

Streptomyces griseobrunneus S3 Family 19 幾丁質分解酵素基因 ChiF 全長序列之選殖及 重組蛋白質之分子特性檢測

楊尚書¹ 李敏惠¹ 曾德賜^{1,2}

¹ 國立中興大學植物病理學系

² 聯絡作者：電子郵件 dstzeng@nchu.edu.tw，電話：+886-4-22851038，傳真：+886-4-22851038

接受日期：中華民國 94 年 6 月 13 日

摘要

楊尚書、李敏惠、曾德賜. 2005. *Streptomyces griseobrunneus* S3 Family 19 幾丁質分解酵素基因 *ChiF* 全長序列之選殖及重組蛋白質之分子特性檢測. 植病會刊 14:133-146.

本研究初步調查 family 19 幾丁質分解酵素，於台灣本土性具幾丁質分解能力鏈黴菌菌株之存在情形，以聚合酵素連鎖反應法 (PCR)，配合 family 19 幾丁質分解酵素專一性引子對的應用檢測，證實於 21 個供試菌株中，有 11 個可檢測到此酵素對應基因之存在。由其中已證實於植物病害防治上，深具應用潛力之 *Streptomyces griseobrunneus* S3 菌株 (SGS3)，並進而選殖成功其 family 19 幾丁質分解酵素對應基因 *ChiF* 之全長核酸序列。所選殖之 *ChiF* 基因經解序，證實共計含 891 bp，所轉譯蛋白含 296 個胺基酸，分子大小約為 31.5 kDa。此基因 5' 端之幾丁質結合區 (ChtBD)，具有與一般細菌幾丁質分解酵素 type 3 ChtBD 同樣之保留序列 AKWWTQ。基因上游啟動子附近，並含有一已被證實與基因表現之幾丁質誘導與葡萄糖抑制調控攸關之核酸鹽基重複序列 (T/A)GGTC(T/C)AGACC(T/A)。本研究已由 SGS3 *ChiF* 轉基因大腸桿菌中，成功萃取此 *ChiF* 重組蛋白，利用 FPLC 純化之蛋白製備，並進而製作成功其免疫檢測用多元抗血清。研究中繼而利用 SDS-PAGE 電泳分離，配合酵素活性染色以及西方漬染分析，且已證實其酵素活性及分子量確如預期，且此蛋白經 SDS 變性後仍可回復其活性。由已知同類酵素之胺基酸序列分析其親緣關係，所獲得樹狀演化圖顯示，SGS3 *ChiF* 與已證實可能由植物 class IV 幾丁質分解酵素演化而來之 *S. griseus ChiC*、*S. coelicolor ChiF* 與 *Nocardopsis prasina chiB* 等均具高度同源性。本文中將討論此 SGS3 *chiF* 基因之分子特性及其與鏈黴菌屬成員抗真菌性表現之關係。

關鍵詞：*Streptomyces griseobrunneus* S3，*ChiF* 基因，Family 19 幾丁質分解酵素，分子特性，親緣關係，抗體製作

緒言

幾丁質 (chitin) 為普遍存在於大自然中，主要由 *N*-acetylglucosaminide (GlcNAc) 經 -1,4 鍵結而成之多醣類聚合物，其為地球上存在量至為豐富的昆蟲與甲殼類動物的外骨骼，以及大部分真菌細胞壁結構之主要組成，幾丁質之合成與分解也因而在大自然之碳、氮循環中扮演極重要的角色。於多種生物體中，已知均

有幾丁質分解酵素 (chitinase) 的存在，已知的幾丁質分解酵素，按胺基酸序列及分解作用機制，大體可分為 family 18 與 family 19 兩類^(1,5,8)，其中屬於 family 18 幾丁質分解酵素，主要見諸於微生物與動物，其對真菌幾無抗菌活性；而歸屬於 family 19 之幾丁質分解酵素，則具有抗真菌活性，其在過去僅見於植物體⁽⁵⁾。1996 年 Ohno 氏等證實鏈黴菌 *Streptomyces griseus* 有 family 19 幾丁質分解酵素之存在，為微生物產生此類

幾丁質分解酵素之首度報導⁽¹⁸⁾，其後 Watanabe 氏等⁽²³⁾及 Saito 氏等⁽¹⁹⁾先後報告此類酵素存在於包括鏈黴菌等其他細菌的存在。

由鏈黴菌屬 *Streptomyces* 所發現之 family 19 幾丁質分解酵素，其幾丁質分解特性及與抗真菌活性之關係，近年來備受重視，Watanabe 氏等曾證實存在 *S. griseus* HUT6037 菌株屬於 family 19 的 *ChiC*，其對應全長基因之大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 轉型菌株，經誘導其大量表現及純化獲得之酵素蛋白，在 PDA 平板上對 *Trichoderma reesei* 菌絲生長可有明顯的抑制作用⁽²³⁾，此一全長基因甫近經構築於農桿菌載體，及進而製備成功 *ChiC* 轉基因水稻，所獲得之水稻轉型株，並已經證實對水稻稻熱病 (rice blast) 的抗性有明顯的促進作用⁽⁷⁾。

鏈黴菌 (*Streptomyces* spp.) 微生物製劑之開發，為植物保護生物技術產業發展的熱門課題，為開發本土性鏈黴菌生物資源，以俾益相關產業發展應用，本研究團隊甫近由根圈土壤與栽培介質，大量分離抗菌性與幾丁質分解性鏈黴菌屬菌株，由所獲得將近 300 個菌落型態近似鏈黴菌之分離菌株中，所選出之 *S. griseobrunneus* S3(SGS3)，其經由 Pilot 級發酵量產技術，所製作成功之孢子懸浮培養液，已經溫室及田間試驗證實對於由 *Phytophthora parasitica* 所引起之柑橘褐腐病、*Pythium aphanidermatum* 引起之胡瓜幼苗簇倒病及由 *Rhizoctonia solani* AG4 引起之甜椒幼苗軟腐病等，均有明顯的防治效果⁽¹³⁾。試驗中並發現 SGS3 在施用後對標的病原真菌的超寄生 (microparasitism) 作用，與病害防治效果顯有密切關係，而多種已知細胞壁分解酵素中，尤其是幾丁質分解酵素與 α -1,3-葡萄糖聚糖分解酵素 (α -1,3-glucanase) 等之作用，則為此超寄生性抗生作用之關鍵⁽¹³⁾。在另一生物防治用菌株 *S. saraceticus* SS31 之拮抗活性機制探討，也已證實其在培養基質中添加膠狀幾丁質 (colloidal chitin) 等多醣類，對抗生物質 (antibiotic) 與幾丁質分解酵素的產量皆有明顯提高的作用，進而利用培養液中，粗萃取的抗生物質與幾丁質分解酵素，進行生體外拮抗性測試更發現，兩者共同存在對抗生活性表現具有協力作用⁽¹⁰⁾。

為瞭解 family 19 抗菌性幾丁質分解酵素於本土分離鏈黴菌菌株之存在與分子特性，以為進一步病害防治生物製劑研發應用之參考，本研究以包括 SGS3 菌株等 21 個幾丁質分解性 (chitinolytic) 菌株，利用 Watanabe 氏等由 *S. griseus* 已知 *ChiC* 全長序列所設計專一性引子對，以聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅，發現其中有 11 個菌株可增幅出預期之 family 19 幾丁質分解酵素專一性片段，繼之本研

究乃以 SGS3 菌株為材料，嘗試選殖其 family 19 幾丁質分解酵素全長基因，除解析所獲得序列之分子特性外，並將 *ChiF* 轉型至 *E. coli* 進行大量表現，利用大量表現之蛋白進行 *ChiF* 對應抗血清之製作，以為相關生物製劑製作改進及作用機制探討之參考依據。

