

構築基因至同一個葉綠基因體轉殖載體以 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、葉綠體基因轉殖、甘藍

摘要:本研究將熱休克蛋白 (heat shock proteins cognate, HSC) 基因與蘇力菌殺蟲晶體蛋白 (Bt) 基因構築在同一個莖苔屬蔬菜葉綠體轉殖載體, 稱之為 pASCCBtHSC; 將超氧化歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 基因與過氧化氫酵素 (catalase, CAT) 基因構築到同一個莖苔屬蔬菜葉綠體轉殖載體, 稱之為 pASCCBtHSC。利用基因槍法將兩種載體分別轉殖到`初秋`甘藍葉綠體中。以 PCR、南方墨點與北方墨點分析轉殖再生植株, 在 pASCCSODCAT (*cat+sod*) 方面, 獲得的七株轉殖甘藍, 均同時具有 *cat* 及 *sod* 基因並轉錄出其 mRNA; 在 pASCCBtHSC (*bt+hsc*) 方面, 獲得的二株轉殖甘藍中, 即有一株轉殖甘藍同時具有 *bt* 及 *hsc70* 基因, 轉錄出 *bt* 及 *hsc70* mRNA, 並大量表現 HSC70 蛋白及具有顯著的抗蟲效果。

前 言

台灣地處亞熱帶, 夏季氣候高溫多濕, 造成病蟲害危害嚴重, 且常有溫度逆境的發生, 因此培育出抗病蟲害、且耐逆境的蔬菜品種, 為育種工作的首要目標。目前將單一基因轉殖到某一種作物, 已經不能滿足產業生產上的需求, 未來之基因改良工作傾向於開發多種性狀同時改良之作物新品種, 使得農民之田間管理工作簡化, 減少農藥的使用, 同時提高作物產量及品質 (Bohnert and Jensen, 1996)。近年來的轉殖植物衍生出一些問題, 例如目標基因藉由花粉的飛散, 污染鄰近未轉殖作物與雜草, 以及目標蛋白質的產量過低等等,

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。

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出現為以上的問題，提供了一個解決的方法。植物葉綠體基因轉移有以下幾種優點：1. 葉綠體的轉殖基因屬母系遺傳，轉殖基因不會因為隨著花粉而散播，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.*, 2001)。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)。目前利用葉綠體作為轉殖的高等植物仍然有限，以菸草居多，主要原因在於植物再生不易，因此擴大葉綠體轉殖的植物種類是必行的目標 (Heifetz, 2000)。另一方面由於葉綠體含有多套 DNA，因此使外源基因完全整合到葉綠體達到同質化是目前需解決的問題，將有助於提升葉綠體轉殖的表現量。

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)。本研究將熱休克蛋白 (heat shock proteins cognate, HSC) 基因與蘇力菌殺蟲晶體蛋白 (Bt) 基因構築在同一個莖苔屬蔬菜葉綠體轉殖載體；將超氧化歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 基因與過氧化氫酵素 (catalase, CAT) 基因構築到同一個莖苔屬蔬菜葉綠體轉殖載體，利用基因槍法將兩種載體分別轉殖至甘藍葉綠體中。由於一個植物細胞含有多套的葉綠體基因組，期望能獲得較佳抗逆境及同時耐高溫、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 (*prrrn*) *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 *prrrn* 為啟動子, 以 *psbA* 的 3' 核酸序列為終結子的 pASCCCHSC (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 *prrrn* 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 *prrrn* 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、轉殖載體構築

(一)、超氧化歧化酵素基因 (*sod62*) 與過氧化氫酵素基因 (*cat78*) 之葉綠體共同轉殖載體 pASCCSODCAT 的構築是利用 pASCCSOD (本研究室, 劉程煒學長所構築) 為載體, 以限制酵素 *Pst* I 做部分切割 (partial digestion) 回收 10 kb 的片段; 以 pokPcat78T (本研究室, 陳志宏學長所構築) 為插入片段, 先用限制酵素 *Sac* II 作用 4-5 小時, 再以 *Pst* I 作部分切割, 回收 2 kb 的 *prrrn-cat78-psba* 完整片段, 與載體作黏貼反應, 完成 pASCCSODCAT (圖 1A)。

