

私立中山醫學院生物化學研究所  
Graduate Institute of Biochemistry  
Chung-Shan Medical & Dental College

碩士論文  
Master's Thesis

十字花科黑腐病菌 XpsG 蛋白在一般蛋白分泌途徑中扮  
演角色之探討

Study of the role of XpsG in general secretion pathway in  
*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*



指導教授：陳凌雲 博士  
Advisor: Dr. Ling-Yun Chen

研究生：陳雅芳  
Graduate student: Avon Chen

中華民國九十年七月  
July, 2001

# 目錄

	頁次
圖次-----	3
縮寫表-----	4
中文摘要-----	5
英文摘要-----	6
一、 前言-----	7
二、 實驗材料與方法-----	12
三、 結果-----	20
四、 討論-----	26
五、 參考文獻-----	30
六、 圖示說明-----	34
七、 附錄-----	50

# 圖次

## 頁次

圖一:XC1713 轉接合菌株含 <i>xpsG</i> 突變基因的澱粉培養基分泌測試-----	34
圖二: XC1701 及 XC1713 轉接合菌株含 <i>xpsG</i> 突變基因的澱粉培養基分泌測試-	35
圖三: 利用 western blot分析 XpsG突變蛋白在 XC1713 的蛋白表現-----	36
圖四: 以 western blot 觀察突變株的澱粉酵素分泌情形 -----	37
圖五: 觀察變異株產生的突變蛋白細胞分佈的情形-----	38
圖六: 由膠質篩濾層析法分析變異株不可溶部分(MF)XpsG 蛋白分子形式-----	39
圖七: 以蔗糖濃度梯度觀察 XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈的情形-----	40
圖八: XpsG 構成橫跨內外兩膜的纖毛構造-----	41
圖九: 以蔗糖濃度梯度觀察在各個 <i>xps</i> knockout 基因的菌株中, 對 XpsG 蛋白內膜 與外膜分佈的-----	42
圖十: XC1701、XC1717、XC1708 內外膜 XpsG 定量圖-----	43
圖十一:以蔗糖濃度梯度觀察在 <i>xpsH</i> 基因缺陷及 <i>xpsH</i> 基因互補的菌株中 XpsG 蛋 白內膜與外膜分佈的差異-----	44
圖十二: 以蔗糖濃度梯度觀察在 <i>xpsD</i> 基因缺陷及 <i>xpsD</i> 基因互補的菌株中 XpsG 蛋白內膜與外膜分佈的差異-----	45
圖十三: 以 <i>xpsD</i> 的 N 端及 C 端 XpsD 抗體偵測變異株的 XpsD 蛋白表現-----	46
圖十四: 以蔗糖濃度梯度觀察在含有 <i>xpsD</i> 基因的 N 端及 C 端的 XC1708 中 XpsG 蛋白內膜與外膜分佈的差異-----	47
圖十五: 由膠質篩濾層析法分析 XC1701 內膜及外膜 XpsG 蛋白分子形式-----	48
圖十六: 由膠質篩濾層析法分析 <i>xps</i> 基因缺陷的菌株 XpsG 蛋白分子形式-----	49

## 縮寫表

DOC : Deoxycholic acid

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TEMED : N,N,N',N',-Tetramethyl Ethylene Diamine

Tris : Tris (hydroxymethyl)aminomethane

XC : *Xanthomonas campestris*

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

DCPIP: 2,6-Dichlorophenol idophenol sodium salt

PMS: phenazine methosulfate

## 中文摘要

革蘭氏陰性菌的細胞結構由外而內分別為外膜、胞外漿質、內膜、細胞質四個部分。而胞外蛋白的分泌在細菌的感染過程中是一項非常重要的機制，因為革蘭氏陰性菌的胞外蛋白要分泌至胞外，必須通過內、外兩層膜，於是不同的革蘭氏陰性菌便發展出不同的分泌途徑。Type II pathway 是分泌途徑中的一種，常見於革蘭氏陰性菌中，又稱為一般分泌途徑(*general secretory pathway* ; GSP)，推測主要是由 12-14 個基因產物構成一個大的複合體，協力將蛋白分泌出。在本論文所研究的對象-十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)，是屬於革蘭氏陰性致病菌，主要感染十字花科類的植物，其蛋白分泌亦是屬於 Type II secretion pathway。其參予蛋白分泌的基因，依基因同源性，依序命名為 *xpsE, F, G, H, I, J, K, L, M, N* 及 *D* 其中 *XpsG* 是由 143 個氨基酸構成的蛋白，在十字花科黑腐病菌的 Type II 蛋白分泌系統中，認為是構成 pilin-like 的成員之一。在之前對 *XpsG* 蛋白研究發現，*XpsG* 蛋白存在於水溶性與脂溶性兩部分。可溶部份(細胞質、膜外漿質)的 *XpsG* 主要以 multimer 型式存在，不可溶部分(細胞膜)經 detergent 萃取後則以 dimer 型式存在。當 *XpsG* 蛋白大量表達時，在胞外可偵測到 *XpsG* 蛋白，故推測 *XpsG* 在正常生理狀況下會形成纖毛構造。而在 *xpsG* 基因上作定位突變，其中 D70E、D121E、D128E、D139E 能回復 XC1713 胞外酵素分泌功能，只有 D103E 不能回復。在本論文研究中，在 *XpsG* 基因第 120 的位置上插入 7 個胺基酸(DHHHHHV)，得到 *XpsG-F120* 蛋白。利用澱粉酵素電泳分析、膠質篩濾層析法、蔗糖濃度梯度實驗，發現此蛋白失去將胞外蛋白分泌出細胞的功能，同時不干擾正常 *XpsG* 蛋白的正常蛋白分泌功能，且此變異蛋白無可溶性部分，不可溶部分則主要分佈在細胞內膜並以大分子型式存在，此結果與正常 *XpsG* 同時分佈在內、外膜不同。由此證實 *XpsG* 在正常生理狀況下，會形成橫跨內外膜的纖毛構造。進一步利用蔗糖濃度梯度，分析各個 *xps* 基因缺損的菌株中 *XpsG* 蛋白內外膜分佈，發現在 *xpsH* 及 *xpsD* 基因缺損(XC1717、XC1708)的菌株中，其 *XpsG* 蛋白在內外膜的分佈有所差異，由此推測在正常生理狀況下，形成橫跨內外膜的 *XpsG* 纖毛構造與 *XpsH* 及 *XpsD* 蛋白有關。但 *XpsH* 及 *XpsD* 真正對於 *XpsG* 纖毛分佈扮演什麼角色，則需要其他實驗證實。

## Abstract

There are four subcellular compartments including the outer membrane, periplasm, inner membrane and cytoplasm in the Gram-negative bacteria. The ability to secrete extracellular proteins is critical for the infectivity of pathogenic bacteria. Several distinct routes have evolved for this purpose in various bacteria. The type II secretion pathway (also known as the general secretory pathway; GSP) is one of such system that widely distributed among bacteria. In *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the apparatus of GSP possess XpsE, F, G, H, I, J, K, L, M, N and D proteins. XpsG, a protein of 143 amino acid residues, is a major component for assembly of the proposed pseudopilin structure that spans both inner and outer membranes. Our previous studies showed that XpsG exists as soluble form (SF) and membrane form (MF) simultaneously in cell. Soluble form, originate from cytoplasm, periplasm, or both compartments, was eluted as multimer (MW > 669 kDa) based upon gel-filtration chromatography in the absence of detergent. Membrane form was eluted as smaller complex (MW 200 kDa) or dimer depends on the detergent applied. Interestingly, overproduction of XpsG conferred the detection of multimer form in the extracellular fraction, suggesting its formation under physiological condition. Such a multimer form may represent a pseudopilin structure protruded out from the outer membrane and truncated due to its overlength. To further characterize the XpsG proteins, several point mutations targeted on the conserved aspartic acid residues were generated. Among them, the plasmid-expressed D70E, D121E, D128E and D139E could functional complement XC1713, a chromosomal *xpsG* mutant, for exportation of  $\alpha$ -amylase. The only exception was D103E. Furthermore, seven amino acid residues (DHHHHHV) were introduced between F121 to generate XpsG-F120. Overexpression of XpsG-F120 could not complement XC1713, neither did it interfere the protein secretion in wild type strain (XC1701). Subcellular fractionation analysis using sucrose-gradient technique revealed that XpsG-F120 mainly appeared in the inner membrane, distinctively different from that of wild type XpsG which spans both membranes. Analysis of the molecular size of XpsG-F120 by gel-filtration chromatography showed that it was less dissociable by detergent and remained as multimer form (>MW 669 kDa). Moreover, in strains defective either with *xpsH* or *xpsD* genes (XC1717 or XC1708, respectively), the distribution ratio of XpsG between inner and outer membrane was changed. This observation suggests that both XpsH and XpsD may involve in the establishment of pseudopilin structure of XpsG.

## 一、前言

革蘭氏陰性菌與革蘭氏陽性菌皆普遍存在於自然界中，兩者最大的不同在於細胞結構上，革蘭氏陰性菌的細胞結構由外而內分別為外膜、胞外漿質、內膜、細胞質四個部分。外膜提供了革蘭氏陰性菌天然的屏障，可以保護菌體免受一些藥物傷害，如清潔劑、消毒劑、染劑、部分抗體；但是相對的，外膜對於營養素的吸收，及胞外蛋白的分泌也是一道阻礙。胞外蛋白的分泌在細菌的感染過程中是一項非常重要的機制，這些蛋白包括了蛋白分解酶、毒素蛋白、水解酵素、澱粉酶，當這些蛋白有效的分泌出胞外，細菌才能成功的感染生物體繼而生存下去。革蘭氏陰性菌的胞外蛋白要分泌至胞外，必須通過內、外兩層膜，於是不同的革蘭氏陰性菌便發展出不同的分泌途徑，就目前所知的胞外分泌途徑主要分為六種方式(Sandkvist, 2001a)。

六種胞外分泌途徑包括有 type I typeII typeIII typeIV、TPS(Two partner secretion)、自動運輸途徑(autotransport pathway)。其中 type I、type III 以單一步驟便可將蛋白分泌至胞外，type I pathway 利用三個蛋白組成橫跨內外膜的分泌通道，type III pathway 至少需要 20 個蛋白構成，兩種方式皆藉由形成通道，使未摺疊的蛋白及不需利用 sec 系統傳送的蛋白可直接利用此通道，穿過內外膜分泌出去。TypeII、TPS、autotransport pathway 共同特色則是皆由 2 個步驟才將胞外蛋白分泌出，而這一類的胞外蛋白在其 N 端皆有信號序列，透過位在內膜上的 Sec 分泌系統，將蛋白由細胞質傳送過內膜，再將信號序列去除後送到胞外漿質，在胞外漿質的蛋白再藉由另外的外膜分泌機制送出胞外。TypeII pathway 推測至少由 12 個基因產物構成一個大的複合體，協力將蛋白分泌出，常見於革蘭氏陰性菌中，又稱為一般分泌途徑 (general secretory pathway; GSP) (Sandkvist, 2001b)。TPS pathway 則藉由 FhaC 在外膜形成孔洞，蛋白便由此通過外膜再分泌至胞外，經由此方式分泌出的蛋白，分子量都大於 100kDa，甚至高達 400-500kDa (Francoise, *et al.*, 2001)。而以 autotransport pathway 分泌的蛋白，在通過外膜時並不需要其他蛋白輔助，此類蛋白的 C 端會插入外膜中形成孔洞，將 N 端蛋白傳送至細胞表面，再經蛋白酶切割後釋放到胞外，達到胞外蛋白分泌的目的。Type IV pathway 藉由形成纖毛 pili 構造，接合宿主與細菌之間，細菌的 DNA 會和蛋白形成複合體，經 type IV pili (Tfp) 形成得的中間孔洞分泌出；而對於毒素蛋白的

分泌，會藉由內膜上的 Sec 分泌系統，將蛋白由細胞質傳送過內膜到達胞外漿質，再藉由 type IV pili ( Tfp)通過外膜，Type II pathway 則與此很相似 (Sandkvist, 2001b ; Wolfgang *et al.*, 2000 ; Peter J. Christie, 2001)。

在本論文所研究的對象-十字花科黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)，是屬於革蘭氏陰性致病菌，主要感染十字花科類的植物，當此病菌經由植物傷口感染後，會分泌一些酵素或蛋白質，包括澱粉酵素 ( $\alpha$ -amylase) 果膠酵素 (polygalacturonate lyase) 蛋白水解酵素 (protease) 及纖維酵素 (cellulase) 等，使病菌容易由植物導管蔓延擴散。當植物受感染後會葉片逐漸枯黃，植物莖部、葉面出現黑點及腐化現象，主要原因是因為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，進而導致植物的枯黃壞死(Swings and Civerolo, 1993)。而此細菌的胞外蛋白分泌便是利用 type II pathway，幫助病菌有效感染宿主。

參與 type II 外膜分泌機制的基因，依菌種的不同有 12~15 個基因參與，其基因的命名多依各菌種的基因英文順序排列。而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 12 kb 長，經由核苷酸定序分析後，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 *Klebsiella oxytoca* pullulanase 分泌的蛋白有很高相似性，故依其基因同源性，依序命名為 *xpsE, F, G, H, I, J, K, L, M, N* 及 *D* (Dums *et al.*, 1991 ; Hu *et al.*, 1992a)。

Type II 外膜分泌機制的蛋白以 GspD 的研究較為清楚，研究指出 GspD 是位於外膜的蛋白，屬於 secretins 的一員，對於 type IV pilus 生成系統及 type III 分泌系統皆是必需的。GspD 蛋白會以 12-14 單體組成複合體，形成 type II 外膜分泌機制外膜上的通道，提供給胞外蛋白通過外膜 ( Bitter *et al.*, 1998 ; Koster *et al.*, 2000 ; Collins *et al.*, 2001)。而其蛋白結構上，1996 年 Chen 等人推論 *Xanthomonas campestris* XpsD 蛋白的 C 端與複合體形成有關(Chen, *et al.*, 1996)。其他研究也指出 secretins 的 C 端會插入外膜中，而 N 端會暴露在胞外漿質，並與其他參與分泌的蛋白產生交互作用( Shevchik *et al.*, 1997 ; Koebnik *et al.*, 2000)。在最近的研究報告以電子顯微影像觀察指出，PulD 蛋白的 C 端在經由蛋白質水解 ( proteolysis ) 的作用後，進而堆疊成一個通道，而 N 端的部份會在 C 端蛋白形成複合體之後，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, *et al.*, 2000)。

Type II 外膜分泌機制的外膜蛋白，除了 GspD 外，在某些菌中會發現 GspS 蛋白，功能上主要是穩定 GspD 蛋白且促進 GspD 插入外膜中(Koster, M., *et al.* 1997； Shevchik, V. E., *et al.*, 1997)。然而 type IV pilus 生成系統及 type III 分泌系統，其外膜蛋白 PilQ、InvG 要插入外膜，並沒有出現和 PulS 相似性高的蛋白(Drake *et al.*, 1997； Daefler and Russel, 1998)

和 GspD 蛋白有交互作用出現的，以目前研究發現有 GspN 和 GspC。GspN 為內膜蛋白，在 *Xanthomonas campestris* 中，從免疫共沉澱的實驗結果中發現，XpsN 會和 XpsD 有 coprecipitation 的現象(Lee, H.-M., *et al.*, 2000)。而 GspC 則同時出現在內外膜，以 cross-linking 的實驗顯示，在 PulD 存在時，pulD 與 PulC 會形成大複合體(Possot *et al.*, 1999)。進一步研究也發現 GspC 和內膜蛋白 GspL、GspM 有交互作用(Possot *et al.*, 2000)。

在 Type II 外膜分泌機制中位於內膜上的蛋白，包括有 GspO、L、M、N、F、E。GspO 有 prepilin peptidase 和 N-methyltransferase 的活性(Hardie, K. R., *et al.*, 1996； Shevchik, V. E., *et al.*, 1997)。在 *P. aeruginosa* 中，XcpA/PilD (GspO family) 蛋白會將 PilA 纖毛前驅物的 N 端 leader sequence 水解進一步進行甲基化，因而產生成熟的 PilA 纖毛(Bally, M., *et al.*, 1991)。目前知道 GspL、M 有交互作用而形成穩定的複合體(Michel *et al.*, 1998)。而在 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 研究中，在 *xpsN* 基因缺損的菌株下，偵測不到 XpsL 和 XpsM；將帶有 *xpsLMN* 基因的質體，送入不包含所有 *xps* 基因的菌株(XC17433)，使此菌株只表現 XpsLMN 蛋白，再以免疫共沉澱法實驗，發現 XpsL-XpsM、XpsM-XpsN、XpsL-XpsN 均有 coprecipitation 的現象，因此推論 XpsN 和 XpsL-XpsM 形成複合體有關(Lee, H.-M., *et al.*, 2001)。GspF 蛋白則為具有三個 transmembrane domain 的蛋白。而 GspE 蛋白須專一性的和 GspL 蛋白結合才能穩定的附著在內膜上(Ball *et al.*, 1999)，有研究指出 GspE 蛋白具有 ATPase 的功能，能提供能量打開外膜通道，或促進 GspGHIJK 穿過內膜組裝成 Pili-like 的結構(Sandkvist *et al.*, 2000)。

GspGHIJK 蛋白和 type IV pili 的 subunits 很相似，將這些蛋白與纖毛 PilA 進行同源比對，發現在兩者蛋白的結構上，其 N 端皆具高度厭水區 (約

