

轉殖四氫嘧啶合成酶(Ectoine Synthase)基因到 水稻葉綠體之研究

陳靖佳¹⁾ 潘怡君²⁾ 馮潔雯³⁾
楊明德⁴⁾ 曾夢蛟⁵⁾

關鍵字：葉綠體基因轉殖、四氫嘧啶合成酶、水稻

摘要：四氫嘧啶(Ectoine)是許多嗜鹽菌或耐鹽菌在高鹽環境下為維持滲透壓平衡，而在細胞內產生的一種滲透調節相容性溶質。Ectoine 能夠穩定蛋白質的水合層，保護酶、DNA 等生物大分子和細胞膜結構，促使細胞抵抗低溫、乾旱、高溫、高鹽、輻射等各種環境逆境。已有報導轉殖四氫嘧啶合成酶之 *ectA*、*ectB*、*ectC* 等三個基因至菸草及番茄，可增加其耐鹽性。本研究利用基因槍轉殖法，將分離自嗜鹽菌 *Halomonas magadiensis* 之 ectoine 合成酶基因 (*ectA*、*ectB*、*ectC*) (*ectABC*) 轉殖到水稻葉綠體，以 streptomycin 或 D-alanine 持續篩選培植體，目前已獲得擬轉殖再生植株。PCR 及 RT-PCR 分析擬轉殖再生水稻因植株之結果顯示，轉殖之目標基因(*ectA*、*ectB*、*ectC*) 已存在水稻葉綠體基因組中，並表現其 mRNA。

前 言

稻米為國人主食，104 年台灣種植稻米面積為 25 萬公頃，佔耕地面積的 31.6%，是台灣栽植面積最廣的農作物 (行政院農業委員會，2015)。惟因社會型態與人民飲食習慣逐漸西化，稻米的需求量減少，栽植面積逐漸縮小，生產成本高，加入 WTO 後開放農作物(包括水稻)進口等因素，使得種植水稻之經濟效益降低，農民栽種水稻意願低落。水稻為台灣

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

最主要農作物，兼具糧食安全、農村經濟發展、社會安定、生態保育及文化傳承等多項功能，因此，台灣還是會維持適度的稻田面積，以確保國內糧食安全及維護產業的永續發展。基於以上考量，利用基因轉殖技術，不斷改進水稻的品質及產量，增加種植水稻的附加經濟價值，成為提昇台灣農業競爭力的重要課題。

Ectoine(四氫嘧啶)是許多嗜鹽菌或耐鹽菌在高鹽環境下為維持滲透壓平衡，而在細胞內產生的一種滲透調節相容性溶質(Ren and Zhou, 2003; Kuhlmann and Bremer, 2002)。Ectoine 能夠穩定蛋白質的水合層，保護酶、DNA 等生物大分子和細胞膜結構，促使細胞抵抗低溫、乾旱、高溫、高鹽、輻射等各種環境逆境(Manzanera *et al.*, 2002; Yancy *et al.*, 1982)。Ectoine 也有許多商業用途，如防止皮膚衰老、防曬、保濕等多功能之全方位生化化妝品。在醫療上是天然細胞保護劑用做酶的穩定劑、微生物的保護劑、治療癌症的化療保護劑等之應用(Antonio *et al.*, 1998)。已有轉殖 *ectA*、*ectB*、*ectC* 等三個基因至於草(Nakayama *et al.*, 2000; Moghaieb *et al.*, 2006; Rai *et al.*, 2006;)及番茄(Moghaieb *et al.*, 2011)之報導，轉殖植株的外表型正常，ectoine 的含量隨鹽處理而增加，植株明顯呈現耐鹽特性。楊明德老師之研究室已自嗜鹽菌 *Halomonas magadiensis* 分離與選殖出 *ectA*、*ectB*、*ectC* 等三個 ectoine 合成酶的基因，並構築成水稻葉綠體之基因轉殖載體。

本研究將轉殖含有 ectoine 合成酶(*ectABC*)基因之載體到水稻的葉綠體，其目的為探討利用無篩選標誌基因之葉綠體基因轉殖系統，培育出耐逆境之水稻的可行性。

材料方法

一、試驗材料

(一)、基因轉殖的植物材料

本實驗以水稻(*Oryza sativa* L. sub. Japonica) '台農 67 號' ('TN67')品種為基因轉殖的材料。將稻穀除去外殼後，以 75% 酒精滅菌 2 分鐘，以無菌水漂洗 1 次，再以 2% 次氯酸鈉滅菌 20 分鐘，以無菌水漂洗 5 次，直至確定沒有泡沫產生。無菌播種於 N6 基本培養基(2 mg/L 之 2,4D、3% 蔗糖、500 mg/L Casamino Acids、500 mg/L L-glutamine、400 mg/L MES hydrate、0.3% gelrite) (Chu *et al.*, 1975)，培養在 27°C、光周期 16 小時與暗期 8 小時的生長箱。培養 2 週後，將子葉盤與癒傷組織一起切下，進行基因槍轟擊。

(二)、轉殖載體基因

本研究所轉殖之攜帶目標基因 *EctABC* 的水稻葉綠體基因轉殖載體計有：pMT92-GEctA(圖 1A)、pMT92-GEctD(圖 1B)、pMT92-GEctR(圖 1C)、pMT92-GEctR-sA(圖 1D)。*ectA*、*ectB*、*ectC* 等三個基因為一個操縱組 (operon)(簡稱為 *ectABC*)，是由中興大學分子生物學研究所楊明德老師之研究室自嗜鹽菌 *Halomonas magadiensis* 分離與選殖出 *ectA*、*ectB*、*ectC* 等三個 ectoine 合成酶的基因。轉殖載體攜帶有：1. *aadA* 基因：由志賀氏桿菌

