

轉殖改造之大豆 β -伴球蛋白 β -亞基基因 (β -Conglycinin β -Subunit) 生產優質水產飼料用蛋白

余俊賢¹⁾ 蔡奕祥²⁾ 楊明德³⁾ 許文輝⁴⁾ 曾夢蛟⁵⁾

關鍵字：大豆、 β -伴球蛋白 β -亞基基因、水產飼料用蛋白

摘要：水產養殖是台灣相當重要的產業，魚粉的價格影響到養殖漁業的穩定收益。大豆的價格便宜及供應平穩，適合做為取代魚粉的原料。大豆種子富含蛋白質及平衡的胺基酸組成分，其中 β -conglycinin 蛋白質含量占種子總蛋白的 35%。大豆蛋白與魚粉相較之下，缺乏胺基酸甲硫胺酸(methionine)及離胺酸(lysine)，若添加甘胺酸(glycine)可以改善大豆適口性。本研究即是分別把含有六套 MGKMGR 及十套 GMKGMR 之重覆套數的核酸片段插入大豆 β -伴球蛋白(β -conglycinin)之 β -亞基 (β -subunit) (*7Sb*) 基因，利用大豆作為生物反應器生產優質水產飼料用蛋白。

本研究將二個改造之 β -亞基基因 (*7Sb-M56* 及 *7Sb-G510*)，構築到含有 *CaMV35S* 啟動子(持續性表現) 及 *GmPM9* 啟動子(種子專一表現) 的植物基因轉殖載體 pCambia 1304。轉殖載體以 *mgfp* 及 *gusA* 為報導基因，以 *hptII* 作為篩選基因，總共完成構築四種植物轉殖載體：pM56-1304-gus、pG510-1304-gus、pGm9-M56-1304-gus、pGm9-G510-1304-gus。將四種植物轉殖載體利用農桿菌基因轉殖法轉殖到'高雄選 10 號'大豆子葉節。培植體以 100 mg/L 的 hygromycin 進行篩選，並誘導再生。再生植株及 T1 後裔均經由 PCR、RT-PCR、西方墨點等方法檢測。目前已確認 T1 轉殖大豆品系攜帶有 *7Sb-G510* 基因，並表現 *7Sb-G510* mRNA 及 *7Sb-G510* 蛋白。

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

前 言

水產養殖飼料成本約佔所有水產養殖成本的 30~60%。由於高品質魚粉在水產飼料工業上的供應不穩定及價格的變動相當大，大豆產品的高蛋白質含量和適當的胺基酸組成、價格低廉、容易製成飼料、高利用性，使得它們已成為部份取代或完全取代魚類飼料中魚粉的理想原料。當使用大豆蛋白產品作為水產飼料上仍有一些的限制，例如：胺基酸組成的不平衡 (缺乏 methionine、lysine)、對某些魚類而言，其嗜口性低、含有可降低磷及其他礦物質的生物利用性的植酸、含有降低消化酵素活性的胰蛋白酶抑制因子。如果能以基因轉殖技術，來克服上述限制因子，開發基因轉殖大豆做為生物反應器生產水產飼料將是很有前景。

將大豆蛋白與白魚粉的胺基酸組成作比較，大豆蛋白的 lysine、methionine 及 glycine 比白魚粉低。因此本研究擬利用生物技術改造大豆種子中 β -conglycinin 蛋白的胺基酸組成，使大豆蛋白的整體胺基酸相對含量近似白魚粉。基本策略是將兩個 glycine(G)、兩個 methionine(M)、一個 lysine(K) 或 arginine(R) 組成套組(M-G-K-M-G-R 或 G-M-K-G-M-R)，選擇較不影響 β -conglycinin 蛋白結構的位置進行多套組的置入或改造。其中，lysine 及 arginine 作為蛋白酶辨識的切位，methionine 補充含硫胺基酸的不足，glycine 含量的提升則能改善大豆蛋白嗜口性不佳的問題。本研究之目的為以基因工程改造大豆蛋白為材料，開發大豆基因轉殖平台生產水產飼料用蛋白之基因改造大豆。

材料與方法

一、植物試驗材料

本試驗以'高雄選十號'大豆[(*Glycine max* (L) Merr. cv. 'Kaohsiung 10')] 作為農桿菌基因轉殖的試驗材料。本試驗所使用之大豆種子皆由亞洲蔬菜中心及台南區農業改良場所提供。無菌播種是將大豆種子經氯氣滅菌 12 小時之後，再無菌播種於含有 3% 蔗糖與 0.8% 洋菜膠之 MSB5 培養基中。培養溫度為 27°C，光強度為 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ，16 小時光週期

二、試驗方法：

(一) 基因轉殖載體之構築

本實驗轉殖之大豆 β -conglycinin (β -伴球蛋白)之 β -subunit 基因(7Sb)是我們研究室蔡奕祥學長自'高雄選十號'大豆中所選殖出來的。清華大學分子與細胞生物研究所王雯靜教授的研究室根據 Maruyama 等(2001)所發表的 7Sb 蛋白結構，預測可將胜肽嵌入而不改變 7Sb 蛋白結構之位置。中興大學分子生物研究所楊明德老師的研究室依此資訊分別在 7Sb 蛋白第 5 改造位置(225~237 胺基酸)置入 6 套 MGKMGR 及 10 套 GMKGMR 胜肽的核酸序列，形成改造的 7Sb-M56 及 7Sb-G510 基因，再將其構築到 *E. coli* 表現載體 pET21 上，

形成 pET21-7Sb-G510 及 pET21-7Sb-M56 載體。本研究先將 7Sb-M56 及 7Sb-G510 基因構築到適用於農桿菌法基因轉殖之植物基因轉殖載體。其主要構築策略為將含有 MGKMGR 及 GMKGMGR 之重複性序列的 7Sb 基(pET21-7Sb-G510、pET21-7Sb-M56)，利用含有限制酶酵素 *SmaI* 及 *SacI* 切位的引子以 PCR 增幅之後，接在啟動子 *CaMV35S* 及 *GmPM9* 的下游，構築載體為 pCambia 1304，帶有 *mgfp-gusA* 報導基因及 *hptII* 篩選基因。構築成 pM56-1304-gus、pG510-1304-gus、pGm9-M56-1304-gus、pGm9-G510-1304-gus 等四個植物轉殖載體。

