

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抑制物質之篩檢及應用 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2317-B-468-002-
執行期間：97年01月01日至97年12月31日
執行單位：亞洲大學生物科技學系

計畫主持人：胡若梅

計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：盧俊達

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 98 年 03 月 03 日

「農業生物技術國家型科技計畫」 重點領域計畫之結案報告



填表日期：97 年 12 月 16 日

壹、基本資料

計畫編號	NSC 97-2317-B-468 -002	經費來源	國科會
計畫名稱	(中文) 十字花科黑腐病菌聚量感應抑制物質之篩檢及應用		
	(英文) Screening and application of anti-quorum sensing agent in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
計畫型別	<input checked="" type="checkbox"/> 個別型 <input type="checkbox"/> 整合型		
計畫主持人 (姓名/職稱) E-mail	(中文) 胡若梅 助理教授 (英文) Rouh-Mei Hu	執行單位	亞洲大學 生科系
	rmhu@asia.edu.tw		
共同主持人 (姓名/職稱)		執行單位	
重要參與人員 (姓名/職稱)	盧俊達 碩士級專任研究助理	執行單位	亞洲大學生科系
執行全期	97 年 1 月 1 日 ~ 97 年 12 月 31 日		

貳、摘要

1. 中文摘要

十字花科黑腐病菌(Xcc)是一種桿狀、好氧性、能產生黃色素的革蘭氏陰性菌，它擁有一單極單鞭毛，是造成十字花科植物黑腐病的病原菌。Xcc 會分泌多種胞外酵素以及胞外黏多醣黃原膠。這兩類物質是細菌對植物感染的重要致病因子。黃原膠與胞外酵素的生成受到 *rpf* 基因串的調控。*rpf* 基因串中的 *rpfF* 基因可產生具擴散性訊息因子(DSF)到胞外，細菌族群內的個體可以偵測到 DSF 的累積，並且依此來調節特定基因的表現，此現象稱為聚量感應。*rpfG* 和 *rpfC* 基因產物則和聚量感應中的訊息傳遞有密切關係。

Xcc 主要的致病因子胞外酵素以及黃原膠的生產即受 DSF 的正調控。*rpfF* 的突變株失去產生 DSF 的能力，同時喪失感染力。由這些資料可以推測抑制這種細菌間的溝通系統可以有效抑制細菌致病。本計畫目的為篩選有效抑制 Xcc 聚量感應的天然萃取物，並進一步測試此類物質的作用機制，以及其作為防治十字花科黑腐病菌藥物之可行性。

關鍵詞：十字花科黑腐病菌，聚量感應，擴散性訊息因子 (DSF), *rpf* 基因串，DSF-抑制分子

「農業生物技術國家型科技計畫」 重點領域計畫之結案報告



填表日期：97 年 12 月 16 日

2. 英文摘要

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (*Xcc*) is a rod-shaped, aerobic, yellow-pigmented, gram-negative bacterium which possesses a single polar flagellum and is the causal agent of black rot in crucifers. *Xcc* produces a range of extracellular enzymes and an extracellular polysaccharide known as xanthan gum. Extracellular enzymes and xanthan are collectively required for bacterial pathogenicity. The production of these factors is regulated by a cluster of genes called *rpf* (for regulation of pathogenicity factors). *rpfF* is implicated in the synthesis of a diffusible regulatory molecule, DSF. Cells of the bacterial population can sense the accumulation of DSF and modulate expression of specific genes, a phenomenon called quorum sensing. RpfG and RpfC are involved in the signal transduction of DSF.

Biosynthesis of the major *Xcc* virulence factors, such as extracellular enzymes and xanthan, are positively regulated by DSF. *rpfF* mutants can not produce DSF and lose the virulence. These data suggest that inhibition of this bacterial cell-cell communication system might efficiently block the microbial pathogenesis. The aims of this project are to screen for putative anti-quorum sensing molecules as disease prevention drugs.

Key words : *Xanthomonas campestris*, quorum sensing, diffusible signal factor (DSF), *rpf* cluster, DSF-quenching molecule

叁、計畫緣由與目的

Xcc 主要的致病因子胞外酵素以及黃原膠的生產即受 DSF 的正調控。*rpfF* 的突變株失去產生 DSF 的能力，同時喪失感染力。由這些資料可以推測抑制這種細菌間的溝通系統可以有效抑制細菌致病。

本計畫目的為

- (1) 進一步測定前期研究所篩選出之植物萃取物對於受聚量感應調控基因表現的影響。
- (2) 測定篩選出之植物萃取物對於抑菌或殺菌的作用。
- (3) 測試植物萃取物作為防治十字花科黑腐病菌藥物之可行性。

