

## 應用農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)做為絲狀真菌基因轉殖工具

曾敏南<sup>1</sup>、陳昱初<sup>2</sup>

### 摘要

當植物受傷而釋放出酚化物時，可誘導農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 啟動癌腫誘導質體 (tumour-inducing plasmid)中的一連串 *Vir* genes，進而將 Ti-plasmid 上的 T-DNA 複製並轉移到寄主植物細胞中，並產生植物生長調節物質，造成植物細胞不正常的增生而形成癌腫。基於此特性，農桿菌已漸被用來做為真菌轉殖及基因研究工具。與傳統的方法比較，在真菌上利用農桿菌進行轉殖，可得到較佳的轉殖效率，其原因除了 *VirE2* 蛋白可以保護 T-DNA 不受寄主細胞中 nucleases 的傷害外，*VirD2* 蛋白可能在 T-DNA 插入寄主基因體 (genome) 之後，扮演著 DNA 修復的角色。近年來農桿菌亦多被應用於基因置換之研究，在基因置換實驗中需建構一個置換盒，置換盒中包含有選殖標誌基因(selectable marker)及建構於選殖標誌基因兩側，與目標基因具同源性的基因片段 (homologous gene fragment)。影響置換效率有許多因子，其中同源性基因片段的長度即為一重要因素，研究發現除了基因片段長度外，序列本身似乎更為重要。

關鍵語：農桿菌、基因轉殖、絲狀真菌

### 前言

由於絲狀真菌(filamentous fungi)基因研究工作中，觸及大量基因功能的研究，因此提高了應用可攜帶高分子量(high molecular weight)去氧核糖核酸(DNA)之工具的需求。酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)為第一個 genome 被完整解序的真菌，目前也有許多工具已被開發來作為酵母菌之應用。在這些工具中包含利用電腦進行基因功能的分析，及利用 2-D 膠體電泳來分析蛋白特徵。在這些工具中，經過修改亦有部分已可適用於絲狀真菌的基因研究，例如利用隨機突變(random insertional mutation)或標的突變 (targeted mutation)的方式來作為基因功能研究的工具。但這些方法需要透過基因轉殖工具而進行，包含 polyethylene glycol (PEG)、限制酵素媒介基因的插入 (restriction enzyme-mediated integration, REMI)，以及農桿菌媒介轉殖(*Agrobacterium* mediated transformation)。這些方法中，由於農桿菌可應用於各種材料，包含：

---

<sup>1,2</sup> 高雄區農業改良場助理研究員及副研究員兼作物環境課長(通訊作者)  
E-mail: yuchu@mail.kdais.gov.tw)

原生質體、孢子、菌絲或菌絲塊，因此使得農桿菌更適合於絲狀真菌之基因轉殖工作。

在絲狀真菌中進行標的突變時，需要建構一個大於 1,000 個鹼基對以上的大片段同源性互換的基因互換匣(gene disruption cassette)，透過此種方式大概可以達到 0.5-30%同源性互換效率，進而達成刪除基因的目的。目前被利用的方法例如利用 transposon 或者利用限制酵素媒介基因的插入 (restriction enzyme-mediated integration, REMI) 的方式亦已被發展並應用於真菌。但這些方式在用來作為突變的目的上皆有其應用限制，利用 transposon 作用基因突變的工具，在許多真菌應用之結果中發現 transposon 並不是隨機插入，而偏好插入非編碼區域 (non-coding region)。另外，利用 REMI 的方法，亦同樣有著不完全隨機的缺點。REMI 的方法似乎偏好將引入的 DNA 插入 genome 中高度轉錄的區域內。1995 年 Bundock 等人發展了一個用於酵母菌的新轉殖方法，而這個方法即長久以來大量應用在植物細胞的農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。此方法是基於農桿菌可轉殖其本身一部分之 DNA (T-DNA) 到真核生物細胞的能力。此外，1998 年 de Groot 等人亦證實了以農桿菌媒介的轉殖系統可應用於多種絲狀真菌。在這份研究報告之後，許多的研究利用農桿菌於絲狀真菌的研究中，包括子囊菌 (Ascomycetes)、擔子菌 (Basidiomycetes)、以及接合菌 (Zygomycetes)。甚至有研究顯示農桿菌亦可能應用於卵菌(Oomycetes)。重要的是，以農桿菌為轉殖的媒介系統已經發展為許多真菌的轉殖方法，例如：*Agaricus bisporus*, *Calonectria morgani*, *Fusarium circinatum* 及 *Helminthosporium turcicum* 等。上述這幾個菌在過去常用的真菌轉殖方法中一直有應用上的困難，但卻經由農桿菌得到了解決。此外，利用農桿菌媒介轉殖的方法亦發現比過去利用原生質體 (protoplast) 的方法更有效率。利用農桿菌作為轉殖媒介也發現比過去傳統使用的轉殖方法有更多的優點，例如可直接利用孢子、菌絲甚至是子實體作為轉殖之材料。相較於過去採用原生質體作為材料的方法更為便利，原生質體的製作不便並受限於使用的酵素，都顯現出以農桿菌為工具的便利性。此外由許多研究顯示，雖然以農桿菌為轉殖媒介亦包含著隨機的基因插入，但亦可達到高效率的插入單一片段的基因到目標基因當中。另外亦有許多研究指出，農桿菌可達到高效率的同源性互換目的，這個特性使得農桿菌成為真菌中作基因功能的系統性研究的有力工具(ref.)。