(二) 大豆農桿菌基因轉殖法

大豆無菌播種前，先於密閉容器內，在抽氣櫃下進行氯氣滅菌。取 100~200 顆大豆種子於燒杯中，加入 100 ml 漂白水(NaOCl)及 3.5 ml 鹽酸(HCl)，再放於密閉容器內中，經由反應會產生 NaCl、H₂O 及 Cl₂(氯氣)，滅菌 6 小時。殺菌消毒過的大豆種子播種於 GM 培養基 (MSB5、3% sucrose、0.8% agar, pH 5.7)。選取發芽 5~7 天的無菌苗，在離子葉節 3 mm 左右處切去下胚軸，然後在兩個子葉中間將胚軸縱向切開，去掉頂芽。用解剖刀在子葉與胚軸交接處劃 3~5 刀，製造傷口以利農改菌感染。經過此操作步驟，每個無菌苗可產生二個子葉節培植體，作為進行農桿菌基因轉殖之材料。

將製備好的子葉節培植體放入備妥之農桿菌菌液中浸泡 30 分鐘。倒掉菌液，將子葉節培植體放入上下均鋪有無菌濾紙的培養皿內，吸掉多餘的菌液。然後將培植體近軸面朝下放置在共同培養基(co-cultivate medium, CCM) (1/10 B5、20 mM MES、1.67mg/L BA、0.25mg/L GA、0.2mg/L AS、8.8mg/L L-cysteine、1.0mg/L sodium thiosulfate 及 1.0mg/L DTT, pH 5.4)，共培養在 24-25 °C、黑暗或弱光下 3 天。再將子葉節培植體放到無菌三角瓶中，加入含有濃度 500 mg/L carbenicillin 之液體 CCM 培養基浸泡並搖晃 60 分鐘以殺滅農桿菌。然後放到誘導芽體再生培養基 (shoot induction medium, SIM) (B5、3 mM MES、3% sucrose、3.0 mg/L BA、1.0 mg/L TDZ, pH 5.7) 中培養。子葉節培植體的近軸面朝上，下胚軸插入培養基，培養溫度為 27°C，光強度為 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ，18 小時光週期，每兩週繼代培養一次。

(三) 大豆培植體再生與篩選

農桿菌感染後的培植體培養於再生培養基 14 天後，在子葉節處會長出再生芽體，再將其繼代培養於含有 500 mg/L carbenicillin 與 100 mg/L hygromycin 之篩選 SIM 再生培養基中以篩選轉殖植株。每 14 天繼代培養一次，未經轉殖成功的再生芽體會慢慢褐化，反之轉殖成功的再生芽體則會保持綠色，繼續生長。待再生出不定芽四週後，再移至誘導芽梢伸長培養基 (shoot elongation medium, SEM) (MSB5、3 mM MES、3% sucrose、2 mg/L GA、0.4 mg/L IAA、100 mg/L asparagine、100 mg/L glutamine, pH 5.7)，使芽梢伸長，每 14 天繼代一次。迨不定芽伸長約 3~4cm 左右，切除培植體基部組織，浸泡於含有 1 mg/L IBA 的 1/2 MSB5 液體培養基 10 分鐘，以促使發根。再移至誘導發根培養基 (rooting medium, RM) (1/2 MSB5、3 mM MES、3% sucrose、1 mg/L IBA、100 mg/L asparagine、100

mg/L glutamine, pH 5.7), 使其根系發育成長, 之後經由健化移出瓶外, 種植於混合介質 (泥炭苔:蛭石:珍珠石=2:1:1) 之中生長。

(四) 大豆再生轉殖植株之檢測

1. 植物體基因組 DNA 之萃取

取植物材料約 0.1~0.2 克在液態氮中研磨, 加入 700 μ l CTAB Buffer (0.8 g polyvinylpyrrolidone、100 μ l 2-mercaptoethanol), 強力震盪均勻後, 置於 65°C 水浴中 30 分鐘, 待冷卻之後於 12,000 rpm, 4°C, 離心 20 分鐘。取上層液加入 700 μ l 的 phenol:chloroform:isoamyl alcohol=25:24:15 之混和有機溶液, 輕搖混合均勻後於 12,000 rpm, 4°C, 離心 20 分鐘。取上層液加入 1ml 的 95%酒精溶液, 置於-20°C 中至少 30 分鐘藉以沈澱 DNA。然後再以 12,000 rpm, 4°C, 離心 15 分鐘, 倒去上層液, 倒置離心管 10 分鐘(涼乾 DNA)。加入含 50 mM Tris-HCl, 10 mM Na-EDTA, pH 8.0 之 0.5 ml TE 溶液使 DNA 完全溶解, 加入 RNase A, 並以 (HOfer TKO-100, fluorometer) 測定濃度後置-20°C 備用。

2. 偵測 7Sb-G510 基因所使用之引子(primer)

偵測 7Sb-G510 基因之 1.5 kb 全長基因片段之引子為 forward primer : 5'CCCGGGATGATGAGAGTGCGGTTTCCTTTG3'(A1) 與 reverse primer : 5'GAGCTCTCAGTGGTGGT GGT GGTGGTGGTAGAG3'(A3)。偵測 7Sb-G510 基因之 0.8 kb 基因片段之引子為 forward primer : 5'CCCGGGATGATGAGAGTGCGGTTTCCTTTG3'(A1) 與 reverse primer : 5'CGATGAAGATCTACGCATACCTTT3'(A2)。

3. 聚合酶連鎖反應

採用 Thermo Hybaid 儀器進行 PCR 分析。PCR 反應液之總體積為 25 μ l, 內含 Taq buffer(1x), 2.5 mM dNTPs (0.25mM), 5 unit Taq, 1 μ M primer 和 100 ng 之轉殖與未轉殖株大豆 DNA。偵測 7Sb-G510 基因的 PCR 反應條件為: 94.0°C(5 分鐘), 1 個 cycle、再進行 94.0°C (50 秒), 58.0°C(50 秒), 72.0°C(1 分鐘), 共 35 個 cycle, 最後進行 72.0°C(10 分鐘), 1 個 cycle。終產物以 0.8%之洋菜膠進行電泳分析。

4. 植物組織 RNA 之萃取

稱取植物葉片組織 2.5 克, 置於研鉢中。加入液態氮研磨成細粉末狀, 加入 1,000 μ l 的 TriSolution Reagent 溶液(GeneMark Technology Co., Ltd., Taiwan), 放置 5 分鐘將植物組織(10~100 mg)均質於溶液中。加入 200 μ l 的 chloroform 溶液, 劇烈震盪 15 秒並於室溫放置 3 分鐘。之後於 12,000 rpm, 4°C, 離心 10 分鐘, 將上清液移至新的離心管中, 加入 250 μ l 的酒精溶液及 250 μ l 的 PS&PG Removal Solution 溶液, 置於-20°C, 1 小時沉澱 RNA。經離心後, 重覆數次酒精沉澱之步驟以去除其他雜質。然後吹乾沉澱, 加入適量之 DEPC 水溶解, 以光譜儀測定其 O.D. 260 與 O.D. 280 吸收值, 估算 RNA 之濃度。

