

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

Bacillus 幾丁質分解酵素基因在 *Pseudomonas* 根圈細菌之表現分析

Expression of *Bacillus* chitinase gene in *Pseudomonas* rhizobacteria

計畫編號：NSC 89-2317-B-002-002 (2/3)

執行期間：88年 08月 01日至 89年 07月 31日

主持人：陳昭瑩

執行機構及單位：臺灣大學植物病理學系

中華民國 89年 09月 28日

一、中文摘要

本研究目的希望將*Bacillus chiA*基因導入根圈螢光假單胞細菌中，使之表現並存在於細菌外膜上而仍具有分解幾丁質的能力且能發揮抑制病原菌的效果。目前已將*ompA*基因的分泌訊息序列及轉膜功能區序列以PCR法擴增出來並選殖於pGEM-T easy載體上。接著以二對引子擴增不同長度的*Bacillus chiA*基因與*ompA*分泌訊息序列及轉膜功能區序列黏接，並選殖於pMMB6載體中。此質體構築已送入*E. coli* TOP10F'中表現幾丁質分解酵素，在glycol chitin-SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳分析、trypan blue-glycol chitin培養基的測試及螢光測定分析均測得幾丁質分解酵素的活性，顯示*ompA*基因的分泌訊息序列及轉膜功能區序列並不影響幾丁質分解酵素基因的表現。由*E. coli* TOP10F' (pMMST2000)在幾丁質培養基上的

生長特性及造成菌落區透明化的特性，初步判斷*ompA*基因的分泌訊息序列及轉膜功能區序列應使細菌細胞中所產生的幾丁質分解酵素移位於細胞外膜上。進一步要將此質體構築送入*Pseudomonas*根圈細菌中，以測試其防禦植物病原真菌的效果。

關鍵詞：幾丁質分解酵素、幾丁質分解酵素基因、根圈細菌、遺傳工程、基因表現載體、生物防治

Abstract

We plan to transfer a *Bacillus chiA* gene into *Pseudomonas* rhizobacteria for the expression of chitinase and tranlocation of chitinase to the outer membrane of bacterial cells. We expect the transformed *Pseudomonas* rhizobacteria will express antifungal activity or be with enhanced antifungal activity. A DNA segment containing the

sequences for signal peptide and transmembrane domain (ST sequence) was amplified by PCR, cloned into pGEM-T easy vector and fused with *chiA* gene segment of different lengths. The construct was subcloned into pMMB6. The plasmid pMMST2000 containing full length of *chiA* gene with ST sequence expressed chitinase in *E. coli* Top10F' as shown in glycol chitin-SDS-PAGE, on trypan blue-glycol chitin medium, and in fluorometric assay, indicating that ST sequence would not affect the expression of chitinase in bacterial cells. Since *E. coli* Top10F'(pMMST2000) had a good growth activity and made clearing of chitin medium just beneath the colonies, we assumed that the ST sequence could drive the chitinase to the membrane. In the next, plasmid pMMST2000 will be transferred into *Pseudomonas* rhizobacteria to examine the antifungal activity of transformants.

Keywords: chitinase, chitinase gene, rhizobacteria, genetic engineering, gene expression vector, biocontrol

二、計畫緣由與目的

許多細菌可以產生幾丁質分解酵素，水解病原真菌的細胞壁，造成原生質流失，有抑制病原真菌孢子發芽與菌絲生長的效果。產生幾丁質分解酵素的微生物在植物病害防治策略中扮演著重要的角色 (Chernin *et al.*, 1995; Inbar and Chet, 1991; Kobaayshi *et al.*, 1995)。被病原菌誘導產生幾丁質