(*Shigella* sp.)篩選出的 aminoglycoside-3'-adenyl transferase 基因(*aadA*)、2. *AlrR* 基因；由麩胺酸生產菌(*Corynebacterium glutamicum* NCHU 87078)篩選出的丙胺酸消旋酵素基因(*AlrR*)、3. *daao* 基因；由三角酵母菌 (*T. variabilis*)篩選出的 D-amino acid oxidase 基因(*daao*)、4. *gus* 基因；由大腸桿菌 (*E. coli*)選殖出 β -glucuronidase 基因 (*gus*)。

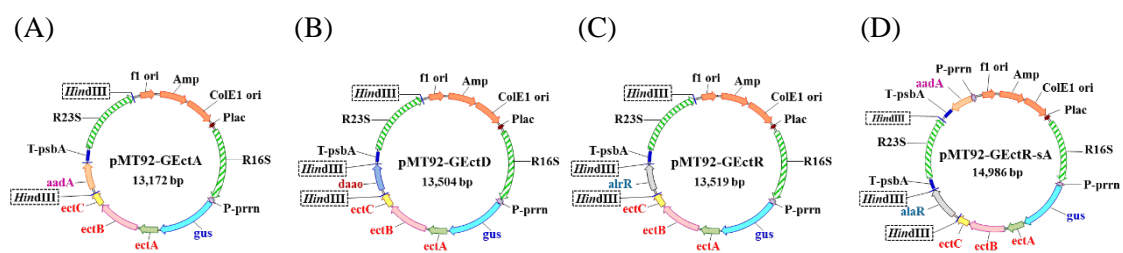


圖 1. 水稻葉綠體轉殖載體 pMT92-GEctA(A)、pMT92-GEctD(B)、pMT92-GEctR(C)、pMT92-GEctR-sA(D) 之基因圖譜。

Fig. 1. Genetic maps of rice chloroplast transformation vectors pMT92-GEctA(A), pMT92-GEctD(B), pMT92-GEctR(C), pMT92-GEctR-sA(D).

二、研究方法

(一)、基因轉移—基因槍

1. 金粉洗滌

秤取 50 mg 金粒子於微量離心管(1.5 ml)中，加入 1 ml 70%酒精，高速震盪 2 分鐘使金粉充分懸浮，再以 10,000 rpm 離心 1 分鐘後，利用 pipette 去除上清液體，隨後加入 1 ml 無菌水，高速震盪 2 分鐘後，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘後去除上清液。重複清洗三次後加入 1ml 無菌水，高速震盪 1 分鐘後，均勻分裝成每管 50 μ l，儲存於 -20 $^{\circ}$ C 備用。

2. 載體 DNA 披覆於金粒子上

取一管 50 μ l 清洗過的金粉溶液，以高速震盪 1 min 後使金粉充分懸浮，加入 10 μ l 之 plasmid DNA (1 μ g/ μ l)，低速震盪混勻，緩緩加入無菌之 50 μ l 的 2.5 M CaCl₂ 低速震盪混勻，加入 20 μ l 的無菌 0.1 M spermidine (SIGMA)，低速震盪混勻後，靜置室溫中 10 分鐘，以 10,000 g 離心 10 秒，去除上清液體，加入 150 μ l 無水酒精低速 vortex 混勻，10,000 g 離心 10 秒，除去上清液，加入 50 μ l 無水酒精混勻後放至入冰桶內備用，每管可轟擊 5 發。

3. 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。

(二)、轉殖水稻植株再生與抗生素篩選

轉殖後將水稻癒傷組織於暗室培養 1 天，隨後移至再生培養基中(4.4 g/L Murashige and Skoog medium、300 mg/L Casamino Acids、15 g/L maltose、15 g/L sorbitol、3 mg/L 6-benzylaminopurine 0.5 mg/L indole-3-acetic Acid、0.2 mg/L thidiazuron、4g/L gelrite、pH 值 5.8)，篩選藥劑為 D-alanine 及 streptomycin 添加濃度為 100 ppm，每兩週繼代一次，直到誘導出芽體後。將芽體與癒傷組織分開移入含有篩選藥劑的發根培養基(2.2 g/L Murashige and Skoog medium、0.5 g/L MES hydrate、15 g/L sucrose、0.5 mg/L 1-naphthylacetic acid、3 g/L gelrite、pH 值 5.8。篩選藥劑 D-alanine 添加濃度為 100 ppm，及 streptomycin 添加濃度為 100 ppm。誘導發根，約兩至三週誘導出根部後，出瓶定植於含有田土的容器內，先套上塑膠袋減少其水分散失，直到植物健化後移除塑膠袋，放置溫室栽培。

(三)、擬轉殖植株分析

1. 擬轉殖植物 genomic DNA 萃取

本試驗利用 GeneMark 的 Plant Genomic DNA Purification Kit 萃取 genomic DNA。聚合酶鏈式反應。以 PCR(Polymerase chain reaction) 技術增幅目標基因片段以檢測分析擬轉殖植株是否帶有目標基因。以葉片 DNA 作為模板，PCR 總反應體積為 25 μ l，包含有的 1 倍的 Dream Taq™ buffer、0.2 mM each dNTP、1 μ M 核酸引子、1.25 U DreamTaq™ DNA polymerase (Fermantas)，再以太離子水補至反應總體積為 25 μ l。置於 DNA 聚合酶鏈鎖反應器中進行 PCR 反應。

2. 偵測各基因之引子及 PCR 反應流程

偵測 *aadA* 基因引子，分別為 5'- GCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTC- 3' (AADA-1)及 5'- GCCGACTACCTTGGTGATCTCGCC-3' (AADA-2)，可增幅出 0.8 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒，55.0°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。

