

轉穀氨醯胺酵素(Transglutaminase, TGA)基因轉殖至大豆(*Glycine max* (L.) Merrill)之研究

施惠蓉¹⁾ 楊明德²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：大豆、轉穀氨醯胺酵素、生物反應器

摘要：大豆種子富含蛋白質，以大豆種子大量表現轉殖基因有極大潛力作為生物反應器，生產工業、食品、飼料及醫藥方面的產品的優勢。轉穀氨醯胺酵素(transglutaminase, TGA)會使蛋白濃縮液形成膠體化，因此在食品加工上有相當高的應用價值及潛力；例如：在漢堡、肉丸、魚漿、豆腐、植物蛋白粉末等可以改善其彈性、質地、口感、風味，並可增加儲存壽命。本研究乃嘗試將分離自 *Streptomyces ladakanum* 的 *tga* 基因(*S.l-tga*)，分別黏接至水稻種子特有之啟動子鹽溶性球蛋白基因(globulin)及油膜蛋白基因(oleosin)之啟動子與 CaMV35S 及 *rbcS* 啟動子上，利用農桿菌基因轉移的方式，轉殖到'高雄選 10 號'大豆中。本研究之目的為建立以轉殖大豆種子為生物反應器之系統，並探討利用大豆生產轉穀氨醯胺酵素之可行性。

轉移四種構築載體之 *S.l-tga* 基因均可獲得再生植株。轉殖植株以 PCR、南方墨點、RT-PCR 及西方墨點雜交分析，其結果顯示 *tga* 基因已存在於轉殖之大豆植株基因組中，且可正確表現 *tga* RNA，並具有 TGA 酵素活性。TGA 酵素活性分析之結果顯示轉殖大豆之葉片之 TGA 酵素活性最高為 0.143 U/mg protein，為未轉殖對照組之 4.9 倍。

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學分子生物學研究所副教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

前 言

以基因轉殖作物為生物反應器，生產工業、食品、飼料及醫藥方面的產品，在高附加價值、低成本及環保因素考量之下，目前是先進國家生物科技公司積極研究發展的重要項目。台灣土地面積及天然資源有限，因此極適合朝植物生物反應器的方向發展。發展大豆作為生物反應器生產高附加價值產品的優點為：1. 大豆種子富含蛋白質，此意謂轉殖基因有極大潛力在大豆種子大量表現、儲存，較之以生產澱粉為主之水稻、玉米或基因轉殖模式植物的馬鈴薯、番茄、菸草等作為生物反應器有較佳發展成生技產業的優勢；2. 以大豆種子作為轉殖基因標的之成功例子尚不多，即使全球目前種植最廣的基因轉殖作物是抗殺草劑的大豆（2005年，全球種植轉殖大豆約5,440萬公頃）。；3. 大豆在中國已有數千年的歷史，東方民族在食品加工上的應用，將其商品價值發揮得淋漓盡至。台灣農業研究機關在毛豆及大豆的研究不曾間斷，已建立良好的基礎，開發大豆做為生物反應器，將可與過去台灣農業研究成果相輔相成，建立台灣農業生技之聲譽

轉穀氨醯胺酵素會使蛋白濃縮液形成膠體化，因此在食品加工上有相當高的應用價值及潛力 (Motoki and Segura, 1994)。例如：在漢堡、肉丸、魚漿、豆腐、植物蛋白粉末等可以改善其彈性、質地、口感、風味，並可增加儲存壽命。目前轉穀氨醯胺酵素大多自動物肝臟中分離純化取得，為鈣依存酵素 (calcium-dependent)，需要有 Ca^{2+} 存在下方具有酵素活性，但由於來源取得不易且分離純化過程複雜，使得轉穀氨醯胺酵素的價格相當高，因此限制了其在食品加工上的應用(朱, 2003)。近年來則發現放線菌屬 *Streptovercillium* sp. 和 *Streptomyces* sp. 能生產出微生物轉穀氨醯胺酵素 (microbial transglutaminase; MTGase)，也具催化 GL 鍵結 ϵ -(γ -glutamyl) lysine 形成的能力，其最大特徵是不具鈣依存性，即使在無 Ca^{2+} 存在下，也具酵素活性 (Motoki *et al.*, 1984)。本研究乃嘗試將分離自 *Streptomyces ladakanum* 的 *tga* 基因 (*S.l-tga*) 分別黏接至水稻種子特有之啟動子鹽溶性球蛋白基因 (globulin) 及油膜蛋白基因 (oleosin) 之啟動子與 CaMV35S 及 *rbcS* 啟動子上，利用農桿菌基因轉移的方式，轉殖到'高雄選 10 號'大豆中。本研究之目的為建立以轉殖大豆種子為生物反應器之系統，並探討利用大豆生產轉穀氨醯胺酵素之可行性。

材 料 與 方 法

一、試驗材料

(一)、基因轉移的植物材料

本實驗以'高雄選 10 號'大豆(*Glycine max* (L.) Merrill cv. KS10) 作為農桿菌基因轉殖的試驗材料。本試驗所使用之大豆種子皆由亞洲蔬菜中心及高雄區農業改良場所提供。無菌

播種是將大豆種子以 70% 酒精經 3 分鐘及商業漂白劑 2.5% Clorox，震動消毒 25 分鐘，再以無菌水洗滌四次藉以去除漂白劑。將已滅菌之種子播種於含 3% 蔗糖與 0.8% 洋菜膠 (agar) 的 1/2MS (Murashing and Skoog, 1962) 基本培養基中。培養於 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, $150 \mu\text{E} \mu\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, 18 小時光週期之生長環境下生長。取無菌播種五到七天的子葉節作為農桿菌基因轉移之材料。

