

MC-Transaction on Biotechnology, 2012, Vol. 4, No. 1, e3

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

利用空心菜為模式植物建立水生植物表現外源蛋白質系統

賴韋綦、呂俊甫、張如璧、劉宏韻、江志明*

銘傳大學健康科技學院生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

隨著植物生物技術學和分子生物學的進步利用基因轉殖植物表現外源蛋白質的技術越來越成熟，本實驗我們計畫利用空心菜建立良好的誘導癒傷組織和再生系統，作為日後發展成水生植物表現外原蛋白質的轉殖再生系統。選用空心菜因其具有以下優點；耐風災、淹水、高溫、病蟲害、所需要的生長空間小。有利於發展成大量生產飼料、食品、工業用蛋白質，或是進一步生產醫藥用疫苗之用途。利用空心菜嫩莖誘導癒傷組織，接著以農桿菌轉殖法將質體(pCAMBIA1303)送入農桿菌 EHA105 後，進行農桿菌感染癒傷組織，質體中之 T-DNA 區域會隨機嵌入植物染色體，將外源蛋白的基因轉殖入。此質體之 T-DNA 區域攜有轉殖篩選與報導所需之 hygromycin 和 β -葡萄糖醛酸苷酶(β -glucuronidase；GUS)基因。利用 hygromycin 來篩選轉殖成功的癒傷組織並進行進行聚合酶連鎖反應和癒傷組織之 GUS 染色，證實外來基因之表現與穩定轉殖之效率達 5.3%並可順利再生成轉殖植株。

關鍵字：空心菜、農桿菌轉殖、 β -葡萄糖醛酸苷酶

通訊作者：江志明 [cmchiang@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2012-5-23 修正：2012-6-18 接受：2012-6-26

前 言

台灣位處熱帶及亞熱帶國家，有利水生蔬菜之栽培。水生蔬菜具有起始投資額少、生產技術性低、栽培週期短、產量高、品質差異不大及不易遭竊等諸多優點 [1]。台灣的水生蔬菜以空心菜為大宗，具有耐風災、淹水、高溫、病蟲害及生長快速等優點，空心菜的總裁培期大約 90~105 天，在此時間內可收穫 12-15 次 [2]。

農桿菌轉殖系統，是利用農桿菌體內Ti質體或Ri質體上的T-DNA會隨機插入植物染色體中[3]。農桿菌原本是植物的病害之一，因此T-DNA內帶有的基因是農桿菌感染植物後，促使植物合成它生活必需的控制基因，其中包含了會使植物長腫瘤的Ti質體，如果將這些基因去除，插入我們想要表現的基因在T-DNA裡，這樣就能有效地送入植物細胞核DNA中，也可以穩定的留在植物基因組裡[4]。

我們利用農桿菌轉殖的方式，將質體 pCAMBIA1303 (內含 GUS 報導基因) 轉殖入空心菜嫩莖癒傷組織，建立高效率的新轉殖系統。此模式植物的農桿菌轉殖系統建立後，可廣泛應用於大量生產飼料、食品、工業用蛋白質，或是進一步生產醫藥用疫苗等[5, 6, 7, 8, 9]。

材料與方法

材料

(1)本實驗採用之空心菜(*Ipomoea aquatica* Forsk)種子為大葉青骨空心菜，購自高雄市富農種苗公司；農桿菌：EHA105品系；質體：pCAMBIA1303。

(2)培養基：

MS培養基(Murashige and Skoog)：MS basal salt 4.4 g/L，3% sucrose，0.7% agar，pH 5.8~6.0；MS誘導癒傷組織培養基：MS basal salt 4.4 g/L，3% sucrose，BA 0.8 mg/L，2,4-D 0.3 mg/L，0.7% agar，pH 5.8~6.0；MS-AS培養基：MS basal salt 4.4 g/L，3% sucrose，BA 0.8 mg/L，2,4-D 0.3 mg/L，50 mg/L acetosyringone，0.7% agar，pH 5.8~6.0；MSC培養基：MS basal salt 4.4 g/L，3% sucrose，BA 0.8 mg/L，2,4-D 0.3 mg/L，250 mg/L cefotaxime，0.7% agar，pH 5.8~6.0；MSCH培養基：MS basal salt 4.4 g/L，3% sucrose，BA 0.8 mg/L，2,4-D 0.3 mg/L，250 mg/L cefotaxime，50 mg/L hygromycin，0.7% agar，pH 5.8~6.0；LB培養基(Luria-Bertani)：1% tryptone，1% NaCl，0.5% yeast extract，pH 7.0~7.5。

