

中山醫學大學生物化學研究所

Institute of Biochemistry

Chung-Shan Medical University

碩士論文

Master's Thesis

十字花科黑腐病菌中 XpsG、H、J 蛋白間交互作用關係的探討

Study of the interactions between XpsG、H、J in

Xanthomonas campestris pv. *campestris*

指導教授：陳凌雲博士

Advisor: Dr. Ling-Yun Chen

研究生：賴祥玲

Graduate student: Hsiang-Ling Lai

中華民國九十一年六月

June 2002

致謝

感謝指導教授 陳凌雲博士這兩年來的悉心指導及照顧，使我學會了實驗上的邏輯思考以及實用的蛋白分析和分生技術，讓我的研究生生活過得既滿足又充實；在生活上，老師所給予的精神也讓我克服許多問題，使我成長不少。

感謝中興大學生化所 胡念台博士、農科所 呂維茗博士在實驗上的不吝指教以及對於論文的細心修正，使我的論文更趨完整。除此之外，也感謝孟訓學長、憲明學長、榮宗學長，以及美婷、雅芳和淑娟學姊在實驗上的教導，也謝謝淑玲姐和姍如學姊在生活上的鼓勵及陪伴。

最後，我將此論文的成果歸功於你們，並寄上我最由衷的感謝。

目錄

| | 頁次 |
|---------|----|
| 圖次 | 1 |
| 附錄說明 | 3 |
| 縮寫表 | 4 |
| 中文摘要 | 5 |
| 英文摘要 | 6 |
| 前言 | 7 |
| 實驗材料與方法 | 12 |
| 結果 | 19 |
| 討論 | 33 |
| 參考文獻 | 39 |
| 圖示說明 | 42 |
| 附錄 | 62 |

圖次

頁次

| | |
|--|----|
| 圖一：XC1717(pFH-his)及 XC1701(pFH-his)菌株之 α -amylase 活性及 干擾測試 | 42 |
| 圖二：觀察十字花科黑腐病菌中 XpsH 蛋白的表現 | 43 |
| 圖三：觀察 XpsH 蛋白在胞內的分佈 | 44 |
| 圖四：可溶性 XpsH-his ₆ 蛋白分子特性的分析 | 45 |
| 圖五：不可溶性 XpsH-his ₆ 蛋白分子特性的分析 | 46 |
| 圖六：以 Ni-NTA chromatography 分析 XpsH-his ₆ 與 XpsG 蛋白之間的 交互作用 | 47 |
| 圖七：XC1718(pFJ-his)及 XC1701(pFJ-his)菌株之 α -amylase 活性及干 擾測試 | 48 |
| 圖八：觀察十字花科黑腐病菌中 XpsJ 蛋白的表現 | 49 |
| 圖九：觀察 XpsH-his ₆ 蛋白對 XpsJ 蛋白穩定度的影響 | 50 |
| 圖十：觀察 XpsJ 蛋白在胞內的分佈 | 51 |
| 圖十一：可溶性 XpsJ 蛋白分子特性的分析 | 52 |
| 圖十二：過量表現 XpsH-his ₆ 蛋白對可溶性 XpsJ 蛋白在膠層過濾層析 法下分佈的影響 | 53 |

| | |
|--|----|
| 圖十三：以 Ni-NTA chromatography 分析過量表現 XpsH 蛋白對可溶性 XpsJ-his ₆ 蛋白與 XpsG 蛋白交互作用的影響 | 54 |
| 圖十四：過量表現 XpsH-his ₆ 蛋白對不可溶性 XpsJ 蛋白在膠層過濾層析法下分佈的影響 | 55 |
| 圖十五：以 Ni-NTA chromatography 分析過量表現 XpsH 蛋白對不可溶性 XpsJ-his ₆ 蛋白與 XpsG 蛋白交互作用的影響 | 56 |
| 圖十六：以 Ni-NTA chromatography 分析 XpsH-his ₆ 與 XpsJ 蛋白之間的交互作用 | 57 |
| 圖十七：XpsG、H、J 蛋白結合關係想像示意圖 | 58 |
| 圖十八：XpsH、J 蛋白生理功能推想圖 | 59 |

附錄說明

2

頁次

| | |
|-----------------------------|----|
| 附錄 1: 構築重組質體所需的 primer..... | 62 |
| 附錄 2: 菌種與質體..... | 63 |
| 附錄 3: 培養基與抗生素製備..... | 64 |
| 附錄 4: 試劑與緩衝溶液的製備..... | 65 |
| 附錄 5: HPLC 分析之標準分子量計算曲線 | 66 |

縮寫表³

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

Triton X-100 : t-Octylphenoxyethoxyethanol

摘要

4

十字花科黑腐病菌為革蘭氏陰性菌，能夠藉由Type II secretion pathway分泌胞外酵素而感染十字花科植物。Type II secretion pathway是革蘭氏陰性菌分泌胞外蛋白的主要機制之一，而這些胞外蛋白往往是使宿主致病的主要原因。故致力研究Type II secretion pathway的分子機制，期望能獲得抑制病原菌感染宿主的方法。

Type II secretion pathway的成員中的 GpsG、H、I、J、K 蛋白被認為會形成類似纖毛狀的結構，與推動胞外蛋白通過外膜有關。過去，雖然以 cross-linking 的實驗發現在 *P. aeruginosa* 中 GspG 蛋白和 GspH、I、J 蛋白間存在著交互作用，然而對於其中詳細的交互作用機制目前仍無所知。所以本篇論文的目的即是針對十字花科黑腐病菌 XpsG、H、J 蛋白之間交互作用關係作詳細的探討。實驗中以膠層過濾層析法以及 Ni-NTA 親合性管柱層析法分別分析 XpsG、H、J 的分子特性及彼此間的交互作用。結果發現：a. XpsH-his₆ 蛋白與 XpsG 蛋白之間具有交互作用；b. XpsH-his₆ 蛋白會與 XpsJ 蛋白產生交互作用並影響 XpsJ 蛋白在膠層過濾層析下的分佈；c. XpsH 蛋白會幫助 XpsG-XpsJ-his₆ 複合體的形成。綜合以上結果可以知道：XpsH 蛋白

能夠幫助 XpsJ 與 XpsG 蛋白之間的結合並形成 XpsG-XpsH-XpsJ 的複合體。

Abstract

Xanthomonas campestris pv. *campestris* exports a number of hydrolytic enzymes to infect plants using type II secretion pathway. Type II secretion pathway is the main terminal branch of the general secretion pathway in gram-negative bacteria for extracellular secretion of toxins and hydrolytic enzymes. Extracellular secretion of proteins is regarded as a major virulence mechanism in bacteria infection. In order to resolve the problem of bacteria infection, the study of type II secretion pathway is important.

The members of type II secretion pathway, XpsGHIJK, were assumed to form pilus-like structure and push secreted proteins through the outer membrane. In the past, the cross-linking experiment in *P. aeruginosa* revealed that GspG could interact with GspH,-I,-J, but the detail protein-protein interactions among GspG, -H, -I, -J is still unknown. In this study, analysis of the interactions between XpsG, -H, -J in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by gel filtration and Ni-NTA affinity chromatography showed that : a. XpsH-his₆ could interact with XpsG; b. XpsH-his₆ could interact with XpsJ and change the fractionation of XpsJ in gel filtration chromatography ; c. XpsH could assist the formation of XpsG-XpsJ-his₆ complex. These observations suggest that

XpsH could regulate the complex formation of XpsG-XpsH-XpsJ.

前言

分泌胞外蛋白 (exoproteins) 是細菌感染宿主的一種主要機制，被分泌的蛋白質 (如蛋白?、磷脂?、脂解? 和毒素等...) 通常能破壞並瓦解宿主細胞而導致疾病的發生。在革蘭氏陰性菌中，胞外蛋白的分泌需經過內膜 (inner membrane)、胞質週緣區 (periplasm)、細胞壁 (cell wall) 及外膜 (outer membrane) 的結構，而目前已知有幾種機制能幫助此過程的進行，其中 type II secretion pathway (general secretion pathway) 則是其分泌路徑中的一種 [1]。

Type II secretion pathway 是廣泛存在於革蘭氏陰性菌中的胞外蛋白分泌機制。在過去的研究中得知，利用此路徑所分泌的蛋白質在功能上並無關聯，但在結構上卻均具一段 N 端訊息序列 (N-terminal signal sequence)。當一個攜帶有 N-terminal signal sequence 的胞外蛋白在細胞質中被合成時，能夠辨識此 N 端序列的蛋白質即會將胞外蛋白帶往內膜上，再經由 Sec-dependent pathway 將胞外蛋白的 N 端序列切除並運送至胞質週緣區。在胞質週緣區中，蛋白會進行摺疊成為成熟的蛋白質，最後再藉由至少 12 個蛋白質所組成的一套第二型分泌機器將其分泌至胞外 [1, 2]。

目前已知擁有 Type II secretion pathway 的革蘭氏陰性致病菌包括有：人類致病菌，如 *Vibrio cholerae*、*Pseudomonas aeruginosa*；魚致病菌，如 *Aeromonas hydrophila*；植物致病菌，如 *Erwinia chrysanthemi*、*Erwinia carotovora*、*Xanthomonas campestris* 等等...

依據不同的菌種，第二型胞外蛋白分泌機器可由 12~15 不等的蛋白質所組成，並以字母 A~O 以及 S 將其命名[2, 3]。另根據在革蘭氏陰性菌胞內的分佈位置，又可將這群蛋白質分為三類：

1. 外膜蛋白：

位於外膜的蛋白包括有 D 蛋白及 S 蛋白。D 蛋白在研究中已知是由 12~14 個單體所組成的巨大複合體，其位於外膜上可形成一個通道，作為胞外蛋白在外膜上的出口[4, 5, 6]。在結構上，研究指出 D 蛋白的 C 端插入於外膜中且可能與形成複合體有關[7]，而其 N 端則是暴露在胞質週緣區並推測可能會與其他的 Gsp 成員產生交互作用[8, 9]，當 D 蛋白的 N 端與其他的 Gsp 成員產生交互作用時則可能誘導 C 端的構形發生改變而打開通道[8]。在某些菌種中，外膜上另存在有 S 蛋白，其功能主要是穩定 D 蛋白並協助其插入於外膜中[8, 10]。

2. 內膜蛋白：

存在於內膜的蛋白包括有 L、M、N、E、F、O 等蛋白。在 2000 年憲明學長的實驗中證實 N 蛋白能夠與上述的 D 蛋白產生交互作用[11]，

而 L、M 蛋白則已由研究中證實會形成一穩定的複合體且彼此存在著某一程度的依存關係能夠彼此保護不受蛋白酶? 的分解[12]，並且發現當 L 蛋白不存在時，M 蛋白會變得不穩定；而當 M 蛋白不存在時，L 蛋白也會變得不穩定[13]。另外，由免疫共沉澱的證據得知，L、M、N 蛋白之間存在著兩兩相互作用的關係[14]。而在今年榮宗學長的實驗中更進一步指出，N 蛋白具有穩定 L、M 蛋白之間結合的功能。E 蛋白是唯一在序列上不具有厭水區域的蛋白質，應屬於細胞質中的蛋白，但經由研究發現：E 蛋白與 L 蛋白具有交互作用而有部份附著在內膜上[15]。另外，E 蛋白在結構上具有一個 Walker box，並有研究證據指出 E 蛋白存在著 autophosphorylation 的活性，推測 E 蛋白在分泌的過程中可能扮演著 ATPase 的角色，分解 ATP 提供能量打開外膜通道或是幫助纖毛結構的形成[16]。F 蛋白是一個穿越內膜三次的蛋白，截至目前為止並未有證據指出能夠與其他的 Gsp 成員產生交互作用。O 蛋白是 Type pilus 組裝過程中的 prepilin peptidase，故推測其也能夠將類纖毛前驅物 G、H、I、J、K 的 N 端 signal peptide 水解並甲基化，使其能夠進行下一步的纖毛組裝[8, 17, 18]。

3. 纖毛構成蛋白：

G、H、I、J、K 五種蛋白，因為在 N 端的序列上【G?(F/M) XXXE】

與 type Ⅱ pilus 組裝中構成纖毛的蛋白具有相似性，故推測也可能形成類似纖毛狀的結構[19, 20]。此一類似纖毛結構的形成在功能上被認為可能是：a. 連接內膜與外膜之間；b. 傳導胞外蛋白通過外膜[21]；c. 推送位於外膜通道中的胞外蛋白至膜外[22]。

過去的研究發現：Type II secretion pathway 中的 pseudopilins G、H、I、J、K 與 type Ⅱ 的 pilins N 端 30 個胺基酸的厭水區域具有同源性，並且發現在其 N 端的 signal peptide 均會被 prepilin peptidase 水解以及甲基化[23]。而在同時擁有 Type II 及 type Ⅱ pilus 的 *Pseudomonas aeruginosa* 中發現：細胞中主要的纖毛蛋白 PilA 能夠與其他的類纖毛蛋白發生作用，而此作用能夠增加胞外蛋白分泌的效率[24]。由以上的種種的相似性顯示：Type II 及 type Ⅱ pilus 可能演化自相同的機制，也因此推測 Type II secretion pathway 中的類纖毛蛋白 G、H、I、J、K 可能與 type Ⅱ 中的纖毛蛋白具有相似的性質，也能夠形成類纖毛結構。在電子顯微鏡的觀察下發現，以 *E. coli* 大量表現的 PulG (*K. oxytoca*) 蛋白會在細胞表面組成類似纖毛狀的結構，但在正常的生理情狀下並無法觀察到此一現象[25]。而在今年本實驗室所發表的論文中指出，XspG 蛋白除了具有膜蛋白的形式之外另存在著一種可溶性的巨分子形式，並推測此由 XspG 所形成的可溶性巨大分子乃是原本為橫跨於內、外膜之間的纖毛結構，但在經過破細胞的機械力

量後掉落所形成[26]。而此項結果也為 type II secretion pathway 中類纖毛結構的形成提供了間接的証據。關於類纖毛蛋白之間交互作用的探討，目前已知在 *P.aeruginosa* 中以 cross-linking 的實驗發現，G 蛋白和 H、I、J 蛋白間均存在著交互作用[25]，然而對於其中詳細的交互作用機制目前仍無所知。

為深入了解類纖毛蛋白之間的作用關係，本論文即以探討 XspG、H、J 蛋白交互作用為主題，利用膠層過濾層析法以及 Ni-NTA 親合性管柱層析法等實驗來分析這三個蛋白之間是如何的彼此影響。

11
實驗材料與方法

一、菌種

請參照附錄 2。

二、抗體

Anti-XpsG 抗體：由李孟訓學長於碩士班期間製備完成，稀釋 1/3000 使用。

Anti-XpsH 抗體：由吳逢昌學長於碩士班期間製備完成，稀釋 1/100 使用。

Anti-XpsJ 抗體：合成 XpsJ 蛋白全長第 38 至 58 個胺基酸(SQRGE AIAQR SERTR AVEEFE)免疫兔子所得的抗血清，稀釋 1/100 使用。

