

火鶴花細菌性葉枯病菌新插入序列 ISXCD1 之分離與分析

李佳蓉¹ 劉秀玲¹ 林長平^{1,2}

1 臺北市 國立臺灣大學植物病理與微生物學系

2 聯絡作者，電子郵件：cplin@ntu.edu.tw；傳真：+886-2-23661980

接受日期：中華民國 93 年 8 月 4 日

摘要

李佳蓉、劉秀玲、林長平. 2004. 火鶴花細菌性葉枯病菌新插入序列 ISXCD1 之分離與分析. 植病會刊 13:219-232.

在本研究中，成功地使用 pUCD800 質體誘鈎獲得火鶴花細菌性葉枯病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (簡稱 XAD) 之一新插入序列 (insertion sequence, IS)。實驗中使用電穿孔法 (electroporation) 將 pUCD800 質體導入 XAD 中，由於質體上 *sacBR* 基因所表現之 levansucrase，致使成功導入具完整 *sacBR* 質體之葉枯病菌轉形株 (transformant)，無法生長於含有蔗糖之培養基。實驗中，利用轉形株在蔗糖培養基上培養特性之改變，可篩選 *sacBR* 基因被轉位子插壞者，並對其內之 pUCD800 進行質體分析，經內鑑識酵素 *EcoRI* 及 *HindIII* 酵解後，分析其圖譜並觀察 *sacBR* 區域變化。總計篩選了 186 株突變株，其中 71 株為質體大小完全不變者，28 株在 *sacBR* 區域有明顯插入 1.2 kb 片段，87 株質體大小發生不可預期的重組現象。依 PCR 測定及序列分析結果顯示，此 *sacBR* 區域中之 1.2 kb 插入片段之 28 株中有 21 株為插入序列 IS1051 所引起之插入點不活化，另 7 株則為屬於 IS3 family 之新插入序列，此一新插入序列已正式登錄並命名為 ISXCD1，其全長為 1,203 bp，包括兩端 38 bp 的不完全 (imperfect) 反向重複序列 (inverted sequence, IR)，其中包含有 11 bp 的錯配 (mismatches)，在轉形株 15-4 及 27-25 之 *sacBR* 基因上出現 4 bp 同向重複序列 (direct repeat, DR)，對應胺基酸序列後發現其為兩個有部分重疊的 open reading frame (ORF)：*orfA* 及 *orfB*，在重疊區域可發現 IS3 family 轉位酶常見的 A₇T motif，在 ORFA 也可找到 helix-turn-helix motif、ORFB 也可找到保守的 DDE motif，其均為 IS3 family 轉位酶之共通特性。由南方氏雜配分析得知 ISXCD1 在 XAD 基因組中有 9-11 個雜配訊號，並且也廣泛存在於親緣較近之 *Xanthomonas* spp. 細菌中。利用反向聚合酵素連鎖反應 (inverse polymerase chain reaction, IPCR)，找到此插入序列在基因組中獨立的五個位置，比對這些插入序列周圍之序列，並未發現有明顯之插入點偏好性。

關鍵詞：火鶴花細菌性葉枯病、插入序列、反向聚合酵素連鎖反應

緒言

植物病原細菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (簡稱 XAD) 能感染多數天南星科 (Family Araceae) 植物，寄主範圍頗廣，最初是在黛粉葉 (*Dieffenbachiae* spp.) 上分離而來⁽¹⁷⁾。1987 年本病在夏威夷火鶴花栽培區爆發大規模的葉枯病感染，造成約五百萬美元的損失⁽¹⁸⁾；台灣則於 1991 年首度發現⁽³⁾，之後此病害即遍及全省的火鶴花產區，罹病植物在葉、花上出現壞疽、黃化或水浸狀斑點，在火鶴花的出口產業上造成嚴重

威脅⁽²⁾。此病原菌原名為 *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* (簡稱 XCD)，後依 DNA-DNA hybridization 結果建議改名為 *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*⁽²⁷⁾。1994 年，Berthier 等人所發表的轉位子 IS1051 在 XAD 基因組中存在 12-15 個套組數 (copy number)，利用此轉位子做各分離株的 restriction fragment length polymorphism (RFLP)，發現能將分離株之地緣關係清楚呈現⁽⁴⁾。

轉位子 (transposon) 為一具有移動特性的遺傳分子 (mobile genetic element)，普遍存在原核及真核生物基因組中，而插入序列 (insertion sequence, IS) 則為轉位子中最高

簡單之形式。一般認為轉位子是多數細菌用來調控基因表現的工具，透過轉位作用 (transposition) 造成突變、插入點不活化、促進或抑制周圍基因表現^(14,16)。由於轉位子的高重複性、可提高偵測的敏感度 (sensitivity)，動物病原菌 *Mycobacterium tuberculosis* 的轉位子 IS6100 即被發現可應用於聚合酶連鎖反應來快速偵測病原菌⁽²⁵⁾。而轉位作用的發生及轉移，使轉位子在種間及屬間呈不一致的多形性現象，此特性在分類上亦極有應用價值⁽⁷⁾。正因轉位子具有上述之高重複性及種間與屬間之多形性，故數種轉位子亦被用來作為原核生物分生研究上的分子標記 (genetic marker)，例如 IS533、IS200、IS1004 等已被應用於病原菌分類及流行病學上之研究^(6, 23, 32)。目前，確實的轉位子功能尚未確定，但轉位子藉由基因組重組 (chromosome rearrangement)，在病原菌的演化過程中似乎扮演著重要角色⁽⁷⁾。由於轉位子上除了具有進行轉位所需的轉位酶 (transposase) 基因外，並無任何方便選殖的標誌基因 (marker)，故多數轉位子的發現也多因在大規模解序之後，不經意的在質體 (plasmid) 上或代謝基因 (metabolic genes) 周圍發現轉位子的存在⁽¹⁶⁾。本研究室亦曾利用差異性雜和反應 (differential hybridization) 策略獲得花生簇葉病菌質體之轉位子⁽²⁹⁾。

1985 年 Gay 等人利用 *Bacillus subtilis* 之 *sacBR* 基因所構築的 pUCD800 質體可作為主動篩選 (positive selection) 轉位子之用⁽¹¹⁾。在研究中，我們成功的將 pUCD800 質體送入火鶴花葉枯病菌中，並利用質體上之 *sacBR* 基因所表現的 levansucrase 引起的毒性致死現象，順利的誘釣出基因組 DNA (genomic DNA) 上之插入序列，並針對其序列及特性加以探討，此後並期望能將此篩選到的新插入序列應用於病原菌的分子生物學或病原菌偵測上之探討。

材料與方法

供試菌株來源、培養與保存

本研究採之火鶴花細菌性葉枯病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (簡稱 XAD) 菌株除由本研究室分離所得⁽¹⁾外，亦分別由臺灣省農業試驗所許秀惠小姐與臺灣糖業公司方金國博士所提供，此等菌株皆由黃化複合型病徵之病株分離而得。其他測試用之細菌包括 *X. campestris* pv. *begoniae* ATCC 49082、*X. axonopodis* pv. *glycines* 69、*X. campestris* pv. *oryzae* 21、*X. campestris* pv. *phaseoli* 73、*Rhizobium leguminosarum* R1 (由中興大學分子生物學研究所陳建華老師所提供)，*X. campestris* pv. *campestris* XCC70、*X. axonopodis* pv. *citri* XW23、*X. campestris* pv. *magniferaeindicae* 29-4、*X. arboricola* SH1-34、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XCV42 (由中興大學生物

科技學研究所黃秀珍老師所提供)，*Bacillus subtilis*、*B. thuringiensis*、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Proteus* sp.、*Pseudomonas cichorii*、*Ralstonia solanacearum* (為國立臺灣大學植物病理與微生物學系植物細菌學研究室之保存菌種)(表一)，所有測試用之細菌菌株皆以 20% 甘油保存於 -70°C 冰箱中。試驗時，以移植環挑取細菌懸浮液劃線於 Luria-Bertani (LB) (*Xanthomonas* spp.) 或 NGA (其他供試菌株) 培養基上⁽¹⁾，於 28°C 培養 24-72 小時後，挑取單一菌落懸浮於 nutrient broth (NB) 中，震盪培養 24-48 小時後挑取其全 DNA (total DNA)，供實驗之用。