5. 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

本試驗使用 Fermentas 公司 RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit。反轉錄反應 (First strand reaction) 的反應步驟: 加入 0.01~5 μ g RNA 及 1 μ l oligo (dT)

primer solution，最後加入 DEPC 水至 12 μ L，充分混合於 65°C 作用 5 分鐘後置於冰上冷卻。再依序加入 4 μ L reaction buffer、1 μ L RNase Inhibitor、2 μ L 10mM dNTP mix、1 μ L Reverse Transcriptase，充分混合於 42°C 作用 1 小時，之後再移到 70°C 作用 5 分鐘，即為 cDNA，保存於-20°C。PCR 增幅採用 Thermo Hybaid 儀器來進行，PCR 反應液之總體積為 25 μ L，內含有 2 μ L (1:1000 dilution) cDNA、1 μ L primer solution、4 μ L 2.5mM dNTP mix、2.5 μ L PCR buffer、Taq DNA polymerase，加入 DEPC 水至 25 μ L，充分混合後進行 PCR 反應。偵測 7Sb-G510 基因的 PCR 反應條件為：94.0°C(5 分鐘)，1 個 cycle、再進行 94.0°C (50 秒)，58.0°C(50 秒)，72.0°C(1 分鐘)，共 35 個 cycle，最後進行 72.0°C(10 分鐘)，1 個 cycle。終產物以 0.8%之洋菜膠進行電泳分析。

6. 植物可溶性蛋白質之萃取

取 1g 之植物葉片，以液態氮研磨成粉末，加入 1ml 之蛋白質萃取液(100 mM potassium phosphate pH 7.5, 2 mM EDTA, 1% PVP-40)，12,000 rpm 離心 10 分鐘，取其上清液儲存-20°C 保存。

7. 轉殖大豆植株種子之抗抗生素篩選與種植

將轉殖大豆植株之種子(T0)與未轉殖之種子(CK)分別播種於含有 100 mg/L hygromycin 之 MS 基本培養基(Murashige and Skoog, 1962)，每隔 2 天調查種子發芽及生長情形，迨 14 天，經過抗生素篩選仍然成活並生長良好之大豆幼苗，經由健化後移出瓶外，種植於混合介質 (泥炭苔:蛭石:珍珠石=2:1:1)中生長。

8. GUS 活性之組織化學染色法 (GUS histochemical staining)

首先將配置好的 GUS 分析緩衝液[100 mM sodium phosphate (pH 7.0)、10 mM Na₂EDTA、0.5 mM K₃Fe(CN)₆ (potassium ferrocyanide)、0.5 mM K₄Fe(CN)₆ (potassium ferrocyanide)、0.1% Tritone X-100、10% MeOH、0.3% X-Gluc(5-bromo-4-Chloro-3-indoyl glucuronid)]分裝於小玻璃管中，再將轉殖植株的葉片及種子組織，完全浸漬於上述的 GUS 分析緩衝溶液中，真空抽氣 5 分鐘使 GUS 分析緩衝溶液能完全進入植物組織中，靜置於 37°C 培養箱中暗處理 12-16 小時，取出後以 70%酒精逐次褪去組織葉綠素，若為轉殖成功的植物組織，便會呈現具有 GUS 活性的藍色反應。

結 果

一、pM56-1304-gus、pG510-1304-gus、pGm9-M56-1304-gus、pGm9-G510-1304-gus 轉殖載體之構築

本研究主要將 7Sb-M56 及 7Sb-G510 基因構築到植物組成型(constitutive) 啟動子—CaMV35S 啟動子，及大豆種子專一性之啟動子—Gm9 啟動子，並置入到適用於農桿菌介導的基因轉殖載體。其主要構築策略為以植物高效率表現載體 pCambia 1304 為基礎，先

置入一個攜帶 *CaMV35S* 啟動子的基因 (*gus*)，再將其基因與 *7Sb-M56* 及 *7Sb-G510* 基因置換，即完成帶 *CaMV35S::7Sb-M56* 及 *CaMV35S::7Sb-G510* 基因之轉殖質體的構築；最後再將 *CaMV35S* 啟動子置換成 *Gm9* 啟動子，即成為帶 *Gm9::7Sb-M56* 及 *Gm9::7Sb-G510* 基因之轉殖質體。四種轉殖載體構築流程之示意圖及限制酶圖譜如圖 1 所示。所有中間載體及最終載體均以相關之限制酵素，檢測各基因片段大小的正確性及載體的可行性。

二、大豆農桿菌基因轉殖之培植體篩選及誘導植株再生

本研究採用“農桿菌介導轉殖大豆子葉節系統”，進行 *7Sb-M56* 及 *7Sb-G510* 基因轉殖。所使用的子葉節，取大豆種子無菌播種於 GM 培養基一週後的子葉節為材料(圖三 A)。並將子葉節去除頂芽及腋芽組織(圖三 B 左)，並用解剖刀在子葉與胚軸交接處直徑約 3 mm 的範圍內劃 3~5 刀(B 右)。刻傷的子葉節浸泡於含有農桿菌的液態 CCM 共同培養基中 30 分鐘，之後將大豆培植體移到 CCM 固態培養基，避光共培養 5 天(圖三 C)。再以含有濃度 1,000 ppm carbenicillin 之 B5 液體培養基浸泡，並搖晃 60 分鐘以殺滅農桿菌(圖三 D)。再將感染後的培植體培養於含 1 mg/L TDZ、3 mg/L BA 之 SIM 誘導芽體再生培養基中(圖三 E)，在誘導芽體再生的過程中，通常會在刻傷處長出再生新芽體或癒商組織(圖三 F)。誘導再生 14 天後則使用 100 mg/L hygromycin 進行轉殖大豆培植體的篩選(圖三 G)，在篩選過程中大豆子葉及未轉殖的再生芽褐化，疑似轉殖再生的新芽則維持綠色(圖三 H)。將疑似轉殖成功的新芽再移至含 2 mg/L GA 之 SEM 誘導芽梢伸長培養基(圖三 I)，使其不定芽繼續生長發育(圖三 J)。每 14 天繼代一次，待不定芽伸長約 3~4cm 左右，再移至 RM 誘導發根培養基，使其根系發育及生長(圖 2K)。之後經由健化移出瓶外，定植於混合介質(泥炭苔:蛭石:珍珠石=2:1:1)，在轉殖溫室生長(圖 2L)。整個過程約在 12~14 月可獲得再生大豆植株。

三、大豆轉殖植株之之基因及表現分析

本研究約共進行了 11,200 個大豆子葉節的農桿菌基因轉殖，使用 100 mg/L hygromycin 進行轉殖大豆培植體的篩選過程中，大多數的培植體均褐化死亡；或後續誘導發根不易，芽梢枯萎死亡；或移出瓶外健化過程植株死亡，因此獲得的再生轉殖植株甚少。若使用 25~75 ppm hygromycin 進行轉殖大豆培植體的篩選，則大多數的再生植株幾乎為篩選逃脫植株(escape plants)。經過反覆檢測篩選基因及目標基因的 PCR 分析，可重覆及穩定偵測得到的再生大豆植株，只有轉殖 *7Sb-G510* 基因的轉殖植株。

