

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys musiformis* 之 cDNA 基因庫之建立及其功能性基因之選殖、特性界定(2/2) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-002-037-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學植物病理與微生物學系暨研究所

計畫主持人：曾顯雄

計畫參與人員：碩士級-專任助理：蕭至君、陳良坤
博士班學生：曾昱、周子禾
碩士班學生(已畢業)：宋蕙菁

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 11 月 07 日

目錄

| | |
|--------------|----|
| 中文摘要 | 2 |
| 英文摘要..... | 3 |
| 前言 | 4 |
| 研究目的 | 5 |
| 材料與方法 | 5 |
| 結果與討論 | 8 |
| 計畫成果自評 | 9 |
| 參考文獻 | 9 |
| 圖 | 13 |
| 表 | 16 |
| 附錄 | 20 |

中文摘要

線蟲捕捉菌 *Arthrobotry musiformis* 侵染線蟲時會形成捕捉網，而此捕捉構造在營養菌絲並不出現，經線蟲誘導方可產生。為探討其侵染線蟲時基因的表現與調控，故以受誘導而產生捕捉構造 *A. musiformis* 建構 subtracted cDNA 基因庫。在受誘導扣除未誘導的 cDNA 基因庫 (T-NT subtracted cDNA library) 中分析、比對後得到 770 個預測性基因，在未受誘導扣除受誘導的 cDNA 基因庫 (NT-T subtracted cDNA library) 中得到 245 個預測性基因。在 T-NT subtracted cDNA library 中，序列經比對後 E-value 小於-5 的序列共有 255 條，其中有 106 條序列為與 manganese superoxide dismutase 相關，約佔總序列數的 13.7%，故針對此基因設計專一性引子對，經由 rapid amplification of cDNA ends 已獲得長度一為 827bp 的 cDNA 序列，於 NCBI 比對亦顯示與 Mn SOD 具極高相似性。SOD 所扮演之角色將藉由基因破壞加以驗證。此外也由所建構之 Fosmid library，以 lectin, fimbrin, β -1, 3-glucanase, proteasome 之基因片段，經 DIG 標識後，當為探針進行菌落雜合，皆有信號顯示，再經 PCR 增幅，也證實有此等基因之產物。此等 Fosmid clones，將在建構散彈槍基因庫，以解析界定其所涵蓋之基因種類及功能。

關鍵詞：線蟲捕捉菌、*Arthrobotry musiformis*、扣減式互補核酸基因庫、長核酸片段基因資料庫、基因選殖、超歧氧化酶

英文摘要

Nematode-trapping fungus *Arthrobotry musiformis* forms adhesive nets during trapping nematodes. However, the trapping nets are absent in mycelia unless induced by the nematodes preys. Attempt to clarify gene expression and regulation in *A. musiformis* during trapping and penetration of victim, experiments were initiated and approached via construction of subtracted cDNA library. The selected clones were sequenced and annotated by blasting genomic database in NCBI and relevant bioinformatics websites. Totally 770 predicted genes were accessed in the subtracted cDNA library of *A. musiformis* with RNA from traps deducting RNA without traps (T-NT subtracted cDNA library). Additionally, 245 predicted genes were found in NT-T subtracted cDNA library. In the T-NT subtracted cDNA library, there were 255 predicted genes with E value lower than -5 . Among these 255 genes, 106 predicted genes were homologous to manganese superoxide dismutase and represented ca. 13.7% to total genes. A full-length cDNA of 827 bp of superoxide dismutase (SOD) was obtained by rapid amplification of cDNA ends, and the sequence also showed high homologous to manganese superoxide dismutase. The function of SOD will be verified through gene disruption and bioassay of the mutants created. Additionally, several Fosmid clones exhibited positive signal by colony hybridization towards labeled putative lectin, fimbrin, β -1, 3-glucanase and proteome genes were selected and further verified by PCR. The identity and function of genes in those clones will be analyzed further by sequencing of the constructed shotgun library.

Keywords: nematode-trapping fungi, *Arthrobotry musiformis*, subtracted cDNA library, fosmid library, gene cloning, manganese superoxide dismutase

前言

線蟲捕捉菌 (nematode-trapping fungi) 是指線蟲寄生菌中能夠產生捕捉構造捕捉線蟲的捕捉性真菌。捕捉構造則有非收縮環、收縮環、黏著球、黏性捕捉柱 (梯狀構造或二度空間黏著網)、黏性捕捉網等幾類，多數不需經誘導就能產生，有些則需經誘導才會產生。本實驗所用的菌株 *Arthrobotrys musiformis* 為一可形成三度空間立體網狀捕捉構造 (捕捉網) 的線蟲捕捉菌，此捕捉構造為營養菌絲所欠缺，須經誘導才能形成。

捕捉網中另有許多細胞器 (organelles)，被稱為 dense bodies 或 electron-dense vesicles (濃電子微囊狀體，150–300 nm)，侵入菌絲及營養菌絲則無。在 *A. oligospora* 中，dense bodies 由內質網形成，並在第一個捕捉網細胞形成時就可發現。它的功能可能是過氧化氫酶體 (peroxisome)，因為具有過氧化氫酶 (catalase) 及胺基酸氧化酶 (D-amino acid oxidase) 活性 (Dijksterhuis *et al.*, 1994)。當線蟲與捕捉網接觸時，這些細胞器似乎將其內容釋放到原生質中，至線蟲被菌絲侵入後，這些胞器就不見了。在 Nordbring-Hertz 的觀察中，顯示這些胞器帶有水解酵素，與捕捉網的快速形成有關，同時，由於只有當線蟲存在時能刺激 vesicles 及濃電子體出現，顯示在濃電子體中有胞外酵素存在 (Nordbring-Hertz and Stålhammar-Carlemalm, 1978)。但是，往後的細微構造研究顯示，dense bodies 隨著侵入管 (penetration tube) 的形成而消失，因此認其功能為提供形成入侵菌絲所需的能量或物質，以及侵入過程中分泌的水解酵素 (Veenhuis *et al.*, 1989; Tunlid *et al.*, 1991)。在 Heintz 及 Pramer 的觀察中，*Dactylella drechsleri* 的黏著球及 *Monacrosporium rutgeriense* 的黏著網也有濃電子微囊狀體的出現 (Nordbring-Hertz and Stålhammar-Carlemalm, 1978)。Tzean and Estey (1979) 於探討多種線蟲捕捉菌之微細構造時，也發現，不論黏著球、黏性捕捉柱或二度空間黏著網，胞內均有顯著之濃電子微囊體構造。此外，在 Nordbring-Hertz 及 Stålhammar-Carlemalm (1978) 的觀察中亦指出，兩者的細胞壁厚度不同，捕捉網的細胞壁厚度通常為營養菌絲四至五倍。本實驗目的在以經由建構 subtracted cDNA library 的方式，找出形成捕捉構造、甚或侵染線蟲過程中差異表現基因。