細菌全 DNA 與微量質體 DNA 之抽取

各實驗細菌全 DNA 之抽取方法乃依據 Current Protocols in Molecular Biology 中之 "Preparation of genomic DNA from bacteria" 之方法稍做修改後進行⁽³⁰⁾。*Xanthomonas* 屬細菌因胞外含大量多醣類 (exopolysaccharides) 會干擾 DNA 抽取之品質，因此在抽取前須先使用 Pett IV (10mM Tris-HCl, 1M NaCl) 緩衝液⁽⁹⁾ 將多醣類洗去。而由攜帶 pUCD800 (由加州大學 Dr. C. I. Kado 提供) 質體之 *E. coli* 及 XAD 轉形株 (transformants) 中微量抽取質體 DNA 時則是採用 Plasmid DNA Miniprep System Kit (Viogren-Biotek Crop, Taiwan) 進行。

pUCD800 質體導入火鶴花細菌性葉枯病菌

本研究係採用電穿孔法將質體 pUCD800 導入葉枯病菌中，方法係依廠商之建議進行 (Electro cell manipulator ECM600[®] electroporation system operation manual; BTX Inc., San Diego, CA)，實驗中選取正值最佳生長期且具高密度菌量之菌體 (XAD 分離株 A128、Ts-2 及 Y5)。執行電穿孔法前先用預冷之緩衝液，移除原本培養液中的任何殘存離子。全程方法如下：進行轉形實驗之前 16-20 小時，將 XAD 接種在 LB agar 固體培養基上，並在 28°C 培養箱中培養。由培養基上選取直徑約 3 mm 大小的單一菌落 (single colony)，將其接種至 LB 液態培養液中，以分光光度計 (spectrophotometer U-2000, Hitachi, Tokyo, Japan) 測量菌液之吸光度，待 OD₆₀₀ 讀值達 0.5 至 0.7 之間時，收集菌液並在 4°C 下以 6,000g 離心 15 分鐘收集菌體沈澱，沈澱加入 40 ml 預冷之無菌水，稍加震盪，混合均勻後離心 15 分鐘 (4°C) 後移去上清液，菌體再依序以 25 ml、15 ml、10 ml 無菌水重複漂洗 (wash) 處理。最後，菌體以 0.4 ml 無菌水懸浮。

取出 40 μ l 置於冰浴中之 XAD 菌體並加入 2 μ l 前述微量製備好的 pUCD800 質體 DNA 溶液，將其吸至預冷的 cuvette (0.1 cm electrode gap) 之凹槽中，置於冰浴中至少 5 分鐘。本實驗採用基因脈衝產生器 (pulse generator BTX-

ECM-600; BTX Inc.)，其設定條件為 1.225 kV，電阻為 129 ohm。完成後，取出 cuvette，立即加入 1 ml 室溫之 SOC medium (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose)，將菌液移至 1.5 ml 微量離心管中，於 28°C 震盪培養 2 小時後，以 M9 培養液 (1.28% Na₂HPO₄·7H₂O, 0.3% KH₂PO₄, 0.1% NH₄Cl, 0.5% NaCl) 做 10 倍系列稀釋 (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) 後，取 200 μl 均勻塗抹於 LB/kanamycin 固態培養基上，於 28°C 恆溫箱培養約 3 日，逢機挑選數個轉形株做純培養。將該等轉形株以 Plasmid DNA Miniprep System Kit (Vioggen-Biotek Crop) 進行微量質體 DNA 之抽取，以確定各轉形株中是否攜帶 pUCD800 質體。

攜帶轉位子重組質體 (recombinant plasmid) 之 XAD 轉形株之篩選

將確認帶有 pUCD800 質體的 XAD 轉形株，在 LB/kanamycin (50 μg/ml) 培養基上做繼代培養，挑選單一菌落接種於 5 ml LB/kanamycin 培養液，培養約 2 日，待 OD₆₀₀ 值達 0.8，直接取菌液 200 μl 均勻塗佈於經修改的 TYS-Km (1% tryptone, 0.6% yeast extract, 5% sucrose, 20mM MgSO₄, 1.5% bactoagar, 50 μg/ml kanamycin) 培養基，經 2 到 3 日後，長出的菌即可能為 *sacBR* 基因發生插

入性變異之突變株，重複幾次繼代培養之後，進行後續之突變株分析。

新轉位子之選殖

為避免插入 *sacBR* 區域之片段是 XAD 之前已發表的插入性序列 IS1051⁽⁴⁾，遂利用針對此轉位子的反向重複序列 (IR) 所設計的引子 Y15⁽⁴⁾，進行聚合酵素連鎖反應 (PCR) 檢測。以前述微量質體抽取方法由突變株抽出重組質體 DNA，稀釋至 15 ng/μl 作為 PCR 之模版 (template)，置於 0.2 ml 微量 PCR 反應管中，依序補入無菌水 (使反應總體積為 20 μl)、2 μl 的 10× *Taq* reaction bufferd、1.6 μl 的 dNTPs mixture (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各 2.5 mM)、引子 Y15 (20 μM) 取 2 μl (使反應濃度為 1 μM)；再加入 1.5 單位之 *Taq* DNA polymerase (Promega Corporation, Madison, WI)。以微量吸管尖端輕輕混勻後，放入已預熱為 94°C 之聚合酵素連鎖反應器 (GeneAmp PCR System 2400; Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT) 中進行聚合酵素連鎖反應。反應器所設定之反應程式 (program) 為：先以 94°C 預熱 (prerun) 5 分鐘；再以 94°C 1 分鐘 (denaturation)，55°C 1 分鐘 (annealing)，72°C 1 分鐘 (extension) 進行 30 個循環 (cycle)；最後再以 72°C 反應 5 分鐘，即完成反應。反應完成後之產物，於 1% 瓊脂凝膠 (1× TAE 緩衝液)，以 5 V/cm 之電壓進行水平電泳分析，

表一、本研究中測試之菌株

Table 1. Bacterial strains used in this study

Bacteria tested	Strain number	Host	Geographic origin
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	A128、A122	Anthurium	Nantou
	Ts-2	Anthurium	Nantou
	Ts-3	Anthurium	Pingtung
	Y-2、Y-3、Y-4、Y-5	Anthurium	Nantou
	ATCC49082	Begonia	u ¹
<i>X. campestris</i> pv. <i>begoniae</i>	XCC70	Cabbage	Changhua
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	XW23	Liucheng	Chiayi
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	69	u	u
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycine</i>	29-4	Mango	Tainan
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	21	u	u
<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	SH1-34	Peach	Nantou
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	73	u	u
<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	XCV42	Sweet pepper	Pingtung
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>		u	u
<i>Bacillus subtilis</i>		u	u
<i>B. thuringiensis</i>		u	u
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>		u	u
<i>Esecherichia coli</i>		u	u
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		u	u
<i>Proteus</i> sp.		u	u
<i>Pseudomonas cichorii</i>		u	u
<i>Ralstonia solanacearum</i>		u	u
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	R1	u	u

¹ u, unknown.

經 EtBr 染色後，觀察聚合酵素連鎖反應的結果。

經上述 PCR 測試後，篩選未增幅出 IS1051 片段 PCR 產物之 XAD 突變株，推論其在 *sacBR* 之插入片段可能為非 IS1051 之轉位子。此外，因從 XAD 抽出之重組質體 DNA 量太少，無法供後續定序等相關實驗使用，故將各重組質體之 *EcoRI* 及 *HindIII* 鑑識酵素酵解片段 (約 2.4 kb) 切下並選殖至 pBluescript[®] II SK(-) phagemid (Stratagene, LA Jolla, CA) (大小約 3 kb) 上，並轉形 (transformation) 至 *E. coli* 中增量以利於後續之解序及分析。所獲得之選殖株重組質體嵌入片段之核苷酸序列定序分析係採用 Perkin Elmer 公司開發出來之 ABI PRISM[™] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit，並配合該公司之自動定序分析儀 (automatic sequencing analyzer) ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT) 進行。

南方氏雜配法 (Southern hybridization analysis)

為瞭解 XAD 各分離株 A128、A122、Y-2、Y-3、Y-4、Y-5、Ts-2、Ts-3 及其他 *Xanthomonas* 屬細菌 (表一) 攜帶在本研究中所發現之新插入序列之套組數，因此進行南方式轉漬 (Southern blotting) 及雜配反應 (hybridization) 之測定。取 10 μ g XAD A128、A122 及其他測試用 *X. campestris* pathovars 細菌之全 DNA，分別以 30 單位 (unit) *EcoRI* 或 *XhoI* 內鑑識酵素酵解，經水平式電泳後，將電泳凝膠上之 DNA 進行 16 至 24 小時的轉漬至 nylon 濾膜後，隨即進行雜配反應。本雜配實驗所使用之探針乃利用引子對 unL1/ unR1 (引子序列 unL1: 5'-GACATCCCGC TTCACCGAC-3'、unR1: 5'-CATCGAGCAGGT TCAGGAC-3'; 序列之位置標示於圖二)，利用 PCR DIG probe synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH) 以 PCR 法進行標識，雜配及呈色方式則均依廠商所建議之方式進行 (aliquant-labeling and detection of hybrids by enzyme immunoassay; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)。雜配反應於 68°C 進行。