實驗方法

(1) 空心菜的無菌播種

取空心菜種子(*Ipomoea aquatica* Forsk)以70%酒精潤濕種子，經30秒後，倒掉酒精。倒入20 mL含0.5% Tween 20和2%次氯酸鈉溶液，旋緊蓋子，置超音波震盪器處理10分鐘，再手搖10分鐘。在無菌操作台中，以無菌水沖洗種子3至5次，將次氯酸鈉與Tween 20完全洗淨。將種子放入無菌水中，浸潤12小時。將種子播種於含有MS固態培養基之醬瓜瓶中。移到26°C光照培養室培養。

(2) 空心菜癒傷組織的培養

取培養約 12 天的空心菜。切取約 3~5 mm 的嫩莖。接種至癒傷組織培養基上。將培養皿移到 26°C 光照培養室培養。

(3) 農桿菌 EHA105 的培養

先配置 LB 液態培養基，高溫高壓滅菌 20 分鐘。滅菌後，等待 LB 液態培養基降溫，加入 5 mg/L kanamycin。以接種環挑選培養基上特定 colony，接種至 LB 液態培養基中。在 28°C 的環境中，旋轉培養。

(4) 農桿菌 EHA105 transformation [freeze-thaw method^[10]]

將已凍之 EHA105 解凍，並將其加入 5 mL YEP medium 中，而後置於 28°C 旋轉培養 over night。取 2 ml 的培養液至 50 mL YEP medium 中，以 250 rpm 旋轉培養，在 28°C 下，直到 OD₆₀₀=0.5~1.0。將培養液置於冰上並且離心 3,000 xg，5 分鐘，4°C。將上清液去除，並以 1 mL 的 20 mM CaCl₂ 回溶(需保存於冰上)，並吸取 100 μL 加入空的 eppendorf 中。加入 1 μg 的 pCAMBIA1303 質體，並丟入液態氮中數秒後拿起。將 eppendorf 置入 37°C 水浴槽，水浴 5 分鐘。加入 1 mL YEP medium 置入 15 mL 離心管中，並在 28°C 旋轉培養 2~4 小時。將培養液吸取至 eppendorf 中，並將其離心 30 秒(3,000 xg)，去除上清液，並以 0.1 mL YEP medium 回溶。將菌液用 L 棒均勻塗抹在含 agar 的 YEP 培養基上(需加入 1 μL/mL 的 kanamycin)，並在 28°C 培養 2~3 天。

(5) 固態培養之空心菜癒傷組織與農桿菌共培養^[11]

將空心菜癒傷組織切至 1-2 mm，移至 MS-AS 固態培養基，以鋁箔紙包起來放在 28°C 培養箱，黑暗培養 3 天。在 laminar flow 中，以 loop 沾取含 pCAMBIA1303 質體的農桿菌，至 50 mL YEP 培養基中攪拌。農桿菌菌液於 28°C，250 rpm 震盪培養 3 天。以分光光度計測農桿菌濃度是否達到 OD 值(600 nm)=1。將含黑暗培養 3 天的空心菜癒傷組織 MS-AS 固態培養基鋁箔紙拆開，在 laminar flow 中，每盤加入 5 mL 菌液，置於 28°C 黑暗共培養 3 天。重覆下列步驟 3 天：在 laminar flow 中，將黑暗共培養 3 天的空心菜癒傷組織，夾入 100 mL MSC 培養基，於 28°C 震盪培養 4 小時。在 laminar flow 中，以篩子過濾含空心菜癒傷組織的 MSC 培養基，將篩子上的空心菜癒傷組織夾入另一瓶 100 mL 無菌水，於 28°C 震盪培養 4 小時。在 laminar flow 中，以篩子過濾含空心菜癒傷組織的無菌水，將篩子上的空心菜癒傷組織夾入另一瓶 100 mL MSC 培養基，於 28°C 震盪隔夜培養。三天後，將空心菜癒傷組織夾至 MSCH 固態培養基中，28°C 光照培養一星期，並觀察有無菌落產生。

