

計畫編號：DOH91-DC-1023

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

人體病原真菌隱球菌基因資料庫及標準分子技術之建立

研究報告

執行機構：台灣大學

計畫主持人：沈偉強

研究人員：薛雁冰，戴雅君，邱傑華，趙丹祥，李淑英

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

	頁碼
壹、中文摘要	(2)
貳、英文摘要	(4)
參、前言	(6)
肆、材料與方法	(14)
伍、結果與討論	(20)
陸、結論與建議	(26)
柒、參考文獻	(28)
捌、圖	(36)
玖、表	(39)

共(41)頁

壹、 中文摘要

隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)為人體重要病原真菌，可由肺部感染擴及全身，引起全身性黴菌感染，稱為隱球菌症(Cryptococcosis)。在過去二十年中，因人類免疫不全病毒(HIV)之感染、癌症及器官移植等醫療行為，導致免疫功能不全之個體大量增加，因而使隱球菌症成為醫療上相當棘手的問題。針對隱球菌引起之感染，在國際上已引起醫學界之重視，正積極進行抗真菌藥物之開發，以及真菌致病性之研究。而國內在人體病原真菌之研究上，除了零星之臨床報告外，對本土菌株之流行病學及生態學上之瞭解，仍屬一片空白。在此相關研究資訊快速累積之際，國內相關之研究單位與人員，應針對該病原菌或其他重要人體病原真菌，進行系統性及整合性的深入研究，以期對本土菌株在病原性及流行病學上能有更深入的了解，並作為相關疾病防治措施之參考依據。本計畫之目的，乃針對隱球菌基因資料庫之建立、基因序列之比對與選殖，核酸分離方法之測試，病原性突變株技術之建立，以及進行快速分子檢測技術之研發及標準流程之建立，以期能對該病原菌在國內流行病學上，生態上以及病原性上有進一步的了解與認識，並在臨床診斷上，提供第一線醫檢人員快速鑑定之依據。本計畫91年度主要有三項目標，一為國際及國內臨床與環境菌株之收集，二為隱球菌標準分析方法之建立，三為隱球菌亞種或血清型標準分子檢測技術流程之建立。針對第一項目標，目前收集共國際及國內菌株165株，其中相當比例為臺大醫院感染科張上淳主任及陳宜君醫師提供之臨床菌株，目前已完成大部份菌株血清型之鑑定，並將持續完成所有菌株血清型之鑑定。未來計劃之重點，乃進行菌株之種內分子分群，以了解國內隱球菌在流行病學及生態學上之意義及與國際菌株之異同。而第二項目標，乃為因應部分菌株之分析，目前亦已完成大部分方法之建立，唯病原性突變株技術，

因無植物基因槍轉殖系統(Bio-Rad)可供測試及調整，一直無法進行，所幸經調整個人計劃經費，終於日前完成採購，以及突變株構築方法的建立。未來應可進行基因轉殖技術測試及突變株構築方法的建立。另外，病原性測試之動物實驗，亦將配合相關管理辦法之要求，進行硬體設備之建立，以應未來需要。針對第三項目標，目前利用 *STE12* 基因，經專一性之 PCR 增幅反應及二種不同限制酶酵素的酶切，已成功地區分四種血清型及交配型，唯此結果乃僅針對少數測試菌株，故仍須進行大量菌株之測試，以確立其可行性。此外，PCR 敏感度之測試，以及發展以培養之菌液直接進行 PCR 反應，及其穩定性與再現性之測試，仍有待後續實驗完成。本年度計劃已累積部分成果，相信若可獲得有關單位之持續支持，應可作為下年度計劃執行之基礎，而整個計劃之成果，也能提供對國內隱球菌在流行病學及生態學上有更深的了解。

中文關鍵詞：隱球菌；隱球菌症；基因資料庫；分子檢測技術

貳、英文摘要

Fungal infection has drawn lots of attention due to dramatically increased number of immunocompromised patients caused by HIV infection, organ and tissue transplantation, and cancer chemotherapy in the past two decades. *Cryptococcus neoformans* is an opportunistic human pathogenic fungus that causes systemic infection called cryptococcosis. Cryptococcal meningitis is often life-threatening in such individuals. To prevent the incidence of the disease and also understand the pathogenesis of the fungus, research projects are currently conducting in various international research institutes or universities. On the other hand, although few clinical surveys have reported in Taiwan, a more thorough and systematic ecological and epidemiological study of the causing fungus was absent. The purpose of the proposal is to establish the gene database and standard molecular techniques, which can be used for the diagnosis and identification of the clinic, and environmental *C. neoformans* isolates. Three aims are set to accomplish for the project in 2002. First is to collect the international *C. neoformans* strains and also conduct the nationwide collection of the clinic and environmental *C. neoformans* isolates. Second is to establish the standard molecular protocols for nucleic acid preparation and other methods including gene deletion systems. Third is to develop the fast molecular serotyping method. In summary, we have totally collected 165 *C. neoformans* international and domestic isolates from clinic and environment. So far, we have completed the serotyping for most strains. We have also established standard molecular protocols except the biolistic transformation system. Finally, we have successfully developed the molecular serotyping method based the *STE12* gene in the mating locus. This method could allow us to quickly analyze the serotype and mating type for the strains in one reaction. Currently, we are optimizing the PCR conditions and testing the sensitivity. In this project, we have collected lots of isolates, established standard procedures, and developed molecular serotyping

techniques. We hope that we can further analyze the isolates collected, generate useful information about the population structure of *C. neoformans* isolates in Taiwan and help to improve the clinical diagnosis and treatment of the disease in the end.

