

一、背景介紹：

革蘭氏陰性致病菌(gram-negative bacteria)普遍存在於動植物之中，如：沙門氏桿菌、霍亂弧菌、淋病雙球菌等會使動物致病，這些動物致病菌的致病機轉，首先透過纖毛附著在動物宿主細胞，當細菌複製達到一定量時就會分泌一些蛋白質，而這些蛋白質可能是毒素或是一些酵素會傷害宿主細胞，進而使宿主致病。在植物方面的致病菌，例如：本論文實驗所研究的對象--十字花科黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)，是革蘭氏陰性致病菌，主要引起十字花科黑腐病。黑腐病菌可經由植物傷口感染，分泌一些酵素或蛋白質，以利其由植物導管蔓延擴散。在此期間黑腐病菌會產生胞外黏多醣(exopolysaccharide)，造成導管水分輸送發生問題，葉片逐漸枯黃，接著使得植物莖部、葉面出現黑點及腐化現象，導致植物的枯黃壞死(Swings and Civerolo, 1993)。由上述可知研究革蘭氏陰性致病菌的蛋白分泌機制，對於治病機制與防治可能會有很大的幫助。

一般來說，革蘭氏陰性菌的細胞膜結構比革蘭氏陽性菌複雜，有兩層膜，稱為內胞膜(inner membrane)、外胞膜(outer membrane)以及內、外胞膜之間的膜外漿質(periplasm)，因此革

蘭氏陰性菌的分泌系統較革蘭氏陽性菌複雜。在革蘭氏陰性菌中，要分泌的蛋白質首先會在胞內合成，接著會通過內、外膜，將蛋白質分泌到胞外。而分泌性蛋白質穿過內、外膜主要分成三種方式(Salmond and Reeves, 1993; Wandersman 1992)。

第一型分泌模式 (The type I secretion pathway)，又稱為 Sec-independent pathway，被分泌的蛋白質其 N 端不具有典型的 signal peptide，分泌過程中，不需要透過 Sec 蛋白系統幫助，其分泌機制是由數個蛋白組成一個橫跨內、外膜的分泌通道，只須經由單一步驟，即可將被分泌的蛋白自胞內不經由膜外漿質，而直接通過內、外膜到達胞外。以大腸桿菌(*Escherichia coli*) 的溶血素(haemolysin,HlyA)為典型的例子(附錄一)，其分泌過程是由 HlyB、HlyD 及 TolC 三者橫跨在內、外膜之間，形成一個蛋白複合體的分泌通道，使的 HlyA 直接經由此通道分泌到胞外(Holland *et al.*, 1990; Wandersman and elepelaire, 1990;Fath and Kolter, 1993)。除此之外，還有一些細菌的胞外蛋白也屬於此分泌機制,如:*Pseudomonas aeruginosa* 的 alkaline protease *Erwinia chrysanthemi* 的 protease、*Bordetella pertusis* 的 cyclolysin、*Pasteurella haemolytica* 的 leucotoxin。

第二種分泌模式(The type II secretion pathway)(附錄二)，又稱

為一般分泌途徑(general secretory pathway; GSP), 常見於革蘭氏陰性菌的分泌系統。被分泌的蛋白具有 signal peptide, 須經由二個階段將被分泌的蛋白分泌到胞外, 第一階段分泌性蛋白質必須藉由內膜分泌系統從內膜到達膜外漿質, 接著第二階段藉由外膜分泌系統將分泌性蛋白質從膜外漿質穿過外膜到達胞外。

關於內膜分泌系統在 1980 年代就已開始研究了, 其大致機制為: 當分泌性蛋白質被合成後, 會和具有 chaperone 功能的 SecB 結合形成一個複合體, 而這個分泌性蛋白質 N 端 signal peptide 會被切割, 接著這個複合體會被帶到內膜並和內膜上的 SecA 結合, SecA 具有 ATPase 活性, 所以能水解 ATP 產生能量, 使得分泌性蛋白能通過由 SecE、SecG 和 SecY 所形成的通道而分泌到膜外漿質, 當分泌性蛋白到達膜外漿質後, 接著必須藉由外膜分泌系統才能通過外膜到達胞外, 此步驟又稱為 The main terminal branch (MTB) of the general secretory pathway (GSP) (Wickner *et al.*, 1991; Pugsely, 1993; Pugsely *et al.*, 1997; Russel, 1998)。外膜分泌系統的研究開始於 1990 年, 從法國學者 Pugsley 研究 *Klebsiella oxytoca* 所調控 pullulanase 的分泌實驗中發現, 至少有 14 個基因參與 pullulanase 的分泌, 其根據英文順序來命名, 依序為 *pulS* 和 *pulC-O* (Pugsley *et al.*, 1990)。隨後陸續在其他種革蘭氏陰性菌中亦分離到類似的基因組, 如: *Erwinia*

carotovora 之 *outC-O* 基因組 (Reeves et al., 1993)、*Pseudomonas aeruginosa* 之 *xcpQ-Z* 及 *xcpA* 基因組 (Akrim et al., 1993; Bally et al., 1992)、*Vibrio cholerae* 之 *epsC-N* 基因組 (Filloux et al., 1990) 及 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 之 *xpsD-N* 基因組 (Dums et al., 1991; Hu et al., 1992) 等。

第三種分泌模式(The type III secretion pathway)，分泌途徑與第一種分泌途徑類似，其分泌性蛋白的 N 端不具有典型的 signal peptide，分泌過程中，不需要透過 Sec 蛋白系統幫助，也不須停留於細胞漿質，所以分泌的胞外蛋白可直接由菌體內送達宿主細胞的細胞質中，又稱為 contact site-dependent pathway，典型的例子是動物性病原菌(*Yersinia enterocolitica*)所合成的分泌型 Yop 蛋白(Charkowski et al., 1997)。

十字花科黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)是一種革蘭氏陰性菌，是引起十字花科黑腐病的病原菌，會分泌許多與致病性相關的胞外酵素，例如：澱粉酵素 (α -amylase)、果膠酵素 (polygalacturonate lyase)、蛋白水解酵素 (protease)、及纖維酵素 (cellulase) 等，這些酵素都是以第二型分泌模式被分泌到胞外。在過去幾年來，Dums 等人(1991)與 Hu 等人(1992)先後發現參與這些胞外酵素分泌到胞外的基因，Hu 等人的研究

是將 Tn5 插入染色體破壞宿主分泌功能,接著再利用 DNA 片段進行互補實驗,結果成功地從十字花科黑腐病菌中,分離到一段與胞外蛋白分泌有關的 DNA 片段,約 12Kb 長,經由核甘酸定序分析後,發現此 DNA 片段中含有 11 個首尾相連的 open reading frames(ORFs),其胺基酸序列和負責 *K. oxytoca* 之 pullulanase 分泌的第二步驟所必須的 13 個 Pul 蛋白中的 11 個蛋白的胺基酸序列有 39%--65% 的相似性,依其基因轉錄方向,依序命名為 *xpsE*、*F*、*G*、*H*、*I*、*J*、*K*、*L*、*M*、*N* 及 *D* (Dums *et al.*, 1991 ; Hu *et al.*, 1992)。

在這些參與外膜分泌系統的蛋白質成員中, GspD 蛋白是唯一位於外膜上的蛋白,因此被認為很可能在外膜上形成通道,提供被分泌的蛋白通過外膜到達胞外。Filamentous phage f1 pIV 在蛋白質胺基酸序列上與 GspD 蛋白 C 端有很高的同源性,在自然情況下是由 10-14 個次單元所組成的複合體(Kazmierczak *et al.*, 1994), 其功能被認為是在外膜上形成通道,讓成熟的 phage 通過,到達胞外(Russel, 1994 ; Russel, 1995)。在 1996 年 Chen 等人將 *Xanthomonas campestris* XpsD 蛋白分成 N 端與 C 端兩部分,並作一系列的刪除突變,然後分析突變蛋白的分泌功能以及干擾實驗,結果發現 C 端刪除會使得複合體無法形成,因此

推論 XpsD 蛋白的 C 端與複合體形成有關(Chen, L-Y., et al.,1996)