(二)、基因轉移之種類

本試驗轉本實驗作為大豆基因轉移之基因是由 *Streptomyces ladakanum* 中篩選出的轉穀氨醯胺酵素基因 (*S.l-tga*) (國立中興大學分子生物研究所楊明德教授所贈)。其轉移的質體有以 CaMV35S 為啟動子的 pBI121-*S.l-tga*，以 *rbcS* 啟動子的 pBI131-*S.l-tga*，以 globulin 啟動子的 pGlo-*S.l-tga* 及以 oleosin 啟動子的 pOle-*S.l-tga* 等共有四種轉殖載體。

二、試驗方法

(一)、轉殖載體的構築

1. pBI121-*S.l-tga*：將 pET21d-*S.l-tga* 上之 *S. ladakanum* 的 *tga* 基因(*S.l-tga*) 以 *XbaI/XhoI* 切下，經 pBluescript SK(-)及 pT7-Blue 等二個中間載體，最後插入 pBI121-GUS 之中置換 *gus* 基因而成為含 CaMV35S 啟動子及 *nos* 終結子之 pBI121-*S.l-tga* (圖 1A)。
2. pBI13-*S.l-tga*：將 pET21d-*S.l-tga* 上之 *S. ladakanum* 的 *tga* 基因(*S.l-tga*) 以 *XbaI/XhoI* 切下，經 pBluescript SK(-)及 pT7-Blue 等二個中間載體，最後插入 pBI13-GUS 之中置換 *gus* 基因而成為含 *rbcS* 啟動子及 *nos* 終結子之 pBI13-*S.l-tga* (圖 1B)。
3. pGlo-*S.l-tga*：將 *S. ladakanum* 的 *tga* 基因(*S.L-tga*) 插入 pKGp7GUS 之中置換 *gus* 基因而成為含 globlin 啟動子及 *nos* 終結子之 pGlo-*S.l-tga* (圖 1C)。
4. pOle-*S.l-tga*：將 *S. ladakanum* 的 *tga* 基因 (*S.l-tga*) 插入 pKOleGUS 之中置換 *gus* 基因而成為含 oleosin 啟動子及 *nos* 終結子之 pOle-*S.l-tga* (圖 1D)。

(二)、三親交配(Triparental mating)

本試驗是根據 Rogers *et al.* (1988)之方法，所使用之農桿菌品系為 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404。Help strain 為 HB101 含 PRK3013 質體。

(三)、農桿菌基因轉移及植株再生

將三親交配後所得的農桿菌接種於 50 ppm kanamycin 及 100 ppm streptomycin 之 M9 minimal medium，於 28°C 培養 18-36 小時 (OD_{600} 0.8~1.0)。取此農桿菌液離心後以感染培養液重新懸浮 (1/10 MS salt, 1.67 mg/l BA, 100 μm AS, 30% Sucrose, pH5.4)。同時選用發芽 5~7 天的無菌苗切取子葉節培植體，在離子葉節 3 mm 左右處切去下胚軸，再切去 1/3 的子葉，然後在兩個子葉中間將胚軸縱向切開，去掉頂芽，用解剖刀在子葉與胚軸交接處直徑約 3 mm 的範圍內劃 5~7 刀。經過此操作步驟，每個無菌苗可產生二個子葉節培植體。

將製備好的子葉節培植體放入備妥之農桿菌菌液中浸泡 5~30 分鐘。倒掉菌液，將培

植體放入上下均鋪有無菌濾紙的培養皿內，吸掉多餘的菌液。然後將培植體近軸面朝下接種在共培養培養基上(1/10 B5含有1.7 mg/l BA, 0.25 mg/l GA3, 3 % 蔗糖, 0.8 % agar, 100 µm/l AS, pH 5.4)。培養在24 - 25 °C、黑暗或弱光下共培養3天。共培養3 天後將培植體轉入無菌三角瓶中，以液體B5W培養基 (B5培養基含有1.7 mg/l BA, 0.25 mg/l GA3, 3 % 蔗糖, carbenicillin 500~100 mg/l, pH 5.8) 清洗三次，每次10~15分鐘。殺菌後，將培植體置於濾紙吸乾殘液，再將感染後的培植體誘導再生成植株。

(四)、DNA 的操作、轉殖植物之南方及北方墨點雜交、蛋白質電泳分析

E. coli、質體 DNA 的萃取、DNA 片段的回收及黏接、*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、蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE) 等方法，參照陳與曾(2001)之方法。

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

利用 PCR 技術複製構築基因片段或用以偵測轉殖基因是否轉入大豆中。以轉殖大豆和未轉殖之對照組植株葉片 DNA 或目標基因為模版，偵測 *tga* 基因的引子為 5'-CATATGGACTCCGACGACAGGGTCCACCCTCC-3'及 5'-CTCGAGCGGCCAGCCCTGCTTTACCTTGTC-3'，反應的流程為 94°C，1 分鐘、52°C，1.5 分鐘、72°C，1.5 分鐘，共計 30 個 cycle。反應完畢後，取 5~8 µl 終產物，於 1.2%之洋菜膠上進行電泳分析。

(六)、反轉錄聚合酵素連鎖反應

本試驗所使用之 RT-PCR 系統為 Gene Mark One-Step RT-PCR Kit，取約 3µl 之大豆 RNA 當模板，加入預先配置的 reaction mix (10 µl 5x mix buffer, 10-15 µl 5x Enhancer, 1 µl Enzyme Mix, 1 µl Upstream primer (50-100 ng/µl), 1 µl Downstream primer (50-100 ng/µl))，最後加入 RNase-Free H₂O 使總體積至 50 µl，混合後置於 thermal cycler (ThermoHybaid Px2, U.S.A.) 中。反應流程為：50°C 下作用 30 分鐘以進行反轉錄反應 (reverse-transcription)，接著以 94°C，2 分鐘，共 1 個 cycle；接著以 94°C，30 秒、55°C，30 秒、72°C，1 分鐘，共進行 35 個 cycle；最後以 72°C，7 分鐘，以確保反應完全。取 10 µl PCR 反應產物以 1% agrose gel 進行電泳分離。

