

構築含無啟動子報導基因之可誘導轉位子

常玉強*、謝嘉珊

國立臺灣大學農藝學系

摘要

轉位子(*Activator*, *Ac*)為研究功能基因體學之重要工具，然而大多數轉位子或 T-DNA 必須創造同源突變體後才能研究功能基因。為了可在異源突變體中研究功能基因，本試驗將先前構築之可誘導轉位子 *INAc* 改造成含有報導基因的轉位子，稱為 *INAcEGFP*。此報導基因為一無啟動子(promoterless)之報導基因，當轉位子以正方插入一個啟動子下游附近時，報導基因就會表現。試驗中並將 *INAcEGFP* 轉殖於水稻中，共得到 51 個獨立的轉殖系，其中有 5 個轉殖系之轉位子自動轉位，自動轉位比率為 9.8 %。並以水楊酸(salicylic acid, SA)和 5-Azacytidine (5-Azac)為誘導劑處理 11 個轉殖系之水稻癒合組織細胞，成功地誘導 *INAcEGFP* 轉位。更進一步，*INAcEGFP* 轉位子或 T-DNA 所插入之水稻基因也成功的定序出來。因此，利用此系統不只可成功的應用在基因鈎取(gene tagging)上，亦可應用於啟動子捕捉上(promoter trap)。

關鍵詞：水稻、可誘導轉位子、基因鈎取、基因捕捉、報導基因。

Construction of an Inducible Transposon with Promoterless Reporter Gene

*通信作者, bocharng@ccms.ntu.edu.tw

投稿日期：2004 年 2 月 10 日

接受日期：2004 年 3 月 4 日

作物、環境與生物資訊 1:89-101 (2004)

Crop, Environment & Bioinformatics 1:89-101 (2004)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan (ROC)

Yuh-Chyang Charng* and Chia-Shan Hsieh

Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan (ROC)

ABSTRACT

Transposon tagging has become one of the powerful tools to create mutants for isolating new genes. A fusion of the SA inducible promoter (*PR-1a*) with the *Ac* transposase gene was constructed and designated *INAc* previously. Its excision can be induced by inducer (SA). In this study, a promoterless reporter gene *EGFP* was inserted into *INAc* to generate a new inducible transposon, termed *INAcEGFP*. This new construct allows the possibility to study gene function in heterologous mutant. *INAcEGFP* was transformed into rice plant and 51 independent transgenic lines were generated. Spontaneous transposition events were detected in 5 out of these transgenic lines. The other transgenic rice lines were induced by SA and yielded high transposition frequencies. Furthermore, the flanking sequence of T-DNA and transposed *INAcEGFP* could be obtained. Thus, the *INAcEGFP* system could be a powerful tool for promoter/gene trap.

Key words: Rice, Transposon, Inducible promoter, Reporter gene.

前言

穀類作物為全世界最重要的糧食作物，水稻同時為單子葉分子生物學研究的模

縮寫字：Ac, *activator*; SA, salicylic acid; 5-Azac, 5-Azacytidine; Ds, dissociation; EGFP, enhanced green fluorescent protein; hpt, hygromycin phosphotransferase gene; INAc, inducible activator; LUC, luciferase; NOS, Nopaline synthase.



式植物，因為在主要穀類作物(包括玉米、小麥、大麥、高粱等)中，水稻的基因組最小(Arumuganathan and Earle 1991)，為 4.3×10^8 bp。又水稻容易進行基因轉殖且效率高(Hiei *et al.* 1994)，並且，在穀類作物基因之核酸序列具高度相似性。因此，了解水稻基因功能可以幫助分離其他穀類類似之基因。如今，水稻的序列已接近全部解碼，其後之工作便是如何利用已解碼的水稻序列與基因功能進行連結。水稻的基因數目一般預估約在 32,000 至 55,000 之間(Greco *et al.* 2003)，然而大部分的基因尚未了解其功能，需要經過試驗才能確認其功能。功能基因體學(functional genomics)目的是找出基因與性狀之間的關係，而研究功能基因體學目前最有效率的方法為建立插入型突變株庫(insertion mutagenesis database)，之後再將 DNA 序列和突變體的訊息進行整合。

本試驗利用 *Activator* (*Ac*)轉位子創造插入型突變株。Barbara McClintock 於 1947 年在玉米中發現 *Ac* 可自動轉位於基因間並可外作用於(*trans-activate*)另一組非自動轉位子 *Dissociation* (*Ds*)，趨動 *Ds* 之轉位。*Ac-Ds* 在 1984 年被德國 Starlinger 選殖並定序(Müller-Neumann *et al.* 1984)，經過進一步研究發現：(1) *Ac* 由 4565 bp 組成，並含有轉位酶基因。(2) *Ds* 與 *Ac* 之差別僅在於 *Ds* 缺少(或突變)了 *Ac* 之轉位酶基因。(3) 一最小之 *Ds* 僅含 *Ac* 之兩端各 250 bp 即可被 *Ac* 活化而轉位(Haring *et al.* 1991)。利用 *Ac/Ds* 轉位子進行基因釣取已成功地應用在其他原無 *Ac* 轉位子之植物，如煙草、番茄、阿拉伯芥等，亦釣取出抗病基因、雄不孕基因(Aarts *et al.* 1993, Jones *et al.* 1994, Whitham *et al.* 1994)，在水稻中也成功地利用自動轉位子 *Ac* 創造水稻突

變株(Enoki *et al.* 1999, Greco *et al.* 2001, Kohli *et al.* 2001)。

創造插入型突變株的方法有基因功能消除法(gene knock-out)、活化標結法(activation tagging)及基因釣取法(gene trap)。大多插入型突變法需以同源突變體執行，而基因捕捉法是為插入型突變法衍生出之技術，能彌補插入型突變法之不足之處，使之更具實用性。方法為將無啟動子之報導基因(promoterless reporter gene)建構於 T-DNA 或轉位子之端點，並送入植物基因體中，即可藉由報導基因之表現偵測被插入基因之特性，並且不需自交即可在當代植株直接觀察報導基因之表現。利用轉位子或是 T-DNA 創造突變株以建立資料庫對於研究植物基因功能極有益處，不過仍有些許問題存在，例如轉位子的轉位行為、轉位次數等均影響其實用性，為了解決這方面的問題，於是本試驗嘗試在水稻中利用可誘導轉位子，以控制轉位子的轉位行為，並加入一無啟動子之報導基因捕捉水稻中之啟動子，期望在水稻中可誘導轉位子系統能專一地受到誘導劑誘導而進行轉位，以創造水稻突變株，並且利用啟動子捕捉法找尋水稻中之啟動子。