偵測 *daao* 基因引子，分別為 5'- ATGGCTAAAATCGTTGTTATTGGTGCC-3'(DAAO-1)及 5'-CTAAAGGTTTGGACGAGTAAGAGCTCT-3'(DAAO-2)，可增幅出 1.1 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒; 60°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。

偵測 *gus*(長)基因引子，分別為 5'- CCCTTATGTTACGTCCTATAGAAA CCC-3' (GUS-1)及 5'-TTGATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGG-3' (GUS-2)，可增幅出 1.8 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒，55°C 30 秒，72°C 90 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。

偵測 *gus*(短)基因引子，分別為 5'- CGTGGTGATGTGGAGTATTG -3' (GUS-3)及 5'-GATCCCTTTCTTGTTACCGC -3' (GUS-4)，可增幅出 0.45 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle，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。

偵測 *EctABC* 基因引子，分別為 5'- ATTCTCGGCTATTCAGCGGG -3' (EctA-1)及 5'- AAGAAGCACGCAAACCGAC -3' (EctC-2)，可增幅出 1.5 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒; 58°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。

偵測 *EctA* 基因引子，分別為 5'- CTGTTGGCAACCCAGTTTCG -3' (EctA-1)及 5'- ATTCTCGGCTATTCAGCGGG -3' (EctA-2)，可增幅出 0.4 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒; 58°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。

偵測 *EctB* 基因引子，分別為 5'- TCGTGACCAACTCCAAGTCG -3' (EctB-1)及 5'- GATACCGCGCATCAAACCAC -3' (EctB-1)，可增幅出 0.4 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒; 58°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。

偵測 *EctC* 基因引子，分別為 5'- AAGAAGCACGCAAACCGAC -3' (EctC-1)及 5'- ATCTTCACGGTGCCTTCGT -3' (EctC-1)，可增幅出 0.4 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒; 58°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。

偵測 *gus* 基因到 *aadA* 基因全長操縱子(operon)的引子(適用 GectA 系列轉殖株)，分別為 5'- CGTGGTGATGTGGAGTATTG -3' (GUS-3)及 5'- GCCGACTACCTTGGTGATCTC GCC -3' (AADA-2)，可增幅出 4.0 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒; 60°C 30 秒; 72°C 4 分鐘，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。

偵測 *gus* 基因到 *daao* 基因全長操縱子(operon)的引子(適用 GectD 系列轉殖株)，分別為 5'- CGTGGTGATGTGGAGTATTG -3' (GUS-DAAO-1)及 5'- CTAAAGGTTTGGACGA GTAAGAGCTCT -3' (GUS-DAAO-2)，可增幅出 4.3 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒; 60°C 30 秒; 72°C 240 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。

偵測 *gus* 基因到 *AlrR* 基因全長操縱子(operon)的引子(適用 GectR 與 GectR-sA 系列轉殖株)，分別為 5'- CGTGGTGATGTGGAGTATTG-3'(GUS-ALRR-1)及 5'- GACCCGAC TCTT AAACATATGCGCGGA -3' (GUS-ALRR-2)，可增幅出 4.3 kb 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘，1 個 cycle; 94°C 30 秒; 60°C 30 秒; 72°C 240 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 8 µl 終產物於 1.0% 的洋菜膠 (agarose gel) 上進行電泳分析。

3. 擬轉殖植物 total RNA 萃取

利用 Faith Technology 的 The One™ RNA Reagent 萃取，首先將剛採取 0.1 g 的植物葉片置於研鉢中、加入液態氮以研杵充分研磨將組織磨細，將樣品粉末置入 1.5 ml 離心管，加入 0.2 ml of chloroform 充分混勻 15 秒，室溫下靜置 3 分鐘，離心 12,000 g 15 分鐘

4°C，取上清液移至新的 1.5 ml 離心管加入 0.25 ml 的 isopropanol 和 0.25 ml De-PSG Solution 溫和混勻室溫下 10 分鐘，離心 12,000 g 10 分鐘 4°C 去除上清液，加入 75 % 酒精，vortex 把 pellet 懸起，離心 12,000 g 5 分鐘 4°C，去除酒精，靜置 5 到 10 分鐘使酒精揮發，回溶 RNA，儲存於 -70°C 備用。

4. 擬轉殖植物 cDNA 備製與 RT-PCR

以 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific)，以植物葉片 total RNA 為模板，使其終濃度為 0.1 ng ~5 µg 之間，加入 1 µl Oligo (dT)₁₈ primer，再以去離子水補滿至反應體積為 12 µl，移至 65 °C 處理 5 分鐘，移至冰上依序加入 1 倍的 Reaction Buffer、20 U RiboLock RNase Inhibitor、1 mM dNTP Mix、200 U RevertAid M-MuLV reverse transcriptase。置於聚合酵素連鎖反應器 (Peltier Thermal cycler, PTC-200; MJ Research, INC) 中進行反應。反應流程為，42°C 60 分鐘，緊接著 72°C 10 分鐘，反應合成 cDNA，長期儲存於 -70°C 備用。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(轉殖植株體之 PCR 分析)相同。