(6) genomic DNA 純化

將材料放入鉢中，並帶上雙層手套。快速倒入液態氮並快速研磨。將磨完之粉末倒入預冷的 eppendorf 中。加入 700 μL urea extraction buffer。將蓋子蓋

上後，劇烈搖晃。再加入 700 μL phenol/chloroform，劇烈搖晃，在室溫下放置 15 分鐘。8,000 rpm 離心 10 分鐘，4 $^{\circ}\text{C}$ 。吸取上層液體，置入新的 eppendorf 中。加入等量 1/10 之 NaOAc，加入 1 mL isopropanol，輕搖，搖完之後開蓋一下使氣體溢出。於 4 $^{\circ}\text{C}$ ，8,000 rpm 離心 10 分鐘後去除上層廢液。加入 200 μL 70%酒精清洗沉澱物。接著於 4 $^{\circ}\text{C}$ ，8,000 rpm 離心 1 分鐘，去除上層酒精。加入 200 μL 100%酒精清洗沉澱物。接著於 4 $^{\circ}\text{C}$ ，8,000 rpm 離心 1 分鐘去除上層酒精。待酒精揮發後加入 100 μL ddH₂O 回溶。

(7) 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

利用 Hotstar PCR SuperMix (GeneDireX[®])進行聚合酶連鎖反應確認轉殖植株帶有 hygromycin 抗性基因。在 PCR tube 中加入 0.5 μg DNA template、1 μL 10 μM Hyg 5F primer (5'-GCTGG GCGGT CGGTT TCC-3')、1 μL 10 μM Hyg 3R primer (3'-CTCAC CGCGA CGTCT GTC-5')及 15 μL Hotstar PCR SuperMix，最後補 ddH₂O 至 20 μL 。將 PCR tube 放入 PCR machine (SelectCycler, Select BioProducts)之中，輸入設程 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec、58 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、35 cycles，72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min，10 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。