材料與方法

一、質粒的構築

建構 *INAcEGFP* 流程主要可分為五個部分(Fig. 1)：無啟動子之報導基因 *EGFP* (Enhanced Green Fluorescent Protein)、植物的篩選標誌基因 *hpt* (hygromycin phosphotransferase gene)、可誘導轉位子 *INAc* (inducible *Activator*)、另一報導基因 *LUC* (luciferase)以及雙偶載體(binary vector) pPZP200。無啟動子之報導基因來源自



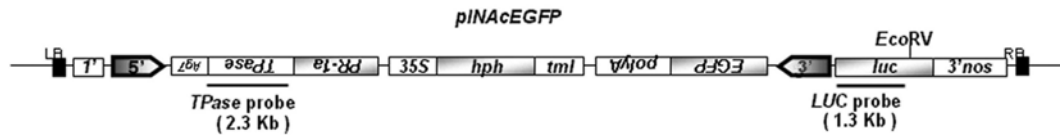


Fig. 1. Schematic representation of the construction of the inducible transposon *INAcEGFP*. LB, left border; RB, right border; 1', 1' promoter; *luc*, luciferase gene; 3'*nos*, nopaline synthase gene (*nos*) 3'UTR; 5' and 3', *Ac* left and right terminal-inverted repeat; *PR-1a*, inducible promoter; *TPase*, transposase; *Ag7*, poly(A); 35S, the cauliflower mosaic virus 35S RNA (CaMV35S) promoter; *hph*, hygromycin B phosphotransferase; *tml*, tumor morphology large gene 3'UTR; *EGFP*, enhanced green fluorescent protein.

pBS/EGFP, 其包含 EGFP 以及 poly(A), 植物的篩選標誌基因以 *Pst* I 和 *EcoRI* 自 pTRA151(Zheng *et al.* 1991)切下後, 接入相同切位的 pBS/EGFP 中, 成為 pEGFP35H。轉位子 3 端序列(*Ac* 3')是由先前構築之質粒 pLucAcHygPR (Chang *et al.* 2000)為鑄模進行 PCR, 擴增出一段大約 340 bp 長的片段, 所使用的 5'端引子(3F)序列為: (CGTACTCGAGCCCGGGGTGTGCTCCAGATTTATA), 畫底線序列為 *Xho* I 以及 *Sma* I 辨認的序列, 3'端引子(3R)序列為: (ACATGTCGACTTTCTAGAGGATCCGCGC), 畫底線序列為 *Sal* I 辨認的序列。再將 *Ac* 3'以 *Sal* I 和 *Xho* I 切下後接至含有 *LUC* 基因及終結子為 *Nos* (Nopaline synthase 基因)的質粒 pBS/LN 中, 成為 pBS/3'LN。將 pBS/3'LN 以 *Not* I 和 *Xho* I 酶切後之片段補成齊頭端, 與 pEGFP35H 以 *Sal* I 酶切後補成齊頭端之載體進行接合反應, 接合成功後之質粒稱為 pEGFP35H3'LN。而可誘導轉位子 *INAc* 基因來源自本實驗室先前構築的質粒 p1'AsTRPΔ, 由於要將此 DNA 片段切下之限制酵素辨認序列有重複, 所以必須進行不完全酶切反應(partial digestion), 以得到正確的 DNA 片段。所使用之限制酵素為 *EcoRI* 與 *HindIII*, 不完全酶切反應之後純化出約 5.2 Kb 大小之片段, 將之接入相同切位之 pBC 中, 稱為 pBC/TPase。

pBC/TPase 再以 *Sac* I 和 *Sal* I 切下後, 接入相同切位的 pPZP200 (Hajdukiewicz *et al.* 1994)雙偶載體(binary vector), 將此質粒稱為 pPZPTase。將 pPZPTase 以 *Sal* I 酶切後補成齊頭端載體, 與質粒 pEGFP35H3'LN 以 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切後, 補成齊頭端之片段進行接合反應, 成為一大小為 17.2 Kb 的質粒, 其中包含無啟動子報導基因之可誘導轉位子序列大小為 7.8 Kb, 命名為 *INAcEGFP*。

二、水稻基因轉殖

取水稻(*Oryza sativa* L. cv TNG 67)開花後約 10-15 天之未成熟種子, 去內外穎, 加 70% 酒精浸泡 5-10 秒鐘, 隨即倒掉, 再以無菌水沖洗。於無菌操作檯中, 將 1% 次氯酸鈉 30ml 消毒種子約 1.5-2 小時, 加入 1 滴的 Tween 20 介面活性劑。之後以無菌水沖洗數次, 移至癒合組織誘導培養基(CIM; callus induction medium)中(Toki 1997), 二到三週後選取新誘導癒合組織利用農桿菌轉殖(Hiei *et al.* 1994, Toki 1997)。使用農桿菌系為 LBA4404。

轉殖後, 將癒合組織置於 2N6-CH 培養基中, 28°C 全日照環境, 進行第一次篩選。約 3-4 週可以獲得帶有 hygromycin 抗性的癒合組織, 若有增生現象的癒合組織, 將移至 CIM-CH 培養基中, 28°C 全日照環境, 進行第二次篩選。最後, 將帶有



hygromycin 抗性的癒合組織移到分化培養基 RM, 28°C 全日照環境, 約 3-4 週可以得到轉殖水稻。

三、南方氏墨點分析

水稻染色體 DNA 之抽取參考 Shue *et al.* (1996) 之方法, 取植株葉片, 在研鉢中以液態氮磨成粉末後, 置於 2 ml 微量離心管中約半滿。加入 0.7 ml 的 Urea extraction buffer (7M urea, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1% sarcosine), 及 0.7 ml phenol / chloroform / isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 混合均勻後, 靜置於室溫下 15 分鐘, 以 8000 rpm 離心 10 分鐘, 吸取上清液至新的微量離心管中, 並加入 1/10 體積 NaOAc (pH 5.2) 及 1 ml IPA, 均勻混合。以微量吸管將 DNA 勾出, 置於 70% 酒精中。以 70% 及 100% 酒精分別清洗 DNA 各一次, 乾燥後將染色體組 DNA 溶於適當體積的 TE 緩衝液, 保存於 4°C。