最近的研究報告指出，XpsD 蛋白的 C 端會經由蛋白質水解 (proteolysis) 的作用之後，形成一個穩定的片段，而這個片段是由兩個環狀結構堆疊而成，中間會被包圍而形成一個通道，但是周圍並沒有其他蛋白包圍在外頭，看起來像一個原始型的複合體，而 N 端的部份會在 C 端蛋白形成原始型的複合體之後，往中央通道部分摺疊回去，所以在平常時這個通道會是關閉的 (Nouwen, N., et al., 2000)。某些菌的 GspD 蛋白的穩定性與脂蛋白 GspS 蛋白有關，一旦 GspS 蛋白和 GspD 蛋白的 C 端結合後即可保護 GspD 蛋白被分解的命運(Koster, M., et al. 1997; Shevchik, V. E., et al, 1997)。但是 GspS 蛋白與 GspD 蛋白複合體形成無關(Koster, M., et al. 1997)。在最近的研究中發現，在 *Klebsiella oxytoca* 中，PulD 會和 PulS 形成一個 complex，而且已經被純化出來，在電子顯微鏡下發現這個 complex 是個圓柱形，直徑大小約 7.6nm，而 PulS 是以輻射狀包在 PulD 的周邊 (Nouwen, N., et al., 1999)。目前在 *Xanthomonas campestris* 中尚未發現 *xpsS* 基因。在免疫共沉澱的實驗結果中發現，XpsN 會和 XpsD 有 coprecipitation 的現象，如果將 XpsD 接上 (His)₆-tag，再利用 metal affinity chromatography column 去純化，

結果發現，XpsN 也會被一起被純化出來，所以推測 XpsN 會和 XpsD 形成一個 complex (Lee, H.-M., *et al.*,2000)

GspO 是一種內膜蛋白，同時具有 prepilin peptidase 和 N-methyltransferase 的活性(Hardie, K. R., *et al.*, 1996; Shevchik, V. E., *et al.*, 1997; Bally, M., *et al.*, 1991)。在蛋白結構上具有兩個相鄰的 cystein rich 高度保留的 motif，motif 中的 cystein 對於 peptidase 和 N-methyltransferase 的活性是必須的，而另一個高度保留的 glycine 對於 N-methyltransferase 的活性也是必須的。在 *P. aeruginosa*，XcpA/PilD(GspO family)蛋白，與纖毛的成熟有關。PilA 纖毛前驅物的 N 端有 leader sequence，其中在切割點部分是由六個高度保留的胺基酸(Gly-Phe-X-X-X-Glu)所組成，prepilin peptidase 會將 Gly-Phe 之間的 peptide bond 水解，而切割點下游的第一個胺基酸 phenylalanine 會被甲基化，因而產生成熟的 PilA 纖毛(Bally, M., *et al.*, 1991)。

從胺基酸序列得知，在 Gsp 蛋白中，GspE 蛋白是唯一沒有厭水區域的蛋白(Forest, K. T., *et al.*, 1997)，GspE 蛋白也是一種內膜蛋白，必須專一性的和 GspL 蛋白結合才能穩定的附著在內膜上(Sandkvist *et al.*, 1995; Ball *et al.*, 1999)。1993 年有報告指出：GspE 蛋白的一級結構中具有 nucleotide-binding domain，若將其

進行定位突變，結果發現蛋白分泌會受到限制(Possot, O. et al., 1994)，至於 GspE 蛋白是否直接或間接需要藉由水解 ATP 產生能量，而促使蛋白分泌？則有待實驗證實。在 1995 年便有研究報告提出：若將 GspE 蛋白做成重組蛋白，探討 GspE 蛋白是否有 ATPase 或 Kinase 的活性，結果發現 GspE 蛋白具有 autokinase 的活性，也就是可以自己磷酸化(autophosphorylation)(Forest, K. T., et al., 1997)。

GspC、F、L、M、N 都是一群內膜蛋白，利用 Alkaline phosphatase 或 β -lactamase topological probes 分析，結果顯示 GspC、M 蛋白的 C 端可以伸展到膜外漿質，而 GspL 蛋白的 N 端位於細胞質(Turner, L. H., et al., 1993)。GspF 蛋白具有三個 transmembrane domain，但蛋白絕大部分區域是朝向細胞質的；GspK、L、M、N 蛋白則推測是穿過內膜一次的蛋白；當 *gspL* 突變時，GspM 蛋白則無法被偵測到，相反的，當 *gspM* 突變時，GspL 蛋白的量會下降，呈現不穩定的狀態，而當 *gspL* 與 *gspM* 基因同時存在時，GspM 和 GspL 蛋白則會穩定存在，顯示 GspM 和 GspL 蛋白間有交互作用(Michel *et al.*, 1998)，若用免疫共沉澱方式也可以偵測到 GspM 和 GspL 蛋白為一複合體(Sandkvist *et al.*, 1999)。

GspG、H、I、J 蛋白，根據同源比對的結果發現和纖毛 PilA 有結構相似的特性：1. N 端具有可被 signal peptidase 切斷的 signal peptide，被切斷的 signal peptide 的第一個胺基酸會被甲基化（在十字花科黑腐致病菌中為 methionine，在其他革蘭氏陰性菌中視 phenylalanine）；2. N 端具有高度厭水區（約 20-30 個胺基酸所組成）。為了和 PilA 組成的纖毛（type IV pilus）區別，一般稱 GspG、H、I、J 蛋白為 pseudopilins。有關纖毛的結構分析，在淋病雙球菌纖毛的結晶立體分析結果可看出：纖毛會組成多功能的 pilus，而且會由 α - β roll 形成一個約 85 Å 的 α -helical，形狀類似針狀一樣，同時也有一個 O-linked 的 disaccharide。Pilin 的表面是屬於疏水性的區域，根據 X 光繞射分析、電子顯微鏡觀察、分子鍵結長度計算的分析，結果發現纖毛是由五個單體所組成，五個單體構成類似冰淇淋尖尖的筒子，約 5000-6000 個筒子套起來之後即為纖毛的構造（Parge, H. E., et al., 1995）。在 *P. aeruginosa* 中，pre-pilin peptidase, PilD(XcpA)，對 pre-pilin 的成熟有關，在第二型分泌機制中也是必須的，這項發現對於 type IV pili 和 *P. aeruginosa* type II secretion pathway 有緊密關係的想法提供了一個強而有力的證據（Fernandez, L. A., et al., 2000）。在 *P. aeruginosa* 中，大概有 30 種基因已經被發現和 type

IV pili 的形成有關 , *pilA-D* 基因主要是形成 pilin(PilA)以及三個輔助蛋白 : PilB, 是一個 cytoplasmic 蛋白 , 具有 ATP binding motif ; PilC, 是一個內膜蛋白 ; PilD、 *fimT*、 *fimU*、 *pilV*、 *pilE* 其基因產物具有 pseudopilin 的特性 , 可能扮演類似纖毛組裝過程的角色(Alm, R. A., et al., 1995 ; Fernandez, L. A., et al., 2000)。

pilM、 *N*、 *O*、 *P*、 *Q* 的基因產物則位在內膜和外膜 , 和纖毛組裝有關 (Fernandez, L. A., et al., 2000)。 若將 *Klebsiella oxytoca* 中參與 pullulanase 分泌的 15 個基因 , 在 *E.coli* 中將這些基因置於 high copy number 的 plasmid 中表現 , 結果發現 , 只有 PulG 會組合形成 pilus-like 的 bundle , 因此推測 PulG 可能是形成 pilin 的主要物質 (Sauvonnet, N., et al., 2000)。 而 PulH、 PulI、 PulJ 和 PulK 可能就是形成 pilin 的次要物質了。 其中 PulI 在 pilus 組裝的過程以及在其結構上是必須的 , 也許 PulI 的功能是 polymerization 的起始者 , 也有可能是協助 pilin 站在細胞的 envelope , 而其他的 pseudopilin 主要的功能是和 pullulanase 的分泌有關 , 也許也會參與 pilus/pseudopilus 的組裝 (Sauvonnet, N., et al., 2000)。

GspK 蛋白 , 雖然在 prepilin peptidase 切割點下游第一及第五個胺基酸不是 phenylalanine 及 glutamate , 但由於 prepilin

peptidase 會認識切割點上游的 glycine , 而且 phenylalanine 對纖毛前驅物的甲基化及纖毛的組裝沒有影響 (Pugsley, A. P., 1996)。 1998 年有研究報告指出 , 在 *P. aeruginosa* XcpX(GspK family)蛋白利用定點突變將 Glycine 以 Valine 取代 , 結果造成 PilD 無法認識切割點 , 導致切割功能喪失 , 使得蛋白分泌受阻 , 所以推測 XcpX(GspK family)是第五個 pseudopilin(Pugsley, A. P., 1996)。

GspG、 H、 I、 J 蛋白由於其 N 端和 type IV pilin 有高度同源性的 signal peptide , 因此被推測可能會形成 pilin-like 的構造 , 以連接其他重要的蛋白 , 其可能的功能是形成一個骨架 (scaffold), 以提供分泌系統中其他蛋白進行組裝 , 或是指引被分泌的蛋白通過外膜 (Nunn and Lory, 1993 ; Hobbs and Mattick, 1993), 然而此類結構至今仍未被證實出來。 Pugsley 在 *Klebsiella oxytoca* 中利用 cross-linking 實驗 , 發現膜蛋白 PulG 可以形成 homodimer , 之後在 *in vivo* cross-linking 實驗 , 發現許多 GspG 蛋白 (PulG、 XcpT、 OutG) 也可以形成 multimer , 因此推測 GspG 蛋白似乎具有形成 multimer 的能力 (Storm, M. S., *et al.*, 1993 ; Parge, H. E., *et al.*, 1995) 若將 XcpT-W 表達在含 histidine 的載體 , 通過 nickel-affinity chromatography 純化 , 利用西方點

