

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070004

參展科別 微生物學

作品名稱 探討芽孢桿菌 FZB42 對植物病原菌拮抗之分子機制

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 陳穎練、許一懿

作者姓名 林芝榕

關鍵詞 芽孢桿菌 FZB42(Bacillus velezensis FZB42)、  
拮抗機制 (antagonistic mechanism)、  
隨機突變 (random insertion mutant)

## 作者簡介



我是北一女中二年級的學生林芝榕，由於在國小及國中皆有參與科展的經驗，對科學研究具有熱忱及興趣，因此上了高中則繼續朝此方向邁進。很高興能夠獲得這次參與國際科展的機會，十分感謝陳穎練教授及許一懿老師的指導，也謝謝實驗室的庭曜學長、宇祥學長以及其他學長姐的親自指導及照顧，讓我對生物學的研究能獲得成長與進步。

## 摘要

植物病原菌為造成台灣農業生產損害的一大威脅，近年來隨環保意識抬頭，生物防治更顯重要。本研究旨在探討芽孢桿菌 FZB42 (*Bacillus velezensis* FZB42) 中，影響對植物病原菌拮抗作用的基因序列，主要選取馬鈴薯瘡痂病菌(*Streptomyces scabies* PS07)做為本研究植物病原菌的受試對象。

研究中以跳躍子 TnYLB-1 隨機插入 FZB42 之基因體，破壞基因的表現能力，並以對峙培養實驗(dual culture experiments)分析其對植物病原菌的抑制圈半徑大小，觀察其拮抗效果的變化，後續以反向聚合酶連鎖反應(Inverse PCR; iPCR)技術確認跳躍子插入所破壞的基因序列，進而探求其對於植物病原菌拮抗的分子機制。

本研究初步篩選出五株 FZB42 突變株(mutant)，於對峙實驗中分析得知其對 *S. scabies* PS07 的拮抗效果較 FZB42 野生株顯著降低，推測該突變株內受跳躍子插入破壞的基因與其拮抗作用相關。再透過 iPCR 確認該基因的序列，經資料庫比對，推論此基因最有可能為「可產生蛋白質 LoaP 以促進菌體內基因簇(difficidin gene cluster)產生抗細菌物質的基因」或「藉光遺傳學控制調控菌體生長的基因」。本研究探究 FZB42 拮抗病原細菌 *S. scabies* PS07 的機制，得證抗細菌基因與芽孢桿菌 FZB42 拮抗馬鈴薯瘡痂病菌 *Streptomyces scabies* PS07 之分子機制具有一定關聯性。

期望透過本研究對此拮抗機制的結果，應用於抑制馬鈴薯瘡痂病菌對作物的威脅，提供未來生物防治領域的參考。

## Abstract

Plant pathogens are the main threat to Taiwan's agricultural production. In recent years, because of the increase of public's environmental awareness, biological control has become more and more important. The purpose of this study is to figure out the gene order of *Bacillus velezensis* FZB42 that affects the antagonism to plant pathogenic microorganisms. In this study, the plant pathogenic microorganism subject is the pathogenic bacteria of potato common scab (*Streptomyces scabies* PS07).

In this study, transposon TnYLB-1 was randomly inserted into the genome of FZB42 to destroy the expression ability of the gene. Analyzing the inhibition zone's radius of plant pathogens by dual culture experiments, and observe the changes in its antagonism. Subsequently, in order to determine the antagonistic mechanism of its antagonism to plant pathogenic microorganisms, I used inverse PCR (iPCR) to confirm the gene order destroyed by the transposon.

In my research, five FZB42 mutant strains have been selected. And in the dual culture experiments, it was found that all of them have lower antagonistic effect than that of the wild type strain of *S. scabies* PS07. Therefore, it is speculated that the gene damaged by transposon insertion in its genome should be related to its antagonistic effect to *S. scabies* PS07. After confirming order of the gene by iPCR and compared it with the database, it was concluded that the gene is most likely to be a "gene that can produce protein LoaP to promote the production of antibacterial substances from the difficidin gene cluster" or " gene that using optogenetics to control bacterial growth". Since the purpose of this research is to decipher the antagonistic mechanism of FZB42's antagonism to the pathogenic bacteria *S. scabies* PS07, it can be proved that there is some relationship between the "gene that can produce protein LoaP to promote the production of antibacterial substances from the difficidin gene cluster" and the mechanism of FZB42's antagonism to *Streptomyces scabies* PS07.

It is hoped that the understanding of this antagonistic mechanism can be used to control the threat of *Streptomyces scabies* PS07 to crops, and provide an important reference for biological control in the future.

## 壹、前言

### 一、研究動機

「植物病原菌」被世人所發現已屆百餘年，而台灣氣候高溫多濕，適合植物病原菌生長，因此植物病原菌常造成作物栽培的一大威脅，損害本土的農業生產（林駿奇，2019）。

近年來，在世界環保意識抬頭，食安問題不斷的情況下，積極尋求可行的生物防治策略更顯重要。日前，在過去文獻中得知芽孢桿菌具有能拮抗植物病原菌之現象（黃雅靖，2011；周浩平、陳以錚，2016），令我感受到植物世界中自然力量交互作用之奧妙。然而，從過去研究中，卻未能發現芽孢桿菌在對抗植物病原菌時之確切基因序列及其互相拮抗的作用機制，對此種桿菌抑制植物病原菌的生物防治方式亦較少研究。

因此，本研究期望能進一步找出並確認芽孢桿菌中得以拮抗植物病原菌的基因，希望能在植物病原菌的生物防治領域有所貢獻。

### 二、研究目的

探討芽孢桿菌 FZB42(*Bacillus velezensis* FZB42)中，影響對植物病原菌拮抗作用之基因序列。

### 三、文獻探討

本文以常見的馬鈴薯瘡痂病菌(*Streptomyces scabies* PS07)做為植物病原菌代表，以下分別介紹馬鈴薯瘡痂病菌(*S. scabies*)、芽孢桿菌 FZB42(*Bacillus velezensis* FZB42)及 FZB42 運用於生物防治之現況。其後，再說明如何運用跳躍子插入 FZB42 基因體破壞基因功能，及以 iPCR 技術確定其插入之基因位置的方法。

## (一) 實驗菌種介紹

### 1. 馬鈴薯瘡痂病菌(*Streptomyces scabies*)簡介

馬鈴薯瘡痂病菌(*Streptomyces scabies*)為一放線菌屬鏈黴菌科之革蘭氏陽性細菌，此類細菌最常見的是引起塊莖和根部作物的疾病，乃是造成馬鈴薯種植期間瘡痂病害之主要病原細菌，可經由土壤與種薯帶菌而傳播（莊雅蓉，2010）。其菌體成絲狀，具有極細分支，其尖端常呈螺旋狀，能連續分割生成大量孢子。病害主要發生之溫度為約 25~30°C，常於中性或弱鹼性之砂質土壤嚴重發病，而土壤酸鹼度 pH5.2 以下則不易發病。

目前所知之致病機制為抑制植物細胞壁之生長，而造成之主要病徵為薯塊木栓化或產生壞疽病斑等，嚴重時病斑癒合呈網狀龜裂（馮如瑩，2019）。雖然常見病斑僅只產生於薯塊表層，但其病斑導致賣相不佳且傷口易感染，常使台灣馬鈴薯的品質及商業價值受到極大影響。然而目前臺灣尚無有效殺菌劑等抗病害方法，輪作等方法之效果亦有限（林芝，2017）。

### 2. 芽孢桿菌 FZB42 (*Bacillus velezensis* FZB42)簡介

芽孢桿菌屬(*Bacillus*)屬於革蘭氏陽性菌，為好氧性的短桿狀細菌，具有周生鞭毛，大多為腐生菌，存在於土壤、水、空氣及植物體內外。可生長在 pH2 至 pH10 的環境之下，具有耐高溫之特性，在不適合生存的情況下，可產生內生孢子以進入休眠狀態，適應不良環境（郭建志，2014）。

芽孢桿菌屬內包含多種菌種，其分類包括模式生物枯草芽孢桿菌和著名的致病菌炭疽桿菌等。此屬細菌中有專性需氧菌或兼性厭氧菌，他們遍布於各種環境，有些獨立存在亦有些會寄生於其他生物。

芽孢桿菌 FZB42 已於 1998 年分離並於 2007 年完成全基因體序列解序。直到 2018 年，在 FZB42 的基因體中已鑑定出 13 個基因簇，這些基因簇涉及具有抗菌作用的二次代謝物合成，這些基因簇占整個基因體約 10%。

*Bacillus velezensis* FZB42 的對植物病原之生物防治機制與其他芽孢桿菌有所不同：FZB42 除了通過植物體根圈中一系列二次代謝物的分泌與植物病原體進行直接競爭與抗生

作用 (Borriss, 2011) 外, 微生物群系對宿主植物的有益作用 (Erlacher et al., 2014) 和植物的誘導系統型抗性 (ISR, Kloepper et al., 2004; Chowdhury et al., 2015a) 之刺激作用具有同等重要性。

## (二) 芽孢桿菌屬運用於生物防治之現況

近年來, 對於液化澱粉芽孢桿菌防治作物病害的研究日益增多。防治作物病害的機制包括: 可以產生多種抗生物質, 如 iturin A、surfactin 與 fengycin 等, 以抑制病原菌的生長; 菌落可纏聚在植物根圈並誘導植物產生防禦反應, 進而抵抗病原微生物的入侵; 具有植物根圈促生細菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 功能, 並誘導植物產生抗病反應。

在臺中農業改良場的研究指出, 液化澱粉芽孢桿菌可以抑制多種的植物病原菌生長, 包含真菌病原、細菌病原等。而液化澱粉芽孢桿菌的製劑, 經溫室與小規模田間防治試驗, 更可有效降低镰孢菌所引起的萎凋病的發生與罹病情形 (郭建志等, 2014)。

另一研究也發現, 以液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* BPD1) 開發成同時兼具藥效與肥效的農用微生物製劑, 並從中篩選出本土潛力菌株 Ba-BPD1, 發現其具有廣泛的病害防治效果, 可拮抗 21 種植物病原真菌與 12 種植物病原細菌 (廖仁宏, 2017)。