材料與方法

供試菌株與培養基

由土壤與栽培介質所分離菌落型態類似鏈黴菌之分離菌株中，選取對 *R. solani* AG4 與 *Pythium aphanidermatum* 拮抗能力強及產孢能力俱優者，包括 SGS3 等共計 21 個菌株 (表一) 供本試驗之用，供試 *Streptomyces* 菌株以馬鈴薯蔗糖瓊脂培養基⁽²⁾ (potato sucrose agar, PSA: 200 g 馬鈴薯所製備煎汁、20 g 蔗糖、15 g 洋菜粉，加蒸餾水至一公升) 平板上培養 6-7 天，俟其產孢良好，收集其孢子，以 10^7 CFU/g 濃度混拌於高壓滅菌過的壤土中，置 4℃ 冷藏永久保存；試驗中供試菌株經於 PDA 平板上於 28℃ 定溫箱培養 3 天後，以消毒過之 0.05% (v/v) Tween 20 溶液將孢子自平板上洗下，調整濃度為 10^8 cell/ml 作為試驗用之接種源。

菌株基因體 DNA 之萃取

以修改自 Kutchma 氏之方法⁽¹²⁾，於盛裝 20 mL 馬鈴薯蔗糖培養液 (potato sucrose broth, PSB) 之 250 ml 三角燒瓶中，經接種各供試菌株接種源 1 ml 後，置 30℃ 定溫箱黑暗中震盪培養 (Firstek Scientific orbital shaking incubator, 120 rpm)，一天後以 10,000 g (Sorvall RC5C, SA-600 rotor) 離心收集孢子及菌絲體，以含 1 mg/ml lysozyme (Amresco Chemical, Ohio, USA) 之 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7) 懸浮，於 37℃ 作用 1-2 小時後，加入 SDS 及 NaCl 使其最終濃度分別達到 1% (w/v) 及 1 M，隨之於液態氮 (4 分鐘) 與 65℃ 的水浴槽 (4 分鐘) 行重覆冷凍解凍處理 3 次，待細胞爆破後，置冰浴 10 分鐘，再於室溫下以 10,000 g (Sigma 2K15, 12145 rotor) 離心 10 分鐘，取上清液，依序加入 RNase (末濃度 200 μ g/ml) 作用 15 分鐘及 Protease K (末濃度 50 μ g/ml) 作用 30 分鐘，繼而加入等體積的 phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1) 混勻後，同樣於室溫下以 10,000 g 離心 10 分鐘，隨後再以等體積的 chloroform/ isoamyl alcohol (24:1) 混勻懸浮及在室溫下 10,000 g 離心 5 分鐘，取上層液並加入兩倍體積的酒精 (95%)，置於 -20℃ 過夜

表一、試驗中所使用之 *Streptomyces* spp. 菌株Table 1. *Streptomyces* strains used in this study

| Strains | Sources |
|---|---|
| S1 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Peat moss, Soil Mix, HEVECO, Canada. |
| S2 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Peat moss, Floral Guard, TKS, Germany. |
| SGS3 (<i>S. griseobrunneus</i>) | Citrus rhizosphere, Taiping, Taichung County. |
| S4 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Peat moss, Soil Mix, HEVECO, Canada. |
| S5 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Taro rhizosphere, Dali, Taichung County. |
| SL7-1 (<i>S. lincolnensis</i>) | Sesbania rhizosphere, Hsingkang, Chayi County. |
| SL7-2 (<i>S. lincolnensis</i>) | Sesbania rhizosphere, Hsingkang, Chayi County. |
| S8 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Taiwan Anoectochilus rhizosphere, Taichung. |
| S9 (<i>S. fimbriatus</i>) | Sugarcane rhizosphere, Hsingkang, Chayi County. |
| S10 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Grape rhizosphere, NCHU, Taichung. |
| S12 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Sesbania rhizosphere, Hsingkang, Chayi County. |
| S14 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Sugarcane rhizosphere, Hsingkang, Chayi County. |
| S15 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Soil, Datsun, Changhwa County. |
| S16 (<i>Streptomyces</i> sp.) ¹ | Mushroom growth substrate, Sinshe, Taichung County. |
| S18 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Sugarcane rhizosphere, Hsingkang, Chayi County. |
| S20 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Citrus rhizosphere, Taiping, Taichung County. |
| SS31 (<i>S. saraceticus</i>) ¹ | Dead cicada remain in citrus orchard. |
| S38 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Peanut rhizosphere, Taiping, Taichung County. |
| SC15 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Soil, Wufeng, Taichung County. |
| SC17 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Soil, Wufeng, Taichung County. |
| SC19 (<i>Streptomyces</i> sp.) | Soil, Wufeng, Taichung County. |

¹ Strain S31 and S16 were each respectively kindly provided by Prof. Jenn-Wen Huang and Dr. Tung-Tsuan Tsai, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

使 DNA 沈澱，次日以 12,000 g、4 離心 10 分鐘，倒掉上清液後以 70% 酒精洗滌沈澱物，以 12,000 g、4 離心 5 分鐘，風乾後加入適量經高壓滅菌蒸餾水將 DNA 回溶，於 -20 保存備用。

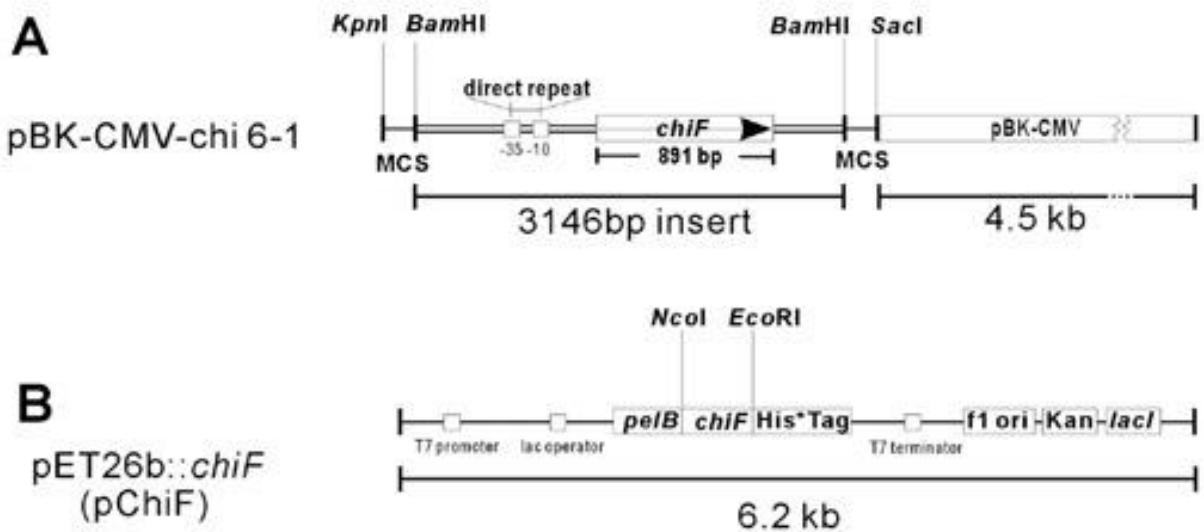
Family 19 幾丁質分解酵素核酸序列片段增幅與核酸探針製備

參考 Watanabe 氏等方法⁽²³⁾，由 *S. griseus* 之 *ChiC* 胺基酸序列 Lys-134 至 Ala-142 及 Ile-256 至 Cys-262 位置，以反轉譯方式設計此引子對 *ChiFF/ChiFR* (5' AAGCGCGAGGCCGCGGCCTTCCTCGCC3' / 5' GCACTCCAGAGCGCCGTTGAT3') 供標的基因專一性片段 PCR 增幅之用，以上述由各 *Streptomyces* spp. 供試菌株所萃取之基因體 DNA 做為模版，於 Perkin-Elmer GeneAmp PCR 9600 Thermocycler 中，按下述流程共進行 30 個熱循環反應：第 1 個循環為 94 4 分鐘，55 30 秒，72 30 秒，第 2 至第 29 個循環為 94 30 秒，55 30 秒，72 30 秒，第 30 個循環為 94 30 秒，55 30 秒，72 5 分鐘。PCR 增幅產物，經以 1.3% (w/v) 瓊脂凝膠 (agarose) 電泳分析檢測，確認預期增幅片段的後，選用 SGS3 基因體做為模版所獲得之增幅片段產物，以 DIG High Prime

DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, Mannheim, Germany)，按下述方法進行核酸探針之製備；由 SGS3 所獲得之 PCR 增幅產物經以 1.3% (w/v) 瓊脂凝膠電泳分離後，切下含標的條帶的膠片，繼經核酸回收試劑組 (DNA Clean/Extraction Kit, GeneMark, Tainan, Taiwan) 回收定量，取 16 μ l (約 1 μ g) 回收後的 DNA，按廠商所附操作流程，於 100 水浴處理 10 分鐘後，立刻置於酒精冰浴數分鐘，加入 4 μ l Dig High Prime 混合均勻後，置於 37 過夜，取出後於 100 中煮沸 10 分鐘，再保存於 4 備用。

SGS3 *ChiF* 全長基因之選殖

以染色體基因庫構築的方式，配合 ZAP Express[®] Predigested Vector Kit 與 ZAP Express[®] Predigested Gigapack[®] Cloning Kit (*Bam*HI/CIAP-Treated, Stratagene, CA, USA) 兩試劑組的應用進行，上述由 SGS3 所萃取基因體 DNA 以 *Bam*HI 進行剪切後，經瓊脂凝膠電泳分離，並回收近 3 kb 之核酸片段，繼而參照試劑組所附廠商說明書，進行基因庫之構築。構築成功之噬菌體，在平板上形成溶菌斑後，以 Immobilon-S Transfer Membranes (Millipore Corporation, Bedford, USA) 黏取部分噬菌體 DNA，以上述由 SGS3 增幅製備之核酸探



圖一、SGS3 *ChiF* 選殖載體 pBK-CMV-chi 6-1 及蛋白大量表現載體 pET26b::*ChiF* 構築示意圖。
 Fig. 1. Construction scheme of cloning vector pBK-CMV-chi 6-1(A) and SGS3 *ChiF* overexpression vector pChiF (B).

針，進行南方雜合反應，雜合反應程序參照 Sambrook 氏等⁽²¹⁾所述方法進行。試驗中經檢測確定帶有 *ChiF* 基因之噬菌體菌株，旋按試劑組所附操作說明，將含 *ChiF* 基因之選殖片段選殖至 pBK-CMV 質體 (圖一、A)，繼經質體純化，最後將含 *ChiF* 全長基因之片段，送交中興大學生物科技發展中心解序，解出之序列除利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 網站上之 Blast2 電腦軟體進行相似序列之搜尋比對，另利用國家衛生研究院網站上之 SeqWeb Version 2 Software (<http://apdb1.nhri.org.tw:8003/>) 核酸序列分析軟體進行序列特性分析。

SGS3 *ChiF* 表現載體之構築與轉型

上述經選殖與定序完成之 SGS3 *ChiF* 基因，首先按其 N-端、C-端序列特性設計其 PCR 增幅全長所需引子對，其中順向引子 5' - GATCCATGGTGTTCACAAACGTGTCCTC-3' 即為 5' 端添加一 *NcoI* 切位之 N 端序列，而逆向引子 5' - GATGAATTCCCGCAGCTCAGGTTCGA-3' 則為在此引子 5' 端添加一 *EcoRI* 切位之 C 端互補序列 (圖一、B)。PCR 增幅反應共進行 30 個循環，第 1 個循環為 94 4 分鐘，55 30 秒，72 30 秒，第 2 至第 29 個循環為 94 30 秒，55 30 秒，72 30 秒，第 30 個循環為 94 30 秒，55 30 秒，72 5 分鐘。增幅出來之預期基因條帶經電泳分離純化，即黏合至 pET26b 表現載體，並進而轉型至 *E. coli* Rosetta™

(DE3) (Novagen, EMB Biosciences Inc., Darmstadt, Germany) 表現寄主。

SGS3 *ChiF* 基因之大量表現及 *ChiF* 蛋白之純化

利用 pET26b 表現載體前方訊號序列 *pelB* 所提供將大量表現蛋白運送至 *E. coli* periplasmic space 之特性，按下述方法進行所表現 *ChiF* 蛋白之純化。含有 p*ChiF* 質體 (pET26b::*ChiF* gene; Km^r) 之 *E. coli* Rosetta™ (DE3)，經以 LB (Luria-Bertani broth) 大量培養，並以 1 mM IPTG 誘導其 *ChiF* 蛋白產生，將菌離心後懸浮在 osmotic shock solution [30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20% (w/v) sucrose] 中，於室溫下緩慢攪拌 10 分鐘，再將菌離心 (10,000 g, Sorvall RC5C, GSA rotor) 沈降，並懸浮在冰冷之 5 mM MgSO₄ 水溶液，於冰浴中以磁石緩慢攪拌 10 分鐘，使 periplasmic 區域蛋白釋至 MgSO₄ 水溶液中，其後於 4 10,000 g 離心 10 分鐘將菌體沈降，再將含有大量表現蛋白之上層液，以 90% 硫酸銨加以處理沈降，最後以黏附緩衝液 (binding buffer: 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4) 將蛋白溶洗出。

ChiF 蛋白進一步純化則利用以 Unicorn 電腦軟體控制之 AKTA FPLC system (Amersham Biosciences, Hong Kong, China) 進行之，法中以 HiTrap Chelating HP 層析管，層析分離前管柱先以 Ni²⁺ 離子極化，上述萃取之標的蛋白，每次約裝填 1 mg 樣品，裝填完成後，先以黏附緩衝液流洗掉未鍵結之蛋白，再以含 0

0.5 M 梯度濃度imidazole 之流洗液 (含20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl) 以 1 ml/min 流速將蛋白流洗出, 流洗過程中以 A_{280} 監測流洗出蛋白部分, 將其個別收集後, 以 HiTrap™ Desalting Column (Amersham Biosciences, Hong Kong, China) 去除純化樣品中所含imidazole 與 NaCl。

SGS3 *ChiF*對應抗血清製備

取上述經 FPLC 純化之 *ChiF* 蛋白樣品, 以 20 mM 醋酸鈉緩衝液 (pH 5.8) 懸浮後, 調製成 2 mg/ml 濃度, 以每次 1 mg 用量注射紐西蘭大白兔大腿內側肌肉, 每週注射一次, 第一次注射樣品以等量 Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories Detroit, Michigan) 佐劑添加與充分乳化後進行, 其後三次連續追加注射, 乳化佐劑則改為 Freund's incomplete adjuvant, 最後一次注射一週後進行採血, 所採得抗血清經定量分裝於 eppendorf tube, 即置於 -20 保存備用。

SGS3 *ChiF* 之 SDS-PAGE 電泳分析與活性偵測

本試驗以添加醣酐幾丁質 (glycol chitin) 之 SDS-PAGE 進行, 其中含醣酐幾丁質之電泳膠片製備採用 Yamaga 及 Imoto 氏⁽²⁴⁾方法, 配置完成含 0.01%(w/v) 醣酐幾丁質之 12% (w/v) 聚丙烯醯胺電泳膠體 (polyacrylamide gel) 後, 供試蛋白樣品取約 10 μ g 與 0.2 倍體積 sample buffer [60mM Tris-HCl pH 6.8, 25% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1%(w/v) bromophenol blue] 混合, 於 100 水浴中煮沸 10 分鐘, 以 80V 定電壓行電泳分離 (Mini-PROTEAN® II, Bio-Rad, Hercules, CA)。電泳完後將膠片取下, 浸泡於 Renaturing buffer [0.1 M sodium acetate pH 5.0, 1% (v/v) Triton X-100], 在 37 下漂洗兩次, 每次 20 分鐘, 再以 0.5 M Tris-HCl (pH 8.9) 緩衝液配製之 0.01% (w/v) Calcofluor white M2R (Sigma, CA, USA) 於室溫染色 30 分鐘, 旋置蒸餾水中過夜退染, 再於 UV 燈箱上觀察是否有醣酐幾丁質分解條帶形成。另備一膠片同法電泳後以 Coomassie blue 染色液 [0.1%(w/v) Coomassie blue, 45% (v/v) methanol, 10%(v/v) glacial acetic acid] 染色 30 分鐘, 以退染劑 [10%(v/v) methanol, 10%(v/v) glacial acetic acid]退染後, 配合分子量標幟蛋白的使用, 估算供試蛋白之分子量。