含有 *7Sb-G510* 基因的大豆植株(轉殖載體為 pG510-1304-gus)之 PCR 方法分析是以 CTAB 法萃取大豆轉殖植株的總 DNA，經 PCR 方式以引子 A1、A2 偵測轉殖植株是否含有 *7Sb-G510* 基因。圖 3A 之分析結果顯示經電泳膠片分離 PCR 產物後，在再生轉殖植株 35S-G510-2 的 DNA 可增幅出預期 0.8 kb 的 *7Sb-G510* 片段，而 35S-G510-2 再生植株及對照組(CK)則無。此 0.8 kb 的 DNA 區域是涵蓋 *7Sb-G510* 基因的起始端(ATG)到插入 10 個 GMKGMR 套組的核酸序列。

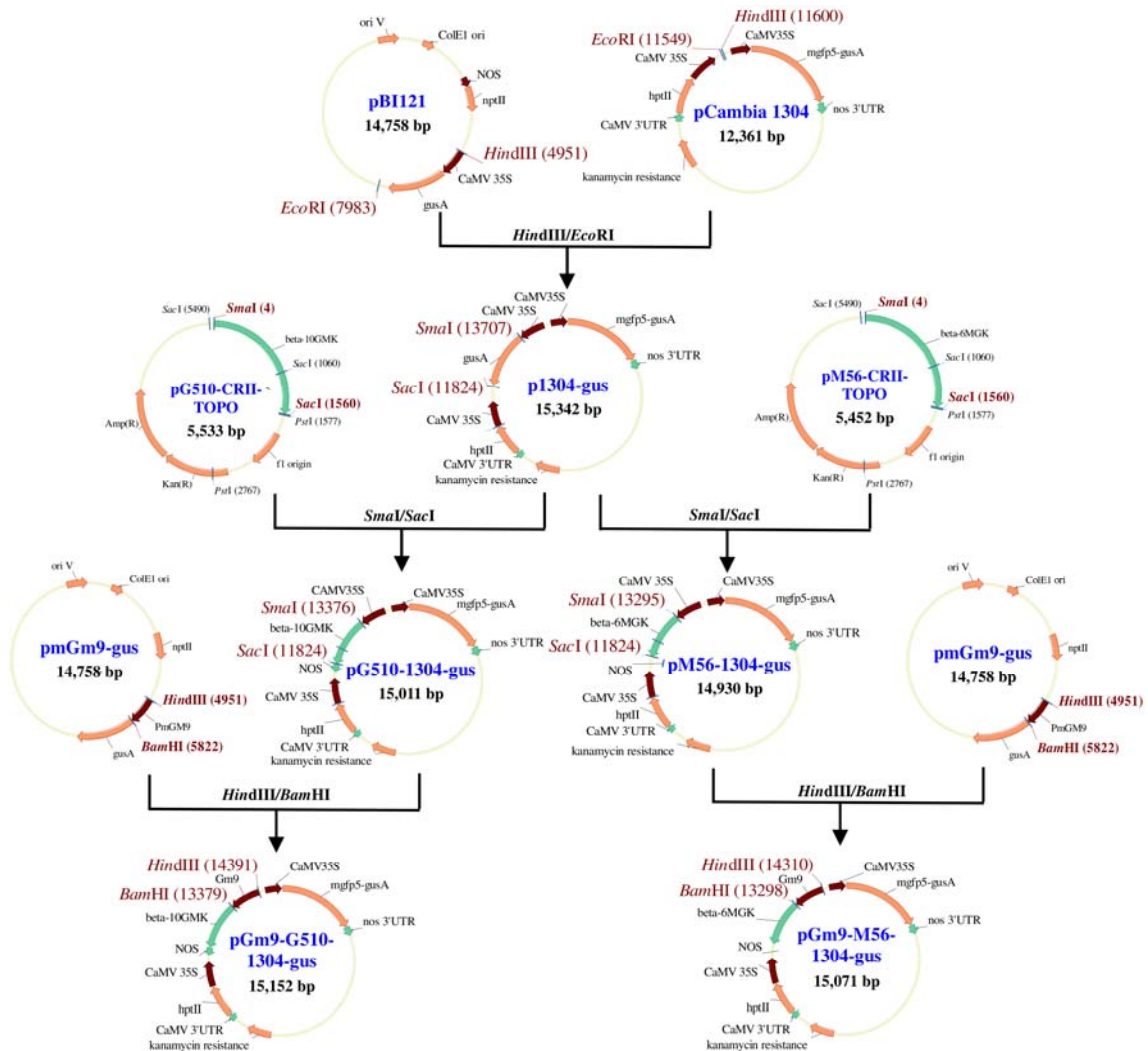


圖 1. 農桿菌轉殖之載體 pM56-1304-gus、pG510-1304-gus、pGm9-M56-1304-gus 及 pGm9-G510-1304-gus 之構築流程及限制酶圖譜。

Fig. 1. Construction scheme and restriction maps of *Agrobacterium* transformation vector pM56-1304-gus, pG510-1304-gus, pGm9-M56-1304-gus, pGm9-G510-1304-gus.

