

混合不同葉綠體基因轉殖載體以基因槍法 共同轉殖基因到甘藍葉綠體

陳立德¹⁾ 曾夢蛟²⁾

關鍵字: 基因槍、葉綠體、共同基因轉殖

摘要: 本研究分別將熱休克蛋白 (heat shock proteins cognate, HSC); 蘇力菌殺蟲晶體蛋白 (Bt); 超氧化歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 與過氧化氫酵素 (catalase, CAT) 基因構築到莖苔屬蔬菜葉綠體轉殖載體, 並同時混合四種不同葉綠體基因轉殖載體 (*bt*、*hsc70*、*cat*、*sod*), 利用基因槍轉移到`初秋`甘藍葉綠體中。以 PCR、南方墨點與北方墨點分析三棵轉植株顯示, 一株植株同時具有二種基因 (*bt*、*cat78*), 並可轉錄出 *bt* 及 *cat78* 之 mRNA; 一株只有一種基因 (*cat78*), 一株則不帶任何轉殖基因。將含有 *bt* 基因的轉植株餵食小菜蛾幼蟲有明顯的殺蟲效果。

前 言

近年來的轉殖植物衍生出一些問題; 目標基因藉由花粉的飛散, 污染了鄰近的雜草, 使雜草能抵抗殺草劑, 轉殖植物的有毒花粉 (蘇力菌晶體蛋白) 危害非目標昆蟲, 以及目標蛋白質的產量過低等等, 皆影響基因轉殖作物的商品化; 然而, 葉綠體基因轉殖技術的開發為以上的問題, 提供了一個解決的方法。

植物葉綠體基因轉移的優點為: 1) 葉綠體的轉殖基因屬母系遺傳, 轉殖基因不會隨著花粉而散播, 2) 植物細胞含多套的葉綠體基因組, 有助於外來基因大量表現, 3) 不會有基因轉移的 gene silence 及 position effect, 4) 較細胞核基因轉移穩定 (Bock, 2001; Daniell *et al.*, 2001a, 2001b); 其缺點為: 1) 轉殖方法不穩定, 基因槍每次打擊都不同, 2) 與農桿菌感染的培植體比較, 需要花較多時間再生, 3) 需要花較多時間, 才能獲得多數轉殖基因的葉綠體, 4) 葉綠體轉殖目前並沒有通用轉殖載體 (universal transformation vector)。

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系教授, 通訊作者。

蘇力菌殺蟲晶體蛋白 (Bt) 具有殺蟲的效果 (Perlak *et al.*, 1990; 1991)；超氧化歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酵素 (catalase, CAT)，能增加植物抗逆境的能力 (Inzé and Van Montagu, 1995)；熱休克蛋白 (heat shock protein, HSP)，與植物耐高溫有密切的關係 (Hendrick and Hartl, 1993)。本研究即將上述四種基因共同轉移到甘藍的葉綠體，由於一個植物細胞含有多套的葉綠體基因組，期望能獲得可同時抗逆境、耐高溫及抗蟲的轉殖植株。

材料與方法

一、植物材料

本實驗以‘初秋’品種之甘藍 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) 作為葉綠體基因轉殖的試驗材料。無菌播種為，將適量的甘藍種子倒入已滅菌過的 25 ml 小空瓶中，以 70% 酒精劇烈振盪 1 分鐘，以無菌水清洗 1 次；將商業漂白劑 5% Clorox 稀釋 1/3 加入小空瓶中，劇烈振盪 1 分鐘，以無菌水清洗 1 次；將漂白劑稀釋 1/2 加入甘藍的小空瓶中，振盪消毒 20 分鐘，再以無菌水洗滌三次。將表面滅菌之種子播種於含 3 % 蔗糖與 1 % 洋菜膠 (agar) 的 1/2 MS 基本培養基中，培養於 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ， $150\ \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ ，16 小時光週期之環境。

二、轉殖基因之種類

本實驗作為甘藍葉綠體基因轉移之基因計有：1. 蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因 (*cryIA(b)*, *bt*) (國立中興大學分子生物研究所陳良築教授所贈)：以 16S ribosomal RNA 啟動子 (*prrn*) *rbc S* 為啟動子，以光系統 II 反應中心 D1 蛋白基因 (*psbA*) 的 3' 核酸序列為終結子的 pASCCBt (本研究室劉程煒學長構築) (劉, 2003)；2. 由番茄中篩選出的熱休克蛋白基因 (*hsc70-2*) (原名 pSHC70 或 pAHSC70 (Lin *et al.*, 1991)，國立清華大學生命科學所林彩雲博士所贈)：以 *prrn* 為啟動子，以 *psbA* 的 3' 核酸序列為終結子的 pASCCHSC (本研究室陳志宏學長構築) (陳, 2004)；3. 由‘濱綠’結球白菜中篩選出的超氧化歧化酵素基因 (本研究室尤進欽學長選殖)：以 *prrn* 為啟動子，以 *psbA* 的 3' 核酸序列為終結子的葉綠體轉殖載體 pASCCSOD (本研究室劉程煒學長構築) (劉, 2003)；4. 由‘濱綠’結球白菜中篩選出的過氧化氫酵素基因 (*cat78*) (本研究室尤進欽學長選殖)：以 *prrn* 為啟動子，以 *psbA* 的 3' 核酸序列為終結子的葉綠體轉殖載體 pASCCCAT (本研究室陳志宏學長構築) (陳, 2004)，共四種基因。

