

黑芥子酶 (*Myr*) 及表皮特異硫蛋白修飾子 (*Esm*) 基因為目標基因、*DAAO* 為非抗生素篩選基因之青花菜葉綠體基因轉殖載體的構築

陳柏亨¹⁾ 潘怡君²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：青花菜、葉綠體基因轉殖、*DAAO* 篩選基因、D-alanine

摘要：黑芥子酶-硫代葡萄糖苷系統為十字花目植物中獨特的防禦機制，硫代葡萄糖苷經黑芥子酶 (Myrosinase, *Myr*) 催化後產生的下游產物除了抗病蟲害之外，其中異硫氰酸酯對人體具有醫療保健效果。為增加異硫氰酸酯於青花菜中含量，並且提升基因轉殖作物的食品安全性，本研究以本實驗室所構築之轉殖載體加以改造，發展出以黑芥子酶 (*Myr*) 及表皮特異硫蛋白修飾子 (Epithiospecifier modifier, *Esm*) 基因為目標基因，以 *DAAO* 為非抗生素篩選基因的青花菜葉綠體基因轉殖載體，此將可使用 D-alanine 作為篩選藥劑應用於轉植株的篩選。較目前被普遍應用於轉殖作物篩選上的耐抗生素及抗除草劑標誌基因，大幅降低對環境及人體的危害。載體構築完成後使用 PCR、酵素酶切及 GUS 活性檢測等方式對載體進行檢測，結果顯示載體攜帶有完整的目標基因，且可於大腸桿菌中表達具活性 GUS 蛋白，可應用於後續青花菜葉綠體基因轉殖試驗。

前 言

青花菜 (*Brassica oleracear* L. var. *italica*) 富含維生素 B、維生素 C、鈣、鋅、鐵、硒及錳等人體必須營養元素，以及葉黃素 (lutein)、玉米黃素 (zeaxanthin)、beta-胡蘿蔔素 (β -carotene) 等抗氧化物質，極具營養價值。近年來則有許多研究，顯示青花菜具有大量含硫化合物，如硫代葡萄糖苷 (glucosinolates) 及其代謝產物異硫氰酸酯 (isothiocyanate) 等，有

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

顯著的防癌效果，具有發展為人體醫藥保健食品之潛力。

植物基因轉殖主要可分為葉綠體基因轉殖及細胞核基因轉殖，其中葉綠體基因轉殖具有許多優點。首先，葉綠體的基因組類似原核生物的質體 (plasmid) 具多重套數，加上植物細胞具數個葉綠體，表示葉綠體可大量表達外源基因；其次，葉綠體基因轉殖可藉由同源重組區域決定外源基因插入位置，然而農桿菌基因轉殖將轉基因隨機插入染色體中，容易造成基因靜默 (gene silencing)，使得基因表現或轉殖株外表型態可能因插入染色體位置不同而受影響；最重要的是，葉綠體基因轉殖之轉基因存在於葉綠體中，並屬於母系遺傳，而植物的花粉中不存在葉綠體，故轉基因不易隨花粉流出 (Wang *et al.*, 2009)。植物基因轉殖於轉殖過程中導入篩選基因 (selectable gene) 可幫助篩選出轉殖成功的培植體。抗抗生素 hygromycin 的 *hptII* (hygromycin phosphotransferase) 基因或抗 kanamycin 的 *nptII* (neomycin phosphotransferase II enzyme) 基因為常見的篩選基因。然而在 hygromycin 長時間篩選下也可能使具有抗性的轉殖株死亡；另外，以 kanamycin 為篩選藥劑則容易被轉殖細胞代謝降解，使周圍未轉殖細胞存活進而抽芽，降低篩選效率 (Jun Cao *et al.*, 1999; J Cao *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001)。除了抗生素外，前人研究顯示 D-form 胺基酸可作為植物基因轉殖後的篩選藥劑。胺基酸於自然界生物中大多以 L-form 形式存在，D 型胺基酸能由 D-amino acid oxidases (DAAO) 催化形成 L-型胺基酸 (Erikson *et al.*, 2004)。以非抗生素篩選載體應用於葉綠體轉殖基因轉殖對環境較友善，且效率較佳，本研究使用實驗室前人構築的青花菜轉殖載體進行改造，將不同載體上的 *aada* 基因置換為 *DAAO* 基因，便於後續青花菜非抗生素轉殖系統的建立。

材料與方法

一、大腸桿菌質體萃取

事先配置萃取溶液 solution I (50 mM glucose、25 mM Tris-HCl、10 mM EDTA (pH 8.0))、solution II (0.2 N NaOH、1% SDS) (需新鮮配製)、solution III (3M sodium acetate、5M glacial acetic acid)。取單一菌落至 5 ml LB broth，加入 ampicillin (終濃度 100 mg/ml)，於 37°C 震盪培養 8 小時，取 1 ml 菌液倒入 1.5 ml 微量離心管中，以室溫 12,000 rpm 離心 1 分鐘，重複此步驟 2 次。去除上清液，加入 100 µl Solution I，震盪打散菌塊並使之再懸浮，加入 200 µl 新鮮配製的 Solution II，搖晃離心管使溶液均勻混合，此時溶液呈半透明黏稠狀，最後加入 150 µl Solution III 並均勻混合溶液，溶液出現白色塊狀物，靜置冰上 5 分鐘，再以室溫 12,000 rpm 離心 5 分鐘，吸取 400 µl 上清液至新的微量離心管。加入 5 µl RNaseA (1mg/ml)，於 60°C 水浴反應 30 分鐘，接著加入等體積的 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)，劇烈震盪使溶液混合均勻，以室溫 12,000 rpm 離心 3 分鐘，取 300 µl 上清液至新的微量離心管，加入等體積的 isopropanol，搖晃均勻後置於 -20°C 30 分鐘以沉澱 DNA，接著以 4°C 12,000 rpm

離心10分鐘，於管壁底部會出現白色沉澱物，接著去除上清液，加入1 ml 75% EtOH 清洗沉澱物，再以4°C 12,000 rpm 離心5分鐘，去除上清液，真空抽乾樣品中殘留的酒精，最後加入適量的ddH₂O回溶DNA並保存於-20°C。

二、限制酶酵素剪切 (Restriction enzyme digestion)

使用Thermo Fisher Scientific®之限制酶進行實驗，取1 µl DNA (1 µg/µl)加入含有2 µl 10X buffer、16 µl H₂O及0.5 µl 限制酶之混合液，混勻後靜置於4°C水浴槽反應12小時，接著進行後續DNA ligation之實驗。