20-30 個胺基酸所組成)，且都有可被 signal peptidase 切斷的 signal peptide。因為與 PilA 相似度很高，所以為了和 PilA 組成的纖毛（type IV pili）有所區別，一般稱 GspGHIJK 蛋白為 pseudopilins；type IV pilins 可組成很長的纖毛，故推測 GspGHIJK 蛋白也可能會形成 pili-like 的構造。最近研究發現，當在 *E. coli* 大量表現 *K. oxytoca* 的 type II 蛋白分泌基因時，PulG 會組成很長的類似纖毛結構，但在正常生理情況下，並不能偵測到這樣的構造，可能因為蛋白表現量很少，或出現時間很短的關係(Sauvonnet *et al.*, 2000)。也因為此因素，使得一直沒有直接證據證明 GspGHIJK 蛋白會形成 pili-like 的構造。而在 2001 年針對 type IV pili 結構的研究中指出，k122-4<sup>(29-150)</sup> pilin 的三級結構是由 4 個  $\beta$ -sheet 及 1 個  $\alpha$ -helix 組成，再藉由電性的不同，五個 pilin 會以螺旋狀排列組成一個“圈”(turn)的 pilus 結構(Keizer *et al.*, 2001)。

針對纖毛組成與其他蛋白的關係的探討，發現在 *P. aeruginosa* 以 cross-linking 的實驗中，GspG 和 GspH、I、J 皆有交互作用(Lu *et al.*, 1997)。另外在 Sauvonnet 研究指出 PulI 在纖毛構成上可能作為組裝起始點，或位於膜上的支持點，而 PulJ 和 PulK 對於纖毛的組成並沒有影響(Sauvonnet *et al.*, 2000)。再以 *Nesseria gonorrhoeae* 的 type IV pili (Tfp)而言，構成此 pili 的主要蛋白為 PilE，PilE 由 PilD 修飾後，經由 PilF 組成纖毛構造，再通過由 PilQ 在外膜形成的通道，將 pili 延伸出去，而正常情況下，PilT 會將 pili 分解掉，藉由此功能平衡了 PilF 功能，也因此穩定了整個系統的正常運作(Wolfgang *et al.*, 2000)。但在菌體內，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%(Strom *et al.*, 1991)。雖然在 type II 蛋白分泌系統中，pseudopilins 和合成 type IV pili 的蛋白很相似，但卻未能清楚找出蛋白和蛋白之間的關係，以及如何控制蛋白的分泌。

而由 Sauvonnet 研究中發現 PulG 是組成纖毛的主要成分，在菌體內 XcpT(GspG)蛋白量也較其他 pseudopilins 多。故在本論文研究中，便是著重在十字花科黑腐病菌 XpsG 蛋白在第二型蛋白分泌機制所扮演角色的探討。

XpsG 是由 143 個氨基酸構成的蛋白，在十字花科黑腐病菌的 type II 蛋白分泌系統中，認為是構成 pili-like 的成員之一。對 XpsG 蛋白的探討，在之前宋浴伶學姐針對 XpsG 蛋白研究發現，將十字花科黑腐致病菌野生株

XC1701 以超高速離心後，區分成可溶部份(包括細胞質、胞外漿質)及不可溶部份(細胞膜)，而 XpsG 蛋白會同時分佈在細胞質、膜外漿質與細胞膜部分。再以膠質篩濾層析法分析可溶部份及不可溶部份時，發現可溶部份的 XpsG 主要以 multimer 型式存在，不可溶部分以 dimer 型式存在。當 XpsG 蛋白大量表達時，在胞外可偵測到 XpsG 蛋白。由以上實驗結果認為 XpsG 在正常生理狀況下會形成纖毛構造。同時在實驗中，學姐也分別將位於 *xpsG* 基因上第 70、103、121、128、139 高度保留的 Aspartate(D)，以定位突變法改成 glutamate(E)，其中 D70E、D121E、D128E、D139E 能回復 XC1713 胞外酵素分泌功能，只有 D103E 不能回復。

為了進一步研究這些位置對 XpsG 蛋白是否有特殊意義，同時也希望利用 Ni-NTA 純化出有功能蛋白，所以在本論文研究中，配合限制酶切位與胺基酸的電性，設計在第 69、100、120 位置上插入 7 個胺基酸(DHHHHHV)。結果得到 F120-I7 蛋白，此變異蛋白失去將胞外蛋白分泌出細胞的功能，同時不干擾正常 XpsG 蛋白的正常蛋白分泌功能。在細胞分佈上與正常 XpsG 不同，沒有分佈在細胞質、胞外漿質。而以膠質篩濾層析法、蔗糖濃度梯度分析，發現此變異蛋白以大分子形式存在，且主要存在內膜上，與正常 XpsG 同時分佈在內、外膜不同。由此推測 XpsG 在正常生理狀況下，會形成橫跨內外膜的纖毛構造。而更進一步利用蔗糖濃度梯度，分析各個 *xps* 基因缺損的菌株中 XpsG 蛋白內外膜分佈，發現在 *xpsH* 及 *xpsD* 基因缺損(XC1717、XC1708)的菌株下，其 XpsG 蛋白內外膜分佈有所差異，由此推測在正常生理狀況下，形成橫跨內外膜的 XpsG 纖毛構造與 XpsH 及 XpsD 蛋白有關。

## 二、實驗材料與方法：

1.菌種：論文中所使用之菌種皆列於附錄中。

2.抗體：XpsG 抗體：由孟訓學長於碩士班期間製備完成。

Amylase 抗體由本實驗室製備。

XpsD 抗體(包括 N 端及 C 端部分): 由中興大學生化所胡念台教授提供。

3.定位突變法：

利用 GeneEditor™ in vitro site-directed mutagenesis system (Promega 製備而成。此系統適用於具有 Ampicilin resistance 標誌的載體，產生重組載體除了保有 Ampicilin resistance 的特性之外，還會產生一個新的

篩選標誌 resistance GeneEditor™ Antibiotic selection Mix。

本文中定點突變的 primer:

xpsG-L69V: 5' -GAACTTCCAGGTCGACACGGG-3'

xpsG-F120V: 5' -CAAACCGGTCGACCTCAACGACC-3'

步驟:

(1) Primer 5' -Phosphorylation:在 25 $\mu$ l 的反應體積中,加入適當的 primer (100 pmol), kinase 10x buffer 2.5 $\mu$ l, T<sub>4</sub> polynucleotide kinase 5 units , ATP 25mM , 再以無菌二次水補到最後體積 25 $\mu$ l。於 37 反應 30 分鐘,馬上置入 70 水浴 10 分鐘終止 kinase 活性,即可完成。反應物可置入-20 冷藏保存或直接進行 Annealing 反應。

(2) Annealing reaction:加入 ssDNA 5 $\mu$ l , Top select oligonucleotide 1 $\mu$ l , phosphorylated mutagenic oligonucleotide (100 pmol/25 $\mu$ l)1 $\mu$ l , annealing 10x buffer 2 $\mu$ l , 加入無菌水到最終體積為 20 $\mu$ l。將反應物置於 75 水浴加熱 5 分鐘,之後慢慢加水降溫到室溫(20-30 分鐘)。將反應物置於冰上,加入 synthesis 10x buffer 3.5 $\mu$ l , 2.5mM dNTPs 6 $\mu$ l , T<sub>4</sub> DNA polymerase 10 units , T<sub>4</sub> DNA ligase 2 units , 10x BSA 2 $\mu$ l。於 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 fl origin 的方向來決定。)

- (3) Transformation to *BMH71-18 mutS* : 將已完成 annealing 的 DNA 10 $\mu$ l 送入 100 $\mu$ l *BMH71-18 mutS* competent cell 混合均勻, 置於冰上 60 分鐘, 再於 42 $^{\circ}$ C 加熱 45-50 秒之後, 馬上置於冰上 2 分鐘, 加入 900 $\mu$ l LB medium, 於 37 $^{\circ}$ C 培養至少 2~3 個小時(待菌液混濁), 再加入 4 ml LB medium 及 100 $\mu$ l GeneEditor<sup>TM</sup> Antibiotic selection Mix 抗生素, 繼續於 37 $^{\circ}$ C 培養到菌液呈混濁。
- (4) Transformation to JM109 : 以 CLONTECH Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit 抽取質體, 經 1 % agarose gel 確定有抽到質體後, 取 5 $\mu$ l 加入 100 $\mu$ l JM109 competent cell 中, 置於冰上 30 分鐘, 再於 42 $^{\circ}$ C 加熱 2 分 45 秒後, 馬上置於冰上 5 分鐘, 再均勻塗在含 125 $\mu$ g/ml Ampicilin 及 100 $\mu$ l GeneEditor<sup>TM</sup> Antibiotic selection Mix 抗生素的培養基上, 於 37 $^{\circ}$ C 培養 O/N。
- (5) 挑出培養基上的菌落, 培養在 5ml LB broth 中, 37 $^{\circ}$ C, O/N, 再抽出質體, 以酵素水解檢查是否含有 insert。
- (6) Enzyme digestion : 在 10 $\mu$ l 的反應體積中, plasmid 取 3 $\mu$ l, 加入限制酶 *Bam*HI 及 *Hind*III 各 0.5 $\mu$ l, 10x BSA 1 $\mu$ l, 10x NEB Buffer 1 $\mu$ l, PCR H<sub>2</sub>O 4 $\mu$ l, 於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽反應二小時, 再以 1 % agarose gel 檢查。
- (7) 當酵素水解檢查確定後, 再進一步以 DNA sequencing 加以確定定位突變成功。

#### 4. *xpsG* 定點突變基因的製備

- (1)載體的製備(prepare vector) : 利用 CLONTECH Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit 抽取 DH5 $\alpha$ /pCPP30-FG 質體 以 1 % agarose gel 檢查有沒有抽到 plasmid (pCPP30-FG), 再用限制酶 *Bam*HI 及 *Hind*III 作 enzyme digestion, 以 1 % agarose gel 分離 DNA 片段, 利用 CLONTECH GEL EXTRACTION Kit 將較大片段 7.5kb 的載體純化出來。
- (2) prepare insert DNA : 抽定位突變成功的質體(mutant DNA/pBluKS<sup>-</sup>), 用限制酶 *Bam* HI 及 *Hind* III 水解 DNA, 以 1 %

agarose gel 分離 DNA 片段, 利用 CLONTECH GEL EXTRACTION Kit 將較小片段 790bp 的 insert 萃取出來。

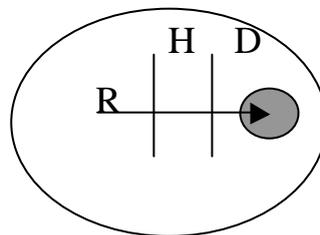
- (3) ligation : 在 10 $\mu$ l 的反應體積中, insert(mutant DNA) : vector (pCPP30)=1:1, 加入 T<sub>4</sub> DNA ligase 1 $\mu$ l, 10x T<sub>4</sub> DNA ligase buffer 1 $\mu$ l。 16 O/N。
- (4) transformation to JM109:將上述已經 ligation 完成的 10 $\mu$ l plasmid 全部送入 50 $\mu$ l JM109 competent cell, 均勻混合後, 置於冰上 30 分鐘, 42 加熱 2 分 45 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 $\mu$ g/ml)的 LB plate 上, 37 O/N。

### 5. *xpsG* 插入突變基因的製備

- (1)為配合限制酶的切位, 將定點突變成功的質體(pCPP30-mutant DNA) 以限制酶 *Bam*HI 及 *Hind* III 水解後, 取其 insert 部份, 與經 *Bam* HI 及 *Hind* III 水解後載體 pET32a 進行 ligation, 再轉殖入 JM109 competent cell 之後再養菌抽取質體, 以 *Sal* I 作 enzyme digestion 篩選正確的質體 DNA。
- (2)抽取大量的成功質體(pET32a-mutant), 以 *sal* I 作 enzyme digestion, 將 6.7kb 的載體純化出來。加入牛小腸磷酸化酶(CIP)1 $\mu$ l, 1/10V 10Xbuffer, 30 反應 45 分鐘用以去除載體兩端磷酸根, 以 1% agarose gel 分離 DNA 片段, 利用 CLONTECH GEL EXTRACTION Kit 將載體萃取出來。
- (3)將兩個 primer: *sal*-His(+):5' -TCGACCACCATCATCATCATG-3'、*sal*-His(-): 5' -TCGACATGATGATGATGGTGG-3' 各取 100 $\mu$ l 混合後, 於 100 加熱 10 分鐘, 自然冷卻至室溫, 於 4 保存, 此片段作為 inser, 稱為 I7。將此 inser 與(2)製備的載體 ligation 後, 轉殖入 JM109 competent cell 之後, 再養菌抽取質體, 作 DNA sequencing。
- (5)成功的 pET32a-mutant-I7 再以 *Bam*HI 及 *Hind* III 插入 pCPP30 中, 構築 pCPP30-mutant-I7。

## 6. 接合作用 (Conjugation):

- (1) 將 Helper cell(H), *E.coli* DH5 $\alpha$ (pRK2013)劃在含 Km(50 $\mu$ g/ml)的 LB plate 上。
- (2) 劃 recipient cell (XC1701;XC1713 或其他 knockout strain mutant)於含 Rif(100 $\mu$ g/ml) 的 LB plate 上。
- (3) 將 donor cell(D) JM109/pCPP30-mutant 劃在含 Tetracyclin(15 $\mu$ g/ml) 的 LB plate 上。
- (4) 準備一個 LB plate , 將 Helper cell、 donor cell 在 LB plate 劃一縱線 (如下圖), 再取適量的 recipient cell, 橫劃過 Helper cell & donor cell , 將此 plate 置 30 $^{\circ}$  培養 24 小時。
- (5) 取箭頭右側長出的菌落, 在含 Rif 及 Tetracyclin 的 LB plate 上劃成三區, 於 30 $^{\circ}$  培養 3-5 天。選在第三區長出的單一菌落, 以斜線的方式劃在同時含 Rif 及 Tetracyclin 的 LB plate 上, 30 $^{\circ}$  , O/N, 作為增菌。之後再將菌點在 starch plate 上作功能測試。



## 7. 互補實驗 :

將構築好的重組質體經接合作用送入 XC1713(*xpsG* knockout)變異株, 增菌後, 再將此菌點在澱粉培養基(starch plate)上, 以 XC1701 以及 XC1713 當作陽性和陰性對照組。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, 來判斷重組質體是否能回復原有基因的功能。

## 8. 干擾實驗 :

將構築好的重組質體經接合作用送入澱粉酵素分泌正常 XC1701, 增菌完後, 將菌點在澱粉培養基(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是否因送入重組質體, 而改變原本正常的分泌功能。

## 9. 西方點墨法：(Western Blot)

- (1) 配置 13.8 % SDS-PAGE
- (2) sample 與 sample buffer 混合後煮沸 5 分鐘,使蛋白變性,再 loading 到 polyacrylamide gel , 用 125V 進行電泳分析。
- (3) 將電泳後的 gel , 以 transfer buffer 進泡 , 於室溫溫和搖盪十分鐘 , 重複 3 次。
- (4) 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 以適量甲醇中浸濕 , 接著再用二次水洗去甲醇 , 並在室溫中搖盪五分鐘 , 最後將 PVDF 浸泡再 transfer buffer 至少十分鐘。)
- (5) 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。
- (6) 1<sup>st</sup>-Ab: 將 PVDF 置於塑膠袋中 , 加入 5ml TBS buffer (含 3 % skim milk) , 再加入 1.7 $\mu$ l XpsG Ab(1/3000)或 1.7 $\mu$ l XpsD Ab(1/3000) , 將塑膠袋密封 , 室溫搖晃至少一小時。
- (7) wash: 以 TBS buffer 浸泡 PVDF , 室溫溫和搖晃至少十分鐘 , 洗 4 次。
- (8) 2<sup>nd</sup> -Ab: 將 PVDF 置於塑膠袋中 , 加入 TBS buffer (含 3 % skim milk) , 再加入 1.7 $\mu$ l anti-rabbit Ab(1/3000) , 將塑膠袋密封 , 室溫搖晃一小時。
- (9) wash: 重複 step 6。
- (10) 呈色 : 使用 SuperSignal 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 5 分鐘 , 再以 X 光片感光呈色。

## 10. 澱粉酵素電泳分析( $\alpha$ -amylase western blot)

- (1) 培養 2 ml 小量菌至混濁後 , 取 100  $\mu$ l 以 12000rpm 離心 5 分鐘 , 留下 pellet 部分。
- (2) Pellet 以 10 % maltose 溶液回溶 , 加入 XOL 中。最終體積為 3 ml 的 XOL 菌液中 , 含有 0.4% maltose 及適當濃度的抗生素。將菌液

於 30 °C 培養箱中培養，起始 OD<sub>600</sub> 為 0.1~0.2，以速度 175rpm 震盪。

- (3) 培養至 OD<sub>600</sub> 到 1.0~1.2 時，取 1 ml 的菌液，以 12000rpm 離心 5 分鐘。取 800 ul 上清液再離心一次，取 720 ul 上清液以 TCA 沉澱，之後再以 43 ul sample buffer 回溶，此為胞外部分(extracellular)。原本剩下的 pellet 部份以 1ml 二次水回溶再離心，重複 2 次，最後 pellet 以 60 ul sample buffer 回溶，此作為胞內部分(cellular)。
- (4) 將胞外及胞內部分進行 western-blot，以 amylase 抗體來偵測。