Keyword: *Cryptococcus neoformans*; Cryptococcosis ; gene database ; Molecular diagnosis

參、前言：

在已知超過約十萬種真菌中，約 200 種真菌可於人體上造成疾病。真菌感染依其臨床症狀，主要可分為表面感染(superficial infections)，皮膚感染(cutaneous infections)，皮下感染(subcutaneous infections)，以及全身性系統感染(systemic infections)。近年來，系統性真菌感染之問題，逐漸受到國際上之重視，其原因為該感染具有潛在致命威脅，再者由於人類族群中，免疫不全症候群的個體大量增加，使受伺機性病原真菌(opportunistic pathogenic fungi) 如 *Candida albicans* and other *Candida* species，*Cryptococcus neoformans* 以及 *Aspergillus fumigatus* 等感染所引起之臨床病例大量增加，造成醫界對真菌感染面臨新的挑戰。

針對此類致命性、全身性真菌感染，國際上醫界、學界以及製藥界皆已陸續投入大量人力、財力進行抗真菌藥物之開發，以及真菌致病性之研究。如針對 *C. albicans* 之問題，美國知名大學如 MIT Whitehead Institute，University of Minnesota 醫學院以及加州大學舊金山分校等之研究人員，皆積極投入 *C. albicans* 真菌本身生理，致病性以及基因體研究等之整合性計劃；針對 *C. neoformans*，在 Duke University 及美國國家衛生研究院 (NIH)，亦有類似生理及致病性之相關研究，而在 Stanford University 亦有 *C. neoformans* 基因體之研究計劃，並已完成大部分之解序工作。由此可知，國際上對此類病原真菌研究重視之程度，而反觀國內該類病原真菌之研究，除零星之報告外，欠缺系統性及整合性之研究。事實上，國內有優秀之相關研究人員，研究資源亦極為豐富，實應進行資源與人力之整合，推動相關病原真菌之重點研究，

以期對本土菌株在病原性及流行病學上能有更深入的了解。

Cryptococcus neoformans 為重要伺機性(opportunistic)人體病原真菌，可造成隱球菌症(Cryptococcosis)。其常侵犯之器官包括肺部與中樞神經系統，亦可侵犯骨骼系統與前列腺等，造成全身系統性感染，當其引起系統性腦膜炎(Cryptococcal meningitis)時，若不及起予以藥物或外科手術治療，將導致極高之致死率。該病原菌自1894年首先於德國被報導後，至今已逾百年。臨床的報告顯示，該菌可在正常的個體上造成感染，另外對免疫不全(immunocompromised)的個體亦極具致命之威脅。在過去二十年中，因愛滋病毒之感染以及其他醫療行為如癌症化學治療、器官移植等所造成免疫系統缺陷的個體大量增加，使得該菌所造成之感染及問題獲得醫療和學術界的重視，目前已對其流行病學、生態、分類、診斷、治療、致病及其相關分子機制有了初步的認識(Casadevall and Perfect, 1998; Heitman *et al.*, 1999; Lengeler *et al.*, 2000)。

根據性狀，血清學、遺傳、生化及流行病學的特性，*C. neoformans*可區分為三個亞種(variety) (varieties *grubii*, *neoformans*, 以及 *gattii*) (Franzot *et al.*, 1999)，五個血清型(serotype) (serotypes A, B, C, D, 以及AD)。血清型A者屬於 *C. neoformans* var. *grubii*，血清型B及C者屬於 *C. neoformans* var. *gattii*，血清型D者屬於 *C. neoformans* var. *neoformans*。Variety *neoformans*之分佈為世界性，經常可由鳥類如鴿子的排泄物分離出(Emmons, 1955)，此外由愛滋病患所分離者，該亞種亦佔絕大部分。而variety *gattii*則多分佈於熱帶及亞熱帶地區(Kwon-Chung and Bennett, 1984a & b)，可在尤加利樹(eucalyptus tree)上發現(Ellis and Pfeiffer, 1990)，而該亞種

極少在愛滋病患造成感染，其原因仍不甚明瞭。

*C. neoformans*在分類上屬於擔子菌綱(Basidiomycete)，在無性繁殖上，一般以發芽(budding)的方式產生酵母菌型式(Yeast form)之菌體，而其有性世代*Filobasidiella neoformans* 則經有性生殖之過程產生有性子代擔子孢子(basidiospore)。*C. neoformans* var. *neoformans*之有性世代為*F. neoformans* var. *neoformans*，而*C. neoformans* var. *gattii* 之有性世代則為*F. neoformans* var. *bacillisporus*。二亞種可經交配(mating)產生少數可存活之擔子孢子，因而不足以將兩者區分為二個不同之種(Kwon-Chung *et al.*, 1982)。*C. neoformans* 屬異宗交配型(heterothallic)，其生活史具有二型式的轉變(dimorphic transition)，無性單套染色體(haploid)的酵母菌族群中，有兩種不同交配型(mating type)存在，分別為交配型 α 和交配型 a。兩種不同交配型的細胞在適當之環境條件下經費洛蒙的辨識(Pheromone sensing)可分別產生接合管(conjugation tube)進行趨向生長及細胞融合，融合後會產生擔子菌綱典型的雙核(dikaryotic)及具融合扣子體(fused clamp connection)之菌絲，最終菌絲之末端會形成膨大的細胞稱擔子柄(basidium)。於擔子柄內，來自不同交配型的細胞之細胞核會進一步進行細胞核融合(karyogamy)，隨之減數分裂(meiosis)發生，進而產生四種重組、單套染色體之細胞核。細胞核並進一步經反覆有絲分裂及發芽之方式在擔子柄上產生四條長鍊之擔子孢子(basidiospore)，擔子孢子會萌發(germinate)形成酵母菌型式之個體。雙核或雙套染色體的菌絲體為有性生殖的過渡型式，在自然或臨床的環境中所分離者為大多為單套染色體之酵母菌型式個體。

研究*C. neoformans*的致病性顯示，莢膜(capsule)的形成，黑色素(melanin)的產生，菌體能否生存於攝氏37°C或以上之溫度以及交型式基因(mating type locus)等為重要之致病因子(virulence factor)。莢膜形成於酵母菌體細胞壁之外圍，在自然環境中，其功用可能為保護細胞免於乾燥(desiccation)或者做為抵抗其他微生物如變形蟲的破壞或分解。無論其在自然界所扮演的角色，研究證據顯示莢膜在致病過程中為一重要的致病因子。莢膜於感染過程中，可能具有抵抗巨噬細胞吞噬(antiphagocytosis)、補體耗竭(complement depletion)等作用。莢膜合成之遺傳及分子作用等研究，明確地證明莢膜的形成與致病性間之關係(Chang and Kwon-Chung, 1994)。

黑色素的產生亦已證實與*C. neoformans*之致病性有關。利用傳統遺傳的方法產生之不形成黑色素的菌株，經由動物實驗比較其與野生菌株(wild type)之病原性顯示不產生黑色素之菌株具有較弱之病原性(Rhodes *et al.*, 1982)。一般認為細胞壁黑色素的堆積，於感染過程中具有抗氧化的功能，因而藉以保護菌體本身。

