過量表現及 RNA 靜默之 *Myr*、*Esm* 與 *Esp* 基因的轉殖載體之構築

林 泳 伸[1)] 潘 怡 君[2)] 尤 進 欽[3)] 曾 夢 蛟[4)]

關鍵字：青花菜、甘藍、基因轉移、蘿蔔硫素、代謝工程

摘要：本研究分別構築帶有青花菜 *Myr* 及 *Esm* 基因為目標基因之蕓苔屬葉綠體轉殖載體與帶有青花菜 *Esp* 基因為目標基因之 RNAi 抑制方式(*ESPi*)的農桿菌基因轉殖載體。總共完成六種蕓苔屬葉綠體轉殖載體：pMT91t-Esm-A、pMT91t-Myr-A、pMT91t-Esm-Myr-A、pMT91t-Esm-GA、pMT91t-Myr-GA 及 pMT91t-Esm-Myr-GA，以 *aadA* 為篩選基因或/且以 *gus* 為報導基因及二種 RNAi 抑制方式的農桿菌基因轉殖載體： p1304-Esp-IN-GH 及 p1304-Esp-IN-GD，以 *mgfp-gusA* 為報導基因，以 *hptII* 或 *daao* 為篩選基因。

前 言

黑芥子酶 (myrosinase, MYR, EC3.2.3.1)，又稱 β-硫代葡萄糖苷解酶，是一種可以降解硫代葡萄糖苷的水解酶，存在於十字花科植物體內。黑芥子酶在細胞中長久存在，是一種很穩定的酶，它以蛋白複合體的形式存在，定位在特定的蛋白體中 (Andréasson *et al*., 2001)，而硫代葡萄糖苷與黑芥子酶是分開的 (Chen *et al*., 2001)。「黑芥子酶－硫代葡萄糖苷體」系統是十字花科植物對付昆蟲、草食動物、病源菌等傷害的一種重要防禦系統 (Kliebenstein *et al*., 2005)。Park 等人 (2011)報導大量表現結球白菜 MYR 基因的轉殖結球白菜之蘿蔔硫素，較對照組增加 3.86 倍。Wu 等人 (2013)過量表現青花菜 MYR 基因的轉殖青花菜之蘿蔔硫素，較對照組增加 0.93 倍。

表皮特異硫蛋白修飾子 (epithiospecifier modifier, ESM)，又稱為黑芥子酶協助蛋白 (myrosinase- associated proteins，MyAP)。在複合體中，它是一個相對分子質量為 40 kd 的

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
2) 國立中興大學園藝系助理教授。
3) 國立宜蘭大學園藝學系教授。
4) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

單體糖蛋白(monomeric glycoprotein)，其基因序列與擬南芥中的脂酶(lipase)基因序列相似。在植物組織內，黑芥子酶需要與黑芥子酶結合蛋白(Myrosinase-binding protein, MBP)和黑芥子酶協助蛋白(Myrosinase-associated proteins, MyAP)共同形成一個黑芥子酶複合物後，才能將硫苷水解成異硫氰酸酯、硫氰酸酯、腈或噁唑烷硫酮等多種化合物(Kissen *et al*., 2009)。

ESM1(MyAP)同時參與在黑芥子酶水解硫代葡萄糖苷過程中抑制腈類化合物(nitriles)形成及促進蘿蔔硫素的生成(Zhang *et al*., 2006; Ku *et al*., 2013)。在植物體內，黑芥子酶與黑芥子酶協助蛋白、黑芥子酶結合蛋白構成複合體，以複合體的形式發揮作用。但就黑芥子酶的水解功能而言，複合體存在的形式不是必需的(Taipalensuu *et al*., 1997)。iMyAP 與複合體並不是以共價鍵的形式結合，且 MyAP 的一個主要片段並沒有結合在複合物中，推測 MyAP 基因在複合體外還有其它功能(Andreasson *et al*., 1999)。

上皮硫特異蛋白(epithiospecifier protein，ESP)是一種小分子蛋白(相對分子質量 30-40 kd)，在甘藍、油菜及青花菜中都已純化得到 ESP。體外實驗顯示，當純化的硫代葡萄糖苷和黑芥子酶在 pH 為中性的環境下進行水解反應時，只產生異硫氰酸酯(Gil and Macleod, 1980)；但 ESP 的大量表現會促使腈類化合物(nitriles)的產生，抑制蘿蔔硫素的合成(Matusheski *et al*., 2006；Williams *et al*., 2008)。

我們的構想是將自青花菜分離之 *Myr* 及 *Esm* 基因構築到蕓苔屬葉綠體基因轉殖載體系統，*Esp* 基因構築到 RNAi 的農桿菌介導的基因轉殖系統，以利用此三個基因各別或共同轉移至青花菜或甘藍之葉綠體/細胞核中，達到抑制 *Esp* 基因表現或/及葉綠體大量合成 Myr 及 Esm，且區隔 Myr 及 Esm 在葉綠體中，如此當植物器官組織受到傷害時，即可大量合成蘿蔔硫素。

材 料 方 法

一、基因轉殖載體之構築

本實驗構築所使用之蘿蔔硫素生和成相關基因，*Esm*、*Myr* 及 *Esp* 基因是由本實驗室蔡奕祥學長自青花菜'綠王' (Green King)中所選殖出來。再將其構築到 pGEM-Teasy Vector (Promega)，分別形成 pGEM-Teasy-Esm、pGEM-Teasy-Myr 和 pGEM-Teasy-Esp，由本實驗室蔡奕祥學長所提供。

本研究構築分成 *Esm*、*Myr* 基因及 *Esp* 基因兩部分。將 *Myr* 及 *Esm* 基因構築到適用於蕓苔屬基因槍轟擊法的基因轉殖載體。構築策略為將 *Myr* 及 *Esm* 基因分別利用含有限制酵素 *Sma*I *Mss*I /*Xba*I 及 *Xba*I/*Sma*I 的引子以 PCR 方式，分別增幅 *Myr* 及 *Esm* 基因的片段後，接在葉綠體啟動子 *Pprn* 及 *PpsbA* 的下游，構築載體由本實驗室傅承泰學長所提供為 pMT91t-A 及 pMT91t-GA，皆帶有 *aadA* 篩選基因，後者另帶有 *gus* 報導基因，構築成

pMT91t-Esm-A、pMT91t-Myr-A、pMT91t-Esm-Myr-A、pMT91t-Esm-GA、pMT91t-Myr-GA 及 pMT91t-Esm-Myr-GA。

Esp 基因部分是將 *Esp* 基因構築到適用於農桿菌介導的基因轉殖載體。其主要構築策略為將 *Esp* 基因分別利用含有限制酵素 KpnI/KpnI 及 MluI/XbaI 切位的引子以 PCR 增幅後，接在 *CaMV35S* 啟動子的下游，構築載體為 pCambia 1304-Gus，帶有 *mgfp5-gusA* 報導基因及 *hptII* 篩選基因，構築成 p1304-Esp-IN-GH 載體。再將 p1304-Esp-IN-GH 載體之 *hptII* 篩選基因替換成 *daao* 篩選基因，構築成 p1304-Esp-IN-GD。

