

## 轉殖蘿蔔硫素合成相關基因到青花菜及甘藍之研究

廖 信 傑<sup>1)</sup> 潘 怡 君<sup>2)</sup> 陳 柏 亨<sup>3)</sup> 曾 夢 蛟<sup>4)</sup>

關鍵字：青花菜、甘藍、蘿蔔硫素、異硫氰酸酯、基因轉移

**摘要：**利用基因槍轉殖法將帶有青花菜 *Esm* (epithiospecifier modifier, 表皮特異硫蛋白修飾子)與 *Myr* (myrosinase, 黑芥子酶)基因的十字花科葉綠體轉殖載體 pMT91t-*Esm*-A 與 pMT91t-*Myr*-A 共同轉到'綠王'青花菜下胚軸、pMT91t-*Esm*-*Myr*-A 轉到'初秋'甘藍下胚軸。再生培植體分別使用 5 ppm spectinomycin 進行篩選。轉殖再生之擬轉殖植株葉片經 PCR 與 RT-PCR 分析顯示 *Esm*、*Myr* 基因成功轉入植株基因體中並表現其 mRNA。分析異硫氰酸酯含量顯示，基因槍轉殖之青花菜與甘藍轉殖株的異硫氰酸酯含量較未轉殖植株為高且具有顯著差異。因此利用基因槍轉殖法轉入青花菜 *Esm* 與 *Myr* 基因到青花菜與甘藍葉綠體以提升葉片總異硫氰酸酯含量是可行的。

### 前 言

青花菜 (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)，英文名 broccoli，俗稱綠花椰或西蘭花，源自義大利，由野生甘藍變種而來，近年來因相關研究指出青花菜富含豐沛的營養物質，如維生素、硫代葡萄糖、膳食纖維、花青素等物質，具有抗氧化、防癌之功效，由於青花菜栽培好冷涼氣候，因此台灣本土栽培多在秋冬季，其他時間多仰賴進口替代。甘藍 (*B. oleracea* L. var. *capitata*)，英文名 cabbage，俗稱高麗菜，是台灣重要蔬菜作物之一。根據台灣行政院農委會的統計，台灣甘藍栽培面積自 2012 年來逐年增加，2017 年為 8775 公

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

頃，產值為 58.9 億元，於台灣農業具有相當重要地位。

研究顯示十字花科作物含有多種營養物質，如  $\beta$ -胡蘿蔔素、葉黃素、槲皮素、葉酸鹽、蘿蔔硫素等含硫化合物，大部分均有抗氧化效用，不僅有防癌效果，還有保護心血管疾病功用。蘿蔔硫素 (sulforaphane) 為一種異硫氰酸酯 (isothiocyanate)，具有促進抗氧化、抗發炎以及抗癌效果。硫代葡萄糖經黑芥子酶 (myrosinase, MYR) 水解後形成異硫氰酸酯 (Isothiocyanate)，但在因為硫代葡萄糖與黑芥子酶在植物細胞中分佈位置有所區隔，因此正常植物體中蘿蔔硫素含量較低。研究顯示，植物體中的上皮硫特異蛋白 (epithiospecifier protein, ESP) 會使黑芥子酶將硫代葡萄糖水解形成環硫脒 (Epithionitriles) 降低異硫氰酸酯的形成。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) 會與黑芥子酶結合，促進硫代葡萄糖的水解。

本研究接續本實驗室林泳伸學長的研究，進一步探討共同轉殖 *Esm* 基因與 *Myr* 基因到青花菜與甘藍葉綠體以提昇蘿蔔硫素的可行性，期望可明顯增加轉殖作物異硫氰酸酯 (蘿蔔硫素) 的含量。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

#### (一) 基因轉殖之植物材料

本試驗之植物材料為十字花科蔬菜作物的'初秋'甘藍' (*B. oleracea* L. var. *capitata* L. 'K-Y cross') 以及'綠王'青花菜' (*B. oleracea* L. var. *italica* L. 'Green King')。將甘藍種子 0.8 g、青花菜種子 1.5 g 分別裝入 50 ml 離心管中，加入 10 ml 之 75% 酒精，利用試管振盪器 (Vortex Genie II) 以 3,200 rpm 劇烈振盪 1 分鐘後去除酒精，加入 15 ml 無菌水後上下搖晃進行洗滌，爾後去除無菌水，加入 25 ml 稀釋之高樂氏 (Clorox) 漂白水 (原味) (7.5 ml 漂白水加入 42.5 ml 無菌水)，使用迴轉式振盪器 (TKS OS-701) 以 100 rpm 進行晃動 15 分鐘，最終去除漂白水，並用無菌水洗滌五次。將滅菌完種子播於播種培養基 [MS30 培養基，4.4 g/L Murashige and Skoog medium (including vitamin) (Duchefa)、30 g/L sucrose、400 mg/L MES hrdrate (Bio Basic Inc.)、pH5.7] 中，放置於 26°C、光週期 16 小時生長室中培養 7 天，取其下胚軸作為基因轉殖之材料。

#### (二) 轉殖基因與載體

本次研究所轉殖之蘿蔔硫素合成相關基因 *Esm* (epithiospecifier modifier, 表皮特異硫蛋白修飾子)、*Myr* (myrosinase, MYR) 基因之轉殖策略為使用基因槍轟擊法進行葉綠體轉殖，因此 *Esm*、*Myr* 基因所構築載體為十字花科莖苔屬基因槍轟擊法的轉殖載體：pMT91t-*Esm*-A、MT91t-*Myr*-A、pMT91t-*Esm*-*Myr*-A，此三種載體均以葉綠體啟動子 *ppsba* 作為 *Esm*、*Myr* 基因的啟動子，由本實驗室林泳伸學長所構築，並透過轉形 (transformation)

將載體個別轉入大腸桿菌 (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )中進行保存(林, 2017)。

## 二、試驗方法

### (一)基因載體 (carrier)處理

以下添加藥品之操作都在無菌操作台內進行。本次研究所使用的金粒子(gold particle)來自 Bio-Rad 公司, 粒子大小為 0.6  $\mu\text{m}$ 。取 1 ml 70%酒精加入裝有 50 mg 金粉的離心管中, 以試管振盪器 3200 rpm 高速震盪 2 分鐘, 以 600 $\times$ g 30 秒的條件進行離心, 去除上清液後加入 1 ml 無菌水進行高速振盪 2 分鐘, 再以相同條件離心後去除上清, 加無菌水、震盪、離心、去上清等步驟重複五次, 待第五次去除上清液後加入現配之 833  $\mu\text{l}$  50%甘油劇烈震盪 2 分鐘, 進行分裝金粉量為 50  $\mu\text{l}$ 。將分裝之金粉保存於-20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### (二)基因載體 (carrier)混合 DNA