### 農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)

可造成植物癌腫病(crown gall disease)的病原細菌農桿菌 (*Agrobacterium*

*tumefaciens*) 為一種革蘭氏陰性細菌。農桿菌中攜有許多可引起植物癌腫的質體 (tumor-inducing plasmid) 稱為 Ti-plasmid，大約為 200kbp。Ti-plasmid 上帶有一段可造成癌腫的片段為 T-DNA (圖 1)，T-DNA 兩端各具有一 24bp 的重複性序列稱為 left border 及 right border，兩個 border 之間則帶有可 encoding auxin 及 cytokinin 的基因。此外，Ti-plasmid 上還有一段造成植物癌腫時不可或缺的基因稱為 virulence region，在這段區域中具有許多 *vir* genes，並在 T-DNA 進行移轉時扮演著不同的角色。實驗證實，只要有 virulence region 存在的情況，T-DNA 上的毒性基因 (如 encoding auxin 的基因) 被刪除並不影響 T-DNA 轉移到寄主細胞。

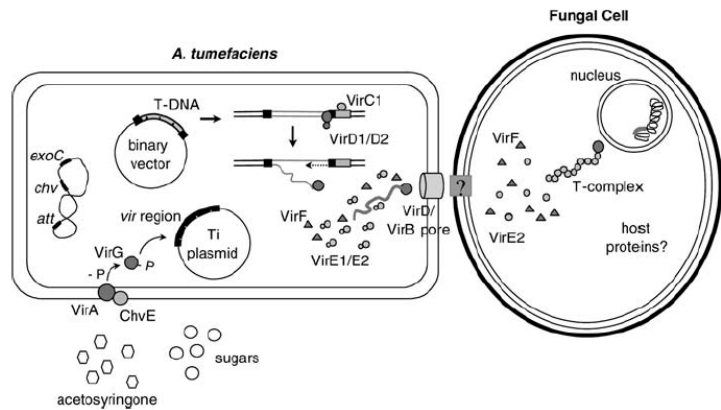


圖 1. 農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 受酚化物誘導後 *Vir* 基因的反應過程 (Michielse *et al.* 2005b)

因為前述特性，故研究人員便將 T-DNA 上的毒性基因去除，並接上我們有興趣的基因用來做為轉殖媒介工具。研究人員為了操作上更加方便，因此將 T-DNA 及 virulence region 分別置於不同的 plasmid 上。去除 T-DNA 而留有 virulence region 的 plasmid 稱為 helper plasmid 或 disarmed plasmid，保留在 *A. tumefaciens* 中。另外帶有 T-DNA 的 plasmid 則可在 *E. coli* 當中，由於該質體小因此便於研究人員操作，當構築好帶有 T-DNA 的質體則可經由 electroporation 或其它方法再送回 *A. tumefaciens* 中，這就是目前最常被使用的 binary vector system。

### T-DNA 的複製、轉移及進入基因體的途徑

農桿菌在自然環境中受到植物體中的酚化物質或糖所誘導而可啟動其致病之途徑。植物受傷時產生的酚化物質或外泌的糖可啟動農桿菌上的 “two-component regulatory system”，這個調控系統包括有 VirA protein (扮演 receptor 的角色) 以及 VirG protein。*virA* gene 可產生細胞膜橋接蛋白 (membrane-spanning protein)，而此細胞膜橋接蛋白則可感應外界之誘導物質，並活化 *virG* gene。接著，VirA protein 啟動 *VirG* gene 的表現，並經由 VirG protein 去啟動其它的 *vir* genes。當 acetosyringone 由植物釋出經 VirA 感應後

產生 autophosphorylation，被磷酸化的 VirA 蛋白再將其 phosphoryl group 移至 VirG，被活化的 VirG protein 具有 DNA binding 特性而成為 VirG 本身及其它 *vir genes* 的 activator (圖 1)。

