

共同轉移 *Bt* 基因到結球白菜葉綠體之研究

林依萱¹⁾ 陳俊麟²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：共同轉移、基因槍、葉綠體基因轉殖、蘇力菌、結球白菜

摘要： 莖苔屬蔬菜在台灣有著重要的民生及經濟地位，但因夏季氣候高溫多濕，易造成病蟲害危害嚴重。因此培育抗蟲害的莖苔屬蔬菜品種，是改善台灣夏季蔬菜生產的重要研究工作。蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, bt) 殺蟲晶體蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICP) 是開發甚早且效果與安全性廣受肯定的生物性農藥之一。本研究將 pCHL-1Ab-1Ac (*cryIAb* 及 *cryIAc* 基因)、pCHL-1Ab-1C (*cryIAb* 及 *cryIC* 基因) 及 pCHL-1Ac-1C (*cryIAc* 及 *cryIC* 基因) 等質體藉由基因槍法轟擊至 '玉冠' 結球白菜葉片的葉綠體，轉殖植株均經由 PCR、南方墨點雜交、RT-PCR 及西方墨點雜交等分析進一步確認。試驗結果顯示轉殖植株表現轉殖之 *bt* 基因及蛋白，並具顯著殺小菜蛾幼蟲的效果。

前 言

土壤常見的微生物蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*，簡稱 *Bt*) 為好氣性之革蘭氏陽性 (Gram-positive) 桿菌，無病原性。是目前最常使用的生物性農藥，其體內伴隨孢子形成而產生殺蟲晶體蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICP) 能有效地造成昆蟲腸道細胞的破損，導致害蟲的死亡 (Gill *et al.*, 1992)，目前在蘇力菌體內發現的毒素蛋白基因種類繁多，且不斷地增加新種類基因 (Crickmore *et al.*, 2006)。以植物葉綠體作為基因大量表現的場所與基因隔離是一種新的考量，運用氬氣驅動金屬粒子的粒子轟擊法 (particle bombardment)，可使粒子穿透細胞壁與葉綠體多層膜，使粒子上帶有之質體 DNA 有機會進入葉綠體，由構築在質體 DNA 的葉綠體同源序列與植物葉綠體內的基因發生同源重組，

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 中州技術學院景觀設計系助理教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

組，可將轉基因插入葉綠體的基因組中。由於改良後的粒子轟擊法易於達到共同轉殖 (co-transformation) 之效果，因此為提高轉殖植株的殺蟲效果、降低抗性害蟲。

材料與方法

一、植物試驗材料

本實驗以'玉冠' (Jade Crown)結球白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)為試驗材料。將供試驗之結球白菜種子經 70%酒精震盪經 1 分鐘，再以商業用漂白劑 2.5% Clorx 加一滴 Tween-20 展著劑，劇烈震盪消毒 15 分鐘，最後以無菌水洗滌三次。將表面滅菌之種子播種於含 3%蔗糖與 0.8%洋菜膠 (agar) 1/2 MS (Murashing and Skoog, 1962) 基本培養基中，7 天後移到較大之培養瓶內繼續培養，培養條件為 25/20°C (D/N)，光強度為 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ ，16 小時光周期之環境生長，實驗時取其無菌播種 14 天之完全展開本葉為材料。

二、試驗方法

(一) 基因種類及轉殖之組合

本實驗作為結球白菜葉綠體基因轉移之基因計有：以 *prn* 為啟動子，以 *psbA* 的 3' 核酸序列為終結子的葉綠體轉殖載體 pCHL-1Ab-1Ac (含有 *cryIAb* 及 *cryIAc* 基因)、pCHL-1Ab-1C (含有 *cryIAb* 及 *cryIC* 基因)及 pCHL-1Ac-1C (含有 *cryIAc* 及 *cryIC* 基因)三組基因(由本實驗室陳鴻霖學長所構築) 進行基因槍共同轉殖的工作。

(二) 基因槍之基因轉殖法

1. 基因槍基因轉移

本實驗基因轉移的方式是以直接基因轉移的基因槍法，所選用的機型為 Bio-Rad 發展成的 PDS-1000/He. Particle Delivery System (Du-Pone, Bio-Rad)。將鋼瓶上閥門打開，調整壓力錶前黑色旋鈕至適當壓力 (至少較所需壓力高 200 psi)，將基因槍組件組合完畢後，調整植物材料與 macrocarrier 之間的距離，本試驗僅使用 6 cm 之距離，關上槍擊室 chamber。每次轟擊時取一片完全展開之本葉置於培養皿中心，半徑約兩公分的同心圓中，將植物受體材料置於槍口下方之穴隔中槍擊，槍擊時以幫浦將槍擊室內抽成部份真空 (28 ~29 in Hg)，待氮氣累積至 900~1,100 psi 時便擊發，每次槍擊時約有 0.5 mg 的金粉，並帶有 10 μg 之目標 DNA。隨後將轟擊完的培植體放入再生培養基中即可。

2. 植株再生與篩選

轟擊後之植物材料置於結球白菜 CBNZ 再生培養基中【含有 1 mg/l BA、1 mg/l Zeatine、0.5 mg/l NAA、0.5 mg/l AgNO_3 與 0.8%洋菜膠 (agar)之 1% sucrose 的 MS 基本鹽類】，於不照光之黑暗環境下培養一週，再切分成大約 3 mm×3 mm 之大小塊狀，放置結球白菜再生培養基中繼續培養，每 14 天繼代一次。待分化長出不定芽後一週，移至 N1 發根篩選培養基【含 0.1 mg/l NAA、10 mg/l spectinomycin 與 0.85%洋菜膠 (agar) 之

3% sucrose 的 1/2 MS】篩選兩個禮拜，接著以 N2 篩選培養基【含 0.1 mg/L NAA、2 mg/l spectinomycin 與 0.85% 洋菜膠 (agar) 之 3% sucrose 的 1/2 MS】篩選四個禮拜使其繼續發育成長，最後予以健化移至瓶外定植，種植於泥炭土：珍珠石：蛭石 = 1：1：1 之混合介質中。

(三)、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 偵測轉基因、探針備製、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。

