

黑芥子酶(Myrosinase, MYR)及表皮特異硫蛋白修飾子(Epithiospecifier modifier, ESM)基因轉殖至青花菜葉綠體之研究

林 泳 伸¹⁾ 潘 怡 君²⁾ 陳 柏 亨³⁾ 曾 夢 蛟⁴⁾

關鍵字：青花菜、葉綠體基因轉移、蘿蔔硫素、代謝工程

摘要：蘿蔔硫素 (sulforaphane)具有抑制癌細胞繁殖、防止癌細胞的發展、抗癌細胞轉移等作用。蘿蔔硫素是一種異硫氰酸鹽 (isothiocyanate)，由硫代葡萄糖苷 (glucosinolates)經存在於植物體液泡內的黑芥子酶 (myrosinase, MYR)水解而得，研究同時顯示 ESM (epithiospecifier modifier, 表皮特異硫蛋白修飾子)會促進蘿蔔硫素的生成。我們將攜帶青花菜之 *Myr* 及 *Esm* 基因之蕁苔屬葉綠體轉殖載體 (pMT91t-Esm-Myr-GA)載體，利用基因槍法將其轉移至'綠王'青花菜下胚軸中。再生培植體經 10 ppm spectinomycin 持續篩選，已獲得再生植株。轉殖再生植株葉片之 PCR、RT-PCR 及 qrt-RT-PCR 分析之結果顯示，轉殖之 *Myr* 及 *Esm* 基因已存在於轉殖植株之葉綠體基因組，並表現其 mRNA。

前 言

青花菜，學名 *Brassica oleracea* var. *italica*，英名 broccoli，為野生甘藍變種而來，在台灣大多於秋冬裡作栽培 (林，2013)，2016 年台灣青花菜的栽種面積為 1,900 公頃，全年生產總值約為新台幣 13.8 億元，青花菜及花椰菜全年進口總值約為新台幣 7 億元 (農業統計年報，2016)。青花菜營養價值高，含有豐富的維生素 A、C 及礦物質，此外還含有具強效抗癌性能的多種營養成分，如蘿蔔硫素 (sulforaphane)、二吡啶甲烷、類黃酮、多酚類等，且具有抗病毒、抗細菌和抗腫瘤活性等作用，受到消費者的青睞(林，2011)。

-
- 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) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
 - 4) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

蘿蔔硫素 (1-異硫氰酸-4-甲磺基丁烷, sulforaphane)是至目前為止所有天然抗癌物質中效力最強、效果最好的活性物質 (Tilaar *et al.*, 2012), 為一種異硫氰酸鹽 (isothiocyanates), 由硫代葡萄糖苷 (glucosinolates)經植物體內黑芥子酶 (myrosinase, MYR)水解所得。在黑芥子酶 (myrosinase, MYR)–硫代葡萄糖苷體 (glucosinolates)系統中, 黑芥子酶存在於植物體內一種特化細胞—黑芥子酶細胞中, 硫代葡萄糖苷儲存於液胞中, 二者分佈呈現區室化隔離 (Pontoppidan *et al.*, 2005)。當植物器官組織受到傷害時, 黑芥子酶–硫代葡萄糖苷的區室化被破壞, 黑芥子酶催化硫代葡萄糖苷發生水解並釋放相應的物質。黑芥子酶催化硫代葡萄糖苷水解生成葡萄糖和不穩定中間物硫苷配基 (aglycone) (圖 1); 硫苷配基在 ESP (epithiospecifier protein, 上皮硫特異蛋白)存在時, 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); 在 ESM (epithiospecifier modifier, 表皮特異硫蛋白修飾子)存在時, 會抑制腈類化合物 (nitriles)形成及促進蘿蔔硫素的生成 (Zhang *et al.*, 2006; Ku *et al.*, 2013)。

植物葉綠體基因轉殖具有大量表現轉殖基因、母系遺傳不會造成基因污染、不會有基因靜寂及插入位置效應、合成物質能區間隔離及較細胞核基因轉殖穩定等優點 (Maliga, 2004)。因此本研究將自青花菜分離之 *Myr* 及 *Esm* 基因構築到蕓苔屬葉綠體基因轉殖載體系統, 將此二個基因共同轉移至青花菜之葉綠體中, 期望在葉綠體中大量表現 *Myr* 及 *Esm* 基因, 如此當植物器官組織受到傷害時, 即可大量合成蘿蔔硫素。

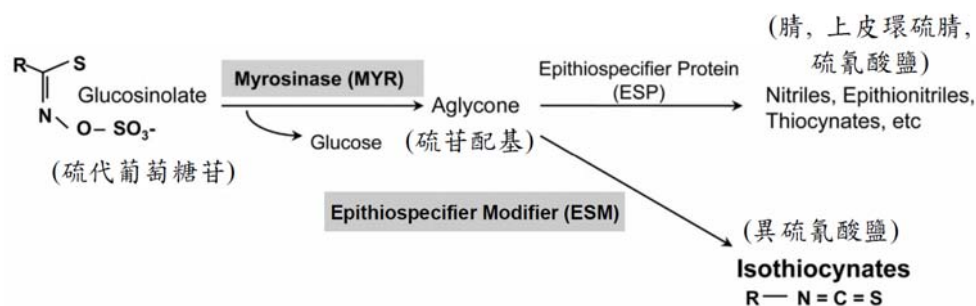


圖 1. 異硫氰酸鹽(包括:蘿蔔硫素)之生合成途徑。(來自: Park *et al.*, 2011)

Fig. 1. Isothiocyanate (include: sulforaphane) biosynthesis pathway. (Source: Park *et al.*, 2011)

材料與方法

一、轉殖植物材料

(一)、基因轉殖植物材料

本試驗以十字花科蕓苔屬蔬菜之'綠王'青花菜 (*Brassica oleracea* L. var. *italica* L. cv. 'Green King') 為葉綠體基因轉殖之試驗材料。無菌播種流程如下, 將適量的種子裝於 50 ml 離心管中, 加入 70%酒精 (約半滿), 劇烈震盪 1 分鐘後, 去除酒精再以無菌水洗滌一

次後，去除無菌水並加入現配混勻之 1.5% 的 ColroX 漂白水，以迴轉式震盪器搖晃 15 分鐘，去除漂白水後以無菌水洗滌五次。將完成滅菌後之種子播於 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培養基中 (MS 培養基含有 3% sucrose、400 mg/L MES hydrate、pH 5.7)，放置於 25°C 光週期為 12 小時的生長箱中，培養七至八天後取其下胚軸直立插入培養基中排列於培養基正中央之 2 公分同心圓中，進行基因槍轟擊。

(二)、葉綠體基因轉殖載體

本試驗轉殖的載體為 pMT91t-Esm-Myr-GA (圖 2)。pMT91t-Esm-Myr-GA 上攜帶有 *PpsbA* 啟動子及 *gus* 報導基因、*Esm* 及 *Myr* 目標基因、*TpsbA* 終結子之操縱組 (operon)，與 *Prrn* 啟動子、*aadA* 篩選基因及 *TpsbA* 終結子，以 *trnA* 及 *trnI* 葉綠體 DNA 為有同源重組的位置。

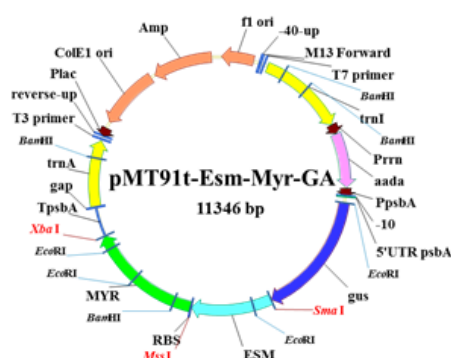


圖 2. 葉綠體轉殖載體 pMT91t-Esm-Myr-G 之基因圖譜。

Fig. 2. Genetic maps of transplastomic vectors pMT91t-Esm-Myr-GA.