三、基因轉殖之基因槍法

(一)、基因載體 (carrier) 備製

將金粒子或鎢粒子分裝 50 mg，先以殺菌釜滅菌，再以 100 % 之酒精 1 ml 清洗 50 mg 的金粒子或鎢粒子三次，最後以無菌水 1 ml 清洗三次去除上清液，加入 1 ml 無菌水分裝 20 管，每一管平均 2.5 mg 金粒子或鎢粒子。

(二)、混合 DNA 與基因載體

將 15 μ l 的目標 DNA 與 50 μ l 2.5 M CaCl_2 , 20 μ l 0.1M spermidine 及備製的粒子在室溫振盪 30 分鐘，加入 200 μ l 無水酒精以 8,000 rpm (Sigma 2K15, rotor 12145) 洗滌三次，去除上清液加入 40-50 μ l 無水酒精，保存在 -20°C 的冰罐中等候槍擊。

(三)、基因轉移

選用 Biolistic® -PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad) 的機型，槍擊時將本葉、子葉、下胚軸等置於培養皿中心半徑約 2 公分的同心圓中，將培植體置於槍口下方之穴隔中槍擊，槍即時以幫浦將槍擊室內抽成部分真空 (28-29 in Hg)，待氬氣累積至 1,100 或 1,350 psi 時便擊發，每次槍擊時約有 0.5 mg 的金粒子或鎢粒子，並帶有 3 μ g 之目標 DNA。隨後將槍擊完的培植體放入陰暗處避光 3 天，再轉放再生培養基。

(四)、植株再生

將消毒過後的甘藍種子播種於 1/2 MS 培養基中。取發芽 6 天後的下胚軸切成適當大小，以及成熟幼葉，先在 L1 再生培養基 (MS 基底培養基含 0.05 ppm picloram, 0.5 ppm BA) 預培養 1 周；經基因槍處理後，放置 L1 再生培養基，同時將抗生素 spectinomycin 由 1~5 ppm 的慢慢改變，之後再換成 L2 發根培養基 (MS 基底培養基含 1 ppm NAA) 上誘導發根並予以健化，最後移至瓶外定植培養。

四、轉殖植株 DNA、RNA 之萃取及操作

E. coli 質體的萃取、DNA 片段的回收及黏接、*E. coli* 宿主勝任細胞 (competent cell) 的備製、質體轉形作用、探針備製、植物染色體 DNA 及 RNA 的萃取方法皆參考陳 (2004) 的方法。

五、聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

利用 PCR 技術複製構築基因片段或用以偵測轉殖基因是否進入轉殖甘藍中，反應時置於 DNA 聚合連鎖反應器 (Peltier Thermal Cycler, PTC-200; MJ Research, INC.) 中。各基因偵測方式分述如下：

所有的反應皆利用 *Taq* DNA polymerase (5 U)(Viogene)、10 x buffer (1 x)、dNTP (0.2 mM)、引子濃度 1 μ M，再加入去離子水，使最終體積為 25 μ l。偵測 *aadA* 基因是以目標基因為範本，並加入引子分別為 5' CAGACAATCGGCTGCTCTGAT 3'、5' TGCGATGTTT CGCTTGGTGGT 3'，可產生出 0.8 kb 片段，反應的流程為 95°C、5 分鐘，1 個 cycle，95°C、1 分鐘，60°C、1 分鐘，72°C、30 秒，35 個 cycle，再進行 72°C、1 分鐘。

偵測 *hsc* 基因是以目標基因為範本，以 *hsc70* 基因上第 1033-1948 設計引子分別為 5' GGCTCCACTAGAATCCCAAAAGTTC3'、5' CCACCTCCTCAATCTTAGGACCAGC3'，可複製出 *hsc70* 羧基端 916 bp 片段。反應的流程為 95°C、5 分鐘，1 個 cycle，95°C、1 分鐘，60°C、1 分鐘，72°C、30 秒，35 個 cycle，再進行 72°C、45 秒。以 *hsc70* 基因上第 742-1948 設計引子分別為 5' GAGGTGAAGGCTACTGCTGGAG3'、5' CCACCTCCTCAATCTTAGGACCAGC 3'，可複製出 *hsc70* 羧基端 1206 bp 片段；反應的流程為 95°C 5 分鐘，1

個 cycle, 95°C、1 分鐘, 61°C、1 分鐘, 72°C、45 秒, 35 個 cycle, 再進行 72°C、1 分鐘。偵測 *Bt* 基因是以目標基因為範本, 偵測 *Bt* 基因的引子分別為 5'CCCGGGTGGTCAGTCCC TTCCATGGATAAC 3'及 5'CGACGGCCCGGAATTTCGATCT CACTCAAC 3'; 反應的流程為 95°C、5 分鐘, 1 個 cycle, 95°C、1 分鐘, 55°C、1 分鐘, 72°C、45 秒, 35 個 cycle, 再進行 72°C、1 分鐘。

