

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

以農桿菌媒介轉形法作為鮑魚菇異源表達之工具

*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as a  
tool for heterologous expression in *Pleurotus ostreatus*

The seal of National Taiwan University is a circular emblem. It features a central design with a bell and two vertical pillars. The Chinese characters '國立臺灣大學' (National Taiwan University) are arranged around the top inner edge, and '國家學術勳章' (National Academic Award) is around the bottom inner edge. The outer ring contains the university's name in both Chinese and English.

蔡媛禎

Yuan-Chen Tsai

指導教授：黃慶璨 博士

Advisor: Ching-Tsan Huang, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

## 謝誌

盼著盼著總算有寫謝誌的一天，首先最要感謝的是我的指導教授 黃慶瓌老師，總是不厭其煩地教誨我們做事與學習上該有的態度與思考方式，要我們將嚴謹時時放在心中，也一直耐心鼓勵、包容我們；研究生涯期間同時承蒙 許瑞祥老師指導，在菇蕈專業知識與實驗上給予許多寶貴意見，並且引領我們思考不同的方向與觀念，在此對兩位老師致上最深的謝意與敬意。口試期間承蒙生化組 楊健志老師、中正大學 陳浩仁老師以及中研院 常怡雍老師，在論文內容的細心審閱與口試時的觀念引導，給予我論文寫作與科學方法修正上很大的幫助，也讓本論文更臻完善，特此感謝！特別感謝中山大學 劉仲康老師在我大學期間給予我的指導，以及研究所入學期間給予我的幫助，讓我得以進入微生所微生物組深造。

兩年在 106 的研究生活，時常受到 106 夥伴的照顧。感謝菇類轉殖大師父俊毅在我最一開始進行研究時的協助與鼓勵，由於你先前的努力，才使得我有許多材料與方向得以進行本研究。感謝琬婷與王董在實驗上給予的許多建議與教導，你們總時詳細回答我實驗上的問題，也是使實驗室得以順利運作的推手，是實驗室的精神榜樣。謝謝我的師父韻涵，是因為妳先前的研究結果使得我的題目能夠誕生，在我初入實驗室時妳的親切讓我記憶猶新，妳的耐心指導，也讓我逐漸對實驗上手。感謝學長昌廷時常協助我解決電腦上的疑難雜症，也提供寶貴的實驗經驗給我。感謝學姐林錚，常常能夠從妳那裏學到不同領域的知識，也時常受到妳的照顧與關心。感謝學長姐明玥、秀欣、家禎、千椀、境芳、敏慈、孟男，你們總會熱心的分享實驗心得，謝謝你們給予我的指導與精神鼓勵。一起走過兩年歲月的佳珮和佩璇，是我生活與實驗上的最佳夥伴，常常跟妳們討論、一同解決、分享實驗上遇到的問題與瓶頸，彼此的鼓勵與打氣，是我在實驗遇到困境時，得以堅持下去的動力之一。感謝升碩二的映慈、明毅，從軍樂的信豪，升碩一的翊倫、瑞芸，因為你們的加入讓 106 更熱鬧也更完整。謝謝所有 106 夥伴為實驗室的付出，也祝福你們未來的路途順利朝自己的理想前進。

感謝大學同學芳寶、歐姐、映妃、珮寧、孝慈、旭祺、恆毅，高中同學乃嘉、維新、安妮、小玉，國中同學尹岑和小學同學阿瑄，因為你們也在不同的地方、不同的領域奮鬥著，難得的聯絡、聚會與分享，都是讓我努力學習、成長的動力。特別感謝初到台北在聖本篤認識的郁萍、馥瑋、亭靜、盈涵等等，還有修女以及許多姐姐妹妹們，是妳們給了我彷彿親人的溫暖讓我逐漸習慣在台北的生活。感謝室友伯爵，每天回到宿舍跟妳聊天常是一天難得的愉快時光，謝謝妳陪我度過碩二無數個煩惱與鬱悶的日子。希望你們所有人都能走出自己的一片天。也感謝拉蒙卡哈，在我碩一的瓶頸期，是靠著你對年輕學者的一番鼓勵，使我不放棄。

最要感謝的，是我的家人。感謝我的父親 蔡精文先生和母親 簡靜蘭小姐含辛茹苦拉拔我二十四個寒暑，總是掛心我的生活與健康，在台北的兩年日子他們時常體貼的寄上許多物資與營養補給品給我，分享他們看到的資訊給我，也總是給我許多可靠寶貴的意見；感謝大姊涵禎與二姊淳禎在我前面披荊斬棘、擋風擋雨，讓我沒有經濟上的顧慮而能求學至今。無盡的感激難以訴諸筆墨，謝謝家人無私地給予我精神與物質上的一切，你們永遠是我的驕傲與榜樣。

最後，僅以此論文獻給所有曾經關心、幫助過我的親友們，也祝福你們。

2009.8.8 媛禎 謹致

## 中文摘要

鮑魚菇在食用菇中的產量僅次於洋菇，其栽培容易且可利用多種農業廢棄材做為基質，受到各國食用菇農業的青睞；建立穩定的鮑魚菇轉形方法可做為發展鮑魚菇作為異源表達系統之工具，進而應用至食用疫苗的開發。

農桿腫瘤菌被譽為「自然的基因工程師」，農桿腫瘤菌媒介之轉形法相較其他轉形方法有操作便利、耗費較低等優點。轉入的異源基因多以單一嵌入位嵌入宿主染色體內，因此能穩定表現。在本研究中，我們成功建立了鮑魚菇以農桿菌媒介之轉形系統，將質體帶有不同啟動子啟動報導基因綠色螢光蛋白質(Green fluorescent protein, GFP)與篩選標記潮黴素磷酸轉移酶(Hygromycin phosphotransferase, *hph*)之農桿菌和鮑魚菇共培養之測試結果，鮑魚菇以菌褶組織做為轉形材料與農桿菌株(AGL-1、LBA4404)共培養能夠得到較多轉形株，約80~90%的轉形效率，而均質菌絲液為轉形材料得到較少轉形株，以菌絲塊則無法得到轉形株。螢光顯微鏡結果顯示，花椰菜鑲嵌病毒 35S 啟動子(CaMV 35S)與洋菇的甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GPD*) 啟動子啟動之綠色螢光蛋白質傾向呈現點狀螢光，類似聚集體(aggresome)的情形；當鮑魚菇 *GPD* 啟動子啟動 C 端融合內質網停留訊息胜肽的 GFP 時，亦有點狀綠色螢光分佈菌絲內。而鮑魚菇、金針菇 *GPD* 啟動子啟動之 GFP 則在菌絲內呈現分散的螢光。推測融合訊息胜肽可能有助於鮑魚菇內 GFP 的累積而導致 GFP 聚集。以三明治法酵素連結免疫吸附分析轉形株內可溶性 GFP，每克總可溶性蛋白質含量最高為 43.83 ng。此外，異源基因在轉形株內於有絲分裂與減數分裂後皆能穩定表現。

關鍵字：鮑魚菇、農桿菌媒介轉形、甘油醛-3-磷酸脫氫酶啟動子、綠色螢光蛋白質

## Abstract

*Pleurotus ostreatus* is the second largest edible mushrooms next to *Agaricus bisporus*. *P. ostreatus* is popular worldwide due to ease of and use of agricultural wastes as substrates. Establishing a stable transformation system of *P. ostreatus* may provide a tool for its heterologous expression and even oral vaccine production in the future. *Agrobacterium tumefaciens* has been known as “natural engineer”. There are many advantages of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) over other transformation methods such as convenience and less expensive. The transformed heterologous gene can be integrated into host genome by mostly single insertion, and consequently more stable.

In this study, we successfully developed the *A.tumefaciens* mediated transformation of *Pleurotus ostreatus*. *Agrobacterium* harboring plasmid with different promoters driving green fluorescent protein (GFP) and hygromycin phosphotransferase gene (*hph*) was co-cultivated with *Pleurotus ostreatus*. *P. ostreatus* gill tissues used as explants co-cultivating with *A.tumefaciens* AGL-1 and LBA4404 could get more transformants, with transformation efficiency around 80 ~ 90%. However, only a few of transformants were obtained when homogenized mycelia was used as starting material, and no transformant was found using mycelia modified pellets (MMP). Fluorescent microscopic observation revealed that GFP can be driven by the califlower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and *Agaricus bisporus* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GPD) promoter, in which GFP tended to appear as aggresome-like fluorescent spot. When GFP gene with C terminal endoplasmic reticulum retention signal was driven by *P. ostreatus* homologous GPD promoters, the GFP also formed green fluorescent spots. In the other hand, the *Flammulina velutipes* GPD and *P. ostreatus* homologous GPD promoters without retention signal showed scattered green fluorescence. These results suggested that fused signal peptide led to GFP accumulation in *P. ostreatus* as aggregates. The highest amount of soluble GFP extracted from *P. ostreatus* detected by ELISA is 43.83 ng per gram total soluble protein. Besides, heterologous gene could be stably expressed after mitosis and meiosis.

Keywords : *Pleurotus ostreatus*, *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GPD) promoter, green fluorescent protein (GFP)

# 目錄

謝誌.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	III
目錄.....	IV
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
第一章 前言.....	1
一、基因工程.....	1
1. 基礎生物研究.....	1
2. 分子育種.....	1
3. 生產異源蛋白質.....	1
二、異源表達系統.....	2
1. 原核表達系統.....	2
2. 真核表達系統.....	3
三、鮑魚菇概述.....	6
1. 形態特徵、分類地位、生活史.....	6
2. 栽培優勢.....	8
3. 藥理活性.....	8
4. 其他應用價值.....	8
四、食用菇類轉形系統.....	10
五、農桿菌媒介轉形.....	13
1. 農桿腫瘤菌.....	13
2. 農桿腫瘤菌的感染過程.....	15
3. 農桿腫瘤菌在基因轉殖的應用.....	20
六、分生策略.....	22
1. 啟動子.....	22
2. 報導基因.....	22
3. 內含子與訊息胜肽.....	23
4. 篩選標記.....	23
七、研究動機與目的.....	24
第二章 材料與方法.....	27
一、實驗材料.....	27
1. 菌株及培養條件.....	27

2. 質體 .....	28
3. 引子 .....	29
二、實驗方法 .....	36
1. 重組質體建構 .....	36
2. 農桿菌轉形 .....	42
3. 農桿菌媒介之鮑魚菇轉形 .....	43
4. 鮑魚菇轉形株篩選與分析 .....	46
第三章 結果 .....	49
一、質體建構 .....	49
1. 重組質體確認 .....	49
二、農桿菌媒介轉形 .....	56
1. 重組質體轉入農桿菌株 .....	56
2. 農桿菌媒介之鮑魚菇轉形 .....	56
三、綠色螢光蛋白質於鮑魚菇之表現 .....	63
1. 螢光顯微鏡觀察 .....	63
2. 西方式雜合分析 .....	67
3. 三明治法酵素連結免疫吸附分析結果 .....	68
四、鮑魚菇轉形株異源基因穩定度 .....	70
1. 無性世代穩定性 .....	70
2. 有性世代穩定性 .....	70
第四章 討論 .....	73
一、鮑魚菇以農桿菌媒介之轉形系統建立 .....	73
1. 宿主材料之選擇 .....	73
2. 農桿菌株 .....	75
3. 誘導物濃度 .....	75
4. 共培養時間 .....	75
二、發展鮑魚菇作為異源表達系統 .....	77
1. 啟動子探討 .....	77
2. 訊息胜肽效應 .....	80
第五章、結論 .....	81
第六章、未來工作 .....	82
第七章、參考文獻 .....	83

## 圖目錄

圖一 鮑魚菇之形態 .....	7
圖二 擔子菌灰蓋鬼傘之生活史與子實體發展過程 .....	7
圖三 VirA受環境因子以及AS誘導活化後之訊息傳導示意圖 .....	16
圖四 誘導農桿腫瘤菌 vir 基因表現的物質結構式 .....	16
圖五 農桿菌腫瘤引發質體與T-DNA移動及嵌入宿主染色體示意圖 .....	19
圖六 農桿菌腫瘤感染植物造成之T-DNA轉形過程示意圖 .....	19
圖七 本論文研究架構圖 .....	26
圖八 實驗室無菌栽培之鮑魚菇子實體。 .....	30
圖九 質體 pCAMBIA0380 與pCAMBIA 1302 之限制酶切位與特定基因圖譜 .....	31
圖九(續) 質體 pCAMBIA0380-PiH與pPiH-PiEGFP/SP之限制酶切位與特定基因圖譜 .....	32
圖九(續) 質體 pCAMBIA0390-AH-AiEGFP 與 pCAMBIA0390-AH-FiEGFP 之限制酶切位與特定基因圖譜 .....	33
圖十 pCAMBIA0380-PiH重組質體建構示意圖 .....	39
圖十(續) pCAMBIA0380-PiH-PiEGFP重組質體建構示意圖 .....	40
圖十(續) pCAMBIA0380-PiH-PiEGFP-SP重組質體建構示意圖 .....	41
圖十一 宿主轉形材料與農桿菌共培養操作示意圖 .....	45
圖十二 pCAMBIA0380-PiH Colony PCR產物之洋菜膠體電泳結果 .....	50
圖十三 pCAMBIA0380-PiH 限制酶截切確認結果 .....	51
圖十四 鮑魚菇GPD啟動子序列 .....	52
圖十四(續) 潮黴素磷酸轉移酶核苷酸序列 .....	53
圖十五 pPiH-PiEGFP colony PCR與pPiH-PiEGFP-SP colony PCR 結果 .....	54
圖十六 pPiH-PiEGFP 與pPiH -PiEGFP-SP限制酶切結果 .....	54
圖十七 EGFP與EGFP-SP核苷酸序列 .....	55
圖十八 農桿菌colony PCR產物之洋菜膠體電泳結果 .....	58
圖十九 鮑魚菇MMP轉形株生長情形 .....	60
圖二十 以鮑魚菇雙核菌絲液作為轉形材料於選擇性培養基上初次生長情形 .....	61

圖二十一 轉形株MLF-2 於選擇性培養基上生長情形良好.....	61
圖二十二 以鮑魚菇蕈褶組織作為轉形材料於選擇性培養基上初次生長情形 .....	62
圖二十三 鮑魚菇蕈褶組織轉形株繼代生長情形 .....	62
圖二十四 鮑魚菇辨識CaMV 35S啟動子所表現之mGFP.....	64
圖二十五 鮑魚菇辨識同源性GPD啟動子所表現之EGFP .....	64
圖二十六 鮑魚菇辨識同源性GPD啟動子所表現之EGFP-SP .....	65
圖二十七 鮑魚菇辨識洋菇GPD啟動子所表現之EGFP .....	65
圖二十八 鮑魚菇辨識金針菇GPD啟動子所表現之EGFP .....	66
圖二十九 螢光顯微鏡觀察野生型鮑魚菇菌絲 .....	66
圖三十 鮑魚菇轉形株粗萃取蛋白質以西方式雜合分析定性結果 .....	67
圖三十一 轉形株菌絲生長速度不均之情形 .....	68
圖三十二 鮑魚菇轉形株蛋白質粗萃液之三明治法酵素連結免疫吸附分析結果..	69
圖三十三 鮑魚菇轉形株抗藥性基因穩定度測試 .....	71
圖三十四 螢光顯微觀察鮑魚菇轉形株液態培養產生之節生孢子萌發菌絲 .....	71
圖三十五 螢光解剖顯微鏡觀察鮑魚菇蕈褶組織 .....	72
圖三十六 螢光顯微鏡觀察鮑魚菇轉形株與野生型擔孢子 .....	72



## 表目錄

表一 不同表達系統生產人類醫藥用重組蛋白質之比較.....	5
表二 鮑魚菇的藥理成分與功用.....	9
表三 鮑魚菇轉形系統之發展.....	11
表四 成功以農桿菌轉形之食用菇類.....	12
表五 農桿腫瘤菌與其腫瘤引發病症於植物之部分研究.....	14
表六 本研究使用之核酸引子序列.....	34
表七 本研究所使用之菌株.....	35
表八 限制酶反應之酵素比例與反應條件.....	36
表九 聚合酶連鎖反應之條件.....	38
表十 共培養使用之誘導培養基 (induction medium, IM)組成成分.....	44
表十一 農桿菌株對應質體與鮑魚菇轉形株之簡稱.....	59
表十二 鮑魚菇以農桿菌媒介轉形時所使用之材料比較.....	74
表十三 已發表能辨識CaMV 35S啟動子之物種.....	79
表十四 鮑魚菇以不同啟動子啟動GFP之表現情形.....	79

# 第一章 前言

## 一、基因工程

基因工程(genetic engineering)為在生物體外進行 DNA 選殖與建構，完成基因重組後，利用轉形系統將重組基因送入目標細胞中，其目的主要可概分為三類

### 1. 基礎生物研究

範圍涵蓋遺傳學、生理學、形態學等，包括針對生物體內特定基因剔除或突變及回補功能分析；融合報導基因之應用如研究生物體之細胞生物學、目標蛋白質於生物體內的位置分佈、生物分子之交互作用、功能探討以及尋找功能性基因、啟動子強度分析等。

### 2. 分子育種

傳統育種方式為人工篩選具觀賞或食用價值之優良農畜品系進行雜交，其子代經不斷繁衍篩選後，以獲得改良的品種，育種過程費力耗時。分子育種(molecular breeding)以基因工程之方式導入特定性狀，改進外觀、產量或風味口感、加快生長速度、延長保存時間等，藉此提高其經濟價值。

### 3. 生產異源蛋白質

從自然界中取得有用的蛋白質必須經過純化的步驟，並且可能潛藏污染或感染的風險，拜基因工程所賜，人類得以利用生物體做為平台大量生產異源蛋白質，這種生物性平台亦稱為異源表達系統。以醫藥研發為例，如利用大腸桿菌生產人類胰島素(97)；以農業生物技術為例，如將農作物轉入蘇力菌基因、抗殺草劑基因、胡蘿蔔素合成路徑之酵素(7)等，提高糧食產量或價值；而工業及環境應用如利用微生物生產替代能源、提供生物質材料或進行污染物處理等。

藉異源表達系統生產目標蛋白質，使得生產成本降低並能夠提供穩定且較為安全的來源。其中，生產重組醫藥蛋白質之表達系統開發仍為目前生物技術中最受重視的應用之一，因此相關表達系統的選擇與轉形技術的改進成為提高經濟效益的關鍵。本研究開發食用菇類中的鮑魚菇(*Pleurotus ostreatus*)做為異源表達系統，改進其轉形系統並探討其表現異源蛋白質之可行性。

## 二、異源表達系統

自基因工程發展以來，異源表達系統亦隨之快速演進，從原核系統至真核系統如真菌、動物、植物、以至近年來新興之食用菇類表達系統(104)。各表達系統簡介如下，其特性與發展之優缺點評估如表一。

### 1. 原核表達系統

原核表達系統具產量高、生長週期短、成本較低之優點。大腸桿菌(*Escherichia coli*)為此系統之中發展最早的，然而過去研究發現，在大腸桿菌體內過量表現異源蛋白質時，常會造成蛋白質的不正常摺疊導致其被細胞內的蛋白酶分解或是會分泌至內涵體(inclusion body)而不具生物活性且不利純化，雖然有研究提出以摺疊調節因子如伴護子(chaperone)或摺疊酶(foldases)來幫助異源蛋白質正確摺疊(88)，或是藉由培養大腸桿菌的溫度降低至 30°C 能夠使蛋白質不被送至內涵體(81)，但大腸桿菌產生之蛋白質以胞內形式存在，其破菌純化步驟常伴隨大腸桿菌內毒素(endotoxin)的釋出，使其不利生產醫用蛋白質。

枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)能夠將蛋白質產物送至胞外，省去純化步驟，其外泌蛋白質每公升可達公克等級的產量(52)，此外，枯草桿菌屬革蘭氏陽性菌，因此沒有內毒素的問題，是原核系統中較適於作為醫用蛋白生產之系統。儘管如此，原核系統因缺乏蛋白質轉譯後修飾作用使得其應用有限。

## 2. 真核表達系統

### 2.1 酵母菌

釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)為單細胞真核生物，具類似原核系統之快速生長與操作容易特性，是真核表達系統中最早開發者。但其具有表達之蛋白質會有過度醣基化現象、轉形株質體不穩定性、部分蛋白質會停留在胞質週緣區(periplasm)、工業化量產不易(異源蛋白質最大產量約 1~5%總蛋白量)等缺點(62)，促成其他酵母菌表達系統的發展：如嗜甲醇酵母菌 *Pichia pastoris*、*Hansenula polymorpha* 等，這些菌株可利用甲醇作為主要碳源，具有能受甲醇誘導的強力啟動子，能利用來大量生產異源蛋白質。此類酵母菌具有可大量生產胞內與胞外蛋白質，及高等真核生物之蛋白質修飾作用如醣基化、雙硫鍵形成與蛋白酶切作用(proteolytic processing)等優點。

其中，*P. pastoris* 因為具商業化之套組而受到研究人員廣泛使用；相對而言，*H. polymorpha* 因為可忍受較高溫度(30~42°C；*P. pastoris*:30°C)、有較快且高產量的發酵能力且能以非甲醇(甘油受限策略)誘導而較受產業界的喜愛(62)。1996 年 Gellissen 及 Lepetic 團隊以 *H. polymorpha* 生產 B 肝疫苗(31, 55)，在一年後通過臨床試驗並於 1997 年上市(43)。

### 2.2 絲狀真菌

以絲狀真菌為表達系統之特色在於其可將大量蛋白質分泌至胞外，主要使用的菌種為麴菌屬如 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 以及木黴菌屬 *Trichoderma reesei*，其中麴菌屬異源蛋白質產量可達每公升 100 毫克(75)。近來也有以新的絲狀真菌表達系統如 *Chrysosporium lucknowense* 生產工業蛋白質，其特色在於轉形效率高、發酵時間短、黏滯度低、可在中性 pH 值環境下生產蛋白質等而倍受矚目(65)。

增進絲狀真菌同源蛋白質產量的方法通常為轉入多套基因數、使用強力的同源性啟動子、使外來基因插入染色體的特定基因序列等，至於異源蛋白質之生產則將該段外來基因融合能夠有效分泌的內源性蛋白質(65)，或是利用蛋白水解酶(protease)突變株來提高生產量(75)。也有研究指出 N 端融合肽能穩定

外來基因的 mRNA，具有促進異源蛋白質分泌、保護異源蛋白質不被分解的作用(37)。

## 2.3 分子農場

分子農場(molecular farming)是利用活細胞或生物體大量生產重組蛋白的概念，通常意指以農作物或牲畜為表達系統。分子農場生產之目標蛋白質可直接使用，省去純化之成本，以植物與菇類(mushrooms)而言，相較動物表達系統之優勢在於食用上的安全性，沒有動物性病源的疑慮且成本較低、可大規模栽種與生產。以下就兩者做簡介。

### 2.3.1 植物

最初以植物作為醫藥蛋白質表達系統的幾個重要研究均以菸草(tobacco)為研究對象，包括 1986 年以農桿菌轉殖獲得的人類生長激素為第一個以植物生產的醫藥蛋白質；1989 年首次以植物表現了抗體 IgG1 (phosphonate ester)顯示了植物能夠組裝數個次單元的複雜醣蛋白，1992 年則表現 B 肝病毒表面抗原，在動物試驗中能引發免疫反應，進一步證實植物表現異源蛋白質在結構上的正確性。近期以植物生產之蛋白質更延伸至工業酵素、研究用蛋白質等(59)，然而植物生長週期較長，且轉基因植物在田間種植時花粉的傳播對生態環境的影響仍受到諸多質疑，因此生長週期短、室內栽培之菇類相對而言更具潛力。

### 2.3.2 菇類

菇類(mushrooms)係指真菌界有性世代產生肉眼可見之子實體，主要涵蓋擔子菌門(basidiomycetes)以及部分子囊菌門(ascomycetes)。以菇類做為表達系統，除可免去基因汙染之疑慮外，亦有生長週期短、附加營養價值高以及具有多種藥用活性物質與免疫調節等優點。

據估計，在八萬種已知的真菌中，約一萬種為菇類，其中可食用並已商業化生產的約四十種，約五到六種以工業化大量生產之菇類如洋菇、鮑魚菇、香菇、金針菇等。

表一 不同表達系統生產人類醫藥用重組蛋白質之比較(59)

Table 1. Comparison of production systems for recombinant human pharmaceutical proteins.

System	Overall cost	Production timescale	Scale-up capacity	Product quality	Glycosylation	Contamination risks	Storage cost
Bacteria	Low	Short	High	Low	None	Endotoxins	Moderate
Yeast	Medium	Medium	High	Medium	Incorrect	Low risk	Moderate
Mammalian cell culture	High	Long	Very low	Very high	Correct	Viruses, prions and oncogenic DNA	Expensive
Transgenic animals	High	Very long	Low	Very high	Correct	Viruses, prions and oncogenic DNA	Expensive
Plant cell cultures	Medium	Medium	Medium	High	Minor differences	Low risk	Moderate
Transgenic plants	Very low	Long	Very high	High	Minor differences	Low risk	Inexpensive

### 三、鮑魚菇概述

#### 1. 形態特徵、分類地位、生活史

鮑魚菇(*Pleurotus ostreatus*)形狀似蠔，又稱蠔菇(oyster mushroom)，中國大陸亦稱之平菇，生長時為叢生，其菌柄(stalk)側生於菌傘(cap)，如圖一所示，其菌傘顏色依光照程度有些微不同，主要為灰白色、淡褐色至褐色。菌褶(gill)面為乳白色或淡褐色，孢子印為白色。

鮑魚菇在分類地位上屬於真菌界(Fungi)，雙核亞界(Dikarya)，擔子菌門(Basidiomycota)，傘菌綱(Agaricomycete)，傘菌目(Agaricales)，側耳科(Pleurotaceae)中的側耳屬(*Pleurotus*)。

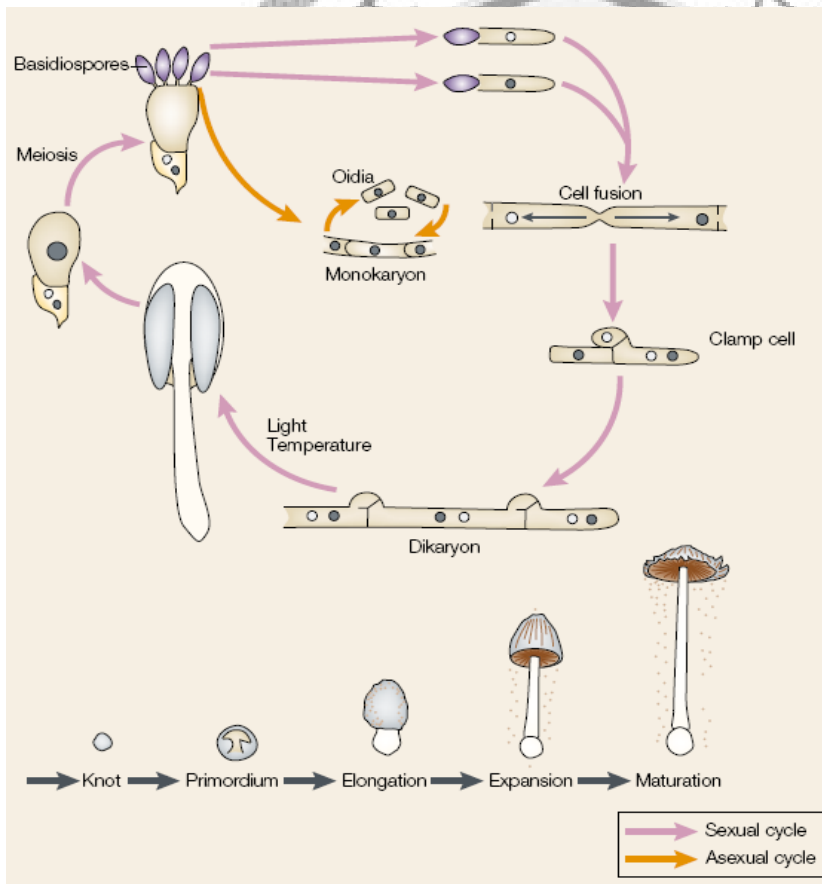
擔子菌的有性孢子著生於菌褶上的擔子(basidia)，因而稱之擔子菌，擔子菌之生活史可分為有性世代與無性世代，有性世代自擔孢子萌發成單核(monokaryon)菌絲後，不同性別之菌絲進行交配(mating)，在接觸面的細胞壁水解，細胞核移動而形成雙核(dikaryon)菌絲；雙核菌絲在菌絲分隔(septa)處具扣子體(clamp cell)，為菌絲在有絲分裂(mitosis)過程中細胞核移動之用。雙核菌絲生長過程中受環境因子(水、光照、溫度)變化刺激生成原基體(primordia，又稱菇蕾)，並進一步分化成子實體(fruiting body)。子實體主要部分為菌傘、菌柄，或部分擔子菌具菌杯(volva)，菌傘內部雙核菌絲末端特化出雙核擔子，經核融合(karyogamy)與減數分裂(meiosis)後產生單核之擔孢子(basidiospore)；擔孢子掉落後萌發成長之單核菌絲產生節生孢子(oidia or arthrospores)則為其無性世代(15)。圖二以灰蓋鬼傘(*Coprinus cinereus*)為例說明擔子菌生活史與子實體發展過程。



圖一 鮑魚菇之形態

Figure 1. Morphology of *Pleurotus ostreatus*

圖片來源：<http://www.natur-lexikon.com/>



圖二 擔子菌灰蓋鬼傘之生活史與子實體發展過程

Figure 2. The hallmark feature of the basidiomycete fungal life cycle is illustrated here by *C. cinereus*. The lower diagram illustrates the stages in the development of the fruiting body. Figure originated from Casselton, L., and M. Zolan., 2002 (15).



