

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 十字花科黑腐病菌聚量感應誘發致病因子之機制研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2317-B-468-001-  
執行期間：95年01月01日至95年12月31日  
執行單位：亞洲大學生物科技與生物資訊學系

計畫主持人：胡若梅

計畫參與人員：碩士級-專任助理：盧俊達  
碩士班研究生-兼任助理：蕭盈如

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96年02月26日

# 國科會專題研究計畫成果報告

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

計畫名稱：十字花科黑腐病菌聚量感應誘發致病因子之機制研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC — 2317 — B — 468 — 002 —

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

計畫主持人：胡若梅助理教授

共同主持人：

計畫參與人員：盧俊達專任碩士助理、蕭盈如碩士兼任助理

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：亞洲大學 生物科技與生物資訊學系

中 華 民 國 96 年 2 月 26 日

## 壹、基本資料

計畫編號	95N-0305	經費來源	國科會
計畫主持人	胡若梅	執行單位	亞洲大學
計畫名稱	字花科黑腐病菌聚量感應誘發致病因子之機制研究		
目標產業別	農業有機化的生產規範及關鍵技術之整合		
執行全期	95年 1 月 1 日 ~ 95 年 12 月 31 日		

## 貳、工作進度甘梯圖

工作項目	95年度												備註
	第1月	第2月	第3月	第4月	第5月	第6月	第7月	第8月	第9月	第10月	第11月	第12月	
構築 Xcc <i>rpfC</i> 和 <i>rpfG</i> 的突變株	■	■	■										
測試 <i>rpfC</i> 和 <i>rpfG</i> 突變株在 EPS 與胞外酵素生成與分泌的情形		■	■	■									
建立簡易的細菌致病基因表現偵測模式	■	■	■	■	■	■	■	■					
測試 EPS 生成相關基因在 <i>rpfF</i> 、 <i>rpfC</i> 和 <i>rpfG</i> 突變株的表現情形				■	■	■	■	■					
測試 EPS 生成相關基因在細菌感染狀態的表現情形								■	■	■	■	■	
測試胞外酵素生成相關基因在 <i>rpfF</i> 、 <i>rpfC</i> 和 <i>rpfG</i> 突變株的表現情形				■	■	■	■	■					
測試胞外酵素生成相關基因在細菌感染狀態的表現情形								■	■	■	■	■	
預定進度累計百分比	10%	15%	20%	30%	40%	50%	65%	75%	80%	90%	95%	100%	

## 參、進度報告

➤ 計畫摘要及目標	十字花科黑腐病菌 (Xcc) 是造成十字花科植物黑腐病的病原菌。由先前研究得知其主要致病因子的產生是受到一種細胞外擴散性訊息因子 DSF 的調控。只要能有效的抑制這條活化的管道即可有效的抑制 Xcc 致病性。本計劃將以尋找拮抗此訊息因子活性的分子為研究目標，期待能有效的控制十字花科植物黑腐病。減少農業損失。		
➤ 全程預定進度 (多年期請分年陳述)	確認聚量感應在細菌獨立生存以及感染狀態下對致病因子表現的調控角色。		
➤ 實際進度			
至95年 3月止	<input type="checkbox"/> 超前	<input checked="" type="checkbox"/> 符合	<input type="checkbox"/> 落後，請說明原因：
至95年 7月止	<input type="checkbox"/> 超前	<input checked="" type="checkbox"/> 符合	<input type="checkbox"/> 落後，請說明原因：
至95年12月止	<input type="checkbox"/> 超前	<input type="checkbox"/> 符合	<input type="checkbox"/> 落後，請說明原因：