偵測 *cat* 基因是以目標基因為範本, 偵測 *cat* 基因的引子分別為 5' GCAGCCATGGAT CCAT ACAAGCACCGCCCG 3'及 5' GCTTTC TTCCTCGGAGCTCCTT ACATGCTC 3'; 反應的流程為 95°C 5 分鐘, 1 個 cycle, 95°C、1 分鐘, 50.5°C、45 秒, 72°C、1 分鐘, 35 個 cycle。偵測 *sod* 基因是以目標基因為範本, 偵測 *sod* 基因的引子分別為 5'GAATGGTG AAGGCCGTCGCAGTT3'及 5' GAAACCAGCAAAGCTAACGGCAGGC 3'; 反應的流程為 95°C 5 分鐘, 1 個 cycle, 95°C、1 分鐘, 58°C、1 分鐘, 72°C、45 秒, 35 個 cycle。

偵測重組區間與篩選基因的片段以目標基因為範本, 引子分別為 5' GCAGCC ATGGA TCCATACAAGCACCGCCCG 3'及 5' GCTTTC TTCCTCGGAGCTCCTTA CATGCTC 3'; 反應的流程為 95°C、5 分鐘, 1 個 cycle, 95°C、30 秒, 60°C、45 秒, 72°C、1 分鐘, 35 個 cycle。反應完畢後, 取 10-20 μ l 最終產物於 1.0% 之洋菜膠上進行電泳分析。

六、南方墨點法

取轉殖植物的葉片 DNA 30 μ g, 經不同限制酵素進行剪切。經 1% 洋菜瓊脂膠體電泳分離。首先將膠體以 10 ml denaturation solution (0.5 M NaCl, 0.2 M NaOH) 輕輕振盪 30 分鐘, 再換至 renature solution (1.5 M NaCl, 1.0 M Tris-HCl, pH 7.4) 輕輕振盪 30 分鐘; 以 10X SSC 潤濕 DNA 轉漬膜 (Zeta-Probe[®] GT Blotting Membranes, BIO-RAD), 再以 Posi Blot[™] Pressure Blotter (Stratagene) 將 DNA 轉移至 DNA 轉漬膜。將轉漬膜加入待完全乾燥後利用紫外光連接器 (UV-cross-Linker) 強化 DNA 與濾膜結合。

將濾膜以 2X SSC 潤濕後置入雜交管內, 加入 5 ml prehybridization solution (0.25 M Na₂HPO₄ pH 7.2, 7% SDS), 於 65°C 進行 1 小時的 prehybridization, 更新 hybridization solution (0.25 M Na₂HPO₄ pH 7.2, 7% SDS) 10 ml, 加入經變性處理的探針, 於 65°C 下進行雜交反應, 14 小時以上。以 low stringency wash buffer (20 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 5% SDS) 於 65°C 下清洗濾膜 10 分鐘二次, 再以 high stringency wash buffer (20 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 1% SDS) 於 65°C 下清洗 5 分鐘二次。將清洗完成之濾膜陰乾, 以塑膠袋密封, 再以 X 光片壓片, 依放射線的強度調整沖洗之時間。

七、北方墨點法

製備含有 2% formaldehyde 之 1.2% 的洋菜瓊脂膠體: 取 1.2 g agarose 溶於 85 ml DEPC H₂O, 加入 10 ml 之 10X MOPS buffer (0.2 M MOPS, 0.05 M NaOAc, 0.01 M EDTA, pH 7.0) 及 5.4 ml 之 37% formaldehyde, 取 20 μ g 的 total RNA 樣品, 加入 14.4 μ l loading buffer (8 μ l formamide, 1.6 μ l 10X MOPS buffer, 2.8 μ l 37% formaldehyde, 2 μ l 0.05% EtBr) 於樣品中, 再加入 2 μ l RNA formaldehyde loading dye, 置於 70°C 中 10 分鐘使之變性, 將處理好的樣

品以 50 伏特進行電泳，待電泳完畢後約 1 小時，以 50 mM NaOH 浸泡膠片 30 分鐘，再以 10X SSC 處理 30 分鐘。將預先剪好的濾膜先浸潤於 10X SSC，再以 Posi Blot™ Pressure Blotter (Stratagene) 將 RNA 轉移至轉漬膜上，再將此濾膜以 2X SSC 與 0.1% SDS 浸濕，洗去雜質，待完全乾燥後利用紫外光連接器 (UV-cross-Linker) 強化 RNA 與濾膜結合。將經過轉漬的濾膜裝入雜交管內，加入 5 ml prehybridization buffer，在雜交箱中以 65°C 預先雜交半小時，更新雜交緩衝液 (同 prehybridization buffer) 10 ml 後，於雜交管中加入已製備完成的 RNA 探針，再置於 65°C 的雜交箱內反應 16-24 小時。雜交反應完成後，去除反應溶液，依序以清洗液 I (同南方墨點法) 及清洗液 II (同南方墨點法) 各自清洗濾膜 30 分鐘兩次。清洗完成之濾膜陰乾後，以 X 光片壓片，依照放射線強度調整沖洗的時間。