## 2. 栽培優勢

側耳屬菇類為白腐真菌(white rot fungi)，可利用多種基質(如稻草、麥桿等農業廢棄物)栽培，以木質纖維基質栽培則可省去堆肥、覆蓋土等步驟(21)。相關研究指出蠔菇可利用香菇栽培使用過的基質，同為側耳屬的杏鮑菇對於使用過的基質利用及出菇效率甚至更勝於未使用過的基質，顯示側耳屬菇類在栽培上可大幅降低生產成本、減低木屑使用率。目前在台灣的商業化生產仍以木屑太空包栽培為主，已有研究指出鮑魚菇的栽培基質可以蔗渣取代三分之二的木屑量，同時能提升出菇產率。

除基質轉換率高以外，鮑魚菇菌絲生長最適溫度約 25~30°C，其出菇溫度較高(14~20°C)且出菇時間短(約 2~3 週)，使其在栽培上更具競爭力。

## 3. 藥理活性

據研究，鮑魚菇具許多藥理功效與活性成分，包含從菌絲體萃取之蛋白聚醣，具抗腫瘤與免疫調節活性(80)、從菇體內萃取之新型凝集素(lectin)，在動物實驗證實具抗肝癌與抗腫瘤(94)功效，並且也有其他成分具抗氧化活性(47)，其他鮑魚菇已發表的藥理成分與功效請參見表二。

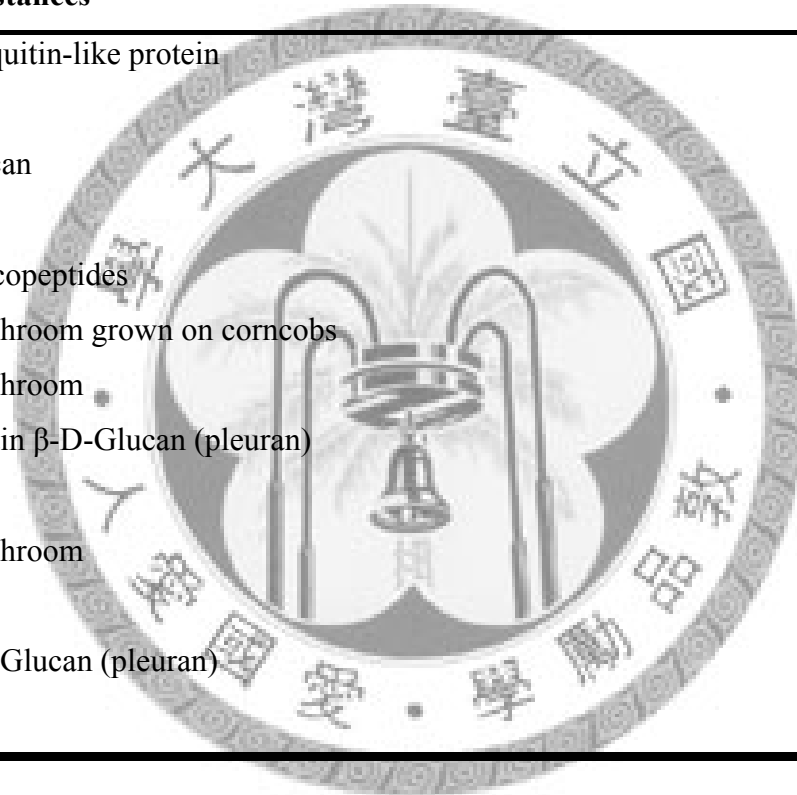
## 4. 其他應用價值

鮑魚菇為白腐真菌，具降解木質素與木質纖維的能力，含有多種具工業應用價值之酵素如peroxidases、laccases、cellulases、hemicellulases以及xylanases.，可應用於過氧化氫之生產、紙漿與造紙業及畜牧飼料業上；更有研究指出鮑魚菇能夠代謝毒化物質，具生物復育潛力(21)。

表二 鮑魚菇的藥理成分與功用

Table 2. Medicinal effects and substances of *Pleurotus ostreatus*

Medicinal effects	Substances	References
Antiviral	Ubiquitin-like protein	(94)
Immunomodulating	Glucan	(71, 80)
Antitumor	Glycopeptides	(56)
	Mushroom grown on corncobs	(103)
	Mushroom	(9)
	Lectin $\beta$ -D-Glucan (pleuran)	
Anticholesterolic	Mushroom	(67)
Antioxidant	$\beta$ -D-Glucan (pleuran)	(8)



#### 四、食用菇類轉形系統

食用菇類的轉形方法多以細胞壁水解酵素處理成原生質體(protoplast)的細胞形式後，再以電穿孔(electroporation)、PEG (polyethylene glycol)法或是搭配限制酶的 REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration)法使外來基因能穩定嵌入染色體。另有少數以基因槍轟擊法(particle bombardment)進行轉形之研究。

以鮑魚菇而言，早期為製作原生質體的方式進行電穿孔、PEG(72, 73)或 REMI 轉形(45)。2001 年 Irie 等人利用 PEG 法外加單股 DNA 有效提高原生質體方法為主的轉形效率 50 倍(45)，然而原生質體製做不易且細胞再生率低仍造成轉形效率降低。2002 年 Sunagawa 與 Magae 以製作成菌絲塊(Mycelial disks)的方式搭配基因槍粒子轟擊法(86)，雖避免了製備原生質體，然而轉形率並無顯著改善。前述研究主要多以同源或異源抗藥性基因為轉殖目標，2006 年 Li 等人的研究以 GFP 做為報導基因進行 PEG 法轉形，但綠色螢光在鮑魚菇轉形後 30 個小時消失(56)。2008 年由 Kuo 建立鮑魚菇等食用菇類以酵素緩和處理的發芽擔孢子或菌絲片段之電穿孔轉形系統使得轉形效率顯著提升，同時成功表現了真核的水母來源綠色螢光蛋白基因(104)。但電穿孔轉形法對細胞傷害大且外來基因嵌入宿主染色體數目不一，宿主生理受影響較多可能導致其異源基因較不穩定。此外，多基因嵌入對於以分生策略提升異源基因表現量的比較也不易判定。鮑魚菇轉形系統之發展列於表三。

自 1998 年 Groot 等人利用農桿腫瘤菌媒介轉形法(*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation)將抗藥性基因(hygromycin phosphotransferase)成功轉入洋菇內表現後(24)，農桿腫瘤菌為食用菇類的轉形帶來新的契機，表四列出成功以農桿菌轉形之食用菇類。

農桿菌媒介轉形法轉入之異源基因為隨機嵌入宿主染色體且多是單一套數，因此能穩定表現外來基因，在眾多轉形方法中其操作較為便利且可選擇材料範圍大、成本低廉，甚至可將 150 kb 大的片段轉形至植物宿主染色體且穩定遺傳至子代(39)，是深具潛力的轉形系統。除了應用於植物轉形外，也已經成功應用於真菌類如酵母菌(11)、麴菌(36)、鐮孢菌(63)、木黴菌(101)及青黴菌屬(99)等。其中以子囊菌最多，至少有五十種已成功轉形；接合菌、卵菌則占少數。而擔子菌至少十二種(61)，顯示農桿菌可轉形宿主範疇多樣，並不侷限於植物而有更多發展可能。

表三 鮑魚菇轉形系統之發展

Table 3. Progressing of transformation system in *Pleurotus ostreatus*

Materials	Transformation method	Efficiency (transformants / $\mu$ g)	Stability	References
Protoplast	PEG	5-46	N.A.	Peng et al., 1992
	PEG / Electroporation	3-48	N.A.	Peng et al., 1993
	PEG / ss DNA	200	N.A.	Irie et al., 2001
	REMI	0.1	Up to 3 months	Irie et al., 2001
Mycelia	Particle bombardment	1	Up to 10 months	Sunagawa et al., 2002
Enzyme treated mycelia / germinated spore	Electroporation	5-50	Up to 6 months	Kuo et al., 2008

PEG : polyethylene glycol, REMI : Restriction Enzyme Mediated Integration, N.A.: Non-available

表四 成功以農桿菌轉形之食用菇類

Table 4. Edible mushrooms successfully transformed by *Agrobacterium*

Species	<i>Agrobacterium</i> strain used	Target gene	Year	References
<i>Agaricus bisporus</i> (洋菇)	AGL-1, LBA1100, EHA105	<i>hph</i>	1998, 2000, 2001	(17, 24)
<i>Suillus bovinus</i> (乳牛肝菌)	AGL-1, LBA1100	<i>hph, EGFP</i>	2002	(69)
<i>Hypholoma sublateritium</i> (栗蕈)	AGL-1	<i>hph</i>	2004	(35)
<i>Tricholoma matsutake</i> (松茸)	AGL-1, EHA105	<i>hph</i>	2006	(64)
<i>Volvariella volvacea</i> (草菇)	EHA105, LBA4404	<i>afp</i>	2008	(95)
<i>Antrodia cinnamomea</i> (牛樟芝)	EHA105	<i>hph</i>	2008	(16)
<i>Flammulina velutipes</i> (金針菇)	AGL-1, LBA4404	<i>hph, EGFP, GUS</i>	2008	(105)

*hph* *Escherichia coli* hygromycin resistance gene, *afp* budworm antifreeze protein gene, *EGFP* enhanced green fluorescent protein, *GUS*  $\beta$ -glucuronidase gene

## 五、農桿菌媒介轉形

### 1. 農桿腫瘤菌

農桿菌 (*Agrobacterium spp.*) 廣泛存在於土壤中，主要由腐生菌組成，然而部分農桿菌因帶有表現毒性蛋白質 (virulence protein) 的質體，為植物致病菌，可以感染雙子葉植物及少數單子葉植物導致其生長變異，例如農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 使植物生成毛狀根 (hairy root)；農桿腫瘤菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 造成植物冠瘿腫瘤病徵 (crown gall disease) 等，皆為典型例子 (29)。

農桿腫瘤菌的致病過程主要由腫瘤引發質體 (Tumor inducing plasmid, Ti plasmid) 所調控，該質體為一環狀巨型雙股DNA分子，全長約200 kb，質體可概分為三部分：毒性蛋白質基因、由兩段約 25 bp 重複的片段Right border與Left border夾帶的T-DNA (Transferred DNA)，以及與 opine 代謝相關的酵素；原生型T-DNA上帶有催化植物合成生長激素如auxin、cytokinin與opine的基因，在毒性蛋白質的輔助下送入宿主細胞並嵌入宿主染色體中而表現，致使植物生長激素失調而生成冠瘿腫瘤，該腫瘤產生opine，而農桿腫瘤菌得以利用宿主生產的opine作為營養源(32, 60)。1980年科學家首次將原生型T-DNA置換為異源基因，完成農桿腫瘤菌媒介的重組DNA轉形植株，此後，農桿腫瘤菌以「自然的基因工程師」普遍應用於基因轉殖研究，並且有更多與農桿腫瘤菌感染機制相關的研究仍在進行中；有關首次探討農桿腫瘤菌所引發的冠瘿腫瘤疾病以及其後將近一個半世紀間，農桿腫瘤菌相關的重要研究整理於表五(29)。

表五 農桿腫瘤菌與其腫瘤引發病症於植物之部分研究

Table 5. Selected discoveries and insights in *Agrobacterium* biology(29)

Year	Discovery	References
1853	首次發表植物冠瘿腫瘤的研究報告	Fabre, Dunal
1897	鑑定出 <i>Agrobacterium vitis</i> 為造成葡萄冠瘿瘤的病因	Cavara
1907	鑑定出 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 為造成 <i>Paris Daisy</i> 冠瘿瘤的病因	Smith and Townsend
1947	植物腫瘤組織在激素缺乏的環境下能不斷增生，因而提出這些植物腫瘤細胞已被農桿菌轉形	Braun
1971	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 在 37°C 下培養不具致病力；致病力能在致病株與非致病株間轉移	Kerr
1974	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 的致病力與腫瘤引發質體(Ti plasmid)的存在有關	Zaenen
1977	Ti plasmid 上的 T-DNA 嵌入冠瘿腫瘤細胞的染色體中，該 T-DNA 與腫瘤形成有關	Chilton
1980	被農桿菌轉形的細胞合成 opine 提供良好環境予農桿菌生長	Guyon
1980	首度利用 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 轉形重組質體至植物	Francois
1984	T-DNA 上的致癌基因調控植物生長激素 auxin 和 cytokinin 大量產生	Klee et al ; Lichtenstein
1985	<i>virA/virG</i> 二元調節系統在農桿菌轉形中扮演訊息接收與傳導的角色	Stachel and Zambryski
1986 ~	更多與T-DNA轉移過程相關的毒性蛋白被發現與探討；鑑定參與農桿菌轉形的宿主基因；擴大農桿菌轉形宿主的範疇；針對 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58)進行染色體DNA解碼	

## 2. 農桿腫瘤菌的感染過程

植物受傷組織最易受到農桿腫瘤菌的感染，感染過程與機制大致如圖六，分述如下：

### 2.1 附著宿主細胞

植物受傷部位會釋放胺基酸、有機酸以及糖類(sugars)，這些物質吸引農桿腫瘤菌附著到植物細胞上。農桿菌首先藉由合成乙醯多醣附著，隨後伸出纖毛固定在植物細胞上(29)。

### 2.2 毒性蛋白質活化

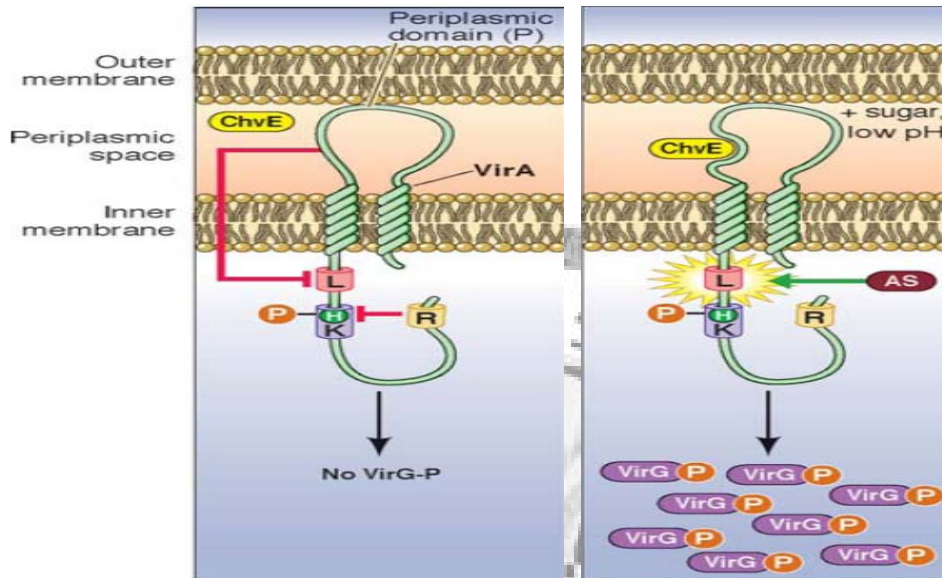
農桿腫瘤菌附著植物細胞的同時，腫瘤引發質體上的毒性蛋白質操作組亦開始啟動表現，該基因群為T-DNA的轉移所必須，受到持續表現的VirA/VirG二元調節系統調控，該系統主要藉由激酶 (Vir A組成之一) 對於下游調控蛋白(VirG)磷酸化與否來控制往下的訊息傳遞 (98)。

植物受傷組織為進行傷口修復，該處細胞苯基丙酸路徑(phenylpropanoid pathway)頻繁而生成大量酚類化合物，胞外環境呈酸性(pH 5.0-5.5)，單糖累積以合成細胞壁等(6)，這些因子共同以直接或間接方式誘導穿膜受器激酶VirA自動磷酸化(autophosphorylation)其組胺酸(Histidine)而活化，活化型VirA進一步將磷酸根轉移至VirG的天門冬胺酸(Aspartate)上，磷酸化的VirG得以專一性結合毒性蛋白基因上游調節位(*vir boxes*)，調控毒性蛋白質基因表現(10)。VirA活化後引發之構形變化與訊息傳導示意圖如圖三。

植物受傷位置細胞釋放毒性蛋白質誘導物如酚類化合物 3,5-Dimethoxyacetophenone(亦為acetosyringone [AS]，其結構如圖四，重要結構特徵包括芳香環上的氫氧基[aromatic hydroxyl]以及甲氧基[methoxyl group])。最早自植物根部及葉片原生質體檢測出，該成分含量高並且具高度誘導毒性蛋白質表現的活性，其活性大小與甲氧基之多寡有關：帶有兩個甲氧基之結構活性最高，單一甲氧基次之，不帶甲氧基者活性最小。無論是人工合成或是自植物苯基丙酸路徑合成的酚類衍生物皆具誘導活性。另外，一些研究指出醛糖亦可作為誘導



物，形成如圖四的六環糖為活性關鍵，其中酸性糖具最高的誘導活性；而酸性環境可能與VirA和ChvE (農桿腫瘤菌染色體上一段與致病力有關之基因編碼的膜蛋白，與糖類結合蛋白有高度同源性)間的交互作用有關，亦影響訊息的傳遞，圖三(60)。

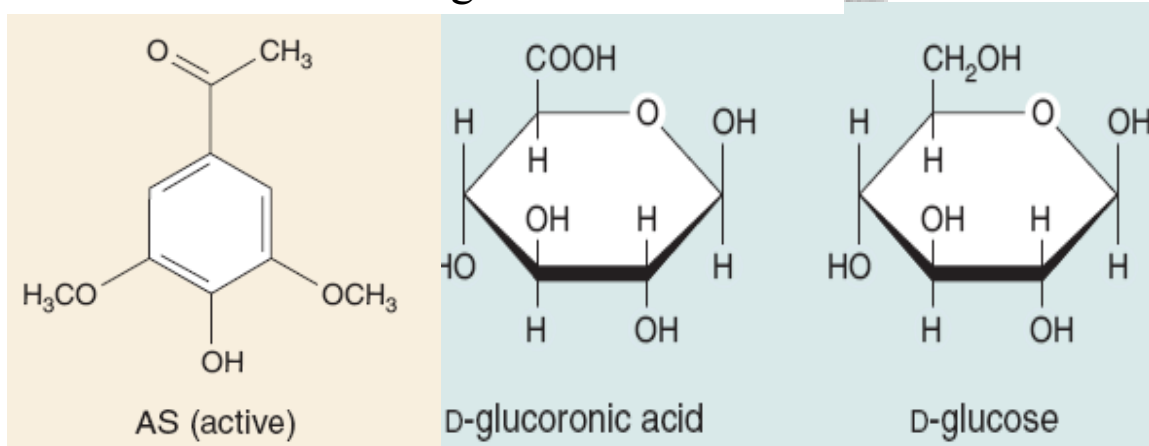


圖三 VirA 受環境因子以及 AS 誘導活化後之訊息傳導示意圖

Figure 3. Schematic view of signal transduction after VirA activated.

## Phenols

## Sugars



圖四 誘導農桿腫瘤菌 *vir* 基因表現的物質結構式。酚類化合物 AS：acetosyringone；六環糖類：葡萄糖醛酸、葡萄糖。

Figure 4. Structural formula of substances capable of inducing *vir* gene expression.

### 2.3 T-DNA形成

毒性蛋白質表現後，具單股核酸內切酶活性的VirD1與VirD2於T-DNA邊緣作用，切開T-DNA底股(bottom strand)近RB與LB位置。新的一股DNA自RB位置開始以頂股(top strand)為模板合成至LB為止，取代原本底股DNA，而裸露的底股DNA即為可傳送的單股T-DNA (84)。毒性蛋白質VirD2結合T-DNA 5'端而與T-DNA共同經由第四型分泌系統送入植物細胞。

### 2.4 傳送T-complex(Transport complex)與毒性蛋白質到宿主體內

第四型分泌系統(Type 4 Secretion System, T4SS)在細菌體內參與蛋白質與遺傳物質傳送的過程，農桿菌利用此分泌系統運送物質到宿主細胞內。該系統為VirB/D4複合體，主要由至少11個VirB與1個VirD4所組成，其功能包括提供運送的能量、形成穿膜孔道以及構成接合線毛(又稱 T-pilus)，這些組成結構協同作用下幫助基質(VirD2-T-strand, VirE2, VirE3, VirF以及VirD5等)穿過農桿菌與宿主細胞間的屏障。在農桿菌體內，VirD4為輔助蛋白質(Coupling protein)，與T-complex上的蛋白質(如VirD2)交互作用後，藉由與T4SS其他的組成蛋白質(如VirB10)結合，將T-complex送至農桿菌細胞膜上的第四型傳送系統附近，進一步利用ATP水解產生的能量將基質送到細胞外(14)；此外，VirD4也能直接與其他毒性蛋白質C端結合(如VirE2)，幫助其送至T4SS附近(3)。研究顯示，VirE2在*in vitro*的情況下會形成可傳送單股DNA的通道，其他研究亦提出VirE2與T-complex分別先後送入宿主體內，前者在T-DNA進入宿主細胞的同時迅速與之結合並摺疊T-DNA，摺疊時釋出能量提供T-DNA進入宿主細胞之所需(27, 28, 38)。此外，VirE2的結合也防止T-DNA受宿主體內核酸酶降解。VirE2在農桿菌中為一多功能的蛋白質，藉由感染時傳送到宿主細胞內，具有保護 T-DNA及與其他毒性蛋白質或宿主蛋白質發生交互作用等功用 (96)。

### 2.5 T-DNA 進入宿主細胞核

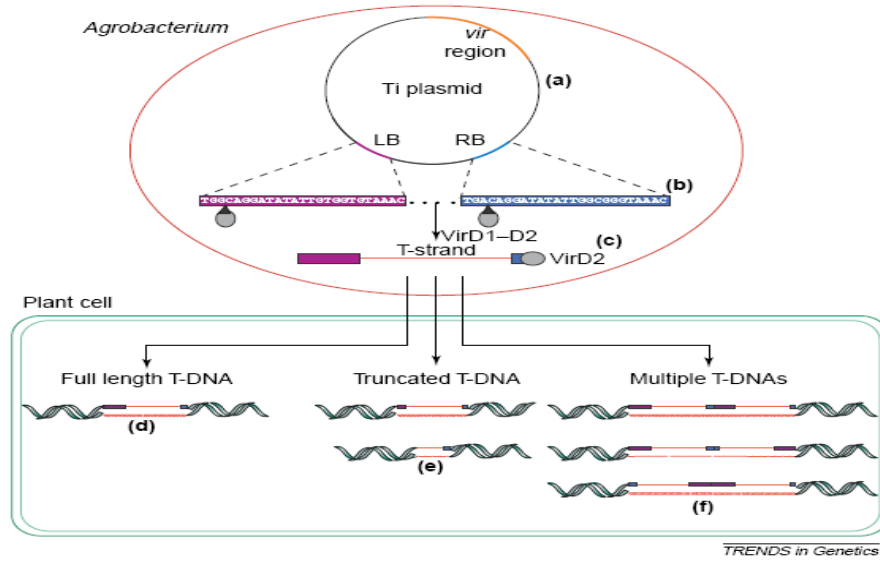
T-DNA進入宿主細胞核的機制亦受毒性蛋白質媒介，包括VirD2與VirE2。VirE2與VirD2被認為直接與T-DNA結合而形成T-complex (102)，其進入宿主細胞核與宿主自身的蛋白質有關。VirE2與VirD2由不同的機制進入細胞核內，VirD2由一種在

動物、酵母菌與植物細胞間具保守性的機制調控進入核內，而VirE2進入細胞核內卻是由植物專一性的機制所調控(19)。此外，一已知可調節VirD2進入到核內的植物蛋白質，阿拉伯芥的karyopherin  $\alpha$  protein，無法辨認VirE2 (4)，更顯示兩者是藉由不同的方式進入宿主細胞核。後者在阿拉伯芥的研究主要藉由與宿主的蛋白質VirE2 - interacting protein 1 (VIP1)結合而進入宿主體內(91)。宿主核外蛋白質進入核內的目的是在於啟動宿主的防禦基因活化表現，農桿菌進而演化出利用宿主此免疫啟動的機制，以毒性蛋白質(如VirE2)與宿主調節防禦基因表現的蛋白質發生交互作用，藉由宿主蛋白質的核轉移將T-DNA送入宿主細胞核內(26)。

## 2.6 T-DNA嵌入宿主染色體

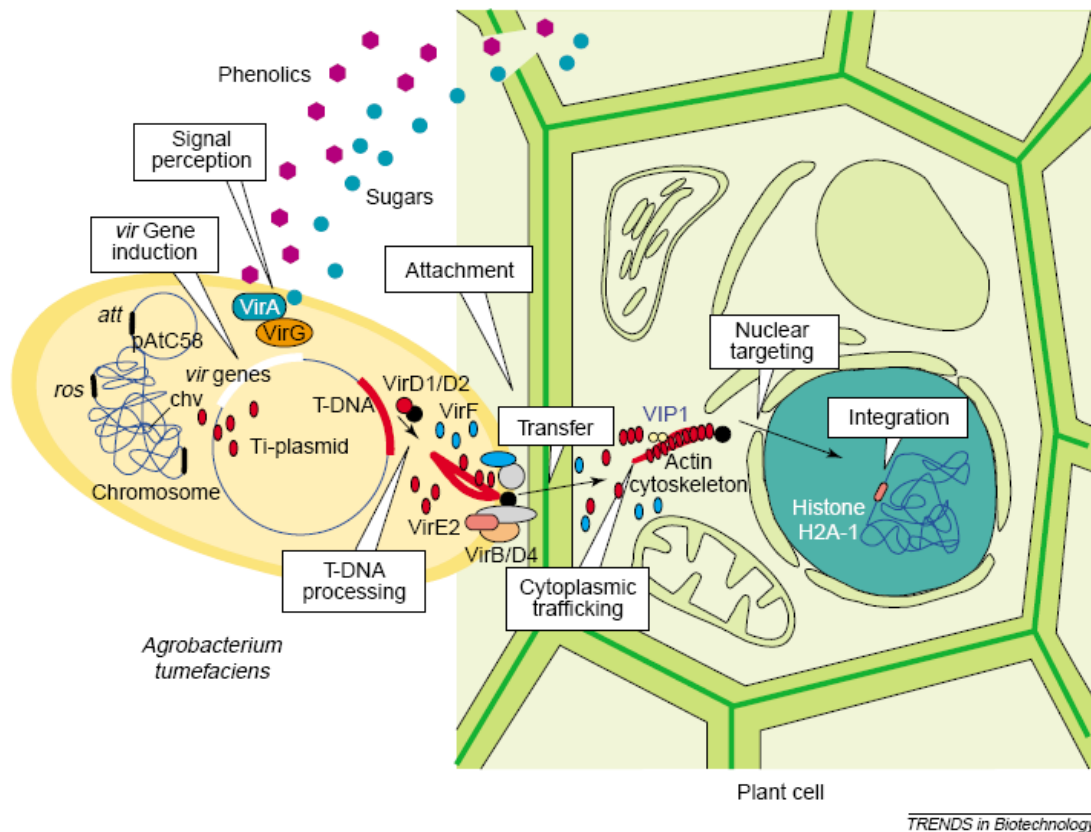
在農桿菌媒介的植物轉形系統中，T-DNA插入宿主染色體位置多為隨機插入，然而部分研究指出其插入位置序列與T-DNA的3'端有微同源性(microhomologies)。在酵母菌的研究中，T-DNA可以非同源性重組(non-homologous recombination, NHR)或同源性重組(homologous recombination, HR)的方式插入酵母菌染色體中，而植物方面的研究則發現依轉形組織的不同，T-DNA會以不同方式嵌入宿主染色體(90)，顯示T-DNA邊緣序列、宿主DNA序列以及農桿菌感染時宿主的生理狀態和環境條件皆會影響T-DNA插入位置。在植物阿拉伯芥的研究中發現，T-DNA傾向嵌入基因間隔區(intergenic regions)、啟動子、5'以及3'端非轉譯區域(2, 79)，但這些結果可能為轉形株經過人為抗藥性篩選所致，在未經篩選的轉形株分析發現，T-DNA的插入確為隨機(34)。T-DNA多以單一拷貝數插入染色體單一位置，或是以多個拷貝數重疊插入單一位置，如圖五所示，其T-DNA border可能完整保留或部分保留，通常left border插入宿主染色體的完整度較高。

雖然有許多假說提出，但造成宿主染色體缺口的機制以及T-DNA接上宿主染色體DNA的方式目前仍無定論，僅推測在T-DNA接合上宿主染色體的過程中，VirD2與某些宿主蛋白質可能以接合酶的角色參與其中，此外，部分宿主蛋白質如DNA修補酵素在T-DNA嵌入染色體過程中亦不可或缺(90)。



圖五 農桿菌腫瘤引發質體與 T-DNA 移動及嵌入宿主染色體示意圖

Figure 5. Schematic structure of the *Agrobacterium* Ti-plasmid and T-DNA mobile and integration. Figure originated from Tzfira et al., 2004 (90).



圖六 農桿腫瘤菌感染植物造成之 T-DNA 轉形過程示意圖

Figure 6. The model of T-DNA transformation process in plant cell during *Agrobacterium tumefaciens* infection. Figure originated from Gelvin, 2003 (33).