➤ 執行成果約250字內，條列式為佳	
至95年 3月止	已完成Xc17 <i>rpfC</i> 和 <i>rpfG</i> 的突變株之構築(圖一)。並且做初步之基因功能之測定。而以螢光為基礎之簡易的細菌致病基因表現偵測模式也正在進行中。
至95年 7月止	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 確認所有突變株之正確性並仔細重複<i>rpfB</i>、<i>rpfC</i>、<i>rpfG</i>和<i>rpfF</i>基因突變對於致病性(圖二)、胞外黏多醣分泌、胞外酵素(如蛋白酶、澱粉酶及纖維素酶)的分泌之影響(圖三)。</li> <li>2. 確認<i>rpfC</i>、<i>rpfG</i>和<i>rpfF</i>基因突變株會喪失致病。但是<i>rpfB</i>突變株仍具有致病能力。<i>rpf</i>基因突變對EPS生成的影響除了<i>rpfF</i>突變株外，在LB 上並不明顯。但在貧乏培養基上，<i>rpf</i>突變株的EPS產量均大幅下降。蛋白酶的表現嚴重的受<i>rpf</i>突變的影響，澱粉酶及纖維素酶基因表現也顯示出受<i>rpf</i>基因不同程度的正調控。<i>rpfB</i>突變對各種胞外酵素的影響較弱。</li> <li>3. 構築螢光/酵素雙報導基因之啟動子活性測量系統(圖四)。</li> </ol>
至95年12月止	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 觀察<i>rpf</i>系列突變株之生長狀況，測量生長曲線，發現在LB培養基中，突變株生長與野生株無異。在有無添加2% 白菜汁之XOLN培養基中測試發現，<i>rpfB</i>與<i>rpfF</i>突變株生長較緩，其餘菌株則與野生株無異。加入白菜汁不影響生長。</li> <li>2. 利用電子顯微鏡觀察<i>rpf</i>突變株菌體之外型，結果顯示<i>rpfF</i> 和 <i>rpfC</i>突變株不具鞭毛結構，但是<i>rpfB</i> 和 <i>rpfG</i>突變株仍保有鞭毛結構。</li> <li>3. <i>prtI</i>基因啟動子區域被選殖到pFY13-9 使其與一個無啟動子之<i>lacZ</i>基因以轉錄融合方式相接。<i>prtI</i>基因啟動子活性以 <math>\beta</math>-galactosidase的活性偵測之。在LB培養基中，<i>prtI</i>基因啟動子表現在<i>rpfF</i> <i>rpfG</i> 及<i>rpfC</i>突變株中嚴重被減少，但在<i>rpfB</i>突變株中被影響的情形較不明顯。在XOLN培養基中，<i>prtI</i>啟動子表現在所有<i>rpf</i>突變株中均嚴重被減少。</li> <li>4. <i>gumB</i>基因啟動子區域被選殖到pFY13-9 使其與一個無啟動子之<i>lacZ</i>基因以轉錄融合方式相接。<i>gumB</i>基因啟動子活性以 <math>\beta</math>-galactosidase的活性偵測之。在LB培養基及XOLN培養基中，<i>gumB</i>基因啟動子表現在<i>rpfF</i> <i>rpfG</i> 及<i>rpfC</i>突變株中輕微被減少，在<i>rpfB</i>突變株中被影響的情形僅在早期log期出現，其他生長期則較不明顯。當菌體進入飽和期時，<i>gumB</i>基因啟動子表現在所有菌株之間無明顯差異。</li> <li>5. 為偵測宿主萃取物(菜汁)對 致病基因<i>prtI</i>，及<i>gumB</i>表現的影響，<i>prtI</i>基因啟動子區域被選殖到pFY13-9 使其與一個無啟動子之<i>lacZ</i>基因以轉錄融合方式相接。<i>prtI</i>基因啟動子活性以 <math>\beta</math>-galactosidase的活性偵測之。(相同方式也用來建構<i>gumB</i>基因啟動子的表現偵測載體。但這裡僅呈現<i>prtI</i>基因啟動子活性偵測結果)。在LB培養基中，<i>prtI</i>基因啟動子表現在<i>rpfF</i> <i>rpfG</i> 及<i>rpfC</i>突變株中嚴重被減少，但在<i>rpfB</i>突變株中被影響的情形較不明顯。在XOLN培養基中，<i>prtI</i>啟動子表現在所有<i>rpf</i>突變株中均嚴重被減少。</li> <li>6. 分析純化之DSF對於<i>rpf</i>突變株之胞外蛋白酶活性的影響。結果顯示純化之DSF可以恢復<i>rpfF</i>突變株之胞外蛋白酶活性，但是對<i>rpfC</i> 和 <i>rpfG</i>突變株之胞外蛋白酶活性恢復作用有限。然而，DSF對於EPS的缺損卻無法恢復。</li> </ol>
➤ 執行成果檢討約250字內，條列式為佳	
至95年 3月止	