以下添加藥品之操作都在無菌操作台中進行。將金粉至-20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱取出後以試管振盪器輕搖 (程度 3)使金粉均勻懸浮, 至無菌操作台中邊攪拌邊緩慢加入 5  $\mu\text{g}$  的質體 DNA, 以試管振盪器輕搖 (程度 3)使金粒子與質體 DNA 混勻, 緩慢加入 50  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (1,000 ppm), 以試管振盪器輕搖, 加入 20  $\mu\text{l}$  亞精胺 (spermidine, 1,000 ppm)輕搖後放至室溫 10 分鐘, 以高速冷凍離心機 600 $\times$ g 17 秒條件進行離心, 去除上清加入 150  $\mu\text{l}$  無水酒精 (-20 $^{\circ}\text{C}$ ), 過程中使用微量吸管尖 (pipette tip)將管壁的金粉刮下, 以相同條件再次離心, 去除上清後加入 55  $\mu\text{l}$  無水酒精 (-20 $^{\circ}\text{C}$ )完成基因槍轟擊之子彈的配置。此配置量可進行五次基因槍轟擊。本次基因槍轉殖分成兩組, 第一組轟擊子彈所用的質體 DNA 為 pMT91t-Esm-Myr-A, 第二組為 pMT91t-Esm-A 與 pMT91t-Myr-A 之混合溶液 (1:1)。

### (三)培植體排盤與基因槍轟擊

將無菌播種之 7 天齡下胚軸切成約 1 公分長度數段, 平鋪於 MS30 培養基並於培養基中心排成半徑兩公分之圓。本研究所使用之基因槍為機型為 Bio-Rad 公司所研發的 Biolistic PDS-1000/He system。將配置好的子彈以試管振盪器混勻後取 10  $\mu\text{l}$  均勻塗抹在 macrocarrier-macrocarrier holder 中間, 等待酒精揮發時將氮氣鋼瓶之壓力閥打開, 調整壓力至 1,300 psi, 打開抽氣馬達與基因槍開關。金粒子內酒精揮發乾後將基因槍組件組合完畢、欲轟擊之下胚軸放至距離 stopping screen support ring 9 公分處, 以抽氣幫浦將轟擊室內部達到部分真空 (28 in-Hg)的環境, 待氮氣累積至 1,100 psi 便會衝破壓力膜擊發進行基因槍轟擊。轟擊完後將培植體放置暗室中暗培養 2 天。

### (四)轉殖培植體再生、篩選、出瓶馴化

將暗處理兩天之下胚軸換至基因槍篩選再生培養基[4.4 g/L Murashige and Skoog medium (including vitamin) (Duchefa)、30 g/L sucrose、400 mg/L MES hrdate (Bio Basic Inc.)、0.5 mg/L 6-benzylaminopurine (SIGMA)、0.05 mg/L picloram (SIGMA)、0.5 mg/L silver nitrate、8 g/L agar (USB)、15 mg/L spectinomycin、pH = 5.7], 每兩周繼代一次直至誘導出芽體, 待芽體長至約 3 公分時切下移入播種培養基使植株健化並使其自然發根, 待根長約 5 公分且展開本葉達三片以上時移出瓶外假植於 3 吋栽培盆混合介質 (泥炭土:蛭石:珍珠石 = 8:

2:1), 套上塑膠袋保溼, 於 25°C 恆溫長日照生長箱 (16 小時光照/8 小時黑暗) 中進行馴化, 約一週後待植株健化去除塑膠袋移至溫室並移至 5 吋黑軟盆中, 最終定植於 8 吋黑軟盆。

#### (五) 擬轉殖植株分析

##### 1. 擬轉殖植株基因體 DNA 檢測

本研究使用 BioKit 公司所出品的 Plant Genomic DNA Purification Kit 進行植物基因體 DNA 萃取。萃取樣本為植物本葉。使用 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技術增幅目標基因體序列的原理來檢測擬轉殖植株中是否含有目標片段序列。以植株本葉之基因體 DNA 為模板, 使用 Blend Taq®-Plus-(TOYOBO) 進行目標序列增幅。PCR 反應物包含 2.5 µl 10X PCR Buffer for Blend Taq、0.25 µl Blend Taq®-Plus-(2.5U/µl)、2.5 µl 2 mM dNTPs、0.5 µl 10 µM each primer、5 µl Genome (約 5-500 ng)、13.75 µl ddH<sub>2</sub>O, 反應總體積為 25 µl。將混合之 PCR 反應物放置於 DNA 聚合酶連鎖反應器[Biometra TOne Thermal Cyclers (Analytik Jena)] 進行反應。偵測基因體序列、引子序列以及增幅流程分述如下:

偵測 *Esm* 基因, 引子序列: 5'-GATCACCAAGGTAGTCGGCAAA-3' (Esm-F)、5'-GGGTGGATCACGTTTGTATTGG-3' (Esm-R), 增幅流程為 94°C 10 分鐘, 1 循環; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分鐘, 35 循環; 72°C 10 分鐘, 1 循環。

偵測 *Myr* 基因, 引子序列: 5'-GTGAGTAGGGGAGTGAACAAAGGA-3' (Myr-F)、5'-CCTGCAGGTCGAATATAGCTCTTC-3' (Myr-R), 增幅流程為 94°C 10 分鐘, 1 循環; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 90 秒, 35 循環; 72°C 10 分鐘, 1 循環。

偵測 *aadA* 基因, 引子序列: 5'-TCGTGGGATTGACGTGAGGG-3' (aadA-F)、5'-GGACTCCCAAGCACACAAATTCTC-3' (aadA-R), 增幅流程為 94°C 10 分鐘, 1 循環; 94°C 30 秒, 57°C 30 秒, 72°C 1 分鐘, 35 循環; 72°C 10 分鐘, 1 循環。

偵測部分 *aadA* 基因到 *Esm* 基因, 引子序列: 5'-GGAGGAACTCTTTGATCCGGTT-3' (AE-F)、5'-CACAGGGTCTGTGGAGGGTTT-3' (AE-R), 增幅流程為 94°C 10 分鐘, 1 循環; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒, 35 循環; 72°C 10 分鐘, 1 循環。

偵測部分 *aadA* 基因到 *Myr* 基因, 引子序列: 5'-TCTTCGAGCCAGCCACGTA-3' (AM-F)、5'-CCAGTTCTTCACCTTTCCACCA-3' (AM-R), 增幅流程為 94°C 10 分鐘, 1 循環; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒(pMT91t-Myr-A) / 150 秒(pMT91T-Esm-Myr-A), 35 循環; 72°C 10 分鐘, 1 循環。

偵測部分 *Esm* 基因到 *Myr* 基因, 引子序列: 5'-GATCACCAAGGTAGTCGGCAAA-3' (Esm-F)、5'-CCTGCAGGTCGAATATAGCTCTTC-3' (Myr-R), 增幅流程為 94°C 10 分鐘, 1 循環; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 150 秒, 35 循環; 72°C 10 分鐘, 1 循環。

##### 2. 植株本葉 mRNA 檢測

本研究利用 EBL Biotechnology 所生產之 NC RNA Extraction Reagent 來萃取植物 RNA。RNA 萃取樣本保存於 -70°C 冰箱。將萃取之 RNA 樣本以分光光度計進行濃度測量後, 取適量樣本進行定量。使用 HiScript I(TM) First Strand cDNA Synthesis Kit(BIONOVAS) 進行

