

書 報 研 讀

題目：A system to induce the deletion of genomic sequences using R/ *RS* site-specific recombination and the *Ac* transposon in transgenic rice plants

在轉殖水稻中利用 R/RS 特定位置之重組及 *Ac* 轉位子來誘導基因體序列缺失的系統

作者：**Y. Nakagawa, C. Machida, Y. Machida, K. Toriyama**

出處：Theoretical and Applied Genetics (2001) 102: 1136-1141

指導老師：胡凱康副教授，常玉強助理教授

報告學生：從逸姍

報告日期：90 年 11 月 29 日

報告時間：上午 10 時 10 分

報告地點：農藝館 112 室

一、摘要

在 *Zygosaccharomyces rouxii* 中，由 *R* 基因做出來的重組酵素 (Recombinase) 促成了兩個特定重組位置 (*RSs*) 間的相互重組作用，因而誘導出介於兩個位置之間的 DNA 片段的刪除或倒置。由 CaMV 35 S 啟動子所控制的 *R* 基因被引進到稻米 (*Oryza sativa*) 中。*R/RS* 特定位置刪除的研究最早是用帶有 *R* 基因基因轉殖稻米的癒合組織作實驗，利用短暫引進一種隱密的報導基因 (reporter gene)，也就是 β -glucuronidase (GUS)，一但兩個位置間發生了刪除情形，此報導基因就會表現。接著，把包含 *R* 基因的稻米與另一種基因轉殖稻米作雜交，也就是帶有包括一個在 T-DNA 間的 *RS* 序列，而另一個 *RS* 在被 *Ac* 轉換酵素作用後轉換到新位置的修飾後 *Ac*，即 (I-*RS*/d*Ac*-I-*RS*) 的 T-DNA。藉由對 F₂ 植株體細胞作 PCR 的分析，就可偵測到兩個 *RSs* 位置間的基因體序列 (genomic sequences) 是否成功的被刪除掉了。這些結果舉出了 *R/RS* 重組系統與 *Ac* 的結合產生稻米染色體刪除技術上的改進。

二、前言

為了分析真核生物染色體的結構與功能，及要處理龐大 DNA 片段，重組 DNA 技術的發展是十分重要的。至於此種技術在植物方面的發展，數種特定位置重組系統 (site-specific recombination system) 已被研究提出，如 Cre-*lox* 系統 (Qin *et al.* 1994; Vergunst *et al.* 1998)、*R-RS* 系統 (Onouchi *et al.* 1991, 1995)、及 FLP-FRT 系統 (Kilby *et al.* 1995; Lyznik *et al.* 1993)。藉由這些系統，染色體的刪除及轉位已在阿拉伯芥、煙草、及蕃茄中被證明 (Medberry *et al.* 1995; Osborne *et al.* 1995; Stuurman *et al.* 1996)。

在 *Zygosaccharomyces rouxii* 中，由 *R* 基因做出來的重組酵素 (Recombinase) 促成了兩個放在同一方位的特定重組位置 (*RSs*) 間的相互重組作用

(Araki et al. 1985, 1992)。在植物中，利用煙草懸浮細胞及阿拉伯芥作為材料，已證實出 R/RS 系統能達成刪除及轉位的目的，為了監測這些植物中 R/RS 重組事件是否發生，已設計出一種被阻隔的 β -glucuronidase (GUS) 報導基因，而有 R 基因參與的重組會誘導出此 GUS 基因的表現。

前人已提出一套特定重組位置以發展一種特定位置的染色體重組為目標，如 RS 及 lox，與玉米的轉位子 Ac 發生重組的系統。在此系統中，T-DNA 的構築中包含了兩個對位置有專一性的重組位置，其中之一被放置在有缺失的 Ac (dAc)，或稱為 Ds 內。有 Ac 轉位酵素來促進 Ds 的轉位應該帶著其中一個 RS 到一個新的基因體所在地，而另一個維持在原本 T-DNA 插入區中。把包含著轉位過的 Ds 及 T-DNA 的植株，其中基因序列是介於兩個特定重組位置之間的，與有表現重組酵素的植株作雜交，重組酵素的作用就是催化兩個重組位置間的重組及誘導染色體的重新排列。這種染色體重組的實驗在運用 Cre-lox 系統後已成功的在阿拉伯芥、煙草、及蕃茄被報告 (Medberry et al. 1995; Osborne et al. 1995; Stuurman et al. 1996.)。然而，利用 R/RS 系統成功的例子，至今尚未被報告出來。