肆、未來的延續性工作

「農業生物技術國家型科技計畫」 重點領域計畫之結案報告



填表日期：97 年 12 月 16 日

1. 對於 DSF 純化的技術將與化學專長的實驗室合作，以期有所突破。
2. 繼續針對 DSF 對於細菌基因表現的影響進行研究。
3. 對於篩選出的植物之殺菌成分進行進一步的機制與可能的應用相關研究。

伍、成果

➤ 執行成果約 250 字內，條列式為佳

1. RpfC 除了與 RpfG 蛋白共同負責 DSF 訊息的傳導外，同時可負调控 DSF 的產生。利用 *rpfC* 突變菌株可大量生產 DSF。
2. 將純化之 DSF 加入早期之 *Xcc* 野生株培養液中，可明顯抑制 *Xcc* 的生長速度。
3. 若於感染前 2 h 加入 DSF 可有效抑制病徵的發生。
4. 一漆科植物的萃取物在低濃度下具有抑制胞外蛋白酶活性，菌株在含萃取物之培養基內，主要蛋白酶 *prtI* 啟動子活性也明顯下降。但是因為 *rpfF* 和 *rpfCG* 啟動子活性未受影響，所以推測其作用機制與 *rpf* 基因串表現無直接關聯。
5. 增加萃取物含量至 512 mg (植物乾重)/ml，即可有效抑制 *Xcc* 的生長，因此，這種植物可以用於開發新的抑菌藥物。

➤ 執行成果檢討約 250 字內，條列式為佳

1. 目前實驗室純化 DSF 的技術尚不純熟，所以僅能以粗萃物作為實驗材料。
2. 前期篩檢出的植物具有很強的抑菌功能，雖然對部分受聚量感應调控基因表現產生抑制作用，但對整體系統的影響尚未獲得清楚的確認。

陸、經費運用

➤ 全程經費 _____ 1,200,000 _____ 元

➤ 經費執行困難之說明 無

柒、人力運用

➤ 參與研究人員 請填寫姓名及職稱

➤ 計畫培育人才 博士後 _____ 人
專任碩士助理 1 人、學士助理 _____ 人
博士生 _____ 人、碩士生 3 人、學士 3 人
其他 _____ 人

捌、績效指標 (僅需填寫 97 年的成果數值)

「農業生物技術國家型科技計畫」
重點領域計畫之結案報告



填表日期：97 年 12 月 16 日

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	
		<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 <u>1</u> 件	Shu Wang, Rouh-Mei Hu , Han C.W. Hsiao, David A. Hecht, Albert K.L. Ng, Rong-Ming Chen, Phillip C.Y. Sheu ¹ , Jeffrey J.P. Tsai (2008) Using SCDL for Integrating Tools and Data for Complex Biomedical Applications. <i>International Journal of Semantic Computing</i> 2(2): 291-308
		<input type="checkbox"/> 學術論文 ___ 件	
		<input type="checkbox"/> 研討會論文 <u>3</u> 件	David Hecht, Rouh-Mei Hu , Rong-Ming Chen, Jong-Waye Ou, Chao-Yen Hsu, Haitao Gong, Ka-Lok Ng, Han C.W. Hsiao, Jeffrey J.P. Tsai, Phillip C-Y Sheu. (2008) BioSemantic System: Applications of Structured Natural Language to Biological and Biochemical Research, IEEE-Conference Sensor Networks, Ubiquitous, and Trustworthy Computing, Held in Taichung Taiwan Jun 11-13
			Chao-Yen Hsu, Rouh-Mei Hu , Rong-Ming Chen, Jong-Waye Ou, and Jeffrey J.P. Tasi (2008) "IHCread: An Automatic Immunohistochemistry Image Analysis Tool," Integrated Design and Process Technology, SDPS Held in Taichung Taiwan Jun 2-6.
			Jong-Waye Ou, Rong-Ming Chen, Rouh-Mei Hu , Chao-Yen Hsu, and Jeffrey J.P. Tasi (2008) A Systematic Gene Expression Explorer Tool For Multiple And Paired Chips. Integrated Design and Process Technology, Held in Taichung Taiwan Jun 2-6.