RNA 反轉錄作用。首先將 10  $\mu$ l 2X Fast premix、2  $\mu$ l Primer mix [Oligo dT(18) and Random Hexamers]、6  $\mu$ l 定量 RNA (約 1  $\mu$ g~10 pg)、1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 混合，將樣本置於聚合酶連鎖反應器中反應 65°C 5 分鐘，再置於冰上 1 分鐘。將反應產物加入 1  $\mu$ l HiScript I Reverse Transcriptase (20000U/100  $\mu$ l)，以聚合酶連鎖反應器進行反應，流程為 42°C 反應 30 分鐘進行反轉錄作用 (reverse transcription)，再以 85°C 反應 5 分鐘終止反轉錄作用 (RT inactivation)。最終反轉錄產物 cDNA 保存於-70°C 冰箱。

以反轉錄產物 cDNA 為模版進行 PCR 反應。大部分偵測基因與引子與先前植物體 DNA 之 PCR 相同，僅 ESP 反向之 RT-PCR 引子有所差異。

Esp 反向 RT-PCR 所用引子：5'-ATGGCATAGCCGTGGTCGGA-3'、5'-CCAAACACGCTCCTCGCAGA-3'，增幅流程為 94°C 10 分鐘，1 循環；94°C 30 秒，56°C 30 秒，72°C 1 分鐘，35 循環；72°C 10 分鐘，1 循環。

### 3. 葉片異硫氰酸酯(Isothiocyanate)含量測定

取 0.2 g 新鮮葉片放入研鉢中加入液態氮磨成細粉，放置於有蓋子的玻璃試管中再加入 4 ml 煮沸之去離子水 (Deionized water)混勻。加熱 100°C 30 分鐘，每 5 分鐘上下搖晃一次，以濾紙 (Filter paper no.1)進行第一次過濾，流出濾液再以 0.45  $\mu$ m 微孔濾器 (millipore)進行第二次過濾。將流出濾液分兩處理，對照組取 0.1 ml 樣本液到微量離心管 (1.5 ml)加入 0.5 ml 磷酸緩衝液 (pH = 8.0)以及 0.6 ml 異丙醇 (isopropanol)；處理組為 0.1 ml 樣本液加入 0.5 ml 磷酸緩衝液(pH = 8.0)和 0.6 ml 10 mM 1,2-苯二硫酚 (1,2-benzenedithiol，溶於異丙醇)。將兩處理樣本放置 65°C 水浴鍋中反應 2 小時，以轉速 5000 rpm (4020 $\times$ g)離心 5 分鐘，取上清液。對照組為空白對照 (blank)，以分光光度計測量處理組 365 nm 光波之吸光值。

### 4. 葉片硫代葡萄糖苷 (glucosinolates)含量測定

將葡萄糖溶液稀釋成 0、50、100、150、200、250、300  $\mu$ mole/L，分裝於試管中。1 ml 樣品加入 1 ml Glucose assay reagent，以 30°C 水浴槽反應 15 分鐘後再以 100°C 加熱 5 分鐘停止反應，最終將樣品以分光光度計測量 340 nm 光波之吸光值，繪製標準曲線。

取 0.2 g 新鮮葉片以液態氮磨成細粉，放置玻璃試管中再加入 4 ml 煮沸之去離子水 (Deionized water)混勻。加熱 100°C 30 分鐘，每 5 分鐘上下搖晃一次，以濾紙 (Filter paper no.1)進行第一次過濾，流出濾液再以 0.45  $\mu$ m 微孔濾器 (millipore)進行第二次過濾。取 250  $\mu$ l 樣本液加入 2750  $\mu$ l 無菌水混勻，將總量 3000  $\mu$ l 的混合樣本緩慢加到 0.5 cm 高 DEAE Sephadex A<sub>25</sub> 管柱，將流出液體丟棄。管柱下方更換新試管後於管柱加入 3 ml 0.1 M 磷酸緩衝液 (phosphate buffer pH = 6.6)，收集流出液。流出液加入 500  $\mu$ l myrosinase 於 37°C 反應 12 小時，取 1 ml 反應完之溶液加入 1 ml Glucose assay reagent，30°C 反應 15 分鐘後再以 100°C 5 分鐘使反應停止。將樣本以分光光度計測量 340 nm 光波之吸光值，3 ml 磷酸緩衝液加 500  $\mu$ l myrosinase 以及 1 ml Glucose assay reagent 作為空白對照 (blank)。將數值帶入標準曲線中計算濃度。

## 結 果

### 一、青花菜與甘藍擬轉殖株之基因及表現分析

#### (一)基因槍轉殖之葉綠體擬轉殖青花菜(pMT91t-Esm-A 與 pMT91t-Myr-A)

##### 1. 聚合酶連鎖反應 (PCR)檢測擬轉殖青花菜

本研究中經由基因槍轟擊之青花菜下胚軸，經由透過 spectinomycin 篩選、誘導再生成擬轉殖植株。萃取得之擬轉殖植株葉片 DNA，以獨特核酸引子進行分析，檢測基因組中是否帶有轉殖之 *Esm*、*aadA-Esm*、*Myr*、*aadA-Myr* 目標基因。分析結果顯示 26 株經過 spectinomycin 初步篩選之青花菜植株中，僅有編號 GB024 植株對於任何檢測均無正反應。經 PCR 檢測結果，青花菜轉殖 pMT91t-Esm-A 與 pMT91t-Myr-A 組合載體之擬轉殖株為 25 株。

*Esm* 基因的引子設計為 Forward primer 黏合處為載體之 psbA 5'UTR 處，Reverse primer 黏合位置為靠近 *Esm* 尾端 (3'端)，經 PCR 反應，增幅出的片段大小為 1.3 kb，涵蓋部份載體片段與 *Esm* 基因全長。根據圖 1A 中顯示，26 株檢測之擬轉殖株中，有 21 株植株獲得預期的 1.3 kb 條帶 (GB01、GB02、GB03、GB05、GB06、GB07、GB08、GB09、GB10、GB11、GB12、GB13、GB14、GB17、GB18、GB19、GB21、GB22、GB25、GB26)。在未轉殖青花菜葉片基因組(CK)中則偵測不到此基因片段。

*aadAEsm* 基因的引子設計為 Forward primer 黏合處為 *aadA* 基因中間，Reverse primer 黏合位置為 *Esm* 前端 (5'端)，經 PCR 反應可增幅出 0.9 kb 的基因片段，藉此分析同時可檢測 *aadA* 基因與 *Esm* 基因是否同時存在相鄰。根據圖 1B 顯示，26 株受檢測的植株中，有 10 株可檢測到 0.9 kb 大小的基因片段，分別是 GB01、GB02、GB12、GB14、GB15、GB17、GB18、GB23、GB25、GB26。

*Myr* 基因的引子設計為 Forward primer 黏合處為 *Myr* 基因，Reverse primer 黏合位置為 TpsbA，經 PCR 反應，增幅出的片段大小為 1.3 kb，涵蓋 *Myr* 基因部份與載體片段。如此可避免增幅到青花菜內源之 *Myr* 基因。根據圖 1C，26 株檢測之擬轉殖株中，有 14 株植株獲得預期的 1.3 kb 條帶 (GB01、GB02、GB03、GB06、GB09、GB10、GB11、GB12、GB14、GB 16、GB17、GB18、GB20、GB21)。在未轉殖青花菜葉片基因組 (CK)中則偵測不到此基因片段。