(四)、聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

利用 PCR 技術複製構築基因片段或用以偵測轉殖基因是否進入轉殖結球白菜中。取轉殖及未轉殖植物的葉片 DNA 或目標基因為模板，偵測 *CryIAb* 基因引子 Bt3、Bt4 分別為 5'- CCCGGGTG GTCAGTCCCTTCCATGGATAAC - 3'、5'- CGACGGCCCCGGGAATT CGATCTCACTCAAC - 3'，可產生出 2.0 kb 片段，反應的流程為 94°C、1 分鐘，60°C、40 秒，72°C、2 分鐘，30 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle；偵測 *CryIAc* 基因引子 Bt1、Bt2 分別為 5'- AGGGCCCCGATGTTCTCCTGG - 3'、5'- GCGGCTCGAGGGTGGCGGTG AC - 3'，可產生出 0.5 kb (499 bp) 片段，反應的流程為 95°C、5 分鐘，1 個 cycle；95°C、1 分鐘，50°C、1 分鐘，72°C、1 分鐘，35 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle；偵測 *CryIC* 引子 Bt5、Bt6 分別為 5'- CATATAATCGATTACGGAGAGACTTAAC - 3'、5'- CTATATCC TTCGCGAGGTGG CACAC - 3'，可產生出 0.6 kb (598) bp 片段，反應的流程為 95°C、5 分鐘，1 個 cycle；95°C、1 分鐘，50°C、1 分鐘，72°C、1 分鐘，35 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。反應完畢後，取 5 μ l 終產物於 1% 之洋菜膠上進行電泳分析。

(五)、逆轉錄 PCR (RT-PCR)

本試驗使用 Stratagene TwoStep RT-PCR kit，First-stand cDNA 反應總體積為 20 μ l，內含有 X μ l RNA (0.01-5 μ g)，1 μ l oligo (dT) primer solution，特定 BT 引子濃度 1 μ M，0.8 μ l 100 mM dNTP mix，2 mM 10 \times AccuScript RT buffer，加入 RNase-free water 至 17 μ l，充分混合後，於 65°C 作用 5 分鐘，然後冷卻 5 分鐘後加入 2 μ l 100 mM 的 DTT 與 1 μ l reverse transcriptase，充分混合後，於 42°C 作用 1 小時，接著 70°C 作用 15 分鐘，此為 cDNA (first-stand reaction)，可貯存於 -20°C 長期保存。之後，進行 PCR amplification 工作，通常採用 ERICOMP 公司之 Single block system 型儀器進行 PCR 分析。PCR 反應液之總體積為 25 μ l，內含有 2 μ l (10%) cDNA、2.5 μ l 10 \times PCR buffer、2.5 μ l 2 mM dNTP mix、*Taq* DNA polymerase (5U)、引子濃度 1 μ M，最後加入 DNAase-free water 至 25 μ l，充分混合後進行 PCR 分析。

(六)、植物可溶性蛋白萃取

取結球白菜葉片組織之 1 g 以液態氮研磨成粉末狀，加入適量之蛋白質萃取緩衝液 (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.5)，混合均勻後，以 13,000 rpm (Sigma 2K15, rotor 12145) 離心 20 分鐘，上清液經 0.45 μ m minipore 過濾，濾液即可用於蛋白質濃度測定及蛋白質

電泳分析，儲存於-20°C 即可。

(七)、西方墨點分析 (Western blot)

取經過 SDS 膠體電泳分離後之膠片，以溼式法 (Mini Trans-Blot Electrophoretic cell, Bio-Rad) 依負極至正極轉漬原則，按序放置海綿、圖畫紙、膠體、PVDF paper、圖畫紙、海綿，以轉移緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% methanol, pH 8.3) 進行轉漬。以 400 毫安培電流於低溫轉漬 4 小時，再將 polyvinylidene fluoride (PDVF) 置於 20 ml blocking buffer (5% non-fat dried milk, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.3, 0.1% Tween-20) 於室溫 blocking 1 小時後，加入新的 15 ml blocking buffer 及適當濃度 (1/1000 或 1/10000) 的一級抗體【primary antibody, polyclonal (rabbit) anti-Bt protein antibody (IgG)】室溫迴旋搖動反應 1 小時，以 blocking buffer 清洗 15 分鐘 3 次，之後將有標定 horseradish peroxidase (HRP) 之第二個抗體 (1:10000，利用 TTBS-0.1% Tween20 當做稀釋液) 作用 1 小時，以 TTBS buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.2% Tween-20) 清洗 10 分鐘 3 次，最後抗體與抗原複合物使用增強化學冷光方法測定 (ECL detection system)，即完成西方墨點分析。

結 果

一、以基因槍法轟擊 *cryIAb*、*cryIAc* 及 *cryIC* 基因至結球白菜葉片及誘導植株再生

基因槍轉殖時，分別以金粉包裹 pCHL-1Ab-1Ac、pCHL-1Ac-1C、pCHL-1Ab-1C 三載體 DNA，轟擊以氮氣壓力 900 psi 條件下進行 14 天齡之結球白菜本葉的葉綠體基因轉殖 (圖 1A)。再將轟擊的結球白菜葉片經暗處理 3~5 天後，隨即將葉片切割成 3×3 mm² 更換至 CBNZ 再生培養基 (圖 1B)，且放置生長箱培養 (25°C，16 小時光週期)，此期間葉片會迅速膨大成原來的 2~3 倍，且葉邊緣相同也有增厚的現象 (圖 1C)。二星期更換一次再生培養基，培養大約四周後會有芽梢產生 (圖 1D)，接著換至 10 ppm spectinomycin 篩選培養基進行篩選，經兩個禮拜篩選過的植株，有經過轉殖的植株則會繼續生長存活下來 (圖 1E)，而未轉殖植株會有白化現象 (圖 1F)，迨芽體發育完全後更換至含有 10 ppm spectinomycin 之發根培養基持續篩選 3 個月 (圖 1G)，迨轉殖植株發根完全後再換至含有 2 ppm spectinomycin 的 MS 健化培養基 (圖 1H)，將健化完全並經過 2 ppm spectinomycin 篩選仍成活的植株移出盆外後套袋馴化一星期 (圖 1I)，之後移至溫室定植 (圖 1J)。

二、篩選及檢驗轉殖 *cryIAb*、*cryIAc* 及 *cryIC* 基因之結球白菜

(一)、PCR 分析轉殖植株

本試驗之所有再生之轉殖結球白菜植株，均先以 PCR 反應作為初步篩選基因轉殖植株。萃取轉殖再生結球白菜葉片的 DNA，以引子 Bt1、Bt2 偵測轉殖植株是否含有 *cryIAb*