墨法分析，結果發現 XcpT 蛋白可以和自己(XcpT)或 pseudopilin 中任何一個蛋白 (XcpU-W) 形成 dimer 的現象，顯示這四個蛋白 (pseudopilin) 彼此之間有可能形成 multisubunit complex。在菌體內，GspGHIJ 的量並不相同，其中 XcpU-W(GspH-J)蛋白含量較少，約佔 XcpT(GspG)蛋白量的 25%~6.25%。因此，GspGHIJ 甚至包括 GspK，在細胞中是如何相互作用，彼此間相互的影響為何？均可能是極為複雜的主題。

為了想探討在十字花科黑腐致病菌中，XpsG-J 蛋白彼此之間是否會有 interaction？是否也會有 pilin-like 構造的形成？所以構築了二個重組蛋白表現載體各為 pET-Hc 與 pET-Ic，並且分別送入宿主細胞大腸桿菌 BL21(DE3)中表現蛋白，並純化出重組蛋白，利用此重組蛋白製作抗體，再配合膠質篩濾層析、離子交換樹脂層析，來探討 XpsH 是否也會形成 multimer？並了解 XpsG、H、I 是否有 interaction？另外，以定點突變法檢查 XpsG 蛋白幾個高度保留的胺基酸 aspartate 是否對 XpsG 蛋白的分泌功能具有必要性。

二、實驗材料與方法：

菌種與抗體：

(1)菌種:XC1701 為野生株,XC1713 為 *xpsG* 基因缺陷的突變株, XC1717 為 *xpsH* 基因缺陷的突變株 (上述菌株均由中興大學生化所胡念台教授提供) , XC1717(pFG)為 *xpsH* 基因缺陷, 但 *xpsG* 基因大量表現的菌株, XC1713(pFH)為 *xpsG* 基因缺陷, 但 *xpsH* 基因大量表現的菌株。

(2)*XpsG* 抗體：由孟訓學長於碩士班期間製備完成。

方法：

1. 聚合酶連鎖反應：

在 100 μ l 的反應體積中, 各加入 2 μ l (50 μ mol)的一組 primer 及 pDBKN1 DNA template(pDBKN1 DNA 為胡念台教授的實驗室所提供, 此 plasmid DNA 包括了 *XpsG*、*H*、*I*、*J* 的基因段), 8 μ l(1.25mM)dNTP, 10 μ l 的 10X Taq polymerase buffer, 0.5 μ l Taq polymerase 及 10% DMSO, 最後加水使總體積成為 100 μ l。反應條件為：94 denature 1 分鐘；52 annealing 1 分鐘；72 extention 2 分鐘；如此反應 35 個循環。所得產物, 利用含有 Ethidine Bromide 的 1% 洋菜膠分析。

2. 重組表現質體之構築：

將 *XpsH*、*I* 之 PCR 產物以 DNA Extraction Kit 純化後, 以限制

酶 *Bam*HI/*Sal*I 切割後，分別插入已經 *Bam*HI/*Sal*I 切割過的載體 pET32a 中，接入時利用 T₄ DNA Ligase 在 16℃ 下進行接合反應 4 小時，並以轉型作用將已接入的重組表現質體送入 JM109 細胞中增殖，並進一步培養以篩選正確的質體 DNA。

3. 抗體製作：

XpsH 或 XpsI 的抗體是設計 primer 以 PCR 將 *xpsH I* 的 DNA 分別放大，再利用 *Bam*HI、*Sal*I 切割 PCR 產物，並接入 pET32a 質體上，於宿主細胞 BL21 內加入 IPTG 使其最終濃度為 2mM 誘發蛋白表現 4-5 小時後，將細胞打破，此時表現蛋白的 NH₂-端含有(His)₆，因此可利用 Ni-NTA column 純化。純化出的蛋白以 Bradford 測其濃度後，將其定量為 0.5mg/ml(其中含等體積的 adjuvant complete freund)，以皮下注射方式注入兔子，二週後再以 250μg 抗原與 adjuvant incomplete freund 混合均勻後做第二次免疫，一個月後抽取血液並收集離心後之上清液即為抗體。

4. 抗體純化：

XpsI 部分：(中山醫學院生化所 謝易修老師技術指導)

先將 Ab I antigen resin packing 在 open column 中，先以 50mM NaCl-phosphate pH 8.0, 300mM NaCl buffer 平衡 column，然後將 Ab I loading 到 resin 上，4 反應隔夜後，收 flowthrough 部分，並

以 0.1M Gly-HCl pH 2.8 buffer elution , 每管收 1 ml , 並加入 60 μ l Tris-HCl pH 8.0 buffer 中和 pH。

XpsH 部分 : (材料由中興大學農科所 呂維茗老師提供)

先將待純化的 Ab H 抗體和 CNBr-pET32a resin 4 反應隔夜或在室溫下反應一至二小時 , 低速離心 (1500rpm) 約 1-2 分鐘 , 取上清液和 CNBr-XC17433 resin 4 反應隔夜或在室溫下反應一至二小時 , 低速離心 (1500rpm) 約 1-2 分鐘 , 取上清液 , 此上清液即是純化後的抗體。

5. 西方點墨法 : (Western Blot)

13.8 % SDS-PAGE

- (1) Sample: 加入 SDS-PAGE buffer 後 , 在 loadind 到 polyacrylamide gel 之前先煮沸 5 分鐘 , 使蛋白變性 , 用 120V 跑上層 stacking gel , 下層 resolving gel 則改成 150V。
- (2) Wash: 將跑完電泳之 gel , 浸泡 50ml blotting buffer , 再室溫溫和震盪十分鐘 , 重複二次。
- (3) Transfer: 將 gel 緊貼於 PVDF 上 , 置於 mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad) , 100V , 通電一小時。 (PVDF 使用前處理 : 將 PVDF 浸泡再適量甲醇中約十秒 , 接著再用二次水洗去甲醇 , 並再室

溫中震盪五分鐘，最後將 PVDF 浸泡再 blotting buffer 至少十分鐘。)

- (4) Blotting: 將 PVDF 浸泡於 50ml TBS buffer (含 3 % skim milk)，室溫下溫和搖晃至少三十分鐘或 4 放置過夜。
- (5) 1st-Ab: 將 PVDF 置於塑膠袋中，加入 5ml TBS buffer (含 1 % skim milk)，再加入 2 μ l XpsG Ab(1/2500)或 25 μ l XpsH Ab(1/250)或 5 μ l XpsI Ab(1/1000)，將塑膠袋密封，室溫搖晃至少一小時。
- (6) wash: 以 50ml TBS buffer 浸泡 PVDF，室溫溫和搖晃至少十五分鐘，洗三次。
- (7) 2nd-Ab: 將 PVDF 置於塑膠袋中，加入 5ml TBS buffer (含 1 % skim milk)，再加入 1.7 μ l anti-rabbit Ab(1/3000)，將塑膠袋密封，室溫搖晃一小時。
- (8) wash: 重複 step 6。
- (9) 呈色：使用 ECL Western blotting Kit，先將第一劑與第二劑以 1：1 的比例加入盒中，再將 PVDF 放進盒內，室溫下均勻反應一分鐘，再以 X 光片感光呈色。

6. 可溶性蛋白與膜蛋白萃取液的製備：

將各個突變株的菌種，分別養在含 50 μ g/ml rifampicin 及 15 μ g/ml tetracyclin 2ml LB 的培養液中，並置入 30 培育箱震盪約 48 小

時，待菌液呈現混濁後，轉移到 200ml LB 的培養液中繼續培養，一直到菌液混濁為止。接著利用高速離心機(10000 rpm，10 min)將細胞收下來，再用適量的二次水將細胞懸浮，高速離心(12000 rpm，10 min)將細胞外多醣類洗掉，此時再用 lysis buffer (20mM Tris-HCl pH 8.0，1mM PMSF，0.1mM DTT)將細胞懸浮，通過 French Press (18000-20000 lb/in，流速 1 滴/2-4 秒)二次，將細胞打破後，先用高速離心機(12000 rpm，10 min)除去未破細胞，接著進行超高速離心(56000 rpm，60 min)，所得到的上清液為可溶性蛋白，利用 Centricon-10 將可溶性蛋白部分從 12ml 濃縮到 2ml，即為備用的可溶性蛋白萃取液。沉澱物溶解在 2 ml 的 20 mM Tris-HCl pH8.0，0.5% DOC 或 2 % Triton X-100 buffer，4 溫和搖晃至少一小時或隔夜，超高速離心(30000 rpm，60 min)，並取上清液備用，為膜蛋白萃取液。