另以由 *E. coli* 萃取之 *ChiF* 蛋白, 利用濾紙圓盤 (8 mm直徑) 施用方式, 直接置於含 0.5%(w/v) 膠狀幾丁質⁽¹⁴⁾ 之 1.5% 洋菜平板, 於 28 定溫箱作用 2 天後, 觀察是否有透化圈產生。

SGS3 *ChiF*蛋白之西方轉漬法偵測

供試蛋白同上述經 SDS-PAGE 電泳後, 以 Bio-Rad transblot apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) 將蛋白質電傳至硝化纖維膜上, 再以上述製備完成之 SGS3 *ChiF* 抗血清, 按 Sambrook 氏⁽²⁰⁾ 所述之流程進行西方漬染檢測。

SGS3 *ChiF* 蛋白與已知 Family 19 幾丁質分解酵素之親緣關係分析

利用本研究選殖出之 SGS3 *ChiF* 全長序列, 選取其酵素活性區間 (catalytic domain) 基因片段, 經以電腦分析轉譯其胺基酸序列後, 選取 145-257th 共計 113 個胺基酸序列, 與基因庫中已見諸發表的 family 19 幾丁質分解酵素基因胺基酸序列進行比對, 所選定做比對用之基因來源列於表二, 共計 29 條不同來源胺基酸序列, 長度分別為 102-137 個胺基酸不等, 比對結果並以 DNASTAR sequence analysis software (DNASTAR, Madison, USA), 以neighbor-joining 方法繪製親緣關係樹狀圖 (phylogenetic tree) 及序列比對圖。

結 果

不同 *Streptomyces* 菌株 Family 19 幾丁質分解酵素基因增幅檢測

由供試 21 個 *Streptomyces* 菌株所萃取基因體 DNA, 經以 PCR 增幅其 family 19 幾丁質分解酵素專一性片段, 增幅結果顯示, 於包括 S1、SGS3、S4、S5、SL7-1、SL7-2、S9、S10、S12、S14 與 S38 共 11 株菌株均可如預期有一接近 400 bp 之增幅條帶 (圖二、箭頭指處), 另外 S2、S8、S15、S16、S18、S20、SS31、SC15、SC17與 SC19 等 10 個菌株則無之, 為瞭解此種於拮抗性鏈黴菌普遍存在 family 19 幾丁質分解酵素之有關分子特性及其與抗真菌性之關係, 本研究選擇以 SGS3 進行全長基因選殖解序。

SGS3 *ChiF* 全長基因之選殖

自 SGS3 基因體 DNA 所構築之基因庫, 經以本試驗中所製備之 SGS3 *ChiF* 核酸探針進行雜合測試, 共篩選出 42 株含有 *ChiF* 基因之噬菌體選殖株, 其中選殖株 Chi 6-1 經解序完成後, 以 SeqWeb 分析軟體分析其序列特性, 分析結果顯示其在載體 *Bam*HI 切位內所含 3,146 bp 插入片段, 內含有一 891 bp 之轉譯片段 (圖一、A), 如圖三所示, 此段基因 N端含一細胞外泌

表二、試驗比對所使用之 family 19 幾丁質分解酵素基因

Table 2. Chitinase peptide sequences used for comparison in this study

| Accession Number | organism | Protein ID. |
|------------------|-------------------------------------|---|
| AAA56787 | Barley | chitinase, class I |
| AAA51377 | Rice | chitinase, class I |
| AAA32769 | Thale cress | chitinase, class I |
| CAA87072 | European elder | chitinase, class I |
| CAA33517 | Potato | chitinase, class I |
| CAA34812 | Tobacco | chitinase, class I |
| CAA39535 | Rice | chitinase, class I |
| AAA34107 | Tobacco | chitinase, class II |
| CAA47921 | Potato | chitinase, class II |
| CAA35791 | Petunia | chitinase, class II |
| AAA32941 | Barley | chitinase, class II |
| CAA40474 | Kidney bean | chitinase, class IV |
| AAA32916 | Beet | chitinase, class IV |
| CAA43708 | Rape | chitinase, class IV |
| AAA33444 | Maize | chitinase, class IV |
| BAA84194 | <i>S. coelicolor</i> | Partial family 19 chitinase |
| BAA84195 | <i>S. lividans</i> | Partial family 19 chitinase, f1 |
| BAA84196 | <i>S. lividans</i> | Partial family 19 chitinase, f2 |
| BAA84197 | <i>S. lividans</i> | Partial family 19 chitinase, f3 |
| BAA84199 | <i>S. coelestis</i> | Partial family 19 chitinase |
| BAA84200 | <i>S. ipomoeae</i> | Partial family 19 chitinase, f1 |
| BAA84201 | <i>S. prasinopilosus</i> | Partial family 19 chitinase, f1 |
| BAA84202 | <i>S. prasinopilosus</i> | Partial family 19 chitinase, f2 |
| BAA84203 | <i>Streptomyces</i> sp. Strain S15 | Partial family 19 chitinase |
| BAA84204 | <i>Streptomyces</i> sp. Strain S84 | Partial family 19 chitinase |
| BAA84205 | <i>Streptomyces</i> sp. Strain S100 | Partial family 19 chitinase |
| BAA84206 | <i>Streptomyces</i> sp. Strain S159 | Partial family 19 chitinase |
| BAA23739 | <i>S. griseus</i> | Complete family 19 chitinase, chitinase C |
| AY953370 | <i>S. lincolnensis</i> (SLS7) | Partial family 19 chitinase |