二、試驗方法

(一)、基因槍轉殖方法

1. 鹼裂解法質體 DNA 萃取

取單一菌落置於 5 ml LB 培養液中，加入抗生素 (ampicillin) 濃度為 100 ppm，以 37°C 轉速 100 rpm 培養 12-16 小時後，吸取 100 μ l 菌液到 100 ml LB 中，添加 100 ppm ampicillin，以 37°C 轉速 100 rpm 培養 12-16 小時後，取菌液置於 50 ml 離心管中以 8,000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，除去上清液體。重複兩次後，加入 10 ml solution I (alkaline lysis) vortex 直到菌體被充分懸浮，加入 15 ml solution II (alkaline lysis) 上下混勻 2 分鐘，置於冰上 3 分鐘，以最高速 (12,000 rpm) 4°C 離心 30 分鐘去除上清液，加入 10 ml 70% 酒精將 pellet 旋起，以最高速 (12,000 rpm) 4°C 離心 30 分鐘去除上清液，離心 30 分鐘，取上清液以濾紙過濾至於新的 50 ml 離心管中，加入等體積 isopropanol 混勻後室溫下靜置 20 分鐘，最高速 (12,000 rpm) 4°C 離心 20 分鐘去除上清液，加入 10 ml 70% 酒精將 pellet 旋起，以最高速 (12,000 rpm) 4°C 離心 10 分鐘去除上清液，加入 500 μ l TE buffer 回溶 pellet 加入 RNase A

使終濃度為 10 mg/ml，37°C 水浴槽培養 1 小時後，取 1 μ l 跑膠確認 RNA 已消除。再分裝至 1.5 ml 離心管中加入等體積量的 phenol/ chloroform/isopropanol (24 : 25 : 1) vortex 15 分鐘後，最高速 (15,000 rpm) 4°C 離心 10 分鐘，取上清液加入等體積量的 phenol/isopropanol (24 : 1) vortex 5 分鐘，最高速 (15,000 rpm) 4°C 離心 10 分鐘取上清液，加入 2 倍體積的絕對酒精與 0.1 倍的 3M NaOAc 混勻後，放進 -70°C 冰箱 20 分鐘沉澱，最高速離心 (15,000 rpm) 4°C 20 分鐘，去除上清液體，加入 10 ml 的 70% 酒精後將 pellet 懸起，最高速離心 (15,000 rpm) 4°C 10 分鐘，去除上清液 pellet 以適當的 TE buffer 回溶，稀釋適當倍率的 DNA 跑膠以 image J 軟體進行 DNA 濃度計算，將 DNA 濃度調整至 1 μ g/ μ l，儲存於 4°C 冰箱備用。

2. 金粒子 (0.6 μ m gold particle, Bio-Rad) 的滅菌與清洗

秤取 50 mg 金粒子於微量離心管中，加入 1 ml 70% 酒精，高速震盪 2 分鐘後，以 600 g 離心 30 秒去上清，加入 1 ml 無菌水，高速震盪 2 分鐘後，以 600 g 離心 30 秒去上清。重複清洗三次後加入 833 μ l 的 50% glycerol，高速震盪 1 分鐘後，均勻分裝成每管 50 μ l，儲存於 -20°C 備用。

3. 金粒子披覆轉殖載體 DNA

取由上述步驟的一管 50 μ l 清洗過的金粉溶液，加入 5 μ l (1 μ g/ μ l) 的轉殖載體 DNA，混合均勻後，慢速加入 50 μ l 2.5 M 氯化鈣溶液，均勻混合後再加入 20 μ l 0.1 M spermidine (SIGMA)，混合均勻後室溫靜置 10 分鐘。再以 600 \times g 離心 17 秒鐘後去上清液，加入 150 μ l 無水酒精混合均勻後，再以 600 \times g 離心 17 秒鐘後去上清液，最後加入 55 μ l 無水酒精混合均勻。

4. 基因槍轟擊

本實驗以 Bio-Rad 公司所研發的基因槍型號 Biolistic[®] PDS-1000/He Particle Delivery System 進行基因槍轟擊。首先以 70% 酒精擦拭無菌操作台與基因槍室內，將微載片、壓力膜 (1,100 psi)、鐵網等基因槍耗材以 95% 之酒精潤濕後，將微載片與 macrocarrier holder 組裝完成置於無菌擦手紙上備用，將 spacer rings 與 stopping screen support 組裝後，開啟 UV 燈照射 15 分鐘。將氦氣瓶開啟升壓高至 1,100 psi 以上後開啟真空幫浦，開啟抽氣馬達及基因槍開關後即可準備轟擊。將 10 μ l DNA-coated gold particles 均勻塗抹在組裝好的 macrocarrier-macrocarrier Holder 的中心，待金粒子內酒精揮發乾後，將所有基因槍零件組裝至基因槍室內，再將準備之培植體，置於槍口正下方的塑膠盤上，調整微載片與培植體至 6 公分之距離準備轟擊。轟擊時將按下抽真空按鈕使基因槍室內達到 27-28 in Hg，再按下加壓開關引入氦氣累積至 1,100 psi 時便會使壓力膜爆破，將微載片上帶有 DNA 之金粒子轟擊至培植體。轟擊後，卸除真空壓力，取出培植體，待所有培植體轟擊完後，關閉氦氣瓶關，抽真空進行空槍擊發，待壓力表皆為 0 時，鬆開壓力閥，關閉馬達與基因槍。

(二)、植株再生、抗生素之篩選、出瓶

轟擊後之培植體於暗室培養 2 天後，將其平貼置於再生培養基一周後，再移至篩選再

生培養基 (再生培養基添加 10 mg/L spectinomycin), 每兩週繼代一次, 直到誘導出芽體後。將芽體切下移入發根培養基 [含有 2.2 g/L Murashige and Skoog medium (Duchefa Biochemie)、0.4 g/L MES hydrate (SIGMA)、15 g/L sucrose (Biochemie MERCK)、0.3 mg/L 1-naphthylacetic acid (MERCK)、8 g/L Agar (USB)、pH 值 5.8], 誘導發根。待誘導出根部且強健後, 移出瓶外定植於混和介質 (泥炭土: 珍珠石: 蛭石 = 8: 1: 1), 先套上塑膠袋保濕, 直到植物健化後移除塑膠袋, 放置溫室栽培。