研究目的

線蟲捕捉菌，如可產生捕捉網之 *Arthrobotrys musiformis*，如何黏著、侵染植物寄生性線蟲，其隱藏於此之生物現象後之分子機制，饒富學術探討旨趣，而所獲得之相關知訊、亦具生技或於轉殖基因植物，以抗線蟲之侵染之應用潛能。故不論基礎學理探討或未來可能之田、林間之生物防治植物病原線蟲之實際應用觀點而言，此一議題深值探討。

材料與方法

菌種與培養

實驗菌絲 *Arthrobotrys musiformis* BCRC 32744 為台灣大學植微所應用真菌研究室所分離、純化、鑑定、保存於新竹食工所生物菌源保存與研究中心 (BCRC)。以 LNM (low nutrition medium: 每公升含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、KCl 1 g、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.03 g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8 mg、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.4 mg、Thiamin-HCl 0.2 mg、Biotin 5 μ g，調整至 pH 6.5，加入 1.5% agar) 加 0.1% peptone 為培養基，並鋪上玻璃紙 (cellophane membrane)。將 *A. musiformis* 接種於玻璃紙上，每皿接種四點，於室溫下培養四天，其後每皿加入約 8000 隻松材線蟲以誘導捕捉網的產生，室溫下培養一天即可見到捕捉網形成。

RNA 萃取

分別刮下有誘導及無誘導捕捉網的菌絲，經冷凍乾燥後，保存於 $-80^\circ C$ ，用於萃取 RNA。取冷凍乾燥菌絲 0.25 克，以液態氮研磨成粉狀，待液態氮揮發後加入 7.5ml TRIZOL (Invitrogen) 試劑，於室溫下處理 5 分鐘。加入 2ml chloroform，翻轉 15 秒使混合均勻，並置於室溫下處理 10 分鐘。以 12,000g、 $4^\circ C$ 離心 15 分鐘，吸取上層液至新離心管，加入 5ml isopropanol。混合均勻並置於室溫 10 分鐘，以 12,000g、 $4^\circ C$ 離心 15 分鐘，則 RNA 沉澱。除去上清液後，加入 10ml 75% ethanol，於 $4^\circ C$ 以低於 7,500g 的速度離心 5 分鐘。重覆酒精清洗步驟三次後，吸去殘餘酒精，於無菌接種箱室溫下風乾 RNA 沉澱 5-10 分鐘。以 100 μ l DEPC-treated water 懸浮 RNA，測量濃度、純度，並進行電泳檢測。電泳以含有 formaldehyde 的 1.0% agarose gel，以 5 V/cm 的電壓進行。

Subtracted cDNA library 建構與分析

分別萃取有或無誘導捕捉網產生之菌絲的 RNA，再利用 PolyAtract[®] mRNA Isolation Systems (Promega) 各分離 2 μ g mRNA 後，使用商品化套組 PCR-Select[™] cDNA Subtraction (Clontech) 進行 subtraction，並以 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) 建構 cDNA library。任意挑選 clones 進行定序，並扣除載體及 adaptor 序列後至 NCBI 網站以 blastx 進行序列比對及分析。

Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

利用 GeneRacer (Invitrogen)、SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD) 及 Advantage 2 PCR Kit (BD), 依使用手冊所述, 分別合成 5'-RACE 及 3'-RACE 所需 cDNA, 再以 kit 所附 universal primer mix, 及依 clone 4-8 插入序列所自行設計的 antisense primer 5'-AAGGAGCCGTATTCCTTTTCGATGGC、sense primer 5'-CCAAGCATCACGCAACATACATTGCG, 進行 PCR 反應快速增幅 cDNA 兩端。反應條件分別如下: 5'-RACE: 94°C 2 分鐘、5 cycles (94°C 30 秒、72°C 1 分鐘半)、5 cycles (94°C 30 秒、70°C 1 分鐘半)、25 cycles (94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分鐘半)、72°C 10 分鐘; 3'-RACE: 94°C 4 分鐘、25 cycles (94°C 30 秒、68°C 30 秒、72°C 3 分鐘)、72°C 7 分鐘。

獲得的 PCR 產物分別定序後, 進行序列組合及比對等分析工作。

Reverse transcription PCR (RT-PCR)

萃取之 total RNA 以 RNase A (BD) 於 37°C 處理 1 小時, 利用 SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD) 將其合成第一股 cDNA, 再以根據 subtracted cDNA 基因庫之序列設計各基因專一性的引子對進行 PCR 以增幅各基因片段, 其後以 pGEM T-Easy vector (Promega) 進行 TA cloning.