*aadAMyr* 基因的引子設計為 Forward primer 黏合處為 *aadA* 基因中間，Reverse primer 黏合位置為靠近 *Myr* 基因中間，經 PCR 反應可增幅出 1.2 kb 的基因片段，涵蓋部分 *aadA* 基因與部分 *Myr* 基因。根據圖 1D，26 株青花菜中共有 8 株偵測到此基因片段 (GB02、GB04、GB12、GB13、GB14、GB16、GB17、GB26)。

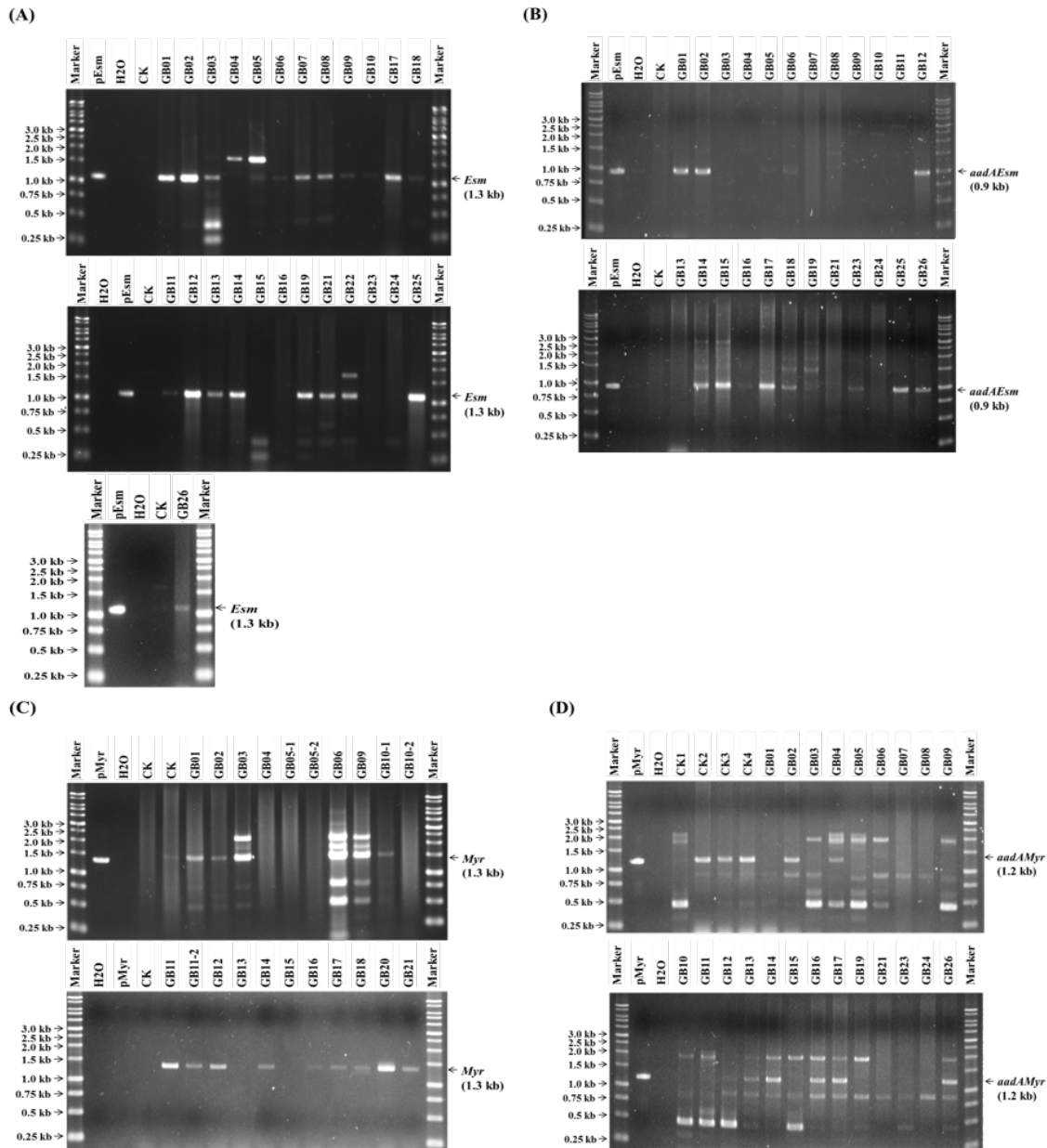


圖 1. 以擬轉殖青花菜 DNA 為模板，使用核酸引子進行聚合酶連鎖反應，將產物 *Esm* (1.3 kb) (A)、*aadAEsm* (0.9 kb) (B)、*Myr* (1.3 kb) (C)、*aadAMyr* (1.2 kb) (D) 基因片段，以電泳膠片分析之結果。pEsm：pMT91t-Esm-A。pMyr：pMT91t-Myr-A。CK：未轉植青花菜。

Fig. 1. PCR analysis of *Esm* (1.3 kb) (A), *aadAEsm* (0.9 kb) (B), *Myr* (1.3 kb) (C), and *aadAMyr* (1.2 kb) (D) gene fragments in putative transplastomic broccoli by using primers. pEsm: pMT91t-Esm-A. pMyr: pMT91t-Myr-A. CK: un-transformed broccoli.

## 2. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)分析擬轉殖青花菜

由 RT-PCR 分析 *Esm* 基因片段的 mRNA，片段大小為 1.3 kb，21 個樣本中有 4 個偵測到此段基因的 mRNA 表現 (GB06、GB08、GB10、GB21)，但表現量微弱(圖 2A)。未轉殖青花菜未測到此段基因的表現。

RT-PCR 分析 *aadAEsm* 基因表現量，21 個檢測樣本有 4 個樣本有偵測到 *aadAEsm* 基因的 mRNA 片段 (GB08、GB10、GB12、GB13)，片段大小為 0.9 kb，然條帶亮度非常微弱 (圖 2B)。未轉殖青花菜則偵測不到此 mRNA 片段。

RT-PCR 分析 *Myr* 基因片段的 mRNA，片段大小為 1.6kb，21 個樣本中有 3 個偵測到此 mRNA 的表現(GB12、GB15、GB16)(圖 2C)。此 3 個樣本偵測到的 mRNA 表現量同樣不高。未轉殖青花菜未測到此段基因的表現。

RT-PCR 分析 *aadAMyr* 基因片段的 mRNA，片段大小為 1.2 kb，21 個樣本中有 5 個偵測到 *aadAMyr* 的 mRNA 表現 (GB01、GB03、GB10、GB11、GB21)(圖 2D)。此 5 個樣本偵測到的 mRNA 表現量也有所差異。未轉殖青花菜未測到此段基因的表現。

### (二)基因槍轉殖之葉綠體擬轉殖甘藍 (pMT91t-Esm-Myr-A)

#### 1. 聚合酶連鎖反應 (PCR)檢測擬轉殖甘藍

本研究中甘藍下胚軸藉由基因槍轟擊，再經過 spectinomycin 篩選、誘導再生形成擬轉殖植株。萃取所得之擬轉殖植株葉片 DNA，以獨特因子核酸引子進行分析，檢測基因組中是否帶有轉殖之 *aadA*、*Esm*、*Myr*、*EsmMyr* 目標基因。分析結果為 12 株經過 spectinomycin 初步篩選之青花菜植株中，僅有編號 GC01、GC02、GC03、GC07、GC09 植株對於部分檢測呈正反應。經 PCR 檢測果，甘藍轉殖 pMT91t-EsmMyr-A 載體之擬轉殖株為 5 株。