7. 膠質篩濾層析法(gel filtration chromatography)

將 Superdex HR-200 (size 25ml，可分 10-600kDa，Pharmacia)膠質篩濾層析管安裝於 FPLC 上，以二倍體積(50ml)的 buffer 平衡，流速為 0.5 ml/min。分析水溶性蛋白時，除非特殊需要，buffer 通常不含 detergent，但分析脂溶性蛋白時，buffer 則必須含 detergent。注入樣本前先將已之分子量的各個蛋白(Thyroglobulin,

669kDa; Albumin, 443kDa; Alcohol DHase, 200kDa; Beta-Amylase, 66kDa; Apoferritin, 29kDa; Cytochrome, 12kDa)以微量針筒注射到 FPLC, 製成分子量修正曲線。水溶性或脂溶性蛋白部分皆以微量針筒取 200 μ l 注射到 FPLC, 收集 retention time 14-31 min, 每管 0.5 ml。每管取 300 μ l 加入四倍體積的丙酮, 在-20 沉澱至少一個小時, 高速離心(12000rpm, 10 min), 去上層液。白色沉澱物有時可再次加入 300 μ l 10% TCA, 以去除鹽類, 4 沉澱 30 分鐘, 離心, 沉澱物風乾, 最後加入 10 μ l SDS-PAGE 1x sample buffer, 進行 SDS-PAGE 以及西方點墨法分析。

8. 陰離子交換樹脂層析：(Ion-exchange chromatography)

將 Ion-exchange 管柱安裝於 FPLC 上, 並設定流速為 0.5ml/min, 先以含有高鹽的 solution B (1M NaCl, 20mM Tris-HCl pH8.0)將雜蛋白清除, 接著用不含鹽的 solution A (20mM Tris-HCl pH8.0)平衡, 最後以微量針筒取 300 μ l sample 注入 FPLC column 中, 以 0-1M NaCl 線性梯度, 將吸附在管柱上的蛋白沖出, 每二分鐘收集成一個 fraction, 從每個 fraction 中取 300 μ l 加入四倍體積的丙酮, 在-20 沉澱至少一個小時, 高速離心(12000rpm, 10 min), 去上層液。白色沉澱物有時可再次加入 300 μ l 10% TCA, 以去除鹽類, 4 沉澱 30 分鐘, 離心, 沉澱物風乾, 最後加入 10 μ l

SDS-PAGE 1x sample buffer , 進行 SDS-PAGE 以及西方點墨法分析。

9. 定位突變法 :

參照 GeneEditor™ *in vitro* site-directed mutagenesis system

(Promega) : 此系統適用於具有 Ampicilin resistance 標誌的載體 , 產生的重組載體除了保有 Ampicilin resistance 的特性之外 , 還會產生一個新的篩選標誌 resistance GeneEditor™ Antibiotic selection Mix。

(1) *Primer 5' -Phosphorylation*

在 25 μ l 的反應體積中 , 加入適當的 primer (100 pmol) , kinase 10x buffer 2.5 μ l , T₄ polynucleotide kinase 5 units , 無菌二次水補到最後體積 25 μ l。 37 °C , 反應 30 分鐘 , 馬上置入 70 °C 水浴 10 分鐘 , 以終止 kinase 活性 , 即可完成 Primer 5' -Phosphorylation 的反應。反應物可置入 -20 °C 冷藏保存或直接進行 Annealing 反應。

(2) *Annealing reaction*

加入 ssDNA(約>0.5 μ g/4 μ l)8 μ l , Top select oligonucleotide 1 μ l , phosphorylated mutagenic oligonucleotide (100 pmol/25 μ l)1 μ l , annealing 10x buffer 2 μ l , 加入無菌水到最終體積為 20 μ l。接著將反應物 75 °C 加熱 5 分鐘 , 之後慢慢降溫到室溫(20-30 分鐘)。將反應物至於冰上備用 , 將 synthesis 10x buffer 3.5 μ l , 2.5mM dNTPs

6 μ l, T₄ DNA polymerase 10 units, T₄ DNA ligase 2 units, 10x BSA 2 μ l 加入上述反應物中。37 反應二小時, 即可完成 mutant strand synthesis 和 ligation, (Top select oligonucleotide 這條 primer 的選擇, 主要是根據 f1 origin 的方向來決定。)

(3) Transformation to BMH71-18 *mutS*

將已完成 annealing 的 DNA 10 μ l 送入 100 μ l BMH71-18 *mutS* competent cell 混合均勻, 置於冰上 60 分鐘, 42 加熱 45-50 秒之後, 馬上置於冰上 2 分鐘, 加入 900 μ l LB medium, 37 劇烈搖晃(225 rpm)至少一個小時(待菌液混濁), 再加入 4 ml LB medium 及 100 μ l GeneEditor™ Antibiotic selection Mix 抗生素, 繼續培養到菌液呈混濁(可能需要到隔夜)。以 CLONTECH Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit 抽取質體, 取 1 μ l 送入 JM109 宿主, 此時培養基含 125 μ g/ml Ampicilin 及 100 μ l GeneEditor™ Antibiotic selection Mix 抗生素。

(4) Enzyme digestion

在 10 μ l 的反應體積中, plasmid 取 4 μ l, 加入 *Bam*HI 及 *Hind*III 各 1 μ l, 10x BSA 10 μ l, 10x NEB Buffer-2 2 μ l, PCR H₂O 2 μ l。37 反應二小時, 用 1 % agarose 檢查抽到的 plasmid 是否含有 insert

(5) DNA sequencing

利用 ABI PRISM 337 Automated Fluorescent DNA Sequencer 進

行 DNA 定序。其方法是用 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISM™ Cycle sequencing kit，原理是利用 ddNTP 上帶有四種不同顏色的螢光劑以 dideoxynucleotide termination 的方式及 PCR 的方法在 DNA template 上 extension 後，加入 1/10x 體積的 3M NaOAc 及 2.5x 體積的 98 % 酒精，冰上作用 10 分鐘，離心到掉上清液，加入 5μl loading dye 後，經 6 % Polyacrylamide sequencing gel 分析後，以 sequencer detector 上雷射光束來偵測螢光顏色的訊號，黑色代表 Guanine，綠色代表 Adenosine，紅色代表 Thymidine，藍色代表 Cytidine。

10. *xpsG* 突變基因的分析

(1) 載體的製備(prepare vector)

培養 5ml DH5α/pCPP30-FG，利用 CLONTECH Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit 抽取質體。先用限制酶 *Bam*HI 及 *Hind*III 檢查有沒有抽到 plasmid (pCPP30-FG)，若有，再全部用 N-butanol 濃縮，以 1 % agarose 分離 DNA 片段，利用 CLONTECH GEL EXTRACTION Kit 將較大分子 7.5kb 的載體萃取出來。

(2) prepare insert DNA

抽大量定位突變成功的質體(mutant DNA/pBluKS⁻)，用限制酶 *Bam*HI 及 *Hind*III 水解 DNA，以 1 % agarose 分離 DNA 片段，利

用 CLONTECH GEL EXTRACTION Kit 將較小分子 790bp 的 insert 萃取出來。

(3) ligation

在 10 μ l 的反應體積中, insert(mutant DNA) : vector(pCPP30)=1:1 , 加入 T₄ DNA ligase 1 μ l , 10x T₄ DNA ligase buffer 1 μ l 16 O/N.