Fosmid colony hybridization

雜合反應

配製 60 ml 雜合液 (Formamide (Sigma) 30 ml、20X SSC (Biomann) 15 ml、10% blocking reagent (附錄一) 12 ml、1% N-lauroylsarcosine (Sigma) 6 ml、10% SDS (Amresco) 120 μ l), 風乾的尼龍膜先以 2xSSC 充分潤濕後, 將尼龍膜捲起置入雜接管內, 有核酸的面朝內, 加入 60 ml 雜合液於 42°C, 8 rpm, 2 小時以進行 prehybridization (避免氣泡在尼龍膜上附著)。之後, 加入已變性探針約 10-15 μ l 至雜合液中, 於 42°C, 8 rpm 以進行雜合反應 18 小時 (新製備的探針必須先於 96°C 中加熱 10 分鐘以進行變性處理, 變性後立即放入冰中, 防止回復成雙股; 含探針之 hybridization buffer 可以保存於 -20°C, 待下次使用, 可使用 3 次, 下次若使用同一種探針, 可配新的雜合液, 進行 prehybridization, 再將雜合液倒掉, 再加入經 68°C 煮 10 分鐘之舊的含探針之雜合液)。

嚴苛度漂洗

取出尼龍膜, 以 2xSSC/0.1% SDS 於室溫振盪漂洗 5 分鐘 (約 100 ml), 2 次再以 0.1xSSC/0.1% SDS 於 60°C 漂洗 15 分鐘 (約 100 ml), 2 次 (高嚴苛度漂洗之 SSC 濃度以及漂洗溫度, 視非專一性反應而定。SSC 濃度愈低及漂洗溫度愈高, 去除非專一性反應的效果愈強。一般而言, SSC 濃度使用 0.1x 至 0.5x 之間, 漂洗溫度介於 55°C 至 68°C 之間)。將尼龍膜依序放入 Buffer I (附錄一) (1 ml/cm membrane, 故約需 200 ml) 震盪漂洗 1 分鐘, 加入 Buffer II (附錄一) (1

ml/cm² membrane，故約需約 100 ml) 震盪漂洗 30 分鐘，再放入含 alkaline phosphatase(AP) conjugate Anti-DIG Ab(Roche)的 Buffer II (比例為 1 µl Anti-DIG AP : 20 ml Buffer II, Fosmid 尼龍膜約需 5 µl Anti-DIG AP : 100 ml Buffer II) 中於室溫振盪作用 30 分鐘 (含 AP 的 Buffer II 可回收保存於 4°C, 24 小時內仍可使用)。之後，以 Buffer I (1ml/cm² membrane, 約 200 ml) 漂洗尼龍膜 15 分鐘, 2 次 (此步驟後，若不立即進行訊號偵測，可將尼龍膜保存於 Buffer I, 4°C 中)。最後，將尼龍膜夾起，在濾紙上稍微蔭乾。

訊號偵測

在壓片匣中攤開剪開的 A4 資料袋，於含有核酸之尼龍膜滴上約 1000 µl CDP-Star Ready-to-use (Roche)，閤上資料夾，以擦手紙擦拭資料袋以趕除膜內氣泡並吸去多餘 CDP-Star (CDP-Star 置於冰上保存)。將資料袋翻面以便使尼龍膜有核酸的面朝上，於暗室中取出底片，置於資料夾上，閤上壓片匣，開始計時壓片 (務必將底片作記號以及和尼龍膜的相對位置；壓片時間一般約 30-60 分鐘，但可依據訊號反應的強弱作調整)。取出底片，依序置入各溶液中震盪，顯影液 (附錄一) 40 秒、水 60 秒、定影液 (附錄一) 40 秒、水 60 秒，最後以自來水流洗數分鐘，即可觀察結果 (顯影液和定影液可用數次後再更換)。

去除膜上探針

以 Buffer III (附錄一) 於室溫下震盪 10 分鐘以漂洗尼龍膜，兩次，以 ddH₂O 漂洗 1 分鐘後，以 5X SSPE (附錄一) 室溫下震盪分鐘，兩次。最後，尼龍膜放置於無菌箱吹乾，約需 3 小時。最後，將尼龍膜收置於 4°C，以備後續重複使用。

菌落增幅反應 (Colony PCR)

在之前的 Fosmid library 雜合反應中，fimbrin, lectin, β-1, 3-glucanase, proteosome 等探針有雜合訊號者，挑取菌落後點在含有 12.5 µg/ml chloramphenicol 之 LB agar 上，於 37°C 下培養 overnight 後，以 colony PCR 進行初步確認，以進行後續 primer walking 及定序等實驗。配製 Master Mix，配方為：10X PCR Buffer 2.5 µl、dNTP (10mM) 1.0 µl、primer 1 (20µM) 1.0 µl、primer 2 (20µM) 1.0 µl、ddH₂O 19.7 µl。接著，將前一晚培養之菌落經由 200µl tip 點取後，於 master mix 中進行 pipetting，確認菌泥有混入 master mix 中後，加入 0.3 µl Taq polymerase (GENET BIO Prime TaqTM DNA Polymerase, 2U/µl)，經短暫離心，使用 Biometra T3 Thermocycler 進行 PCR，program 為 95°C, 1min, 1 cycle; 95°C, 30 s, X °C, 30 s, 72°C, 1 min/kb, 30 cycles; 72 °C, 7 mins; 4 °C, pause (annealing temperature 的部分，如同之前在 Virtual Northern 所記載之各基因黏合溫度)。最後，以 1.5% agarose gel 100V, 25 分鐘電泳分析。

結果與討論

Subtracted cDNA library

定序並扣除載體後，T-NT 共有 770 條序列、NT-T 共有 245 條序列完成序列比對。在 T-NT 中，E-value 小於 $1e-20$ 者約占 15.46%，介於 $1e-10\sim 1e-20$ 者約占 7.14%，介於 $1e-5\sim 1e-10$ 者約占 10.52%，E-value 大於 $1e-5$ 者約占 66.88%；而在 NT-T 中，E-value 小於 $1e-20$ 者約占 16.74%，介於 $1e-10\sim 1e-20$ 者約占 12.24%，介於 $1e-5\sim 1e-10$ 者 9.39%，E-value 大於 $1e-5$ 者約占 61.63% (Fig.1)。此結果顯示佔百分之六十以上差異表現性隻基因於 NCBI 之基因資料庫中找不到同源性較高之基因序列，換言之，此等基因應於線蟲捕捉菌較具特異性 (unique)，是值得應用不同之方法，如 AMT (Agrobacterium-mediated transformation) 進行基因破壞，產生變異菌株，再由其基因型 (genotype) 或表現型 (phenotype) 之檢測、分析驗證此等基因之功能。在組成 contigs 方面，T-NT 可分成 91 個 contigs 及 20 個單條序列，而 NT-T 則可分成 49 個 contigs 及 101 個單條序列 (Fig.1)。