*aadA* 基因片段所使用的引子，Forward primer 黏合處為啟動子 *prn*，Reverse primer 接合位在 *psbA* 5'UTR 上，經 PCR 後可得到大小 0.8 kb 的片段。此組引子設計涵蓋了整個 *aadA* 基因。根據圖 3A 結果顯示，12 組檢測樣本中僅有編號 GC07、GC09 兩株有偵測到此段基因片段。未轉殖甘藍沒有偵測到此段基因。

*Myr* 基因條帶大小為 1.3 kb，根據圖 3B 所示，所檢測的 12 組樣本均沒有偵測到轉殖的 *Myr* 基因片段。根據圖 3C，1.1 kb 片段大小的 *Esm* 基因檢測結果僅有編號 GC01 有偵測到轉殖 *Esm* 基因。根據圖 3D，2.5 kb *EsmMyr* 基因檢測結果僅有 GC02、GC03 有偵測到微量的基因片段。

#### (2) 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)分析擬轉殖甘藍

根據圖 4A 為基因槍轉殖甘藍擬轉殖株 mRNA 分析結果，九株檢測樣本均無法偵測到 *Myr* 基因 (1.3 kb) 的 mRNA。圖 4B 膠圖顯示僅有 GC02 與 GC03 有偵測到 *Esm* 基因 (1.2 kb) 的 mRNA 表現，且訊號明顯。圖 4C 結果顯示並沒有偵測到任何 *EsmMyr* 基因 (2.5 kb) 的 mRNA 表現訊號。



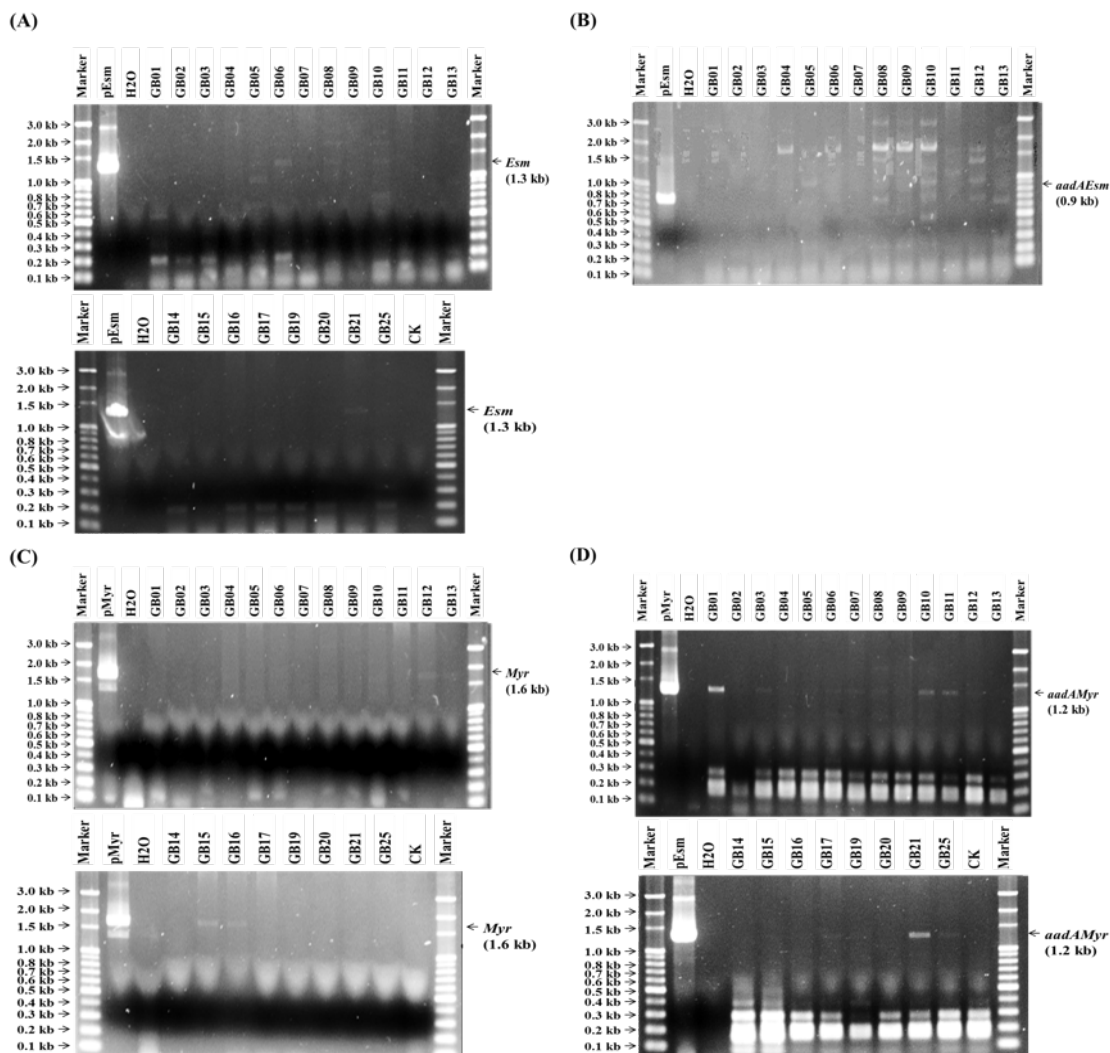


圖 2. 以擬轉殖青花菜 cDNA 為模板，使用核酸引子進行聚合酶連鎖反應，將產物 *Esm* (1.3 kb) (A)、*aadAEsm* (0.9 kb) (B)、*Myr* (1.3 kb) (C)、*aadAMyr* (1.2 kb) (D) 基因片段，以電泳膠片分析之結果。pEsm：pMT91t-Esm-A。pMyr：pMT91t-Myr-A。CK：未轉植青花菜。

Fig. 2. RT-PCR analysis of *Esm* (1.3 kb) (A), *aadAEsm* (0.9 kb) (B), *Myr* (1.3 kb) (C), and *aadAMyr* (1.2 kb) (D) gene fragments in putative transplastomic broccoli by using primers. pEsm: pMT91t-Esm-A. pMyr: pMT91t-Myr-A. CK: un-transformed broccoli.