### 3. 農桿腫瘤菌在基因轉殖的應用

自1980年科學家將細菌的跳躍子基因(Transposon, Tn7)置入農桿菌腫瘤引發質體而轉入植物細胞後(42)，農桿菌即廣泛應用於植物基因工程上。以農桿菌進行轉形時，轉入的異源基因套數較少，大部份的情況為異源基因以單一套數嵌入宿主染色體，此情況相較於其他轉形方法，對宿主生理的影響較小因此能較為穩定的表現異源基因(25)，而未知基因標定也較為容易。儘管如此，農桿腫瘤菌在自然界的宿主為雙子葉植物，因此仍有部分植物不易以農桿菌進行轉形，然而在實驗室操作下，農桿菌可轉形的宿主範疇已擴大至真菌(24, 36)甚至是人類細胞(51)。

1995年Bundock等人的研究發現農桿腫瘤菌可以感染酵母菌而使T-DNA轉移嵌入酵母菌染色體內，雖然其轉形機制似乎不同於農桿菌對植物細胞的轉形(11)，但該研究開啟了以農桿腫瘤菌應用於真菌轉形系統之先例。隨後的研究亦發現部分絲狀真菌、菇類皆能夠以農桿腫瘤菌成功轉形且能穩定表現異源基因(24)，農桿腫瘤菌進而發展為部分真菌轉形或致突變的工具。然而，農桿腫瘤菌媒介之轉形在應用於特定真菌物種前仍需經過感染條件測試與改進，其考量因素包括：

#### 1. 轉形材料的選擇

真菌可選擇的材料如菌絲、菌塊、菌褶組織、孢子或發芽孢子、原生質體等，不同種類的真菌各有其最易感染的細胞形態，可以參考Caroline等人將已知能被農桿菌成功轉形之真菌所使用的起始材料做的整理(61)。

#### 2. 農桿腫瘤菌菌株與質體

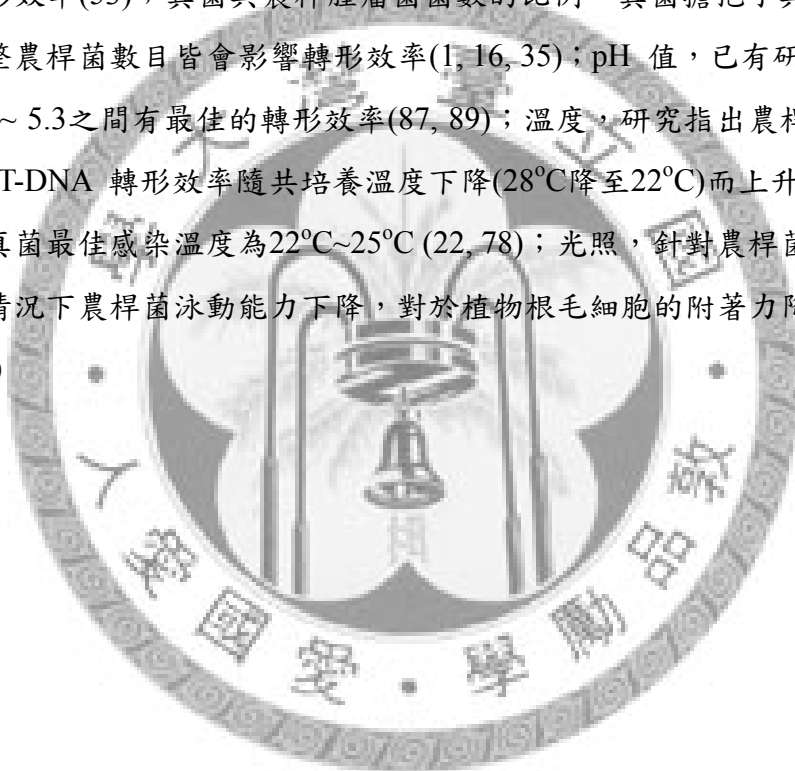
過量表現特定毒性蛋白質的菌株對於片段較長之異源基因轉形效率可能較佳(39)，而不同菌株亦有其最易感染的物種對象，例如在板栗疫菌(*Cryphonectria parasitica*)的研究發現，農桿菌菌株A281與AGL-1的轉形效率較LBA4404高(70)，此外，草菇轉形之研究也提出EHA105的轉形效率較LBA4404為佳(95)。

1983年Hoekema等人以及Framond發現毒性蛋白質基因與T-DNA位於同一農桿菌株之不同的質體上仍保有轉形效果後，便發展出雙偶型載體系統。雙

偶型載體系統之T-DNA位於雙偶型載體上，而傳送T-DNA相關之毒性蛋白質基因則位於農桿菌體內的輔助質體(helper plasmid)上(54)。雙偶型系統發展25年來，也有許多符合不同需求的設計與相關商品化質體，不同菌株搭配不同質體的使用也會影響轉形效率(13)，Lee及Gelvin(54)對較常使用之雙偶型載體特色與常用農桿菌去致病性(disarmed)菌株做了較完整的介紹。

### 3. 共培養條件

包括誘導物在農桿菌前處理時的添加濃度以及共培養時的添加濃度，皆會影響轉形效率(53)；真菌與農桿菌菌數的比例，真菌擔孢子與農桿菌數比例或調整農桿菌數目皆會影響轉形效率(1, 16, 35)；pH 值，已有研究指出pH值介於5.0 ~ 5.3之間有最佳的轉形效率(87, 89)；溫度，研究指出農桿菌感染酵母菌時其 T-DNA 轉形效率隨共培養溫度下降(28°C降至22°C)而上升(30)，亦有研究指出真菌最佳感染溫度為22°C~25°C (22, 78)；光照，針對農桿菌之研究發現在光照情況下農桿菌泳動能力下降，對於植物根毛細胞的附著力降低，致病力減弱(66)



## 六、分生策略

### 1. 啟動子

本研究中使用之主要啟動子為鮑魚菇同源與異源如洋菇、金針菇之甘油醛-3-磷酸脫氫酶(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, *GPD*)上游啟動子。甘油醛-3-磷酸脫氫酶除了在細胞內參與糖解(glycolysis)與醣升(gluconeogenesis)作用外，也與膜運送與胞吞作用、核內 tRNA 傳送到細胞質、轉譯調節、核外 DNA 複製和修補有關(5, 83)，為持續表現的基因，因此使用其啟動子可望提高下游基因表現量。

另外使用花椰菜鑲嵌病毒(Califlower mosaic virus, CaMV)來源之啟動子測試其是否能被鮑魚菇辨識及啟動子效果如何。花椰菜鑲嵌病毒常感染十字花科植物，特別是甘藍菜、花椰菜、油菜、芥菜等，為了能在宿主体內複製自己的 DNA，病毒演化出壓過宿主調節系統的強力啟動子(35S 與 19S 啟動子)，將其置於自身基因之前，誘騙宿主持續表現其基因。目前在植物轉形中，最常使用的是 35S 啟動子，幾乎應用於所有基因改造作物上，特別是基改玉米。CaMV 35S 啟動子重複序列(duplicated)甚至能增加植物體內之基因表現達數百倍以上，對於下游較遠端之基因亦有少許啟動作用(49)。

### 2. 報導基因

本研究中以綠色螢光蛋白質 (Green fluorescent protein, GFP)為報導基因評估異源蛋白質表現量的多寡。綠色螢光蛋白質有 238 個胺基酸，其分子量約 27kDa，於 1962 年由日本學者 Osamu Shimomura 等人自水母 *Aequorea victoria* 體內純化並研究其特性，1992 年 Douglas Prasher 等人選殖出綠色螢光蛋白質基因促進了此後螢光蛋白質的相關研究與做為報導基因之應用，然而野生型綠色螢光蛋白質激發波峰非單一(395 nm 與 475 nm)且在 37°C 下摺疊不易，促使研究人員開發了綠色螢光蛋白質突變型，如 S65T 突變型，使激發波峰發生紅移至單一波峰 488nm。綠色螢光蛋白質由於不需基質、穩定而耐熱(可達 65°C)，適於做為偵測基因表現量的指標。

### 3. 內含子與訊息胜肽

研究發現裂褶菌(*Schizophyllum commune*)表現潮黴素磷酸轉移酶以及洋菇(*Agaricus bisporus*)、灰蓋鬼傘(*Coprinus cinereus*)表現綠色螢光蛋白質時，必須有內含子(intron)存在才能表現，這可能是因為內含子能維持 mRNA 之穩定而可以在細胞內累積足夠的量(12, 58)；另外，在裂褶菌等真核表達的研究發現提高異源基因之 G+C 含量可增進表達原核基因的效率(82)。

另有研究提出蛋白質 C 端帶有訊息胜肽時，能提高異源蛋白質表現量，其目的為使目標蛋白質停留在特定位置而累積，這些訊息胜肽如 SEKDEL、KDEL、HEEL 或 HDEL。

### 4. 篩選標記

在植物與菇類表達系統中，最常使用的異源篩選標記為潮黴素磷酸轉移酶(hygromycin B phosphotransferase)，以潮黴素(hygromycin B)篩選轉形株。潮黴素為胺基環醣醇類抗生素，具廣效活性，能影響真核與原核細胞生長，其方式為干擾 tRNA 辨識、與核糖體結合影響其移位(translocation)，進而抑制蛋白質合成。多數胺基環醣醇類抗生素被酵素作用而失去活性，包括乙醯化(acetylation) 三磷酸腺苷酸化(adenylation)以及磷酸化(phosphorylation)作用。潮黴素磷酸轉移酶存在於對潮黴素具抗性之細菌或產生潮黴素的菌株 *Streptomyces hygroscopicus*(76)，成功轉入並表現該酵素之轉形株即能在含有潮黴素之選擇性培養基生長。

鑒於異源抗藥性基因對於生態的影響，許多研究也以營養缺陷株、同源性篩選標記進行轉形株的篩選，如鮑魚菇已發表之琥珀酸脫氫酶(succinate dehydrogenase)其鐵硫蛋白(iron sulfur protein)經點突變後具有 carboxin 抗性，相關研究中也認為同源性篩選標記的使用能夠提高轉形效率(44, 46)。而在草菇轉形的研究中，使用夜蛾(budworm)的抗凍基因(Antifreeze protein, afp)進行抗凍轉形株篩選，亦為免去細菌抗藥性基因汙染的策略提供不同的選擇(95)。



## 七、研究動機與目的

本實驗室先前已建立鮑魚菇等食用菇類之電穿孔轉形系統(104)，但電穿孔轉形法對細胞傷害大且外來基因嵌入宿主染色體數目不一，可能導致其異源基因較不穩定。農桿菌媒介轉形法轉入之異源基因因為隨機嵌入宿主染色體且大多是單一套數，因此能穩定表現外來基因，其操作便利、成本低廉，近年由本實驗室 Hsu 成功建立金針菇之農桿菌媒介轉形法(105)，然而不同物種有其最適轉形的細胞形態與條件，若能發展作為鮑魚菇的轉形工具可望提高鮑魚菇的研究與應用層面。

本論文欲探討鮑魚菇利用農桿菌媒介轉形法之可行性並建立最適化條件，利用實驗室先前選殖的鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子，配合其他菇類(洋菇、金針菇)來源的 *GPD* 啟動子以及花椰菜鑲嵌病毒來源之啟動子，表現綠色螢光蛋白質基因以比較不同來源啟動子啟動基因表現的情形與差異性；另比較報導基因融合內質網停留訊息胜肽的蛋白質表現情形。期以農桿菌媒介轉形法能使異源基因於鮑魚菇穩定表現進而在未來應用於醫藥蛋白質的生產。

欲達上述目的所需達成之目標包括：

### 1. 表現質體建構

1.1 以 pCAMBIA0380 為骨架，置入鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子啟動之篩選標記 *hph*

1.2 將項目 1. 完成之重組質體置入鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子啟動之報導基因 EGFP

1.3 將項目 1. 完成之重組質體置入鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子啟動之 C 端帶有訊息胜肽(HDEL)的報導基因 EGFP

### 2. 鮑魚菇以農桿菌媒介轉形測試

2.1 將前述表現質體、本實驗室已建構帶有洋菇啟動子啟動之 GFP、金針菇啟動子啟動之 GFP 質體以及商品化質體 pCAMBIA1302 藉電穿孔方式送入農桿菌株 AGL-1 與 LBA4404

2.2 製備鮑魚菇菌絲塊、菌絲液與菌褶組織塊做為轉形材料

2.3 將帶有表現質體之農桿菌株與不同的鮑魚菇材料進行共培養，另測試共培養天數、誘導物 AS 濃度。

### 3.轉形株篩選與分析

3.1 將生長於選擇性培養基上之菌絲以螢光顯微鏡觀察 GFP 表現情形

3.2 以西方式雜合分析進行 GFP 定性

3.3 以三明治法酵素連結免疫吸附分析對轉形株之 GFP 進行定量

### 4.轉形株穩定度探討

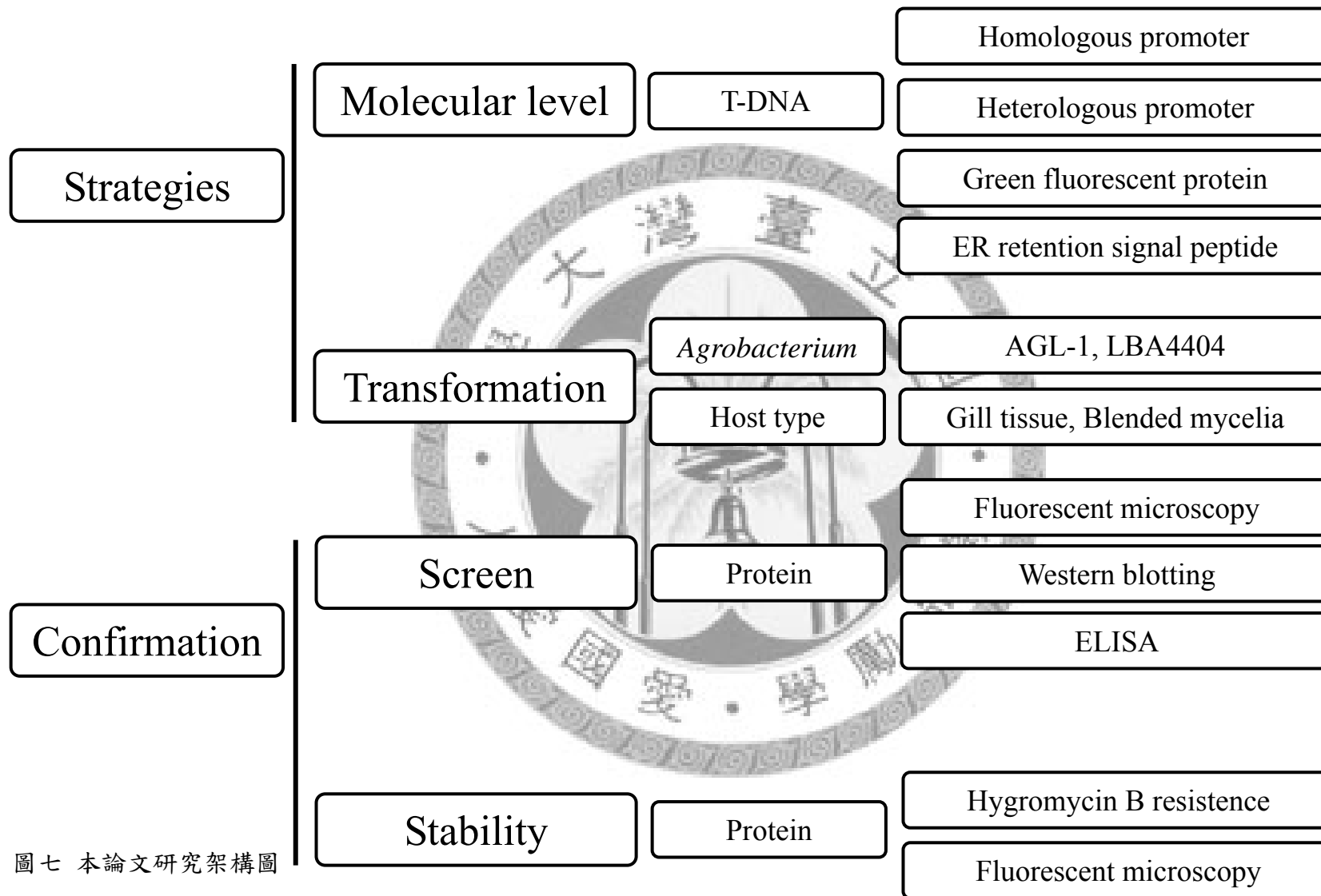
#### 4.1 異源基因無性世代穩定性

轉形株於選擇性培養基上繼代四次後，於不含抗生素之培養基繼代四次，進一步轉至選擇性培養基，觀察是否仍具抗性。轉形株於液態培養基培養時產生之無性節生孢子以螢光顯微鏡觀察 GFP 表現情形

#### 4.2 異源基因有性世代穩定性

將轉形株進行出菇後，以螢光解剖顯微鏡觀察茸褶組織 GFP 表現情形，收集擔孢子以螢光顯微鏡觀察 GFP 基因是否遺傳至子代並表現，另將擔孢子塗佈於選擇性培養基上觀察生長情形。





圖七 本論文研究架構圖

Figure 7. Schematic framework of this study

## 第二章 材料與方法

### 一、實驗材料

#### 1. 菌株及培養條件

##### 1.1 真菌

鮑魚菇(*Pleurotus ostreatus*)雙核菌株與單核菌株為本實驗室保存。使用之培養基為 1.5% PDA (potato dextrose agar) 平板培養基，於 25°C 避光培養，三周後確認菌絲形態無誤後，將平板培養基上菌絲生長邊緣之菌塊接種至 1.5% PDA 斜面培養基上保存，約每三個月接到新鮮 PDA 斜面培養基。

將木屑培養基(木屑：米糠 = 3:1，含水量約 70%)裝填於耐高溫之塑膠袋內壓實，置於玻璃燒杯中滅菌降溫後，接種鮑魚菇雙核菌絲，待菌絲長滿後(約三周)，以滅菌之接種棒劃開塑膠袋及菌絲，添加水分並佐以 15°C 低溫、光週期(9hr 光照/15hr 黑暗)等出菇刺激後約兩到三周可得無菌子實體，如圖八。

##### 1.2 細菌

大腸桿菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株為質體保存使用之宿主細胞，大腸桿菌 Top 10 菌株則為分生操作使用之細胞，37°C 下培養於含 1.5% Agar 之固態 Luria-Broth (LB, Acumedia Manufacturers, Michigan) 平板培養基或液態 LB 培養基中，液態培養震盪條件為 250 rpm。另以含 25% Glycerol 之 LB 培養基長久保存於 -80°C。

農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株為 AGL-1 與 LBA4404，亦培養於 LB 培養基，培養溫度為 28~30°C，液態震盪條件為 250 rpm，長久保存條件同大腸桿菌。

## 2. 質體

### 2.1 pCAMBIA0380

pCAMBIA0380 (CAMBIA, Australia)全長約 6.8 kb，為雙偶型載體，由長度各 25 bp 之 Left border 與 Right border 夾帶 T-DNA 共 582 bp，內含 pUC8 之多重選殖位(Multiple cloning site)，Nopaline synthase (nos) poly A signal。骨架上含胺基糖類磷酸轉移酶(Aminoglycoside phosphotransferase)為卡那黴素 (Kanamycin)抗性基因，做為細菌篩選之標記。

### 2.2 pCAMBIA1302

pCAMBIA1302 (CAMBIA, Australia)全長約 10.5 kb，為雙偶型載體，由長度各 25 bp 之 Left border 與 Right border 夾帶 T-DNA 共 4.3 kb，內含兩段重複的 CaMV 35S 啟動子序列啟動之潮黴素磷酸轉移酶，做為真菌抗藥性篩選之用；一段 CaMV 35S 啟動子啟動之 MGFP，其 3'端帶有 6 個 histidine 以及 nos poly A signal。

### 2.3 pCAMBIA0380-PiH

pCAMBIA0380-PiH 全長約 8.7 kb，以 pCAMBIA0380 作為骨架，其 T-DNA 之 MCS 近 LB 端置入鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子帶有第一個內含子啟動之 *hph* 抗藥性基因。

### 2.4 pPiH-PiEGFP

pPiH-PiEGFP 全長約 10.1 kb，為 pCAMBIA0380-PiH 近 RB 端置入鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子帶有第一個內含子啟動之 EGFP 報導基因。

### 2.5 pPiH-PiEGFP-SP

pPiH-PiEGFP-SP 全長約 10.1 kb，為 pCAMBIA0380-PiH 近 RB 端置入鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子帶有第一個內含子啟動之 EGFP 報導基因，其 3'端帶有內質網停留訊息胜肽 HDEL。

## 2.6 pAiH-AiEGFP

pAiH-AiEGFP 全長約 9.4 kb，以 pCAMBIA0390 作為骨架，其 T-DNA 之 MCS 近 LB 端為洋菇 *GPD* 啟動子帶有第一個內含子啟動 *hph* 抗藥性基因，近 RB 端則為洋菇 *GPD* 啟動子帶有第一個內含子啟動之 EGFP 報導基因

## 2.7 pAiH-FiEGFP

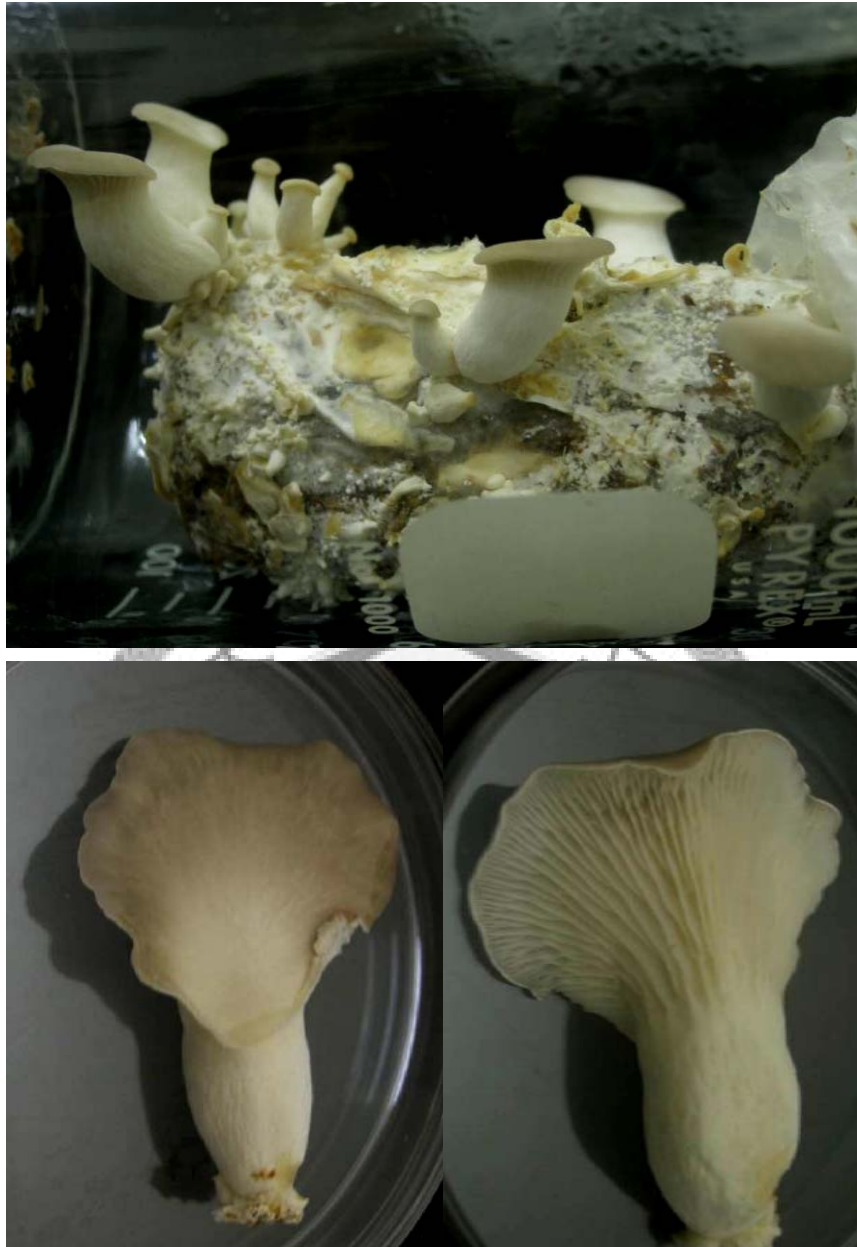
pAiH-FiEGFP 全長約 10.5 kb，以 pCAMBIA0390 作為骨架，其 T-DNA 之 MCS 近 LB 端為洋菇 *GPD* 啟動子帶有第一個內含子啟動 *hph* 抗藥性基因，近 RB 端則為金針菇 *GPD* 啟動子帶有第一個內含子啟動之 EGFP 報導基因。

上述質體之基因圖譜如圖九所示

## 3. 引子

本研究中所使之引子為委託生技公司合成 (禾鑫生技, 台北), 序列整理於表六；使用之菌株整理如表七。

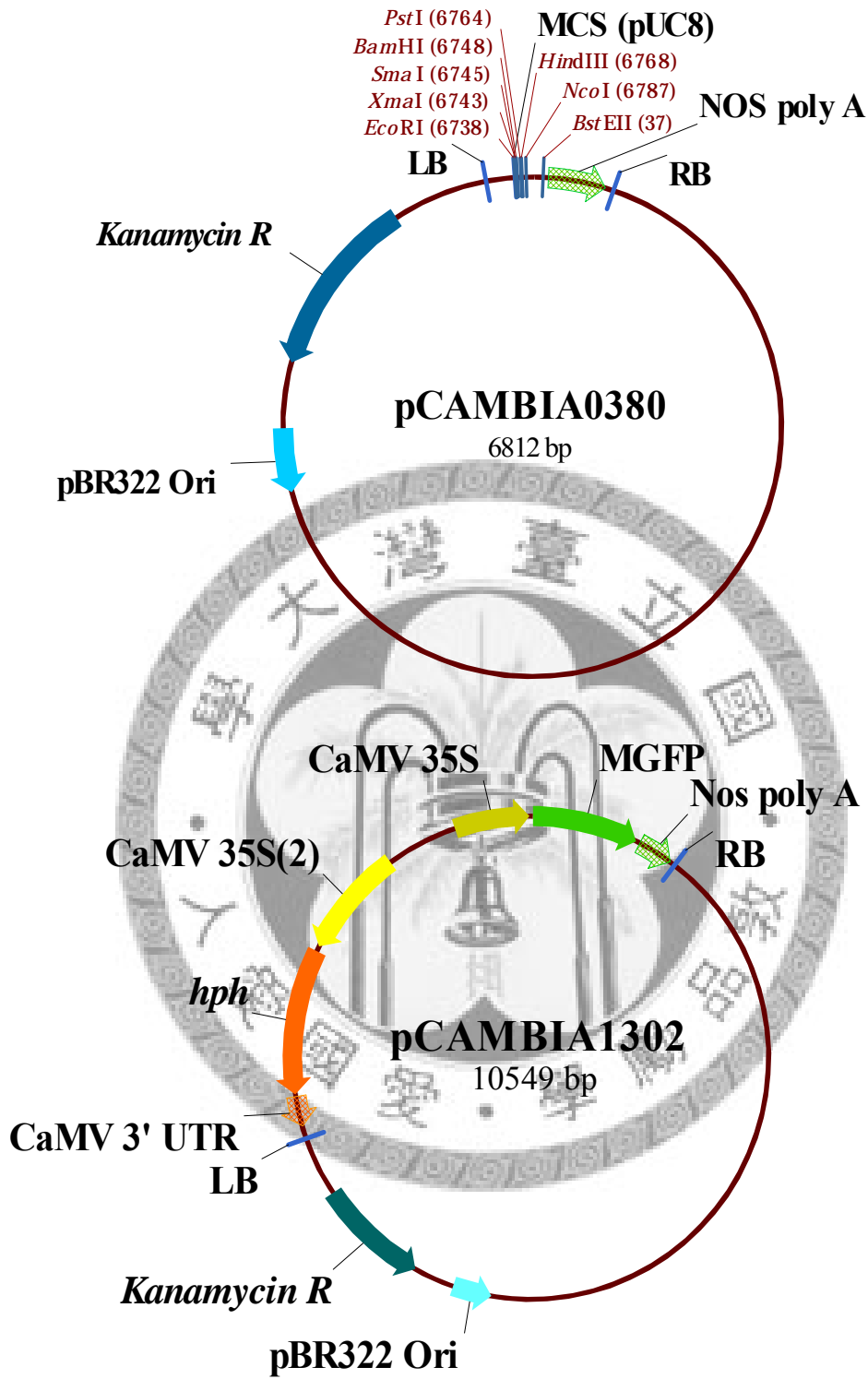




圖八 實驗室無菌栽培之鮑魚菇子實體。

上圖：玻璃燒杯內子實體生長情形；下圖：子實體傘面(左)與萼褶面(右)

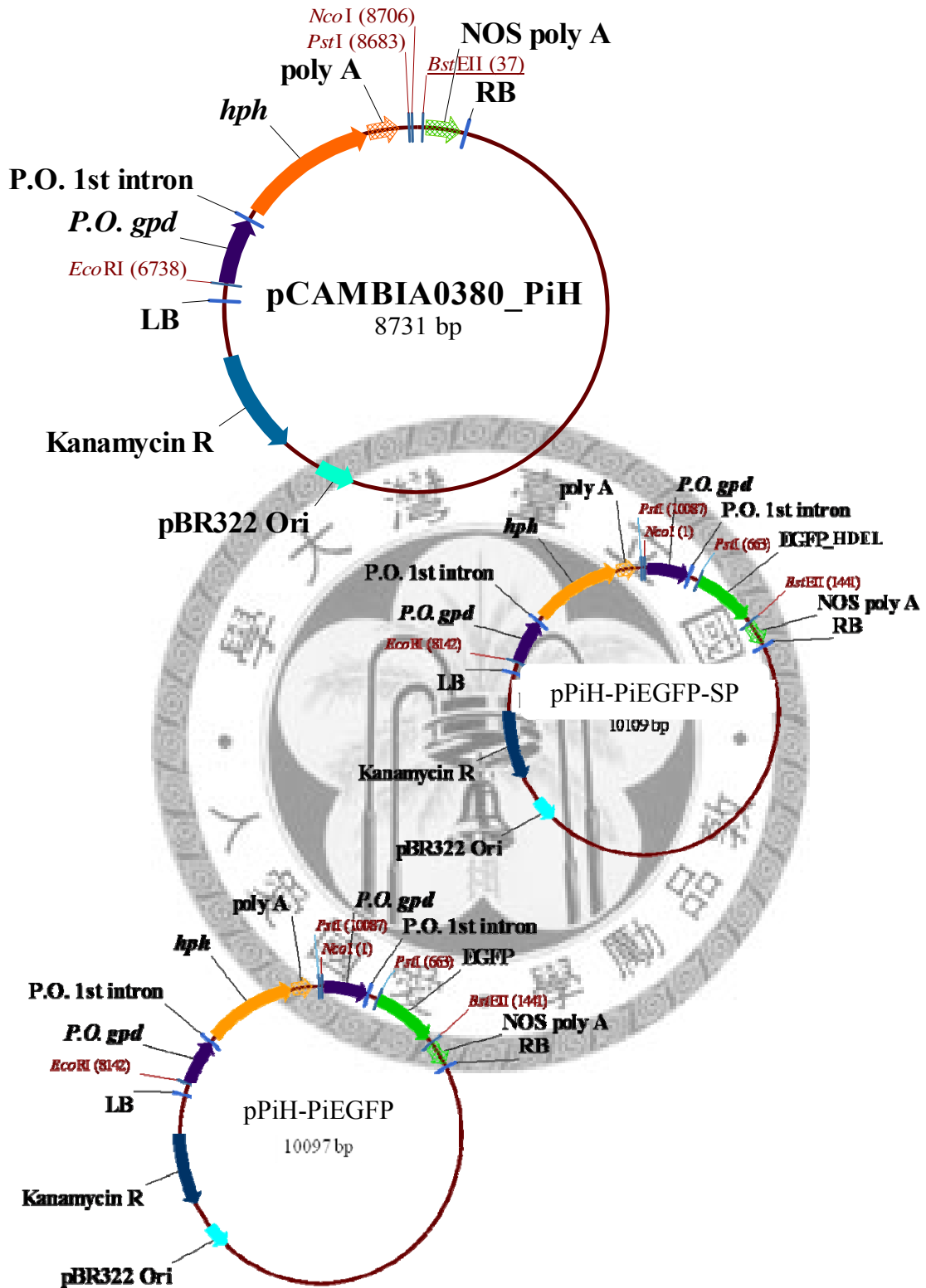
Figure 8. Sterile fruiting bodies of *P. ostreatus* cultivated in laboratory.



