

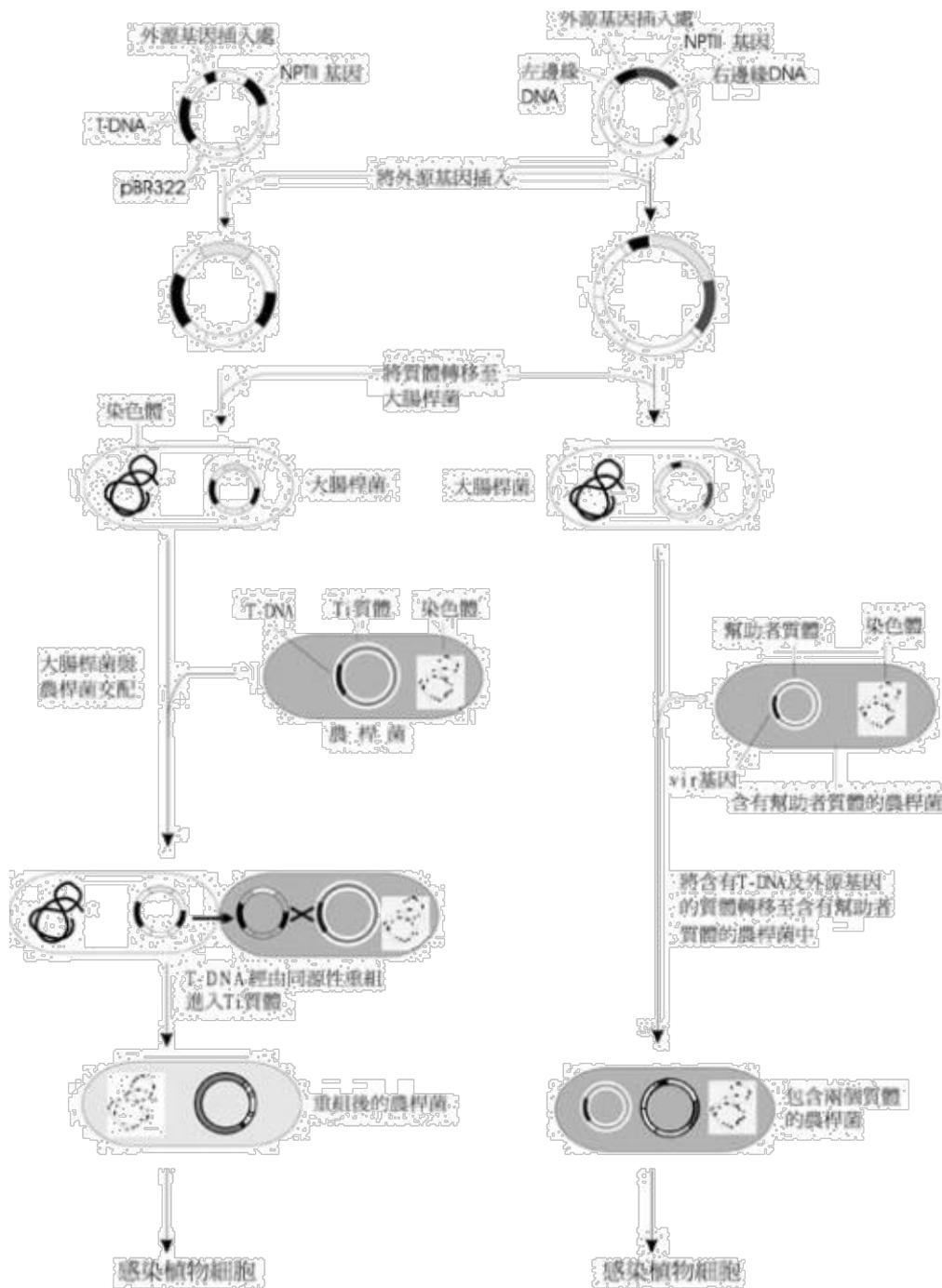
## 農桿菌在植物基因轉殖上之原理及應用(下)

王啓正 2000-12 花蓮區農業專訊 34:20-22

### 利用 T-DNA 當作基因載體轉殖基因的方式

利用基因工程的技術可以將外源基因帶在基因載體上，這種基因載體可以將外源基因帶入及嵌入生物的染色體中。當 T-DNA 作為外源基因載體時，有兩種方法可以使用，第一為整合型系統法，第二則為雙偶型系統法，如圖二。整合型系統法和雙偶型系統法最大的不同點在於整合型系統法所用的農桿菌中只有一個質體，而雙偶型系統法的農桿菌中有兩個質體。

使用整合型系統法時，將外源基因插入一個含有 T-DNA 的質體中，然後將這種質體轉移進入大腸桿菌，由於這質體經過人工改造，可在大腸桿菌中複製並擁有抵抗 ampicillin（一種可以殺細菌的抗生素）的基因，所以含有這種質體的大腸桿菌不怕抗生素，為了證明質體轉入大腸桿菌，可以將大腸桿菌放在含有 ampicillin 等抗生素培養基中培養，能夠繼續生長繁殖的即為擁有這種含有外源基因 T-DNA 質體的大腸桿菌。此外，這個質體也經過人工加入與農桿菌的 Ti 質體同源的 DNA 段落，因此含有這種質體的大腸桿菌和野生型農桿菌擺在一起培養時，兩個菌種的質體某些段落會相互交換（同源性重組現象），這種重組過的農桿菌內就含有外源基因的 T-DNA 片段，如此外源基因可藉由農桿菌的作用嵌入植物染色體中（如圖二）。



圖三 整合型系統(左)及雙偶型系統(右)作為外源基因載體的方式 (改繪自Recombinant DNA, 1992)