(二)、蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因 (*Bt*) 與熱休克蛋白基因 (*hsc70*) 之葉綠體共同轉殖載體 pASCCBtHSC 的構築是利用 pASCCBt (本研究室, 劉程煒學長所構築) 為載體, 以限制酵素 *Pst* I 做部分切割, 處理 Klenow fragment 30 分鐘, 回收 11 kb 的片段, 先進行自我黏接反應 (self-ligation), 以 *Pst* I 做確認, 選取只剩單一 *Pst* I 切位的質體為載體; 以 pokPhscT (本研究室, 陳志宏學長所構築) 為插入片段, 以 *Pst* I 做部分切割, 回收 2.65 kb 的 *prrrn-hsc70-psba* 完整片段, 與載體作黏貼反應, 完成 pASCCBtHSC (圖 1B)。

四、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 CaCl₂, 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、DNA 的操作、轉殖植物之南方及北方墨點雜交分析

E. coli、質體 DNA 的萃取、DNA 片段的回收及黏接、蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE)、*E. coli* 宿主勝任細胞 (competent cells) 的製備、質體轉形作用、PCR 偵測轉殖的基因、探針製備、植物染色體 DNA 及 RNA 的備製、南方及北方墨點雜交分析等方法，參照陳(2004)之方法。

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'GGCTCCACTAGAATCCCAAAGTTC3'、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'CCACCTCCTCAATCTTAG GACCAGC3'，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'CCCGGGTGGTCA GTCCCTTCCATGGATAAC3'及 5'CGACGGCCCGGAATTCGATCTCACTCAAC3'；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'GCAGCCATGG ATCCATACAAGCACC GCCCG3'及 5'GCTTTC TTCTCGGAGCTCCTT ACATGCTC3'；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'GAATGGTGAAGGCCGTCGCAGTT3'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'GCAGCCATGGATCCATAACAAGCACCGCCCG 3'及 5'GCTTTCTTCCTCGGAGCTCCTTACATGCTC 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、西方墨點法

取經過 SDS 膠體電泳分離後之膠片，以濕式法 (Mini Trans-Blot Electrophoretic cell, Bio-Rad) 依正極至負極轉漬原則，按序放置海綿、圖畫紙、PVDF paper、膠體、圖畫紙、海綿，以轉移緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% Methanol, pH 8.3) 進行轉漬。以 70 伏特、200 毫安培電流於低溫轉漬 2 小時，再將 PVDF paper 置於 30 ml blocking buffer (5% non-fat dried milk, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA pH8.0, 0.05% Tween-20) 室溫下輕輕搖動 1 小時，以 TTBS buffer (20mM Tris-HCl pH7.5, 0.5M NaCl, 0.05% Tween-20) 清洗 10 分鐘 3 次，加入 25ml TTBS buffer 及適當濃度 (1/1000) 的一級抗體 [primary antibody, monoclonal (mouse) anti-heat shock protein 70 Antibody (IgG), Catalog No. MA3-007, ABR] 室溫迴旋搖動 2hr，以 TTBS buffer 清洗 10 分鐘 3 次，加入 25ml TTBS buffer 及適量濃度 (1/2000) 的二級抗體 [secondary antibody, anti-mouse IgG (H+L), AP conjugated] 於室溫迴旋搖動 2hr，以 TTBS buffer 清洗 10 分鐘 3 次，加入 10ml AP substrate、16.5 μ l NBT、33 μ l BCIP 進行呈色反應約 10 分鐘後，PVDF paper 稍有明顯條帶出現時，以 50mM EDTA (pH8.0) 終止反應，待 PVDF paper 風乾後，即完成西方墨點分析。

七、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。續選取轉殖植株與對照植株，觀察經小菜蛾幼蟲餵食 1 天後植株外觀之比較。

結 果

一、葉綠體基因轉殖植株之再生

本研究個別將帶有 *bt+hsc70* 基因及 *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 *prrn* 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 能有效的區別轉殖株與未轉

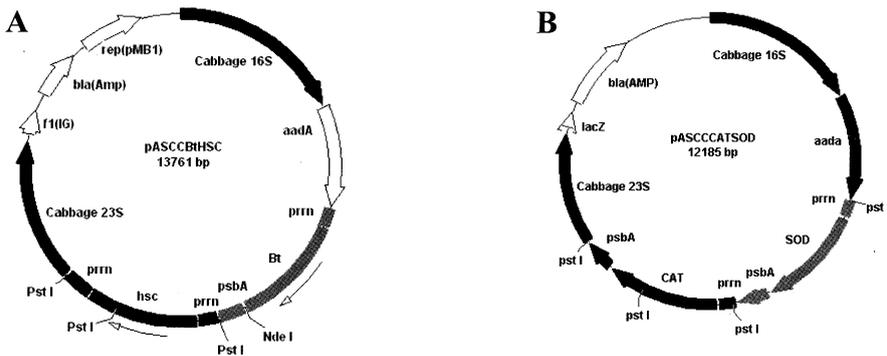


圖 1. pASCCBtHSC (A)及 pASCCSODCAT (B)之限制酵素圖譜。

Fig. 1. Restriction enzyme maps of pASCCBtHSC (A), and pASCCSODCAT (B).