取 20 µg 水稻染色體組 DNA, 加入 60 units 限制酵素 *EcoRV* 進行酵素反應。將總體積濃縮成 35 µl, 於 0.8% 的瓊脂膠體中進行電泳, 電壓大小為 35 V, 電泳時間約為 14 h。將 DNA 轉漬至尼龍膜, 並利用 DIG 標定探針, 進行雜合反應。

四、以水楊酸處理水稻癒合組織

將轉殖後具 hygromycin 抗性的水稻癒合組織, 移至含有水楊酸 (salicylic acid, SA) 和 5-Azacytidine (5-Azac) 的 CIM-H (callus induced medium-hygromycin) 培養基, 以三種不同濃度之 5-Azac 進行誘導處理 (0 mM、0.1 mM、1 mM), 水楊酸之濃度則固定為 5 mM。處理 5 天後, 將癒合組織再移回 CIM 培養基。經過 14 天培養之後, 抽取染色體組 DNA。

五、PCR 法檢測轉殖株及轉位子轉位情形

設計兩組專一引子, 一組為 3F (5'-CG TACTCGAGCCCCGGGGTGTGCTCCAGATTATA-3')、Luc2 (5'-GCGGGCGCAACTGCAACTCC-3'), 另一組為 1' (5'-TCCTTCGCAAGACCCTTCCT-3')、Luc2。PCR 反應程式設定為:

94°C 1 分鐘, 一次循環; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分鐘, 35 次循環。72°C 5 分鐘, 一次循環。

六、Thermal asymmetric interlaced (TAIL-) PCR

利用 TAIL-PCR 技術 (Liu *et al.* 1995) 分析插入基因體 DNA 之轉位子或 T-DNA 側翼序列 (flanking sequence), 設計三個為一組織專一引子, 於本試驗中共使用了四組專一之引子, 分別是

(luc-1: 5'-GTTGCGCGAGGAGTTGTGTTTG-3', luc-2: 5'-CTCATAAAGGCCAAGAAGGGC-3', luc-3: 5'-GAAGGGCGGAAAGTCCAAATTG-3')、(1P-1: 5'-GAATAGATACGCTGACACGCCAAG-3', 1P-2: 5'-CGCTTTACAGCAAGAACGGAATGC-3', 1P-3: 5'-GGTGACGCCATTTTCGCTTTTCAGA-3')、(5'-1: 5'-GGAGCTGGCCATATTGCAGTCATC-3', 5'-2: 5'-TATCCCGTTTCCGTTCCGTTTTTCG-3', 5'-3: 5'-GGTTATACGATAACGGTCGGTACG-3') 和 (3'-1: 5'-CGGGGTGTGCTCCAGATTTATATGG-3', 3'-2: 5'-GATTTGACTTTAACCAGACCGGA-3', 3'-3: 5'-CGTTTTTCGTTACCGTGTGTCCCG-3'), 並設計兩組 AD (arbitrary degenerate) 引子, 分別為

AD1: 5'-NTCGA(G/C)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT-3', AD2: 5'-NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA-3', AD3: 5'-(A/T)GTGNAG(A/T)ANCANAGA-3' 和 AD4: 5'-TG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(G/C)AGA-3',



AD8:5'-(G/C)TTGNTA(G/C)TNCTNTGC-3',
AD9:5'-(A/T)CAGNTG(A/T)TNGTNTCTG-3'。

電泳分析 PCR 之產物後，回收 TAIL-PCR 第三次步驟的 DNA 片段，接到 pGEM-T easy vector (Promega, USA)，以 T7，SP6 引子定序，結果與 National Center of Biotechnology

Information (NCBI) BLAST 伺服器 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)及 TIGR (The Institute for Genome Research; <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/BAcmapping/description.shtml>) 資料庫，利用 Blast 法進行比對。

Table 1. Spontaneous transposition of the *INAcEGFP* in primary transformed rice plants. PCR analyses were performed by using two sets of primers. "+" indicates the existence of the predicted product. "-" indicates no PCR product was yielded. Plants regenerated from the same callus were indicated by alphabetic letters.

Line	Primer		Line	Primer	
	3F & Luc2	1' & Luc2		3F & Luc2	1' & Luc2
C-1	+	+	C-34	+	-
C-2	+	-	C-35	+	-
C-3A	+	-	C-37	+	-
C-3B	+	-	C-38	+	-
C-4	+	-	C-39	+	-
C-5	-	-	C-40	+	-
C-6	+	-	C-41	+	-
C-7	+	-	C-43	+	-
C-8	+	-	C-44	+	+
C-9A	+	-	C-48	+	-
C-9B	+	-	C-49	-	-
C-10	+	-	C-50	+	-
C-11	+	-	C-52	+	-
C-12A	+	-	C-53	-	-
C-12B	+	-	C-54A	+	-
C-12C	+	-	C-54B	+	-
C-14	+	-	C-55	+	-
C-15A	+	-	C-57	+	-
C-15B	+	-	C-62	+	-
C-18	+	-	C-63	+	-
C-20	-	-	C-65	+	-
C-21	+	-	C-67	+	-
C-22A	+	-	C-68	-	-
C-22B	+	-	C-72	+	-
C-23	+	+	C-78	+	+
C-26	+	+	C-79	+	-
C-27B	+	-	C-80	-	-
C-28	+	-	C-82	+	-
C-30A	+	-	C-83	+	-
C-30B	+	-	C-85	+	-
C-31	-	-	C-88	+	-
C-32A	+	-	C-89	-	-
C-32B	+	-	C-92	+	-
C-33	+	-	C-94	+	-