(七)、植物可溶性蛋白之萃取

取 1 g 之植物葉片，以液態氮研磨成粉末，再加入 2 ml 之萃取緩衝液 (100 mM potassium phosphate pH 7.5, 2 mM EDTA, 1% PVP-40)，以 15,000 g 離心 20 分鐘，最後取其上清液 (Anderson *et al.*, 1995)。上清液經 miracloth 過濾，濾液即可進行蛋白質濃度測定及蛋白質電泳分析。

(八)、西方墨點分析

取經過 SDS 膠體電泳分離後之膠片，以 TEB buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2

mM EDTA)清洗20分鐘，此用濕式法轉漬法 (Mini Trans-Blot Electrophoretic cell, Bio-Rad)，以200毫安培電流於低溫下轉漬2小時，再將PVDF paper置於blocking buffer (5% non-fat dried milk, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH8.0, 0.05% Tween-20) 室溫下輕輕搖動1小時，更換新的blocking buffer，加入適當濃度 (1/10000) 的一級抗體 (primary antibody, rabbit anti-transglutaminase antibody)，於4°C下迴旋搖動3小時後，以TTBS buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20) 清洗10分鐘4~6次，再將PVDF paper放入含適量濃度 (1/10000) 的二級抗體 (secondary antibody, anti-rabbit, AP conjugated) 於室溫下迴旋搖動，至少二小時後，以TTBS buffer清洗10分鐘4~6次，使用BexLite Substrate Kit for Chemiluminescent Detection System (BEXEL Biotechnology)進行酵素呈色反應約1分鐘後，稍將膜上溶液瀝乾，以清水洗淨。

(九)、轉殖植物之TGA酵素活性分析

TGA酵素活性測定參考Folk(1970)之colorimetric hydroxamate method，其反應液中含有0.1 M triacetate buffer (pH 6.0)-700 μ l，2 M hydroxylamine-50 μ l，0.1 M N- α -carbobenzoxglycine(CBZ)-150 μ l，再與粗酵素溶液100 μ l混合，於37°C水浴槽反應10分鐘後，加入1ml之15% trichloroacetic acid—5% FeCl₃溶液終止反應。以離心機6,000 rpm離心5分鐘，取上清液，以分光光度計(Hitach U-200)測定波長525 nm之吸光值。

結 果

一、轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)轉殖到大豆後植株再生情形

'高雄選10號'大豆種子於無菌培養基中發芽5~7天後，切取無菌苗之包括子葉節之子葉培植體進行農桿菌感染，感染後種植於B5W培養基 (圖2A)，每二週繼代一次；待誘導出癒傷組織後(圖2B)，在相同的B5W培養基可誘導出芽體(圖2C)；迨抽出芽梢後，轉換到芽梢抽長培養基 (MS salt, B5 vitamins, 1 mg/l BA, 0.5 mg/l GA,) 上誘導芽梢抽長(圖2D)；待芽梢抽長約2~3公分即可移至MS發根培養基上誘導發根並予以健化，最後移至瓶外溫室定植培養(圖2E)。本試驗所得的大部分轉殖大豆，均生長良好可正常開花結果(圖2F)。

二、轉殖植物之基因分析

(一)、聚合酶連鎖反應分析

萃取大豆轉殖植株葉片之DNA，以*tga*基因特定設計之引子(TGA-*Nde* I及TGA-*Xho* I)，進行PCR反應。若再生植株有轉殖之*tga*基因，則可在電泳膠片上顯現出1.1 kb之條帶，而對照組及未轉移成功之植株則無此條帶產生。圖3為以PCR分析轉殖*tga*基因大豆之情形，試驗結果顯示四種轉殖組合之再生植株均可偵測到預期之1.1 kb的*tga*基因片段。