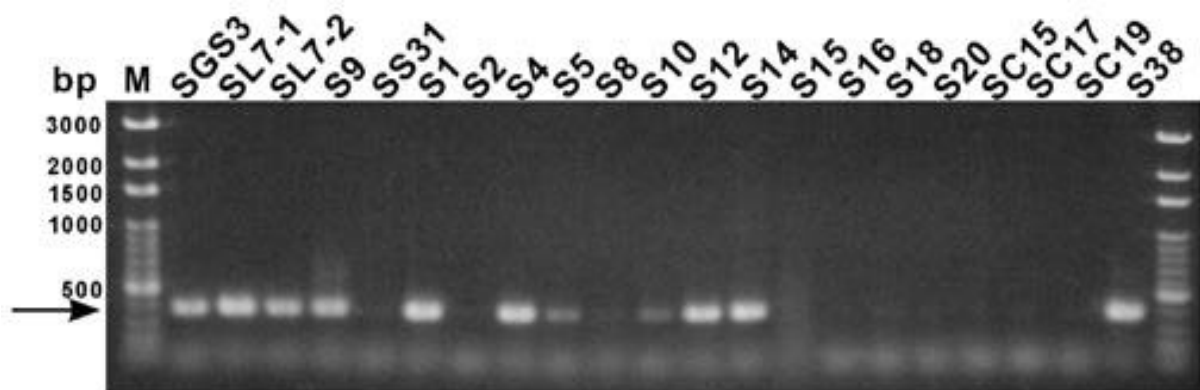
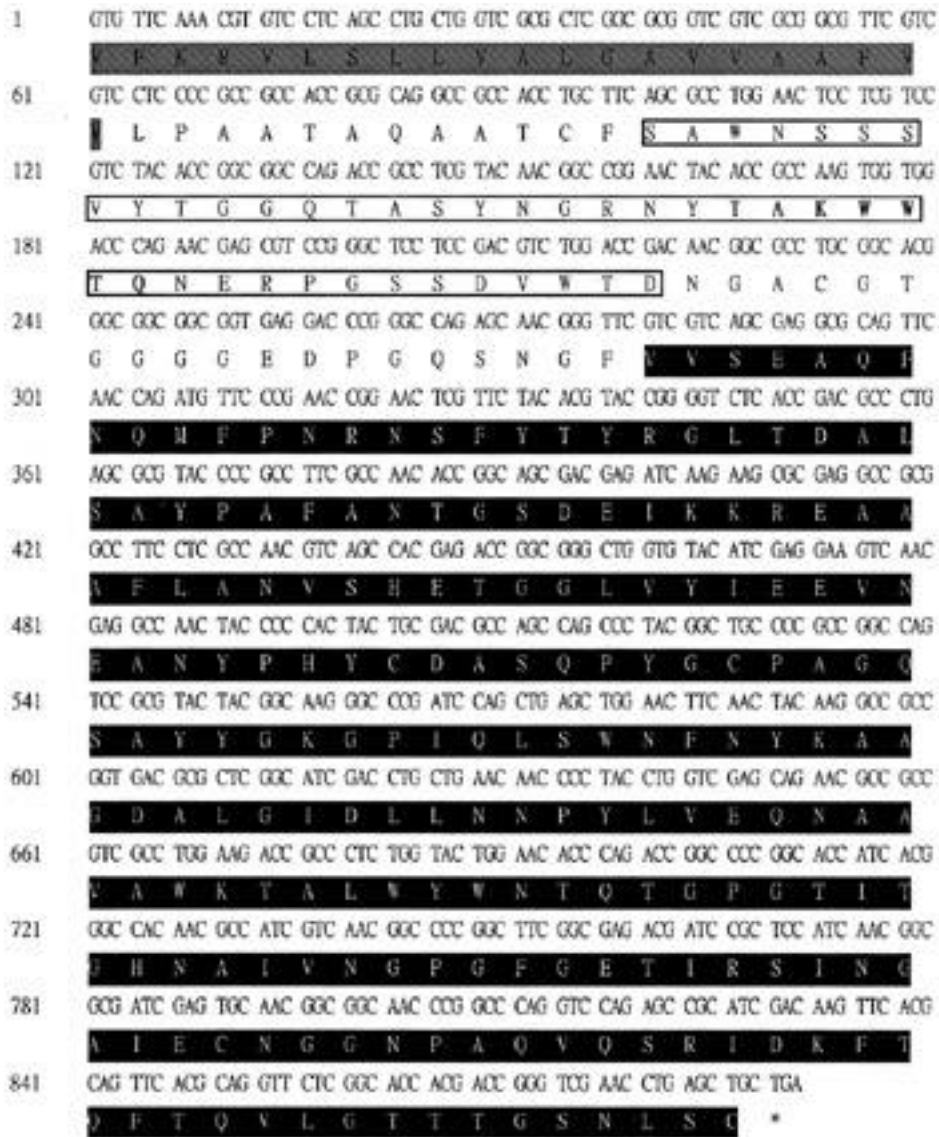
圖二、利用 ChiFF、ChiFR 引子對增幅 21 株 *Streptomyces* 菌株之 family 19 幾丁質分解酵素基因片段。

Fig. 2. PCR amplification of family 19 chitinase gene from 21 *Streptomyces* spp. tested strains by using primer pair ChiFF and ChiFR. The arrow indicated the predicted 387 bp amplicon of the partial family 19 chitinase gene.

訊號片段 (secretory signal peptide domain) 與幾丁質結合區間 [chitin binding domain (ChtBD)], 而其 C 端具一酵素活性區間。由此片段所轉譯蛋白質為含 296 個胺基酸之片段, 分子量約為 31.5 kDa。值得一提的是, 在胺基酸序列第 24-29 位置為 ChtBD 特有之胺基酸

序列 AKWWTQ⁽²²⁾。另外在轉譯起始點上游 62 及 86 個核酸鹽基處, 則為其啟動子序列 TTGAGT(-10) 及 TTGACA(-35) (圖四)。而在啟動子 -10 及 -35 序列間, 則有與幾丁質分解酵素基因表現誘導可能攸關的核酸鹽基重複序列 (direct repeat sequence)



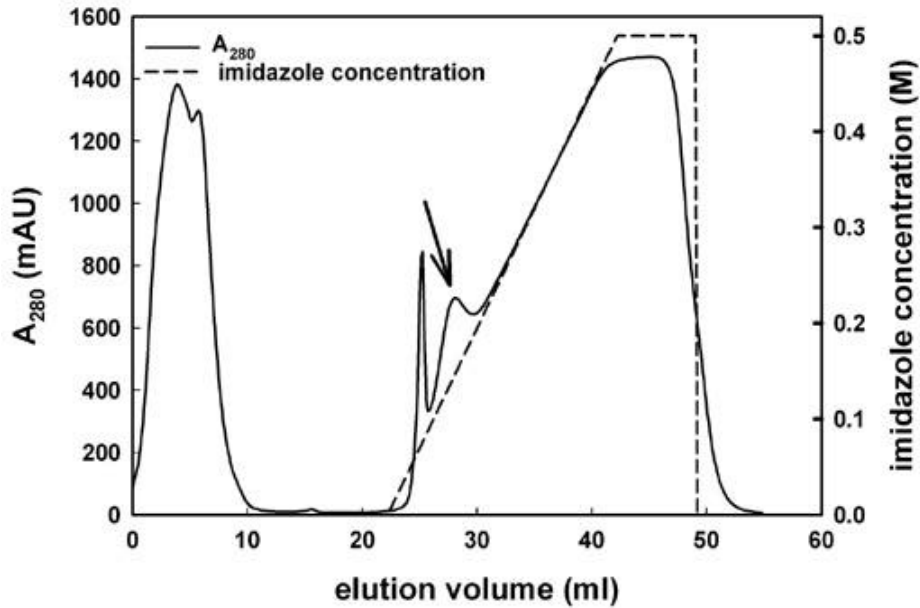
圖三、所選殖 SGS3 *ChiF* 基因之核酸及對應之胺基酸序列。

Fig. 3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of SGS3 *ChiF* gene of *S. griseobrunneus* S3. Amino acids are specified in single-letter code under the first of each codon. Shadow box and open box indicated the secretory signal peptide and chitin binding domain (chtBD) each respectively. Catalytic domain is printed in white on black boxes. It consists 891bp in length, which encodes a 296 amino acid peptide with a molecular weight of 31.5 KDa. A ChtBD consensus sequence AKWWTQ (shown in bold type) was found in the gene at 24-29th amino acids of the peptide sequence.



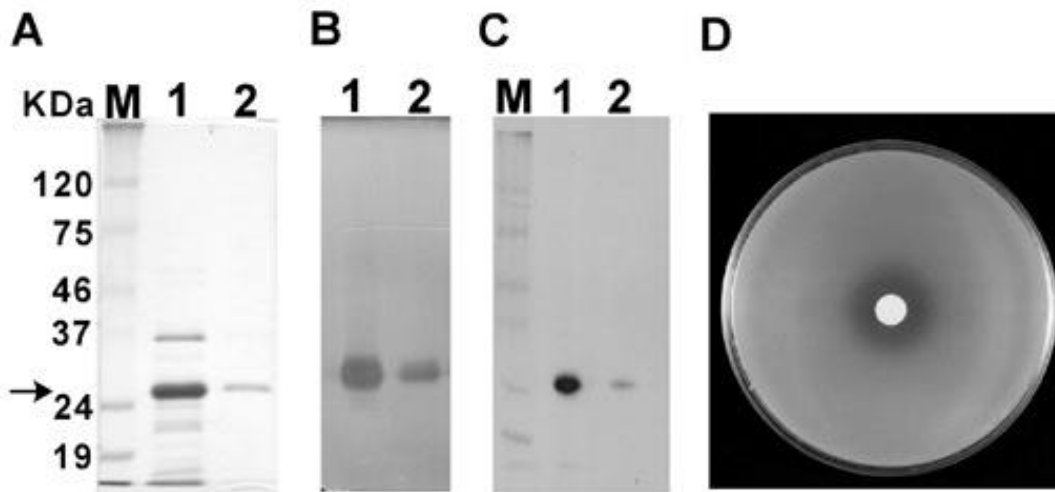
圖四、所選殖 SGS3 *ChiF* 基因啟動子附近存在之核酸序列重複片段。

Fig. 4. Nucleotide sequence of the promoter regions of *ChiF* gene (p-*chiF*) of *S. coelicolor* A3(2) and *ChiF* gene of *S. griseobrunneus* S3. The -35 and -10 sequence of each promoter are double- and single-underlined, respectively. Nucleotide sequences of direct repeats are printed in upper-case letters and those identical to the consensus sequence (Saito *et al.* 2000) are printed in white on black background.