結果

一、轉殖水稻之獲得

將得到正確之構築後進行水稻轉殖。利用水稻臺農 67 號(TNG 67)幼胚衍生之癒合組織為材料，經農桿菌轉殖後，以 50 mg l⁻¹ hygromycin 篩選後，得到抗 hygromycin 的癒合組織後，將之移至分化培養基誘導植物再生，一共得到 59 個轉殖系、共 68 株的再生水稻，將 59 個轉殖系分別命名為 C-，其後附隨轉殖株之編號(Table 1)。

二、利用 PCR 檢測 T0 世代轉殖水稻之轉位

為了快速檢測轉殖基因是否成功轉入

水稻基因體中，並了解轉位子是否還留在 T-DNA 原插入位置，試驗中以 PCR 進行分析(Fig. 2A)。其中以 3F、Luc2 這一組引子進行 PCR 擴增反應時，若植株確實為轉殖株並且轉位子仍留在 T-DNA 原插入位置，PCR 之結果會增殖出約 670 bp 大小的片段。另一組引子 1'、Luc2 則可以檢測轉位子是否已跳離原插入位置，若轉位子已跳離 T-DNA 原插入位置，可增殖出大約 590 bp 大小的片段，若轉位子沒有跳離，則無法增殖出任何片段，因為從引子 1'到引子 Luc2 之間 DNA 大小約為 8.2 Kb，PCR 擴增反應條件無法有效增殖這麼大的片段(Fig. 2)。在檢測的 59 個轉殖系、共 68 株轉殖水稻之結果中，共得到 51 個正確的轉殖系(轉基因

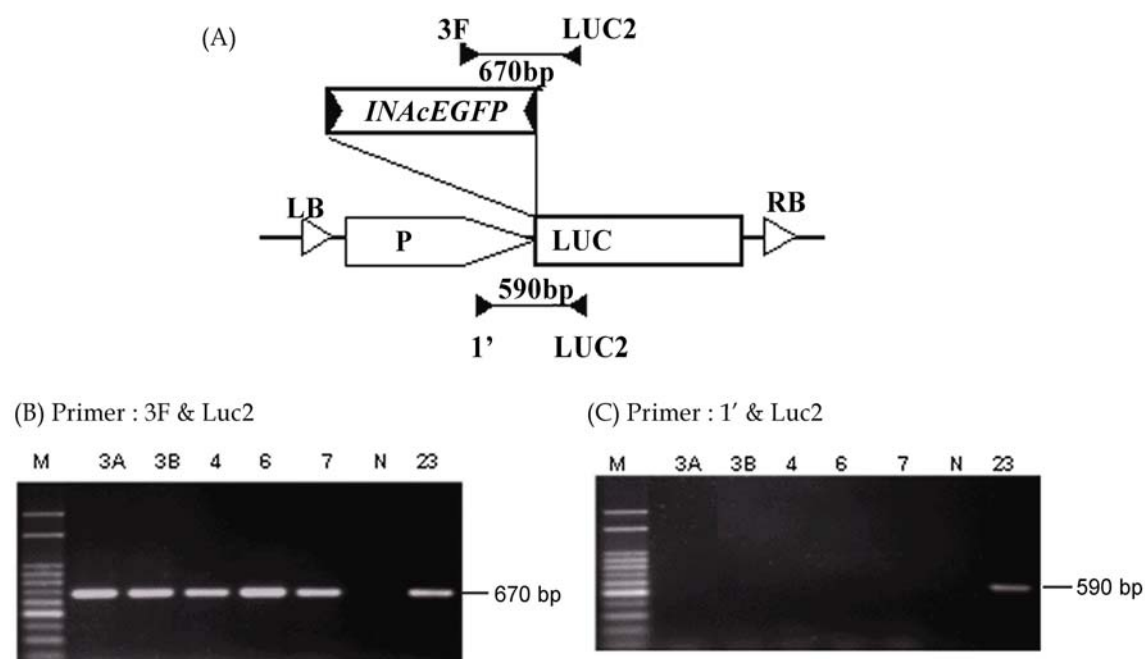


Fig. 2. PCR analysis of *INAcEGFP* excision. (A) Structure of the *INAcEGFP* element and the location of primers (shown as solid triangles) used for PCR analysis. The sizes of expected PCR products (670 and 590-bp before and after excision of *INAcEGFP*, respectively) are indicated. (B) & (C) Ethidium bromide-stained agarose gel on which PCR products were separated. PCR was performed with genomic DNA from the indicated transformants and with the indicated primers. Lane M, 100-bp DNA ladder. Abbreviations: LB and RB, left and right borders of T-DNA; p, 1' promoter; LUC, luciferase gene.

成功轉入水稻基因體中)，比例為 86.44% (正確轉殖系/總轉殖系) (Table 1)。其中，又有 5 個轉殖系之水稻未受水楊酸誘導即轉位(即自動轉位)，分別為 C-1、C-23、C-26、C-44、C-78。此結果顯示 *INAcEGFP* 在水稻中即使不受水楊酸誘導也可以轉位，其自動轉位比率為 9.8 % (自動轉位之轉殖系/總轉殖系)。

三、T₀ 世代之轉殖基因分析

以 *luc* 基因為探針的試驗結果顯示，轉殖基因的拷貝數介於 1-3 個 (Fig. 3A)。另外，為了偵測轉位子轉位情形，試驗中以 *TPase* 基因為探針進行雜合反應 (Fig. 3B)，若是轉位子已轉位，或轉位之後又插入至水稻基因組的其他位置，則偵測到的片段大小和數目，會與以 *luc* 基因為探針之結果相異。C-1、C-44 利用兩種探針雜合結果，皆

有出現不同的條帶差異，顯示這兩個轉殖系皆為自動轉位之水稻轉殖株，與先前以 PCR 檢測轉位子轉位結果相符。其中使用 *TPase* 基因為探針的分析結果中，與以 *luc* 基因為探針之結果比較，C-1 以 *luc* 基因為探針所偵測到的條帶大小約為 24.6 Kb 和 22.2Kb，而以 *TPase* 基因為探針所偵測的結果多了一個條帶大小約為 6.5 Kb；C-44 以 *luc* 基因為探針所偵測到的條帶大小約為 23.7 Kb 和 4.1 Kb，而以 *TPase* 基因為探針所偵測的結果則是少了 4.1 Kb 的條帶。