依 Carlsson 及 Stenlid (2003) 所述，E-value 小於 -19 為 high significant，E-value 介於 -5~-9 為 moderately significant，E-value 介於 -2~-4 為 weakly significant，E-value 大於 -2 為 non-significant。在本實驗中，T-N 序列經比對後 E-value 小於 -5 的序列共有 255 條 (Table 1)，其中有 58 條序列為 manganese superoxide dismutase precursor，且 E-value 幾乎都在 $2E-55$ 左右，其次為 manganese superoxide dismutase (Mn SOD)，共 48 條，E-value 大幾乎都在 $1E-9$ (Table 2)。綜合而言，與 SOD 相關的序列約占 E-value < -5 序列的 47.1%、總序列數的 13.7%。與 class III chitinase 基因片段相似的序列之 E-value 雖皆大於 -5 (介於 0.0009 至 5 之間)，但數目亦有 99 項，N-methyl D-aspartate receptor 2B 基因相似序列則有 28 條 (E-value 介於 0.0008 至 1.4 之間)，photosystem II protein D1 基因片段相似的序列則有 62 項 (E-value 介於 $3.00E-5$ 至 1.2 之間，其中 13 條小於 $9.00E-05$)。此數據顯示超歧氧化酶 (SOD) 其於線蟲捕捉菌，不論是於捕捉構造之誘發產生，或是於侵染線蟲寄主所扮演之角色，皆深值以前述之方法、途徑進行探討，此外有一群 hypothetical proteins 其出現表現頻率，甚至比 SOD 高出兩倍，此等基因所扮演之生理功能亦深值探討。此外，由註解分析產生捕捉網 subtracted cDNA 基因 (Fig.2, 3)，於 cellular, binding, catalytic activity, transcription regulation, cellular process, physiological process 皆比無產生捕捉網出現更多之 copy number，似具更多生理活性 (Table 1, Fig.3, 4)，此也意指此等基因所轉錄之蛋白質或酵素對於其捕捉侵染線蟲時，扮演了一定之功能和活性。

RACE

由於 T-NT subtracted cDNA library 中 Mn-SOD 數目最多，並且經 Northern hybridization 確認在有捕捉網時表現量大增，故以其中一段相似序列，clone 4-8 插入序列，進行 RACE 以找出與 SOD 相似序列的 mRNA 全長。重疊 5'-及 3'-RACE

後，已獲得長度為 827bp 的 cDNA 序列，NCBI 比對亦顯示與 Mn SOD 具極高相似性(Table 3)。Fang 等人的研究中 (2002)，發現 *Colletotrichum graminicola* 之 SOD2 基因 (encoding MnSOD) 的轉錄與卵孢子及分生孢子的形成有密切關聯。他們認為 SOD2 的表現量增加，可能與調控產孢過程中訊息傳導途徑中的氧壓力有關，如同在 *Neurospora crassa* 中，氧壓力在產孢過程所占重要調控角色一般。

RT-PCR

此外亦由 T-NT 以及 NT-T 之 subtracted cDNA library 中選取 aminopeptidase、fimbrin、proteasome、ubiquitin 及 actin、S-adenosylmethioinine synthetase 設計專一性引子對，並已獲得預計部分序列，並且於 NCBI 資料庫比對，確定具預期基因之假設性功能，目前進行其 virtual Northern 以檢測此等基因之差異性表現以及其所蘊涵之意義。

Fosmid library

選擇某些指標性之假設性基因，如 lectin, fimbrin, β -1, 3-glucanase, proteasome 和已建構之 Fosmid library 進行雜合，由呈現訊號之選殖株 (clones)(Table.4)，以此等具專一性之引子進行 PCR 增幅檢測，也證實了這些 Fosmid clones 都含有這些基因(Fig.5)，這些 clones 正進行 shotgun library 之建構，將來解序、註解完成後，將可瞭解和黏著、侵染有關之基因是否有形成基因串之情形，以進一步選殖和功能性界定。

計畫成果自評

初階之試驗似符合當初研擬計畫所擬定之目標，如 SOD 或 protease 等皆已獲得 cDNA 全長度，在完成基因破壞、功能性界定之後，所得較為完整之數據後，將此成果發表，以提供學界或相關學術研究單位或人員參酌。此外，chitinase, β -1, 3-glucanase, fimbrin 等基因亦有初階之瞭解，往後將在 fosmid clone 解序後繼續探討，待內容完整，也將發表可資說明其於黏著侵染線蟲所具之功能。

參考文獻

- Ahman, J., B. EK, L. Rask and A. Tunlid 1996. Sequence analysis and regulation of a cuticle degrading serine protease from the nematophagous fungus *Arthrobotrys ologospora*. *Microbiology* 142: 1605-1616.
- Ahman, J.m T. Johansson, M. Olsson, P. J. Punt, Cees. A.M.J.J. van den Hondel, and A. Tunlid. 2002. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of asubtilion with nematotoxic activity. *Appl. Environ.*

Microbiol. 68: 3408-3415.

Balogh, J., A. Tunlid, and S. Rosen 2003. Deletion of a lectin gene does not affect the phonotype of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Fungal Gen Biol 39: 128-135.

Bird, J., and R.P. Herd. 1995. In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. Veterinary Parasitology 56: 181-187

Chen, J.L., T.L. Huang and S.S. Tzean. 1998. *Dactylella huisuniana*, a new nematode-trapping fungus from Taiwan. Mycological Research 102: 1269-1273.

Chen, T.H., C.S. Hsu, P.J. Tsai, Y.F. Ho, and N.S. Lin. 2001. Heterotrimeric G-protein and signal transduction in the nematode-trapping fungus. *Arthrobotrys dectyloides*. Planta 212: 858-863.

Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., Harder, W., and Nordbring-Hertz, B. 1994. Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships. Adv. Microb. Physiol. 36: 112-143.

Fang, G-C., Hanau, R. M., and Vaillancourt, L. J.. 2002. The *SOD2* gene, encoding a manganese-type superoxide dismutase, is up-regulated during conidiogenesis in the plant-pathogenic fungus *Collectotrichum graminicola*. Fungal Genetics and Biology 36: 155-165

Flores-Crespo, J., P. Mendoxa de Gives, E. Liehano-Hernandez, V.M. Vazquez-prats, M.E. Lopez-Arelano. 2003. The predatory capability of three nematophagous fungi in the control of *Hahmanchus contortus* infective larvae in ovine faeces. J. Helminthology 77: 297-303.

Hay, F.S., J.H. Nizen, C. Miller, L. Bateson, and H. Robertson, 1997. Infestation of sheep dung by nematophagous fungi and implication for the control of free-living stages of gastro-intestinal nematodes. Veterinary Parasitology 70: 247-254.

Liou, J.Y., and S.S. Tzean. 1992. Stephanocyst as nematode-trapping and infecting propagules. Mycologia 84: 786-790.

Liou, G.Y., and S.S. Tzean. 1997. Phylogeny of *Arthrobotrys* and allied nematode trapping fungi based on rDNA sequences. Mycologia 89: 876-884.

- Liou, J.Y., J. Y. Shih and S.S. Tzean. 1999. *Esteya*, a new genus of nematophagous fungus from Taiwan, attacking, pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Mycological Research* 103: 242-248.
- Liou, J.Y., G.Y. Liou and S.S. Tzean. 1995. *Dactylella formosana*, a new nematode-trapping fungus from Taiwan. *Mycological Research* 99: 751-755.
- Nordbring-Hertz, B., and Stålhammar-Carlemalm, M. 1978. Capture of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*, an electron microscope study. *Can. J. Bot.* 56: 1297-1307.
- Persmark, L., and N. Nordbring-Hertz. 1997. Conidial trap formation of nematode-trapping fungi in soil and soil extracts. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 313-323.
- Rosen, S., M. Kata, Y. Persoon, P. H. Lipniunas, M. Wikstorm, C.A. M.J.J. Van Hondel, J.M. van den Brink, L. Rask, L-O. Heden and A. Tunlid 1996. Molecular characterization of a saline-soluble lectin from a parasitic fungus extensive sequence similarities between fungal lectins *Eur. J. Biochem* 23: 822-829.
- Tikhnov, V. E., L. V. Lopez-Llorca, J. Salinas and H. B. Jansson. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*, *Fungal Genetics and Biology* 35: 67-78.
- Tsai, P.J., Jenn Ju, and T.H. Chen. 2002. Cloning of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase from the filamentous fungus *Arthrobotrys dectyloides*. *FEMS Microbiology letters* 212: 7-13.
- Tunlid, A., J. Ahman and R.P. Oliver. 1999. Transformation of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *FEMS Microbiology Letters*. 173: 111-116.
- Tunlid, A., S. Rosen, E. Bo and L. Rask. 1994. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology* 140: 1687-1895.
- Tunlid, A., Johansson, T., and Nordbring-Hertz, B. 1991. Surface polymers of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J. Gen. Microbiol* 137: 1231-1240.
- Tzean, S. S., and Estey, R. H. 1979. Transmission electron microscopy of fungal

nematode-trapping devices. *Can. J. Plant Sci.* 59: 785-795.

Tzean, S.S., J.S. Liou, G.S. Liou, and Yuan, G.F. 1997. Atlas of Nematophagous Fungi from Taiwan. Food Industry Research & Development Institute Mycological Monograph No. 12. 55pp

Tzean, S.S., and S.S. Tzean. 1993. Nematophagous resupinate basidiomycetes fungi. *Phytopathology* 83: 1015-1020.

Veenhuis, M., Wijk, C. V., Wyss, U., Nordbring-Hertz, B., and Harder, W. 1989. Significance of electron dense microbodies in trap cells of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 56: 251-262.

Zhao, M. G., M. Mo, and K. zhang. 2004. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligespora*. *Mycologia* 96: 16-22.