三、*xpsH* 及 *xpsJ* 基因 C 端 H-his₆ tag 的構築

a. PCR 反應

取 1 μ l pCPP30FH 或 pCPP30FJ 質體，加入 1 μ l PSB primer 及 1 μ l 設計的 primer(含 *Xho* site)，8 μ l dNTP (1.25 mM)、10 μ l 10X Tag polymerase buffer、1 μ l Tag polymerase、10% DMSO，最後再加入 PCR 水將體積帶至 100 μ l。PCR 反應條件為 94 denature 1 分

鐘，52 annealing 1 分鐘，72 extension 2 分鐘，反應 35 循環。所得的 PCR 產物以 1% agarose gel 分析並以 Qiagen gel extraction kit 純化。

b. Ligation

將 PCR 產物以 *Hind* 及 *Xho* 酵素水解後以 1% agarose gel 分析並以 Qiagen gel extraction kit 純化作為 insert。另外，抽取 pSYP9 質體以 *Hind* 及 *Xho* 酵素水解，利用 1% agarose gel 分析並以 Qiagen gel extraction kit 純化作為 vector。各取 3.5 μ l insert 及 vector，加入 1 μ l DNA ligase 及 2 μ l 5X DNA ligase buffer 混合均勻置於 16 中反應 O/N。

四、勝任細胞(competent cell)

培養 2 ml *E.coli*. JM109 小量菌過夜後轉至 50 ml 中大量培養至 OD₆₀₀ 0.6~0.8，將菌液以 3000 rpm 離心 10 分鐘並去除上清液(無菌操作)。將 pellet 以 25 ml 冰浴的無菌 100 mM CaCl₂ buffer 輕輕回溶，置於冰上 30 分鐘。將溶液再次以 3000 rpm 離心 10 分鐘並去除上清液，再將 pellet 以 2 ml 冰浴的無菌 100 mM CaCl₂ buffer 輕輕回溶，最後加入 final 40% 的甘油，以 100 μ l 分裝於 microtubes 中並儲存於 -80 。

五、轉型作用(transformation)

取 10 μ l ligation product 加入 100 μ l 勝任細胞中輕巧的混合並靜置

於冰上 30 分鐘，再置於水浴槽中以 42 °C heat shock 45 秒後立刻置於冰上，5 分鐘後平塗於含有抗生素的 plate 上，培養於 37 °C 中挑其生成的單一菌落，抽其質體檢查。

六、接合作用(conjugation)

- a. 預先以 LB plate 培養輔助細胞(helper cell) 接受細胞(recipient cell)以及捐贈細胞(donor cell)，分別是 *E.coli* DH5a(pRK2013) /km^r、Xc/Rif^r、JM109(pCPP30-mutant)/Tc^r 過夜。
- b. 取適量接受細胞劃過輔助細胞及接受細胞混合均勻培養在 LB plate 上於 30 °C 過夜。
- c. 以劃單一菌落的方式將上述混合的細菌劃在含有 Tc 及 Rif 的 plate 上培養至單一菌落的生成，挑單一菌落培養並檢查蛋白表現。

七、互補試驗

將構築好的 pCPP30FH-his 及 pCPP30FJ-his 經接合作用分別送入 XC1717(*xpsH* knockout)和 XC1718(*xpsJ* 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 XC1717 或 XC1718 當作陽性和陰性對照組。觀察菌落周圍透明暈圈的大小，以測試各重組蛋白是否能夠回復原正常蛋白的功能。

八、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的 XC1701 菌株中，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，以測試各重組蛋白是否會干擾原正常蛋白的功能。

九、precleared antibody 的製備

將 200 ml XC1717 或 XC1718 的菌株以 15 ml 的 TBS buffer 回溶破細胞，再以 12000 rpm, 10 min 高速離心去除未破細胞，取 5 ml 分別與 50 μ l 的 anti-XpsH 或 anti-XpsJ 抗體於 4 反應 O/N，再加入 0.3 g 的脫脂奶粉混合均勻即可使用。

十、西方轉印法(western blot)

將 SDS PAGE 膠片緊貼於 PVDF 上，置於 mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad), 100V, 通電一小時，將蛋白質轉印至 PVDF 上。(PVDF 使用前處理：將 PVDF 浸泡以適量甲醇浸濕，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 以 transfer buffer 浸泡十分鐘)。將轉印後的 PVDF membrane 以 50ml 含 6% skim milk 的 TBS buffer 浸泡並置於旋轉器上反應 30 分鐘。之後將 PVDF membrane 置於夾鏈袋中與 precleared 抗體於室溫中反應 1 小時，之後再以 TBS buffer 清洗 PVDF membrane 4 次，每次 10

分鐘。洗淨的 PVDF membrane 再置於夾鏈袋中與 anti-rabbit 抗體(1/3000)於室溫中反應 1 小時，之後再以 TBS buffer 清洗 PVDF membrane 4 次，最後使用 Super Signal Western blotting Kit(騰達行)將 PVDF membrane 反應，再以 X 光片感光呈色。

十一、可溶蛋白及膜蛋白萃取液的製備

將所要分析的菌種,分別培養於含 rifampicin 及 tetracyclin 的 2 ml LB 中。待菌液菌液呈現混濁後，換到 200 ml LB 的培養液中培養至 OD₆₀₀ 約 1.0 左右。接著利用 10000 rpm，10 分鐘的高速離心收菌，再用適量的二次水將細胞懸浮，再以 12000 rpm，10 min 高速離心，將細胞外多醣類洗掉，重複兩次。用 15 ml lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl, 1 mM PMSF)將細胞懸浮，通過 French Press (18000-20000 lb/in，流速 1 滴/2-4 秒) 3~4 次破菌，用 10000 rpm，離心 10 分鐘除去未破細胞，接著進行 56000 rpm 超高速離心(Beckman rotor Ti 90)1 小時，所得上清液為可溶性蛋白。沉澱物回溶在 2 ml 的 20 mM Tris-HCl pH8.0, 2 % Triton X-100 buffer，4 溫和搖晃 2 小時~ O/N，以 30000 rpm 超高速離心 1 小時，所得上清液為膜蛋白萃取液。

十二、DE52 陰離子管柱層析法

將 3 ml 的 DE52 resin 填於 column 中先以 50 ml, 1M 的 NaCl buffer

清洗，再以 200 ml 的二次水將鹽離子完全洗淨。洗淨的 DE52 resin 以 50 ml 無鹽的 buffer (20 mM Tris-HCl, 含或不含 1% 於 Triton x-100) 平衡後，加入 membrane 或 soluble sample 於 4 反應 O/N。將 resin 回填於 column 中收集流下來的液體為 flow through (FT) 的部分。接著後以 50 ml 無鹽的 buffer (20 mM Tris-HCl, 含或不含 1% 於 Triton x-100) 清洗，再加入 elution buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 含或不含 1% 於 Triton x-100)，每 ml 收集一管，收集 10 管。每管取 5 μ l 以 SDS PAGE 及 western 分析。

十三、膠層過濾層析法

將 Superdex HR-200 (size 25ml, 可分 10-600kDa, Pharmacia) 膠質篩濾層析管柱安裝於 FPLC 上，以二倍體積(50 ml) 的 buffer 平衡，流速為 0.5 ml/min。將 sample 以微量針筒取 250 μ l 注射到 FPLC，收集 retention time 14-40 min，每管 0.5 ml。每管取 300 μ l 加入四倍體積的丙酮，於 -20 中沉澱 O/N 之後於 4 中以 12000 rpm 高速離心 15 分鐘，小時倒掉上清液。將沉澱物風乾，最後加入 25 μ l 1x sample buffer，進行 SDS-PAGE 電泳以及西方點墨法分析。

十四、Ni-NTA affinity chromatography

Ni-NTA resin 先以 buffer(10 mM imdazole , 20 mM Tris-HCl , 200 mM NaCl , 含或不含 1% Triton x-100)平衡後 , 再將 membrane 或 soluble sample 與 1 ml Ni-NTA resin 混合於 4 反應 O/N。之後將 resin 回填入 10 cm x 1 cm(diameter) column 中 , 收集流下來的液體為 flow through (FT)的部分。接著以 50 ml wash buffer (25 mM Imidazole , 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 含或不含 1% Triton x-100) 清洗 , 收集第一管與最後一管 , 此為 W₁ W_n 加入 elution buffer (500mM Imidazole , 20 mM Tris-HCl , 300 mM NaCl , 含或不含 1% Triton x-100) , 每 1ml 收集一管 , 共收集 2 管 , 此為 E₁、 E₂。將所收集到的 W_n E₁、 E₂ 加入丙酮於-20 沉澱 O/N。高速離心 (12000rpm, 15 min) , 去上層液。將沉澱物風乾 , 最後加入 10 μl sample buffer , 進行 SDS-PAGE 電泳及 western 分析。

結果

18

一、觀察十字花科黑腐病菌中 XpsH 蛋白的表現

a. pCPP30FH-his₆ 質體的構築

為使用 Ni-NTA affinity chromatography 的分析探討 XpsG、H、J 蛋白間的交互作用，故利用引子以 PCR 的方式在 *xpsH* 基因終止密碼前創造出 *Xho* 酵素切位，再以 *Hind* 及 *Xho* 酵素將 *xpsH* 基因剪接到帶有 (His)₆-tag 的 pSYP9 質體上，使其在送入十字花科黑腐菌中能夠表現出 C 端帶有 6 個 Histidine 的 XpsH-his₆ 蛋白。

b. α -amylase 活性及干擾測試

將構築好的 pCPP30FH-his 質體分別送入 wild type (XC1701) 及 *xpsH* 基因的缺損株 (XC1717) 中以 starch plate 來觀察 XpsH-his₆ 蛋白在 XC1717 中是否能夠互補 XpsH 蛋白的功能使其恢復分泌 α -amylase 的活性；而在 XC1701 中是否會產生干擾抑制的現象。結果由圖一可知：XpsH-his₆ 蛋白在 XC1717 中可以互補 XpsH 蛋白的功能，並且在 XC1701 中不會產生干擾抑制的現象。由此結果顯示 C 端接上 6 個 Histidine 並不會影響

XpsH 蛋白的功能。

c. 觀察 XpsH 蛋白的表現

在圖二中，我們利用西方墨點法觀察十字花科黑腐病菌中 XpsH 蛋白的表現。結果發現在外送 pCPP30FH 及 pCPP30FH-his 質體的互補菌株中可分別偵測到約 14 及 15 kDa 的訊號，此分子量的大小與預測的 18.2 kDa 及 19 kDa 相近。為確定此訊號是否為 XpsH 蛋白，我們同時於實驗中觀察以相同質體表現 XpsG-his₆、XpsI-his₆、XpsJ-his₆ 蛋白的互補菌株來排除 pCPP30 質體的因素以及 XpsGHIJ 蛋白間 cross-reaction 的可能性；除此之外，所使用的抗體也事先和 XC1717 (? *xpsH*) 的 total lysate 作用去除背景的雜訊。結果由圖二可知，除了以質體大量表現 XpsH 及 XpsH-his₆ 蛋白的菌株可以偵測得到 XpsH 蛋白訊號之外，在其他菌株均無法偵測到 XpsH 蛋白的表現。而由於在 XC1701 中無法偵測到 XpsH 蛋白的表現，因此以下的實驗我們就均以含 pCPP30FH 或 pCPP30FH-his 質體的菌株進行。

二、觀察 XpsH 蛋白在胞內的分佈

由於先前本實驗室證明了 XpsG 蛋白在菌體中同時存在著可溶 (soluble form) 及不可溶 (membrane form) 的分子形式[26]，

所以針對 XpsH-his₆ 蛋白，我們也想觀察其在菌體中是否也同時存在兩種不同的分子形式。實驗中我們利用 French press 將菌體打破，再利用 56000rpm 的超高速離心將其分為 soluble 及 membrane 兩部份，之後取等菌量的樣品進行 western blot 分析。結果發現(圖三)，XpsH-his₆ 蛋白與 XpsG 蛋白同樣具有 soluble form 及 membrane form 兩種形式，但均以 membrane form 為主。

三、 XpsH-his₆ 蛋白分子特性的分析

針對 XpsH-his₆ 蛋白的 soluble form 及 membrane form，我們以 gel filtration chromatography 分析兩者在分子型態上是否有差異，並且和 XpsG 蛋白進行對照比較。

a. 可溶性蛋白部份

將以質體表現 XpsH-his₆ 蛋白的互補菌株打破經由超高速離心後得到的上清液取 250 μ l (相當於 OD₆₀₀ 1, 3.3 ml 的菌量) 通過 Superdex HR200 的膠層過濾管柱，收集 14~40 分鐘的樣本以 western 作分析。結果發現(圖四)，soluble form 的 XpsH-his₆ 蛋白主要分佈在 15、16 分鐘，與 XpsG 蛋白的分佈相同 (co-fractionation) 而由此結果顯示，soluble form 的 XpsH-his₆ 蛋白可能會與 soluble form XpsG 蛋白共同形成巨大的分子。

b. 不可溶性蛋白部份

以相同的方法來分析 membrane form 的 XpsH-his₆ 蛋白。結果發現 (圖五 a): membrane form 的 XpsH-his₆ 蛋白分佈是從 15 分鐘開始持續往後拖延至 25、26 分鐘，而 XpsG 蛋白則是少許分佈在 20、21、22 分鐘，其餘則主要分佈在 23、24、25 分鐘，二者的主要分佈並不相同。由於在 *P. aeruginosa* 中以 cross-linking 的實驗證明，GspG 和 GspH 蛋白具有交互作用 [25]，而在此實驗中我們所得到的結果似乎與前人的結果有所矛盾。

四、XC1701 中不可溶性 XpsH 蛋白分子特性的分析

解釋圖五(a)所得到的結果，我們認為以外送質體大量表現的 XpsH-his₆ 蛋白，其 membrane form 的部份可能會因為蛋白濃度過高而產生聚集的現象，故在 gel filtration chromatography 的分析下會出現在高分子量的 15~19 分鐘。為了要驗證我們的解釋，我們嘗試觀察內生性的 XpsH 蛋白在 gel filtration chromatography 分析下的分佈情形，因此改以 XC1701 菌株作分析。由圖五(b)顯示 XC1701 中有微量 membrane form 的 XpsH 蛋白分佈在 20、21、22 分鐘，暗示在圖五(a)中 15~19 分鐘的訊號的確是過量表現的 XpsH-his₆ 蛋白產生聚集的結果。同時，比較 XC1701 中 XpsH 與 XpsG 蛋白 membrane form 的分佈，發

