

合成型蘇力菌毒素基因 *cryIA(c)* 與野生型基因 *cryIC* 之共同轉殖及其在菸草中殺蟲效力之表現差異

林志輝¹ 張美玲¹ 曾經洲² 陳良築^{1*}

¹台中市 國立中興大學分子生物學研究所

²台中縣霧峰鄉 農委會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

(接受日期：中華民國 91 年 7 月 24 日)

摘 要

林志輝、張美玲、曾經洲、陳良築* 2002 合成型蘇力菌毒素基因 *cryIA(c)* 與野生型基因 *cryIC* 之共同轉殖及其在菸草中殺蟲效力之表現差異 植保會刊 44 : 209-232

將不含蛋白 C 端結晶區域的蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 毒素蛋白之人工合成基因 *cryIA(c)*，以及經過聚合酶連鎖反應 (PCR) 分離與核酸定序的 *cryIC* 基因，分別構築於轉殖載體 pCAMBIA1300 與 pCHL1，得到質體 pCAM-Ac 與 pN-IC101。藉由粒子轟擊法 (particle bombardment) 將質體射入菸草葉細胞中，篩選同時對抗生素 Hygromycin (Hyg^r) 與 Spectinomycin ($\text{Sp}c^r$) 有抗性的轉殖株，經由 PCR 篩檢，得到 3 棵同時帶有 *cryIA(c)* 與 *cryIC* 的共同轉殖菸草 Nt-Ac/C-1、Nt-Ac/C-2、Nt-Ac/C-3。利用南方墨漬法 (Southern blot) 鑑定共同轉殖菸草之 *Hind* III 限制酶圖譜，得知 *cryIA(c)* 與 *cryIC* 基因共同進入植物細胞中，其中明確顯示 *cryIC* 進入葉綠體 *rbcL* 與 *accD* 基因之間的位置。針對 *cryIC* 與 *cryIA(c)* 基因造成的殺蟲效果，分別以三齡的斜紋夜盜蛾 (*Spodoptera litura*) 幼蟲與蕃茄夜蛾 (*Helicoverpa armigera*，又名玉米穗蟲) 幼蟲進行共同轉殖菸草葉部的殺蟲活性測試。結果發現處理 48 小時後，共同轉殖菸草對斜紋夜盜蛾幼蟲之殺蟲效果到達 100%，顯示葉綠體中的 *cryIC* 基因可表現出強效的殺蟲效果。對蕃茄夜蛾幼蟲所造成的死亡率，在 96 小時後，可達到 25 - 33%。測量蟲體重之變化，發現轉殖 *cryIA(c)* 基因對蕃茄夜蛾幼蟲雖無高致死效果，平均蟲體重卻僅增加 10.6 - 51.7%，而對照組蟲平均體重則增加 255%，顯示轉殖 *cryIA(c)* 基因可明顯

* 通訊作者。E-mail: ljchen@dragon.nchu.edu.tw

地抑制蕃茄夜蛾幼蟲的生長，進而達到植物保護之效果。此二個蘇力菌毒素基因在細胞內的表現差異，初步顯示葉綠體應是蘇力菌毒素基因表現之優良場所，且在不形成毒素晶體的情況下，即能發揮有效之致死效果。

(關鍵詞：蘇力菌、殺蟲晶體蛋白、轉基因植物、共同轉殖、細胞核、葉綠體)

緒 言

蘇力菌殺蟲晶體蛋白 (insecticidal crystal protein, ICP) 是目前使用最普遍的生物性殺蟲劑。蘇力菌為革蘭氏陽性菌，屬於好氣的非病原性土壤細菌，在逆境下產生孢子與 ICP，其中 ICP 可高達蛋白總量的 30%⁽⁶⁾。不同分類系列的 ICP 基因具有各自專一的殺蟲對象，例如 *cry1* 系列可毒害鱗翅目、*cry2* 系列可同時毒害鱗翅目與雙翅目、*cry3* 系列可毒害鞘翅目、*cry4* 系列可毒害雙翅目，以及產生細胞溶解結晶蛋白 (cytolytic crystal protein) 的 *cyt* 系列等⁽³⁰⁾。目前蘇力菌基因種類已經累積增加至 *cry40* 系列，約 225 個基因，和 *cyt1*、*cyt2* 系列，約 18 個基因，且持續增加中⁽¹⁴⁾。雖然商品化之蘇力菌農藥在田間施用的歷史已超過 30 年，然而藥劑的效期甚短 (約 3 天)，主要是受到陽光中波長介於 280 – 330 nm 的紫外線 UV-B 照射之破壞⁽⁴⁵⁾，使其田間殘效期不及化學性農藥。因此若能將 ICP 基因轉入植物體內，則在植物體的保護下，應能發揮長效的殺蟲效果。

首例轉入蘇力菌 ICP 基因的植物是菸草，再生的植株可造成 75% 以上的菸草天蛾 (*Manduca sexta*) 幼蟲死亡率⁽⁶²⁾，此後，抗蟲植物之育種即不斷藉著分子生物技術的進步而有所突破。例如更改影響轉錄產物生成或穩定的核酸序列⁽⁴⁴⁾、提高基因密碼使用頻率的修改^(43, 49)、強效轉錄啟動子的利用⁽⁷⁾等。目前利用植物基因工程法改造完成的抗蟲作物有菸草⁽⁶²⁾、番茄⁽²³⁾、大豆⁽⁴⁷⁾、玉米⁽³⁸⁾、水稻⁽²⁴⁾、棉花⁽⁴⁸⁾、馬鈴薯⁽⁵⁰⁾等，並在美洲有數百萬公頃的大規模種

植面積，明顯地提高糧食之生產量，顯示轉基因植物 (transgenic plant) 在綠色革命的農業生產改進項目中扮演重要角色⁽⁴²⁾。

目前常用的植物基因轉殖方法主要分為農桿菌轉殖法 (*Agrobacterium* transformation)⁽³⁴⁾、粒子轟擊法 (particle bombardment)⁽³⁵⁾，以及原生質融合法 (protoplast fusion)⁽¹⁸⁾。其中，農桿菌轉殖法屬於生物性方法，由於農桿菌有寄主對象之限制，不能全然廣效地使用；而原生質融合法屬於化學性方法，係利用化合物 polyethylene glycol (PEG) 造成細胞膜融合來達成遺傳物質的轉移，惟操作費時，且利用組織培養再生不易，或者突變率偏高，容易影響作物原有之優良農藝性狀。粒子轟擊法是物理性方法，沒有特定目標的限制，原理是利用金屬粒子吸附 DNA 的作用，將轉殖質體 DNA 包覆在特選的金屬粒子上，利用外來動力瞬間加速粒子，撞擊植物組織標靶，使 DNA 轉移至細胞內，透過特異或非特異的嵌入機制，使外來基因嵌入在染色體上。早期的加速裝置係利用火藥，危險性與限制性高，目前商用機種改採高壓且無活性的氮氣，作為粒子加速的動力來源⁽⁵⁹⁾。此外，在金屬粒子的選擇上，亦發現使用黃金粒子對細胞的毒性較低，約是鎢粒子所造成細胞毒性的四分之一⁽⁵¹⁾。改良後的粒子轟擊法易於達到共同轉殖 (co-transformation) 之效果，例如將十二種基因或質體同時轉入作物的染色體中^(10, 27)，且每個基因或質體插入植物染色體的機會均等。惟相同的外來基因大量進入細胞內，造成單一細胞內含高拷貝數 (high copy number) 的同一外來