圖九 質體 pCAMBIA0380 與 pCAMBIA 1302 之限制酶切位與特定基因圖譜

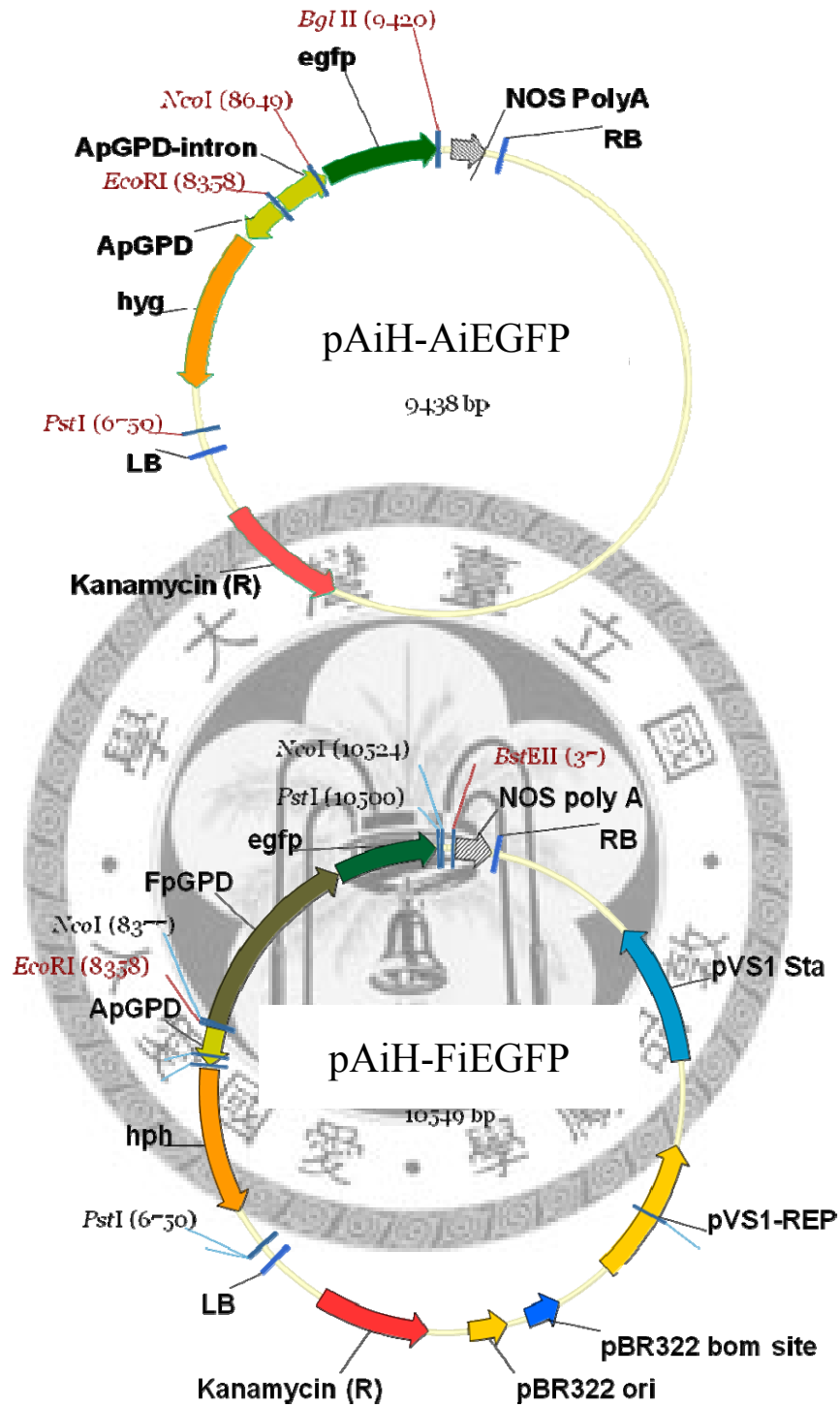
Figure 9. Restriction sites and specific gene map of plasmid pCAMBIA0380 and pCAMBIA 1302.





圖九(續) 質體 pCAMBIA0380-PiH 與 pPiH-PiEGFP/SP 之限制酶切位與特定基因圖譜

Figure 9.(Continued) Restriction sites and specific gene map of plasmid pCAMBIA0380-PiH and pPiH-PiEGFP (w/o signal peptide).



圖九(續) 質體 pCAMBIA0390-AH-AiEGFP 與 pCAMBIA0390-AH-FiEGFP 之限制酶與基因圖譜。本圖源自徐, 2008。

Figure 8. (Continued) Restriction sites and specific gene map of plasmid pCAMBIA0390-AiH-AiEGFP and pCAMBIA0390-AiH-FiEGFP. Originated from Hsu, 2008)

表六 本研究使用之核酸引子序列

Table 6. Primers used in this study

Primer	Sequence (5' → 3') <sup>a</sup>	Source
<b>PO GPD i-F</b>	CCAGTTAGTGGAAATCAATGGCAGCCGT	This lab
<b>PO GPD i-R</b>	CCAAAGGTTGGGACGTTGACCTGAATACG	This lab
<b>Hph-f</b>	<u>ACTAGT</u> ATGAAAAAGCCTGAACTCACC	This lab
<b>Hph-r</b>	<u>CTGCAG</u> ACAACCTTAATAACACATTGCG	This lab
<b>L</b>	GGCCATTACGGCCGGCTGGTGGCAGGATATATTGTGGTG	This lab
<b>R</b>	GGCCGAGGCGGCCAACGCTCTTTCTCTTAGGTTTACCC	This lab
<b>EGFP-F</b>	AGGTCAA <u>GGATCC</u> ATGGTGAGCAAGG	This lab
<b>EGFP-R</b>	<u>GGTCACC</u> TACTTGTACAGCTCGTCCAT	This lab

<sup>a</sup> 引子內之限制酶切位以底線粗體標示，*SpeI*：ACTAGT；*Pst I*：CTGCAG；*BamHI*：GGATCC；*BstE II*：GGTCACC

表七 本研究所使用之菌株

Table 7. Strains used in this study

Strain	Characteristics	Source
<i>P. ostreatus</i>	Dikaryon	This lab
<i>P. ostreatus</i> (A1B2)	Monokaryon	This lab
<i>P. ostreatus</i> (A2B1)	Monokaryon	This lab
<i>E. coli</i> Top10	For molecular manipulation	Invitrogen (Carlsbad, CA)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	For plasmid conservation	Invitrogen (Carlsbad, CA)
<i>A.tumefaciens</i> AGL-1	Disarmed strain, <i>A.tumefaciens</i> C58 as chromosome background with rifampicin and carbenicillin resistance. Harboring Ti plasmid pTiBo542 $\Delta$ T-DNA without marker gene.	
<i>A.tumefaciens</i> LBA4404	Disarmed strain, <i>A.tumefaciens</i> Ach5 as chromosome background with rifampicin resistance. Harboring pAL4404 with spectinomycin and streptomycin resistance.	

## 二、實驗方法

### 1. 重組質體建構

#### 1.1 鮑魚菇啟動子序列確認

將實驗室保存之 TA-PiH 質體上鮑魚菇 *GPD* 啟動子及第一個內含子序列進行核  
酸定序 (源資, 台北), 序列如圖十四。

#### 1.2 質體抽取與限制酶截切

將帶有目標質體之大腸桿菌皆種於 3 ml LB 培養(TA 為骨架者添加  
ampicilin 最終濃度為 100 µg/ml, pCAMBIA 為骨架者則添加 kanamycin 最終濃度  
為 50µg/ml), 37°C 下 250 rpm 震盪培養 14~16 小時, 離心收取菌體後, 以 Plasmid  
Extraction Kit (Viogene, 台北) 抽取細菌質體。

抽出之質體 TA-PiH、pCAMBIA0380 分別以酵素 *Pst* I 與 *EcoR* I 截切,  
TA-PiEGFP、TA-PiEGFP-SP、pCAMBIA0380-PiH 分別以 *BstE* II 與 *Nco* I 截切, 反  
應組成與條件見表八。

表八 限制酶反應之酵素比例與反應條件

Table 8. The restriction enzyme ratio and reaction condition

Restriction enzymes	Percentage (v/v)	Reaction time (hour) <sup>b</sup>
<i>EcoR</i> I	2	1
<i>Pst</i> I	2	1.5
<i>BstE</i> II	2	1
<i>Nco</i> I <sup>a</sup>	2	0.6

<sup>a</sup> Digest first when pairing with *BstE* II. <sup>b</sup> Temperature used refer to *New England Biolabs* products information. All in buffer 3 system. The DNA volume is 25 ~ 30µl and total volume is 50µl.

### 1.3 洋菜膠體電泳與 DNA 回收

將抽取之質體或截切後之產物與 6x 追蹤染體(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, 50% glycerol)混合後，以 1%洋菜膠體進行電泳，於 0.5x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH8.0)以電壓 140 伏特進行電泳 20 分鐘。經 ethidium bromide 染色 10~15 分鐘後，在 UV box 上照相、觀察結果，以 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia,CA)純化目標片段。

### 1.4 質體接合與轉形

將洋菜膠體純化出的目標片段再經洋菜膠體電泳後，確認其產量與大小，估算莫耳數比 vector : insert = 3 : 1 或 4 : 1，各加入所需體積與 1 $\mu$ l T4 接合酶、10x 緩衝液 A、10 x 緩衝液 B (益生，台北)，加入無菌水至最終體積為 10~20  $\mu$ l。於 4 $^{\circ}$ C 反應隔夜後轉形至大腸桿菌 Top 10 或 DH5 $\alpha$  菌株，於含有 50  $\mu$ g/ml kanamycin 之 LB plate 培養 16~18 小時。各質體建構流程如圖十所示。

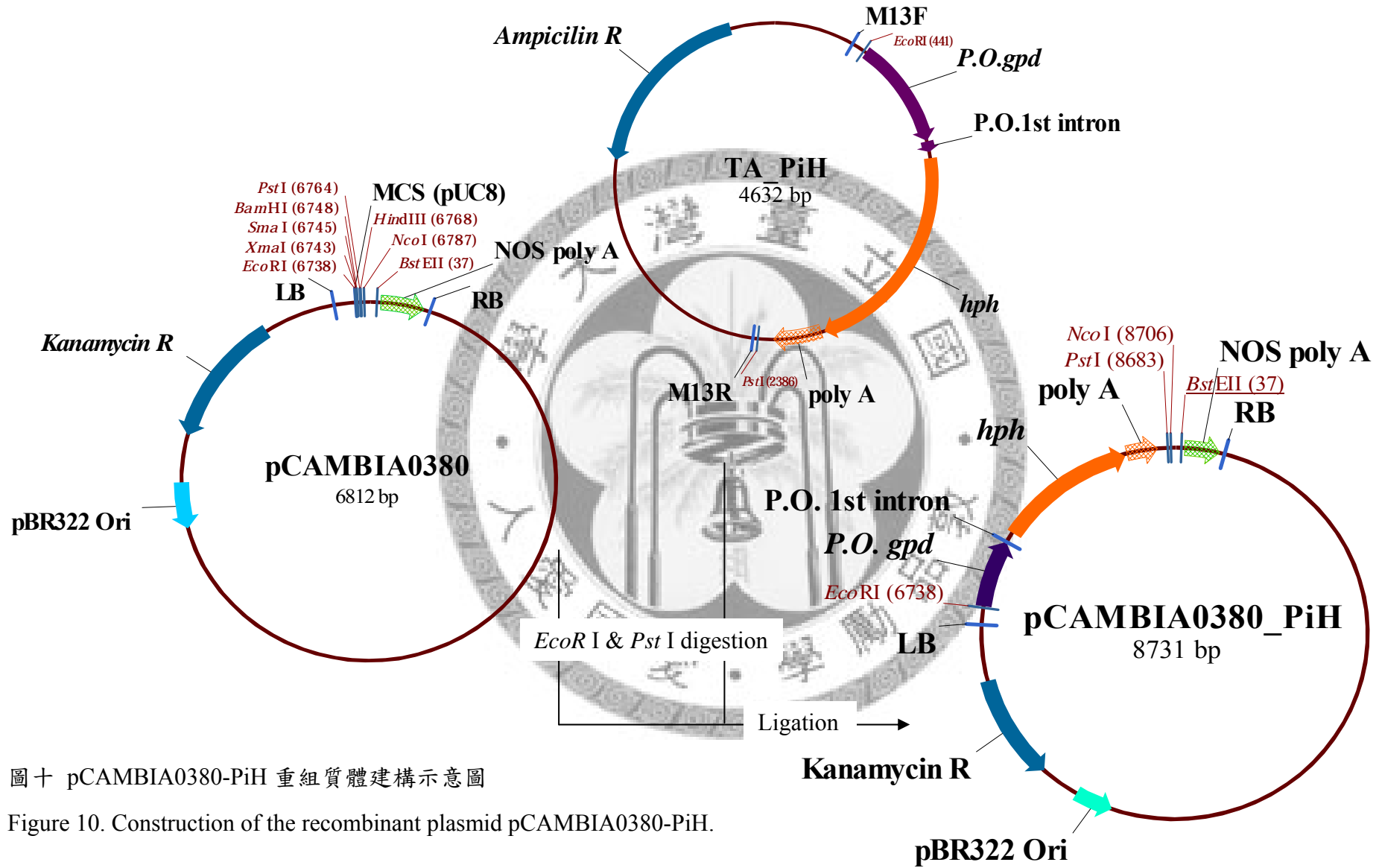
### 1.5 大腸桿菌轉形株篩選

以牙籤挑取生長於 Kanamycin 選擇性培養基上的菌落，加入專一性引子與試劑進行菌落聚合酶連鎖反應(Colony PCR)，PCR 反應條件見表九。反應完成後以洋菜膠體電泳分析，確認目標產物大小無誤後，抽取質體進行限制酶截切確認並將正確質體進行核酸定序 (源資，台北)。

表九 聚合酶連鎖反應之條件

Table 9. Polymerase chain reaction condition used.

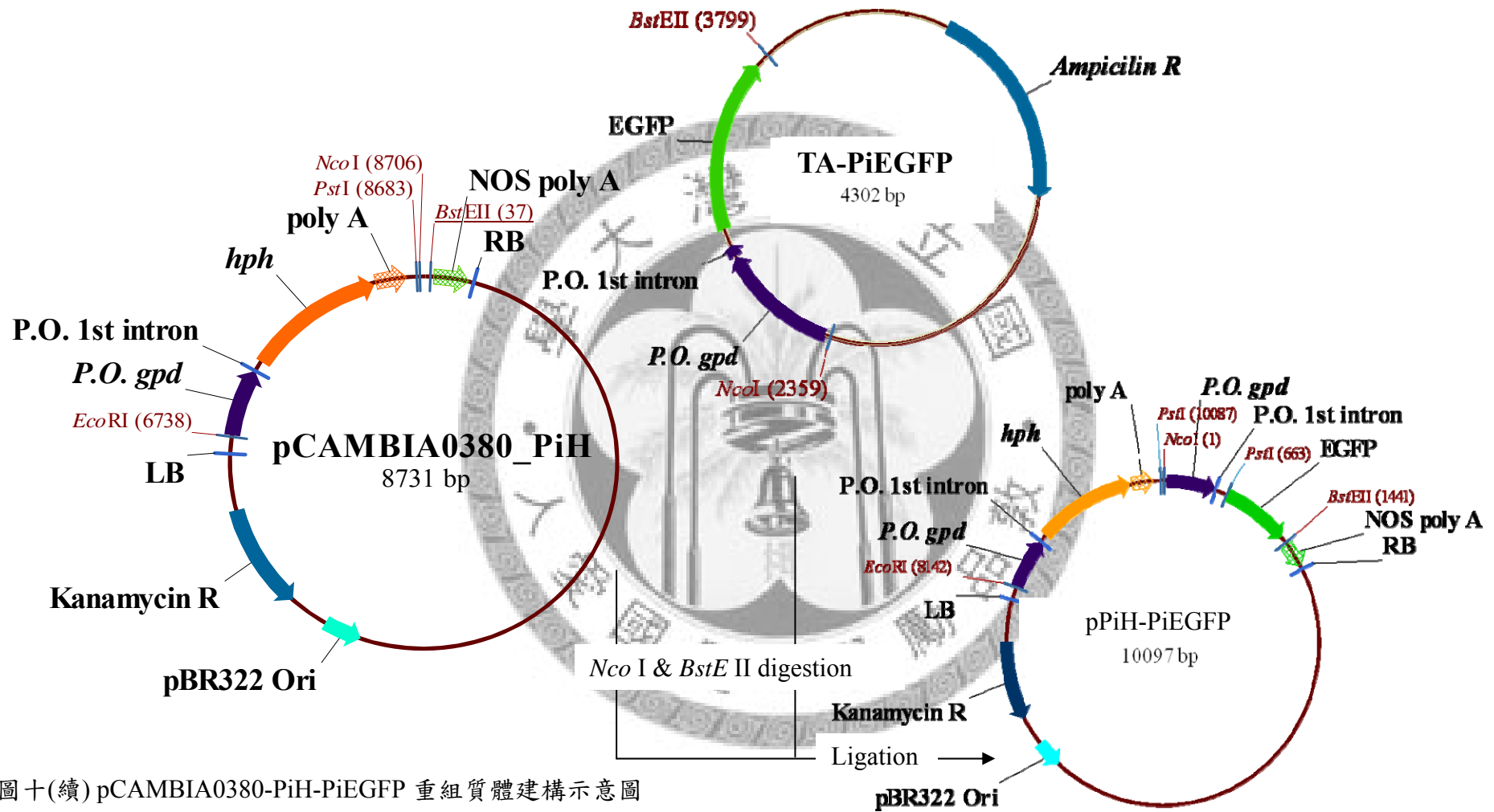
Target gene	Primers	Reaction condition	Cycle
<i>P. o</i> GPD promoter -intron	POGPD i-F / POGPD	94°C 2 min	1
	i-R	94 °C 40sec→55 °C 40sec→ 72 °C 1min	30
		72 °C 10min	1
<i>hph</i>	Hph-f / Hph-r	94°C 2 min	1
		94 °C 40sec→56 °C 40sec→ 72 °C 2min	30
		72 °C 10min	1
T-DNA	L / R	94°C 2 min	1
		94 °C 40sec→56 °C 40sec→ 72 °C 3min	30
		72 °C 10min	1
EGFP	EGFP-F / EGFP-R	94°C 2 min	1
		94 °C 40sec→56 °C 40sec→ 72 °C 1min	30
		72 °C 10min	1



圖十 pCAMBIA0380-PiH 重組質體建構示意圖

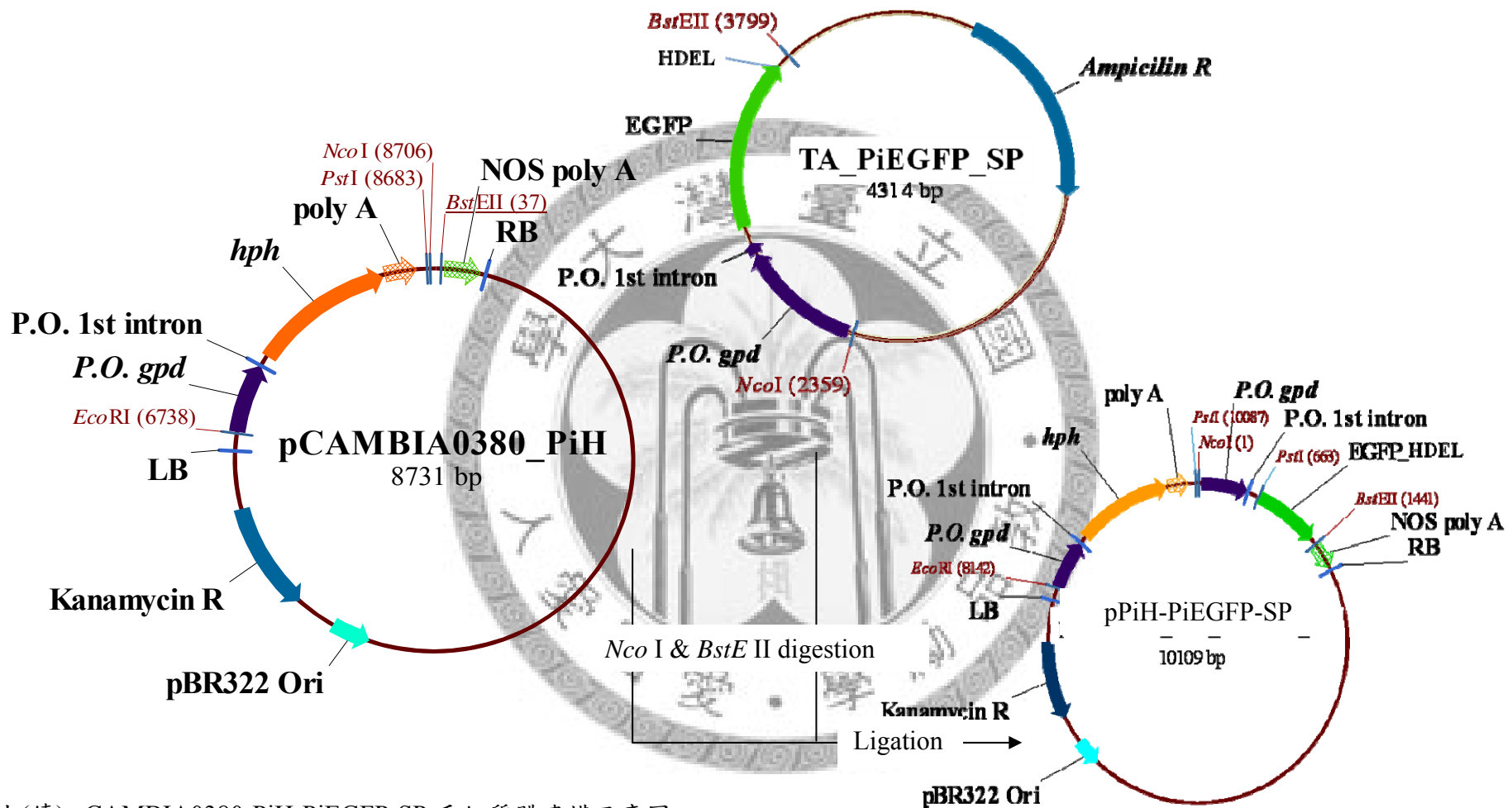
Figure 10. Construction of the recombinant plasmid pCAMBIA0380-PiH.





圖十(續) pCAMBIA0380-PiH-PiEGFP 重組質體建構示意圖

Figure 10. (Continued) Construction of the recombinant plasmid pCAMBIA0380-PiH-PiEGFP



圖十(續) pCAMBIA0380-PiH-PiEGFP-SP 重組質體建構示意圖

Figure 10. (Continued) Construction of the recombinant plasmid pCAMBIA0380-PiH-PiEGFP-SP

## 2. 農桿菌轉形

### 2.1 農桿菌勝任細胞製備

以接種環於 LA 平板培養基挑取農桿菌單一菌落，接種於 3 ml LB 中，30°C 下以 250 rpm 震盪培養 48 小時後，該農桿菌菌液取 1 ml 至 100 ml LB 中，同前述培養條件培養隔夜，至 O.D.<sub>600</sub> 吸光值為 1.5~2.0 時，於 4°C 下以 3000 g 離心 10 分鐘，去除上清液後，菌體以 100 ml 4°C 的無菌水懸浮，再於前述離心條件沉降菌體，重覆以 4°C 的無菌水懸浮、離心沉降菌體，共六次。最後加入 400 µl 4°C 無菌之 10% glycerol 懸浮菌體後，分裝至微量離心管(40µl/管)，於-80°C 下保存備用。

### 2.2 電穿孔

將 2 µl 質體加入 40 µl 農桿菌勝任細胞，於冰上靜置 2 分鐘後，取至 1 mm gap cuvette (BTX Disposable Cuvette P/N 610)，以 BTX Electro Cell Manipulator 進行電穿孔，設定條件為：電容 25 µF、電阻 200 ohms、電壓 1.25 kV，預期電場強度 12.5 kV/cm、預期電脈衝時間為 5.0 msec。操作後於無菌操作下加入 400 µl LB，再全部取至微量離心管中，在室溫下靜置 2.5 小時後，取 50 µl 塗布在含有 50 µg/ml Kanamycin 的 LA 上，於 30°C 下培養 48 小時。

### 2.3 農桿菌轉形株篩選

以滅菌之牙籤挑取單一農桿菌菌落於 PCR tube 中，加入已混合專一性引子 (Hph-f/ Hph-r 或 L/ R 或 EGFP-F / EGFP-R)之 PCR 藥劑，經 PCR 反應後，以洋菜膠進行 PCR 產物電泳，確認目標片段大小是否符合預期，PCR 反應條件見表九。

### 3. 農桿菌媒介之鮑魚菇轉形

#### 3.1 鮑魚菇轉形材料製備

##### 3.1.1 菌絲塊 (Modified Mycelia Pellet, MMP)

接種鮑魚菇菌絲於 PDA 上，待兩到三個禮拜菌絲長滿培養基後，以打孔器將菌絲生長邊緣打成數個圓形塊，為 MMP。

##### 3.1.2 菌絲液 (Blended mycelia)

將鮑魚菇菌絲接種至 10 ml PDB 中，待菌絲生長兩到三個禮拜，以均質機將菌絲打碎後，續培養兩天，於使用前再以均質機高速打碎 2 分鐘(間隔 10 秒)，取 1.5 ml 打碎的菌絲液於微量離心管中，在 25°C 下以 5000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，為直接使用之營養菌絲。

##### 3.1.3 蕈摺組織 (Gill tissue)

無菌培養之鮑魚菇菇體，以酒精燈燒紅滅菌之剪刀將其蕈傘剪成約 0.64 cm<sup>2</sup> 大小，作為轉形材料。

#### 3.2 農桿菌培養與前處理

將已轉入重組質體之農桿菌-80 °C 冷凍菌液於含 50µg/ml Kanamycin 之 LA 四區劃線，接種單一農桿菌菌落於 3ml LB，30°C 下以 250 rpm 震盪培養 48 小時後，取 0.5 ml 至 50 ml LB 中，同前述培養條件培養隔夜，以 4°C、3000 g 離心 10 分鐘沉降菌體後，倒去上清液，加入 50 ml 含有 200 µM 或 500 µM 誘導物 (Acetosyringone, AS)的誘導培養基(Induction medium, IM；配方如表十所示) 懸浮菌體。

#### 3.3 農桿菌與真菌共培養

##### 3.3.1 菌絲塊(Modified Mycelia Pellet, MMP)

將菌絲塊直接放入以 IM 懸浮的農桿菌菌液，靜置 3 小時後，取出放置在覆

蓋玻璃紙之 IM plate(含有 200  $\mu$ M 或 500  $\mu$ M AS)上，於 25 $^{\circ}$ C 下共培養 3~5 天。

### 3.3.2 菌絲液(Blended mycelia)

將菌絲片段加入 1 ml IM 懸浮的農桿菌菌液，25 $^{\circ}$ C 下靜置半小時後，取 1 ml 混合液於均勻散布在覆蓋玻璃紙之 IM plate (含有 200  $\mu$ M 或 500  $\mu$ M AS) 上，於 25 $^{\circ}$ C 下共培養 3~5 天。

### 3.3.3 萼摺組織 (Gill tissue)

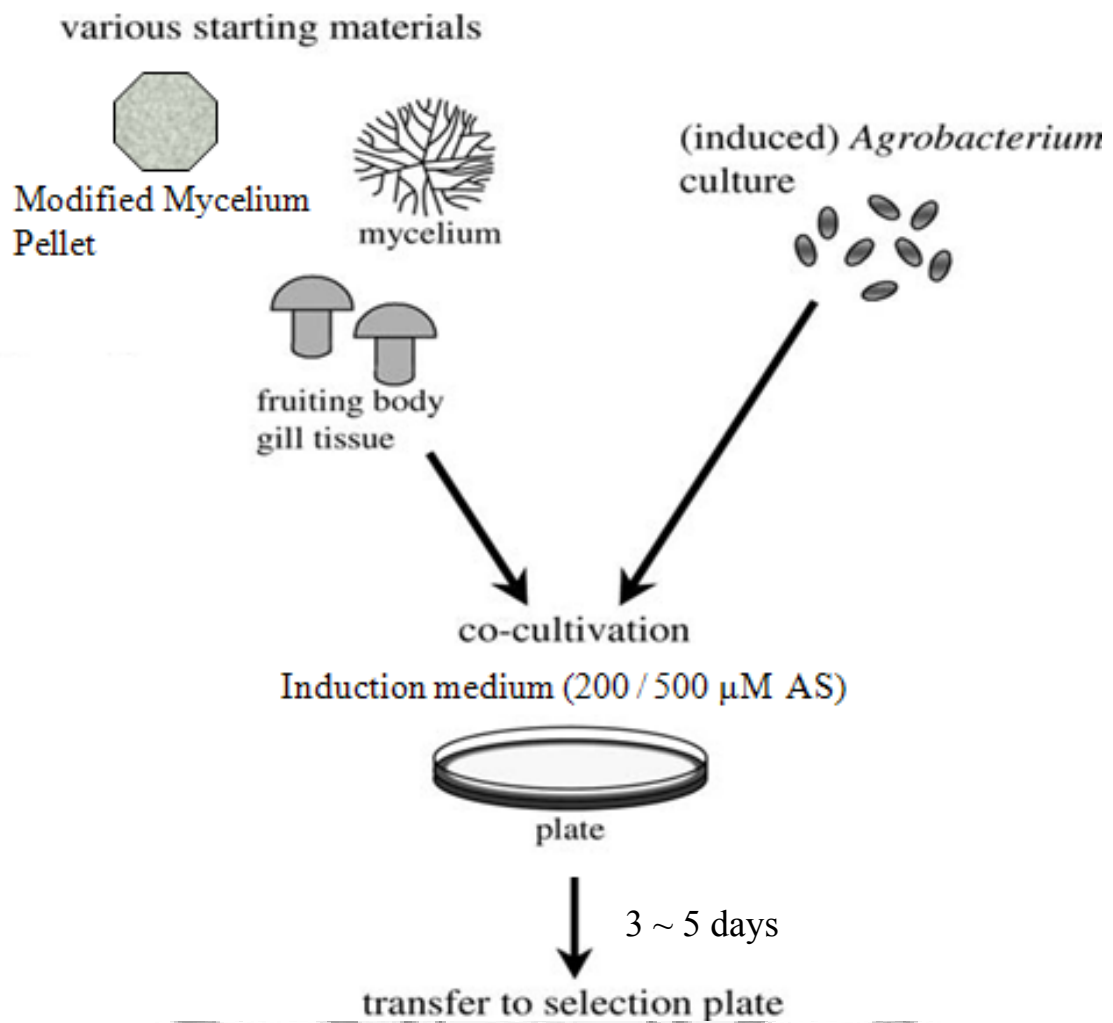
將 0.25 cm<sup>2</sup> 萼摺組織直接放入以 IM 懸浮的農桿菌菌液，靜置 3 小時，取出放置在覆蓋玻璃紙之 IM plate (含有 200  $\mu$ M 或 500  $\mu$ M AS) 上，於 25 $^{\circ}$ C 下共培養 3~5 天。

上述之宿主轉形材料與農桿菌共培養操作示意圖見圖十一。

表十 共培養使用之誘導培養基 (induction medium, IM)組成成分。

Table 10. Constituents of induction medium. Note : IM plate contain 0.9 g/L glucose.