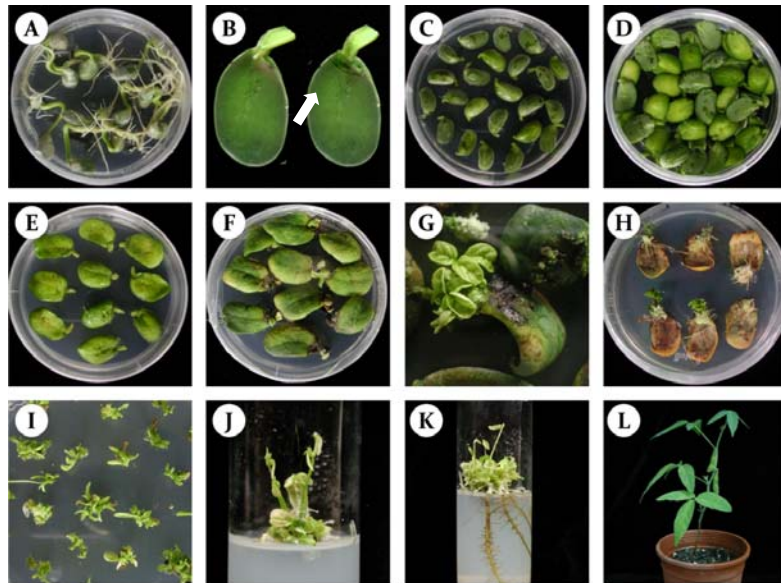


圖2. '高雄選10號'大豆經農桿菌感染轉移7Sb-M56及7Sb-G510基因之過程與誘導再生之情形。(A)大豆種子無菌播種於GM培養基，生長一週後之情形；(B)切取七天齡的大豆子葉(左)，切除頂芽並在子葉節上方進行刻傷(右)；(C)經刻傷的子葉節培與農桿菌培養於CCM培養基3天後之情形；(D)以含有500 mg/L carbenicillin的培養液浸泡子葉節，殺滅農桿菌；(E)子葉節培養於SIM培養基14天後之情形；(F)子葉節刻傷處誘導出芽體之情形；(G) 100 mg/L hygromycin 篩選28天後之芽梢生長情形；(H) hygromycin篩選，成活與死亡芽梢之比較；(I)~(J) 成活芽梢於SEM培養基進行誘導增殖及伸長之生長情形；(K) 於RM培養基進行誘導發根之生長情形；(L) 再生植株移出瓶外定植。

Fig. 2. Process of *Agrobacterium*-mediated transformation of 7Sb-M56 and 7Sb-G510 genes and regeneration of 'Kaohsiung Sel. No.10' soybean. (A) Soybean seeds were germinated *in vitro* for one week. (B) Cotyledon node of soybean seedling was cut (left), axillary bud was removed and 3-5 horizontal slices were made in the cotyledonary node region (right). (C) The explants were incubated in the co-culture medium (CCM) with *Agrobacterium* suspension for 3 days. (D) The explants were washed in a liquid SIM medium containing 500 mg/L carbenicillin to remove excess *Agrobacterium*. (E). The explants were cultivated in SIM medium for shoots induction for 14 days. (F). Shoots were emerged from the wounded tissue of the cotyledonary node region. (G). Shoots were grown in the SIM medium containing 100 mg/L hygromycin. (H) Selection of transformed explants was performed in the regeneration medium supplied with hygromycin. (I)~(J). Induction of shoot elongation and multiproliferation were performed in the SEM medium. (K). Induction of root formation was performed in RM medium. (L) The regenerated plants were transplanted to pots and grown in the greenhouse.

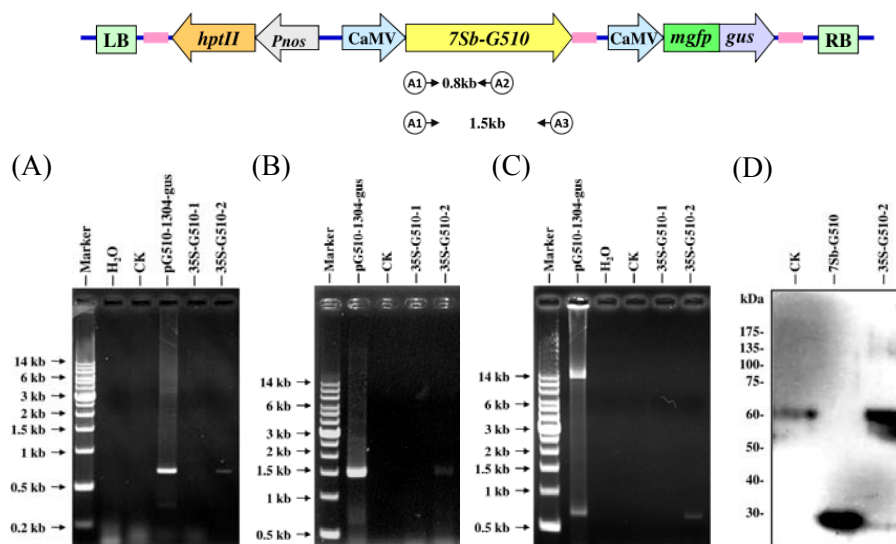


圖 3. 轉殖 pG510-1304-gus 質體的'高雄選十號'大豆葉片。(A) 以 A1、A2 為引子，經 PCR 分析 *7Sb-G510* 基因(0.8 kb)。(B) 以 A1、A3 為引子(1.5 kb)，經 RT-PCR 分析 *7Sb-G510* mRNA。(C) 以 A1、A2 為引子(0.8 kb)，經 RT-PCR 分析 *7Sb-G510* mRNA。(D) 葉片蛋白以 anti-MGK 為抗體經由西方墨點分析 *7Sb-G510* 蛋白之情形。CK：未經轉殖的大豆植株。

Fig. 3. Analysis of regenerated 'Kaohsiung No.10' soybean after transformed with pG510-1304-gus plasmid. (A) The part of *7Sb-G510* gene sequence (0.8 kb) was amplified from leaves DNAs using primers A1 and A2. (B) The part of *7Sb-G510* gene sequence was amplified from leaves DNAs using primers A1/A3 (1.5 kb). (C) and A1/A2 (0.8 kb) (D) Western blot analysis of *7Sb-G510* protein. Anti-MGK was used as antibody. CK: un-transformed soybean.

萃取轉殖再生大豆葉片的總 RNA，進行 RT-PCR 檢測，以檢測轉殖植物表現轉殖 *7Sb-G510* 之 mRNA 的情形。分析結果顯示無論以引子 A1、A3 (圖 3B)或引子 A1、A2 (圖 3C)檢測轉殖植株 35S-G510-2，均可偵測到 *7Sb-G510* 之 mRNA，分別為 1.5 kb 全長或 0.8 kb。證明轉移的 *7Sb-G510* 基因存在大豆葉片中，並轉錄出 *7Sb-G510* mRNA。

萃取 35S-G510-2 轉殖植株之蛋白，經 SDS-PAGE 分離，以對 GMK 胜肽具有特異性的抗體 anti-MGK 為探針，進行西方墨點分析。試驗結果顯示在 BL21(DE3)/pET21-*7Sb-G510* 中仍只能偵測到降解為 30 kDa 的 *7Sb-G510* 蛋白片段(圖 3D, Lane 2)，但在 35S-G510-2 轉殖植株可偵測到完整的 60 kDa 的 *7Sb-G510* 蛋白(圖 3D, Lane 3)。

四、轉殖大豆種子之抗 hygromycin 篩選與轉殖後裔植株(T1)之基因及表現分析

圖 4A 為轉殖 *7Sb-G510* 基因的大豆 T1 植株之 DNA，以 A1、A2 為引子，經 PCR 方式呈正反應的 11 個株系之分析結果，顯示可偵測到預期的 1.5 kb 的 *7Sb-G510* 基因，而未轉殖對照組(CK)則無，且 4-1 株系的 1.5 kb 條帶則不穩定。分析轉殖 *7Sb-G510* 基因的大豆 T1 植株表現轉殖 *7Sb-G510* 基因之 mRNA 的情形，顯示在 12 個株系，均可偵測到約 1.5 kb 的 *7Sb-G510* 基因之 mRNA (圖 4B)，而未轉殖對照組(CK)則無。