### (三) 取得拮抗基因之過程與技術

#### 1. 轉型作用(transformation)——跳躍子隨機插入 FZB42 基因體之原理及機制

欲使跳躍子 TnYLB-1 能隨機插入芽孢桿菌 FZB42 之基因體中，須先使其進入 FZB42 之菌體內，而質體 pMarA 即為將跳躍子送入其菌體內之媒介。下圖為質體 pMarA 之示意圖，橘色部分為跳躍子 TnYLB-1，上有 Kan<sup>R</sup> (抗抗生素 Kanamycin) 基因，故跳躍子插入基因體後，Kan<sup>R</sup> 隨之插入，可做為標誌基因。藍色部分為 Erm<sup>R</sup> (抗抗生素 erythromycin) 基因，屬於 pMarA 上之一段，但未位於跳躍子 TnYLB-1 上，故會隨著質體的剔除而消失，可作為質體存在與否的辨識。

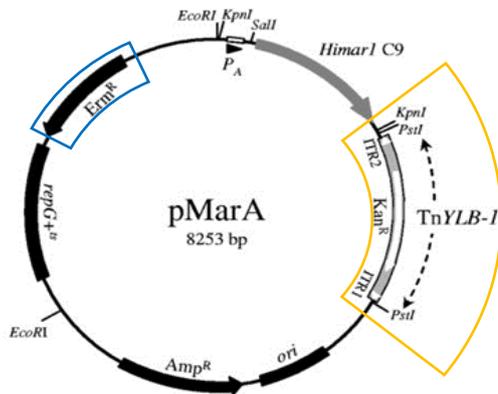


圖 1. 質體 pMarA 示意圖 (圖片來源：Yoann, 2006)

先將 FZB42 與具有質體 pMarA (上有跳躍子 TnYLB-1) 的大腸桿菌 *Escherichia coli* 進行共培養，使兩者產生接合作用(conjugation)<sup>\*註 1</sup>，進而將 TnYLB-1 藉由 pMarA 送入 FZB42 之菌體內。後將 FZB42 (菌體內有 pMarA) 置於較低溫環境培養，使跳躍子隨機插入 FZB42 基因，再移至較高溫環境培養，使質體不再自我複製，並培養於含 Kanamycin 抗生素之培養基，使不具 Kan<sup>R</sup> 基因之菌株死亡，篩選出具 TnYLB-1 插入轉型之菌株，同時於繼代後之 FZB42 剔除此質體。

\*註 1：接合作用：兩個細菌之間透過直接接合或者藉由兩者線毛相接所形成之通道接合，發生遺傳物質的交換現象。此處作用機制為後者所述。

## 2. Inverse PCR (iPCR)過程及原理

以跳躍子 TnYLB-1 隨機插入 FZB42 基因體中後，先利用限制酶將其基因體隨機切割成 DNA 片段，再使其自我黏合，後以與 TnYLB-1 之序列配對之引子對，對具有 TnYLB-1 之片段做反向 PCR (iPCR)，即其複製方向為由內向外複製延伸，與 PCR 由外向內複製之方向相反。又因每段 DNA 序列為隨機切割而得，故所產生之產物長度不一，可藉膠體電泳依 PCR 產物大小做分離後，將各長度大小不同之產物分別進行序列之定序，比對 FZB42 之全基因序列，便可得知因跳躍子插入而受破壞失去功能之基因。

## 貳、研究材料及方法

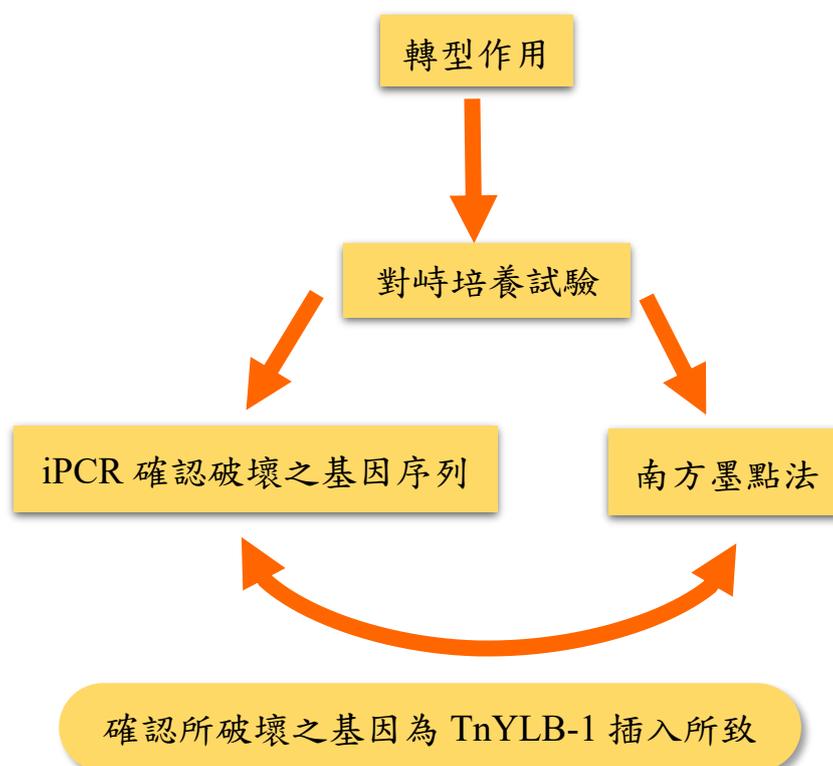


圖 2. 研究流程與架構圖

## 一、轉型作用(transformation)

(一) 器具：無菌操作台、培養箱 (28°C、30°C、37°C、50°C，內有試管震盪裝置)、離心機、微量吸管、培養基、PCR 儀器、分光光度計 (測量菌液 OD 值)、玻璃珠

(二) 材料：芽孢桿菌 FZB42、大腸桿菌勝任細胞 (*E.coli* S17-1，菌體內含具跳躍子 TnYLB-1 的 pMarA 質體)、含抗生素 PMB (polymyxin B)+mls (lincomycin & erythromycin) 之 LB 固態培養基、含 Kan (Kanamycin) 抗生素 LB 培養液、無菌水(ddH<sub>2</sub>O)

### LB 固態培養基(PMB+mls)

Tryptone	4 g
Yeast extract	2 g
NaCl	4 g
Agar	6 g
Polymyxin B (10mg/mL)	400 µL
Lincomycin (25mg/mL)	400 µL
Erythromycin (1mg/mL)	400 µL
dH <sub>2</sub> O	400 mL

### LB 固態培養基(Kan)

Tryptone	4 g
Yeast extract	2 g
NaCl	4 g
Agar	6 g
Kanamycin (5mg/mL)	400 µL
dH <sub>2</sub> O	400 mL

(三) 步驟：FZB42 突變株(mutant)的製備

1. Conjugation (Donor: *E.coli* S17-1, Recipient: FZB42)

混合等量濃度為 1 OD 的大腸桿菌勝任細胞(內含具跳躍子 TnYLB-1 的 pMarA 質體)及 FZB42 野生株之菌液(以 LB 培養液為基底)，將上述混合菌液於一 LB 固態培養基平均分為 20 滴(每滴 10 $\mu$ L)滴加。

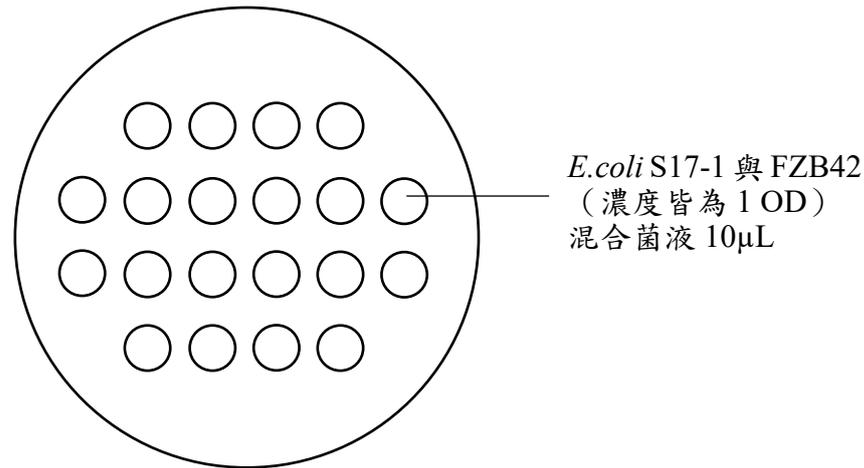


圖 2. 共培養菌液滴加分布示意圖

2. 隔夜培養後，於 LB 固態培養基加入 3mL ddH<sub>2</sub>O 洗下菌落懸浮液，離心後以 ddH<sub>2</sub>O 回溶。
3. 將回溶後之菌液塗盤於含抗生素 PMB 及 mls 之 LB 固態培養基，於 30°C 培養箱中靜置 1~2 天。抗生素 PMB 用於殺死共培養時使用之大腸桿菌，又質體 pMarA 上具有可抗 mls 之基因序列，故可以抗生素 mls 篩選出具有質體之轉型 FZB42 菌株。