反向聚合酵素連鎖反應 (inverse polymerase chain reaction, IPCR)

為瞭解本研究中發現之新插入序列之插入點序列 (target sequence)，因此進行反向聚合酵素連鎖反應 (IPCR)，取 4 μ g 之 XAD A128 全 DNA，以 4 單位之內鑑識酵素 (*HindIII*、*KpnI* 或 *SacI*) 於適當溫度下作用 3 小時後，以 80°C 處理 20 分鐘以終止反應，直接取 2 或 17.5 μ l 置入微量離心管中進行後續之黏結反應，反應時依序加入黏結酵素緩衝液 (ligation buffer) 及 1 單位黏結酵素 (ligase) 使反應總體積為 20 μ l，於 14°C 水浴中作用 16 小時，使其有機會形成環狀分子 (monomeric circles)⁽¹⁷⁾。經黏結酵素

作用完畢之 DNA 溶液以 QIAGEN 公司所開發的 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 將酵素除去，取 2 μ l 作為 PCR 反應之模版。針對此新插入序列的解序結果設計一組往外 (outwarding) 引子對 15-4L3/ unL1-R (引子對序列 15-4L3: 5'-GTCCGGTGAAGCGGGATGTC-3'、unL1-R: 5'-GACATCCCGCTTCACCGAC-3'; 序列位置標示於圖二)，反應條件如下：在 0.2 ml 之微量 PCR 反應管中依序加入無菌水 (使反應總體積為 50 μ l)、5 μ l 的 10 \times Taq reaction buffer、4 μ l 的 dNTPs mixture、兩引子 (均為 20 μ M) 各取 1.25 μ l (使反應濃度各為 1 μ M)；模板 DNA 2 μ l；再加入 1.5 單位之 Taq DNA polymerase (Promega Corporation)。以微量吸管尖端輕輕混勻後，放入已預熱為 94°C 之聚合酵素連鎖反應器中進行聚合酵素連鎖反應。反應器所設定之反應程式 (program) 為：先以 94°C 預熱 (prerun) 5 分鐘；再以 94°C 45 秒 (denaturation)，50°C 30 秒 (annealing)，72°C 4 分鐘 (extension) 進行 30 個循環 (cycle)；最後再以 72°C 反應 10 分鐘，即完成反應。反應完成後之產物，於 0.8% 瓊脂凝膠 (1 \times TAE 緩衝液)，以 5 V/cm 之電壓進行水平電泳分析，經 EtBr 染色後，觀察聚合酵素連鎖反應的結果。將 PCR 產物由電泳膠片上回收，方法如同前述。回收之 IPCR 產物溶於 20 μ l 無菌水中以進行選殖工作，選殖策略乃是採用 Invitrogen 公司 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 所開發出來之 TOPO TA Cloning[®] Kit 進行，依廠商建議之方法將 IPCR 產物選殖於 pCR[®] II-TOPO 載體 (vector)，並轉形至勝任細胞 (competent cell) TOP10[®] (Invitrogen Corporation)。將獲得之轉形株所攜帶之重組質體進行其 IPCR 產物嵌入片段核苷酸序列之定序以確定其插入點序列，定序之方法如同前述。

結果

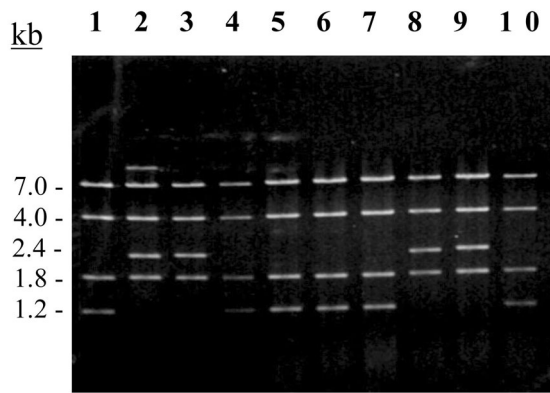
新轉位子之分離

將帶有質體 pUCD800 之 XAD 轉形株塗佈至 TYS-Km 上培養時，突變株的發生率約為 10⁻⁴-10⁻⁵，每次實驗隨機挑選 20 至 50 株於 LB/ kanamycin 培養基上作繼代培養，並進行該等突變株的分析。本研究總計篩選 186 株帶有 pUCD800 質體之 XAD 突變株，篩選情形統計於表二。將各突變株之質體經內鑑識酵素 *HindIII* 及 *EcoRI* 酵解獲得之圖譜進行初步比對，結果顯示有 71 株 (38.2%) 質體大小不變，115 株質體大小發生改變。經內鑑識圖譜分析顯示，*sacBR* 區域片段由原 1.2 kb 約增大為 2.4 kb (圖一)，將在此區域有明顯插入 DNA 片段之重組質體進行分析。單純在 *sacBR* 區域發生大小改變者，有 28 株 (15%) 在該區域有大小約 1.2 kb 之 DNA 插入片段，經利用 IS1051 之 PCR 引子進行 PCR 檢驗後，其中有 21 株可增幅出約 1 kb 之

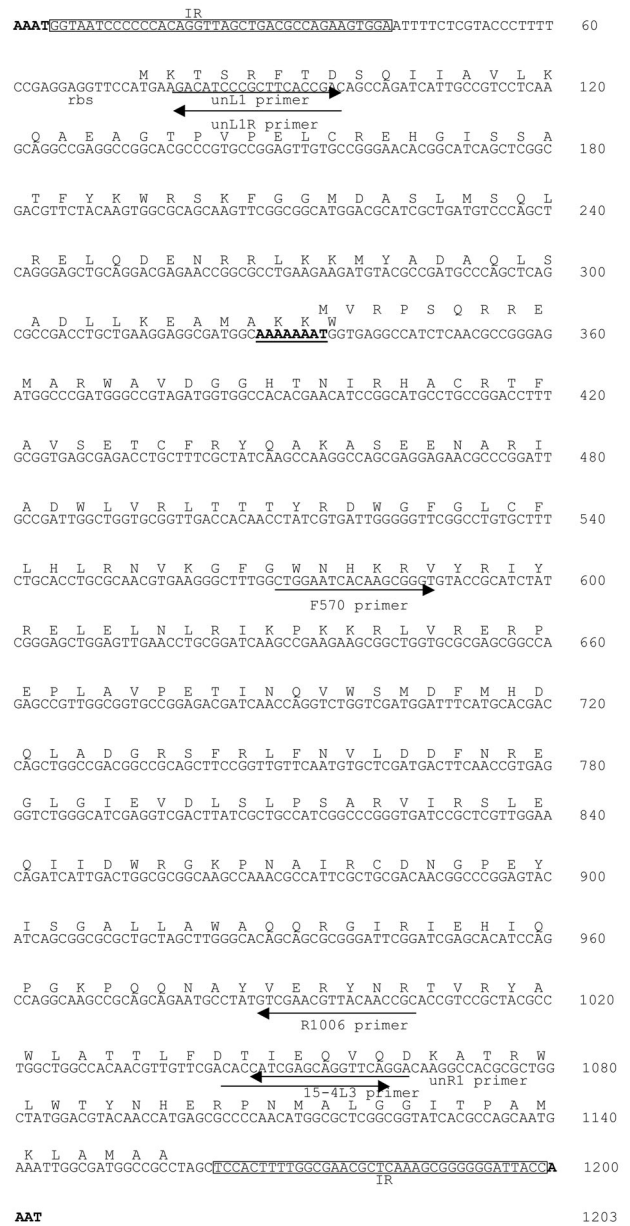
IS1051 預期產物，該等轉形株應為 IS1051 所引起的插入點不活化，而另 7 株經 Y15 引子測試並無 IS1051 之 PCR 產物，逢機選取七株中之二株 (均為 XAD Ts-2 之突變株)，將其可能攜帶有新插入序列之 2.4 kb 片段利用 *EcoRI* 及 *HindIII* 切下，並將之選殖至 pBluescript® II SK(-) phagemid 載體上，其在 *E. coli* 之轉形株分別命名為 15-4 及 27-2。其餘之 87 株 (46.8%) 因質體大小發生不可預期之重組現象，故並未在本研究中予以進一步之分析。