三、DNA黏合 (DNA ligation)

使用Promega®之T4 DNA Ligase進行實驗，取17 ng insert和100 ng vector加入含有H₂O、1 µl Ligase 10X buffer及1µl T4 DNA Ligase之溶液，總體積為10 µl，混勻後靜置於4°C水浴槽反應12小時，接著進行後續大腸桿菌轉型 (transform)之實驗。

四、大腸桿菌勝任細胞 (competent cell)製備

本實驗總供需三天時間，第一天先將大腸桿菌劃於LB agar 菌盤，置於37°C培養16-20小時。第二天挑取單一菌落，接種於內含50 ml LB 培養基的錐形瓶，於37°C震盪培養16-20小時，同時放入兩個含有250 ml LB 的錐形瓶於37°C預熱。第三天分別加入25 ml 菌液至兩個250 ml LB 培養基中，於37°C震盪培養至OD₆₀₀ = 0.2，同時放入一個含有150 ml LB 的錐形瓶於37°C預熱。每瓶菌液加入75 ml 預熱之LB 培養基並接著於37°C震盪培養30分鐘。將菌液轉移至事先預冷之50 ml 離心管中，以4°C、5000 rpm離心10分鐘，去掉上清液後加入87.5 ml 預冷之100 mM MgCl₂，再懸浮菌塊並置於冰上10分鐘。以4°C、4000 rpm離心10分鐘。去除上清液後加入17.5 ml 預冷之100 mM CaCl₂，再懸浮菌塊並置於冰上20分鐘。以4°C、4000 rpm離心10分鐘。接著去除上清液，加入3.5 ml 預冷之85% (v/v) 100 mM CaCl₂和15% (v/v)100% glycerol 混合液，再懸浮菌塊並分裝於微量離心管中，每管80 µl，置於-80°C保存。

五、大腸桿菌熱休克轉型 (Heat shock transformation)

自-80°C凍箱中取出大腸桿菌勝任細胞 DH5α (OD₆₀₀ = 0.5/80µl)，置於冰上解凍，加入5µl ligation產物，混勻後於冰上靜置15分鐘，接著將勝任細胞放入42°C水浴槽中45秒，再快速轉移至冰上並靜置2分鐘，加入920 µl SOC培養基 (2% tryptophan、0.5% Yeast extract、10mM NaCl、2.5mM KCl、20mM Mg²⁺、20mM glucose, pH = 7)，於37°C培養箱震盪培養1小時後，以400 rpm 離心並去除上清液，加入100 µl SOC使菌塊再懸浮，將菌液塗抹於含有100 mg/ml ampicillin之 LB agar培養基中，放置於37°C生長箱中培養12小時。

六、聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

PCR使用EBL Master Mix (2x) red dye，預先配製反應溶液並混勻，接著加入樣本DNA，反應溶液包含12.5 µl 2x PCR Master mix、0.5 µl forward primer (1 µM)、0.5 µl reverse primer (1 µM)、11.5 µl ddH₂O、1 µl DNA樣本 (100 ng/µl)。PCR反應條件設定為step 1：95°C 維持2 min、1 cycle；step 2：95°C 維持30 sec、55°C 20 sec、72°C 20 sec、30 cycle；step 3：

72°C 5 min、16°C、1 cycle。最後使用 1x TAE buffer、1% agarose gel 進行膠體電泳確認。

七、*E.coli* β -glucuronidase (GUS) 染色分析

使用構築完成之菌種，畫菌於含 ampicillin 抗生素的菌盤上，於 37°C 培養 12 小時，挑取單一菌落培養於含 ampicillin 抗生素的 LB 中，於 37°C 培養 8 小時後，以分光光度計測量 OD₆₀₀ 菌液吸光值，取適當量菌液至 1.5 ml eppendor，定量至 1 ml OD₆₀₀ 為 2，以 5000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，加入 200 μ l X-Gluc 染劑，震盪使沉澱再懸浮，置於 37°C 恆溫生長箱中反應，每小時拍照記錄，X-Gluc 染劑配置方法為取 5 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) 溶於 1.0 ml dimethylformamide (DMF)，加入 2.5 ml 200 mM NaPO₄ buffer (最終濃度為 50 mM)，以去離子水定量至 10 ml，存放於 4°C、避光備用。

八、載體構築

(一)、構築 pMT91t- PpsbA-MyrD

將本實驗室林泳伸同學所構築之載體 pMT91t- PpsbA-MyrA，以酵素 *SalI* 和 *SwaI* 進行酵素酶切，將 *aada* 篩選基因、*Prrn* 葉綠體啟動子序列及同源重組序列 *trnI* 一同切除。另外，使用由本實驗室李家宇同學所構築之載體 pMT91t-D，同樣以酵素 *SalI* 和 *SwaI* 進行酵素酶切，將 *DAAO* 篩選基因、*Prrn* 葉綠體啟動子連同 *trnI* 同源重組序列一同切下，作為插入子，置入前述已剔除 *aada*、*Prrn* 及 *trnI* 基因之 pMT91t-Myr-A 質體，構築成以 *PsbA* 作為啟動子，*DAAO* 基因為篩選基因之質體 pMT91t- PpsbA-MyrD。

(二)、構築 pMT91t- PpsbA-MyrGD

將本實驗室林泳伸同學所構築之載體 pMT91t-MyrGA，以酵素 *SwaI* 及 *NotI* 進行酵素酶切，將 *PpsbA* 葉綠體啟動子序列、*GUS* 報導基因、*Myr* 目標基因及 *TpsbA* 葉綠體終結子序列切下作為插入子。此外，使用本實驗室李家宇同學所構築之載體 pMT91t-D，以酵素 *SwaI* 及 *NotI* 切除 *TpsbA* 葉綠體終結子序列，將前述之插入子置入此 pMT91t-84D 中，構築成以 *PsbA* 作為啟動子，*DAAO* 基因為篩選基因及帶有 *GUS* 報導基因之質體 pMT91t- PpsbA-MyrGD。