(三)、甘藍及青花菜轉殖植株之檢測

1. 聚合酵素鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)分析

採用 Thermo Hybrid 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 μ l, 包含有的 1 倍的 Blend Taq buffer、0.2 mM each dNTP、0.1 μ M 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°C 10 分鐘, 1 個 cycle; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 60 秒, 共進行 35 個 cycles, 最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後, 取終產物 8 μ l 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

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

偵測 *gus* 基因引子, 分別為 5'-ATGTGCTGTGCCTGAACCGT-3' (*gus*-3)及 5'-TTTGCC TCCCTGCTGCGG -3' (*gus*-2), 可增幅出 425 bp 片段。反應流程為 94°C 10 分鐘, 1 個 cycle; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒, 共進行 35 個 cycles, 最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後, 取終產物 8 μ l 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'-CTAC CTTGGTGATCTCGCCTTTC-3' (*aadA*-2), 可增幅出 0.8 kb 片段。反應流程為 94°C 10 分鐘, 1 個 cycle; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 60 秒, 共進行 35 個 cycles, 最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後, 取終產物 8 μ l 於 1%之洋菜膠上進行電泳分析。

2. 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR)分析

進行 RT-PCR 時以 cDNA 作為模板進行 PCR 工作。偵測各基因之引子及 PCR 反應流程，與上述 (轉殖載體之 PCR 分析) 相同。

3. 即時定量反轉錄聚合酵素連鎖反應 (Quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, qrt-RT-PCR) 分析

採用 CFX Connect Real-Time PCR Detection System 儀器進行 qrt-PCR，利用的螢光染劑為非專一性的 SYBR Green I。取 1 μ l 的 cDNA 加入含有 0.5 μ l 的 0.1 μ M 核酸引子及 10 μ l iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD)，再以去離子水補滿至 20 μ l。置於即時定量聚合酶鏈鎖反應器中進行 qrt-PCR 反應。各基因偵測方式分述如下：

偵測 *Actin* 基因引子，5'-CATGTTCCACCACACAGCCG-3' (Myr-4) 及 5'-TCTTCTCG ATGGAGGAGCTGGTT-3' (Myr-5)。反應流程為 95°C 3 分鐘，1 個 cycle；95°C 10 秒，60°C 10 秒，72°C 30 秒，共進行 39 個 cycles。

偵測 *Myr* 基因引子，5'-GATAAGACTGACCAAGCCAGCAGAG-3' (Myr-4) 及 5'-GAAG CCGACTACCCACAATTTCC-3' (Myr-5)。反應流程為 95°C 3 分鐘，1 個 cycle；95°C 10 秒，60°C 10 秒，72°C 30 秒，共進行 39 個 cycles。

偵測 *Esm* 基因引子，5'-CTAGCACCATTGGGTTGCTTACC-3' (Esm-4) 及 5'-CGGACC GATCTTCTCGTTGTG-3' (Esm-5)。反應流程為 95°C 3 分鐘，1 個 cycle；95°C 10 秒，60°C 10 秒，72°C 30 秒，共進行 39 個 cycles。

結 果

一、青花菜的葉綠體基因轉殖、培植體篩選及誘導再生

本研究之試驗材料是將青花菜的種子無菌播種一週後 (圖 3A) 取其下胚軸，以便進行基因槍轟擊。基因槍轟擊時將青花菜之下胚軸直立排列於培養基中間 2 公分的圓周內 (圖 3B)，進行轟擊。轟擊過後的下胚軸經暗處理兩天後，換至再生培養基培養一週 (圖 3C)，讓傷口癒合。隨後將下胚軸平躺於含有 10 ppm spectinomycin 的再生培養基中進行篩選，並於每兩週更換至含有新的 10 ppm spectinomycin 的再生培養基中，以保持篩選壓力的穩定。

篩選兩週後下胚軸末端會形成較肥大的癒傷組織 (圖 3D)。篩選六週後，下胚軸末端癒傷組織會形成芽體 (圖 3E)，因其 spectinomycin 的作用，導致下胚軸再生成芽時會出現不同程度的白化現象 (圖 3F)。將芽體經過多次長時間篩選，芽體會逐漸褐化死亡，不再有分化生長的現象 (圖 3G)。轉殖成功之培植體在具有 spectinomycin 長期篩選壓力下仍會再生出正常芽體 (圖 3H)。存活的植株則移至不含 spectinomycin 的發根培養基誘導發根 (圖 3I)，約二至四週後，芽體成功分化出健全的根部 (圖 3J)，將發根完全的植株移出瓶外定植於滅菌過的混合介質 (泥炭土：珍珠石：蛭石=3：1：1)，套上塑膠袋保濕 (圖 3K)，待植株健化完全後移除塑膠袋，放置溫室 (圖 3L)。

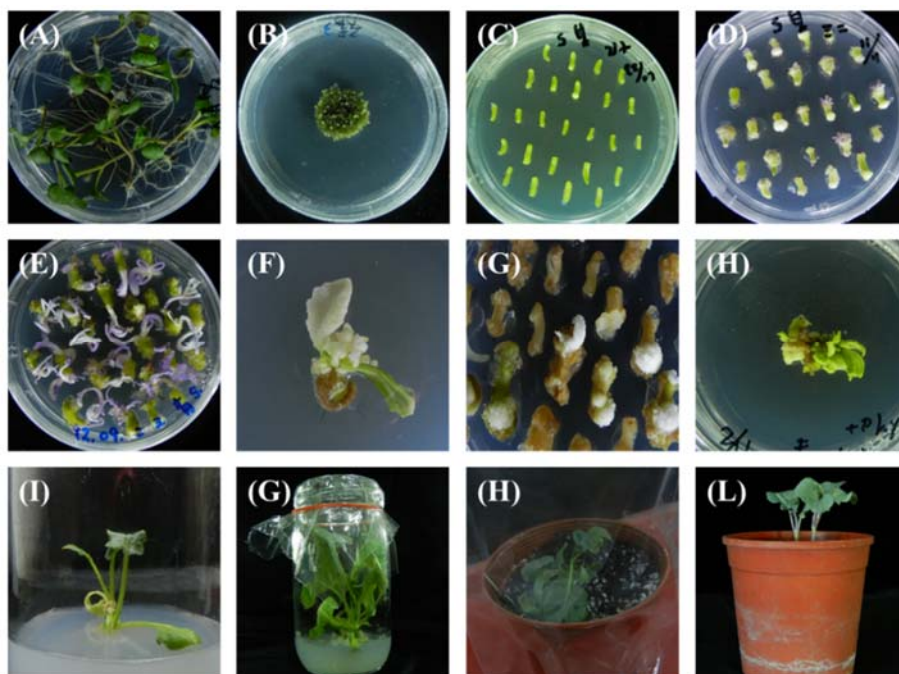


圖 3. '綠王'青花菜下胚軸經基因槍轉移基因、篩選及誘導植株再生之情形。(A) 甘藍種子無菌播種一週後之情形；(B)將無菌播種一週後之甘藍下胚軸排列在 2 cm 的圓周內準備轟擊；(C) 培植體轟擊後暗處理兩天移至再生培養基再生一週之情形；(D) 篩選二週後培植體生長情形；(E) 篩選六週後培植體生長情形；(F) 經過 10 ppm spectinomycin 篩選後植株白化之情形；(G) 篩選十週後，未轉殖成功之培植體逐漸褐化死亡；(H) 在有篩選壓力下，仍正常生長之培植體；(I) 篩選存活之植株移至發根培養基；(J) 芽體分化出完整根部；(K) 再生植株出瓶馴化；(L) 定植於溫室植株。