新轉位子之選殖與定序

轉形株 15-4 及 27-2，經內鑑識酵素 *EcoRI* 及 *HindIII* 確認其嵌入片段皆為 2.4 kb 後，利用載體上位於嵌入片段兩側之 T7 及 T3 引子進行核苷酸定序，發現轉形株 15-4 及 27-2 之嵌入片段中，除原本 pUCD800 的 *sacBR* 區域外，尚含有一 IS-like element，利用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 軟體在 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 序列資料庫內比對後，發現其與硫酸還原細菌 (sulfate-reducing bacterium) *Desulfovibrio vulgaris* 的 ISD1⁽¹⁰⁾ 之 DNA 序列相同度 (identity) 達 57%，並與同屬 IS3 family 的插入序列 IS1389⁽¹²⁾、ISRI⁽²⁰⁾ 之 DNA 序列均有約 50% 的序列相同度。ISD1 屬典型的 IS3 family 之轉位子，其轉位酶由兩個具部分重疊之 ORFs (open reading frames) : *orfA* 及 *orfB* 轉譯而得。將吾人所獲得之新插入序列經 Lasergene (DNASTAR Inc. Madison Wisconsin) 軟體轉譯後亦可獲得二個有意義的 ORFs (圖二)，將其與 IS3



圖一、以內鑑識酵素 *EcoRI* 和 *HindIII* 對蔗糖培養基上 XAD 突變株之重組 pUCD800 質體所做之分析。
Fig 1. Restriction enzyme analysis of recombinant plasmids from several sucrose-resistant transformants carrying derivatives of pUCD800. Molecular weight (in kb) of major DNA bands are indicated on the left. Plasmid DNA was digested with *EcoRI* and *HindIII* and separated on a 1% agarose gel. Lane 1, pUCD800 (control); lanes 2-10, pUCD800 derivatives from sucrose-resistant isolates. The plasmids in lane 2, 3, 8 and 9 carry insertions of approximate 1.2 kb in size.



圖二、插入序列 ISXCD1 之核酸序列。
Fig. 2. Nucleotide sequence of ISXCD1 of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. The flanking duplicated target site (AAAT) is indicated in bold. Left and right IR (inverted repeat) are boxed. The two open reading frames that encode the cognated transposase (*orfA* (nt 74 to 337) and *orfB* (nt 334 to 1158)) are indicated by the above translated amino sequences *orfA* gene is preceded by a ribosome binding site (rbs). An A₇T shifty codon motif (nt 328 to 335) is underlined and shown in bold letters, and several primer sequences are indicated.

A

helix turn helix

```

                *           20           *           40           *           60
unknown-or : -----MKTSRFTDSQIIAIVLQAEAGTPVPELCREHGISSATFYKWRSKF : 45
ISD1-orfA  : -----MKKSRFSESQIIRILKEADGGRKVVDTCRENGVSQATYYQWKAKF : 45
ISR1-orfA  : -----MKRSRFTTEEQIIGILREQEAGVATAEVCRRHGVSSATFYKWKAKF : 45
IS1389-orf : -----MKKRFSEEQIIGFLREAEAGIAIKDLGRRHGFSEASYLWRSKF : 44
IS1222-orf : -----MKKRFSDQQLISILREAEAGVSARELCRKHAISDATFYTWRRKKY : 44
IS2-orfA   : -----MIDVL-GPEKRRRRTTQEKIATVQQSFEPGMTVSFVARQHGVAASQLFLWRKQY : 53
ISRm1-orfA : MTSSNFKMEVLSGPERRRRWSTAEKLAIIHETYEADATVSIVARRHGIQPNQLFAWRKLA : 60
                r 3 6 e g 6 R hg 5 W4
    
```

```

                *           80           *           100          *           120
unknown-or : G-----GMDASLMSQLRELDENRRLLKKMYADAQLSADLLKEAMAKKW----- : 88
ISD1-orfA  : G-----GMEASDIRRLKELEBENSCLKRMFANLSLENEALKDVIKAKL----- : 88
ISR1-orfA  : G-----GLDVSEARRLKALEDENARLKRMLADAMLDNVALKDLLGKKW----- : 88
IS1389-orf : G-----GMSVPDAKRLKDLAENARLKKLLAEQLFENDLIKDALRKKW----- : 87
IS1222-orf : G-----GMEVPEVKRLKSLBENARLKKLLAEAMLKDALQVALGRKY----- : 87
IS2-orfA   : QEGSLTAVAAAGEQVVPASELAAMKQIKELQRLGKKTMESELKEALEIAGSPKKHLLR : 112
ISRm1-orfA : SQGALTATAAEEVVPASEYRALQAVKELQRLGKKTMESELKEALEIAGSPKKHLLR : 120
                g 1 1 2 L 46 6k 6
    
```

```

unknown-or : ----- : -
ISD1-orfA  : ----- : -
ISR1-orfA  : ----- : -
IS1389-orf : ----- : -
IS1222-orf : ----- : -
IS2-orfA   : APLLPGDGE : 121
ISRm1-orfA : SLSLP---- : 125
    
```

B

```

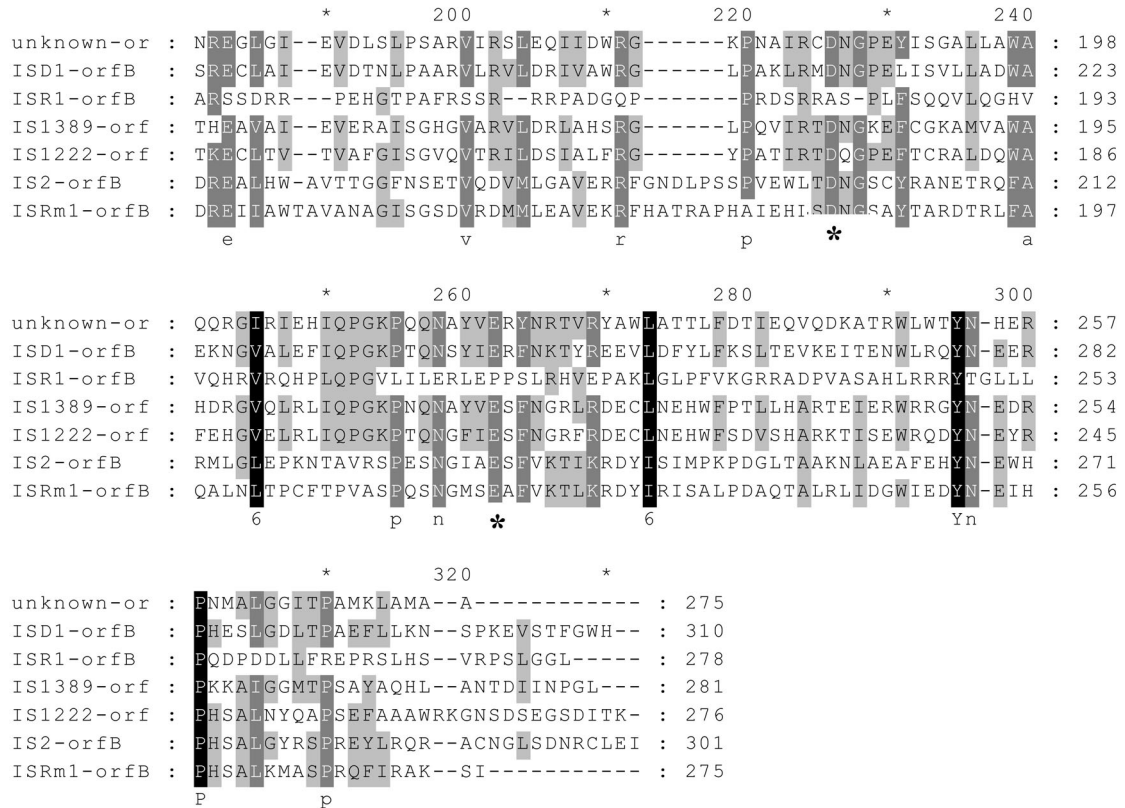
                *           20           *           40           *           60
unknown-or : -----MVRPSQRREMARWAVDGGHTNIRHACRTFAVSE : 33
ISD1-orfB  : RREQQAQAHVRSQSPRERGLEGRHCKKALRPAEKRDADFHSSEHGLSERRSCAALGLSR : 60
ISR1-orfB  : -----MPLSLTMVSGRPRCRMTASNSRRTTRAPDSEV : 31
IS1389-orf : -----MVSAPARRALVREWIGRG-ASERRALAAIGMSA : 32
IS1222-orf : -----MLICDATG---LSQRRACRLTGLSL : 22
IS2-orfB   : -----MDSARALIARGWGVSLVSRCLRVSRAQLHVR : 34
ISRm1-orfB : -----MKAVADT-LGVSRSNLIERIKG : 21
                r
    
```

```

                *           80           *           100          *           120
unknown-or : TCFRYQAKAS--EENARIADWLVRLTTTYRDWGFGLCFHLHRLN---VKGFGWNHKRVMR : 87
ISD1-orfB  : TVYRYELKP---RDDSLIIEALLGLADRYPRYGFGLFAVLR----RHGFRWNHKRVMR : 112
ISR1-orfB  : SATSAKHSRVQLSITVRMRKRPSVSWSATKSATSAGWAPAA----GHGRRVPIARLR : 86
IS1389-orf : SALRYCP-RQ--DRNGELRERLALAHRRHRYGVGMILYKLR----QEGRLVNYKRVR : 84
IS1222-orf : STCRYEAQRP--AADAHLSGRITELALERRRFGYRRIWQLLR----REGLHVNHKRVMR : 75
IS2-orfB   : TDDWMDGRRSRHTDQTDVLLRTHHVIGELPTYGYRRVWALLRRQAELDGMPAINAKRVMR : 94
ISRm1-orfB : RSKPR-GPYN-KAEDAELLPAERRLVDQRPTYGYRRIAALLNRERRAADQPVVNAKRVR : 79
                6 6 g 1 n kR6 R
    
```

```

                *           140          *           160          *           180
unknown-or : IYRELELNLRIKPKRRLVR-ERPEPLAVPETINQVWSMDFMHDQLADGRSFRFLFNVLDDF : 146
ISD1-orfB  : VYCLLKMNLRRKGGKRLPS-RNPQPLAVPPCANVCWSIDFMHDALASGQFRFTFNVLDDF : 171
ISR1-orfB  : APAHRQLLVAIIDPLDFPPVDRMALAPQHQVQATIAEPSTFLARAFSRSRRARRRPGSPDS : 146
IS1389-orf : LYREQQLQVRRRKRKKVPV-GERHALLRPAQANQVWSMDFVFDSDGGRVVKCLVIVDDA : 143
IS1222-orf : LYHLSGLGVKRRRKRKGLA-TERLPLLRPAAPNLTWSDDFVMDALATGRRIKCLTCVDDF : 134
IS2-orfB   : IMRQNALLLERKPAVPPSK-RAHTGRVAVKESNQRWCSDFGFEFCDDNGERLRVTFALDCC : 153
ISRm1-orfB : IMGNHAMLLKHTAVRKG--RLHDGKVMVMSNLRWCSDFGFEFCDDNGERLRVTFALDCC : 137
                6 6 n w * g 4 d
    
```