(三)、構築 pMT91t-PpsbA-EsmD

由上述所構築之質體 pMT91t-PpsbA-MyrD，以 *XmaI* 和 *NotI* 酵素切除 *Myr* 基因和 *TpsbA* 葉綠體終結子序列。另將本實驗室林泳伸同學所構築之載體 pMT91t-EsmA，以 *XmaI* 和 *NotI* 酵素切下 *Esm* 目標基因和 *TpsbA* 葉綠體終結子序列作為插入子，置入上述酵素酶切處理之質體 pMT91t-PpsbA-MyrD，構築成以 *PsbA* 作為啟動子，*DAAO* 基因為篩選基因之質體 pMT91t- PpsbA-EsmD。

(四)、構築 pMT91t-PpsbA-EsmGD

將由本實驗室李家宇所構築之載體 pMT91t-D，以酵素 *SwaI* 及 *NotI* 切除 *TpsbA* 葉綠體終結子序列。使用本實驗室林泳伸同學所構築之載體 pMT91t-PpsbA-EsmGA，以 *SwaI* 及 *NotI* 酵素切下 *PpsbA* 葉綠體啟動子序列、*GUS* 報導基因、*Esm* 目標基因和 *TpsbA* 葉綠體終結子序列作為插入子，置入上述酵素酶切處理之質體 pMT91t-D，構築成為以 *PsbA* 作

為啟動子，*DAAO* 基因為篩選基因及帶有 *GUS* 報導基因之質體 pMT91t-PpsbA-EsmGD。

(五)、構築 pMT91t-PpsbA-PpsbA-EsmMyrD

將由本實驗室李家宇同學所構築之載體 pMT91t-D，以酵素 *SwaI* 及 *NotI* 切除 *TpsbA* 葉綠體終結子序列。使用本實驗室林泳伸同學所構築之載體 pMT91t-PpsbA-EsmMyrA，以 *SwaI* 及 *NotI* 酵素切下 *PpsbA* 葉綠體啟動子序列、*Esm*、*Myr* 目標基因和 *TpsbA* 葉綠體終結子序列作為插入子，置入上述酵素酶切處理之質體 pMT91t-D，構築成為以 *PpsbA* 作為啟動子，*DAAO* 基因為篩選基因且同時帶有 *Esm* 和 *Myr* 目標基因之質體 pMT91t-PpsbA-EsmMyrD。

(六)、構築 pMT91t-PpsbA-EsmMyrGD

由上述所構築之質體 pMT91t-PpsbA-EsmMyrD，以 *SwaI* 和 *XmaI* 酵素切除 *PpsbA* 葉綠體啟動子序列。另將本實驗室林泳伸同學所構築之載體 pMT91t-PpsbA-EsmGA，以 *SwaI* 和 *XmaI* 酵素切下 *GUS* 報導基因 *PpsbA* 葉綠體啟動子序列作為插入子，置入上述酵素酶切處理之質體 pMT91t-PpsbA-EsmMyrD，構築成以 *PpsbA* 作為啟動子，*DAAO* 基因為篩選基因，帶有 *GUS* 報導基因和 *Esm* 及 *Myr* 目標基因之質體 pMT91t-PpsbA-EsmMyrGD。

結 果

一、轉殖載體構築

本試驗所使用之載體骨架為本實驗室先前所構築之帶有 *aada* 基因之青花菜葉綠體轉殖載體，分別為 pMT91t-PpsbA-MyrA、pMT91t-PpsbA-MyrAG、pMT91t-PpsbA-EsmA、pMT91t-PpsbA-EsmAG、pMT91t-PpsbA-EsmMyrA、pMT91t-PpsbA-EsmMyrAG 以及只帶有 *DAAO* 基因之載體 pMT91t-D。本研究將 *DAAO* 基因與各載體中的 *aada* 基因置換，完成帶有 *DAAO* 基因的青花菜葉綠體轉殖載體之構築，包含 pMT91t-PpsbA-MyrD、pMT91t-PpsbA-MyrDG、pMT91t-PpsbA-EsmD、pMT91t-PpsbA-EsmDG、pMT91t-PpsbA-EsmMyrD、pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG 等載體。pMT91t-PpsbA-MyrD 和 pMT91t-PpsbA-MyrDG 載體構築流程如圖 1 所示、pMT91t-PpsbA-EsmA 及 pMT91t-PpsbA-EsmAG 載體構築流程如圖 2 所示、pMT91t-PpsbA-EsmMyrA 與 pMT91t-PpsbA-EsmMyrAG 載體構築流程如圖 3 所示。

二、轉殖載體檢測

(一)、pMT91t-PpsbA-MyrD 載體檢測

轉殖載體構築完成後使用限制酵素剪切以檢測載體正確性。以 *EcoRI* 剪切 pMT91t-PpsbA-MyrA 可得到 6896 bp、928 bp 及 546 bp 大小之 DNA 片段；以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-MyrD 可得到 6130 bp、1044 bp、928 bp 及 546 bp 大小的 DNA 片段 (圖 4A)。以 PCR 檢測轉殖載體目標基因，顯示於 pMT91t-PpsbA-MyrD 殖體中檢測到 1071 bp 大小之 *DAAO* 基因，和 1331 bp 大小的 *Myr* 基因 (圖 4C)，顯示載體構築之正確性。