結 果

一、誘導水稻癒傷組織、基因槍轉殖、篩選及再生水稻植株

本研究轉殖 pMT92-GEctA、pMT92-GEctD、pMT92-GEctR、pMT92-GEctR-sA 等四個葉綠體轉殖載體到之水稻成熟種子所誘導的癒傷組織、經基因槍轉移基因、篩選及誘導再生植株之情形，如圖 2 所示。首先，將'台農 67 號'水稻的成熟種子去除稻殼，無菌播種於培養皿誘導癒傷組織(圖 2A)。培養 2 週後，將子葉盤誘導出的癒傷組織切下，移至新的播種培養基使癒傷組織增殖(圖 2B)。2 週後，將癒傷組織集中排成直徑 2 公分的同心圓，隔日以 Biolistic®-PDS-1000/He Particle Delivery System 的基因槍於 28 in Hg、1,100 psi 的條件下，將轉殖載體轟擊到水稻癒傷組織(圖 2C)。依照轉殖載體所攜帶的抗篩選藥劑基因，將轟擊過後的癒傷組織移入含有 100 ppm streptomycin 或 D-alanine 的再生培養基中(圖 2D)，再生時間 2~3 個月，未轉殖成功的植株逐漸褐化或是白化死亡(圖 2E)，成功再生的植株則呈現翠綠色(圖 2F)。再生植株生長到三公分左右時(圖 2G)，置入含有 100 ppm 的 streptomycin 或 D-alanine 發根培養基，誘導發根(圖 2H)。根系生長正常之植株移出培養瓶外定植於塑膠杯中並套袋健化(圖 2I~J)，健化完成後換入塑膠盆移至溫室種植(圖 2K)。大多數的擬轉殖植株生長正常，且能正常抽穗與結實(圖 2L)。

二、轉殖水稻植株基因表現分析

(一)、聚合酵素連鎖反應 (PCR) 分析轉殖再生植株

水稻癒傷組織由基因槍轟擊、篩選、共再生成 34 株擬轉殖水稻植株，其中 GEctA 轉殖系有 1 株、GEctD 轉殖系有 8 株、GEctR 轉殖系有 17 株、GEctR-sA 轉殖系有 8 株。選

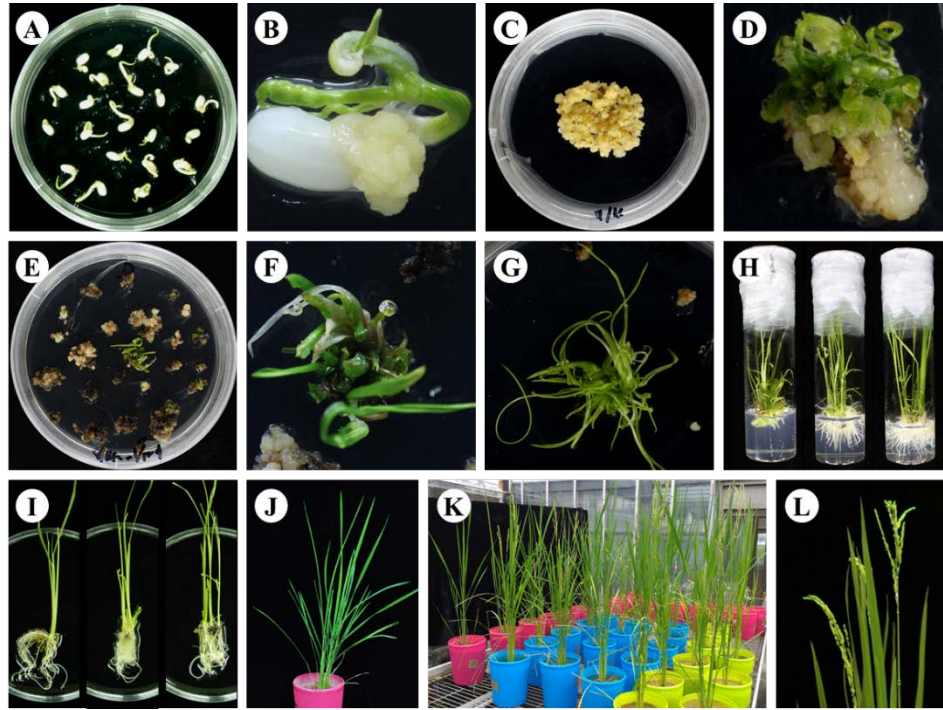


圖 2. '台農 67 號'水稻之成熟種子誘導癒傷組織、經基因槍轉移基因、篩選及誘導再生植株之情形。(A) 水稻種子無菌播種；(B) 種子發芽二週後，子葉盤誘導出癒傷組織；(C) 癒傷組織置於培養皿中心 (2 cm)，進行基因槍轟擊；(D) 轟擊後，癒傷組織長出綠芽點；(E) 培植體以含 100 ppm D-alanine 的再生培養基進行誘導及篩選，篩選後未轉殖成功的培植體白化；(F) 成活擬轉殖培植體保持綠色的放大圖；(G) 誘導培植體芽體伸長；(H) 誘導發根；(I) 再生植株出瓶；(J) 再生植株定植後生長情形；(K) 再生水稻植株在溫室生長的情形；(L) 再生水稻結穗。

Fig. 2. Regeneration of transplastomic rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*, 'TNG 67') from callus. (A) Rice seeds were germinated in vitro. (B) Calli were induced from scutellum. (C) Calli were placed in the circle within a 2 cm radius for biolistic bombardment. (D) Appearances of green pots were shown on the bombarded calli after 3 weeks of cultivation. (E) After selection with 50ppm D-alanine, non-transplastomic plantlets showed chlorosis and bleaching. (F) Greening appearances were shown in the putative transplastomic plantlets. (G) Shoots were further cultivated in shoot-elongating medium. (H) Induction of root formation was performed in root-inducing medium. (I) Putative transplastomic plants were transferred to pot. (J~K) Putative transplastomic rice was grown in the greenhouse. (L)

取其葉片萃取 genomic DNA 後，分別以 *aadA* 核酸引子、*daao* 核酸引子、*EctABC* 核酸引子、*EctA* 核酸引子、*EctB* 核酸引子、*EctC* 核酸引子、*AlrR* 核酸引子、*gus* 核酸引子進行 PCR 分析，偵測是否帶有目標基因 *aadA*、*daao*、*EctABC*、*EctA*、*EctB*、*EctC*、*AlrR*、*gus* 等基因。