複製單股 T-DNA 時，Vir C 及 Vir D 蛋白為必要元件。Vir D2 可經由 Vir D1 的協助而精準的在 right border 的第 3 和第 4 個 nucleotide 之間的位置造成缺口。接下來由 right border 的 3'OH 端往 left border 的方向複製出 T-strand，最後 VirD2-T-strand complex，將透過 type IV 的外泌機制經由 T-pilus 傳送到寄主細胞中。而 virulence protein VirB1-11 及 VirD4 在傳送 T-strand 的過程中具有重要的功能。VirB protein 形成 transport pore 並在細胞表面形成稱為“T-pilus”的結構。VirB2 protein 可構成 T-pilin，再由 T-pilin 構成 T-pilus。在膜內則有 VirD4 protein 作用於 T-strand 及 VirB complex 之間。除了 VirD2/T-strand complex 之外，還有 VirE2、VirE3 及 VirF 亦經由 T-pilus 傳送到寄主細胞。VirE2 為一個單股 DNA 的結合蛋白，一般認為 VirE2 可包覆於 T-strand 外並隨之進入寄主細胞，保護 T-strand 不受寄主細胞內的 nucleases 破壞，並可保持 T-strand 為未摺疊的形態以利通過 transport pore。VirD2 的 C-terminal 具有 nuclear localization signal 的特性，因此當 T-strand 進入寄主細胞後，仍然結合在 5'端的 VirD2 即扮演著導引 T-strand 前往細胞核的工作。然而，至目前為止 T-DNA 進入基因體的明確機制並不清楚。

上述的這些途徑主要以植物及酵母菌為研究對象，在 de Groot et al. 1998 年的研究中發現，利用農桿菌對真菌進行基因轉殖時，不論利用分生孢子或是 protoplast 皆需在 acetosiringone 存在的情況下才會有轉殖株產生，這意謂著利用農桿菌進行真菌基因轉殖時仍需 virulence system。Michielse 等人(2004)進一步將 *vir gene* 各別進行突變，再以這些突變後的菌株對 *Aspergillus awamorni* 進行轉殖試驗。以了解各個 *vir gene* 在真菌轉殖過程中扮演的角色(圖 2，表 1)。

一般認為 VirC、E、F、H 在植物上，為 T-DNA 進行某些寄主植物時所必需。在本實驗中發現 VirF、H 及 VirE3 被去除之菌株在轉殖的過程中，轉殖效率完全不

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>H</b>
<u>vir locus</u>	<u>function</u>						
A	Regulatory (recognizes plant metabolites, activates virG)						
G	Regulatory (transcriptional activator of other vir loci)						
D	Nicks Ti plasmid at T-DNA borders, covalently attaches to "T-strand"						
C	Unknown function involved in host-range determination						
E	Ss-DNA binding protein (stabilizes T-DNA during or after transfer)						
B	Transfer apparatus						
F	Regular plant cell division cycle						
H	Putative cytochrome P450						

圖 2. Ti-plasmid 中 virulence region 所包括之基因示意圖，以及各基因之功能 (Toro et al. 1988)

受影響。但是在本實驗中卻也發現 VirC2 被去除後，能明顯降低

表 1. 利用農桿菌 vir 基因突變株進行轉殖後所得之轉型株數量(Michielse *et al.* 2004)

Strain	vir mutation	Proposed function	Number of transformants/10 <sup>6</sup> spores
LBA1100 <sup>a</sup>	None		200 ± 25 <sup>c</sup>
LBA1141	virH	Putative cytochrome P450	200 ± 25
LBA1142	virA	Phenolic sensor protein	0
LBA1143	virB4	ATPase, transport activation	0
LBA1144	virB7	Stabilizer transport pore	0
LBA1145	virG	Phenolic response regulator	0
LBA1146	virC2	Unknown	15 ± 5
LBA1147	3'virD2	T-DNA processing (nuclear targeting signal deleted)	5 ± 5
LBA1148	virD4	Coupling factor	0
LBA1149	virE2	Protection T-strand against nucleases, facilitating T-strand import into the nucleus	125 ± 15
LBA1150	virD1	T-DNA processing	0
LBA1151	5'virD2	T-DNA processing (no exonuclease activity)	0
LBA2561	virF	Regulator plant cell division cycle	200 ± 25
LBA2565	virE3	Unknown	200 ± 25
A348 <sup>b</sup>	None		150 ± 25 <sup>c</sup>
A348	virB1	Transglycosylase (minor component of the T-pilus)	7 ± 3
A348	virB2-virB11	Formation of transport pore	0

<sup>a</sup> Co-cultivation was performed for 3 days at 22.5 °C.

<sup>b</sup> Co-cultivation was performed for 2 days at 25 °C.

<sup>c</sup> Values represent the mean of three independent experiments.

*Aspergillus* 的轉殖率。在 Toro 等人(1988)的研究中發現，當 Vir C1 和 Vir C2 被突變時，T-DNA 上 nicking 的情況明顯下降，因此推論 VirC 可能也和 T-DNA 的 nicking 有關，對照這個結果便可呼應 Michielse 等人的試驗，由於 VirC2 被去除而導致於無法在 T-DNA 前端產生缺刻因而明顯降低 T-DNA 被複製出的量。VirA、B、D 及 G 這些基因被破壞則完全無法產生轉殖株。