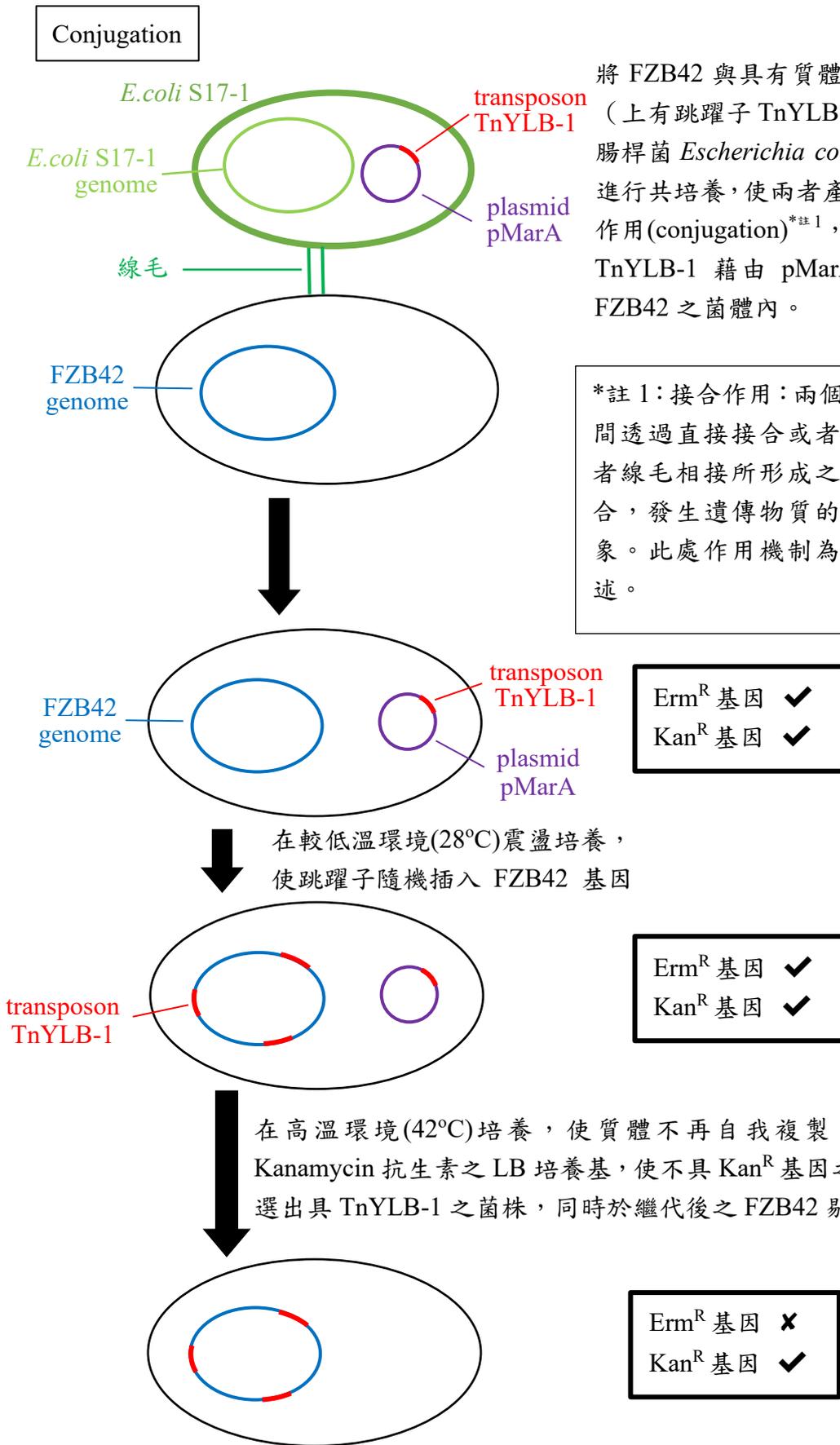
4. Colony PCR

挑選含抗生素 PMB 及 mls 之培養基上之單一菌落，以牙籤適量沾取菌落置入 PCR 反應管，加入引子對(JC1512、JC1513)、反應混合物(Master mix)、ddH<sub>2</sub>O 進行 PCR 反應檢測 Erm<sup>R</sup> 基因，確認 FZB42 菌體中的 pMarA 質體(確認電泳結果之條帶)。

5. 將內含 pMarA 質體的 FZB42 培養於 3mL 含 Kan 之 LB 培養液(篩選菌體內具有 Kan<sup>R</sup> 基因可於抗生素環境下存活性)，在 28°C 下震盪隔夜培養，使跳躍子 TnYLB-1 隨機插入基因體中。

6. 將震盪培養後的菌液稀釋（濃度為原液的  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  及  $10^{-6}$  倍）後，塗盤於含 Kan 之 LB 固態培養基，在  $50^{\circ}\text{C}$  下培養 48 小時，使 pMarA 質體不再自我複製，新分裂之 FZB42 菌株即不具此質體，而成功插入 FZB42 基因體之 TnYLB-1 則仍繼續複製，方可達剔除質體之目的。
7. 再次進行 colony PCR，以引子對 JC1512、JC1513 檢測  $\text{erm}^{\text{R}}$  基因（只存在於質體而不存在於跳躍子上，故無法產生此段序列之產物方為成功剔除質體），以引子對 JC1816 檢測跳躍子 TnYLB-1（應產生此段序列之產物方為跳躍子成功插入基因體）。
8. 以膠體電泳檢測  $\text{Erm}^{\text{R}}$  基因及 TnYLB-1 片段，其中結果為「具有 TnYLB-1 片段而不具  $\text{Erm}^{\text{R}}$  基因者」可用於作為對峙培養試驗之對象。

(四) 轉型作用之分子機制



將 FZB42 與具有質體 pMarA (上有跳躍子 TnYLB-1) 的大腸桿菌 *Escherichia coli* S17-1 進行共培養，使兩者產生接合作用(conjugation)<sup>\*註1</sup>，進而將 TnYLB-1 藉由 pMarA 送入 FZB42 之菌體內。

\*註 1: 接合作用: 兩個細菌之間透過直接接合或者藉由兩者線毛相接所形成之通道接合，發生遺傳物質的交換現象。此處作用機制為後者所述。

## 二、對峙培養試驗（濾紙片擴散實驗）

(一) 器具：無菌操作台、離心機、培養箱、養菌管、鑷子、微量吸管、圓形濾紙片、分光光度計、玻璃珠、游標尺

(二) 材料：FZB42 野生株、FZB42 突變株、馬鈴薯瘡痂病菌(*Streptomyces scabies* PS07)孢子懸浮液、YME 固態培養基、無菌水(ddH<sub>2</sub>O)

### YME 固態培養基

Yeast extract	1.6 g
Malt extract	4 g
Agar	8 g
20% glucose	0.8 mL
dH <sub>2</sub> O	400 mL

(三) 步驟：

1. 將 FZB42 野生株及各突變株之培養液離心 15 分鐘後，倒除上清液並以 2ml dH<sub>2</sub>O 回溶。
2. 將菌液 10 倍稀釋後以分光光度計測量其 OD 值，調整各菌液濃度至 1 OD。
3. 以濃度  $10^9$  spores/mL 之 *S. scabies* 孢子懸浮液 100 $\mu$ L 塗盤於 YME 固態培養基。
4. 將圓形濾紙片以滅菌鑷子夾取移入培養 *S. scabies* 之 YME 培養基上並輕壓，使濾紙片與培養基表面接觸並固定位置（每盤各 2 片）。

5. 以微量吸管吸取 3 $\mu$ L 拮抗菌 FZB42 之菌液（或 ddH<sub>2</sub>O）滴加於濾紙片上。每盤之兩濾紙片分別滴加 ddH<sub>2</sub>O（對照組）及欲測試之拮抗菌液（實驗組）。

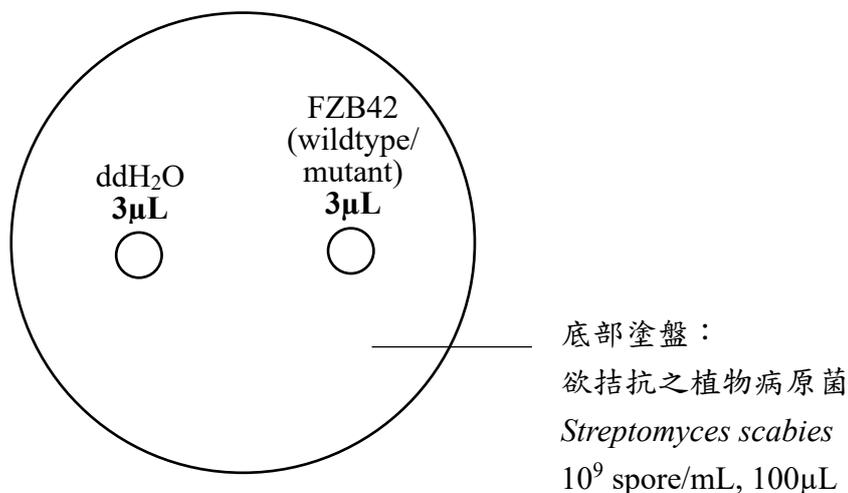


圖 3. 濾紙片擴散實驗之示意圖

6. 在 28°C 下培養 3 至 5 天。待病原菌生長，量測抑制圈之半徑大小（測量範圍=濾紙片中央至抑制圈邊緣之長度-拮抗菌菌落大小），將突變株與野生株之數據進行統計分析比較。

### 三、反向聚合酶連鎖反應（iPCR）

(一) 器具：1.5mL 離心管、微量吸管、電泳槽、PCR 反應儀、恆溫式水浴槽、紫外光及藍光膠體觀察箱

(二) 材料：FZB42（突變株）菌液、抽取 DNA 之材料、限制酶 Taq $\alpha$ I、DNA 純化材料、iPCR 材料、膠體電泳用之洋菜膠(agarose gel)、無菌水(ddH<sub>2</sub>O)

(三) 步驟：

1. 取拮抗效果相較於 FZB42 野生株具有顯著下降 (P-value<0.05) 之突變株（即抑制圈半徑經統計後有顯著降低者），並抽取其 DNA 以確認跳躍子插入之基因序列。

## 2. 基因體切割(Digestion)

於 1.5mL 離心管中，將已抽取出的 FZB42 之 DNA 5 $\mu$ g，加入 cut smart 緩衝液 5 $\mu$ L 及 ddH<sub>2</sub>O (至 50 $\mu$ L)，以限制酶 Taq $\alpha$ I 1 $\mu$ L 進行 FZB42 之基因體切割，置於恆溫式水浴槽中，在 65°C 下反應 30 分鐘。

## 3. DNA 純化 (clean up)

## 4. DNA 自我黏合(self-ligation)

取 100ng DNA，加入 10X T4 ligase buffer 2 $\mu$ L、T4 ligase 1 $\mu$ L 及 ddH<sub>2</sub>O(至 20 $\mu$ L)，在 16°C 下隔夜反應。