四、以水楊酸誘導轉位子之轉位

前述結果已證明 *INAcEGFP* 轉位子可在水稻中自動轉位，而本試驗之主要目的為誘導含 *INAcEGFP* 轉位子之水稻受誘導後執行轉位。因此選擇未發生自動轉位之水稻轉殖株執行誘導實驗。試驗中將轉殖後具

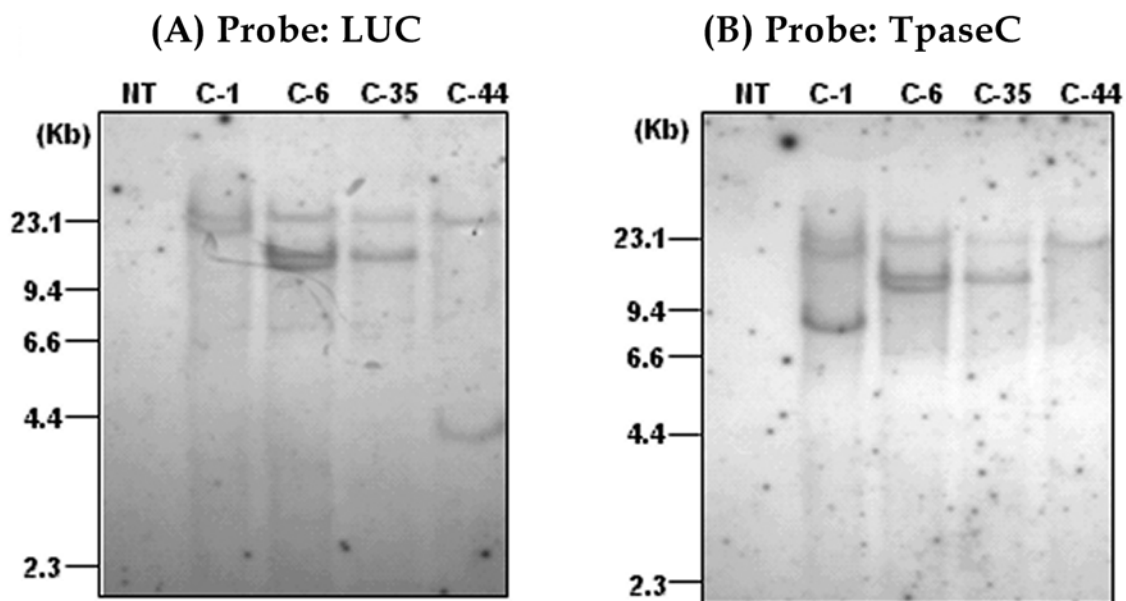


Fig. 3. Southern blot hybridization of *Eco* RV digested genomic DNAs isolated from different transgenic rice lines with the LUC probe or with the TPase probe (for construction see Fig. 1). The LUC probe (A) revealed the T-DNA copy and together with the TPase probe (B) revealed the un-transposed or transposed *INAcEGFP*.

hygromycin 抗性的水稻癒合組織，移至含有水楊酸(SA)和 5-Azac 的 CIM-H (callus induced medium-hygromycin)培養基，水楊酸可誘導 *PR-1a* 啟動子表現，使下游轉位酶基因表現而產生轉位酶，使得轉位子進行轉位；5-Azac 為一去甲基化藥劑

(demethylating agent)，功能為延緩 DNA 複製時的甲基化，造成在 DNA 複製時，細胞中存在單股 DNA 的時間延長，期望轉位子就是在這段時間進行轉位(Scortecci *et al.* 1997)。分析轉位效率時以經過 SA 和 5-Azac 處理的水稻癒合組織染色體組 DNA 當作模

Table 2. PCR analysis of rice calli treated with SA and 5-Azac. "+" indicates the existence of the predicted product. "-" indicates that no product was yielded.

Line	Concentration of 5-Azac ; SA (mM)	Primer 3F & Luc 2 repeat 1	Primer 3F & Luc 2 repeat 2	Primer 1' & Luc 2 repeat 1	Primer 1' & Luc 2 repeat 2
C-3	0 ; 5	-	+	-	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	+	+
C-7	0 ; 5	+	+	+	+
	0.1 ; 5	-	+	-	+
	1 ; 5	+	+	-	+
C-8	0 ; 5	-	+	-	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	+	+
C-14	0 ; 5	-	+	-	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	-	+
C-18	0 ; 5	+	+	+	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	+	+
C-22	0 ; 5	+	+	+	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	-	+
C-23	0 ; 5	+	+	+	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	+	-
C-44	0 ; 5	+	+	+	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	+	+
C-50	0 ; 5	+	+	+	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	+	+
C-54	0 ; 5	+	-	+	-
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	+	+
C-78	0 ; 5	+	+	+	+
	0.1 ; 5	+	+	+	+
	1 ; 5	+	+	+	+

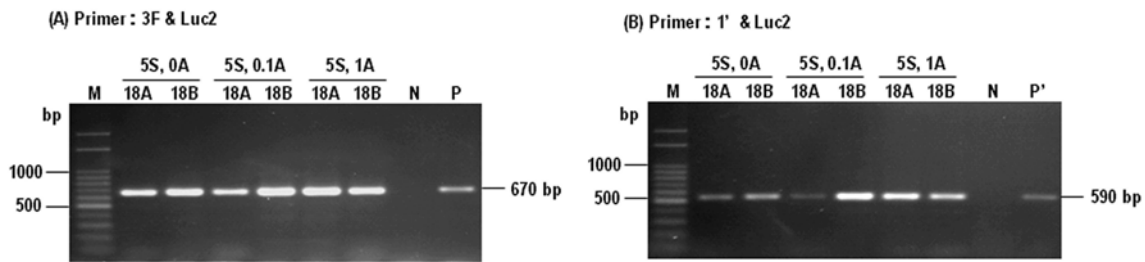


Fig. 4. PCR analysis for detecting transposition events for SA-treated transgenic rice lines harboring *INAcEGFP*. Each PCR reaction was performed with 3F/LUC2 primers (A) and 1'/LUC2 primers (B). Lane M, 100-bp DNA ladder. Abbreviations: 5S, 5 mM SA treatment; 0A, 0.1A and 1A, 0 mM, 0.1 mM and 1 mM 5Azac treatment, respectively; N, TNG 67 (negative control); P, pINAcEGFP (positive control); P', genomic DNA of transgenic rice C-1 (positive control).