Constituent	g / L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.45
NaCl	0.15
MgSO	0.5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.067
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0025
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
MES (pH 5.3)	8.53
Glucose*	1.8
Glycerol	5
Acetosyringone	200 or 500 $\mu$ M



圖十一 宿主轉形材料與農桿菌共培養操作示意圖

Figure 11. Schematic operation of host materials co-cultivate with *A. tumefaciens*.

Figure adapted from Michielse et al., 2005 (61).

## 4. 鮑魚菇轉形株篩選與分析

### 4.1 選擇性培養基篩選

將共培養完畢之鮑魚菇轉形材料以無菌水沖洗數次，滅菌過的擦手紙拭乾後，移至含有 30  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin 之選擇性培養基培養(添加 200  $\mu\text{M}$  cefotaxime 抑制農桿菌生長)，待可能之轉形株菌絲長出後，再次接種於新鮮的選擇性培養基 (含 30 $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin 與 200  $\mu\text{M}$  cefotaxime)，重複接種至新鮮選擇性培養基一次，以確認菌絲是否的確具有潮黴素抗性。

### 4.2 螢光顯微鏡觀察

以滅菌過之牙籤挑取在選擇性培養基上生長於邊緣之菌絲或利用微量吸管以滅菌過之 tip 吸取液態培養基中之菌絲至玻片上，蓋上蓋玻片除去氣泡後，以鉛筆末端橡皮擦將菌絲輕輕敲散，並在玻片周圍塗上指甲油封片。利用螢光顯微鏡 Eclipse E600 (Nikon, Kanagawa, Japan) 觀察菌絲表現 EGFP 情形。  
(Excitation wavelength : 450 ~ 490 nm , Emission wavelength : 520 nm)

### 4.3 蛋白質分析

#### 4.3.1 轉形株總可溶蛋白質粗萃取

接種生長於選擇性培養基邊緣之菌絲於 10 ml PDB，待 2 ~ 3 個禮拜後收取菌絲體，先於 -80°C 預冷一小時後，置入 Speed Vac 抽乾至隔日，將乾燥之菌絲體佐以液態氮磨碎均質後，秤取乾重，每 1 mg 菌粉加入 20  $\mu\text{l}$  蛋白質萃取緩衝液(50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 1mM PMSF, 0.1% Triton X-100, pH 7.4) 混勻後放置冰上 1 小時，於 4°C 以 13000g 條件離心半小時後，直接使用於 BCA 定量、ELISA 分析，或經濃縮後做為西方式雜合分析之用，另分裝凍於 -20°C 備用。

### 4.3.2 蛋白質定量

#### 4.3.2.1 總可溶蛋白質 BCA 定量

以 BSA (Sigma, Germany) 配製 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0 mg/ml 之濃度做為標準曲線，將欲測樣品稀釋適當倍數(10 或 20 倍)後，各取 10  $\mu$ l 二重複加入 96 孔微量滴定盤，再加入 200  $\mu$ l BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) 使用前均勻混合之 BCA working reagent (reagent A : B = 50 : 1)，避光放置於 37°C 反應半小時後，偵測 562 nm 吸光值。將所得 O.D.<sub>562</sub> 代入 BSA 標準曲線算得蛋白質量，再回乘稀釋倍數為轉形株總可溶蛋白質粗抽液內蛋白質含量(Total soluble protein, TSP, 單位為 mg/ml)。

#### 4.3.2.2 三明治法酵素連結免疫吸附分析 (sandwich ELISA)

配製 coating buffer (0.1 M carbonate / bicarbonate, pH 9.6)，將 mouse anti-GFP 單株抗體 (ab1218, Abcam, Cambridge, UK) 以 coating buffer 稀釋 4000 倍，取 100  $\mu$ l 加入 ELISA 專用 96 孔微量滴定盤 (Nunc, Denmark) 放置於 4°C 靜置 17 小時，以 200  $\mu$ l PBST (0.05% Tween-20, 0.13% NaCl, 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 清洗四次後，新鮮使用。

實驗室保存大腸桿菌表現純化之 EGFP (pET21a 為載體，EGFP 帶有 T7 tag 與 His tag) 經 BCA 定量之粉末回溶，稀釋配製 0 ~ 600 pg/ml 之濃度做為標準曲線，與轉形株蛋白質粗抽液各取 100  $\mu$ l 加入 96 孔微量滴定盤中，4°C 靜置一小時。以 200  $\mu$ l PBST 清洗四次後，加入 100  $\mu$ l blocking buffer (0.25% gelatin in PBST)，室溫靜置兩小時。200  $\mu$ l PBST 清洗四次後，加入 100  $\mu$ l blocking buffer 稀釋適當倍數之 rabbit anti-GFP 多株抗體(ab6556, Abcam, Cambridge, UK) 4°C 靜置一小時後，同樣以 200  $\mu$ l PBST 清洗四次後，加入 100  $\mu$ l 以 blocking buffer 稀釋適當倍數之 goat anti rabbit HRP conjugate (PerkinElmer) 於 4°C 靜置一小時，200  $\mu$ l PBST 清洗四次後加入 100  $\mu$ l 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine 基質溶液(TMB One Component HRP Microwell Substrate, BioFX, MD, USA) 靜置 5 分鐘後，偵測 O.D.<sub>650</sub> 吸光值，每 5 分鐘偵測一次至半小時，選取標準曲線 R<sup>2</sup> 值較高者之時段測得的吸光值，推算轉形株蛋白質原始粗抽液內可溶性 EGFP 含量(單位為 pg/ml)。



轉形株總可溶蛋白質中所測得 EGFP 含量之比例即為各轉形株以同樣萃取方式抽出之 EGFP 含量比較依據，表示為 EGFP / TSP (ng/g)。

#### 4.3.3 西方雜合分析

取轉形株蛋白質粗萃液 500 $\mu$ l 以離心過濾裝置 Microcon YM-10 (Millipore Corporation Bedford, U.S.A)於 4°C，6000 g 進行濃縮至體積約 50 $\mu$ l，取 15  $\mu$ l 與 5  $\mu$ l 5x SDS 樣品緩衝液混合均勻，100°C 加熱 10 分鐘後，放置冰上冷卻 3 分鐘，離心半分鐘後備用。

配製 12% SDS 聚丙醯胺膠體，架設於電泳槽，於內外槽倒入 SDS 電泳緩衝液(0.01% SDS, 2.5 mM EDTA, 80 mM Boric acid, 90 mM Tris, pH 8.4)後，以微量吸管置入樣品，先以 80 伏特電壓使之焦集 30 ~ 40 分鐘，待樣品到達分離膠體時再提高電壓至 140 伏特，約一小時後即可取出膠片浸泡於轉印緩衝液中(1x 電泳緩衝液含 15 % 甲醇)。先將 PVDF (0.45  $\mu$ m) 浸泡於 100% 甲醇中，以半乾式電泳轉漬槽 (Genmedika Biotechnology, 台北)，依序放置轉印緩衝液浸濕之濾紙兩片、電泳膠片、PVDF 膜、轉印緩衝液浸濕之濾紙兩片，單片轉漬條件為 75 mA，15 分鐘。

轉漬後之 PVDF 膜以 TSW buffer (0.25% Gelatin, 0.1% Triton X-100, 0.02% SDS, 0.9 % NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4) 震盪浸洗 1.5 小時(80 rpm)，再置換為 TSW 稀釋 6000 倍之 mouse anti-GFP 一次抗體(Living colors A.v. Monoclonal [JL-8], Clontech, Mountain View, CA, USA)室溫震盪反應 14 小時，以 TSW 稍微搖晃清洗一次後，震盪浸洗三次，每次十分鐘。加入以 TSW buffer 稀釋 5000 倍之 goat anti-mouse IgG AP conjugate 二次抗體(PerkinElmer, Boston, MA, USA)室溫震盪反應 1 小時，再以 TSW 稍微搖晃清洗一次後，震盪浸洗三次，每次十分鐘，以 AP buffer 平衡 15 分鐘，加上基質 NBT/BCIP 避光靜置反應 15 ~ 20 分鐘，待色帶出現以一次水漂洗終止反應。

## 第三章 結果

### 一、質體建構

#### 1. 重組質體確認

##### 1.1 pCAMBIA0380-PiH

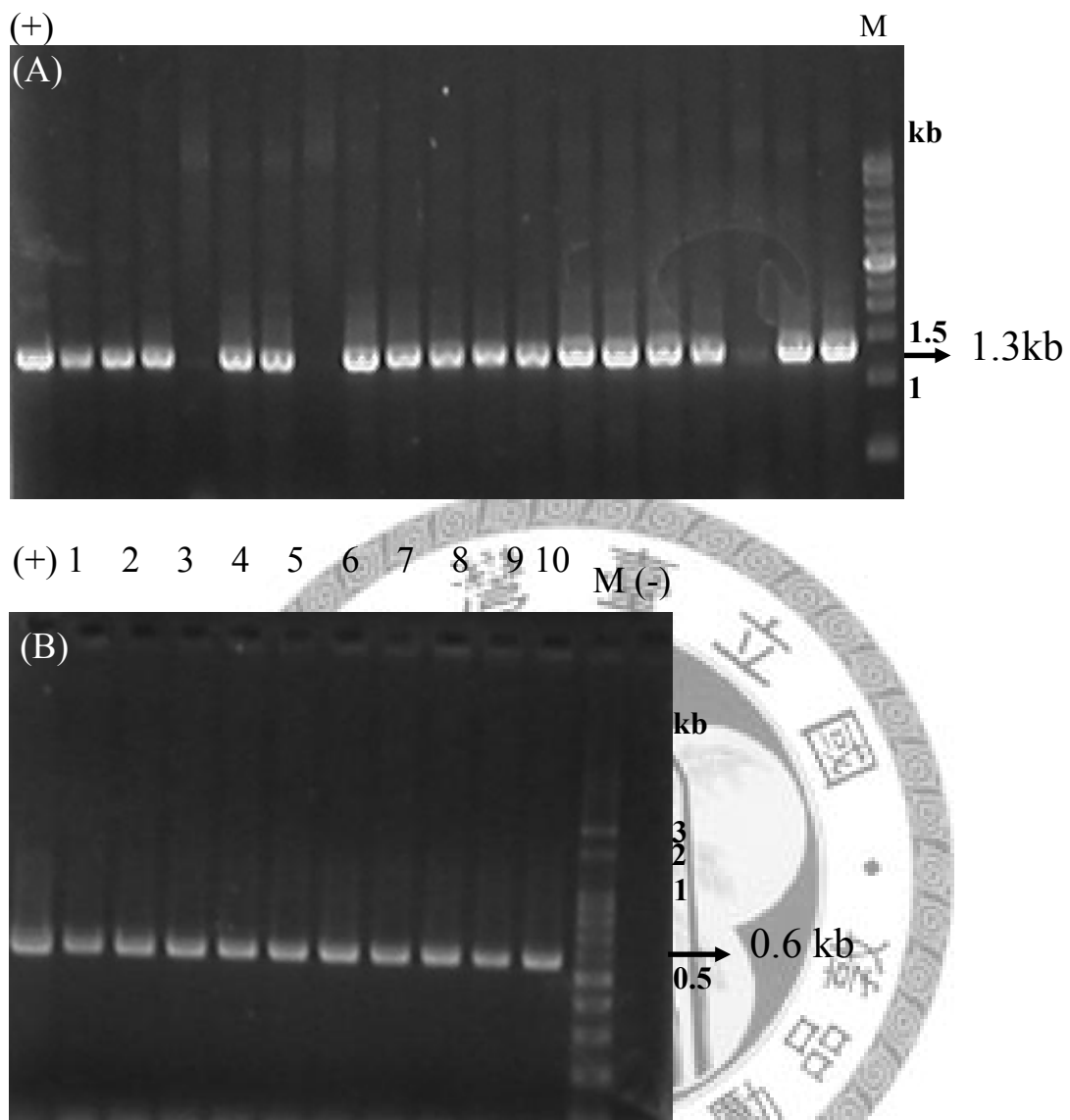
將接合反應後的質體轉入大腸桿菌後，以 Hph-f & Hph-r 進行 colony PCR，順利接合並且轉形成功者可於洋菜膠體電泳後，看到約 1.3 kb 的片段，如圖十二(A)。以 PO *GPD* i-F & PO *GPD* i-R 可放出約 0.6kb 大小的片段，圖十二(B)。以限制酶 *Eco* RI 與 *Pst* I 截切後可得到預期片段：6.8 kb 與 1.9 kb，如圖十三(A)；另以限制酶 *Bgl* II 截切後亦可得到預期片段：7.2 kb 與 1.6 kb，圖十三(B)。將質體抽出後送定序，鮑魚菇 *GPD* 序列及 hygromycin phosphotransferase 序列如圖十四。

##### 1.2 pPiH-PiEGFP

將接合反應後的質體轉入大腸桿菌後，以 EGFP-F & EGFP-R 進行 colony PCR，順利接合並且轉形成功者可於洋菜膠體電泳後，看到約 0.7 kb 的片段，如圖十五(A)。將質體抽出以限制酶 *Nco* I 與 *BstE* II 截切，經洋菜膠體電泳確認，如圖十六。將質體定序後，EGFP 序列如圖十七。

##### 1.3 pPiH-PiEGFP-SP

將接合反應後的質體轉入大腸桿菌後，以 EGFP-F & EGFP-R 進行 colony PCR，順利接合並且轉形成功者可於洋菜膠體電泳後，看到約 0.7 kb 的片段，如圖十五(B)。將質體抽出以限制酶 *Nco* I 與 *BstE* II 截切，經洋菜膠體電泳確認，如圖十六。將質體定序後，EGFP-SP 序列如圖十七。



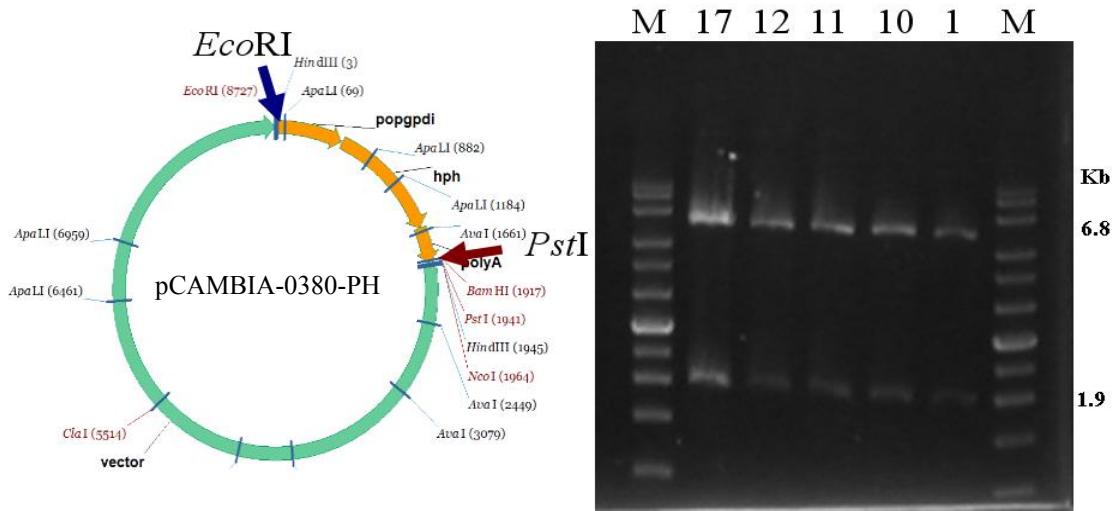
圖十二 pCAMBIA0380-PiH Colony PCR 後洋菜膠體電泳結果

Figure 12. Agarose gel electrophoresis of pCAMBIA0380-PiH colony PCR products

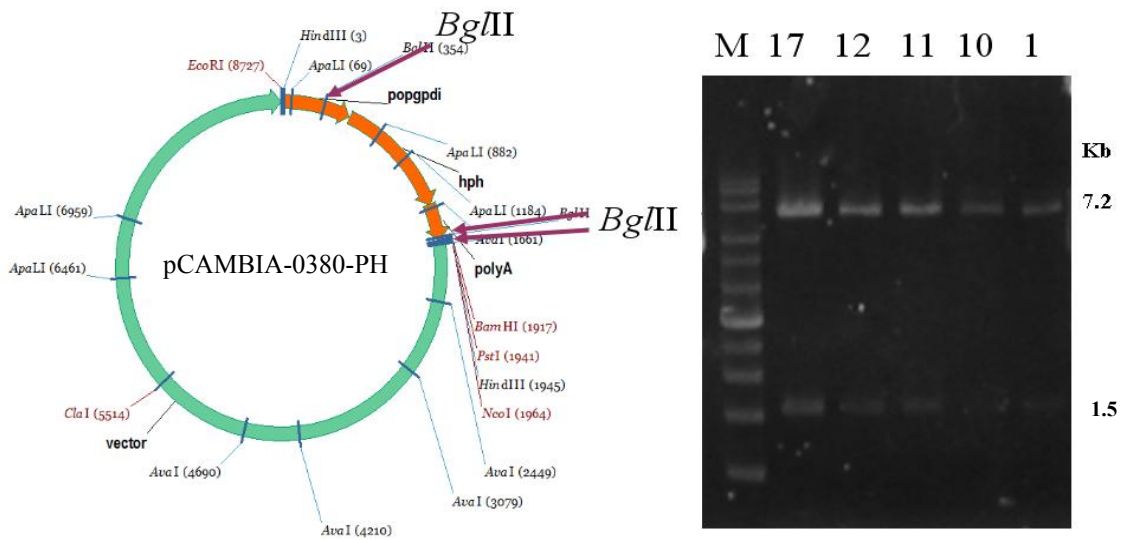
(A) 以 Hyg-F & Hyg-R 進行 colony PCR 之產物

(B) 以 PO GPD i-F & PO GPD i-R 進行 colony PCR 之產物

(A)



(B)



圖十三 pCAMBIA0380-PiH 限制酶截切確認圖

圖左為 pCAMBIA0380-PiH 限制酶截切示意圖；圖右為限制酶截切後以洋菜膠體電泳確認 DNA 片段大小

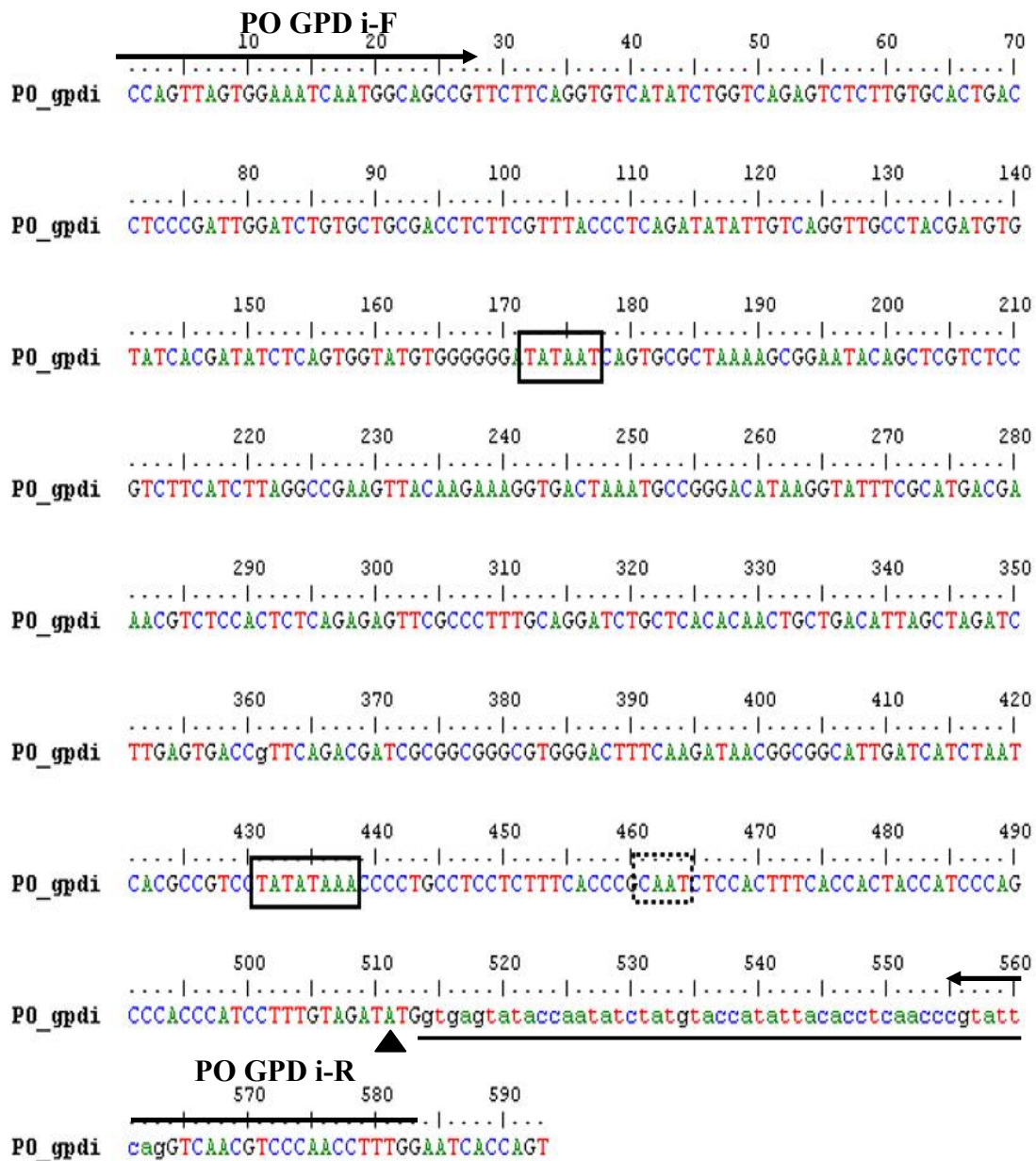
Figure 13. Left : Restriction sites of pCAMBIA0380-PiH map

Right : Agarose gel electrophoresis of enzyme digested

pCAMBIA0380-PiH fragments to confirm DNA size

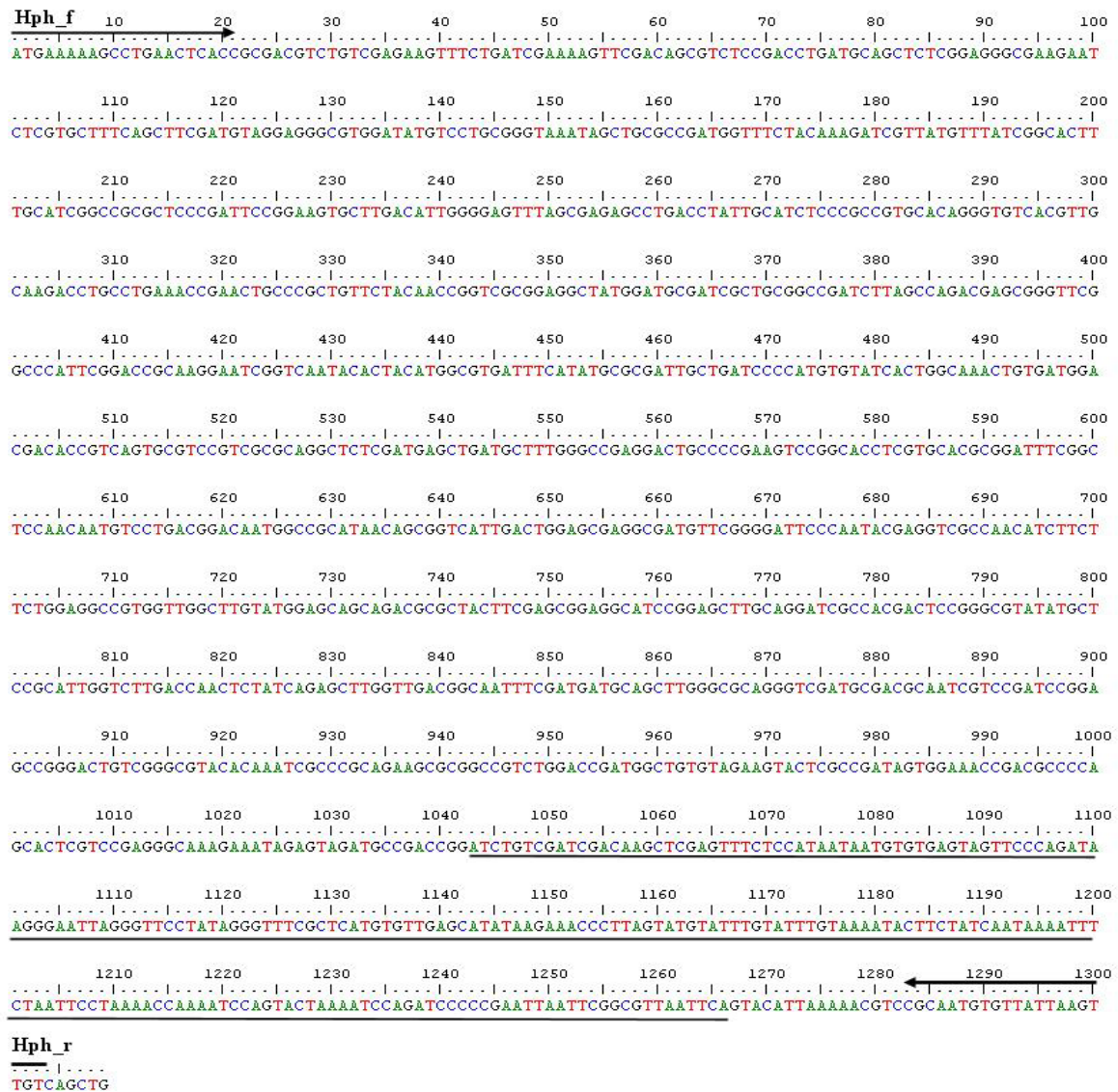
(A) 分別以限制酶 *EcoRI* 與 *PstI* 截切，於洋菜膠體電泳後得到預期片段：6.8 kb 與 1.9 kb

(B) 以限制酶 *BglII* 截切，於洋菜膠體電泳後得到預期片段：7.2 kb 與 1.5 kb



圖十四 鮑魚菇 *GPD* 啟動子序列(104)。實線框為 TATA box，虛線框為 CAAT box，三角所指為轉譯起始點；小寫下標線部分為 *GPD* 第一個內含子序列。箭頭所示分別為 PCR 反應放大鮑魚菇 *GPD* 啟動子所使用的引子 PO *GPD* i-F 與 PO *GPD* i-R

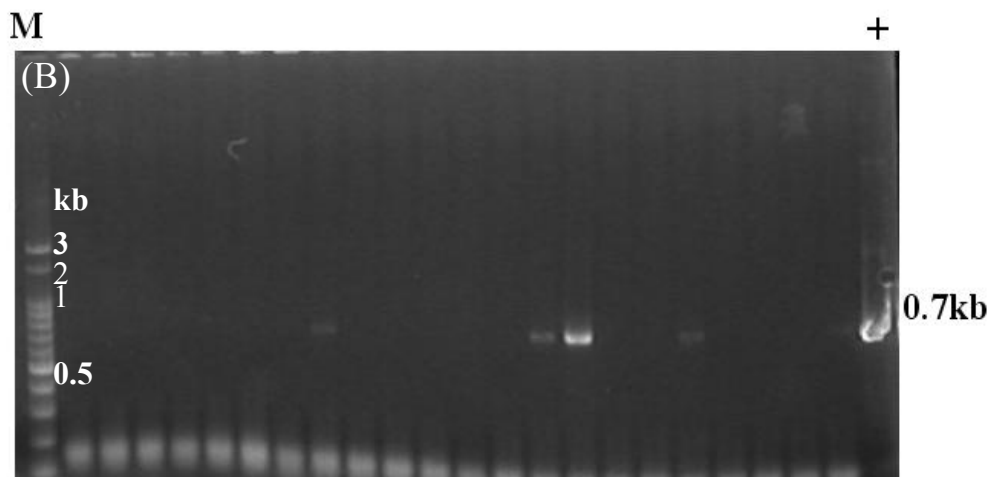
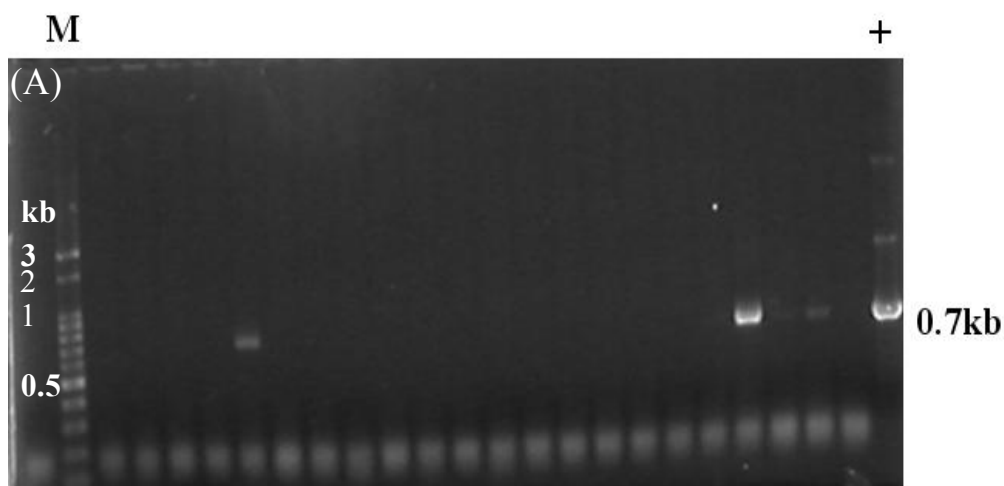
Figure 14. Nucleotide sequence of the promoter region of *P. ostreatus GPD*. Putative TATA and CAAT boxes are indicated by box. Small letters with underline indicate the first intron of *P. ostreatus GPD*. Arrows represent primers PO *GPD* i-F and PO *GPD* i-R used to amplify *P. ostreatus GPD* promoter.