### 在真菌中影響農桿菌媒介轉殖效率的因子

在多種真菌研究農桿菌媒介轉殖的研究過程中發現，有許多因子可影響轉殖的效率，包括有用來作為轉殖標的物的材料、農桿菌的菌株、真菌菌株及轉殖時培養的條件等。利用農桿菌進行轉殖的一項優點為可以利用各種不同的材料作為轉殖的標的。例如，利用原生質體、孢子、菌絲以及子實體的組織等，目前皆有成功轉殖的案例。在許多研究中顯示，利用原生質體亦或完整細胞皆可獲得同樣之轉殖效率。然而這並非在所有菌種中都可適用的，例如接合菌中的 *Rhizopus oryzae* 及 *Mucor- circinelloides* 僅在以原生質體為材料時能成功轉殖，而尚未有利用孢子或發芽孢子為材料而成功的案例。於大多數的研究中主要以孢子及已發芽的孢子為材料，在 *Coccidioides immitis* 則證實利用已發芽的孢子為材料可提高轉殖率。相反的在某些種類當中發現，利用營養生長的組織或子實體的組織其轉殖效率較高於利用孢子或已發芽的孢子所得之轉殖率。另外一個影響轉殖的條件是材料的成熟度。利如，較老

熟的 *Blastomyces dermatitidis* 利用農桿菌轉殖時其轉形率較低。由實驗的資料所得，不同的農桿菌菌株及不同的真菌菌株之間的組合皆可能影響轉殖的效率。在許多研究中發現在真菌與農桿菌進行共同培養的階段，添加 acetosyringone(AS)

是必需的，這也指出在真菌上利用農桿菌時誘發 *vir* genes 工作是必需的(表 2)。而農桿菌在 pre-culture 的階段是否添加 AS 則顯得並非那麼重要，在 *Beauveria bassiana*、*Fusarium oxysporum* 及 *Magnaporthe grisea* 的研究上發現於 pre-culture 時加入 AS 反而使得轉殖率下降。

表 2. 利用農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 對 *Aspergillus awamori* 進行轉殖所獲得之轉型株的數量(Toro *et al.* 1988)

Experiment	Medium	No. of protoplasts or conidia	No. of Hyg <sup>r</sup> transformants
1	-AS	3×10 <sup>6</sup> protoplasts	0
	+AS	3×10 <sup>6</sup> protoplasts	100
	+AS	3×10 <sup>6</sup> protoplasts	197
2	-AS	3×10 <sup>6</sup> protoplasts	0
	+AS	3×10 <sup>6</sup> protoplasts	1200
	+AS	3×10 <sup>6</sup> protoplasts	2170
3	-AS	1×10 <sup>7</sup> protoplasts	0
	+AS	1×10 <sup>7</sup> protoplasts	480
	+AS	1×10 <sup>7</sup> protoplasts	300
1	-AS	1×10 <sup>7</sup> conidia	0
	+AS	1×10 <sup>6</sup> conidia	100
2	-AS	1×10 <sup>7</sup> conidia	0
	+AS	1×10 <sup>6</sup> conidia	20
3.	-AS	1 x 10 <sup>6</sup> conidia	0
	+AS	1 x 10 <sup>6</sup> conidia	90

### 農桿菌媒介轉殖至木黴菌之研究實例

由於木黴菌 (*Trichoderma atroviride*) 具有可拮抗許多土媒性病原真菌的能力，因此使應用來作為生物防治的工具。然而為了要了解木黴菌的生物防治機轉而需進行的基因研究中，直接破壞木黴菌之基因亦或利用同源性置換的方法在木黴菌上都不容易達成。1993 年 Suominen 等人利用 *T. reesei* 的原生質體及 calcium/polyethylene glycol 的方法來得到突變株時具有不錯的效率，約莫在 32-52% 間。但是利用 *T. atroviride* 卻只能獲得非常低的轉殖率。為了解決這個問題，Zeilinger (2004) 利用農桿菌構建了兩個 *T. atroviride* 中的基因的置換盒(gene replacement cassette)，包括有 *tmk1* (可 encodign MAP kinase) (圖 3A) 及 *tga3* 基因 (可 encoding heterotrimeric G protein 的  $\alpha$ -subunit)(圖 3B)。利用同源性置換的方式來進行基因的破壞。在 *tmk1* 這個 disruption cassette 中帶有一個 *EcoRI* 的切位，如果這個 disruption cassette 成功的經由同源性互換而進入到 genome 當中，那麼以 *EcoRI* 去切，會得到