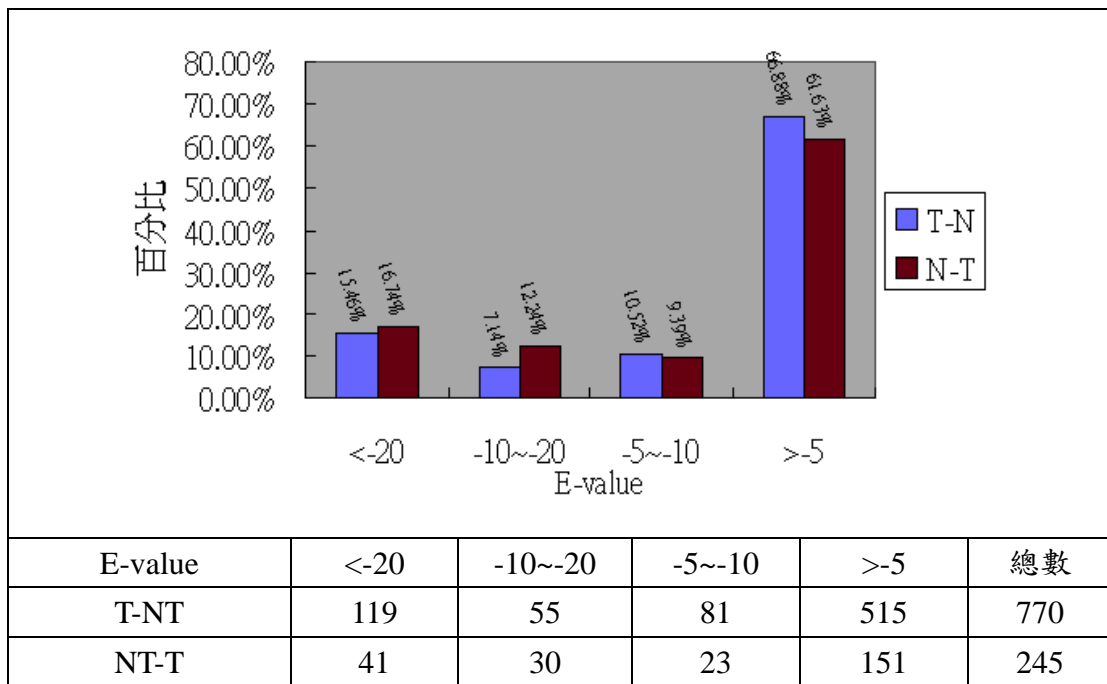


Fig.1. T-NT 之 subtracted cDNA library 之 E-value 數值比例。

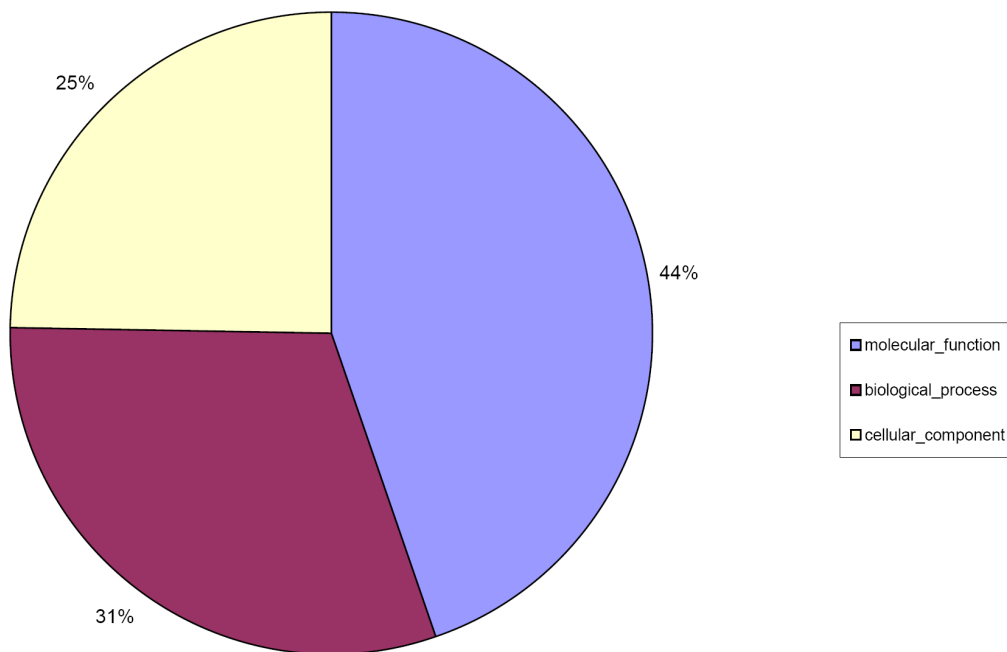


Fig.2. Relative percentage of gene products annotated below molecular function.

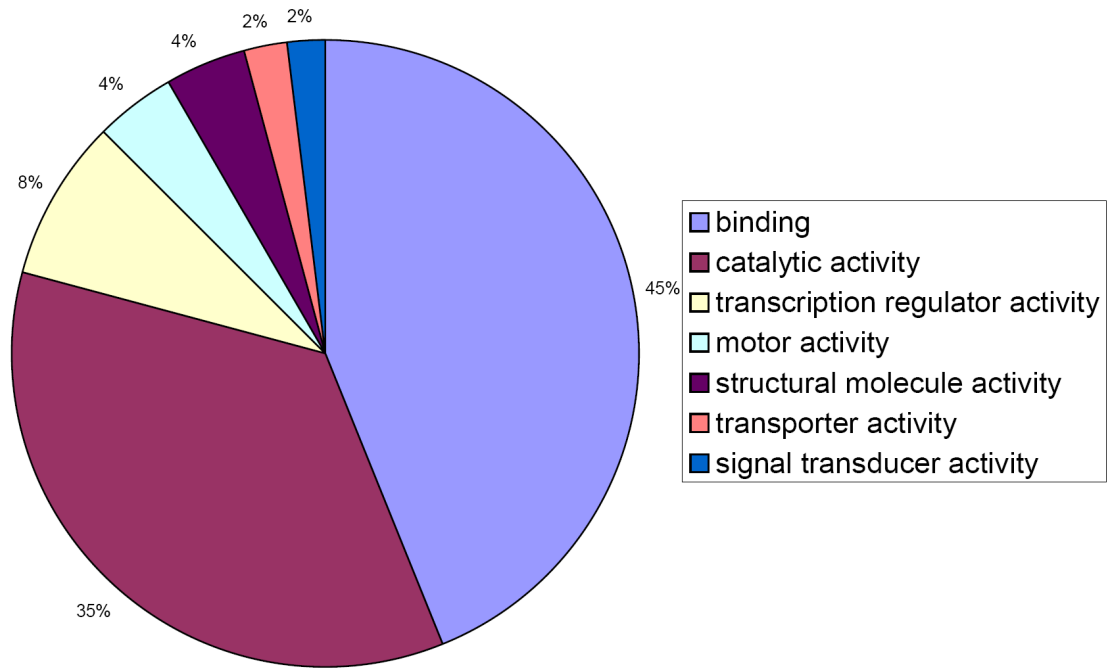


Fig.3. Relative percentage of gene products annotated below gene ontology.