基因，部分外來基因有可能被拆散，產生 RNAi (RNA interference) 現象，致使完整的外來基因發生基因靜默效應 (gene silencing)，降低目標基因的表現⁽⁶¹⁾。

以植物葉綠體基因組 (plastid genome, plastome) 為轉殖目標，是目前植物基因轉殖的重要工作之一。一個高等植物細胞內含有約 500 - 10,000 個葉綠體基因組，大小約 120 - 160 kb，有遺傳數量之優勢，並同時具有真核與原核形式的基因表現特性，因此使得葉綠體成為基因轉殖之新目標⁽²⁸⁾。運用氬氣驅動金屬粒子的粒子轟擊法，可使粒子有效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組序列發生同源重組，可將轉基因插入葉綠體的基因組中⁽⁵⁵⁾。目前已知利用葉綠體作為轉殖目標有以下諸多優點，例如可提高 10 - 50 倍的轉基因表現量、無基因靜默與位置效應 (position effect) 之變異、單一啟動子可同時啟動多基因表現 (polycistronic expression)、母性遺傳 (maternal inheritance) 可防止花粉散播轉基因、可以有目標的藉由同源重組置換基因與控制表現、可限制外來蛋白表現的範圍，減少對細胞質的干擾等⁽²⁸⁾。

將單一性狀或代謝途徑的多個基因同時送入植物基因組的多基因轉殖，已經成為作物育種的新趨勢。例如將基因經過改良的 PHB (poly-D-(-)-3-hydroxy butyrate) 生合成基因 *phaB*、*phaC* 一齊轉入棉花，可產生絕緣效果較佳的耐熱纖維⁽³²⁾；或將蘇力菌毒素基因、雪花凝集素 (snowdrop lectin) 基因 *gna* 或抗細菌性枯萎病 (bacterial blight) 之 Xa21 基因一起轉入水稻，可獲得抗多重病蟲害之轉殖品系^(39, 40, 60)。此外，在考量依據外來基因的真核或原核屬性，以及表現後修飾路徑的不同，而需要同時選擇植物細胞核與具有遺傳物

質的胞器作為轉基因表現的場所，則只有粒子轟擊法能滿足外來基因進入植物細胞不同遺傳系統之需求。由於蘇力菌屬於原核生物，試驗其毒素基因在植物細胞不同遺傳系統之表現，有助於擴大植物體作為生物反應器之應用範圍。

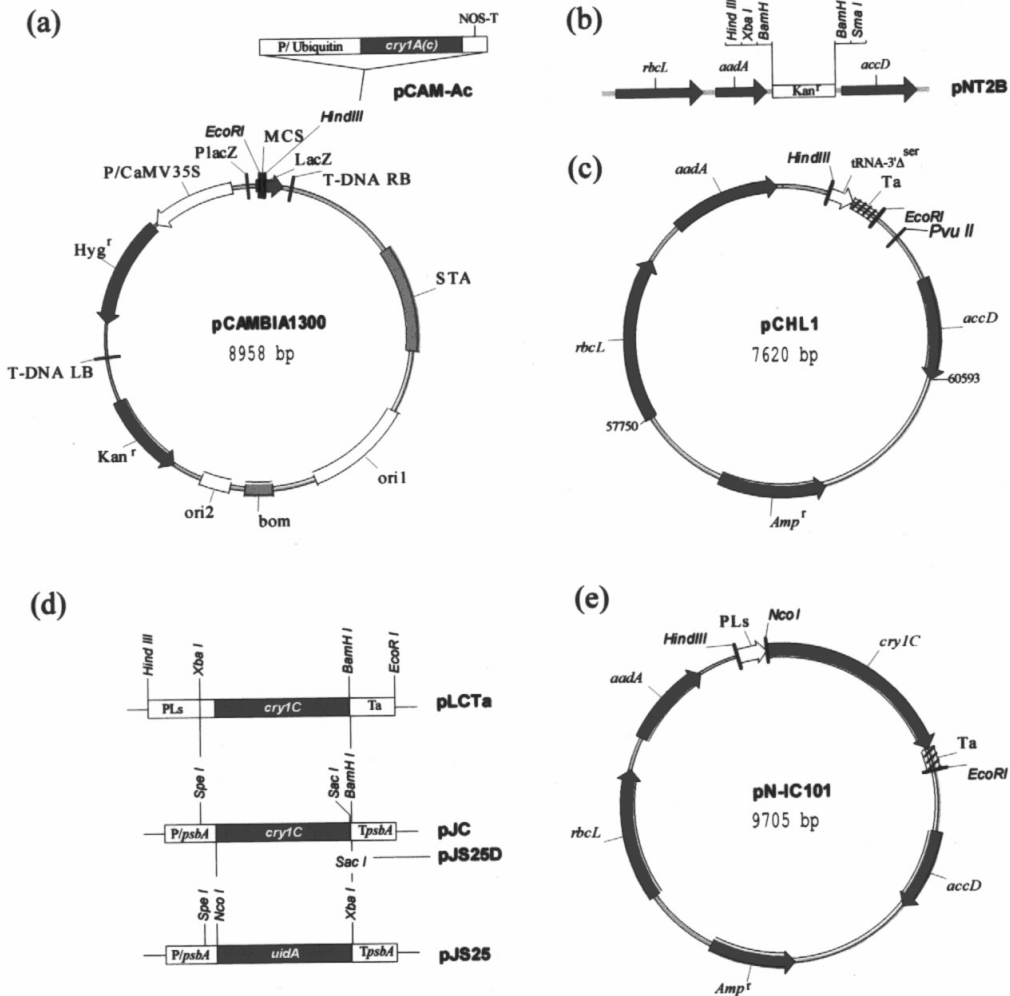
材料與方法

轉殖載體來源與修飾

轉殖載體 pCAMBIA1300 (GenBank accession no. AF234296)，全長 8,958 bp，係農桿菌與大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 之雙宿主載體 (binary vector)，帶有抗 Kanamycin (Kan^r) 之基因以及抗 Hygromycin (Hyg^r) 之基因 (如圖一 a)。轉殖載體 pCHL1 大小約 7.6 kb (圖一 c)，係由葉綠體轉殖載體 pNT1 修飾而來，pNT1 則是 pZS197⁽⁵⁸⁾ 之衍生物。利用 pZS197 載體完成 pCHL1 之構築過程為：轉殖載體 pZS197 是將菸草葉綠體基因組序列 (GenBank accession no. Z00044) 第 57,750 至 60,593 個核苷酸之間的片段取代 pBluescript KS(+) (Stratagen Co., GenBank accession no. X52331) 質體之 *Sac* II - *Eco*RV 的 MCS (multiple cloning sites) 小片段，並在第 59,286 個核苷酸的 *Bam*H I 切位，接入可抗 Spectinomycin (Spc^r) 及 Streptomycin (Str^r) 的 *aadA* (aminoglycoside 3'-adenylyltransferase) 基因；*aadA* 基因片段約 1.3 kb，包含菸草葉綠體 16S rDNA 啟動子 (*Prrn*) 與 *psbA* 基因之 3' 端非轉譯區 (3'-untranslated region, 3'-UTR)。轉殖載體 pNT1 則是在 pZS197 的 *aadA* 基因表現區下游之 *Bam*H I 切位接上 *Sma* I - *Hind* III 之連接子 (linker)。修飾 pNT1 載體之過程為：將 pNT1 之 *Sma* I - *Hind* III 連接子切除，以 Klenow 聚合酶補平端點，接入輔助質體 pUC19-4K 之 *Sal* I - *Eco*RI 片段 (約 1.3 kb，近 Kan^r 基因兩側為 *Bam*H I 切位，