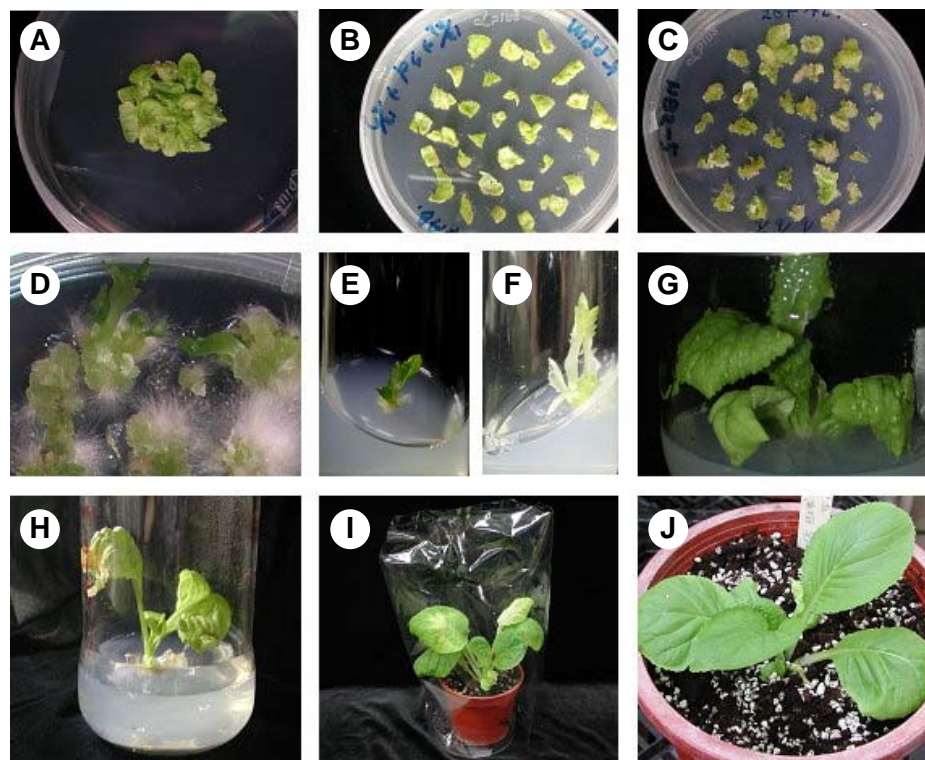


圖 1. 白菜葉綠體基因轉殖再生情形。(A) 將無菌播種 2 星期後之結球白菜葉片切下置於培養皿中心；(B) 槍擊後切成 3 mm×3 mm 面積繼代培養；(C) 繼代培養四週後開始再生癒傷組織；(D) 誘導再生之新梢；(E) 經過 10 ppm spectinomycin 篩選後植株生長情形；(F) spectinomycin 篩選後植株成白化現象；(G) 置於發根培養基中形成根系並以 10 ppm spectinomycin 作二次篩選；(H) 移入 MS 培養基中健化；(I) 套袋馴化；(J) 移入溫室定植。

Fig. 1. Regeneration of chloroplast-transformed Chinese cabbage from leaf. (A) Chloroplast transformation of Chinese cabbage was achieved by biolistic bombardment of young sterile Chinese cabbage leaves. (B) After bombardment, leaf sample were cut into small pieces ($3 \times 3 \text{ mm}^2$) and cultivated in the regeneration medium. (C) Emergence of callus occurred after four weeks of cultivation. (D) Shoots regenerated from calli after subculture. (E) Chloroplast-transformed plantlet was confirmed by resistance to 10 ppm spectinomycin. (F) Nontransformed plantlets showed chlorosis and bleaching, then died after spectinomycin treatment. (G) Roots were induced and then subjected to the spectinomycin screening. (H) Plantlets were cultivated in the MS medium for further hardiness. (I) Plants were transferred to pot and covered with plastic bag. (J) Young chloroplast-transformed Chinese cabbage was grown in the greenhouse.

基因之試驗結果顯示，有四株轉殖植株(CCBT-01、CCBT-02、CCBT-03、CCBT-05) 可偵測到所預期之 2.0 kb 染色條帶，而未轉殖植株則不具有此條帶 (圖 2A)。經 PCR 方式以引子 Bt3、Bt4 偵測轉殖植株是否含有 *cryIAb* 基因作為轉殖植株初步的篩選與分析，試驗結果顯示有二株轉殖植株 (CCBT-01、CCBT-05) 可偵測到所預期 499 bp 的 *cryIAc* 片段染色條帶，而未轉殖植株及對照組 (CK) 則無 (圖 2B)。以引子 Bt5、Bt6 偵測轉殖植株是否含有 *cryIC* 基因之試驗結果，顯示有二株轉殖植株 (CCBT-02、CCBT-03) 可偵測到所預期 598 bp 的 *cryIC* 片段染色條帶，而未轉殖植株及對照組 (CK) 則無(圖 2C)。

