

綠色螢光蛋白基因(*egfp*)轉殖至水稻之研究

陳俊麟¹⁾ 紀銘坤²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：綠色螢光蛋白基因、水稻、基因轉殖

摘要：本研究利用農桿菌轉殖法將綠色螢光蛋白基因(*egfp*)轉殖到'台農 67 號'水稻 (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67)，探討以 *egfp* 基因作為篩選標誌基因的可能性。轉殖之水稻癒傷組織經 2-3 週後，於螢光顯微鏡檢測即可發現綠色螢光，並可誘導再生植株，轉殖再生率為 7-12.5%。再生之轉殖植株生長正常，以 PCR 檢測綠色螢光蛋白基因(*egfp*)的結果，顯示所有檢測的植株皆具有 750 bp 的 *egfp* 基因片段。轉殖植株經照設藍光後，可發散出綠色螢光。在根部的組織，以轉殖 pKcEGFP (CaMV35S 啟動子)的轉殖株表現最佳，可觀察到最亮的綠色螢光。葉片與稻穗的部份則以轉殖 pKrEGFP (*rbcS* 啟動子)的轉殖株表現較佳。試驗結果顯示，可利用 *egfp* 基因在水稻基因轉殖過程中，作為早期篩選之用。

前 言

在植物轉殖技術的發展過程，藉由改進標的基因的設計(Callis *et al.*, 1987)，DNA 運送的方法(Sanford, 1990; Hiei *et al.*, 1994)，並經由可篩選的(Jefferson *et al.*, 1987; Wright *et al.*, 1996)以及可選擇的(Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Fromm *et al.*, 1990)標誌基因的使用，使得轉殖技術更趨完善。活體標誌基因的研究及應用於監測標的基因在植物組織或細胞特異表現，對增進植物基因轉殖科技及植物細胞分子生物學的發展助益良多。

水母(*Aequora victoria*)的綠色螢光蛋白質基因(*gfp*)在有紫外線/藍光和氧 (Sheen *et al.*, 1995)的情形下，螢光即會發生，而不需任何額外添加受質。通常，GFP 以 396 nm 或 475 nm 激發而在 508 nm 發散出最大強度的綠色螢光。GFP 有下列幾項超越其他的視覺標誌

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

蛋白的優點：(1) 在活細胞和生物體中以簡單的光即可激發作用，它的表現能即時被偵測 (Cubitt *et al.*, 1995)，(2) GFP 不需要受質，且與螢火蟲 luciferase (LUC) (Ow *et al.*, 1986)及 β -glucuronidase 分析 (GUS) (Jefferson *et al.*, 1987)相比是不具毒性的，(3) GFP 的小分子量 (26.9 kDa) 使融合蛋白基因的構築變得更容易 (Wang and Hazelrigg, 1994)，且有利於發展以病毒為基礎的載體 (Baulcombe *et al.*, 1995)，(4) GFP 可監測在胞器、細胞和組織層次的基因表現和蛋白質的轉運現象。

GFP 在植物方面應用最多的是作為基因轉殖研究之報導基因。最早是 1995 年 Sheen 等人報導，以電擊法將 *gfp* 送入玉米原生質體，有 50% 原生質體有 GFP 螢光，且集中在細胞質或核周圍。GFP 運用於轉殖植物組織的短暫表現(transient expression)，在水稻癒傷組織、菸草葉肉細胞(Chiu *et al.*, 1996)、阿拉伯芥原生質體 (Huang *et al.*, 2001)等均有報導，顯示在單子葉和雙子葉植物 GFP 都具有效果。GFP 也已經被運用作為活體的標誌基因在轉殖的小麥和玉米植物(Pang *et al.*, 1996)，之後，就有許多 GFP 成功的在植物中的穩定表達的報導，例如 Vain 等人(1998) 將 GFP 轉殖到水稻癒傷組織再生轉基因 GFP 植株。2002 年 Mercuri 等人經由基因轉殖將螢光蛋白送入洋桔梗、非洲菊等觀賞花卉，利用 UV 光或藍光照射後使之產生綠色螢光的花，提高了商品觀賞價值。

轉殖成功與否的鑑定和篩選通常是依賴在藥物存在情況下，篩選可能費時幾個月，且須要高量篩選的藥劑之使用以降低未轉殖植株的出現。尤其是在單子葉植物種類之基因轉殖，例如水稻，轉殖殖系或植物的決定性之確認通常在基因轉殖之後 6-12 周發生，且在整個過程期間需要使用高濃度的抗生素或除草劑(Christou *et al.*, 1991; Cao *et al.*, 1992)。以視覺篩選轉殖植株，將會降低勞力與成本的投入，尤其在牽涉到轉殖植物之應用的生產系統中。Vain 等人(1998)報導用基因槍方法將 GFP 轉殖到 *indica* 水稻未成熟胚，於砲擊之後的 12-22 天即可作早期篩選，經由癒傷組織再生得到的植株均為轉 *gfp* 基因植株。

本試驗嘗試以農桿菌基因轉移法將 GFP 基因轉殖入'台農 67 號'水稻，其目的為建立以 *egfp* 為篩選標誌的農桿菌基因轉殖水稻再生系統，以期達到早期快速篩選轉殖植株的目的。