現 XC1701 中 membrane form 的 XpsG 蛋白在膠層過濾層析法下分佈於兩群，分別是 20、21、22 及 23、24、25 分鐘，而前者與 XpsH 蛋白的分佈相同，由此顯示在 20、21、22 分鐘出現 membrane form 的 XpsH 與 XpsG 蛋白之間可能具有交互作用。而由圖五(b)的結果也暗示在正常的生理情況下 XpsG 蛋白可能同時具有 XpsG-XpsG 及 XpsG-XpsH 的複合體。

五、以 Ni-NTA chromatography 分析 XpsH-his₆ 與 XpsG 蛋白之間的交互作用

由膠層過濾層析法的實驗中，我們發現 soluble 及 membrane form 的 XpsH 與 XpsG 蛋白均具有相同的分佈，由此可暗示其間交互作用的成立。為了更進一步驗證這項結果，我們進行 Ni-NTA affinity chromatography 分析，觀察二者是否可被共純化。利用以質體表現 XpsH-his₆ 蛋白的互補菌株進行分析，結果如圖六所示，當以 Ni-NTA 管柱純化 soluble(a)或 membrane form(b)的 XpsH-his₆ 蛋白時可看到 XpsG 蛋白被一起純化。雖然在圖六中可觀察到 control 組也有一些 XpsH、XpsG 蛋白與 Ni-NTA 管柱有非專一性的結合，但比較其濃度上的差異，實驗組的結果應是可信的。而由此結果則可以驗證：soluble 及 membrane form 的 XpsH-his₆ 蛋白在菌體中的確可能與 XpsG 蛋

白作用並進而產生複合體。

六、觀察十字花科黑腐病菌中 XpsJ 蛋白的表現

a. pCPP30FJ-his₆ 質體的構築²³

對於類纖毛蛋白的另一成員，XpsJ 蛋白，為了方便接下來實驗的分析，所以同樣也在 *xpsJ* 基因的 C 端接上 His₆-tag，使之在送入 Xc 後能夠表現出 C 端帶有 6 個 Histidine 的 XpsJ-his₆ 蛋白

b. α-amylase 活性及干擾測試

將構築好的 pCPP30FJ-his 質體分別送入 wild type (XC1701) 及 *xpsJ* 的缺損株 (XC1718) 中以 starch plate 來觀察 XpsJ-his₆ 蛋白在 XC1718 中是否能夠互補 XpsJ 蛋白的功能使其恢復分泌 α-amylase 的活性；在 XC1701 中是否會產生干擾抑制的現象。結果由圖七可知：XpsJ-his₆ 蛋白在 XC1717 中可以互補 XpsJ 蛋白的功能，並且在 XC1701 中不會產生干擾抑制的現象。

c. 共同表現 XpsJ 蛋白及 XpsH-his 蛋白

為了探討菌體中 XpsJ 及 XpsH 蛋白之間的關係，我們使用外送兩個不同質體的策略，使其在菌體中能夠同時大量表達兩種不同的蛋白。我們先將 *xpsJ* 基因剪接到 pBBR1MCS5- (Gm^r) 質體上，再將此質體送入含有 pCPP30FH-his 質體的 XC1717 菌株以及含有 pCPP30FH-his 質體的 XC1713 菌株中，並同時使用

Tc 及 Gm 抗生素進行篩選以獲得含有兩個不同質體的菌株。

d. 觀察 XpsJ 蛋白的表現

圖八的結果是以西方墨點法來觀察十字花科黑腐病菌中 XpsJ 蛋白的表現。結果發現在 XC1701 中無法偵測到 XpsJ 蛋白的訊號，顯示內生性的 XpsJ 蛋白與 XpsH 蛋白相同，其表現量均很低。而當利用質體表達 XpsJ 蛋白時可偵測到分子量約 22 kDa 的訊號，而此分子的大小與預期的 22.7 kDa 近似，故判定應是抗體與 XpsJ 蛋白專一性結合的訊號。實驗中同時觀察相同以質體表現的 XpsG-his₆、XpsH-his₆、XpsI-his₆ 蛋白互補菌株來排除質體的因素和 XpsGHJI 蛋白 cross-reaction 的可能性；除此之外，所使用的抗體也事先和 XC1718 (? *xpsJ* gene) 的 total lysate 作用來去除背景訊號。由圖八中我們觀察到三個特別的現象：一是當 XpsJ 蛋白在 C 端接上 6 個 Histidine 時，其蛋白的表現量則會明顯的降低 (lane 7)，顯示 C 端的 6 個 Histidine 會讓 XpsJ 蛋白變得較不穩定，但其原因目前尚未清楚；二是當同時大量表達 XpsH-his₆ 蛋白時，XpsJ 蛋白的濃度會隨之增加 (lane 5、6)，暗示著 XpsH-his₆ 蛋白可能具有穩定 XpsJ 蛋白的功能；三則是當 XpsJ 蛋白濃度升高時可同時觀察到一個電泳移動速度較慢的 XpsJ 蛋白分子 (lane 5、6)，而此分子的

形成原因目前也不明瞭。

七、觀察 XpsH-his₆ 蛋白對 XpsJ 蛋白穩定度的影響

由於在上個實驗中，發現大量表現 XpsH-his₆ 蛋白可以使 XpsJ 蛋白的濃度增高，故推測 XpsH-his₆ 蛋白可能具有穩定 XpsJ 蛋白的能力。所以接下來為了觀察 XpsH-his₆ 蛋白是否真能穩定 XpsJ 蛋白，我們將 1717(pFH-his₆,pBJ)以及 1718(pFJ)菌株同時培養於 2 ml 的 LB 中，分別於不同的 OD₆₀₀ 值收菌並加入 sample buffer，接著以 SDS PAGE 與 western blot 來觀察。結果由圖九可看到，當菌株中只大量表現 XpsJ 蛋白時，XpsJ 蛋白的濃度會隨著 OD₆₀₀ 值的增加而下降。顯示在菌體中單獨大量表現的 XpsJ 蛋白其實並不穩定，待細菌生長到後期時即會快速的被降解，所以其濃度會隨著 OD₆₀₀ 值的增加而下降。然而當同時大量表現 XpsH-his₆ 蛋白時發現，即使將菌液一直培養至 OD₆₀₀ 為 4.0 時，XpsJ 蛋白仍穩定的存在，顯示大量表現的 XpsH-his₆ 蛋白可能可以穩定大量表現的 XpsJ 蛋白，因而減緩其降解的速度。

八、觀察 XpsJ 蛋白在胞內的分佈

接著觀察 XpsJ 蛋白在胞內的分佈。結果竟意外的發現大量表現的 XpsJ 蛋白並不同於 XpsG 及 XpsH 蛋白，其大部份是以 soluble

form 的形式存在，而泳動速度較慢的 XpsJ 蛋白則分佈在 membrane 的部份(圖十)。由於 XpsJ 蛋白 N 端有一段厭水的區域，但為何大量表現後會主要分佈在 soluble 的部份？對於此特殊的現象，我們接著針對 soluble form 的 XpsJ 蛋白作膠層過濾層析法的分析。

九、可溶性 XpsJ 蛋白分子特性的分析

將質體表現 XpsJ 蛋白的互補菌株經由超高速離心後所得的上清液先經過 DE52 的陰離子交換管柱進行初步的純化 (圖十一 a)，之後將洗出的第三管取 250 μ l 通過新的 HR200 的膠層過濾管柱，收集 14~40 分鐘的樣本以 XpsJ 及 XpsG 的抗體作 western 分析。結果發現(圖十一 b) soluble form 的 XpsJ 蛋白主要分佈在兩群，分別是 17、18 分鐘及 30、31、32、33 分鐘。對照 XpsJ 蛋白的菌株 XC1718(圖十一 c)，我們發現在 32、33 分鐘出現的訊號有部份是非專一性的雜蛋白，而 30、31 分鐘的訊號則應是約 45 kDa 左右的 XpsJ 雙倍體分子，推測可能為細胞質內之 XpsJ 蛋白。除此之外，主要出現在 17、18 分鐘的 XpsJ 蛋白與 15、16 分鐘出現的 XpsG 蛋白分佈並不完全相同，暗示過量表現的可溶性 XpsJ 蛋白與 XpsG 蛋白之間的交互作用很弱，或可能根本不具有交互作用。

十、 過量表現 XpsH-his₆ 蛋白對可溶性 XpsJ 蛋白在膠層過濾層析法下分佈的影響

由於以膠層過濾層析法分析單獨大量表現的 XpsJ 蛋白時發現 XpsJ 與 XpsG 蛋白之間的交互作用似乎不存在，而根據圖九的結果知道：大量表現的 XpsH-his₆ 蛋白具有穩定 XpsJ 蛋白的功能，暗示其間可能存在著交互作用關係；同時，大量表現的 XpsH-his₆ 蛋白與 XpsG 蛋白之間可能藉由彼此的交互作用而形成複合體(圖六)。而由這樣的三角關係所以接著想要了解：大量表現的 XpsH-his₆ 是否會影響 XpsJ 與 XpsG 蛋白在膠層過濾層析法下的分佈？實驗中以同時大量表達 XpsH-his₆ 與 XpsJ 蛋白的 1717(pFH-his₆,pBJ)菌株進行膠層過濾層析法分析，觀察大量表現的 XpsH-his₆ 蛋白是否會影響 XpsJ 與 XpsG 蛋白的分佈。

由圖十二 a 的結果發現，當大量表現 soluble form 的 XpsH-his₆ 蛋白時，原本於 17、18 分鐘出現的 soluble form XpsJ 蛋白會提早於 15、16 分鐘與 XpsG、XpsH-his₆ 蛋白一起出現，而完全不表現 XpsH 蛋白時 soluble form XpsJ 蛋白則維持原來的分佈(圖十二 b)。由此結果可知，在菌體中大量表現的 soluble form XpsH-his₆ 蛋白能夠影響 XpsJ 蛋白的分佈，並且暗示著 XpsH-his₆ 蛋白可能有助於 XpsG- XpsH-his₆-XpsJ 複合體的形

成。

十一、以 Ni-NTA chromatography 分析過量表現 XpsH 蛋白對可溶性 XpsJ-his₆ 蛋白與 XpsG 蛋白交互作用的影響

28

在圖十二中可知 soluble form 的 XpsH-his₆ 蛋白會改變 XpsJ 蛋白的分佈使其與 XpsG 蛋白同分佈，而此證據暗示著 XpsH-his₆ 蛋白可能有助於 XpsJ 與 XpsG 蛋白之間交互作用的形成。為了證明 XpsH 蛋白存在促進 XpsJ 與 XpsG 蛋白之間交互作用的效應，我們將帶有 *xpsH* 基因的 pBBR1MCS5-質體送入含有 pCPP30FJ-his 質體的 XC1718 菌株中；同時也將 pCPP30FJ-his 質體送入 XC1717 (*xpsH*) 中表現，再將這兩株菌株同步作 Ni-NTA affinity chromatography 的分析，來觀察 XpsH 蛋白是否會影響 XpsJ-his₆-XpsG complex 的形成。由圖十三的結果可知，在完全不表現 XpsH 蛋白的菌株中，XpsG 蛋白並不能隨著 XpsJ-his₆ 蛋白而被一起純化；然而在同時大量表現 XpsH 蛋白的菌株裡，我們就能夠在 500 mM imidazole 洗出的部份觀察到 XpsG、XpsH 蛋白隨著 XpsJ-his₆ 蛋白被共純化。由此實驗的結果可以證明 XpsH 蛋白可能能夠幫助 XpsJ-his₆ 與 XpsG 蛋白之間的交互作用使其形成 XpsJ-his₆-XpsH-XpsG 的複合體。

十二、過量表現 XpsH-his₆ 蛋白對不可溶性 XpsJ 蛋白在膠層過濾層

析法下分佈的影響

在我們了解 soluble form XpsG、XpsH 及 XpsJ 蛋白之間的關係之後，接著對其 membrane form²⁹ 作分析。將 1717(pFH-his, pBJ) 菌株經過破菌、超高速離心後得到的 membrane 經 2% Triton X-100 萃取後先通過 DE52 陰離子交換管柱初步純化，再取高鹽洗出的第三管通過 HR200 膠層過濾管柱，收集 14~40 分鐘的樣本進行 western blot。結果發現(圖十四 a)在 XpsH-his₆ 大量表現下 XpsJ 蛋白有三群分佈，分別是 16~21 分鐘、22~26 分鐘及 31~33 分鐘。分析 XpsJ 蛋白的分佈，我們發現 16~21 分鐘與 XpsH-his₆ 蛋白的分佈相同，暗示此分子大小的 XpsJ 蛋白與 XpsH-his₆ 蛋白可能具有交互作用。另外比較圖五 b 的結果知道內生性的 XpsH 蛋白分佈在 19-21 分鐘，所以在 16~18 分鐘出現的分子可能是大量表現的 XpsJ XpsH-his₆ 蛋白發生聚集的結果，而 19~21 分鐘出現的分子則可能是同時包含 XpsJ XpsH-his₆ 及 XpsG 蛋白的複合體。由於在 soluble form 的分析中已知 XpsH-his₆ 蛋白會影響 XpsJ 蛋白的分佈，所以想了解 membrane form 的情形是否也相同。圖十四 b 的結果中看到，在完全不表現 XpsH 蛋白時 XpsJ 蛋白的濃度下降，所以其分佈與圖十四 a 並不能比較出差異；而 XpsG 蛋白在無 XpsH 蛋白的表現下其

分佈似乎較集中在 22、23、24 分鐘。總結圖十四的差異發現，XpsH-his₆ 蛋白似乎與形成 19~21 分鐘的 XpsJ、XpsH-his₆ 及 XpsG 蛋白複合體有關。

十三、以 Ni-NTA chromatography 分析過量表現 XpsH 蛋白對不可溶性 XpsJ-his₆ 蛋白與 XpsG 蛋白交互作用的影響

接著，利用 Ni-NTA chromatography 的實驗觀察 XpsH 蛋白對於 membrane form XpsJ-his₆ 與 XpsG 蛋白之間交互作用的影響。結果發現 membrane form (圖十五) 與 soluble form 相同(圖十三)，當大量的 membrane form XpsH 蛋白存在時，能夠幫助 XpsG-XpsH- XpsJ-his₆ 複合體的形成，故在 imidazole 洗出的部份可以觀察到 XpsH、XpsG 蛋白隨著 XpsJ-his₆ 蛋白被共同純化，而在 XpsH 蛋白完全不表現的菌株中則無法看到此現象。