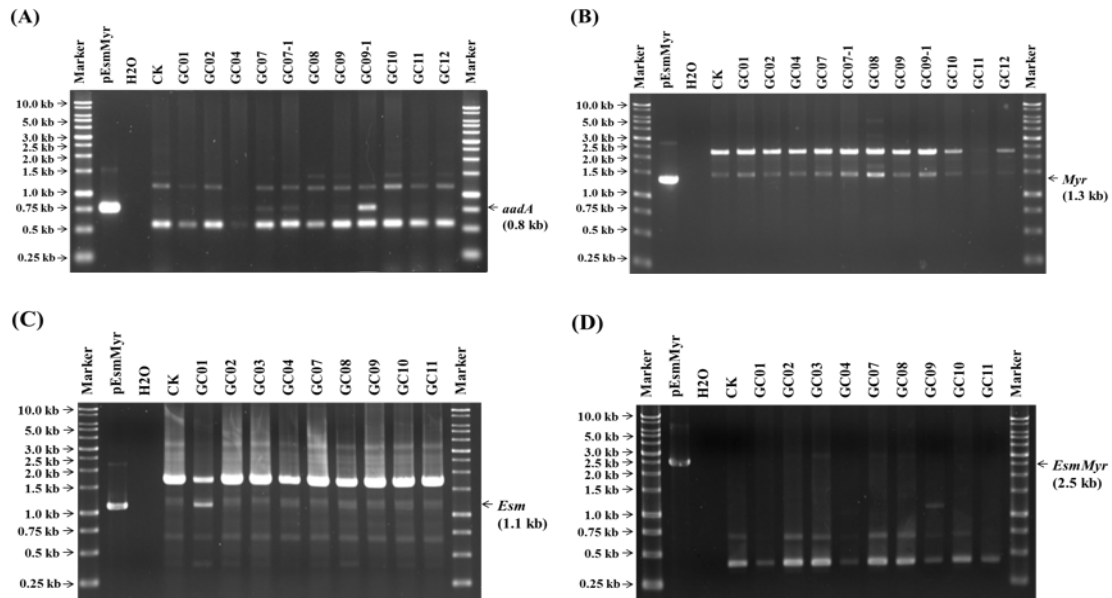


圖 3. 以擬轉殖甘藍 DNA 為模板進行聚合酶連鎖反應，將產物 *aadA* (0.8 kb) (A)、*Myr* (1.3 bp) (B)、*Esm* (1.1 kb) (C)、*EsmMyr* (2.5 kb) (D) 基因片段，以電泳膠片分析之結果。p : pMT91t-EsmMyr-A。CK : 未轉殖甘藍。

Fig. 3. PCR analysis of *aadA* (0.8 kb) (A), *Myr* (1.3 bp) (B), *Esm* (1.1 kb) (C), and *EsmMyr* (2.5 kb) (D) gene fragments in putative transplastomic cabbage. p: pMT91t-EsmMyr-A. CK: un-transformed cabbage.

## 二、擬轉殖青花菜與甘藍之異硫氰酸酯(isothiocyanate)與硫代葡萄糖苷(glucosinolates)含量分析

葉綠體擬轉殖青花菜葉片之異硫氰酸酯含量分析結果如圖 5 所示。26 個檢測分析的樣本中，有 19 株擬轉殖株的異硫氰酸酯含量與未轉殖青花菜 (ck, 1.508 mmole/100 g-Fw) 有顯著差異，其中最大含量為 GB 07 (7.560 mmole/100 g-Fw, 5.1 倍)，最小為 GB09 (2.508 mmole/100 g-Fw, 1.6 倍)。

葉綠體擬轉殖甘藍葉片之異硫氰酸酯含量分析結果如圖 6 所示。10 個檢測分析的樣本中，有 5 株擬轉殖株的異硫氰酸酯含量與未轉殖甘藍 (ck, 2641  $\mu$ mole/100 g-FW) 有顯著差異，含量介於 6187 至 9870  $\mu$ mole/100 g-FW。

基因槍轉殖之葉綠體擬轉殖青花菜葉片之硫代葡萄糖苷含量如圖 7 所示。其中 GB03、GB13、GB21、GB22、GB25、GB26 等六株植株的硫代葡萄糖苷含量，較對照組 (CK, 130.81  $\mu$ mole/100 g-Fw) 為高，有顯著差異。

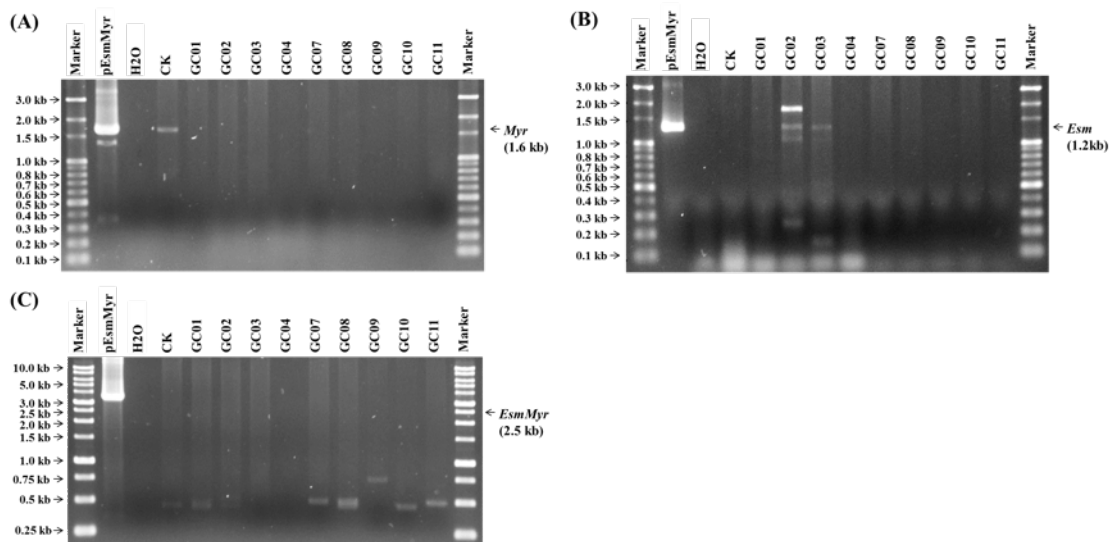


圖 4. 以擬轉殖甘藍 cDNA 為模板，進行反聚合酶連鎖反應，將產物 *Myr* (1.3 bp) (A)、*Myr* (1.6 kb) (B)、*EsmMyr* (2.5 kb) (C) mRNA 片段，以電泳膠片分析之結果。p：pMT91t-EsmMyr-A。CK：未轉殖甘藍。

Fig. 4. RT-PCR analysis of *Myr* (1.3 bp) (A)、*Myr* (1.6 kb) (B)、*EsmMyr* (2.5 kb) (C) mRNA in putative transplastomic cabbage. p: pMT91t-EsmMyr-A. . CK: un-transformed cabbage.

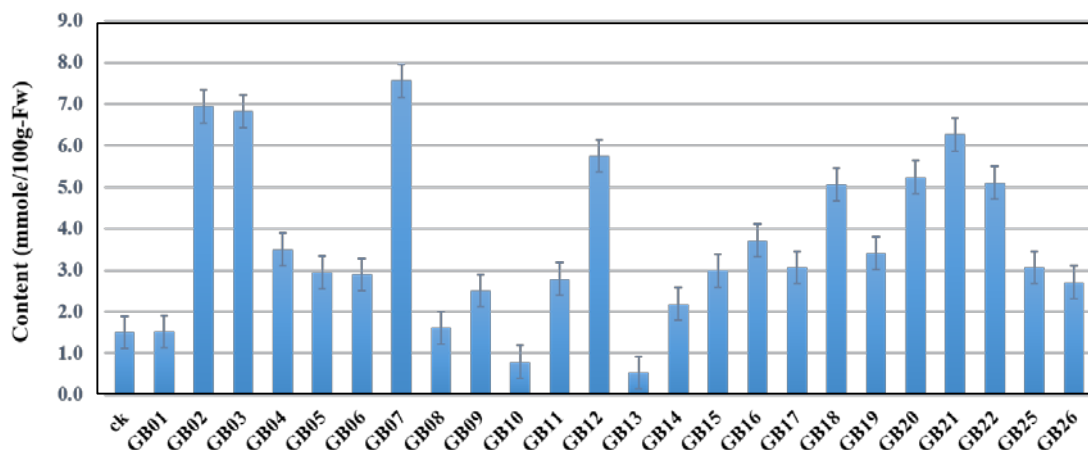


圖 5. 基因槍轉殖之葉綠體擬轉殖青花菜葉片之異硫氰酸酯含量。表格數據為試驗經三重複後之平均數值。

Fig. 5. The contents of isothiocyanate in putative transplastomic broccolis via biolistic bombardment. The data were the means of three replications. mmole/100 g-Fw.