板，利用相同的兩組引子進行 PCR；相同處理之癒合組織採樣兩份萃取染色體 DNA (即作為兩重覆)，兩重複中出現一次預期產物即視為成功轉位。結果顯示，所有經過誘導的品系，幾乎都有部分的細胞內之轉位子在誘導之後已經轉位，合成出預期的片段 590 bp，並且仍有部分細胞內之轉位子仍留在原 T-DNA 插入位置 (Fig. 4)，表示以水楊酸處理轉殖水稻能成功的誘導轉位子轉位 (Table 2)，比較三種不同濃度的誘導效率，5-Azac 濃度為 0 mM 和 0.1 mM 的誘導效率皆達 100%，而 5-Azac 濃度為 1 mM 的誘導效率較低，為 81.8 % (Table 3)。

Table 3. The effect of 5-Azac on transposition efficiencies of *INAcEGFP* in rice.

Concentration of 5-Azac/SA	Ratio of transposition	Percent of transposition
0 mM; 5 mM	18/18	100 %
0.1 mM; 5 mM	22/22	100 %
1 mM; 5 mM	18/22	81.82 %

五、利用 TAIL-PCR 分析 T-DNA 和轉位子之側翼序列 (flanking sequence)

前述結果已證明 *INAcEGFP* 轉位子可在水稻中受誘導且執行高效率轉位—即高效率創造水稻插入型突變體。而創造插入型

突變體之優點為可立即將所突變之基因定序，為了證明 *INAcEGFP* 插入之水稻突變基因 (即側翼序列) 可立即被定序，本試驗以 TAIL-PCR 技術執行側翼序列之選殖及定序。更進一步，由於本試驗除了 *INAcEGFP* 轉位子外，尚有另一插入型突變劑—即 T-DNA，因此本試驗同時將兩種插入型突變劑之側翼序列之選殖並定序。分述如下：

1. T-DNA 之側翼序列

TAIL-PCR 利用三個逐漸靠近 T-DNA 之 LB 序列之引子 (1P-1, 1P-2, 1P-3) 或是 RB 序列之引子 (luc-1, luc-2, luc-3) (Fig. 5A) 和兩組 AD (arbitrary degenerate) 引子 AD1, AD2, AD3 (Liu *et al.*, 1995) 和 AD4, AD8, AD9 (Sha *et al.* 2003)。本試驗中分析了自動轉位的 C-23、C-26 等轉殖系，並將定序結果與網路上的資料庫 NCBI (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 比對 (Table 4)。C-23 轉殖系之 T-DNA 插入位置為第十條染色體；C-26 轉殖系之 T-DNA 插入位置為第三條染色體。

2. 轉位子之側翼序列

TAIL-PCR 利用三個逐漸靠近轉位子 3

Table 4. Genomic sequences flanking T-DNA in transgenic rice plants harboring the *INAcEGFP* element.

Line	copy No. ^a	Chromosome	BACs/PACs	GenBank accession no.	Identities
23	3	10	OSJNBa0065C16	AC074354	611/639 (95%)
26	nd	3	OSJNBa0002I03	AC091246	45/48 (93%)

^a The copy number was determined by DNA blot analysis from T0 transgenic rice plants.