#### 11.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 rifampicin 及 tetracyclin 2ml LB 的培養液中，並置入 30 °C 培育箱震盪，待菌液菌液呈現混濁後，換到 200ml LB 的培養液中繼續培養，直到菌液呈現混濁後為止。接著利用高速離心 10000 rpm，10 min 將細胞收下來，再用適量的二次水將細胞懸浮，以 12000 rpm，10 min 高速離心，將細胞外多醣類洗掉，重複兩次，再用 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF, 0.1 mM DTT)將細胞懸浮，通過 French Press (18000-20000 lb/in，流速 1 滴/2-4 秒)3~4 次，將細胞打破後，先用以 12000 rpm，10 min 離心除去未破細胞，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。沉澱物回溶在 2 ml 的 20 mM Tris-HCl pH8.0, 0.5% DOC 或 2 % Triton X-100 buffer, 4 °C 溫和搖晃至少 2 小時，超高速離心(30000 rpm，60 min)，並取上清液備用，為膜蛋白萃取液。

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

將 Superdex HR-200 (size 25ml，可分 10-600kDa，Pharmacia)膠質篩濾層析管柱安裝於 HPLC 上，以二倍體積(50ml)的 buffer 平衡，流速為 0.5 ml/min。將 sample 以微量針筒取 200µl 注射到 HPLC，收集 retention time 14-38 min，每管 0.5 ml。每管取 300µl 加入四倍體積的丙酮，在 -20 °C 沉澱至少一個小時，高速離心(12000rpm, 15 min)，去上層液。將沉澱物風乾，最後加入 25µl SDS-PAGE 1x sample buffer，進

行 SDS-PAGE 電泳以及西方點墨法分析。

### 13.蔗糖濃度梯度分析法(sucrose gradient sedimentation analysis)

- (1) sample 製備:將 200ml 菌液養至 OD600 約為 1.0~1.2 時，將菌液收下  
下  
接著利用高速離心 10000 rpm，10 min 將細胞收下來，再用適量的二次水將細胞懸浮，以 12000 rpm，10 min 高速離心將細胞外多醣類洗掉，重複兩次，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)3~4 次，將細胞打破後，以 3000 rpm，20 min 離心除去未破細胞，再以 12000rpm，1hr 離心，所取得的沉澱物以 1 ml 的 10 mM Tris-HCl pH8.0 回溶即成。
- (2) 蔗糖溶液的充填: 分別配置 61%、54%、46%、39%、32%、25% 的蔗糖溶液由下而上充填，形成梯度分層。
- (3) 將 sample 充填於蔗糖梯度分層的最上層，進行超高速離心 (23000rpm,23hr)。離心完後由上而下 1ml 收集 1 管，每 1 管再個別取 200ul 作 TCA 沉澱。
- (4) TCA 沉澱: 取 200ul sample 與 TCA 充分混合後，置於 4℃，30 分鐘以上(TCA 最終濃度為 10%)。之後離心 15 分鐘，倒掉上清液，加入有機溶液(乙醚:酒精=1:1)混合，再離心 5 分鐘，重複兩次，主要是為了洗去殘留的 TCA，剩下的 pellet 風乾即可。
- (5) pellet 風乾，最後加入 40ul sample buffer，進行西方點墨法分析。
- (6) 分析 SDH(succinate dehydrogenase)酵素活性:主要作為內膜標誌。  
取 50 ul 收集液與 930 ul 反應液(50 mM Tris-HCl，pH8.0，4 mM KCN, 40 mM succinate)混合，於室溫反應 5 分鐘，加入 10 ul 的 4 mM DCPIP，10 ul 的 20 mM PMS，以波長 600 測其吸光值連續 2 分鐘，根據所得的變化值換算酵素活性。
- (7) 蔗糖濃度偵測:利用糖度計測量糖濃度含量，確定糖梯度正確。

#### 14. Ni-NTA affinity chromatography

Ni-NTA resin 先以 extraction buffer(1% triton x-100 , 20 mM Tris-HCl , 200 mM NaCl)平衡後 , 再以膜蛋白萃取液與 1 ml Ni-NTA resin 混合 , 於 4 °C 搖盪 O/N 之後將混合物充填入 10 cm x 1 cm(diameter) column 中 , 收集流下來的液體 , 重新回填至 column 中 , 再收集流下來的 , 此為 FT(flow throw)部分。加入 30ml wash buffer(1% triton x-100 , 20 mM Tris-HCl , 200 mM NaCl , 25 mM Imidazole)將雜蛋白清洗下來 , 收集第一管與最後一管 , 此為 W<sub>1</sub> W<sub>2</sub> 加入 elution buffer(1% triton x-100 , 20 mM Tris-HCl , 200 mM NaCl , 250 mM Imidazole) , 每 1ml 收集一管 , 共收集 4 管 , 此為 E<sub>1</sub>~E<sub>4</sub>。將所收集到的 , 每管取 500μl 加入 1ml 的丙酮 , 在 -20 °C 沉澱至少一個小時 , 高速離心(12000rpm, 15 min) , 去上層液。將沉澱物風乾 , 最後加入 10μl sample buffer , 進行 SDS-PAGE 電泳及蛋白質硝酸銀染色。

#### 15.蛋白質硝酸銀染色法(protein silver stain)

採用 BIO-RAD 的 Silver stain plus kit。

### 三、結果

#### 一、重組蛋白 XpsG-F120、XpsG-L69 的構築

因為要在 *xpsG* 基因上插入 7 個胺基酸(DHHHHHV)，所以首先配合限制酶切位與胺基酸的電性，設計在 *xpsG* 基因上的基因序列作定點突變，將原本的基因序列改成限制酶 *salI* 的切位(GTCGAC)。在本論文中成功得到兩個定點突變的突變基因:L69V、F120V。L69V 是 XpsG 蛋白第 69 個氨基酸 Leucine 改為 Valine，F120V 則是將第 120 個氨基酸 Phenylalanine 改為 Valine。經核酸定序確定突變成功後(附錄 2、3)，便繼續進行互補實驗，以確定上述定點突變是否影響原有胞外蛋白分泌功能。

XC1701 為十字花科黑腐病菌野生株，能正常分泌胞外蛋白，澱粉酵素(α-amylase)便是其中之一胞外蛋白，能分解澱粉成分，所以會在澱粉培養基上的菌落周圍產生透明暈圈。藉由菌落周圍透明暈圈的大小，來判斷澱粉酵素分泌情形。而 XC1713 為十字花科黑腐病菌 *xpsG* 基因缺損菌株，胞外蛋白分泌機制有障礙，不會在澱粉培養基上產生暈圈。因此可從暈圈產生與否來進行互補實驗，判斷定點突變基因 L69V、F120V 對原有胞外蛋白分泌功能的影響。從圖一知含有突變基因 L69V、F120V 的 XC1713(XC1713/pL69V、XC1713/pF120V)適量點在澱粉培養基上，置於 30℃ 培養箱中，培養 O/N，再以 XC1701、1713 分別作為陽性、陰性對照組，結果發現 L69V、F120V 皆能使 XC1713 恢復正常胞外酵素分泌功能(圖一)。

確定定點突變 L69V、F120V 不影響原有胞外蛋白分泌功能後，便進行基因插入重組實驗，在 L69、F120 位置插入 7 個氨基酸序列(DHHHHHV)，經由核酸定序確定基因重組成功後(附錄 4、5)，將重組質體(pCPP30-L69-I7、pCPP30-F120-I7)接合到 XC1713 中，以澱粉培養基培養，結果發現含有重組基因 L69-I7、F120-I7 的 XC1713，皆不能恢復正常胞外酵素分泌功能。再將 pCPP30-L69-I7、pCPP30-F120-I7 接合到 XC1701，以澱粉培養基培養，XC1701、1713 分別作為陽性、陰性對照組，觀察具有正常胞外酵素分泌功能的 XC1701 是否會受到干擾，結果發現重組基因 L69-I7、F120-I7 不會干擾正常胞外酵素分泌功能。(圖二)

L69-I7、F120-I7 不會恢復亦不干擾正常胞外酵素分泌功能，要了解

原因首先觀察重組基因是否會產生蛋白？將含有 L69-I7、F120-I7 的 XC1713 培養於 2 ml LB broth 中，待菌混濁後，取其 total cell lysate 進行 SDS-PAGE 電泳分離，以 XpsG 抗體作 western blot，並以 XC1701、XC1713 的 total cell lysate 作陽性、陰性對照組。結果顯示，XC1713/pCPP30-L69-I7 並沒有看到 XpsG 重組蛋白的表現(圖三、A)，XC1713/pCPP30-F120-I7 則看到分子量比原來 XpsG 蛋白較大的 XpsG 重組蛋白 F120-I7(重新命名為 XpsG-F120)(圖三、B)。由此可知 L69-I7 不會恢復亦不干擾正常胞外酵素分泌功能，其原因是重組蛋白產生後非常不穩定，很快便被分解掉了，所以在 total cell lysate 的 western blot 結果中看不到重組蛋白的出現；XpsG-F120 會產生重組蛋白，但不會恢復亦不干擾正常胞外酵素分泌功能，故接下來便想針對此重組蛋白，探討 XpsG-F120 重組蛋白與正常 XpsG 的差異。

## 二、XpsG-F120 重組蛋白的分析

為了更進一步確定重組蛋白對於胞外酵素分泌的影響，於是便利用以  $\alpha$ -amylase 為抗體的 western blot，直接看澱粉酶的分佈。以 XC1701、XC1713 分別為陽性、陰性對照組，實驗結果顯示在含有 F120-I7 基因的 XC1701 (XC1701/pCPP30-F120-I7)，在胞外可以看到  $\alpha$ -amylase 的分佈；而 XC1713/pCPP30-F120-I7 在胞外看不到  $\alpha$ -amylase(圖四)。由此更加確定 XpsG-F120 不會恢復亦不干擾正常胞外酵素分泌功能。

為比較 XpsG-F120 重組蛋白與正常 XpsG 的差異，首先觀察蛋白在細胞分佈中分佈情況。將 XC1701/pCPP30-F120-I7、XC1713/pCPP30-F120-I7 細胞抽取液以超高速離心區分成可溶(細胞質、膜外漿質)與不可溶(細胞膜)部分，以 XpsG 抗體作 western blot，結果發現在 XC1713/pCPP30-F120-I7 菌株中，可溶部分並沒有偵測到 XpsG-F120 蛋白；XC1701/pCPP30-F120-I7 的正常 XpsG 蛋白則同時分佈在可溶與不可溶部分，但是 XpsG-F120 蛋白仍然只分佈在不可溶部分(圖五)。由此推測 XpsG-F120 蛋白無法恢復正常胞外酵素分泌功能，可能與 XpsG-F120 蛋白沒有分布在可溶部分有關；且由 XC1701/pCPP30-F120-I7 也發現 XpsG 蛋白仍能在可溶部分出現，表示 XpsG-F120 蛋白不會干擾

XpsG 蛋白的分佈，推測兩者之間可能沒有交互作用。

之前在浴伶學姊的實驗中發現，經膠質篩濾層析法分析，在可溶部分的 XpsG 蛋白，主要以大分子複合體的形式存在；在 0.5% DOC 條件下，酯溶性部分主要以雙體型式的 XpsG 存在。而 XpsG-F120 蛋白只分佈在不可溶部分，所以接下來便想探討酯溶性 XpsG-F120 蛋白的分子形式為何？將 XC1713/pCPP30-F120-I7 不可溶部分的膜蛋白萃取液，通過 Superdex HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，緩衝平衡液分別含有 0.5% DOC 或 1% Triton X-100，收集層析後的沖出液，以 4 倍體積的丙酮沉澱風乾後，經 SDS-PAGE 進行電泳分離，並以 XpsG 抗體作 western blot。結果顯示，不管以 DOC 或 Triton 為緩衝平衡液，XpsG-F120 蛋白主要都出現在 retention time 15、16 分鐘，表示 XpsG-F120 蛋白會緊密簇集在一起，同時在 22-26 分鐘偵測到一些小片段，這也顯示當 XpsG-F120 蛋白大量產生時，也相對的容易被內生性蛋白酶分解掉(圖六、A)。再以 1% Triton X-100 為緩衝平衡液時，以 HR-200 膠質篩濾層析法分析 XC1701、XC1701/pF120-I7 不可溶部分的膜蛋白萃取液，以 XpsG 抗體作 western blot，來比較正常與突變蛋白分子型式差異，結果顯示 XpsG-F120 蛋白出現在 retention time 15、16 分鐘，而正常 XpsG 蛋白分佈在 retention time 18~26 分鐘。正常與突變 XpsG 蛋白同時存在時，發現 XpsG-F120 和 XpsG 蛋白的主要分佈並沒有交集(圖六、B)。故由此實驗證明 XpsG-F120 和 XpsG 蛋白之間沒有交互作用，而且 XpsG-F120 蛋白的分子形式和 XpsG 蛋白是不同的。

十字花科黑腐病菌屬於革蘭氏陰性菌，具有兩層膜構造。為了分析 XpsG 蛋白與 XpsG-F120 蛋白在內外膜的分佈，於是利用蔗糖濃度梯度以超高速離心 23 小時(23000 rpm, 4<sup>h</sup>)，將內外膜部分分離，由蔗糖低濃度至高濃度，以 1 ml 收集一管，以終濃度 10% TCA 沉澱後風乾，進行 SDS-PAGE 電泳分離，並以 XpsG 抗體作 western blot，同時以 OmpA 蛋白、SDH 酵素活性作外膜與內膜的標誌，蔗糖密度作為梯度分層正確的指標。由實驗結果顯示，XpsG 蛋白主要分佈在 11-17 管及 23-28 管兩區域，而 XpsG-F120 蛋白分佈在 13-18 管，再經由 OmpA 蛋白、SDH 酵素活性比對下，得知 XpsG 蛋白分佈在內外膜，XpsG-F120 蛋白只分佈

在內膜(圖七)。

綜合以上結果，因為 XpsG-F120 蛋白並沒有恢復正常胞外蛋白分泌的功能，在可溶部分(細胞質、膜外漿質)並沒有出現，而且只分佈在內膜；相對的，具有正常生理狀態下，XpsG 具有胞外蛋白分泌功能，同時分佈在可溶部分(細胞質、膜外漿質)及不可溶部分(細胞膜)，且以蔗糖濃度梯度分析也發現 XpsG 是分佈在內外膜的，因此推測 XpsG 會在十字花科黑腐病菌中形成一個橫跨內外膜的纖毛構造(圖八)。

### 三、以蔗糖濃度梯度探討各 *xps* 基因對 XpsG 蛋白內外膜分佈的影響

以蔗糖濃度梯度發現十字花科黑腐病菌野生菌 XC1701 的 XpsG 蛋白會分佈在內外膜，為探討哪一個 Xps 蛋白會影響 XpsG 蛋白內外膜的分佈，故利用蔗糖濃度梯度分析各個 *xps* 基因缺損菌株的 XpsG 蛋白分佈，以 1 ml 收集一管，以終濃度 10% TCA 沉澱後風乾，進行 SDS-PAGE 電泳分離，並以 XpsG 抗體作 western blot。由結果發現，在 XC1717( $\Delta H$ )、XC1708( $\Delta D$ )的 XpsG 蛋白分布上，內膜 XpsG 蛋白表現比外膜表現量較少，兩者的差異較大。為了更清楚各個 *xps* 基因缺損菌株 XpsG 蛋白在內外膜分布量的差異，便利用數位影像將內外膜 XpsG 蛋白分佈作定量分析，以百分比為單位，內膜與外膜的蛋白總合為百分之百，將內膜所佔的百分比與外膜作比較，再以 XC1701 的內外膜分佈百分比為基準，觀察各個 *xps* 基因缺損菌株，結果發現 XC1717( $\Delta H$ )、XC1708( $\Delta D$ )的 XpsG 蛋白分佈差異最為明顯(圖九、B)。

為了確定 XC1717( $\Delta H$ )、XC1708( $\Delta D$ )的 XpsG 蛋白分佈差異，便重複作 XC1717( $\Delta H$ )、XC1708( $\Delta D$ ) 蔗糖濃度梯度分析，各取三次實驗的定量數值，以 ORIGIN 分析軟體計算標準差後與 XC1701 作比較(圖十)。由圖顯示 XC1701、XC1717、XC1708 的 XpsG 蛋白內外膜分佈量在統計學上是有意義的。在本實驗中，顯示 *xpsH* 或 *xpsD* 基因缺損時，XpsG 蛋白主要會傾向分佈在外膜區域。

因為 XC1717 的 XpsG 蛋白主要會傾向分佈在外膜區域，於是想探討 XC1717/pFH 能否回復 XpsG 蛋白的分佈比例？便利用蔗糖濃度梯度分析 XC1717/pFH，以 XpsG 抗體作 western blot 觀察 XpsG 蛋白的分佈，同時

作定量分析(圖十一)。比較 XC1701、XC1717、XC1717/pFH，發現 XC1717/pFH 能回復 XC1717 在 XpsG 蛋白的分佈差異。同樣的方式，比較 XC1701、XC1708、pKC118 的 XpsG 蛋白的分佈，結果與 XC1717 相似(圖十二)。