(4) transformation to JM109

將上述已經 ligation 完成的 10 μ l plasmid 全部送入 50 μ l JM109 competent cell , 均勻混合後 , 置於冰上 30 分鐘 , 42 加熱 2 分 50 秒(勿超過 3 分鐘) , 馬上置於冰上 5 分鐘 , 均勻混合後全部塗在含 Tetracyclin(15 μ g/ml)的 LB plate 上 , 30 O/N。

11. Conjugation :

接合作用開始先將下列三種菌都培養好(盡可能讓菌都是新鮮的)。(1)劃 Helper cell(H) , E.coli DH5 α (pRK2013)在含 Km(50 μ g/ml)的 LB plate 上。(2)劃 recipient cell (XC1701;XC1713 或其他 knockout strain mutant)在含 Rif(100 μ g/ml) 的 LB plate 上。(3)將 donor cell(D) JM109/pCPP30-mutant 劃在含 Tetracyclin(15 μ g/ml)的 LB plate 上。

Conjugation 的步驟如下 :

- a. 準備一個 LB plate
- b. 利用竹棒取適量的 Helper cell、 donor cell , 如下圖 : 在 LB plate

劃一縱線

c. 利用竹棒取適量的 recipient cell , 如下圖 : 在 LB plate 橫劃過

Helper cell & donor cell

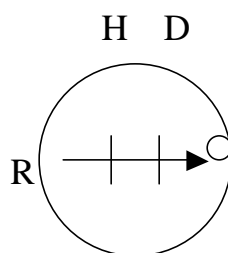
d. 將此 plate 置 30 ° 培養 24 小時 , 將箭頭右側長出的菌落 , 三區

劃線在同時含 Rif(100 μ g/ml)及 Tetracyclin(15 μ g/ml)的 LB plate

上 , 30 ° 培養 3-5 天。選 3-5 個第三區長出的單一菌落 , 以斜

線的方式劃在同時含 Rif(100 μ g/ml)及 Tetracyclin(15 μ g/ml)的 LB

plate 上 , 30 ° , O/N。



12. Starch plate(XOL starch)的製備 :

(a) tryptone 0.625g , yeast extract 0.625g , agar 7.5g , 完全溶解在 250ml

體積的二次水。

(b) starch (soluble potato)10g , K_2HPO_4 0.35g , $(NH_4)_2SO_4$ 0.5g , $MgCl_2$

0.05g , $MnCl_2$ 0.0005g , KH_2PO_4 0.1g , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005g , 完全溶

解在 250ml 體積的二次水。

(c) a 和 b 各自(勿混合)高壓滅菌 , 之後再混合在一起 , 到適量體積到

petri dish , 凝固後至少需冷藏在 4 一個星期後方可使用。

13. 互補實驗：

利用接合作用(conjugation)將構築好的重組質體送入

XC1713(*xpsG* knockout)變異株，將此菌點在澱粉培養基(starch plate), 分別以 XC1701 以及 XC1713 當作澱粉酵素分泌的陽性和陰性對照組，觀察菌落周圍透明圈的大小，以測試各變異株澱粉酵素分泌功能正常與否。

14. 干擾實驗：

利用接合作用(conjugation)將構竹好的重組質體送入澱粉酵素分泌正常的 XC1701，此菌點在澱粉培養基(starch plate)，觀察菌落周圍透明圈的大小，以測試各變異株澱粉酵素分泌功能正常與否。

三、結果：

1. 核苷酸定序分析：

由核酸定序法作進一步分析重組質體中所嵌入的核苷酸序列及嵌入位置。核酸定序是使用 ABI PRISM 377 Automated Fluorescent DNA Sequencer, 此鑑定方法是採用購自 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISM™ cycle sequencing kits, 其原理是利用 AmpliTaq DNA polymerase 為酵素與帶有螢光染劑標定的 ddNTP, 在同時存有 DNA template 和 primer 下, 以 PCR 的方式在 DNA 片段上 extension 及 dideoxy termination reaction 後, 經 6 % Polyacrylamide sequencing gel 分析, 再以 sequencer detector 上的雷射光來偵測其螢光反應。黑色代表 Guanine, 綠色代表 Adenosine, 紅色代表 Thymidine, 藍色代表 Cytidine。從分析結果可以證明 H、I 的嵌入點確實正確 (附錄 3-6)。

2. 重組蛋白的表現：

將已構築正確的重組表現質體(pET/H_N、H_C、I_N、I_C)經 CaCl₂ 之轉型作用送入大腸桿菌 BL21(DE3)宿主細胞內, 以進行重組表現質體的蛋白表現。分別在培養基中隨機挑選二至三個內含重組表現質體(pET/ H_N、H_C、I_N、I_C)的菌落, 經最終濃度 2mM IPTG 誘發表現四小時之後, 以 13.8% acrylamide gel 進行 SDS-PAGE 電泳分析及 Coomassive blue 染色 (圖 1)。由結果顯示, 在 pET 系統下, pET/ I_N 的重組蛋白並不表現, 其餘的重組蛋白均有誘

發表現。

3. 重組蛋白的純化：

因為重組表現蛋白其 NH₂ 端上接有六個連續的 Histidine 胺基酸所形成的 peptide，可與正二價金屬離子結合。所以利用 Ni-NTA (Qiagen)親和性管柱純化重組表現蛋白。以 stepwise 的方式在含有 250mM imadazole 的沖洗液下將重組蛋白沖出，並收集沖出液以 SDS-PAGE 分析，結果顯示重組表現蛋白 XpsH_C、I_C 均能有效地被純化出來（圖 2）。並將所純化的重組表現蛋白測其蛋白含量之後，以皮下的方式注入兔子體內，一個月後取其血清，此血清即可能含有抗體。

4. 抗體分析：

將拿到的四批抗體做 Western-blot 來檢查抗體是否正確，其中將第二批的抗體經過 pre-clear，以便和其他三批抗體做比較，以野生株 XC1701、XC1717(pFH)做陽性對照組，XC1717 (*xpsH* 基因缺陷的突變株)做陰性對照組，結果顯示在野生株下由於 XpsH 蛋白的量太低，所以無法看到 XpsH 蛋白的表現，而以 XC1717(pFH)、XC1717 來做比較，發現在經過純化的抗體，XC1717(pFH)有單一 band 出現，相同位置在 XC1717 並沒有，另外三批抗體也有相同結果，所以所純化出來的 XpsH 抗體是正

確的 (圖 3)。而 XpsI 抗體檢查的部分則是由學妹陳淑娟負責。

5. 分析各個突變株水溶性與脂溶性 XpsH 蛋白的生化特性：

抗體及菌種的鑑定：

在分析 XpsH 蛋白的生化特性之前，首先必須先確定我們所構築的各個突變株 (XC1717-pFH、XC1717-pFG、XC1713-pFG、XC1713-pFH) 菌種以及所用的抗體是否正確，所以將這四株突變株的 total cell lysate 以西方點墨法分析，分別以 XpsH、XpsG 抗體做偵測。結果在 XpsG 部分：除了 XC1713-pFH 之外，其餘菌種均有 XpsG 蛋白的表現；在 XpsH 部分：因為 XpsH 蛋白的表現量在一般菌株內很低，所以在 XC1713-pFG 這株菌內無法偵測到 XpsH 蛋白，XC1717-pFG 為 *xpsH* 缺陷的突變株，所以也無法看到 XpsH 蛋白；XC1717-pFH、XC1713-pFH 這二株菌均可偵測到 XpsH 蛋白(圖 4)，因此證明所用的菌株及抗體均正確

細胞分布 (subcellular location) 的探討：

在取得 XpsH、XpsG 抗體之後，接著想要探討 XpsH、XpsG 蛋白位於這四株黑腐病菌突變株的哪個區域，所以將這四株十字花科黑腐病的突變株以超高速離心分成可溶 (細胞質、膜外漿質) 與不可溶 (細胞膜) 兩個部分。分別作 XpsH、XpsG 的西方點墨法分析，結果發現，在 XpsG 部分：除了 XC1713-pFH 之外其

餘三株突變株的可溶及不可溶的部分均有 XpsG 蛋白的分布；在 XpsH 部分：除了 XC1713-pFG、XC1717-pFG 之外，其餘二株突變株的可溶及不可溶的部分均有 XpsH 蛋白的分布（圖 6）。

由膠質篩濾層析法分析四個突變株水溶性及脂溶性 XpsH XpsG 蛋白的分子形式：

為了探討可溶及不可溶的 XpsG、XpsH 蛋白在各個突變株下其分子大小是否有所不同，所以將這四株突變株的可溶性與膜蛋白萃取液，通過 Superdex HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，並收集層析後的沖出液，以 4x 體積的 acetone 沉澱抽乾後，再以 SDS-PAGE(13.8%)電泳分析及 XpsG、XpsH 抗體的 Western-blot 實驗。結果顯示，XC1713-pFG 水溶性 XpsG 蛋白在 retention time 15-21 min 出現，對照校正曲線圖，此時蛋白的分子量 > 600kDa，是一個大分子複合體；若以 0.5%DOC 處理，則發現蛋白出現時間會延後到 28-31min，這個時候的分子量大約是 30-50 kDa，可能為一個雙體型式的 XpsG 蛋白；若以 1% Triton X-100 處理，則發現蛋白出現時間會在 23-28min，這個時候的分子量大約是 66-200kDa，可能是一個 oligomer 的 XpsG 蛋白（圖 6）；同樣的結果也出現於 XC1717-pFG 水溶性 XpsG 蛋白的部分（圖 8），而脂溶性 XpsG 蛋白在 0.5%DOC 緩衝液下，retention time 為 28-33

min，對照校正曲線圖，此時蛋白的分子量亦約 30-50 kDa，可能為一個雙體型式的 XpsG 蛋白；若以 1% Triton X-100 處理，則發現蛋白出現時間會在 22-26 min，這個時候的分子量大約是 200 kDa，可能是一個 oligomer 的 XpsG 蛋白（圖 7）同樣的結果也出現於 XC1717-pFG 及 XC1717-pFH 脂溶性 XpsG 蛋白的部分（圖 9、11B）。由此可知，XpsG 蛋白在膠質篩濾層析法中無論有無 XpsH 均不會影響它出現的時間。