「農業生物技術國家型科技計畫」
重點領域計畫之結案報告



填表日期：97 年 12 月 16 日

	<input type="checkbox"/> SCI 論文 <u>5</u> 件	<p>Yi-Min Hsiao, Mei-Huei Zheng, Rouh-Mei Hu, Tsuey-Ching Yang, Yi-Hsiung Tseng (2008) Regulation of the <i>pehA</i> Gene Encoding the Major Polygalacturonase of <i>Xanthomonas campestris</i> by Clp and RpfF. <i>Microbiology</i> 154(Pt 3):705-13. (Mar. 2008)</p> <p>Rouh-Mei Hu, Kuang-Jay Huang, Lii-Tzu Wu, Ying-Ju Hsiao, Tsuey-Ching Yang (2008) Studies on Induction of L1 and L2 β-lactamases of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> 52(3):1198-200. (Mar. 2008)</p> <p>Cheng-Wen Lin, Rouh-Mei Hu, Shao-Cheng Huang, Ying-Ju Hsiao, Tsuey-Ching Yang (2008) Induction potential of clavulanic acid toward L1 and L2 β-lactamases of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>. <i>European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases</i> (Accepted 6, June, 2008)</p> <p>R.-M. Hu, K.-H. Chiang, C.-W. Lin, T.-C. Yang (2008) Modified nitrocefin-EDTA method to differentially quantify the induced L1 and L2 β-lactamases in <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>. <i>Letters in Applied Microbiology</i> 47:457-461.</p> <p>Cheng-Wen Lin, Yi-Wei Huang, Rouh-Mei Hu, Kai-Hung Chiang, Tsuey-Ching Yang (2008) The Role of AmpR in the Regulation of L1 and L2 β-lactamases in <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>. <i>Research in Microbiology</i> (Accepted, Nov. 2008).</p>
	<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 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、申請年份：
	<input type="checkbox"/> 已通過 ___ 件	所有人、名稱、國家、通過證號、通過年份：
技術轉移情形	<input type="checkbox"/> 無	
	<input type="checkbox"/> 可技轉技術 項	名稱：

「農業生物技術國家型科技計畫」 重點領域計畫之結案報告

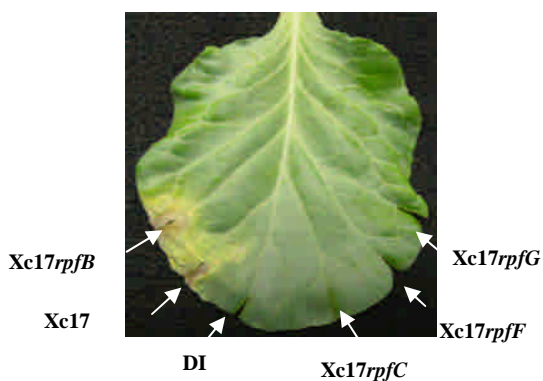


填表日期：97 年 12 月 16 日

	<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	

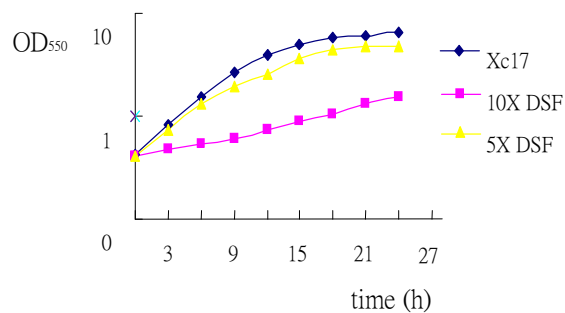
玖、具代表性成果圖表（至少三張，每張圖表大小請勿超過 1MB）

圖表一



中文說明：*rpfF*、*rpfC* 和 *rpfG* 突變株喪失致病力。

圖表二



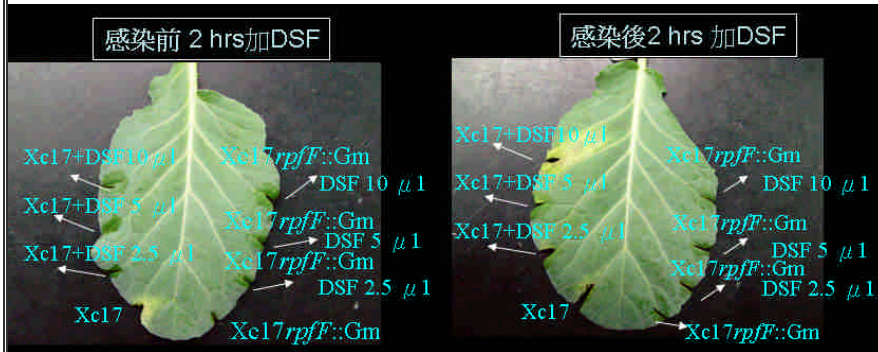
中文說明：
加入 DSF 至 LB 培養基中，可抑制菌的生長。
(X 倍數相當於同體積的飽和菌液所產生的 DSF 量。)

「農業生物技術國家型科技計畫」
重點領域計畫之結案報告



填表日期：97 年 12 月 16 日

圖表三



中文說明：

在感染前將 DSF 塗佈至植物傷口上，可以有抑制感染病徵發生。若於感染後加入 DSF，則效果不佳。

拾、參考文獻

Blank area for references.