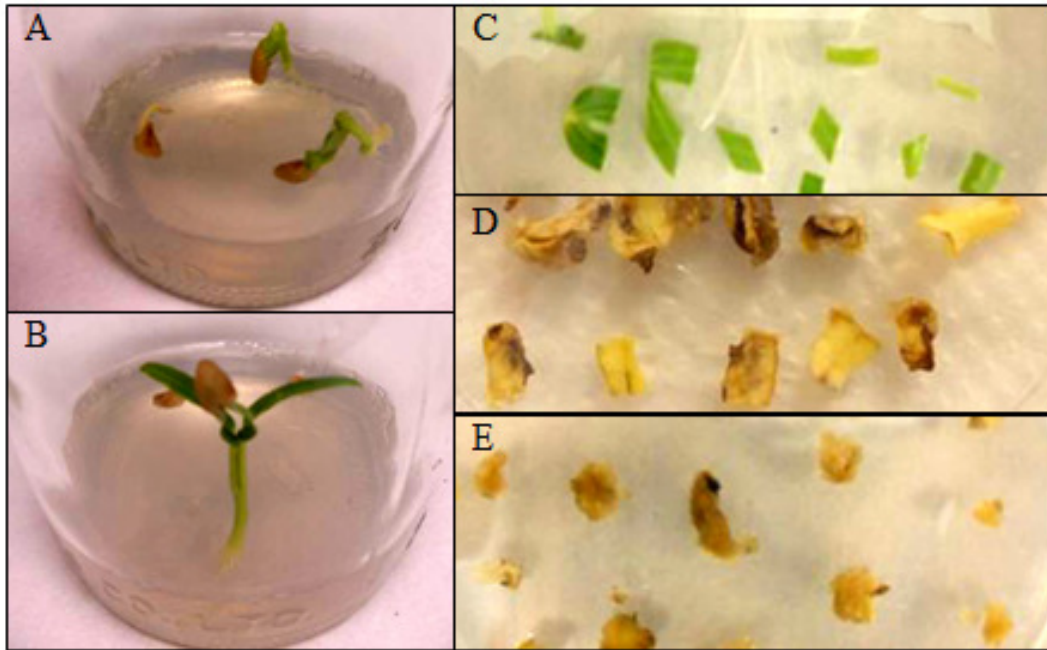
(8) 報導基因 GUS 分析

從 MSH plate (4.4 g/L 含 B5 vitamin 的 MS salts，30 g/L sucrose，50 mg/L hygromycin，3 g/L phytigel，pH 5.7)取適量的癒傷組織放入 96 孔盤之中，加入 200 μL GUS activity stain mixture (1 mL 50 mg/mL X-GluC，25 mL 200 mM Na₂PO₄ pH 7.0，0.2 mL 0.5 M EDTA，40 mg K ferrocyanide，40 mg K ferricyanide，0.01 mL 0.01% NP40，total 100 mL)於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱中反應 6hr_[12]。

結 果

誘導空心菜癒傷組織

取空心菜種子每瓶 10 顆，將空心菜種子消毒過後，將種子放入無菌水中，浸潤 12 小時。再將種子播種於含有 MS 固態培養基之醬瓜瓶中。移到 26 $^{\circ}\text{C}$ 光照培養室培養。經過 3~4 天後有發芽的現象(圖一、A)，五天後空心菜子葉長出(圖一、B)，切取空心菜嫩莖放置誘導癒傷組織培養基，誘導癒傷組織(圖一、C)。約 10 天後可以觀察到末端有膨大的現象(圖一、D)，20 天後可誘導出約 0.5 cm 鬆散的黃綠色癒傷組織(圖一、E)。



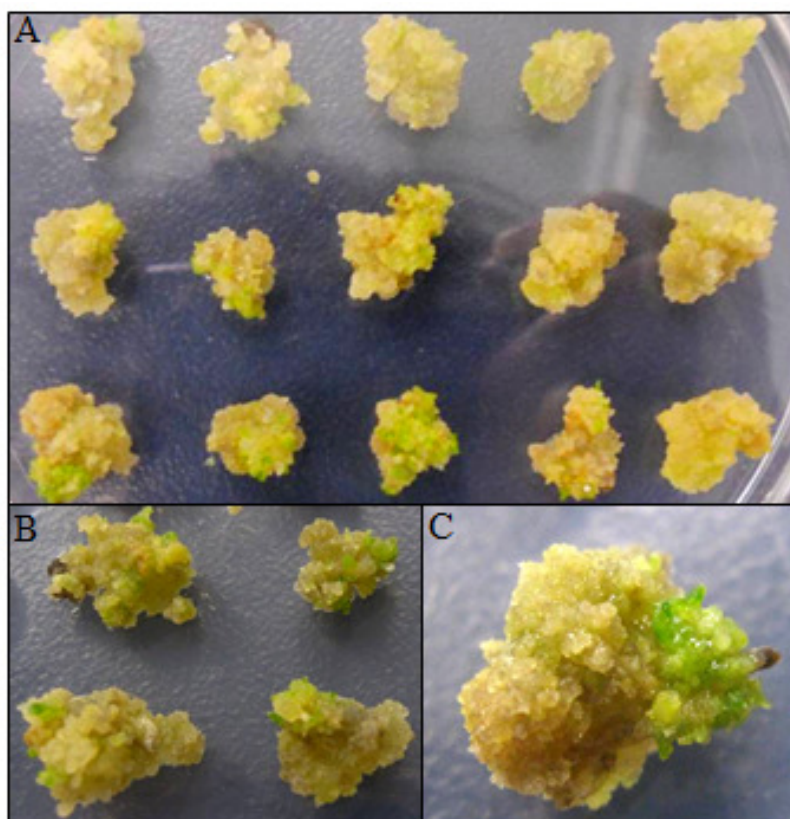
圖一、空心菜癒傷組織之誘導。(A) 無菌播種後第三天；(B) 無菌播種後第五天；(C) 取無菌播種後第五天之嫩莖誘導癒傷組織；(D) 空心菜嫩莖癒傷組織誘導第十五天癒傷組織；(E) 取(D)之癒傷組織繼續培養五天。