為了要發展出一套相似的系統為利用 R/RS 重組來結合 Ac/Ds，作者構築了一個 (I-RS/dAc-I-RS) 的 T-DNA，其中包含了一個 RS 位置在 T-DNA 裡面，兩個 RSs 在缺失 Ac 片段內 (Machida et al. 1997)。在 (dAc-I-RS) 裡面的兩個 RS 位置是被置於相反的方位的，這麼做是為了讓 dAc-I-RS 在跳動轉位後，其中一個 RS 就會與在 dAc-I-RS 片段外的 T-DNA 區域上的 RS 有相同的方向。這個構築也包含了讓內核酶 (I-SceI) 進行切除的位置。此 (I-RS/dAc-I-RS) 的 T-DNA 曾經用於阿拉伯芥來決定 dAc-I-RS 轉位後的相對距離 (Machida et al. 1997.)。作者介紹了此相同的構築在稻米上，並記述了數種 dAc-I-RS 片段藉由 Ac 轉位酶轉位的植株的特徵。

在這篇研究報告中，作者把帶有轉位的 dAc-I-RS 的稻米植株與帶有 R 基因促成 R/RS 特定位置重組的植株作雜交，並以 F₂ 植株的體細胞，來檢測

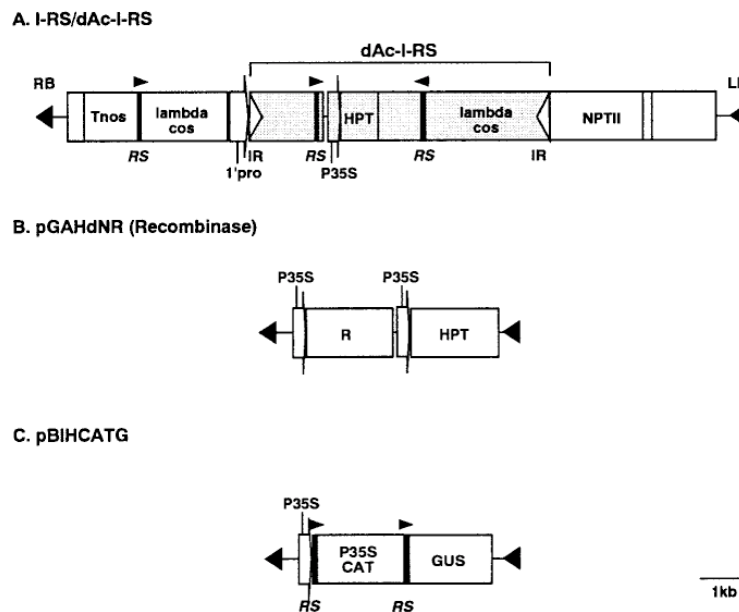
原本 T-DNA 內的 RS 與跳動的 dAc-I-RS 內 RS 之間是否發生刪除。經初步雜交試驗，作者實現了一個短暫的分析來確認質料中，用粒子槍送進被阻隔的 GUS 報導基因進入稻米組織細胞後的重組酵素活性。

三、材料與方法

植物與構築

稻米植株編號 #d5 有單一的一套 (I-RS/dAc-I-RS) T-DNA (Nakagawa et al. 2000)，其中包含了三個 RSs，如【圖一】所示。植株 #d5 與一個在 P35S 調控下帶有 Ac 轉位酶的植株作雜交，然後挑選出並記述特徵有跳動 dAc-I-RS 成分在獨立位置的數個 F₂ 植株 (Nakagawa et al. 2000)。此跳動子位置的確定在於利用熱不對稱性交錯的聚合酶連鎖反應 (Thermal Asymmetric Interlaced-Polymerase Chain Reaction，簡稱 TAIL-PCR) 定序出介於 dAc-I-RS 間的區域。