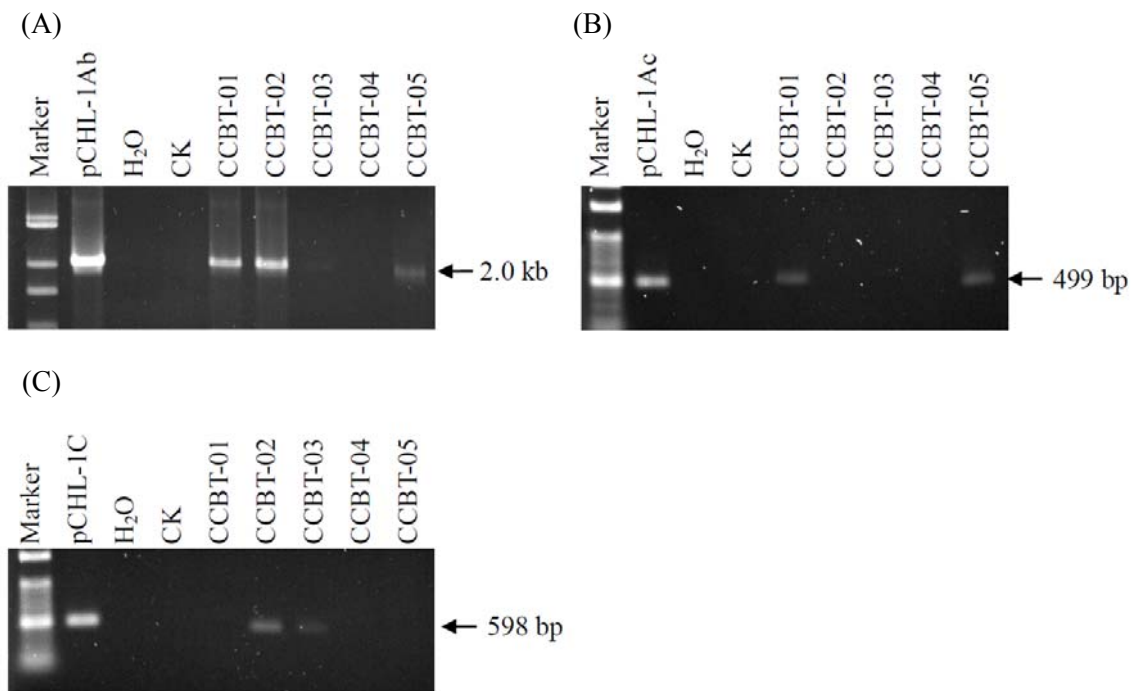


圖 2. 轉移 *bt* 基因 (pCHL-1Ab-1Ac、pCHL-1Ac-1C、pCHL-1Ab-1C) 的'玉冠'結球白菜，以引子 3、4 分析 *cryIAb* 基因(A)、以引子 1、2 分析 *cryIAc* 基因(B)、以引子 5、6 分析 *cryIC* 基因(C)，經 PCR 反應之產物在電泳膠片上分離之情形。CK：未轉殖'玉冠'結球白菜。

Fig. 2. PCR analysis of *cryIAb* (A), *cryIAc* (B), and *cryIC* (C) genes in *bt* genes transformed 'jade crown' Chinese cabbage using primer 3 and 4 (A), primer 1 and 2 (B), and primer 5 and 6 (C), respectively. The parts of *cryIAb* (2.0 kb), *cryIAc* (499 bp), and *cryI* (598 bp) gene sequence were amplified from plant DNA and analyzed by electrophoresis. CK: un-transformed Chensis cabbage.

(二)、南方墨點雜交分析轉殖植株

萃取轉殖再生結球白菜葉片的 DNA 以限制酶酵素 *Pst* I 切割後，經電泳分離，再與 *cryIAb* (2.0 kb) 基因部分片段之放射性探針雜交之結果如圖 3 所示。試驗結果顯示在 PCR 偵測有 *cryIAb* 基因的四株轉殖植株 (CCBT-01、CCBT-02、CCBT-03、CCBT-05) 均可偵測到與 *cryIAb* 探針有雜交之訊息(圖 3A)。偵測有 *cryIAc* 基因的二株轉殖植株 (CCBT-01、CCBT-05) 均可偵測到與 *cryIAc* 探針有雜交之訊息 (圖 3B)。轉殖再生結球白菜葉片的 DNA 以限制酶酵素 *Pst* I 切割後，與具放射性之 *cryIC* (598 bp) 基因部分片段為探針進行南方墨點雜交分析之結果如圖 3C 所示，試驗結果顯示在 PCR 偵測有 *cryIC* 基因的二株轉殖植株 (CCBT-02、CCBT-03) 均可偵測到與 *cryIAc* 探針有雜交之訊息 (圖 3C)。

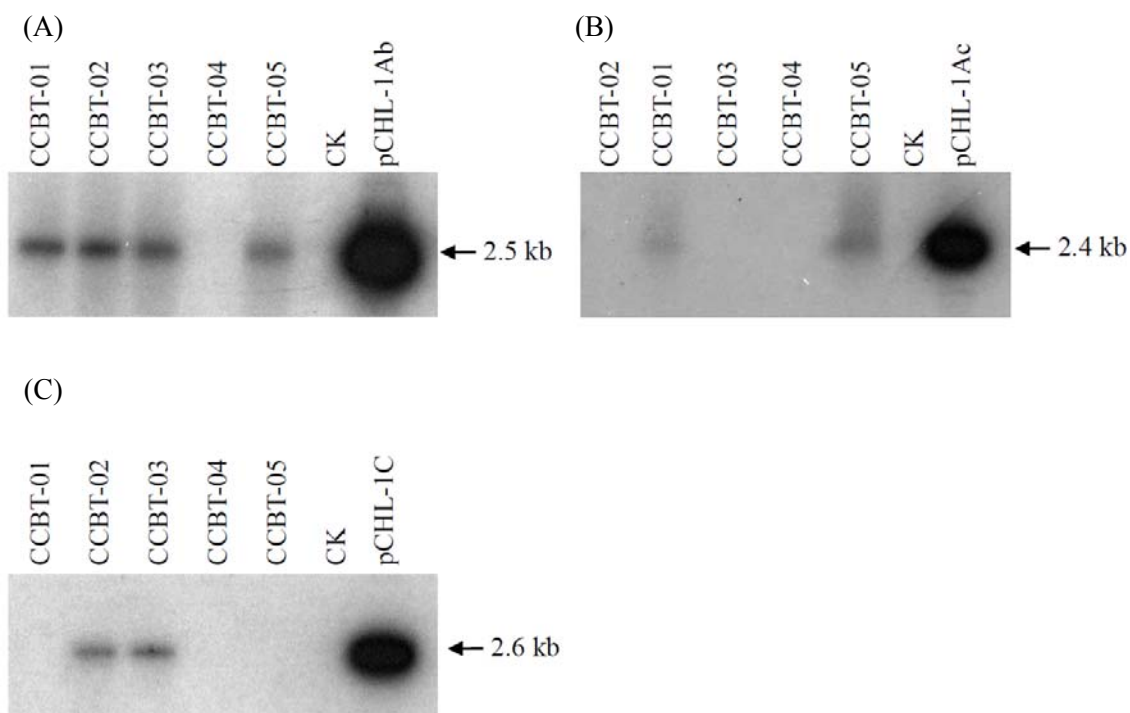


圖 3. 轉移 *bt* 基因 (pCHL-1Ab-1Ac、pCHL-1Ac-1C、pCHL-1Ab-1C) 的'玉冠'結球白菜，其 DNA 以限制酵素 *Pst* I (A、C)、*Kpn* I (B) 切割再以 *cryIAb* (A)、*cryIAc* (B)、*cryIC* (C) 基因的 PCR 產物作為探針經南方墨點雜交法分析之情形。CK：對照組。

Fig. 3. Southern hybridization of *cryIAb* (A), *cryIAc* (B), and *cryIC* (C) genes transformed 'Jade Crown' Chinese cabbage with the P^{32} -labeled *cryIAb* (A), *cryIAc* (B), and *cryIC* (C) genes as the probe. DNAs were digested with *Pst* I (A, C) or *Kpn* I (B). CK: non-transformed Chinese cabbage.