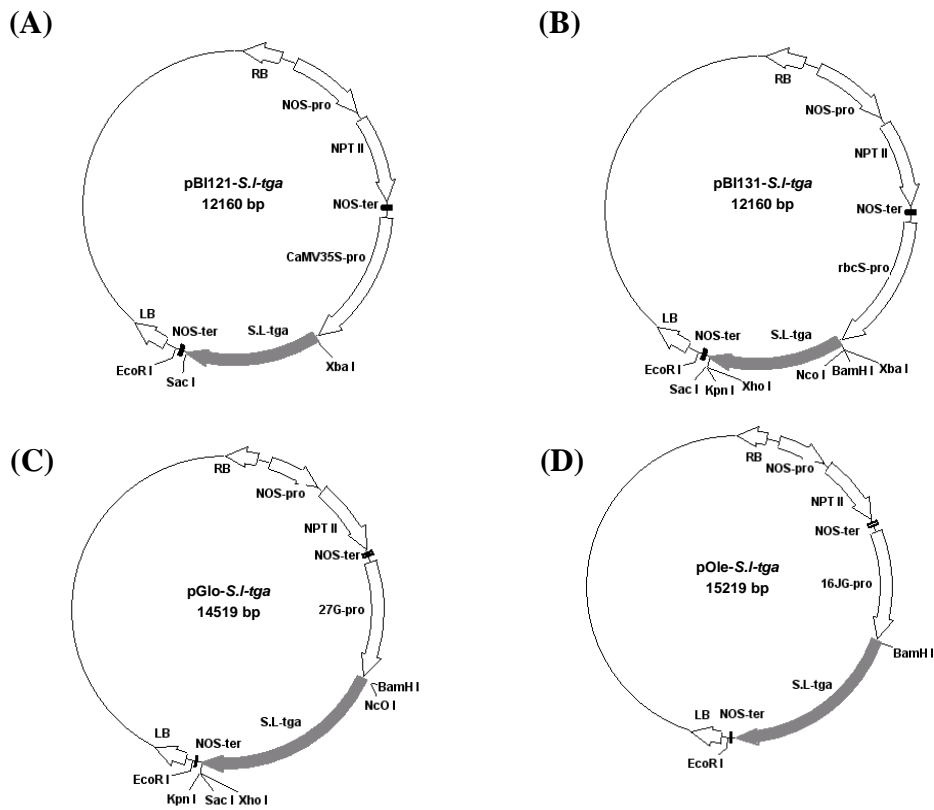


圖 1. 轉殖載體 pBI121-S.l-tga (A)、pBI131-S.l-tga (B)、pGlo-S.l-tga (C)、pOle-S.l-tga (D) 之限制酵素圖譜。pBI121-S.l-tga 攜帶以 CaMV35S 為啟動子的 tga 基因。pBI131-S.l-tga 攜帶以 rbcS 為啟動子的 tga 基因。pGlo-S.l-tga 攜帶以 globulin 為啟動子的 tga 基因。pOle-S.l-tga 攜帶以 oleosin 為啟動子的 tga 基因。

Fig. 1. Restriction maps of pBI121-S.l-tga (A), pBI131-S.l-tga (B), pGlo-S.l-tga (C), and pOle-S.l-tga (D) vectors. The tga gene driven by the CaMV35S, rbcS, globulin, and oleosin promoter was included in the pBI121-S.l-tga, pBI131-S.l-tga, pGlo-S.l-tga, and pOle-S.l-tga vector, respectively.

(二)、南方墨點雜交分析

萃取大豆轉殖植株葉片之基因組 DNA，以 XbaI/SacI 限制酵素切割後，經 1% Agarose gel 分離轉漬至 Zeta-probe membrane 上，進行南方墨點雜交分析。結果如圖 4 中所示，轉殖大豆之 DNA 進行雜交反應後，在 1.1 kb 之位置均會出現雜交訊號，對照組植株則沒有雜交訊號之出現，由此可得知，轉殖的 tga 基因已插入大豆之染色體組上。

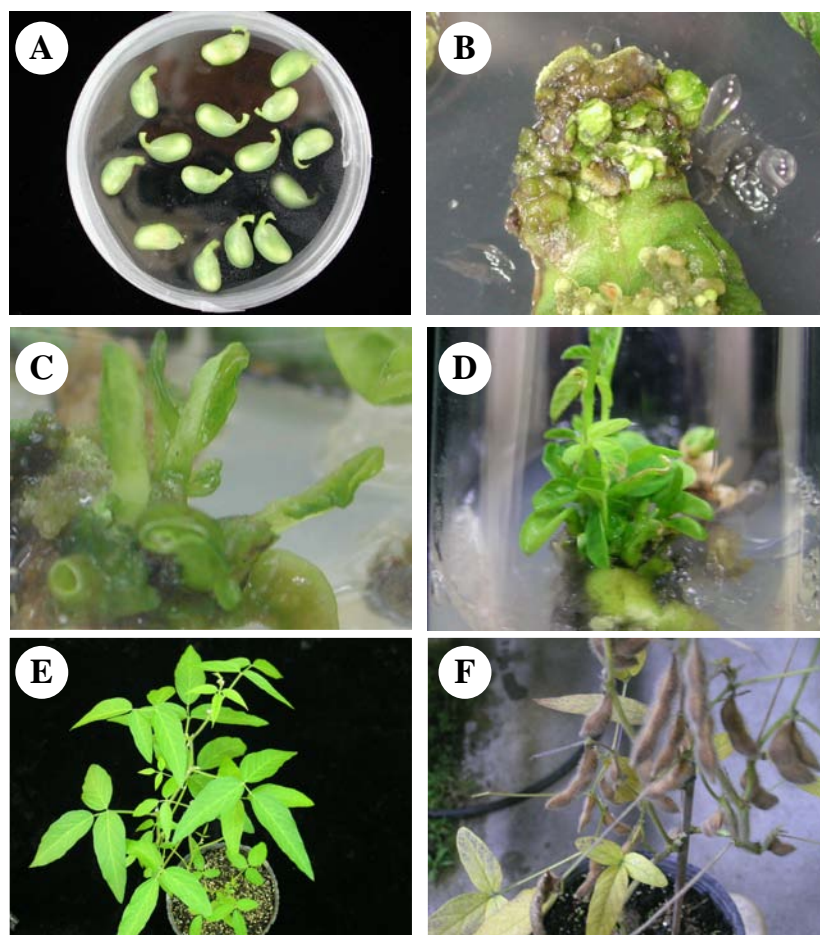


圖 2. 高雄選 10 號'大豆經農桿菌感染後再生之情形。(A)大豆子葉經農桿菌感染後之情形；(B)大豆子葉誘導癒傷組織增生；(C)芽稍發生；(D)芽稍增生、(e)定植、(f)結莢。

Fig. 2. Regeneration of 'Kaohsiung Sel. No.10' soybean (*Glycine max* (L) Merr. cv. KS10) after *Agrobacterium* transformation. (A)Soybean cotyledon after inoculation with *Agrobacterium*; (B)Induction of callus formation from the cotyledon node; (C)Shoot formation; (D)Shoot elongation; (E)Regenerated plant; (F)Pod setting.