圖十四(續) 潮黴素磷酸轉移酶核苷酸序列。箭頭所示分別為 PCR 反應放大 Hph 所使用的引子 Hph-f 與 Hph-r

Figure 14. (Continued) Nucleotide sequence of hygromycin B phosphotransferase.

Arrows represent primers Hph-f and Hph-r used to amplify Hph in PCR reaction.

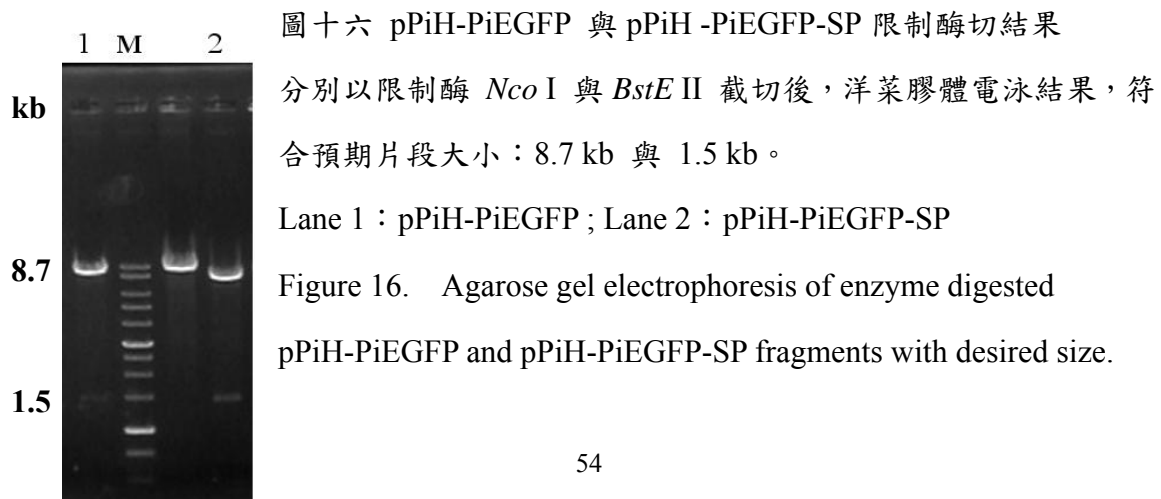


圖十五 pPiH-PiEGFP colony PCR 與 pPiH-PiEGFP-SP colony PCR 結果

Figure 15. Agarose gel electrophoresis of colony PCR products amplified with EGFP-F and EGFP-R

(A) pPiH-PiEGFP colony PCR 後，可得到預期片段 0.7 kb

(B) pPiH-PiEGFP-SP colony PCR 後，可得到預期片段 0.7 kb



圖十六 pPiH-PiEGFP 與 pPiH -PiEGFP-SP 限制酶切結果

分別以限制酶 *Nco* I 與 *BstE* II 截切後，洋菜膠體電泳結果，符合預期片段大小：8.7 kb 與 1.5 kb。

Lane 1 : pPiH-PiEGFP ; Lane 2 : pPiH-PiEGFP-SP

Figure 16. Agarose gel electrophoresis of enzyme digested pPiH-PiEGFP and pPiH-PiEGFP-SP fragments with desired size.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Egfp_SP  CTGCAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACCGGGGTGGTGCCATCCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG
Egfp     CTGCAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACCGGGGTGGTGCCATCCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG

      90     100     110     120     130     140     150     160
Egfp_SP  GCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAAGTTCATCTGCACCACC
Egfp     GCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAAGTTCATCTGCACCACC

      170    180    190    200    210    220    230    240
Egfp_SP  GGC AAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGGCTTCAGCCGCTACCCCGACCA
Egfp     GGC AAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGGCTTCAGCCGCTACCCCGACCA

      250    260    270    280    290    300    310    320
Egfp_SP  CATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG
Egfp     CATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG

      330    340    350    360    370    380    390    400
Egfp_SP  GCAACTACAAAGCCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
Egfp     GCAACTACAAAGCCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC

      410    420    430    440    450    460    470    480
Egfp_SP  AAGGAGGACGGCAACAATCCCTGGGGCAAAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAAGCA
Egfp     AAGGAGGACGGCAACAATCCCTGGGGCAAAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAAGCA

      490    500    510    520    530    540    550    560
Egfp_SP  GAAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGC
Egfp     GAAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGC

      570    580    590    600    610    620    630    640
Egfp_SP  AGAAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGAC
Egfp     AGAAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGAC

      650    660    670    680    690    700    710    720
Egfp_SP  CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTGCGTGACCGCCGCCGGGATCACCTCGGCATGGACGAGCTGTA
Egfp     CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTGCGTGACCGCCGCCGGGATCACCTCGGCATGGACGAGCTGTA