二、試驗方法

(一)、轉殖載體之酵素切割分析

為確認轉殖載體 DNA 片段是否正確，載體 p1304-Esp-IN-GH 分別以 *Ava*I 及 *Nco*I 限制酶切割，p1304-Esp-IN-GD 以 *Eco*RI 及 *Bst*Z17I (double digestion)限制酶切割，pMT91t-Esm-A 以 *Sma*I 及 *Xba*I (double digestion)限制酶切割，pMT91t-Esm-A、pMT91t- Esm-GA、pMT91t-Myr-A、pMT91t-Myr-GA、pMT91t-Esm-Myr-A、pMT91t-Esm-Myr-GA 以 *Bam*HI 限制酶切割，pMT91t-Myr-A、pMT91t-Myr-GA、pMT91t-Esm-Myr-A、pMT91t-Esm-Myr-GA 以 *Eco*RI 限制酶切割。於 37℃水浴鍋作用 1 小時，其後以 1.0%的洋菜膠 (agarose gel)，在電壓 100 伏特分離 DNA，當下層染劑到達距離凝膠底部約 1.5 公分時，便可停止分離。再使用 ethidium bromide (EtBr)進行染色後便可於長波 UV 下觀察 DNA 片段。

(二)、轉殖載體之聚合酵素鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction，PCR)分析

採用 Thermo Hybaid 儀器進行 PCR 技術增幅目標基因片段以檢測分析載體是否帶有目標基因。以質體 DNA 作為模板，PCR 總反應體積為 25 μl，包含有的 1 倍的 Blend Taq buffer、0.2 mM each dNTP、0.1 μM 核酸引子、0.625 U Blend Taq® -Plus- DNA polymerase (TOYOBO)，再以去離子水補滿。置於 DNA 聚合酵素鏈鎖反應器中進行 PCR 反應。各基因偵測方式分述如下：

偵測 *Myr* 基因引子，5'- GAGGAATGCCAAGAGAACGAGC -3' (Myr-1)及 5'- ACACCCTTCTCCCTGATGACCT -3' (Myr-2)，可增幅出 1,331 bp 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 μl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *Esm* 基因引子，5'- TGTGAGTGTCATGGGAGCAC -3' (Esm-1)及 5'- CGACGACGAATAGACGGCTT -3' (Esm-2)，可增幅出 1,101 bp 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 μl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *Esm* 基因到 *Myr* 基因全長的引子，5'- TGTGAGTGTCATGGGAGCAC -3' (Esm-1)及 5'- ACACCCTTCTCCCTGAT GACCT - 3' (Myr-2)，可增幅出 2,563 bp 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，

最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測部分 *Esm* 基因到 *Myr* 基因的引子，5'- ACGCTTCTATTCTTGGGG CTCC-3' (Esm-3)及 5'- GCAGCAGAAGCAACACCGAATA -3' (Myr-3)，可增幅出 1,104 bp 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *Esp* 基因(正向)的引子，5'- GCGCGCTCTAGATTACGCGGAATTA A -3' (Esp-1)及 5'- ATATATACGCGTATGGCTCCGAGTGT -3' (Esp-2) ，可增幅出 1.0 kb 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *Esp* 基因(反向)的引子，5'- ATACGGGGTACCTTACGCGGAATTAA CTG -3' (Esp-3)及 5'- ATATATGGTACCATGGCTCCGAGTGTGC -3' (Esp-4)，可增幅出 1.0 kb 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *gus* 基因引子，分別為 5'- CGTCCTGTAGAAACCCCAACCC -3' (gus-1)及 5'- TTTGCCTCCCTGCTGCGG -3' (gus-2)，可增幅出 1.8 kb 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *mgfp-gusA* 基因引子，分別為 5'- CGTCCTGTAGAAACCCCAACCC -3' (mgfp-gusA-1)及 5'- TTTGCCTCCCTGCTGCGG -3' (mgfp-gusA-2)，可增幅出 1.8 kb 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *aadA* 基因引子，分別為 5'- ATGGCAGAAGCGGTGATCG -3' (aadA-1)及 5'- CTACCTTGGTGATCTCGCCTTTC -3' (aadA-2)，可增幅出 0.8 kb 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *daao* 基因引子，分別為 5'- CTCGAGATGGCTAAAATCGTTGTTAT -3' (daao-1)及 5'- CTCGAGCTAAAGGTTTGGACGAGTAA -3' (daao-2)，可增幅出 1.1 kb 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個

cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *hpt*II 基因引子，分別為 5'- CTATTTCTTTGCCCTCGGACG -3' (hptII-1)及 5'-CCGCGACGTCTGTCGAGA -3' (hptII-2)，可增幅出 0.8 kb 片段。反應流程為 94℃ 10 分鐘，1 個 cycle；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72℃ 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

(三)、載體之 *gus*、*mgfp5-gusA*、*aadA*、*daao* 及 *hptII* 基因的 *in vivo* 活性測試

挑取上述構築載體之單一菌落(single colony)，加入適當抗生素 (100 ppm amcilillin 或 100 ppm kanamycin)之 5 ml LB 液體培養基中，置於 37℃震盪培養 12-16 小時。將培養後之菌液以劃菌環沾取均勻並分別塗佈於含有適量 D-alanine、spetinomycin、hygromycin 及 0.3-1.0 g X-gluc 之 LB 固體培養基上，於 37℃培養 12-16 小時。

結　果

本研究將 *Myr* 及 *Esm* 基因構築到適用於基因槍轟擊法的蕓苔屬基因轉殖載體。構築策略為將 *Myr* 及 *Esm* 基因分別利用含有限制酵素 SmaI MssI /XbaI 及 XbaI/SmaI 的引子以 PCR 增幅 *Myr* 及 Esm 基因的片段後，接在葉綠體啟動子 *Pprn* 及 *PpsbA* 的下游。構築載體，pMT91t-A 及 pMT91t-GA，由本實驗室傅承泰學長所提供，皆帶有 *aadA* 篩選基因，後者另帶有 *gus* 報導基因。*Myr* 及 *Esm* 基因共計構築成 pMT91t-Esm-A、pMT91t-Myr-A、pMT91t-Esm-Myr-A、pMT91t-Esm-GA、pMT91t-Myr-GA 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 等 6 個載體，此六種轉殖載體構築流程之示意圖及限制酵素圖譜如圖 1 所示。