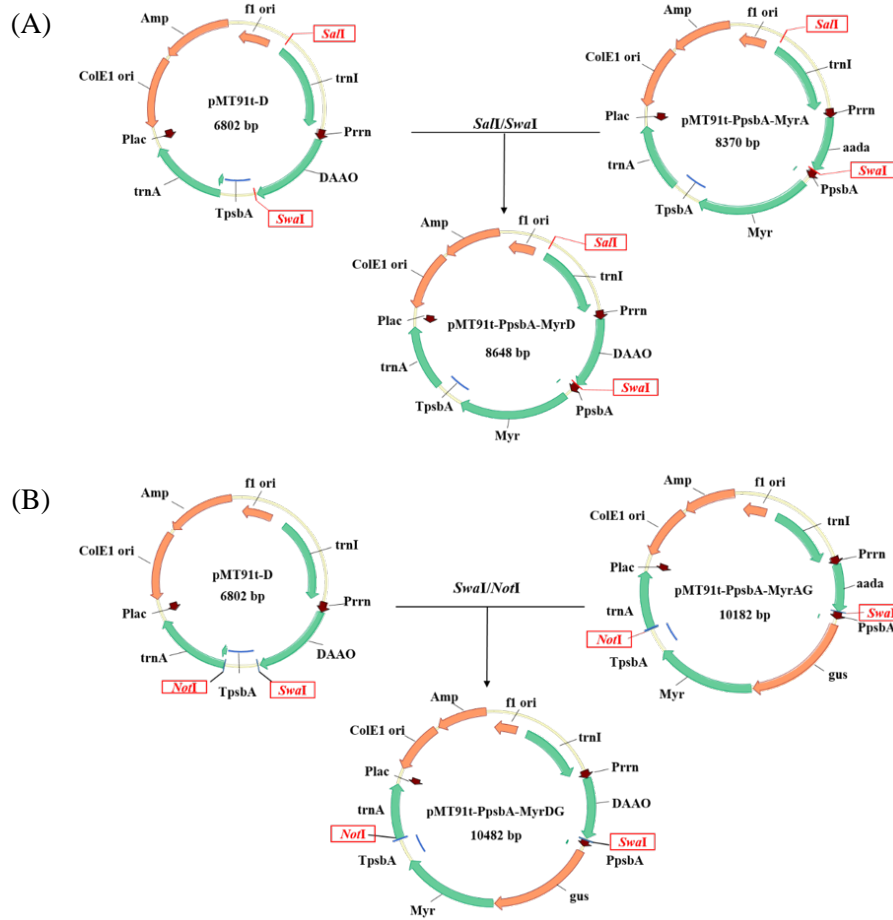


圖1. 葉綠體轉殖載體pMT91t-PpsbA-MyrD和pMT91t-PpsbA-MyrDG之構築流程。
(A) pMT91t-PpsbA-MyrD載體構築：將pMT91t-D載體上的到DAAO片段以SalI和SwaI限制酵素切下作為插入子，置換pMT91t-PpsbA-MyrA載體上的到aada片段。
(B) pMT91t-PpsbA-MyrDG載體構築：將pMT91t-PpsbA-MyrAG載體上的PpsbA到TpsbA片段以SwaI和NotI限制酵素切下作為插入子，置換pMT91t-D載體之TpsbA片段。

Fig. 1. Construction scheme of pMT91t-PpsbA-MyrD and pMT91t-PpsbA-MyrDG.

(A) Construction of pMT91t-PpsbA-MyrD: the fragment from DAAO to trnI of pMT91t-D was digested with SalI and SwaI, and then replaced with the fragment from trnI to aada of pMT91t-PpsbA-MyrA. (B) Construction of pMT91t-PpsbA-MyrDG: the fragment from PpsbA to TpsbA of pMT91t-PpsbA-MyrAG was digested with SwaI and NotI and then replaced the fragment TpsbA of pMT91t-D.

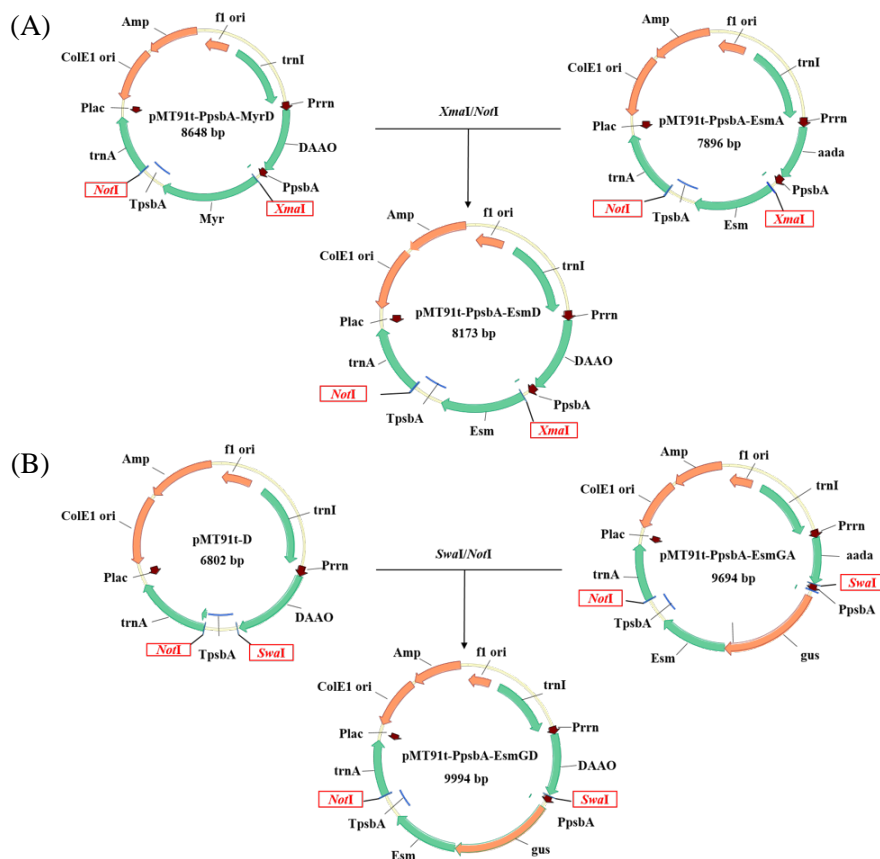


圖2. 葉綠體轉殖載體pMT91t-PpsbA-EsmD及pMT91t-PpsbA-EsmGD之構築流程。

(A) pMT91t-PpsbA-EsmD載體構築：將pMT91t-PpsbA-EsmA載體上的Esm到TpsbA之片段以XmaI和NotI限制酵素切下作為插入子，置換pMT91t-PpsbA-MyrD載體之Myr到TpsbA片段。(B) pMT91t-PpsbA-EsmDG載體構築：將pMT91t-PpsbA-EsmGA載體上的PpsbA到TpsbA之片段以SwaI和NotI限制酵素切下作為插入子，置換pMT91t-D載體之TpsbA片段。

Fig. 2. Construction scheme of pMT91t-PpsbA-EsmD and pMT91t-PpsbA-EsmGD.

(A) Construction of pMT91t-PpsbA-EsmD: the fragment from Esm to TpsbA of pMT91t-PpsbA-EsmA was digested with XmaI and NotI and replaced with the fragment from Myr to TpsbA of pMT91t-PpsbA-MyrD. (B) Construction pMT91t-PpsbA-EsmDG: The fragment from PpsbA to TpsbA of pMT91t-PpsbA-EsmAG was digested with SwaI and NotI and replaced with the fragment, TpsbA of pMT91t-D.