      730    740
Egfp_SP  CAAAGACTAGTCAATGATGAACTG
Egfp     CAAAGACTAGT

```

圖十七 EGFP 與 EGFP-SP 核苷酸序列。方框內為編碼內質網停留訊號之序列

Figure 17. Nucleotide sequence of EGFP and EGFP-SP. Box indicate endoplasmic reticulum retention signal peptide fused to EGFP C - terminus.



## 二、農桿菌媒介轉形

### 1. 重組質體轉入農桿菌株

將三個重組質體 pPiH-PiEGFP、pPiH-PiEGFP-SP 與 pCAMBIA1302 分別經電穿孔轉入農桿菌菌株 LBA 4404 與 AGL-1 後，塗布於含有 50  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin 的 LB 平板培養基上，將抗生素篩選後得到的菌落以 EGFP-f 與 EGFP-r 進行 colony PCR，於洋菜膠體電泳後可看到目標片段 0.7 kb。另以 Hph-f 與 Hph-r 進行 colony PCR 後，可看到目標片段 1.3 kb，如圖十八。

### 2. 農桿菌媒介之鮑魚菇轉形

#### 2.1 轉形材料選擇

##### 2.1.1 菌絲塊

以雙核和單核菌絲塊作為轉形材料，發現與農桿菌進行共培養後的單核菌絲可於選擇性培養基上長出，而雙核菌絲則否，將疑似轉形株的單核菌絲挑到新鮮選擇性培養基上，約 20 天後可看到部分菌絲生長於菌塊周圍，如圖十九，然而挑選邊緣菌絲第二次轉移到選擇性培養基後，菌絲卻不再生長，顯示以菌絲塊作為轉形材料應不適宜

##### 2.1.2 菌絲體

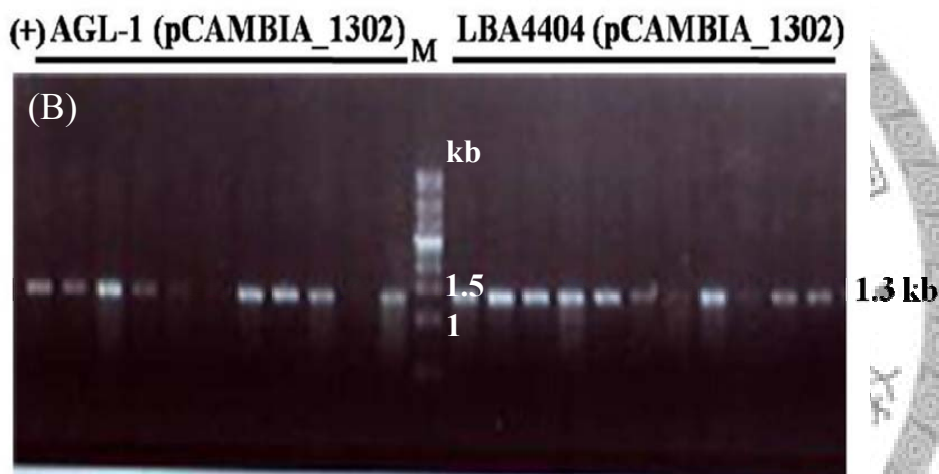
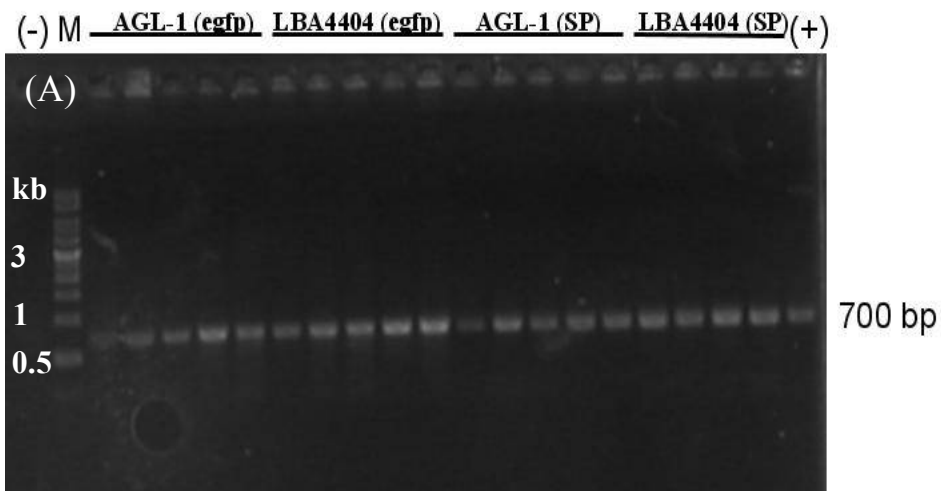
將均質機打碎的鮑魚菇菌絲片段與農桿菌共培養，AS 濃度為 500  $\mu\text{M}$  之實驗組，在第一次篩選初期疑似轉形株生長比例較 AS 濃度為 200  $\mu\text{M}$  之實驗組多，如圖二十，但經過一個禮拜後兩者比例相當，挑至新鮮選擇性培養基後即沒有生長上的差異。挑選可能具抗性的菌絲至新鮮選擇性培養基後，僅約 5~10% 的菌絲能再度於選擇性培養基上長出，菌絲生長緩慢而擴展範圍小，並且高達 80% 疑似轉形株第三次接種於選擇性培養基上即無法生長。其中，轉形株 MLF2 (參照表十一) 在選擇性培養基上生長良好，且能穩定維持抗性五代以上，見圖二十一。

(註：一代為在新鮮選擇性培養基上生長約 20~25 天)

### 2.1.3 蕈褶組織

與農桿菌共培養後的鮑魚菇蕈褶組織能在選擇性培養基上長出抗性菌絲，如圖二十二，轉形效率近 90~100%，AS 濃度 200  $\mu\text{M}$  與 500  $\mu\text{M}$  之實驗組轉形株生長比例相當，經挑選到新鮮選擇性培養基後，亦能長出擴展之菌絲，如圖二十三。其中，轉形株 GA10-4 (參照表十一) 抗性能維持七代以上。故選擇蕈褶組織為鮑魚菇後續轉形時所使用之主要材料類型。





圖十八 農桿菌 colony PCR 電泳結果

(A)以引子 EGFP-f 與 EGFP-r 進行 PCR 之產物

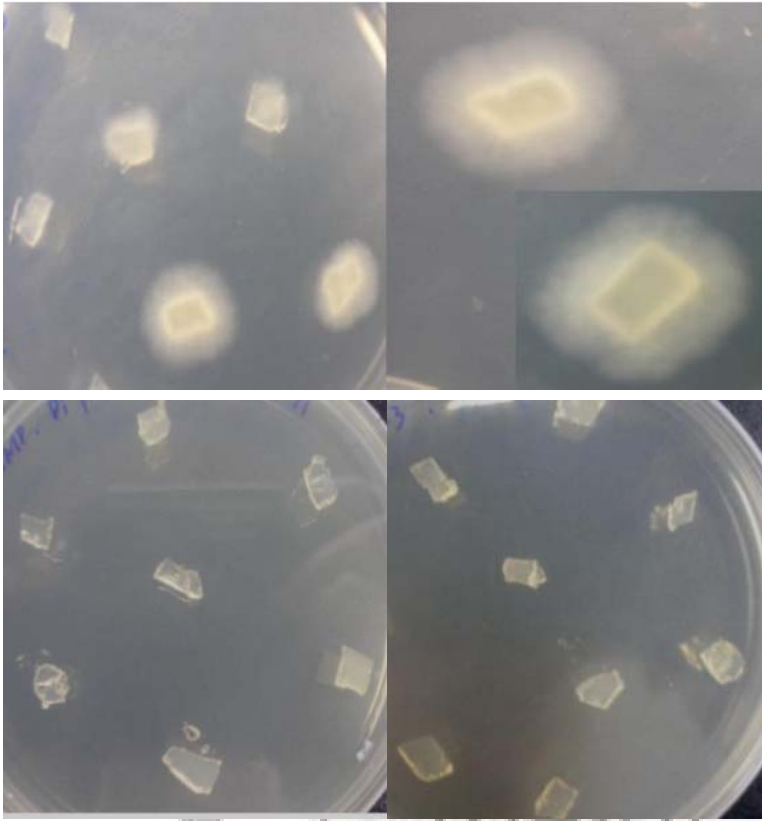
(B)以引子 Hph-f 與 Hph-r 進行 PCR 之產物

Figure 18. Agarose gel electrophoresis of agrobacterium colony PCR products amplified with primers EGFP-F/EGFP-R or Hph-f/Hph-r.

表十一 農桿菌株對應質體與鮑魚菇轉形株之簡稱

Table 11. Abbreviated names of *A.tumefaciens* strains and *P. ostreatus* transformants with specific plasmid

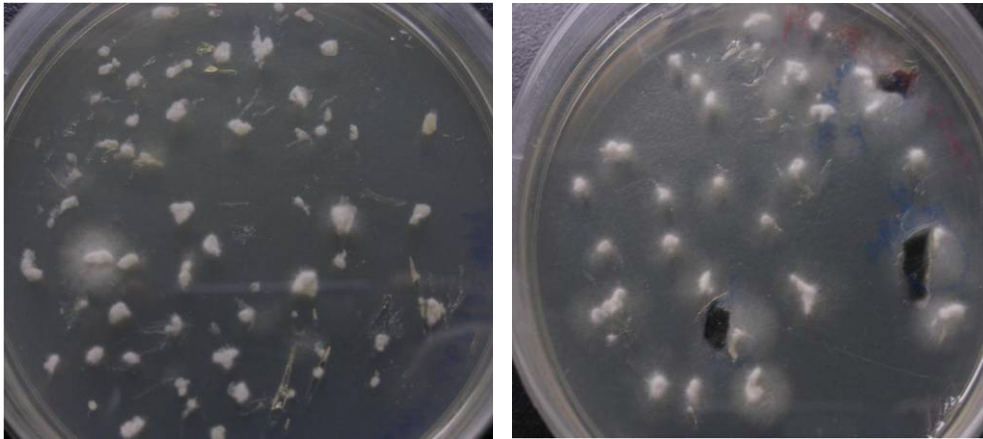
Abbreviated name	<i>A.tumefaciens</i> strain	Plasmid	<i>P. ostreatus</i> materials used	<i>P. ostreatus</i> transformants
<b>A10</b>	AGL-1	pCAMBIA1302	Gill tissues	GA10
<b>L10</b>	LBA4404	pCAMBIA1302		
<b>AP</b>	AGL-1	pPiH-PiEGFP		
<b>LP</b>	LBA4404	pPiH-PiEGFP	Gill tissues	GLP
<b>APsp</b>	AGL-1	pPiH-PiEGFP-SP	Gill tissues	GAPsp
<b>LPsp</b>	LBA4404	pPiH-PiEGFP-SP		
<b>AA</b>	AGL-1	pAiH-AiEGFP	Gill tissues	GAA
<b>LA</b>	LBA4404	pAiH-AiEGFP		
<b>AF</b>	AGL-1	pAiH-FiEGFP		
<b>LF</b>	LBA4404	pAiH-FiEGFP	Blended mycelia	MLF



圖十九 鮑魚菇 MMP 轉形株生長情形

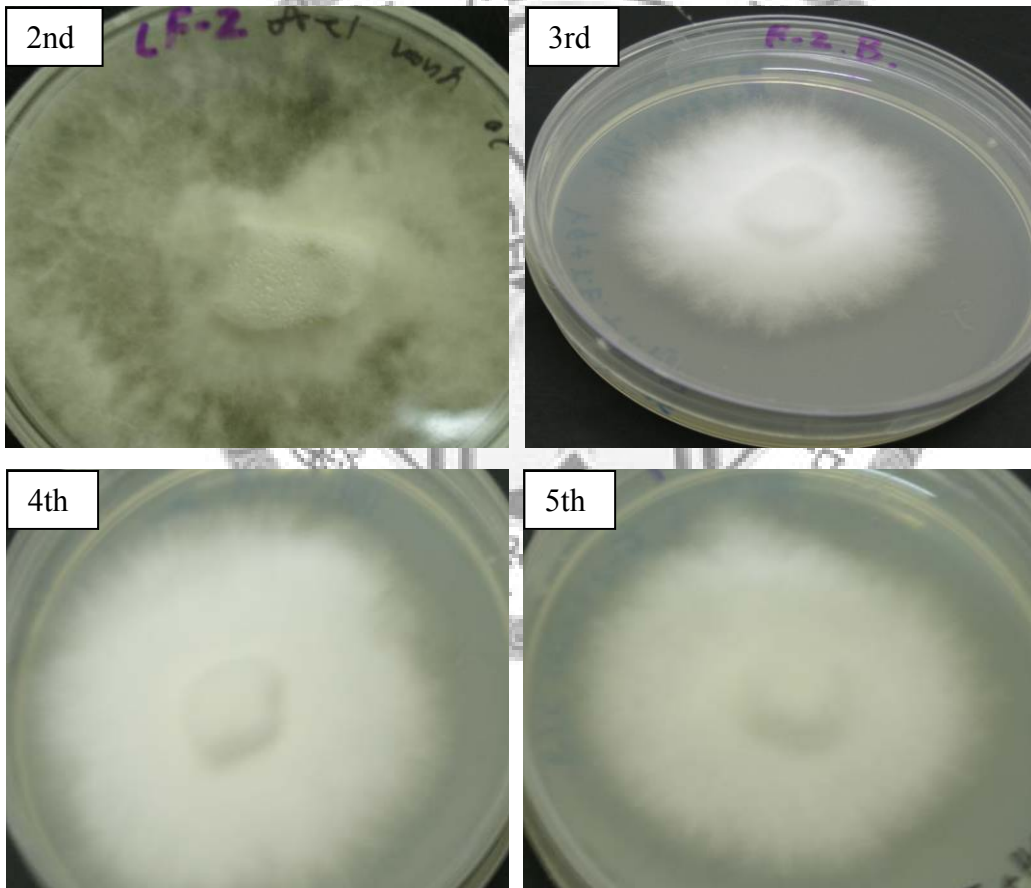
以鮑魚菇單核 MMP (上列圖)與雙核 MMP (下列圖)作為轉形材料，二次轉移至新鮮選擇性培養基上生長情形

Figure 19. *P. ostreatus* monokaryotic MMP (upper panel) and dikaryotic MMP (lower panel) as transformation material grow on selective medium.



圖二十 以鮑魚菇雙核菌絲液作為轉形材料於選擇性培養基上初次生長情形

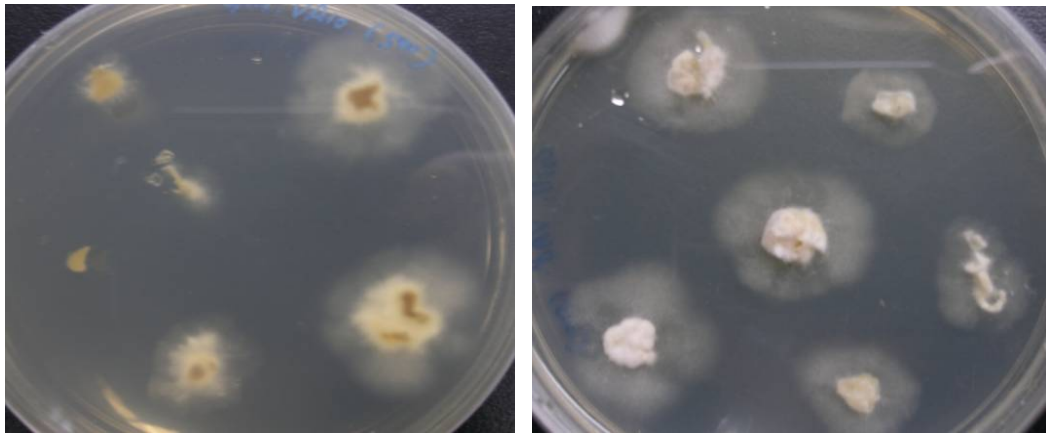
Figure 20. *P. ostreatus* dikaryotic blended mycelium (left : 200  $\mu$ M AS; right : 500  $\mu$ M AS ) as transformation materials grown on selective medium the first time.



圖二十一 轉形株 MLF-2 於選擇性培養基上生長情形良好

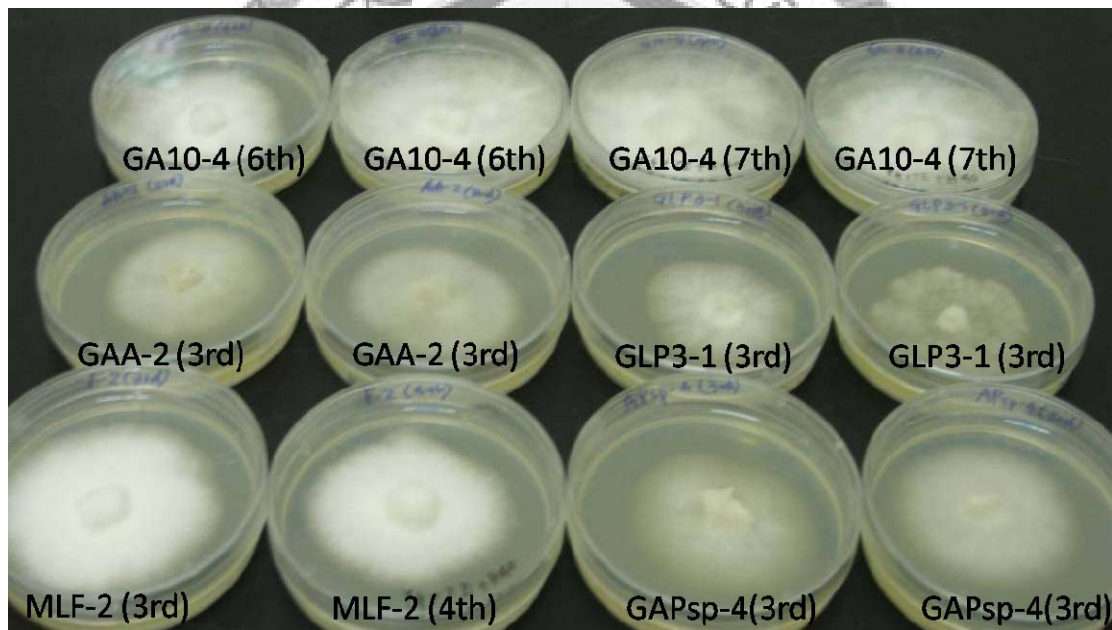
圖中左上角數字為轉形株於選擇性培養基上繼代次數

Figure 21. The transformant MLF-2 grown well on selective medium. Number on each figure indicates the subculture time on selective medium.



圖二十二 以鮑魚菇蕈褶組織作為轉形材料第一次於選擇性培養基上生長情形

Figure 22. *P. ostreatus* gill tissue as transformation material grown on selective medium the first time.



圖二十三 鮑魚菇蕈褶組織轉形株繼代生長情形

以鮑魚菇蕈褶組織作為轉形材料時，菌絲接種至新鮮選擇性培養基上皆能生長出擴展菌絲，圖中文字為轉形株簡稱，括號內為繼代次數。

Figure 23. *P. ostreatus* mycelium developed on fresh selective medium when using gill tissue as transformation material. The subculture times of each transformant was symbolized in parentheses.

### 三、綠色螢光蛋白質於鮑魚菇之表現

#### 1. 螢光顯微鏡觀察

##### 1.1 pCAMBIA1302

螢光顯微鏡觀察結果發現，鮑魚菇能夠辨識 CaMV 35S 啟動子而表現 mGFP，其綠色螢光蛋白質聚集呈點狀分佈於鮑魚菇菌絲內，亦有均勻分佈情形，見圖二十四。

##### 1.2 pPiH-PiEGFP

以鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子啟動之 EGFP 在鮑魚菇菌絲內之表現為均勻分佈，見圖二十五(A)。

##### 1.3 pPiH-PiEGFP-SP

以鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子啟動之 EGFP 末端帶有內質網停留訊息胜肽時，綠色螢光表現亦有點狀分布情形，見圖二十五(B)，顯示於鮑魚菇累積表現 EGFP 時，EGFP 會以聚集顆粒之形式存在菌絲體內，同時觀察到有綠色螢光分佈至菌絲扣子體內細胞核的位置，見圖二十六。

##### 1.4 pAiH-AiEGFP

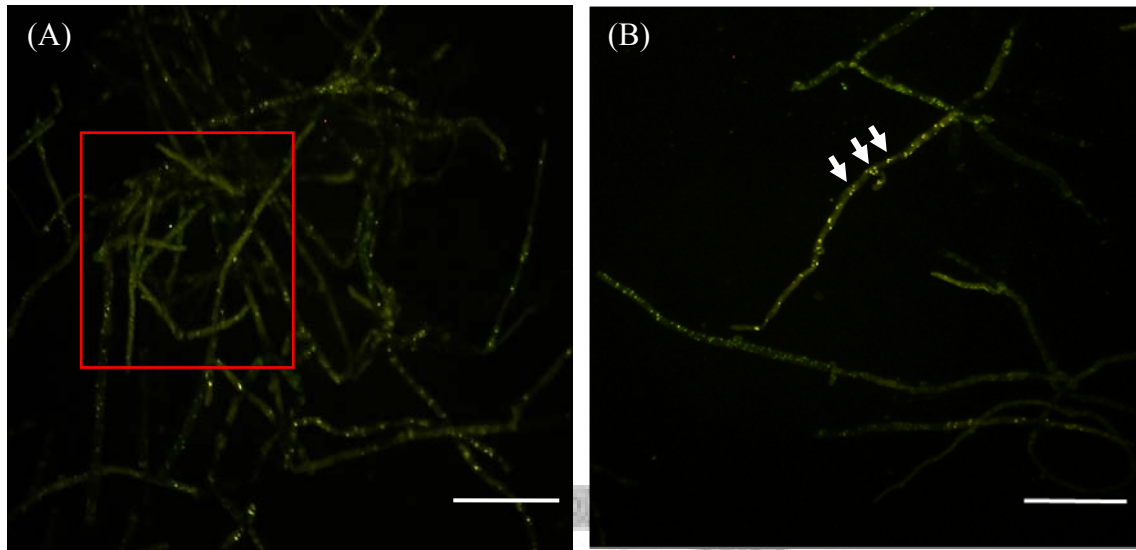
以洋菇 *GPD* 啟動子啟動之 EGFP 於鮑魚菇菌絲內表現之情形類似以 CaMV 35S 啟動子啟動 mGFP 以及鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子啟動之 EGFP-SP，同樣有綠色螢光點狀分佈，見圖二十七。

##### 1.5 pAiH-FiEGFP

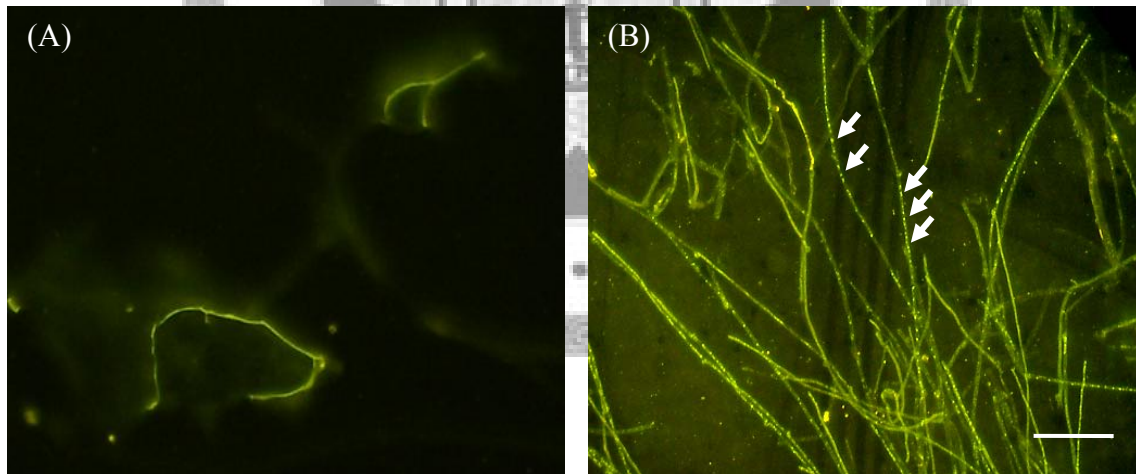
以金針菇 *GPD* 啟動子啟動之 EGFP 為均勻分布菌絲體內形式，但螢光情形較微弱，見圖二十八。

野生型菌絲則無綠色螢光產生，見圖二十九。

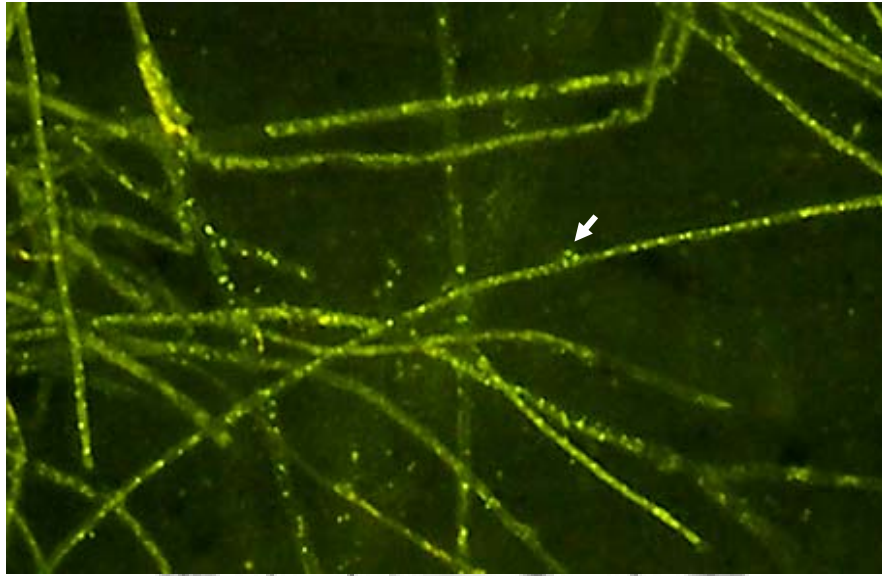




圖二十四 鮑魚菇啟動 CaMV 35S 啟動子所表現之 mGFP，圖(A)紅色方框內為綠色螢光均勻分佈之菌絲，圖(B)白色箭頭所指為綠色螢光點狀分佈。圖中刻度 50  $\mu\text{m}$ 。  
 Figure 24. mGFP expression in *P. ostreatus* with CaMV 35S promoter driving mGFP. Red box indicates mGFP scattered mycelia and white arrows indicate the mGFP spot in mycelia. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

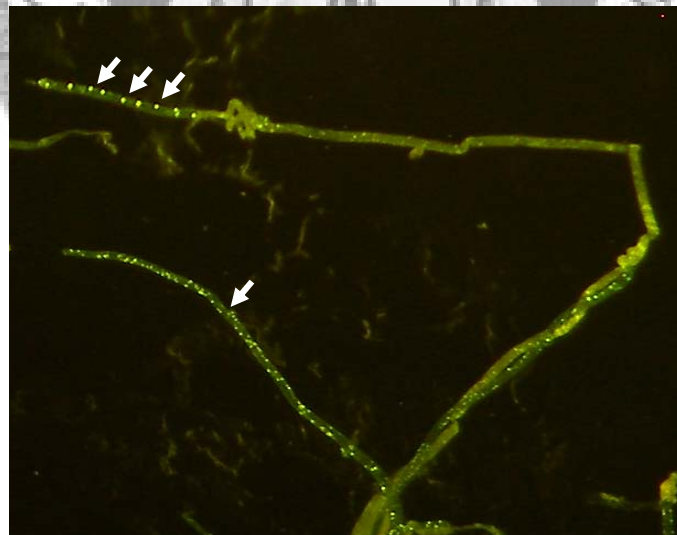


圖二十五 鮑魚菇啟動同源性 GPD 啟動子所表現之 EGFP 情形，圖(A)為表現不帶訊息胜肽之 EGFP，圖(B)為表現帶有訊息胜肽之 EGFP，白色箭頭所指為 EGFP 點狀分佈情形，圖中刻度為 50  $\mu\text{m}$ 。  
 Figure 25. EGFP expression in *P. ostreatus* with homologous *GPD* promoter driving EGFP. (A): EGFP without signal peptide. (B): EGFP with signal peptide. White arrows indicate the EGFP spot in mycelia. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .



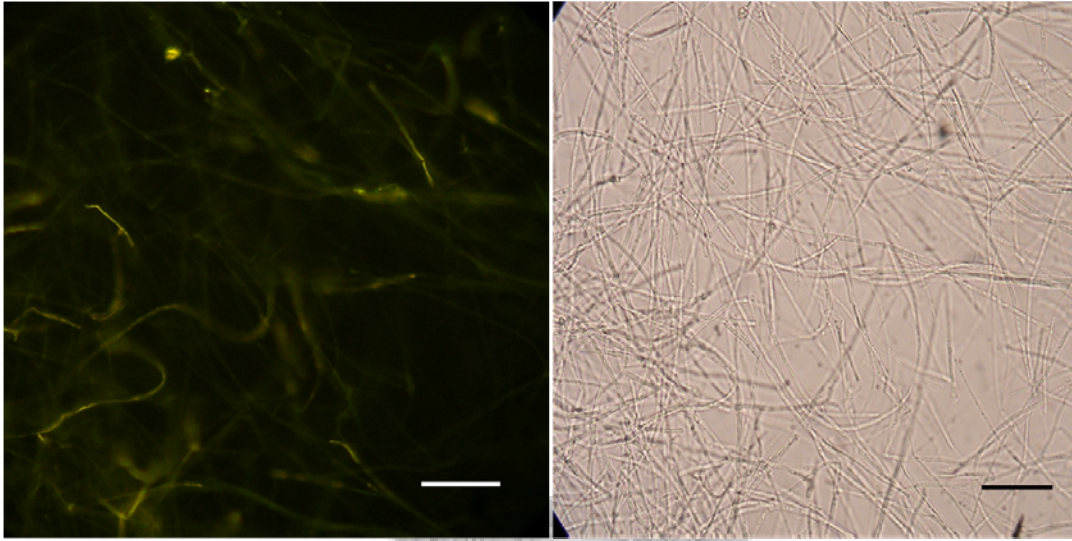
圖二十六 鮑魚菇辨識同源性 *GPD* 啟動子所表現之 EGFP-SP，箭頭所指為扣子體內發出綠色螢光之細胞核分配情形。

Figure 26. EGFP expression in *P. ostreatus* with homologous *GPD* promoter driving EGFP-SP. White arrow indicates the EGFP spot localized in partitioning nuclei within the clamp.

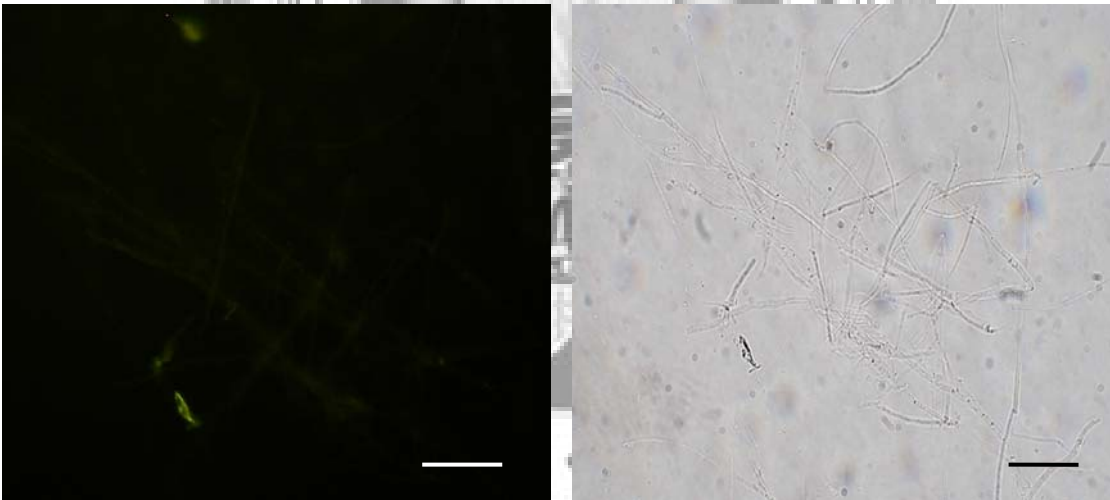


圖二十七 鮑魚菇辨識洋菇 *GPD* 啟動子所表現之 EGFP，白色箭頭所指為 EGFP 點狀分佈情形

Figure 27. EGFP expression in *P. ostreatus* with *A. bisporus GPD* promoter driving EGFP. White arrow indicates the EGFP spot in mycelia.



圖二十八鮑魚菇辨識金針菇 *GPD* 啟動子所表現之 EGFP 情形，圖中刻度為 50  $\mu\text{m}$   
Figure 28. EGFP expression in *P. ostreatus* with *F. velutipes* *GPD* promoter driving EGFP. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

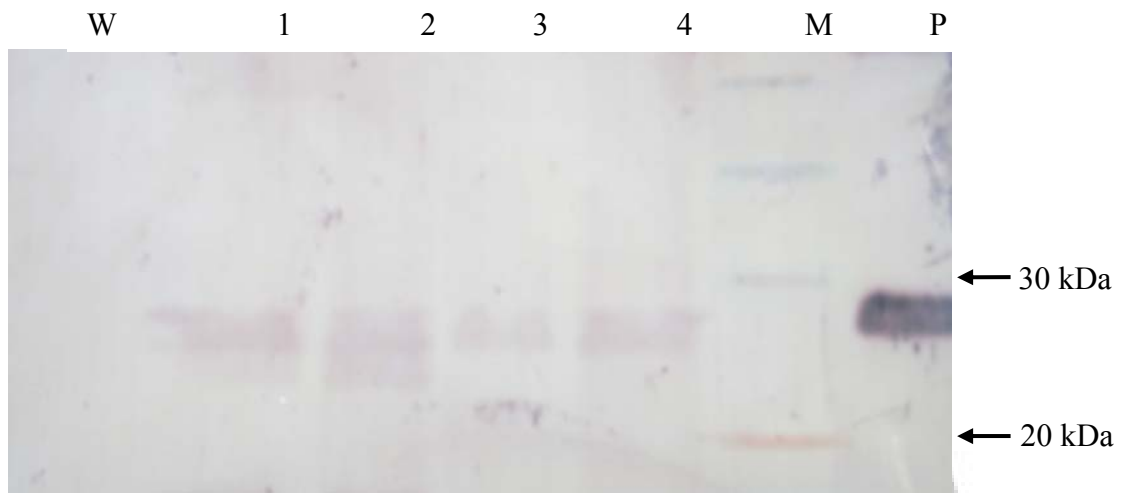


圖二十九 野生型鮑魚菇菌絲於螢光顯微鏡下觀察。左圖為藍光激發視野，右圖為明視野之菌絲，圖中刻度為 50  $\mu\text{m}$ 。

Figure 29. Fluorescent observation of wild type *P. ostreatus* mycelia.  
Left : Blue light excitation field. Right : Bright field. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

## 2. 西方式雜合分析

將轉形株萃取之蛋白質粗萃液經濃縮後進行西方式雜合分析，結果如圖三十，可偵測到綠色螢光蛋白質大小約 28kDa 之訊號。



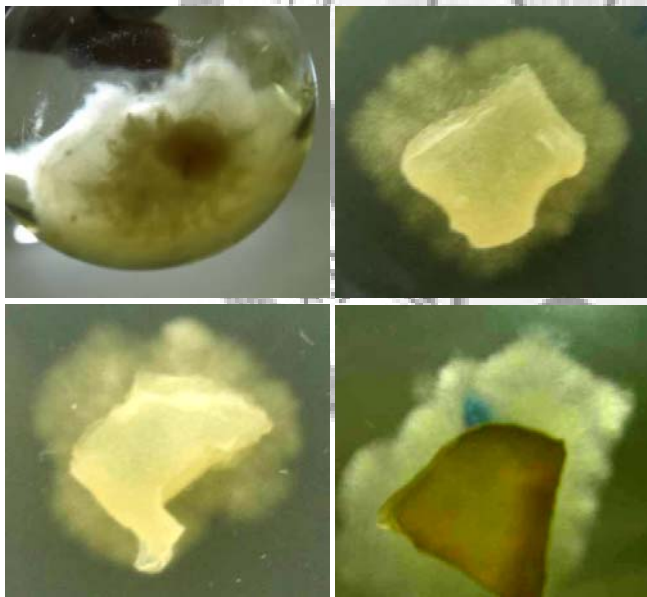
圖三十 鮑魚菇轉形株粗萃取蛋白質以西方式雜合分析定性結果

W：野生型鮑魚菇，做為負控制組；1：轉形株 MLF-2；2：轉形株 GA10-4；3：轉形株 GAPsp-4；4：轉形株 GLP-1；M：Prestained protein marker；P：正控制組。

Figure 30. Western blotting analysis of GFP proteins extracted from *P. ostreatus* transformants

### 3. 三明治法酵素連結免疫吸附分析結果

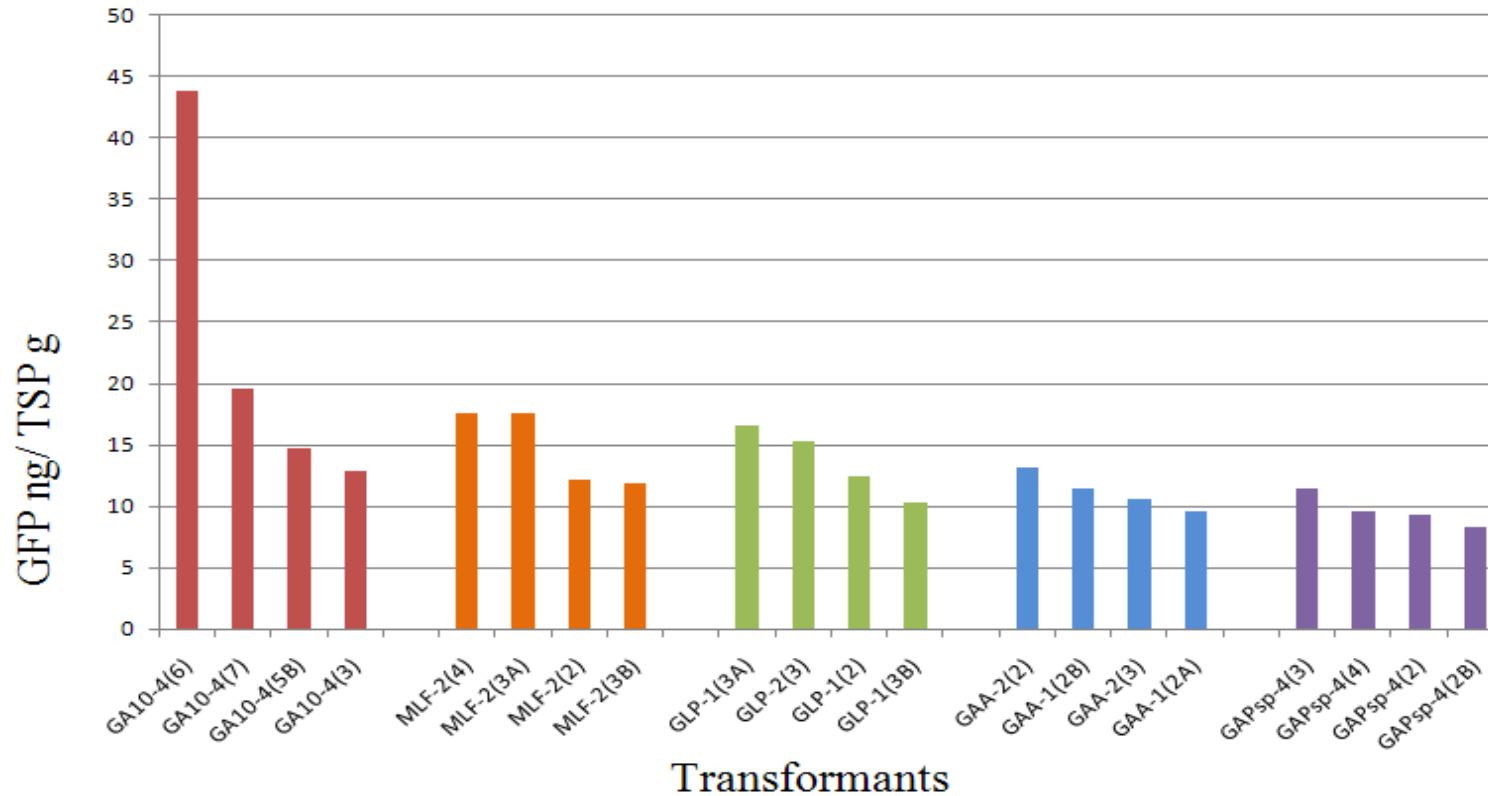
由於蕈褶組織為一多細胞形態，以鮑魚菇蕈褶組織作為轉形材料時所得到的轉形株可能為複合的多個轉形株或混雜野生型菌絲，其基因歧異度大可能導致異源表現不均，而能在選擇性培養基上觀察到轉形株呈不規則扇形生長的情形，在液態培養中也能觀察到轉形株菌絲生長速度不均，見圖三十一。藉由持續在選擇性培養基上篩選四至五代，轉形株生長速率趨近一致以判定轉形株的同質性。將不同繼代次數之轉形株與同一菌塊轉形株長出之不同位置菌絲接種至不含抗生素培養基中培養，收取菌絲體粗萃取總可溶蛋白質後進行 sandwich ELISA 分析，並推算總可溶蛋白質中可溶性 GFP 含量，將不同啟動子啟動 GFP 之轉形株所測得 GFP 含量最高前四名整理如圖三十二。



圖三十一 轉形株菌絲生長速度不均之情形

在液態與固態培養時鮑魚菇轉形株基因歧異度大導致菌絲生長速度之差異；左上圖為液態培養；其餘為固態培養。

Figure 31. Genetically diverse of *P. ostreatus* transformants results in different growth rate when culturing. Upper left : liquid medium. Others : solid medium.



圖三十二 鮑魚菇轉形株蛋白質粗萃液之三明治法酵素連結免疫吸附分析結果。括號中數字表示在選擇性培養基上繼代次數，英文字母表示菌塊長出之不同位置菌絲。GA10 轉形株可測得每克總可溶蛋白質(TSP)中約 13-44 ng 的 GFP；MLF 轉形株可測得每克 TSP 中約 12-18ng 的 GFP；GLP 轉形株可測得每克 TSP 中約 10-17 ng 的 GFP；GAA 轉形株可測得每克 TSP 中約 10-13 ng 的 GFP；GAPsp 轉形株可測得每克 TSP 中約 8-11 ng 的 GFP。

Figure 32. Sandwich ELISA analysis of protein crude extracts from *P. ostreatus* transformants .

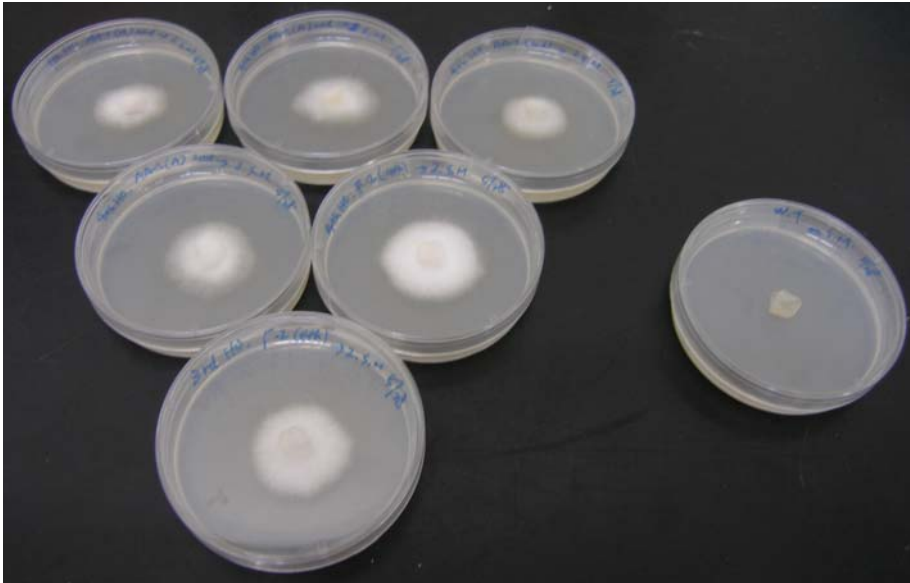
## 四、鮑魚菇轉形株異源基因穩定度

### 1. 無性世代穩定性

將於選擇性培養基上繼代四次以上的菌株接種於不含抗生素的培養基上生長，繼代 4 次後再轉至新鮮選擇性培養基，皆可長出具抗性之菌絲，其生長情形見圖三十三。自不含抗生素之液態培養基中取出鮑魚菇分生孢子萌發之菌絲，以螢光顯微鏡觀察，發現轉形株 GLA 及 GA10-4 皆有綠色螢光分佈，見圖三十四，顯示異源基因在未有篩選壓力之情況下仍存在菌絲體內並能遺傳至無性節生孢子。

### 2. 有性世代穩定性

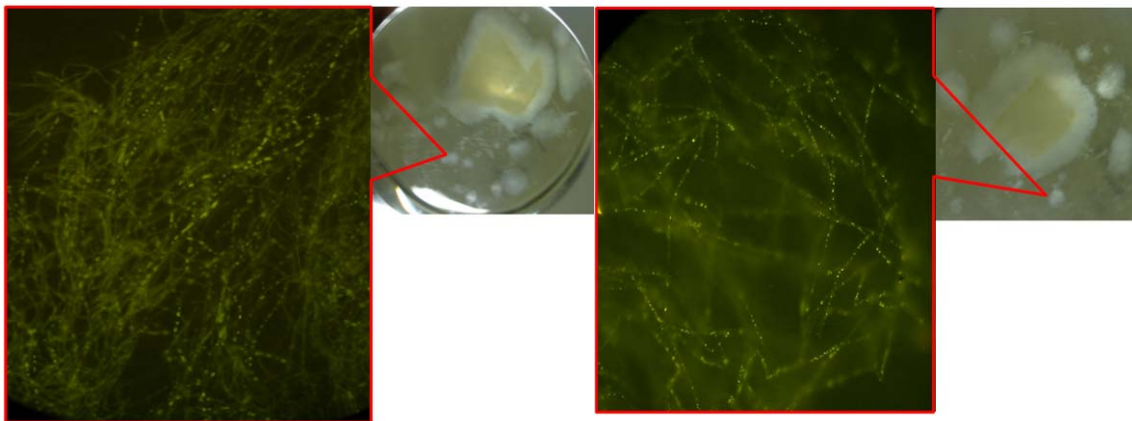
將轉形株接種於木屑培養基後進行出菇，以螢光解剖顯微鏡觀察野生型與轉形株 GA10-4 之萼褶，可觀察到轉形株 GA10-4 在萼傘邊緣相較野生型散發明顯的綠色螢光，此外，萼摺處也因散發綠色螢光而不易辨識，見圖三十五。收集萼傘掉落之擔孢子以螢光顯微鏡觀察結果如圖三十六，擔孢子亦散發綠色螢光，將擔孢子塗佈於選擇性培養基可長出具潮黴素抗性之菌絲，顯示 GFP 與 *hph* 異源基因在鮑魚菇體內可於有性世代穩定表現。



圖三十三 鮑魚菇轉形株抗藥性基因穩定度測試

於無篩選壓力下繼代四次後，仍能在選擇性培養基上生長；圖右為野生型鮑魚菇。

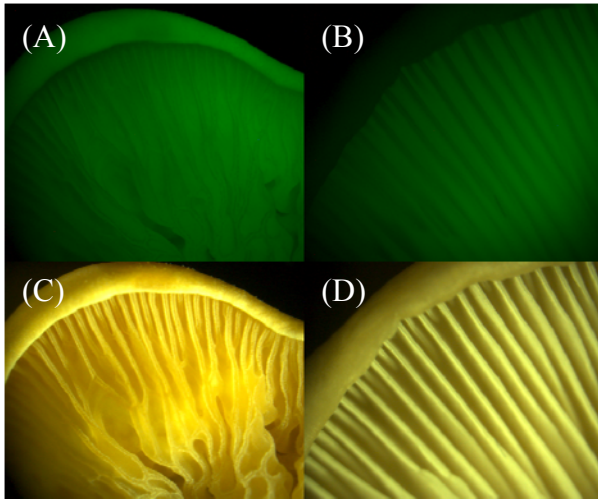
Figure 33. *P. ostreatus* transformants grew on selective medium after subcultured on nonselective medium four times. Right plate : wild type *P. ostreatus* on selective medium.



圖三十四 螢光顯微觀察鮑魚菇轉形株液態培養產生之節生孢子萌發菌絲，左圖為轉形株 GA10-4，右圖為轉形株 GLA。

Figure 34. Fluro-observation of transformants derived from germinated oidia in liquid culture



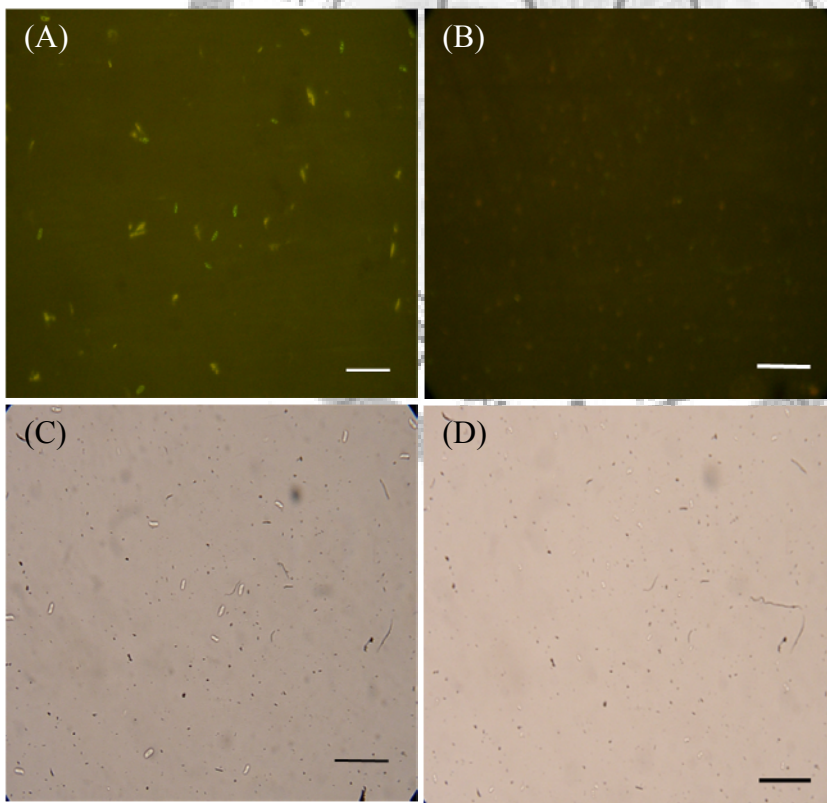


圖三十五 以螢光解剖顯微鏡觀察鮑魚菇茸褶組織。(A)(B)為藍光激發視野，(C)(D)明視野；(A)(C)轉形株 GA10-4，(B)(D)為野生型。圖中放大倍率 16X，曝光 5.4 秒

Figure 35. Fluorescent stereomicroscope observation of *P. ostreatus* gill tissue.

Upper panel : blue light excitation field. Lower panel : bright field.

Left : transformant GA10-4. Right : wild type.



圖三十六 螢光顯微鏡觀察鮑魚菇轉形株與野生型擔孢子，上列圖(A)轉形株 GA10-4 (B)野生型。下列圖為明視野下的轉形株(C)與野生型(D)擔孢子。

Figure 36. Fluorescent observation of *P. ostreatus* basidiospores. Scale bar = 50  $\mu$ m.

## 第四章 討論

### 一、鮑魚菇以農桿菌媒介之轉形系統建立

自農桿腫瘤菌順利感染真菌、人類細胞等植物以外的生物系統後，農桿菌可以感染的宿主似乎並不限制於特定物種，選擇不同宿主起始材料、農桿菌株，配合感染時環境因子的調整，應能順利轉形成功。本研究中測試的指標包括宿主不同生理狀態的起始材料、農桿菌株、誘導物濃度以及共培養時間，這些因子影響鮑魚菇以農桿菌轉形之效率的探討如下：

#### 1. 宿主材料之選擇

經測試後發現本研究中鮑魚菇以農桿菌媒介轉形的關鍵因子之一在於使用的宿主起始形式，當其他感染因子皆相同的條件下，以菌絲塊轉形無法獲得轉形株；以均質 30 秒之菌絲液做為材料之初期亦無法得到轉形株，將高速均質時間延長至 2 分鐘，可順利得到轉形株，其原因可能在於菌絲片段與農桿菌接觸面積增加，提高感染機率；以蕈褶組織做為轉形材料則有最佳的轉形效率。

在其他物種以農桿菌轉形的研究中，亦有使用不同起始材料顯著影響轉形成功與否的例子，例如接合菌中的米根黴(*Rhizopus oryzae*)與捲枝毛黴(*Mucor circinelloides*)，必須以原生質體作為轉形材料才能順利轉形，孢子或發芽孢子皆無法得到轉形株(61)。本實驗室先前在金針菇以農桿菌媒介轉形之研究中，使用菌絲塊、菌絲液、蕈褶組織皆能順利感染(105)，而同為擔子菌的洋菇研究中，起始材料的選擇顯著影響轉形效率，以營養菌絲及蕈褶組織相較發芽孢子有更好的轉形效率(17)，顯示不同物種之起始材料選擇會造成不同的轉形結果，然而這些結果也可能與轉形起始細胞數的多寡有關，以菌絲、蕈褶組織作為轉形材料時細胞總數多，只要其中一個細胞順利感染即為成功轉形，得到轉形株的機率便相對以單一擔孢子總數為分母時，轉形成功率要高出許多，但卻也較容易有轉形株非單一細胞長成之菌落的困擾。將本研究中測試過的鮑魚菇三種起始材料優缺點列於表十二。

本研究中主要採用的轉形起始材料為蕈褶組織，參考 2000 年 Chen 等人所做

的研究，該研究自阿拉伯芥花朵浸泡農桿菌液而轉形(20)之研究中獲得靈感，成功應用於洋菇蕈褶組織以農桿菌進行轉形。在洋菇轉形實驗中使用的蕈褶組織面積約 2 ~ 5 mm<sup>2</sup> (約相當於 0.02 ~ 0.04 cm<sup>2</sup>)，轉形效率以多少蕈褶組織塊可獲得多少轉形株計算，約 40%(17)；本研究使用的鮑魚菇蕈褶組織面積約 0.64 cm<sup>2</sup>，轉形效率約 90 ~ 100%，然而在金針菇的研究中，使用蕈褶組織面積約 1 cm<sup>2</sup>，轉形效率卻僅有 5 ~ 15% (105)，顯示不單是蕈褶組織面積大小影響轉形效率，不同物種可能有細胞大小、細胞壁組成不盡相同而造成轉形效率差異，此外，蕈褶組織來源之子實體於不同發育時期亦會影響轉形效率。探討洋菇以蕈褶組織作為轉形材料的研究中，子實體不同發育時期對轉形效率的影響，發現在蕈傘初開時轉形效率最高，推測原因可能是該時期蕈褶內核融合與減數分裂等細胞活動頻繁，因此適於進行 DNA 重組而容易使外來基因嵌入轉形(13)，而鮑魚菇之蕈褶組織有最佳轉形效率之原因可能也在於此。

表十二 鮑魚菇以農桿菌媒介轉形時所使用之材料比較

Table 12. Comparison of different materials from *Pleurotus ostreatus* used in *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation

Materials	Advantages	Disadvantages
MMP	Easy to get materials. Easy to manipulate. Short preparation time.	Unable or difficult to get transformants. Genetically diverse in transformants.
Blended mycelia		Difficult to manipulate. Difficult to get transformants Longer preparation time. Genetically diverse in transformants.
Gill tissue	Easy to manipulate. Easy to get transformants.	Must fruiting to get materials. Genetically diverse in transformants.

## 2. 農桿菌株

在其他擔子菌以農桿菌轉形之研究中，使用之菌株多為 EHA105、AGL-1 以及 LBA4404；松茸與洋菇的研究中，EHA105 與 AGL-1 的轉形效率並無顯著差異(17, 64)，而草菇以 EHA105 之轉形效率較 LBA4404 佳(95)，本實驗室先前以農桿菌媒介金針菇轉形研究中，AGL-1 感染之轉形株可以有效表現 GUS 報導基因，相形之下，LBA4404 感染之轉形株則無明顯 GUS 活性(105)；顯見不同農桿菌菌株在傳送 T-DNA 之效率上確實會有不同的結果。本實驗中以農桿菌株 AGL-1 與 LBA4404 將綠色螢光蛋白基因轉形至鮑魚菇體內表現，都能順利感染成功，在其他感染因子皆相同時，轉形效率並沒有明顯差異，若使用其他報導基因或異源基因進行轉形，應會有不一樣的結果。

## 3. 誘導物濃度

在牛樟芝以農桿菌媒介之轉形中，使用 0.1, 1, 10, 20mM 四種濃度的誘導物 AS 測試轉形效率，其中 1 mM 的 AS 有最佳轉形效率(16)，在白僵菌(*Beauveria bassiana*)的研究中，AS 濃度從 0.2 mM 增加至 0.5 mM 可提高轉形效率(53)；研究中所使用的 AS 濃度(0.2 mM)參考多數真菌之農桿菌媒介轉形研究(17, 64, 69)，可順利誘導農桿菌成功感染鮑魚菇。當 AS 濃度提高一倍至 0.5 mM 亦能順利感染，以蕈褶組織做為起始轉形材料時，就目前測試之兩種 AS 濃度而言，因為轉形效率皆高達 80~90%，因此並無顯著差異。若欲進一步探討 AS 最適濃度必須減少蕈褶組織面積，使轉形效率下降，以不同濃度之 AS 誘導農桿菌進行感染後，能顯著提升轉形效率之實驗組，始能初步判定為誘導農桿菌感染鮑魚菇之最適 AS 濃度。

## 4. 共培養時間

在白僵菌(*Beauveria bassiana*)的研究中，測試真菌與農桿菌共培養時間為 2, 3, 4, 5, 7 天，以共培養四天之實驗組可得到最多轉形株，共培養天數延長為五、七天時，轉形株數量反而減少(53)；牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)的研究結果也顯示，

測試的共培養天數(0, 3, 6, 9 天)之中，共培養 6 天可得到最多轉形株，共培養 9 天轉形株數目下降(16)，顯示共培養時間確有其最適長度，可能依感染物種不同而各有差異；超過最適共培養時間後轉形效率會降低，應是共培養時野生型菌絲生長過多致使轉形株篩選不易。本研究中測試共培養天數 3, 4, 5 天，在其他感染因子皆相同的條件下，並不影響轉形效率，然而為避免野生型菌絲生長過盛妨礙轉形株的篩選，在感染條件測試後選擇共培養 3 天作為後續轉形之共培養時間。



## 二、發展鮑魚菇作為異源表達系統

一個理想的異源表達系統能夠穩定表現外來基因，並且有一定的異源蛋白質產量。本研究中以報導基因綠色螢光蛋白質作為偵測指標，可確定鮑魚菇以農桿菌進行轉形後，能夠表現綠色螢光蛋白質基因且於有絲分裂及減數分裂後皆能穩定表現，而蛋白質表現量的要求，若以口服疫苗為目標，以 B 肝疫苗為例，每隻小鼠每次的抗原攝取量為 5  $\mu\text{g}$  (77)。研究中鮑魚菇表現之綠色螢光蛋白質產量最高僅每克可溶性蛋白質有 43.83ng 綠色螢光蛋白質含量，與理想抗原產量相去甚遠，茲就研究中採用的兩種分生策略試圖提高鮑魚菇表現綠色螢光蛋白質的產量，以及偵測之產量未如預期之原因試作分析如下：

### 1. 啟動子探討

研究中選用了不同來源之啟動子啟動下游 GFP 基因，在前人的研究中，鮑魚菇能辨識同源的 *GPD* 啟動子(104)與異源的香菇 *GPD* 啟動子(45)。本研究中利用農桿菌成功轉形之鮑魚菇轉形株不僅能夠辨識同源的 *GPD* 啟動子，亦能辨識其他菇類如金針菇與洋菇的 *GPD* 啟動子，甚至是病毒(CaMV)來源的啟動子，可以成功啟動下游基因 *hpt* 與 GFP 的表現。

在螢光顯微鏡的觀察結果中，CaMV 35S 與洋菇 *GPD* 啟動子啟動的 M/EGFP 在菌絲體內呈現聚集現象，這種 M/EGFP 聚集的現象，可能是 M/EGFP 在鮑魚菇體內表現時並非正確摺疊，導致蛋白質部分疏水區域裸露，當 M/EGFP 表現量偏高時，便傾向相互聚集形成所謂的聚集體(aggresome) (50)而能觀察到點狀發亮的 GFP，在其他真菌表現 GFP 的研究中，添加疏水性訊息胜肽亦會發生 GFP 聚集的情形(68)。蛋白質不正確摺疊(misfolding)的原因可能是來自於基因轉錄、mRNA 剪輯(processing)或轉譯上的錯誤所導致，也可能是環境壓力如溫度、氧化、滲透壓力所致，目前尚無法斷定；許多不正確摺疊的蛋白質會暴露疏水性區域，而該疏水性區域可能包埋在蛋白質內部，亦可能與其他蛋白質的疏水區域交互作用而聚集形成聚集體(48)。

就啟動子而言，CaMV 35S 啟動子最常使用於植物轉形的研究中，是一強力啟

動子，也已經在其他物種發現皆能辨識 CaMV 35S 啟動子，整理如表十三。在洋菇的研究中發現，洋菇無法辨識 CaMV 35S 啟動子因此不能以潮黴素篩選獲得抗藥性轉形株(17)；與鮑魚菇同屬側耳屬的金頂側耳則能辨識 CaMV 35S 啟動子，然而其啟動報導基因 GUS 的活性低於香菇 *GPD* 啟動子啟動之 GUS 活性(85)。本研究中洋菇之 *GPD* 啟動子與 CaMV 35S 啟動子皆會啟動綠色螢光蛋白質表現，並有聚集現象，可見得其啟動子與 RNA 聚合酶結合並且轉錄的效率應高於未有綠色螢光聚集情形之金針菇與鮑魚菇同源 *GPD* 啟動子，然而 ELISA 定量結果卻未完全符合螢光顯微鏡觀察結果，僅 CaMV 35S 啟動子可測得較高綠色螢光蛋白質含量，洋菇啟動子啟動之 GFP 與金針菇與鮑魚菇啟動之 GFP 含量相近，這可能是與萃取蛋白質的方法是利用一般萃取總可溶蛋白質的方式進行有關。聚集體為非水溶性(50)，可能必須以添加 Guanidinium chloride (GnCl) 等萃取內涵體蛋白質的方式萃取(23, 92)，GFP 可以承受達 6M GnCl 不影響其構形(57)，然而偵測蛋白質的抗體 IgG 無法在變性劑存在的環境下作用，必須將蛋白質萃取液經過透析置換緩衝液後方能進行蛋白質含量偵測，步驟繁瑣且人為操作因子增多，另尋報導基因如 GUS 或選擇鮑魚菇同源性酵素作為偵測啟動子指標為較可行且可信的做法。現階段可以確定的是，以螢光顯微鏡觀察結果而言，鮑魚菇 RNA 聚合酶辨識 CaMV 35S 啟動子與洋菇 *GPD* 啟動子並轉錄的效率大於鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子與異源金針菇 *GPD* 啟動子，在金針菇的研究中，亦有異源啟動子較同源啟動子更有效的表現綠色螢光蛋白質基因的結果(105)。

就金針菇與鮑魚菇之 *GPD* 啟動子強度而言，在螢光顯微鏡觀察結果中，鮑魚菇 *GPD* 啟動子所啟動的綠色螢光較金針菇微亮，在 ELISA 定量上則無明顯差異(金針菇啟動子前四高平均約 14.79 ng/g；鮑魚菇 13.67 ng/g)，以目前實驗結果而言兩者啟動效率相當，鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子並沒有較異源顯著的啟動效率。以上這些結果顯示同源與異源啟動子在鮑魚菇內並非決定啟動子啟動效率的主要原因，也可能與啟動子長度無關，見表十四，啟動子的功能區域如 TATA、CAAT 與 GC box 可能扮演重要角色。

表十三 已發表能辨識 CaMV 35S 啟動子之物種

Table 13. Published species capable of recognizing CaMV 35S promoter

Host	Species	References
<b>Bacteria</b>	<i>Escherichia coli</i>	Assaad and Signer, 1990 Lewin et al., 1998
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Lewin et al., 1998
	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Lewin et al., 1998
<b>Fungi/Yeast</b>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Pobjecky et al., 1990
	<i>Ganoderma lucidum</i> (靈芝)	Sun et al., 2002
	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (金頂側耳)	Sun et al., 2002
<b>Human</b>	Cell extract of HeLa cells (human cancer cell)	Guilley et al., 1982 Cooke and Penon., 1990 Burke et al., 1990

表十四 鮑魚菇以不同啟動子啟動 GFP 之表現情形。A.b.為洋菇(*Agaricus bisporus*)的簡寫；F.v.為金針菇(*Flammulina velutipes*)的簡寫；P.o.為鮑魚菇(*Pleurotus ostreatus*)的簡寫。Average GFP (ng/g TSP)意指各轉形株每克總可溶性蛋白質中測得的前四高 GFP 平均含量。

Table 14. GFP expression in *P. ostreatus* with different promoter driving GFP.

		promoter	Length (bp)	Target gene	GFP localization	Average GFP (ng/g TSP)		
		<b>Heterologous</b>						
<b><i>Pleurotus ostreatus</i></b>	A T M T	CaMV 35s	538	mGFP	Yes	22.74±14.34		
		A.b. gpd	270	eGFP	Yes	11.15±1.53		
		F. v. gpd	1320	eGFP	No	14.79±3.23		
		<b>Homologous</b>						
		P. o. gpd	510	eGFP,	No	13.67±2.81		
		P. o. gpd		eGFP_ sp	Yes		9.64±1.34	



## 2. 訊息胜肽效應

在植物的表達系統中，目標蛋白質融合訊息胜肽往往能有效提升產量(18, 74, 93, 100)，本研究中螢光顯微鏡觀察結果發現，鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子啟動綠色螢

光蛋白質時，綠色螢光散佈菌絲體內，當綠色螢光蛋白質融合內質網停留訊號時，綠色螢光即呈現類似 *CaMV 35S* 啟動子與洋菇 *GPD* 啟動子啟動之綠色螢光蛋白質聚集體，顯示在鮑魚菇體內表現綠色螢光蛋白質時，訊息胜肽的添加，使得蛋白質產量累積，而有類似於強力啟動子表現綠色螢光蛋白質的作用，也透露出綠色螢光蛋白質在鮑魚菇體內表現時，可能會經細胞內的水解或外泌作用而減低產量，使用內質網停留訊息胜肽能減少異源蛋白質被宿主的平衡機制作用。值得注意的是，表現綠色螢光蛋白質的轉形株在生長上明顯趨緩，並且也有部分停滯生長的情形，實驗中亦曾觀察到綠色螢光分佈至細胞核內，由於與螢光生成相關之自由基的形成可能會對細胞產生毒性(40)，在植物阿拉伯芥高度表現 GFP 之轉形株中亦有過量產生的 GFP 分佈至細胞核內並且影響轉形株再生的例子(41)，因此選擇其他基因作為偵測指標確有其必要性。

## 第五章、結論

本論文建立鮑魚菇以農桿菌媒介之轉形系統，以綠色螢光蛋白質基因為報導基因比較不同啟動子啟動基因表現的情形與差異性，另比較報導基因融合內質網停留訊息胜肽的蛋白質表現情形。由實驗結果可得到以下結論：

1. 本研究使用鮑魚菇蕈褶組織( $\sim 0.64 \text{ cm}^2$ )為主要轉形材料，以濃度 0.2 mM 或 0.5 mM 的 AS 誘導之農桿菌株 LBA4404 以及 AGL-1 共培養 3~5 天皆可成功得到轉形株，轉形效率約 80~90 %。
2. 鮑魚菇除了能夠辨識同源 *GPD* 啟動子以外，亦能辨識異源啟動子包括 CaMV 35S、洋菇 *GPD* 啟動子以及金針菇 *GPD* 啟動子而啟動綠色螢光蛋白質表現。
3. 由螢光顯微鏡結果可知，在鮑魚菇體內表現綠色螢光蛋白質時，CaMV 35S 與洋菇 *GPD* 啟動子啟動效率較強；螢光顯微鏡配合 ELISA 定量結果則顯示金針菇 *GPD* 啟動子與鮑魚菇同源性 *GPD* 啟動子兩者啟動效率相當。
4. 從螢光顯微鏡結果可知，內質網停留訊息胜肽的添加可以累積異源蛋白質 EGFP 在鮑魚菇體內的含量。
5. 以農桿菌媒介轉形法將異源基因轉入鮑魚菇後，於無篩選壓力下生長之鮑魚菇菌絲或經出菇後獲得的子代皆具抗藥性並且仍可以螢光顯微鏡觀測到綠色螢光，顯示異源基因在鮑魚菇體內於有絲分裂及減數分裂後皆能穩定表現，

## 第六章、未來工作

本研究成功建立鮑魚菇以農桿菌媒介之轉形法，以報導基因綠色螢光蛋白質作為鮑魚菇異源表現指標，異源基因能夠穩定表現。然而就醫藥蛋白質表現系統而言，異源基因產量尚不足以應用於食用疫苗之開發，欲使建立之鮑魚菇異源表達系統更有應用前景，未來工作可從以下幾點著手

### 1. 農桿菌媒介轉形方法改進

轉形株之穩定性及異源蛋白質產量可信度亦受到菌落純度的影響，若能以鮑魚菇擔孢子進行轉形而獲得單一轉形株，將有利於後續分析。

### 2. 更換報導基因

可以選擇不同的報導基因作為評估異源基因表現量的依據，以能夠正常摺疊且不會產生聚集者為佳，另外能以鮑魚菇同源性酵素作為不同啟動子在鮑魚菇體內啟動效率評估之指標。

### 3. 測試不同啟動子

選擇較適當的報導基因後，鈎取強力啟動子，針對同源以及異源啟動子再次評估，經 Southern blotting 確定基因拷貝數及 ELISA 定量後，確定鮑魚菇體內啟動效率最好的啟動子