片段兩端其餘的切位各為 *Sal* I - *Xba* I - *Bam*HI 與 *Bam*HI - *Sma* I - *Kpn* I - *Sac* I - *Eco*R I，端點切位 *Sal* I 與 *Eco*R I 適以 Klenow 聚合酶補平)，*Kan*^r 基因片段其中一側補平的 *Sal* I 切位與切開 pNT1 的 *Hind* III 補平切位相接時，可回復 pNT1 的 *Hind* III 切位，藉由篩選回復之 *Hind* III 切

位靠近 *aadA* 基因者，可得到新質體 pNT2B（圖一 b）。切除 pNT2B 上含 *Kan*^r 基因之 *Hind* III - *Sma* I 片段，以質體 pSU86AΔ3⁽⁶⁴⁾ 之 *Hind* III - *Pvu* II 片段（含菠菜葉綠體 tRNA^{ser} 基因之 3'端刪減突變體與 *E. coli* *tha* 終止子）取代之，即得到新的葉綠體轉殖載體 pCHL1（圖一 c）。



圖一、轉殖載體之修飾與質體 pCAM-Ac、pN-IC101 之構築。(a) 由 pUBC 切下含玉米 ubiquitin 啟動子、人工合成之 *cry1A(c)* 基因與 NOS 終止子，約 4.1 kb 的片段，插入 pCAMBIA1300 的 *Hind* III 切位，經篩選 *cry1A(c)* 轉錄方向與 *lacZ* 啟動子 (*PlacZ*) 同向者，即為 pCAM-Ac。pCAMBIA1300 是一個雙宿主載體，在 *E. coli*

中利用核酸複製起點 *ori2* (即 *ColE1*) 與 *Kan^r* 基因, 在農桿菌中可利用來自質體 pVS1 之核酸複製起點 *ori1* (*rep*)。載體上含有重組的 T-DNA 片段, 作為目標基因之構築區域。CaMV35S 啟動子 (P/CaMV35S) 位於 T-DNA 左邊界 (T-DNA LB) 與右邊界 (T-DNA RB) 之間, 負責 *Hyg^r* 基因之表現與篩選轉基因植物。*cryIA(c)* 基因插入 *lacZ* 基因上游之 MCS。bom 序列協助質體由 *E. coli* 轉移至農桿菌, STA 序列片段源於 pVS1 質體, 與 *ori1* 共同維持農桿菌中質體的穩定性。(b) pNT2B 質體是構築葉綠體轉殖質體過程的中間產物, 含有菸草葉綠體部分之 *rbcL* 與 *accD* 基因, 以及篩選轉基因植物用之 *aadA* 基因。插入之 *Kan^r* 基因係修飾切位用。(c) pCHL1 質體源於 pNT2B, 亦為構築過程的中間產物, pNT2B 上原含 *Kan^r* 基因之 *Hind III* – *Sma I* 片段, 已置換為含菠菜葉綠體 tRNA^{ser3} 端突變基因 (tRNA-3'Δ^{ser}) 與 *E. coli* *tha* 終止子 (Ta) 之 *Hind III* – *Pvu II* 片段。(d) 經由 PCR 分離之 *cryIC* 基因, 構築於 pJS25D 的 *Nco I* 與 *Sac I* 切位之間, 取代原 *uidA* (GUS) 基因, 得到 pJC 質體。由 pJC 質體之 *psbA* 5'-UTR 上的 *Spe I* 切位與 *cryIC* 下游之 *BamH I* 切出含 RBS (ribosomal binding site) 與 *cryIC* 基因, 接入 pTZ19-PLsTa, 得到 pLCTa。pJS25 質體源自 pUC119, 在 MCS 位置接有菸草葉綠體 *psbA* 基因啟動子連同 5'-UTR (P/*psbA*)、*psbA* 3'-UTR (T/*psbA*), 以及 *uidA* 基因。利用插入之 *Kan^r* 基因修飾切位, 可將 *uidA* 下游之 *Xba I* 切位更改為 *Sac I* 與 *BamH I*, 得到 pJS25D。(e) 構築終產物 pN-IC101 係將 pLCTa 的 *Hind III* – *EcoR I* 片段插入 pCHL1 質體, 取代 pCHL1 上相同切位之片段。圖中 (b)–(e) 之質體皆以 *E. coli* 為宿主, 並含抗 Amp 之基因 (*Amp^r*)。

Fig. 1. Construction of pCAM-Ac and pN-IC101. (a) A 4.1-kb fragment, comprising the maize ubiquitin promoter, the synthetic *cryIA(c)* gene, and the NOS terminator, from the pUBC plasmid was inserted into the *Hind III* site of pCAMBIA1300. The resulting plasmid with the same direction of transcription of the *lacZ* promoter (PlacZ) was designated pCAM-Ac. pCAMBIA1300 is a binary vector replicated and maintained in *E. coli* through *ori2* (*ColE1*) and the *Kan^r* gene and in *Agrobacterium* through *ori1* (*rep*) and STA from the pVS1 plasmid. The bom segment is responsible for genetic transformation from *E. coli* to *Agrobacterium*. In addition, pCAMBIA1300 contains a CaMV35S promoter (P/CaMV35S)-driven hygromycin-resistant gene (*Hyg^r*), multiple cloning sites (MCS), and a *lacZ* gene within the left border (LB) and the right border (RB) of the T-DNA. (b) pNT2B, an intermediate vector, is composed of partial sequences of tobacco chloroplast *rbcL* and *accD* genes, the selection marker *aadA* gene, and the *Kan^r* gene. The *Kan^r* fragment containing various restriction sites at both ends can be used for further modification. (c) pCHL1, derived from pNT2B, was constructed by replacing the *Hind III*–*Sma I* fragment of pNT2B with the *Hind III*–*Pvu II* fragment of plasmid pSU86AΔ3' which comprises a 3' deletion mutant of the spinach chloroplast tRNA^{ser} gene and the *E. coli* *tha* terminator (Ta). (d) Plasmid pJS25, originating from pUC119, contains the promoter and terminator of the tobacco chloroplast *psbA* gene and the GUS reporter *uidA* gene. The *Xba I* site of pJS25 was changed to *Sac I* and *BamH I* sites to form pJS25D. Plasmid pJC was constructed by inserting the PCR-isolated *cryIC* gene fragment into the *Nco I* and *Sac I* sites of pJS25D. Then the *Spe I*–*BamH I* fragment of pJC was inserted into pTZ19-PLsTa to form pLCTa. (e) pN-IC101 was constructed by replacing the *Hind III*–*EcoR I* fragment of pCHL1 with the same restriction fragment from pLCTa. All plasmids in (b)–(e) contain the *Amp^r* gene for selection in *E. coli*.