材料及方法

一、實驗材料：

(一)、植物材料

本試驗以'台農 67 號'水稻 (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) (TN 67) 作為基因轉移的植物材料。'台農 67 號'水稻成熟種子經無菌處理後，播種於含 3% 蔗糖、2 mg/L 的 2,4-D 與 0.3% 水晶洋菜(gelrite)的 N6 基礎培養基(Chu *et al.*, 1975)誘導癒傷組織，培養條件為 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ，16 小時光週期，每二週繼代一次，以作為農桿菌基因轉移之材料。

(二)、轉移之基因

本試驗將 pEGFP (購自 Clontech Inc.) 之綠色螢光蛋白基因 (*egfp*) 分別黏接於 CaMV35S 或 *rbcS* 啟動子與 NOS 終結子間，構築 *egfp* 基因轉殖載體 pKcEGFP (CaMV35S 啟動子) 及 pKrEGFP (*rbcS* 啟動子)，以作為農桿菌基因轉移之用。

二、實驗方法：

(一)、三親交配 (Triparental mating)

本試驗所使用的農桿菌品系為 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404)。Help strain 為含 pRK2013 質體的 HB101。依據 Rogers 等人(1988)，將農桿菌培養於 5 ml 含 Streptomycin (100 ppm) 之 LB 培養液，於 28°C 培養 12-36 小時。而 HB101/pRK2013 和 HB101/(pKcEGFP 或 pKrEGFP) 則分別培養於 5 ml 含 kanamycin (50 ppm) 之 LB 培養液，於 37°C 培養 12 小時。待三種菌液於光電比色計波長 600 nm 的讀值為 0.6-0.8 時，各取 1 ml 菌液混合、離心，將沉澱之菌體懸浮於 2 ml 之 10 mM MgSO₄。此懸浮液經過濾將濾液收集於濾膜 (transfer membrane) (ImmobilonTM- Ny⁺)，將濾膜置於 LB 固體培養基上，於 28°C 下隔夜培養後以 2 ml、10 mM MgSO₄ 將濾膜上之菌體沖下，取少量菌液均勻塗佈於含有 50 ppm kanamycin 及 100 ppm streptomycin 之 M9 minimal medium (2 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 20 mM KH₂PO₄, 8 mM NaCl, 40 mM NH₄Cl, 0.02% glucose, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂)。於 28°C 中培養 2-3 天，長出之菌落即為三親交配之農桿菌，可作為感染及基因轉移之用。

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

以目標基因為模板，並加入 *Taq* DNA polymerase (1 U) (MBI)、10 × buffer (1 ×)、dNTP (0.2 mM)、MgCl₂ (1.25 mM)、引子 (0.375 μM)，再加入去離子水，使最終體積為 25 μl。反應時置於 DNA 聚合連鎖反應器 (Px2 Thermal cycler; ThermoHybaid) 中。本試驗總共設計有 2 條引子：EGFP-1: 5'-ACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'，EGFP-2: 5'-CGCGGCCGCTTTACTTGTACAGC-3'，用以偵測 *egfp* 基因。PCR 反應條件為以 94°C、45 秒，64°C、45 秒及 72°C、1 分鐘，共計 30 個循環。反應後以 1.2% 的洋菜電泳膠片分析。

(三)、農桿菌基因轉移方法

主要是參考 Zhang 等人(1996)的方法再予以修飾而成。將經消毒的水稻成熟種子，無菌播種於 N6-D 培養基 (Chu *et al.*, 1975) 中，誘導 10~14 天後的癒傷組織作為農桿菌感染之材料。置於 N6-D 培養液內含 O.D₆₀₀ 值約為 0.8~1.0 的農桿菌液，感染 30 分鐘後，置於已滅菌過的衛生紙上吸乾感染液，再置於 N6-AS (acetosyringone，以 DMSO 或甲醇溶解) 培養基中，於 28°C 下避光共同培養三天，再以含有 1,000 ppm 的 carbenicillin 之 N6-D 培養液浸泡 15 分鐘三次後，置於已滅菌過的衛生紙上吸乾，再將癒傷組織培養於含有 500 ppm 之 carbenicillin 與 100 ppm 之 G-418 的 MS 再生培養基上，每二週繼代培養一次，待長出枝梢後，換至 250 ppm 之 carbenicillin 與 100 ppm 之 G-418 的 MS 培養基上，待植株稍大後移至 MS 發根培養基上誘導發根並予以健化，最後移至瓶外定植培養。

(四)、DNA 的操作、轉殖植物之南方及北方墨點雜交分析

E. coli、質體 DNA 的萃取、DNA 片段的回收及黏接、蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE)、*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 的製備、南方及北方墨點雜交分析等方法，參照陳與曾(2001)之方法。

(五) 轉殖水稻癒傷組織與轉殖水稻植株組織之螢光檢測分析

1. 轉殖水稻癒傷組織之螢光檢測分析

轉殖水稻癒傷組織螢光檢測是在無菌的狀態下進行觀察，將農桿菌感染後培養 2-3 星期的癒傷組織置於配備有螢光燈源 (Nikon HB-10101AF)與螢光濾鏡組 (Nikon DM 510, B-2A, BA520)的顯微鏡 (Nikon DIAPHOT)下，進行觀察 GFP 螢光，以初步篩選具綠色螢光的水稻癒傷組織。將這些癒傷組織繼續培養誘導再生植株。

2. 轉殖水稻植株組織螢光檢測分析

轉殖水稻植株之螢光檢測是以 Kodak IMAGE STATION 2000MM 螢光照相系統來進行分析。將欲檢測之組織自轉殖株剪下，將組織以清水適度清洗乾淨，並以去離子水保濕防止組織脫水。之後將欲檢測組織置於照相系統內，經過適度時間的曝光後，即可檢視組織螢光分析之結果。