(三)、反轉錄聚合酵素連鎖反應分析

選取經 PCR 反應檢測以及經南方墨點雜交分析後，呈現正反應之大豆植株，萃取其葉片總 RNA，使用 RT-PCR 系統 Gene Mark One-Step RT-PCR Kit，進行反轉錄聚合酵素連鎖反應。最後取 PCR 反應產物以 1% agrose gel 進行電泳分離。結果顯示有預期 1.1 kb 的

tga 基因片段出現，對照組植株則沒有出現預期基因片段，因此推測 *tga* 基因已被轉移進入植物染色體組中，並能正常的表現 *tga* 基因之 RNA (圖 5)。

(四)、西方墨點法分析

選取 CaMV35S-*S.l-tga* 及 *rbcS-S.l-tga* 轉殖大豆植株，萃取其葉片總蛋白質，經 SDS-PAGE 分離後，以濕式法將膠體上之蛋白質轉漬至 PVDF membrane 上，加入稀釋 10,000 倍之 polyclonal anti-transglutaminase 抗體，進行西方墨點分析 TGA 酵素在轉殖植株中之表現情形。試驗結果顯示，供試之轉殖大豆其葉片蛋白質在 37 kDa 的位置均有明顯的雜交訊號出現 (圖 6)，對照組植株則沒有雜交條帶。結果說明了轉殖的 *tga* 基因已經成功轉殖進入到大豆染色體，並能表現出 TGA 蛋白質。

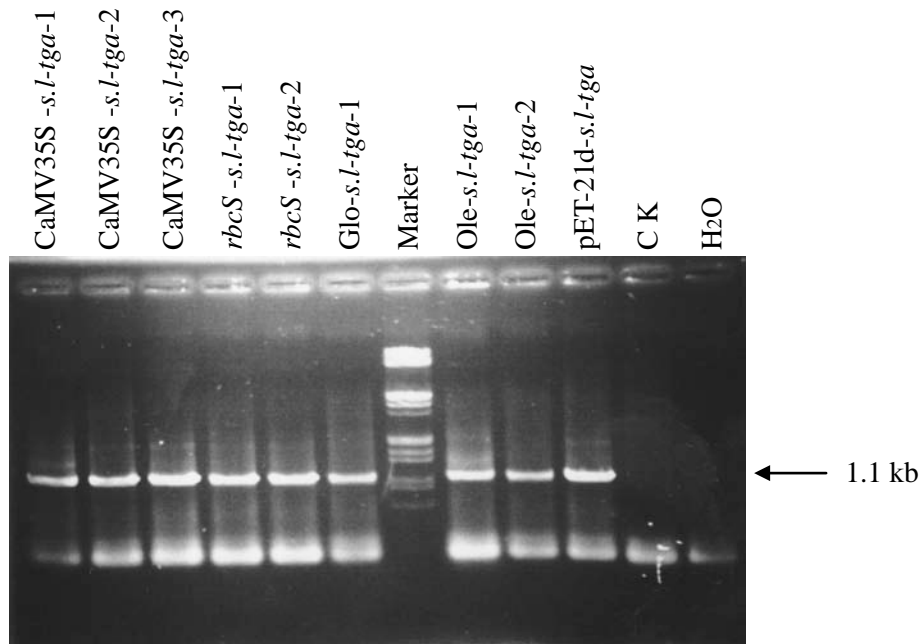


圖 3. 轉移 *tga* 基因之大豆葉片 DNA，經 PCR 反應，分析 *tga* 基因之情形。CK：未轉殖大豆。

Fig. 3 . PCR analysis of *tga* gene in transformed soybean from the leaves DNA. The part of *tga* gene (1.1kb) was amplified from a plasmid or DNA from plants and analyzed by electrophoresis. CK: non-transformed soybean.

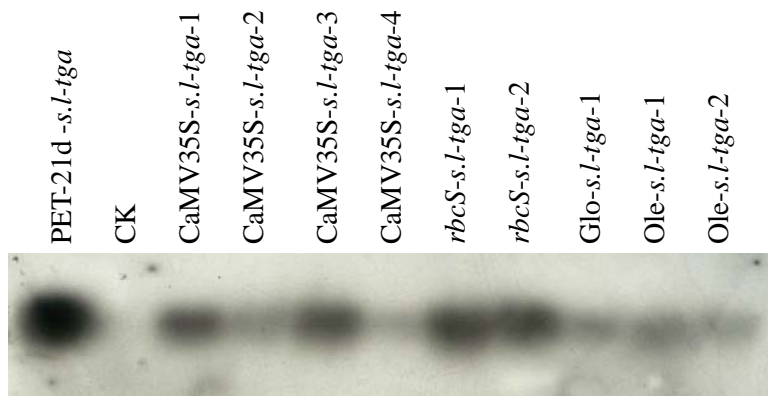


圖 4. 轉移 *tga* 基因之大豆葉片 DNA，經南方墨點雜交分析之情形。大豆葉片 DNA 以限制酵素 *NcoI/XhoI* 進行切割，雜交時以 *tga* 基因片段為探針進行雜交反應。CK：未轉殖大豆。

Fig. 4. Analysis of *tga* gene in transformed soybean by Southern blot hybridization. Plants DNA from each sample was digested with *NcoI/XhoI*, and analyzed by electrophoresis. The ³²P-labelled *tga* fragment was added during the hybridization reaction. CK: non-transformed soybean.