前述之輔助質體 pUC19-4K，其構築為：由 pUC4-KSAC（類似 pUC4K, Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA）切下含 Kan^r 基因之 BamH I 片段，接入 pUC19（GenBank accession no. M77789），作為上述構築 pCHL1 之輔助質體。

基因來源與轉殖質體構築

本試驗使用之 *cryIA(c)* 基因來自 Ubi-CryIA(c) 構築 (pUBC) ^(11, 53)，基因經由 PCR 與接合反應 (ligation) 合成，大小為 1,848 bp (圖二)，僅含蛋白 N 端毒性區域。基因上游接有 2.02 kb 的玉米 ubiquitin 基因啟動子，下游接有 260 bp 之 NOS 終止子 ⁽⁵³⁾。利用 Hind III 限制酶，可將質體 pUBC 的 *cryIA(c)* 基因切下，同時包含轉錄啟動子與終止子，接入 pCAMBIA 1300 的 Hind III 切位，篩選與 *hpt* II 基因位向相反者，即為質體 pCAM-Ac (圖一 a)。

cryIC 基因僅包含毒素蛋白之 N 端區域，大小為 1,986 bp (圖三)，係以質體 pSB744⁽⁸⁾ 為模板，利用引子 PSB25 (5'-GAGATGGAGGTAACCCATGGAGGAA-3') 與 28SstIC (5'-CTGGAGCTCAMTCMACTAAATTGGATAC-3'; M=A 或 C) 進行 PCR 與核酸定序。產物包含 *cryIC* 基因 ORF (open reading frame) 之 Nco I - Sac I 片段，將片段選殖入 pJS25D 質體，得到 pJC (圖一 d)。質體 pJC 之 Spe I - BamH I 片段包含源自菸草葉綠體 *psbA* 基因之核糖體結合位置 (ribosomal binding site, RBS) 與 *cryIC* 基因 ORF 之 Nco I - Sac I 片段。將 pJC 之 Spe I - BamH I 片段接入 pTZ19-PLSTa⁽⁹⁾ 之 Xba I 與 BamH I 切位之間，得到 pLCTa (圖一 d)。質體 pLCTa 的 *cryIC* 基因，係由葉綠體之 *rbcL* 啟動子負責轉錄之啟動，*E. coli* 的 *tha* 終止子負責轉錄終止，pLCTa 的 Hind III - EcoR I 片段即包含啟動子、*cryIC* 基因與 *tha* 終止子。將

此片段取代轉殖載體 pCHL1 的 tRNA^{ser} 突變基因與終止子片段，即得到 pN-IC101 (圖一 e)。

前述之輔助質體 pJS25D 與 pJC，其構築為：將 *uidA* 基因 (GUS) 構築於質體 pUC119 之 MCS 中，並在 *uidA* 上、下游接入來自菸草葉綠體 *psbA* 基因之啟動子、5'-UTR 與 3'-UTR，即為 pJS25⁽⁵⁶⁾ (圖一 d)。為了將 pJS25 上之 *uidA* 基因與 3'-UTR 相接的 Xba I 切位改成 Sac I 切位，以便將 *uidA* 基因置換為 *cryIC* 基因，乃利用質體 pUC4-KSAC 之 Kan^r 基因 (基因兩側 4 個對稱切位由外而內依序為 EcoR I - BamH I - Sac I - Pst I) 的接入與切出，將 pJS25 的 Xba I 改成 Sac I。方法是先破壞原 pUC119 之 Sac I 切位，再切開 *uidA* 基因與 3'-UTR 相接之 Xba I 切位，補平切位後，接入來自 pUC4-KSAC 含 Kan^r 基因的 EcoR I - EcoR I 片段 (補平 EcoR I 切位)，隨後切除 Kan^r 基因的 Sac I - Sac I 片段，將 BamH I、Sac I 遺留在 pJS25 原 Xba I 之位置，得到 pJS25D (圖一 d)。將 *cryIC* 基因之 Nco I - Sac I 片段取代 pJS25D 的 *uidA* 基因，即得到 pJC (圖一 d)。

攜帶 *aadA* 與 *cryIC* 基因的轉殖質體 pN-IC101，由於基因兩側附有源自菸草葉綠體 *rbcL* - *accD* 之片段，若和葉綠體基因組發生同源重組，可將 *aadA* 與 *cryIC* 基因一齊插入葉綠體基因組之 *rbcL* 與 *accD* 兩基因之間。

轉殖質體與轉殖菸草之產生

微載體 (microcarrier) 之製備與 DNA 包覆 (coating)：

以 1 μm 之鎢粉 (tungsten, M-10, Bio-Rad Inc., CA, USA) 作為微載體。稱取 60 mg 之鎢粉於微量離心管中，以 1 ml 之 75% 酒精浸洗 2 次，再以 1 ml 之無菌去離子水清洗數次，瞬間離心後去除上清液，將沉澱之鎢粉懸浮於 1 ml 之無菌去離子水，保存於 -20

℃下。取 50 μ l 製備之鎢粉懸浮液於微量離心管中，保持低速振盪，並依序加入 5 μ l 之質體 DNA (1 μ g/ μ l)、50 μ l 之 2.5 M CaCl_2 、20 μ l 之 100 mM spermidine，均勻混合後，冰浴 10 min，離心去除上清液，加入 200 μ l 之 75% 酒精，振盪懸浮後離心，吸去上清液，將沉澱鎢粉重新懸浮於 20 μ l 之 95% 酒精。

粒子轟擊法：

以基因槍 (PDS-1000He, Bio-Rad Inc., CA, USA) 進行粒子轟擊。上述製備之 20 μ l 樣品可轟擊 3–6 次。將適量之鎢粉液塗抹在橘色圓形的大載體片 (macrocarrier) 上，待陰乾後置入載體片的固定鋼座 (macrocarrier holder)。選用 1,100 psi 之破裂膜 (rupture disc)，並設定 9 cm 之轟擊距離，依照操作手冊完成裝置之組裝與真空操作，轟擊無菌之菸草 (*Nicotiana tabaccum* cv. Petit Havana) 葉背組織。

共同轉殖菸草之再生：

轟擊後之葉組織置於 RMOP 培養基 (4.32 g/l MS salts, 1 mg/l thiamine-HCl, 0.1 g/l myoinositol, 3% sucrose, 1 mg/l N^6 -benzyl adenine, 0.1 mg/l α -naphthalene acetic acid, 0.4% phytagar, pH 5.8) 上，暗培養 2–4 天後，切割成約 5 mm^2 之小塊，移植至含 500 μ g/ml 抗生素 Spc 與 50 μ g/ml 抗生素 Hyg 之 RMOP 培養基上，置於 24 $^{\circ}\text{C}$ ，D:L = 8:16 之定溫培養箱，每隔 2 週更換新鮮培養基，約 8 週後白化組織上開始有綠芽形成。切下綠芽轉移至含抗生素 Spc 與 Hyg 之 MS 培養基 (4.32 g/l MS salt, 0.4 mg/l thiamine-HCl, 0.1 g/l myo-inositol, 0.5 mg/l nicotinic acid, 0.5 mg/l pyridoxine-HCl, 2 mg/l glycine, 3% sucrose, 0.4% phytagar, pH 5.8)，持續篩選 6 個月以上，再進行發根。發根後改以培養土種植，並移至恆溫生長箱內持續生長。

共同轉殖菸草之鑑定

植物總量 DNA 之抽取：

以植物基因組 DNA 少量製備試劑組 (Plant genomic DNA miniprep kit, GPG1001, Viogene-Biotek Co., Taiwan, ROC) 萃取無 RNA 成份之菸草葉片總量 DNA。萃取步驟依照操作手冊。以分光光度計 (Spectrophotometer, DU-640, Beckman Instruments Inc., CA, USA) 測定萃取之 DNA 濃度。