植株，故以 5 ppm 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 再生培養基約兩周，之後再換到含有 5 ppm 抗生素的 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 抗生素的 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 的發根培養基中發根皆篩選，約三週可發根；將發根完全的轉植株換到含有 5 ppm 抗生素的 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，但是最終獲得的轉植株在共同轉殖 *bt* 與 *hsc70* 基因方面只有二棵，在共同轉殖 *sod6* 與 *cat78* 基因方面則有七棵。

二、轉殖植株分析

(一)、聚合酵素鏈鎖反應 (PCR)

共同轉殖的甘藍植株之 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，共同轉殖的植株均可獲得預期的 *aadA* 片段 (0.8 kb)，未轉殖植株及對照組則無 (圖 2A)。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 *bt+hsc70* 基因的甘藍植株可獲得預期的 *hsc70* 片段 (0.9 kb)(圖 2B)，*bt* 片段 (2.0 kb)(圖 2C)，共同轉殖 *sod62+cat78* 基因的甘藍植株可獲得預期的 *cat78* 片段 (1.5 kb)(圖 2D)，*sod62* 片段 (0.65 kb)(圖 2E)；在共同轉殖 *bt* 與 *hsc70* 基因甘藍轉殖植株方面，二株再生轉殖植株中只有 ASCCBtHSC-11-1 可偵測到存在 *aadA*、*hsc70* 與 *bt* 基因片段。在共同轉殖 *sod62* 與 *cat78* 基因甘藍轉殖植株方面，七棵轉殖植株皆有 *aadA*、*sod62* 與 *cat78* 基因的片段。

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。在上述共同轉殖基因的甘藍植株均可獲得預期的 1.9 kb 條帶 (*rrn16S-aadA*)(圖 2F)。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。