XpsD 蛋白是外膜蛋白，會由 10-12 個蛋白組成大分子複合體，形成類似孔洞的構造。對於位在外膜的 D 蛋白研究認為其 C 端會插入膜中，而 N 端會暴露在胞外漿質(Koebnik *et al.*, 2000)。既然 pKC118 經蔗糖濃度分析，發現能回復 XC1708 的 XpsG 蛋白分佈比例，接著便想探討是 XpsD 蛋白的 C 端或是 N 端區域改變 XpsG 蛋白分佈的？首先分別將 C 端(pCD105)、N 端基因(pMH7)接合入 XC1708，取其 total cell lysate 作 western blot, XC1701、XC1708、XC1713 作控制組，以 XpsD-C、XpsD-N、XpsG 抗體偵測。pCD105 的 XpsD 約 39kDa，pMH7 表現的 XpsD 蛋白約 43kDa，由結果確定菌種沒有問題(圖十三)。

以 pCD105、pMH7 進行蔗糖濃度梯度分析並定量，結果發現 XpsD-C 與 XpsD-N 皆能明顯回復 XC1708 的 XpsG 蛋白分佈比例(圖十四)。

#### 四、以膠質篩濾層析法比較內膜與外膜 XpsG 蛋白差異

將 XC1701 經蔗糖濃度梯度區分的內外膜部分經 Triton 萃取後，以膠質篩濾層析法分析，並以 XpsG 抗體作 western blot，發現內膜部分的 XpsG 蛋白出現在 24、25 分鐘，外膜部分出現在 23-25 分鐘的位置，兩者蛋白分子型式無明顯差異(圖十五、A)。

為了探討在內外膜的 XpsG 蛋白與其他蛋白交互作用關係，便利用 C 端含有 His 氨基酸序列的 *xpsG* 基因接合入 XC1713(XC1713/pFG(His<sub>6</sub>))，會產生 His-tagged XpsG 蛋白。以蔗糖濃度梯度區分 XpsG 內外膜部分，再經超高速離心以獲得內外膜，Triton X-100 萃取後，其內外膜蛋白萃取液分別通過 Ni-NTA column，收集 Flow throw、wash、elution 部分，各取 500  $\mu$ l 以丙酮沉澱風乾。同時以 XC1713/pFG 作為控制組。將 Flow throw、wash、elution 部分，利用 SDS-PAGE 電泳分離後，以蛋白硝酸銀染色，發現 His-tagged XpsG 會出現在 elution 部分，不含 His-tagged 的 XpsG 蛋白幾乎都留在 Flow throw、wash 部分。而比較內外膜的差異，

結果發現在 XC1713/pFG(His<sub>6</sub>)外膜部分，於 elution-1 中 26、27kD 處有微弱的蛋白出現(星號所標之處)，而在內膜部分及 XC1713/pFG 並沒有，推測這些蛋白和 XpsG 之間有交互作用。

#### 五、*xps* 基因缺陷的菌株並不會影響蛋白分子形式

由蔗糖濃度梯度分析各個 *xps* 基因缺陷的菌株的結果，發現 XC1717、XC1708 內外膜的 XpsG 蛋白分佈與 XC1701 不同，接著便想探討各個 *xps* 基因缺陷的菌株其 XpsG 蛋白分子型式是否有不同？將 XC1701、XC1717(*DxpsH*)、XC1718(*DxpsJ*)、XC1721(*DxpsK*)、XC1714(*DxpsM*)、XC1708(*DxpsD*)的膜蛋白萃取液，通過 Superdex HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，以 1% Triton X-100 為緩衝平衡液，收集層析後的沖出液，以 4 倍體積的丙酮沉澱抽乾後，以 SDS-PAGE 進行電泳分離，並以 XpsG 抗體作 western blot。結果顯示在這些 *xps* 基因缺陷菌株的 XpsG 蛋白主要皆分佈在 19-26 分鐘 (圖十六、A)。再以含有 0.5% DOC 為緩衝平衡液，將 XC1701、XC1716 膜蛋白萃取液，以膠質篩濾層析法分析，發現皆出現在 30、31 分鐘(圖十六、B)。由此實驗得知 XpsG 蛋白分子型式並不因這些 *xps* 基因缺陷而有所改變。

## 四、討論

### XpsG 會形成橫跨內外膜的纖毛構造

一般革蘭氏陰性致病菌靠著細胞表面的大分子纖毛，附著在宿主細胞進行複製，並分泌胞外酵素來幫助感染。Type IV pathway 藉由形成長纖毛(pili)構造，將蛋白分泌至胞外。而GspGHIJK 蛋白其 N 端序列與 type IV pilin 有很高的相似性，並稱為 pseudopilin，推測也會形成類似纖毛的結構。

在 1996 年，Pugsley 利用 cross-linking 實驗看到 PulG 可形成 multimer(dimmer-pentamer)。之前浴伶學姊的實驗中，對於十字花科黑腐致病菌 XpsG 蛋白的研究，認為可分為兩種型式，水溶部份(包括細胞質、胞外漿質) 以 multimer 型式存在，脂溶部份(細胞膜) 以 dimmer 型式存在；又因 XC1713/pCPP30-FG 大量表現 XpsG 時，在胞外可偵測到 XpsG 蛋白，進一步以膠質篩濾層析法分析，也發現胞外的 XpsG 蛋白和水溶部分的 XpsG 分子形式是一樣的，故推測在正常生理狀況下，XpsG 於膜上會形成纖毛結構。

XpsG 是由 143 個氨基酸構成的蛋白，將 XpsG 與其他 GspG 作序列比對時，發現除了 N 端厭水區域外，在 C 端區域亦有較高的相似性。本論文實驗中，原本期望在 XpsG 蛋白上插入 7 個胺基酸(DHHHHHV)，在不改變蛋白活性下，利用 Ni-NTA 對 XpsG 蛋白進行純化。因此在實驗設計上，配合限制酶切位與胺基酸的特性，先以定點突變方式，成功拿到 L69V 和 F120V 突變株。L69V 是將第 69 個氨基酸 Leucine ( CTC)改成 valine (GTC)，F120V 是將第 120 個氨基酸 phenylalanine ( TTC)改成 valine ( GTC)，因為 Leucine、valine、phenylalanine 屬中性氨基酸，且具有厭水性，因此定點突變對整個蛋白的厭水性並沒有改變，所以以澱粉培養基看蛋白分泌功能時，也確定 XpsG 正常功能不受定點突變的影響(圖一)。

插入 7 個胺基酸(DHHHHHV)後，由 L69-I7、F120-I7 互補、干擾實驗得知，兩者皆不會回復胞外蛋白分泌的功能，也不干擾正常 XpsG 蛋白的正常蛋白分泌(圖二)。然而從圖二來看，XC1701/pF120-I7 其透明暈圈較

XC1701 小，可能是因為以澱粉培養基看蛋白分泌功能只是簡略的初步鑑定，很容易受到菌量的多寡、培養時間長短、菌的新鮮與否等，影響澱粉培養基暈圈的判讀。所以若要精確判定蛋白分泌是否受影響，則必須直接以 western 方式看澱粉酵素的分泌。

L69-I7 和 F120-I7 變異株，以 XpsG western blot 發現 L69-I7 沒有重組蛋白出現，F120-I7 則有。分析 XpsG-F120 重組蛋白發現，XpsG-F120 重組蛋白只出現在不可溶部分（圖五）。以膠質篩濾層析法分析，發現不管是在 DOC 或 Triton 情況下，XpsG-F120 重組蛋白都出現在 retention time 15、16 分鐘，而 XpsG 則出現在 retention time 19~26 分鐘(圖六)。而 DOC 是一種帶負電的 ionic detergent，可以有效的從細胞膜中將 integral membrane protein 萃取出來，會形成 4-6kDa 的 small micelles；Triton X-100 屬中性 detergent，亦能將細胞膜中將 integral membrane protein 萃取出來，但會形成較 DOC 大的 micelles。然而這兩種 detergent 皆無法將 XpsG-F120 重組蛋白解離，推測在 detergent 存在下，XpsG-F120 重組蛋白會產生 aggregate，從結果也顯示 XpsG-F120 重組蛋白與 XpsG 沒有交互作用。而因為第 120 位置恰好位於 C 端區域，因此推測 XpsG 的 C 端區域可能在組成較大結構上扮演重要角色。

而進一步以蔗糖濃度分析 XpsG、XpsG-F120 在內外膜的分佈時，發現 XpsG 會分佈在內外膜區域，XpsG-F120 重組蛋白只存在內膜。綜合以上結果更加確定在十字花科黑腐病菌中，XpsG 極可能會形成橫跨內外膜的纖毛構造(圖八)。接著分析內外膜 XpsG 差異，發現內外膜的 XpsG 蛋白分子形式幾乎是一樣的(圖十五)，這表示纖毛由內膜以同樣方式組合至外膜，而在可溶部分看到的 XpsG 即為纖毛斷掉的部分。

以 Ni-NTA column 蛋白質硝酸銀染色觀察內外膜 XpsG 的差異時，發現在 XC1713/pFG-His<sub>6</sub> 外膜部分 26、27kDa 出現的蛋白與內膜的蛋白表現不同，這些蛋白和 XpsG 蛋白一樣在外膜的 elution-1 出現，表示可能和 XpsG 有交互作用。但這些蛋白表現量很微弱，可能和本身所產生的蛋白量不多有關，再加上經萃取、Ni-NTA column 分析所造成的蛋白流失，因此在蛋白

所佔比例不高的情況下，以蛋白質硝酸銀染色仍很難清楚的看到明顯的蛋白表現。而就目前研究得知，在 *P. aeruginosa* 的 *xcpA* 基因突變株中，XcpU 會分佈在內外膜，在野生株中則 XcpU 分佈在外膜上( Bally *et al.*, 1992)。同時在 cross-linking 的實驗中，發現 GspG 和 GspH、I、J 皆有交互作用(Lu *et al.*, 1997)，而 GspH、I、J 的蛋白表現也較 XpsG 少。然而就外膜蛋白而言，在十字花科黑腐病菌中只發現 XpsD 在外膜上，而 XpsD 蛋白約 79kDa，另外 XpsH、I、J 蛋白分子量約 18、15、22kDa，與這兩個蛋白出現位置不符。那麼這兩個蛋白只有在外膜部分出現，是不是代表當 XpsG 形成纖毛到達外膜時，需要其他蛋白來控制纖毛完成正常蛋白分泌功能，而這些蛋白主要位於纖毛的頂端，或與纖毛於外膜部分有交互作用，所以才會在外膜部分出現？而又是哪些蛋白？若以 Xps 蛋白分子量來判斷，則以 XpsK(27kDa)、XpsN(26kDa)可能性較大，但也可能為其他非 Xps 蛋白。因此若要進一步證實，則需要以相關實驗來觀察了。

### **XpsH、XpsD 會影響 XpsG 內外膜的分佈**

在十字花科黑腐病菌野生株 XC1701 中，XpsG 分佈在內外膜。而 XC17433/pFG 的 XpsG 亦分佈在內外膜，由此可知要形成類似纖毛構造可能不需要其他蛋白的參與。而 1996 年 Pugsly 也認為 PulG 蛋白在細胞膜會形成類似葡萄串的結構，而不需要 PulO 或其他 Pul 蛋白的參與，此纖毛的形成與 type IV pilin 生成是不同的。雖如此，但仍不能排除其他蛋白對 XpsG 分佈的影響，因為 XC17433 沒有含任何的 *xps* 基因，當送入質體 pCcp30-FG，使蛋白大量表達後分析其分佈，不能代表自然狀態下的 XpsG 蛋白表現。以 XpsHIJK 而言，在菌中的蛋白含量比 XpsG 少很多，但是當其中一個基因缺損時，便造成整個第二型蛋白分泌機制不能正常運作。而之前研究指出 GspG 與 GspH、-I、-J 皆有 interaction，既然不是影響 XpsG 纖毛的組成，那麼可能在正常情況下，其他蛋白與纖毛分解、分佈、運動狀態(伸縮)、受質的認知結合、訊息傳遞等有關。

當以膠質篩濾層析分析各不同基因缺損的菌株，發現其 XpsG 蛋白分子

形式並無差異(圖十六)。利用不同基因缺損的菌株進行蔗糖濃度梯度分析，發現 XpsG 蛋白在 XC1717( $\Delta H$ )及 XC1708( $\Delta D$ )中的內外膜分佈，比其他菌株有明顯差異(圖十)。與 XC1701 相比下，XC1717、XC1708 內膜蛋白分佈量比外膜少，而其互補株均能將 XpsG 內外膜分佈回復(圖十一、圖十二)。

對於 XC1717、XC1708 外膜 XpsG 比內膜多，推測有二個可能原因：

1. XpsH 和 XpsD 有交互作用：由於 XpsD 位在外膜上，形成孔洞構造，當 XpsG 纖毛逐漸形成後，可將分泌性蛋白引領至由 XpsD 組成的孔洞，蛋白藉由此通道通過外膜分泌至胞外。然而當沒有 XpsD 形成孔洞構造時，纖毛無法正確形成，於是便堆積在外膜，造成外膜 XpsG 蛋白比較多。而 XpsH 和 XpsG 之間有交互作用，當 XpsH 沒有表現時，外膜蛋白比較多，推測可能是作為認知正確 XpsD 孔洞的媒介。因為膜是具有流動性的，沒有 XpsH 時，纖毛無法找到 XpsD 正確位置，便一直往外膜堆積以尋找 XpsD。就像電扶梯，假設 XpsD 是出口，XpsH 是梯子與出口橋樑，XpsG 為電扶梯成員，當 XpsD、XpsH 兩者缺一時，XpsG 便一直往上堆積。

2. XpsH 和 XpsD 無交互作用：XpsH 不是認知正確 XpsD 孔洞的媒介，而是作為幫助纖毛穩固在內膜的基石。當沒有 XpsH 時，纖毛便無法很穩固的停在內膜。

因為 XC1708 可看出 XpsG 內外膜分佈的不同，於是分別將 N 端 XpsD 蛋白(pMH7)及 C 端 XpsD 蛋白(Pcd105)看 XpsG 內外膜分佈，結果發現兩者皆可回復 XpsG 蛋白內外膜分佈(圖十四)，是什麼原因使得 XpsG 蛋白內外膜分佈比例沒有差異，目前尚無法解釋。

## 五、參考文獻

**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, 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.

**Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., De Cock, H., and Tommassen, J.** (1998) Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involve in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **27**: 209-219

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

**Christie, P.J.** (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* **40**: 294-305

**Collins, R. F., Davidsen, L., Derrick, J. P., Ford, R.C., and Tonjum, T.** (2001) Analysis of the PilQ secreetin from *Neisseria meningitides* by Transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure. *J Bacteriol.* **183**: 3825-3832

**Daefler, S., and Russel, M.** (1998) The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol. Microbiol.* **28**: 1367-1380

**Drake, S. L., Sandstedt, S. A., and Koomey, M.** (1997) PilP, a pilus biogenesis lipoprotein in *Neisseria gonorrhoeae* affects expression of PilQ as a high-molecular –mass multimer. *Mol. Microbiol.* **23**: 657-668

**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.

**Francoise, J. -D., Locht, C., and Antoine, R.** (2001) Two-partner secretion in gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* **40**: 306-313

**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  $\alpha$ -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.

**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.

**Keizer, D. W., Slupsky, C.M., Kalisiak, M., Campbell, A. P., Crump, M. P., Sastry, P. A., Hazes, B., Irvin, R. T., and Sykes, B. D.** (2001) Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bio. Chem.* **276**: 24186-24193

**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.

**Koster, M., Bitter, W., Tommassen J.** (2000) Protein secretion mechanism in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol.* **290**: 325-331

**Koebnik, R., Locher, K. P., and Van Gelder, P.** (2000) Structure and function of bacterial outer membrane protein : barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**: 239-253

**Lee, H. -M., Wang, K. -C., Liu, Y. -L., Yew, H. -Y., Chen, L. -Y., Leu, W. -M., Chen, D. -C., Hu, N. -T.** (2000) Association of the cytoplasmic membrane protein XpsN with the outer membrane protein XpsD in the

- typeII protein secretion apparatus of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *J. Bacteriol.* **182**: 1549-1557
- Lee, H. -M., Tyan, S. -W., Leu, W. -M., Chen, L. -Y., Chen, D. -C., and Hu, N. -T.** (2001) Involvement of the XpsN protein in formation of the XpsL-XpsM complex in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* TypeII secretion apparatus. *J. Bacteriol.* **183**: 528-535
- 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., 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.
- 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.
- Possot, O. M., Gerard-Vincent, M., and Pugsley, A. P.**(1999) Membrane association and multimerization of secretin component pulC. *J. Bacteriol.* **181**: 4004-4011
- 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.
- 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.
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., and Howard, S. P.** ( 2000) Characterization of the multimeric Eps complex required for cholera toxin secretion. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 345-350

**Sandkvist, M.** ( 2001a) TypII secretion and pathogenesis. *Infect. Immun.* **69**: 3523-3535

**Sandkvist, M.** ( 2001b) Biology of typII secretion. *Mol. Microbiol.* **40**: 271-283

**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

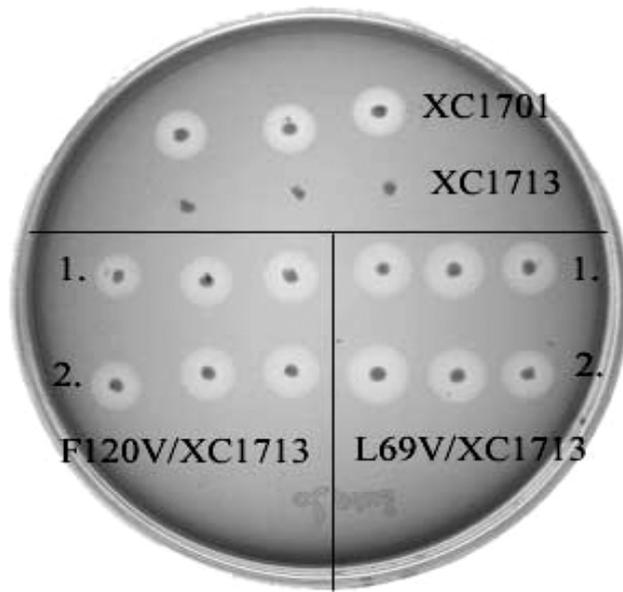
**Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G.** ( 1997) Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of general secretory pathway and secreted protein. *EMBO J.* **16**: 3007-3016.