(三)、RT-PCR 分析轉殖植株

萃取轉殖再生結球白菜葉片的總 RNA，進行 RT-PCR 檢測 (逆轉錄-PCR)，以檢測轉殖植物在 RNA 層次上之表現轉殖 *bt* 基因的情形。以引子 Bt3、Bt4 偵測轉殖植株是否含有 *cryIAb* mRNA 之 RT-PCR 試驗結果顯示，也只有三株轉殖植株 (CCBT-01、CCBT-02、CCBT-03) 可偵測到所預期之 2.0 kb 染色條帶，而未轉殖植株(CK)則不具有此條帶，CCBT-05 植株則不能偵測到 *cryIAb* mRNA 的存在 (圖 4A)。引子 Bt1、Bt2 偵測轉殖植株是否含有 *cryIAc* mRNA 之 RT-PCR 試驗結果顯示只有一株轉殖植株 (CCBT-05) 可偵測到所預期 499 bp 的 *cryIAc* 片段染色條帶，而未轉殖植株及對照組 (CK) 則無 (圖 4B)，而先前在 PCR 及南方墨點呈正反應的 CCBT-01 植株則不能偵測到 *cryIAc* mRNA 的存在。以引子 Bt5、Bt6 偵測轉殖植株是否含有 *cryIC* mRNA 之 RT-PCR 試驗結果，只有一株轉殖植株 (CCBT-02) 可偵測到所預期 598 bp 的 *cryIC* 片段染色條帶，而未轉殖植株 (CK) 則不具有此條帶，CCBT-03 植株亦不能偵測到 *cryIC* mRNA 的存在 (圖 4C)。

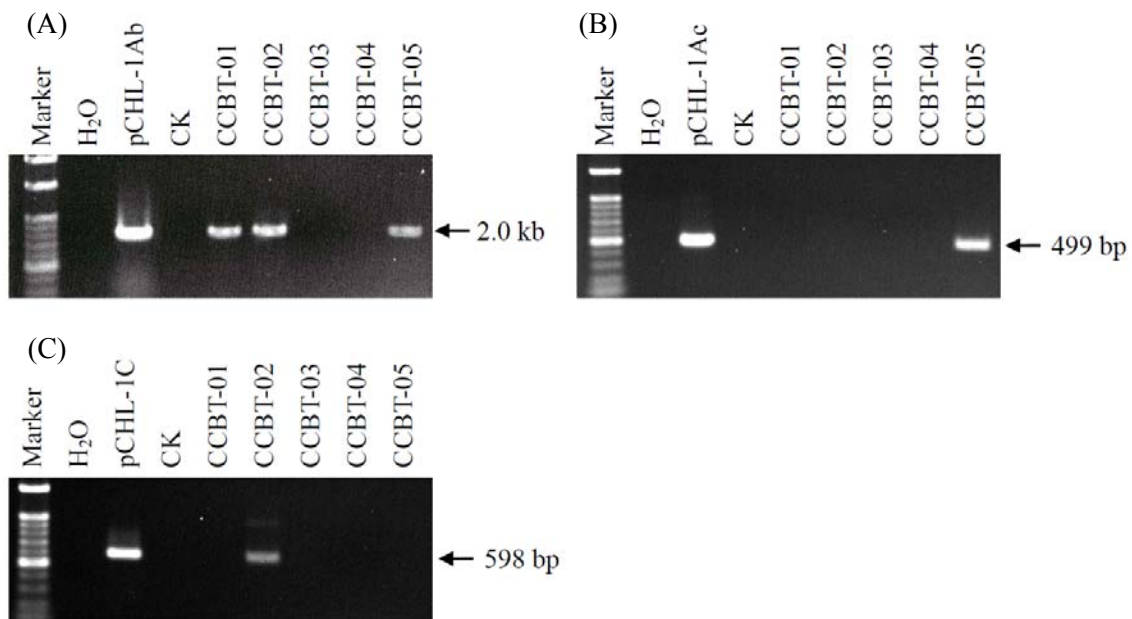


圖 4. 轉移 *bt* 基因 (pCHL-1Ab-1Ac、pCHL-1Ac-1C、pCHL-1Ab-1C) 的'玉冠'結球白菜，以引子 3、4 分析 *cryIAb* mRNA (A)、以引子 1、2 分析 *cryIAc* mRNA (B)、以引子 5、6 分析 *cryIC* mRNA (C)，經 RT-PCR 反應之產物在電泳膠片上分離之情形。CK：未轉殖'玉冠'結球白菜。

Fig. 4. RT-PCR analysis of *cryIAb* mRNA (A), *cryIAc* mRNA (B), and *cryIC* mRNA (C) genes in *bt* genes transformed 'jade crown' Chinese cabbage using primer 3 and 4 (A), primer 1 and 2 (B), and primer 5 and 6 (C), respectively. The parts of *cryIAb* (2.0 kb), *cryIAc* (499 bp), and *cryI* (598 bp) gene sequence were amplified from plant RNA and analyzed by electrophoresis. CK: un-transformed Chensis cabbage.