分析結果顯示，經電泳膠片分離 *AlrR*-PCR 產物後，GectR 轉殖系共 2 株 (GectR-13、GectR-14、GectR-15、GectR-16)、GEctR-sA 轉殖系共 4 株 (GectR-sA-2、GectR-sA-4、GectR-sA-6、GectR-sA-7)轉殖植株可檢測到 *AlrR* 基因之約 1.1 kb 的預期條帶 (圖 3A)。經電泳膠片分離 *daao*-PCR 產物後，GectD 轉殖系共有 5 株 (GectD-1、GectD-2、GectD-3、GectD-5、GectD-6)轉殖植株可檢測到 *daao* 基因之約 1.1 kb 的預期條帶 (圖 3B)。經電泳膠片分離 *gus* -PCR 產物後，GectD 轉殖系共有 2 株 (GectD-2、GectD-6)、GectR 轉殖系共 2 株 (GectR-13、GectR-14)、GEctR-sA 轉殖系共 2 株 (GectR-sA-4、GectR-sA-5)轉殖植株可檢測到 *gus* 基因之約 1.8 kb 的預期條帶 (圖 3C)。經電泳膠片分離 *EctA* -PCR 產物後，GectD 轉殖系共有 1 株 (GectD-2)轉殖植株可檢測到 *EctA* 基因之約 0.4 kb 的預期條帶 (圖 3D)。經電泳膠片分離 *EctB* -PCR 產物後，GectR 轉殖系共有 1 株 (GectR-7)轉殖植株可檢測到 *EctB* 基因之約 0.4 kb 的預期條帶 (圖 3E)。經電泳膠片分離 *EctC* -PCR 產物後，GectD 轉殖系共有 4 株 (GectD-4、GectD-6、GectD-7、GectD-8)、GectR 轉殖系共 11 株 (GectR-4、GectR-5、GectR-6、GectR-7、GectR-11、GectR-12、GectR-13、GectR-14、GectR-15、GectR-16、GectR-17)、GEctR-sA 轉殖系共 3 株 (GectR-sA-2、GectR-sA-3、GectR-sA-8)轉殖植株可檢測到 *EctC* 基因之約 0.4 kb 的預期條帶 (圖 3F)。經電泳膠片分離 *gus* -*AlrR*-PCR 產物後，GEctR 轉殖系共有 2 株 (GectR-7、GectR-12)、GEctR-sA 轉殖系共 1 株 (GectR-sA-5)轉殖植株可檢測到 *gus* -*AlrR* 基因之約 4.3kb 的預期條帶 (圖 3G)。

(二)、反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)分析轉殖再生植株

為進一步確認轉殖基因是否有成功轉錄為 RNA，將擬轉殖株萃取 total RNA 之後反轉錄合成 cDNA，再進行 PCR 增幅，檢測轉殖植物表現轉殖目標基因之 *aadA*、*daao*、*ectABC*、*ectA*、*ectB*、*ectC*、*AlrR*、*gus* 的 mRNA 情形。

以核酸引子 *AlrR* 進行 RT-PCR 偵測 *AlrR* CmRNA，經電泳膠片分離 *AlrR* -RT-PCR 產物後，GectR 轉殖系共有 3 株 (GectR-5、GectR-7、GectR-14)、GectR-sA 轉殖系共有 2 株 (GectR-sA-4、GectR-sA-5)轉殖植株可檢測到 *AlrR* mRNA (圖 4A)。以核酸引子 *EctA* 進行 RT-PCR 偵測 *EctA* mRNA，經電泳膠片分離 *EctA* -RT-PCR 產物後，GectR 轉殖系共有 1 株 (GectR-11)轉殖植株可檢測到 *EctA* mRNA (圖 4B)。以核酸引子 *EctB* 進行 RT-PCR 偵測 *EctB* mRNA，經電泳膠片分離 *EctB* -RT-PCR 產物後，GectR 轉殖系共有 1 株 (GectR-7)轉殖植株可檢測到 *EctB* mRNA (圖 4C)。以核酸引子 *EctC* 進行 RT-PCR 偵測 *EctC* CmRNA，經電泳膠片分離 *EctC* -RT-PCR 產物後，GectD 轉殖系共有 1 株 (GectD-2)、GectR 轉殖系共有 2 株 (GectR-13、GectR-14)、GectR-sA 轉殖系共有 1 株 (GectR-sA-5)轉殖植株可檢