在*Cryptococcus*的種類中，僅有*C. neoformans*能始終於哺乳動物之體溫攝氏37度或以上之溫度進行生長，該特性為人體病原菌所不可或缺。研究Calcineurin分子訊息傳導機制，亦進一步證明該訊息傳導機制與*C. neoformans*能否成功感染及存活在寄主體內，能否生存在37度或以上之溫度以及適應寄主體內5%二氧化碳濃度及pH7.3~7.4有關 (Odom *et al.*, 1997)。

另外，經由自然環境及臨床的調查，以及動物病原性的實驗等結果顯示，交配型 α 可能與致病性有關(Kwon-Chung *et al.*, 1978;

Kwon-Chung *et al.*, 1992)。環境中與臨床上所分離出來的*C. neoformans*超過95%為交配型 α 之菌種。而Wickes等人於1996年報導交配型 α 的菌種，在特殊的條件下如嚴重脫水及氮素源不足的情形下，可產生單核菌絲，並於其末端形成單一交配型，即交配型 α 之擔子孢子，若干特徵可藉以與有性生殖產生擔子孢子的過程有所區別。該無性生殖的特性，亦被推測與自然環境及臨床上所分析的結果有所關聯，因此交配型 α 之相關基因應扮演重要角色(Wickes *et al.*, 1996)，另外，Kwon-Chung等人，亦利用遺傳回交(backcross)的方式產生同基因型(congenic),不同交配型的血清型D的菌種，並以老鼠進行病原性的測定。結果顯示交配型 α 者較a者具有更強之病原性(Kwon-Chung *et al.*, 1992)。而交配型 α 之基因如何造成病原菌較強的致病能力則有待進一步之觀察。

在隱球菌的診斷上，可由微生物學、血清學以及組織學上的方法進行診斷。在微生物學的方法上，可利用India墨汁蓋片檢查法直接檢視腦脊髓液，以判斷腦膜炎患者是否為隱球菌腦膜炎。而進一步確認則有待培養結果以為佐證，培養的工作可由腦脊髓液、血液及尿液等檢體進行，。在利血清學的方法上，可利用偵測抗原及抗體來進行(Ikeda *et al.*, 1982; Shadomy *et al.*, 1987)。抗原之偵測乃利用樹脂凝集試驗法(latex agglutination test)進行多醣類莢膜抗原之偵測。而抗體之偵測，因健康成人往往亦可被偵測到，因此無法做為直接之診斷依據。而在組織病理學上，往往借助特殊的染劑，如methenamine silver或Mayer's mucicarmine將真菌之細胞或莢膜染出，以便與組織或其他真菌做區別。

C. neoformans 所引起之隱球菌症目前在臨床早期診斷上有其

困難度。病患多於感染擴及中樞神經系統後，出現相關臨床合併症包括腦壓增加引起之頭痛及視聽障礙等使前往求診。而在診斷上則需由腦脊髓液、血液及尿液等由專業醫檢人員進行檢體鏡檢及培養，始可確認病因，進行治療。此一過程費時數日，對於預後影響甚鉅。針對此項缺點，為對病因快速且正確診斷，分子生物學上的診斷技術已被發展應用於隱球菌症的診斷鑑定(Aoki *et al.*, 1999; Brant *et al.*, 1995; Chaturvedi *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 1999; Viviani *et al.*, 1997)。但由於各項技術未經仔細評估及整合，在時效上或結果判讀上，都有改進之空間，因此，在實際使用上，為提供給第一線醫檢人員快速且正確之診斷方法，不同方法之應用與整合，以及標準流程之建立，仍有待進一步研發。

此外，國內對隱球菌之研究已有臨床報告發表 (Chen *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 1994)，其中在 *var. neoformans* 及 *var. gattii* 之分佈及感染病例上，在本島南北部地區似乎有所差異。在美國感染族群中有很高比例為愛滋患者，然而相較於國內其比例卻很低。此外，各血清型(*serotype*)及亞種(*variety*)之感染比例、在地理及生態的分佈特性，亦與國外有所區別。針對此等現象，實有必要廣泛性地收集、分離、鑑別菌株，並進行流行病學調查工作，以建立本土病原真菌之資料庫。因此針對此一現象，實有必要做更全面性菌株之收集，分離與調查。在此同時若能先發展出快速且正確辨別亞種之方法，則除了提供臨床第一線之檢驗，醫護人員可從中獲取用藥參考之依據，另外，亦可解決從事相關調查時，大量樣品分析所帶來的問題與困擾。

全程計畫之總目標

本計畫之總目標為針對國內人體病原真菌隱球菌進行系統性

及整合性的研究，其中包括國際及國內隱球菌之收集、分離、比對及病原性之探討、基因資料庫之建立、基因序列之比對與選殖，核酸分離方法之確立，病原性突變株技術之建立，以及標準快速分子檢測技術之研發等，以期能對該病原菌在國內流行病學上，生態上以及病原性上有進一步的了解與認識，並在臨床診斷上提供第一線醫檢人員快速鑑定依據。

分年計畫之目的

91年度計畫之目的，乃針對隱球菌基因資料庫之建立、基因序列之比對與選殖，核酸分離方法之測試，病原性突變株技術之建立，以及進行快速分子檢測技術之研發及標準流程之建立。此外，亦將進行國際菌種及國內臨床菌株之收集，對其進行亞種、血清型，以及交配型之確認。

92年度計畫之目的，將持續國內隱球菌菌株之收集，除包括臨床菌株之收集外，並將擴大至環境菌株包括由鴿糞及尤加利樹種進行菌株之分離與收集。部分確認之菌株，將進行病原相關特性之比較。及探討，並繼續進行快速分子檢測技術。

93年度計畫之目的，將國內所收集之*C. neoformans*所有菌株，包括臨床病患及自然環境者，完成亞種、血清型，以及交配型之確認，並進行其生態分佈以及流行病學上的特性之進行綜合分析，並以RAPD的方法，進行臨床及環境菌株之分群，以期對國內*C. neoformans*菌株特性有更清楚之瞭解，作為相關疾病防治措施之參考依據。