Fig. 3. Regeneration of transplastomic 'Green King' broccoli from hypocotyls after biolistic bombardment. (A) Broccoli seeds were germinated *in vitro* for 7 days. (B) The hypocotyls were excised from 7-day-old seeding and placed in a circle within a 2 cm radius for biolistic bombardment. (C) After biolistic bombardment, hypocotyls were cultivated in dark for 2 days and then transferred to the regeneration medium for 7 days. (D), (E) Regenerated shoots were subjected to 10 ppm spectinomycin for 2 weeks and 6 weeks, respectively. (F) Bleaching leaves were appeared in non-transplastomic explants after 10 ppm of spectinomycin treatment. (G) After 10 weeks of cultivation, non-transplastomic explants showed chlorosis and bleaching. (H) Vigorous growths were shown in transplastomic plantlets in 10 ppm spectinomycin. (I) Induction of root formation was performed in root-inducing medium. (J) Growth of roots. (K) Putative transplastomic plants were transferred to pot and acclimated for ambient environment. (L) Putative transplastomic broccoli was grown in the greenhouse.

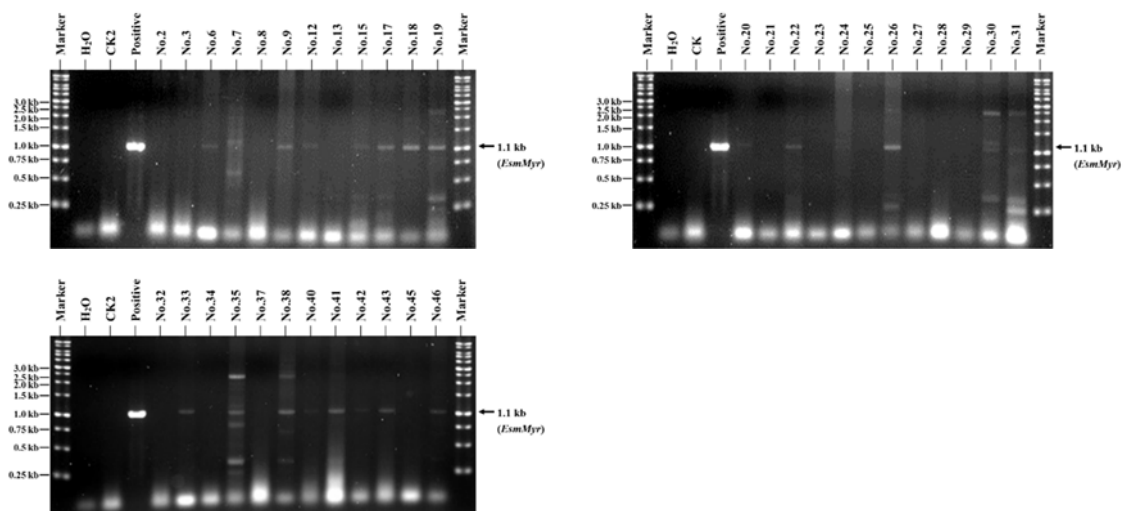
二、擬轉殖青花菜植株之基因及表現分析

(一)、聚合酶連鎖反應(PCR)分析

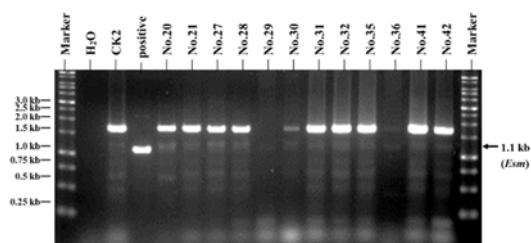
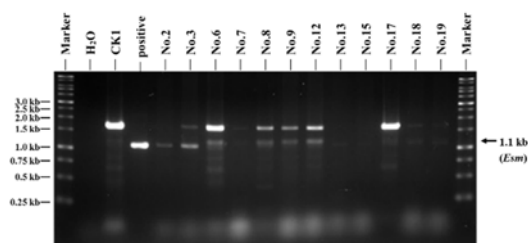
本研究以基因槍轟擊青花菜下胚軸，經 spectinomycin 篩選，誘導植株再生。所得之再生植株，萃取葉片基因組 DNA，分別以 *Esm*、*Myr*、*aadA* 及 *gus* 等之獨特核酸引子進行 PCR 分析，偵測是否帶有 *EsmMyr*、*Esm*、*Myr*、*aadA*、*gus* 等目標基因。PCR 分析結果顯示共獲得 39 株擬轉殖青花菜。

PCR 分析 *EsmMyr* 基因片段結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中的 23 株偵測到 1.1 kb 之 *EsmMyr* 基因片段。圖 4A 顯示供試的 36 株轉殖青花菜樣品中有預期 *EsmMyr* 基因片段條帶 (1.1 kb) 的 23 株轉殖植株，未轉殖植株 (CK1、CK2) 則無。分析 *Esm* 基因之結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中只有 6 株可偵測到轉殖的 1.1 kb 之 *Esm* 基因，而未轉殖植株 (CK1、CK2) 則無 (圖 4B)。在大部份轉殖青花菜及未轉殖植株都可偵測到另一條條帶亮度很強，約 1.75 kb 的青花菜內源性 *Esm* 基因條帶。分析 *Myr* 基因之結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中共有 25 株可偵測到轉殖的 1.3 kb 之 *Myr* 基因，而未轉殖植株 (CK1、CK2) 則無 (圖 4C)。同時在大部份轉殖青花菜及未轉殖植株都可偵測到另二條約 1.5 kb 及 2.3kb 的青花菜內源性 *Myr* 基因。分析 *aadA* 基因之結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中的 28 株都可偵測到轉殖的 0.8 kb 之 *aadA* 基因，未轉殖植株 (CK1、CK2) 則無 (圖 4D)。同時在少數轉殖青花菜可偵測到另一條約 0.65 kb 的 *aadA* 基因條帶，而轉殖載體 (positive control) 及未轉殖植株 (CK3) 則無。

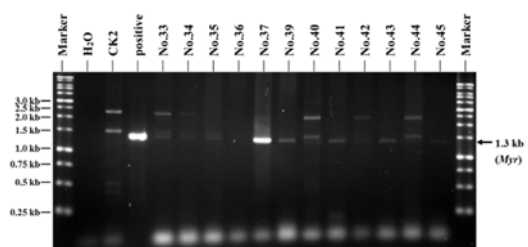
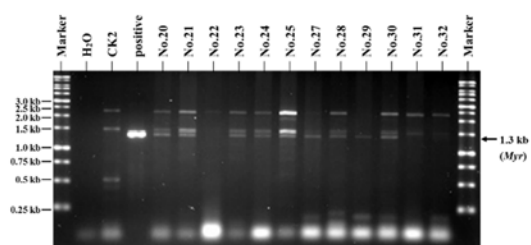
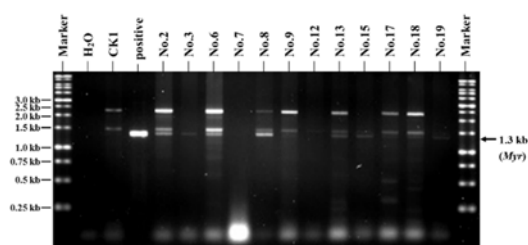
(A) *EsmMyr* 基因片段