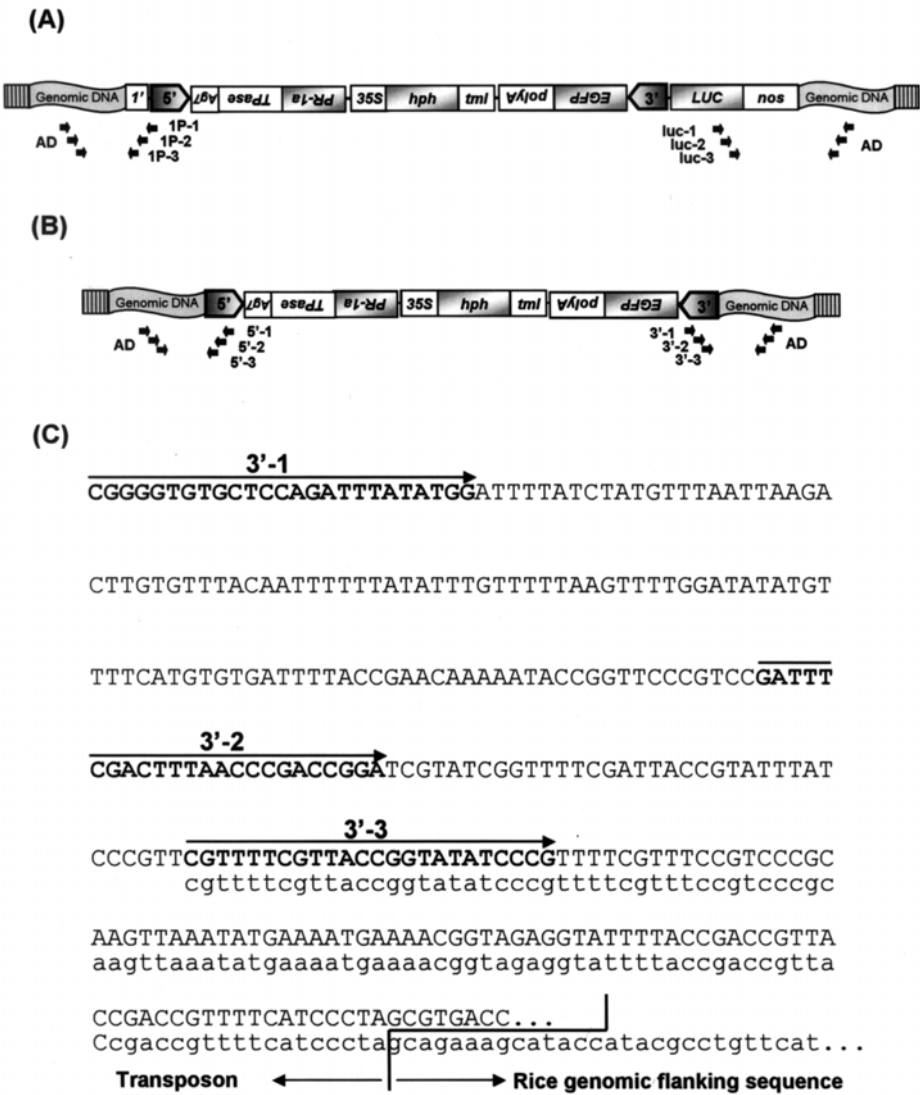


Fig. 5. Sequenced TAIL-PCR products. (A) and (B) indicate the location of each primers for detecting the un-transposed (A) and transposed (B) *INAcEGFP*, respectively. (C) The flanking sequence of the transposed *INAcEGFP* of transformed line C-78. The sequence shown in lower case letters was determined by sequencing of the amplification product of TAIL-PCR. Nucleotide sequence of specific primers 3'-1, 3'-2 and 3'-3 are highlighted.



Table 5. Genomic sequences flanking the transposed *INAcEGFP* element in transgenic rice plants.

Line	Chromosome	BACs/PACs	GenBank accession no.	Identities
23	1	P0443D08	AP003250	467/478 (97%)
26	3	OSJNBb0081B07	AC093018	67/67 (100%)
	8	P0528B09	AP004703	89/89 (100%)

端序列的引子 (Fig. 5B) 和兩組 AD (arbitrary degenerate) 引子 AD1, AD2, AD3 (Liu *et al.* 1995) 和 AD4, AD8, AD9 (Sha *et al.* 2003)。本試驗中分析了自動轉位的 C-23、C-26 等轉殖系，在轉位之後插入位置的側翼序列，並將定序結果與網路上的資料庫 NCBI 比對 (Table 5)，結果發現 C-23 之轉位子新插入位置位於水稻第一條染色體。C-26 之轉位子新插入的位置有二個，一個為水稻第三條染色體；另一個為水稻第八條染色體，表示轉位子插入的位置有二個。

討論

一、T0 世代轉殖水稻

本試驗利用南方氏墨點法分析轉殖株之拷貝數及轉位情形。試驗中以 *luc* 基因為探針，偵測轉殖株之拷貝數，由於 *luc* 基因位於轉位子外側，因此當轉位子發生轉位後，*luc* 基因仍會留在原 T-DNA 插入位置，因此不論轉位與否，均不影響其轉位基因拷貝數。另外，為了偵測轉位子轉位情形，試驗中另以 *TPase* 基因為探針進行雜合反應，*TPase* 基因位在轉位子之中，當轉位子轉位時，*TPase* 基因也會隨著轉位，比較這兩種探針之結果，即可了解轉位子的轉位情形。此外，配合 PCR 檢測結果顯示，(3F, Luc2) 和 (1', Luc2) 兩組引子均能合成正確之片段，表示水稻中有一部分細胞之可誘導轉位子已經轉位。接著利用 TAIL-PCR 分析轉位子側翼序列的試驗中，若能找到轉位

子在水稻基因組中之位置，即可確定該轉殖系之轉位子已經轉位。

理論上，當細胞中部分的轉位子轉位後，以 *luc* 基因為探針所偵測的結果應出現兩個大小差異為 7.8 Kb 之條帶，而 7.8 Kb 即為本構築中可誘導轉位子之大小。另外，若轉位子轉位後有插入水稻基因體組，比較以 *luc* 基因為探針和以 *TPase* 基因為探針所偵測的結果，後者會出現大小與前者不同的條帶。若是轉殖水稻中轉位子並無轉位情形，則以這兩種不同探針偵測的結果則會完全相同，例如無轉位的 C-6、C-35 轉殖系以兩種探針偵測，則出現的條帶皆相同 (Fig. 4A, 4B)。而自動轉位之 C-1、C-44 轉殖系，以兩種不同探針偵測的結果不同，表示轉位子已經轉位 (Fig. 4A, 4B)。自動轉位之 C-1 轉殖系以 *TPase* 基因為探針之結果比 *luc* 基因為探針之結果多出一個 6.5 Kb 的條帶，針對這結果兩種解釋：(1) 表示轉位子已插入水稻基因組的另一位置。(2) 理論上若轉位子跳離原位置之後，以 *luc* 基因為探針所偵測的結果應出現兩個大小差異為 7.8 Kb 之條帶，由於 C-1 轉殖系並沒有出現這樣的結果，所以另一種推斷為此條帶之出現也許是 T-DNA 插入水稻基因組中時發生錯誤的情形。C-44 轉殖系以 *luc* 為探針所偵測到的 4.1 Kb 條帶，由於小於轉位子的片段大小 (7.8 Kb)，因此可能為 T-DNA 插入時發生錯誤所造成。而另一可能為 C-44 轉殖系有兩個拷貝數，其中之一的轉位子在細胞分裂初期即跳離原位置，但並未插入水稻基因組



中，所以才會出現小於轉位子大小之片段。綜觀以上之推論，以 *TPase* 基因為探針進行雜合之結果，只能判定轉位子是否轉位，而無法從結果中推論轉位子的轉位次數。另外，C-1 和 C-44 轉殖系都是 2 個拷貝數，其轉位子轉位情形更不易預期，因此，在利用轉位子進行基因釣取和啟動子捕捉時，應選擇單一拷貝數之轉植株，並且能控制轉位子的轉位次數，例如本試驗中，利用可誘導啟動子控制轉位子的轉位，如此才能正確地進行後續分析。