農桿菌基因轉殖與篩選

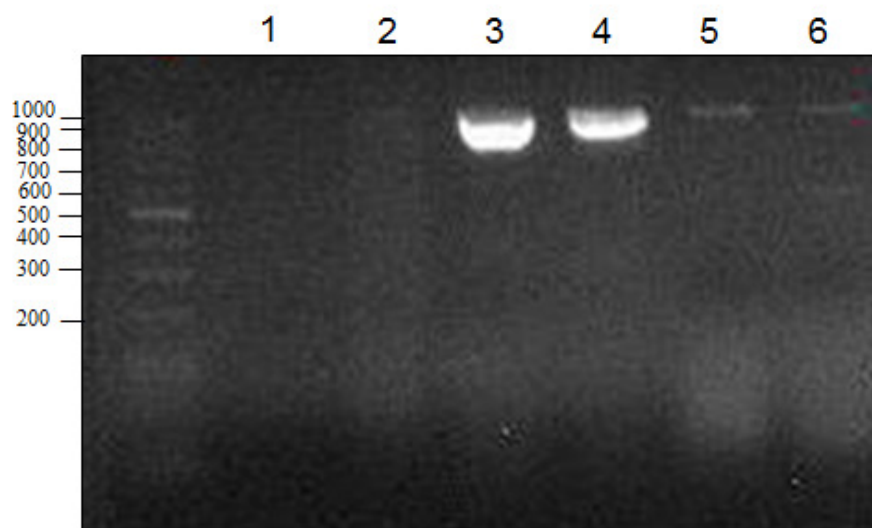
用 freeze-thaw method 可以成功的將質體 pCAMBIA1303 轉入農桿菌 EHA105 中，再將轉形的農桿菌塗在含 kanamycin 的 YEP 培養基上，並在 28°C 培養 2~3 天，藉以篩選菌株。挑選長出的單一菌落，作 PCR 測試構築的片段是否成功轉殖到農桿菌中。利用空心菜癒傷組織作為培植體，用帶有重組基因之農桿菌感染，置於含 hygromycin 和 cefotaxime 的培養基，篩選癒傷組織，過 2~3 個禮拜後，可以看到有新的癒傷組織增生(圖二、A)。再抽取轉殖成功癒傷組織和沒轉殖癒傷組織的 genomic DNA，做 PCR 測試。可以看到其轉殖片段，有轉殖成功的癒傷組織因為有帶 hygromycin 基因，所以在 1 kb 左右可以看到夾出來的片段(圖三、lane 5 及 lane 6)。且繼代二個月後的癒傷組織很明顯的有抽芽之現象(圖二、C)。