結 果

一、構築植物轉殖載體

本試驗是將購自 Clontech Inc.之 pEGFP 的 *egfp* 基因分別黏接於 CaMV35S 或 *rbcS* 啟動子與 NOS 終結子間，構築具 *egfp* 基因之轉殖載體 pKcEGFP(CaMV35S 啟動子)及 pKrEGFP(*rbcS* 啟動子)，以作為農桿菌基因轉移之用。

(一)、CaMV 35S 啟動子之 *egfp* 基因

以 *Bam*HI 及 *Not*I 將 pEGFP 中之 0.75 kb 的 *egfp* 基因片段切下，黏接至中間載體 pBluescript SK⁻ 成為 pBlueEGFP，創造出新的限制酵素切位。再以 *Bam*HI 與 *Sac*I 作用，切下 0.75 kb 的 DNA 片段，接至 pBI121 質體，置換 *gus* 基因，即為含有 CaMV35S 啟動子及 *egfp* 基因的植物轉殖載體 pKcEGFP (圖 1A)。

(二)、*rbcS* 啟動子之 *egfp* 基因

將 pEGFP 以 *Bam*HI 及 *Not*I 作用，切下具 *egfp* 基因的 0.75 kb 片段，黏接至中間載體 pBluescript SK⁻ 成為 pBlueEGFP，再以 *Bam*HI 與 *Sac*I 作用，切下 0.75 kb 的 DNA 片段，接至 pBI131 質體，置換 *gus* 基因，即為含有 *rbcS* 啟動子及 *egfp* 基因的植物轉殖載體 pKrEGFP(圖 1B)。

轉殖載體構築完成後，均進行 PCR 及限制酵素檢測，確認所構築的轉殖載體的正确性，再進行備置成農桿菌的轉殖載體。

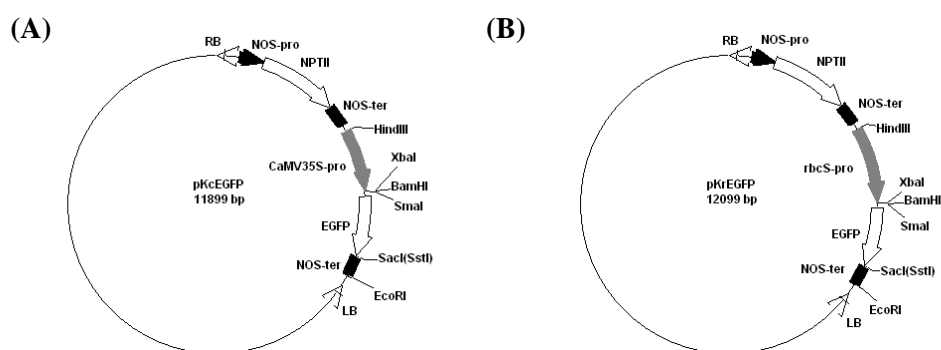


圖 1. 轉殖載體 pKcEGFP(A)與 pKrEGFP(B)之限制酵素圖譜。pKcEGFP 攜帶以 CaMV35S 為啟動子的 *egfp* 基因。pKrEGFP 攜帶以 *rbcS* 為啟動子的 *egfp* 基因

Fig. 1. Restriction maps of pKcEGFP(A) and pKrEGFP(B) vectors. The *egfp* gene driven by the CaMV35S promoter was included in the pKcEGFP vector. The *egfp* gene driven by the *rbcS* promoter was included in the pKrEGFP vector.

二、*egfp* 基因轉殖到水稻

(一)、農桿菌感染及水稻再生

將培養 2~3 週(約 2~4 mm)之'台農 67 號'水稻癒傷組織，感染攜帶所構築基因的農桿菌。感染後將癒傷組織培養置於含有 500 ppm 之 carbenicillin 的 MS 再生培養基 (圖 2A)，並以 100 ppm G418 抗生素進行初次篩選，每二週繼代培養一次。待長出枝梢後 (圖 2B)，換至 250 ppm 之 carbenicillin 的再生培養基上，持續以 100 ppm G418 抗生素進行篩選，篩選約 2~4 週。待植株稍大後移至 MS 發根培養基上誘導發根並予以健化 (圖 2C)，最後移至瓶外定植培養(圖 2D)。大部分轉殖水稻，生長良好並抽穗 (圖 2E)。本試驗共獲得具抗生素抗性之植株計有：pKcEGFP 有 14 株，再生率為 7%、pKrEGFP 有 25 株，其再生率為 12.5% (表 1)。

圖 3 為以農桿菌轉殖 *egfp* 之水稻癒傷組織於螢光顯微鏡檢測之情形。結果顯示感染後 2-3 星期的癒傷組織於螢光顯微鏡下照射藍光後，會發散綠色螢光(圖 3A、圖 3B)；照射一般白光則無綠色螢光之情形(圖 3C、圖 3D)。對照組或無 *egfp* 表現的組織經藍光照射後，都呈現橘黃或淺黃色的螢光。