雙偶型系統法如上所述：感染植物所用的農桿菌含有兩個質體，其中一個質體叫做雙偶型載體，含有 T-DNA 的 25 個鹼基對邊緣及外源基因 T-DNA 片段，另一個質體稱為幫助者質體，含有 vir gene，可以作用及提供轉移蛋白質使雙偶型載體中的 T-DNA 片段轉移至植物細胞中。迫使含有外源基因的載體進入含有幫助者質體的農桿菌體內有兩種方式，即電穿孔法及三親雜交法；電穿孔法就是透過電擊農桿菌的方式，使其產生暫時性通透孔使載體進入；三親雜交就是將含有特殊質體的大腸桿菌（稱為幫助者菌系）與含有外源基因

的大腸桿菌，及含有幫助者質體的農桿菌三種菌類一起培養，含有外源基因的載體即會進入含有幫助者質體的農桿菌。

### 影響農桿菌轉殖效率的因子

1. 作物的種類：大部分的雙子葉植物為農桿菌的寄主，因此雙子葉作物利用農桿菌轉殖基因較容易成功；近年來單子葉的作物也因為轉殖技術的突破而有一些轉殖成功的例子，然而轉殖的效率卻仍依作物種類和品種的不同而有所差異。

2. 轉殖所用的植物培植體種類及生理年齡：所謂植物培植體就是植物的一部份，可以提供組織培養大量繁殖之用，也可以作為基因轉殖的對象。這些培植體經過基因轉殖及大量增殖之後，必須經過再生的過程才能形成完整的植株。轉殖所用植物培植體的部位通常有種子、下胚軸、葉圓片或莖頂等，同品種內轉殖效率的高低常常跟培植體的種類及生理年齡有關。例如以番茄子葉片段當作培植體，八到十天苗齡的子葉轉殖基因的效率最佳。

3. 農桿菌菌系及載體：在選擇好植物的培植體之後，要進行農桿菌的感染，選擇適當的菌系及載體是很重要的，菌系及載體通常依作物種類、品種及所轉殖的基因特性而有不同的適用種類，有的菌系只針對某些作物品種有效。目前常用且商業化的農桿菌有 LBA4404，質體有 PBI121，PBI131 等。例如番茄培植體在感染時，利用 MS 或 MS 加 B5 維生素之液體培養基稀釋農桿菌液到農桿菌濃度達每毫升  $10^6$  至  $10^9$  個，再將番茄培植體浸泡在農桿菌液中，以利農桿菌的感染。

4. 共培養 (co-cultivation) 的條件：植物培植體和重組後的農桿菌在無菌培養基中一起培養，使農桿菌感染植物並讓 T-DNA 嵌入植物染色體過程稱為共培養。共培養時影響農桿菌轉殖效率的因子有培養基成份組成及型態 (固體或液體)、pH 值及共培養時的溫度及時間；培養基通常要加入 AS 等酚類化合物，pH 值為酸性、保持高滲透壓則有助於 T-DNA 的嵌入。例如水稻共培養的適合溫度為  $20^{\circ}\text{C}$  至  $28^{\circ}\text{C}$ ，pH 值在 4.8 到 6.2 之間，以 N6 固態培養基添加 2,4-D 及酪酸水解物較佳；一定要加入 AS，否則無法轉殖成功。在大部分報告番茄的基因轉殖實驗中，番茄培植體需經過與煙草懸浮細胞液體前培養兩天，再與農桿菌一起共培養，但有人認為不需要經過浪費時間的前培養過程，在共培養基中加入 AS 即可，共培養時以  $25^{\circ}\text{C}$  至  $28^{\circ}\text{C}$  兩天的轉殖效率較一天或三天為佳。

5. 組織培養的條件：例如培養基的組成份可以影響培植體再生成完整植株的比率，進而影響轉殖成功的機率。在轉殖番茄成功的報告中，再生培養基的生長調節劑組成以 zeatin 和 IAA 組合最多。而以水稻轉殖基因報告中，N6 培養基再生效率優於 MS 培養基，添加脯胺酸者轉殖效率亦較佳，生長調節劑組成則以 kinetin 及 NAA 組合最多。

6. 篩選標誌 (selectable makers) 的配合：為了確定經過共培養後 T-DNA 有無嵌入植物培植體，通常會在 T-DNA 片段中加上篩選或標誌用的基因，較常用的有抵抗抗生素的基因、抗殺草劑基因及報導基因；抵抗抗生素的基因例如 NPT II 及 G418 基因轉入植物後可

使植物抗 kanamycin 這種抗生素；抗殺草劑基因可使轉殖植物製造 PPT（殺草劑）轉化酵素，因此以上轉殖成功的植物培植體可以在含有抗生素或 PPT 殺草劑的培養基上存活；存活的植物組織則有極大的比率成爲轉殖成功的培植體。另外，最常用的報導基因爲 GUS 基因，如果嵌入植物染色體中並表達出來，植物即可製造一種酵素與特殊染色劑產生藍色的反應，證明嵌在 T-DNA 上的 GUS 基因已成功地轉殖在植物上。

## 結語

農桿菌轉殖系統主要優點在於組織培養再生系統比較容易。一般來說，培植體一旦被農桿菌感染，T-DNA 會辨識細胞核中染色體所在而嵌入，因此外源基因嵌入植物染色體的機率頗大，但是農桿菌轉殖技術在許多單子葉及某一些雙子葉作物上仍無法突破，外源基因仍無法成功轉殖，主要因素在於科學家對於農桿菌感染植物的機制仍未十分瞭解，若能在感病分子生理的瞭解、菌系及質體的開發、共培養條件的試驗及再生系統的改善四方面徹底努力，相信利用農桿菌轉殖基因的技術將會更普遍、簡單和方便。