以 *Sma*I 及 *Xba*I 限制酵素分別切割 pMT91t-Esm-A 及 pMT91t-Esm-GA，可切出 6,706 bp、1,190 bp 及 8,518 bp、1,176 bp 的 DNA 片段 (圖 2A)。再以 *Bam*HI 限制酵素切割，則分別可切出 4,107 bp、3,406 bp、383 bp 及 5,905 bp、3,406 bp、383 bp 的 DNA 片段 (圖 2A)。以核酸引子 aadA-1 及 aadA-2 引子偵測 *aadA* 基因，在載體 pMT91t-Esm-A 及 pMT91t-Esm-GA 可獲得預期片段 0.8 kb 之 *aadA* 之基因片段 (圖 3A、圖 4A)。以核酸引子 gus-1 及 gus-2 引子偵測 *gus* 基因，在載體 pMT91t-Esm-GA 可獲得預期片段 1.8 kb 之 *gus* 之基因片段 (圖 4B)。以核酸引子 Esm-1 及 Esm-2 引子偵測 *Esm* 基因，在載體 pMT91t-Esm-A 及 pMT91t-Esm-GA 均可獲得預期片段 1.2 kb 之 *Esm* 之基因片段 (圖 3B、圖 4C)。以上檢測結果顯示 pMT91t-Esm-A 及 pMT91t-Esm-GA 構築的正確性。以上檢測結果顯示 pMT91t-Esm-A 及 pMT91t-Esm-GA 構築的正確性。

以 *Bam*HI 限制酵素分別切割 pMT91t-Myr-A 及 pMT91t-Myr-GA，可切出 3,406 bp、2,526 bp、2,055 bp、383 bp 及 3,867 bp、3,406 bp、2,526 bp、383 bp 的 DNA 片段 (圖 2B)，再以 *EcoRI* 限制酵素切割，則分別可切出 6,896 bp、928 bp、546 bp 及 6,896 bp、2,740 bp、

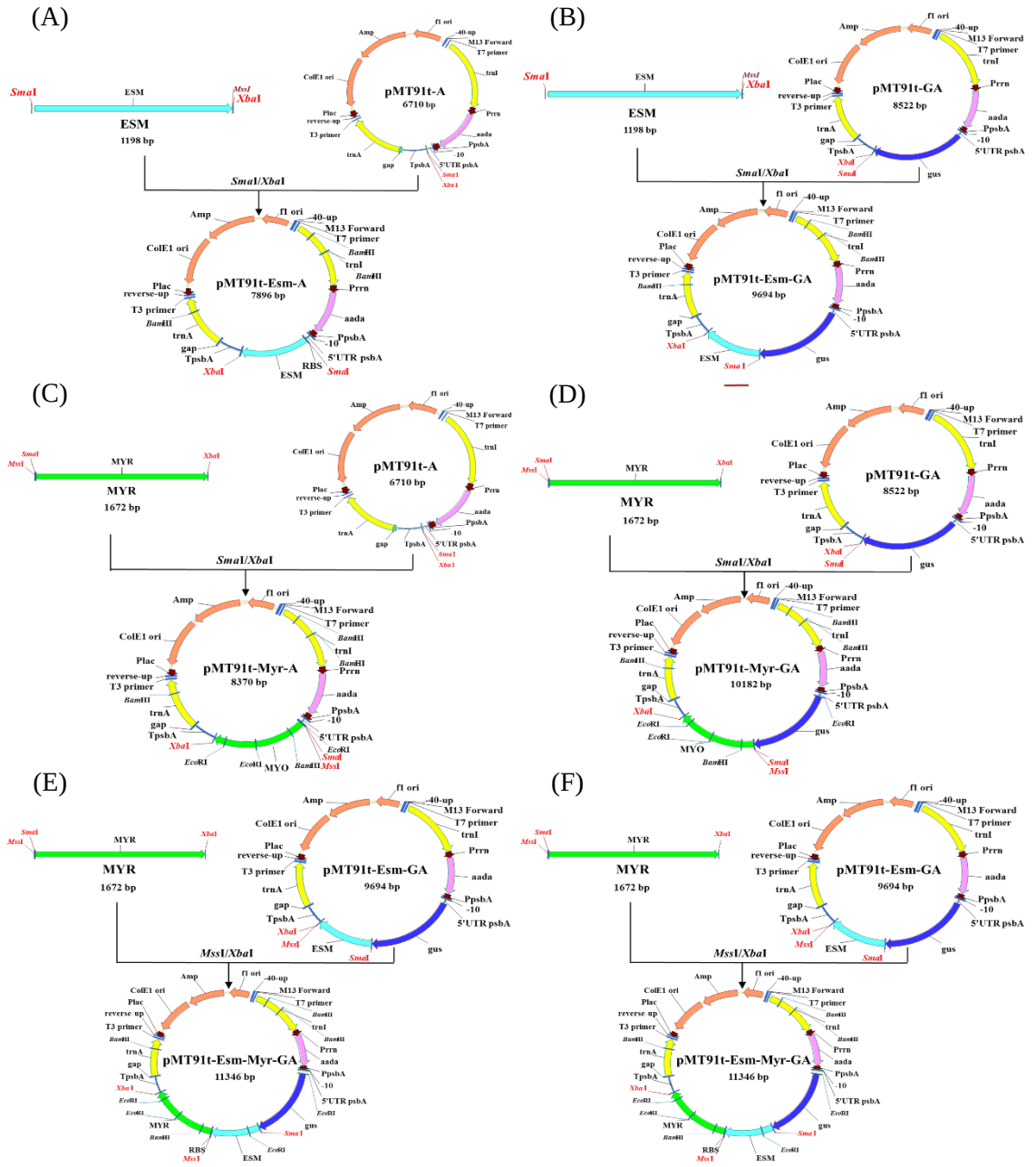


圖 1. 葉綠體轉殖載體 pMT91t-Esm-A (A)、pMT91t-Esm-GA (B)、pMT91t-Myr-A (C)、pMT91t-Myr-GA (D)、pMT91t-Esm-Myr-A (E)及 pMT91t-Esm-Myr-GA (F)之構築流程及限制酵素圖譜。

Fig. 1. Construction scheme and restriction enzyme maps of transplastomic vectors pMT91t-Esm-A (A), pMT91t-Esm-GA (B), pMT91t-Myr-A (C), pMT91t-Myr-GA (D), pMT91t-Esm-Myr-A (E) and pMT91t-Esm-Myr-GA (F).

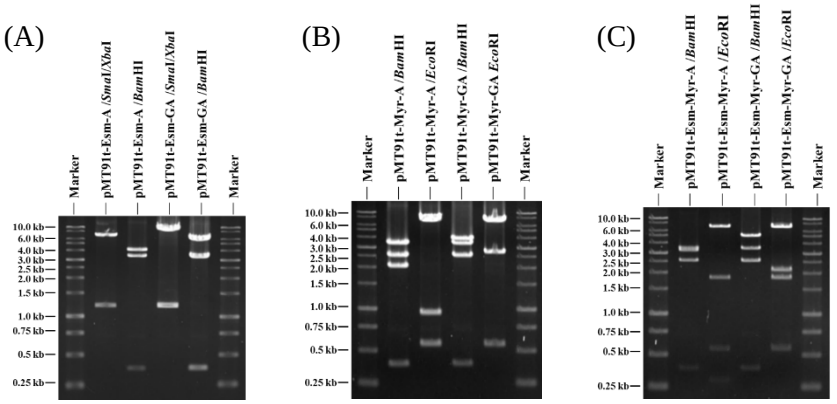


圖 2. pMT91t-Esm-A (A)、pMT91t-Esm-GA (A)、pMT91t-Myr-A (B)、pMT91t-Myr-GA(B)、pMT91t-Esm-Myr-A (C)及 pMT91t-Esm-Myr-GA (C)載體之檢測。

Fig. 2. Identification of pMT91t-Esm-A (A), pMT91t-Esm-GA (A), pMT91t-Myr-A (B), pMT91t-Myr-GA (B), pMT91t-Esm-Myr-A (C) and pMT91t-Esm-Myr-GA (C) vector.