至95年 7月止	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 螢光基因EGFP及DsRed均能在Xc中表現，並且並未顯現出有明顯毒性跡象，然而在實際觀測之後發現DsRed基因的螢光雖然較強，但是因為和植物葉綠體自體螢光接近，不易區隔，所以DsRed將被捨棄不用，單獨採EGFP。</li> <li>2. 廣宿主性質體pFY13-9在無抗生素環境中約四天後會被Xc大量排除，所以在觀察感染狀況植物對細菌致病基因表現之影響時要併用穩定之系統，即將報導基因鑲嵌入染色體特定基因上。</li> <li>3. 在數種胞外酵素中僅protease的表現明顯受<i>rpf</i> 調控，所以啟動子活性測量系統將以<i>prt1</i>及EPS生成主要啟動子<i>gumB</i>為主。</li> </ol>
至95年12月止	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 雙報導基因的系統測並結果不如單報導基因敏感，對後續的篩檢工作將以單報導基因為主。</li> <li>2. EGFP 的發射波為可見光，所以易受培養基干擾。</li> <li>3. 鞭毛的產生似乎受<i>rpfF</i>、<i>rpfC</i>影響，但不受<i>rpfG</i>、<i>rpfB</i>影響；所以這可能是與DSF無關的調控路徑所致。我們將繼續加以驗證。</li> <li>4. 純化的DSF 能互補<i>rpfF</i>突變的胞外蛋白酶產生的缺陷，但是無法互補<i>rpfC</i>突變的胞外蛋白酶產生的缺陷，對<i>rpfG</i>突變的影響也有限，代表這兩種菌的DSF由胞外傳遞進細胞的途徑受損。</li> <li>5. DSF無法互補<i>rpfF</i>突變的EPS生產缺陷，由<i>gumB</i>啟動子活性測試也可知其受<i>rpf</i>的影響有限，可見EPS的調控可能是多因素的，不僅由DSF控制。</li> </ol>

#### 肆、經費運用

➤ 全程經費	<u>1,100,000</u> 元
至95年 3月止	目前支用 <u>184,128</u> 元 / 本年經費 <u>1,100,000</u> 元 = <u>16.7</u> %
至95年 7月止	目前支用 <u>391,180</u> 元 / 本年經費 <u>1,100,000</u> 元 = <u>35.6</u> % (註)
至95年12月止	目前支用 <u>1,100,000</u> 元 / 本年經費 <u>1,100,000</u> 元 = <u>100</u> %
➤ 經費執行困難之說明	

#### 伍、人力運用

➤ 參與研究人員	主持人胡若梅助理教授、盧俊達專任碩士助理、蕭盈如碩士兼任助理
➤ 計畫培育人才	博士後 _____人 專任碩士助理 <u>1</u> 人、學士助理 _____人 博士生 _____人、碩士生 <u>1</u> 人、學士 _____人 其他 _____人

#### 陸、績效指標

成果形式		數值	請逐篇列舉 論文著作需包括：Paper Title, Author, Year, Journal (全名), Vol. & Page
論文著作	國內	<input type="checkbox"/> 期刊論文 _____件	
		<input type="checkbox"/> 學術論文 _____件	
		<input type="checkbox"/> 研討會論文 _____件	1 Mei-Jung Tsai, Chai-Hsin Li, Pei-Chun Hsieh, Chun-Da Lu and Rouh-Mei Hu (2006) The <i>rpf</i> gene cluster can be a novel drug target for <i>Xanthomonas</i> species. The 40th Annual Meeting of the Chinese Society of Microbiology, Held in Taipei, Taiwan, Nov. 18