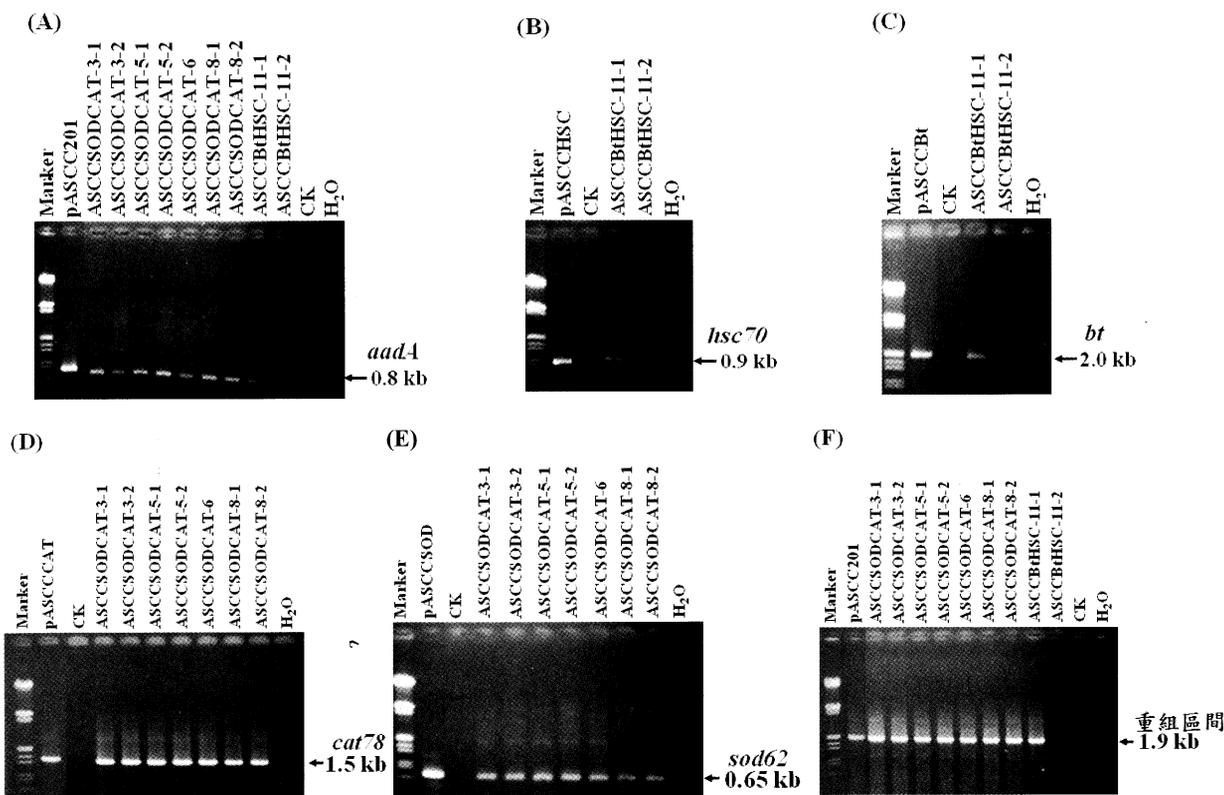


圖 2. 共同轉殖 *bt+hsc70* 與 *sod62+cat78* 基因的甘藍再生植株之基因組 DNA 以 PCR 分析 (A) *aadaA* 基因、(B) *hsc70* 基因、(C) *bt* 基因、(D) *cat78* 基因、(E) *sod62* 基因與 (F) 重組區間片段，其產物在電泳膠片上分離之情形。ASCCBtHSC 與 ASCCSODCAT 為轉殖甘藍，CK 為對照組。

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR products containing part of the *aadaA* gene (A), *hsc70* gene (B), *bt* gene (C), *cat78* gene (D), *sod62* gene (E) and recombination site (F) fragments amplified from the pASCCBtHSC and pASCCSODCAT co-transformed cabbage. ASCCBtHSC and ASCCSODCAT: transgenic cabbage, CK: non-transgenic cabbage.

(二)、南方墨點分析

萃取共同轉殖甘藍植株之總 DNA，以限制酵素切割，經電泳分離後進行南方墨點分析。以 *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，編號 ASCCBtHSC-11-1 有雜交訊號 (圖 3A)。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 ASCCBtHSC-11-1 有雜交訊號 (圖 3B)，而編號

ASCCBtHSC-11-2 則皆無雜交訊號 (圖 3A、B)。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 ASCCSODCAT-3-1、3-2、5-1、5-2、6、8-1、8-2 七株植株有雜交訊號 (圖 3C)。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，編號 ASCCSODCAT-3-1、3-2、5-1、5-2、6、8-1、8-2 七株植株有雜交訊號產生 (圖 3D)。對照組皆無雜交訊號的產生。