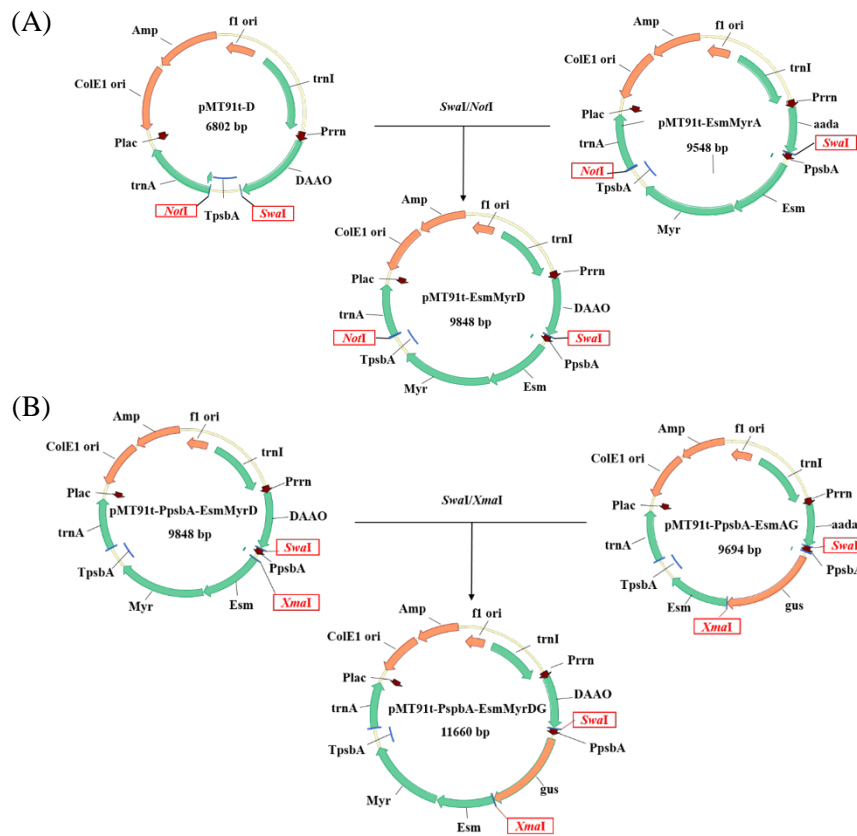


圖3. 葉綠體轉殖載體pMT91t-PpsbA-EsmMyrD和pMT91t-PpsbA-EsmMyrGD之構築流程。
 (A) pMT91t-PpsbA-EsmMyrD載體構築：將pMT91t-PpsbA-EsmMyrA載體上的*PpsbA*到*TpsbA*之片段以*SwaI*和*NotI*限制酵素切下作為插入子，置換pMT91t-D載體之*TpsbA*片段。
 (B) pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG載體構築：將pMT91t-PpsbA-EsmAG載體上的*PpsbA*至*GUS*之片段以*SwaI*和*XmaI*限制酵素切下作為插入子，置換pMT91t-PpsbA-EsmD載體之*PpsbA*片段。

Fig. 3. Construction scheme of pMT91t-PpsbA-EsmMyrD and pMT91t-PpsbA-EsmMyrGD.
 (A) Construction of pMT91t-PpsbA-EsmMyrD: the fragment from *PpsbA* to *TpsbA* of pMT91t-PpsbA-EsmMyrA was digested with *SwaI* and *NotI*, and then replaced with the fragment *TpsbA*. (B) Construction of pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG: the fragment from *PpsbA* to *GUS* of pMT91t-PpsbA-EsmAG was digested with *SwaI* and *XmaI* and replaced with the fragment *PpsbA*, of pMT91t-PpsbA-EsmD.

(二)、pMT91t-PpsbA-MyrDG載體檢測

檢測pMT91t-PpsbA-MyrDG載體之正確性，同樣使用*EcoRI*剪切pMT91t-PpsbA-MyrAG載體後，可得到6896 bp、2740 bp及546 bp大小之DNA片段；另一方面，以*EcoRI*剪切pMT91t-PpsbA-MyrDG可得到6132 bp、2704 bp、1064 bp及546 bp大小的DNA片段（圖4B）。以PCR檢測轉殖載體pMT91t-PpsbA-MyrDG，顯示可以檢測到目標基因，包含1071 bp大小之*DAAO*基因、1331 bp大小之*Myr*基因及1812 bp大小之*GUS*基因（圖4D），顯示載體構築之正確性。

(三)、pMT91t-PpsbA-EsmD載體檢測

圖5A為使用*EcoRI*剪切pMT91t-PpsbA-EsmA及pMT91t-PpsbA-EsmD，分別於前者可得到7606 bp及290 bp大小之DNA片段，後者則可得到6804、1044 bp及289 bp大小的DNA片段。PCR檢測pMT91t-PpsbA-EsmD載體之結果，顯示可檢測到包含1071 bp大小之*DAAO*基因以及1178 bp大小之*Esm*基因等目標基因（圖5C）。

(四)、pMT91t-PpsbA-EsmDG載體檢測

檢測pMT91t-PpsbA-EsmDG載體之正確性，以*EcoRI*剪切pMT91t-PpsbA-EsmAG可得到7606 bp及2088 bp大小之DNA片段；以*EcoRI*處理pMT91t-PpsbA-EsmDG可得到6840 bp、1044 bp及289 bp大小的DNA片段，顯示*aada*基因已被置換為*DAAO*基因（圖5B）。以PCR檢測 pMT91t-PpsbA-EsmDG載體，可增幅出1071 bp片段大小之*DAAO*基因、1812 bp 片段大小之*GUS*基因及1178 bp 片段大小之*Esm*基因（圖5D）。

(五)、pMT91t-PpsbA-EsmMyrD載體檢測

以*EcoRI*處理來檢測pMT91t-PpsbA-EsmMyrD載體正確性，pMT91t-PpsbA-EsmMyrA經*EcoRI*剪切後的可得到6896 bp、1816 bp、546 bp及290 bp大小之DNA片段；pMT91t-PpsbA-EsmMyrD以*EcoRI*處理可得到6132 bp、1816 bp、1064 bp、546 bp及290 bp大小的DNA片段（圖6A）。PCR檢測pMT91t-PpsbA-EsmMyrD載體顯示可偵測到 1071 bp片段大小之*DAAO*基因、1178 bp DNA片段大小之*Esm*基因及1331 bp大小之*Myr*基因（圖6C），顯示載體構築之正確性。