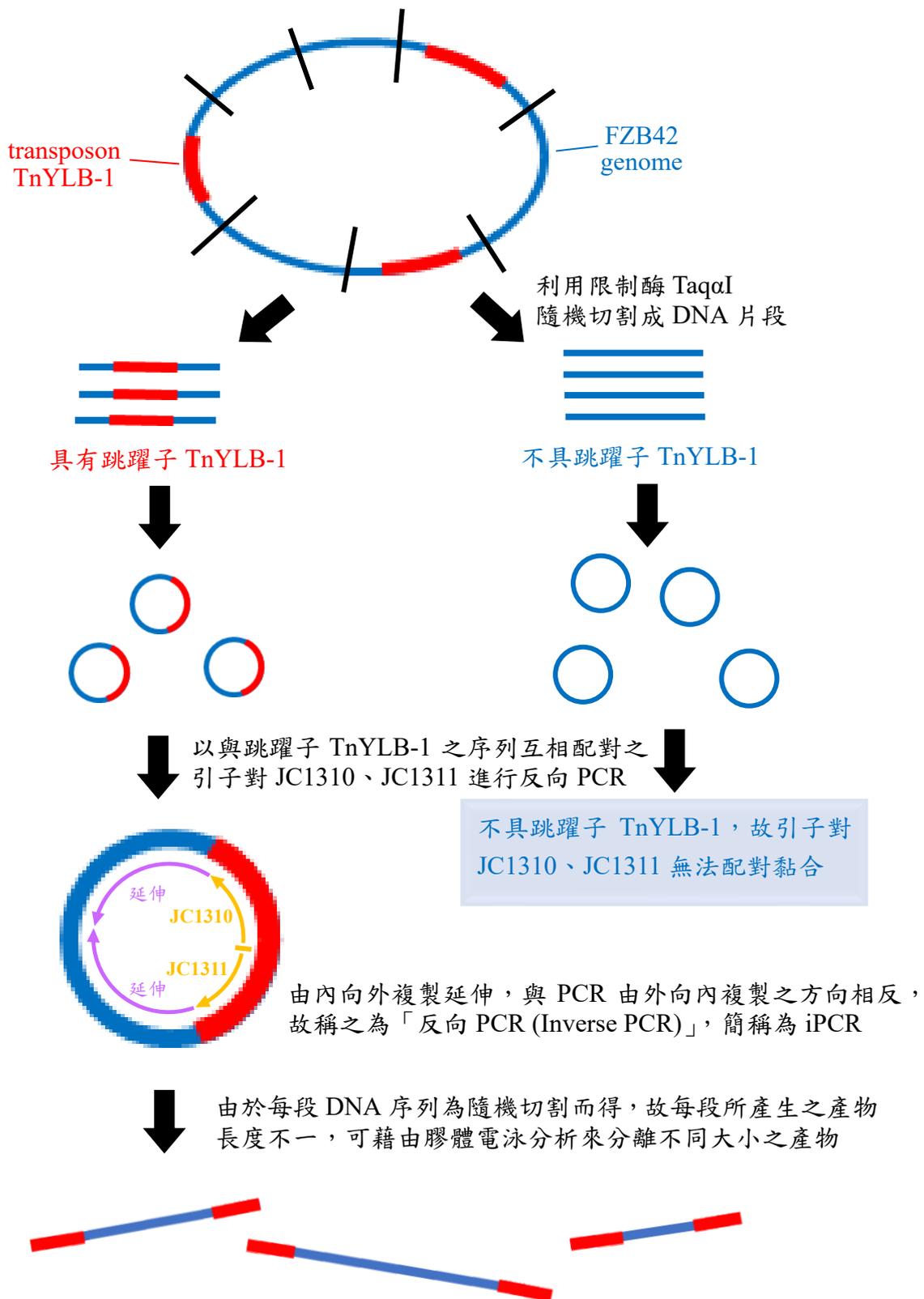
## 5. 隔夜反應後，在 95°C 下 15 分鐘以停止黏合(inactivate)。

## 6. 以引子對 JC1310、JC1311 (各 2.5 $\mu$ L) 進行 iPCR 反應，另外加入 DNA 聚合酶 Ex Taq 0.25 $\mu$ L、緩衝液 Taq buffer 5 $\mu$ L、dNTP 5 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 15 $\mu$ L 及前述之已自我黏合之 DNA 20 $\mu$ L。參考引子對之 T<sub>m</sub> 值，推算其黏合溫度(annealing temperature)，後又經過多次嘗試與調整後，最終以 46°C 作為流程中之黏合溫度。

## 7. 以膠體電泳方式檢查 iPCR 產物之片段大小。

## 8. 經 DNA 定序後，推知跳躍子 TnYLB-1 插入後所破壞之基因序列，即可推得可能與拮抗現象相關之特定基因序列，進而了解其拮抗作用之分子機制。

(四) iPCR 之分子機制



以膠體電泳依 PCR 產物大小做分離後，可將位於各條帶（代表長度大小不同）之產物分別進行序列之定序，比對 FZB42 之全基因序列，便可知因跳躍子插入而受破壞失去功能之基因，即可推論其與拮抗病原菌能力之相關性。

#### 四、南方墨點法(Southern blot)

(一) 器具：微量吸管、PCR 反應儀、電泳槽、玻璃板、重物、烘箱、紫外光及藍光膠體觀察箱、雜合管、雜合箱

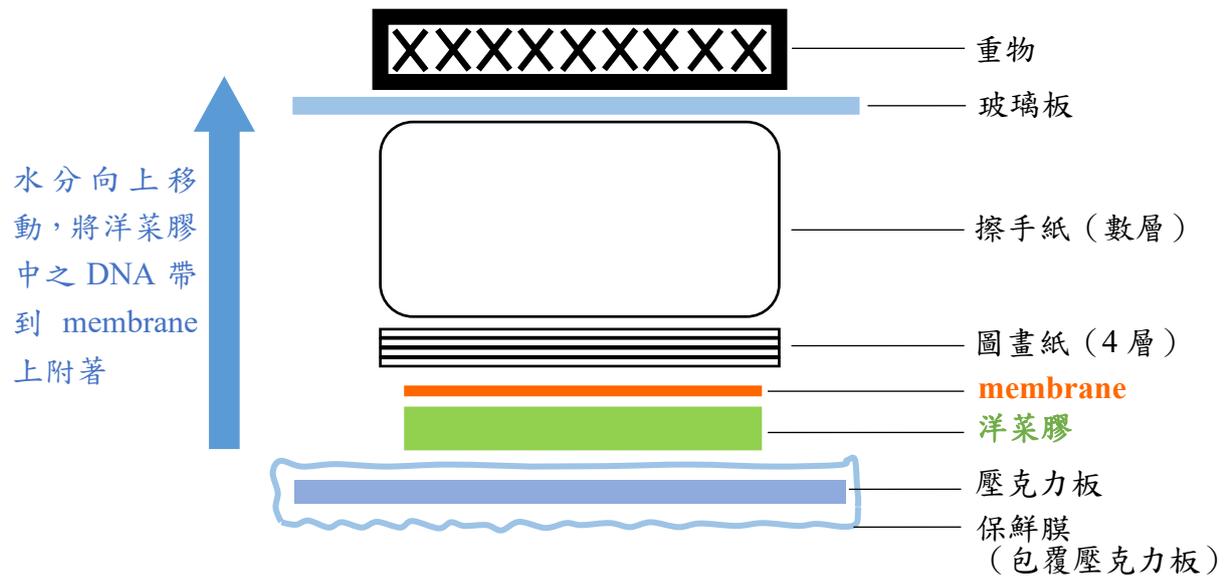
(二) 材料：FZB42 突變株之 DNA、TnYLB-1 DNA、DNA Ladder、酵素 HindIII、NEB buffer2.1、膠體電泳用之洋菜膠(agarose gel)、depurination solution(0.25N HCl)、denaturing buffer(0.5N NaOH、1.5M NaCl)、neutralization buffer(0.5M Tris-HCl、1.5M NaCl)、擦手紙、圖畫紙、轉染模(membrane)、2X SSC buffer、探針製備用之溶液(Cross-linker solution、reaction buffer、labeling reagent)、hybridization buffer、wash buffer(1<sup>st</sup>/2<sup>nd</sup>)、顯影用之溶液(CDP-Star Detection Reagent、顯影液、定影液)、底片、無菌水(ddH<sub>2</sub>O)

(三) 步驟：

1. DNA 切割(digestion)：取 10-20 $\mu$ g DNA，加入酵素 HindIII 1.8 $\mu$ L、NEB buffer2.1 2.5 $\mu$ L (總量 25 $\mu$ L)，隔夜反應始其充分切割(即各菌株之基因體所切割之位點相同)。後以膠體電泳確認切割後之 DNA 片段大小呈連續而分散的分布(smear)。(先以 70V 電壓進行 10 分鐘，再改以 50V 電壓進行 1.5~2 小時)
2. DNA 變性(denaturing)：使 DNA 之雙股分開。
  - (1)將膠體電泳後之洋菜膠，置於 depurination solution 中搖晃 15 分鐘(約 60~70 rpm)。
  - (2)而後置於 denaturing buffer 中搖晃 25 分鐘。
  - (3)而後置於 neutralization buffer 中搖晃 30 分鐘。

### 3. 轉染(blotting)

(1)利用毛細現象使洋菜膠上之 DNA 轉染至轉染膜(membrane)，裝置如下。



(2)利用 2X SSC buffer 潤洗 membrane 兩次，每次 2 分鐘。

(3)將 membrane 置於 60~70°C 之烘箱烘乾 7 分鐘。

(4)Cross-link：將 membrane 置於紫外光下，兩面各照射 3 分鐘，使 DNA 與 membrane 結合更穩固。

### 4. 製備探針(probe)

(1)取 4 $\mu$ L Cross-linker solution，加入 16 $\mu$ L H<sub>2</sub>O 稀釋(working solution)。

(2)取 10 $\mu$ L TnYLB-1 DNA(100ng)，置於 95°C 10 分鐘使其變性 (兩股分開)，再置於冰上冷卻 5 分鐘後離心。

(3)將 DNA Ladder 稀釋 100 倍。

(4)混合 100ng DNA、1 $\mu$ L 稀釋之 DNA Ladder、10 $\mu$ L reaction buffer、1 $\mu$ L labeling reagent 及 10 $\mu$ L cross link working solution 於一 PCR 反應管中。

(5)將該反應管置於 37°C 下培養 30 分鐘。

## 5. 雜合(hybridization)

- (1)將 membrane 置入雜合管中 (DNA 所在一面朝內，避免與管壁摩擦)
- (2)於雜合管中加入 15mL 已預熱 55°C 之 hybridization buffer。
- (3)Pre-hybridization：預先將 membrane 與 hybridization buffer 置於 55°C 雜合箱中培養 1 小時 (約 15rpm)。
- (4)於雜合管中加入探針(probe)後隔夜反應。

## 6. 清洗 membrane

- (1)利用已預熱 55°C 之 1st wash buffer 清洗 membrane 兩次，每次 10 分鐘。
- (2)利用 2nd wash buffer 清洗 membrane 兩次，每次 5 分鐘。

## 7. 顯影(detection)

- (1)將 membrane 置於一塑膠片上，滴加 1mL CDP-Star Detection Reagent 使探針顯影，再以另一塑膠片覆蓋其上，靜置 5 分鐘。
- (2)於暗房中以一底片置於 membrane 上，隔夜等待使其充分轉印。
- (3)將底片置入顯影液中，用清水清洗後再置入定影液中，再次以清水清洗後即得 TnYLB-1 及 DNA Ladder 之顯影結果。

## 參、研究結果與討論

### 一、研究結果

#### (一)以 colony PCR 篩選合適突變株

##### 1. Conjugation

以引子對 JC1512、JC1513 複製放大質體 pMarA 上之  $Erm^R$  基因片段，篩選出經 FZB42 與大腸桿菌共培養後，質體成功進入 FZB42 菌體者。