(B) *Esm* 基因



(C) *Myr* 基因



(D) *aadA* 基因

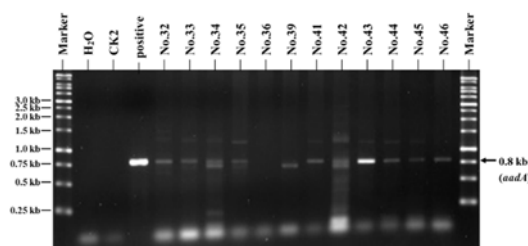
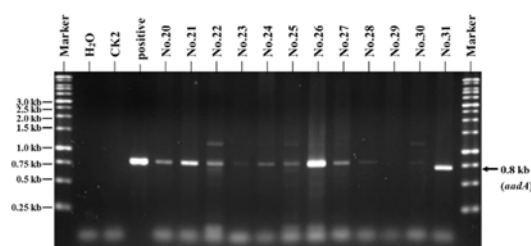
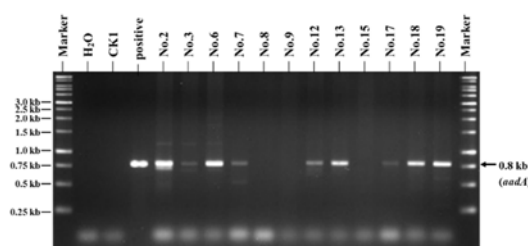


圖 4. 以擬轉殖青花菜葉片之 DNA 為模板，使用 Esm-3/Myr-3 (A)、Esm-1/Esm-2 (B)、Myr-1/Myr-2 (C)、aada-1/aada-2 (D) 核酸引子進行聚合酵素鏈鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *EsmMyr* 基因片段 (1.1 kb) (A)、*Esm* (1.1 kb) (B)、*Myr* (1.3 kb) (C)、*aada* (0.8 kb) (D) 基因的情形。CK1、CK3：未轉殖青花菜。Positive: pMT91t-Esm-Myr-GA。

Fig. 4. PCR analysis of *EsmMyr* fragment (A), *Esm* (B), *Myr* (C), and *aada* (D) genes in putative transplastomic broccoli. The parts of *EsmMyr* (1.1 kb) (A), *Esm* (1.1 kb) (B), *Myr* (1.3 kb) (C), and *aada* (0.8 kb) (D) gene sequences were amplified from plant DNAs using primers Esm-3/Myr-3, Esm-1/Esm-2, Myr-1/Myr-2, and aada-1/aada-2, respectively, and analyzed by electrophoresis. CK1 CK2: un-transformed broccoli. Positive: pMT91t-Esm-Myr-GA.

(二)、反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 分析轉殖青花菜植株

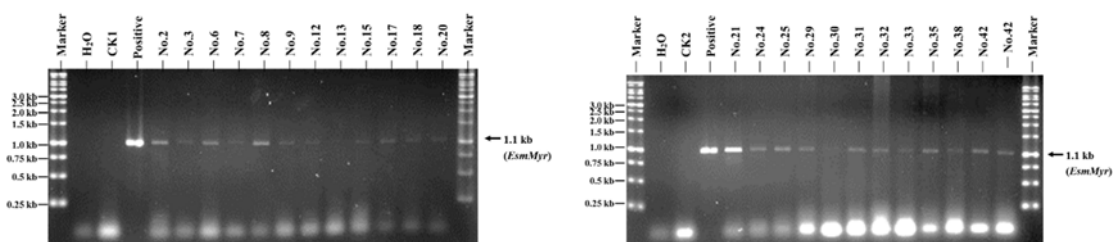
RT-PCR 分析 *EsmMyr* 片段之 mRNA 結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中有 24 株可偵測到轉殖的 1.1 kb 之 *EsmMyr* 片段之 mRNA，而未轉殖植株 (CK1、CK2) 則無 (圖 5A)。分析 *Esm* 基因片段結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中的 27 株都可偵測到 1.1 kb 之 *Esm* mRNA。圖 5B 顯示供試的 24 株轉殖青花菜樣品均可偵測到預期 *Esm* mRNA (1.1 kb)，未轉殖植株則無 (CK1) 或條帶亮度極微弱 (CK2) (圖 5B)。同時在部份轉殖青花菜可偵測到另一條約 1.8 kb 的 *Esm* mRNA，而轉殖載體 (positive control) 及未轉殖植株 (CK1、CK2) 則無。分析 *Myr* mRNA 結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中的 27 株都可偵測到 1.3 kb 之 *Myr* mRNA。圖 5C 顯示供試的 24 株轉殖青花菜樣品均可偵測到預期 *Myr* mRNA (1.1 kb)，未轉殖植株則無 (CK1、CK2)。分析 *aada* mRNA 結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中有 28 株可偵測到 0.8 kb 之 *aada* mRNA。圖 5D 顯示供試的 23 株轉殖青花菜樣品中有 22 株可偵測到轉殖的 0.8 kb 之 *aada* 基因，而未轉殖植株 (CK1、CK2) 則無 (圖 5D)。分析 *gus* 片段之 mRNA 結果顯示，39 株擬轉殖青花菜中有 20 株可偵測到轉殖的 0.43 kb 之 *gus* mRNA，而未轉殖植株 (CK3) 則無 (圖 8E)。

(三)、即時定量反轉錄聚合酵素連鎖反應 (qRT-PCR) 分析轉殖青花菜植株

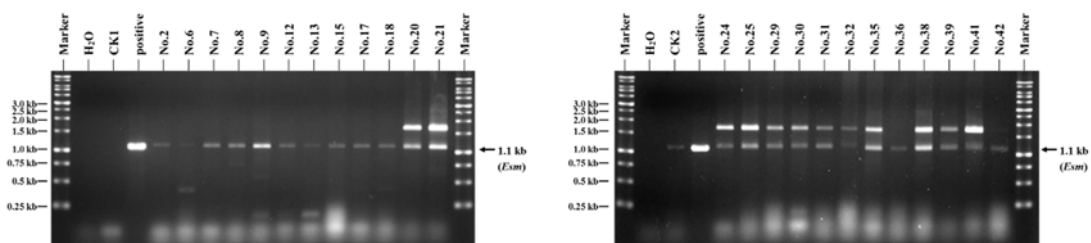
以 qRT-PCR 分析擬轉殖青花菜 *Esm* 及 *Myr* 基因的相對表現量，其結果如圖 9 所示。於 39 株擬轉殖青花菜中 *Esm* 基因的表現量最高者依序為 No.7 (為對照組的 68.4 倍)、No.36 (49.5 倍)、No.15 (31.2 倍)，其次為 No.31 (19.5 倍)、No.38 (17.2 倍)、No.16 (14.8 倍)、No.35 (14.8 倍)、No.45 (14.8 倍)、No.24 (14.4 倍)、No.32 (12.5 倍)、No.27 (12.4 倍)、No.43 (11.7 倍)、No.19 (10.2 倍)，再其次為 No.6 (9.8 倍)、No.29 (9.7 倍)、No.8 (9.5 倍)、No.39 (9.0 倍)、No.42 (8.7 倍)、No.2 (8.4 倍)、No.12 (7.5 倍)、No.37 (6.3 倍)、No.3 (4.4 倍)、No.17 (4.4 倍)、No.28 (3.4 倍)、No.30 (3.1 倍)、No.46 (2.6 倍) 等共 26 株轉殖青花菜植株。*Myr* 基因的表現量最高者依序為 No.43 (為對照組的 673.9 倍)、No.42 (358.5 倍)、No.36 (253.3