利用 GUS 染色來計算空心菜轉殖效率

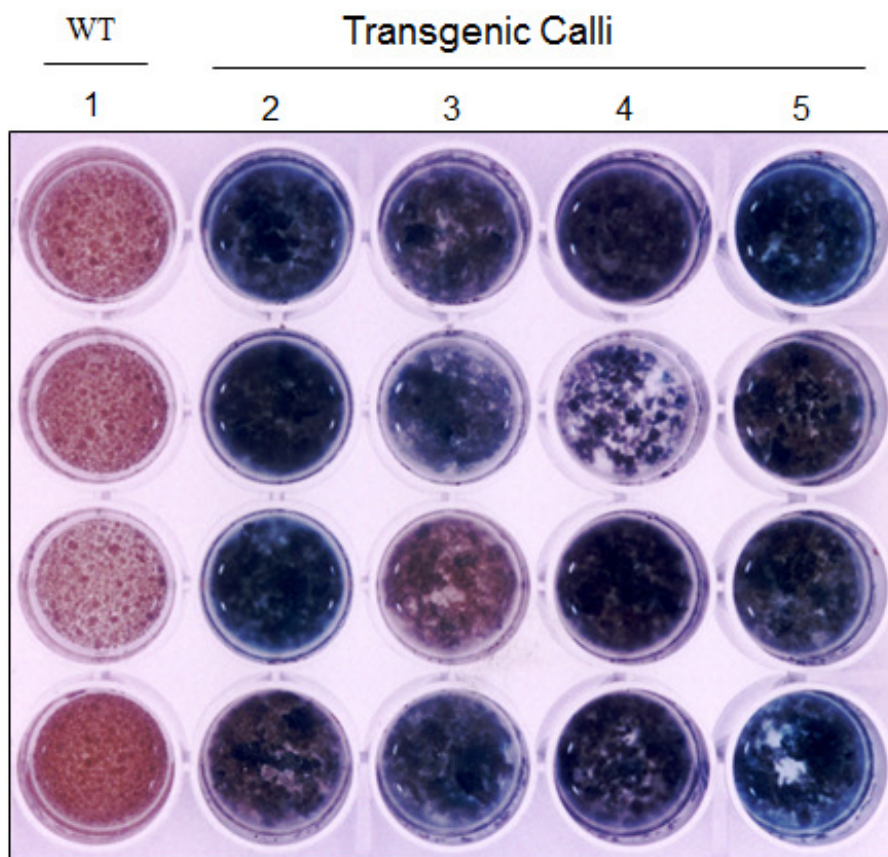
此次利用農桿菌轉殖空心菜葉誘導之癒傷組織，經 GUS 組織染色(圖四)發現轉殖效率達 5.3%(表一)，此首次利用農桿菌轉殖空心菜癒傷組織的實驗結果證明將空心菜作為模式植物建立水生植物表現外源蛋白質系統是一個可行的方向。



圖二、篩選轉殖成功之空心菜癒傷組織。(A) 空心菜癒傷組織經農桿菌感染後，置於 MSCH 上篩選，轉殖成功之癒傷組織；(B) 繼代一個月後的癒傷組織；(C) 繼代二個月後的癒傷組織。



圖三、利用 genomic DNA PCR 篩選轉殖成功的空心菜癒傷組織，所 PCR 之基因為長 1,026 bp 之 hygromycin 基因片段。M：100 bp marker、Lane1：blank (ddH₂O)、Lane2：NT (non-transgenic wild type)、Lane3：pCAMBIA1303 plasmid (300ng)、Lane4：pCAMBIA1303 plasmid (150 ng)、Lane5：transgenic plant 1、Lane6：transgenic plant 2。



圖四、GUS 酵素活性之組織化學分析，轉殖癒傷組織有活性者呈藍色(lane2 至 lane4 共 16 個獨立轉殖癒傷組織)，非轉殖癒傷組織則無 GUS 活性者(lane1)。

表一、膿桿菌轉殖效率統計表。

Plasmid	Total number of transfected callus	Number of Hygromycin resistant callus	Transformation Efficiency %
pCAMBIA1303	300	16	5.3

討 論

本實驗利用整株空心菜當作培植體，放置於誘導癒傷組織的培養基中，約 10 天後，在嫩莖末端可觀察到些微膨大的現象；約 15 天後，可誘導出 0.5 cm 鬆散的黃綠色癒傷組織，此參照遼寧大學姜長陽的實驗^[13]。姜長陽採用空心菜嫩莖，用不同濃度的 BA 和 2,4 D，誘導癒傷組織，證明誘導嫩莖癒傷組織的理想培養基是