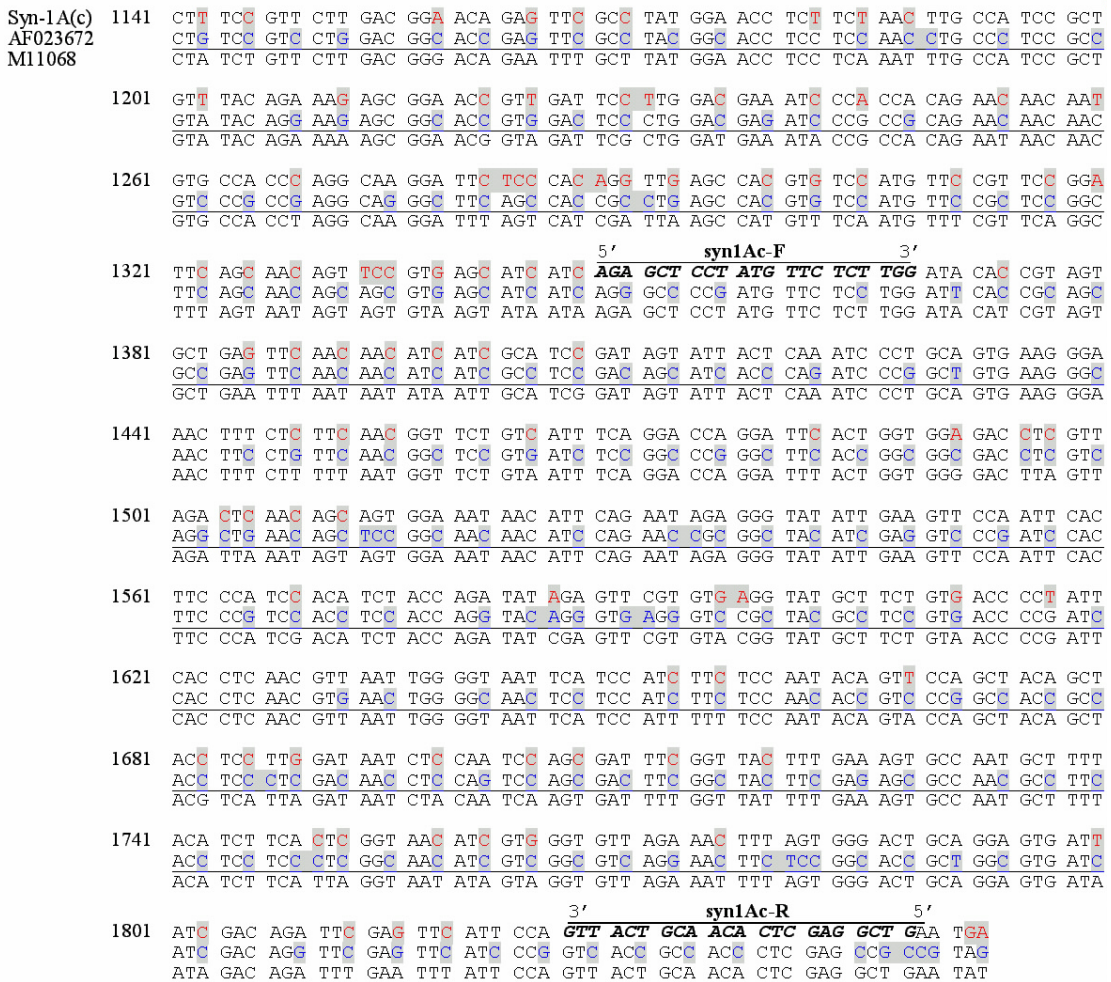
PCR 檢定：

取適量之植物總量 DNA 作為模板，進行 PCR。核酸引子計有 ① syn1Ac-F: 5'-AGGGCCCCGATGTTCTCTCTGG-3'、② syn1Ac-R: 5'-GCGGCTCGAGGGTGGCGGTGAC-3'、③ 1C-F: 5'-CATATAATCGATTACGGAGAGACTTAAC-3'，以及 ④ 1C-R: 5'-CTATATCCTTCGCGAGGTGGCACAC-3'，引子在基因中之位置，可見圖二、圖三。PCR 反應中，同時加入 4 個引子，反應條件為：95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min，1 次；95 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min，50 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min，35 循環；72 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min，1 次；冷卻至 4 $^{\circ}\text{C}$ ，以 2% 之瓊膠 (agarose) 膠片進行電泳分析。共同轉殖菸草若含檢定標的 *cryIA(c)* 基因，可得 499 bp 之片段，若含 *cryIC* 基因，可得 598 bp 之片段。

蘇力墨漬法 (Southern blotting)：

取定量已純化之植物總量 DNA，以 Hind III 限制酶進行切割反應，並以 1.2% 瓊膠膠片進行電泳分析 (E = 5 Volt/cm)。含 DNA 之膠片經過染色、照相、鹼處理、中和等步驟後進行轉漬⁽⁵²⁾。轉漬完成的尼龍膜片，經過乾燥、紫外線交聯反應 (UV-crosslinking, 1200x100 μ joule) 後，與標定 ^{32}P 同位素之探針進行雜交反應。同位素標定探針係利用 Rediprime 試劑組 (Rediprime DNA