十四、XpsH-his₆ 與 XpsJ 蛋白之間的交互作用

在圖十三及十五中觀察到 XpsH 蛋白能夠隨著 XpsJ-his₆ 蛋白而被 Ni-NTA 管柱所純化，表示 XpsH 蛋白與 XpsJ-his₆ 蛋白之間可能具有交互作用。而 XpsH 與 XpsJ 蛋白之間的交互作用是否需要 XpsG 蛋白的參與？為了解答這個問題，接著以 Ni-NTA chromatography 的實驗來觀察。實驗中以 1717(pFH-his, pBJ) 和 1713(pFH-his, pBJ) 菌株來對照 XpsG 蛋白的存在是否會影響

XpsH 蛋白與 XpsJ-his₆ 蛋白之間的交互作用。結果發現(圖十六), 不論是 soluble (a)或 membrane form (b)的 XpsJ 蛋白均會隨著 XpsH-his₆ 蛋白而一起被 Ni-NTA 管柱所純化, 而且不管在有沒有 XpsG 蛋白的存在下均不會影響此結果, 顯示著大量表現的 XpsJ 與 XpsH-his₆ 蛋白能夠藉由彼此的交互作用而形成複合體, 並且此複合體的形成並不需要 XpsG 蛋白的參與。

討論₃₂

為了想要探討 type II secretion pathway 中類纖毛蛋白，XpsG、H、J 之間的交互作用，首要工作便是確定所製備的抗體是否能專一性的辨認所要觀察的蛋白質。Anti-XpsG 的抗體是由孟訓學長製備並確認，而 anti-XpsH 及 XpsJ 的抗體則於本論文中確認其專一性。由圖二八的結果中看到：anti-XpsH 的抗體的確能夠專一性的辨認 XpsH 及 XpsH-his₆ 蛋白。而在圖二中 XC1701 無法偵測到 XpsH 蛋白的訊號有兩個可能原因：一是在 XC1701 中 XpsH 蛋白根本不表現；二則是 XpsH 蛋白在 XC1701 中表現太低所致。由於在 XC1717(?*xpsH* gene) 中觀察到其分泌 α -amylase 的能力喪失，顯示在 XC1701 中能夠表現具有功能的 XpsH 蛋白幫助 α -amylase 的分泌。故解釋圖二的結果可能是在 XC1701 中 XpsH 蛋白的濃度太低以致以 western blot 仍無法被偵測；而 anti-XpsJ 抗體雖然在圖八中只能辨認出 XpsJ 蛋白，而不能辨認出 XpsJ-his₆ 蛋白，但在圖十三以 XpsJ 抗體所作的 western 中可以看到，經由 Ni-NTA 管柱所大量純化的 XpsJ-his₆ 蛋白其分子量的確較 XpsJ 蛋白大，因此便可確認 anti-XpsJ 抗體的專一性。確定了 anti-XpsH 及 anti-XpsJ 抗體的專一性後，接著觀察十字花科黑腐病菌

中 XpsH 及 XpsJ 蛋白的表現。結果發現，相較於 XpsG 蛋白，內生性的 XpsH 及 XpsJ 蛋白在菌體中的濃度相當低，甚至於以 western blot 的方法仍無法偵測(圖二 lane1、圖八 lane 1)。1990 年的研究中發現，五種 pseudopilins PulG、H、I、J、K 當中，PulG 蛋白的表現量最高[27]；而在 type II pilus 的研究中顯示：type II pili 的結構主要是由細胞中含量最多的纖毛蛋白(major pilin)所組成[28]，不過其他含量較少(minor pilins)的纖毛蛋白對纖毛結構的形成也是必需的[29]。又根據 type II 分泌機制與 type II pilus 生成的相似性，所以推測在十字花科黑腐病菌中 XpsH 及 XpsJ 蛋白可能是屬於 minor pseudopilins，雖然它們在細胞中的表現量很低，但對於 type II secretion pathway 中類纖毛結構的形成卻扮演著不可或缺的角色；而 XpsG 蛋白則可能屬於 major pseudopilins 形成纖毛結構中的骨幹。

關於 XpsG、H、J 蛋白三者間的關係，從 gel filtration 結果發現，大量表現 XpsH-his₆ 蛋白時會發生 aggregation 的現象，可能是因為正常的生理情況下 XpsH 蛋白的需要量很少，一旦濃度大量升高時過多的蛋白彼此發生碰撞而導致聚集。另外由 XC1701 的結果知道，內生性的 XpsH 蛋白只出現在 20、21、22 分鐘並且與 XpsG 蛋白 co-fractionation，因此推論此時出現的 XpsH 及 XpsG 蛋白可能具有交互作用。接著再利用 Ni-NTA chromatography 的方法分析，結果發現

XpsG 蛋白能夠隨著 XpsH-his₆ 蛋白而被一起純化，證明 XpsH-his₆ 及 XpsG 蛋白可能藉由交互作用而產生複合體。

無論是利用 gel filtration 或是 Ni-NTA chromatography 的方法均可以觀察到 XpsH-his₆ 與 XpsG 蛋白存在著交互作用的事實（圖四、五、六）。同時觀察到在正常的生理情況下（XC1701）XpsG 蛋白可能具有 XpsG-XpsG 及 XpsG-XpsH 的複合體，因此推測 XpsG-XpsG 複合體可能為提供 XpsG 蛋白的 pool；而 XpsG-XpsH 複合體的形成可能在分泌的過程中扮演著一個重要的角色。

另外，由圖九的結果發現：大量表現的 XpsH-his₆ 蛋白可以穩定大量表現的 XpsJ 蛋白使其不易被降解。在單獨大量表現 XpsJ 蛋白時，雖其菌中含有以染色體表現的 XpsH 蛋白，但因其濃度極低故對於穩定大量的 XpsJ 蛋白作用不大，所以當 XpsJ 蛋白在細胞質中被大量合成時隨即就會快速的被降解，而這也暗示著過量表現的 XpsJ 蛋白可能大部份都不具有功能。從圖十一 gel filtration 的結果可知，大部份 soluble form 的 XpsJ 蛋白可能都是雙倍體，推測這些分子較小的 XpsJ 蛋白皆是透過質體大量表現的結果，使得濃度過高的 XpsJ 蛋白堆積在細胞質中。綜合以上的結果發現，大量表達的 XpsH-his₆ 及 XpsJ 蛋白大部份在細胞中會產生聚集的現象而不會與 XpsG 形成有功能的纖毛，對於胞外蛋白的分泌並也無增進效果，由此可進一步支持 XpsH

及 XpsJ 蛋白在細胞中可能是 minor pseudopilins 的角色。

接著在 gel filtration 的分析中發現：soluble form 的 XpsH-his₆ 蛋白能夠影響 XpsJ 蛋白在層析法下的分佈（圖十二）；而在 Ni-NTA chromatography 的結果中知道：XpsH 蛋白能夠幫助 XpsJ-his₆ 與 XpsG 蛋白的結合（圖十三、十五）。經由這些證據我們可以推論：XpsH 蛋白也許能夠分別與 XpsJ 蛋白及 XpsG 蛋白發生交互作用並因此促進 XpsJ 及 XpsG 蛋白之間的結合，而 XpsH 蛋白對於 XpsJ 蛋白及 XpsG 蛋白之間的結合可能扮演中間者的角色。

綜合前面的結果可以得到一個結論：大量表現的 XpsH 與 XpsJ 蛋白可能與 XpsG 蛋白發生作用而形成 XpsG-XpsH-XpsJ 複合體。而此複合體的形成原因可能有三種情形：a. XpsH 與 XpsJ 蛋白形成一個 XpsH-XpsJ 複合體，而此複合體可以藉由 XpsH 蛋白與 XpsG 蛋白發生作用而形成 XpsG-XpsH-XpsJ 複合體；b. XpsH 與 XpsG 蛋白會先形成 XpsG-XpsH 複合體，而 XpsJ 蛋白會與 XpsH-XpsG 複合體上的 XpsH 蛋白發生作用而產生 XpsG-XpsH-XpsJ 複合體；c. XpsH 蛋白會分別與 XpsG、J 蛋白形成 XpsH-XpsG 及 XpsH-XpsJ 複合體，而這兩種複合體再藉由 XpsH 蛋白間的作用而形成 XpsG-XpsH_n-XpsJ 複合體 (n?1)（圖十七）。另外在圖十四中可以知道，當大量表現 XpsH 與 XpsJ 蛋白時在菌體中可同時觀察到 XpsG-XpsH-XpsJ 及 XpsG-XpsG 的複

合體，推測在分泌胞外蛋白的過程中這兩種分子形式可能是必須的。

故解釋 XpsH 與 XpsJ 蛋白在生理上的功能與意義為：

a. 調控 XpsG 蛋白組裝成類纖毛結構

根據在細胞中蛋白濃度的比例，所以推測 XpsG 蛋白應為主要構成纖毛骨幹的 major pseudopilin，而 XpsH 與 XpsJ 蛋白則可能在 XpsG 蛋白在組成類纖毛的過程中提供必要的幫助，使其能夠組成正確的纖毛構形。雖然在 2000 年的研究中顯示：minor pseudopilin 中只有 Pull 對於 PulG pili 的組裝過程中是必需的 [25]，但在十字花科黑腐病菌中 XpsH 與 XpsJ 蛋白對於胞外蛋白的分泌是重要的。所以推測 XpsG 蛋白也許可以自行組裝成纖毛結構，但此結構可能並不完整而不具有功能，只有在 XpsH 與 XpsJ 蛋白的幫助下 XpsG 蛋白才能組裝成具有分泌功能的完整纖毛結構（圖十八 a）。

b. 是類纖毛結構中的重要零件

若 XpsG 蛋白為纖毛結構的主幹，則 XpsH 與 XpsJ 蛋白則可能是結合在主幹上的重要零件。當缺乏 XpsH 與 XpsJ 蛋白時，XpsG 蛋白骨幹則喪失推動胞外蛋白的能力（圖十八 b）。

c. 影響 XpsG 蛋白的構形

當 XpsH、XpsJ 蛋白與 XpsG 蛋白結合時可能會誘導 XpsG 蛋白的構形發生改變，所以可能在藉由 XpsH、XpsJ 蛋白與 XpsG 蛋白結合、

分離的過程而造成纖毛結構在構形上的轉換，並且藉助這樣構形上的變化而將胞外蛋白推送出去（圖十八 c）。

由於在 XC1701 中，內生性的 XpsH、XpsJ 蛋白含量很低，而本論文中以外送質體大量表現兩蛋白所觀察到的現象是否真能反應出菌株中真實的生理情況，未來仍需要以實驗更進一步的證明。

參考文獻

38

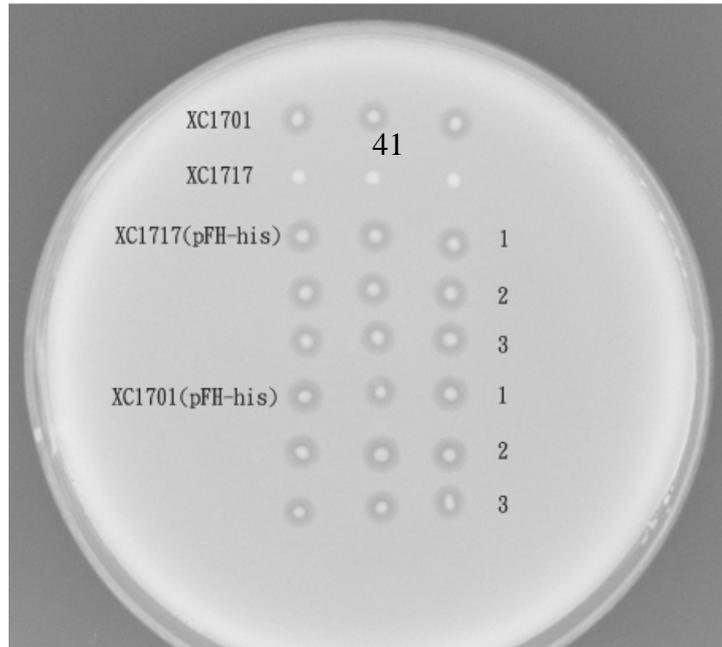
1. **Sandkvist, M.** (2001a) TypII secretion and pathogenesis. *Infect. Immun.* **69**: 3523-3535
2. **Sandkvist, M., Hough, L. P., Bagdasarian, M. M., and Bagdasarian, M.** (1999) Direct interaction of the EpsL and EpsM protein of the general secretion apparatus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **181**: 3129-3135
3. **Pugsley, A. P., O. Francetic, O. M. Possot, N. Sauvonnet, and K. R. Hardie.** 1997. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Gene* **192**: 13-19
4. **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
5. **Koster, M., Bitter, W., Tommassen J.** (2000) Protein secretion mechanism in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol.* **290**: 325-331
6. **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
7. **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.
8. **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.
9. **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
10. **Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A.,Cornelis, G. R., and**

Tomassen, 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

- 11. 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
- 12. Sandkvist, M.** (2001b) Biology of typII secretion. *Mol. Microbiol.* **40**: 271-283
- 13. 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.
- 14. 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
- 15. 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 areuginosa*. *J. Bacteriol.* **181**: 382-388.
- 16. Sandkvist, M., Bagdasarian, M., and Howard, S. P.** (2000) Characterzation of the multimeric Eps complex required for cholera toxin secretion. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 345-350
- 17. 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
- 18. 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
- 19. Pugsley, A. P. and Possot, O.** (1993) The general secretory pathway of *Klebsiella oxytoca*: no evidence for relocalization or assembly of pilin-like PulG protein into a multiprotein complex. *Mol. Microbiol.* **10**, 665-674
- 20. Hobbs, M. and Mattick, J. S.** (1993) Commom components in the assembly of