分解酵素也是重要的植物抗病機制之一，可抑制病原真菌在植物體內的擴展(Bowles, 1990)。利用遺傳工程方法可能加強或賦予植物或微生物抗病或抗菌的能力(Koby *et al.*, 1994)。本研究目的將 *Bacillus chiA* 基因導入根圈螢光假單胞細菌中，使之表現並存在於細菌外膜上，仍具有分解幾丁質的能力，並能發揮抑制病原菌的效果。目前已將 *Bacillus chiA* 基因選殖於載體 pMMB6 上 *ptac* 啟動子的下游，再以 triparental mating 方法將所構築的質體送入螢光假單胞細菌中。經由蛋白質電泳分析幾丁質分解酵素活性，顯示 *Bacillus chiA* 基因可在螢光假單胞細菌中表現，可由 *pchiA* 啟動子控制或由 *ptac* 啟動子控制。

由於所表現的幾丁質分解酵素存在於螢光假單胞細菌的細胞間質中，故採一策略使幾丁質分解酵素自細胞間質轉位至細胞外膜上，能附於螢光假單胞細菌的菌體外，可發揮酵解的功能。如此當目標真菌接近植物的根，產生幾丁質分解酵素的螢光假單胞細菌可能藉由分解幾丁質及真菌細胞壁的作用而有保護植物避免其罹病的效果。

OmpA 是大腸桿菌細胞外膜蛋白，其外膜定位功能區已利用在驅使原先存在於細胞質的蛋白質轉位至細胞外膜(Bremer *et al.*, 1982)。現將 OmpA 外膜定位功能區與幾丁質分解酵素基因黏接，希望能使幾丁質分解酵素轉位至細胞外膜且朝向細胞外並發揮抗菌的效果。工作項目分段如下：(1)以 PCR 法擴增含 *ompA* 基因的分泌訊息序列及轉膜功能區序列；(2)以聚合酵素鏈鎖反應擴增不同長度含

Bacillus 幾丁質分解酵素基因片段的 DNA ; (3)將二部份 DNA 構築於可以在 *Pseudomonas* 細胞中複製的載體上; (4)分析選殖株幾丁質分解酵素的活性,瞭解源自於桿菌屬細菌的幾丁質分解酵素是否可藉由 *ompA* 基因的轉膜功能區序列而移位於革蘭氏陰性菌的細胞外膜上。

三、結果與討論

首先根據 *ompA* 基因序列(Beck and Bremer, 1980)設計二引子 5'-(*Hind*III) AAGCTTAACGAGGCGCAAAAAA TGAAAAAGACAG -3' 及 5'-(*Sma*I) CCCGGGG TGCTTGGTCTGTACTT CCGGTGC-3', 以 PCR 擴增大腸桿菌中 *ompA* 基因的分泌訊息序列及轉膜功能區序列。將 PCR 產物選殖於 pGEM-T easy 載體上, 並經序列分析確定序列無誤。再以二對引子(5'-AA CCCCC GGG(*Sma*I)CTCCAACCTGC TACGG CC -3', 5'- AACCCCTCGAG (*Xho*I)GA ATTC (*Eco*RI)CTATTGAA GCTGCC ACAAGGC -3'; 5'-AAC CCCCGGG (*Sma*I)CTCCAACCTGC TACGGCC-3', 5'- AACCCCTCGAG(*Xho*I)GAA TTC (*Eco*RI) CTACACTG TACCTCCGGT AGGC-3') 擴增不同長度的 *chiA* 基因, 以 *Sma*I 切位與 *ompA* 的分泌訊息序列及轉膜功能區序列黏接。

如此完成的質體構築可於 *E. coli* TOP10F' 中表現。 *E. coli* TOP10F' (pST2000) 於 LB 液體培養基振盪培養一天的培養液全蛋白質, 以 glycol chitin-SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳分析可觀察到約 90 kDa 具幾丁質分解酵素活性的蛋白質。在 trypan blue-

glycol chitin 培養基可以清楚地 在菌落周圍觀察到透明圈; 在幾丁質培養基上則無法清楚地觀察到透明圈, 但在 *E. coli* TOP10F' (pST2000) 菌落下方則明顯地成透明狀且菌落的生長較 *E. coli* TOP10F' (pST) 及 *E. coli* TOP10F' (pST1200) 為好。故認為幾丁質分解酵素在 *E. coli* TOP10F' (pST2000) 中表現且應移位於細胞外膜上, 仍需進一步確定幾丁質分解酵素在 *E. coli* TOP10F' (pST2000) 中的位置是否已由細胞間質轉位於細胞外膜。