		<input type="checkbox"/> SCI論文 ___件	
		<input type="checkbox"/> 專書 ___件	
		<input type="checkbox"/> 技術報告 ___件	
	國際	<input type="checkbox"/> 期刊論文 ___件	
		<input type="checkbox"/> 學術論文 ___件	
		<input type="checkbox"/> 研討會論文 ___件	
		<input type="checkbox"/> SCI論文 ___件	
<input type="checkbox"/> 專書 ___件			
<input type="checkbox"/> 技術報告 ___件			
專門技術	_____件	名稱：	
申請專利情形	<input checked="" type="checkbox"/> 無		
	<input type="checkbox"/> 預備申請___件	名稱：	
	<input type="checkbox"/> 申請中 ___件	申請人、名稱、國家、申請證號：	
	<input type="checkbox"/> 已通過 ___件	所有人、名稱、國家、通過證號：	
技術轉移情形	<input checked="" type="checkbox"/> 無		
	<input type="checkbox"/> 可技轉技術 項	名稱：	
	<input type="checkbox"/> 已技轉授權 項	名稱、對象、年限及金額：	
其他協助產業發展之具體績效	<input type="checkbox"/> 新公司或衍生公司	名稱：	
	<input type="checkbox"/> 產業諮詢或指導		
	<input type="checkbox"/> 主辦相關研討會	名稱：	
	<input type="checkbox"/> 本計畫之產業推 動及整合		
	<input type="checkbox"/> 其他未及歸類 者，請說明		

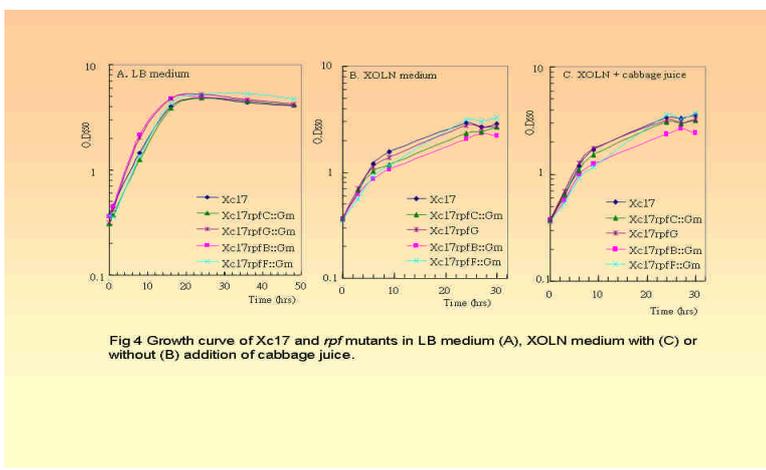
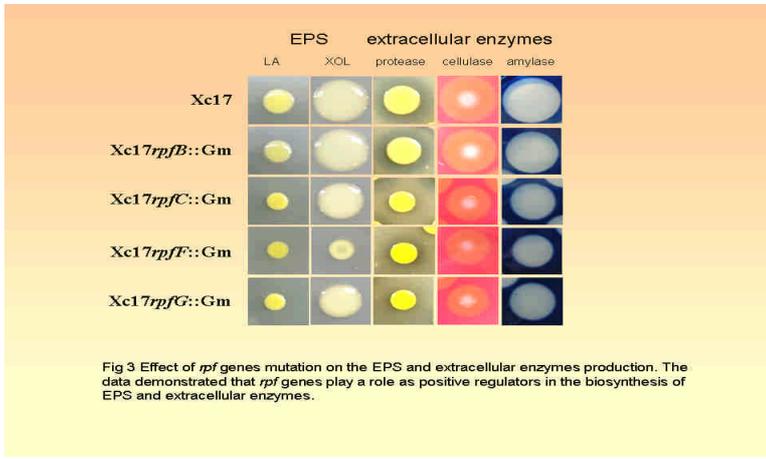
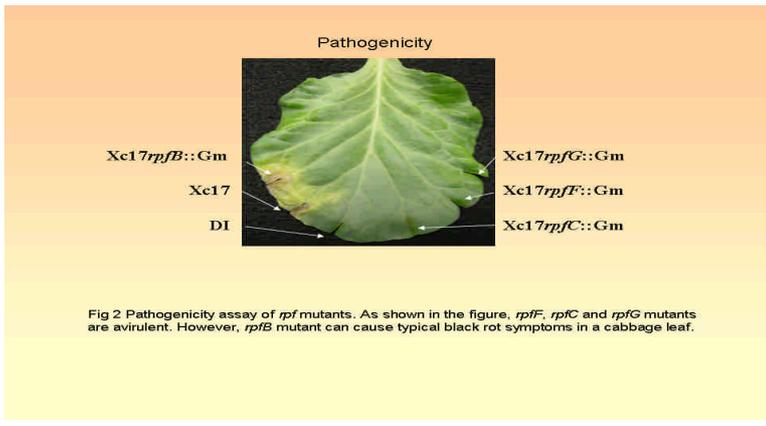
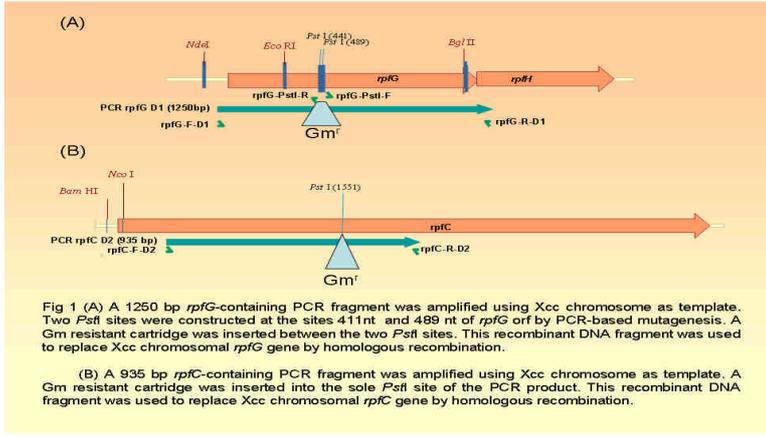
參、具代表性成果圖片說明約250字內