本計畫91年度所要達成之目標為隱球菌基因資料庫之建立、基因序列之比對與選殖，核酸分離方法之測試與建立，病原性突變

株技術之建立，以及進行快速分子檢測技術之初期研發。所要完成之工作項目包括：

- (1). 隱球菌國際菌株與國內臨床菌株之取得
- (2). 收集之菌株，對其進行亞種、血清型，以及交配型之確認
- (3). 隱球菌基因資料庫之建立
- (4). 基因資料之查詢、比對與選殖
- (5). 專一性PCR引子之設計與測試，PCR敏感度及相關方法之測試
- (6). 核酸分離方法之測試
- (7). 病原性突變株技術之建立

肆、材料與方法

(1). 隱球菌國際菌株之取得及鑑定

隱球菌不同血清型之菌株，將透過管道取得國際菌株。在國內臨床菌株方面，將由臺大醫院及全國各大醫院或相關研究單位取得，而在環境菌株方面，將由鴿糞、鳥糞，以及相關樹種進行分離，所有菌株亦將進行培養，並加以鑑定確認。確認之菌株，將作為標準快速分子檢測技術研發之用。環境隱球菌分離之方法，乃將由各處採集得到之鴿糞樣本編號，取適量之樣本懸浮於10ml之無菌水中，混合均勻後，吸取50 μ l塗佈至CCA培養基(Corn Meal Agar 17.5g, Agar 5g, Caffeic Acid 0.3g, Bile 3.5g, Chloramphenicol 50 μ g/ml, 1 liter)上，於30°C下培養3至5天後，觀察培養基上之菌落分佈，挑取呈褐色之單一菌落至YEPD培養基上，劃出單一菌落培養，挑取單一菌落進行培養。在鑑定方面，分離所得之菌株，除將輔以其他傳統生理、生化及血清等方法(Kwong-Chung *et al.*, 1982; Salkin and Hurd, 1982; Shadomy *et al.*, 1987; Ikeda *et al.*, 1982) 進行亞種及血清型之鑑定外，主要將以下列方法進行鑑定。

1). 莢膜之有無: 莢膜之形成，可利用誘導莢膜產生之 LIM

培養 (Vartivarian *et al.*, 1993) 基進行。菌株在 30°C 下，培養於 LIM 培養基 1~2 天，然後利用印地安墨汁染色，在光學顯微鏡下，以 40×物鏡觀察所分得菌株是否具有莢膜。

2). 黑色素之有無: 黑色素之形成，以可以誘導黑色素產生之 CCA 培養基，觀察所分離之菌株是否會產生黑色素。首先，以牙籤沾取少量菌體懸浮於無菌水中，取 10 μ l 菌液滴在 CCA 培養基上，於 30°C 下培養 3-5 天後，觀察菌落是否呈現棕褐色。

3). 利用本計劃所開發出之隱球菌專一性引子對 WC53, WC54 或 WC64, WC65，及核酸抽取方法，進行聚合酶連鎖反應增幅偵測，測試結果為陽性者，表示分離菌株確為隱球菌。此外，亦進一步利用限制酶切割圖譜來鑑定分離株之血清型及亞種。

(2). 隱球菌基因資料庫之建立

隱球菌基因等相關資料，將由已發表之文獻或 National Center for Biotechnology Center 及 Stanford Genome Technology Center 中之 *C. neoformans* 基因體資料庫中收集，以建立相關基因資料庫，其內容包括基因名稱，核酸序

列，生理功能，以及相關文獻等。

(3). 基因資料之查詢、比對、選殖與定序

C. neoformans var. *neoformans* serotype D 菌株，在美國史丹福大學正進行基因體定序之工作，且已大半完成。利用文獻中 serotype D 或 A 菌株已發表之基因，可在基因體資料庫進行比對及確認；而 var. *gattii* 同源基因可於資料庫內進行搜尋、比對及確認。交配型位點(mating type locus)上之相關基因將優先進行查詢、比對，因其除了提供交配型及染色體套數辨別外，亦將進一步開發為 *C. neoformans* 亞種及血清型之辨別工具。經比對後，選擇適當之同源基因，對於序列缺少或不足者，將以 PCR 進行選殖，選殖之產物並將經定序進行確認，以便進行比對。

(4). 專一性 PCR 引子之設計及測試

依據 GenBank 搜尋得到之相關基因並經比對後，吾人選擇位於隱球菌交配型位點之 *STE12* α and *STE12a* 基因，進行專一性 PCR 引子之設計。根據搜尋文獻所得之 *STE12* 血清型 A 與 D 基因序列，經比對後選擇適當之區域，設計隱球菌專一性 PCR 引子對 WC53/WC54 及 WC64/WC65，進行專一性

PCR 之測試。PCR 引子之序列如下:

WC53: CCAGAGCGCATCGTGAGCATT

WC54: CTCACCCACTACGATCGTCGT

WC64: CGTGTGTTCTTTGGAATGGCT

WC65: GTCTCCGAGCCGAATTGTTCA

預期會在交配型 α 及交配型 a 之菌株分別增幅出 1086 bp 及 810 bp 之片段。聚合酶連鎖反應每管聚合酶連鎖反應之反應物濃度及條件如下：每 50 μ l 反應中含有 1 μ l (10 ng) 的隱球菌 DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1 mg/ml nuclease free BSA, 0.25 mM 之 dNTP, 3.2 pmol 之各 PCR 引子, 以及 2.5U 之 *Taq* DNA 聚合酶 (BIOMAN SCIENTIFIC CO., LTD)。增幅條件為 96°C 4 分鐘, 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分鐘, 35 個循環後, 72°C 7 分鐘。10 μ l 之增幅產物, 利用洋菜膠體電泳來檢視增幅片段之大小及產量, 電泳在 80 volt, 約 1 至 1.5 小時之後, 利用 0.5 μ g/ml 之 EtBr 進行電泳膠片之染色, 並在紫外燈下觀察結果。增幅之 PCR 產物, 另外並佐以限制酶酵素之酵解, 以特定圖譜作為鑑別依據。限制酶切反應乃以剩餘之 40 μ l 聚合酶連鎖反應產物, 利用 GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification 套組(Amersham