由膠體電泳結果可見，代號 C2、C6、C11 之條帶較亮，表示質體成功進到菌體內。而 C3、C5、C10 亦可見白色條帶，但亮度不如前述三者，可推測進入菌體之質體數量較少，可能較不利於後續突變株之製造。經篩選後，取 C2、C3、C5、C6、C10、C11 分別在 28°C 下進行液態培養。

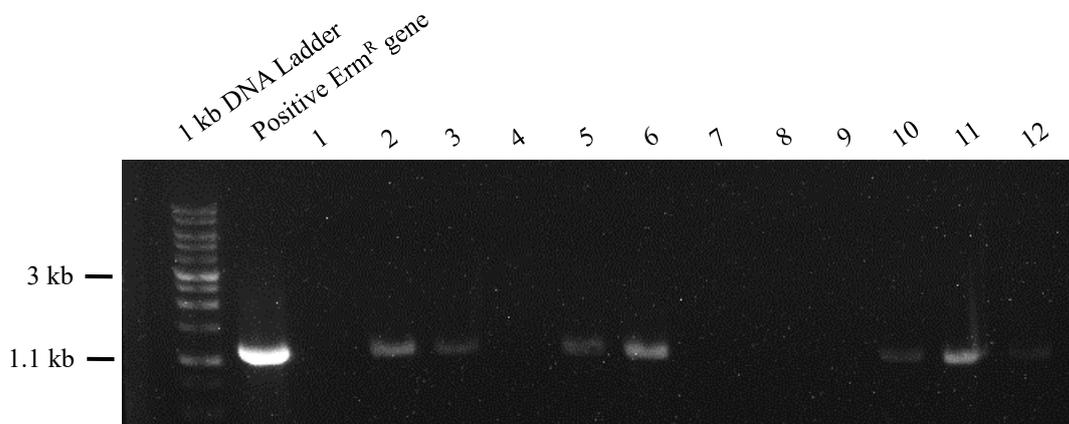


圖 4. <sup>\*註 2</sup>  $Erm^R$  基因之 PCR 產物之膠體電泳分析結果

註 2：圖中左側第一排為 DNA Ladder (分子量標準液)，作為 DNA 片段大小之比較。左側第二排為純  $Erm^R$  基因片段，作為剩餘 12 突變株之對照組。自第三排至最末排依序為代號 C1 至 C12，其中具有白色條帶者意即其菌體內具有  $Erm^R$  基因片段，可得知其於共培養後，菌體內具有質體 pMarA (上有  $Erm^R$  基因片段供辨識) 帶入跳躍子。

2. 經低溫(28°C)培養使跳躍子隨機插入基因體，後以高溫(50°C)剔除質體後，應留下具有跳躍子 TnYLB-1 片段（上有 Kan 基因）而不具質體上其他片段所帶有之  $Erm^R$  基因片段。

由圖中可見 Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11 符合「有 TnYLB-1 片段條帶而無  $Erm^R$  基因條帶」，可用於後續與病原菌之對峙試驗。

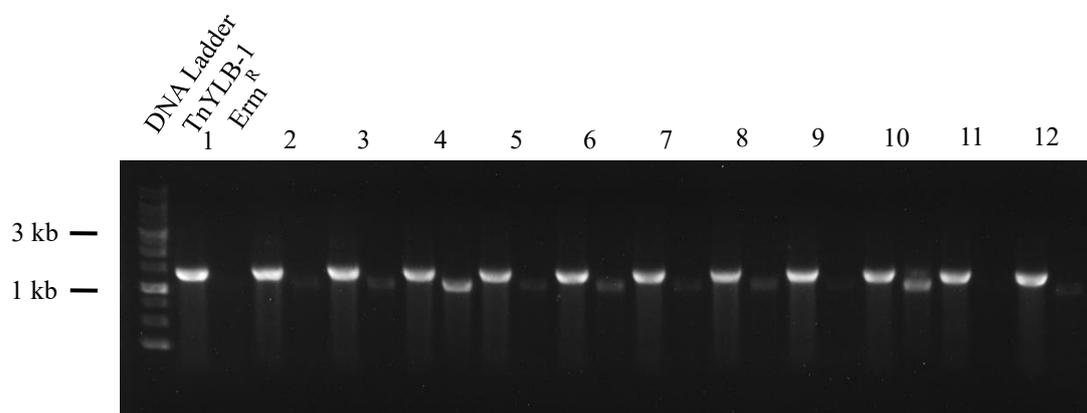


圖 5.\*註3 TnYLB-1 片段及  $Erm^R$  基因之 PCR 產物之膠體電泳分析結果

註3：圖中左側第一排為 DNA Ladder（分子量標準液），作為 DNA 片段大小之比對。由於 TnYLB-1 片段大小約 1300~1400bp，而  $Erm^R$  基因片段大小約 1100bp，故  $Erm^R$  基因之產物為在相同時間內，距離起點（圖片上方）較遠者。圖中第二排開始依序為代號 Tn1 至 Tn12，為經高溫培養於含抗生素 Kan 之培養基所得之菌株，每一菌株分別有兩排，左側為 TnYLB-1 片段之產物，右側為  $Erm^R$  基因之產物。

(二) 以濾紙片擴散之對峙實驗觀察 FZB42 突變株對 *Streptomyces scabies* PS07 之拮抗情形

藉由量測其抑制圈之半徑大小，取同一拮抗菌株之三次實驗結果，以統計方法計算 4 個突變菌株之結果與野生株之差異。如下三統計圖呈現 FZB42 突變株 Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11 與 FZB42 野生株的三次對峙實驗所測量之抑制圈半徑大小。以 T. test 做統計圖，其中 p-value<0.05 者，結果具有顯著差異，意即其拮抗效果有顯著下降，其差異以「\*」之個數做程度之區別。

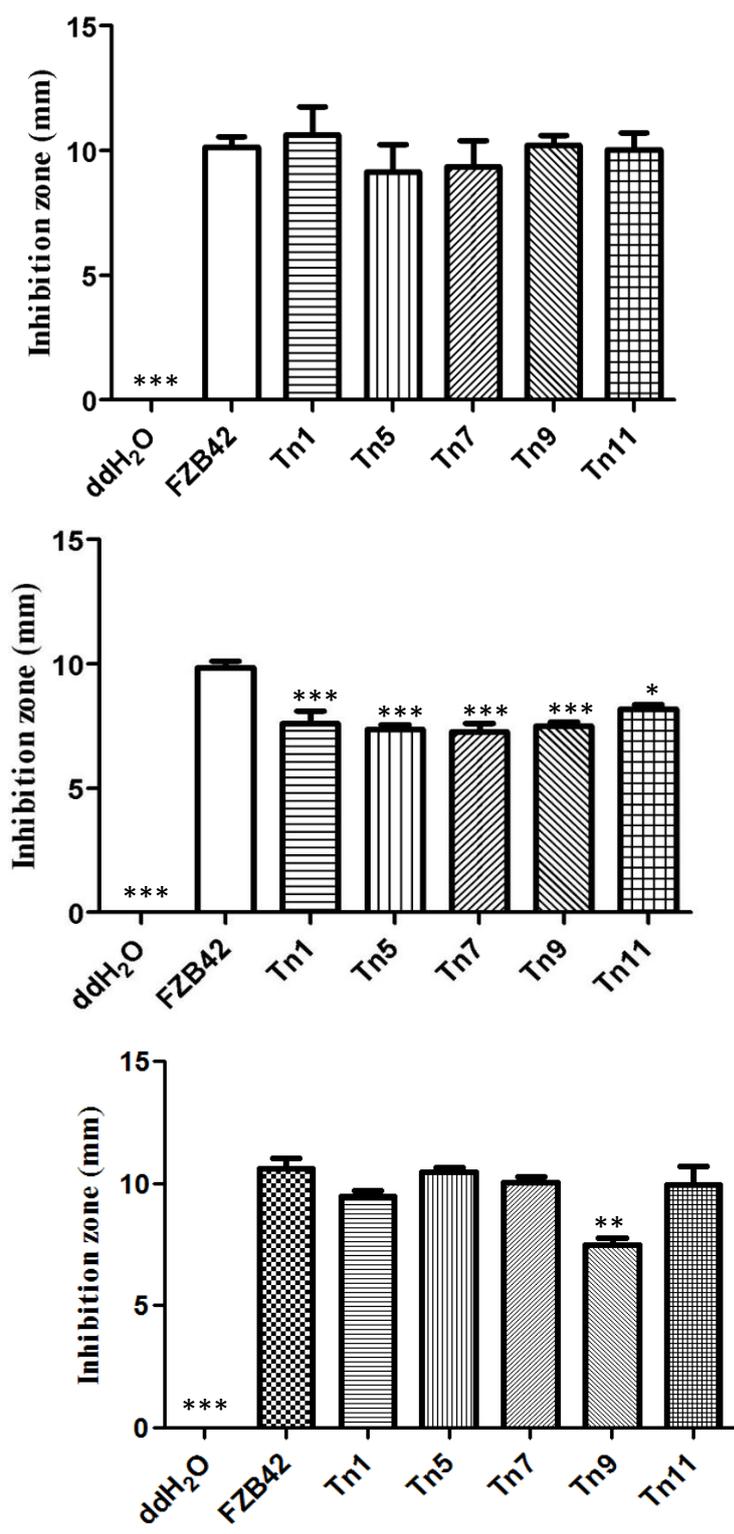


圖 6. FZB42 之野生株與突變株(Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11)對 *S. scabies* PS07 之對峙結果分析圖<sup>\*註4</sup>