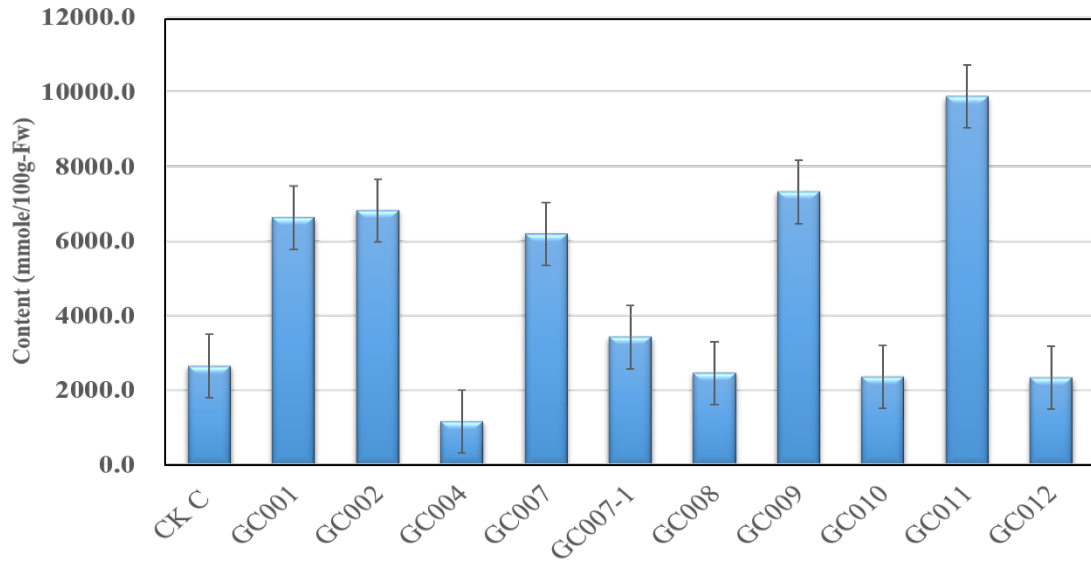


圖 6. 基因槍轉殖之葉綠體擬轉殖甘藍葉片之異硫氰酸酯含量。表格數據為試驗經三重覆後之平均數值。

Fig. 6. The contents of isothiocyanate in putative transplastomic cabbage *via* biolistic bombardment. The data were the means of three replications.

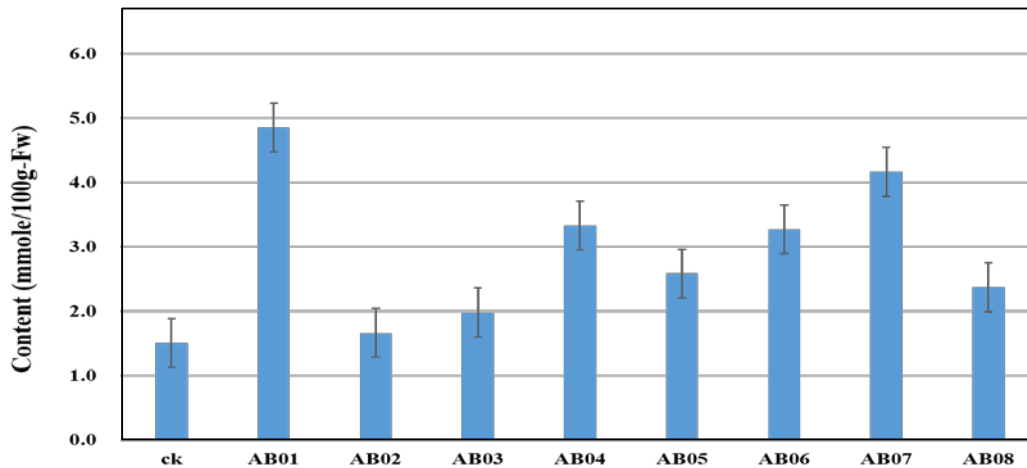


圖 7. 基因槍轉殖之葉綠體擬轉殖青花菜葉片之硫代葡萄糖苷含量。表格數據為試驗經三重覆後之平均數值。

Fig. 7. The contents of glucosinolates in putative transplastomic broccolis *via* biolistic bombardment. The data were the means of three replications.

## 討 論

### 一、青花菜與甘藍基因槍葉綠體基因轉殖、培植體篩選與再生馴化

本試驗選用'初秋'甘藍與'綠王'青花菜作為轉殖材料。本實驗室已建立甘藍下胚軸之組織培養與基因槍轉殖再生系統，故本試驗以此為主要參考依據，而後根據青花菜篩選再生情況去進行調整。在培植體排盤方式與先前學長姐之試驗有所不同，將垂直緊密的排列方式改成水平緊密擺放，原因為在試驗過程中有觀察過自身與本實驗室林泳伸學長之培植體再生芽體情況並無明顯差別，但在操作上水平緊密擺放較為快速。轟擊後進行暗處理結束後，本試驗為將下胚軸直接進入篩選而非先再生恢復傷勢。部分培植體，尤其是青花菜容易在癒傷期間就發生芽體分化，而甘藍則易分化不定根。不同培植體對於 spectinomycin 的耐受性有所差異，為避免再生期間分化的芽體發生逃脫現象，固本試驗在暗處理兩天就使用低濃度 (5 ppm) 篩選藥劑針對培植體細胞進行篩選，如此還能縮短一週的轉殖時間，增加轉殖頻率。

青花菜部份，本研究共計進行 35 次基因槍轟擊，所使用之青花菜下胚軸約為 6800 根，經篩選再生存活之植株共 26 株，轉殖再生率約為 0.38%。甘藍部份，本研究共計進行 38 次基因槍轟擊，所使用之甘藍下胚軸約為 3500 根，經篩選再生存活之植株共 12 株，轉殖再生率約為 0.34%。

### 二、青花菜與甘藍擬轉植株基因檢測與表現分析

藉由基因槍轟擊進行基因轉殖、篩選再生形成的轉植株，在基因偵測上都有面臨到訊號微弱以及再現性不穩定的問題。在前述提到擬轉殖培植體會有嵌合體的發生，由於植物細胞中含有多個葉綠體，一個葉綠體又含有多套染色體，以單一細胞而言，轉殖的染色體套數與未轉殖的比例或許相當懸殊，如若沒有維持長時間的篩選壓力，再經過多次的細胞分裂後，未帶有轉殖基因的細胞數會逐漸增加，降低轉殖基因在整體基因體所佔的比例，因此導致訊號微弱的情形發生。在有篩選壓力情況下，容易以肉眼分辨此葉片組織是轉殖細胞多寡，在樣本選擇上可以更加準確的挑選有轉殖的細胞進行分析，提高訊號以及再現性。青花菜培植體在試驗過程中維持篩選時間較甘藍長，在偵測基因訊號的再現性與強度上青花菜也相對高於甘藍。