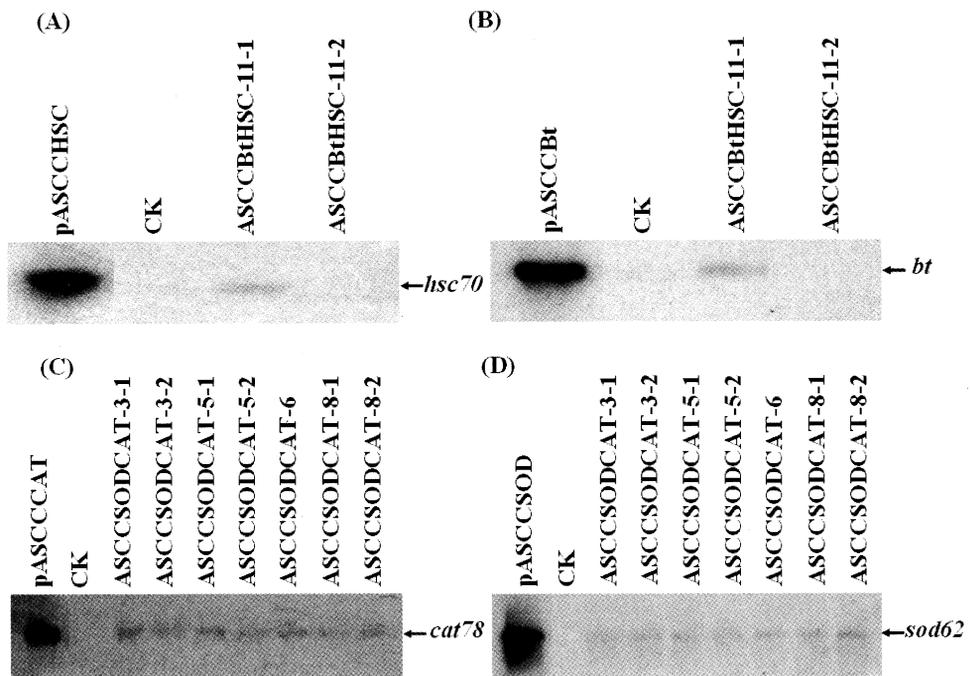


圖 3. 共同轉殖 *bt+hsc70* 與 *sod62+cat78* 基因的甘藍再生植株，其 DNA 經限制酵素 *Eco* RI (A)、*Sma* I (B)、*Nco* I 與 *Sac* I (C)、*Eco* RI 與 *Kpn* I (D) 及切割並以 *hsc70* (A)、*bt* (B)、*cat78* (C) 及 *sod62* (D) 基因為探針，經南方墨點雜交分析之情形。ASCCBtHSC 與 ASCCSODCAT 為轉殖甘藍，CK 為對照組。

Fig. 3. Southern hybridization of the pASCCBtHSC and pASCCSODCAT co-transformed cabbage with the P³²-labeled, *hsc70* (A), *bt* (B), *cat78* (C), and *sod62* (D) gene fragments as the probe. DNA was digested with *Eco* RI (A), *Sma* I (B), *Nco* I and *Sac* I (C), and *Eco* RI and *Kpn* I (D). ASCCBtHSC and ASCCSODCAT: transgenic cabbage, CK: non-transgenic cabbage.

(三)、北方墨點分析

萃取共同轉殖甘藍植株的總 RNA，經電泳分離後進行北方墨點分析。分別以 *hsc70*、*bt*、*cat78* 及 *sod62* 四種基因為探針，偵測是否有其 RNA 的表現。試驗結果顯示，編號 ASCCBtHSC-11-1 有 *hsc70* 及 *bt* mRNA 的訊號 (圖 4A、B)；編號 ASCCBtHSC-11-2 則無任何訊號 (圖 4A、B)；而編號 ASCCSODCAT-3-1、3-2、5-1、5-2、6、8-1、8-2 皆有 *cat78* 及 *sod62* mRNA 雜交訊號產生 (圖 4C、D)。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。

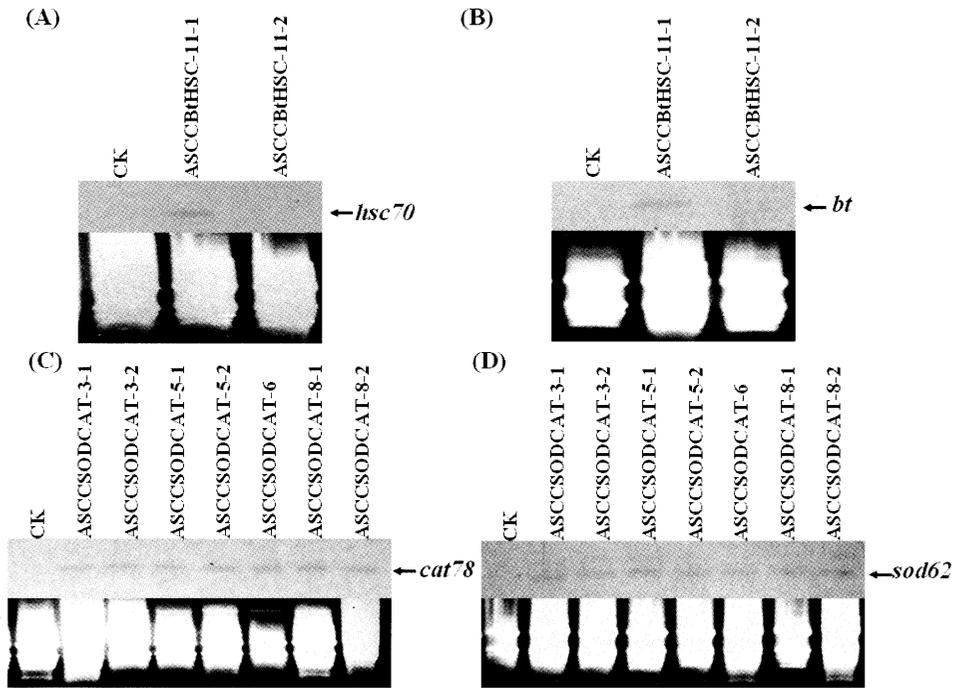


圖 4. 共同轉殖 *bt+hsc70* 與 *sod62+cat78* 基因的甘藍再生植株，萃取其總 RNA 經北方墨點分析 *hsc70* (A)、*bt* (B)、*cat78* (C) 及 *sod62* (D) 基因之情形。ASCCBtHSC 與 ASCCSODCAT 為轉殖甘藍，CK 為對照組。