註 4：以 T. test 做統計數據，\*：p<0.05，\*\*：p<0.01，\*\*\*：p<0.001，\*\*\*\*：p<0.0001

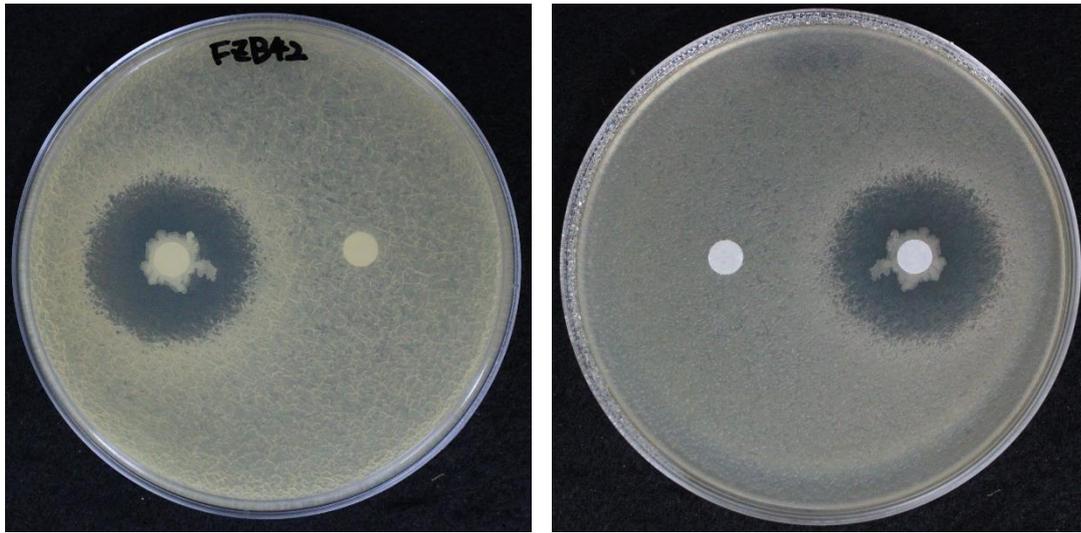


圖 7. FZB42 野生株對 *S. scabies* PS07 之對峙結果 (左：背面/右：正面) <sup>\*註 5</sup>

註 5：各菌株左圖之結果中，左側濾紙片為滴加 FZB42，右側為滴加等量 ddH<sub>2</sub>O 作為對照組。右圖之左右側則反之。(圖 8 至圖 12 亦同)

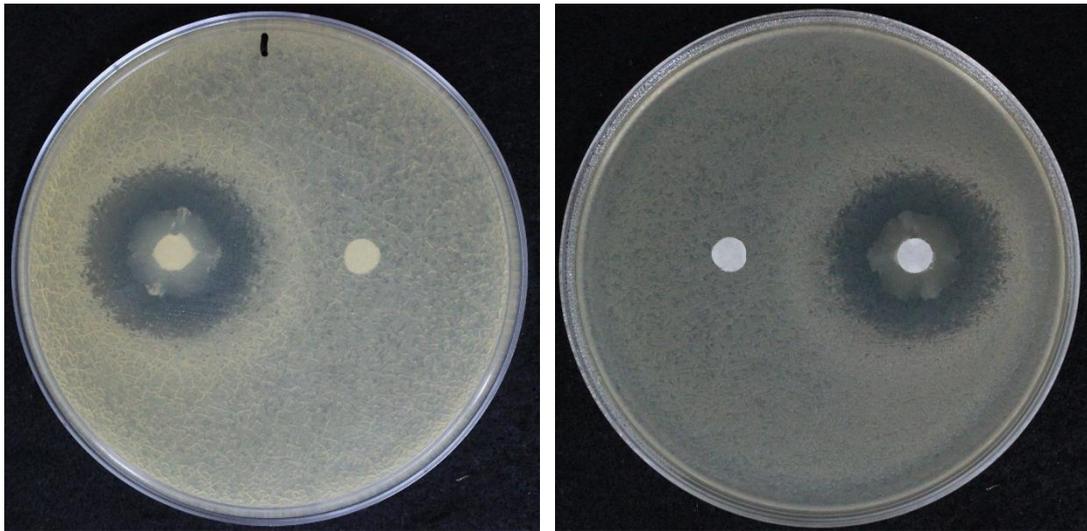


圖 8. FZB42 突變株(Tn1)對 *S. scabies* PS07 之對峙結果 (左：背面/右：正面)

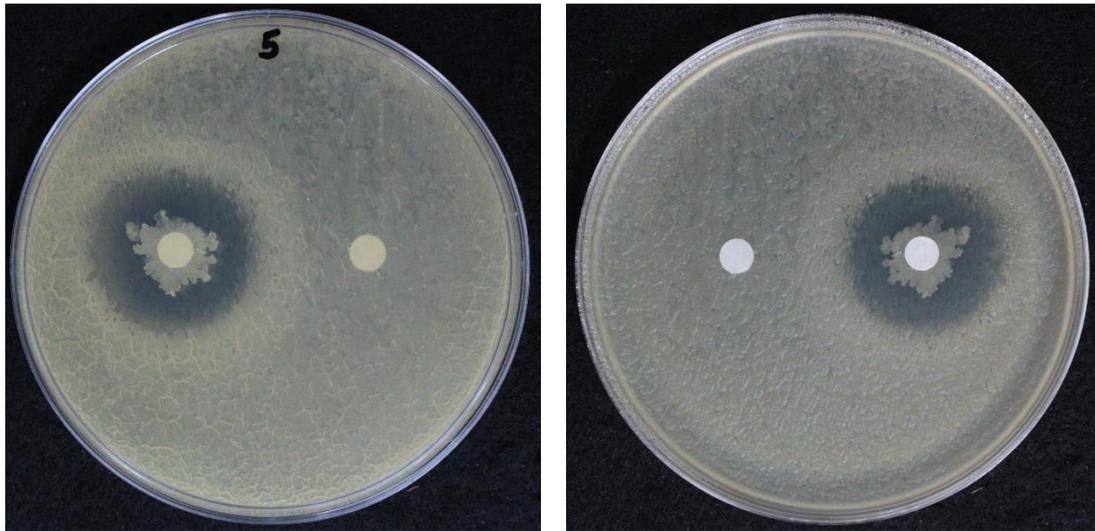


圖 9. FZB42 突變株(Tn5)對 *S. scabies* PS07 之對峙結果 (左：背面/右：正面)

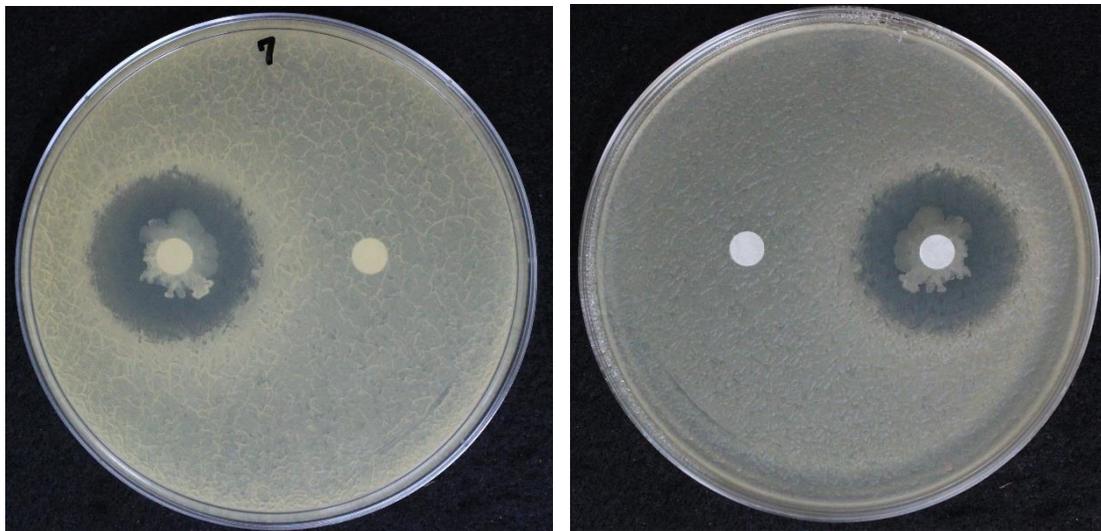


圖 10. FZB42 突變株(Tn7)對 *S. scabies* PS07 之對峙結果 (左：背面/右：正面)

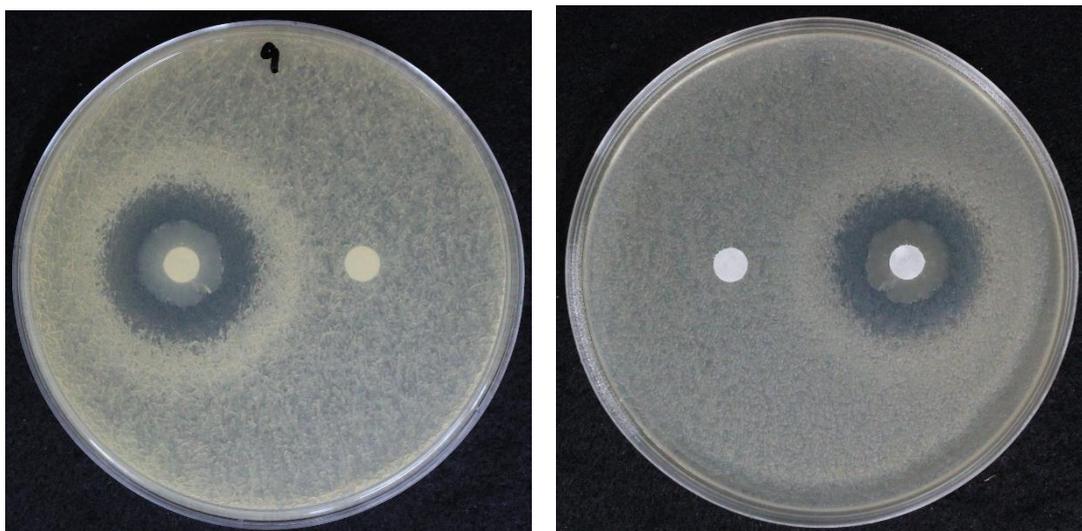


圖 11. FZB42 突變株(Tn9)對 *S. scabies* PS07 之對峙結果 (左：背面/右：正面)

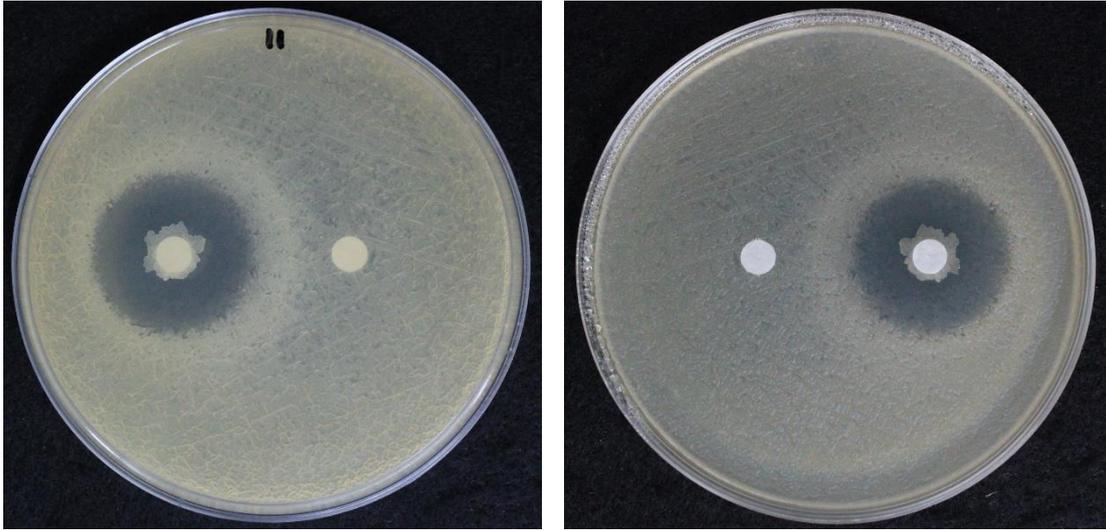


圖 12. FZB42 突變株(Tn11)對 *S. scabiei* PS07 之對峙結果 (左：背面/右：正面)