Pharmacia Biotech Inc.)純化，取約 0.5 μ g 之產物，依下列反應條件，在 37°C 水浴中，作用 1.5 小時，限制酶 *Kpn*I-5U，10 mM Bis Tris Propane-HCl，10 mM MgCl₂，1 mM DTT pH 7.0。限制酶 *Hinf*I -5U，50 mM NaCl，10 mM Tris-HCl，10 mM MgCl₂，1mM DTT，pH 7.9。酶切後之 DNA，利用 2% 洋菜膠體電泳來檢視酶切之後之片段大小。

(5). PCR 敏感度及相關方法之測試

PCR 敏感度之測試，利用純化 genomic DNA 及純粹培養之菌液，稀釋成不同 DNA 濃度或菌數，進行 PCR 敏感度之測試，已界定其偵測極限。

(6). 核酸分離方法之建立

隱球菌核酸萃取之方法，乃參考 Rose *et al.*, 1990 之方法。移植單一菌落體至 5 ml 液態 YEPD 培養基中，在 30°C 生長箱中，培養隔夜。利用冷凍乾燥的前處理，配合不同核酸(DNA 與 RNA)萃取液，進行萃取液與分離方法之測試，及標準流程之建立。

(7). 病原性突變株技術之建立

利用植物基因槍轉殖系統(Biolistic Transformation System,

Bio-Rad)，進行隱球菌基因轉殖技術，以及突變株構築方法的建立。

伍、結果與討論

1. 隱球菌國際模式菌株之取得

隱球菌 *C. neoformans* 不同血清型(serotype)之國際菌株，已透過正常申請程序，由 Duke University Medical Center Dr. Joseph Heitman 實驗室取得，其中包含不同亞種及血清型菌種共 29 株。另外，成功大學醫學院皮膚科許銘隆醫師慷慨提供隱球菌國際模式菌株 4 株。而在收集台灣本土隱球菌臨床及環境菌株上，已由臺大醫院感染科張上淳主任及陳宜君醫師取得臨床菌株 112 株，國家衛生研究院羅秀容博士臨床菌株 6 株，疾病管制局李淑英博士提供由單一病患所分離之臨床隱球菌菌株 7 株，以及本實驗室初步由鴿糞所分離到之隱球菌 7 株，總計共 165 株。所收集之部分菌株，應用於鑑定隱球菌亞種或血清型標準分子檢測技術流程之建立，其他菌株亦將作為該技術後續大規模測試之用。目前，已對大部分收集之國際菌種，國內臨床及環境菌株，完成其亞種、血清型，以及交配型之確認，無法以分子檢測方法辨別者，將以血清試劑商品化套組進一步確認。

2. 隱球菌基因資料庫之建立

在隱球菌基因資料庫之建立部份，已由文獻及基因資料庫中

收集隱球菌已發表之不同亞種或血清型之基因約 16 個，如表一。

目前已收集整理其相關核苷酸序列，其中與有性生殖費洛蒙訊息傳導有關的基因 *STE12* 及 *GPB1*，已進行序列比對，並設計專一性 PCR 引子，進行研發為鑑定隱球菌亞種或血清型之分子標的。

3. 基因資料之查詢、比對、選殖與定序

在已收集或比對之 *C. neoformans* 基因中，選取 2 個與有性生殖費洛蒙訊息傳導有關的基因 *STE12* 及 *GPB1*，進行基因序列之分析。*STE12* 基因為交配型專一性基因，除了可提供交配型及染色體套數之辨別外，亦開發為 *C. neoformans* 亞種及血清型之辨別。日前針對該二基因設計專一性 PCR 引子，進行增幅反應，並已成功增幅出預期大小之片斷，而其中 *STE12* 基因，佐以二種限制酶酵素之切割，已可成功區分交配型及四種不同血清型。結果詳述如下：

在 *GPB1* 基因部分，設計專一性引子對 JOHE5897 及 WC52，預期增幅片段大小於血清型 A 及 D 上分別為 612 bp 及 601 bp。為能明顯區分不同血清型，吾人進一步佐以限制酶酵素 *EcoRV* 之切割，血清型 A 因無切位，仍維持 612 bp 之大小，而血清型 D 因具一切位，可得 186 bp 及 415 bp 兩片段大小，而與血清型

A 區別。在血清型 B 上其結果類似血清型 D，而血清型 C 則類似於血清型 A。故若欲利用 *GPBI* 基因進行不同血清型之鑑別，需嘗試以其他限制酶酵素或設計涵蓋更大片段之 PCR 引子，再行測試。

在 *STE12* 基因部分，*STE12* 位於交配型位點(mating type locus)上，於不同交配型具不同之基因序列 (idiomorph) 分別為 *STE12* α 及 *STE12a*，故可藉以同時進行交配型之確認。針對 *STE12* α ，設計專一性引子對 WC53 及 WC54，已成功增幅預期片段大小，血清型 A 及 D 上分別為 1086 bp 及 1083 bp，血清型 B 及 C 與 A、D 大小相仿。同樣佐以單一限制酶酵素之切割，可成功區分三種血清型。限制酶酵素 *KpnI* 酶切後片段大小，血清型 A 為 458 bp、365 bp、263 bp，血清型 D 為 454 bp、629 bp，血清型 B 之酶切結果類似血清型 D，而血清型 C 因沒有此酵素的切位，酵解後片段仍在接近 1100 bp 大小處。而另以限制酶酵素 *SacI* 酶切後之片段大小血清型 A 因沒有此酵素的切位，酵解後片段仍為 1086 bp，血清型 D 為 614 bp、469 bp，血清型 B 之酶切結果仍類似血清型 D，而血清型 C 酵解後片段約為 744 bp、339 bp。結果如圖一所示。

針對 *STE12a*，設計專一性引子對 WC64 及 WC65，目前已成功增幅血清型 D 預期片段大小 810 bp，血清型 B 及 C 與血清型 D 者大小相仿，而在血清型 A 上，目前無確定菌株可供測試。同樣以限制酶酵素 *KpnI* 酶切後片段大小，血清型 D 得片段 589 bp、221 bp，血清型 B 之酶切結果仍與血清型 D 類似，而血清型 C 因沒有此酵素的切位，酵解後片段仍在接近 810bp 大小處。而因三種血清型都沒有 *SacI* 限制酶酵素的切位，酶切後仍呈現原來增幅出的 810bp 大小。結果如圖一所示。