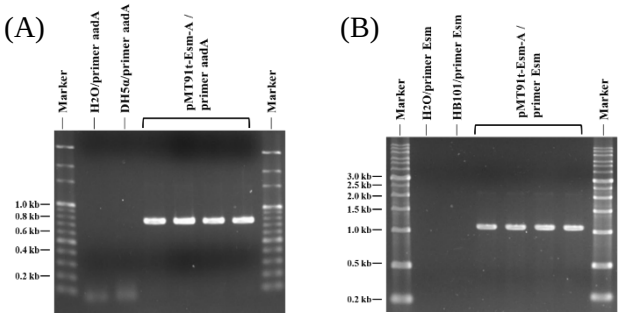


圖 3. 以 PCR 檢測 pMT91t-Esm-A 載體之 *aadA* (A)及 *Esm* (B)基因的正確性。

Fig. 3. Identification of *aadA* (A) and *Esm* (B) genes in transplastomic vector of pMT91t-Esm-A.

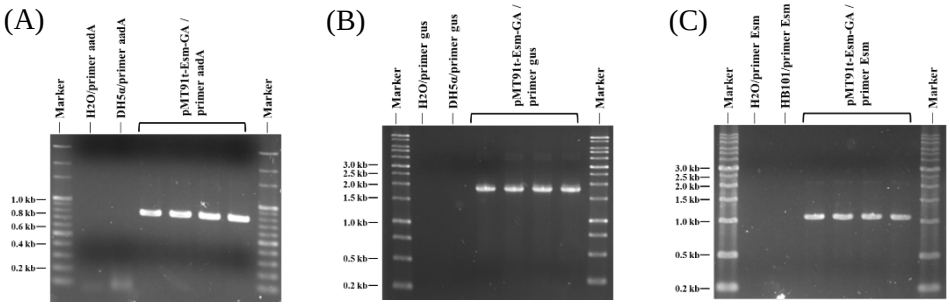


圖 4. 以 PCR 檢測 pMT91t-Esm-GA 載體之 *aadA* (A)、*gus* (B)及 *Esm* (C)基因的正確性。

Fig. 4. Identification of *aadA* (A), *gus* (B), and *Esm* (C) genes in transplastomic vector of pMT91t-Esm-GA.

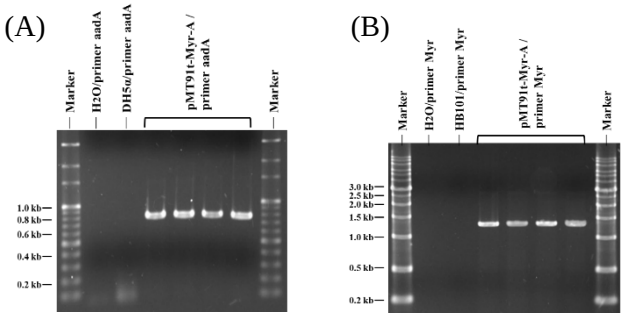


圖 5. 以 PCR 檢測 pMT91t-Myr-A 載體之 *aadA* (A)及 *Myr* (B)基因的正確性。

Fig. 5. Identification of *aadA* (A) and *Myr* (B) genes in transplastomic vector of pMT91t-Myr-A.

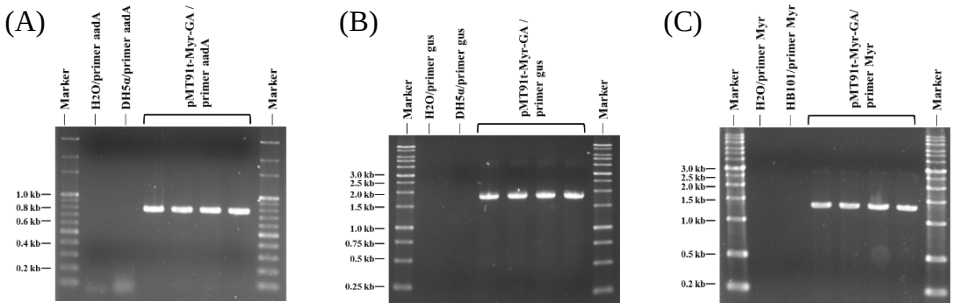


圖 6. 以 PCR 檢測 pMT91t-Myr-GA 載體之 *aadA* (A)、*gus* (B)及 *Myr* (C)基因的正確性。

Fig. 6. Identification of *aadA* (A), *gus* (B), and *Myr* (C) genes in transplastomic vector of pMT91t-Myr-GA.

546 bp 的 DNA 片段(圖 2B)。以核酸引子 aadA-1 及 aadA-2 引子偵測 *aadA* 基因，在載體 pMT91t-Myr-A 及 pMT91t-Myr-GA 可獲得預期片段 0.8 kb 之 *aadA* 之基因片段 (圖 5A、圖 6A)，以核酸引子 gus-1 及 gus-2 引子偵測 *gus* 基因，在載體 pMT91t-Myr-GA 可獲得預期片段 1.8 kb 之 *gus* 之基因片段， (圖 6B)，以核酸引子 Myr-1 及 Myr-2 引子偵測 *Myr* 基因，在載體 pMT91t-Myr-A 及 pMT91t-Myr-GA 可獲得預期片段 1.3 kb 之 *Myr* 之基因片段 (圖 5B、圖 6C)。以上檢測結果顯示 pMT91t-Myr-A 及 pMT91t-Myr-GA 構築的正確性。以上檢測結果顯示 pMT91t-Myr-A 及 pMT91t-Myr-GA 構築的正確性。

以 *Bam*HI 限制酵素分別切割 pMT91t-Esm-Myr-A 及 pMT91t-Esm-Myr-GA，可切出 3,406 bp、3,233 bp、2,526 bp、383 bp 及 5,031 bp、3,406 bp、2,526 bp、383 bp 的 DNA 片段 (圖 2C)，再以 *EcoRI* 限制酵素切割，則分別可切出 6,896 bp、1,816 bp、546 bp、290 bp 及 6,896 bp、2,088 bp、1,816 bp、546 bp 的 DNA 片段 (圖 2C)。以核酸引子 aadA-1 及 aadA-2 引子偵測 *aadA* 基因，在載體 pMT91t-Esm-Myr-A 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 可獲得預期片

