

利用農桿菌進行植物基因轉殖簡介

沈翰祖*

前言

由於生物技術之進步，植物基因轉移成為有效縮短作物育種時間與生產特殊生成產物的工具，其常利用之操作方式可大致分為直接基因轉移與間接基因轉移。而基因轉移常需利用質體 (plasmid) 來配合，質體是在細菌、單細胞真核生物如酵母菌體內一種細小且能自身複製的環狀 DNA 分子，它獨立於染色體之外，在遺傳工程中被廣泛用作載體 (vector)，以人為方式設計並改造為適合做基因轉移的序列，其上有多種選殖位置 (multiplecloning site; MCS)，可將外來基因或某段 DNA (insert) 插於其中，來進行基因轉移。

植物基因轉移法

其中直接基因轉移的方法首先基因槍 (gene gun、microprojectile、particle gun、partical bombardment) 的方式，是將金屬鎢或金粒子與 DNA 片段混合，以高速射出刺穿細胞壁及細胞膜，將附著在金屬粒子上的 DNA 帶入細胞內，而達到基因轉移的目的。其次是 PEG 法，PEG 是一種融合促進劑，是極度親水性分子，會吸走溶液中的游離水，在高濃度 PEG 下，DNA 等大分子會沉澱下來附著於原生質體表面，PEG 同時誘導原生質體進行內胞飲作用，而將 DNA 帶入細胞內。另外，電穿孔法 (electroporation) 將植物細胞的原生質體與外來基因懸浮於 buffer solution 中，施以瞬間高

壓電流，使細胞膜暫時形成維持極短時間的無數微細孔洞然後癒合，裸露的 DNA 片段可經由這短暫開放的微孔，進入細胞質內。

利用間接基因轉移的方法來進行共同轉移主要是以農桿菌共同轉移 (感染) 法為主。

農桿菌

(*Agrobacterium tumefaciens*)

農桿菌是一種存在於土壤中的細菌，農桿菌感染植物的目的是要寄主植物替他製造植物本身不會合成的氨基酸～opine (含 nopaline 與 octopine)，而它具有的 Ti 質體 (Ti plasmid) 上有一段特殊的 DNA 片段稱為 T-DNA，其中即具有合成 nopaline 與 octopine 的基因，在農桿菌感染植物後，會將 T-DNA 帶入寄主細胞核中，插入 genomic DNA 上 (過程將詳述於後)，使寄主植物替他製造上述氨基酸；自然界中被農桿菌感染的組織會發生腫大的現象，是因為其 T-DNA 上除了上述製造 opine 的基因外，因含有製造 auxin 的 aux 基恩與製造 cytokinin 的 cyt 基因，使植物大量製造 auxin 與 cytokinin 而引起細胞不正常分裂所致。

轉殖載體的構築

分子生物學家將 Ti 質體與 T-DNA 片段以人為方式設計並改造為適合做基因轉移的序列，在遺體工程中被廣泛用作載體 (vector)，T-DNA 之左右二端各具有 left border

* 種苗改良繁殖場 助理研究員

(LB) 與 right border (RB)，只要是在此二者之間的片段均可插入寄主 genomic DNA 上，並不拘是自然界原始的序列如上述者或人為設計者。在 LB 與 RB 之間包含多重選殖位置 (multiple cloning site; MCS)，被設計成可被許多種不同的 DNA 限制酵素 (restriction enzyme) 辨識，亦即具有許多不同的限制酵素切位，可經由限制酵素將 plasmid 的特定位置切斷，再將外來基因或某段 DNA (insert) 經黏接酵素 (ligase) 進行基因片段之黏接反應 (ligation)，此稱之為載體的構築 (Construction)。經完成構築之質體需再送入宿主勝任細胞 (Competent cells) 如大腸桿菌 (*E. coli*) 進行大量增殖，稱為質體轉型作用 (Transformation)，一般常利用電穿孔或熱膨脹方式進行。再配合 Helper strain 的 *E. coli* 如 HB101 與農桿菌如 LBA 4404 三者混合，進行三親交配 (Triparental mating) 而將轉型後的質體送入農桿菌之中。

農桿菌基因轉移

農桿菌之所以能感染植物，必須此一植物帶有傷口，傷口會分泌酚類化合物，誘使農桿菌靠近而由此傷口進入植物，其詳細途徑是因植物受傷的傷口分泌酚類化合物，誘使農桿菌細胞膜內膜上的 *virA* 基因活化 (磷酸化) 而產生 VirA 蛋白，而 VirA 蛋白又使細胞質中的 *virG* 基因活化而產生 VirG 蛋白，VirG 蛋白續使 Ti 質體上的 *virB* 基因與 *virCDE* 基因活化，分別產生 VirB 與 VirCDE 蛋白，VirB 蛋白可在農桿菌細胞膜與植物細胞接觸的位置開一個小孔，而 VirCDE 蛋白可牽引著新複製的 T-DNA 片段移至 VirB 蛋白所開的小孔，並經此小孔進入寄主細胞與細胞核，並插入 genomic DNA 上。

因此農桿菌基因轉移法必須先使植物受傷，T-DNA 繼而將目標基因導入植物體，而達到基因轉移之目的。

一般操作是將構築好的農桿菌於 28°C 下以 LB 液體培養基與 50 μ M Acetophenol (是一種人工合成之酚類化合物，以提早增強農桿菌的感染能力)，避光震盪培養 18-36 小時 ($OD_{600} \approx 0.8-1.0$)。取此農桿菌液 100 μ l 加入 20ml 的感染培養液 (1/2MS salt, 2,4-D 1mg/l, Kinetin 1 mg/l, Sucrose 20g/l, pH5.7)，將欲轉殖之培植體於室溫下避光共培養 1 小時，再將培植體移至固體培養基於室溫下避光共培養 48 小時後，再將之取出浸泡於含 500 mg/l Carbenicillin 的感染培養液 20 分鐘，以殺死感染培植體之農桿菌，續將培植體移至滅過菌的濾紙上吸乾殘液，最後將其培養於含 100 mg/l Carbenicillin 之再生培養基，以防止農桿菌復發，即完成基因轉移的步驟；以上處理的時間與濃度與配合不同作物而各異。

結語

基因轉移方式若依是否需構築特殊的 T-DNA、寄主範圍的限制、操作的便利性、是否由原生質體再生、組織培養期長短、轉移效率、組織表現的一致性、操作模式的複雜與否來評估各種常用的轉移方式，其首選絕對是農桿菌莫屬，其次是基因槍，再來才是 PEG 與電穿孔法。而基因轉移亦發生組織培養材料因受傷後再生不易、共同轉殖與表現率低、基因是以隨機的方式插入染色體、產生嵌合體、基因插入後重組、基因不表現、數代後轉殖基因消失等實際的困難，尚待未來的研究人員持續的努力與克服。