接著再檢查 XpsH 蛋白，由層析知 XC1717-pFH 水溶性 XpsH 蛋白在 retention time 15-20 min 出現，對照校正曲線圖，此時蛋白的分子量 > 600kDa，是一個大分子複合體（圖 10A）；若以 0.5% DOC 處理，則發現蛋白的出現廣泛存在於每一部份。上述實驗每一個 Fraction 亦均另以 XpsG 蛋白當作對照組，以確定層析法的效果（圖 10B）；若以 1% Triton X-100 處理，則發現蛋白出現時間會在 22-25min，這個時候的分子量大約是 66-200 kDa，可能是一個較小分子複合體的 XpsH 蛋白；上述實驗每一個 Fraction 亦均另以 XpsG 蛋白當作對照組，以確定層析法的效果（圖 10C）。而 XC1717-pFH 脂溶性 XpsH 蛋白在 0.5% DOC 緩衝液下，retention time 為 27-29 min，對照校正曲線圖，此時蛋白的分子量約 40 kDa，可能為一個雙體型式的 XpsH 蛋白；上述實驗

每一個 Fraction 亦均另以 XpsG 蛋白當作對照組，以確定層析法的效果（圖 11A）；若以 1% Triton X-100 處理，則發現蛋白出現時間會在 15-18 min 以及 22-23 min，這個時候的分子量一個大約 > 600kDa，而另一個大約是 200kDa，可能為一個較大分子複合體，而一個則是較小分子複合體的 XpsH 蛋白；上述實驗每一個 Fraction 亦均另以 XpsG 蛋白當作對照組，以確定層析法的效果（圖 11B）。

接著探討在無 XpsG 蛋白存在下是否會影響到 XpsH 蛋白在層析法中所出現的時間。由層析知 XC1713-pFH 水溶性 XpsH 蛋白在 retention time 15-19 min 出現，對照校正曲線圖，此時蛋白的分子量 > 600kDa，是一個大分子複合體（圖 12）；若以 0.5% DOC 處理，則發現蛋白出現時間會在 20-22 min，這個時候的分子量大約是 440 kDa，為一個大分子複合體的 XpsH 蛋白（圖 12）；若以 1% Triton X-100 處理，則發現蛋白出現時間會在 21-25 min，這個時候的分子量大約是 66-200 kDa，可能是一個較小分子複合體的 XpsH 蛋白（圖 12）。而 XC1713-pFH 脂溶性 XpsH 蛋白在 0.5% DOC 緩衝液下，retention time 為 18-20 min 以及 26-29 min，對照校正曲線圖，此時蛋白的分子量約 450 kDa 以及 40 kDa，為一個較大分子複合體的 XpsH 蛋白，而另一個則是雙

體型式的 XpsH 蛋白；若以 1% Triton X-100 處理，則發現蛋白出現時間會在 16-17min 以及 21-27min，這個時候的分子量一個大約 > 600 kDa，而另一個大約是 60-400 kDa，可能為一個較大分子複合體而一個則是較小分子複合體的 XpsH 蛋白（圖 13）。所有突變株水溶性及脂溶性蛋白通過 Gel-filtration column 的分布情形整理於表一。

由陰離子交換樹脂層析管柱分析 XpsG、H、I 蛋白之間的關係：為了想要了解在十字花科黑腐病菌中，XpsG、H、I 蛋白之間是否有 interaction，所以將各個突變株的可溶性與脂溶性蛋白部分，通過陰離子交換層析管柱，收集層析後的沖出液，以 Western-blot 分析。結果顯示，在 XC1713-pFG、XC1717-pFG 以及 XC1717-pFH 的可溶性 XpsG 蛋白，在經過陰離子交換層析之後均出現在 fraction 11-13，似乎在 *xpsH* 基因缺陷的情形下，並不會影響 XpsG 蛋白出現的管數（圖 14）。而在 XC1713-pFG、XC1717-pFG 以及 XC1717-pFH 的脂溶性 XpsG 蛋白，在經過陰離子交換層析之後均出現在 fraction 7-11，似乎在 *xpsH* 基因缺陷的情形下，也並不會影響 XpsG 蛋白出現的管數（圖 15）。在 XC1713-pFH 的可溶性 XpsH 蛋白部分則是出現在 fraction 11-15；在 XC1717-pFH 的可溶性 XpsH 蛋白部分則是出現在

fraction 11-12, 兩者均是在 fraction 12 濃度最高, 似乎在 *xpsG* 基因缺陷的情形下, 也並不會影響 XpsH 蛋白出現的管數(圖 16), 而在 XC1713-pFH 的脂溶性 XpsH 蛋白部分則是出現在 fraction 8-12; XC1717-pFH 的脂溶性 XpsH 蛋白部分則是出現在 fraction 8-15, 似乎在 *xpsG* 基因存在時, XC1717-pFH 的脂溶性 XpsH 蛋白分布管數會較廣(圖 17)。在可溶性 XpsI 蛋白的部分, 這四個突變株的可溶性蛋白所出現的管數, 大約都是 fraction 7-8, 都以 fraction 8 的濃度最高(圖 18); 在脂溶性 XpsI 蛋白的部分, XC1717-pFG 以及 XC1713-pFH 的脂溶性蛋白所出現的管數, 都是在 fraction 7-11, 以 fraction 8-9 的濃度最高; 而 XC1713-pFG 以及 XC1717-pFH 的脂溶性蛋白所出現的管數, 都是在 fraction 8-10, 以 fraction 9 的濃度最高(圖 19)。所以, 不論是可溶性或是脂溶性 XpsI 蛋白, 其分布的管數都在 7-10 之間。所有突變株水溶性及脂溶性蛋白通過 Ion-exchange column 的分布情形整理於表二。

XpsG 變異蛋白 (D®N) 對 XC1713 之互補實驗:

XpsG 蛋白是胞外酵素分泌所必須的蛋白, 在過去 XpsG 蛋白的突變研究發現, 宋浴伶學姊將 XpsG 五個保留的 Asp(D70, D103,

D121, D128, D139)改變成 Glu 後，只有 D103E 突變蛋白失去活性。我們為了繼續探討是否其他保留的 Asp 對於蛋白分泌是必須的，所以我們將其他四個保留的 Asp(D70, D121, D128, D139)改變成 Asn 後，再觀察 XpsG 蛋白的功能是否失去？將含有突變基因 (D70N, D121N, D128N, D139N) 的 XC1713 菌株適量點在澱粉培養基上，30℃，O/N，並以 XC1701 以及 XC1713 當陽性及陰性對照組，藉由菌落周圍透明圈大小來觀察各變異株澱粉酵素的分泌情形。結果顯示，除了 D139N 以外，其餘的 D70N、D121N、D128N 等菌株皆能使 XC1713 恢復正常胞外酵素分泌功能 (圖 20)。

XpsG 變異蛋白 (D[®]N) 對 XC1701 之干擾實驗：

將突變後的重組質體 (pCPP30-D139N) 接合到胞外酵素分泌正常的 XC1701，並以 XC1701 以及 XC1713 當陽性及陰性對照組。結果顯示，此 XpsG(D139N)變異蛋白並不影響野生株 XC1701 澱粉酵素的分泌 (圖 20)。

以 Western-blot 分析 XpsG 變異蛋白 (D[®]N) 對 XC1713 之互補實驗：

由 starch plate 的結果得知，除了 XC1713-D139N 之外其餘三個變異株皆會分泌澱粉酵素，所以拿這四株變異株的 total cell

lysate 以 Western-blot 分析，以 XpsG 抗體偵測。結果顯示，XC1713-D70N、XC1713-D121N、XC1713-D128N 均有 XpsG 蛋白的表現，而 XC1713-D139N 卻沒有 XpsG 蛋白的表現(圖 21)，而作了第二次接合實驗時還是得到同樣的結果(圖 22)，由此可知 D139N 突變蛋白的穩定性受到嚴重影響。

以 Western-blot 分析 XpsG 變異蛋白 (D[®]N) 對 XC1701 之干擾實驗：

將突變後的重組質體(Pcpp30-D139N)接合到胞外酵素分泌正常的 XC1701，並以 XC1701、XC1713 當對照組，結果顯示，此變異蛋白並不會干擾 XC1701 澱粉酵素的分泌(圖 20)，將 XC1701-D139N 的 total cell lysate 以 Western-blot 分析，以 XpsG 抗體偵測。結果顯示有 XpsG 蛋白的表現(圖 22)。