圖五、以 chelating gel 親和層析管柱純化 SGS3 ChiF 重組蛋白。

Fig. 5. Purification of ChiF protein by chelating gel on an AKTA FPLC system. Ammonium sulfate precipitated SGS3 ChiF protein was dissolved in binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4) and resolved by HiTrap Chelating HP column. The arrow indicates SGS3 ChiF protein peak eluted.



圖六、SGS3 ChiF 重組蛋白電泳分析活性測定與西方漬染檢測。

Fig. 6. Detection of recombinant SGS3 ChiF protein by SDS-PAGE (A and B), western blot (C), and by clear zone formation on 0.5% colloidal chitin amended agar plate (D). Recombinant ChiF was extracted by ammonium sulfate precipitation and purified by chelating gel chromatography. For SDS-PAGE analysis, approximately 10 μ g of the protein sample were loaded on each lane, and the resolved gel was stained with Coomassie blue (A) or with Calcofluor white M2R under UV illumination (B). Lane M, molecular weight marker (ProSive[®] color protein markers, BioWhittaker Molecular Applications Inc., USA). Lane 1, sample from ammonium sulfate precipitation; lane 2, sample purified from chelating gel chromatography. The arrow indicates the recombinant ChiF protein with the molecular weight at 31.5 kDa. The proteins were trans-blotted onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and reacted with the ChiF antiserum. The existence of ChiF was revealed by indirect enzyme-linked immunoassay (C) by use of phosphatase labeled goat anti-rabbit IgG (KPL, Gaithersburg, MD, USA) as secondary antibody. For the plate assay (D), approximately 100 μ g of the purified enzyme were applied on the paper disc laid on 0.5% colloidal chitin containing agar. The picture shown was taken 2 days after treatment.

TGGTCTAGACCT及AGGTCCAGACCA^(3,4,16) (圖四)。此全長基因序列經利用NCBI網站之 Blast2 軟體進行比對，發現其與 *S. griseus* 之 *ChiC* (accession no. AB009289)、*Nocardopsis prasina* 之 *ChiB* (AB086832) 及 *S. coelicolor* 之 *ChiF* (AB017012) 等三個已知基因序列相同度最高，進而將 SGS3 *ChiF* 基因與此三基因，以國家衛生研究院網站上 SeqWeb 軟體進行比對，其與 *S. griseus ChiC*、*N. prasina ChiB*、*S. coelicolor ChiF* 之相同度分別為 87.4、85 與 73%，其中所有序列之酵素活性區間其序列相同度更高達 90%。本試驗中解序完成之 SGS3 *ChiF* 3,146 bp 核酸片段，已經送交 NCBI 進行註冊 (Accession No. AY348315)。

SGS3 *ChiF* 蛋白之純化

帶有質體 pET26b::*ChiF* 之 *E. coli* Rosetta™ (DE3) 轉型菌株，經以 IPTG 誘導蛋白大量產生後，由 periplasm 釋出之蛋白粗萃取物，經以 90% 硫酸銨鹽析沈降濃縮後，以 HiTrap Chelating HP 管柱層析進行純化，於以 imidazole 濃度梯度流洗過程中，發現可在 0.14 M imidazole 洗出液部分獲得一明顯 A₂₈₀ 波峰 (圖五箭頭指處)，此波峰之蛋白樣品，繼而以 SDS-PAGE 電泳分離，證實其分子量約為 31.5 kDa，與預期大小一致 (圖六、A, lane 2)，此電泳膠片中之蛋白條，帶經以 renaturing buffer 處理後仍可回復其活性，並於利用 Calcofluor white M2R 染色時呈現醯酐幾丁質分解之透化條帶 (圖六、B)；同一位置條帶，另以西方轉漬法檢測，更顯示其與利用 SGS3 *ChiF* 蛋白對應抗血清呈現專一性反應 (圖六、C)，此一 *E. coli* 轉型菌株培養所獲得之酵素蛋白，另以 100 μg 用量，以濾紙圓盤方式，添加到含膠狀幾丁質洋菜平板上，於 28 °C 中反應兩天後，即可看到有明顯透化圈之形成 (圖六、D)。

酵素活性區間胺基酸序列比對與親緣關係之分析

經由比對總計 15 個分屬不同鏈黴菌屬及 15 個分屬不同植物種類，已知之 family 19 幾丁質分解酵素蛋白酵素活性區間 (catalytic domain) 之胺基酸序列特性，結果顯示包括 SGS3 菌株在內的 15 個鏈黴菌屬菌株，其酵素蛋白之胺基酸序列有相當高的相似度 (圖七)，其在親緣關係樹狀圖上自成一類 (圖八)，有別於其他植物系統之 family 19 幾丁質分解酵素。進而比對 *Streptomyces* 屬與植物上同 family 19 幾丁質分解酵素之胺基酸序列則發現，其與歐洲接骨木 (European elder)、菜豆 (kidney bean)、油菜 (rape)、甜菜 (beet) 及玉米 (maize) 等歸屬於 class IV 的幾丁質分解酵素同樣，在圖中胺基酸序列

33th 及 111th 131th 位置，當與植物 class I 及 II 比較，同屬於刪除區間 (圖七)，而序列 60th 110th 則為相似度較高之區段。由親緣關係分析圖可以看出，除 *Streptomyces* 屬自成一類，植物的酵素部分則 class IV 幾丁質分解酵素成一類，另外 class I 與 II 則歸為一類 (圖八)。