(二)、轉殖水稻植株之基因及蛋白表現分析

1. 轉殖植株之聚合酵素連鎖反應(PCR)分析

萃取經 G418 篩選之再生水稻葉片之 DNA 作為模板，以 *egfp* 基因設計之引子(EGFP-1 及 EGFP-2)，進行 PCR 反應。若為具轉殖之再生植株，在電泳膠片可顯現 750 bp 之條帶，而對照組與未轉移成功之植株則無此條帶。圖 4 為以 PCR 反應檢驗轉殖 *egfp* 基因的轉

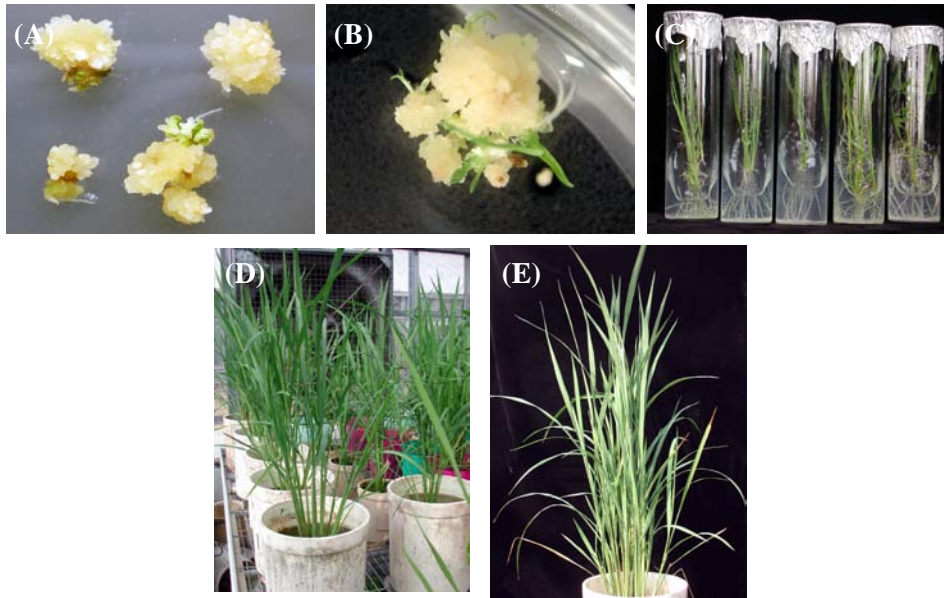


圖 2. '台農 67 號'水稻經農桿菌感染後再生之情形。(A) 水稻成熟胚誘導之癒傷組織增生；(B) 芽梢發生；(C) 以 G418 篩選轉殖水稻植株；(D) 定植；(E) 抽穗。

Fig. 2. Regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) after *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/ pKcEGFP, /pKrEGFP) harbouring with *egfp* gene driven by different promoters. (A) Amplification of calli induced from the embryo of mature seeds; (B) shoot formation; (C) selection of transformed plantlets by G418, (D) regenerated plants, (E) spike.

表 1. 不同啟動子的 *egfp* 基因(pKcEGFP, pKrEGFP)轉移至'台農 67 號'水稻癒傷組織，經誘導再生的情形。

Table 1. Regeneration of 'TN 67' rice from calli after transformation via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/ pKcEGFP, /pKrEGFP) harbouring with *egfp* gene driven by different promoters.

質體(啟動子) Plasmid (Promoter)	感染培植體數 No. of infected explants	再生植株數目 No. of regenerated plantlets resistant to G-418	再生百分率 Regenerated percentage (%)
pKcEGFP (CaMV35S)	200	14	7
pKrEGFP (<i>rbcS</i>)	200	25	12.5

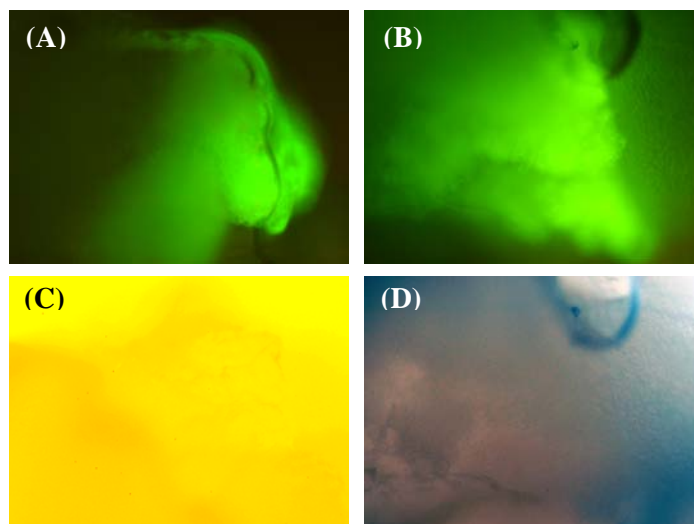


圖 3. 以農桿菌轉殖水母綠色螢光蛋白基因(*egfp*)之水稻癒傷組織於螢光顯微鏡檢測之情形。(A, B) 於螢光顯微鏡下照射藍光發散綠色螢光之情形；(C, D) 照射一般白光之情形。

Fig. 3. Expression of *egfp* in transgenic rice callus after transformation of *egfp* gene via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/ pKcEGFP, /pKrEGFP). A, B: fluorescence images. C, D: optical images.