萃取 12 個 T1 大豆株系之蛋白，經 SDS-PAGE 分離，以對 GMK 胜肽具有特異性的抗體 anti-MGK 為探針，進行西方墨點分析。同時以 0.5 mM IPTG 只誘導 4 小時後，萃取 BL21(DE3)/pET21-7Sb-G510 蛋白質，進行西方墨點分析。試驗結果顯示在 BL21(DE3)/pET21-7Sb-G510 及 12 個 T1 大豆株系均能偵測到 60 kDa 的 *7Sb-G510* 蛋白(圖 5)，而未轉殖對照組(CK)則無。T1 種子之西方墨點分析之結果，也均能偵測到 *7Sb-G510* 蛋白 (圖 7)。本研究之初步分析的結果顯示，無論在 DNA、RNA 及蛋白質層次的檢驗中，均證實帶有十套 GMKGMR 的 *7Sb-G510* 基因及蛋白均存在於轉殖大豆的染色體，並遺傳到 T1 大豆的基因組中，轉錄出 *7Sb-G510* mRNA，轉譯出 *7Sb-G510* 蛋白。

進行 GUS 活性染色分析轉殖大豆 T1 葉片，能偵測到 GUS 藍色反應，而未轉殖對照組(CK)則無(圖 6)。GUS 藍色反應在轉殖大豆葉片的維管素組織(葉脈)表現最強(圖 6A)。

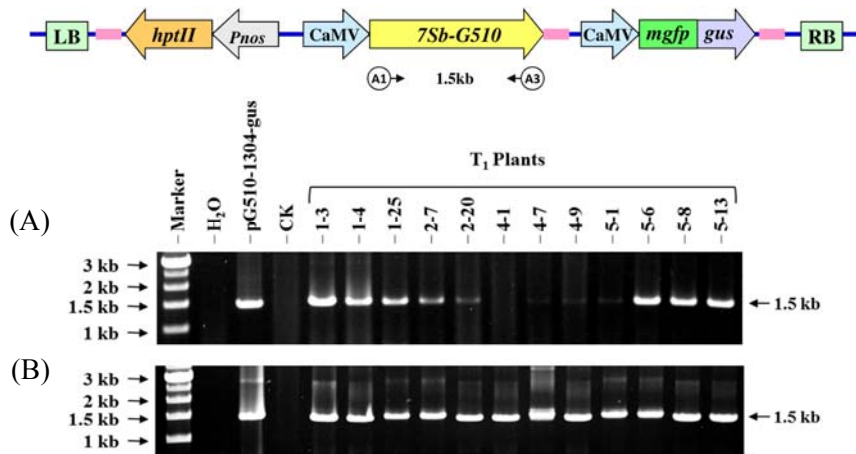


圖 4. 轉殖'高雄選十號'大豆 T1 葉片，(A) DNA 以 A1、A3 為引子(1.5 kb)，經 PCR 分析 *7Sb-G510* 基因 (1.5 kb) 之情形。(B) RNA 以 A1、A3 為引子(1.5 kb)，經 RT-PCR 分析 *7Sb-G510* mRNA，其產物在電泳膠片上分離的情形。CK：未經轉殖的植株大豆。

Fig. 4. Analysis of *7Sb-G510* mRNA in the T1 progeny of transgenic 'Kaohsiung No.10' soybean. (A) The part of *7Sb-G510* gene sequence (1.5 kb) was amplified by PCR from leaves DNAs using primers A1 and A3. (B) The part of *7Sb-G510* mRNA sequence was amplified by RT-PCR from leaves RNAs using primers A1/A3 (1.5 kb), and analyzed by electrophoresis. CK: un-transformed soybean.

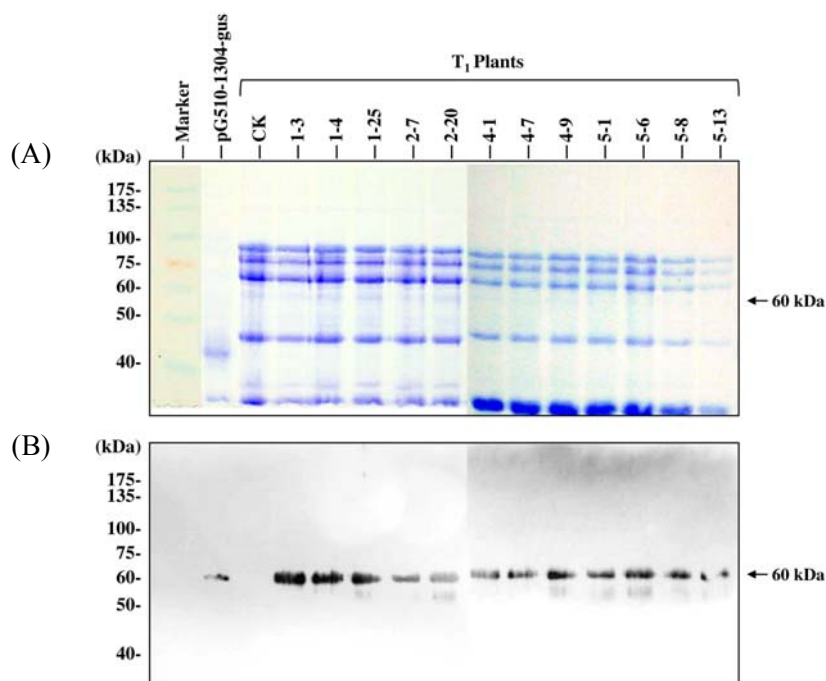


圖 5. 轉殖含 10 套 GMKGMR 之重覆套組的核酸片段的'高雄選十號'大豆 7Sb-G510 基因之大豆 T1 後裔的葉片蛋白，經 SDS-PAGE 分離 (A)；以 anti-MGK 為抗體經由西方墨點分析 7Sb-G510 蛋白之情形(B)。CK：未經轉殖的大豆植株。

Fig. 5. Western blot analysis of 7Sb-G510 protein in the leaves of T1 progeny of transgenic 'Kaohsiung No.10' soybean. Anti-MGK was used as antibody. CK: un-transformed soybean.

