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 ( Pt 2), 279-288.

Soll, D.R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* 81, 101-110.

Soll, D.R. (2004). Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays* 26, 10-20.

Soll, D.R., Morrow, B., and Srikantha, T. (1993). High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet* 9, 61-65.

Taylor, J.W., Geiser, D.M., Burt, A., and Koufopanou, V. (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev* 12, 126-146.

Tsong, A.E., Miller, M.G., Raisner, R.M., and Johnson, A.D. (2003). Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* 115, 389-399.

Tzung, K.W., Williams, R.M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., *et al.* (2001). Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3249-3253.

Wenzel, R.P., and Gennings, C. (2005). Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis* 41 *Suppl 6*, S389-393.

White, T.C., Pfaller, M.A., Rinaldi, M.G., Smith, J., and Redding, S.W. (1997). Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient. *Oral Dis* 3 *Suppl 1*, S102-109.

Zordan, R.E., Miller, M.G., Galgoczy, D.J., Tuch, B.B., and Johnson, A.D. (2007). Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol* 5, e256.