Syn-1A(c) AF023672 M11068	1	ATG GAC AAC AAC CCA AAC ATC AAC GAA TGC ATT CCA TAC AAC TGC TTG AGT AAC CCA ATG GGT ATG ATT ACG CCT AGC TTG CAT GCC TGC ATC CCG TAC AAC TGC CTG AGC AAC CCG ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA AGT AAC CCT
	61	GAA GTT GAA GTA CTT GGT GGA GAA CGC ATT GAA ACC GGT TAC ACT CCG ATC GAC ATC TCC GAG GTG GAG GTG CTG GGC GGC GAG CGC ATC GAG ACC GGC TAC ACG CCG ATC GAC ATC TCC GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC
	121	TTG TCC TTG ACA CAG TTT CTG CTC AGC GAG TTC GTG CCA GGT GCT GGC TTC GTT CTC GGA CTG TCC CTC ACC CAG TTC CTG CTG AGC GAG TTC CTC CCG GGC CCG GTC GTG CTG GGC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA
181	CTA GTT GAC ATC ATC TGG GGT ATC TTT GGT CCA TCT CAA TGG GAT GCA TTC CTG GTG CAA CTG GTG GAC ATC ATC TGG GGC ATC TTC GGC CCG TCC CAG TGG GAC GCC TTC CTG GTG CAG CTA GTT GAT ATA ATA TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA	
241	ATT GAG CAG TTG ATC AAC CAG AGG ATC GAA GAG TTC GCC AGG AAC CAG GCC ATC TCT AGG ATC GAG CAG CTG ATC AAC CAG CGC ATC GAA GAG TTC GCC CGC AAC CAG GCC ATC TCT AGA ATT GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC ATT TCT AGA	
301	TTG GAA GGA TTG AGC AAT CTC TAC CAA ATC TAT GCA GAG AGC TTC AGA GAG TGG GAA GCC CTG GAG GGC CTG AGC AAC CTG TAC CAA ATC TAC GCC GAG TCC TTC CCG GAG TGG GAG GCT TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA	
361	GAT CCT ACT AAC CCA GCT CTC GGC GAG GAA ATG CGT ATT CAA TTC AAC GAC ATG AAC AGC GAC CCG ACC AAC CCG GCC CTG AGG GAG GAG ATG CCG ATC CAG TTC AAC GAC ATG AAC TCC GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT	
421	GCC TTG ACC ACA GCT ATC CCA TTG TTC GCA GTC CAG AAC TAC CAA GTT CCT CTC TTG TCC GCC CTG ACC ACC GCC ATC CCG CTG TTC GCC GTG CAG AAC TAC CAG GTG CCG CTC CTG TCC GCC CTT ACA ACC GCT ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA	
481	GTG TAC GTT CAA GCA GCT AAT CTT CAC CTC AGC GTG CTT CGA GAC GTT AGC GTG TTT GGG GTG TAC GTG CAG GCC GCC AAC CTC CAC CTG TCG GTC CTG AGG GAC GTG TCC GTG TTC GGC GTA TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA GTG TTT GGA	
541	CAA AGG TGG GGA TTC GAT GCT GCA ACC ATC AAT AGC CGT TAC AAC GAC CTT ACT AGG CTG CAG CGC TGG GGC TTC GAC GCC ACC GCC ATC AAC AGC CCG TAC AAC GAC CTG ACC AGG CTG CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT	
601	ATT GGA AAC TAC ACC GAC CAC GCT GTT CGT TGG TAC AAC ACT GGC TTG GAG CGT GTC TGG ATC GGC AAC TAC ACC GAC TAC GCC GTC CGC TGG TAC AAC ACC GGC CTG GAG CGC GTG TGG ATT GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG	
661	GGT CCT GAT TCT AGA GAT TGG ATT AGA TAC AAC CAG TTC AGG AGA GAA TTG ACC CTC ACA GGC CCG GAC TCT AGA GAC TGG GTC AGG TAC AAC CAG TTC AGG CGC GAG CTC ACC CTC ACC GGA CCG GAT TCT AGA GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA GAA TTA ACC CTA ACT	
721	GTT TTG GAC ATT GTG TCT CTC TTC CCG AAC TAT GAC TCC AGA ACC TAC CCT ATC CGT ACA GTG CTG GAC ATC GTG GCC CTG TTC CCC AAC TAC GAC TCC AGG AGG TAC CCC ATC AGG ACC GTA TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA ATT CGA ACA	
781	GTG TCC CAA CTT ACC AGA GAA ATC TAT ACT AAC CCA GTT CTT GAG AAC TTC GAC GGT AGC GTG AGC CAG CTG ACC AGG GAA ATC TAC ACC AAC CCC GTG CTG GAG AAC TTC GAC GGC AGC GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACC AAC CCA GTA TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT	
841	TTC CGT GGT TCT GCC CAA GGT ATC GAA GGC TCC ATC AGG AGC CCA CAC TTG ATG GAC ATC TTC CGC GGC AGC GCC CAG GGC ATC GAG AGG AGC ATC AGG AGC CCG CAC CTC ATG GAC ATC TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA	
901	TTG AAC AGC ATA ACT ATC TAC ACC GAT GCT CAC AGA GGA GAG TAT TAC TGG TCT GGA CAC CTG AAC AGC ATC ACC ATC TAC ACC GAC GCC CAC CGC GGC TAC TAC TAC TGG TCC GGC CAC CTT AAC AGT ATA ACC ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT	
961	CAG ATC ATG GCC TCT CCA GTT GGA TTC AGC GGG CCC GAG TTT ACC TTT CCT CTC TAT GGA CAG ATC ATG GCC TCC CCC GTG GGC TTC TCC GGC CCG GAG TTC ACC TTC CCG CTG TAC GGC CAA ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG CTA TAT GGA	
1021	ACT ATG GGA AAC GCC GCT CCA CAA CAA CGT ATC GTT GCT CAA CTA GGT CAG GGT GTC TAC ACC ATG GGC AAC GCC GCC CCG CAG CAG AGG ATC GTC GCC CAG CTC GGC CAG GGC GTG TAC ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT	
1081	AGA ACC TTG TCT TCC ACC TTG TAC AGA AGA CCC TTC AAT ATC GGT ATC AAC AAC CAG CAA AGG ACC CTC TCC TCC ACC CTG TAC CGC AGG CCC TTC AAC ATC GGC ATC AAC AAC CAG CAG AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA	



圖二、人工合成的 *cryIA(c)* 基因與野生型基因密碼序列之比較。本試驗使用之人工合成 *cryIA(c)* 基因，標示為 Syn-1A(c)，全長 1,848 bp，與野生型 *cryIA(c)* 基因 (GenBank accession no. M11068) 比較，有差異之核苷酸標以紅色，另一修改較多的人工合成基因 (GenBank accession no. AF023672)，全長 1,851 bp，與野生型 *cryIA(c)* 基因之核苷酸差異標以藍色。所有與野生型基因的差異處皆以灰色區塊表示。PCR 引子 syn1Ac-F 與 syn1Ac-R 標示於 Syn-1A(c) 序列上，以黑色粗斜體表示，其中 syn1Ac-R 標示序列為引子之互補股。原始 *cryIA(c)* 基因原長 3,534 bp，僅列出表現 N 端毒蛋白部分的核酸序列，長 1,848 bp。

Fig. 2. Coding sequences comparison of two synthetic *cryIA(c)* genes with the wild-type gene. The synthetic *cryIA(c)* gene used in this experiment is represented as Syn-1A(c). Its length is 1,848 bp. The bases of Syn-1A(c) which differ from those of the wild-type *cryIA(c)* gene (GenBank accession no. M11068) are shown in red. Another modified *cryIA(c)* gene (GenBank accession no. AF023672) with a length of 1,851 bp is also shown. Its base differences are shown in blue. All differences of the two synthetic genes compared with the wild type are highlighted by gray blocks. The two primers, syn1Ac-F and syn1Ac-R, used for PCR assay are in boldface and italicized. Only 1,848 bp, the N-terminal domain of the wild-type *cryIA(c)* gene (3,534 bp), is shown.

1 ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT CCT GAA GAA
M E E N N Q N Q C I P Y N C L S N P E E

61 GTA CTT TTG GAT GGA GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT TCT CTG TCA
V L L D G E R I S T G N S S I D I T C T L S

121 CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GGG GGA GGA TTT TTA GTT GGA TTA ATA
L V Q F L V S N F V P G G G F L V G L I

181 GAT TTT GTA TGG GGA ATA GTT GGC CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA GTA CAA ATT GAA
D F V W G I V G P S Q W D A F L V Q I E

241 CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT AGG AAT GCT GCT ATT GCT AAT TTA GAA
Q L I N E R I A E F A R N A A I A N L E

301 GGA TTA GGA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTG GAA GCA TTT AAA GAA TGG GAA GAT CCT
G L G N N F N I Y V E A F K E W E E D P

361 AAT AAT CCA GCA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CGC TTT CGT ATA CTT GAT GGG CTA CTT
N N P A T R T R V I D R F R I L D G L L

421 GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA TCC GTT TAT
E R D I P S F R I S G F E V P L L S V Y

481 GCT CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT GGA GAA AGA
A Q A L N N F N I Y V E A F K E W E E R

541 TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT AGG CAT ATT GAT
W G L T T I N V N E N Y N R L I R H I D

601 GAA TAT GCT GAT CAC TGT GCA AAT ACG TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA CCG AAA TCT
E Y A D H C A N T Y N R G L N L P K S

5' 1C-F 3'