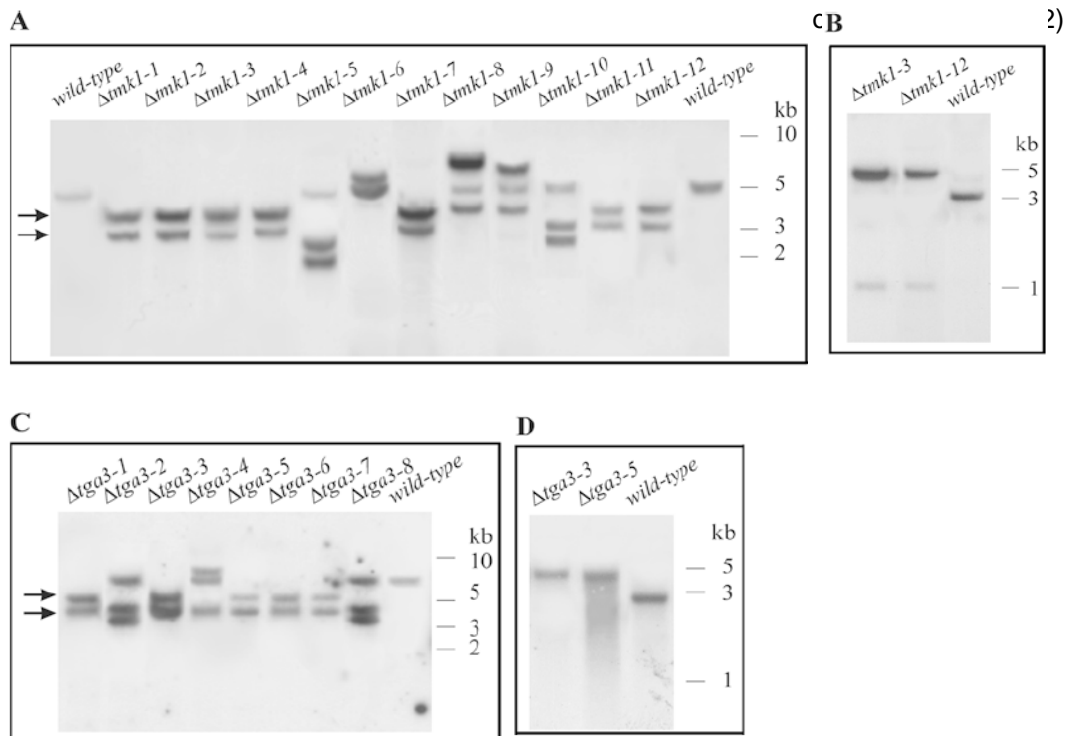


圖 3. 南方雜合分析。經由農桿菌媒介轉殖(A)pTSZ $\Delta$ tmk1 或(B)pTSZ $\Delta$ tga3 之轉殖株，其染色體 DNAs 經由 *Eco*RI (A, C)、*Apa*I/*Nhe*I (B) 或 *Sma*I/*Cla*I (D) 進行酵解 (Zeilinger *et al.* 2004)

兩個較小的條帶。如果基因未被置換，則會切出帶有 *tmk1* 全長的條帶 (較大)。另外，在這個置換盒也設計了 *Apa*I 及 *Nhe*I 做為雙重確認的切位，如果經由同源性互換則以 *Apa*I 及 *Nhe*I 同時切的話會得到兩個較小的條帶，否則只有一較大的條帶。在 *tga3* 這個基因的置換盒中亦採取了同樣的策略，Zeilinger (2004) 同樣建構了不同的切位，以利轉殖之後用來確認基因是否已經由同源性的方式置換破壞。

完成轉殖後選出約 50 個 *T. atroviride* 的轉殖株，並經繼代培養後確定菌株的穩定性後隨機選出 12 株轉殖株與 wild type 一起進行 southern blot 的分析以確認轉殖的情形。菌株的 genomic DNA 分別利用 *Eco*RI、*Apa*I/*Nhe*I 及 *Sma*I/*Cla*I 限制酵素處理，並以整個置換盒上的序列做為探針進行偵測。在其試驗設計中預測置換盒中的基因如果經由同源性互換的方式進入到 genome 中，則經過 *Eco*RI 處理後 *tmk* 及 *tga* 基因破壞的轉殖株應該分別出現 4.2 kb/3.2 kb 及 5.7 kb/4.1 kb 的片段。在 southern blot 的分析中可發現 wild type 只出現一個大於 4.2 kb 及 5.7 kb 的片段，即分別包含有 *tmk* 及 *tga* 基因全長的片段。另外在 *tmk1* 基因的試驗中出現 6 個菌株如前述有 4.2kb/3.2kb 兩個片段，此可確認是經由同源性互換進入寄主細胞。另外有 6 個菌株同時具有 *tmk* 全長

的片段及另外兩個大小不等的基因片段，這幾個菌株有可能是經由非同源性的方式插入寄主細胞。同樣的在 *tga* 基因的試驗中，wild type 亦只出現一條大於 5.7kb 的片段，即 *tga* 基因全長。另外亦有 5 個菌株呈現 5.7 及 4.1 kb 兩個片段，另外亦有三個菌株出現三段大小不等的片段，其含意亦分別代表置換盒經由同源性或非同源性的方式進入寄主細胞。另外，作者分別挑出 *tmk* 及 *tga* 基因試驗中已確認為同源性置換的菌株再次進行確認。分別利用 *tmk* 及 *tga* 基因 5' 及 3' 端的 non-coding region 為 primer 以及利用 hygromycin 的序列為 primer 與上述兩個菌株進行 PCR 確認。