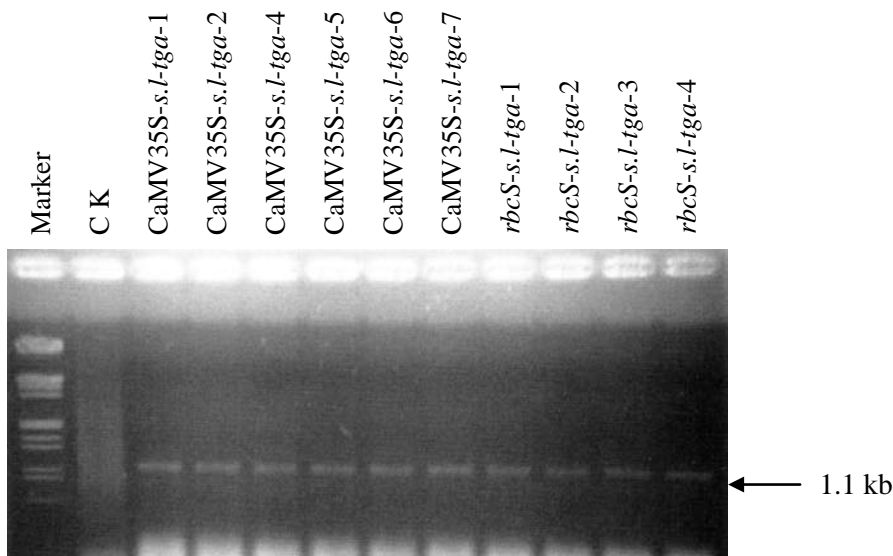


圖 5. 轉移 *tga* 基因之大豆葉片 RNA，經反轉錄聚合酵素連鎖反應分析之情形。CK：未轉殖大豆。

Fig. 5. Analysis of *tga* gene in transformed soybean by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). CK: non-transformed soybean.

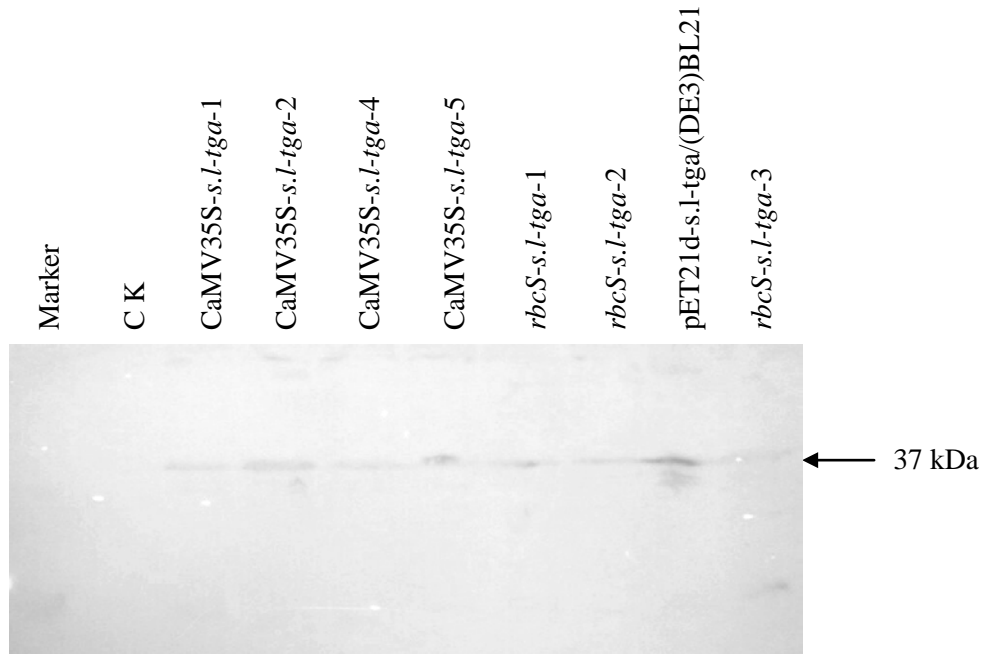


圖 6. 轉移 *tga* 基因之大豆葉片可溶性蛋白質經西方墨點雜交分析 TGA 蛋白質的情形。
CK：未轉殖大豆。

Fig. 6. Western blot hybridization of transglutaminase in leaves of *tga* gene transformed soybean probe by rabbit polyclonal antitransglutaminase antibody. CK: non-transformed soybean.

(五)、葉片蛋白之 TGA 酵素活性分析

萃取轉殖植株葉片的總可溶性蛋白質，測定 TGA 酵素活性之結果如表 1 所示。分析結果顯示以轉移 CaMV35S 為啟動子之 *tga* 基因的轉殖葉片 TGA 酵素活性最高為對照組之 4.9 倍，以 *rbcS* 啟動子之 *tga* 基因的轉殖葉片 TGA 酵素活性最高為對照組之 4.7 倍，轉移以 globlin 及 oleosin 為啟動子的 *tga* 基因的轉殖葉片 TGA 酵素活性則沒有增加，與對照組相當。

表 1. 轉移 *tga* 基因之大豆葉片之基因檢測與 TGA 酵素活性分析之情形。Table 1. Genetic analysis and TGA enzyme activity in *tga* transformed soybean.