圖三、插入序列 (*ISXCD1*) 轉位酶之胺基酸序列經 CLUSTAL 軟體與 IS3 family 轉位子比對結果。

Fig. 3. CLUSTAL analysis of IS3 family transposases. The designations of IS shown in Table 3. Unknown-or stands for *ISXCD1*. (A) Sequence alignment of ORFA sequences. (B) Sequence alignment of ORFB sequences. Consensus residues in 4 or 5 of the 7 sequences are shaded in gray, and conserved residues are shaded in black. The DNA binding helix-turn-helix motif in ORFA and the D, D- (35)-E motif in ORFB are also indicated by inverted U on the top and underlying asterisks, respectively.

family 之 ORFA、ORFB 比對，結果顯示其中一 ORF 與 ISD1 之 ORFA 胺基酸具有 45% 相似度 (similarity)，另一 ORF 則與其 ORFB 具有 41% 之相似度，二者並與 IS3 family members 之 ORFA、ORFB 之胺基酸皆有一定的相似度 (表三)；而在此新插入序列之 *orfA* (共轉譯出 88 個胺基酸) 及 *orfB* (共轉譯出 275 個胺基酸) 重疊區域上亦可發現 IS3 family 轉位酶常見的 A₇T motif (圖二)，並且在 ORFA 可找到 helix-turn-helix motif (HTH motif)，在 ORFB 可找到保守的 DDE motif (D-(58)-D-(35)-E) (圖三)。

解序後發現選殖至 *E. coli* 後之 15-4 與 27-2 兩轉形株之插入點及序列完全相同，應屬同一插入序列。利用此序列內部引子對 unL1/ unR1 (預估產物約為 1 kb)。對其餘 5 株 XAD 突變株利用 PCR 鑑定其是否為同一插入序列引起的突變株，PCR 結果顯示均可增幅出 1 kb 產物 (表二)，推論應屬相同之插入序列，故未再針對該五株作選殖之工作。

火鶴花細菌性葉枯病原菌新插入序列 *ISXCD1* 之特性分析

經上述序列分析及基因庫比對之結果顯示此序列應為一新插入序列，其序列顯示於圖二：序列全長為 1,203 bp，包括兩端 38 bp 的不完全反向重複序列 (IR) 及在插入點造成的 4 bp 的同向重複序列 (DR)，經轉譯成胺基酸序比對分析後，顯示部分核苷酸重疊的 *orfA* 及 *orfB* 及特定具有功能的胺基酸區域 (motif/ domain) 均與現公認的轉位子 IS3 family 之轉位酶類似。本研究將此一插入序列命名為 *ISXCD1*，並將其序列登錄至 NCBI，登錄號碼為 GenBank AF263433。

研究中為了得知 *ISXCD1* 於不同 XAD 分離菌株內基因組之分佈，利用依據 *ISXCD1* 序列所設計之引子對 unL1/ unR1 製備核酸探針，以其進行南方雜配實驗，結果顯示在所有 XAD 分離株中皆約有 9-11 個雜配訊號，其分佈情形均與 A128 極為一致 (圖四)。

表二、帶有pUCD800質體之XAD突變株之質體分析

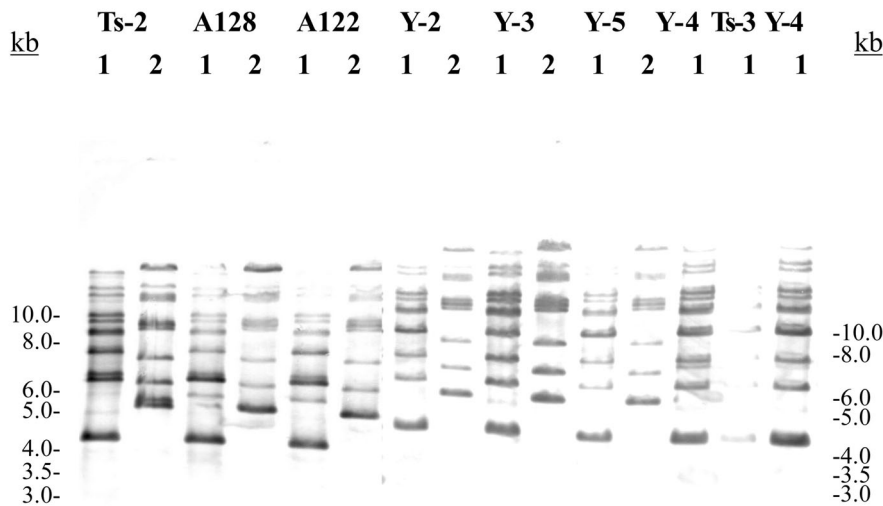
Table 2. Analysis of recombinant pUCD800 plasmids from *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

Bacterial strain		No. of plasmid analyzed	No. of plasmid without size change	No. of plasmid with size change	No. of positive PCR reaction with primer pair	
					Y15/ Y15	unR1/ unL1
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	A128 (pUCD800)					
	test #1	45	24	17	4	0
	test #2	47	15	30	2	0
	test #3	48	7	35	6	0
	Ts-2 (pUCD800)					
	test #1	43	22	5	9	7
	Y-5 (pUCD800)					
	test #1	3	3	0	0	0
Total		186	71	87	21	7