四、討論：

在表達重組蛋白的實驗方面，所採用的是 pET 表現系統，主要以 BL21(DE3)為宿主細胞，具有 T7 promoter 且受 *lac operon* 所調控，而且所表現出的為 fusion protein，因此誘發蛋白表現的產量以及穩定性都很高，但是 XpsI_N 重組蛋白無法表現，可能的原因是 XpsI 的 N 端

部分含有很多疏水性胺基酸，造成誘發蛋白表現時效率很低。在純化重組蛋白時，所利用的是 Ni-NTA affinity column 來純化，採用開放式管柱的方式，細胞萃取液通過管柱後，以 250mM imidazole 的條件將重組蛋白純化出來，以 SDS-PAGE 分析結果發現純化效果很好，但是會有低回收率的現象，後來則是先將細胞萃取液和 resin 在室溫下反應約一個小時之後，再將細胞萃取液再次通過 Ni-NTA affinity column，發現低回收率的現象已大大改善（結果未附）。

在 SDS-PAGE 的實驗中，發現在 pET 表現系統中，所構築的重組蛋白是 fusion protein，所以分子量會高過預估值，判讀時應注意。

有研究報告指出，XpsG、H、I、J 為胞膜蛋白，在浴伶學姊的研究中發現，將野生株 XC1701 以 French Press 打破細胞進行 subcellular location 的實驗，結果發現在可溶與不可溶部分均可看到 XpsG 蛋白；在本實驗中，曾經嘗試在野生株 XC1701 下來探討 XpsH 蛋白，但是由於 XpsH 蛋白的量太低了，以至於無法在野生株 XC1701 下看到 XpsH 蛋白，後來便以 XC1717-pFH (*xpsH* 基因大量表現的互補菌) 來代替 XC1701，用以探討 XpsH 蛋白的生化特性。將 XC1717-pFH 同樣的以 French Press 打破細胞進行 subcellular location 的實驗，結果發現在可溶與不可溶部分均也看到 XpsH 蛋白。

為了進一步想探討水溶性和脂溶性 XpsH 蛋白的差異，以及了解

XpsH 和 XpsG 蛋白之間是否有交互作用，於是作了一系列的生化層析實驗。

首先，先構築了兩個突變株，分別是只有 XpsG 蛋白表現但 XpsH 蛋白不表現的 XC1717-pFG 與只有 XpsH 蛋白表現但 XpsG 蛋白不表現的 XC1713-pFH，以及兩個互補菌株，分別是 XC1717-pFH 與 XC1713-pFG。上述菌株可幫助我們了解 XpsH 和 XpsG 蛋白之間是否有相互作用的關係。從膠質篩濾層析法，看到在這四個菌株中除了 XC1713-pFH 外，其他的脂溶性 XpsG 蛋白若以 0.5% DOC buffer 處理，則發現分子量約為 30-50 kDa (圖 7、9、11)，推測均是以 dimer form 的型式存在；若是以 Triton X-100 buffer 處理，則發現在脂溶性 XpsG 蛋白分子量會變大，約為 200 kDa(圖 7、9、11)，這種 detergent 的效應可能是因為不同的 detergent 會使蛋白複合體的解離程度有所不同；另外一種解釋是不同的 detergent 形成不同的 micelle，因而在層析上出現不同的分子大小。

而在水溶性 XpsG 蛋白膠質篩濾層析實驗發現是以 multimer 的型式存在，從分子量校正曲線得知，其分子量大於 600kDa (圖 6、8)。如果將水溶性 XpsG 蛋白通過含有 0.5% DOC buffer 的 HR-200 column，則發現 XpsG 蛋白會由複合體型式解離成雙體型 (圖 6、8、10)，此結果與脂溶性 XpsG 蛋白相類似 (圖 7、9、11)，也就是說

DOC 會促使 XpsG multimer 解離;如果將層析緩衝液由 DOC 改成 1% Triton X-100 buffer 再通過 HR-200 column, 則發現 XpsG 蛋白會由複合體型式部分解離成較小分子的複合體, 分子量約為 200 kDa(圖 6、8、10), 此結果與脂溶性 XpsG 蛋白相類似(圖 7、9、11), 也就是說 Triton X-100 只能使 XpsG multimer 部分解離。上述 XpsG 蛋白的分析, 不論 *xpsH* 基因存在與否都不影響結果, 意謂著 XpsH 蛋白存在與否並不會影響 XpsG 蛋白在構形上的改變(圖 6-11)。

在 XpsH 水溶性蛋白的部分, 發現不論是 XC1713-pFH 或是 XC1717-pFH, 其水溶性蛋白和 XpsG 蛋白一樣, 都是以 multimer 的型式存在(圖 10A、12), 但是若是將水溶性 XpsH 蛋白通過含有 0.5% DOC buffer 的 HR-200 column, 則是發現 XC1717-pFH XpsH 蛋白的複合體型式會變成兩個不同大小的分子(圖 10B), 推測可能是 XpsH 蛋白會和自己或者和其他未知蛋白甚至是 XpsG 蛋白, 形成一群複合體, 而當有 DOC 存在時, 會依結合程度的不同而造成不同程度的解離情形(圖 10B)。如果將層析緩衝液由 DOC 改成 1% Triton X-100 buffer 再通過 HR-200 column, 則發現 XpsH 蛋白的解離情形會和 XpsG 蛋白一樣, 相同的結果也出現於 XC1713-pFH 水溶性 XpsH 蛋白(圖 10C、12)。XC1713-pFH 水溶性 XpsH 蛋白若通過含有 0.5% DOC buffer 的 HR-200 column, 則發現 XpsH 蛋白的複合體型式只有

稍微解離成分子量約 440 kDa 的複合體 (圖 12), 可能的解釋是這個 multimer 此時不含 XpsG 蛋白, 蛋白與蛋白間的結合力增強, 因而不容易被 DOC 所解開。

再來看看脂溶性 XpsH 蛋白的部分, XC1717-pFH 的脂溶性蛋白在通過含有 0.5% DOC buffer 的 HR-200 column 之後, 出現的時間約在分子量 40-60 kDa 左右(圖 11A), 估計亦是一種 dimer form 型式。如果將層析緩衝液由 DOC 改成 1% Triton X-100 buffer 再通過 HR-200 column, 結果發現脂溶性 XpsH 蛋白幾乎不被 Triton X-100 所解開, 分子量大於 600 kDa (圖 11B), 此結果與脂溶性 XpsG 蛋白有很大的不同 (圖 11B); XC1713-pFH 不含 XpsG 的 XpsH 脂溶性蛋白在通過含有 0.5% DOC buffer 的 HR-200 column 之後, 發現會有兩群蛋白的出現, 一個是分子量約為 500 kDa 的複合體, 而另一個是分子量約為 40-60 kDa 的雙體結構(圖 13) 若如果將層析緩衝液由 DOC 改成 1% Triton X-100 buffer 再通過 HR-200 column, 結果發現脂溶性 XpsH 蛋白與脂溶性 XpsG 蛋白有相類似的結果, 分子量約為 200 kDa, 但仍有一小部份還是處於分子量大於 600 kDa 的大分子狀態 (圖 13)。推測在脂溶性 XpsG 蛋白不存在時, XpsH 蛋白可能會和自己也有可能和別的未知蛋白形成各種形式的複合體, 所以在 DOC 的環境下會有兩群蛋白的出現 (圖 11、13)。所以從膠質篩濾層析分析的結果可以

看出，水溶性的 XpsH 蛋白在沒有 detergent 處理下會和 XpsG 蛋白一樣，會形成大分子的 multimer，但有 detergent 處理時就會發現 XpsH 蛋白和 XpsG 蛋白在結構上會有不同；而脂溶性 XpsH 蛋白在 XpsG 蛋白不存在時其蛋白結構是和 XpsG 蛋白存在時是不同的。

在分析完 XpsH 蛋白和 XpsG 蛋白在結構上的差異性之後，接下來想要探討 XpsH 蛋白、XpsI 蛋白和 XpsG 蛋白之間是否會有 interaction? 所以便將這四株菌的水溶性蛋白和脂溶性蛋白，分別通過陰離子交換樹脂層析管柱，來分析 XpsH 蛋白、XpsI 蛋白和 XpsG 蛋白之間的關係。結果發現，水溶性 XpsG 蛋白會在第 11-13 管出現，而第 12 管的濃度會最高(圖 14)，同樣的結果也出現於 XpsH 蛋白上(圖 16)。但是不管 *xpsG* 或 *xpsH* 基因缺陷的菌株上，所得到的結果也是如此，所以並無法直接看出 XpsH 蛋白和 XpsG 蛋白之間有 interaction，只看出兩個蛋白之間有 cofractionation 的現象。XpsI 蛋白都是在第 8 管的濃度最高(圖 18)，所以在水溶性蛋白部分，XpsI 和 XpsH、XpsG 並沒有直接的 interaction。在脂溶性 XpsG 蛋白會在第 7-10 管出現(圖 15)，而在 *xpsG* 基因缺陷的菌株上，XpsH 蛋白會在第 8-12 管出現，在互補菌株上則是在第 8-14 管出現(圖 17)，XpsI 蛋白在互補菌株上是在第 9 管出現，在 *xpsG* 或 *xpsH* 基因缺陷的菌株上，則是在第 8-10 管出現(圖 19)，所以在脂溶性蛋白部分，也是無