一稻米植株中 R 重組酵素的表現，是由於帶有被 P35S 所控制的 R 基因的 pGAHdNR (Onouchi et al. 1995)，藉著農桿菌媒介 (*Agrobacterium*-mediated) 的基因轉殖而製造出來的 (Nakagawa et al. 2000)。經過了對自交後裔進行南方式墨點法分析及分離分析後，確定了第 #Re-2 號植株包含了單一 copy 的 R 基因，而第 #Re-3 號植株含有兩個 copy 的 R 基因。將帶有跳動 dAc-I-RS 片段的植株當作母本，與帶有 R 基因的 #Re-2 植株作雜交，得到的 F₁ 經由分析後，選出了同時帶有跳動 dAc-I-RS 片段與 R 基因的植株再做自交使產生 F₂ 種子。這些 F₂ 種子就被拿來檢測兩個 RSs 間的缺失是否發生。



【圖一】A-C 此圖為 T-DNA 上 I-RS/dAc-I-RS (A), pGAHdNR (Recombinase) (B), 及 pBIHCATG (C)。RB: Right border, LB: Left border, P35S: CAMV 35S promoter 花椰菜嵌紋病毒 35S 啟動子, IR: inverted repeat, HPT: hygromycin phosphotransferase, RS 重組區域被 R 基因做的蛋白辨識, NPTII: neomycin phosphotransferase, 1'pro promoter 在 T-DNA 上, lambda cos: lambda phage 的 lambda DNA 片段含有"cos"的區域, Tnos 3': signal of nopaline synthase, CAT: chloramphenicol acetyltransferase, GUS: β -glucuronidase。RSs 的方向如箭頭所指。

以粒子槍撞擊稻米癒合組織的轉殖作為短暫的分析

癒合組織的誘導是來自於有 R 基因同源結合體的 #Re-2 與 #Re-3 植株種子的小盾板，誘導的方法是由 Wakita 等人所描述的 PDS-1000/He 粒子傳達系統 (BioRad)，把小盾板與質粒 pBIHCATG (Onouchi et al. 1995) 或 pBI221 (Jefferson 1987) 撞擊而來。20-50 個癒合組織分別用在這三種撞擊上，撞擊後的兩天，癒合組織再用來檢測 RSs 間的缺失是否發生。

質粒 pBIHCATG 包括一個被阻隔的 GUS 基因，此基因是位於有兩個 RSs 為邊界的 35S 啟動子與 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 之後，因此當兩個 RSs 之間發生了缺失後，CAT 基因也被刪除，而提供了 GUS 基

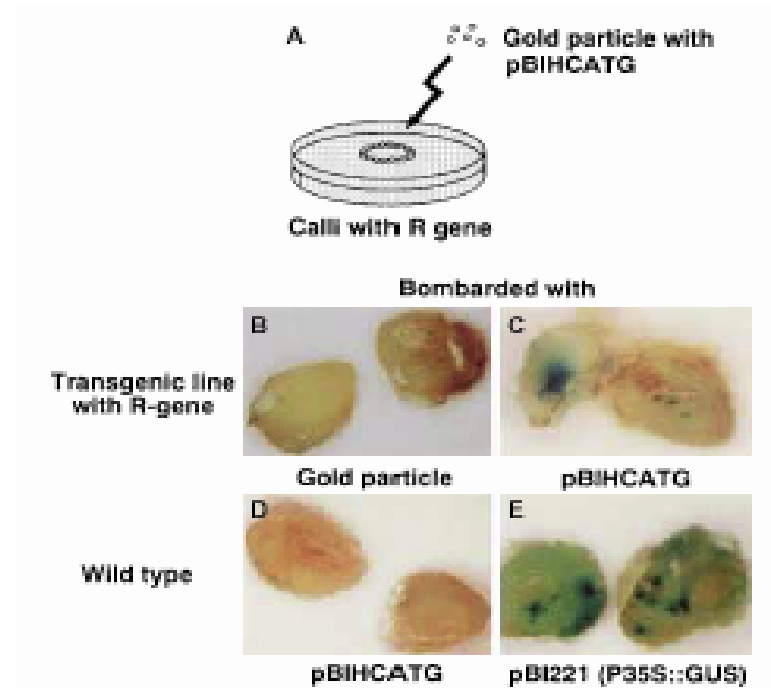
因的活化作用。GUS 的活性檢測是經由用 X-glucuronide 為受質的組織化學 GUS 分析法。