由於初步試驗已指出幾丁質分解酵素應可由 OmpA 分泌訊息序列及轉膜功能區的作用而移位於細菌細胞的外膜, 故將此 ST-ChiA 的 DNA 片段選殖於 pMMB6 載體中。已完成之構築確實可於 trypan blue-glycol chitin 培養基上產生透明圈且以螢光測定法得到螢光值, 顯示 *E. coli* TOP10F' (pMMST2000) 可以產生幾丁質分解酵素。接下來即要將質體構築送入 *Pseudomonas* 根圈細菌中, 以測試其防治病害的效果。

四、成果自評

幾丁質分解酵素已經被證實能夠防治多種真菌性病原菌, 直接施用具有分泌幾丁質分解酵素的微生物 (Singh *et al.*, 1999) 為一般的應用方式, 亦有學者以遺傳工程改良幾丁質分解酵素基因 (Limon *et al.*, 1999), 增加微生物對病原真菌的拮抗能力。但這些方法不外乎是希望幾丁質分解酵素能分泌至微生物體外, 進而與病原真菌接觸, 達到防治的目的。本實驗探討另一種防治方式, 將 OmpA 分泌

訊息序列及轉膜功能區序列與幾丁質分解酵素結合，藉由 OmpA 能分泌到細胞外膜上的能力，使幾丁質分解酵素移位於細菌體表。利用該基因轉殖菌株能有效地纏聚於作物體表，使根的表面覆上一層產生幾丁質分解酵素的細菌，而達到防禦病原真菌的能力。為了證明幾丁質分解酵素已附在細菌細胞外膜上，還需進一步分離細菌細胞外膜與內膜，分析外膜是否確實含有幾丁質分解酵素。

實驗中所構築的 *E. coli* TOP10F'(pST2000) 及 *E. coli* TOP10F'(pMMST2000) 攜帶有完整的 *chiA* 基因，在幾丁質培養基、glycol chitin-SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳分析與螢光基質分析均確定有幾丁質分解酵素的活性，接著擬探討 *chiA* 基因在缺少 C-端部份時，是否仍具幾丁質分解酵素的活性。並將構築質體送入 *Pseudomonas* 根圈細菌中，測試幾丁質分解酵素的表現情形及其於植物病害防治的效果。

五、參考文獻

- (1) Beck, E. and Bremer, E. 1980. Nucleotide sequence fo the gene *ompA* coding the outer membrane protein II of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 8:3011-3024.
- (2) Bowles, D. J. 1990. Defense-related protein in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59:873-907.
- (3) Bremer, E., Cole, S. T., Hindennach, I., Henning, U., Beck, E., Kurz, C., and Schaller, H. 1982. Export of a protein into the outer membrane of *Escherichia coli* K12. Stable incorporation of the OmpA protein requires less than 193 amino-terminal amino-acid residues. *Eur. J. Biochem.* 122:223-231.
- (4) Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., and Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Env. Microb.* 61:1720-1726.
- (5) Inbar, J., and Chet, I. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. *Soil. Biol. Biochem* 23:973-978.
- (6) Kobaayshi, D. Y., Guglielmoni, M., and Clarke, B. B. 1995. Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* as biological control agents for summer patch disease of turfgrass. *Soil Biol. Biochem.* 27:1479-1487.
- (7) Koby, S., Schichler, H., Chet, I., and Oppenheim, A. B. 1994. The chitinase encoding Tn7-based *chiA* gene endows *Pseudomonas fluorescens* with the capacity to control plant pathogens in soil. *Gene* 147:81-83.
- (8) Limón, M. C., Pinto-Toro, J. A., and Benítez, T. 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89:254-261.
- (9) Singh, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S., and Chung, Y. R. 1999. Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89:92-99.