**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.

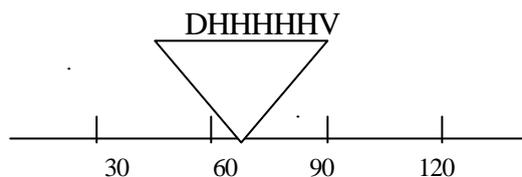
**Wolfgang, M., van Putten, J. P., Hayes, S. F., Dorward, D, and Koomey, M.** (2000) Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *EMBO J.* **19**: 6408-6418



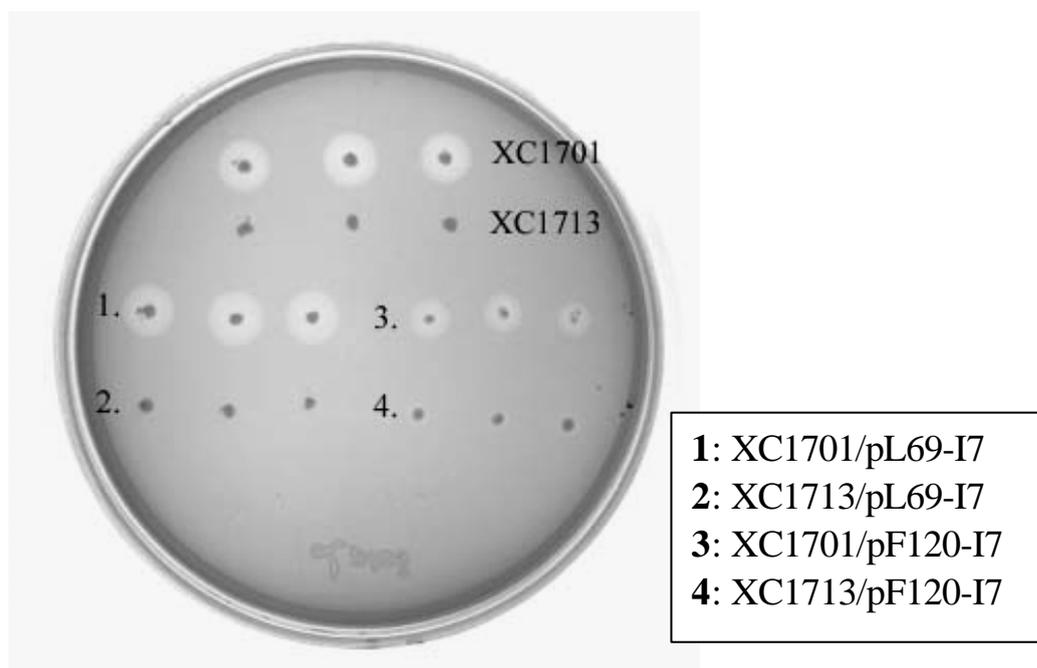
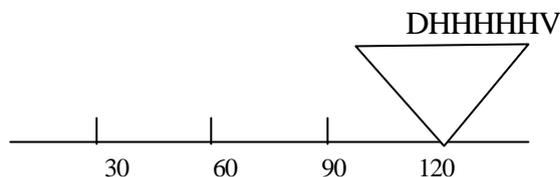
圖一： XC1713 轉接合菌株含 *xpsG* 突變基因的澱粉培養基分泌測試

將含有不同 *xpsG* 突變基因(L69V、 F120V)的 XC1713 菌株，取適當菌量點在澱粉培養基上，並以 XC1701 作陽性對照組，以 XC1713 作陰性對照組，將培養基置於 30 °C，O/N。觀察菌落周圍的透明暈圈大小，來判斷各變異株澱粉酵素分泌的情形。XC1701: wild type , XC1713: knockout *xpsG*。

**L69-I7:**

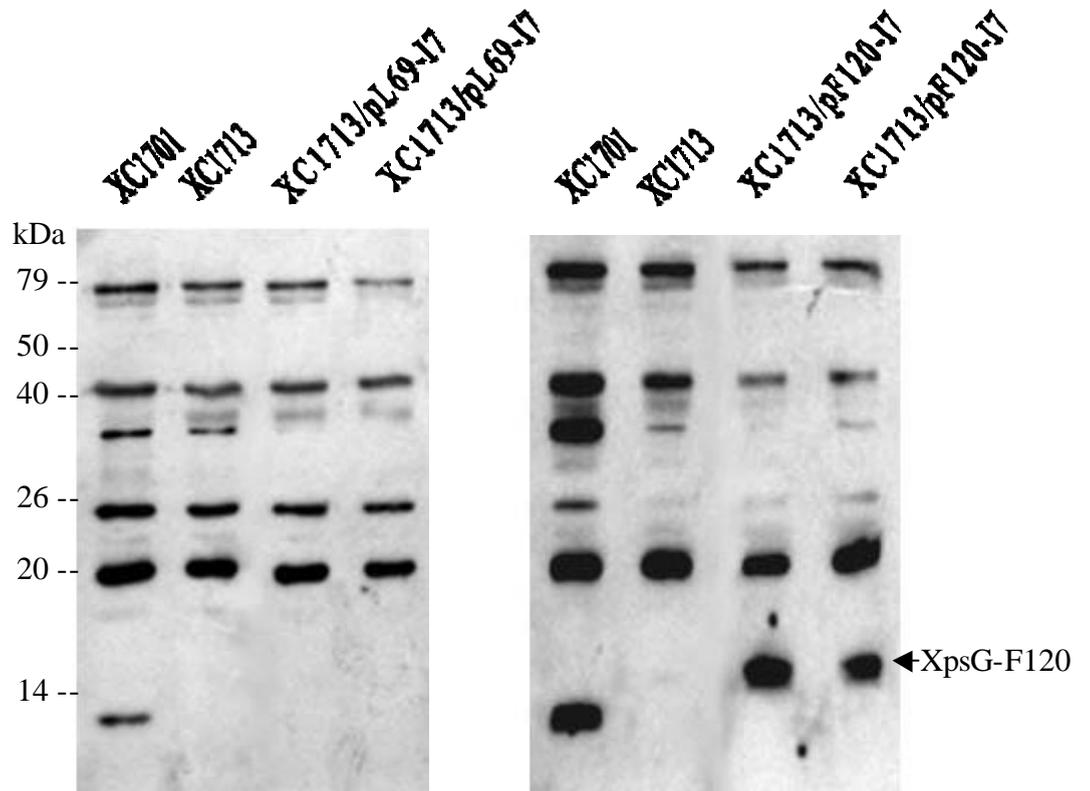


**F120-I7**



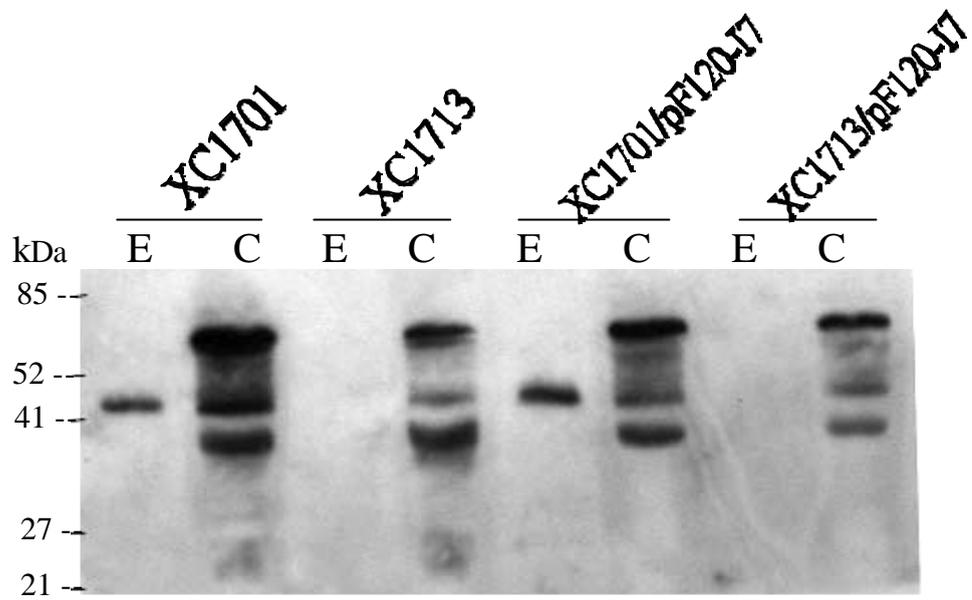
**圖二: XC1701 及 XC1713 轉接合菌株含 *xpsG* 突變基因的澱粉培養基分泌測試**

將含有不同 *xpsG* 突變基因(L69-I7、F120-I7)的 XC1701 及 XC1713 菌株，取適當菌量點在澱粉培養基上，並以 XC1701 作陽性對照組，以 XC1713 作陰性對照組，將培養基置於 30 °C，O/N。觀察菌落周圍的透明暈圈大小，判斷各變異株澱粉酵素分泌的情形。



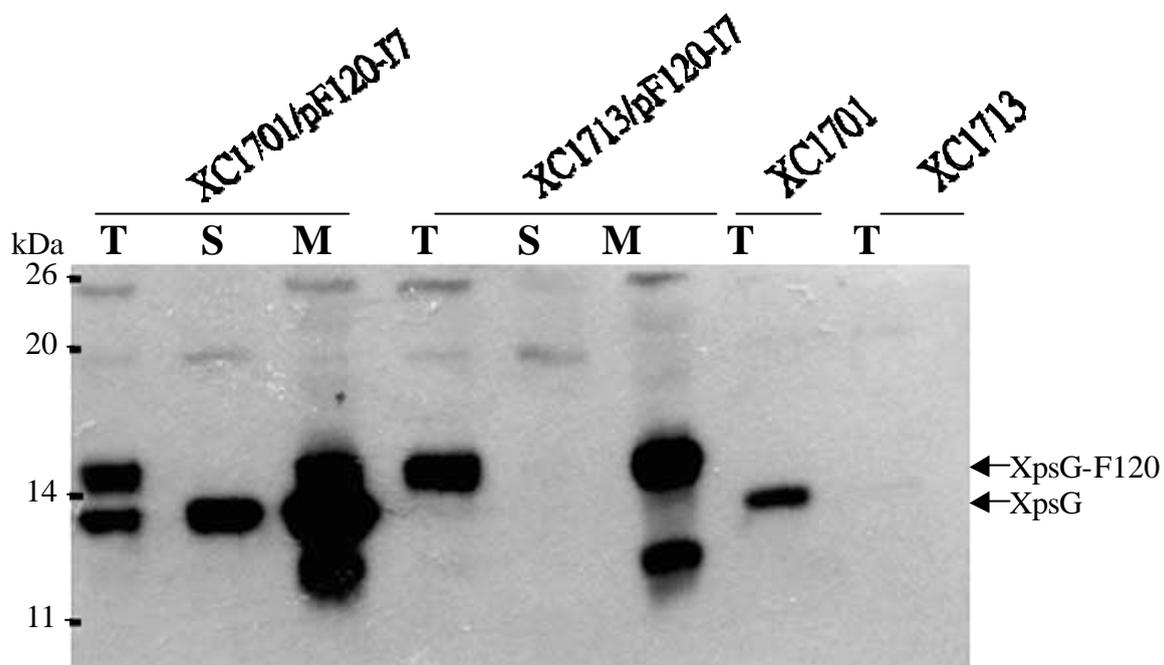
圖三:利用 western blot 分析 XpsG 突變蛋白在 XC1713 的蛋白表現

培養 2 ml 的含有不同 *xpsG* 突變基因(L69-I7、F120-I7)的 XC1713 菌株，待菌液混濁後，取 200  $\mu$ l 離心(12000 rpm, 5 min)取 pellet，以 40  $\mu$ l sample buffer 回溶，作為 total cell lysate，並以 XC1701、XC1713 total cell lysate 作為陽性、陰性控制組，進行 XpsG 的 western blot。



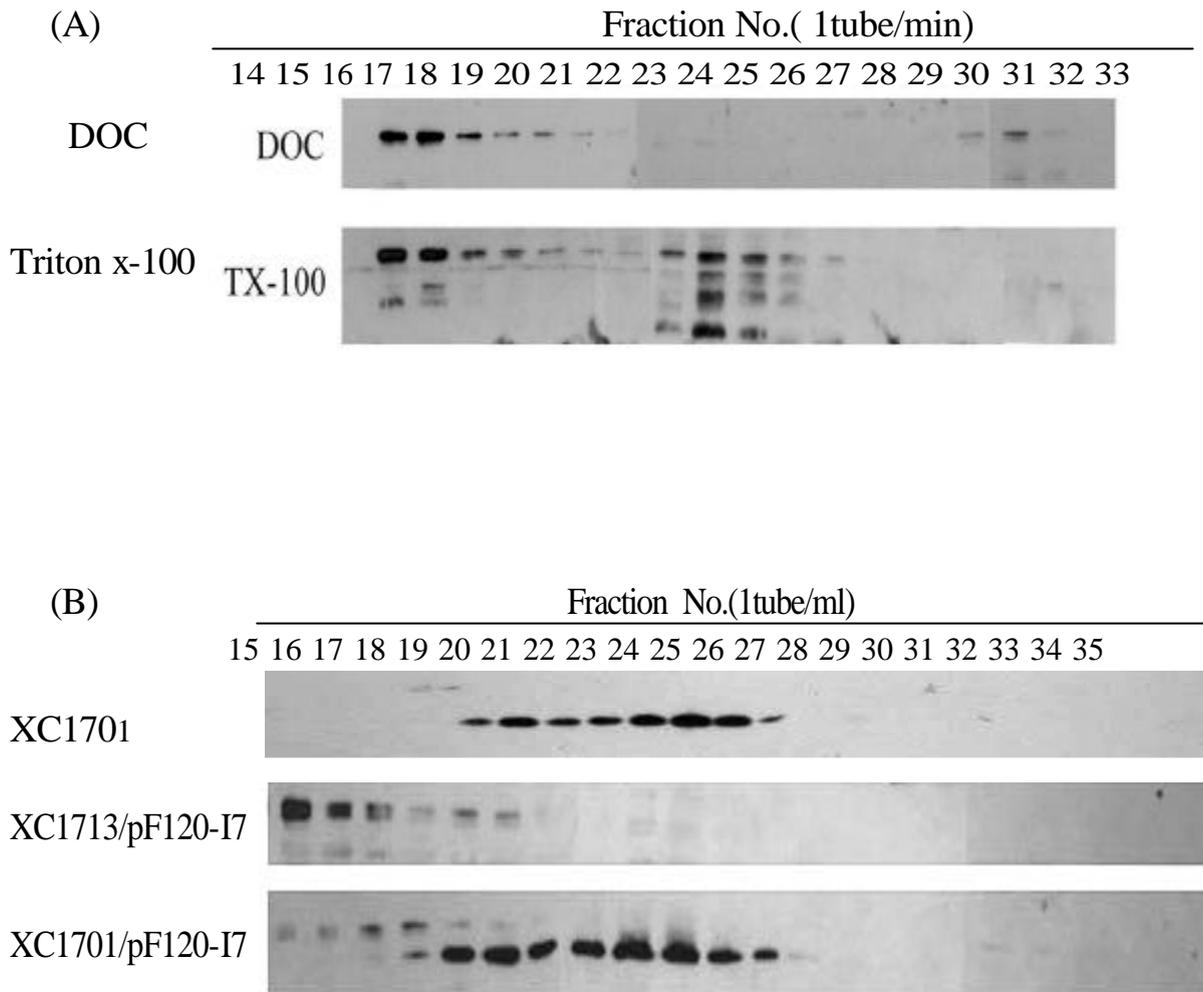
圖四：以 western blot 觀察突變株的澱粉酵素分泌情形

XC1701、XC1713 分別作為陽性及陰性控制組。當菌液培養至 OD 約 1.0~1.2 時，取 1 ml 菌液區分成胞外及胞內兩部分，進行電泳分析，以澱粉酵素為抗體來觀察其分泌情形。E 指胞外部分(Extracellular)，C 指胞內部分(Cellular)。