PCR 分析

基因體 DNA 是由種子長出的幼葉所分離出來，而 PCR 的執行方法如 Nakagawa 等人 (2000) 之敘述。dAc-I-RS 片段的檢測是利用兩段引子：AcG4178F (5'-GTGTCATGTGTGCTAGTAGA-3') 及 AcG4542R (5'-GGATGAAAACGGT- CGGTAAC-3')。R 基因的檢測則利用引子 R-fow (5'-CGTGTGCATGTATCGAG- CCT-3') 及 R-rev (5'-ATTTGTTGTGGGGGTACACG-3')。

為了要增加檢測兩個 RSs 間缺失的專一性與敏感度，作者執行了兩個步驟的 PCR，利用互相套疊的引子與 Z-tag 聚合酶。第一次 PCR 是在 98°C，5 秒下 denature 30 循環，然後在 68°C 下黏合及延伸 2 分鐘。第二次 PCR 也包括了在 98°C，5 秒下 denature 30 個循環，然而黏合及延伸是用第一次 PCR 產物的 1/25，在 68°C 下進行 20 秒。為了要估計葉細胞中缺失被誘發的百分比，吾人在第二次 PCR 執行用的是內部的引子。符合 RS 缺失結果的條帶，是以第二次 PCR 產物為探針的南方式墨點法分析檢測出來的。從第二次 PCR 產物中也重建出一個拷貝數的標記。這條條帶的強度是和葉細胞及一個拷貝數標記的一連串稀釋來做比較。引子的 5'-3' 的序列如下：a，CATGGAACAAGCGGATTTTCG 在 Ac 基因體；b，ACCTGCGTGCAATCCATCTT 在 neomycin phosphotransferase (NPT II) 基因；c，GTTAGCCTAAAGAAGCTCTAGG 在 Ac 基因體與 RS 的接合處；d，CCGCCACCAATTCCCGATCT 在 λ 序列與末端點 nopaline synthase (nos) 的接合處；e，CTATCGCCTTCTTGACTAGT 在 NPT II 基因；f，CTCATGATTTGTTG- CAGCAG 在 Ac 基因體；g，TCTTGCGTTGATGAATCTCGGG 在端點 nos 及 RS 之間；h，

TTGACGGATCTCTAGGACGCG 在花椰菜鑲嵌病毒 35S 啟動子 (P35S)。
以上引子的位置如【圖三】。



【圖二】A-E 在水稻癒合組織上做的短暫 GUS 來檢測 R/RS 的重組。A，以粒子槍把質體送進水稻癒合組織的圖示。B，只以粒子槍把 gold particle 送進了結合 R 基因的轉殖癒合組織 (#Re-2)，無任何藍點顯示。C，以粒子槍送進 pBIHCATG (含被阻隔的 GUS 基因) 到有 R 基因的癒合組織 (#Re-2)，出現了代表 GUS 活性的藍點。D，野生型的癒合組織以粒子槍送進質體 pBIHCATG，無藍點產生。E，野生型癒合組織以粒子槍送進質體 pBI221 (P35S::GUS)，顯現出許多藍點。