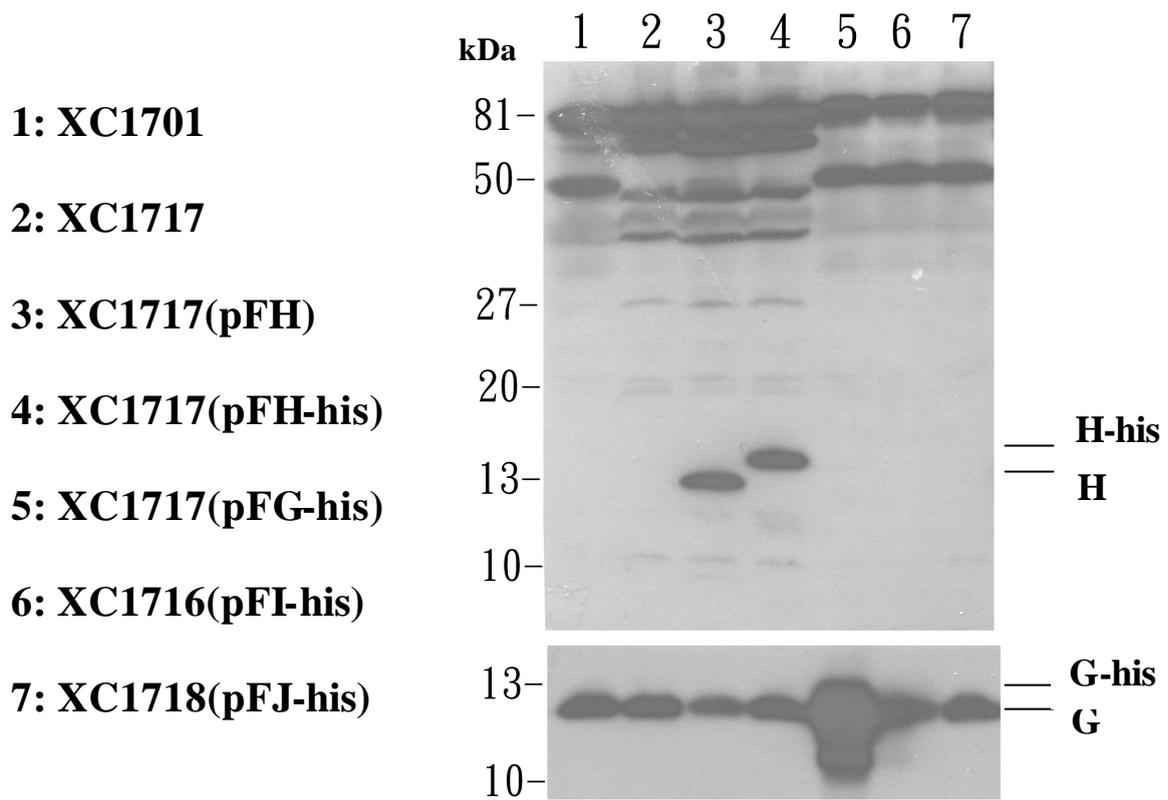
type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretin apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* **10**, 233-243

21. **Russel, M.** (1998) Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type ⁴⁰ protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* **279**, 485-499
22. **Fillous, A., Michel, G. and Bally, M.** (1998) GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 177-198
23. **Pugsley, A. P. and Dupuy, B.** (1992) An enzyme with type prepilin peptidase activity is required to process components of the general extracellular protein secretion pathway of *Klebsiella oxytoca*. *Mol. Microbiol.* **6**, 751-760
24. **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
25. **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
26. **Ni-T Hu, W-M Leu, M-S Lee, Avon Chen, S-C Chen, Y-L Song and L-Y Chen.** (2002) XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms pilus-like structure between cytoplasmic and outer membrane. *Biochem J.* **365**: 205-211
27. **Reyss, I and Pugsley, A. P.** (1990) Five addition genes in the *pulC-O* operon of the Gram-negative bacterium *Klebsiella pneumoniae* strain UNF5023, *Mol. Microbiol.* **4**: 59-72
28. **Parge, H. E. et al.** (1990) Biochemical purification and crystallographic characterization of the fiber-forming protein pilin from *Nisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **265**: 2278-2285
29. **Russel, M. M. and Darzins, A.** (1994) The pile gene of *Pseudomonas aeruginosa*, required for pilus biogenesis, shares amino acid sequence identity with the N-terminal of the type 4 prepilin proteins. *Mol. Microbiol.* **13**: 973-985



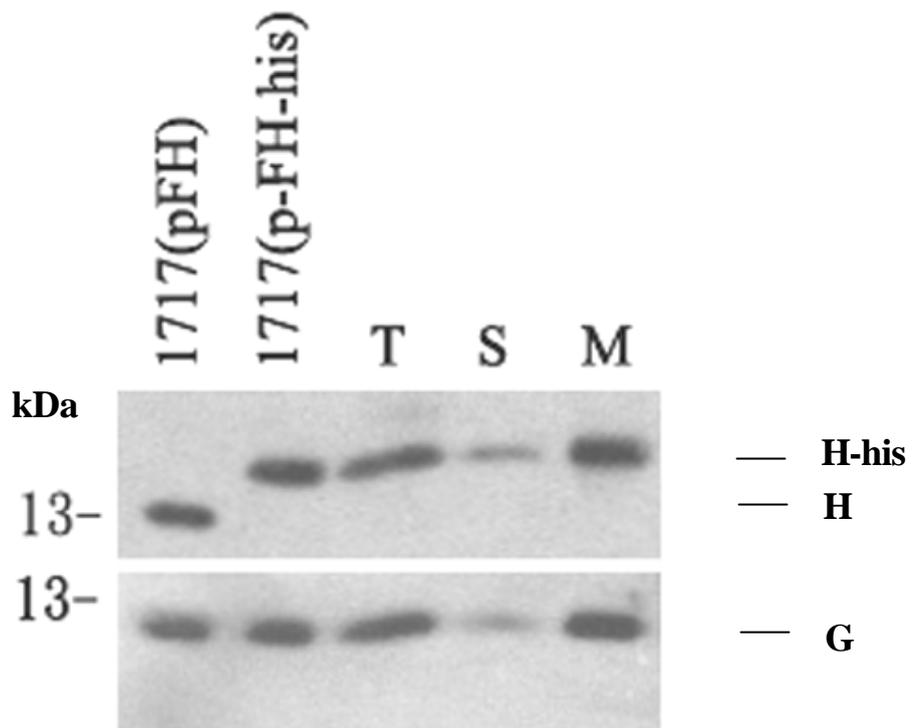
圖一：XC1717(pFH-his)及 XC1701(pFH-his)菌株之 α -amylase 活性及干擾測試

將少量的 XC1717(pFH-his)及 XC1701(pFH-his)菌點在含有澱粉的培養基上於 30 培養過夜，並同時以 XC1701 為陽性對照組，以 XC1717 為陰性照組。圖中產生暈圈代表具有分泌 α -amylase 的活性。XC1701：wild type；XC1717：knockout *xpsH* gene。



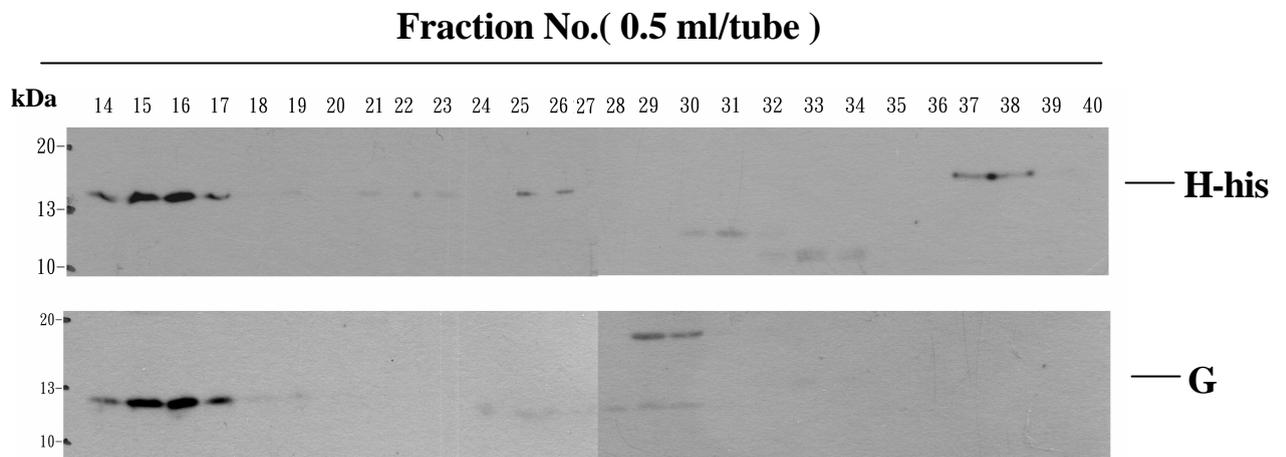
圖二：觀察十字花科黑腐病菌中 XpsH 蛋白的表現

將想要觀察的菌株以小量 (2 ml) 於 30 培養至 OD₆₀₀ 約 1.0 , 取 100 μl 以 12000 rpm 離心 5 分鐘去上清液 , 將 pellet 以 10 μ l sample buffer 回溶 , 以 SDS PAGE 及 western 分析。



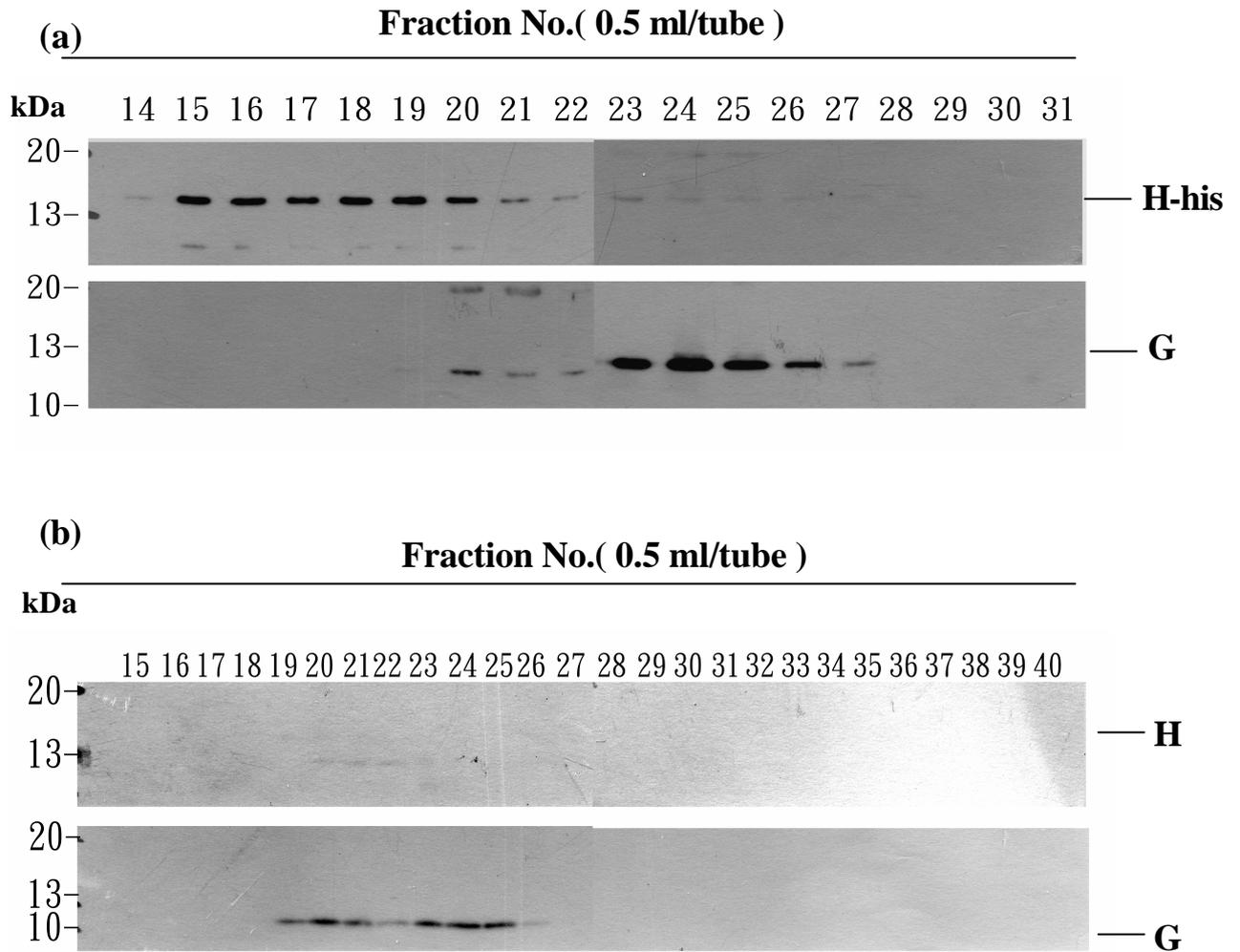
圖三：觀察 XpsH 蛋白在胞內的分佈

培養 200 ml 的 1717 (pFH-his) 菌株至 OD_{600} 約 1.0 後收菌，並經二次水洗二次，以 French press 破菌後去除未破細胞，再以 56000 rpm 離心 1 小時。所得的 membrane 以 2% Triton X-100 於 4 萃取 2 小時後，以 30000 rpm 離心 1 小時取上清液為膜蛋白萃取液。將等菌量(約 OD_{600} 1,100 μ l)的 soluble 及 membrane extract 以 SDS PAGE 和 western 分析。T: total lysate ; S : soluble ; M : membrane。



圖四：可溶性 XpsH-his₆ 蛋白分子特性的分析

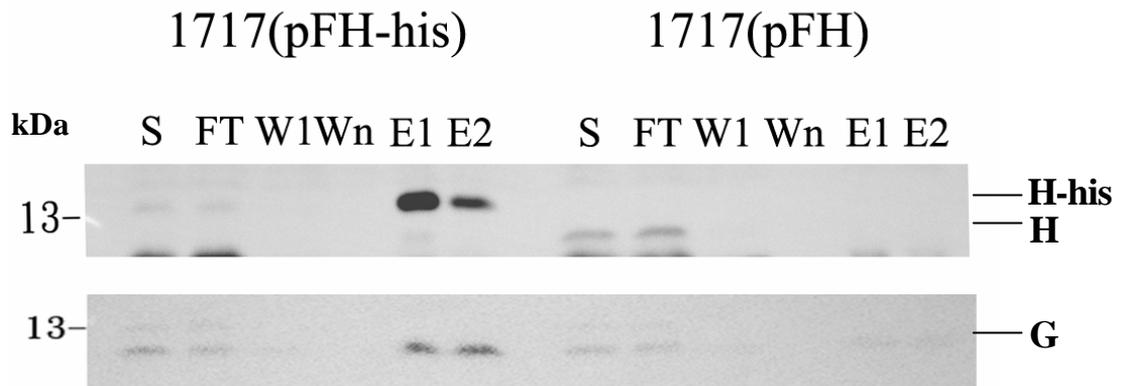
將 200 ml 1717 (pFH-his) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後所的上清液取 250 μ l 通過 Superdex HR200 膠層過濾管柱，以每分鐘 0.5 ml 的流速每分鐘收集一管，收集 14~40 分鐘的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。