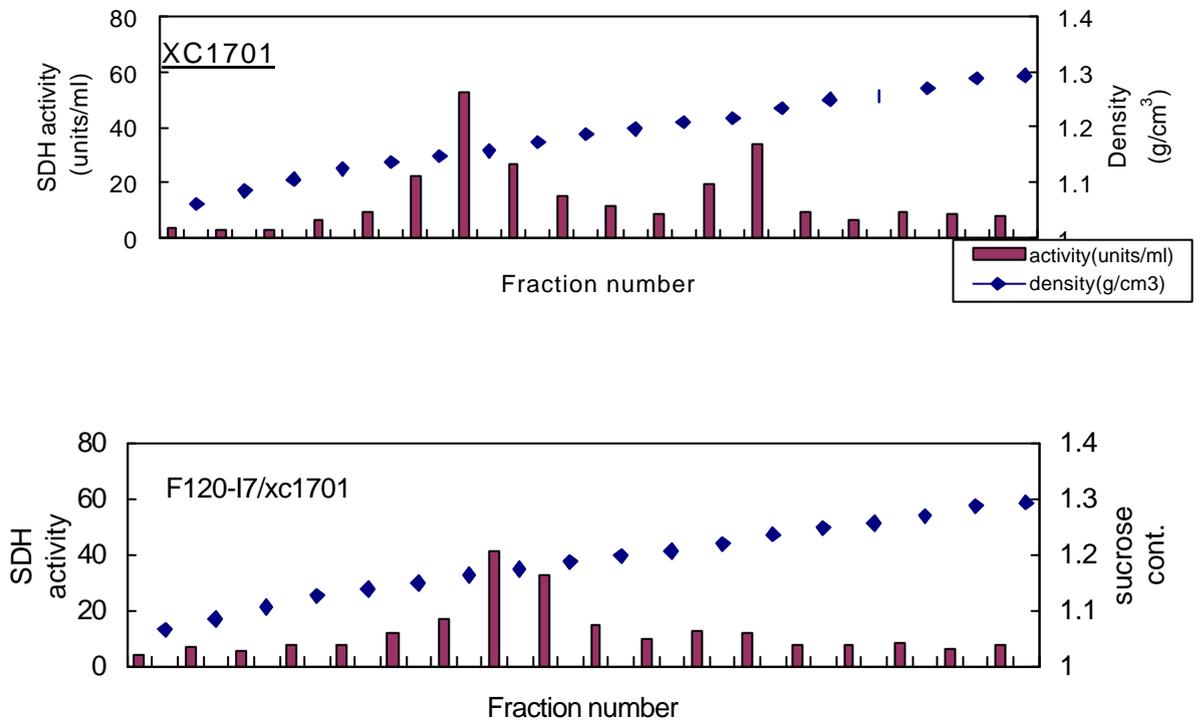
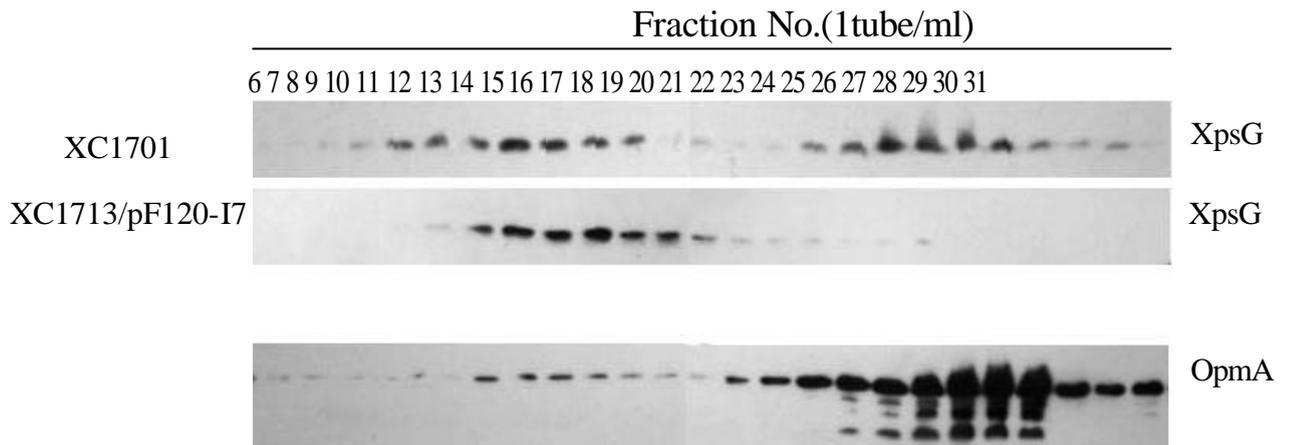
圖五：觀察變異株產生的突變蛋白細胞分佈的情形

將變異株(XC1701/pF120-I7、XC1713/pF120-I7)分為可溶(細胞質、胞外漿質)及不可溶(細胞膜)兩部分，作 XpsG western blot。T: total cell lysate , S: soluble , M: membrane。



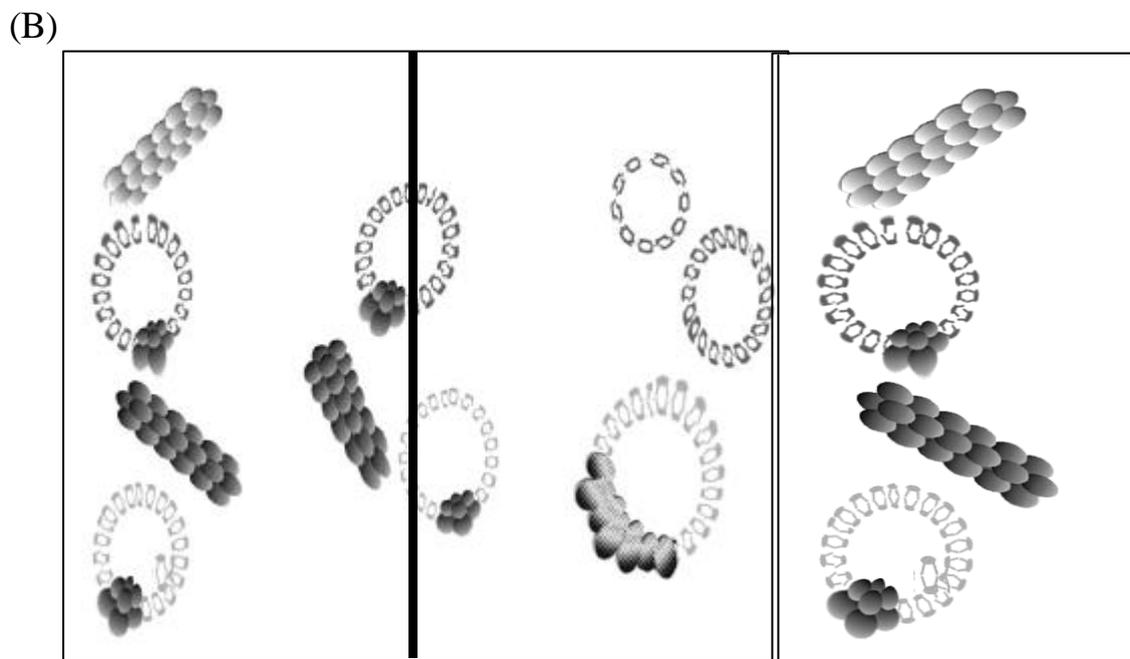
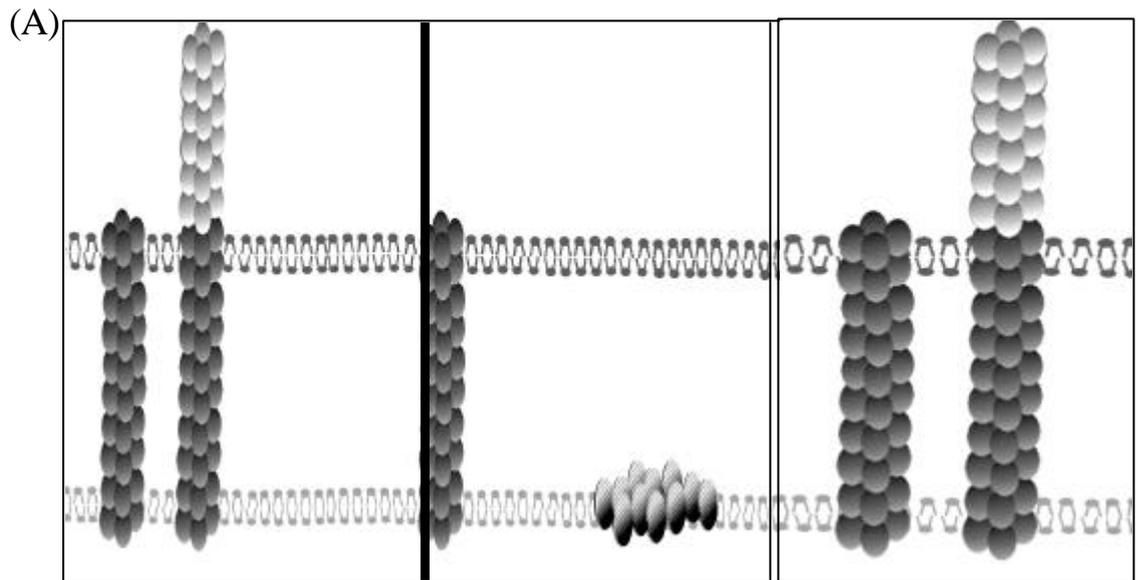
**圖六：由膠質篩濾層析法分析變異株不可溶部分(MF)XpsG 蛋白分子形式**

將變異株不可溶部份與萃取緩衝液( 20mM Tris-HCl pH8.0 , 2% Triton X-100 or 0.5% DOC)反應 2 小時後，以 30000 rpm 離心 1 小時，取得膜蛋白萃取液。將萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱，平衡緩衝液為 20mM Tris-HCl pH8.0 , 250mM NaCl , 1% Triton X-100 or 0.5% DOC，收集 retention time 15-36 分鐘，作 XpsG western bolt。(A)XC1713/pF120-I7 不可溶部份，以含 Triton X-100 or DOC 清潔劑的 buffer 萃取後，經膠質篩濾層析法分析的 XpsG 蛋白分佈。(B) XC1701、XC1713/pF120-I7、XC1701/pF120-I7 不可溶部份，以 1% Triton X-100 萃取後，經膠質篩濾層析法分析，觀察正常 XpsG 蛋白與變異蛋白的分佈，比較兩者分子形式的差異。



圖七：以蔗糖濃度梯度觀察 XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈的情形

取得野生菌株(XC1701)及變異株(XC1713/pF120-I7)膜部分後，以蔗糖濃度梯度 25%~60% 區分出內膜、外膜部分，每 1 ml 收集一管，取 7-31 管作電泳分析，分別用 XpsG 及 OmpA 抗體偵測，觀察 XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈。OmpA 的分佈則作為外膜的標誌。以 SDH 酵素活性作為內膜的標誌。

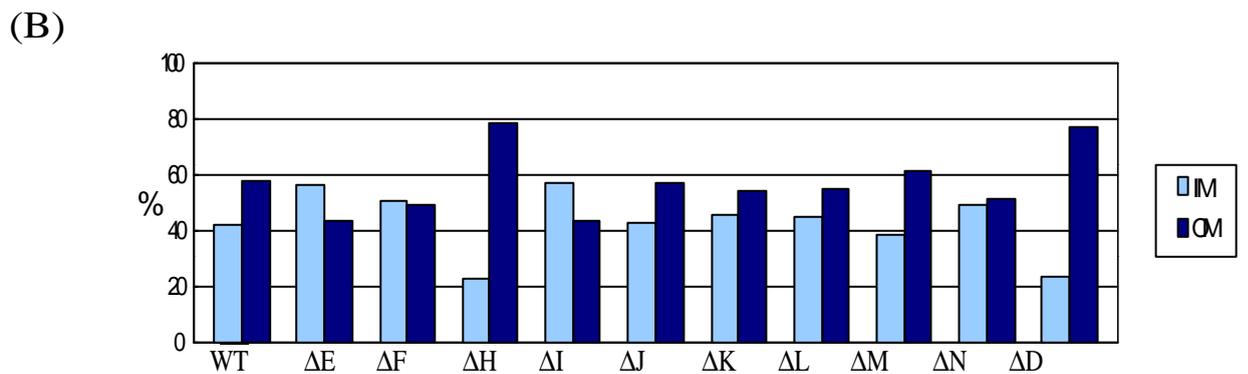
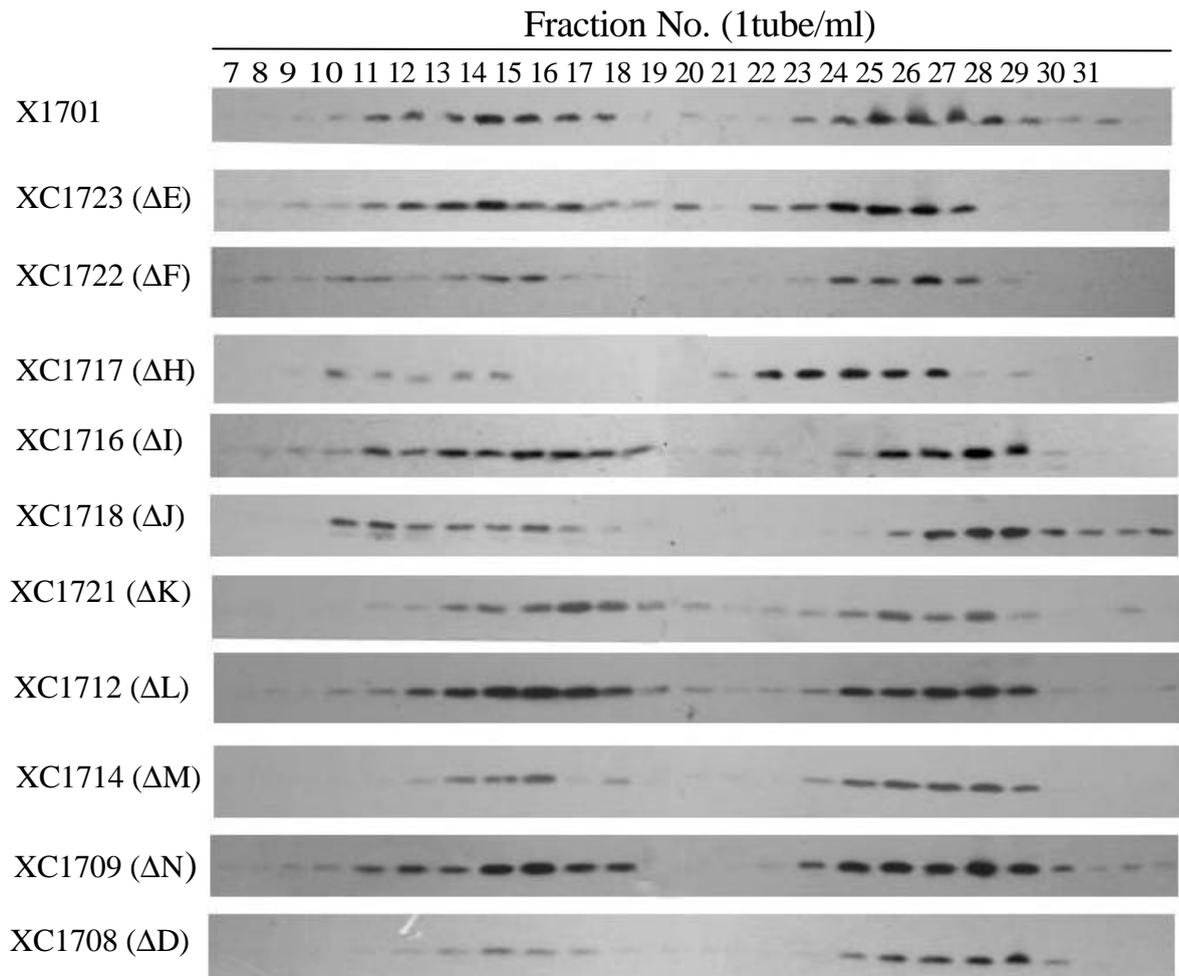


● 外膜， ● 內膜， ● 為 XpsG 蛋白， ● 為 XpsG-F120 蛋白

圖八: XpsG 橫跨內外兩膜纖毛構造的想像示意圖

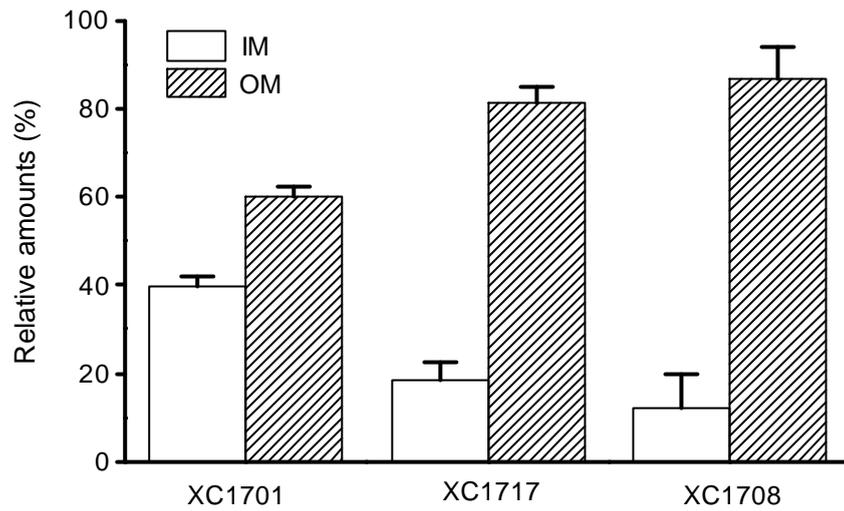
(A)為細胞的纖毛結構，由左而右菌株分別為 XC1713/pFG、XC1701、XC1713/pF120-I7。