(四)、西方墨點分析轉殖植株

萃取轉殖再生結球白菜葉片的總蛋白質，經 SDS-PAGE 電泳分離後，並以化學冷光西方墨點雜交法分析 *bt* 蛋白表現之情形，其結果如圖 8 所示。以 cry1Ab 蛋白之抗體為探針，可偵測到三株轉殖植株有雜交訊號 (CCBT-01、CCBT-02、CCBT-05) (圖 5A)。此結果與上述 RT-PCR 分析之結果相同，亦即 CCBT-01、CCBT-02、CCBT-05 等三株轉殖植株之 RT-PCR 分析亦呈正反應。以 cry1Ac 蛋白之抗體為探針，則只偵測到一株轉殖植株 (CCBT-05) 有雜交訊號 (圖 5B)。以 cry1C 蛋白之抗體為探針，也只偵測到一株轉殖植株 (CCBT-02) 有雜交訊號 (圖 5C)。此結果也與上述 RT-PCR 分析之結果相同，在 CCBT-05 轉殖植株及 CCBT-02 轉殖植株也分別可偵測到 *cry1Ac* mRNA 及 *cry1C* mRNA 之存在。

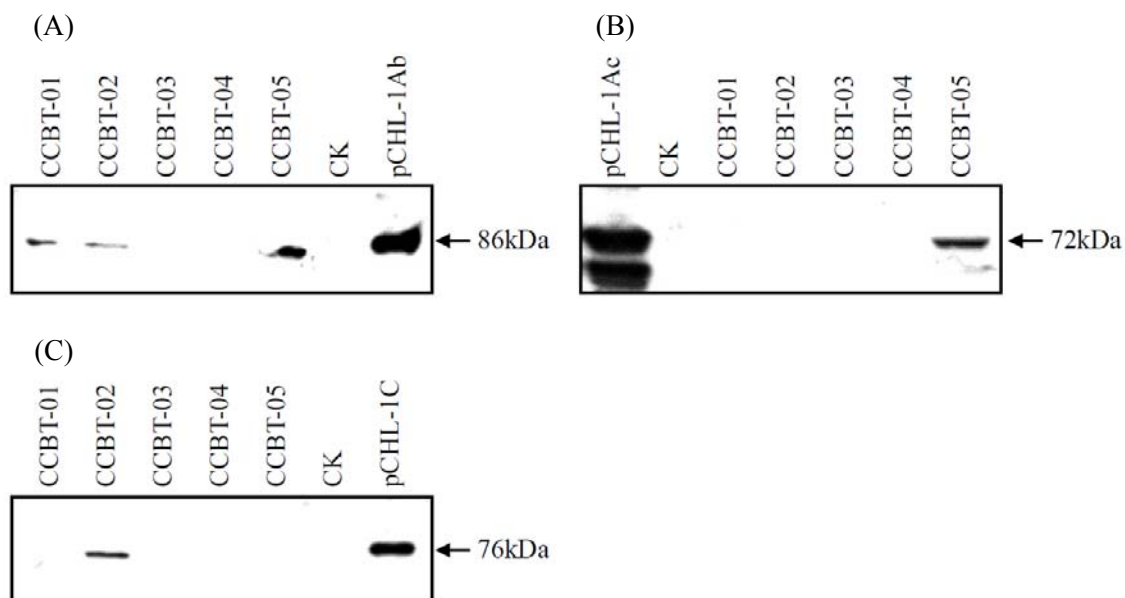


圖 5. 轉殖 *bt* 基因 (pCHL-1Ac-1Ab、pCHL-1Ab-1C、pCHL-1C-1Ac) 的'玉冠'結球白菜，以化學冷光西方墨點雜交分析 cry1Ab (A)、cry1Ac (B) 及 cry1C (C) 蛋白質表現的情形。萃取轉殖 *bt* 基因的結球白菜再生植株之蛋白質經 SDS-PAGE 分離，並以蘇力菌晶體蛋白多株抗體偵測。CK：未轉殖植株。

Fig. 5. Bt expression evaluated by western blot analysis using polyclonal rabbit anti-cry1Ab (A), anti-cry1Ac (B), and anti-cry1C (C) in the transformed 'Jade Crown' Chinese cabbage. Total soluble proteins extracted from leaves of Chinese cabbage wild type (CK) and five transgenic plants were separated by SDS-PAGE.

(五)、轉殖結球白菜植株抗蟲特性分析

選取轉殖結球白菜植株葉片，依葉片面積大小各自餵食 6~9 隻三齡小菜蛾幼蟲，於三天後觀察葉片受到小菜蛾啃食的情形。圖 6 為轉殖再生'玉冠'結球白菜餵食小菜蛾幼蟲的結果，未轉殖對照組結球白菜葉片 80%以上受到啃食，危害情形十分嚴重。五株轉殖結球白菜之間受小菜蛾為害的情形則差異很大。CCBT-02 及 CCBT-05 轉殖植株的葉片幾乎沒有受到傷害，葉片仍然保持完整，受害面積低於 10%。CCBT-01 及 CCBT-03 轉殖植株的葉片受傷皆低於 20%，CCBT-04 轉殖植株的葉片受害面積約為 40%，而未轉殖對照組葉片(CK) 受害面積則高達 85%。

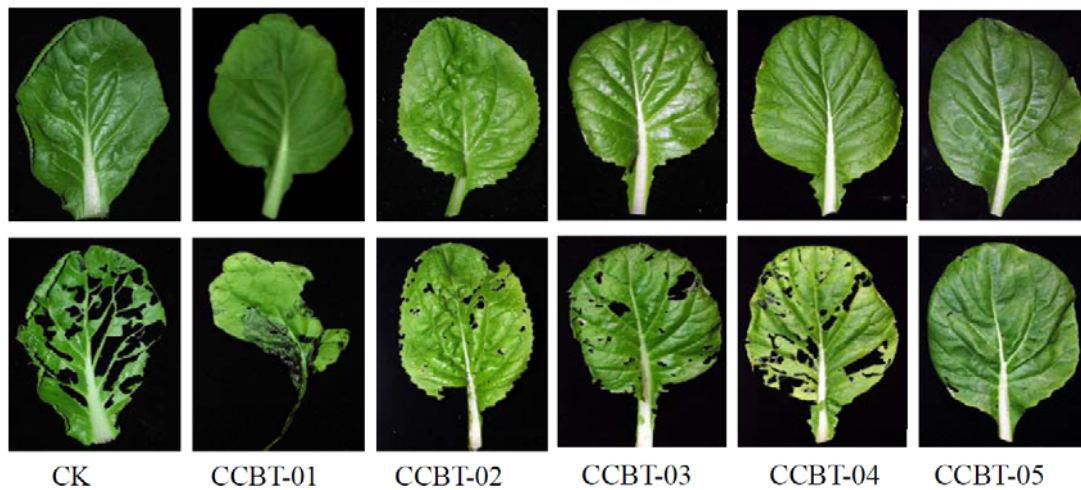


圖 6. 轉殖 *bt* 基因 (pCHL-1Ac-1Ab、pCHL-1Ab-1C、pCHL-1C-1Ac) 的'玉冠'結球白菜，及對照組 (CK) 的葉片，餵食小菜蛾 72 小時前 (上) 及後 (下)，小菜蛾危害葉片之情形。

Fig. 6. Appearances of leaves of *bt* genes (pCHL-1Ab-1C, pCHL-1Ab-1Ac, pCHL-1c-1Ac) transformed (CCBT) and un-transformed (CK) 'jade crown' Chinese cabbage before (upper) and after (lower) feeding with *Plutella xylostella* for 72 hours.