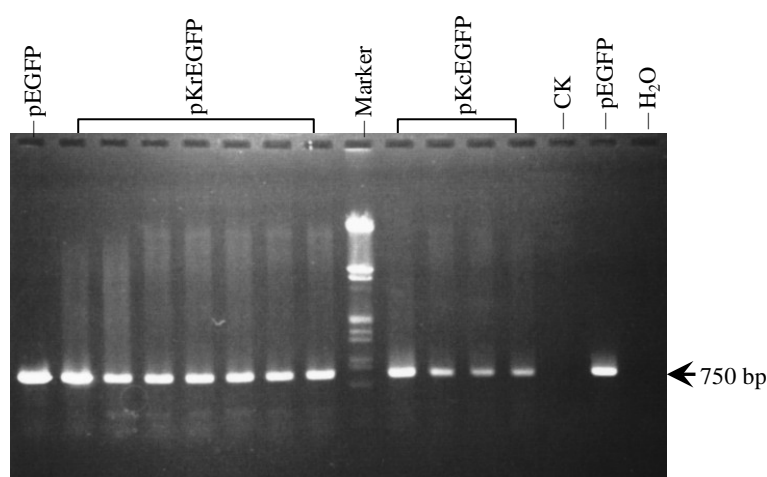


圖 4. 以農桿菌轉殖 *egfp* 基因之再生'台農 67 號'水稻植株，其 DNA 經 PCR 反應之產物在電泳膠片上分離 *egfp* 基因之情形。

Fig. 4. PCR analysis of *egfp* gene in regenerated "TN67" rice after transformation of *egfp* gene via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/pKcEGFP, /pKrEGFP). The part of *egfp* (750 bp) was amplified from a leaf DNA of regenerated rice and analyzed by electrophoresis.

殖水稻之電泳分析圖，包括二種啟動子的 *egfp* 基因轉殖水稻。試驗結果顯示此二種轉殖植株均可偵測到預期之 750 bp 的 *egfp* 基因片段，而對照組植株則無此基因片段。經 PCR 初步篩選轉殖植株，在 CaMV35S 啟動子部分：轉殖 pKcEGFP 之水稻植株共檢測 8 株，8 株轉殖水稻均呈正反應，轉殖效率為 100%；在 *rbcS* 啟動子部分：pKrEGFP 之轉殖再生水稻共檢測 15 株，此 15 株轉殖水稻皆呈正反應，轉殖效率亦為 100% (表 2)。

2. 南方墨點分析轉殖植株

經過 PCR 初步分析與篩選後，選取供試的水稻'台農 67 號'轉殖再生植株，萃取其基因組 DNA，取 50 μ g 以 *Bam*HI/*Sac*I 作用後，經電泳分離並轉漬至 Zeta-probe membrane (Bio-Rad) 後，以 *egfp* 基因片段為探針進行南方墨點雜交分析，其結果如圖 5 所示。不論是轉殖 pKcEGFP 或 pKrEGFP 的再生水稻，在 0.75 kb 的位置皆有雜交的訊號，而對照組未轉移植株則沒有雜交訊號。'台農 67 號'轉殖植株中皆可偵測到 *egfp* 基因的存在，再將有正反應的植株進行螢光檢測分析，觀察目標基因之產物是否正常作用。

3. 轉殖植株之螢光檢測分析

將南方墨點分析確認的水稻'台農 67 號'轉殖再生植株，選取其根、稻穗與葉片於 Kodak IMAGE STATION 2000MM 螢光照相系統進行綠色螢光檢測，其結果如圖 6A、6B 與 6C 所示。轉殖植株的根於藍光(463 nm)照射後，不論是轉殖 pKcEGFP 或 pKrEGFP 都具有綠色螢光的表現，且以轉殖 pKcEGFP 的植株之根表現較強的綠色螢光，對照組則無綠色螢光的出現(圖 6A)。在轉殖植株稻穗綠色螢光的表現情形與根類似，即是轉殖 pKcEGFP 或 pKrEGFP 都具有綠色螢光的表現，但稻穗的表現情形以轉殖 pKrEGFP 的轉殖植株較強，對照組則無綠色螢光(圖 6B)。轉殖植株葉片的表現情形，不論是轉殖 pKcEGFP 或 pKrEGFP

表 2. 轉移具不同啟動子的 *egfp* 基因(pKcEGFP, pKrEGFP)的再生'台農 67 號'水稻，其葉片 DNA 經 PCR 反應，分析 *egfp* 基因之綜合結果。

Table 2. Transformation efficiency of *egfp* gene in regenerated 'TN 67' rice from callus transformation of *egfp* gene via *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain harbouring with *egfp* gene driven by different promoters.

質體(啟動子) Plasmid (Promoter)	檢測植株數 Tested Plants (A)	PCR 呈正反應之植株數 PCR + Plants (B)	轉殖率 Transformation efficiency(B/A)
pKcEGFP (CaMV35S)	8	8	100%
pKrEGFP (<i>rbcS</i>)	15	15	100%