段 0.8 kb 之 *aadA* 之基因片段 (圖 7A、圖 8A)，以核酸引子 gus-1 及 gus-2 引子偵測 *gus* 基因，在載體 pMT91t-Esm-Myr-GA 可獲得預期片段 1.8 kb 之 *gus* 之基因片段(圖 8B)，以核酸引子 Esm-1 及 Esm-2 引子偵測 *Esm* 基因，在載體 pMT91t-Esm-Myr-A 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 可獲得預期片段 1.1 kb 之 *Esm* 之基因片段 (圖 7B、圖 8C)，以核酸引子 Myr-1 及 Myr-2 引子偵測 *Myr* 基因，在載體 pMT91t-Esm-Myr-A 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 可獲得預期片段 1.3 kb 之 *Myr* 之基因片段 (圖 7C、圖 8D)，以核酸引子 Esm-1 及 Myr-2 引子偵測 Esm 到 Myr 基因 (全長)，在載體 pMT91t-Esm-Myr-A 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 可獲得預期片段 2.6 kb 之 Esm 到 Myr 之基因片段 (圖 7D、圖 8E)，以核酸引子 Esm-3 及 Myr-3 引子偵測 Esm 到 Myr 基因(部分)，在載體 pMT91t-Esm-Myr-A 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 可獲得預期片段 1.0 kb 之 Esm 到 Myr 之基因片段 (圖 7E、圖 8F)，顯示 pMT91t-Esm-Myr-A 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 構築的正確性。

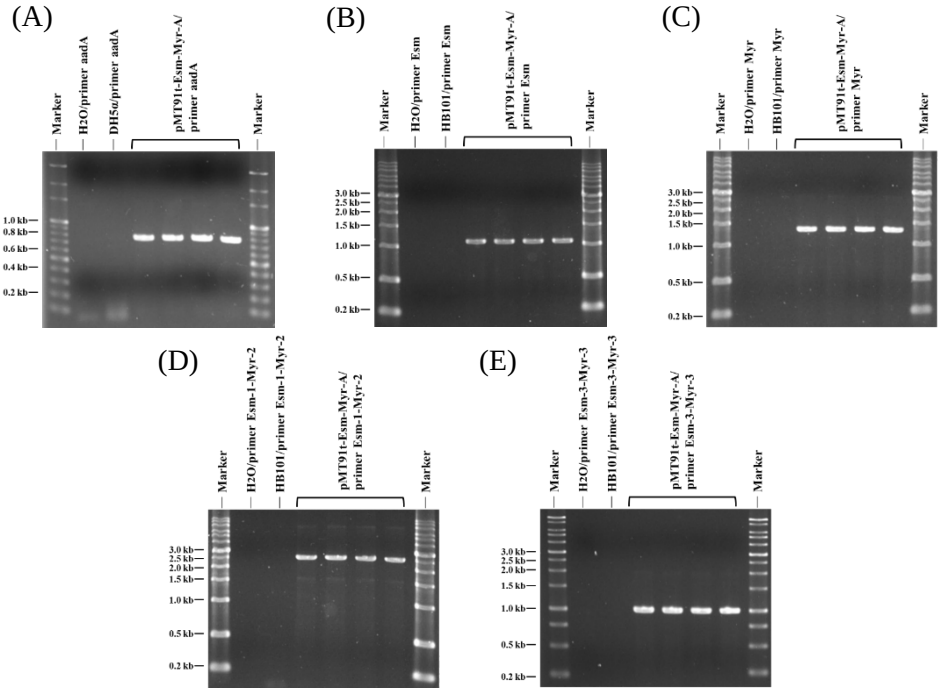


圖 7. 以 PCR 檢測 pMT91t-Esm-Myr-A 載體之 *aadA* (A)、*Esm* (B)、*Myr* (C)、*EsmMyr* (全長) (D)及 *EsmMyr* (半長) (E)基因之正確性。

Fig. 7. Identification of *aadA* (A), *Esm* (B), *Myr* (C), *EsmMyr* (full length) (D) and *EsmMyr* (partial length) (E) genes in chloroplast transformation vector of pMT91t-Esm-Myr-A.

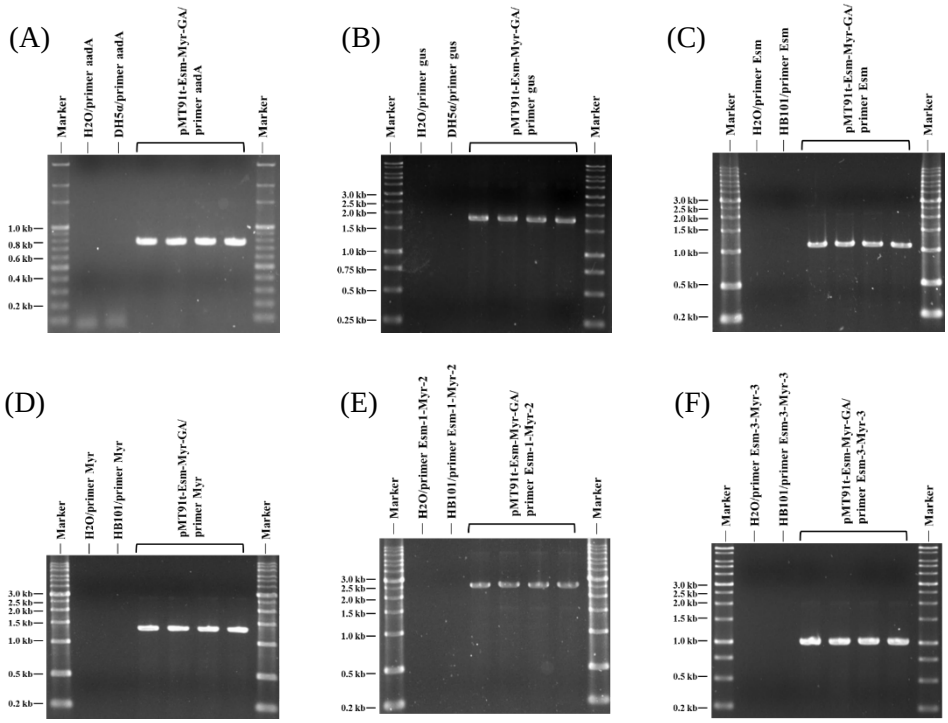
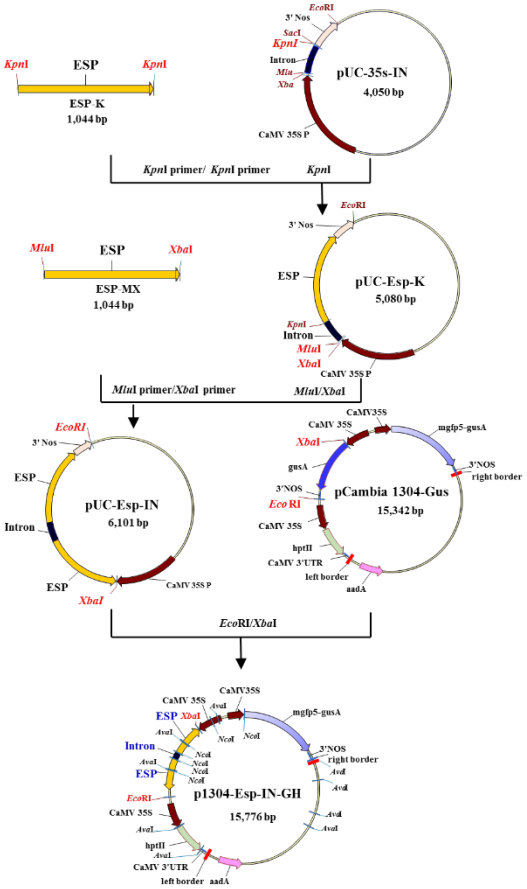


圖 8. 以 PCR 檢測 pMT91t-Esm-Myr-GA 載體之 *aadA* (A)、*gus* (B)、*Esm* (C)、*Myr* (D)、*EsmMyr* (全長) (E)及 *EsmMyr* (半長) (F)基因之正確性。

Fig. 8. Identification of *aadA* (A), *gus* (B), *Esm* (C), *Myr* (D), *EsmMyr* (full length) (E) and *EsmMyr* (partial length) (F) genes in chloroplast transformation vector of pMT91t-Esm-Myr-GA.