MS + BA 0.8 mg/L + 2.4-D 0.3 mg/L。且可利用農桿菌轉殖得到轉殖植株，因空心菜嫩莖癒傷組織在一般的 MS 培養基上很容易長出小芽。此實驗發現空心菜是一易於再生為植株的水生植物，對於基因轉殖和植物表現外源蛋白質系統非常有利，將來可廣泛應用於大量生產飼料、食品、工業用蛋白質，或是進一步生產醫藥用疫苗等。

參考文獻

- [1] 李文汕：東南亞地區水生蔬菜之栽培與利用現況。水生植物多樣性開發與利用研討會專刊 2009，79-99
- [2] 林文華：水生植物食用價值之開發運用。水生植物多樣性開發與利用研討會專刊 2009，127-139。
- [3] Klee H: A guide to *Agrobacterium binary* Ti vectors, Trends Plant Sci 2000, 5: 446-451.
- [4] Langridge WHR: One day children may get immunized by munching on foods instead of enduring shots, Edible Vaccines 2000, 283: 66-71.
- [5] Curtiss R 3rd and Cardineau GA: Oral immunization by transgenic plants, World Patent Application WO 90/02484 Washington University (Assignee) 2009.
- [6] Marusic C: Plant-based strategies aimed at expressing HIV antigens and neutralizing antibodies at high levels-Nef as a case study. Transgenic Res 2009, 18: 499-512.
- [7] Brodzik R: Generation of plant-derived recombinant DTP subunit vaccine, Vaccine 2009, 27: 3730-3734.
- [8] Smith, ML: Factors important in the extraction, stability and in vitro assembly of the hepatitis B surface antigen derived from recombinant plant systems, Biotechnol Prog 2002, 18: 538-550.
- [9] Sunil Kumar GB: Production of hepatitis B surface antigen in recombinant plant systems: An update, Biotechnol Prog 2007, 23: 532-539.

[10] Detlef W, Jane G (2002) Transformation of *Agrobacterium* using the freeze-thaw method. Cold Spring Harb Protoc 2002.

[11] Yu B: Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Plant Cell Tiss Organ Cult 2007, 90: 265-273.

[12] Qu le Q, Xing YP, Liu WX, Xu XP, Song YR: Expression pattern and activity of six glutelin gene promoters in transgenic rice, J Exp Bot 2008, 59: 2417-24.

[13] 姜長陽、龐婧、劉甯、鄒玉英、鄒翠霞：空心菜無性系的建立及快速繁殖。遼寧大學學報(自然科學版) 2004，31: 275-278。

Using *Ipomoea aquatica* Forsk as a model plant to establish the expression system of foreign proteins

Wei-Chen Lai, Jyun-Fu Lyu, Ju-Pi Chang, Hung-Yun Liu, Chih-Ming Chiang*

Department Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University, (Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

Abstract

The water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) has the following advantages for its use in transgenesis: *ie.*, resistance to hurricane, flooding, high temperature, diseases, pests, and only need a small space for its growth. Here, we established an induction and regeneration system for the *Ipomoea aquatica* Forsk callus. It can be further used to transform aquatic plants into transgenic proteins expression system in future. Because there are a lot of advantages, such as low cost, easiness of storage and transportation, the callus are produced from *Ipomoea aquatica* Forsk young stems and transformed by an *Agrobacterium* containing the expression vector pCAMBIA1303. Since the vector carried hygromycin and GUS (β -glucuronidase) genes in the T-DNA, selection of cultures were conducted using hygromycin and cefotaxime. Stable clones containing integration and expression of the transgenes were confirmed by both polymerase chain reaction (PCR) and GUS assay. The transformation efficiency is about 5.3%. To our knowledge, this is the first report of *Agrobacterium*-mediated transgenesis in a water spinach. These results indicate that the *Ipomoea aquatica* Forsk is an ideal system for the expression of foreign proteins.

Keyword: *Ipomoea aquatica* Forsk, *Agrobacterium*-mediated transformation, β -Glucuronidase

Corresponding author: Chih-Ming Chiang [cmchiang@mail.mcu.edu.tw]

Received 23 May 2012/Revised 18 June 2012/Accepted 26 June 2012

MC-Transaction on Biotechnology, 2012, Vol. 4, No. 1, e3

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.