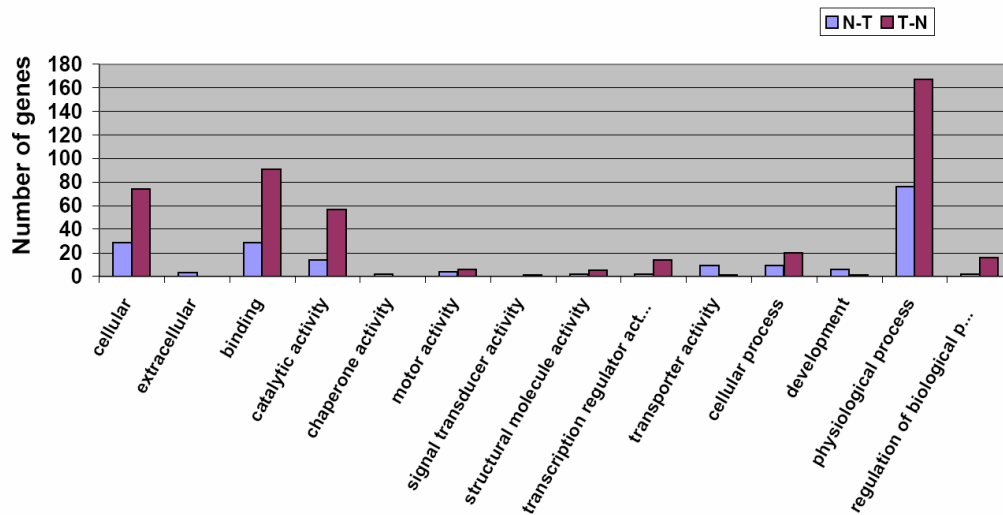


Fig.4. Prevalence annotated gene of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys musiformis* subtracted cDNA library with adhesive net trap minus without adhesive net trap (T-N) or vice versa (N-T).

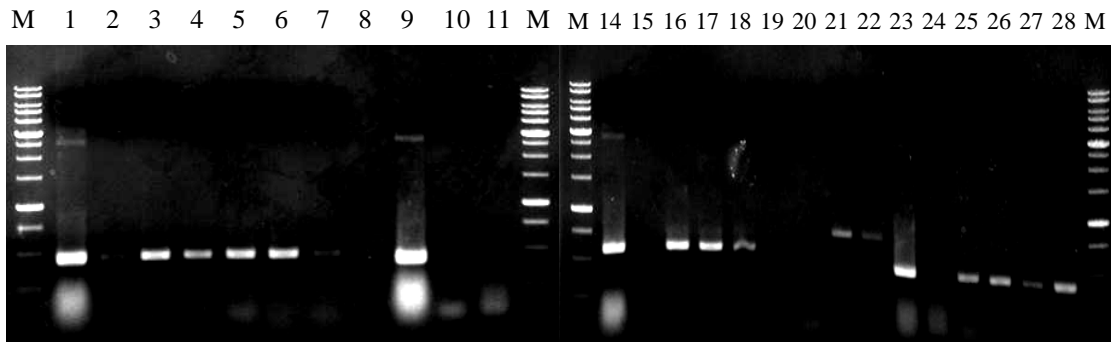


Fig 5. Electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) amplified DNA products from lectin, fimbrin, β -1,3-glucanase and proteasome Southern blot positive fosmid clones by using specific primers, respectively. Lane M: 1Kb marker; Lane 1: Lectin positive control; Lane 2: ddH₂O negative control; Lane 3~7: Fosmid clones amf02013A10, amf02001J15, amf02001G18, amf02009K24, amf02003K24; Lane 9: Proteasome positive control; Lane 10: ddH₂O negative control; Lane 11: amf02019M17; Lane 14: Fimbrin positive control; Lane 15: ddH₂O negative control; Lane 16~22: Fosmid clones amf02009O03, amf02017L01, amf02015A10, amf02004D01, amf02016G22, amf02013B12, amf02019B12; Lane 23: β -1,3-glucanase positive control; Lane 24: ddH₂O negative control; Lane 25~28: Fosmid clones amf02002E05, amf02008E05, amf02001I06, amf02007M11.

Table.1. Annotation of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys musiformis* gene derived subtracted cDNA library with adhesive net trap minus without adhesive net trap (T-N) or vice cersa (N-T).

| Category | Characteristitics | Number of genes | |
|---------------------------|----------------------------------|-----------------|------------|
| | | N-T | T-N |
| Cellular component | cellular | 29 | 74 |
| | extracellular | 3 | 0 |
| molecular function | binding | 29 | 91 |
| | catalytic activity | 14 | 57 |
| | chaperone activity | 2 | 0 |
| | motor activity | 4 | 6 |
| | signal transducer activity | 0 | 1 |
| | structural molecule activity | 2 | 5 |
| | transcription regulator activity | 2 | 14 |
| | transporter activity | 9 | 1 |
| Biological process | cellular process | 9 | 20 |
| | development | 6 | 1 |
| | physiological process | 76 | 167 |
| | regulation of biological process | 2 | 16 |
| | Total | 187 | 453 |

Table.2. The annotated putative gene of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys musiformis* with E value less than < -5 derived from subtracted rDNA library (T-NT).

| Putative gene | 個數 |
|---|-----|
| manganese superoxide dismutase precursor | 58 |
| manganese-superoxide dismutase | 48 |
| hypothetical protein | 109 |
| putative reverse transcriptase | 8 |
| isopentenyl-diphosphate delta-isomerase | 3 |
| mannose phospho-dolichol synthase | 2 |
| conserved hypothetical protein | 2 |
| similar to ubiquitin-conjugating enzyme e2-32k | 2 |
| suppressor of the cold-sensitive snrnp biogenesis mutant brr1-1; sub2p | 2 |
| unknown | 2 |
| gamma-aminobutyric acid transaminase | 1 |
| ubiquitin conjugating enzyme (ubc-3) | 1 |
| probable proteasome subunit alpha type 2 emb cab91760.2 | 1 |
| rla0_neucr 60s acidic ribosomal protein p00 | 1 |
| secretion related gtpase (srgb) | 1 |
| ensangp00000017519 | 1 |
| glutamine synthetase | 1 |
| ubiquitin / ribosomal protein s27a - potato (fragment) | 1 |
| 60s ribosomal protein 115 | 1 |
| nubm_neucr nadh-ubiquinone oxidoreductase 51 kda subunit, mitochondrial precursor | 1 |
| anthranilate synthase component ii | 1 |
| rs9_podan 40s ribosomal protein s9 (s7) | 1 |
| trimethyllysine dioxygenase | 1 |
| chaperonin containing tcp-1 (58.4 kd) (cct-4) | 1 |
| similar to dead/h (asp-glu-ala-asp/his) box polypeptide 16 | 1 |
| unnamed protein product [homo sapiens] | 1 |
| u6 snrna-associated sm-like protein, putative | 1 |
| cg8031-pa | 1 |
| nir_emeni nitrite reductase | 1 |
| muscle protein 684 | 1 |