Fig. 4. Detection of the *hsc70* (A), *bt* (B), *cat78* (C), and *sod62* (D) gene in the pASCCBtHSC and pASCCSODCAT co-transformed cabbage by northern hybridization. The *hsc70* (A), *bt* (B), *cat78* (C), and *sod62* (D) gene fragments were used as the probe. ASCCBtHSC and ASCCSODCAT: transgenic cabbage, CK: non-transgenic cabbage.

(四)、西方墨點分析

萃取上述經過基因分析具有 *hsc70* 基因之轉殖甘藍，編號 ASCCBtHSC 11-1 的可溶性蛋白質，經 SDS-PAGE 電泳分離，並以西方墨點法偵測 HSC70 蛋白表現之情形。試驗結果顯示，轉殖植株編號 ASCCBtHSC 11-1 有約 70 kDa 蛋白質的雜交條帶出現，未轉殖植株也有相同蛋白的條帶出現，但是轉殖植株的量明顯較對照組多 (圖 5)。

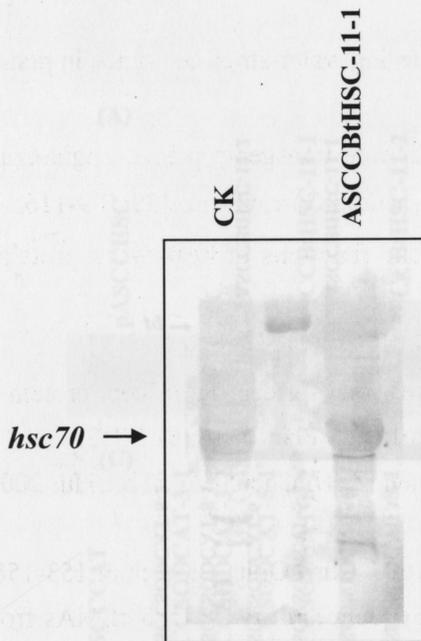


圖 5. 轉移 *bt+hsc70* 基因 (pASCCBtHSC) 的初秋甘藍，以西方墨點雜交分析 HSC70 蛋白質。萃取轉殖 *bt+hsc70* 基因 (pASCCBtHSC) 的甘藍再生植株之蛋白質經 SDS-PAGE 分離，並以熱休克蛋白單株抗體偵測。CK: 未轉殖植株

Fig. 5. Detection of HSC70 by western blot. Proteins extracted from the pASCCBtHSC transformed cabbage were separated in SDS-PAGE, and then subjected to western blot using rabbit monoclonal anti-heat shock protein antibody (IgG). CK: un-transformed cabbage.

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 6A)，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。選取 ASCCBtHSC-11-1 及對照組植株，施放 50 隻小菜蛾幼三齡幼蟲到整株植株，餵食一天後觀察植株外觀之變化。圖 6B 顯示對照組植株在餵蟲處理後，外觀上與上述以葉片餵食之結果類似，餵食後，對照組葉面啃食嚴重，尤以愈靠近植株中心部位頂芽附近愈嚴重；而轉殖植株僅稍有被小菜蛾幼蟲啃食的破洞，並有蟲的屍體停留在啃食的葉片周圍。