討 論

一、以基因槍法轟擊 *cryIAb*、*cryIAc* 及 *cryIC* 基因至結球白菜葉片及誘導植株再生

目前研究葉綠體基因轉殖技術的轉移方式有很多種，包括農桿菌法、PEG 法及基因槍轉殖法，但仍以基因槍轉移方式最有效率 (Su *et al.*, 2001)。因此本試驗採取基因槍的方式，進行結球白菜的葉綠體基因轉殖。將帶有葉綠體基因轉殖載體的金粒子，利用不同的氬氣壓力投射到距槍口不同距離的培植體中，經過測試結球白菜部分則以 900 psi 的氬氣壓力投射到槍口 6 公分的培植體可獲得最高的轉殖效率。

本實驗所使用的材料為'玉冠'結球白菜的本葉部份，雖然本葉部位其組織較老，比起下胚軸或子葉不易再生，但本研究室也曾利用結球白菜本葉進行葉綠體基因槍轉殖，且已獲得不錯的結果 (劉, 2003)。由於本葉部分含有較多的葉綠體，因此本研究利用結球白菜本葉進行再生轉殖的工作，期望獲得更高的轉殖率。在基因槍施打金粉過程中，需將本葉緊密的平貼置於培養基上，由於本葉很大片，因此幾乎只需要 2 至 3 片結球白菜本葉就可排列成環狀，比起利用下胚軸進行基因槍轉殖可節省更多時間及材料。當基因槍轟擊完後的葉片培植體，皆放在相同的 CBNZ 培養基並且未含抗生素先暗處理培養一週，一週後而這些培植體會膨大成原本的二至三倍，因此需要將其切成 3mm×3mm 的大小繼續培養。分切後的葉片會先形成癒傷組織，然後抽出芽體，走器官分化途徑，當芽體由第二片葉長出第三片葉時開始進行篩選工作，培養基中放入 spectinomycin 抗生素緩慢的由 5 ppm 提升到 10 ppm 以進行篩選工作，原因是在此階段的芽體分化並未開始行光合作用，當芽體抽出第三片葉時進行篩選工作是讓細胞中有轉殖成功的葉綠體能夠增生，但抗性較弱的葉綠體也不致於殺死。在低濃度 (5 ppm) 的抗生素 spectinomycin 不會影響培植體的再生能力與生長速度，但仍會有未轉殖白化芽體產生，當抗生素 spectinomycin 移至 10 ppm 持續篩選健化發根時，卻發現經轉殖的 6 株植株最後會白化死亡，甚為可惜。推測可能是轉殖成功的葉綠體數量不夠所造成的，為葉綠體呈異質型轉殖植株；或是結球白菜作物本身對於抗生素 spectinomycin 的耐受性較其它他作物低，如菸草 (Ready *et al.*, 2002)、馬鈴薯 (Ruf *et al.*, 2001) 及胡蘿蔔 (Kumar, *et al.*, 2004) 等等。結球白菜與油菜同屬芸苔屬作物，對於抗生素 spectinomycin 的耐受性比較接近，Lu 等人 (2006) 利用油菜進行葉綠體基因轉殖，同樣轉入抗蟲 *Bt* 基因，在抗生素 spectinomycin 篩選方面，只利用 10 ppm 的 spectinomycin 進行篩選工作，本研究結果也顯示結球白菜的耐受性僅能承受 10 ppm 的 spectinomycin，並可以此篩選濃度作為進行結球白菜葉綠體基因轉殖之篩選指標。

二、篩選及檢驗轉殖 *cryIAb*、*cryIAc* 及 *cryIC* 基因之結球白菜

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 *bt* 基因存在於結球白菜轉殖再生植株中轉殖再生植株，除了於實驗初期以 spectinomycin 作為篩檢之外，在植株在瓶中或是較大移出瓶外馴化期間，剪其葉片，抽取基因組 DNA 作 PCR 及南方墨點雜交分析，由實驗結果顯示，能抗 spectinomycin 之再

生植株其染色體組不一定插有目標基因；黃及曾 (2000) 亦報導多種基因同時轉殖至同一株植株時，對 spectinomycin 的耐性會有加成作用產生。結球白菜轉殖植株已偵測到 *bt* 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。本研究分別使用 *cryIAb*、*cryIAc* 及 *cryIC* 之多株抗體對轉殖植株進行西方墨點分析，在供試驗的五株轉殖植物中，以 *cryIAb* 抗體可偵測到三株轉殖植株具有 *cryIAb* 蛋白，而 *cryIAc* 抗體及 *cryIC* 抗體則均分別偵測到一株有蛋白質雜交條帶出現。本研究由於轉殖材料數量受限，目前尚無法分離轉殖結球白菜葉綠體，進行基因及蛋白分析，但經由初步的分析轉殖結球白菜之結果，證實了 *cryIAb*、*cryIAc* 及 *cryIC* 基因已轉移到結球白菜的葉綠體中，且有表現。