(B)為細胞破裂後 membrane vesicle 與可溶性蛋白的想像圖。



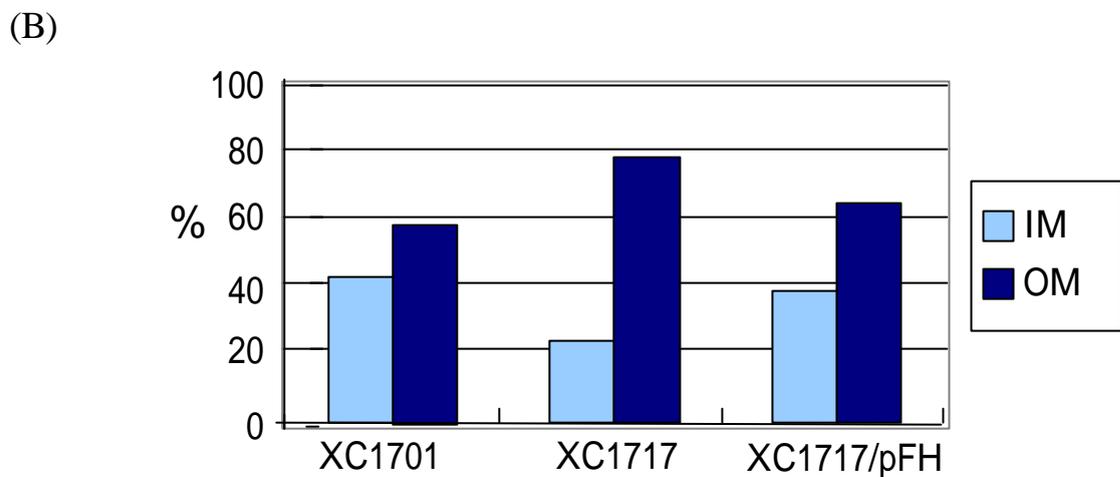
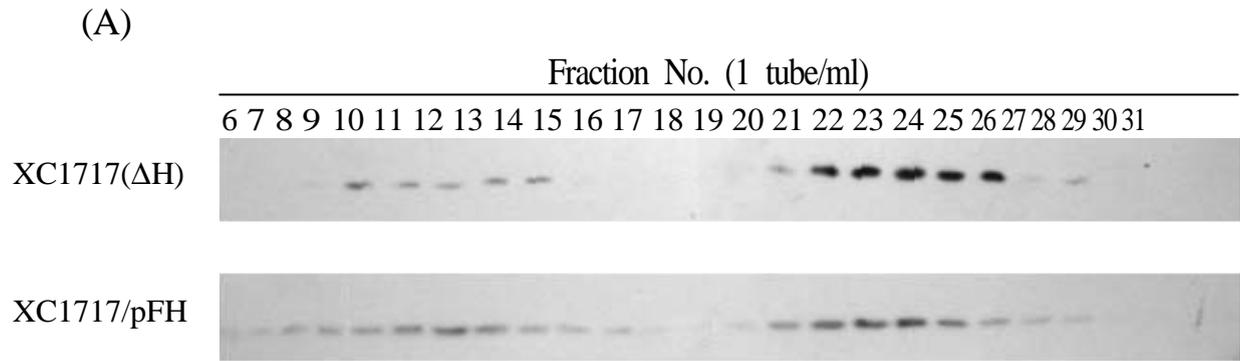
圖九：以蔗糖濃度梯度觀察在各個 *xps* knockout 基因的菌株中，對 XpsG 蛋白內膜與外膜分佈的影響

200ml 菌液培養至 OD 為 1.0-1.2，取其膜部分，以蔗糖濃度梯度 25%~60% 區分出內膜、外膜部分，每 1 ml 收集一管，取 7-31 管作電泳分析，分別用 XpsG 抗體偵測，觀察 XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈。(A)各 *xps* 基因缺損菌株，其 XpsG 蛋白在內外膜的分佈情形(B)各菌株的 XpsG 蛋白在內外膜的分佈定量百分比圖。



圖十： XC1701、XC1717、XC1708 內外膜 XpsG 定量圖

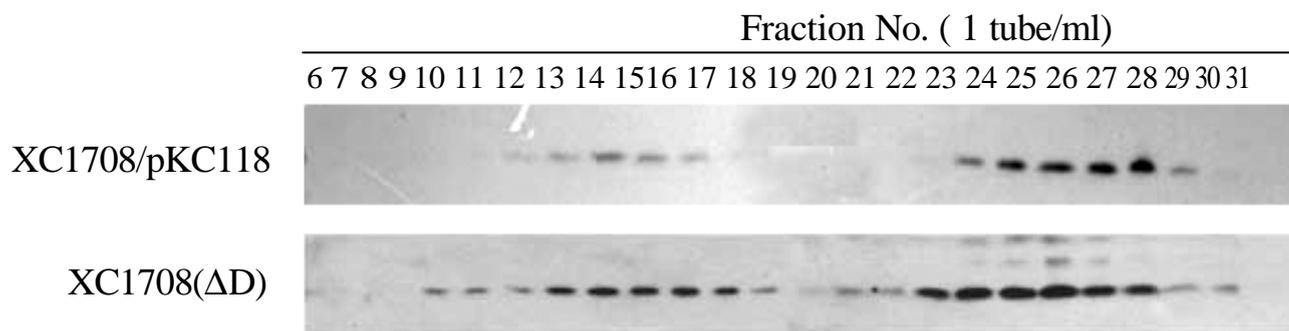
將 XC1701、XC1717、XC1708 內外膜 XpsG 分布量的百分比，以 Origin 軟體統合計算後，以柱狀圖顯示。發現 XC1717、XC1708 內外膜 XpsG 分布與 XC1701 是有差異的。



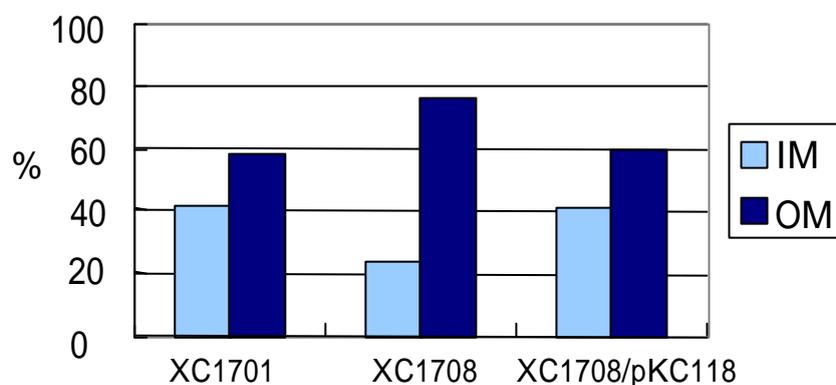
圖十一：以蔗糖濃度梯度觀察在 *xpsH* 基因缺陷及 *xpsH* 基因互補的菌株中 XpsG 蛋白內膜與外膜分佈的差異

(A)將 *xpsH* 基因缺陷的突變株 XC1717, 及 *xpsH* 基因互補的菌株 XC1717/pFH, 培養至 OD 為 1.0-1.2, 取膜部分, 以蔗糖濃度梯度 25%~60% 區分出內膜、外膜部分, 每 1 ml 收集一管, 取 7-31 管作電泳分析, 分別用 XpsG 抗體偵測, 觀察 XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈。(B) XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈定量百分比。

(A)

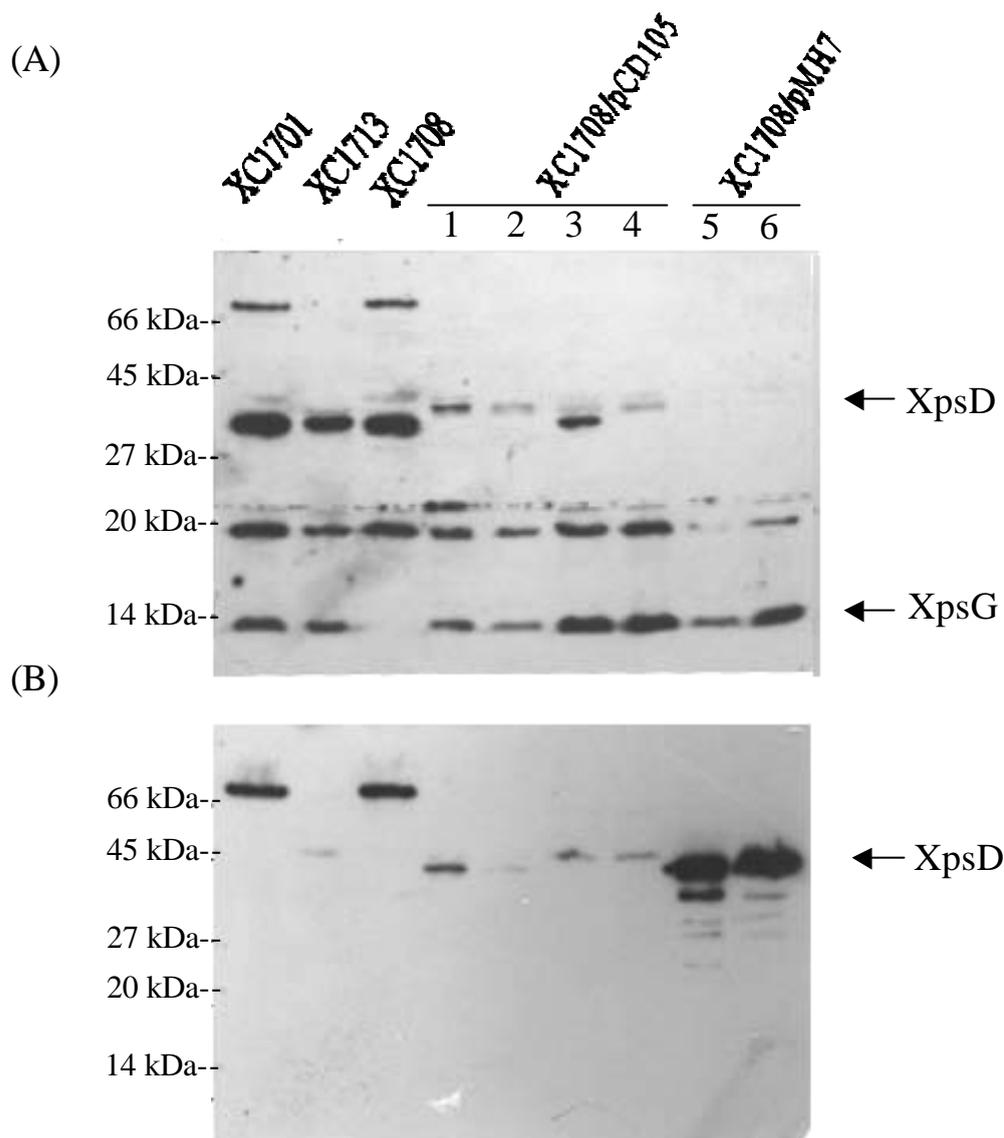


(B)



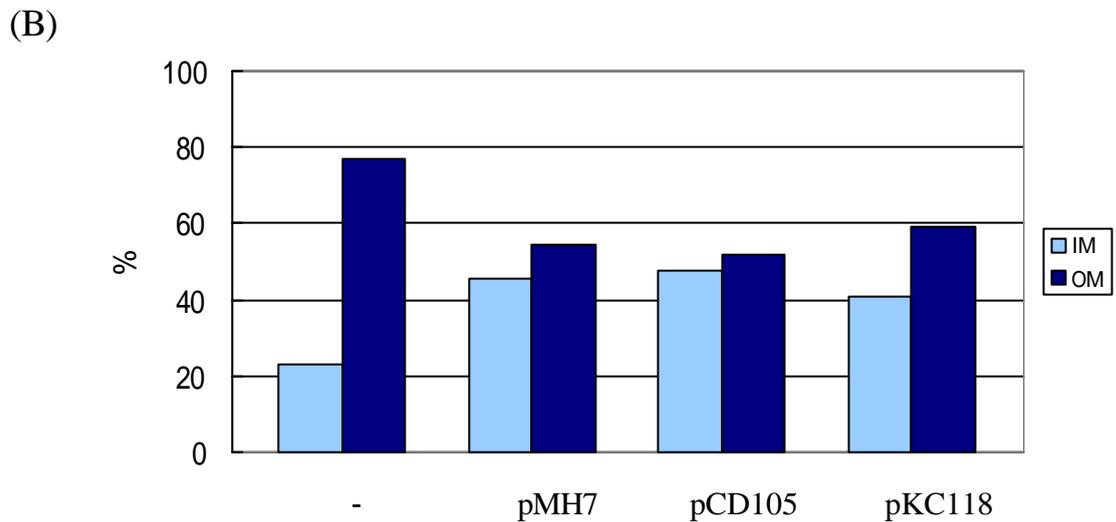
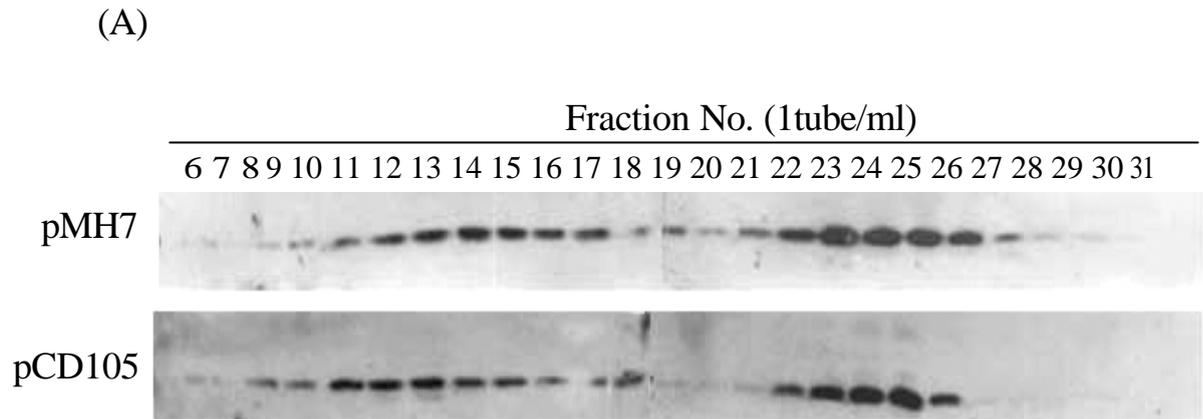
圖十二：以蔗糖濃度梯度觀察在 *xpsD* 基因缺陷及 *xpsD* 基因互補的菌株中 XpsG 蛋白內膜與外膜分佈的差異

(A)將 *xpsD* 基因缺陷的突變株 XC1708，及 *xpsD* 基因互補的菌株 pKC118，培養至 OD 為 1.0-1.2，取得膜部分，以蔗糖濃度梯度 25%~60% 區分出內膜、外膜部分，每 1 ml 收集一管，取 7-31 管作電泳分析，分別用 XpsG 抗體偵測，觀察 XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈。(B)定量百分比圖。



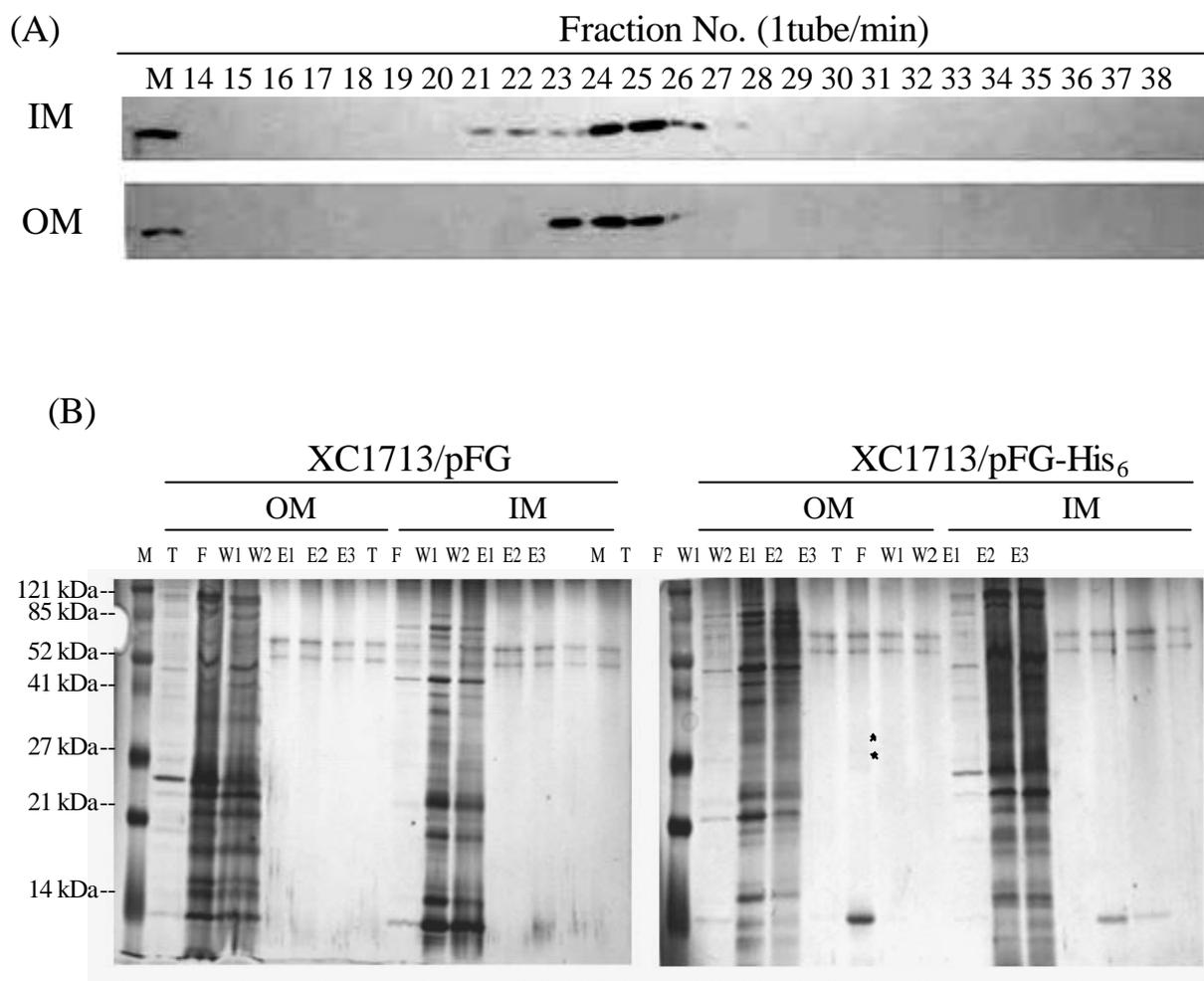
圖十三:以 *xpsD* 的 N 端及 C 端 XpsD 抗體偵測變異株的 XpsD 蛋白表現