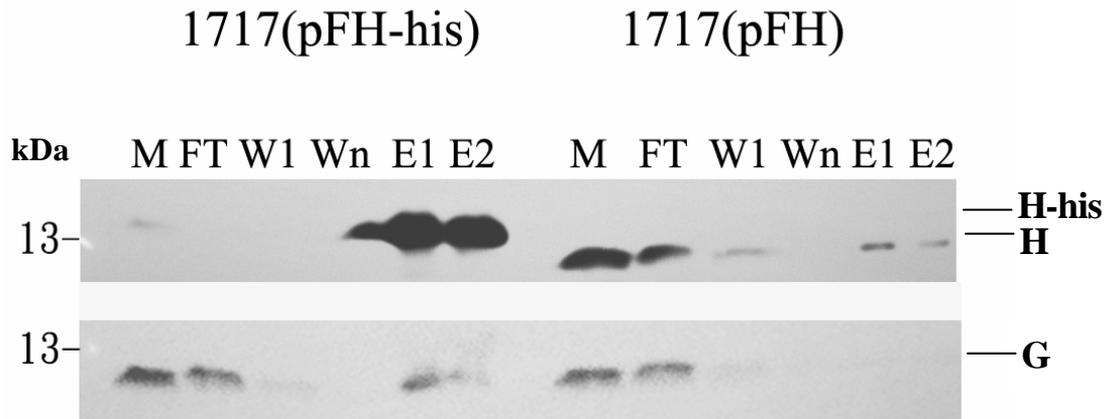
圖五：不可溶性 XpsH-his₆ 蛋白分子特性的分析

將 200 ml XC1701 及 1717 (pFH-his) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後去上清液取 membrane 以 2% Triton X-100 於 4 °C 萃取 2 小時後,以 30000 rpm 離心 1 小時, 取上清液 250 μ l 通過 Superdex HR200 膠層過濾管柱, 以每分鐘 0.5 ml 的流速每分鐘收集一管, 收集 14~40 分鐘的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。(a) : XC1717 (pFH-his); (b) : XC1701

(a)

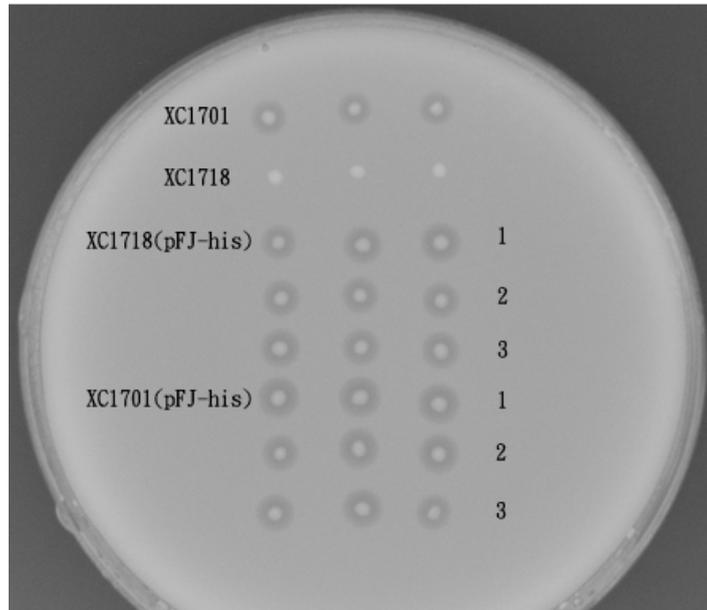


(b)



圖六：以 Ni-NTA chromatography 分析 XpsH-his₆ 與 XpsG 蛋白之間的交互作用

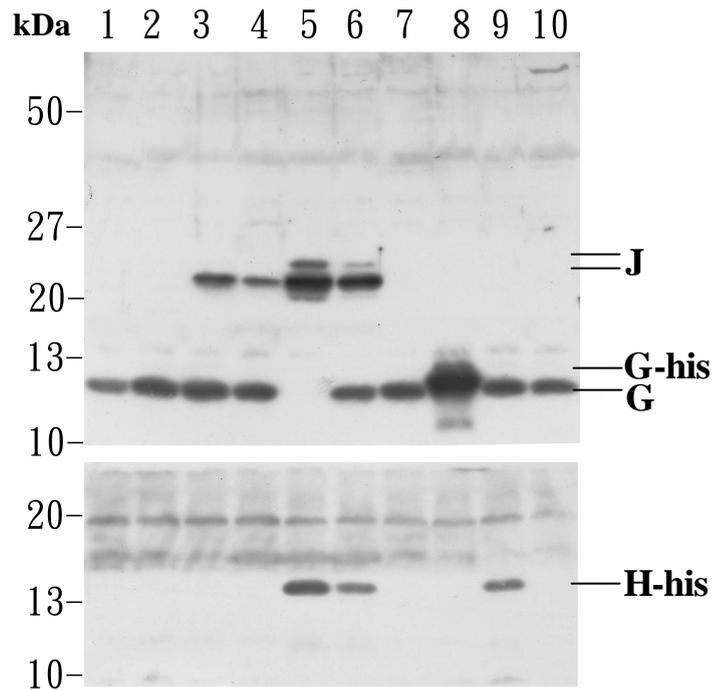
將 400 ml 1717 (pFH) 及 1717 (pFH-his) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後所得的上清液及膜蛋白萃取液分別通過 Ni -NTA 管柱並收集 flow through(FT) , 再以 25 mM imidazole buffer 清洗 50 ml 並收集清洗的第 1 ml(W1)及最後 1 ml(Wn) , 最後以 2 ml 500 mM imidazole buffer 洗出(E1 , E2) 。 所得的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。(a) : soluble form ; (b) : membrane form



圖七：XC1718(pFJ-his)及 XC1701(pFJ-his)菌株之 α -amylase 活性及干擾測試

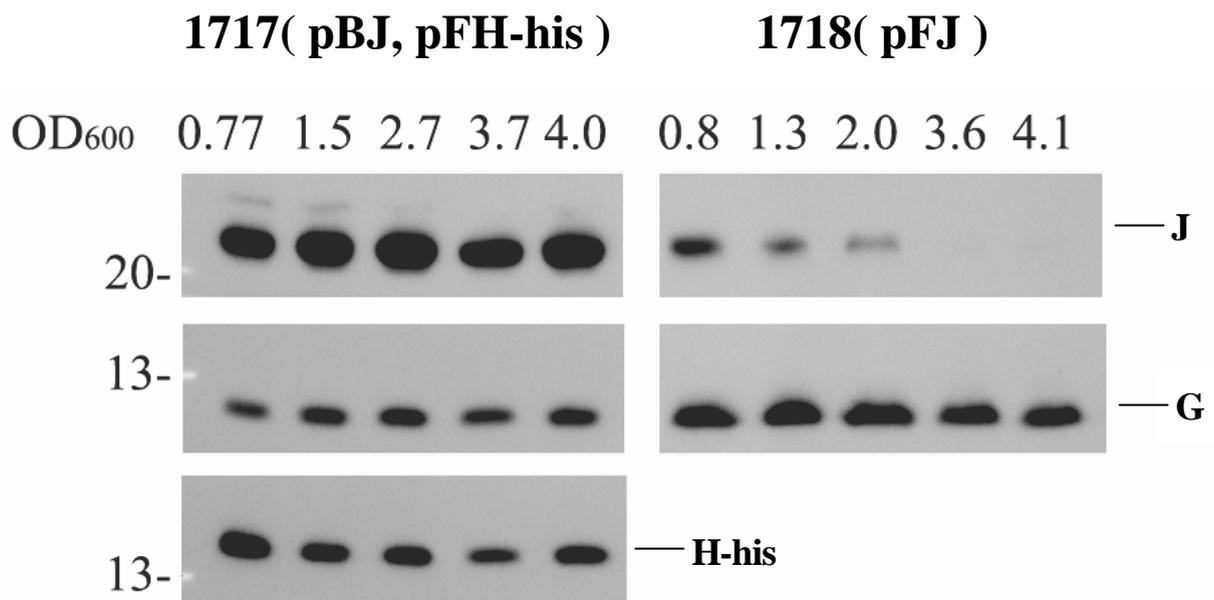
將少量的 XC1718(pFJ-his)及 XC1701(pFJ-his)菌點在含有澱粉的培養基上於 30 培養過夜，並同時以 XC1701 為陽性對照組，以 XC1718 為陰性照組。圖中產生暈圈代表具有分泌 α -amylase 的活性。XC1701 : wild type ; XC1718 : knockout *xpsJ* gene。

- 1: XC1701
- 2: XC1718
- 3: XC1718(pFJ)
- 4: XC1718(pBJ)
- 5: XC1713(pBJ, pFH-his)
- 6: XC1717(pBJ, pFH-his)
- 7: XC1718(pFJ-his)
- 8: XC1713(pFG-his)
- 9: XC1717(pFH-his)
- 10: XC1716(pFI-his)



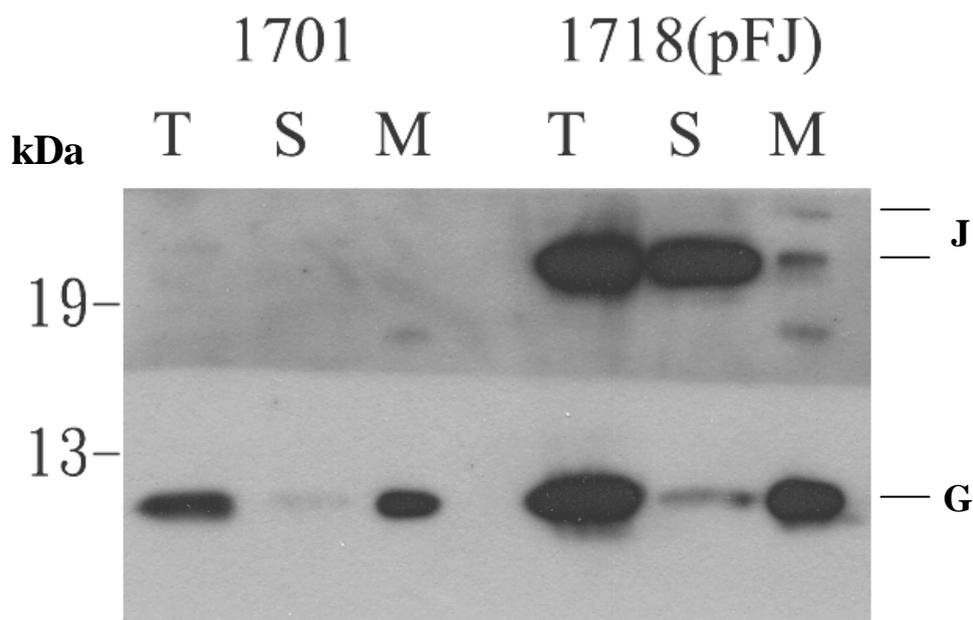
圖八：觀察十字花科黑腐病菌中 XpsJ 蛋白的表現

將想要觀察的菌株以小量 (2 ml) 於 30 °C 培養至 OD₆₀₀ 約 1.0 , 取 100 μl 以 12000 rpm 離心 5 分鐘去上清液 , 將 pellet 以 10 μl sample buffer 回溶 , 以 SDS PAGE 及 western 分析。



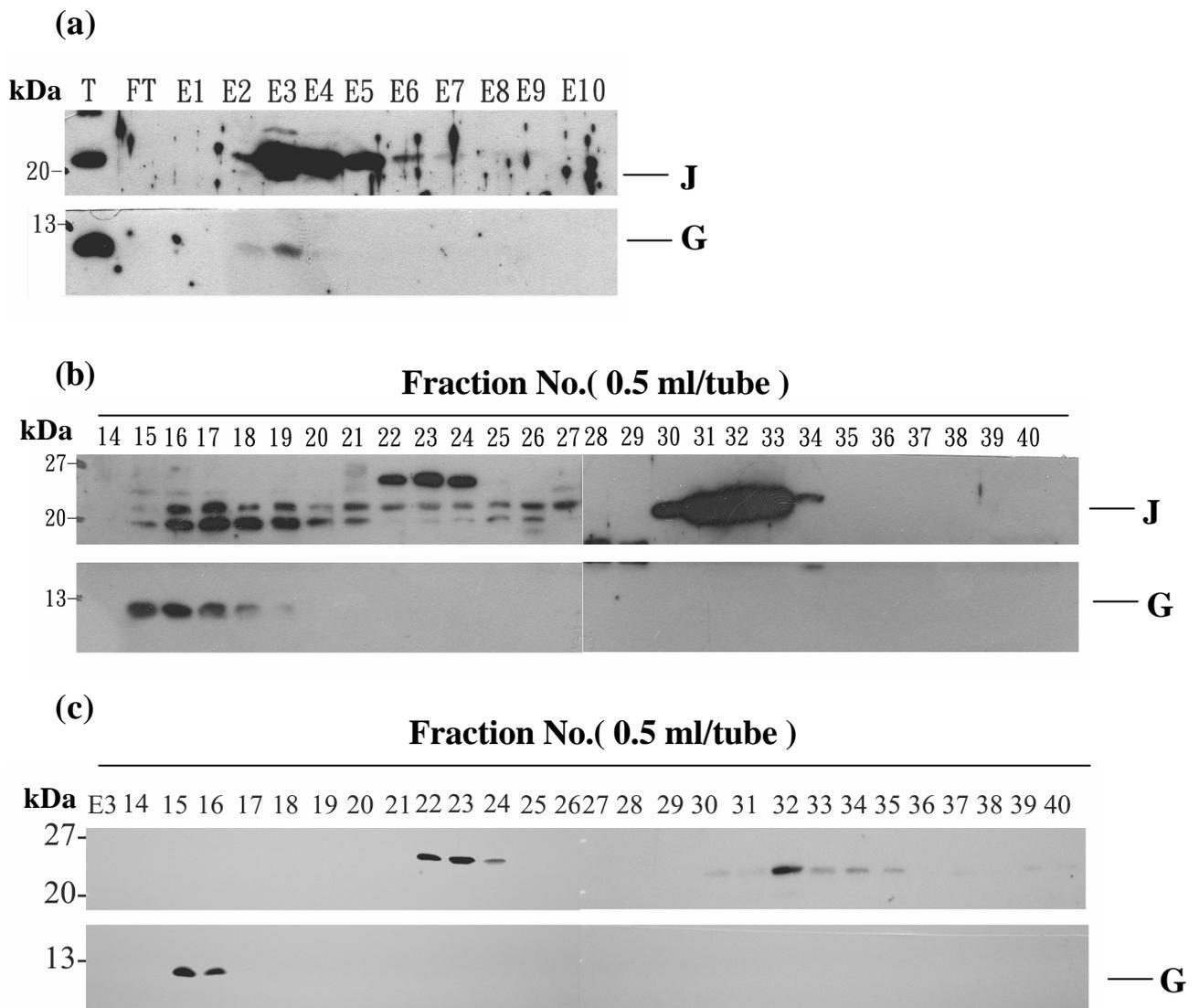
圖九：觀察 XpsH-his₆ 蛋白對 XpsJ 蛋白穩定度的影響

將 1717(pFH-his,pBJ)以及 1718(pFJ)菌株同時培養於 2 ml 的 LB 中，分別於不同的 OD₆₀₀ 值收菌並加入 sample buffer，接著以 SDS PAGE 與 western 來觀察。