亦都具有綠色螢光，但以轉殖 pKrEGFP 的植株表現較強的綠色螢光，而轉殖 pKcEGFP 的植株綠色螢光就微弱許多，對照組則無綠色螢光的表現(圖 6C)。

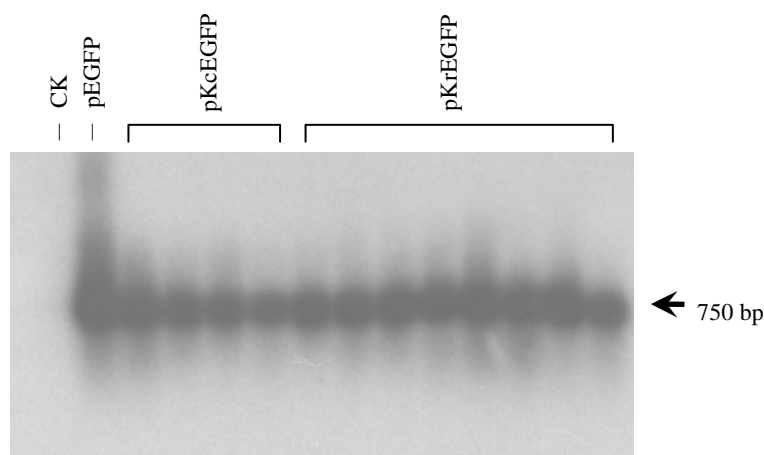


圖 5、轉移具不同啟動子的 *egfp* 基因(pKcEGFP, pKrEGFP)的再生'台農 67 號'水稻，其葉片 DNA 經南方墨點雜交分析之情形。

Fig. 5. Southern analysis of *egfp* gene in regenerated 'TN67' rice after transformation of *egfp* gene via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/pKcEGFP, /pKrEGFP). The gene of *egfp*(0.75 kb) from a leaf DNA of regenerated rice was hybridized with isotope-labeled probe.

討 論

植物基因轉殖的鑑定和篩選通常有賴藥物來進行篩選，以區別轉殖與非轉殖的組織或植物。篩選的時間長短取決於轉殖系統的使用，為降低未轉殖植株的出現機率，可能需要花費許多時間與大量的篩選藥劑。尤其在單子葉植物種類之基因轉殖，以水稻為例，通常需要在基因轉殖之後 6-12 週才能確認轉殖之組織或植物，且在整個過程期間需要使用高濃度的抗生素或除草劑(Christou *et al.*, 1991; Cao *et al.*, 1992)。因為不同的水稻種類對於篩選的藥劑展現不同的敏感性，所以決定最佳單一篩選條件，在發展依基因型而定的轉殖過程中是麻煩且難處理。再者，有時因為篩選藥劑濃度需要很高，如水稻以 kanamycin 進行篩選時需要的濃度常達 200-300 ppm，甚至高達 500 ppm，而造成轉殖株再生不易與產生植株白化、不稔性等變異(Ayres and Park, 1994)。因此須選擇適當的篩選標誌基因以作為篩選之用是很重要。本試驗以 G-418 作為篩選之藥劑，濃度為 100 ppm。此濃度能有效的對未轉殖水稻癒傷組織產生抑制，達到以 *nptII* 作為篩選標誌基因之目的(Ayres and Park, 1994)。此外若能以視覺篩選更進一步的改良轉殖篩選工作，將大幅降低投入之勞力與成本，尤其在轉基因植物應用的商業生產體系中。

本試驗以農桿菌將 *egfp* 基因轉殖至'台農 67 號'成熟種子胚誘導之癒傷組織，於感染後 2-3 星期在螢光顯微鏡下進行螢光檢測，即可觀察到具有綠色螢光的癒傷組織(圖 4)，此顯示表示以農桿菌基因轉移法轉殖 *egfp* 基因至'台農 67 號'水稻作為早期篩選是可行的。而且篩選出的組織可繼續培養誘導再生，與 Vain 等人 (1998) 用基因槍方法將 *egfp* 轉殖到 *indica* 水稻未成熟胚，可於基因轉殖後的 12-22 天作為早期篩選，經由癒傷組織再生得到轉基因 GFP 植株情形相似。而不需要如螢火蟲 luciferase 基因(*luc*)添加受質進行基因表現之誘導(Ow *et al.*, 1986)及 β -glucuronidase 分析(*gus*)需要對組織進行破壞性的傷害(Jefferson *et al.*, 1987)。