(六)、pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG載體檢測

以*EcoRI*剪切pMT91t-PpsbA-EsmMyrAG載體可得到6896、2088 bp、1816 bp及546 bp大小之DNA片段，另外以*EcoRI*剪切pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG則可得到6132 bp、2102 bp、1816 bp、1064 bp及546 bp大小的DNA片段（圖6B）。使用PCR檢測pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG載體顯示可偵測到 1071 bp片段大小之*DAAO*基因、1812 bp 片段大小之*GUS*基因、1178 bp DNA片段大小之*Esm*基因及1331 bp大小之*Myr*基因（圖6D），顯示載體構築之正確性。

(七)、GUS活性染色檢測

前人研究指出，葉綠體轉殖載體使用的啟動子亦可適用於原核生物中表達下游基因（Brixey *et al.*, 1997）。GUS活性染色用於檢測載體中*GUS*基因是否表達並轉譯為GUS蛋白，本試驗以帶有不同轉殖載體的*E.coli*以固態培養基培養，並進行GUS活性檢測。圖7顯示帶

有 *GUS* 基因之轉殖載體，包括 pMT91t-PpsbA-MyrDG、pMT91t-PpsbA-EsmDG 和 pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG 於 LB agar plate 培養 *E. coli*，處理 X-gluc 染劑 24 小時，觀察到出現 *GUS* 活性反應，而其他無 *GUS* 基因之菌株則呈現陰性反應。

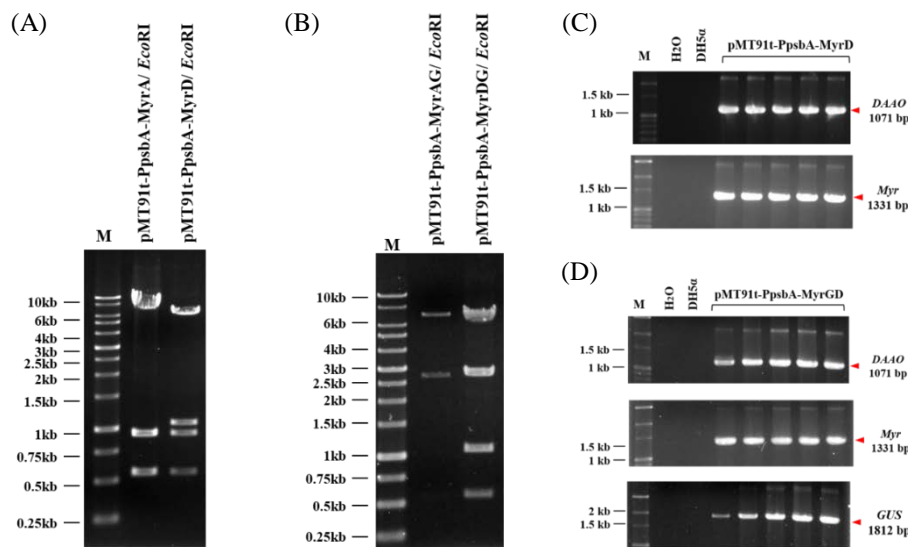


圖 4. pMT91t-PpsbA-MyrD 及 pMT91t-PpsbA-MyrDG 載體檢測。

(A) 以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-MyrA 可得到 6896 bp、928 bp 及 546 bp 大小之 DNA 片段；以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-MyrD 可得到 6130 bp、1044 bp、928 bp 及 546 bp 大小的 DNA 片段。(B) 以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-MyrAG 可得到 6896 bp、2740 bp 及 546 bp 大小之 DNA 片段；以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-MyrDG 可得到 6132 bp、2704 bp、1064 bp 及 546 bp 大小的 DNA 片段。(C) 以 PCR 檢測 pMT91t-PpsbA-MyrD 載體之 *DAAO* 和 *Myr* 基因。(D) 以 PCR 檢測 pMT91t-PpsbA-MyrDG 載體之 *DAAO*、*Myr* 和 *GUS* 基因。M：DNA marker；H₂O 和 DH5 α 勝任細胞作為負對照組。

Fig. 4. Identification of pMT91t-PpsbA-MyrD and pMT91t-PpsbA-MyrDG vectors.

(A) pMT91t-PpsbA-MyrA was digested with *EcoRI* to produce 6896 bp, 928 bp and 546 bp DNA fragments; pMT91t-PpsbA-MyrD was digested with *EcoRI* to produce 6130 bp, 1044 bp, 928 bp, and 546 bp DNA fragments. (B) pMT91t-PpsbA-MyrAG was digested with *EcoRI* to produce 6896 bp, 2740 bp, and 546 bp DNA fragments; pMT91t-PpsbA-MyrDG was digested with *EcoRI* to produce 6132 bp fragments, 2704 bp, 1064 bp, and 546 bp DNA fragments. (C) *DAAO* gene and *Myr* gene of pMT91t-PpsbA-MyrD were amplified by PCR. (D) *DAAO* gene, *Myr* gene and *GUS* gene of pMT91t-PpsbA-MyrDG were amplified by PCR. M: Marker; H₂O and DH5 α were used as negative control.