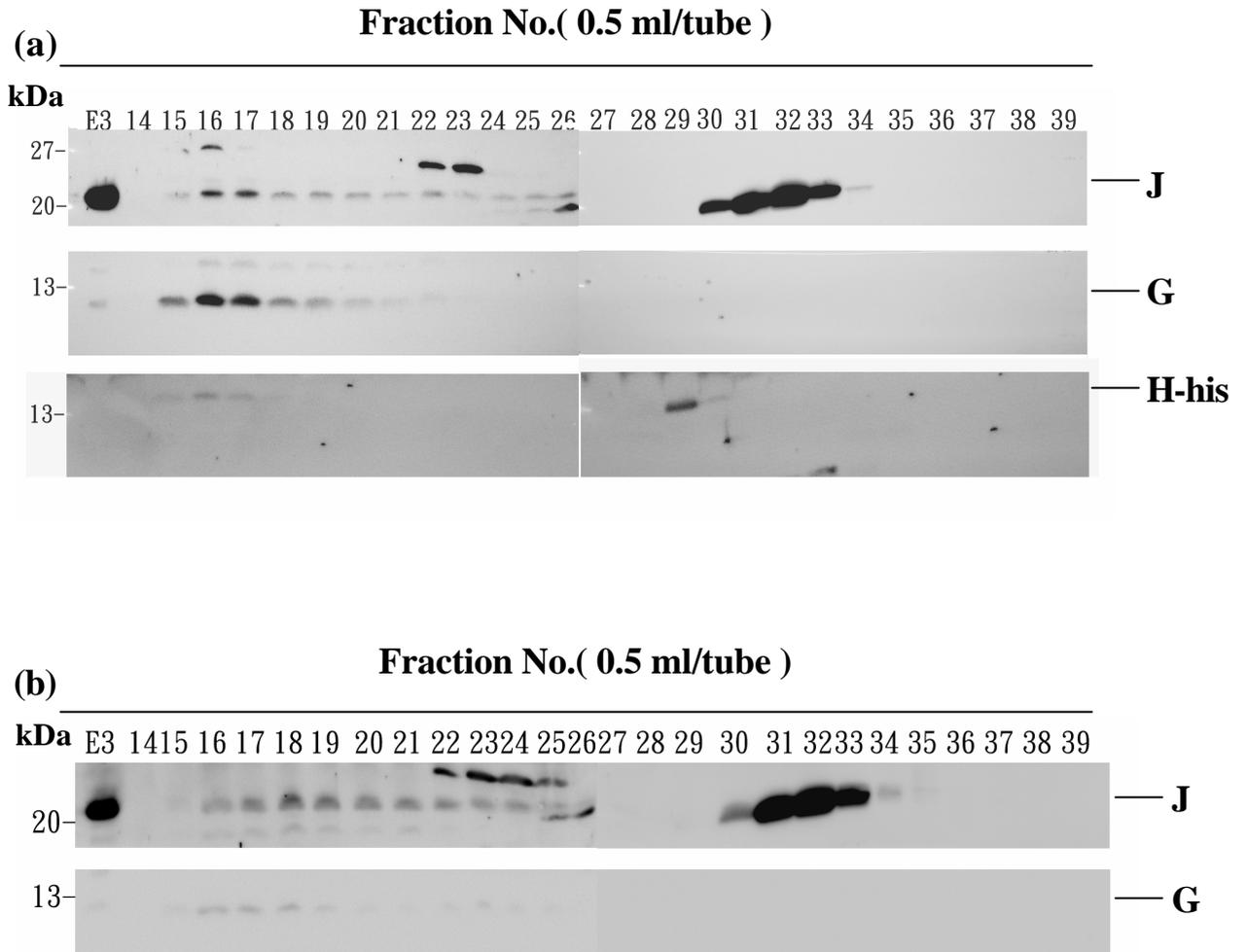
圖十：觀察 XpsJ 蛋白在胞內的分佈

培養 200 ml 的 XC1701 及 1718 (pFJ) 菌株至 OD_{600} 約 1.0 後收菌，並經二次水洗二次，以 French press 破菌後去除未破細胞，再以 56000 rpm 離心 1 小時。所得的 membrane 以 2% Triton X-100 於 4 萃取 2 小時後，以 30000 rpm 離心 1 小時取上清液為膜蛋白萃取液。將等菌量的 soluble 及 membrane extract 以 SDS PAGE 和 western 分析。T: total lysate ; S: soluble ; M: membrane。



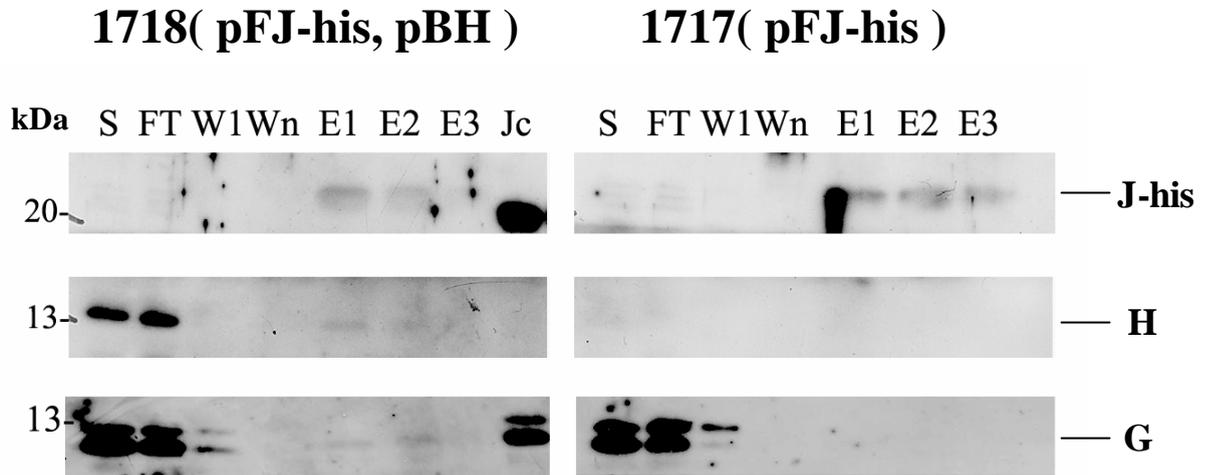
圖十一：可溶性 XpsJ 蛋白分子特性的分析

將 200 ml XC1718 及 1718 (pFJ) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後所的上清液先過 DE52 陰離子管柱初步純化 (a)。將純化後所得的 E3 取 250 μ l 通過 Superdex HR200 膠層過濾管柱，以每分鐘 0.5 ml 的流速每分鐘收集一管，收集 14~40 分鐘的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。 (a) : DE52 陰離子管柱初步純化，T: total lysate ; FT: flow through ; E : elute。 (b) : XC1718 (pFJ) ; (c) : XC1718



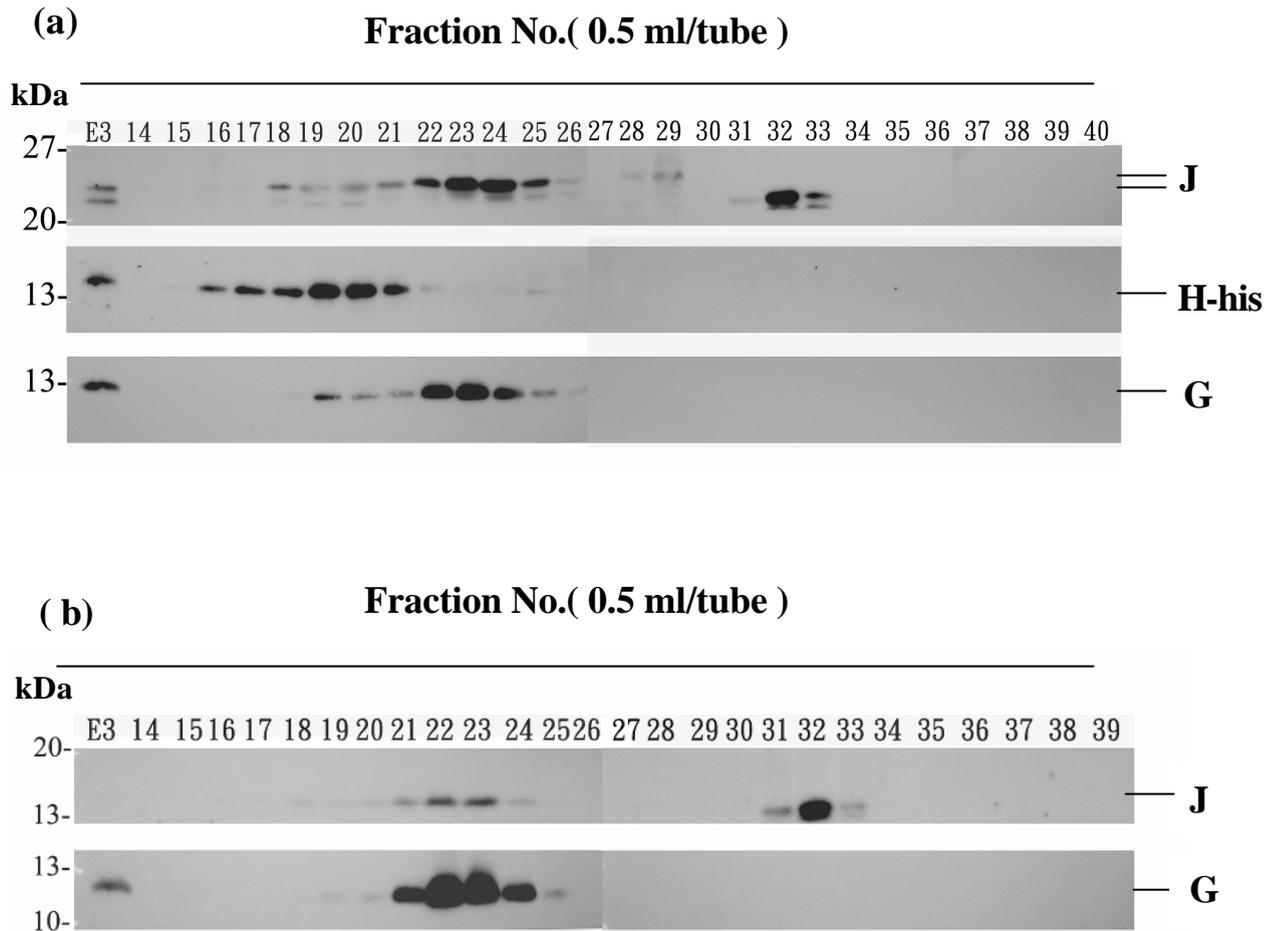
圖十二：過量表現可溶性 XpsH-his₆ 蛋白對 XpsJ 蛋白在膠層過濾層析法下分佈的影響

將 200 ml 1717 (pFH-his, pBJ) 及 1717 (pFJ) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後所的上清液先經過 DE52 陰離子管柱初步純化。將純化後所得的 E3 取 250 μ l 通過 Superdex HR200 膠層過濾管柱，以每分鐘 0.5 ml 的流速每分鐘收集一管，收集 14~40 分鐘的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。
 (a) : 1717 (pFH-his, pBJ); (b) : 1717 (pFJ)



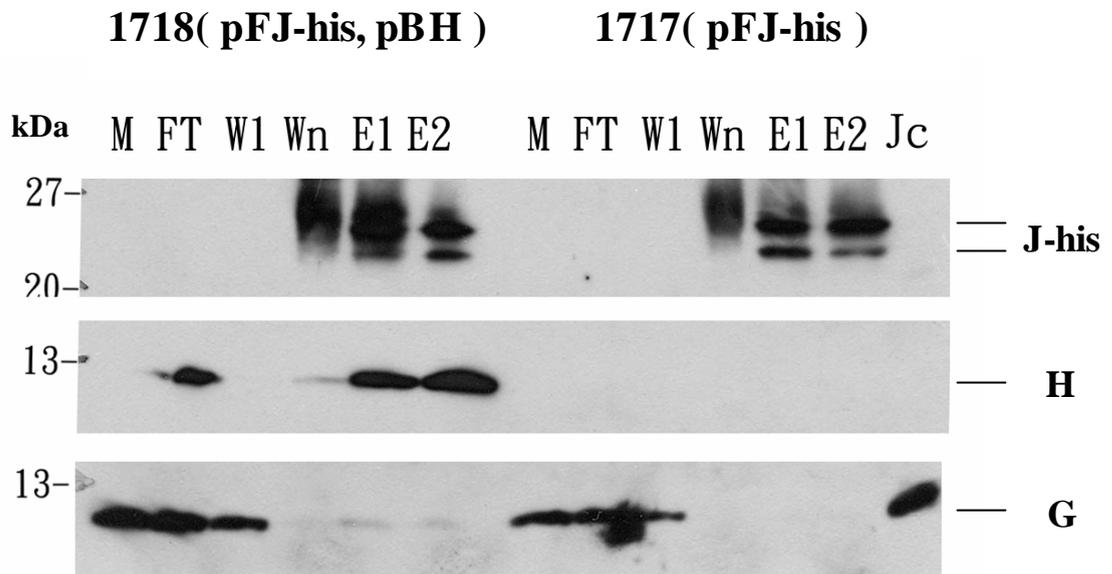
圖十三：以 Ni-NTA chromatography 分析過量表現可溶性 XpsH 蛋白對 XpsJ-his6 蛋白與 XpsG 蛋白交互作用的影響

將 400 ml 1718 (pFJ-his, pBH) 及 1717 (pFJ-his) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後所得的上清液分別通過 Ni-NTA 管柱並收集 flow through(FT) , 再以 25 mM imidazole buffer 清洗 50 ml 並收集清洗的第 1 ml(W1)及最後 1 ml(Wn) , 最後以 2 ml 500 mM imidazole buffer 洗出(E1 , E2) 。 所得的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。



圖十四：過量表現不可溶性 XpsH-his₆ 蛋白對 XpsJ 蛋白在膠層過濾層析法下分佈的影響

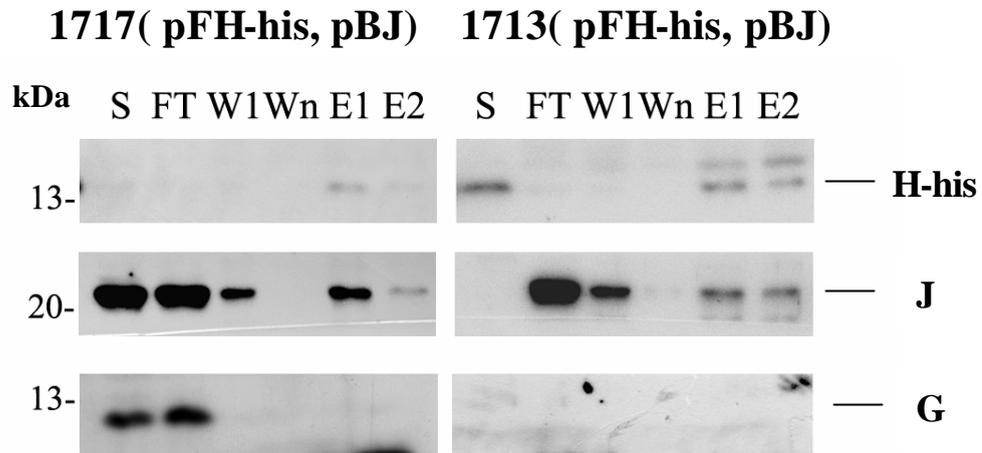
將 200 ml 1717 (pFH-his, pBJ) 及 1717 (pFJ) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後去上清液取 membrane 以 2% Triton X-100 於 4 °C 萃取 2 小時後，以 30000 rpm 離心 1 小時，取上清液先經過 DE52 陰離子管柱初步純化。將純化後所得的 E3 取 250 μ l 通過 Superdex HR200 膠層過濾管柱，以每分鐘 0.5 ml 的流速每分鐘收集一管，收集 14~40 分鐘的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。(a)：1717 (pFH-his, pBJ); (b)：1717 (pFJ)