本研究的另一重點是將 *Esp* 基因之反向重複結構 (inverse repeat)構築到植物持續表現(constitutive)啟動子—*CaMV35S* 啟動子，並置入到適用於農桿菌介導的基因轉殖載體 pCambia 1304-Gus。其 RNAi 構築策略主要為以 pUC-35S-IN 載體為基礎，於插入子前後分別置入反向與正向的 *Esp* 基因，形成反向重複結構，即完成 p1304-Esp-IN-GH 之載體構築；最後將篩選基因 *daao* 與 p1304-Esp-IN-GH 的 *hptII* 篩選基因進行替換，即完成 p1304-Esp-IN-GD 之載體構築。此兩種轉殖載體構築流程之示意圖及限制酵素圖譜如圖 9 及圖 10 所示。

以 *AvaI* 限制酵素分別切割 p1304-Esp-IN-GH，可切出 4,187 bp、3,867 bp、1,961 bp、1,416 bp、1,131 bp、1,077 bp、1,010 bp、630 bp、480 bp 的 DNA 片段 (圖 11A)，再以 *NcoI* 限制酵素切割，則分別可切出 12,457 bp、1,176 bp、1,089 bp、422 bp、396 bp、236 bp 的 DNA 片段(圖 11A)。以核酸引子 hptII-1 及 hptII-2 引子偵測 *hpt*II 基因，在載體 p1304-Esp-IN-GH 可獲得預期片段 1.0 kb 之 *hpt*II 之基因片段 (圖 12A)，以核酸引子 gus-1 及 gus-2 引



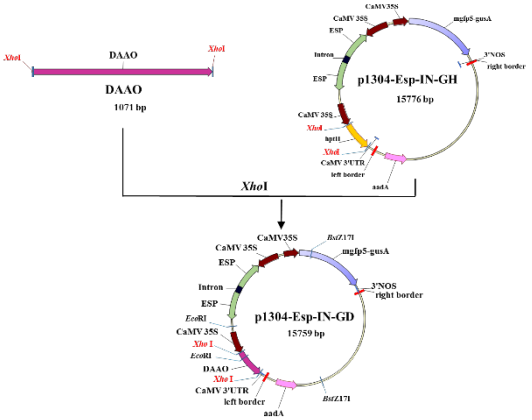


圖 10. 農桿菌轉殖載體 p1304-Esp-IN-GD 之構築流程及限制酵素圖譜。

Fig. 10. Construction scheme and restriction enzyme maps of Agrobacterium transformation vector p1304-Esp-IN-GD.

圖 9. 農桿菌轉殖載體 p1304-Esp-IN-GH 之構築流程及限制酵素圖譜。

Fig. 9. Construction scheme and restriction enzyme map of *Agrobacterium* transformation vector p1304-Esp-IN-GH.

子偵測 *mgfp5-gusA* 基因，在載體 p1304-Esp-IN-GH 可獲得預期片段 1.8 kb 之 *mgfp5-gusA* 之基因片段 (圖 12B)，以核酸引子 Esp-1 及 Esp-2 引子偵測 *Esp* (正向)基因，在載體 p1304-Esp-IN-GH 可獲得預期片段 1.0 kb 之 *Esp* (正向)之基因片段 (圖 12C)，以核酸引子 Esp-3 及 Esp-4 引子偵測 *Esp* (反向)基因，在載體 p1304-Esp-IN-GH 可獲得預期片段 1.0 kb 之 *Esp* (反向)之基因片段 (圖 12D)，顯示 p1304-Esp-IN-GH 構築的正確性。

以 *Eco*RI 及 *Bst*Z17I 限制酵素切割 p1304-Esp-IN-GD，可切出 6,502 bp、4,691 bp、3,286 bp 及 1,280 bp 的 DNA 片段 (圖 11B)。以核酸引子 daao-1 及 daao-2 引子偵測 *daao* 基因，在載體 p1304-Esp-IN-GD 可獲得預期片段 1.0 kb 之 *hpt*II 之基因片段 (圖 12A)，以核酸引子 gus-1 及 gus-2 引子偵測 *mgfp5-gusA* 基因，在載體 p1304-Esp-IN-GD 可獲得預期

片段 1.8 kb 之 *mgfp5-gusA* 之基因片段 (圖 12B)，以核酸引子 Esp-1 及 Esp-2 引子偵測 *Esp* (正向)基因，在載體 p1304-Esp-IN-GD 可獲得預期片段 1.0 kb 之 *Esp* (正向)之基因片段 (圖 12C)，以核酸引子 Esp-3 及 Esp-4 引子偵測 *Esp* (反向)基因，在載體 p1304-Esp-IN-GD 可獲得預期片段 1.0 kb 之 *Esp* (反向)之基因片段 (圖 12D)，顯示 p1304-Esp-IN-GD 構築的正確性。

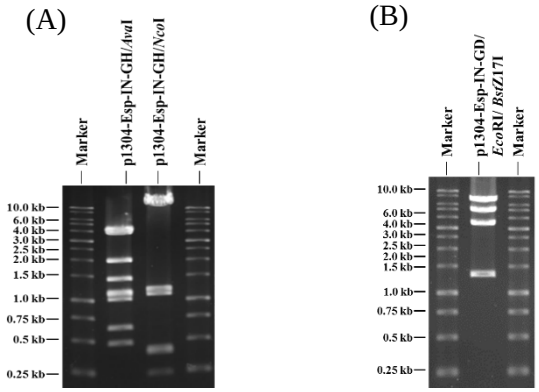


圖 11. p1304-Esp-IN-GH (A)及 p1304-Esp-IN-GD 載體之檢測。

Fig. 11. Construction and identification of p1304-Esp-IN-GH (A) and p1304-Esp-IN-GD (B) vector.