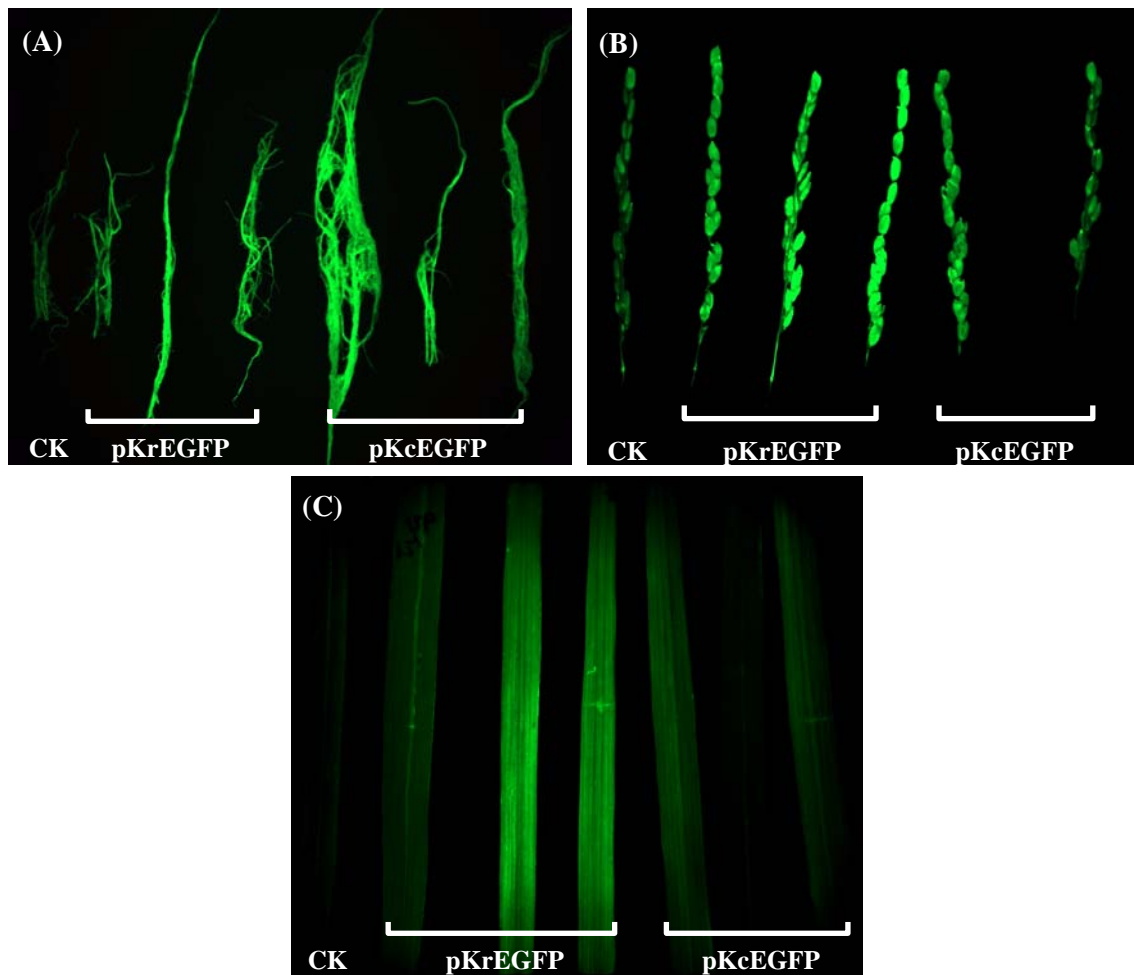


圖 6. 轉殖水母綠色螢光蛋白基因(*egfp*)之水稻轉殖植株於照射藍光發散綠色螢光之情形。(A)：根、(B)：稻穗、(C)：葉片。

Fig. 6. Emission of green fluorescence of *egfp*-transformed rice plants via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/ pKcEGFP, /pKrEGFP) mediated transformation. (A) root, (B) spikes, (C) leaves.

將篩選出的癒傷組織繼續培養並誘導再生轉殖植株，轉殖植株均生長正常。轉殖 pKcEGFP 的癒傷組織共有 200 個，獲得之再生植株數為 14 株，再生率為 7%，經 PCR 與南方墨點分析檢測的轉殖植株都具有 0.75 kb 之 *egfp* 基因的片段，轉殖率為 100%；而轉殖 pKrEGFP 的癒傷組織亦為 200 個，獲得 25 株之再生植株，再生率為 12.5%，經 PCR 與南方墨點分析檢測的轉殖植株都具有 0.75 kb 之 *egfp* 基因的存在，轉殖率亦為 100%。轉殖植株再生率較上述幾章的再生率稍高，但與其他系統的 10-20%(Hiei *et al.*, 1994)甚至高達 75-95%(Sallaud *et al.*, 2003)的轉殖再生率比較，本研究仍屬於偏低。本試驗設計有 2 條引子：EGFP-1 (pEGFP 質體 286~307)，EGFP-2 (pEGFP 質體 1018~996)，用以偵測 EGFP 基因(732 bp)。PCR 反應之產物電泳分析之結果，顯示所有構築皆有 732 bp (約 0.75 kb)的片段出現(圖 5)，證實 *egfp* 基因存在於轉殖水稻中。

轉殖植株於螢光照相系統觀察的結果，亦發現所有植株皆有綠色螢光產生，在根部的組織，以轉殖 pKcEGFP (CaMV35S 啟動子) 的轉殖植株表現最佳，具最亮的綠色螢光。葉片與稻穗的部份則以轉殖 pKrEGFP(*rbcS* 啟動子)的轉殖植株表現較佳。以啟動子的特性而言，CaMV35S 啟動子在許多植物組織中均能具有很高的表現，為一不具組織特異性的啟動子，常被用來當做植物基因的啟動子(Benfey and Chua, 1990)。而 *rbcS* 啟動子為綠色植物中最大量的蛋白質(Rubisco)基因之啟動子，被認為是植物中最強且最有效率之啟動子。因此，本研究之結果發現以 *rbcS* 啟動子的轉殖 pKrEGFP 轉殖植株 *egfp* 在綠色組織均表現較強的綠色螢光，而根部的表現就以轉殖 pKcEGFP (CaMV35S 啟動子)的轉殖植株較佳。就不同組織表現綠色螢光的情形而言，不論轉殖 pKcEGFP 或 pKrEGFP 的轉殖植株，比較根、稻穗與葉片等組織的綠色螢光表現的情形，結果顯示都是以根部組織表現最亮的綠色螢光，且與對照組差異最為明顯。而稻穗次之，葉片則是差異最不明顯的部位。這可能與葉綠素受到激發光照射後，會產生自發螢光而干擾到 *egfp* 綠色螢光的結果，因此根部的細胞與組織是很容易進行 *egfp* 綠色螢光觀察(Mercuri *et al.*, 2002)。

檢測的結果中亦發現個別植株在綠色螢光有不同程度的差異，甚至部份組織沒有表現，這可能與轉基因的是否活化或插入套數有關。因為基因插入的套數過多，可能也會造成基因的不活化(Park *et al.*, 1996)。亦可能與基因插入之位置，造成位置效應(position effect)有關，這方面的原因需要進一步的探討。目前結果顯示利用農桿菌法轉移 *egfp* 至水稻組織中當作早期篩選的標誌是可行的，並且可再生轉殖植株。因此，利用 *egfp* 在水稻基因轉殖過程中可作為早期篩選之依據。

參 考 文 獻

- 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。
Ayres, N. M. and W. D. Park. 1994. Genetic transformation of rice. *Critical Rev. Plant Sci.* 13: 219-239.