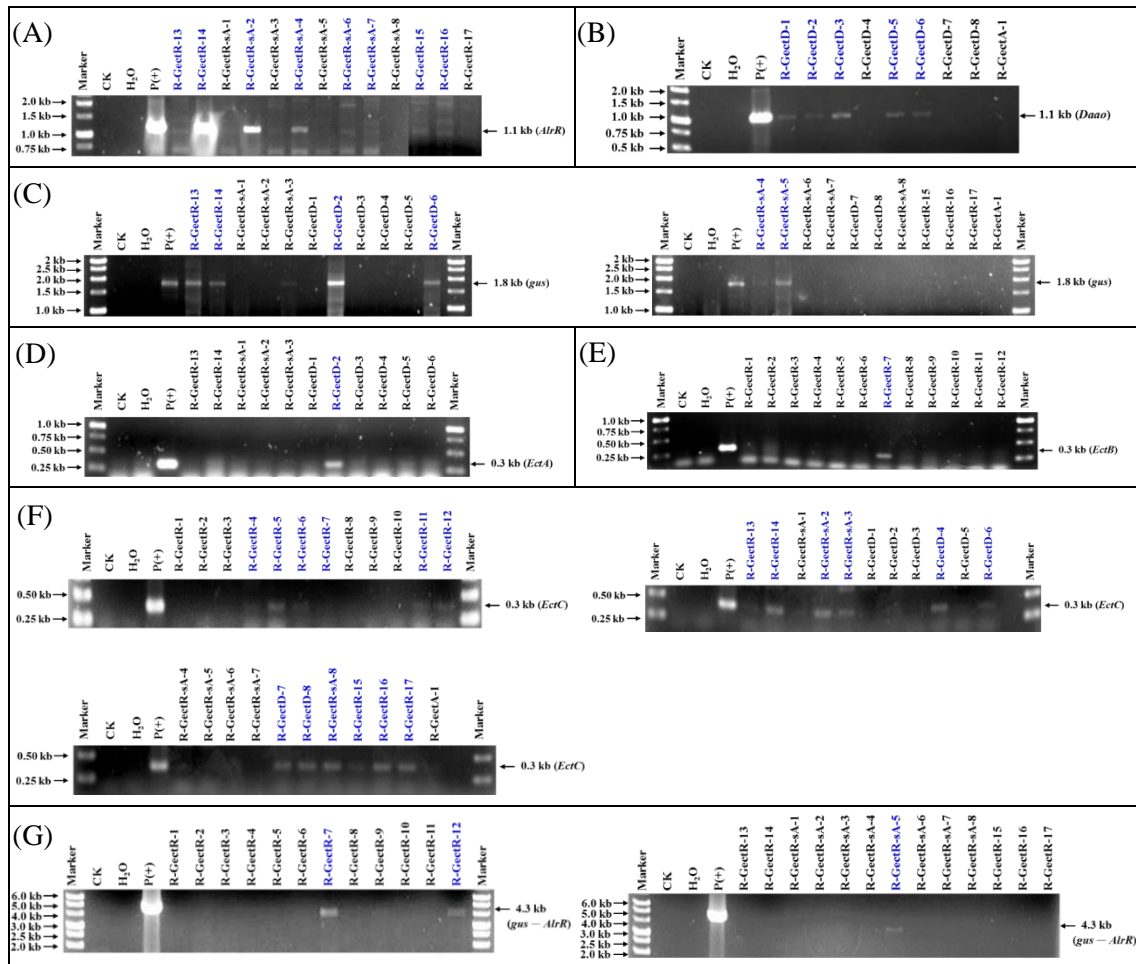


圖 3. 以擬轉殖水稻的葉片 DNA 為模板，分別使用 *AlrR*-1/*AlrR*-2 (A)、*Daao*-1/*Daao*-2 (B)、*GUS*-1/*GUS*-2 (C)、*EctA*-1/*EctA*-2 (D)、*EctB*-1/*EctB*-2 (E)、*EctC*-1/*EctC*-2 (F)、*GUS*-3/*AlrR*-2 (G) 等核酸引子進行聚合酵素鏈鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *AlrR* (1.1 kb) (A)、*Daao* (1.1 kb) (B)、*gus* (1.8 kb) (C)、*EctA* (0.3 kb) (D)、*EctB* (0.3 kb) (E)、*EctC* (0.3 kb) (F)、*gus - AlrR* (4.3 kb) (F) 等基因的情形。CK：未轉殖水稻。P(+): pMT92-GectR。

Fig. 3. PCR analysis in putative transplastomic rice lines. The parts of *AlrR* (1.1 kb) (A), *Daao* (1.1 kb) (B), *gus* (1.8 kb) (C), *EctA* (0.3 kb) (D), *EctB* (0.3 kb) (E), *EctC* (0.3 kb) (F), and *gus - AlrR* (4.3 kb) (F) gene sequences were amplified from plant DNAs using *AlrR*-1/*AlrR*-2 (A), *Daao*-1/*Daao*-2 (B), *GUS*-1/*GUS*-2 (C), *EctA*-1/*EctA*-2 (D), *EctB*-1/*EctB*-2 (E), *EctC*-1/*EctC*-2 (F), and *GUS*-3/*AlrR*-2 (G) primers and analyzed by electrophoresis, respectively. CK: un-transformed rice. P(+): pMT92-GectR.

測到 *Ect C* mRNA (圖 4D)。以核酸引子 *gus-AlrR* 進行 RT-PCR 偵測 *gus-AlrR* mRNA，經電泳膠片分離 *gus-AlrR* -RT-PCR 產物後，GectR 轉殖系有 1 株 (GectR-7)轉殖植株可檢測到 *gus-AlrR* mRNA (圖 4E)。