八、餵食小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 幼蟲處理

選取轉殖植株與對照植株葉片，分別置入底部鋪設濕潤 3MM paper 之保鮮盒中，並於每盒中放入小菜蛾幼蟲 15 隻，調查 3 天後小菜蛾幼蟲之生長狀態與葉片被啃食之情形。

結 果

一、葉綠體基因轉殖植株之再生

本研究將個別帶有 *bt*、*hsc70*、*sod62*、*cat78* 基因的葉綠體轉殖載體利用基因槍的方式轉殖到「初秋」甘藍的下胚軸中，藉由葉綠體特殊啟動子 *prrm* 在轉殖植株中大量表現外源基因。在實驗中發現，利用 5 ppm 的抗生素 spectinomycin 能有效的區別轉殖植株與未轉殖植株，故以 5 ppm spectinomycin 為篩選植株的標準。經過基因槍轟擊的下胚軸暗處理三天後，換到 L1 再生培養基約兩週，之後再換到含有 5 ppm spectinomycin 的 L1 培養基篩選三個月；將帶有再生綠色芽梢的下胚軸換到含有 1 ppm spectinomycin 的 L1 培養基讓芽梢抽長，約三週；將抽長的芽梢切下換到含有 2 ppm spectinomycin 的發根培養基中發根皆篩選，約三週可發根；將發根完全的轉殖植株換到含有 5 ppm spectinomycin 的 1/2 MS 健化培養基中健化植株，約 2 週後移植到溫室馴化及定植。本實驗所轟擊下胚軸的數量很多，但是最終獲得的轉殖植株只有三棵。

二、轉殖植株分析

(一)、聚合酵素鏈鎖反應 (PCR)

共同轉殖四種基因的甘藍植株之 PCR 分析總 DNA，先以引子偵測轉殖植株是否含有 *aadA* 基因。試驗結果顯示經電泳膠片分離 PCR 產物後，共同轉殖的植株可獲得預期的 *aadA* 片段 (0.8 kb)，未轉殖植株及對照組則無 (圖 1A)。分別以不同引子偵測轉殖植株是否含有 *bt*、*hsc70*、*cat78* 及 *sod62* 基因，經電泳膠片分離 PCR 產物後之試驗結果顯示，共同轉殖的甘藍植株可獲得預期的 *cat78* 片段 (1.5 kb) (圖 1B)，*sod62* 片段 (0.65 kb) (圖 1C)，*hsc70* 片段 (0.9 kb) (圖 1D)，*bt* 片段 (2.0 kb) (圖 1E)；總計在這三棵植株中 ASCCSOD/CAT/Bt/