### 農桿菌媒介轉殖至 *Aspergillus awamori* 之研究實例

基因置換常被用來作為精準的刪除研究的標的基因，而在基因置換的研究中線性的基因片段、包含有篩選基因的置換盒可被導引並經由同源性互換或非同源性互換而進入寄主細胞中。在酵母中(例如 *Saccharomyces cerevisiae* 及 *S. pombe*)約 50-100 bp 的短序列可以很容易經由置換盒進入同源性的區域，並達到約 50-100% 的高置換率<sup>(1,16)</sup>。相對的在絲狀真菌的研究上，常需要用到較大的基因片段 (>1000 bp)，而經由置換盒所達到的置換效率大概介於 10~30% 左右。其中置換片段的大小、置換片段的 G/C content、目標基因在 chromatin 上的結構對轉殖效率扮演著重要的角色。

Michielse 等人 (2005 a,b) 除了採用置換盒的策略之外，更為了確認置換盒中用來作為同源性交換的片段對轉殖率的影響因子有那些，因而設計了不同長短與區域的同源性基因片段在不同的置換盒中。這樣可以用來確認當位於左右兩端的基因片段長短不一或者包含不同的區域時是否影響互換率，也就是說除了確認基因片段長短對互換率的影響力之外，還可確認相同長短，但不同區域的序列是否亦可影響置換率。因此本實驗以 *Aspergillus awamori* 中的 *pyrG* 基因為目標設計了一系列的長度不等的置換基因，分別為帶有 1000、500、250、100 及 50 bp 的 5'*pyrG* 及 3'*pyrG* 片段。另外為了了解不同的序列位置是否對轉殖率亦有影響，接著設計了一個只含 5'*pyrG* 及 3'*pyrG* 外側序列的 500 bp 片段的置換盒 (圖 4)。

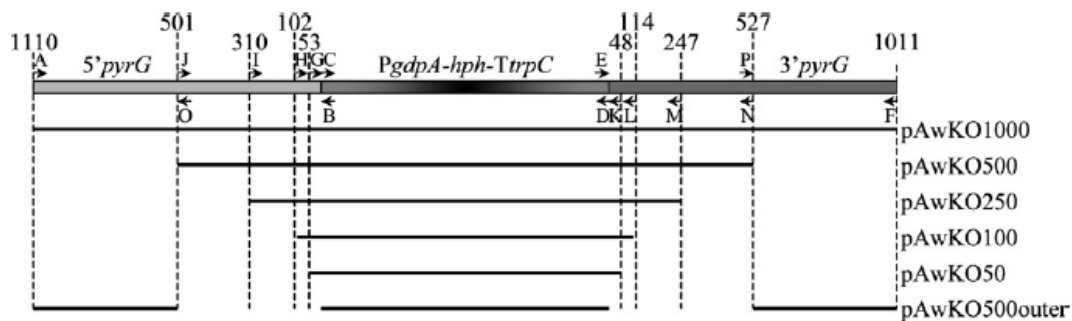


圖 4. *Aspergillus awamori* 之 *pyrG* 基因片段置換盒(Michielse et al. 2005a)



該實驗為了比較不同置換片段長短在農桿菌與傳統的  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  與原生質體的方法中是否有具有不同的轉殖率，因此亦將上述的 1000、500 及 250 bp 的置換盒用於原生質體的轉殖方法中作為比較。上述一系列置換盒的建構是以 *pgd* promoter 接上 *hygromycin* 的編碼基因為置換主體，並在兩端接上 5' *pyrG* 及 3' *pyrG* 基因的序列。接著於 5' *pyrG* 側翼的 5' 端接上 *amdS* 基因，以便於轉殖後作為雙重檢測的標的。*Amds* gene 可 encode acetamidase (E.C3.3.1.4)，這個基因使得 *Aspergillus* 可以利用 acetamide 做為氮及碳素源。Acetamidase 可水解乙醯胺 (acetamide) 成為醋酸鹽 (acetate) 及氨鹽 (ammonium)，因此具有 *amdS* gene 之微生物體，可利用 acetamide 作為碳及氮素源<sup>(8)</sup>。但是若在培養基中加入 fluoroacetamide，則 fluoroacetamide 可被具有 acetamidase 的菌株代謝成 fluoroacetate 並進入檸檬酸循環造成毒性使得菌株死亡。*Amds* gene 在置換盒的構築策略上，它被接在含有同源性置換片段及置換基因的外側，因此置換盒若是經由同源性互換的方式進入寄主細胞，則 *amdS* gene 不會隨之進入(圖 5)。

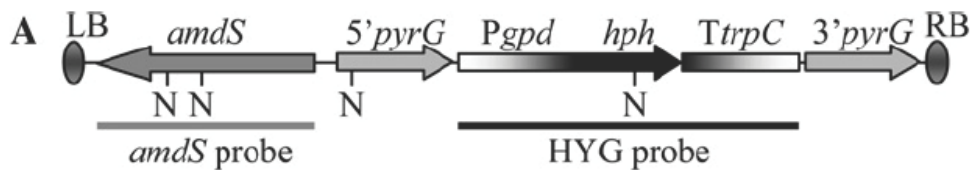


圖 5. *amdS* 基因置換盒 (Michielse *et al.* 2005 b)