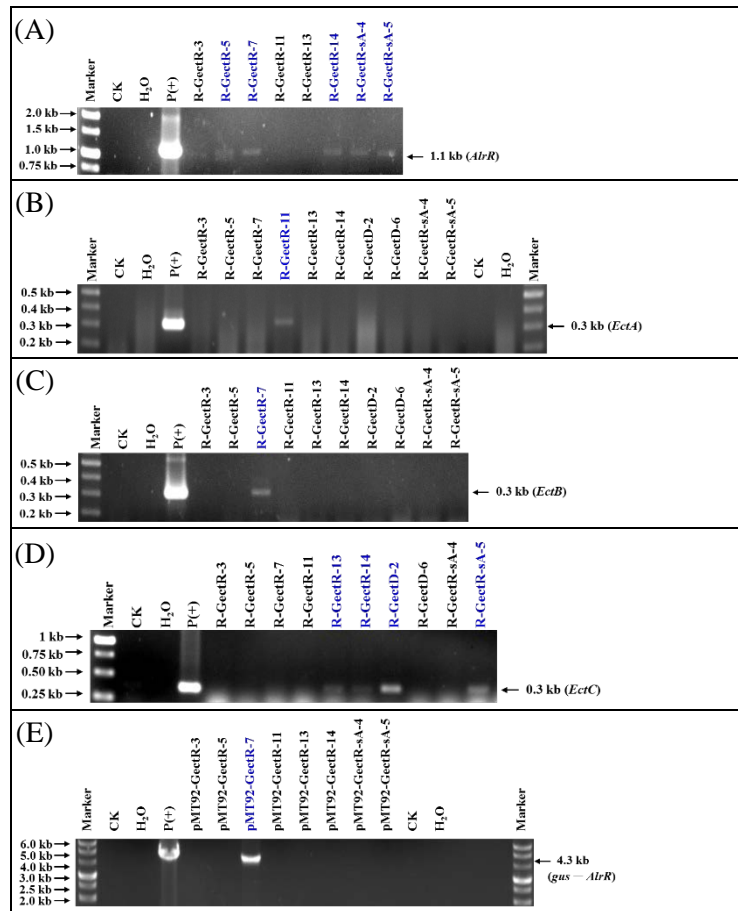


圖 4.以擬轉殖水稻的葉片 RNA 反轉錄之 cDNA 為模板，使用 *AlrR*-1/*AlrR*-2 (A)、*EctA*-1/*EctA*-2 (B)、*EctB*-1/*EctB*-2 (C)、*EctC*-1/*EctC*-2 (D)、*GUS*-3/*AlrR*-2 (E) 等核酸引子進行聚合酶鏈鎖反應之產物，以電泳膠片分析 *AlrR* (1.1 kb) (A)、*EctA* (0.3 kb) (B)、*EctB* (0.3 kb) (C)、*EctC* (0.3 kb) (D)、*gus-AlrR* (4.3 kb) (E) 等 mRNA 的情形。CK：未轉殖水稻。P(+): pMT92-GectR。

Fig. 4. RT-PCR analysis mRNA in putative transplastomic rice lines. The parts of *AlrR* (1.1 kb) (A), *EctA* (0.3 kb) (B), *EctB* (0.3 kb) (C), *EctC* (0.3 kb) (D), and *gus-AlrR* (4.3 kb) (E) cDNA sequences were amplified from plant RNAs using *AlrR*-1/*AlrR*-2 (A), *EctA*-1/*EctA*-2 (B), *EctB*-1/*EctB*-2 (C), *EctC*-1/*EctC*-2 (D), and *GUS*-3/*AlrR*-2 (E) primers and analyzed by electrophoresis. CK: un-transformed rice. P(+): pMT92-GectR.

討 論

一、轉殖 *EctABC* 基因到水稻葉綠體之研究

本研究轉殖 pMT92-GEctA、pMT92-GEctD、pMT92-GEctR、pMT92-GEctR-sA 的四個水稻葉綠體轉殖載體，是將目標基因 *ectA*、*ectB*、*ectC* (*ectABC*)、報導基因 *gus* 及/或篩選基因 *aadA/daao/AlrR* 構築成一操縱組(operon)，以 *prn* 為啟動子，減少同源重組時整併之 DNA 片段的長度，方便多個蛋白同時表現。pMT92-GEctR-sA 的篩選基因 *aadA* 是構築在同源重組序列(16S rRNA、23S rRNA)外側者，設計做為剔除篩選標誌基因 *aadA* 的轉殖載體。pMT92-GEctD 及 pMT92-GEctR 的篩選藥劑為 D-alanine，屬非抗生素篩選標誌基因 (*daao*、*AlrR*)的應用；pMT92-GEctA 的篩選藥劑為 streptomycin 或 spectinomycin，其為胺基糖苷類抗生素，做為非抗生素篩選標誌基因之對照用載體；pMT92-GEctR-sA 則可用 D-alanine 或 streptomycin 來篩選基因轉殖植株。

本研究共獲得 34 株再生擬轉殖水稻植株，其中 GEctA 轉殖系有 1 株、GEctD 轉殖系有 8 株、GEctR 轉殖系有 17 株、GEctR-sA 轉殖系有 8 株。以上顯示使用 D-alanine 篩選，有較高機會獲得較多的再生植株，但獲得逃脫篩選的再生植株也會較多。

本研究以 PCR 分析擬轉殖再生水稻植株，偵測是否帶有目標基因 *aadA*、*daao*、*EctABC*、*EctA*、*EctB*、*EctC*、*Alar*、*gus* 等基因。在 34 株擬轉殖再生甘藍植株均無法偵測到完整的 *EctABC* 基因及 *aadA* 基因，但是分別檢測 *EctA*、*EctB*、*EctC* 基因，則發現 GectR-7 擬轉殖系同時可偵測到 *EctB* 及 *EctC* 基因，另有 1 株 GectD 擬轉殖系 (GectD-1)可偵測到 *EctA* 基因。然而其他有 17 株擬轉殖系可偵測到 *EctC* 基因，包括 GectD 轉殖系共有 4 株 (GectD-4、GectD-6、GectD-7、GectD-8)、GectR 轉殖系共 10 株 (GectR-4、GectR-5、GectR-6、GectR-11、GectR-12、GectR-13、GectR-14、GectR-15、GectR-16、GectR-17)、GEctR-sA 轉殖系共 3 株 (GectR-sA-2、GectR-sA-3、GectR-sA-8)。

以 RT-PCR 分析擬轉殖再生水稻植株表現 *aadA*、*daao*、*EctABC*、*EctA*、*EctB*、*EctC*、*AlrR*、*gus* 的 mRNA 情形，均無法偵測到 *EctABC* mRNA 的存在，但可偵測到有 1 株有 *EctA* mRNA (GectR-11)，有 1 株有 *EctB* mRNA (GectR-7)，有 4 株有 *EctC* mRNA (GectD-2、GectR-13、GectR-14、GectR-sA-5)。