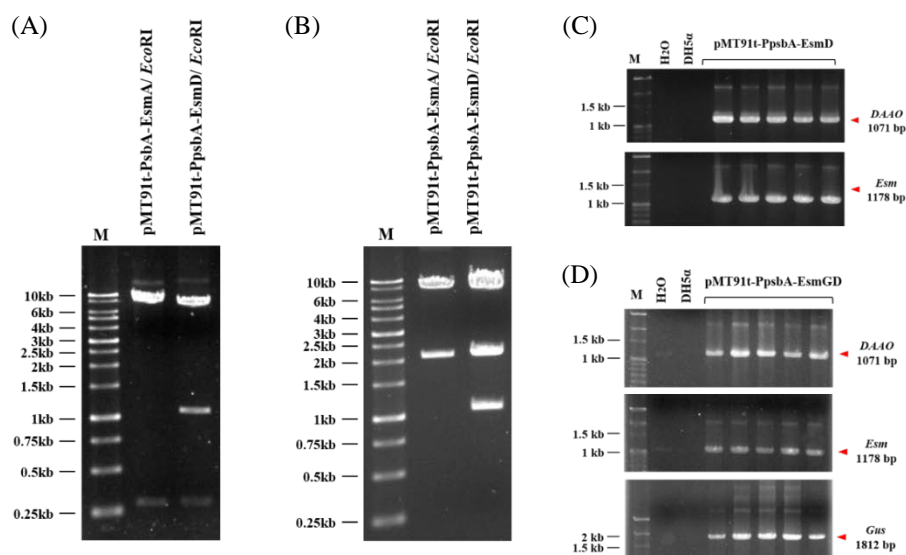


圖5. pMT91t-PpsbA-EsmD及pMT91t-PpsbA-EsmDG載體檢測。

(A)以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-EsmA 可得到 7606 bp 及 290 bp 大小之 DNA 片段；以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-EsmD 可得到 6840 bp、1044 bp 及 289 bp 大小的 DNA 片段。(B)以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-EsmAG 可得到 7606 bp 及 2088 bp 大小的 DNA 片段；以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-EsmDG 可得到 6842 bp、2088 bp 及 1064 bp 大小的 DNA 片段。(C)以 PCR 檢測 pMT91t-PpsbA-EsmD 載體之 *DAAO* 和 *Esm* 基因。(D)以 PCR 檢測 pMT91t-PpsbA-EsmDG 載體之 *DAAO*、*Esm* 和 *GUS* 基因。M：DNA marker；H₂O 和 DH5 α 勝任細胞作為負對照組。

Fig. 5. Identification of pMT91t-PpsbA-EsmD and pMT91t-PpsbA-EsmDG vectors.

(A) pMT91t-PpsbA-EsmA was digested with *EcoRI* to produce 7606 bp and 290 bp DNA fragments; pMT91t-PpsbA-EsmD was digested with *EcoRI* to produce 6840 bp, 1044 bp, and 289 bp DNA fragments. (B) pMT91t-PpsbA-EsmAG and was digested with *EcoRI* to produce 7606 bp and 2088 bp; pMT91t-PpsbA-EsmDG was digested with *EcoRI* to produce 6842 bp, 2088 bp, and 1064 bp DNA fragments. (C) *DAAO* gene and *Esm* gene of pMT91t-PpsbA-EsmD were amplified by PCR. (D) *DAAO* gene, *Esm* gene and *GUS* gene of pMT91t-PpsbA-EsmDG were amplified by PCR. M: Marker; H₂O and DH5 α were used as negative control.

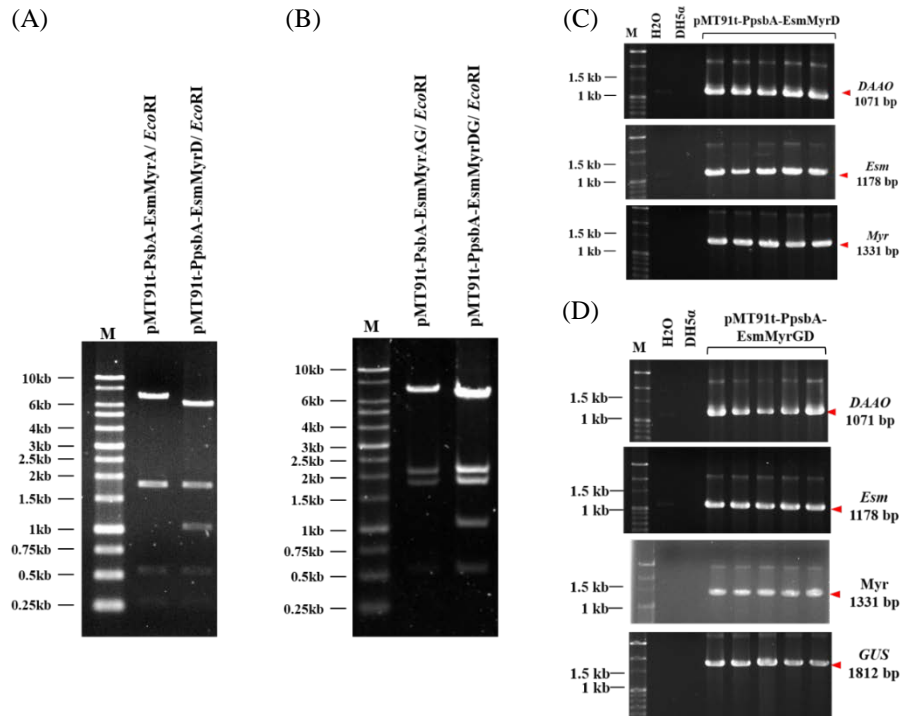


圖 6. pMT91t-PpsbA-EsmMyrD及pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG載體檢測。

(A)以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-EsmMyrA 可得到 6896 bp、1816 bp、546 bp 及 290 bp 大小之 DNA 片段；以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-EsmMyrD 可得到 6132 bp、1816 bp、1064 bp、546 bp 及 290 bp 大小的 DNA 片段。(B)以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-EsmMyrAG 可得到 6896、2088 bp、1816 bp 及 546 bp 大小的 DNA 片段；以 *EcoRI* 處理 pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG 可得到 6132 bp、2102 bp、1816 bp、1064 bp 及 546 bp 大小的 DNA 片段。(C)以 PCR 檢測 pMT91t-PpsbA-EsmMyrD 載體之 *DAAO*、*Esm* 和 *Myr* 基因。(D)以 PCR 檢測 pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG 載體之 *DAAO*、*Esm*、*Myr* 和 *GUS* 基因。M：DNA marker；H₂O 和 DH5 α 勝任細胞作為負對照組。

Fig. 6. Identification of pMT91t-PpsbA-EsmMyrD and pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG vectors.

(A) pMT91t-PpsbA-EsmMyrA was digested with *EcoRI* to produce produce 6896 bp, 1816 bp, 546 bp, and 290 bp DNA fragments; pMT91t-PpsbA-EsmMyrD was digested with *EcoRI* to produce and 6132 bp, 1816 bp, 1064 bp, 546bp, and 290 bp DNA fragments. (B) pMT91t-PpsbA-EsmMyrAG and was digested with *EcoRI* to produce 6896 bp, 2088 bp, 1816 bp, and 546 bp; pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG was digested with *EcoRI* to produce 6132 bp, 2102 bp, 1816 bp, 1064 bp, and 546 bp DNA fragments. (C) *DAAO* gene *Esm* gene and *Myr* gene of pMT91t-PpsbA-EsmMyrD were amplified by PCR. (D) *DAAO* gene, *Esm* gene, *Myr* gebne and *GUS* gene of pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG were amplified by PCR. M: Marker; H₂O and DH5 α were used as negative control.