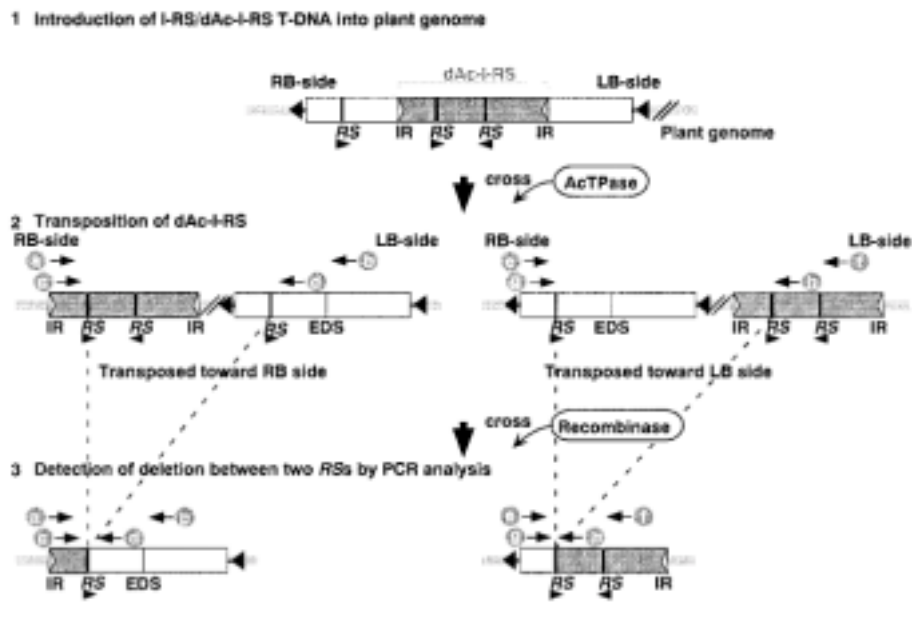
四、結果

檢測稻米懸浮液中 R/RS 重組的短暫表現試驗

為了調查帶有 R 基因的轉殖稻米(植株#Re-2 及#Re-3)中重組酵素的活性，作者利用的是一個被阻隔 (cryptic) 的 GUS 報導基因 (pBIHCATG)，其設計的目的是用在做出重組酵素，促進介於 RSs 間 CAT 基因的刪除而出現 P35S-GUS 結構，並有 GUS 表現出來。當由植株#Re-2 及#Re-3 的種子中誘導出來的懸浮液中，經粒子槍送進一個被阻隔的報導基因，GUS 的活性就會被觀察到成一個紫藍色點 (如【圖二】)。在 170 個#Re-2 癒合組織

中觀察到 5 個這樣的藍點，而 130 個#Re-3 癒合組織中僅有一個藍點被觀察到。野生型的癒合組織在粒子槍送進被阻隔 GUS 基因後則沒有任何藍點顯現。未使用粒子槍的癒合組織，及只被粒子槍送進 gold particles 的癒合組織則沒有顯現任何的活性 GUS。依據這些結果，植株#Re-2 及#Re-3 具有重組酵素活性，且 R/RS 的重組促使刪除作用也的確在稻米細胞中發生。

當野生型的癒合組織經粒子槍送進含有 P35S-GUS 的 pBI221 後，120 個之中看到 44 個有藍點【圖二】。臆測相同的基因轉殖效率，很有可能在引進隱密 GUS 基因的稻米細胞中，兩個 RSs 之間發生刪除情形的機率約 5%。作者最後決定用#Re-2 植株來做進一步的雜交試驗因為其含有一個拷貝數的 R 基因，且比含有兩個拷貝數的 R 基因的#Re-2 植株產生較多的藍點。



【圖三】利用 I-RS/dAc-I-RS T-DNA 來誘導 R/RS 缺失之流程圖及以 PCR 分析來檢測兩個 RSs 間缺失的情形。轉位子 dAc-I-RS 由於與表現轉位酵素 (AcTPase) 的轉殖株雜交而跳動。R/RS 的缺失預期將發生在 T-DNA 上的 RS 與轉位子 dAc-I-RS 上另一個有相同方向的 RS 之間。兩次步驟的 PCR 用來檢測兩個 RSs 間的缺失。當轉位子往 RB 方向跳動時，第一次 PCR

用引子 a 和 b，而第二次 PCR 用的是引子 c 和 d，放大的結果是一條 300 bp 的條帶。當轉位子往 LB 方向跳動時，第一次 PCR 用引子 e 和 f，而第二次 PCR 用的是引子 g 和 h，放大的結果是一條 200 bp 的條帶。箭頭 (*Arrowheads*) 是指 RS 的方位，帶有字母的箭頭代表了引子的位置。其餘的縮寫都與【圖一】中的一樣。