由於 PCR 及 RT-PCR 分析擬轉殖再生水稻植株之轉殖基因及其表現 mRNA 之結果呈現零星分散的基因資訊。因此設計完整操縱子的核酸引子，探討其全長 DNA 片段是否存在擬轉殖再生水稻植株中，及其表現 mRNA 情形。分析結果顯示在 GEctR 轉殖系共有 2 株 (GectR-7、GectR-12)，GEctR-sA 轉殖系共 1 株 (GectR-sA-5)轉殖植株可檢測到 *gus*—*AlrR* 基因之約 4.3 kb 的預期條帶 (圖 3G)。其中 GectR-7 以 RT-PCR 分析可偵測到 *gus*—*AlrR* mRNA (4.3 kb)(圖 4E)。葉綠體同質化程度低、同源重組後再被剔除、萃取 DNA 及 RNA 技術不熟稔、PCR 及 RT-PCR 實驗過程有缺失 (引子設計、PCR 反應溫度等)、逃脫篩選的植株等因素都有可能造成上述基因檢測結果不穩定的情形，有待後續分析後裔植

株，進一步探討。

PCR 及 RT-PCR 的分析結果可以發現，經過篩選藥劑處理存活下的植物未必能完整偵測到轉殖之基因及表現其目標基因，不可排除有逃脫篩選的未轉殖再生植株，亦有可能在於實驗設計的核酸引子專一性不足、在進行 PCR 過程中溫度調整不利於其反應。再者，轉殖再生植株之葉綠體同質率低，造成在葉片萃取 DNA/RNA 時未能萃取出目標 DNA/RNA 或是萃取濃度過低，因而進行 PCR 或 RT-PCR 分析時經過稀釋的 DNA/RNA 時造成目標基因的缺乏而無法被偵測到，引子設計不良導致檢測的靈敏度降低。此有待繁殖大量同質轉植葉綠體植株後裔，進而分析轉殖植株的葉綠體基因組成，調查其目標基因及其表現。

參 考 文 獻

- 行政院農業委員會。2015。農業統計年報，台北市。
- Antonio, V., J. Joaquín, and A. O. Nieto. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (2): 504-544.
- Kuhlmann, A. U. and E. Bremer. 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2): 772-783.
- Manzanera, M., A. Garcia de Castro, A. Tondervik, M. Rayner-Brandes, A. R. Strøm, and A. Tunnacliffe. 2002. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (9): 4328-4333.
- Moghaieb, R. E. A., A. Nakamura, H. Saneoka, K. Fujita. 2011. Evaluation of salt tolerance in ectoine-transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in terms of photosynthesis, osmotic adjustment and carbon partitioning. *GM Crops.* 2 (1): 58-65.
- Moghaieb, R. E. A., N. Tanaka, H. Saneoka, Y. Murooka, H. Ono, H. Morikawa, A. Nakamura, N. T. Nguyen, R. Suwa, and K. Fujita. 2006. Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning. *Plant Cell Environ.* 29 (2): 173-182.
- Nakayama, H., K. Yoshida, H. Ono, Y. Murooka, and A. Shinmyo. 2000. Ectoine, the Compatible Solute of *Halomonas elongata*, Confers Hyperosmotic Tolerance in Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 1239-1247.
- Rai, M., M. Pal, K. V. Sumesh, V. Jain, A. Sankaranarayanan. 2006. Engineering for biosynthesis of ectoine (2-methyl 4-carboxy tetrahydro pyrimidine) in tobacco chloroplasts leads to accumulation of ectoine and enhanced salinity tolerance. *Plant Sci.* 170 (2): 291-306.
- Ren, P. G. and P. J. Zhou. 2003. Research progress of moderately halophilic bacteria. *Acta*

Meteorol. Sin. 43 (3): 427–431.

Yancy, P. H., M. E. Clark, and S. C. Hand. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222.

Studies on Transformation of Ectoine Synthase Genes into Rice Chloroplast

Ching-Chia Chen¹⁾ I-Chun Pan²⁾ Kit-Man Fung³⁾
Ming-Te Yang⁴⁾ Menq-Jiau Tseng⁵⁾

Key words: Chloroplast gene transformation, Ectoine biosynthesis gene (*ectABC*), Rice.

Summary

Ectoine (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidine carboxylic acid), is a widespread cyclic amino acid synthesized by both halotolerant and halophile bacteria. Ectoine acts in microorganisms as an osmotic compatible solutes against halostress. Besides functioning as osmoprotectants, ectoine was shown to protect biomolecules such as proteins, nucleic acids, biomembranes, and whole cells against denaturation caused by heating, freezing, desiccation, or chemical agents. Overexpression of genes encoding the enzymes involved in the ectoine biosynthesis, *ectA*, *ectB*, and *ectC*, resulted in tolerance to salt stress in transgenic tobacco and tomato had been reported. In this study, we proposed to engineering the *ectA*, *ectB*, and *ectC* (*ectABC*) genes involving the ectoine biosynthesis into the chloroplast of rice. The objectives of this study was to engineer transplastomic rice with stress tolerance.

Constructed chloroplast transformation vectors harboring the *daao* or *aadA* as selectable marker genes and *ectA*, *ectB*, and *ectC* (*ectABC*) genes isolated from moderate halophile *Halomonas magadiensis* as target genes were transferred into rice chloroplast, *via* biolistic bombardment. The regenerated plants were selected by D-alanine or and spectinomycin. The results of PCR and RT-PCR analysis of putative transplastomic rice indicated that the transformed genes *ectA*, *ectB*, and *ectC* (*ectABC*) genes were present in the chloroplast genome of transplastomic rice plants, and its mRNAs were expressed.

-
- 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, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.
 - 4) Associate Professor, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.
 - 5) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.