法直接看出 XpsH 蛋白、XpsI 蛋白及 XpsG 蛋白之間有 interaction , 只看出三個蛋白之間有 cofractionation 的現象 , 因此還必須要有其他的實驗來證明 XpsH 蛋白、XpsI 蛋白及 XpsG 蛋白之間是否有交互作用。

在 XpsG(Aspartate→Asparagine)定點突變的實驗上 , 將 XpsG 蛋白高度保留的 Aspartate 以 Asparagine 取代 , 從互補實驗看到 XpsG-D139N 變異蛋白無法補償 XC1713(*xpsG* knockout)所失去的蛋白分泌功能 , 而在干擾實驗上 XpsG-D139N 變異蛋白也並不會干擾 XC1701 澱粉酵素的分泌 從 Western-blot 分析結果看到 XpsG 蛋白不見了 , 由此可解釋 XpsG-D139N 不能補償與不能干擾的原因。但為何在 XpsG 的 C-末端 , 只有一個小小的 D N 的改變 , 就會造成 XpsG 蛋白穩定性上發生劇烈改變 , 目前還無法解釋。

五、參考文獻：

Alm, R. A. and Mattick, J. S., 1995 Identification of a gene *pilV* required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* whose product posses a pre-pilin-like leader sequence. *Mol. Microbiol.*, **16.** 485-496.

Akrim, M., Bally, M., Ball, G., Tommassen, J., Teerink, H., Filloux, A. and Lazdunski, A. 1993. Xcp-mediated protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of two addition genes and

evidence for regulation of *xcp* gene expression. *Mol. Microbiol.* **10**, 431-444.

Ball, G., Chapon-Herve, V., Bleves, S., Michel, G., and Bally, M., 1999
Assembly for XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**. 382-388.

Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., and Tommassen, J. 1992. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven *xcp* genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol. Microbiol.* **6**. 1121-1131.

Bally, M., Filloux, G., Badere, A., and Lazdunski, A. 1991. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the *xcpA* gene encodes an integral membrane protein homologous to *Klebsiella pneumoniae* secretion function PulO. *J. Bacteriol.*, **173**. 479-486.

Charkowski, A. O., Huang, H.-C., and Collmer, A. 1997. Alter localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp* mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membrane of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **179**. 3866-3874.

Chen, L.-Y., Chen, D.-Y., Miaw, J., and Hu, N.-T. 1996. XpsD, an outer membrane protein required for protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a multimer. *J. Biol. Chem.* **271**. 2701-2708.

Dums, F., Dow, J. M., and Daniels, M. J. 1991. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion

system of other gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **229**. 357-364.

Fath, M. J., and Kolter, R., 1993. ABC transporters: bacteria exporters. *Microbiol. Rev.* **57**. 995-1017.

Fernandez, L. A., and Berenguer, J., 2000. Secretion and assembly of regular surface in gram-negative bacteria, *FEMS Microbiology Review*, **24**. 21-44.

Filloux, A., Bally, M., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J., and Lazdunski. A., 1990. Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanism in different bacteria. *EMBO J.* **9**. 4323-4329.

Forest, K. T., and Tainer, J. A., 1997. Type-4-pilus-structure outside to inside and top to bottom –a minireview. *Gene.* **192**. 165-169.

Hardie, K. R., Lory, S., and Pugsley, A. P., 1996. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperon-like protein. *EMBO J.*, **15**.978-988.

Hobbs, M., and Mattick, J. S., 1993. Common components in the assembly of type IV fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complex. *Mol. Microbil.* **10**. 233-243.

Holland, I. B., Blight, M. A. ,and Keeny. B., 1990. The mechanism of secretion hemolysin and other polypeptide from gram-negative bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 473-491.

Hu, N.-T., Hing, M.-N., Huang, A.-M., Tsai, H.-F., Yang, B.-Y., Chow, T.-Y., and Tseng, Y.-H., 1992a. Molecular cloning, characterization and nucleotide sequence of the gene for secreted α -amylase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J.Gen. Microbiol.* **138**.

1647-1655.

Hu, N.-T., Hung, M.-N., Chiou, S.-J., Tang, F., Chiang, D.-C., Huang, H.-Y., and Wu, C.-Y., 1992b. Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* **174**. 2679-2687.

Kazmierczak, B. I., Mielke, D.L., Russel, M., and Model, P., 1994. pIV, a filamentous phage protein that mediates phage exproton across the bacterial cell envelope, forms a multimer. *J. Mol. Biol.* **238**. 187-198.

Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G. R., and Tommassen, J., 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.*, **26**. 789-797.

Lu, H. M., Motley, S. T. and Lory, S., 1997. Interaction of the component of the general secretion pathway: role of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin subunits in complex formation and extracellular protein secretion. *Mol. Microbiol.*, **25**. 247-259.

Michel, G., Bleves, S., Ball, G., Lazdunski, A. and Filloux, A., 1998. Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **144**. 3379-3386.

Nouwen, N., Stahlberg, H., Pugsley, A. P., and Engel, A., 2000. Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electro microscopy. *EMBO J.* **19**.2229-2236.

Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A., and Pugsley, A. P., 1999. Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**.

8173-8177.

Nunn, D. N., and Lory, S., 1993. Cleavage. Methylation. and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT. –U. –V. and –W. *J. Bacteriol.*, **175**, 4375-4382.

Parge, H. E., Forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. E., Getzoff, E. D., and Tainer, J. A., 1995. Structure of the fibre forming protein pilin at 2.6Å resolution. *Nature*, **378**. 32-38.

Possot, O. and Pugsley, A. P., 1994. Molecular characterization of PulE. A protein required for pullulanase secretion. *Mol. Microbiol.* **12**. 287-299.

Possot, O. M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F., and Pugsley, A. P., 2000. Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. *J. Bacteriol.* **182**. 2142-2152.

Pugsley, A. P., d'Enfert, C., Reys, I., and Kornacker, M. G., 1990. Genetics of extracellular protein secretion by gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 67-90.

Pugsley, A. P., 1993. The complete general protein secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 50-108.

Pugsley, A. P., Francetic, O., Possot, O. M., Sauvonnet, N., and Hardie, K. R., 1997. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in gram-negative bacteria-a review. *Gene*, **192**. 13-19.

Reeves, P. J., Whitcombe, D., Wharam, S., Gibson, M., Bunce, N., Barallon, R., Douglas, P., Mulholland, V., Stevens, S., Walker, D., and Salmond, G. P. C., 1993. Molecular cloning and characterization

of 13 *out* genes from *Eewinia carrotovora* subspecies *carrotovora*: genes encoding membranes of a general secretion pathway (GSP) widespread in gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **8**, 443-455.

Russel, M. 1994. Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export? *Science.* **265**. 612-614.

Russel, M. 1995. Moving through the membrane with filamentous phage. *Trends Microbiol.* **3**. 223-228.

Russel, M. 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein systems. *J. Mol. Biol.*, **279**. 485-499.

Salmond, G. P. C., and Reeves, P. J. ,1993. Membrane traffic wardens and protein in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem.Sci.* , **18**, 7-12.

Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S. P., and DiRita, V. J., 1995. Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is require for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J.* **14**. 1664-1673.

Sandkvist, M., Hough, L. P., Bagdasarian, M. M., and Bagdasarian, M., 1999. Direct interaction of the EpsL and EpsM protein of the general secretion apparatus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **181**.3129-3135.

Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A. P., and Gounon, P., 2000. Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **19**. 2221-2228.

Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A. P., and Gounon, P., 2000. PpdD type IV pilin of *Escherichia coli* K-12 can be assembled into pili in

Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* **182**. 2142-2152.

Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G., 1997.

Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of general secretory pathway and secreted protein.

EMBO J., **16**. 3007-3016.

Strom, M. S. and Lory, S., 1991. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**. 565-596.

Swings, J. G., and Civerolo, E. C., 1993. Xanthomonas. Chapters 1-2.

Turner, L. H., Cano. Lara, J., Nunn, D. N. and Lory, S., 1993.

Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in

Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* **175**. 4962-4969.

Wandersmam, C., 1992. Secretion across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Trends Genet.*, **8**, 317-322.

Wandersmam, C., and Delepelaire, P., 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4776-4780.

Wickner W., Driessen, A. J. M., and Hartl F. U., 1991, The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 101-124.