藉由轉殖稻米細胞的雜交來誘導細胞體 R/RS 的重組

作者把帶有 R 基因的植株 (#Re-2) 與每行帶有轉位子 dAc-I-RS (k2-1, k4-1, k4-4, 及 k2-2) 的轉殖稻米植株做雜交。轉位子 dAc-I-RS 的位置藉由定序已決定出來。這些植株中轉位的相對距離的變化從 2.6 到 7.4 kbp。轉植株 k2-2 的轉位子 dAc-I-RS 朝 LB 邊跳動，而其餘的植株轉位子朝 RB 邊跳動。dAc-I-RS 的方位與原本的 I-RS/dAc-I-RS 是一樣的。R/RS 促使的刪除理應在兩個同方位的 RSs 間才會發生。轉位子 dAc-I-RS 行中兩個相同方位的 RSs 間的距離為 7.3-10.1 kbp【Table.1】。【圖三】的圖表是指預期中的 R/RS 重組作用，及藉著 PCR 分析來檢測缺失。正如意料的，當 dAc-I-RS 往 RB 方向跳動，一旦 R/RS 刪除發生後，一個放大的 300-bp 條帶會出現，而當 dAc-I-RS 往 LB 方向跳動時，200-bp 的條帶會出現。在 82 個 k2-2 (dAc-I-RS 往 LB 方向跳動) × #Re-2 的 F₂ 植株中，有三株出現 200-bp 條帶，如【圖四】中第 7 行所示，然而大部份的植株並未出現任何條帶 (【圖四】的第 8 行)，兩個親本也未出現任何條帶 (【圖四】，第 5、第 6 行)。在另一方面，從 k2-2, k4-1, k4-4 (dAc-I-RS 往 RB 方向跳動) F₂ 世代的某些植株中可偵測到一個 300-bp 條帶。【圖四】顯示出了 k2-1 的兩個個別 F₂ 後代的代表性結果，其中之一有一條 300 的條帶 (第 3, 第 4 行)。其親本也未產生任何條帶 (【圖四】，第 1、第 2 行)。分析 200-bp 及 300-bp 片段的核苷酸序列，可知重組作用如同預料的，正

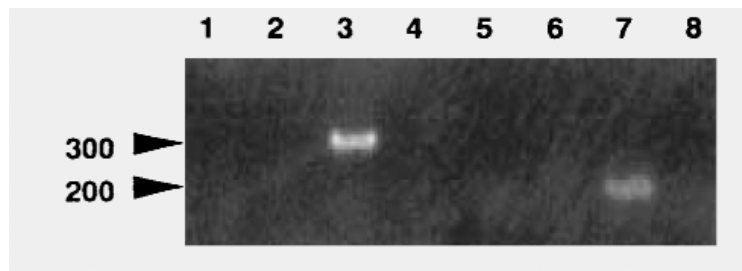
確的發生在兩個 RSs 之間。這些結果都顯示了，缺失的確發生在跳動子 dAc-I-RS 內的 RS 與原本 T-DNA 上的 RS 之間。植株 k2-1，k4-1，及 k4-4 分別含有基因體序列 2.8kbp，1.0kbp，及 0.1kbp。因此，介於基因體序列上兩個 RSs 間的缺失確實發生了。

【Table.1】裡總結了有 RS 缺失的 F₂ 植株數目。總體來說，573 個 F₂ 植株經測試後有 25 個發現有 RS 缺失。在這些 F₂ 植株中 R 基因的出現也由 PCR 分析出來。所有顯現 RS 缺失的植株都顯露出包含了 R 基因(資料未刊載)。檢視 RS 缺失的研究有可能源自於 F₂ 植株的體細胞或者是 F₁ 植株的生殖細胞。然而，有 RS 缺失的 F₂ 植株經南方式墨點法分析後，作者並沒有觀察到任何由生殖細胞而來的條帶(資料未刊載)。因此，缺失發生的位置是源自於 F₂ 植株的體細胞而非 F₁ 的生殖細胞。

為了要估計在體細胞中誘發缺失的百分比，作者以南方式墨點法來比較 k4-1 F₂ 植株葉細胞的 PCR 產物，300-bp 片段，與重新構築的模板的不同。PCR 產物的條帶的強度隨著植物種類不同而異，而最強的條帶與從一個拷貝數的 1:10000 稀釋液的強度信號一樣(資料未刊載)。因此來做估計，RS 缺失發生的機率最多約為測試的 F₂ 植株葉細胞的 0.01%。

【Table. 1】在有轉位子 dAc-I-RS 品系中兩個 RSs 間的距離，及雜交轉位子 dAc-I-RS 品系(及母本)和重組酵素品系(#Re-2)所得的 F₁ 植株後，F₂ 後裔中表現有 RS 缺失的 F₂ 植株數目。

dAc-I-RS line	Direction of transposition	Distance between two RSs (kbp)	F ₂ plants tested	Number of F ₂ plants showing RS deletion
k2-2	LB side	7.4	82	3
k2-1	RB side	10.1	308	5
k4-1		8.3	151	16
k4-4		7.3	32	1
Total			573	25