Transgenic plant	Leaves				TGA activity (U/mg)
	PCR	Southern	RT-PCR	Western	
CaMV35S- <i>S.l-tga-1</i>	+	+	+	+	0.143
CaMV35S- <i>S.l-tga-2</i>	+	+	+	+	0.130
CaMV35S- <i>S.l-tga-3</i>	+	+	—	—	0.037
CaMV35S- <i>S.l-tga-4</i>	+	+	+	+	0.118
CaMV35S- <i>S.l-tga-5</i>	+	+	+	+	0.057
CaMV35S- <i>S.l-tga-6</i>	+	+	+	+	0.045
CaMV35S- <i>S.l-tga-7</i>	+	+	+	+	0.120
CaMV35S- <i>S.l-tga-8</i>	+	+	—	—	0.032
<i>rbcS-S.l-tga-1</i>	+	+	+	+	0.092
<i>rbcS-S.l-tga-2</i>	+	+	+	+	0.072
<i>rbcS-S.l-tga-3</i>	+	+	+	+	0.083
<i>rbcS-S.l-tga-4</i>	+	+	+	+	0.138
<i>rbcS-S.l-tga-5</i>	+	+	+	+	0.132
Glo- <i>S.l-tga-1</i>	+	+	×	×	0.038
Ole- <i>S.l-tga-1</i>	+	+	×	×	0.025
Ole- <i>S.l-tga-2</i>	+	+	×	×	0.031
Ole- <i>S.l-tga-3</i>	+	+	×	×	0.034
CK	—	—	—	—	0.029

+: positive ; —: negative ; ×: not determined

討 論

一、轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)轉殖到大豆

大豆對從事基因轉殖者是極富挑戰性的材料。雖然早在 1988 年大豆基因轉殖工作即首見於二個不同的研究群 (Hinchee *et al.*, 1988; McCabe *et al.*, 1988)，大豆的轉殖試驗對多數研究者而言仍然是困難重重。專家、學者對於大豆的組織培養再生和基因轉殖技術進行了許多研究，雖然抗殺草劑轉殖大豆已經大量商品化生產，但是截至目前為止，大豆仍是公認為較難進行基因轉殖的作物之一，這是因為大豆組織培養再生困難，可重複性差、轉殖頻率在不同基因型品種間差異較大，使得利用基因工程對大豆進行遺傳性狀改良受到限制 (Droste *et al.*, 2000)。因此，建立良好之再生及抗生篩選系統是進行大豆基因轉殖刻不容緩的課題。

在大豆組織培養所使用的方法很多，但是品種、植株部位、年齡等皆會影響組織再生能力。大豆轉殖系統最常用的三種基因轉殖方式為農桿菌轉殖子葉、基因槍轉殖頂芽及基因槍轉殖胚體懸浮培養 (程, 1997)，目前仍以農桿菌轉殖為主流，其主要原因為其操作方法簡易、便宜等優點 (Walden and Wingender, 1995)。培植體則以子葉為主，其同樣具有方法及簡易等優點，不像懸浮培養及體胚等材料之操作方式複雜，技術層面較高 (程, 1997)。

另外本試驗亦發現大豆若使用液態共培養的方式進行農桿菌法轉殖，則培植體容易因水分過多等造成培植體相當程度的傷害，降低大豆培植體的再生能力，甚至造成培植體直接褐化死亡，故在本試驗中採用 Olhoft (2001) 等人所使用之感染方式。其感染方式為先以液態農桿菌共培養 30 分鐘後，吸去多餘菌液置入含有 1/10 MS 基礎培養液、適當濃度生長調節劑及酚類化合物之固體培養基，黑暗共培養 2~3 天後，再以含有 500 ppm carbenicillin 的大豆感染培養液，清洗培植體 15 分鐘 3 次，以去除培植體之農桿菌，再將培植體以無菌紙吸乾殘液，最後將感染後之培植體培養於含有 500 ppm carbenicillin 的大豆再生培養基 (MS salt, B5 vitamins, 1.67 mg/l BA, 30% sucrose, 0.8% agar pH 5.8)。結果顯示此法可降低培植體產生褐化死亡的機率，提高培植體再生之能力。但此方法在組織培養過程中，容易產生農桿菌復發的情形，所以將其以液態農桿菌共培養 30 分鐘的時間，縮短成 7~10 分鐘可有效降低農桿菌復發的機率。本研究同時發現經過基因轉殖的植株較一般未轉殖植株虛弱，其生長勢較差。所以需較長時間在生長箱中馴化、健化後，再移植到溫室生長，會有較佳的生長勢及可提高轉殖植株之存活率。

本研究已經可以成功獲得轉移轉穀氨醯胺酵素基因之大豆再生植株，但是所需之時間仍然過長，至少需要三個月的時間才能移出瓶外培養，而且在組織培養過程中容易有農桿菌復發的情形發生，造成培植體生長緩慢甚至褐化死亡，此問題雖已由降低農桿菌濃度及共培養的時間獲得良好改善，但仍需更進一步試驗建立一套更適合'高雄選 10 號'大豆之農桿菌基因轉殖的再生系統，以提高再生率及縮短獲得基因轉殖植株的再生時間。

二、轉殖大豆植株之基因及蛋白質表現分析

本研究經由 PCR、南方墨點、RT-PCR、西方墨點及酵素活性的檢測，均可明確證實轉移之 *tga* 基因存在於大豆轉殖再生植株中。但是在進行 PCR 檢測時有時偵測不到預期 1.1 kb 片段，必須反覆調整反應條件才可獲得預期之 1.1 kb 片段。因此本試驗的轉殖植株，均會在進行南方墨點分析後才可確認是否為轉殖植株。本試驗以限制酵素 *Nco* I 及 *Xho* I 進行大豆葉片 DNA 限制酵素切割後，進行南方墨點分析，均可獲得預期大小之基因片段之雜交訊號，顯示轉殖植株的染色體基因組中轉穀氨醯胺酵素基因的完整性，而對照組植株則無雜交訊號出現（圖 4）此結果證實 *tga* 基因已成功轉移到大豆轉殖植株的染色體基因組中。大豆轉殖植株已偵測到 *tga* 基因之 DNA 後需更進一步確認其在 RNA 層次上之表現，以避免只是將基因轉入而不表現之情形發生，故進行 RT-PCR 藉此證明轉殖植株可以正常表現 RNA。本試驗亦獲得有些轉殖再生植株再南方墨點雜交時呈現正反應，但在反轉錄聚合酵素連鎖反應分析時沒有出現預期片段。對於造成此種結果之原因，是否因為 DNA 插入時被甲基化、重組 (Benfey and Chua, 1989)、截斷 (Bate *et al.*, 1990)，有待進一步深入探討。