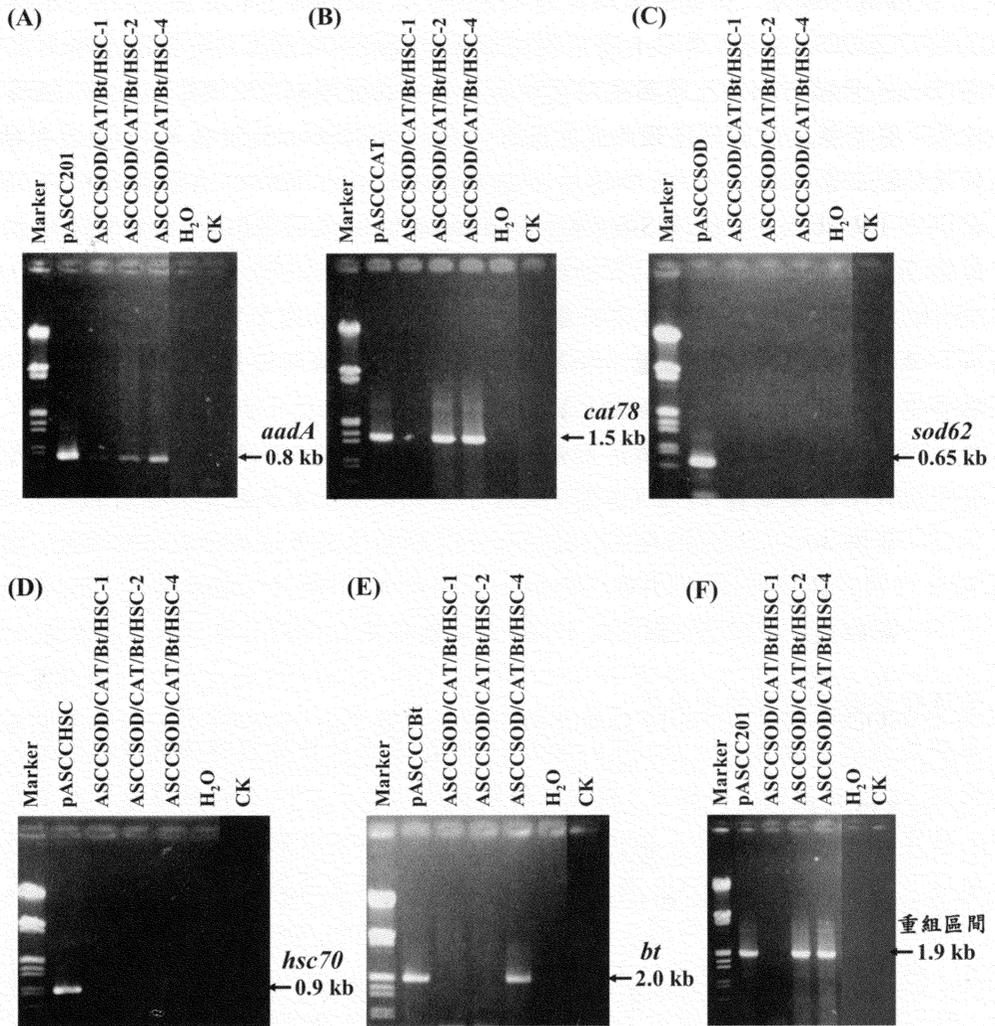


圖 1. 共同轉殖四種基因的甘藍再生植株之基因組 DNA 以 PCR 分析(A) *aadA* 基因、(B) *cat78* 基因、(C) *sod62* 基因、(D) *hsc70* 基因、(E) *bt* 基因與 (F) 重組區間片段，其產物在電泳膠片上分離之情形。ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1, -2, -4 為轉殖甘藍，CK 為對照組。

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products containing part of the *aadA* gene(A)、*cat78* gene (B)、*sod62* gene (C)、*hsc70* gene (D)、*bt* gene (E) and recombination site (F) fragments amplified from the pASCCSOD/CAT/Bt/HSC co-transformed cabbage. ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1, -2, -4: transgenic cabbage, CK: non-transgenic cabbage.

HSC-4 有 *aadA*、*bt*、*cat78* 等三種基因，ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-2 有 *aadA*、*cat78* 等二種基因，ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1 則不帶有任何轉移之基因。

為了進一步確認轉移之基因是否重組到轉殖甘藍葉綠體，本研究設重組區間與篩選基因之引子，分析葉綠體轉殖基因之重組位置 (*rrn16S-aadA*)。經 PCR 反應之產物在電泳膠片上分離。在上述 2 株共同轉殖四種基因的甘藍植株 (ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-2, -4) 均可獲得預期的 1.9 kb 條帶 (*rrn16S-aadA*) (圖 1F)。顯示轉移之基因經所設計之重組位置插入到甘藍葉綠體中。

(二)、南方墨點分析

萃取共同轉殖四種基因甘藍植株之總 DNA，以限制酵素切割，經電泳分離後進行南方墨點分析。以 *Nco* I 與 *Sac* I 切割，以 *cat78* 基因片段做為探針偵測是否有 *cat78* 基因的存在。試驗結果顯示，編號 ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-2、-4 兩株植株有雜交訊號，而 ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1 則無 (圖 2A)。以 *Eco* RI 與 *Kpn* I 切割，以 *sod62* 基因片段做為探針偵測是否有 *sod62* 基因的存在，結果顯示三株轉殖植株皆無雜交訊號產生 (圖 2B)。以 *Eco* RI 切割，以 *hsc70* 基因片段做為探針偵測是否有 *hsc70* 基因的存在，結果顯示三株轉殖植株皆無雜交訊號產生 (圖 2C)。以 *Sma* I 切割，以 *bt* 基因片段做為探針偵測是否有 *bt* 基因的存在。結果顯示，編號 ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-4 有雜交訊號產生 (圖 2D)，而編號 ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1、-2 則無雜交訊號 (圖 2D)。對照組在四種基因皆無雜交訊號的產生。

(三)、北方墨點分析

萃取共同轉殖四種基因甘藍植株的總 RNA，經電泳分離後進行北方墨點分析。分別以 *cat78*、*sod62*、*hsc70* 及 *bt* 四種基因為探針，偵測是否有其 mRNA 的表現。試驗結果顯示，在三株轉殖植株中編號 ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-2、4 有 *cat78* mRNA 的訊號 (圖 3A)；編號 ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-4 有 *bt* mRNA 的訊號 (圖 3D)；而 *sod62* 與 *hsc70* 基因則是無雜交訊號產生 (圖 3B、圖 3C)。此試驗結果與 PCR 及南方墨點所呈現的結果相同，而對照組植株則均無雜交訊號。

三、餵食小菜蛾幼蟲處理

選取轉殖植物與未轉殖之對照植物葉片進行小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 三齡幼蟲餵食 3 天後，外觀上有極大的差異 (圖 4)，對照組葉面上尚有小菜蛾幼蟲在啃食，且有許多被小菜蛾幼蟲啃食過明顯的破洞並遍佈蟲屎顆粒；而轉殖植株僅有被小菜蛾幼蟲啃食過少許的破洞，且破洞比對照組小，而蟲屎顆粒分布也明顯少於對照組，並可觀察到有蟲的屍體分佈在葉片周圍。而轉殖株 ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-2 在分子檢測上並沒有 *bt* 基因訊號產生，但是抗蟲性屬中等 (圖 4)，其他所轉殖植株葉片均受到小菜蛾嚴重殘食。