表三、轉位子ISXCD1與其他IS3 family轉位子在DNA序列及ORF之胺基酸相似度百分比

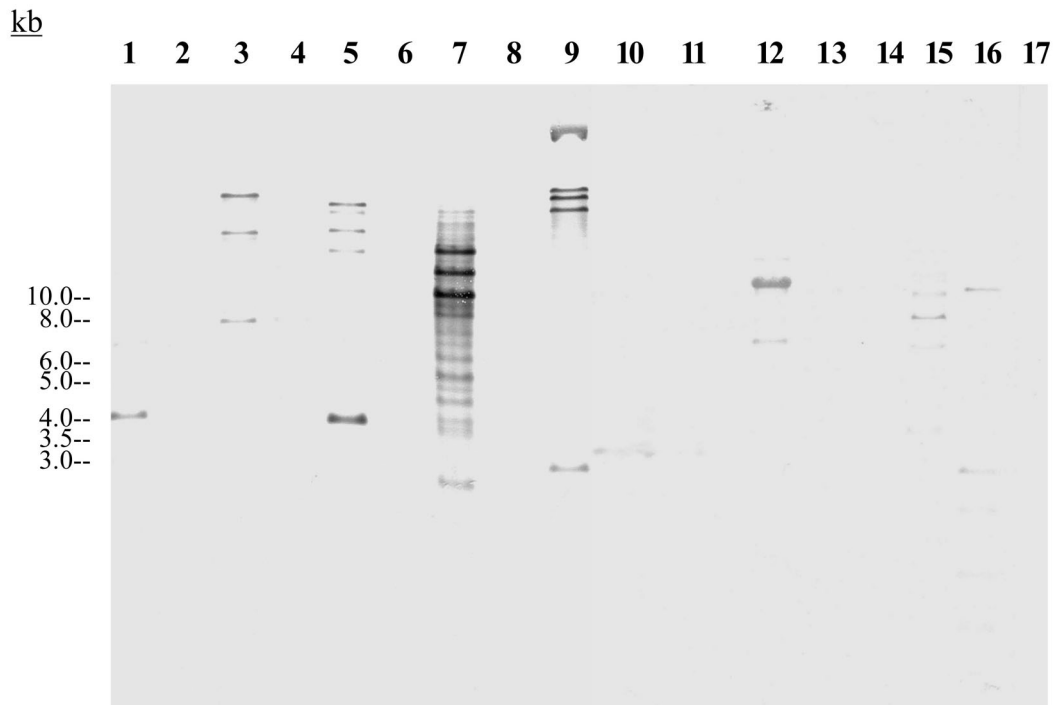
Table 3. Comparison of DNA sequences and predicted amino acid sequences of ISXCD1 and other members of the IS3 family

IS	Original source	ISXCD1			Reference
		DNA sequence	ORFA	ORFB	
		Identity (%)	similarity (%)	similarity (%)	
ISD1	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	57	45	41	Fu and Voordouw., 1998
ISR1	<i>Rhizobium meliloti</i>	48	50	12	Priefer <i>et al.</i> , 1989
IS1389	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>amaranthicola</i>	56	47	34	Gomez <i>et al.</i> , 1999
IS1222	<i>Enterobacter agglomerans</i>	32	42	45	Steibl and Lewecke, 1995
ISRm1	<i>Rhizobium meliloti</i>	37	19	15	Watson and Wheatcroft, 1991
IS2	<i>Escherichia coli</i>	28	21	16	Besemer <i>et al.</i> , 1980



圖四、以插入序列ISXCD1內1 kb片段為核酸探針對XAD各分離株Ts-2、A128、A122、Y-2、Y-3、Y-5、Y-4、Ts-3、Y-4經內鑑識酵素EcoRI或XhoI酵解之全DNA進行南方氏雜配之結果。

Fig. 4. Southern hybridization analyses of EcoRI- (lane 1), XhoI- (lane 2) digested total DNA prepared from *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* Ts-2, A128, A122, Y-2, Y-3, Y-5, Y-4, Ts-3 and Y-4 hybridized with DIG-labeled 1 kb fragment amplified from the internal segment of the ISXCD1. The molecular weight (in kb) is shown in the margins.



圖五、插入序列 ISXCD1 在各種測試細菌中之分佈。

Fig. 5. Southern hybridization analysis of *EcoRI*-cleaved total DNA from various pathovars of *Xanthomonas campestris* and several G (-) or G (+) bacteria hybridized with DIG-labeled 1 kb fragment from the internal sequences of ISXCD1. Lane 1, *X. campestris* pv. *campestris* (XCC70); lane 2, *X. campestris* pv. *begoniae* (ATCC49082); lane 3, *X. axonopodis* pv. *citri* (XW23); lane 4, *X. axonopodis* pv. *glycine* (69); lane 5, *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (29-4); lane 6, *X. campestris* pv. *oryzae* (21); lane 7, *X. campestris* pv. *phaseoli* (73); lane 8, *X. arboricola* pv. *pruni* (SH1-34); lane 9, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (XCV42); lane 10, *Bacillus subtilis*; lane 11, *B. thuringiensis*; lane 12, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; lane 13, *Klebsiella pneumoniae*; lane 14, *Pseudomonas cichorii*; lane 15, *Proteus* sp.; lane 16, *Rhizobium leguminosarum*, lane 17, *Ralstonia solanacearum*. The molecular weight (in kb) is shown on the left.

ISXCD1 在其他 *Xanthomonas* 屬及其他細菌中之分佈

利用上述核酸探針，以南方氏雜配實驗觀察 ISXCD1 在不同菌種間分佈之情形，結果顯示 ISXCD1 普遍存在於測試菌株中，其中在 *X. campestris* pv. *campestris* 70 中出現 12 個雜配訊號，*X. axonopodis* pv. *citri* XW23、*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* 29-4 均有 8-9 個雜配訊號，而 *X. axonopodis* pv. *glycines* 69 及 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XCV42 則有 6 個雜配訊號，尤其在 *X. campestris* pv. *phaseoli* 中雜配訊號極密集，推測約有 20 個以上類似片段存在(圖五)。

ISXCD1 插入點序列(target sequence)之分析

爲了瞭解 ISXCD1 之插入點序列遂進行了 IPCR 實驗，並將 IPCR 產物選殖到 pCR® II-TOPO 載體上，針對獲得之數個轉形株 H-2 (嵌入片段約 1.6 kb)、Kpn2.1 (嵌入

片段約 1 kb)、Kpn1.1 (嵌入片段約 1.6 kb)、Sac1.4 (嵌入片段約 1.5 kb)、Sac2.3 (嵌入片段約 1 kb)，由載體上的引子對 T7/ Sp6 向兩端約解序 700 bp，在解出的序列上找出原本設計的引子對位置，並將 ISXCD1 周圍序列集中比對(圖六)。所得到的 5 個轉殖株連同先前的 15-4 與 27-2 轉形株解序結果，顯示 15-4 及 27-2 具有 4 bp (aaat) 之同向重複序列 (DR)，而 IPCR 之五個轉形株中，H-2 與 Sac2.3 轉形株亦具有 4 bp 之同向重複序列 (DR)，其序列分別爲 acct 與 attg，而 H-2 轉形株解序後發現在 ISXCD1 周圍序列竟爲另一轉位子 IS1051 之序列，此應是 ISXCD1 轉位至 IS1051 之結果。其他轉形株之 ISXCD1 周圍序列在比對上並未發現與任何特定已知基因有序列上的相似性；轉形株 Kpn1.1 解序之後發現僅在其一端找到轉位子序列。序列比對的結果顯示同向重複序列 (DR) 並無明顯偏好性，但 ISXCD1 使目標序列產生 4 bp 的同向重複序列 (DR) 幾乎是可以確定的。

source	IR	IR
15-4/ 27-2	___catctaacacagtaacagatgaaatGGTAA....TTACCaaattgaacgcgcgaacgtctt___
Genomic1 (H-2)	___tggccatctcggccaagaacacctGGTAA....TTACCacctcacgcgcgctccgcttgc___
Genomic2 (Kpn2.1)	___ccggtctggggaaggccgctggctgGGTAA....TTACCcccggagccgaccgcatgcagg___
Genomic3 (Sac1.4)	___gctgaccgcccagctggttacggatGGTAA....TTACCccacgacaggatttctctgct___
Genomic4 (Sac2.3)	___tggcgatgagttcgcgcacccattgGGTAA....TTACCattgcacctcgacacgtcccga___
Genomic5 (Kpn1.1)	TTACCcctgaaaggcgcgatgctctcg___

← unL1R 15-4L3 →

圖六、比對 *ISXCD1* 在基因組上 5 個獨立的位置並對應 15-4/ 27-2 轉形株之序列。

Fig. 6. Alignment of insertion sites for *ISXCD1* homologues. Partial IR sequences are shown in upper case, and the internal IS sequences are indicated by dotted lines. Flanking sequences are presented in lower case, with the duplicated 4-bp element underlined. Genomic copies 1 through 5 were recovered independently from separate inverse PCR reactions whose templates are treated with different restriction enzymes. Genomic copy 5 provides information only for the right flanking sequence.