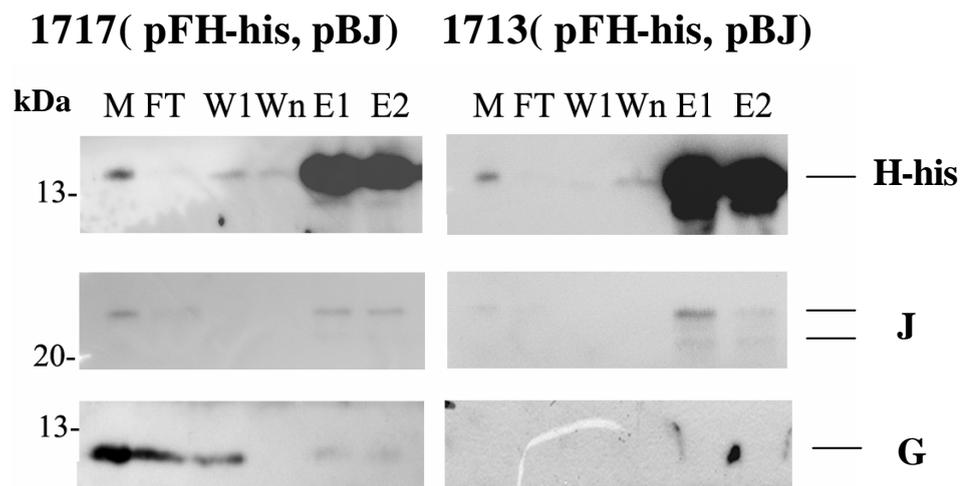
圖十五：以 Ni-NTA chromatography 分析過量表現不可溶性 XpsH 蛋白對 XpsJ-his₆ 蛋白與 XpsG 蛋白交互作用的影響

將 400 ml 1718 (pFJ-his, pBH) 及 1717(pFJ-his) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後所得的膜蛋白萃取液分別通過 Ni-NTA 管柱並收集 flow through (FT)，再以 25 mM imidazole buffer 清洗 50 ml 並收集清洗的第 1 ml(W1)及最後 1 ml(Wn)，最後以 2 ml 500 mM imidazole buffer 洗出(E1, E2)。所得的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。

(a)



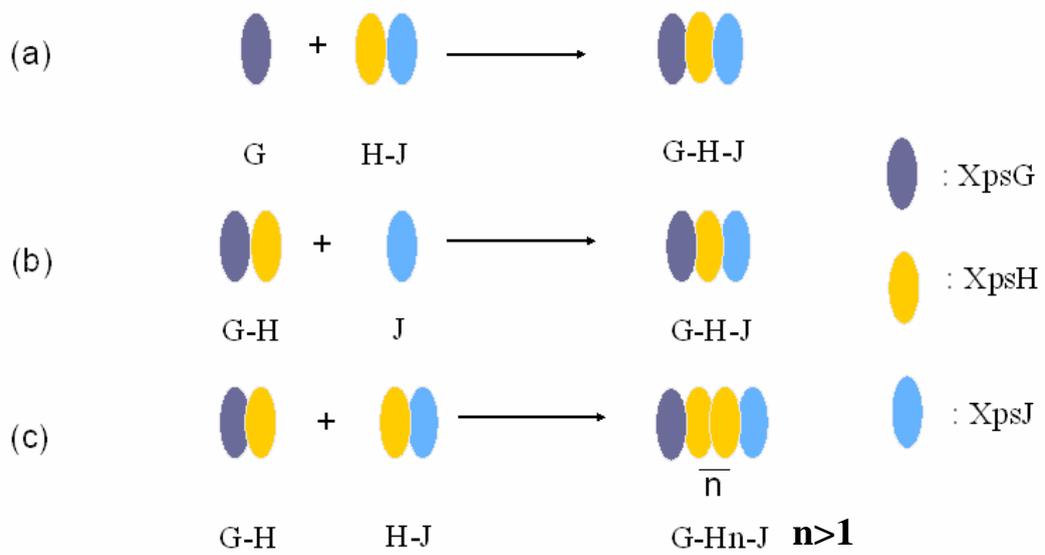
(b)



圖十六：以 Ni-NTA chromatography 分析 XpsH-his₆ 與 XpsJ 蛋白之間的交互作用

將 400 ml 1717 (pFH-his, pBJ) 及 1713 (pFH-his, pBJ) 菌株經破菌及 56000 rpm 離心後所得的上清液及膜蛋白萃取液分別通過 Ni-NTA 管柱並收集 flow through(FT) , 再以 25 mM imidazole buffer 清洗 50 ml 並收集清洗的第 1 ml(W1)及最後 1 ml(Wn) , 最後以 2 ml 500 mM imidazole buffer 洗出 (E1 , E2) 。 所得的 sample 以 SDS PAGE 及 western 分析。 (a) : soluble form ; (b) : membrane form。

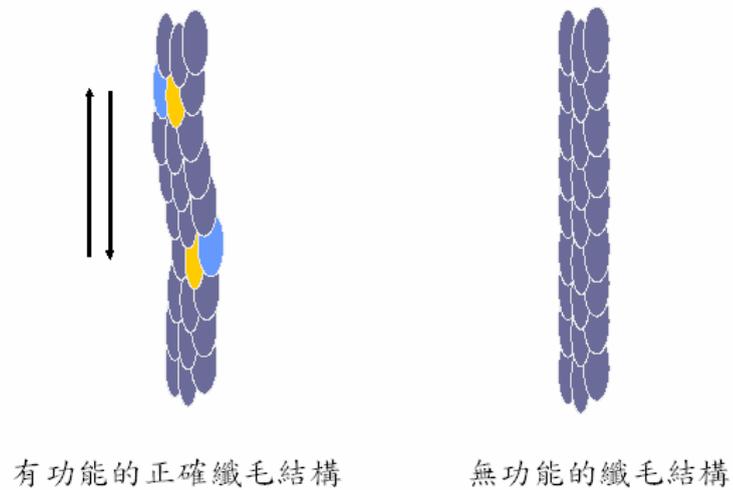
推測XpsG、H、J三者的關係可能為：



圖十七：XpsG、H、J蛋白結合關係想像示意圖

推測XpsH、J的生理功能為：

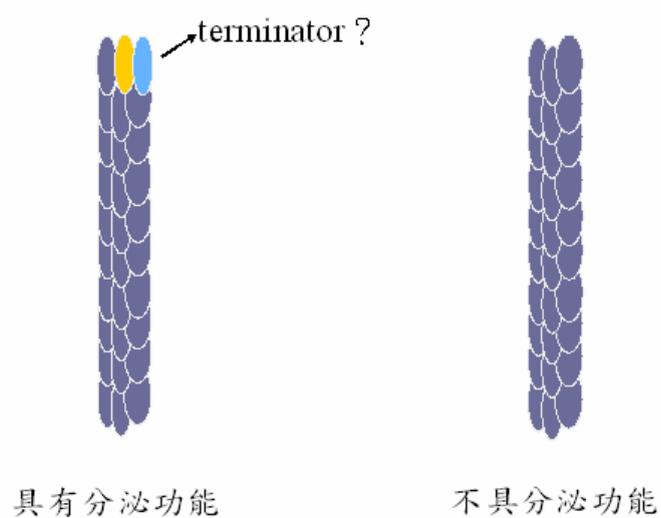
a. 調控XpsG蛋白組裝成具有功能的正確類纖毛結構



圖十八：XpsH、J 蛋白生理功能推想圖

(a): XpsG 蛋白可能構成纖毛主要骨幹，而 XpsH 與 XpsJ 蛋白則可能在 XpsG 蛋白在組成類纖毛的過程中提供必要的幫助，使其能夠組成正確的纖毛構形。

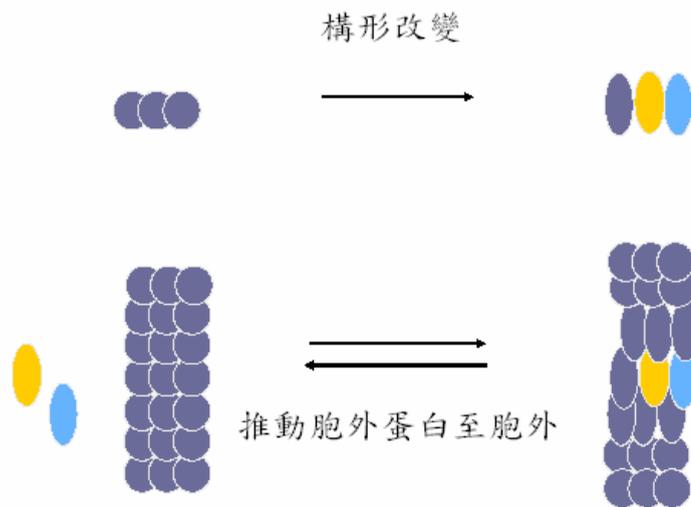
b. 是類纖毛結構中的重要零件



圖十八：XpsH、J 蛋白生理功能推想圖

(b): XpsH 與 XpsJ 蛋白可能是結合在纖毛主幹上的重要零件。當缺乏 XpsH 與 XpsJ 蛋白時，XpsG 蛋白骨幹則喪失推動胞外蛋白的能力。

c. 影響 XpsG 蛋白的構形



圖十八：XpsH、J 蛋白生理功能推想圖

(c): XpsH、XpsJ 蛋白與 XpsG 蛋白結合時可能會誘導 XpsG 蛋白的構形發生改變，藉由 XpsH、XpsJ 蛋白與 XpsG 蛋白結合、分離的過程造成纖毛結構在構形上的轉換，而這樣構形上的變化使得胞外蛋白推送出去。

附錄 1：構築重組質體所需的 primer

PSB primer : (5' 3') CCC AAT ACG CAA ACC GCC TCT

XpsH-(his)₆ : (5' 3') CAC TTG CTC GAG TGG CGC TGG CGT CCG CAG

XpsJ-(his)₆ : (5' 3') CAC TTG CTC GAG TTG CGC CAC GGC TCC ACC

附錄 2:菌種與質體

| strain | Relevant characteristics | Source/Reference |
|---|--|--|
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5 | F ⁻ 80 <i>dlacZ</i> ΔM15 <i>recAI endAI</i> <i>gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>supE44 relAI deoRA</i> (<i>lacZYA-argF</i>)U169 | Hanahan(1993) |
| JM109 | <i>endAI relAI gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>relAI supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) (F ⁺ <i>traD36 pro AB lacI</i> ^{qZ} ΔM15) | Yanisch-perron <i>et al.</i> (1985) |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i> | | |
| XC1701 | Rif ^r | Hu <i>et al.</i> (1992a). |
| XC1713 | XpsG ⁻ Rif ^r | Lee, Meng-Shiunn |
| XC1717 | XpsH ⁻ Rif ^r | Hu <i>et al.</i> |
| XC1716 | XpsI ⁻ Rif ^r | Hu <i>et al.</i> |
| XC1718 | XpsJ ⁻ Rif ^r | Hu <i>et al.</i> |
| XC1717(pFH) | XpsH ⁺ Rif ^r | Hu <i>et al.</i> |
| XC1718(pFJ) | XpsJ ⁺ Rif ^r | Hu <i>et al.</i> |
| XC1718(pBJ) | XpsJ ⁺ Gm ^r | this study <i>l</i> |
| XC1713(pFG-his) | XpsG-his ⁺ Rif ^r | S.-C.,Chen |
| XC1717(pFH-his) | XpsH-his ⁺ Rif ^r | this study |
| XC1716(pFI-his) | XpsI-his ⁺ Rif ^r | S.-C.,Chen |
| XC1718(pFJ-his) | XpsJ-his ⁺ Rif ^r | this study |
| XC1717(pFH-his,pBJ) | XpsH-his ⁺ · XpsJ ⁺ Rif ^r Gm ^r | this study |
| XC1718(pFJ-his,pBH) | XpsJ-his ⁺ · XpsH ⁺ Rif ^r Gm ^r | this study |
| Plasmid | | |
| pCPP30 | Tc ^r , clone vector of XC, Tra ⁻ Mod ⁺ 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 |
| pCPP30-J | <i>xpsJ</i> fragment subcloned in pCPP30 | Hu <i>et al.</i> |
| pCPP30-H-his | <i>xpsH-his</i> fragment subcloned in pCPP30 | this study |
| pCPP30-J-his | <i>xpsJ-his</i> fragment subcloned in pCPP30 | this study |
| pBBR1MCS-5 | Gm ^r , clone vector of XC | Hu <i>et al.</i> |
| pBBR1MCS-5-H | <i>xpsH</i> fragment subcloned in pBBR1MCS-5 | this study |
| pBBR1MCS-5-J | <i>xpsJ</i> fragment subcloned in pBBR1MCS-5 | this study |

附錄 3:培養基與抗生素製備

LB 液體培養基: 25g LB Broth (*MO BIO*)

add D.II water to 1L, autoclave immediately

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

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_2HPO_4 0.35g

KH_2PO_4 0.1g

$(NH_4)_2SO_4$ 0.5g

$MnCl_2$ 0.0005g

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05g

potato starch 10g ,add D.II water to 250ml boiling,
autoclaved

(c) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005g, add D.II water to 10ml,

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

抗生素

Ampicilin (Amp)

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

Working: 35-50 μ g/ml

Kanamycin (Km)

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

Working: 50 μ g/ml

Tetracyclin (Tc)

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

Working: 12.5-15 μ g/ml

Rifampicin (Rif)

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

Working: 1mg/100 ml

Gentamycin(Gm)

Stock: 10 mg/ml in D.II water, passed through 0.22 μ m filter, stored at 4

Working: 10 μ g /100 ml

附錄 4: 試劑與緩衝溶液的製備

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

Blocking buffer: add 3 g non-fat milk powder to 50 ml TBS buffer

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。