(三) 以反向聚合酶連鎖反應 (iPCR) 確定 TnYLB-1 插入 FZB42 基因體中所影響的基因序列

如上個部分的拮抗試驗結果，FZB42 突變株 Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11 之拮抗效果與野生株互相分析比較，可見其皆有一定的差異性，故五個突變株皆進到此步驟中做進一步序列分析。

### 1. Digestion

抽取出 FZB42 突變株之 DNA 後，測量濃度並經過計算後，各菌株分別取 5 $\mu$ g DNA 做基因體切割(digestion)後，將其產物直接進行膠體電泳分析之結果如下圖。

由下圖可見各菌株經過切割所得之產物大小皆呈現連續而分散的分布，可推知其切割出之片段乃是隨機切割所得，其中可能有被切割機率較高或較低之位點，每個菌株之 DNA 被切割出之片段並不一定存在共同性。

由於無法確定能達到最佳效果的基因體切割時間，故在經過多次嘗試後，判斷切割時間約為 25-30 分鐘為最佳。如圖，切割 25 分鐘者因切割時間較短，產物片段普遍較大，故其條帶較切割 30 分鐘者，距離起點 (圖片上方) 更近，移動路徑較短。

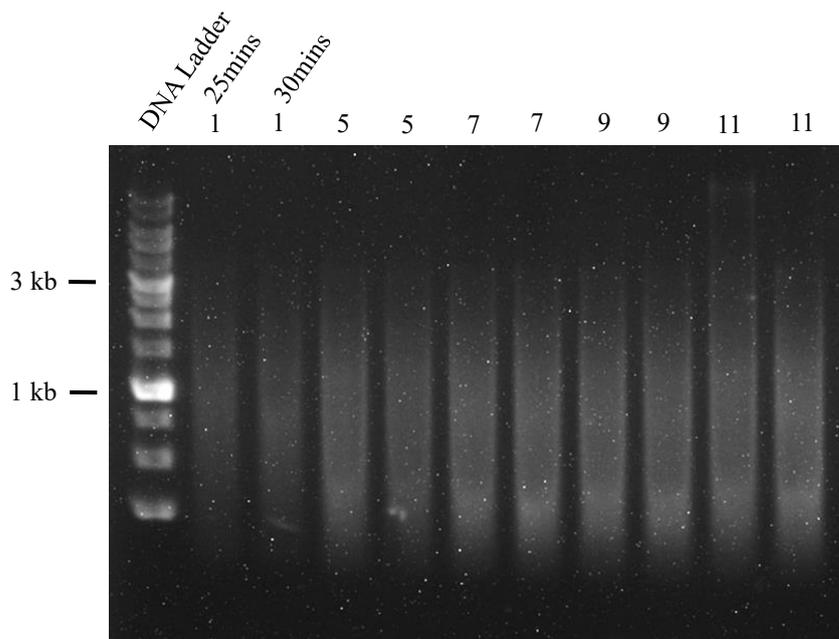


圖 13. FZB42 突變株之 DNA 經基因體切割(digestion)所得產物之膠體電泳分析結果<sup>\*\*註6</sup>

註 6：圖中左側第一排為 DNA Ladder（分子量標準液），作為 DNA 片段大小之比對。左側第二排始，每兩排為一菌株之結果。每一菌株之兩排結果中，左側為切割時間 25 分鐘者，右側為切割時間 30 分鐘者。

## 2. Inverse PCR (iPCR)

將切割完成之 DNA 進行自我黏合後，以與跳躍子配對之引子對 JC1310、JC1311 進行 iPCR 反應，以膠體電泳分析其產物之結果如下圖。

由於先前所提基因體切割為隨機事件，故可視每個切割出之 DNA 片段皆不同大小，即可推論不同大小之片段可代表為跳躍子插入之不同位置，因此應利用膠體電泳將不同大小片段分離，分別進行定序，即可得到各個跳躍子插入位置之 DNA 序列。

如圖中可見，Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11 之結果皆有一清晰可辨識之條帶，且各菌株所產生之條帶皆在同一產物大小處。

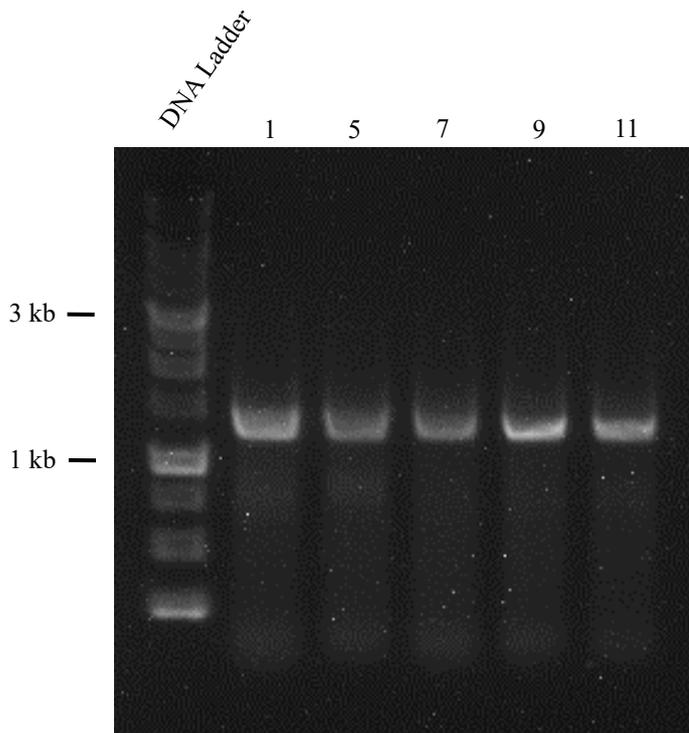


圖 14. FZB42 突變株之 DNA 經 iPCR 所得產物之膠體電泳分析結果<sup>\*註 7</sup>

註 7: 圖中左側第一排為 DNA Ladder (分子量標準液), 作為 DNA 片段大小之比對。  
左側第二排始, 依序為 Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11

由於在 iPCR 產物之膠體電泳分析中, 可見各菌株皆僅呈現出一清晰之條帶, 可判斷其產物中皆僅含一跳躍子插入位點所複製出之產物, 故直接以 iPCR 之產物送交生技公司進行序列分析。

以分析過後所得之序列, 與美國國家生物技術資訊中心(NCBI)之 DNA 序列 GenBank 中之資料進行分析比對。經比對後, 各菌株所得之結果皆相同, 以下圖所示之兩個基因與此序列具最高相似度, 其相似度高達 98.47%。

如下, 左圖中所示為一 *Bacillus amyloliquefaciens* 菌體中發現之基因, 其產物蛋白質可促進該菌體中產生抗細菌物質之基因簇的表現, 進而促使該菌體具備拮抗細菌生長之效果。而右圖所示, 為一 *Bacillus subtilis* 菌體中發現之基因, 其可藉由光遺傳學控制, 調節其菌體之生長與代謝, 影響其本身之生長情況。

經邏輯判斷及合理推測，右圖所示之基因僅為控制其整體生長之基因，其影響層面廣泛，並無聚焦於對抗病原細菌之分子機制。反觀左圖所示之基因，其乃是針對產生抗細菌物質之基因進行調控，本研究中所欲拮抗之植物病原菌又以細菌病害 *Streptomyces scabies* PS07 為目標，故此基因對抗病原細菌之機制，乃與本研究之目的契合。因此後者（抗細菌基因）為符合本研究所欲尋找之目標基因。

Cloning vector pJG030, complete sequence	Integration vector Integration module 12 sequence
GenBank: KX499660.1 <a href="#">FASTA</a> <a href="#">Graphics</a>	GenBank: MK995034.1 <a href="#">FASTA</a> <a href="#">Graphics</a>
<a href="#">Go to:</a> <input type="checkbox"/>	<a href="#">Go to:</a> <input type="checkbox"/>
LOCUS KX499660 5607 bp DNA circular SYN 18-JAN-2017	LOCUS MK995034 8403 bp DNA circular SYN 29-JUL-2019
DEFINITION Cloning vector pJG030, complete sequence.	DEFINITION Integration vector Integration module 12 sequence.
ACCESSION KX499660	ACCESSION MK995034
VERSION KX499660.1	VERSION MK995034.1
KEYWORDS .	KEYWORDS .
SOURCE Cloning vector pJG030	SOURCE Integration vector
ORGANISM <a href="#">Cloning vector pJG030</a>	ORGANISM <a href="#">Integration vector</a>
other sequences; artificial sequences; vectors.	other sequences; artificial sequences; vectors.
REFERENCE 1 (bases 1 to 5607)	REFERENCE 1 (bases 1 to 8403)
AUTHORS Goodson,J., Klupt,S., Zhang,C., Straight,P. and Winkler,W.	AUTHORS Castillo-Hair,S., Baerman,E., Fujita,M., Igoshin,O. and Tabor,J.
TITLE A Broadly Conserved Antiterminator Protein Controls a Regulon of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Antibiotic Gene Clusters	TITLE Optogenetic control of <i>Bacillus subtilis</i> gene expression
JOURNAL Unpublished	JOURNAL Nat Commun 10 (1), 3099 (2019)
REFERENCE 2 (bases 1 to 5607)	PUBMED 31308373
AUTHORS Goodson,J.R.	REMARK Publication Status: Online-Only
TITLE Direct Submission	REFERENCE 2 (bases 1 to 8403)
JOURNAL Submitted (01-JUL-2016) Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, 3112 Bioscience Research Building, College Park, MD 20742, USA	AUTHORS Castillo-Hair,S.M.
	TITLE Direct Submission
	JOURNAL Submitted (29-MAY-2019) Bioengineering, Rice University, 6100 Main St., Houston, TX 77005, USA