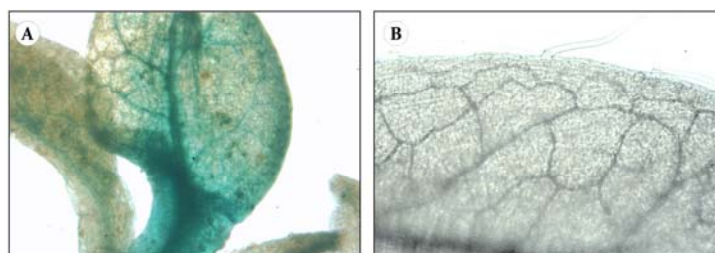


圖 6. 轉殖'高雄選十號'大豆 T1 植株(A)及對照組(B)，進行 GUS 活性染色分析之情形。CK：未經轉殖的大豆植株。

Fig. 6. Gus histochemical staining of the leaf in T1 progeny of transgenic (A) and un-transformed (B) 'Kaohsiung No.10' soybean. CK: un-transformed soybean.

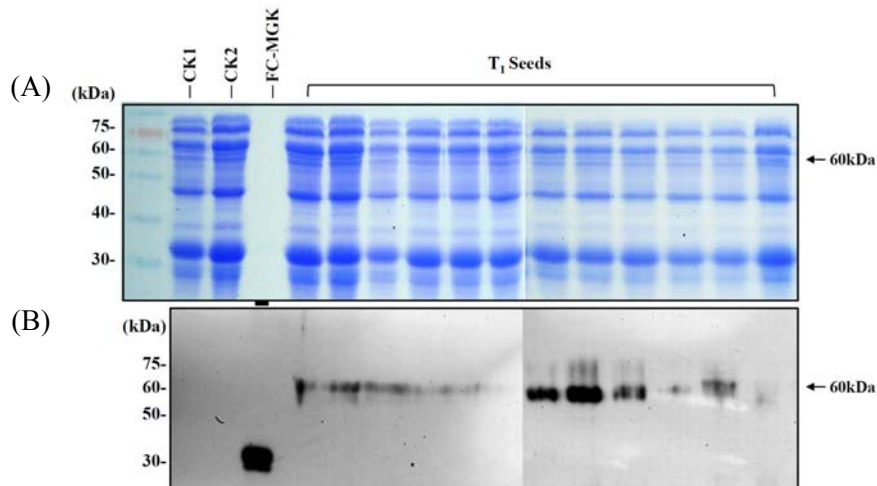


圖 7. 轉殖含 10 套 GMKGMR 之重覆套組的核酸片段的大豆 7Sb-G510 基因之大豆 T₁ 後裔的種子蛋白，經 SDS-PAGE 分離 (A)；以 anti-MGK 為抗體經由西方墨點分析 7Sb-G510 蛋白之情形(B)。CK：未經轉殖的大豆植株。FC-MGK：分液收集之純化含 GMKGMR 蛋白，分子量為 32kDa。

Fig. 7. Western blot analysis of 7Sb-G510 protein in the seeds of T₁ progeny of transgenic 'Kaohsiung No.10' soybean. Anti-MGK was used as antibody. CK: un-transformed soybean. FC-MGK: purified 7Sb-G510 protein, M.W. 32kDa.

討 論

一、四種轉殖載體之構築

本試驗共構築了四種適用於農桿菌介導的基因轉殖載體 pM56-1304-gus、pG510-1304-gus、pGm9-M56-1304-gus、pGm9-G510-1304-gus。7Sb-M56 及 7Sb-G510 基因分別構築到 *CaMV35S* 啟動子及 *Gm9* 啟動子，*CaMV35S* 啟動子是在植物中強及持續性表現的啟動子，*Gm9* 啟動子大豆種子專一性啟動子，其策略希望轉殖蛋白能有高度持續性在種子表現，達到大豆種子生產高單位胺基酸以取代魚粉之目的。其主要構築策略為以植物高效率表現載體 pCambia 1304 為基礎，插入 *CaMV35S/Gm9::7Sb-M56* 及 *CaMV35S/Gm9::7Sb-G510* 基因。pCambia 1304 上帶有 *mgfp-gusA* 報導基因及 *hptII* 篩選基因，方便以 hygromycin 篩選轉殖培植體及早期以綠色螢光及 GUS 染色偵測是否為轉殖植株。四種轉殖載體均經限制酶切割確認載體及基因的 DNA 片段大小正確，構築無誤，可在後續試驗中進行基因轉殖之用。

二、大豆農桿菌基因轉殖之培植體篩選及誘導植株再生

植物基因轉殖常用的方法包含農桿菌基因轉殖法與基因槍轉殖法。在 2001 年，Li 等人利用農桿菌與基因槍等兩個基因轉殖方法，分別轉殖抗黴菌的 chitinase (*chi*) 基因至大豆下胚軸，發現農桿菌基因轉殖的轉殖效率比基因槍轉殖效率佳。本試驗使用農桿菌 (LBA4404) 進行大豆農桿菌轉殖，以 hygromycin 作為大豆再生系統的篩選抗生素。Hygromycin 抗生素在蛋白質合成過程中會抑制肽鏈的延長，進而殺滅未轉殖的細胞，轉殖的植物細胞在 hygromycin 篩選之下，不受影響而存活，而達到篩選目的 (Olhoft *et al.* 2003)。本研究使用 100 mg/L hygromycin 進行轉殖大豆培植體的篩選，篩選過程中大多數的培植體均褐化死亡，特別是根生長受阻壞疽，或影響後續再生甚巨。如果 hygromycin 濃度太低，成活植株大多為逃脫篩選之未轉殖株。因此發展大豆基因轉殖系統中，建立完善篩選標基因與篩選藥劑的系統是首要工作。大多數大豆基因轉殖都是以大豆子葉節作為基因轉殖的標的材料，但是 Liu 等人 (2004) 比較大豆下胚軸、胚芽、子葉節等不同的培植體對轉殖效率的影響，發現胚芽的再生率比子葉節與下胚軸高 (Liu *et al.*, 2004)。是否以胚芽為基因轉殖的標的材料，可提高本試驗之轉殖效率，有待進一步研究探討。

本試驗中，培植體與農桿菌共培養的感染環境為 24°C，共培養時間為 72 小時，此乃參考 Uranbey 等人 (2005) 發現在此條件下共培養，再生植株經 GUS 染色分析，轉殖率百分比比較高的報導。篩選大豆培植體及誘導再生過程，培植體褐化是另一大問題。Dang 及 Wei (2007) 報導共培養之培養基維持在 pH 5.4 酸鹼環境下，共培養培養基添加 1 mM sodium thiosulfate、8.8 mM L-cysteine、1 mM DTT 可明顯增加轉殖效率及減少培植體的傷口褐化。Olhoft 等人 (2003) 也建議在大豆培植體與農桿菌共培養過程中，添加 L-cysteine、D-cysteine、sodium thiosulfate、glutathione、DTT 等硫醇類化合物，有助於增加 GUS 表現及減少培植體褐化的產生。其原因主要是硫醇類化合物可以抑制 polyphenol oxidase (PPO) 及 peroxidase (POD) 的酵素活性，DTT 也可抑制 POD 的酵素活性 (Okpuzor and Omidiji 1998)。