本研究中最主要之目的在探討轉穀氨醯胺酵素基因能在大豆植株中表現 *tga* 基因，並累積 TGA 蛋白酵素，故選取基因檢測呈現正反應的大豆轉殖植株，萃取其葉片可溶性蛋白質，進行西方墨點分析 TGA 蛋白在轉殖植株中表現之情形。結果顯示在有 37 kDa 的位置上有一雜交訊號出現，顯示 *tga* 基因可以再轉殖植株中穩並的表現 TGA 酵素。但是其雜交訊號相當微弱，推測其原因可能是植物體內水分含量較多造成稀釋作用所導致。

TGA 酵素活性分析之結果顯示，轉移 CaMV35S 為啟動子之 *tga* 基因的轉殖葉片 TGA 酵素活性最高為對照組之 4.9 倍，以 *rbcS* 啟動子之 *tga* 基因的轉殖葉片 TGA 酵素活性最高為對照組之 4.7 倍。此結果顯示，使用 CaMV35S 及 *rbcS* 為啟動子的轉殖植株其酵素活性並沒有因啟動子的不同而有所差異，但是選用 globulin 及 oleosin 種子特异性啟動子的葉片則其酵素活性與對照組沒有明顯的差異。推測其原因應該是 globulin 及 oleosin 啟動子為種子特异性啟動子，具有組織特异性所以無法在葉片中表現轉穀氨醯胺酵素。

綜合本研究結果顯示轉穀氨醯胺酵素基因除了可利用植物體做表現外，更可以植物作為生物反應器，來生產具有商機、實用及安全性高之轉穀氨醯胺酵素之可能性。本研究之基因轉殖大豆中 TGA 酵素活性的產率是否符合經濟效益，尚待分析遺傳穩定的大量轉殖植株後裔才可得知。

參 考 文 獻

- 朱文深。2003。微生物轉穀氨醯胺酶之開發。中國農業化學會。113-130。
- 陳一男、曾夢蛟。2001。過量表現番茄 hsc70-2 基因於甘藍之研究。興大園藝。26(3): 29-42。
- 程台生、連大進、陳麗珠。1997。大豆基因轉殖。科學農業。45(5,6): 186-193。
- Bate, G. W., S. A. Carle, and W. C. Piastuch. 1990. Linear DNA introduced into carrot protoplasts by electroporation undergoes ligation and recircularization. *Plant Mol. Biol.* 14: 899-908.
- Benfey, P. N. and N. H. Chua. 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244: 174-181.
- Droste, A., G. Pasquali, M. H. Bodanese-Zanettini. 2000. Integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Mol. Rep.* 18: 51-59.
- Folk, J. E. 1970. Transglutaminase in "Methods in Enzymology", Tabor, H. and Tabor, C. W. (ed.), Vol. 182, pp.586-601.
- Hinchee, M. A., D. V. Conner-Ward, C. A. Newell, R. E. McDonnell, S. J. Sato, C. S. Gasser, D. A. Fischhoff, D. B. Re, R.T. Fraley and R. E. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/technology* 6: 915-922.
- McCabe, D. E., W. F. Swain, B. J. Martinell, and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.
- Motoki, M. and K. Seguro. 1994. Trends in Japanese soy protein research. *Inform.* 5: 308-313.
- Motoki, M., N. Nio, and K. Takinami. 1984. Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1257-1261.
- Olhott P. M. and D.A. Somers. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep.* 20:706-711
- Rogers, S. G., H. Klee, M. Byren, R. B. Horsch, and R. T. Fraey. 1988. Gene transfer in plant: production of transformed plants using Ti plasmid vector. In: Weissbach, A. and H. Weissbach. (eds.) *Method for Plant Molecular Biology*. Acad. Press. P.423-463
- Walden, R., and R. Wingender. 1995. Gene-transfer and plant regeneration techniques. *Trends in Biotech.* 13: 324-331.

Studies on the Transformation of the Transglutaminase Gene (*tga*) into Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

Hui-Jung Shih ¹⁾ Ming-Te Yang ²⁾ Menq-Jiau Tseng ²⁾

Key words: soybean, transglutaminase, bioreactor

Summary

Soybean is a rich source of protein. Use transgenic soybean seeds as bioreactor to produce food, feed, industrial, and pharmaceutical proteins have the advantage over other bioreactor systems. Transglutaminase (TGA) is an enzyme capable of stabilizing protein assemblies by gamma-glutamyl-epsilon-lysine crosslinks. The specific function of transglutaminase allows their biotechnological application in the foodstuffs industry: fish products (surimi), processed meat and sausages, chesses and yoghurt, ice creams, gelatines, chocolate etc. because food texture, firmness, elasticity, or fat and salt content can be modified.

In this study, the *tga* gene isolated from *Streptomyces ladakanum* was constructed into plant transformation vectors driven by CaMV 35S, *rbcS*, oleosin, and globulin promoter. The constructed genes were transferred into soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. KS10) cotyledonary node *via Agrobacterium*-mediated transformation. The regenerated plants were primary selected by kanamycin. The results of PCR, Southern, RT-PCR and Western hybridization analysis indicated that the *tga* gene was present in the genome of transformed soybean, and expressed *tga* mRNA and TGA protein with enzyme activity. The highest TGA activity in the leaves of *tga*-transformed soybean was 0.143 U/mg protein which was 4.9 folds of the controls.

-
- 1) Graduate student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 2) Associate Professor, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.
 - 3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