Table.3. The partial full-length cDNA of managanese superoxidese dismutase of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys musiformis*.

```
241   CCGGCCTCAACGCGGGCGGAGGAGAGCTACGCCAAGGCGCCCTCGCCCAAGGAGCGGATTC  
    · G L N A A E E S Y A K A P S P K E R I L ·  
301   TCCTTCAGCCC GCGCTCAAATTCAATGGCGGAGGTCACATCAATCACTCGCTCTTCTGGA  
    · L Q P A L K F N G G G H I N H S L F W K  
361   AGAACCTTGC GCGCCCAGTCGCAGGGTGGCGGCCAGCTCGCTGCGGGTCCCTTCAAAGATG  
    · N L A P Q S Q G G G Q L A A G P F K D A ·  
421   CAGTAGATGCTGACTTCGGCGGTGTCGATGGCTTGAAGAAGAAATTGAACGCGGCGACAG  
    · V D A D F G G V D G L K K K L N A A T A ·  
481   CTGCCATCCAGGGCTCCGGTTGGGGCTGGCTTGGATAACAATCCGACCACTAAAAAGCTTG  
    · A I Q G S G W G W L G Y N P T T K K L E ·
```

Table 4. Verification of lectin, fimbrin, β -1,3-glucanase and proteasome Southern blot positive fosmid clones of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys musiformis* by specific primers using polymerase chain reaction (PCR), respectively.

| Fosmid clones | Putative genes* | | | |
|---------------|-----------------|---------|--------------------|------------|
| | Lectin | Fimbrin | β -glucanase | Proteasome |
| amf02013A10 | + | | | |
| amf02001J15 | + | | | |
| amf02001G18 | + | | | |
| amf02009K24 | + | | | |
| amf02003K24 | - | | | |
| amf02009O03 | | + | | |
| amf02017L01 | | + | | |
| amf02015A10 | | + | | |
| amf02004D01 | | - | | |
| amf02016G22 | | - | | |
| amf02013B12 | | \pm | | |
| amf02019B12 | | \pm | | |
| amf02002E05 | | | + | |
| amf02008E05 | | | + | |
| amf02001I06 | | | - | |
| amf02007M11 | | | + | |
| amf02019M17 | | | | - |

* +: positive reaction; -: negative reaction; \pm : positive reaction but amplified DNA size larger than expected.

附錄一、實驗試劑配方

1X MOPS running buffer

以DEPC-treated ddH₂O 稀釋10X MOPS running buffer

10X MOPS running buffer

0.2 M MOPS (Sigma)

50 mM Sodium acetate (Sigma)

10 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) (Sigma)

pH 7.0 。需經高溫高壓滅菌

10% (w/v) Blocking reagent

取5 g 的Blocking reagent (Roche) ，加入Buffer
(附錄一) 至50 ml ，經高溫高壓滅菌後保存於4°C

10 mg/ml RNase A

秤取10 mg RNase A 粉末 (BD biosciences) ，溶於1 ml ddH₂O 中，接著以滾水煮10 分鐘以去除可能存在DNase 活性，之後即可使用或保存於-20°C。

20X SSPE

3 M NaCl (Sigma)

200 mM NaH₂PO₄ (Sigma)

200 mM EDTA (Sigma)

pH 7.4

Buffer I

0.1 M Maleic acid (Sigma)

0.15 M NaCl

pH 7.5

Buffer II

10 ml 10% blocking

90 ml Buffer I

Buffer III

100 mM NaOH (Sigma)

10 mM EDTA]

0.1% (w/v) SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Amersco)

DEPC-treated ddH₂O

配製0.1% DEPC (Sigma) 的水溶液並經高溫高壓滅菌

Formaldehyde loading buffer

1 mM EDTA

50% (v/v) Glycerol (Riedel-de Haën)

Formaldehyde loading Dye

1 mM EDTA

50% (v/v) Glycerol

0.25% (w/v) Bromophenol blue (Sigma)

0.25% (w/v) Xylene cyanole FF (Sigma)

TE Buffer

10 mM Tris-HCl

0.1 mM EDTA

pH 7.8

Solution I :

50 mM Glucose (Sigma)

25 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

pH 8.0 (滅菌後保存於4°C)

Solution II :

0.2 M NaOH

1% (w/v) SDS

必須現配，避免NaOH 吸收空氣中的CO₂ 而改變pH 值使得lysis 效果不佳

Solution III :

3.0 M Potassium acetate (Sigma)

11.5 ml Galical acetic acid

加ddH₂O 至100 ml

定影液

Kodafix solution (Kodak) : ddH₂O= 1:3

顯影液

Kodak Developer (Kodak) : ddH₂O= 1:2

A solution: acrylamide/bis-acrylamide (30%/0.8%,w/v)

B solution: 1.5 M Tris-HCl,

pH8.8

0.4% SDS

C solution: 0.5 M Tris-HCl,

pH 6.8

0.4% SDS

20% (w/v) ammonium persulfate (APS) (最好是現配，否則保存在4°C也不要放太久)

10x PAGE running buffer: 30.3g Tris-base

144 g Glycine

10g SDS

Add ddH₂O to 1

L

5x sample buffer:

0.5M Tris-HCl (pH6.8) 2.5 ml

B-mercaptoethanol 1 ml

Glycerol 5 ml SDS 1g

Bromophenol blue 0.005 g

Add ddH₂O to 10 ml