### 4. 提高異源蛋白質表現量

提高目標蛋白質產量之方式包括選用強力啟動子、融合訊息胜肽，抑或是以農桿菌將目標基因轉入不同交配型之鮑魚菇單核菌絲，藉由轉形株之交配提升蛋白質產量；亦可篩選表現量較高之轉形株子代進行交配，以達提高目標蛋白質產量的目的。

## 第七章、参考文献

1. **Abuodeh, R., M. Orbach, M. Mandel, A. Das, and J. Galgiani.** 2000. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of infectious diseases* **181**:2106-2110.
2. **Alonso, J., A. Stepanova, T. Leisse, C. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, and R. Cheuk.** 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**:653-657.
3. **Atmakuri, K., Z. Ding, and P. Christie.** 2003. VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology* **49**:1699-1713.
4. **Ballas, N., and V. Citovsky.** 1997. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *94*:10723-10728.
5. **Barbosa, M., D. Passos, M. Felipe, R. Jesuino, M. Pereira, and C. de Almeida Soares.** 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genetics and Biology* **41**:667-675.
6. **Baron, C., and P. Zambryski.** 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annual Review of Genetics* **29**:107-129.
7. **Beyer, P., S. Al-Babili, X. Ye, P. Lucca, P. Schaub, R. Welsch, and I. Potrykus.** 2002. Golden Rice: Introducing the  $\beta$ -Carotene Biosynthesis Pathway into Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A Deficiency 1. *Journal of Nutrition* **132**:506-510.
8. **Bobek, P., and S. Galbavy.** 2001. Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *British Journal of Biomedical Science* **58**:164-168.
9. **Bobek, P., L. Ozdin, and S. Galbavy.** 1998. Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition* **14**:282-286.
10. **Brencic, A., and S. Winans.** 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**:155-194.
11. **Bundock, P., A. den Dulk-Ras, A. Beijersbergen, and P. Hooykaas.** 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **14**:3206-3214.
12. **Burns, C., K. Gregory, M. Kirby, M. Cheung, M. Riquelme, T. Elliott, M. Challen, A. Bailey, and G. Foster.** 2005. Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genetics and Biology* **42**:191-199.
13. **Burns, C., K. Leach, T. Elliott, M. Challen, G. Foster, and A. Bailey.** 2006. Evaluation of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agricus bisporus* using a range of promoters linked to hygromycin resistance. *Molecular Biotechnology* **32**:129-138.
14. **Cascales, E., and P. Christie.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion

- systems. *Nature Reviews Microbiology* **1**:137-149.
15. **Casselton, L., and M. Zolan.** 2002. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature Reviews Genetics* **3**:683-697.
  16. **Chen, E., Y. Su, S. Kanagarajan, D. Agrawal, and H. Tsay.** 2008. Development of an activation tagging system for the basidiomycetous medicinal fungus *Antrodia cinnamomea*. *Mycological Research* **113**:290-297.
  17. **Chen, X., M. Stone, C. Schlagnhauser, and C. Romaine.** 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4510-4513.
  18. **Chong, D., and W. Langridge.** 2000. Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Research* **9**:71-78.
  19. **Citovsky, V., J. Zupan, D. Warnick, and P. Zambryski.** 1992. Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. *Science* **256**:1802-1805.
  20. **Clough, S., and A. Bent.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**:735-743.
  21. **Cohen, R.** 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**:582-594.
  22. **Combiér, J., D. Melayah, C. Raffier, G. Gay, and R. Marmeisse.** 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS microbiology letters* **220**:141-148.
  23. **De Bernardez Clark, E.** 1998. Refolding of recombinant proteins. *Current opinion in biotechnology* **9**:157-163.
  24. **De Groot, M., P. Bundock, P. Hooykaas, and A. Beijersbergen.** 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* **16**:839-842.
  25. **De Wilde, C., H. Van Houdt, S. De Buck, G. Angenon, G. De Jaeger, and A. Depicker.** 2000. Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Molecular Biology* **43**:347-359.
  26. **Djamei, A., A. Pitzschke, H. Nakagami, I. Rajh, and H. Hirt.** 2007. Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**:453-456.
  27. **Duckely, M., C. Oomen, F. Axthelm, P. Van Gelder, G. Waksman, and A. Engel.** 2005. The VirE1VirE2 complex of *Agrobacterium tumefaciens* interacts with single-stranded DNA and forms channels. *Molecular Microbiology* **58**:1130-1142.
  28. **Dumas, F., M. Duckely, P. Pelczar, P. Van Gelder, and B. Hohn.** 2001. An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**:485-490.
  29. **Escobar, M., and A. Dandekar.** 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* **8**:380-386.
  30. **Fullner, K., and E. Nester.** 1996. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* **178**:1498-1504.
  31. **Gellissen, G., and K. Melber.** 1996. Methylophilic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals.

- Arzneimittel-Forschung **46**:943-948.
32. **Gelvin, S.** 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**:16-37.
  33. **Gelvin, S.** 2003. Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends in Biotechnology* **21**:95-98.
  34. **Gelvin, S., and S. Kim.** 2007. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. *BBA-Gene Structure and Expression* **1769**:410-421.
  35. **Godio, R., R. Fouces, E. Gudina, and J. Martin.** 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the antitumor clavarinic acid-producing basidiomycete *Hypholoma sublateritium*. *Current genetics* **46**:287-294.
  36. **Gouka, R., C. Gerke, P. Hooykaas, P. Bundock, W. Musters, C. Verrips, and M. de Groot.** 1999. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens* mediated homologous recombination. *Nature Biotechnology* **17**:598-601.
  37. **Gouka, R., P. Punt, and C. Van den Hondel.** 1997. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*?: progress, limitations and prospects. *Applied microbiology and biotechnology* **47**:1-11.
  38. **Grange, W., M. Duckely, S. Husale, S. Jacob, A. Engel, and M. Hegner.** 2008. VirE2: a unique ssDNA-compacting molecular machine. *PLoS Biol* **6**:343-351.
  39. **Hamilton, C., A. Frary, C. Lewis, and S. Tanksley.** 1996. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**:9975-9979.
  40. **Haseloff, J.** 1998. GFP variants for multispectral imaging of living cells, p. 139-157, *Green Fluorescent Proteins*.
  41. **Haseloff, J., and B. Amos.** 1995. GFP in plants. *TRENDS in Genetics* **11**:328-329.
  42. **Hernalsteens, J., F. Van Vliet, M. De Beuckeleer, A. Depicker, G. Engler, M. Lemmers, M. Holsters, M. Van Montagu, and J. Schell.** 1980. The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature* **287**:654-656.
  43. **Hollenberg, C., and G. Gellissen.** 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Current opinion in biotechnology* **8**:554-560.
  44. **Honda, Y., T. Matsuyama, T. Irie, T. Watanabe, and M. Kuwahara.** 2000. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current genetics* **37**:209-212.
  45. **Irie, T., Y. Honda, T. Hirano, T. Sato, H. Enei, T. Watanabe, and M. Kuwahara.** 2001. Stable transformation of *Pleurotus ostreatus* to hygromycin B resistance using *Lentinus edodes* GPD expression signals. *Applied microbiology and biotechnology* **56**:707-709.
  46. **Irie, T., Y. Honda, T. Watanabe, and M. Kuwahara.** 2001. Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied microbiology and biotechnology* **55**:566-570.
  47. **Jayakumar, T., E. Ramesh, and P. Geraldine.** 2006. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* **44**:1989-1996.
  48. **Johnston, J., C. Ward, and R. Kopito.** 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *The Journal of Cell Biology* **143**:1883-1898.

49. **Kay, R., A. Chan, M. Daly, and J. McPherson.** 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**:1299-1302.
50. **Kopito, R.** 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* **10**:524-530.
51. **Kunik, T., T. Tzfira, Y. Kapulnik, Y. Gafni, C. Dingwall, and V. Citovsky.** 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**:1871-1876.
52. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, and S. Borchert.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.
53. **Leclerque, A., H. Wan, A. Abschutz, S. Chen, G. Mitina, G. Zimmermann, and H. Schairer.** 2004. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Current genetics* **45**:111-119.
54. **Lee, L., and S. Gelvin.** 2008. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology* **146**:325-332.
55. **Lepetic, A., M. Seigelchifer, R. Arduino, J. Lazovski, F. Nacinovich, E. Sturba, and D. Stamboulian.** 1996. Novel recombinant HB vaccine produced by a high-level expression *Hansenula polymorpha* yeast system. *Clin Infect Dis* **23**:276.
56. **Li, G., R. Li, Q. Liu, Q. Wang, M. Chen, and B. Li.** 2006. A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms. *FEMS microbiology letters* **256**:203-208.
57. **Lorang, J., R. Tuori, J. Martinez, T. Sawyer, R. Redman, J. Rollins, T. Wolpert, K. Johnson, R. Rodriguez, and M. Dickman.** 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Am Soc Microbiol* **67**: 1987-1994
58. **Lugones, L., K. Scholtmeijer, R. Klotwijk, and J. Wessels.** 1999. Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. *Mol Microbiol* **32**:681-689.
59. **Ma, J., P. Drake, and P. Christou.** 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* **4**:794-805.
60. **McCullen, C., and A. Binns.** 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **22**:101-27.
61. **Michielse, C., P. Hooykaas, C. van den Hondel, and A. Ram.** 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics* **48**:1-17.
62. **Muller, S., T. Sandal, P. Kamp-Hansen, and H. Dalboge.** 1998. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**:1267-1283.
63. **Mullins, E., X. Chen, P. Romaine, R. Raina, D. Geiser, and S. Kang.** 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* **91**:173-180.
64. **Murata, H., T. Igasaki, K. Shishido, and M. Sunagawa.** 2006.

- Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* that produces commercially valuable fruit bodies, matsutake. *Mycoscience* **47**:228-231.
65. **Nevalainen, K., V. Te'o, and P. Bergquist.** 2005. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology* **23**:468-474.
  66. **Oberpichler, I., R. Rosen, A. Rasouly, M. Vugman, E. Ron, and T. Lamparter.** 2008. Light affects motility and infectivity of *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Microbiology* **10**:2020-2029.
  67. **Opletal, L., L. Jahodar, V. Chobot, P. Zdansky, J. Lukes, M. Bratova, D. Solichova, G. Blunden, C. Dacke, and A. Patel.** 1997. Evidence for the anti-hyperlipidaemic activity of the edible fungus *Pleurotus ostreatus*. *British Journal of Biomedical Science* **54**:240.
  68. **Pggeler, S., S. Masloff, B. Hoff, S. Mayrhofer, and U. K ck.** 2003. Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. *Current genetics* **43**:54-61.
  69. **Pardo, A., M. Hanif, M. Raudaskoski, and M. Gorfer.** 2002. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycological Research* **106**:132-137.
  70. **Park, S., and D. Kim.** 2004. Transformation of a filamentous fungus *Cryphonectria parasitica* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **9**:217-222.
  71. **Paulik, S., S. Svrcek, M. Huska, J. Mojzisova, A. Durove, and Z. Benisek.** 1992. The effect of fungal and yeast glucan and levamisole on the level of the cellular immune response in vivo and leukocyte phagocytic activity in mice. *Veterinarni medicina* **37**:675-685.
  72. **Peng, M., P. Lemke, and J. Shaw.** 1993. Improved conditions for protoplast formation and transformation of *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**:101-106.
  73. **Peng, M., N. Singh, and P. Lemke.** 1992. Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants. *Current Genetics* **22**:53-59.
  74. **Peng, R., Q. Yao, A. Xiong, Z. Cheng, and Y. Li.** 2006. Codon-modifications and an endoplasmic reticulum-targeting sequence additively enhance expression of an *Aspergillus* phytase gene in transgenic canola. *Plant Cell Reports* **25**:124-132.
  75. **Punt, P., N. van Biezen, A. Conesa, A. Albers, J. Mangnus, and C. van den Hondel.** 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology* **20**:200-206.
  76. **Rao, R., N. Allen, J. Hobbs, W. Alborn, H. Kirst, and J. Paschal.** 1983. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **24**:689-695.
  77. **Richter, L., Y. Thanavala, C. Arntzen, and H. Mason.** 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology* **18**:1167-1171.
  78. **Rolland, S., C. Jobic, M. Fevre, and C. Bruel.** 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Current genetics* **44**:164-171.
  79. **Rosso, M., Y. Li, N. Strizhov, B. Reiss, K. Dekker, and B. Weisshaar.** 2003. An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for



- flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* **53**:247-259.
80. **Sarangi, I., D. Ghosh, S. Bhutia, S. Mallick, and T. Maiti.** 2006. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology* **6**:1287-1297.
  81. **Schein, C., and M. Noteborn.** 1988. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/technology* **6**:291-294.
  82. **Scholtmeijer, K., H. Wosten, J. Springer, and J. Wessels.** 2001. Effect of introns and AT-rich sequences on expression of the bacterial hygromycin B resistance gene in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:481-483.
  83. **Sirover, M.** 1997. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *Journal of Cellular Biochemistry* **66**:133-140.
  84. **Stachel, S., B. Timmerman, and P. Zambryski.** 1986. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* **322**:706-712.
  85. **Sun, L., H. Cai, W. Xu, Y. Hu, and Z. Lin.** 2002. CaMV 35S promoter directs  $\beta$ -glucuronidase expression in *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus citrinopileatus*. *Molecular Biotechnology* **20**:239-244.
  86. **Sunagawa, M., and Y. Magae.** 2002. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. *FEMS microbiology letters* **211**:143-146.
  87. **Takahara, H., G. Tsuji, Y. Kubo, M. Yamamoto, K. Toyoda, Y. Inagaki, Y. Ichinose, and T. Shiraishi.** 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. *Journal of General Plant Pathology* **70**:93-96.
  88. **Thomas, J., A. Ayling, and F. Baneyx.** 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Applied biochemistry and biotechnology* **66**:197-238.
  89. **Tsuji, G., S. Fujii, N. Fujihara, C. Hirose, S. Tsuge, T. Shiraishi, and Y. Kubo.** 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of General Plant Pathology* **69**:230-239.
  90. **Tzfira, T., J. Li, B. Lacroix, and V. Citovsky.** 2004. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *TRENDS in Genetics* **20**:375-383.
  91. **Tzfira, T., M. Vaidya, and V. Citovsky.** 2001. VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *The EMBO Journal* **20**:3596-3607.
  92. **Villaverde, A., and M. Mar Carrio.** 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* **25**:1385-1395.
  93. **Wandelt, C., M. Khan, S. Craig, H. Schroeder, D. Spencer, and T. Higgins.** 1992. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *The Plant Journal* **2**:181-192.
  94. **Wang, H., J. Gao, and T. Ng.** 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus*

- ostreatus*. Biochemical and Biophysical Research Communications **275**:810-816.
95. **Wang, J., L. Guo, K. Zhang, Q. Wu, and J. Lin.** 2008. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Volvariella volvacea*. Bioresource Technology **99**:8524-8527.
  96. **Ward, D., and P. Zambryski.** 2001. The six functions of *Agrobacterium* VirE2. National Acad Sciences **98**: 385-386.
  97. **Williams, D., R. Van Frank, W. Muth, and J. Burnett.** 1982. Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. Science **215**:687-689.
  98. **Wolanin, P., P. Thomason, and J. Stock.** 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. Genome Biol **3**:3013.
  99. **Zhang, P., B. Xu, Y. Wang, Y. Li, Z. Qian, S. Tang, S. Huan, and S. Ren.** 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffeii*. Mycological Research **112**:943-949.
  100. **Zheng, G., Y. Yang, Q. Rao, Y. Lin, B. Zhang, and K. Wu.** 2006. Expression of bioactive human M-CSF soluble receptor in transgenic tobacco plants. Protein Expression and Purification **46**:367-373.
  101. **Zhong, Y., X. Wang, T. Wang, and Q. Jiang.** 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. Applied microbiology and biotechnology **73**:1348-1354.
  102. **Zupan, J., T. Muth, O. Draper, and P. Zambryski.** 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. The Plant Journal **23**:11-28.
  103. **Zusman, I., R. Reifen, O. Livni, P. Smirnoff, P. Gurevich, B. Sandler, A. Nyska, R. Gal, Y. Tendler, and Z. Madar.** 1997. Role of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in chemically induced colon cancer in rats fed corncob fiber treated with the fungus *Pleurotus ostreatus*. Anticancer Res **17**:2105-13.
  104. 郭俊毅. (2008) 食用菇異源基因表現系統之建立及其應用。國立台灣大學微生物與生化學研究所博士論文。
  105. 徐韻涵. (2008) 以農桿菌媒介轉形法進行金針菇表達系統之研究。國立台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文。