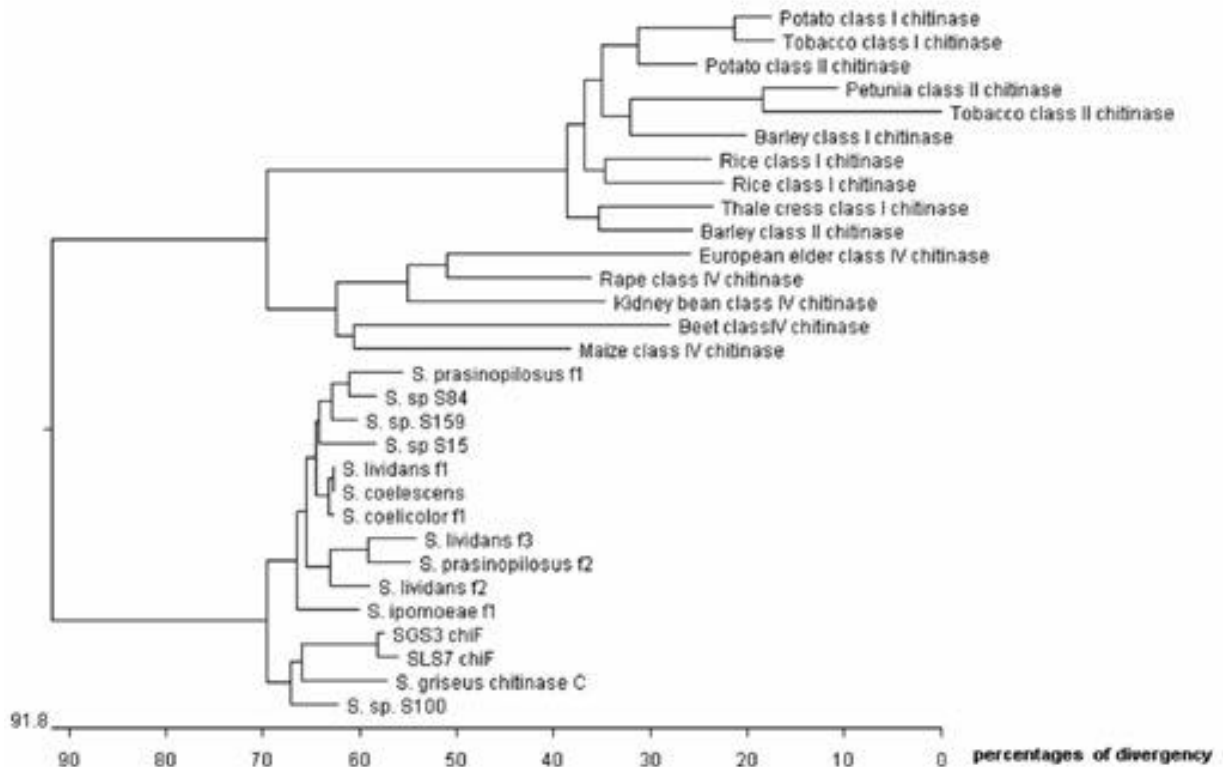
討 論

幾丁質分解酵素基因的選殖應用，為近年來植物抗病性管理應用 (disease resistance manipulation) 極為熱門的研究課題，屬於 family 19 之幾丁質分解酵素，原僅見於植物，且已知為植物抗病性之誘導表現攸關重要的病程蛋白 (pathogenesis-related protein, PR protein) 組成之一，酵素分子本身具抗真菌 (antifungal) 特性^(9,15)。鏈黴菌屬成員在植物病害防治生物製劑發展上之應用，近年來備受重視，family 19 抗菌性幾丁質分解酵素，在本屬細菌上之首度發現⁽¹⁸⁾，及其轉基因水稻對稻熱病菌感染抗性的提昇效果⁽⁷⁾，使得此類酵素的應用性相關研究熱度再度提高。本研究中，利用台灣採集根圍土壤中，所分離到的 21 個拮抗性鏈黴菌菌株，以專一性引子對行 PCR 增幅，證實多數測試菌株，均可如預期的增幅到此類酵素的對應基因片段 (圖二)，顯示此一抗菌性酵素極可能普遍存在於本屬細菌之本地分離菌株，由所增幅片段分子量之近似性更顯示，此一基因於不同菌株間之高度保留性。唯供試 21 菌株中有 10 株未見增幅產物，是否顯示此段基因在特定菌株存在之歧異性則有待瞭解。

本試驗中利用基因庫篩選方式成功獲得之 SGS3 *ChiF* 全長 891 bp 序列 (圖三)，經比對結果，與 *S. griseus ChiC*、*N. prasina ChiB*、*S. coelicolor ChiF* 之相同度分別為 87.4、85 與 73%，此序列的高度相同度，充分顯示此一酵素對應基因在演化上之同源性。此一基因上游之 ChtBD 區，其序列特性與 *S. griseus chiC* 與 *N. prasina chiB* 基因已知的 ChtBD 區序列，同屬於 CBM_5_12 (carbohydrate binding domain)，且都具有 ChtBD type 3 之同源性 AKWWTQ 序列⁽²²⁾。截至目前所知之幾丁質分解酵素 ChtBD，依其序列特性，大致可分為主要見諸於真菌與植物之 type 1、見諸於病毒與昆蟲之 type 2、以及主要見諸於細菌之 type 3 等三種型式，此 SGS3 *ChiF* 序列中所屬 ChtBD type 3，甫近已有報導證實，其與不可溶性幾丁質、可溶性幾丁質、纖維素及 N-乙 醯幾丁質六碳醯 (N-acetylchitohexaose) 等作用基質，均具有良好接合能力⁽⁶⁾。此一存在於鏈黴菌屬 family 19 幾丁質分解酵素分子上特異性之 ChtBD type 3，其轉譯蛋白分子本身，已知無直接殺死真菌之



圖七、Family 19 幾丁質分解酵素作用區間胺基酸序列比對。
 Fig. 7. Pileup alignment of amino acid sequences of family 19 chitinase catalytic domain. Aligned amino acid sequences were processed by MegAlin program of DNASTAR sequence analysis software (DNASTAR, USA) by the method of Clustal W. “ - ” indicated the amino acid sequence deletion site (gap). The sequences identical to SGS3 ChiF were surrounded with boxes.



圖八、*S. griseobrunneus* S3 之 *ChiF* 酵素作用區間胺基酸序列與美國生物技術中心 (NCBI) 資料庫 (GenBank) 既有 family 19 幾丁質分解酵素作用區間胺基酸序列比對之親緣關係樹狀圖。

Fig. 8. Phylogenetic tree based on deduced amino acid sequence comparisons of catalytic domain of family 19 chitinase protein.

效果⁽²²⁾，然最近在有關鏈黴菌幾丁質分解酵素有關分子特性研究，則已相繼有報告指出，*ChiBD*-deletion 處理所獲得之突變菌株，其對真菌之拮抗能力均有明顯降低的現象^(6, 22)，很顯然，刪減突變所導致酵素分子對真菌細胞壁上作用受質接合能力的降低，應為其主要原因，此一特質對抗真菌特性表現上顯然不可或缺。

由植物所產生的 family 19 幾丁質分解酵素中，已知 class I 與 IV 幾丁質分解酵素可與入侵植物病原性真菌直接作用，並可將其殺死而防止其入侵作用^(9, 15)，近年來始於特定細菌上發現的 family 19 幾丁質分解酵素，Watanabe 氏等以經 *ChiC* 轉型之 *E. coli* 菌株，經誘導其大量表現所獲之 *S. griseus* *ChiC* 蛋白純化製備，證實其於 PDA 平板上對 *T. reesei* 菌絲可有明顯生長抑制效果⁽²³⁾。本研究由 SGS3 所選殖之 *ChiF* 全長序列，其與 *S. griseus* *ChiC* 相同度高達 87.4%，由 SGS3 *ChiF* 轉型 *E. coli* 菌株大量誘導表現所獲得之 SGS3 *ChiF* 蛋白純化製備，本試驗已證實其分子量確如預期與 *ChiC* 相似 (圖六、A)，對醣酐幾丁質 (圖六、B) 與膠狀幾丁質 (圖六、D) 等均具有良好分解能力，另以所製備抗血清進行免疫偵測，也證實反應條帶與 SGS3 *ChiF* 之相

關性 (圖六、C)。然研究過程中曾嘗試以此由 *E. coli* 大量表現之 SGS3 *ChiF* 蛋白與 *Trichoderma virens*、*Alternaria* sp.、*Rhizoctonia solani* AG4、*Rhizopus* sp. 及 *Pyricularia oryzae* 等分別行對峙培養，進行抑菌性測試，然皆未見有如預期的抑制生長效果 (結果未示出)，此一 family 19 幾丁質分解酵素蛋白之抗菌性，其敏感性是否因標的菌而異，抑或是其拮抗作用仍需要有一、三- 葡萄聚醣水解酵素、纖維素水解酵素 (cellulase) 等其他水解酵素共同參與作用，仍有待進一步研究闡明。

啟動子的特性為關係基因表達之關鍵，本研究選殖 SGS3 *ChiF* 基因啟動子序列中，由圖四結果所示可以明顯看出，其與 Satio 氏等所報導 *S. coelicolor* 之 *ChiF* 基因極為近似，均有獨特性之核酸鹽基重複序列存在⁽²⁰⁾，Ni 氏等⁽¹⁷⁾曾報導指出，此種重複序列之存在，為與幾丁質分解酵素基因表現之受質誘導與葡萄糖抑制有關之特性，據此，SGS3 *ChiF* 基因表達之調控，與一般微生物幾丁質分解酵素基因之幾丁質受質誘導與葡萄糖抑制，應為一致的現象，類似此一重複序列的特性，顯非 family 19 酵素所專具，於本研究室

甫近由 SGS3 所選殖屬於 family 18 之 SGS3 *ChiA* 基因全長序列中，其啟動子部分也含有類似核酸重複序列 TGGTCTGGACCA 的存在（陳金堯，未發表之資料）；有關幾丁質受質對微生物酵素基因的誘導作用，常見有多數同功異構酵素之同時產生⁽¹⁰⁾，此種啟動子上類似重複序列的存在，顯示其應為基因表達層次有關的調控作用。