倍)、No.32 (184.6 倍)、No.16 (108.5 倍)、No.31 (103.8 倍)、No.35 (91.7 倍)、No.27 (71.0 倍)、No.38 (51.0 倍)、No.12 (50.6 倍), 其次為 No.15 (47.0 倍)、No.45 (38.4 倍)、No.18 (37.2 倍)、No.23 (37.0 倍)、No.17 (34.3 倍)、No.6 (32.8 倍)、No.37 (31.9 倍)、No.46 (30.8 倍)、No.21 (20.7 倍)、No.13 (20.6 倍), 再其次為 No.2 (18.4 倍)、No.8 (11.3 倍)、No.9 (10.9 倍)、No.40 (10.4 倍)、No.3 (10.3 倍)、No.30 (10.3 倍)、No.34 (6.7 倍)、No.24 (6.0 倍)、No.28 (5.9 倍)、No.20 (4.5 倍)、No.41 (3.7 倍)、No.22 (2.0 倍)等共 32 株轉殖青花菜植株。

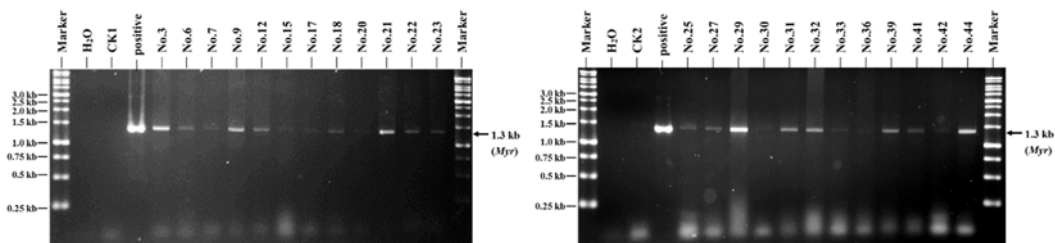
(A) *EsmMyr* 基因片段



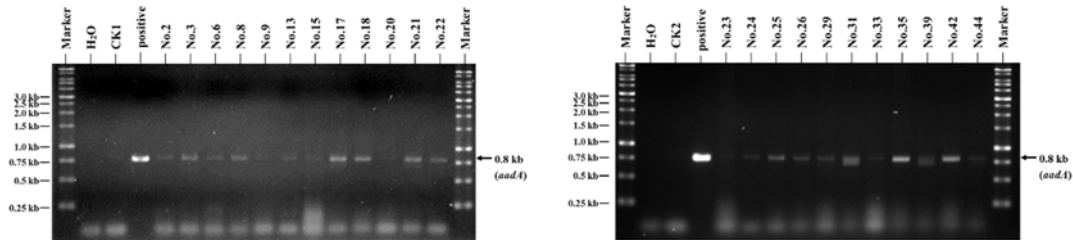
(B) *Esm* 基因



(C) *Myr* 基因



(D) *aadA* 基因



(E) *gus* 基因

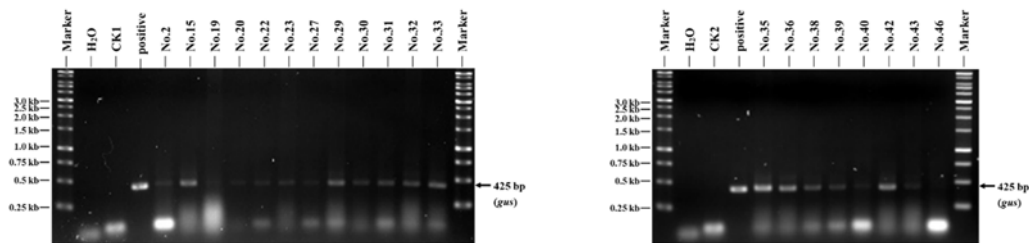


圖 5. 以擬轉殖青花菜葉片之 RNA 反轉錄之 cDNA 為模板，使用 Esm-3/Myr-3 (A)、Esm-1/Esm-2 (B)、Myr-1/Myr-2 (C)、*aada*-1/*aada*-2 (D)、*gus*-3/*gus*-2 (E) 核酸引子進行聚合酶鏈鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *EsmMyr* 基因片段 (1.1 kb) (A)、*Esm* (1.1 kb) (B)、*Myr* (1.3 kb) (C)、*aadA* (0.8 kb) (D)、*gus* (425 bp) (E) 的情形。CK1、CK2：未轉殖青花菜。Positive：pMT91t-Esm-Myr-GA。

Fig. 5. RT-PCR analysis of *EsmMyr* fragment (A), *Esm* (B), *Myr* (C), *aadA* (D), and *gus* (E) mRNA in putative transplastomic broccoli. The parts of *EsmMyr* (1.1 kb) (A), *Esm* (1.1 kb) (B), *Myr* (1.3 kb) (C), *aadA* (0.8 kb) (D), and *gus* (425 bp) (E) mRNA were amplified from plant RNAs by RT-PCR using primers Esm-3/Myr-3, Esm-1/Esm-2, Myr-1/Myr-2, *aada*-1/*aada*-2, and *gus*-3/*gus*-2, respectively, and analyzed by electrophoresis. CK1, C2: un-transformed broccoli. Positive: pMT91t-Esm-Myr-GA.