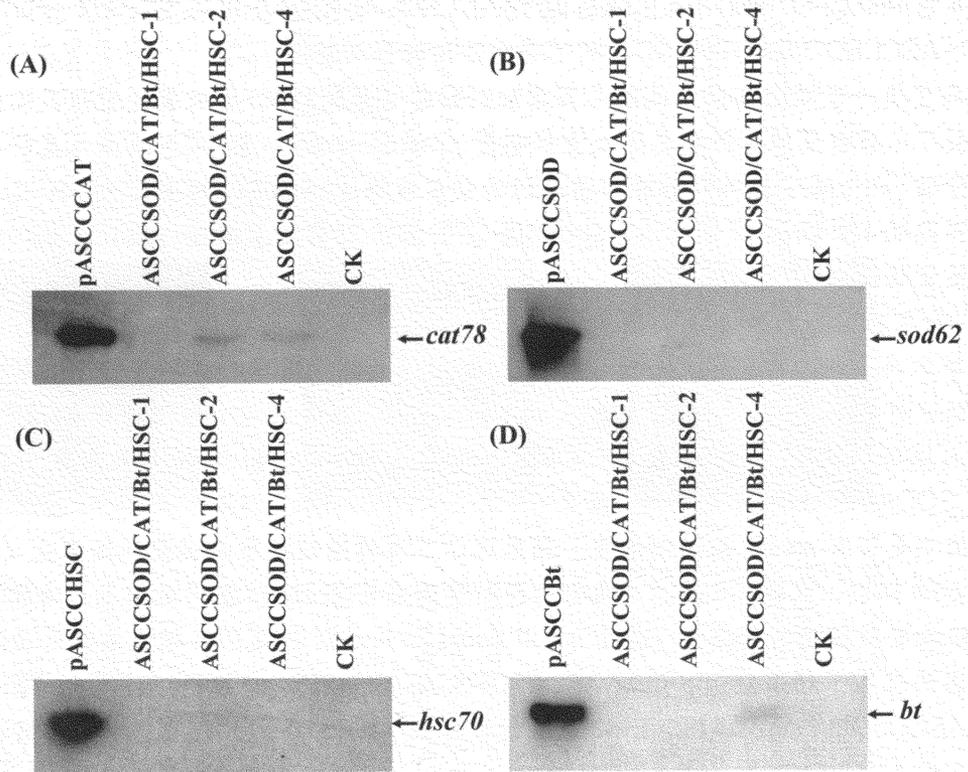


圖 2. 共同轉殖四種基因的甘藍再生植株，其 DNA 經限制酵素 *Nco* I 與 *Sac* I (A)、*Eco* RI 與 *Kpn* I (B)、*Eco* RI (C) 及 *Sma* I (D) 切割並以 *cat78* (A)、*sod62* (B)、*hsc70* (C) 及 *bt* (D) 基因為探針，經南方墨點雜交分析之情形。ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1, -2, -4 為轉殖甘藍，CK 為對照組。

Fig. 2. Southern hybridization of the pASCCSOD/CAT/Bt/HSC co-transformed cabbage with the P³²-labeled *cat78* (A), *sod62* (B), *hsc70* (C) and *bt* (D) gene fragments as the probe. DNA was digested with *Nco* I and *Sac* I (A), *Eco* RI and *Kpn* I (B), *Eco* RI (C) and *Sma* I (D). ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1, -2, -4: transgenic cabbage, CK: non-transgenic cabbage.

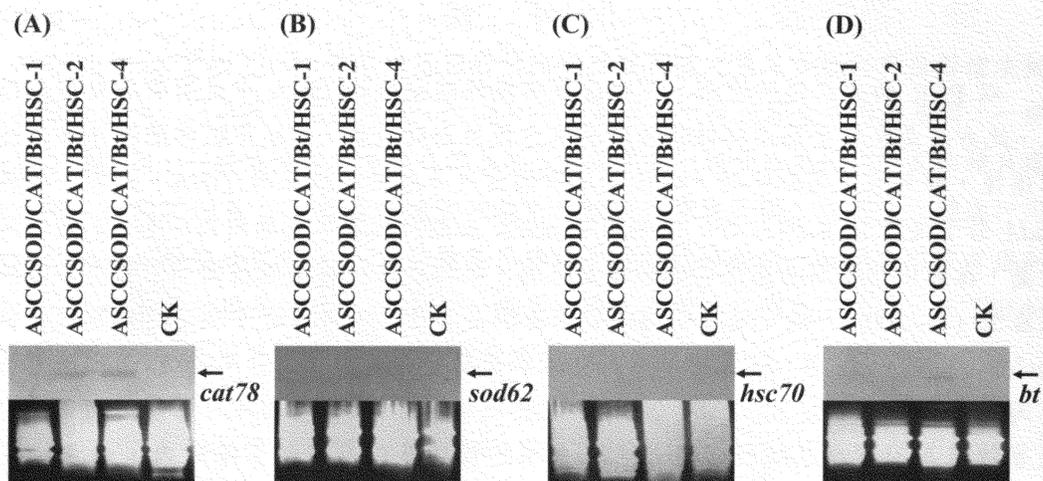


圖 3. 共同轉殖四種基因的甘藍再生植株，萃取其總 RNA 經北方墨點分析 *cat78* (A)、*sod62* (B)、*hsc70* (C) 及 *bt* (D) 基因之情形。ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1, -2, -4 為轉殖甘藍，CK 為對照組。