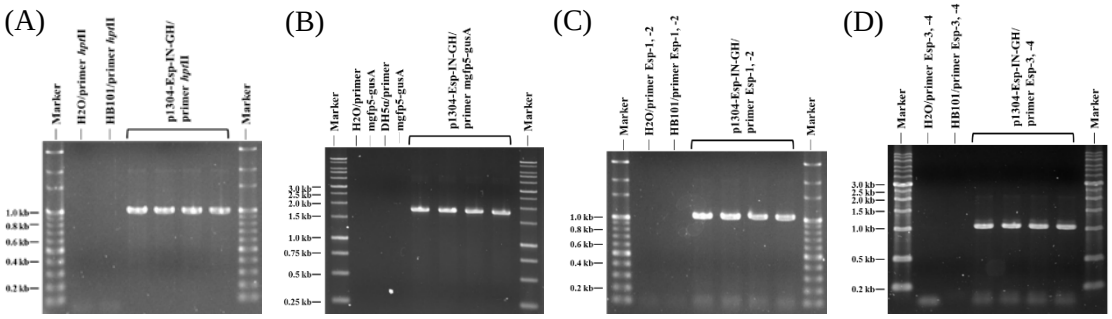


圖 12. 以 PCR 檢測 p1304-Esp-IN-GH 載體之 *hpt*II (A)、*mgfp5-gusA* (B)及 *Esp* (C), (D)基因之正確性。

Fig. 12. Identification of *hpt*II (A), *mgfp5-gusA* (B) and *Esp* (C), (D) genes in *Agrobacterium* transformation vector of p1304-Esp-IN-GH.

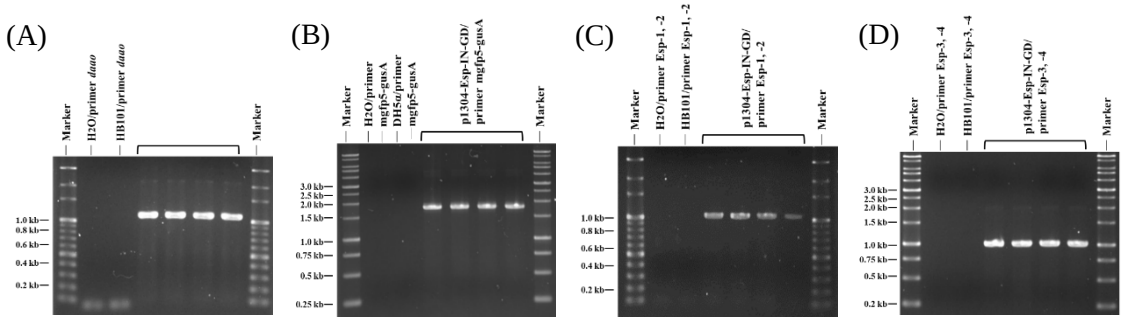


圖 13. 以 PCR 檢測 p1304-Esp-IN-GD 載體之 *hpt*II (A)、*mgfp5-gusA* (B)及 *Esp* (C), (D)基因之正確性。

Fig. 13. Identification of *hpt*II (A), *mgfp5-gusA* (B) and *Esp* (C), (D) genes in *Agrobacterium* transformation vector of p1304-Esp-IN-GD.

(四)、構築載體之 *gus*、*aadA*、*daao* 及 *hpt*II 基因的 *in vivo* 活性測試

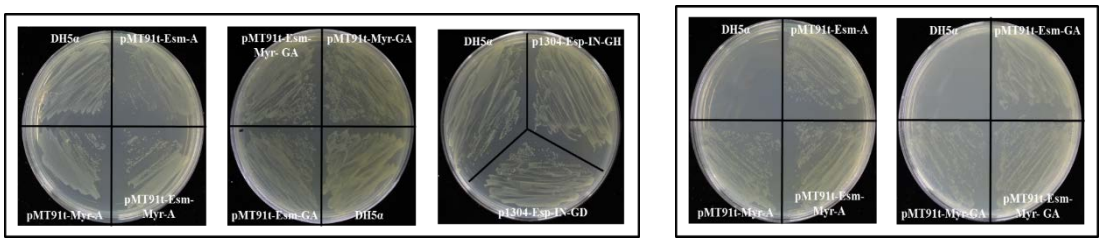
以限制酵素以及PCR分析確認構築載體的正確性後，進一步進行八個構築載體之*gus*、*aadA*、*daao* 及 *hpt*II 基因的活性測試。將攜帶八個構築載體及不攜帶載體之大腸桿菌株 (*E. coli* DH5α)，培養在 LB 培養基上，經隔夜培養後，菌株皆生長良好 (圖 14A)。將 pMT91t-Esm-A、pMT91t-Myr-A、pMT91t-Esm-Myr-A、pMT91t-Esm-GA、pMT91t-Myr-GA 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 等六個質體之大腸桿菌菌株 (*E. coli* DH5α) 培養在含有 25 ppm spectinomycin 的 LB 培養基中，觀察其生長情形。因上述六個載體皆具有 *aadA* 基因可產生 spectinomycin 抗性，因此上述六個菌株皆可正常生長，而不攜帶載體的 (*E. coli* DH5α 則不能生長 (圖 14B)。

將 p1304-Esp-IN-GH 及 p1304-Esp-IN-GD 兩個質體之大腸桿菌菌株 (*E. coli* DH5α) 分別培養在含有 50 ppm hygromycin 及 50 mM D-alanine 的 LB 培養基中，觀察其生長情形。因 p1304-Esp-IN-GH 具有 *hpt*II 基因，而 p1304-Esp-IN-GD 帶有 *daao* 基因，因此兩個載體分別能在 50 ppm hygromycin 及 50 mM D-alanine 的 LB 培養基中正常生長 (圖 14C 及圖 14D)。

在含有 X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)的 LB 培養基中檢測 GUS 活性。pMT91t-Esm-GA、pMT91t-Myr-GA 及 pMT91t-Esm-Myr-GA 含有 *gus* 基因，轉譯後之蛋白質可與 X-gluc 作用，呈現藍色反應 (圖 14E)。

經由限制酶切割確認載體 DNA 大小片段正確，PCR 偵測載體皆有目標基因，以及 *E. coli* 菌株中各載體之基因活性測試顯示，基因功能皆有正常顯現，顯示本實驗所構築之載體正確，攜帶有欲轉殖之目標基因，並表現出基因的活性。

(A) LB (B) LB + 25 ppm spectinomycin



(C) LB + 50 ppm hygromycin (D) LB + 50 mM D-alanine (E) GUS histochemical stain

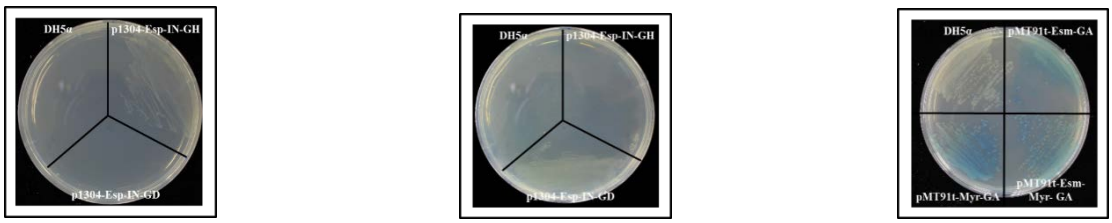


圖 14. 攜帶 pMT91t-Esm-A、pMT91t-Myr-A、pMT91t-Esm-Myr-A、pMT91t-Esm-GA、pMT91t-Myr-GA、pMT91t-Esm-Myr-GA、p1304-Esp-IN-GH 及 p1304-Esp-IN-GD 等質體之大腸桿菌株 (*E. coli* DH5α)培養於 LB 培養基，在未含抗生素 (A)、25 ppm spectinomycin (B)、50 ppm hygromycin (C)或 50 mM D-alanine (D) 之生長情形，以及進行 GUS 活性染色 (E)。

Fig. 14. The growth of *E. coli* DH5α harboring the pMT91t-Esm-A, pMT91t-Myr-A, pMT91t-Esm-Myr-A, pMT91t-Esm-GA, pMT91t-Myr-GA, pMT91t-Esm-Myr-GA, p1304-Esp-IN-GH and p1304-Esp-IN-GD cultivated in the LB medium (A), or containing 25 ppm spectinomycin (B), 50 ppm hygromycin (C), 50 mM D-alanine (D), and results of GUS histochemical staining (E).