【圖四】藉 PCR 分析來檢測水稻葉片中 R/RS 的缺失。300 bp 條帶表示當 R/RS 缺失時轉位子往 RB 方向跳動，而 200 bp 的條帶表示轉位子往 LB 方向跳動。*Lane 1*：k2-1（轉位子往 RB 跳動），*Lane 2*：帶有 R 基因的 #Re-2，*Lane 3*：k2-1 × #Re-2 的一個 F₂ 個體；一個 300 bp 條帶表示了 R/RS 發生缺失，*Lane 4*：沒有檢測到缺失的一個 F₂ 個體，*Lane 5*：k2-2（轉位子往 LB 跳動），*Lane 6*：#Re-2，*Lane 7*：#d5-k2-2 × #Re-2 的一個 F₂ 後裔，*Lane 8*：沒有檢測到缺失的 F₂ 後裔。這些條帶的顯現是靠 ethidium bromide 染膠片而來。

五、討論

由 *Z. rouxii* 的 R 基因轉譯而來的重組酵素會促進兩個 RSs 間的相互重組作用，並促使介於 RSs 間的 DNA 片段產生刪除或倒置。這種 R/RS 重組已被成功的誘發在煙草及阿拉伯芥上（Onouchi et al. 1995）。就目前的研究，作者也證實了 R/RS 重組也能在稻米中被誘發。以被阻隔的 GUS 基因來做短暫的檢測對決定稻米細胞的重組酵素活性也是很有效率的。

在煙草及阿拉伯芥的研究上，相同的被阻隔 GUS 報導基因也同樣被用來預測 R/RS 重組的發生（Onouchi et al. 1991, 1995）。帶有被阻隔 GUS 基因的煙草 BY-2 細胞被用來當作目標細胞，傳送進一個帶有 P35S 及 R 基因的質體（pGAHdNR）。Onouchi 等人（1991）觀察到有納入 R 基因的植物細胞中大約有 40% 有 RS 缺失。目前對水稻的研究方面，以粒子槍引進 GUS 基因並有 R 基因合併的水稻細胞，作者估計約有 5% 的水稻在 RSs 間有缺失。此發生之頻率與之前的煙草研究相比，水稻的比例較低，雖然在目標細胞與基因短暫傳送的轉換基因是相反的。根據藍點的數目，植株

#Re-2 比#Re-3 有較高的重組酵素活性。未來很有可能在會因有更強的 R 基因表現而加強水稻 R/RS 的重組。

阻隔報導基因也隨著與帶有 R 基因的轉植株雜交被引入阿拉伯芥(Onouchi et al. 1995)，在 F₂ 植株中獲得體細胞與生殖細胞兩者的重組。所有用來實驗的 F₂ 植株中，顯示有體細胞與生殖細胞重組的比率，分別從 0 到 62.5% 及從 0 到 2.4%，視轉植株數而定。轉植株中，在生殖細胞發生重組的植株數與在體細胞發生的最高比率是 38/745，也就是 5%。而在目前，作者觀察到的是 573 株有轉位子 dAc-I-RS 的轉殖行與帶有 R 基因的轉殖行進行雜交後，有 25 株有 R/RS 重組。這個研究結果很有可能是 RS 缺失發生在水稻葉子的體細胞內。按照之前研究阿拉伯芥生殖細胞與體細胞的比例，有必要再做更多的研究去探討由生殖細胞重組的 F₂ 植株數量。現今正在進行的研究是藉由篩選 F₃ 族群來找出哪些植株是經歷了生殖細胞的 R/RS 缺失。

R/RS 重組誘導缺失或倒置。在目前的研究，作者把焦點集中在缺失作用因為其目標是在誘導水稻染色體大段的刪除，因此作者並未做有關可能發生在水稻細胞中因重組而倒置的實驗。

過去已被報導用 Cre-lox 為特定位置重組系統，來實現結合特定位置重組及 Ac/Ds 系統去誘導染色體重新排列的策略。也有人觀察到了蕃茄中體細胞與生殖細胞有 130-kbp 的片段進行倒置 (Stuurman et al. 1996)，阿拉伯芥有高達 16.5-cM (Osbone et al. 1995)，及在煙草有將近 10-cM (Medberry et al. 1995)。然而，缺失的突變株在這種系統下尚未被報導出來。作者的結論就指出了，R/RS 重組系統與 Ac 轉位子的結合可以用來產生水稻染色體的刪除。