請將圖片以附檔寄送，本項將列為本辦公室對外展現成果引用之參考，可於每次送交報告時更新，自行增減。

圖片一：	<p>中文說明：利用插入外來抗藥基因突變法構築Xcc17 <i>rpfC</i> 和 <i>rpfG</i>的突變株。</p> <p>英文說明：Construction of Xcc <i>rpfC</i> and <i>rpfG</i> mutants by insertional mutagenesis.</p>
------	---

<p>圖片二：</p>	<p>中文說明：<i>rpf</i> 基因突變株之致病性測試。如圖所示，<i>rpfF</i>, <i>rpfC</i> 及 <i>rpfG</i> 突變株失去致病能力。然而，<i>rpfB</i> 突變株仍可在包心菜葉上引發典型黑腐病病癥。</p> <p>英文說明：Pathogenicity assay of <i>rpf</i> mutants. As shown in the figure, <i>rpfF</i>, <i>rpfC</i> and <i>rpfG</i> mutants are avirulent. However, <i>rpfB</i> mutant can cause typical black rot symptoms in a cabbage leaf.</p>
<p>圖片三：</p>	<p>中文說明：<i>rpf</i> 基因突變對胞外黏多醣及胞外酵素生成之影響。結果顯示，<i>rpf</i> 基因在EPS及各種胞外酵素的生成上均扮演正調控的角色。</p> <p>英文說明：Effect of <i>rpf</i> genes mutation on the EPS and extracellular enzymes production. The data demonstrated that <i>rpf</i> genes play a role as positive regulators in the biosynthesis of EPS and extracellular enzymes.</p>
<p>圖片四：</p>	<p>中文說明：<i>rpf</i> 基因突變對生長曲線的影響，分別在LB及分別有無添加2% 白菜汁之XOLN培養基中測試。</p> <p>英文說明：Growth curve of Xc17 and <i>rpf</i> mutants in LB medium (A), XOLN medium with (C) or without (B) addition of cabbage juice.</p>
<p>圖片五：</p>	<p>中文說明：利用電子顯微鏡觀察<i>rpf</i> 突變株菌體之外型，結果顯示<i>rpfF</i> 和 <i>fpfC</i> 突變株不具鞭毛結構，但是<i>rpfB</i> 和 <i>rpfG</i> 突變株仍保有鞭毛結構。</p> <p>英文說明：Conformation of <i>rpf</i> mutants observed by electronic microscope. The <i>rpfF</i> and <i>fpfC</i> mutants lost their flagellum, but <i>rpfB</i> and <i>rpfG</i> mutants are still flagellated.</p>
<p>圖片六：</p>	<p>中文說明：分析<i>prt1</i> 基因在<i>rpf</i> 突變株菌體內表現情形。(A) <i>prt1</i> 基因啟動子區域被選殖到 pFY13-9 使其與一個無啟動子之<i>lacZ</i> 基因以轉錄融合方式相接。<i>prt1</i> 基因啟動子活性以 <math>\beta</math>-galactosidase 的活性偵測之。(B) 在LB培養基中，<i>prt1</i> 基因啟動子表現在<i>rpfF</i> <i>rpfG</i> 及 <i>fpfC</i> 突變株中嚴重被減少，但在<i>rpfB</i> 突變株中被影響的情形較不明顯。在XOLN培養基中，<i>prt1</i> 啟動子表現在所有<i>rpf</i> 突變株中均嚴重被減少。</p> <p>英文說明：Analysis of the activity of <i>prt1</i> promoter in <i>rpf</i> mutants. (A) The promoter region of <i>prt1</i> gene was cloned into the plasmid pFY13-9 to be in a transcriptional fusion with a promoterless <i>lacZ</i> gene. The activity of <i>prt1</i> promoter was monitored by the <math>\beta</math>-galactosidase activity. (B) In LB medium, expression of <i>prt1</i> gene was severely reduced in <i>rpfF</i> <i>rpfG</i> and <i>fpfC</i> mutants and moderately reduced in a <i>rpfB</i> mutant. In XOLN medium, expression of <i>prt1</i> gene was severely reduced all of the four <i>rpf</i> mutants.</p>