討 論

火鶴花細菌性葉枯病病原菌 *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (XAD) 於 1987 年在夏威夷造成火鶴花細菌性葉枯病害嚴重發生，此病原菌遂引起極大注意與許多研究；此菌寄主範圍極廣，在分類上歧異度較高，各分離株間在脂肪酸成分、致病能力、寄主範圍、及水解澱粉能力等特性均有明顯差異⁽⁸⁾。根據寄主植物之分類大抵可與目前血清型分析相符⁽¹⁵⁾；在分子遺傳學上，使用 *E. coli* 16S 及 23S rDNA 為核酸探針在 RFLP 之分析上，可發現 XAD 各分離株間之歧異性相較於其他 *X. campestris* pathovars 之歧異性更高，但尚可分辨出不同寄主的分離株。Berthier 等人利用插入序列 *IS1051* 作為分子標記，能將不同地緣的 XAD 分離株明顯區別⁽⁴⁾。由於轉位子本身的特性，及其在細菌間經由轉位 (transposition) 現象或接合 (conjugation) 作用，而進行基因組重組或垂直傳播之情形，故本研究希望藉由透過分離出葉枯病菌之新轉位子，而能更加瞭解葉枯病菌的分生特性及其基因調控的方式。在本研究中利用轉位子發生轉位作用所引起的插入點不活化之原理來篩選葉枯病菌之新轉位子，實驗中將 pUCD800 質體系統導入至 XAD 中並成功地選殖到一新插入序列 *ISXCD1*。經南方氏雜配顯示此新插入序列存在於 XAD 基因組中多個位置，並由 IPCR 結果推論其插入點並無明顯偏好性。

於本研究過程中，pUCD800 質體轉形方式先採用之前 Chen 等人在 *X. campestris* pv. *campestris* 上所使用的三親交配 (triparental mating) 方式⁽⁹⁾，但並不能成功將 pUCD800 送入 XCD 中，其後改採用電穿孔法才順利將 pUCD800 質體送入 XCD 中。電穿孔之後的結果顯示，質體上來自 *Bacillus subtilis* 的 *sacBR* 基因顯然能夠在 XAD 中表現，以致菌的生長情形及菌量明顯受到蔗糖的抑制。

實驗中藉由篩選大量突變株進行質體大小分析，期望篩選到引起插入片段不活化的轉位子。理論上，在含有蔗糖培養基上長出之突變株，其 *sacBR* 無法正常表現出 levansucrase，以致不會引起菌體死亡；此等突變可能因 *sacBR* 基因上發生插入、缺失、或單一鹼基的點突變，或者可能因此酵素分泌之基因、或其他基因發生突變。此種菌體自發性突變 (spontaneous mutations) 之機制⁽¹¹⁾，具有維持族群生存之意義。在利用此 pUCD800 質體系統篩選轉位子時受限於下列幾項因素：1. 必須是具有功能 (functional) 轉位酶 (transposase) 之轉位子才會被篩選出來。2. 必須是無特定插入點偏好性之轉位子，否則 *sacBR* 區域並不適於做為誘鈎轉位子的目標序列。由本研究結果所獲得之 *ISXCD1*，在 XAD 中具有多重複數，且能由基因組 DNA 轉位至 pUCD800，顯示其轉位酶具功能性，且無偏好的插入點，正符合以上所述之二特性。

在本實驗中共篩選了 186 株突變株，分析其 pUCD800 質體大小，38.2% 之質體大小完全不變，15% 之質體為單純的 *sacBR* 區域有明顯插入 1.2 kb 片段者，另一部份 (46.8%) 質體大小發生不可預期的重組現象。篩選之初，1.2 kb 插入片段經 Y15 引子⁽⁴⁾ 聚合酵素連鎖反應，結果顯示其大部分為已發表的 *IS1051* (佔 21/28)，為避免篩選到同一類突變株的後代，遂採行多次逢機篩選。此外，篩選方法是先抽取 XAD 突變株的質體 DNA 再將其轉形至 *E. coli* 中予以純化供後續研究使用。而實驗初期 XAD 質體的抽取結果不佳，後來參照文獻上於抽取 XAD 質體 DNA 前，使用鹽溶液將菌體漂洗兩遍，以減少多醣類對抽取出 DNA 的影響⁽⁸⁾，如此方取得實驗所需之 XAD 質體 DNA，由此結果可推論可能是 pUCD800 質體在 XAD 中的複製情形不佳，但在將 XAD 質體經由轉形至 *E. coli* 培養後，再由 *E. coli* 中抽取，即可獲得足量的 DNA 作進一步分析。

實驗中所選殖到非 *IS1051* 之新插入序列 *ISXCD1* 全長 1,203 bp，兩端有 38 bp 不完全反向重複 (其中包含 11 bp 的錯配 (mismatches))，並在轉形株 15-4 及 27-2 中 *sacBR* 基因上造成 4 bp 同向重複序列 (DR)(圖二)。在 DNA 及預測的胺基酸序列上與 *ISD1* 分別具 57% 之 DNA 相同度及 45% (ORFA) 與 41% (ORFB) 之胺基酸相似度，且二者在序列結構上極為相似。*ISD1* 長約 1,200 bp，兩端約 44 bp 不完全反向重複；*ISD1* 屬典型的 IS3 family 轉位子⁽¹⁰⁾。*ISXCD1* 之 *orfA* 及 *orfB* 推衍的胺基酸各為 88 及 275 胺基酸，並且由篩選實驗上可知，此新轉位子能產生具活性之轉位酶。而在 *ISXCD1* 之 ORFA、ORFB 上分別可找到與 DNA 結合 (DNA binding) 具相關性的 HTH motif 及具保留性 (conservation) 的 DDE motif，再者 *orfA* 及 *orfB* 之重疊區域可發現 IS3 family 中常見的 A₇T motif，並且由各自的胺基酸序列上找到第一個 methionine，其轉譯位置 (phase) 正好有 -1 之位差，以上各特徵均符合典型之 IS3 family 轉位子之特性。並且根據轉位酶在 DDE motif 保守區域之各保守胺基酸相互間距離為 D-(58)-D-(35)-E，故此新插入序列 *ISXCD1* 應分屬於 IS3 family 的 *IS407* subgroup⁽¹⁶⁾。

由南方氏雜配試驗可知，*ISXCD1* 在 XAD 基因組中之重複數目約 9-11 copies 較先前發現的 *IS1051* 在 XCD 基因組中重複數目 (12-15 copies) 較少⁽⁴⁾。在本次研究中，測試來自不同地區之 XAD 分離株內 *ISXCD1* 分佈之情形，比對結果顯示 Ts-2 分離株 (分離自埔里) 與其他分離株 (A128、A122 分離自埔里；Ts-3、Y-2、3、4、5 則分離自屏東) 之雜配圖譜僅具有一個雜配訊號的差異 (圖五)，由此結果無法推論其與地緣關係是否有關聯。對親緣關係較近的 *Xanthomonas* 屬細菌中，平均約有 7 個以上雜配訊號，尤其對 *X. campestris* pv. *phaseoli* 基因組有多達 20 個以上之雜配訊號。

而 IPCR 產物選殖共得到的五個轉形株，經解序後比對其反向重複 (IR) 之周圍序列 (flanking sequence)，結果可知此五個 clone 各為基因組上獨立的位置，且其 4bp 的同向重複序列 (DR) 亦不相同，此一比對結果顯示 *ISXCD1* 並沒有明顯的插入點偏好性。插入點序列產生的同向重複序列 (DR) 被認為是轉位作用時轉位子插入目標序列造成的單股 DNA 斷裂 (staggered break) 所引起的⁽²²⁾。此 DR 的缺乏可能是由於位在基因組上不同的轉位子間發生基因重組現象，並且在不相似的相鄰序列間也有可能發生轉位子所主導的缺失 (IS-mediated deletion) 現象；但此缺失現象在非複製型 (non-replicative transposition) 轉位現象中比較少見⁽²¹⁾，在複製型轉位 (duplicative intramolecular transposition) 中則比較可能出現⁽²⁶⁾。不同轉位子間對目標序列的選擇各有不同，目前對於插入點偏好性之相關報告多由個別的轉位現象之統計結果 (population-based methods) 得來⁽¹⁶⁾。因此，對於此新插入序列 *ISXCD1* 目標序列的選擇是否具備偏好性，仍須更多研究統計資料，方能

做出結論。

配合現有的分類方式，轉位子似乎能將一些菌種區分至不同地緣區域分離株之層次，其應用的方式包括簡易的南方氏雜配法、鑑識酵素多型性片段分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、或 PCR 等方式。因轉位子在各分離株中分佈位置不一，致使其增幅產物呈多型性現象，如此可用來鑑別各分離株。部分轉位子因具種間專一性，可配合專一性偵測之用，例如動物病原菌 *Mycobacterium tuberculosis* 的轉位子 *IS6100*，可配合聚合酵素連鎖反應快速偵測病原菌⁽²⁵⁾。此外，也能利用轉位子之轉位作用引起之突變，從事基因功能之研究⁽¹³⁾。在本研究中，嘗試藉由瞭解 *ISXCD1* 於各分離株基因組之分佈窺知其與地域性之關聯，但研究結果顯示其間並無明顯相關性。