討　論

本試驗將自青花菜分離之 *Myr* 及 *Esm* 基因構築了六種適用於蕓苔屬葉綠體基因轉殖載體，pMT91t-Esm-A、pMT91t-Myr-A、pMT91t-Esm-Myr-A、pMT91t-Esm-GA、pMT91t-Myr-GA 及 pMT91t-Esm-Myr-GA，及自青花菜分離之 *Esp* 基因構築兩種適用於 RNAi 型式之農桿菌介導的基因轉殖載體 p1304-Esp-IN-GH 及 p1304-Esp-IN-GD。上述八種載體均經過限制酵素切割，確認載體及基因片段大小的正確性，以 PCR 偵測八種載體皆帶有目標基因。並針對載體上之 *gus*、*aadA*、*daao* 及 *hpt*II 基因是否正常表現，進行 D-alanine、spectinomycin、hygromycin 等抗藥性試驗及 gus 活性分析，試驗結果證實基因皆可正常運

作並表現出活性。由以上結果顯示本試驗構築之載體是構築正確無誤，並可在後續試驗中進行基因轉殖之用

本次實驗中，因構築 *Myr* 基因是利用帶有 *Sma*I *Mss*I 及 *Xba*I 酵素切位為引子，製造出 *Sma*I *Mss*I 及 *Xba*I 的限制酵素切位。使用 *Xba*I 酵素時，無法順利將 *Myr* 基因切下，造成構築 *Myr* 基因無法順利完成。原以為是引子最初設計有誤或是酵素無法正常運作，但經定序後發現引子並無問題，且 *Xba*I 酵素於其他質體中仍可正常作用。經搜索文獻後得知在大腸桿菌中的 GATC 序列會被甲基化 (Razin and Friedman, 1982)，而本實驗室蔡奕祥學長所選殖的 *Myr* 基因 5'端末兩碼為 GA，*XbaI* 酵素的辨識序列前兩碼為 TC，當製造出 *Xba*I 酵素切位時，剛好形成 GATC 序列，而大腸桿菌中的 Dam 甲基化酶 (Dam methylase) 會造成此序列甲基化，使得 *Xba*I 酵素無法辨識進行切割。為了解決此題，我們改用其他大腸桿菌菌系。本試驗構築 *Myr* 基因時所使用的菌系為 GM48，其特點為 Dam 甲基化酶的基因突變，使 Dam 甲基化酶無法在 GATC 序列上作用，因此將構築過程所使用的大腸桿菌菌系從 DH5α 藉由轉型作用至大腸桿菌菌系 GM48，以解決 GATC 序列甲基化的問題，而本研究得以順利完成 *Myr* 基因的構築。

參 考 文 獻

Andreasson, E., J. Taipalensuu, L. Rask, and J. Meijer, 1999. Age-dependent wound induction of a myrosinase-associated protein from oilseed rape (*Brassica napus*). Plant Molecular Biology 41: 171-180.

Andréasson, E., L. B. Jørgensen, A. Höglund, L. Rask, and J. Meijer. 2001. Different Myrosinase and Idioblast Distribution in Arabidopsis and *Brassica napus*. Plant Physiol. 127: 1750-1763.

Kissen, R., J. T. Rossiter, and A. M. Bones. 2009. The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. Phytochemistry Reviews 8: 69-86.

Kliebenstein, D. J., J. Kroymann, and T. Mitchell-Olds. 2005. The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. Curr. Opin. Plant Biol. 8: 264-271.

Ku, K. M., J. H. Choi, H. S. Kim, M. M. Kushad, E. H. Jeffery. 2013. Methyl jasmonate and 1-methylcyclopropene treatment effects on quinone reductase inducing activity and post-harvest quality of broccoli. PLoS ONE 8(10): e77127. doi:10.1371/journal.pone. 0077127.

Park, J.-H., S.-J. Lee, B.-R. Kim, E.-T. Woo, J.-S. Lee, E.-H. Han, Y.-H. Lee, and Y.-D.Park. 2011. Isolation of myrosinase and glutathione S-transferase genes and gransformation of ghese genes to develop phenylethylisothiocyanate enriching Chinese cabbage. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29(6): 623-632.

Razin, A. and J. Friedman. 1982. DNA Methylation and its Possible Biological Roles. Prog. Nucletic Acids Res. Mol. Biol. 25: 33-52.

Taipalensuu, J., E. Andreasson, S. Eriksson, and L. Rask L. 1997. Regulation of the wound-induced myrosinase-associated protein transcript in *Brassica napus* plants. Eur. J. Biochem. 247(3): 963-971.

Williams, D. J., C. Critchley, S. Pun, S. Nottingham, and T. J. O'Har. 2008. Epithiospecifier proteinactivity in broccoli: The link between terminal alkenyl glucosinolates and sulphoraphane nitrile. Phytochemistry 69: 2765-2773.

Wittstock, U. and B. A. Halkier. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. Trends Plant Sci. 7(6):263-270.

Wu, Q., J. Lin, K. Huang and M. Liu. 2013. Characterization and expression analysis of myrosinase for sulforaphane synthesis in broccoli. Int. J. Agric. Biol. 15: 83-89.

Zhang, Z. Y., J, A, Ober, and D. J. Kliebenstein. 2006, The gene controlling the quantitative trait locus *EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1* alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 18: 1524-1536.

Construction of Over-expression and RNAi Suppression Vectors of *Myr*, *Esm* and *Esp* Genes

Yung-Shen Lin[1)] I-Chun Pan[2)] Jinn-Chin Yiu[3)] Menq-Jiau Tseng[4)]

Key words: Broccoli, Cabbage, Gene Transformation, Sulforaphane, Metabolic Engineering

Summary

In this study, *Brassica* chloroplast transformation vectors harboring the *MYR* and *ESM* genes were constructed. Vectors harboring antisense--oriented *ESP* gene (*ESPi*) were also constructed for *Agrobacterium*-mediated transformation. Six *Brassica* chloroplast transformation vectors had been constructed, namely pMT91t-Esm-A, pMT91t-Myr-A, pMT91t-Esm-Myr-A, pMT91t-Esm-GA, pMT91t-Myr-GA and pMT91t-Esm-Myr-GA. Two RNAi constructs for *ESP* gene has been obtained, namely, p1304-Esp-IN-GH and p1304-Esp-IN-GD.

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

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

3) Professor, Department of Horticulture, National Ilan University.

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