二、TAIL-PCR 分析 T-DNA 和轉位子之側翼序列

於本試驗中進行 TAIL-PCR 分析 T-DNA 和轉位子側翼序列時，並不是固定只使用同一種專一的引子(例如：3'-1, 3'-2, 3'-3 或是 luc1, luc2, luc3)，亦使用另外設計的專一引子(例如：5'-1, 5'-2, 5'-3 或是 1P-1, 1P-2, 1P-3)。AD1, AD2, AD3 原是針對阿拉伯芥所設計(Liu *et al.* 1995)。使用這三個 AD 引子進行轉位子或是 T-DNA 側翼序列分析研究時，在水稻中亦有成功例子(Chin *et al.* 1999, Greco *et al.* 2003, Jeon *et al.* 2000)。在本試驗中亦嘗試使用另一報告(Sha *et al.* 2003)的 AD 引子(AD4, AD8, AD9)，目的均是增加 TAIL-PCR 的成功率。其中，以 TAIL-PCR 分析 T-DNA 之側翼序列時，並不能擴增出所有的側翼序列。若是該轉殖系具有 1 個以上的拷貝數，以 TAIL-PCR 分析 T-DNA 之側翼序列時，並不一定能得到符合拷貝數的側翼序列。例如：C-23 轉殖系以南方氏墨點分析法得知具 3 個拷貝數，但是以 TAIL-PCR 進行側翼序列分析時，只能擴增出一個 DNA 片段，表示 TAIL-PCR 有其限制存在。不過，創造突變株以進行功能基因體之研究時，本

應期望能得到單一拷貝數之突變株，以利後續分析，因此，TAIL-PCR 仍是一有效並且快速分析側翼序列之方法。

三、以水楊酸誘導轉位子之轉位

PR-1a (pathogenesis-related protein 1a)啟動子是一個受到水楊酸誘導表現的啟動子，在先前研究中，在蕃茄和菸草中就已經以此啟動子成功地利用水楊酸誘導啟動下游基因表現(Charng *et al.* 2000)。因此，本試驗中將轉殖 *INAcEGFP* 基因，並具有 hygromycin 抗性的水稻癒合組織進行三種誘導處理，結果顯示以 5 mM SA, 0 mM 5-Azac 和 5 mM SA, 0.1 mM 5-Azac 誘導 *INAcEGFP* 轉位效果最好，誘導效率達 100%，而 5 mM SA, 1 mM 5-Azac 處理的誘導效率較低，但是誘導效率也有 81.8%。與先前之研究水楊酸濃度為 5 mM 為最佳的誘導濃度結果相同(Charng, unpublished data)。在本試驗中設計了三種不同濃度的 5-Azac，分別為 0, 0.1, 1 mM，結果顯示當 5-Azac 濃度到達 1 mM 時，反而降低了轉位子的轉位效率。綜合以上結論，證實可誘導轉位子系統能成功地在水稻中受水楊酸誘導而表現。

誌謝

本試驗承行政院國家科學委員會計畫(NSC91-2313-B-002-368-)補助經費，特此致謝。

引用文獻

- Aarts MG, WG Dirkse, WJ Stiekema, A Pereira (1993) Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 363(6431): 715-717.
- Arumuganathan K, E Earle (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.



- Charng YC, AJP Pfitzner, UM Pfitzner, KF Charng-Chang, CM Chen, J Tu, TT Kuo (2000) Construction of an inducible transposon, *INAc*, to develop a gene tagging system in higher plants. **Mol. Breed.** 6(4): 353-367.
- Enoki H, T Izawa, M Kawahara, M Komatsu, S Koh, J Kyoizuka, K Shimamoto (1999) *Ac* as a tool for the functional genomics of rice. **Plant J.** 19(5): 605-613.
- Greco R, PBF Ouwerkerk, RJD Kam, C Sallaud, C Favalli, L Colombo, E Guiderdoni, AH Meijer, JHC Hoge, A Pereira (2003) Transpositional behaviour of an *Ac/Ds* system for reverse genetics in rice. **Theor. Appl. Genet.** 108(1): 10-24.
- Greco R, PBF Ouwerkerk, C Sallaud, A Kohli, L Colombo, P Puigdomenech, E Guiderdoni, P Christou, JHC Hoge, A Pereira (2001) Transposon insertional mutagenesis in rice. **Plant Physiol.** 125(3): 1175-1177.
- Hajdukiewicz P, Z Svab, P Maliga (1994) The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. **Plant Mol. Biol.** 25: 989-994.
- Haring MA, CM Rommens, HJ Nijkamp, J Hille (1991) The use of transgenic plants to understand transposition mechanisms and to develop transposon tagging strategies. **Plant Mol. Biol.** 16(3): 449-461.
- Hiei Y, S Ohta, T Komari, 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.
- Jones DA, CM Thomas, KE Hammond-Kosack, PJ Balint-Kurti, JD Jones (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science** 266(5186): 789-793.
- Kohli A, J Xiong, R Greco, P Christou, A Pereira (2001) Tagged Transcriptome Display (TTD) in *indica* rice using *Ac* transposition. **Mol. Genet. Genomics** 266(1): 1-11.
- Liu YG, N Mitsukawa, T Oosumi, RF Whittier (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **Plant J.** 8(3): 457-463.
- Müller-Neumann M, JI Yoder, P Starlinger (1984) The DNA sequence of the transposable element of *Ac* of *Zea mays* L. **Mol. Gen. Genet.** 198: 19-24.
- Scortecchi K, Y Dessaux, A Petit, MA van Sluys (1997) Somatic excision of the *Ac* transposable element in transgenic *Arabidopsis thaliana* after 5-azacytidine treatment. **Plant Cell Physiol** 38: 336-343.
- Sha Y, S Li, Z Pei, L Luo, Y Tian, C He (2004) Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. **Theor. Appl. Genet.** 108(2):306-14.
- Sheu JJ, TS Yu, WF Tong, SM Yu (1996) Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice alpha-amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes. **J Biol. Chem.** 271:26998-7004.
- Toki S (1997) Rapid and efficient *Agrobacterium* mediated transformation in rice. **Plant Mol. Biol. Rep.** 15:16-21.
- Whitham S, SP Dinesh-Kumar, D Choi, R Hehl, C Corr, B Baker (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. **Cell** 78(6): 1,101-1,115.
- Zheng Z, A Hayashimoto, Z Li, N Murai (1991) Hygromycin resistance gene cassettes for vector construction and selection of transformed rice protoplasts. **Plant Physiol.** 97: 832-835.