在植株#d5 上原先 T-DNA 結合的位置已經由 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 定位出來 (Nakagawa et al. 2000)。大多數有轉位子 dAc-I-RS 的株行的特徵是與原本 T-DNA 的位置緊密結合的，就如同根據

先前報告指出 Ac 有效率的轉位到鄰近的區域 (Machida et al. 1997)。此實驗中兩個 RSs 間的相對距離最多有 10.1-kbp。作者發現有些行株的 dAc-I-RS 轉位到新位置時，與原本 T-DNA 位置只有微弱的連結或甚至沒有連結在一起 (Nakagawa et al. 2000)。作者現在正嘗試要檢視兩個遠距 RSs 間大區域染色體的缺失。此實驗用的(I-RS/dAc-I-RS) T-DNA 包含了 I-SceI，因此染色體上兩個 RSs 序列間的物理距離可以被正確的決定出來 (Machida et al. 1997)。因此這個有 R/RS 系統媒介在有 dAc-I-RS 轉位的水稻植株，對於系統上檢驗染色體的缺失是十分有幫助的。

六、謝誌

這項研究是由” Research for the future” Program of the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS=RFTF97L00601) 所贊助。Y. Nakagawa 先生是 JSPS 日本青年科學家獎學金得主。

七、參考文獻

Araki H, Jearnpipatkul A, Tatsumi H, Sakurai T, Usio K, Muta T, Oshima Y (1985) Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. *J Mol Biol* 182:191–203.

Araki H, Nakanishi N, Evans BR, Matsuzaki H, Jayaram M, Oshima Y (1992) Site-specific Recombinase, R, encoded by yeast plasmid pSR1. *J Mol Biol* 225:25–37.

Izawa, T., Miyazaki, C., Yamamoto, M., Terada, R., Iida, S. and Shimamoto, K. (1991) Introduction and transposition of the maize transposable element Ac in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Biol.* 227:391-396.

Izawa, T., Ohnishi, T., Nakano, T., Ishida, N., Enoki, H., Hashimoto, H., Oti, K., Terada, R., Wu, C., Miyazaki, H., Endo, T., Iida, S., and Shimamoto, K., (1997) Transposon tagging in rice. *Plant Mol. Biol.* 35:219-229.

- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387–405.
- Kilby NJ, Davies GJ, Snaith MR, Murray JAH (1995) FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *Plant J* 8:637–652.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier R (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8:457–463.
- Lyznik LA, Mitchell JC, Hirayama L, Hodges TK (1993) Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res* 21:969–975.
- Machida C, Onouchi H, Koizumi J, Hamada S, Semiarti E, Torikai S, Machida Y (1997) Characterization of the transposition pattern of the *Ac* element in *Arabidopsis thaliana* using endonuclease I-*Sce*I. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8675–8680.
- Medberry SL, Dale E, Qin M, Ow DW (1995) Intra-chromosomal rearrangements generated by Cre-*lox* site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 23:485–490.
- Nakagawa Y, Machida C, Machida Y, Toriyama K (2000) Frequency and pattern of transposition of the maize transposable element *Ds* in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* 41:733–742.
- Onouchi H, Yokoi K, Machida C, Matsuzaki H, Oshima Y, Matsuoka K, Nakamura K, Machida Y (1991) Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res* 23: 6373–6378.
- Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, Machida Y, Machida C (1995) Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 247:653–660.
- Osborne BI, Wirtz U, Baker B (1995) A system for insertional mutagenesis and chromosomal rearrangement using the *Ds* transposon and Cre-*lox*. *Plant J* 7:687–701.
- Qin M, Bayley C, Stockton T, Ow DW (1994) Cre recombinasemediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci*

USA 91:1706–1710.

Stuurman J, Vroomen MJ, Nijkamp HJJ, van Haaren MJJ (1996) Single-site manipulation of tomato chromosomes *in vitro* and *in vivo* using Cre-lox site-specific recombination. *Plant Mol Biol* 32:901–913.

Vergunst AC, Hooykaas PJJ (1998) Cre/lox-mediated site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of *cre*. *Plant Mol Biol* 38:393–406.

Wakita Y, Otani M, Shimada T (1998) Co-integration, co-expression and co-segregation of an unlinked selectable marker gene and *NtFAD3* gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment. *Genes Genet Syst* 73:219–226.