為能以 *STE12* 基因進行血清型之分子鑑定，突破無法區分血清型 B 與 D 之情形，日前針對 *STE12 α* 基因設計涵蓋較大片段之 PCR 引子 WC71，與 WC53 進行 PCR 反應，血清型 A 片段大小為 1511 bp，血清型 D 片段大小為 1508 bp，而血清型 B 與 C 亦可增幅出類似片段大小。在進行選殖與解序後，發現血清型 B 與 D 間，僅有 5 個核苷酸之差異，根據酵素切位圖譜的判定，找到一個可能適當的限制酶 *HinfI*。酵解結果顯示，此酵素的確可以區分出血清型 B，D 之增幅片段，其大小分別為血清型 D：379 bp、99 bp、100 bp、40 bp、31 bp，及 433 bp。在 2% 洋菜膠體電泳分析之下，可以觀察到 433 bp、379 bp，及 99 bp、100 bp 三個

大小的片段;在血清型 B 上，則會呈現出 467 bp 及 619 bp 兩個片段(如圖二所示)。在 *STE12a* 基因方面，亦在進行選殖與解序後，發現限制酶 *HinfI* 為可能之酶切酵素。酵解結果顯示，此酵素亦可以同時區分出 *STE12a* 在血清型 B, C, D 之增幅片段，其大小約為：血清型 B：530 bp、253 bp、27 bp（其中 27 bp 片段在 2% 洋菜膠體電泳分析之下無法觀察到）；血清型 C：389 bp、274 bp、141 bp；血清型 D 則仍維持增幅後 810 bp 之長度(如圖二所示)。目前初步結果顯示，利用專一性引子對 WC53 WC54，WC64 WC65 進行增幅並佐以限制酶 *KpnI* 及 *HinfI*，可成功鑑別出隱球菌四種血清型及交配型。

而為能針對未知菌株，以單一 PCR 反應快速檢測出其血清型與交配型，吾人亦以血清型 A、B、C 及 D 之 *MAT α* 及 *MATa* 菌株 genomic DNA，以四個混合 PCR 引子 WC53、WC54、WC64 及 WC65，進行 *STE12 α* 與 *STE12a* 之專一性增幅反應。結果顯示，兩組 PCR 引子對不會互相干擾，仍可增幅出專一性鑑別產物(結果如圖 3 所示)，故可混合所有試劑於單一 PCR 反應管中，進行未知菌株之鑑定。

4. 核酸分離方法之測試

在核酸分離方法上，已利用冷凍乾燥或液氮處理等方法，成功分離出高品質與產量之核酸 (DNA 與 RNA)，可應用於後續之相關菌株病原性及基因表現差異性等之研究。

陸、結論與建議

91年度本計劃執行上，有三項主要目標，一為國際及國內臨床與環境菌株之收集，二為隱球菌標準分析方法之建立，三為隱球菌亞種或血清型標準分子檢測技術流程之建立。針對第一項目標，目前收集共國際及國內菌株165株，其中相當比例為臺大醫院感染科張上淳主任及陳宜君醫師提供之臨床菌株，目前已完成大部份菌株血清型之鑑定，並將持續完成所有菌株血清型之鑑定。未來計劃之重點，乃進行菌株之分子分群，以了解國內隱球菌在流行病學及生態學上之意義及與國際菌株之異同。而第二項目標，乃為因應部分菌株之分析，目前亦已完成大部分方法之建立，唯病原性突變株技術，因無植物基因槍轉殖系統(Bio-Rad)可供測試及調整，一直無法進行，所幸經調整個人計劃經費，終於日前完成採購，以及突變株構築方法的建立。未來應可進行基因轉殖技術測試及突變株構築方法的建立。另外，病原性測試之動物實驗，亦將配合相關管理辦法之要求，進行硬體設備之建立，以應未來需要。針對第三項目標，目前利用STE12基因，經專一性之PCR增幅反應及二種不同限制酶酵素的酶切，已可相當成功地區分四種血清型及交配型，唯此結果乃僅針對少數測試菌株，故仍

須進行大量菌株之測試，以確立其可行性。此外，PCR敏感度之測試，以及發展以培養之菌液直接進行PCR反應，及其穩定性與再現性之測試，仍有待後續實驗完成。

本年度計劃已累積部分成果，相信若可獲得有關單位之持續支持，應可作為下年度計劃執行之基礎，而整個計劃之成果，也能提供對國內隱球菌在流行病學及生態學上有更深的了解。

柒、参考文献

Aoki FH, Imai T, Tanaka R, Mikami Y, Taguchi H, Nishimura NF, Nishimura K, Miyaji M, Schreiber, AZ and Branchini, MLM: New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *J Clin Microbiol* 1999; 37:315-20.

Brant ME., Hutwagner LC, Kuykendall RJ, Pinner RW, and The Cryptococcal Disease Active Surveillance Group: Comparison of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1890-95.

Casadevall A, and Perfect JR: *Cryptococcus neoformans*. *ASM Press* Washington, D. C. 1998.

Chang YC, and Kwon-Chung KJ: Complementation of a capsule-deficiency mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* 1998; 14:4912-19.

Chang YC, Penoyer LA, and Kwon-Chung KJ: The second STE12 homologue of *Cryptococcus neoformans* is *MATa*-specific and plays an important role in virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:3258-63.

Chaturvedi S, Hamilton A J, Hobby P, Zhu G, Lowry CV, and Chaturvedi V:

Molecular cloning, phylogenetic analysis and three-dimensional modeling of Cu, Zn superoxide dismutase (*CnSOD1*) from three varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Gene* 2001; 268:41-51.

Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, McClelland CM, Wickes BL, and Chaturvedi V: Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* *MAT* and *MATa* pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2007-09.

Chen YC, Chang SC, Shih CC, Hung CC, Luh KT, Pan YS, and Hsieh WC: Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36:175-83.

Clarke D L, Woodlee G L, McClelland C M, Seymour T S, and Wickes BL: The *Cryptococcus neoformans* *STE11alpha* gene is similar to other fungal mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) genes but is mating type specific. *Mol Microbiol* 2001; 40:200-13.

Cox G M, McDade H C, Chen SCA, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell TC, Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum M A, and Perfect JR: Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2001; 39: 166-75.