但置換盒若是以外源性的方式插入，則會連同 *amdS* gene 一併插入寄主細胞，如此一來，非經由同源性互換而產生的轉植株便無法在含有 fluoroacetamide 的培養基中存活，存活下來的僅有經同源性互換而產生的轉植株。藉由這個策略可快速篩選轉植株是否經由同源性互換而產生，而不需一一經由基因片段的偵測。在 *Aspergillus awamori* 的試驗中，以農桿菌媒介轉殖及  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  轉殖的轉殖率比較，置換片段為 1000 bp 者，在農桿菌中所得到的轉殖率(29%)明顯比利用原生質體的轉殖率(10%)高。但置換片段為 500 及 250bp 者，不論在那種方法所得的效率皆非常低。在農桿菌中，置換片段為 1000 bp 者，其轉殖率為 29%而 500 bp 者為 5%，然而同樣為 500 bp 但選擇的序列區域為 3' 端的 500 bp 序列(outer)確明顯提高轉殖率為 34%，甚至比長片段的 1000 bp 更高(表 3)。

在 250 bp 置換片段長度的試驗中，農桿菌還有機會成功轉殖 (獲得一株轉植株) 但在  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  的方式中則可能片段過短而無任何轉植株產生。這

應當是片段實在過短以致於無法產生同源性互換。在 southern analysis 的結果中可看到，以同源性置換的方式產生的轉植株只有一個 *NcoI* 切位而可獲得一個 2659 bp 的片段，而野生株則可獲得一個 3091 bp 的片段。

經由隨機插入寄主細胞的轉植株則產生一個 3091 bp 片段及一個大於 3091 bp 的片段 (圖 6)。當 *pyrG* 基因的片段由 1000 bp 減少到 500 bp 時，其置換率由 29% 下降到 5%。但 500 outer (同樣為 500 bp，但序列位置不同，見圖 6) 卻可得到 34% 的互換率。

以 *amds* 基因為第二個篩選基因的試驗中，若將 *amds* 基因接在 *pyrG* 基因啟動子外側則可獲得約 6% 的轉殖率，若接在 *pyrG* 基因 terminator 的外側，則可獲得 8% 的轉殖率。相較之下可發現接有 *amds* 基因的置換盒所得的轉殖率明顯低於含 1000 bp *pyrG* 基因但不含 *amds* 基因的置換盒。

表 3. 比較農桿菌媒介轉殖及  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  轉殖法之基因置換率 (Michielse *et al.* 2005 a)

<i>pyrG</i> flanks (bp)	Replacement efficiency <i>Agrobacterium</i> (%)	Replacement efficiency $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$ (%)
1000	29 ( $n^a = 718$ )	10 ( $n = 121$ )
500	5 ( $n = 285$ )	2 ( $n = 150$ )
250	1 ( $n = 457$ )	0 ( $n = 141$ )
100	0 ( $n = 318$ )	n.d. <sup>b</sup>
50	0 ( $n = 120$ )	n.d.
500 <sub>outer</sub>	34 ( $n = 200$ )	n.d.

<sup>a</sup> n, number of transformants analyzed.

<sup>b</sup> n.d., not determined.

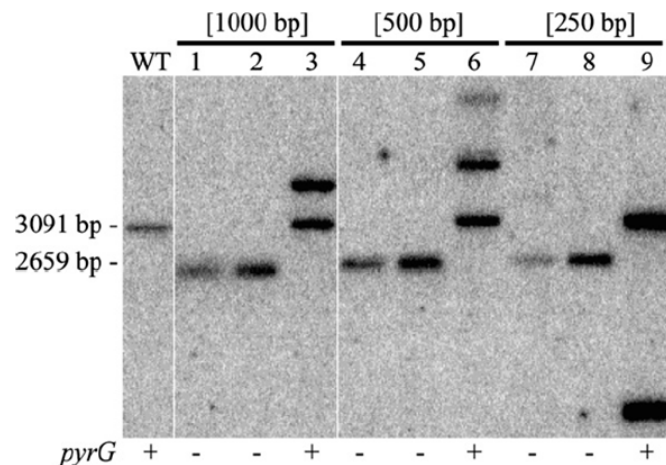


圖 6. *pyrG* 基因破壞的轉植株之南方雜合分析，+及-代表 *pyrG* 的表現型(phenotype) (Michielse *et al.* 2005 b)

## 討論與結論

AMT 適用於多種絲狀真菌之基因置換工作。透過 Michielse 等人(2005 b) 的研究比較 AMT 及  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  兩種方法的轉殖效率。此研究亦測試了同源性互換片段的長度對於基因互換效率的影響，並利用第二個選殖標誌基因來幫助轉植株更有效率的篩選。在這個試驗中使用的置換盒成功的置換 *pyrG* 基因。利用帶有 1000bp *pyrG* flank 的農桿菌媒介轉殖法所得的轉殖效率比利