<p>圖片七：</p>	<p>中文說明：分析 <i>gumB</i> 基因在 <i>rpf</i> 突變株菌體內表現情形。(A) <i>gumB</i> 基因啟動子區域被選殖到 pFY13-9 使其與一個無啟動子之 <i>lacZ</i> 基因以轉錄融合方式相接。<i>gumB</i> 基因啟動子活性以 <math>\beta</math>-galactosidase 的活性偵測之。(B) 在 LB 培養基及 XOLN 培養基中，<i>gumB</i> 基因啟動子表現在 <i>rpfF</i> <i>rpfG</i> 及 <i>fpfC</i> 突變株中輕微被減少，在 <i>rpfB</i> 突變株中被影響的情形僅在早期 log 期出現，其他生長期則較不明顯。當菌體進入飽和期時，<i>gumB</i> 基因啟動子表現在所有菌株之間無明顯差異。</p> <p>英文說明：Analysis of the activity of <i>gumB</i> promoter in <i>rpf</i> mutants. (A) The promoter region of <i>gumB</i> gene was cloned into the plasmid pFY13-9 to be in a transcriptional fusion with a promoterless <i>lacZ</i> gene. The activity of <i>gumB</i> promoter was monitored by the <math>\beta</math>-galactosidase activity. (B) In LB medium as well as in XOLN medium, expression of <i>gumB</i> gene was severely reduced in <i>rpfF</i> <i>rpfG</i> and <i>fpfC</i> mutants and moderately reduced in a <i>rpfB</i> mutant only in the early log phase of growth. In the stationary phase, the difference of <i>gumB</i> promoter activity between the mutant strains and Xc17 become less evident.</p>
<p>圖片八：</p>	<p>中文說明：分析 <i>prtI</i> 基因在 <i>rpf</i> 突變株菌體內表現情形。(A) <i>prtI</i> 基因啟動子區域連同一個無啟動子的 EGFP 基因一起被選殖到 pFY13-9 使其再與一個無啟動子之 <i>lacZ</i> 基因以轉錄融合方式相接。<i>prtI</i> 基因啟動子活性則分別以 EGFP 的螢光值 (B)，與 <math>\beta</math>-galactosidase 的活性 (C) 偵測之。結果則顯示此一轉錄融合系統的敏感度比 pFY-<i>prtI</i> 差。</p> <p>英文說明：Analysis of the activity of <i>prtI</i> promoter in <i>rpf</i> mutants. (A) The promoter region of <i>prtI</i> gene along with a promoterless EGFP gene was cloned into the plasmid pFY13-9 to be in a transcriptional fusion with a promoterless <i>lacZ</i> gene. The activity of <i>prtI</i> promoter was monitored by the fluorescence of EGFP (B) and <math>\beta</math>-galactosidase activity (C), in the presence or absence of plant extract. The results demonstrated that this fusion system is less sensitive than the pFY-<i>prtI</i> clone.</p>
<p>圖片九：</p>	<p>中文說明：分析純化之 DSF 對於 <i>rpf</i> 突變株之胞外蛋白酶活性的影響。結果顯示純化之 DSF 可以恢復 <i>rpfF</i> 突變株之胞外蛋白酶活性，但是對 <i>rpfC</i> 和 <i>rpfG</i> 突變株之胞外蛋白酶活性恢復作用有限。然而，DSF 對於 EPS 的缺損卻無法恢復。</p> <p>英文說明：Analysis the effect of purified DSF on the extracellular protease activity of <i>rpf</i> mutants. The results demonstrated that DSF can recover the extracellular protease activity of <i>rpfF</i> mutant but can't recover that of <i>rpfC</i> and <i>rpfG</i> mutants. However, the EPS production defect of <i>rpfF</i> mutant cannot be recover by the supplementation of DSF.</p>



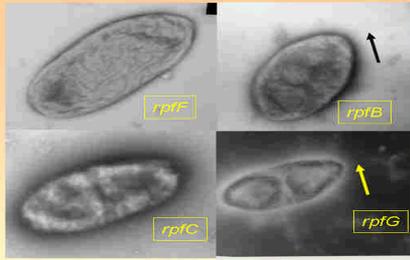


Fig 5 Conformation of *rpf* mutants observed by electronic microscope. The *rpfF* and *rpfC* mutants lost their flagellum, but *rpfB* and *rpfG* mutants are still flagellated.

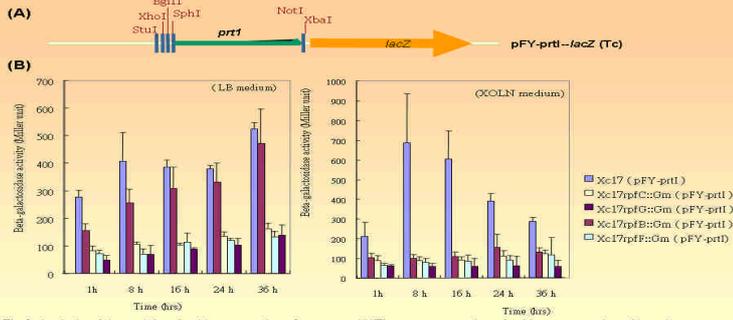


Fig 6 Analysis of the activity of *prtI* promoter in *rpf* mutants. (A) The promoter region of *prtI* gene was cloned into the plasmid pFY13-9 to be in a transcriptional fusion with a promoterless *lacZ* gene. The activity of *prtI* promoter was monitored by the  $\beta$ -galactosidase activity. (B) In LB medium, expression of *prtI* gene was severely reduced in *rpfF*, *rpfG* and *rpfC* mutants and moderately reduced in a *rpfB* mutant. In XCOLN medium, expression of *prtI* gene was severely reduced all of the four *rpf* mutants.