Kaneda 等人 (1997) 比較不同的培養基及不同的細胞分裂素對大豆子葉節與下胚軸等培植體再生的影響，發現大豆培植體在含有 2 mg/L TDZ 的培養基中再生能力比含有 1.15 mg/L BA 培養基的再生能力佳。在不同培養基分別都添加 2 mg/L TDZ 的研究，以 1/2 B5 培養基影響大豆再生效果較其他培養基佳 (Kaneda *et al.*, 1997)。Franklin 等人 (2004) 探討不同濃度的 TDZ 及 BA 培養基對大豆培植體再生再生之影響，發現成熟培植體再生率比未成熟培植體佳，且含有 TDZ (4.54 μM) 與 BAP (13.3 μM) 的培養基再生效果較好 (Franklin *et al.*, 2004)。所以在本試驗中，選用添加含有 TDZ 與 BAP 的 B5 培養基作為大豆再生培養基。

三、大豆轉殖植株之基因及表現分析

本研究所獲得的轉殖基因植株，先以 PCR 分析進行初步的檢測，此方法在初步篩選轉殖植株時具有方便性與時效性。萃取農桿菌轉殖後再生的大豆植株的 DNA，以專一性

極高的引子 A1 與 A2 引子進行 PCR 分析，偵測目標基因 *7sb-G510*。其結果顯示在四種載體的轉殖植株中，僅有轉殖 pG510-1304-gus 有 1 棵轉殖再生植株(35S-G510-2)有 0.8 kb 的 *7sb-G510* 基因，所以確認目標基因帶有 10 套的 GMKGMR 序列的存在。以 RT-PCR 及西方墨點分析轉殖植株(35S-G510-2) 更證實了 *7sb-G510* 在轉殖大豆中表現出其 mRNA 及大約 60kDa 的 7Sb-G510 蛋白。

四、轉殖後裔植株(T1)之基因及表現分析

本研究以 PCR、RT-PCR 與西方墨點等方法分析大豆 T1 後裔，探討轉殖基因是否穩定遺傳於下一代植株。轉殖植株的種子經過 100 mg/L hygromycin 抗生素篩選後，成活苗株種植於溫室。萃取其植株的 DNA，以 A1 與 A3 引子進行 PCR 分析，偵測 *7Sb-G510* 基因。檢測 84 株 T1 後裔，有 12 株的植株可偵測到具有 1.5 kb 的 *7Sb-G510* 條帶。RT-PCR 分析 T1 後裔之基因表現情形顯示，此 12 株植株均可轉錄出 *7Sb-G510* mRNA。西方墨點分析可明顯的偵測到其中 10 株大豆 T1 植株表現 7Sb-G510 蛋白，另 2 株的 7Sb-G510 蛋白表現則較弱。本研究中，獲得 12 株大豆 T1 轉殖株系，無論在 DNA、RNA 及蛋白質層次的檢驗中，均證實帶有十套 GMKGMR 的 *7Sb-G510* 基因。*7Sb-G510* 基因及蛋白在轉殖大豆的遺傳穩定性及改造蛋白的胺基酸組成，還有待分析穩定後裔才能確知。

參考文獻

- 張靜芬。2011。魚粉業推動永續魚粉產業。國際漁產貿易訊息 96: 7-9。台北市：中華民國對外漁業合作發展協會。
- Dang, W. and Z.-m. Wei. 2007. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Science* 173: 381-389.
- Franklin, G, L. Carpenter, E. Davis, C.S. Reddy, D. Al-Abed, W. Abou Alaiwi, M. Parani, B. Smith, S.L. Goldman and R.V. Sairam. 2004. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons. *Plant Growth Regulation* 43: 73-79.
- Kaneda, Y., Y. Tabei, S. Nishimura, K. Harada, T. Akihama, and K. Kitamura. 1997. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Reports* 17(1): 8-12.
- Liu, H.-K., C. Yang, and Z. M. Wei. 2004. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta* 219: 1042-1049.
- Maruyama, N., M. Adachi, K. Takahashi, K. Yagasaki, M. Kohno, Y. Takenaka, E. Okuda, S. Nakagawa, B. Mikami, and S. Utsumi. 2001. Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. *Eur. J. Biochem.* 268: 3595- 3604.
- Olhoft, P. M., L. E. Fligel, C. M. Donovan, and D. A. Somers. 2003 Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216:723–735.
- Okpuzor, J. and O. Omidiji. 1998. Peroxidase-polyphenol oxidase association in *Dioscorea esculenta*. *Z Naturforsch* 53C:957-960.
- Uranbey, S., C. Sevimay, M. D. Kaya, A. İpek, C. Sancak, D. Basalma, C. Er and S. Özcan. 2005. Influence of different co-cultivation temperatures, periods and media on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *Biologia Plantarum* 49: 53-57.

Engineering of Soybean β -Conglycinin β -Subunit Genes for the Production of High Quality Soybean Proteins in Aquaculture Feeds

Jun-Shian Yu ¹⁾ I-Hsiang Tsai ²⁾ Ming-Te Yang ³⁾
Wen-Hwei Hsu ⁴⁾ Menq-Jiau Tseng ⁵⁾

Key Words : Soybean, β -Conglycinin β -Subunit, Aquaculture Feed

Summary

Aquaculture is an important sector of fishery industry in Taiwan. Stable income of aquaculture is dependent on the price of fish meal. However, fish meal is in short supply and expensive, it is necessary to develop new product to substitute for the fish meal in aqua feeds. The high protein content, balanced amino acid composition, steady supply, and low cost of soybean made the derived products to be the ideal ingredients to replace the fish meal. The intrinsic limitations associated with soybean seed protein are low methionine, lysine content and poor palatability for fish. Attempts had been made to modify the soybean β -subunit of β -conglycinin gene (*7Sb*) by inserting the nucleotides of six and ten repeats of MGKMGR (*7Sb-M56*) and GMKGMR (*7Sb-G510*), respectively, so as to modify the amino acid composition of the soybean protein as a remedy.

The modified *7Sb* genes driven by the *CaMV35S* or *Gm9* promoter (soybean seed-specific) had been sub-cloned onto pCambia 1304 vector. These plasmids were used for soybean transformation. Cotyledon nodes were used as explants for transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr cv. 'Kaohsiung 10'] by *Agrobacterium*-mediated transformation. The transformed explants were selected with 100 ppm hygromycin. The regenerated plants and T1 progeny were examined by PCR, RT-PCR, and western blots. T1 progenies of *7Sb-G510* transgenic soybean were confirmed as evidenced by the presences of *7Sb-G510* gene, *7Sb-G510* mRNA, and *7Sb-G510* protein.

1) Student in M.S. Program, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.

2) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Associate Professor, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.

4) Professor, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.

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