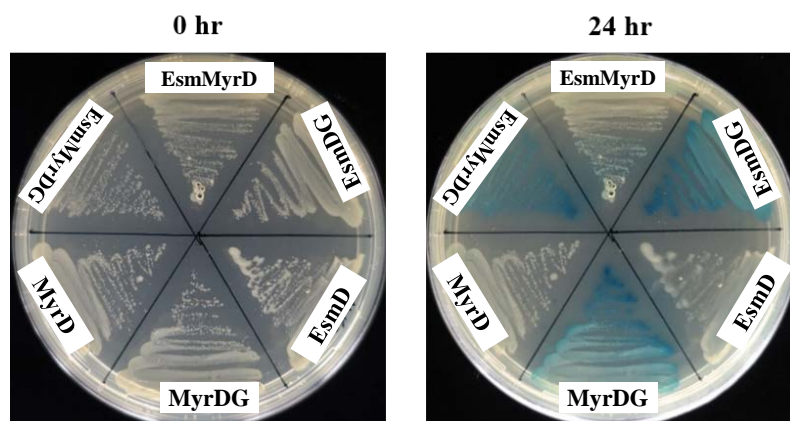


圖 7. 轉殖載體 GUS 組織活性染色。搭載不同轉殖載體之大腸桿菌塗盤後再以 GUS 染劑處理，比較染色前與染色後 24 小時菌盤顏色。

Fig. 7. GUS histochemical staining of transformed host *E.coli*. Comparison of *E.coli* plates color before and after 24 hours of GUS staining.

討 論

本試驗使用本實驗室已構築之轉殖載體，將 *DAAO* 基因與 *aada* 篩選基因置換，產生以 *DAAO* 非抗生素篩選基因的青花菜葉綠體轉殖載體。*DAAO* 基因編碼 D-amino acid oxidase，能夠將對植物具有毒害作用的 D 型胺基酸，轉變為無毒之 L 型胺基酸 (Erikson *et al.*, 2004)。*DAAO* 作為篩選基因有許多優點，D 型胺基酸較殺草劑或抗生素具有較低的生產成本；此外由於 D 型胺基酸對動物及微生物較無毒性，以 D 型胺基酸取代抗生素進行篩選，可減少抗生素或殺草劑外流所造成環境傷害之風險。D 型胺基酸篩選載體已有應用於模式植物轉殖的成功案例，如阿拉伯芥、菸草等 (Erikson *et al.*, 2004; Gisby *et al.*, 2012)(Erikson *et al.*, 2004; Gisby *et al.*, 2012)，而近年也有十字花科的葉綠體基因轉殖技術使用 D 型胺基酸篩選系統進行篩選 (Cheng *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007)。本研究構築的 *DAAO* 篩選基因載體共六個，以 GUS 活性染色顯示在 *PpsbA* 啟動子調控下可製造出 GUS 蛋白 (圖 7)，基於 GUS 活性染色可作為一種轉殖株的鑑定方式，故選擇帶有 GUS 基因的三個載體，分別為 pMT91t-PpsbA-MyrDG、pMT91t-PpsbA-EsmDG 和 pMT91t-PpsbA-EsmMyrDG，加上前人構築之 pMT91t-PpsbA-MyrAG 做為不同篩選基因之對照組，進行後續的轉殖試驗。

参 考 文 献

- Brixey, P., C. Guda, and H. Daniell. 1997. The chloroplast psbA promoter is more efficient in *Escherichia coli* than the T7 promoter for hyperexpression of a foreign protein. *Biotechnology letters* 19: 395-400.
- Cao, J., J. D. Tang, N. Strizhov, A. M. Shelton, and E. D. Earle. 1999. Transgenic broccoli with high levels of *Bacillus thuringiensis* Cry1C protein control diamondback moth larvae resistant to Cry1A or Cry1C. *Mol. Breed.* 5(2): 131-141.
- Cao, J., J.-Z. Zhao, J. Tang, A. Shelton, and E. Earle. 2002. Broccoli plants with pyramided cry1Ac and cry1C Bt genes control diamondback moths resistant to Cry1A and Cry1C proteins. *Theor. Appl. Genet.* 105(2): 258-264.
- Chen, L.-F. O., J.-Y. Hwang, Y.-Y. Charng, C.-W. Sun, and S.-F. Yang. 2001. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. *Mol. Breed.* 7(3): 243-257.
- Cheng, L., H.-P. Li, B. Qu, T. Huang, J.-X. Tu, T.-D. Fu, and Y.-C. Liao. 2010. Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons. *Plant Cell Rep.* 29(4): 371-381.
- Erikson, O., M. Hertzberg, and T. Näsholm. 2004. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nat. Biotechnol.* 22(4): 455-458.
- Gisby, M. F., E. A. Mudd, and A. Day. 2012. Growth of transplastomic cells expressing D-amino acid oxidase in chloroplasts is tolerant to D-alanine and inhibited by D-valine. *Plant Physiol.* 160(4): 2219-2226.
- Liu, C.-W., C.-C. Lin, J. J. Chen, and M.-J. Tseng. 2007. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep.*(10): 1733-1744.
- Wang, H.-H., W.-B. Yin, and Z.-M. Hu. 2009. Advances in chloroplast engineering. *J. Genet. Genomics* 36(7): 387-398.

Construction of Broccoli Chloroplast Transformation Vectors Using *Myr* and *Esm* Genes as Target Genes, and *DAAO* as Non-antibiotic Selection Marker Gene

Po-Heng Chen¹⁾ I-Chun Pan²⁾ Meng-Jiau Tseng³⁾

Key words: Broccoli, Chloroplast transformation, *DAAO* selectable gene, D-alanine

Summary

Myrosinase-glucosinolate system is the defense mechanism specific in Brassicales plants. The downstream products from glucosinolate hydrolyzing by myrosinase (*Myr*) can against insects and diseases. One of the products is isothiocyanate even has the pharmaceutical function for human. In order to enhance the content of isothiocyanates in broccoli and ensure the safety of transgenic plants, we modified the vectors from previous studies and developed the vectors for chloroplast gene transformation of broccoli. Broccoli chloroplast transformation vectors were constructed using *Myr* and *Esm* genes as target genes, and *DAAO* as non-antibiotic selection marker gene. For the reason that D-alanine can be used to screen the transgenic plants containing *DAAO* gene, it reduces the harm for environment and people health. The PCR, enzyme digestion and GUS activity assay were used to confirm the vectors after construction. Results showed that the vectors harbored complete target genes which can be expressed as functional protein in *E.coli*. These vectors can be applied to gene transformation of broccoli in the future.

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