Fig. 3. Detection of the *cat78* (A), *sod62* (B), *hsc70* (C) and *bt* (D) gene in the pASCCSOD/CAT/Bt/HSC co-transformed cabbage by northern hybridization. The *cat78* (A), *sod62* (B), *hsc70* (C) and *bt* (D) gene fragments were used as the probe. ASCCSOD/CAT/Bt/HSC-1, -2, -4: transgenic cabbage, CK: non-transgenic cabbage.

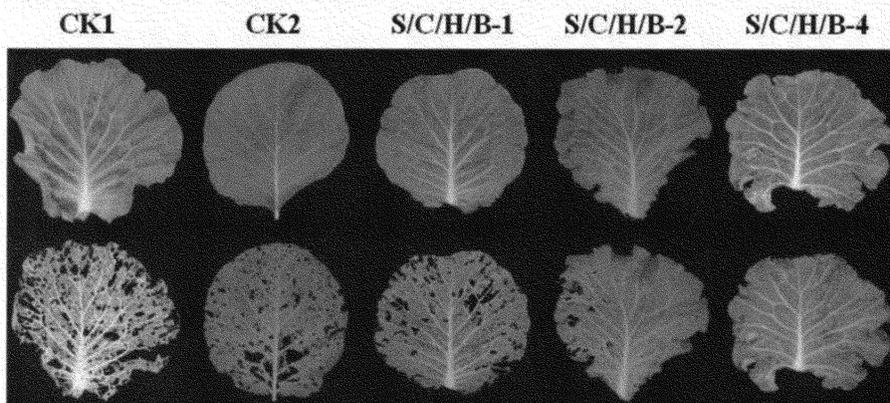


圖 4. 共同轉殖四種基因的甘藍再生植株 (S/C/H/B-1, -2, -4) 與未轉殖植株 (CK1, CK2)，餵食 15 隻小菜蛾前 (上) 與餵食三天後 (下) 植物葉片外觀的比較。

Fig. 4. Appearances of leaves of co-transformed cabbage (S/C/H/B-1, -2, -4), and un-transformed cabbage (CK1, CK2) before (upper) and after (lower) feeding with 15 *Plutella xylostella* for 3 days.

討 論

以 PCR 的方式進行檢測，可以直接確認轉殖植株的 DNA 中是否帶有目標基因的存在，此方法是在初步篩選轉殖植株時具有方便性及時效性。實驗中在轉殖植株經過抗生素篩選後，移到生長箱馴化時，以微量萃取的方式萃取轉殖植株的 DNA，以專一性極高的 *aadA* 引子進行 PCR 的分析，偵測篩選 *aadA* 基因。因為本實驗所用的 *aadA* 基因為細菌所屬，在與植物之間其基因的相似度並不高，因此在分析轉殖植株時，不會有非預期的片段產生 (劉, 2003)。為了更加以確認目標基因是否存在，再以引子測定轉殖甘藍是否帶有 *cat78*、*sod62*、*hsc70*、*bt* 基因。然而植株本身具有 *cat78*、*sod62*、*hsc70* 與轉殖的基因具有高度的相似性 (尤, 2000; 陳, 2004)，因此同時具有 *aadA* 基因及目標基因的訊號，才代表著轉殖基因有存在植物當中。為了更確定轉殖基因存在於葉綠體內，以重組區域的 *rrn16S* 與 *aadA* 基因間設計引子，分析可獲得 1.9 kb 的片段 (圖 1F)，雖然此法可以確認基因位在於葉綠體染色體內，但無法確認有多少比例的葉綠體攜帶有轉移之基因，因此未來若能藉由後代分析將可進一步的確認本研究轉殖甘藍的葉綠體同質性程度。

當基因轉殖進入植物的 DNA 後，最重要的工作便是確認目標基因的片段大小及完整性，以南方墨點法能檢測轉入植株內的基因。將所有甘藍轉殖植株以限制酵素切割，以 *Nco* I/*Sac* I 切割出完整的 *cat78* 基因，以 *Eco*R I/*Kpn* I 切割出完整的 *sod62* 基因，以 *Eco*R I 切割出完整的 *hsc70* 基因，以 *Sma* I 切割出完整的 *bt* 基因。由結果顯示 2 號轉殖植株可偵測到 *cat78* 基因，4 號轉殖植株可偵測到 *cat78* 及 *bt* 基因 (圖 2A, 2D)，但在 *sod62* 及 *hsc70* 基因方面，在三株轉殖植株則均無雜交訊號。