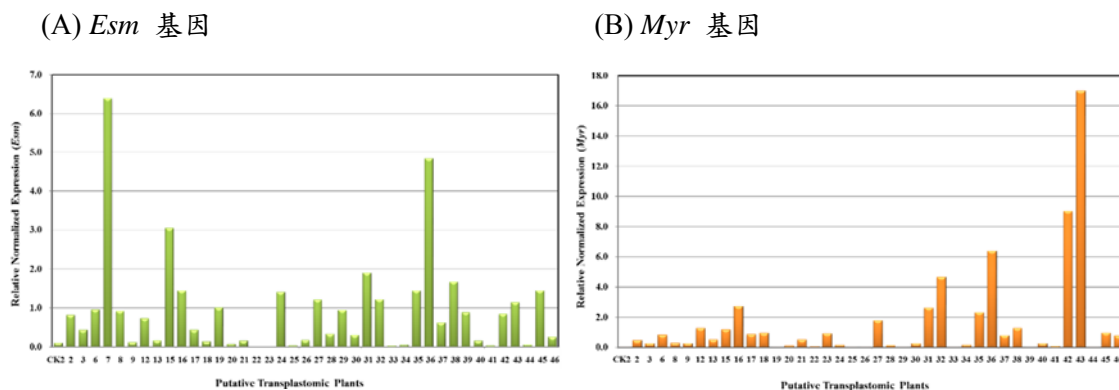


圖 6. 以 qrt-RT-PCR 分析擬轉殖青花菜之 *Esm* (A) 及 *Myr* (B) 基因之相對表現量。CK2：未轉殖青花菜。

Fig. 6. The relative normalized expression of *Esm* (A) and *Myr* (B) genes in putative transplastomic cabbage by qrt-RT-PCR analysis. CK2: un-transformed broccoli.

討 論

一、聚合酵素連鎖反應分析轉殖植株

經由基因槍葉綠體轉殖後，培植體經過篩選藥劑篩選及誘導再生後，所得之再生植株，萃取葉片基因組 DNA，分別以 *Esm*、*Myr*、*aadA* 及 *gus* 等之獨特核酸引子進行 PCR 分析，偵測是否帶有 *Esm*、*Myr*、*aadA*、*gus* 等目標基因。PCR 分析結果顯示共獲得共獲得 39 株擬轉殖青花菜。

Myr 基因是一個複雜的基因家族，在各種十字花科植物中基本分為 4 類，MA、MB 和 MC 以及阿拉伯芥中發現的 TGG1、TGG2、TGG3 基因 (Bones and Rossiter, 1996)。MA 亞族含有 4~5 個基因，MB 亞族所含基因超過 10 個，MC 亞族由 3-4 個基因構成 (Falk *et al.*, 1995)。MA 及 MC 亞族的基因主要在種子中表現，MB 亞族的基因主要在生長發育期表現 (Rask *et al.*, 2000)。阿拉伯芥中發現的 TGG1 與 TGG2 基因 (*Myr*) 具有 12 個 exon 與 11 個 intron，此種結構在十字花科植物具有高度保存 (Xue *et al.*, 1995)。油菜中選殖的 *Myr* 基因具有 5 個 exon 與 11 個 intron (Andreasson, *et al.*, 1999)。

本研究將已構築完成的 pMT91t-*Esm*-*Myr*-GA 載體利用基因槍轟擊的方式，將目標基因轉殖到甘藍及青花菜之下胚軸。*Myr* 及 *Esm* 基因是以 operon 的形式構築。在擬轉殖植株 DNA 的 PCR 檢測，設計目標基因 *Esm* 及 *Myr* 基因的引子，因本試驗中所轉殖的 *Esm* 及 *Myr* 基因皆由'綠王'青花菜本身選殖而來，因此使用目標基因 *Esm* 及 *Myr* 基因的引子時，因為 *Esm* 及 *Myr* 基因都含有多個內含子 (intron)，針對目標基因應會擴增到較大的片段。理想上可以在 PCR 的檢測中同時顯現兩種大小不同的片段，轉殖目標基因的片段及植株

本身含有內含子的基因片段。但因現有的資訊並不知道青花菜 *Esm* 及 *Myr* 目標基因的內含子位置在序列的哪一段，假若引子剛好恆況兩個外顯子 (exon) 的位置，對 DNA 進行 PCR 時可能會有引子專一黏合不足的情況發生，且造成很多大小不一的片段產生。在本次試驗中，引子的設計上無法理想地呈現的同時有兩種大小不同的目標基因片段。

PCR 分析結果顯示，在轉殖 pMT91t-*Esm-Myr-GA* 質體中，有 23 株青花菜擬轉殖株有偵測到 *EsmMyr* 基因，但在各別偵測 *Esm* 及 *Myr* 目標基因時，*Esm* 基因有 6 株，*Myr* 基因有 25 株擬轉殖株。本試驗結果顯示利用三組引子對 (*Esm-3/Myr-3*、*Esm-1/Esm-2*、*Myr-1/Myr-2*) 偵測 *EsmMyr* 基因片段、*Esm*、*Myr* 目標基因，同時被偵測到的機率很低，是不符合預期的。可是利用二組引子對 (*Esm-1/Esm-2*、*Myr-1/Myr-2*) 偵測 *Esm* 及 *Myr* 目標基因，同時被偵測到的有青花菜有 9 株 (No.2、No.8、No.15、No.18、No.19、No.27、No.28、No.29、No.36)，但有 28 株青花菜擬轉殖株偵測到 *aadA* 基因，亦不符合預期。

在本試驗使用 PCR 偵測中，亦發現有些植株僅出現微弱的訊號，且重覆性不穩定，造成分析上的困擾。進一步推測可能原因為：(1) 葉綠體同質率低，因後期無法再以篩選方式使轉殖葉綠體強勢增殖，隨著植株生長，細胞內的未轉殖葉綠體也大量分裂增殖，在不均質的情況下，造成在葉片萃取 DNA 時未能萃取出目標 DNA 或是萃取濃度過低，因而進行 PCR 分析時經過稀釋 DNA 或是添加 DNA 樣品時造成目標基因的缺乏而使後續之檢測難以穩定或是無法偵測；(2) 因本試驗所轉殖的質體所選用的啟動子與終結子皆為 *prrm* 與 *psbA*，其中又因啟動子片段稍長，較有機會發生啟動子同源重組，使預期出現的目標基因被置換導致基因缺失，造成異常之基因組合 (Iamtham and Day, 2000)；(3) 引子設計不良導致檢測的靈敏度降低，且因 *Esm* 及 *Myr* 基因為內源基因，造成轉殖基因與內源基因競爭，使得引子專一黏合度不足，無法使轉殖基因被偵測。

二、RT-PCR 分析轉殖植株

基因分析結果發現經過 PCR 檢測分析有目標基因的擬轉殖株，在進行 RT-PCR 分析時，部分擬轉殖株僅出現微弱的訊號或是完全不表現，亦有在 PCR 分析 DNA 層次沒有偵測到目標基因，卻在 RT-PCR 分析 RNA 中被探測到目標基因，這些現象皆不符合預期。推測除了前段敘述的原因外，亦有可能是萃取 RNA 技術不夠純熟，導致 RNA 萃取率極低或是過程中有降解的發生使得 PCR 和 RT-PCR 的結果無法對應。

然而雖然有內源性 *Esm* mRNA 及 *Myr* mRNA 的干擾，但比較轉殖載體 (positive control) 及未轉殖植株的 RT-PCR 產物的訊號 (包括有無及強弱)，顯示利用三組引子對 (*Esm-3/Myr-3*、*Esm-1/Esm-2*、*Myr-1/Myr-2*) 偵測之 1.1 kb 之 *EsmMyr* mRNA、1.1 kb 之 *Esm* mRNA、1.3 kb 之 *Myr* mRNA 是轉殖青花菜所獨特具有轉殖基因所表現的 mRNA。利用三組引子對 (*Esm-3/Myr-3*、*Esm-1/Esm-2*、*Myr-1/Myr-2*) 同時可偵測到 *EsmMyr* mRNA、*Esm* mRNA、*Myr* mRNA 的青花菜有 17 株 (No.3、No.6、No.7、No.9、No.12、No.15、No.17、No.18、No.20、No.21、No.25、No.29、No.30、No.31、No.32、No.41、No.42)。