661 ACG TAT CAA GAT TGG ATA CA TAT AAT CGA TTA CCG AGA GAC TTA ACA TTG ACT GTA TTA
T Y Q D W I T Y N R L R R D L T L T V L

721 GAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC AAT AGG AGA TAT CCA ATT CAG CCA GTT GGT
D I A A F F P N Y D N R R Y P I Q P V G

781 CAA CTA ACA AGG GAA GTT TAT ACG GAC CCA TTA ATT AAT TTT AAT CCA CAG TTA CAG TCT
Q L T R E V Y T C D P L I N F N P Q L Q S

841 GTA GCT CAA TTA CCT ACT TTT AAC GTT ATG GAG AGC AGC GCA ATT AGA AAT CCT CAT TTA
V A Q L P T F N V M E S A I R N P H L

901 TTT GAT ATA TTG AAT AAT CTT ACA ATC TTT ACG GAT TGG TTT AGT GTT GGA CGC AAT TTT
F D I L N N L T I F T D W F S V G R N F

961 TAT TGG GGA GGA CAT CGA GTA ATA TCT AGC CTT ATA GGA GGT GGT AAC ATA ACA TCT CCT
Y W G G H R V I S S L I G G G N I T S P

1021 ATA TAT GGA AGA GAG GCG AAC CAG GAG CCT CCA AGA TCC TTT ACT TTT AAT GGA CCG GTA
I Y G R E A N Q E P P R S F T F N G P V

1081 TTT AGG ACT TTA TCA AAT CCT ACT TTA CGA TTA TTA CAG CAA CCT TGG CCA GCG CCA CCA
F R T L S N P T L R L Q Q P W P A P P

1141 TTT AAT TTA CGT GGT GTT GAA GGA GTA GAA TTT TCT ACA CCT ACA AAT AGC TTT ACG TAT
F N L R G V E G V E F S T P T N S F T Y

3'

1201 CGA GGA AGA GGT ACG GTT GAT TCT TTA ACT GAA TTA CCG CCT GAG GAT AAT AGT GTG CCA
R G R G T V D S L T E L P P E D N S V P

1C-R 5'

1261 CCT CGC GAA GGA TAT AGT CAT CGT TTA TGT CAT GCA ACT TTT GTT CAA AGA TCT GGA ACA
P R E E G Y S H R L L C H A T F V Q R S G T

1321 CCT TTT TTA ACA ACT GGT GTA GTA TTT TCT TGG ACG CAT CGT AGT GCA ACT CTT ACA AAT
P F L T T G V V F S W T H R S A T L T N

1381 ACA ATT GAT CCA GAG AGA ATT AAT CAA ATA CCT TTA GTG AAA GGA TTT AGA GTT TGG GGG
T I D P E R I N Q I P L V K G A F R V W G

1441 GGC ACC TCT GTC ATT ACA GGA CCA GGA TTT ACA GGA GGG GAT ATC CTT CGA AGA AAT ACC
G T S V I T G P G F T G G D I L R R N T

1501 TTT GGT GAT TTT GTA TCT CTA CAA GTC AAT ATT AAT TCA CCA ATT ACC CAA AGA TAC CGT
F G D F V S L Q V N I N S P I T Q R Y R

1561 TTA AGA TTT CGT TAC GCT TCC AGT AGG GAT GCA CGA GTT ATA GTA TTA ACA GGA GCG GCA
L R F R Y A S S R D A R V I V L T G A A

1621 TCC ACA GGA GTG GGA GGC CAA GTT AGT GTA AAT ATG CCT CTT CAG AAA ACT ATG GAA ATA
S T G V G G Q V S V N M P L Q K T M E I

1681 GGG GAG AAC TTA ACA TCT AGA ACA TTT AGA TAT ACC GAT TTT AGT AAT CCT TTT TCA TTT
G E N L T S R T F R Y T D F S N P F S F

1741 AGA GCT AAT CCA GAT ATA ATT GGG ATA AGT GAA CAA CCT CTA TTT GGT GCA GGT TCT ATT
R A N P D I I G I S E Q P L F G A G S I

1801 AGT AGC GGT GAA CTT TAT ATA GAT AAA ATT GAA ATT ATT CTA GCA GAT GCA ACA TTT GAA
S S G E L Y I D K I E I I L A D A T F E

1861 GCA GAA TCT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG AAT GCC CTG TTT ACT TCT TCC AAT
A E S D L E R A Q K A V N A L F T S S N

1921 CAA ATC GGG TTA AAA ACC GAT GTG ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG
Q I G L K T D V T D Y H I D Q V S N L T V

1981 GAG TGA
E

圖三、經定序之 *cryIC* 基因密碼與對應之氨基酸序列。經 PCR 自蘇力菌質體 pSB744 分離出一 *cryIC* 型基因，經核酸定序，解得全長為 1,986 bp，可編碼成 661 個氨基酸，預估分子量為 74.3 kDa。序列與已知之 *cryICa5* 基因 (GenBank accession no. X96682) 相同，僅因引子設計，造成第 1,983 個核苷酸由 T 變為 G，使第 661 個氨基酸由 Aspartic acid (D) 突變為 Glutamic acid (E)。引子 1C-F 與 1C-R 使用於核酸定序與轉基因植物之 PCR 檢定，以黑色粗斜體表示，其中 1C-R 標示序列為引子之互補股。

Fig. 3. Coding sequence and its deduced amino acid sequence of the *cryIC* gene. This *cryIC*-type gene was isolated from plasmid pSB744 by PCR. The 1,983-bp sequence coding for 661 amino acids with a predicted molecular mass of 74.3 kDa is shown. The sequence is identical to the published *cryICa5* gene (GenBank accession no. X96682) except the 1,983th base where “T” was replaced by “G” causing Aspartic acid (D) being changed to Glutamic acid (E). The two primers, 1C-F and 1C-R, used for PCR assay and DNA sequencing are in boldface and italicized.

labeling systems, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, England) 進行製備。

殺蟲活性之生物檢定法

分別取斜紋夜盜蟲 (*Spodoptera litura*) 之 3 齡初幼蟲與蕃茄夜蛾 (*Helicoverpa armigera*) 之 3 齡末幼蟲進行生物檢定。剪取共同轉殖菸草成熟葉片，以葉面積測量儀 (LI3100 leaf area meter, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) 先行測出葉面積，再以濕潤的泡綿夾住葉基部，置於盛水的杯中。每片葉測試蟲數為每 20 cm² 之葉面積接入 1 隻幼蟲，每隻受測蟲於處理前已先行測量體重，各轉基因植物品系的受試葉片依大小每葉使用 2 - 5 隻幼蟲。餵食試驗樣品置於 25°C，75% RH，D : L = 12 : 12 之恆溫箱中，24 h 後觀察幼蟲死亡數及測量葉面積，並且更換新鮮菸草葉片供測試蟲繼續取食，於處理後 48、72、96 h，分別再觀察記錄及更換新葉片，96 h 後測量存活之蟲體重。每棵轉殖株均採樣 3 片葉作為 3 重覆試驗，以求取平均死亡率與平均蟲體重增加之百分率。