前已述及，family 19 幾丁質分解酵素在過去僅見於高等植物體內，此類酵素最近在 *Streptomyces* 首度發現之後，其有關對應基因之解序結果，與植物 class I 與 IV，尤其是 class IV 的酵素基因非常相似⁽²³⁾。本研究中，經比較源自 *Streptomyces* 屬已知酵素基因與源自植物的酵素基因間的關係，由酵素活性區間胺基酸序列資料（圖七）所進而繪製之親緣關係（圖八），其中由上述結果中所顯現 *Streptomyces* 屬與植物 class IV 幾丁質分解酵素同樣，在胺基酸序列 33 50 及 111 131 間，與植物之 class I 與 II 類酵素比較，存在有同樣的刪除區間之特性，充分顯示此種微生物源的酵素與植物 class IV 酵素間之近緣關係，就已知的 family 19 幾丁質分解酵素種類而言，上述圖八所示樹狀圖進而明白顯示，*Streptomyces* 屬之酵素為與植物系統已知的 class IV 幾丁質分解酵素相近，而與 class I 及 II 類酵素親緣關係較遠之一群，由序列的相似性關係，Watanabe 氏等認為 *Streptomyces* 之 family 19 幾丁質分解酵素應是演化後期由植物獲得⁽²³⁾，由於 *Streptomyces* 屬細菌普遍存在於根圈土壤中，其與高等植物根圈有長期共同存在的密切關係，其成員中如 *S. scabies*、*S. ipomoeae* 等，更為已知可在特定植物上造成危害之病原菌，與植物如此密切接觸的關係，應可解釋此類細菌如何自植物獲得此基因的緣由，除在鏈黴菌屬之外，此類酵素基因已知可於 *Burkholderia gladioli*⁽¹¹⁾ 及 *N. prasina* OPC-131⁽²²⁾ 等細菌中可以找到，顯示此基因在不同微生物族群中應有相當程度的普遍性。本研究為首度由台灣本土性鏈黴菌屬中選殖成功此 family 19 幾丁質分解酵素全長基因，並已製備成功此一特異性酵素蛋白免疫檢測所需抗血清，有關此一酵素基因表現操控，於植物抗病性管理，以及拮抗性鏈黴菌屬在病害生物防治應用作用機制關係之闡明，為未來繼續探討之工作重點。

謝 辭

本研究工作承蒙行政院農委會中美合作計畫（計畫編號 94 中美-1.4-合-01）經費資助，特此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Armand, S., Tomita, H., Heyraud, A., Gey, C., Watanabe, T., and Henrissat, B. 1994. Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalyzed by chitinase A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12. *FEBS Lett.* 343:177-180.
2. Beever, R. E., and Bollard, E. G. 1970. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *J. Gen. Microbiol.* 60:273-279.
3. Delic, I., Robbins, P., and Westpheling, J. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:1885-1889.
4. Fujii, T., and Miyashita, K. 1993. Multiple domain structure in a chitinase gene (*chiC*) of *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 139:677-686.
5. Iseli, B., Armand, T., Boller, T., Neuhaus, J.-M., and Henrissat, B. 1996. Plant chitinase use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett.* 382:186-188.
6. Itoh, Y., Kawase, T., Nikaidou, N., Fukada, H., Mitsutomi, M., Watanabe, T., and Itoh, Y. 2002. Functional analysis of the chitin-binding domain of a family 19 chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037: Substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1084-1092.
7. Itoh, Y., Takahashi, K., Takizawa, H., Nikaidou, N., Tanaka, H., Nishihashi, H., Watanabe, T., and Nishizawa, Y. 2003. Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:847-855.
8. Kawase, T., Kanai, R., Ohno, T., Tanabe, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., Mitsutomi, M., and Watanabe, T. 2001. Identification of three family 18 chitinase genes of *Streptomyces griseus* HUT6037. *Chitin Chitosan Res.* 7:241-251.
9. Keefe, D., Hinz, U., and Meins, F. 1990. The effect of ethylene on the cell-type specific and intracellular localization of β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta* 182:43-51.
10. Ko, H. -C. 2000. Effect of nutrient supplement on antibiotic and chitinase production by *Streptomyces saraceticus* SS31. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 90pp. (in Chinese with English abstract)
11. Kong, H., Shimosaka, M., Ando, Y., Nishiyama, K., Fujii, T., and Miyashita, K. 2001. Species specific distribution of a modular family 19 chitinase gene in *Burkholderia gladioli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37:135-141.

12. Kutchma, A.J., Roberts, M.A., Knaebel, D.B., and Crawford, D.L. 1998. Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia or spores. *Biotechniques* 24:452-457.
13. Lai, W. -R. 2003. Development of *Streptomyces griseobrunneus* S3 as a bioagent for the control of plant fungal disease. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 114pp. (in Chinese with English abstract)
14. Lee, M, -D. 1995. Application of chitinolytic *Actinomycetes* for controlling Southern root-knot nematode. M. S. Thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. 74pp. (in Chinese with English abstract)
15. Mauch, F., and Staehelin, A. 1989. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell* 1:447-457.
16. Miyashita, K., and Fujii, T. 1993. Nucleotide sequence and analysis of a gene (*chiA*) for a chitinase from *Streptomyces lividans* 66. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1691-1698.
17. Ni, X., and Westpheling, J. 1997. Direct repeat sequences in the *Streptomyces* chitinase-63 promoter direct both glucose repression and chitin induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:13116-13121.
18. Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., and Watanabe, T. 1996. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J. Bacteriol.* 178:5065-5070.
19. Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., Redenbach, M., Ohno, T., Watanabe, T., and Miyashita, K. 1999. High-multiplicity of chitinase gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:710-718.
20. Saito, A., Ishizaka, M., Francisco, P.B., Jr., Fujii, T., and Miyashita, K. 2000. Transcriptional co-regulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Microbiology* 146:2937-2946.
21. Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
22. Tsujibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K., and Inamori, Y. 2003. Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic Actinomycete, *Nocardiopsis prasina* OPC-131. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:894-900.
23. Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., and Miyashita, K. 1999. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology.* 145:3353-3363.
24. Yamaga, H., and Imoto, T. 1981. A convenient synthesis of glycochitin, a substrate of lysozyme. *Carbohydr. Res.* 92:160-162.

ABSTRACT

Yang, S. S.¹, Lee, M. H.¹, Tzeng, D. D. S.^{1,2} 2005. Cloning of full length sequence of a family 19 chitinase gene *ChiF* from *Streptomyces griseobrunneus* S3 and the molecular characterization of the recombinant protein. Plant Pathol. Bull. 14:133-146. (¹Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ²Corresponding author, Email: dstzeng@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22851038)

A preliminary survey of existence of family 19 chitinase gene among Taiwan native chitinolytic *Streptomyces* strains was conducted. Among 21 tested strains, 11 were detected positive by PCR (polymerase chain reaction) with the use of a family 19 chitinase gene specific primer pair. A full-length chitinase gene SGS3 *ChiF* was cloned from *Streptomyces griseobrunneus* S3—a chitinolytic strain known to have great potential in plant disease control application. Sequence analysis revealed that the gene contains 891 bp which encodes a 296 amino acid peptide with a molecular weight around 31.5 KDa. The gene contains a chitin binding domain (ChtBD) with ChtBD consensus sequence AKWWTQ. On its upstream was a promoter region with characteristic direct repeat sequence (T/A)GGTC(T/C)AGACC(T/A) known to be critical in chitin induction and glucose repression. From a SGS3 *ChiF* transformed *Escherichia coli* Rosetta™ (DE3), the ChiF recombinant protein with a predicted size around 31.5 KDa was extracted and purified by Fast Performance Liquid Chromatography. The polyclonal antibody for immuno-detection of the recombinant protein was successfully prepared. The enzyme appeared to survive denaturing during SDS-PAGE analysis, the enzyme characteristics of recombinant protein was demonstrated by activity stain and western blotting. A phylogenetic analysis revealed that the cloned gene was highly homologous to the comparative gene known on *S. griseus*, *S. coelicolor*, and *Nocardiopsis prasina*, which might be adapted evolutionarily from the class IV chitinase of plant system. The molecular characteristics of the gene and its possible connection to antifungal characteristic of *Streptomyces* are herein discussed.

Keyword: *Streptomyces griseobrunneus* S3, *ChiF* gene, family 19 chitinase, molecular characteristics, phylogenetic relationships, preparation of polyclonal antibody