用  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  的置換率高出 3 倍。該試驗中另外使用了 *gfaA* 基因，而利用農桿菌轉殖 *gfaA* 基因的置換率則比利用  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  得到的置換率高出 6 倍。在同樣的方法進行轉殖的情況下，卻因基因的不同而得到不同的置換率，因而可歸納出基因之置換率取決於基因之位置。在過去的研究中亦發現在 *Kluyveromyces lactis* 中，相較於電穿孔的方法農桿菌可提高 10 到 71 倍的轉殖率<sup>(4)</sup>。由這點可推論農桿菌具有較高的轉殖率並不是因為轉殖了特定的基因序列亦或是因為特定的寄主細胞而造成，而是起因於農桿菌本身遞送基因的系統。

農桿菌媒介轉殖比  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  的轉殖方法具有更高的轉殖率，可能是因為農桿菌遞送到寄主細胞的是單股核酸與蛋白質的複合體，而  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  的方式則是轉殖雙股核酸。DNA-protein complex 包含的是單股核酸及 VirD2 及 VirE2 蛋白，而單股的核酸更容易引起同源性的交換。在幾篇 *Streptomyces* spp. 及 *S. cerevisiae* 的研究中顯示出單股 DNA 特別有利於 DNA 插入與同源性互換<sup>(6, 13)</sup>。雖然尚無法排除單股 DNA 的結合蛋白 VirD2 及 VirE2 在同源性互換功能上可能扮演的角色，但目前的研究推論這兩個結合蛋白可能比  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  的方法更有助於其所結合的蛋白找到寄主細胞的細胞核。另外前述的結合蛋白可保護其所結合的核酸不受 nucleases 所破壞是已確定的功能，這也會在提高轉殖率上提供重要的功能。

由 Michielse 等人 (2005) 的研究看來，當 1000 bp 的 *pyrG* 基因為一分為二，成為 500 bp inner flagement 及 500bp outer flagement 時卻可發現其互換率明顯不同，前者僅有 5% 的置換率而後者卻提高為 34% 的置換率。這個實驗顯示出在同源性互換的影響因子中不僅只是在長度上的不同而已，而且序列本身的影響亦甚大。作者在本試驗完成後進行 500bp inner 及 500bp outer 這兩段基因的序列分析，發現並未存在任何較特別的 motif 適合於同源性互換。目前已知基因序列上的 G/C content 可影響基因的互換率，但這兩段基因的 G/C content 並無明顯的區別，分別為 46% 與 53%，這樣的差異可能是由於 chromatin 的結構型態所導致的結果。

### 參考文獻

1. Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., Pringle, J. R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-base gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14: 943-951.
2. Bako, L., Umeda, M., Tiburcio, A. F., Schell, J., and Koncz, C. 2003. The

- VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. PNAS 100: 10108-10113.
3. Bundock, P., Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P. J. 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14: 3206-3214.
  4. Bundock, P., Mroczek, K., Winkler, A. A., Steensma, H. Y., Hooykaas, P.J. 1999. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. Mol. Gen. Genet. 261:115-121.
  5. De Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J., and Beijersbergen, A. G. M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol. 16: 839-842.
  6. Hilleman, D., Puhler, A., Wohlleben, W. 1991. Gene disruption and gene replacement in *Streptomyces* via single stranded DNA transformation of integration vectors. Nucleic Acids Res. 19: 727-731.
  7. Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., and Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303: 179-180.
  8. Hynes, M. J. 1977. Induction of the acetamidase of *Aspergillus nidulans* by acetate metabolism. J. Bacterio. 131: 770-775.
  9. Michielse, C. B., Arentshorst, M., Ram, A. F. J., and van den Hondel, C. A. M. J. J. 2005a. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. Fungal Genet. Boil. 42: 9-19.
  10. Michielse, C. B., Hooykaas, P. J. J., van den Hondel, C. A. M. J. J., and Ram, A. F. J. 2005b. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Curr. Genet. 48: 1-17.
  11. Michielse, C. B., Ram, A. F. J., Hooykaas, P. J. J., and van den Hondel, C. A. M. J. J. 2004. Role of bacterial virulence proteins in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. Fungal Genet. Boil. 41: 571-578.
  12. Roberts, R. L., Metz, M., Monks, D. E., Mullaney, M. L., Hall, T., and Nester, E. W. 2003. Purine synthesis and increased *Agrobacterium tumefaciens* transformation of yeast and plants. PNAS 100: 6634-6639.
  13. Simon, J. R., Moore, P. D. 1987. Homologous recombination between single-stranded DNA and chromosomal genes in *Saccharomyces cerevisiae*.

- Mol. Cell. Biol. 7:2329-2334.
14. Suominen, P. L., Mantyla, A. L., Karhunen, T., Hakola, S., and Nevalainen, H. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. MGG 241: 523-530.
  15. Van Attikum, H. Bundock, P. and Hooykaas, P. J. J. 2001. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. EMBO J. 20: 6550-6558.
  16. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P., 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 10: 1793-1808.
  17. Zeillinger, S. 2004. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*- mediated transformation. Curr. Genet. 45: 54-60.