Cruz MC, Cavallo LM, Gorfach JM, Cox G, Perfect JR, Cardenas ME, and

Heitman J: Rapamycin antifungal action is mediated via conserved complexes with *FKBP12* and *TOR* kinase homologs in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* 19:4101-12.

Davidson R C, Moore TD, Odom AR, and Heitman J: Characterization of the *MFalpha* pheromone of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2000 38:1017-26.

Edman JC, and Kwon-Chung KJ: Isolation of the *URA5* gene from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and its use as a selective marker for transformation. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4538-44.

Ellis DH, and Pfeiffer TJ: Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1642-44.

Emmons CW: Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg* 1955; 62:227-32.

Franzot SP, Fries BC, Cleare W, and Casadevall A: Genetic relationship between *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* strains of serotypes A and D. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2200-04.

Franzot SP, Salkin IF, and Casadevall A: *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37:838-40.

Halliday CL, Bui T, Krockenberger M, Malik R, Ellis DH, and Carter DA: Presence of and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2920-26.

Heitman J, Casadevall A, Lodge JK, Perfect JR: The *Cryptococcus neoformans* genome sequencing project. *Mycopathologia* 1999; 148:1-7.

Hsu MML, Chang CJ, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M: Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* isolated in Taiwan. *Mycopathologia* 1994; 125:77-81.

Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L: Antigenic chracterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1982; 16:22-29.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE: High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zentralbl Bakteriol Hyg A* 1984a; 257:213-18.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE: Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984b; 120:123-30.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Rhodes JC: Taxonomic studies on *Filobasidiella* species, and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek* 1982; 48:25-38.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Theodore TS: *Cryptococcus neoformans* sp. nov.: serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. *Int J Syst Bacteriol* 1978; 28:616-20.

Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wicks BL: Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1992; 60:602-05.

Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE: Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* (serotype B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15:535-37.

Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen W-C, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J: Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Micorbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:746-85.

Lengeler KB, Wang P, Cox GM, Perfect JR, Heitman J: Identification of the *MATa* mating-type locus of *Cryptococcus neoformans* reveals a serotype A *MATa* strain thought to have been extinct. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:14455-60.

McClelland CM, Fu J, Woodlee GL, Seymour TS, Wicks BL: Isolation and characterization of the *Cryptococcus neoformans* *MATa* pheromone gene.

Genetics 2002; 160:935-47.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrel TC: Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999; 20:1790-99.

Nosanchuk JD, Rudolph J, Rosas AL, Casadevall A: Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. *Infect Immun* 1999; 67: 5477-79.

Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect JR, Heitman J: Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 1997; 16:2576-89.

Perfect JR, Ketabchi N, Cox GM, Ingram CW, Beiser CL: Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1993; 31:3305-09.

Perfect JR, Magee BB, Magee PT: Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulse field gel electrophoresis. *Infect Immun* 1989; 57:2624-27.

Rhodes JC, Polacheck I, Kwon-Chung KJ: Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1982;

36:1175-84.

Rose MD, Winston F, Heiter P: *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1990.

Salkin IE, Hurd NJ: New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs. *J Clin Microbiol* 1982; 15:169-71.

Schmeding KA., Jong SC, Hugh R: Sexual compatibility between serotypes of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). *Curr Microbiol* 1981; 5:133-38.

Shadomy HJ, Wood-Helie S, Shadomy S, Dismukes WE, Chau RY, the NIAID Mycoses Study Group: Biochemical serogrouping of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 6:131-38.

Vartivarian SE, Anaissie EJ, Cowart RE, Sprigg HA, Tingler MJ, Jacobson ES: Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis* 1993; 167:186-90.

Viviani MA, Wem H, Roverselli A, Caldarelli-Stefano R, Cogliati M, Ferrante P, Tortorano AM: Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. *J Med Vet Mycol* 1997; 35:355-60.

Wang P, Perfect JR, Heitman J: The G-protein beta subunit GPB1 is required for mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* 2000; 20:352-62.

Wickes BL, Edman U, Edman JC: The *Cryptococcus neoformans* *STE12* α gene: a putative *Saccharomyces cerevisiae* *STE12* homologue that is mating type specific. *Mol Microbiol* 1997; 26: 951-60.

Wickes BL, Maryorga ME, Edman U, Edman JC: Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the α -mating type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:7327-31.

Wickes BL, Moore TDE, Kwon-Chung KJ: Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 1994; 140:543-50.

Williamson PR: Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol.* 1994; 176:656-64.

Yue C, Cavallo LM, Alspaugh JA, Wang P, Cox GM, Perfect JR, Heitman J: The *STE12* α homolog is required for haploid filamentation but largely dispensable for mating and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 1999; 153:1601-15.

捌、圖

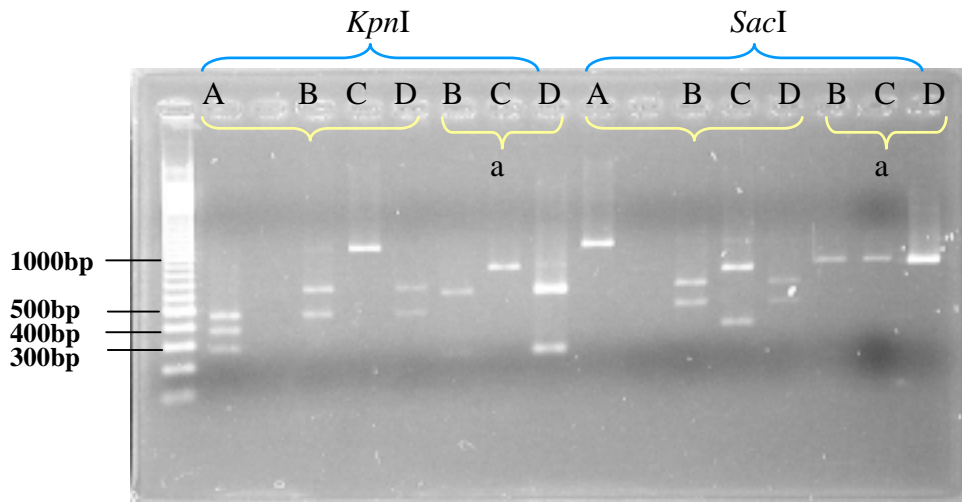


Fig. 1. *STE12* 基因 PCR 片段限制酶酵素切割圖譜。血清型 A、B、C 及 D 之 *MAT α* 菌株 genomic DNA，以 PCR 引子對 WC53 及 WC54 進行 *STE12 α* 增幅反應，佐以限制酶酵素 *kpnI* 及 *SacI* 切割之圖譜。血清型 B、C 及 D 之 *MAT α* 菌株 genomic DNA，以 PCR 引子對 WC64 及 WC65 進行 *STE12 α* 增幅反應，佐以限制酶酵素 *kpnI* 及 *SacI* 切割圖譜之電泳分析結果。