經由南方氏雜配實驗及 PCR 測定顯示 *ISXCD1* 似乎普遍存在 *Xanthomonas* 屬細菌中，故若欲解決在專一性上之問題，則有待專一性之尋找，因相較於一般使用於偵測病原菌之核酸探針序列 (例如：rDNA spacer region、特殊代謝基因或毒性因子)，轉位子存在基因組中的重複性較高，故能提高偵測之敏感性，甚具應用價值。其實，同一轉位子在基因組上不同位置或在不同菌株中，每個套組間仍然有可能具有數個鹼基上之差異⁽³¹⁾，由於聚合酵素連鎖反應在偵測上敏感度及專一性較高，引子對的設計常僅需數個核苷酸的差異，即可利用調整反應的條件而達成專一性之反應結果。因此，轉位子之核苷酸序列在專一性聚合酵素連鎖反應引子對的設計上，仍深具潛力。

謝 辭

本研究承農業試驗所許秀惠小姐與台灣糖業公司方金國博士提供實驗菌株，加州大學 Dr. C. I. Kado 提供質體 pUCD800，中興大學分生所陳建華博士提供技術支援，謹此致謝。

引用文獻

1. 林貝珊、林長平. 2002. 火鶴花細菌性葉枯病原菌 PCR 引子之研發與應用. 植病會刊 11: 97-106。
2. 許秀惠. 1994. 臺灣花卉之細菌病害. 臺灣花卉病蟲害研討會專刊. 中華植物保護學會特刊新二號. 中華植物保護學會編印. p. 63-75。
3. 許秀惠、黃秋雄. 1991. 火鶴花之細菌性葉枯病. 植物保護學會會刊 33: 421(摘要)。
4. Berthier, Y., Thierry, D., Lemattre, M., and Guesdon, J.-L. 1994. Isolation of an insertion sequence (*IS1051*) from *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* with potential use for strain identification and characterization.

- Appl. Environ. Microbiol. 60: 377-384.
5. Besemer, J., Gortz, G., and Charlier, D. 1980. Deletions and DNA rearrangements within the transposable DNA element IS2. A model for the creation of palindromic DNA by DNA repair synthesis. *Nucleic Acids Res.* 8: 5825-33.
 6. Bik, E. M., Gouw, R. D., and Mooi, F. R. 1996. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identified epidemic strains. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1453-1461.
 7. Califano, J. V., Arimoto, T., and Kitten, T. 2003. The genetic relatedness of *Porphyromonas gingivalis* clinical and laboratory strains assessed by analysis of insertion sequence (IS) element distribution. *J. Periodont. Res.* 38: 411-416.
 8. Chase, A. R., Stall, R. E., Hodge, N. C., and Jones, J. B. 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological, and fatty acid analyses. *Phytopathology* 82: 754-759.
 9. Chen, J. H., Hsieh, Y. Y., Hsiau, S. L., Lo, T. C., and Shau, C. C. 1999. Characterization of insertions of IS476 and two newly identified insertion sequences, IS1478 and IS1479, in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* 181: 1220-1228.
 10. Fu, R., and Voordouw, G. 1998. ISDI, an insertion element from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structure, transposition, and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 53-61.
 11. Gay, P., Coe, D. L., Berkelman, T., and Kado, C. I. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164:918-921.
 12. Gomez, P., Ribas-Aparicio, R. M., Pelaez, A. I., and Rodicio, M. R. 1999. Characterization of IS1389, a new member of the IS3 family of insertion sequences isolated from *Xanthomonas campestris* pv. *amaranthicola*. *Arch. Microbiol.* 172: 15-21.
 13. Guilhot, C., Ota, I., van Rompaey, I., Martin, C., and Gicquel, B. 1994. Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. *J. Bacteriol.* 176: 535-539.
 14. Lin, T. H., Tsai, K. C., and Lo, T. C. 2003. Homology modeling of the central catalytic domain of insertion sequence ISLC3 isolated from *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Protein Engineering* 16 (11): 819-829.
 15. Lipp, R. L., Alvarez, A. M., Benedict, A. A., and Berestecky, J. 1992. Use of monoclonal antibodies and pathogenicity tests to characterize strains of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* from aroids. *Phytopathology* 82: 677-682.
 16. Mahillon, J., and Chandler, M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:725-774.
 17. McCulloch, L., and Pirone, P. P. 1939. Bacterial leaf spot of dieffenbachia. *Phytopathology* 29: 956-962.
 18. Nishijima, W. T. 1988. Anthurium blight: An overview. Pages 6-8 in: *Proc. Anthurium Blight Conf.*, 1st. A. Alvarez, ed. HITAH Journal Series 02.04.88. University of Hawaii at Manoa, Honolulu.
 19. Ochman, H., Gerber, A. S., and Hart, D. L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.
 20. Priefer, U.B., Kalinowski, J., Rieger, B., Heumann, W., and Puhler, A. 1989. ISR1, a transposable DNA sequence resident in Rhizobium class IV strains, shows structural characteristics of classical insertion elements. *Plasmid* 21: 120-8.
 21. Roberts, D. E., Ascherman, D., and Kleckner, N. 1991. IS10 promotes adjacent deletions at low frequency. *Genetics* 128: 37-43.
 22. Sekine, Y., Eisaki, N., and Ohtsubo, E. 1996. Identification and characterization of the linear IS3 molecules generated by staggered breaks. *J. Biol. Chem.* 271: 197-202.
 23. Stanley, J., Baquar, N., and Threlfall, E. J. 1993. Genotypes and phylogenetic relationships of *Salmonella typhimurium* are identified by molecular fingerprinting of IS200 and 16S rrn loci. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1133-1140.
 24. Steibl, H. D., Lewecke, F. M. 1995. IS1222: analysis and distribution of a new insertion sequence in Enterobacter agglomerans 339. *Gene* 156: 37-42.
 25. Thierry, D., Brisson-Noel, A., and Mekalanos, J. J. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2668-2673.
 26. Ton-Hoang, B., Polard, P., and Chandler, M. 1998. Efficient transposition of IS911 circles in vitro. *EMBO J.* 17: 1169-1181.
 27. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
 28. Watson, R. J., and Wheatcroft, R. 1991. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* insertion sequence

- ISRm1*: homology to IS2 from *Escherichia coli* and IS426 from *Agrobacterium tumefaciens*. DNA Seq. 2:163-172.
29. Wei, H. C., and Lin, C. P. 2004. Cloning and sequencing of extrachromosomal DNA and insertion sequence of phytoplasma associated with peanut witches' broom using readom sequencing. Plant Pathol. Bull. Taiwan 13: 125-136.
30. Wilson, K. 1994. Preparation of genomic DNA from bacteria. Pages 2.4.1-2.4.5 in: Current Protocols in Molecular Biology. Janssen, ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
31. Zheng, J., and McIntosh, M. A. 1995. Characterization of IS1221 from *Mycoplasma hyorhinis*: expression of its putative transposase in *Escherichia coli* incorporates a ribosomal frameshift mechanism. Mol. Microbiol. 16: 669-685.
32. Zuerner, R. L., Alt, D., and Bolin, C. A. 1995. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. J. Clin. Microbiol. 33: 3284-3289.

ABSTRACT

Lee, C. J.¹, Liu, H. L.¹, and Lin, C. P.^{1,2} 2004. Isolation and characterization of a new insertion sequence, *ISXCD1*, from *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, the causal agent of anthurium blight. *Plant Pathol. Bull.* 13:219-232. (¹Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R. O. C.; ² Corresponding author, E-mail: cplin@ntu.edu.tw; Fax: +886-2-23661980)

A new insertion sequence, *ISXCD1*, is successfully isolated from *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (XAD) by disrupting the *sacBR*-harboring plasmid, pUCD800, which was introduced into XAD via electroporation. Based on restriction enzyme analyses, the plasmids isolated from 186 sucrose-resistant colonies are divided into three classes: insertions in the *sacBR* element of pUCD800 (18.8%), no noticeable change in the structure of pUCD800 (38.2%), and rearrangement of pUCD800 (46.77%). *ISXCD1* (accession no. AF263433) is identified from the insertions of the *sacBR* element. *ISXCD1* is 1,203 bp in size, contains 38 bp inverted repeats with 11 bp mismatches at its termini, and carries two overlapping open reading frames (*orfA* and *orfB*) with an A₇T motif in the overlapping region. It generated 4-bp target site duplication after transposition. The deduced amino acid sequences of *orfA* and *orfB* contained a potential helix-turn-helix motif and a DDE domain of transposases, respectively. *ISXCD1* is present about 9-11 copies in the XAD genome according to the results of Southern hybridization. Southern hybridization analyses also reveal *ISXCD1* is widely distributed in G (-) and G (+) bacteria. Sequence analysis of five IPCR products obtained from various *ISXCD1*-inserted locations of genome indicated there is no preferred target sequence for its transposition.

Key words : anthurium blight, insertion sequence (IS), inverse polymerase chain reaction (IPCR)