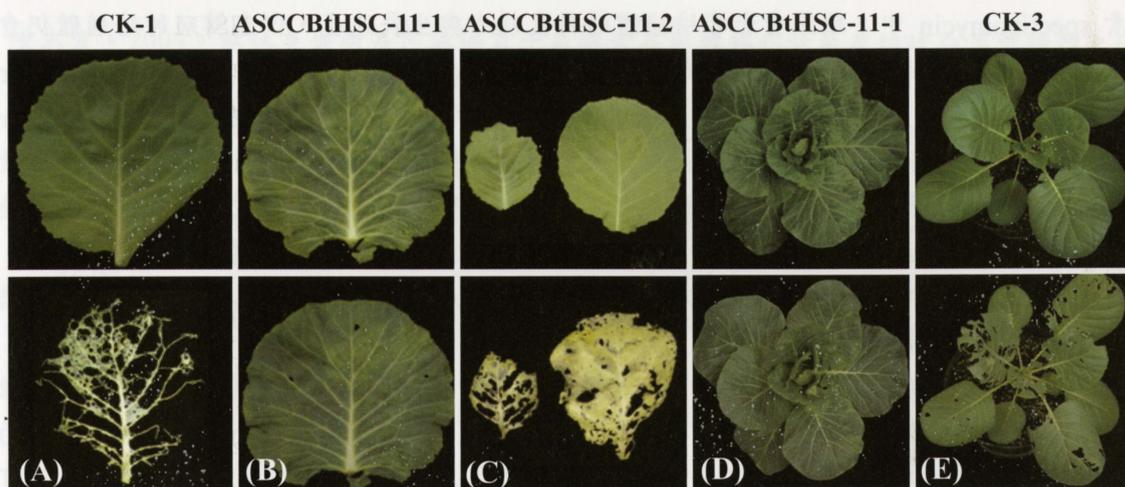


圖 6. 共同轉殖 *bt+hsc70* 基因 (pASCCBtHSC) 的甘藍再生植株 (BtHSC-11-1, 11-2) 與未轉殖植株 (CK-1, CK-3), 餵食 15 隻(A~C)或 60 隻(D~E)小菜蛾前 (上列) 與餵食三天後 (下列) 植物葉片外觀的比較。

Fig. 6. Appearances of leaves of pASCCBtHSC transformed cabbage (BtHSC-11-1, 11-2), and un-transformed cabbage (CK-1, CK-3) before (upper row) and after (lower row) feeding with 15 (A-C) or 60 (D-E) *Plutella xylostella* for 3 days.

討 論

目前進行葉綠體基因轉殖的轉移方式有很多種, 但仍以基因槍的轉移方式最有效率 (Su *et al.*, 2001)。因此本實驗採取基因槍的方式, 進行甘藍的葉綠體基因轉殖。將帶有葉綠體基因轉殖載體的金粒子, 以 1,350 psi 及 1,100 psi 的氮氣壓力轟擊到距槍口 9 公分的培植體。本實驗所使用的材料為'初秋'甘藍的胚軸與幼葉, 其中本研究室過去對甘藍的下胚軸組織培養再生系統已建立起高效率的再生。雖然下胚軸的葉綠體含量比葉片、子葉所含的量低, 但 Hou 等人 (2003) 成功以油菜的子葉柄進行葉綠體基因轉移, 因此本研究才想以甘藍的下胚軸來模擬油菜子葉柄以進行葉綠體基因轉移。以基因槍施打金粉的過程中, 將下胚軸垂直緊密的插在培養基上並排列呈環狀, 比起橫放排列成環狀具有更多的好處, 因為胚軸的頭尾切口是易於再生芽體的位置。當基因槍轟擊完後, 將培植體放入黑暗處避光, 有助於使受傷的培植體能恢復。轟擊過後的胚軸與葉片等培植體, 皆放在相同的未含抗生素之 L1 培養基, 培養四天, 然而這些培植體會因放在培養基而膨大的倍率不一, 其中以葉部會膨大成兩到三倍, 是故需將其切成 $3 \times 3 \text{ cm}^2$ 的大小繼續培養。先將培植體在 L1 再生培養基中讓芽梢長出, 約三週; 之後培養基再將放入 spectinomycin 抗生素緩慢的由 5 ppm 以進行篩選的工作, 目的是讓細胞中有轉殖的葉綠體能夠增生。在低濃度的抗生

素 spectinomycin 中，雖然會影響培植體的再生能力與生長速度，但有轉殖的培植體仍會有綠色芽梢的存活，因此在篩選三個月後將仍存活的培植體換到含有 1 ppm spectinomycin 的 L1 培養基中，讓芽梢能長大。長大的芽梢換到 L2 發根培養基中，含有 2 ppm spectinomycin，有轉殖的培植體生長良好，未轉殖的植株則白化。最後換成 5 ppm 抗生素篩選成株。但篩選最後存活的甘藍植株並不多，推測可能是下胚軸的葉綠體數量不多所造成。利用葉片轉殖，因為在再生過程中葉片褐化的很快，在沒有抗生素的 L1 培養基中，約兩個月就會自然衰亡，期間試過許多培養基但是效果都不好，所以本研究利用葉片當培植體並沒有再生出植株。