- Baulcombe, D. C., S. Chapman, and S. Santa Cruz. 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 7: 1045-1053.
- Benfey, P. N. and N. -H. Chua. 1990. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250: 959-966.
- Callis, J., M. Fromm, and V. Walbot. 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* 1: 1183-1200.
- Cao, J., X. Duan, D. McElroy, and R. Wu. 1992. Regeneration of herbicide-resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* 11: 586-591.
- Chiu, W., Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi, and J. Sheen. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 3: 325-330.
- Christou, P., T. L. Ford, and M. Kofron. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technol.* 9: 957-962.
- Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Sci. Sinica.* 18: 659-668.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, and R. Y. Tsien. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20: 448-455.
- Fromm, M. E., F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas, and T.M. Klein. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technol.* 8: 833-839.
- Gordon-Kamm, W. J., T. M. Spencer, M. L. Mangano, T. R. Adams, R. J. Daines, W. G. Start, J. V. O'Brien, S. A. Chambers, W. R. Adams Jr, N. G. Willetts, T. B. Rice, C. J. Mackey, R. W. Krueger, A. P. Kausch, and P. G. Lemaux. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282.
- Huang, Z., Y. Han, and S. H. Howell. 2001. Effects of movement protein mutations on the formation of tubules in plant protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and Cauliflower mosaic virus movement protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1026-1031.

- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987 GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Mercuri, A., A. Sacchetti, L. D. Benedetti, T. Schiva, and S. Alberti. 2002. Green fluorescent flowers. *Plant Sci.* 162: 647-654.
- Ow, D. W., K. V. Wood, M. Deluca, J. R. de Wet, D. R. Helinski, and S. H. Howell. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856-859.
- Pang, S., D. L. DeBoer, Y. Wan, G. Ye, J. G. Layton, M. K. Neher, C. L. Armstrong, J. E. Fry, M. A. W. Hinchee, and M. E. Fromm. 1996. An improved green-fluorescence protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 112: 893-900.
- Park, Y. -D., I. Papp, E. A. Moscone, V. A. Iglesias, H. Vaucheret, A. J. M. Matzke, and M. A. Matzke. 1996. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* 9: 183-194.
- Rogers, S. G., H. Klee, M. Byren, R. B. Horsch, and R. T. Fraey. 1988. Improved vector for plant transformation: expression cassette vector and new selectable marker. *Method in Enzymology.* Academic Press.
- Sallaud, C., D. Meynard, J. van Boxtel, C. Gay, M. Bès, J. P. Brizard, P. Larmande, D. Ortega, M. Raynal, M. Portefaix, P. B. F. Ouwerkerk, S. Rueb, M. Delseny, and E. Guiderdoni. 2003. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1396-1408.
- Sanford, J. C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79: 206-209.
- Sheen, J., S. Hwang, Y. Niwan, H. Kobayashi, and D. W. Galbraith. 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 8: 777-784.
- Vain, P., B. Worland, A. Kohli, J. W. Snape, and P. Christou. 1998. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. *Theor. Appl. Genet.* 96: 164-169.
- Wang, S. and T. Hazelrigg. 1994. Implication for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369: 400-403.
- Wright, M. S., K. Launis, C. Bowman, M. Hill, J. Dimaio, C. Kramer, and R. D. Shillito. 1996. A rapid visual method to identify transformed plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 32: 11-13.
- Zhang, S., L. Chen, R. Qu, P. Marmey, R. Beachy, and C. Fauquet. 1996. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* 15: 465-469.

Studies on Transformation of Green Fluorescent Protein Gene (*egfp*) into the Rice

Jiun-Lin Chen ¹⁾ Ming-Kun Ji ²⁾ Menq-Jiau Tseng ³⁾

Key words: Green fluorescent protein (GFP), Rice, Gene transformation

Summary

In this study, green fluorescent protein gene (*egfp*) of jelly fish was transformed into the rice (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) via *Agrobacterium*-mediated transformation to explore the possibility of using *egfp* genes as selection marker in gene transformation. The regenerated percentage of G418 resistance rice calli was 7 to 12.5%. The transformed plants were fertile and normal in appearance. A 750 bp fragment of *egfp* could be amplified from transformed rice plants by PCR analysis. Emission of green fluorescence could be observed from *egfp* transformed rice calli and regenerated plants after excitation with blue light. In roots, high emission of green fluorescence was found in the pKcEGFP (CaMV35S promoter) transformed plants. In leaves and spikes, higher emission of green fluorescence was found in the pKrEGFP (*rbcS* promoter) transformed plants than those of pKcEGFP transformed plants. The data show the feasibility of using EGFP as a convenient and rapid reporter to select for the genetically modified rice plantlets both *in vivo* and *in vitro*.

-
- 1) Assistant Professor, Department of Landscape Architecture, ChungChou Institute of Technology.
 - 2) Research Assistant, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
 - 3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.