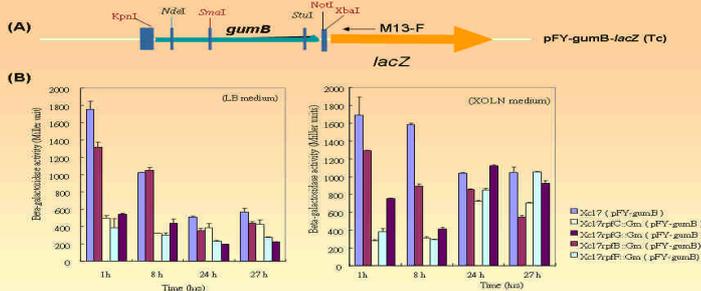
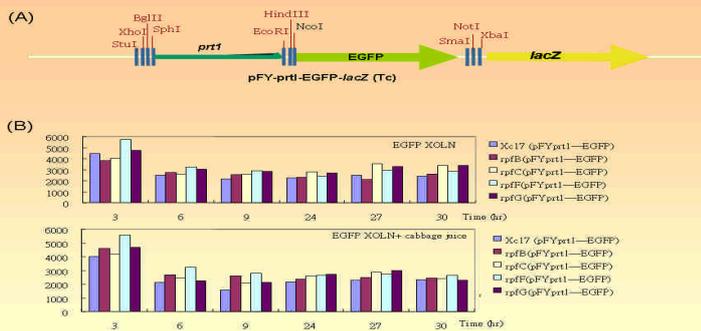


Fig 7 Analysis of the activity of *gumB* promoter in *rpf* mutants. (A) The promoter region of *gumB* gene was cloned into the plasmid pFY13-9 to be in a transcriptional fusion with a promoterless *lacZ* gene. The activity of *gumB* promoter was monitored by the  $\beta$ -galactosidase activity. (B) In LB medium as well as in XCOLN medium, expression of *gumB* gene was severely reduced in *rpfF*, *rpfG* and *rpfC* mutants and moderately reduced in a *rpfB* mutant only in the early log phase of growth. In the stationary phase, the difference of *gumB* promoter activity between the mutant strains and Xc17 become less evident.



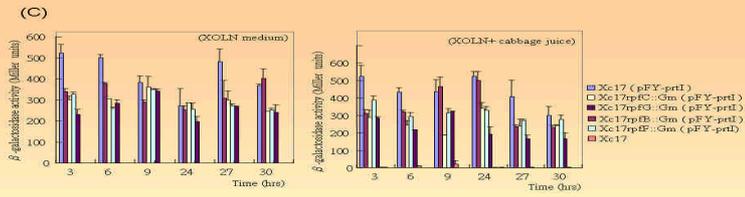


Fig 8 Analysis of the activity of *prt1* promoter in *rpf* mutants. (A) The promoter region of *prt1* gene along with a promoterless EGFP gene was cloned into the plasmid pFY13-9 to be in a transcriptional fusion with a promoterless *lacZ* gene. The activity of *prt1* promoter was monitored by the fluorescence of EGFP (B) and  $\beta$ -galactosidase activity (C), in the presence or absence of plant extract. The results demonstrated that this fusion system is less sensitive than the pFY-*prt1* clone.

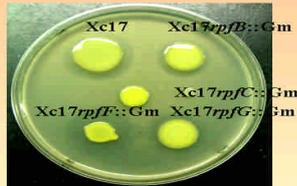


Fig 9 Analysis the effect of purified DSF on the extracellular protease activity of *rpf* mutants. The results demonstrated that DSF can recover the extracellular protease activity of *rpfB* mutant but can't recover that of *rpfC* and *rpfG* mutants. However, the EPS production defect of *rpfB* mutant cannot be recover by the supplementation of DSF.