葉綠體的研究不論是在基礎研究上或是在應用研究方面都已有許多的成果，而在葉綠體基因轉殖中葉綠體基因組的基因排列模式、調控模式、GC 鹼基對含量及轉譯所偏愛的密碼子與原核生物相近 (Mcbride *et al.*, 1994)，並且由於具有原核特性，多個外源基因可以採 polycistron 形式同時在葉綠體中轉錄和表達 (Hibberd *et al.*, 1998) 與細胞核基因轉殖有很大的不同。在本研究中構築的策略並不是以 polycistron 的形式，而是以一基因一 cassette 的形式，這樣的形式會造成載體中重組區間的擴大，使同源重組的機率相對變小而降低轉殖率。

本實驗將 *bt* 與 *hsc70* 基因及 *sod62* 與 *cat78* 基因構築在同一個葉綠體轉殖載體後利用基因槍法轉殖到甘藍葉綠體中，分別總共獲得 *bt+hsc70* 的甘藍轉殖株二棵與 *sod62+cat78* 的甘藍轉殖株七棵植株，經過分子檢測後 *bt* 與 *hsc70* 基因的二棵轉殖株中有一棵有 *bt* 與 *hsc70* 基因的訊號並且有 HSC70 蛋白的表現及明顯殺蟲的效果，*sod62* 與 *cat78* 基因的甘藍轉殖株七棵中皆有 *sod62* 與 *cat78* 基因的訊號；由於本實驗的下胚軸再生率很高但是轉殖率卻很低，推測可能是因為：1. 葉綠體基因轉殖是靠隨機發生的，如過基因沒有進到葉綠體內，發生重組的機率就會比較低；2. 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。由於實驗材料的限制以及時間不足，只利用 PCR 的方式證明轉殖基因有進入到葉綠體內，並沒有分離葉綠體進行葉綠體基因組的分子檢測以及各個基因的蛋白活性，待往後的實驗能做更進一步的確認。本研究之結果顯示進行基因槍之葉綠體共同基因轉移時，以將標的基因一起構築在同一個葉綠體基因轉殖載體，會較混合不同葉綠體基因轉殖載體的轉殖效率為佳。但構築在同一個葉綠體基因轉殖載體之基因數量的上限，則有待再測試。

參 考 文 獻

- 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.
- Bohnert, H. J. and R. G. Jensen. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnology* 14: 89-97.
- Daniell, H., B. Muthukumar, and S. B. Lee. 2001. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr. Genet.* 139:109-116.
- Hendrick, J. P. and F. U. Hartl. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 349-384.
- Heifetz, P. B. 2000. Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie.* 82: 655-666.
- Hibberd, M., J. Linley, and M. Khan. 1998. Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojection bombardment. *Plant J.* 16: 627-732.
- Hou, B. K., Y. H. Zhou, L. H. Wan, Z. L. Zhang, G. F. Shen, Z. H. Chen, and Z. M. Hu. 2003. Chloroplast transformation in oilseed rape. *Trans. Res.* 12: 111-114.
- 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.
- McBride, K. E., D. Schaaf, and M. Daley. 1994. Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear encoded and plastid targeted T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 7301-7305.
- 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.
- 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.
- Su, N., Y. M. Wu, B. Y. Sun, and G. F. Shen. 2001. A new way of plant genetic engineering chloroplast transformation. *Biotechnol. Information* 4: 9-13.

Co-transfer of Genes into Cabbage (*Brassica oleracea*) Chloroplast by *via* Particle Bombardment with Co-constructed Transplastomic Vector

Li-Te Chen ¹⁾ Menq-Jiau Tseng ²⁾

Key words: biolistic bombardment, chloroplast transgenic, cabbage

Summary

In this study, *bt* and *hsc70* genes as well as *sod62* and *cat78* genes were constructed in the same *Brassica*-specific-plastid vector which were named pASCCBtHSC and pASCCBtHSC, respectively. The constructed vectors were transferred into cabbage (KY-cross) chloroplast *via* particle bombardment mediated transformation. The results of PCR, Southern and Northern blot hybridization indicated that seven plants of co-transformed *sod 62* + *cat 78* plants contained both *sod 62* and *cat 78* gene, and expressed *sod 62* and *cat78* mRNA. One of the two co-transformed *bt* + *hsc70* plants contained both *bt* and *hsc70* genes, and 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.