綜合 PCR、南方墨點雜交、RT-PCR 及西方墨點雜交分析之結果顯示：CCBT-01 轉殖植株為 *cryIAb-cryIAc* 共同轉殖植株，*cryIAb* 基因有表現出 *cryIAb* mRNA 及 *cryIAb* 蛋白，但 *cryIAc* 能偵測到其存在，確無其 mRNA 及蛋白；CCBT-02 轉殖植株為 *cryIAb-cryIC* 共同轉殖植株，均能偵測到 *cryIAb* 及 *cryIC* 基因表現出 *cryIAb* mRNA、*cryIC* mRNA 及 *cryIAb*、*cryIC* 蛋白；CCBT03 轉殖植株亦為 *cryIAb-cryIC* 共同轉殖植株，但均無法偵測到其各別基因之 mRNA 或蛋白；CCBT-04 植株可能不是基因轉殖植株；CCBT-05 轉殖植株為 *cryIAb-cryIAc* 共同轉殖植株，均能偵測到 *cryIAb* 及 *cryIAc* 基因表現出 *cryIAb* mRNA、*cryIAc* mRNA 及 *cryIAb*、*cryIAc* 蛋白。因此歸納本研究獲得雙 *bt* 基因共同表現的植株有二株，CCBT-02 (*cryIAb-cryIC*)及 CCBT-05 (*cryIAb-cryIAc*)，單 *bt* 基因共同表現的植株有一株 CCBT-01 (*cryIAb*)。

三、轉殖結球白菜植株抗蟲特性分析

以三齡的小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 幼蟲進行轉殖結球白菜的葉片殺蟲活性檢定，結果發現餵食 72 小時之後，同時能表現 *cryIAb* 與 *cryIC* 基因 (CCBT-02) 及 *cryIAb* 與 *cryIAc* 基因 (CCBT-05) 的共同 *bt* 轉殖結球白菜，殺蟲效果可達到 100%；能表現 *cryIAb* 基因 (CCBT-01) 的共同 *bt* 轉殖結球白菜，殺蟲效果可達到 99%；存在 *cryIAb* 及 *cryIC* 基因，但均無法表現其各別基因之轉殖結球白菜 (CCBT-03)，殺蟲效果亦可達 60%；不是基因轉殖植株的 CCBT-04 及未轉殖對照組之殺蟲效果都極差。本研究獲得之部份轉殖結球白菜，可偵測到 *bt* 基因存在，但無法偵測到 *bt* 基因表現的訊號，且在餵蟲的過程中被小菜蛾幼蟲啃食的情形明顯比對照植物要少，推測原因可能是轉殖 *bt* 基因成功的葉綠體在整體植物中含量不多，導致在分子檢測上偵測不到訊號，但是所產生的蛋白質亦能發揮部份殺蟲的效果。由於轉殖材料數量受限，目前尚無法進行大量葉片或全株進行更深入的轉殖植株的殺蟲效果分析。雖然初步的轉殖結球白菜的抗蟲特性分析只能作為參考，但也顯示出轉移的 *bt* 基因已轉殖移到結球白菜的葉綠體中，且有表現，共同 *bt* 基因轉殖對殺蟲效果有加乘效果。

參 考 文 獻

- 黃群益、曾夢蛟。2000。共同轉移蘇力菌殺蟲晶體蛋白、D型氨基酸氧化酵素、轉酮醇酵素、熱休克蛋白等基因至甘藍之研究。興大園藝 24(4): 47-58。
- 林志輝。2003。抗蟲基因轉殖與葉綠體內轉錄終止之研究。國立中興大學分子生物學研究所博士論文。
- 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。
- Gill, S. S., E. A. Cowles and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Griffitts, J. S., J. L. Whitacre, D. E. Stevens and R. V. Aroian. 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Sci.* 293(5531): 860-864.
- Daniell, H., S. Kumar and N. Dufourmantel. 2005. Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends in Biotechnology.* 23(5): 238-245.
- Kao, S. S., F. C. Hsieh, C. C. Tzeng and Y. S. Tsai. 2003. Cloning and expression of the insecticidal crystal protein gene *cry1Ca9* of *Bacillus thuringiensis* G10-01A from Taiwan granaries. *Curr Microbiol.* 47: 295-299.
- Hoa, T. T., B. B. Bong, E. Huq and T. K. Hodges. 2002. Cre/lox sit-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Thero. Appl. Genet.* 104: 518-525.
- Reddy, V. S., S. Leelavathi, A. Selvapandiyan, R. Raman, F., V. Giovanni, R. Shukla and K. Bhatnagar. 2002. Analysis of *Chloroplast* transformed tobacco plant with *cry1a5* under rice psbA transcriptional elements reveal high level expression of Bt toxin without imposing yield penalty and stable inheritance of transplastome. *Mol Breed.* 9: 259-269.
- Su, N., Y. M. Wu, B. Y. Sun and G. F. Shen. 2001. A new way of plant genetic engineering chloroplast transformation. *Biotechnology Information* 4: 9-13.
- Zhang, Z. L., Y. G. Ren, Y. X. Shen, S. Shan, G. C. Fan, X. F. Wu, K. X. Qian and G. F. Shen. 2000. Expression of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) crystal toxin gene in the chloroplast of tobacco. *Acta Genet. Sinica* 27: 270-277.

Co-Transferring *Bt* Genes into the Chloroplasts of Chinese Cabbage

E-Shen Lin ¹⁾ Jiun-Lin Chen ²⁾ Menq-Jiau Tseng ³⁾

Key words: Co-transformation, Particle bombardment, Chloroplasts Transformation, Chinese cabbage

Summary

Brassica vegetables play an important role in livelihood of the people and the economic status in Taiwan. In summer, the high temperature and humidity cause very serious and plant diseases in combination with pests and insects. Development of *Brassica* varieties with more insect-resistant is considered to be of great economic importance in worldwide. On the basis of the increase in activities of multiple Bt proteins providing plants with better insect-defense capability, we propose to transfer *cryIAb*, *cryIAc* and *cry1C* genes into the chloroplast of Chinese cabbage. The *cryIAb-cryIAc* (pCHL-1Ab-1Ac), *cryIAb-cry1C* (pCHL-1Ab-1C), or *cryIAc-cry1C* (pCHL-1Ac-1C) genes were transferred into the 'Jade Crown' cabbage chloroplast *via* particle gun mediated transformation. Transgenic plants were confirmed by resistance to 10 ppm of spectinomycin. The results of PCR, Southern hybridization, RT-PCR and Western hybridization analysis indicated that the transformed *bt* genes were integrated into the chloroplast genome and expressed its mRNA and protein. High degree of resistance to the *Plutella xylostella* were found in the transformed plants containing either one or two *bt* genes.

1) Graduate Student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant Professor, Department of Landscape Architecture, ChungChou Institute of Technology.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.