三、qrt-PCR 分析轉殖植株

以 qrt-RT-PCR 分析擬轉殖青花菜之 *Esm* 及 *Myr* 基因的相對表現量，其結果顯示分別有 26 株的 *Esm* 基因及 32 株的 *Myr* 基因的相對表現量較對照組顯著增加。其中 *Esm* 及 *Myr* 基因的相對表現量均顯著增加的擬轉殖青花菜計有 No.36 (*Esm* 49.5 倍、*Myr* 253.3 倍)、No.15 (*Esm* 31.2 倍、*Myr* 47.0 倍)、No.31 (*Esm* 19.5 倍、*Myr* 103.8 倍)、No.38 (*Esm* 17.2 倍、*Myr* 51.0 倍)、No.16 (*Esm* 14.8 倍、*Myr* 108.5 倍)、No.35 (*Esm* 14.8 倍、*Myr* 91.7 倍)、No.45 (*Esm* 14.8 倍、*Myr* 38.4 倍)、No.24 (*Esm* 14.4 倍、*Myr* 6.0 倍)、No.32 (*Esm* 12.5 倍、*Myr* 184.6 倍)、No.27 (*Esm* 12.4 倍、*Myr* 71.0 倍)、No.43 (*Esm* 11.7 倍、*Myr* 673.9 倍)、No.6 (*Esm* 9.8 倍、*Myr* 32.8 倍)、No.8 (*Esm* 9.5 倍、*Myr* 11.3 倍)、No.42 (*Esm* 8.7 倍、*Myr* 358.5 倍)、No.2 (*Esm* 8.4 倍、*Myr* 18.4 倍)、No.12 (*Esm* 7.5 倍、*Myr* 50.6 倍)、No.37 (*Esm* 6.3 倍、*Myr* 31.9 倍)、No.3 (*Esm* 4.4 倍、*Myr* 10.3 倍)、No.17 (*Esm* 4.4 倍、*Myr* 34.3 倍)、No.28 (*Esm* 3.4 倍、*Myr* 5.9 倍)、No.30 (*Esm* 3.1 倍、*Myr* 10.3 倍)、No.46 (*Esm* 2.6 倍、*Myr* 30.8 倍)等，共 22 株轉殖青花菜植株。

上述的 22 株轉殖青花菜植株，均為最適宜的材料，進行分析黑芥子酶 (*Myr*) 酵素活性及表皮特異硫蛋白修飾子 (*Esm*) 特性。待轉殖植株成長穩定後，繁殖大量之同質轉殖葉綠體之甘藍或青花菜後裔，鑑定及分析總硫代葡萄糖苷及蘿蔔硫素含量，方能評估量產轉殖青花菜及甘藍生產蘿蔔硫素之可行性及經濟效益。

參 考 文 獻

- 林俊城、吳秋雲、高燦紅、黃科。2011。青花菜硫、硒代謝競爭及其對保健功能的影響研究進展。中國細胞生物學學報 4: 422-432。
- 林經偉。青花菜栽培之土壤及施肥管理。2013。臺南區農業專訊 85: 13-17。
- 行政會農委會。2016。農業統計年報，台北市。
- 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.
- Bones, A. M. and J. T. Rossiter. 1996. The myrosinase-glucosinolate system: its organization and biochemistry. Physiol. Plant. 97: 194-208.
- Falk, A., B. Ek, and L. Rask. 1995. Characterization of a new myrosinase in *Brassica napus*. Plant Molecular Biology 27: 863-874.
- Iamtham, S. and A. Day. 2000. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. Nat. Biotechnol. 18: 1172-1176.
- Ku, K. M., J. H. Choi, H. S. Kim, M. M. Kushad, E. H. Jeffery, and J. A. Juvik. 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.
- Maliga, P. 2004. Plastid transformation in higher plants. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 289-313.
- Matusheski, N. V., R. Swarup, J. A. Juvik, R. Mithen, M. Bennett, and E. H. Jeffery. 2006. Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *Italica*) inhibits formation of the anticancer agent sulforaphane. J. Agri. Food Chem. 54: 2069-2076.
- 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 transformation of these genes to develop phenylethylisothiocyanate enriching Chinese cabbage. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29(6): 623-632.
- Pontoppidan, B., R. Hopkins, L. Rask, and J. Meijer. 2005. Differential wound induction of the myrosinase system in oilseed rape (*Brassica napus*): contrasting insect damage with mechanical damage. Plant Sci. 168: 715-722.
- Rask, L., E. Andréasson, B. Ekbom, S. Eriksson, B. Pontoppidan, and J. Meijer. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. Plant Mole. Biol. 42: 93-113.
- Tilaar, W., S. Ashari, B. Yanuwidi, and J. Polii-Mandang. 2012. Synthesis of sulforaphane during the formation of plantlets from broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) *in vitro*. Int. J. Eng. Technol. IJET-IJENS. 12(3): 1-5.
- Williams, D. J., C. Critchley, S. Pun, S. Nottingham, and T. J. O'Har. 2008. Epithiospecifier protein activity in broccoli: The link between terminal alkenyl glucosinolates and sulphoraphane nitrile. Phytochemistry 69: 2765-2773.
- Xue, J., M. Jorgensen, U. Pihlgren, and L. Rask. 1995. The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organization, expression and evolution. Plant Mol. Biol. 27: 911-922.
- Yuan, G. and Q. Wang. 2012. Function of epithiospecifier protein gene from broccoli. J. Zhejiang Univ. Agric. Life Sci. 38(5): 529-534.
- 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.

Transformation of Myrosinase (MYR) and Epithiospecifier Modifier (ESM) Genes into Broccoli Chloroplast

Yung-Shen Lin ¹⁾ Yi-Chun Pan ²⁾ Po-Heng Chen ³⁾ Menq-Jiau Tseng ⁴⁾

Key words: Broccoli, Chloroplast gene transformation, Sulforaphane, Metabolic Engineering

Summary

Sulforaphane has been found to inhibit proliferation of cancer cells, prevent cancer cells to develop, and anti-metastasis of cancer cells. Sulforaphane is an isothiocyanate which is produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis. Myrosinase (MYR) is physically separated from glucosinolates in intact plant cells. Production of sulforaphane is upregulated by the MYR and ESM (epithiospecifier modifier). *Brassica* chloroplast transformation vector, pMT91t-Esm-Myr-GA, harboring both *myr* and *esm* genes was transferred into the hypocotyls of 'Green King' broccoli *via* biolistic bombardment. Transformed plantlets were selected by 10 ppm spectinomycin. The results of PCR, RT-PCR, and qrt-RT-RCR analysis indicated that the transformed genes were present in the chloroplast genome of transplastomic plants, and expressed its mRNA.

-
- 1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 3) Student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