另外由於本次試驗所轉殖的目標基因均選殖自青花菜，因此在單一目標基因的檢測上如何避免偵測到內源性基因也是引子設計考量要點之一。在林泳伸學長的試驗 *Esm*、*Myr* 基因時在未轉植株與擬轉植株中均發現一條較目標條帶大的基因片段，當時討論可能是含有內含子 (intron) 的內源性 *Esm*、*Myr* 基因，由於現有資訊不清楚'綠王'青花菜的 *Esm*、*Myr* 基因序列，因此無法直接推斷該條帶是否為內源性基因。為了避免內源性基因條帶對轉殖目標條帶產生訊號強度影響，在引子設計上會將某一股引子設計黏合在載體或其他基因上，如此能有效降低其他基因訊號的干擾。另外針測 mRNA 表現上也可以避免偵測內源性產生的訊號判讀錯。

在 RT-PCR 結果中，有部分植株出現奇怪的訊號，如 GB10 與 GB11 在偵測 *aadAMyr* mRNA 時，由於從未偵測到該基因的 DNA 訊號，理論上不應該會有相同基因的 RNA 訊號，但在圖 5D 中可清楚看到偵測的條帶產物，推測原因可能為設計引子時只進行基因體序列的比對，未針對 mRNA 序列進行比對。當某些基因去除內含子後之序列可能就會與引子吻合。但要合成與目標大小相同的產物在機率上非常渺小，因此該推斷或許不正確。較有可能是 DNA 訊號過低而導致僅偵測到 mRNA 的結果。

### 三、擬轉植青花菜與甘藍異硫氰酸酯含量分析

異硫氰酸酯的分析結果大多符合預期，與未轉殖株相比有較高的含量且具顯著差異，部分擬轉殖株雖含量較少但卻沒有顯著差異發生。但有幾點值得探討：

#### (一)有偵測到轉殖基因但異硫氰酸酯含量沒有顯著差異

可能性有下列幾種可能性：(1) 基因 DNA 未轉錄成 mRNA，(2) 植物細胞本身的條件影響異硫氰酸酯的生物合成效果，包含硫代葡萄糖苷的含量、細胞酸鹼值、ESP 蛋白的活性等等。根據圖 10 與圖 12，GB08 與 GB10 異硫氰酸酯含量較未轉殖株低的原因或許是因為本身硫代葡萄糖含量較少的緣故，除了這點否有其他因子影響異硫氰酸酯生合成仍需進行更多分析方能下定論，究竟是何原因導致基因轉殖成功但卻未達分析結果。

#### (二)異硫氰酸酯含量有顯著差異但未偵測到轉殖基因

這部分分析與前一項討論類似，由於今日所轉殖的作物本身就具有異硫氰酸酯的生合成途徑，因此不像部分基因轉殖的分析結是有或無的呈現方式。

除了單純判斷基因是否成功轉入，有無 mRNA 表現外，生物影響因子：蛋白活性、硫代葡萄糖含量、病蟲害，或者非生物因子：溫度 (Guo *et al.*, 2016)、酸鹼值、鹽害 (Esfandiari *et al.*, 2017)、光照 (Pérez-Balibrea *et al.*, 2008)、金屬離子 (Liang *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2010)等都是影響異硫氰酸酯合成的重要因素，包含分析前的取樣後處理都會造成異硫氰酸酯含量變化的關鍵。

### 四、基因槍轉殖青花菜硫代葡萄糖苷含量分析

本試驗預期結果為當轉入黑芥子酶與黑芥子酶協助蛋白後，會促進硫代葡萄糖苷的水解效率，形成低硫代葡萄糖、高異硫氰酸酯的結果。和異硫氰酸酯相同，硫代葡萄糖苷的生合成與代謝是十字花科作物本身就具有的生物活性，除了基因表現影響外，植物抗逆境相關賀爾蒙(茉莉酸、水楊酸等)、病蟲害、真菌、細菌、病毒都會影響硫代葡萄糖的含量。因此分析結果或許會與期望不同。

## 參 考 文 獻

- 林泳伸。青花菜蘿蔔硫素生合成相關基因之構築及轉殖。2017。碩士論文。台中：國立中興大學園藝學系。
- Andréasson, E., L. B. Jørgensen, A. S. Höglund, L. Rask, and J. Meijer. 2001. Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 127(4): 1750-1763.
- Fahey, J. W., A. T. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochem.* 56: 5-57.
- Guo, L., R. Yang, Z. Wang, Q. Guo, and Z. Gu. 2014. Glucoraphanin, sulforaphane and myrosinase activity in germinating broccoli sprouts as affected by growth temperature and plant organs. *J. Func. Foods.* 9: 70-77.
- Guo, L., R. Yang, Y. Zhou, and Z. Gu. 2016. Heat and hypoxia stresses enhance the accumulation of aliphatic glucosinolates and sulforaphane in broccoli sprouts. *Eur. Food Res. Technol.* 242(1): 107-116.
- Halkier, B. A. and J. Gershenzon. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biolo.* 57: 303-333.
- Husebye, H., S. Chadchawan, P. Winge, O. P. Thangstad, and A. M. Bones. 2002. Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128: 1180-1188.
- 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. *Phytochem. Rev.* 8: 69-86.
- Matusheski, N. V. and E. H. Jeffery. 2001. Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J. Agric. Food Chem.* 49(12): 5743-5749.
- Pedras, M. S., C. M. Nycholat, S. Montaut, Y. Xu, and A. Q. Khan. 2002. Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochem.* 59: 611-625.
- Rask, L., E. Andréasson, B. Ekbom, S. Eriksson, B. Pontoppidan, and J. Meijer. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* 42:93-113.

## Studies on Transformation of Sulforaphane Biosynthetic Related Genes into Broccoli and Cabbage

Shin-Jie Liao<sup>1)</sup> I-Chun Pan<sup>2)</sup> Po-Heng Chen<sup>3)</sup> Menq-Jiau Tseng<sup>4)</sup>

Key words: Broccoli, Cabbage, Sulforaphane, Isothiocyanates, Gene Transformation

### Summary

In this study, two Brassica chloroplast transformation vectors pMT91t-Esm-A and pMT91t-Myr-A were co-transferred into the hypocotyls of 'Green King' broccoli, and the pMT91t-Esm-Myr-A was transferred into the hypocotyls of 'K-Y cross' cabbage by biolistic bombardment. Transformed plantlets were selected by 5 ppm spectinomycin. The results of PCR and RT-PCR analysis indicated that the transformed genes are present and expressed its mRNA in the transgenic plants.

Isothiocyanate content analysis showed that the transplastomic broccoli and cabbage had more isothiocyanate than that of the untransplanted plants. It is feasible to increase the isothiocyanate content in the leaves by transferring *Esm* (epithiospecifier modifier) and *Myr* (myrosinase) genes to broccoli and cabbage chloroplasts by biolistic bombardment.

---

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

2) Associate 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.