以 XC1701、XC1708、XC1713 作為控制組，XC1708/pCD105 為含 *xpsD* 基因 C 端部分的 XC1708 菌株。挑選其中 4 株 (1、2、3、4)；XC1708/pMH7 為含 *xpsD* 基因 N 端部分的 XC1708 菌株，挑選其中 2 株 (5、6)。利用這些菌株的 total cell lysate，以 13.8% SDS-PAGE 進行電泳分析，並個別用(A) XpsD<sub>C</sub> 及 XpsG 抗體 (B)XpsD<sub>N</sub> 抗體偵測。



圖十四：以蔗糖濃度梯度觀察在含有 *xpsD* 基因的 N 端及 C 端的 XC1708 中 XpsG 蛋白內膜與外膜分佈的差異

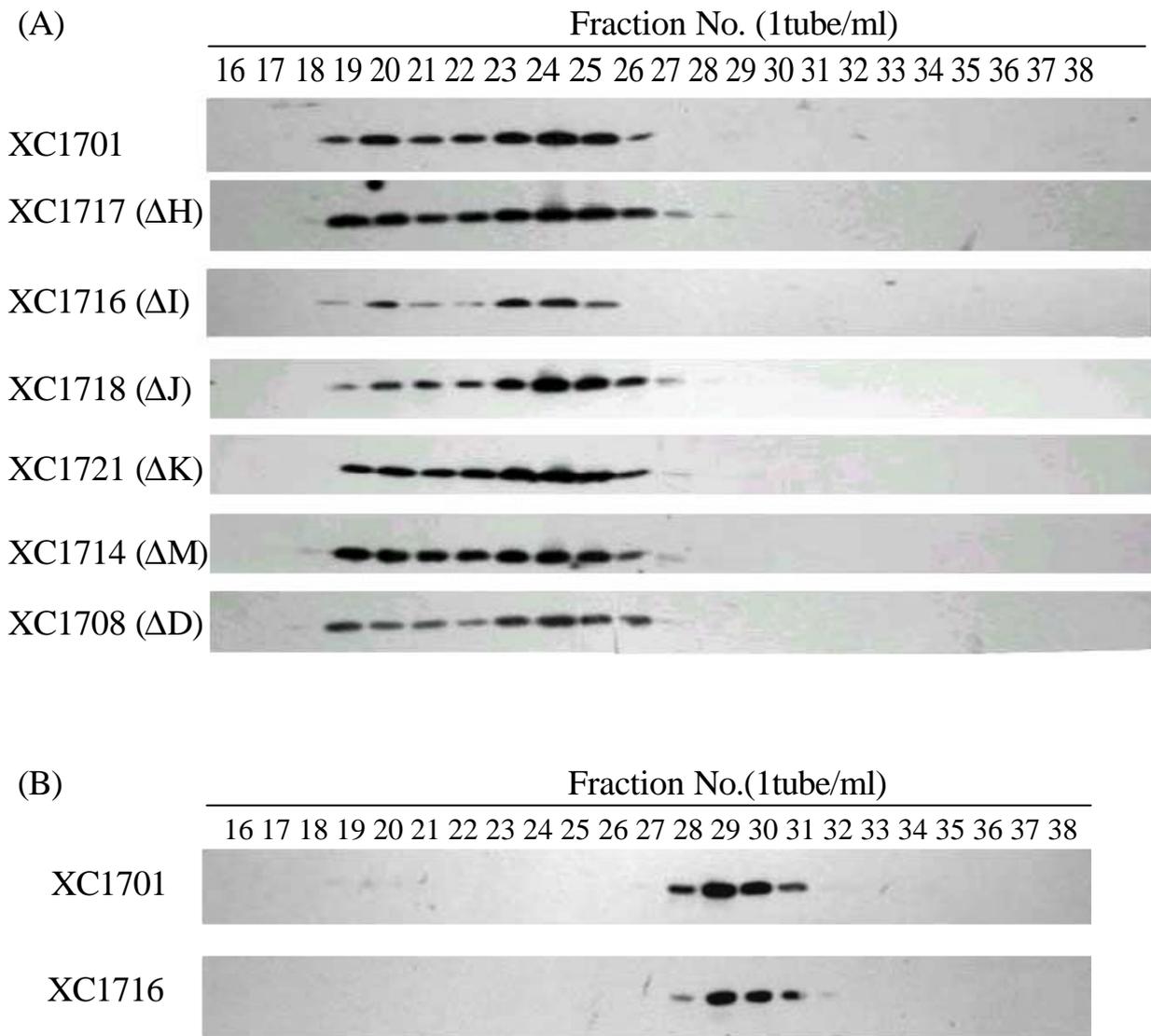
(A)將含有 *xpsD* 基因的 N 端及 C 端的 XC1708 菌株(pMH7、 pCD105), 培養至 OD 為 1.0-1.2, 取得膜部分, 以蔗糖濃度梯度 25%~60%區分出內膜、外膜部分, 每 1 ml 收集一管, 取 7-31 管作電泳分析, 分別用 XpsG 抗體偵測, 觀察 XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈。(B) XpsG 蛋白在內膜與外膜分佈定量百分比。



圖十五：由膠質篩濾層析法分析 XC1701 內膜及外膜 XpsG 蛋白分子形式

(A)將 XC1701 經蔗糖濃度梯度區分的內膜及外膜部分，內膜取 13-16 管，外膜取 24-27 管，經二次水稀釋成 13 ml 後，以 56000 rpm 離心 1.5 小時，取不可溶部份與萃取 buffer ( 20mM Tris-HCl pH8.0, 2% Triton X-100)反應 2 小時，再以 30000 rpm 離心 1 小時，取得膜蛋白萃取液。將萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱，buffer 為 20mM Tris-HCl pH8.0, 1% Triton X-100, 250mM NaCl, 收集 retention time 14-38 分鐘，作 XpsG western bolt。

(B)XC1713/pFG(His<sub>6</sub>)為 *xpsG* 基因 C 端接上 His-tag，以同(A)的方法收集 XC1713/pFG、XC1713/pFG-His<sub>6</sub> 內外膜的部分，進行 Ni-NTA column，XC1713/pFG 則作為控制組，將所收集到的 sample 各取 500  $\mu$ l 與丙酮沉澱，以 10  $\mu$ l sample buffer 回溶，進行 SDS-PAGE 電泳分析後，再作蛋白質硝酸銀染色，觀察內外膜的蛋白是否有差異。T: membrane extract; F: flow throw fraction; W1、W2: wash fraction; E1~E3: elution fraction



圖十六：由膠質篩濾層析法分析 *xps* 基因缺陷的菌株 XpsG 蛋白分子形式

取各菌株不可溶部份與萃取 buffer ( 20mM Tris-HCl pH8.0 , 2% triton x-100 or 0.5% DOC)反應 2 小時,再以 30000 rpm 離心 1 小時, 取得膜蛋白萃取液。將萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱, buffer 為 20mM Tris-HCl pH8.0 , 250mM NaCl, 1% Triton X-100 or 0.5% DOC , 收集 retention time 16-38 分鐘, 作 XpsG western bolt。(A)為各 *xps* 基因缺陷菌株不可溶部分, 經 Triton X-100 萃取後, 經膠質篩濾層析後, 觀察 XpsG 蛋白的分子形式。(B)XC1701、XC1716 不可溶部份, 以 DOC 處理, 經膠質篩濾層析後的 XpsG 蛋白分子形式。

附錄 1: XpsG 之順序與推測之氨基酸

ATGATCAAGCGTTCCATCACCCGCAGTCCGTGCGCGCAGGCCAGGCCGGCATGAGCTTGCTGGAAATCATCATC  
M I K R S I T R S P S R A G Q A G M S L L E I I I 25  
GTCATCGTGCTGATCGGCGCGGTGCTCACCCCTGGTCGGCAGCCGCGTGCTCGGTGGTGCCGATCGCGGCAAGGCG  
V I V L I G A V L T L V G S R V L G G A D R G K A 50  
AACCTTGCCAAGACGCAGATCCAGACCCTGGCCGGCAAGATCGAGAACTTCCAGCTCGACACGGGTAAGTTGCCG  
N L A K A Q I Q T L A G K I E N F Q L D T G K L P 75  
AGCAAGCTCGATGACCTGGTCACCCAGCCCGGCGGCAGCAGCGGTTGGCTGGGCCCCTACGCCAAACCGGTCGAA  
S K L D D L V T Q P G G S S G W L G P Y A K P V E 100  
CTCAACGACCCGTGGGGCCACACCATCGAATACCGCGTGCCCGGCGATGGCCAGGCCCTTCGACCTGATCAGCCTC  
L N D P W G H T I E Y R V P G D G Q A F D L I S L 125  
GGCAAGGATGGCCGCCCTGGCGGCAGCAGCTACGACTCGGACATCAAGTACCAGTAA  
G K D G R P G G S S Y D S D I K Y Q

↓  
*Sal* I: GTCGAC

## 附錄 2:菌種與質體

strain	Relevant characteristics	Source/Reference
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5	F <sup>-</sup> 80 <i>dlacZ</i> ΔM15 <i>recAI endAI</i> <i>gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 relAI deoRA</i> Δ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Hanahan(1993)
JM109	<i>endAI relAI gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>relAI supE44</i> Δ ( <i>lac-proAB</i> ) (F <sup>+</sup> <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> ΔM15)	Yanisch-perron <i>et al.</i> (1985)
BMH71-18	<i>thi supED</i> ( <i>lac-proAB</i> ) <i>mutS::Tn10</i>	promega
MutS	(F <sup>+</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> ΔM15)	
<b><i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i></b>		
XC1701	Rif <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i> (1992a)
XC1723	XpsE <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Leu <i>et al.</i>
XC1722	XpsF <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i>
XC1713	XpsG <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Lee, Meng-Shiunn
XC1717	XpsH <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i>
XC1716	XpsI <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i>
XC1718	XpsJ <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i>
XC1721	XpsK <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i>
XC1712	XpsL <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i>
XC1714	XpsM <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Lee <i>et al.</i> (2001)
XC1709	XpsN <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Lee <i>et al.</i> (2000)
XC1708	XpsD <sup>-</sup> Rif <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i> (1992a)
XC17433	Rif <sup>r</sup> XC1701::Tn5	Hu <i>et al.</i> (1992a)
<b>Plasmid</b>		
pBluescript SK <sup>-</sup>	Amp <sup>r</sup> , a phagemid vector; ColE1 replicon with an f (-) <i>ori</i>	Stratagene
pCPP30	Tc <sup>r</sup> , clone vector of XC, Tra <sup>-</sup> Mod <sup>+</sup> IncP replicon	D. W. Bauer
pCPP30-G	<i>xpsG</i> fragment subcloned in pcpp30	Hu <i>et al.</i>
pCPP30-H	<i>xpsH</i> fragment subcloned in pcpp30	wu, Feng-chang
pCD105	<i>xpsD</i> (Δ29-428) fragment subcloned in pcpp30	Chen <i>et al.</i> (1996)
pET32a	Amp <sup>r</sup> , clone vector	Novagen Co.
pKC118	<i>xpsD</i> fragment subcloned in pcpp30	Chen <i>et al.</i> (1996)
pMH7	<i>xpsD</i> (Δ414-759) fragment subcloned in pcpp30	Chen <i>et al.</i> (1996)

### 附錄 3:培養基與抗生素製備

**LB 液體培養基:** 25g LB Broth ()

add D.II water to 1L, autoclave immediately

**LB 固體培養基:** 200 ml LB medium+ 3g agar, autoclaved immediately

**XOL 液體培養基:** (a)tryptone 0.625g

yeast extract 0.625g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.35g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5g

MnCl<sub>2</sub> 0.0005g

MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.05g

potato starch 10g ,add D.II water to 490ml, autoclaved

(b)FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.005g, add D.II water to 10ml,

filter-sterilized through 0.22μm filter

→Mix(a)(b)

**XOL-starch 固體培養基:** (a) tryptone 0.625g

yeast extract 0.625g

agar 7.5g , add D.II water to 240 ml, autoclaved

(b) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.35g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5g

MnCl<sub>2</sub> 0.0005g

MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.05g

potato starch 10g ,

add D.II water to 250ml boiling, autoclaved

(c) FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.005g, add D.II water to 10ml,

filter-sterilized through 0.22μm filter→Mix(A)(B)(C)

#### **抗生素 (Antibiotics)**

##### **Ampicilin (Amp)**

Stock: 100 mg/ml in D.II water, passed through 0.22μm filter, stored at -20

Working: 35-50μg/ml

##### **Kanamycin (Km)**

Stock: 50 mg/ml in D.II water, passed through 0.22μm filter, stored at -20

Working: 50μg/ml

##### **Tetracyclin (Tc)**

Stock: 12.5 mg/ml in 50% EtOH, passed through 0.22μm filter, stored at -20

Working: 12.5-15 μg/ml

##### **Rifampicin (Rif)**

Stock: 10 mg/ml in DMF( dimethylformamide), passed through 0.22 μm filter, stored at 4 °C, avoid light

Working: 1mg/100 ml

## 附錄 4: 試劑與緩衝溶液的製備

lysis buffer: 20mM Tris-HCl ,pH 8.0

1 mM PMSF

0.5mM DTT

1% triton buffer(for HPLC): 1% triton x-100

20mM Tris-HCl ,pH 8.0

250mM NaCl

0.5% DOC buffer(for HPLC): 0.5% DOC

20mM Tris-HCl ,pH 8.0

250mM NaCl

sucrose solution:

Conc.	Sucrose (g)	H <sub>2</sub> O (ml)
25%	6.25	18.75
32%	8	17
39%	9.75	15.25
46%	11.5	13.5
54%	13.5	11.5
61%	15.25	9.75

### Ni-NTA column

Extraction buffer: 20mM Tris-HCl ,pH 8.0

1% Triton X-100

200mM NaCl

Wash buffer: 20mM Tris-HCl ,pH 8.0

1% Triton X-100

200mM NaCl

5mM Imidazole

Elution buffer: 20mM Tris-HCl ,pH 8.0

1% Triton X-100

200mM NaCl

150mM Imidazole

## SDS-PAGE

2X SDS sample buffer: Tris-HCl (0.5M,pH 6.8) 1ml  
10% SDS 2ml(2%)  
1.25M DTT 0.5ml(1/20)  
100% glycerol 1ml  
Bromophenol blue 0.5ml (0.002%)  
add D.II water to final volume 10ml

13.8% SDS-PAGE(resolving gel): 30% acrylamide-bis acrylamide(29:1) 1.85ml  
1.5M Tris-HCl, pH8.8 1ml  
10% SDS 0.04ml  
1.5% ammonium persulfate 0.5ml  
D.II water 0.6ml  
TEMED 0.0002ml  
Final volume 4ml

Stacking gel : 30% acrylamide-bis acrylamide(29:1) 0.25ml  
0.5M Tris-HCl, pH6.8 0.5ml  
10% SDS 0.02ml  
1.5% ammonium persulfate 0.1ml  
D.II water 1.03ml  
TEMED 0.0002ml  
Final volume 2ml

Electro buffer: Tris-base 3g  
Glycine 14.4g  
SDS 1g add D.II water to final volume 1L

## Western blot

Transfer buffer: Tris-base 9.1g  
Glycine 43.2g  
Methanol 600ml add D.II water to final volume 3L

TBS buffer : 0.5M Tris-HCl, pH7.5 20ml  
NaCl 9g add D.II water to final volume 1L

## 附錄 5 : HPLC 分析之標準分子量計算曲線

縱軸為分子量之對數值，橫軸為滯留時間，圖中直線是經最小平方法計算得之，直線方程式為  $Y=4.98129-0.11077X$ 。管柱是 Superdex 200 HR 10/30(Pharmacia)，液體動相為 20mM Tris-HCl pH 8.0，250mM NaCl，偵測波長為 280nm，流速為每分鐘 0.5 ml。