圖 15. iPCR 產物之 DNA 序列與 NCBI 資料庫比對之結果<sup>\*註 8</sup>

註 8：此二圖為 DNA 比對結果之截圖，圖中標示此基因的資料來源之文獻名稱。藉由文獻探討可得知該基因序列之特性及功能等資訊，用以佐證其影響 FZB42 拮抗植物病原菌效果之機制。

#### (四) 南方墨點法

製備與 TnYLB-1 及 DNA Ladder 對應之探針，使其標記膠體電泳後之 DNA 特定片段，其標記處於顯影後可呈現出深色條帶。如圖中可見，Tn1、Tn5、Tn7 之結果皆有一明顯條帶，而 Tn9 及 Tn11 雖然條帶不明顯，但仍可見些許條帶之痕跡位於與其他突變株之條帶相同之位置。由於此處之基因體切割為特定切位，而各菌株所產生之條帶皆在同一大小處，可再次驗證 iPCR 中所推論之結果：各突變株皆被 TnYLB-1 插入破壞相同位置，並確認 iPCR 中所得之條帶確實由 TnYLB-1 所複製出。

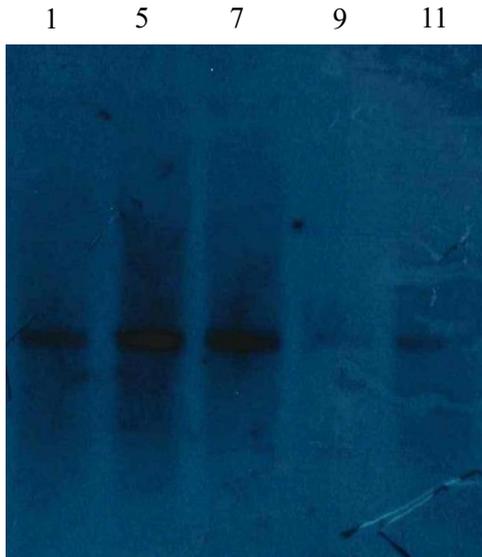


圖 14. FZB42 突變株之 DNA 經 iPCR 所得產物之膠體電泳分析結果<sup>\*註9</sup>

註 9：圖中由左側開始依序為 Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11

## 二、討論

### (一) 高溫培養剔除質體之溫度調整

在製備 FZB42 之突變株的過程中，在利用高溫培養促使質體 pMarA 不再自我複製，以將菌體中之質體剔除的環節，根據參考文獻中之實驗方法，我原先依照其所實驗之條件——42°C 來進行，然而實際剔除質體之效果並不佳，許多菌株無法完全將質體剔除，導致實驗可用之菌株數目不足。

依據其以高溫抑制質體自我複製的原理，我將此環節中培養之溫度適度提高，期望更高溫能更有效降低質體自我複製的能力，以達到更完全剔除之功效。在多次嘗試後，發現若將溫度提升到 50°C，即可大幅提升質體成功剔除之菌體比例，也有效提高實驗的效率及成功率。

### (二) 對峙實驗中底部病原菌生長狀況不佳

在進行對峙實驗以測試突變株之拮抗效果的階段，曾多次失敗而無法觀測結果，其中又以底部病原菌生長狀況不佳為主要原因。

推測其生長不佳的原因可能為以下三點：

1. 病原菌活性喪失：可能因離開冷藏保存環境過久，或是保存天數過久，導致病原菌活性逐漸降低，最終於進行對峙實驗時無法呈現出正常生長狀況。
2. 固態培養基之養分流失或分布不均：其中幾次實驗曾遇到底部病原菌僅有其中一半面積正常生長，為異常狀況。因此判斷可能因培養基製備後保存過久，且存放時因空間不足而使其傾斜放置，導致養分於培養基上之分布不均，甚至有逐漸流失的情況。
3. 病原菌濃度不足：由於菌種之濃度為製備時所測量，而未於後續每次進行實驗前重新量測，故可能因存放時間等因素使孢子液之濃度有些微變動。然而，若保存之環境受到較大的變動，將使其菌種濃度有大幅改變，此種情況便可能影響病原菌的生長，導致實驗操作受影響。

### (三) 跳躍子 TnYLB-1 隨機插入之位置

在閱讀文獻了解跳躍子作用機制時，得知跳躍子之插入位置為隨機，無特定位點。因此，在 iPCR 反應後的膠體電泳結果，原先預測其結果應為每菌株皆不盡相同，且同一菌株中應會產生多個不同大小的條帶，意即各個菌株中，跳躍子插入之位點皆不盡相同，且同一菌株中亦有多個跳躍子插入破壞之位點，須以膠體電泳的方式分離，並利用切膠的方式分別取得各個不同序列之 DNA 片段，而後分別分析其序列所代表之不同基因。

然而，在我的實驗中，每個菌株經 iPCR 反應後之產物，在膠體電泳分析時，皆僅產生一種同一大小之產物，經序列比對後，其結果顯示所插入之序列亦為相同之基因，此結果與原先認知之隨機插入之機制矛盾。

後針對此現象進行文獻查找，得知跳躍子之重組插入機制中，存在「熱點(hotspot)」，意即此處因與跳躍子具序列同源性，有較高機率成為跳躍子之插入位點。此說明可解本研究中膠體電泳結果不符合原先假設之原因。

## 肆、結論與應用

### 一、結論

經跳躍子 TnYLB-1 隨機插入破壞基因之實驗方法，篩選出 FZB42 突變株 Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11 共五株，並在對峙實驗之抑制圈半徑大小分析中，得知 Tn1、Tn5、Tn7、Tn9、Tn11 皆對 *Streptomyces scabies* PS07 之拮抗效果較 FZB42 野生株有顯著降低的情形，故推測其基因體內受跳躍子插入破壞之基因應與其對 *S. scabies* PS07 之拮抗作用相關。後續再透過 iPCR 之步驟確認 TnYLB-1 插入所破壞之基因序列，經定序後比對，得知此段序列有兩可能性——「可產生蛋白質 LoaP 以促進菌體內基因簇(difficidin gene cluster)產生抗細菌物質之基因」及「藉光遺傳學控制調控菌體生長之基因」。由於本研究之目的為探究 FZB42 拮抗病原細菌 *S. scabies* PS07 之機制，故以前者更能聚焦主題。因而得證「可產生蛋白質 LoaP 以促進菌體內基因簇(difficidin gene cluster)產生抗細菌物質之基因」與芽孢桿菌 FZB42 拮抗馬鈴薯瘡痂病菌 *Streptomyces scabies* PS07 之分子機制具有一定的影響與關聯。

### 二、未來展望與應用

- (一) 可藉由特定基因剔除技術，將本研究中所定序出與 FZB42 拮抗 *Streptomyces scabies* PS07 之基因進行剔除，以進一步確認該基因與拮抗機制之關聯性。
- (二) 可利用馬鈴薯盆栽試驗，確認 FZB42 野生株與突變株實際運用於染病之馬鈴薯時，其拮抗效果是否同樣具顯著差異。
- (三) 期望未來能應用基因轉殖之技術，將此基因轉譯出之蛋白質運用於研發對抗植物病害之新藥。
- (四) 建議未來研究可致力於發掘此基因是否存在於更多其他的菌種或植物中，若能有更多發現，即可將植物病害的生物防治技術層面更廣泛的推展，不但能減少台灣農業經濟的損害，也可為地球環境友善盡一份棉薄之力。

## 伍、參考文獻

- 周浩平、陳以錚(2016)·應用液化澱粉芽孢桿菌PMB01防治作物土壤傳播性病害·*農政與農情*，第283期。
- 郭建志(2014)·芽孢桿菌屬細菌防治作物病害之應用現況·*臺中區農業改良場特刊*，第122號，p332-338。
- 郭建志、陳俊位、廖君達、陳葦玲、蔡宜峯(2014)·液化澱粉芽孢桿菌在作物病害防治的開發與應用·*農業生物資材產業發展研討會專刊*·p69-86。
- 黃振文(2002)·*鐮孢菌的分類系統概論*·植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會刊·p208-244。
- 黃雅靖(2011)·*液化澱粉芽孢桿菌之分子鑑定與生物防治效果之評估*·國立高雄師範大學生物科技系碩士論文。
- 廖仁宏(2017)·*液化澱粉芽孢桿菌Ba-BPDI及其抗菌脂肽防治作物病害之研究*·中興大學化學工程學系所博士論文。
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (p.41-76). Springer.
- Castillo-Hair, S.M., Baerman, E.A., Fujita, M. et al. (2019). Optogenetic control of *Bacillus subtilis* gene expression. *Nature communications* 10, 3099.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015a). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*, 6(780), 1-11.

Erlacher, A., Cardinale, M., Grosch, R., Grube, M., & Berg, G. (2014). The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5(175), 1-8.

Goodson JR, Klupt S, Zhang C, Straight P, & Winkler WC. (2017). LoaP is a broadly conserved antiterminator protein that regulates antibiotic gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nature Microbiology* 2, 17003.

Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259–1266.

Lin C, Tsai C-H, Chen P-Y, Wu C-Y, Chang Y-L, Yang Y-L, et al. (2018). Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PLOS ONE* 13(4): e0196520.

陸、 Le Breton Y, Mohapatra NP, & Haldenwang WG (2006). In Vivo Random Mutagenesis of *Bacillus subtilis* by Use of TnYLB-1, a mariner-Based Transposon. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1). p.327-333.

## 【評語】 070004

1. 利用分子生物學及微生物學方法研究芽孢桿菌具有能拮抗植物病原菌之現象，並試圖用跳躍基因圖變方法找尋影響的基因，並獲致初步結果。對高中生而言是個很好的科展作品，但似乎缺少原創性。
2. 實驗結果的標題應用所得結論為標題較易理解，而非用實驗方法或流成為標題。
3. 實驗結果的陳述應先說明為了何目的進行了什麼實驗，所得結果如下，讀者較易融會貫通。電泳膠的圖說不夠清楚。
4. 電泳膠結果的描述，應用精準的語言說明 DNA 的大小，而不應寫成“Ermr 基因之產物為在相同時間內，距離起點（圖片上方）較遠者”。
5. 所篩得的 T1、T4、T9、T10 突變株仍有明顯的 Erm 基因被放大，宜進一步確認。
6. 抑菌圈試驗，而不用”對峙培養實驗”。若非新創技術，不要新創名詞。

7. 本研究有應用潛力，但目前僅有初步結果，離達成研究目的仍有一段距離。
8. 跳躍子插入突破為研究細菌特殊功能相關基因的常用手法。
9. 實驗並未有具體結果，基因必須定序，鑑定相關基因被破壞和拮抗作用的相關性，並且以正常基因回補才算完成。
10. 拮抗之分子機制不明，尚待完成。