有學者指出有些轉殖植株即使在 DNA 的層次上可以被偵測得到，但不見得會在 RNA 的層次上穩定表現，可能是因為轉入的基因被修飾、重組或是基因靜默 (gene silence) 現象 (Hobbs *et al.*, 1990)。為了避免上述的原因且確認轉殖植株是否可以穩定表現轉殖基因，便萃取所有轉殖植株葉片的總 RNA，進行北方墨點雜交分析。分別以 *cat78*、*sod62*、*hsc70* 及 *bt* 基因為探針之雜交結果顯示，在 2 號及 4 號轉殖植株可偵測到預期的雜交訊號，確認可以轉錄出其 mRNA，與 PCR 及南方墨點的結果相同。本研究之部份轉殖植株的北方墨點雜交訊號較為微弱，此可能是未轉殖的葉綠體與轉殖的葉綠體同時存在於葉片組織中，因此稀釋了轉殖基因之 mRNA 與放射性探針雜交的強度 (Bock, 2001)；再者，本研究因為轉殖材料數量受限，無法大量分離葉綠體，進行葉綠體基因檢測，因此所獲得之轉殖葉綠體基因在葉綠體內的複製、轉錄及轉譯等的資訊也受限。

選取轉殖植物與未轉殖對照組葉片，進行小菜蛾幼蟲餵食 3 天，檢測結果顯示，4 號轉殖植株被啃食的情形明顯比對照組植物要少，表示 *bt* 基因可在其葉綠體中正常的表現，並發揮降低小菜蛾幼蟲對植株的傷害。而 2 號轉殖植株在 PCR、南方墨點及北方墨點的檢測中都沒有 *bt* 基因之訊號產生，但在餵蟲的過程中被小菜蛾幼蟲啃食的情形明顯比對照植物要少，而比 2 號轉殖植株多一點。推測原因可能是轉殖 *bt* 基因成功的葉綠體在整體

植物中含量不多，導致在分子檢測上偵測不到訊號，但是所產生的蛋白質亦能發揮部份殺蟲的效果。

綜合以上，本實驗是以四種不同基因的葉綠體轉殖載體定量混合後利用基因槍法轉殖到甘藍葉綠體中，總共獲得三棵植株，經過分子檢測後有一棵植株含有兩種基因，一棵植株含有一種基因，一棵植株則不含有目標基因，與期望在一棵甘藍中同時含有四種目標基因有差距，推測可能為：1) 四種轉殖載體都是用相同的重組區間，在與葉綠體進行同源重組時有被互相替換的可能，2) 葉綠體基因轉殖是靠隨機發生的，如果基因沒有進到葉綠體內，發生重組的機率就會比較低，3) 本實驗所利用的培植體為下胚軸，而下胚軸所含有的葉綠體相對比葉片要少，所以轉殖成功率也相對較低。

參 考 文 獻

- 尤進欽。2000。超氧化歧化酵素與過氧化氫酵素基因之轉殖與選殖。國立中興大學園藝學研究所博士論文。
- 陳志宏。2004。熱休克蛋白基因與過氧化氫酵素基因轉移到甘藍及結球白菜葉綠體之研究。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。
- 劉程煒。2003。水稻農桿菌基因轉殖系統與甘藍及水稻葉綠體基因轉殖系統之建立及應用。國立中興大學園藝學研究所博士論文。
- Bock, R. 2001. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J. Mol. Biol.* 312: 425-438.
- Boynton, J. E., N. W. Gillham, and E. H. Harris. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojection. *Science* 240: 1534-1538.
- Daniell, H., B. Muthukumar, and S. B. Lee. 2001a. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr. Genet.* 139:109-116.
- Daniell, H., S. B. Lee, T. Panchal, and P. O. Wiebe. 2001b. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplast. *J. Mol. Biol.* 311: 1001-1009.
- Hendrick, J. P. and F. U. Hartl. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 349-384.
- Hobbs, S. L. A., P. Kpodar, C. M. O. Delong. 1990. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.* 15: 851-864.
- Inzé, D. and M. Van Montagu. 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 153-158.
- Lin, T. Y., N. B. Duck, J. Winter, and W. R. Flok. 1991. Sequences of two hsc70 cDNAs from

Lycopersicon esculentum. *Plant Mol. Biol.* 16: 475-478.

Perlak, F. J., R. L. Fuchs, D. A. Dean, S. L. Mcpherson, and D. A. Fischhoff. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3324-3328.

Perlak, F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate and D. A. Frischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8:939-943.

Co-transfer of Genes into Cabbage (*Brassica oleracea*) Chloroplast *via* Particle Bombardment with Mixture of Transplastomic Vectors

Li-Te Chen ¹⁾ Menq-Jiau Tseng ²⁾

Key words: biolistic bombardment, chloroplast, co-transfer

Summary

In this study, *hsc70*, *bt*, *sod62* and *cat78* gene was constructed in the *Brassica* chloroplast transgenic vector, respectively. Mixture of the transgenic vector was co-transferred into cabbage (KY-cross) chloroplast *via* particle bombardment. The results of PCR, Southern and Northern blot hybridization indicated that one of three plant contained transformed *bt* and *cat78* genes, and expressed *bt* and *hsc70* mRNA. One of three co-transfer plants contained *cat78* gene and the other plant didn't containing target genes. The *bt* gene transformed plants exhibited the high degree of resistance to the *Plutella xylostella*.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