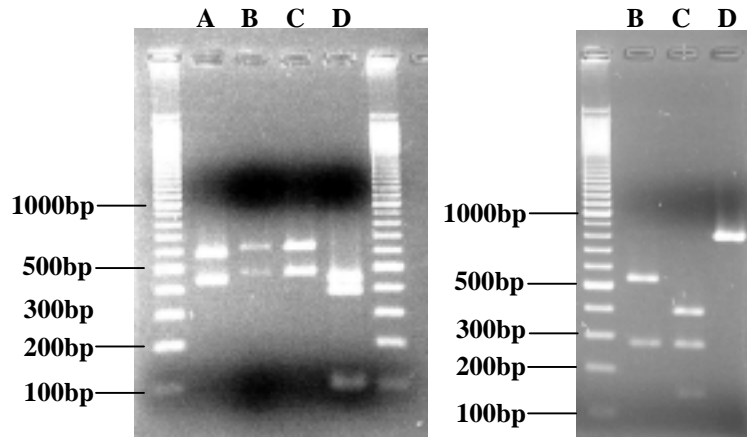


Fig.2. *STE12* 基因 PCR 片段限制酶酵素切割圖譜。左，血清型 A、B、C 及 D 之 *MAT α* 菌株 genomic DNA，以 PCR 引子對 WC53 及 WC54 進行 *STE12 α* 增幅反應，佐以限制酶酵素 *HinfI* 切割之圖譜。血清型 B、C 及 D 之 *MAT α* 菌株 genomic DNA，以 PCR 引子對 WC64 及 WC65 進行 *STE12 α* 增幅反應，佐以限制酶酵素 *HinfI* 切割圖譜之電泳分析結果。

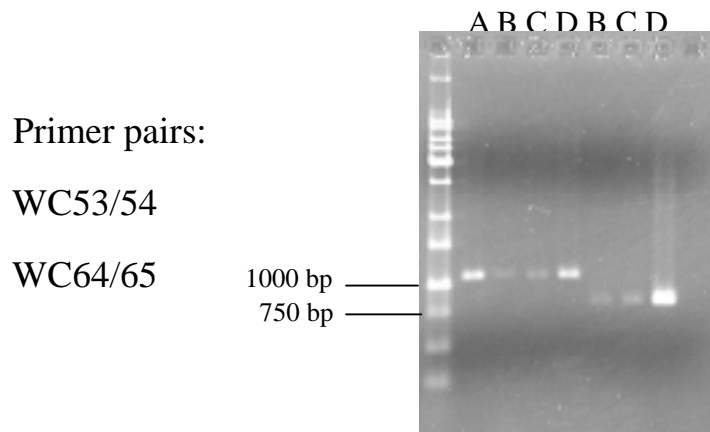


Fig. 3. *STE12* α 及 *a* 基因混合 PCR 引子 WC53、WC54、WC64 及 WC65 專一性增幅反應測試。血清型 A、B、C 及 D 之 *MAT* α 及 *a* 菌株 genomic DNA，以混合 PCR 引子 WC53、WC54、WC64 及 WC65 進行 *STE12* α 與 *STE12a* 專一性增幅反應之電泳分析結果。

玖、表

Table 1. 隱球菌相關基因序列及文獻一覽表

基因名稱	血清型	序列長度 (bp)	來源	相關文獻
STE12 α	A.	3162	GenBank	Yue,C. et. al. 1999
	B	1086*	本計畫選殖解 序	
	C	1086*	本計畫選殖解 序	
	D	3798	GenBank	Wickes,B.L et al 1997
STE12a	B	810*	本計畫選殖解 序	
	C	810*	本計畫選殖解 序	
	D	3000	GenBank	Chang,Y.C 2001
GPB1	A	2131	GenBank	Wang,P. et.al. 2000
	D	4376	本實驗室 Unpublished data	

STE20a	A	1824	GenBank	Lengeler,K.B. et. al. 2000
	D	2078	GenBank	Lengeler,K.B. et. al. 2000
STE20 α	A	2430	GenBank	Lengeler,K.B. et. al. 2000
	D	2861	GenBank	Lengeler,K.B. et. al. 2000
URA5	A	777*	GenBank	Franzot,S.P. et. al 1998
	C	779*	GenBank	Casadevall,A et. al.
	D	2029	GenBank	Edman,J.C. et al 1990
SOD1	A	1062	GenBank	Chaturvedi,S 2001
	B	1824	GenBank	Chaturvedi,S 2001
	D	1915	GenBank	Chaturvedi,S 2001
PLB1	A	2221	GenBank	Cox,G.M. 2001
	B	1905	GenBank	Latouche,G.N.
	C	2239	GenBank	Latouche,G.N.
	D	2212	GenBank	Varma,A.
CAP59	D	1641	GenBank	
Laccase	A	562*	GenBank	Patter,R.
	B	567*	GenBank	Chaturvedi,V
	C	559*	GenBank	Chaturvedi,V

	D	3821	GenBank	Williamson,P.R. 1994
CPR α 1	D	1326	GenBank	Chang,Y.C
STE11 α	D	3996	GenBank	Clarke,D.L. 2001
MF α 1	D	128	GenBank	McClelland,C.M. 2002
MF α 2	D	128	GenBank	McClelland,C.M. 2002
MF α 3	D	128	GenBank	McClelland,C.M. 2002
MF α 1	D	116	GenBank	Davidson,R.C. 2000
MF α 2	D	116	GenBank	Davidson,R.C. 2000
MF α 3	D	116	GenBank	Davidson,R.C. 2000
CPR α 1	D	1321	GenBank	Karos,M
TOR1	A	8440	GenBank	Cruz,M.C. 1999
	D	3249	GenBank	Cruz,M.C. 1999

*者代表部分序列