結 果

人工合成 *cryIA(c)* 基因之修飾

蘇力菌 ICP 基因屬於原核基因，在不改變氨基酸序列下，進行人工密碼修改，已經證明可提高蘇力菌殺蟲蛋白在真核的植物體內表現⁽⁴⁹⁾。經由人工合成的 *cryIA(c)* 基因種類，除了以專利保護之序列，例如：植物科學股份有限公司 (Plant Bioscience Ltd., Norwich, UK) 的人工合成 *cryIA(c)* 基因 (GenBank accession no. AX044386, AX044393, AX044394, AX044395)，以及未曾公開的序列之外，目前已知人工合成 *cryIA(c)* 基因有 2 條 (GenBank accession no. AF177675, AF023672)，其中 1 條 (AF023672) 已有轉殖試驗之分析報導^(20, 63)，其它還有數篇研究報導亦使用他種人工合成之 *cryIA(c)* 基因進行植物體內的表現^(4, 11, 57)。本試驗使用之 *cryIA(c)* 基因亦為人工合成基因，係經由 DNA 連接酶將 PCR 修飾後的基因片段連接起來，並在禾本科的玉米與水稻中有良好的表現^(11, 53)。

將本試驗用之人工合成的 *cryIA(c)* 基因

與基因序號 AF023672 的人工合成 *cryIA(c)*^(20, 63)，以及野生型毒性蛋白 N 端之基因序列 (GenBank accession no. M11068)⁽⁵⁾ 進行排列 (圖二)，比較其中密碼修飾的情形，顯示本試驗使用之 *cryIA(c)* 基因與野生型基因 *cryIAc1* 有 80.9% 的一致性 (identity)。比較全長 615 個氨基酸，一致性則達 99%，變異位置有 6 處，分別為 Y206H、V227I、A245S、R254T、R289G 以及 Y313E。另一基因序號 AF023672 的人工合成 *cryIA(c)* 基因與野生型基因的一致性為 69.6%，蛋白質氨基酸之一致性為 98.2%，此人工合成基因的蛋白質全長為 616 個氨基酸，較野生型毒性蛋白質多出 1 個氨基酸，多出的位置位於 N 端，亦即人工合成基因的蛋白質 N 端前 10 個氨基酸序列為 MAMITPSLHA，野生型基因的蛋白質 N 端前 9 個氨基酸為 MDNNPNINE，餘後之 604 個氨基酸則兩者完全相同，在蛋白尾端的 2 個氨基酸，人工基因的蛋白質末 2 碼為 PP，野生型基因之蛋白末 2 碼則為 AE。

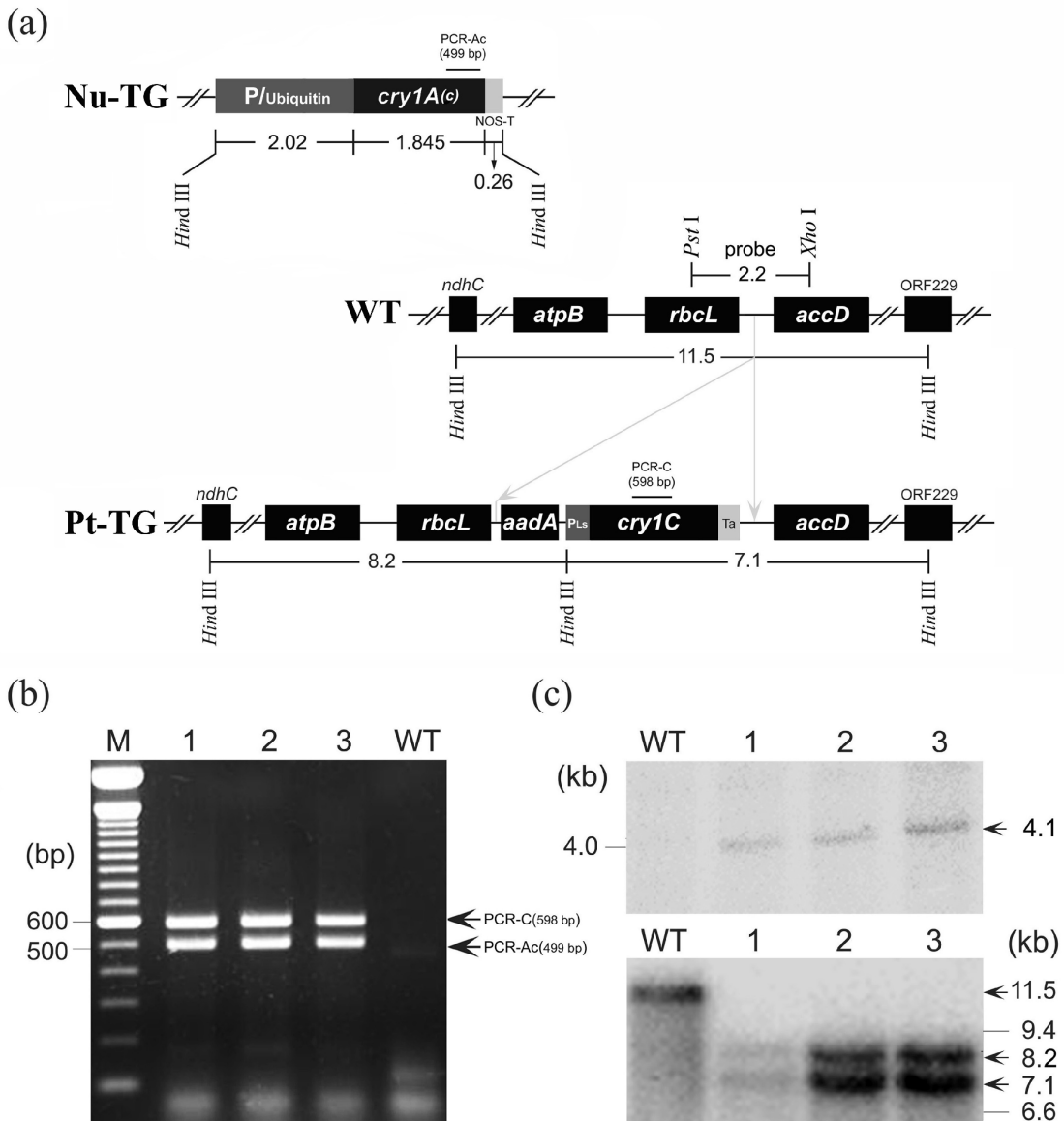
與基因序號 M11068 的野生型 *cryIAc1* 基因⁽⁵⁾ 密碼子 (codon) 比較，觀察各突變基因之密碼子在 Wobble 位置 (即密碼子第 3 碼位置) 之突變頻率 (圖二)。本試驗使用之人工合成 *cryIA(c)* 基因密碼子有 310 個有變異，變異頻率為 50.3%，其中 Wobble 位置變異的密碼子有 306 個，佔所有已變動密碼子的 98.7%；另一基因序號 AF023672 的人工合成 *cryIA(c)* 基因密碼子有 507 個有變異，變異頻率為 82.2%，其中 Wobble 位置變異的密碼子有 498 個，佔所有已變動密碼子的 98.2%；就 G+C% 的變化而言，野生型 *cryIAc1* 基因的 G+C% 為 37.3%，本試驗使用之人工合成 *cryIA(c)* 基因的 G+C% 為 47.7%，基因序號 AF023672 的人工合成 *cryIA(c)* 基因的 G+C% 更高達 64.1%。

cry1C 基因之分離與類型鑑定

藉由引子 PSB25 與 28SstIC 進行

PCR，自質體 pSB744 中分離出一個 *cry1C* 基因，在引子 PSB25 上設計含有轉譯起始密碼 ATG 的 *Nco* I 切位，在引子 28SstIC 上則設計有轉譯終止密碼 TGA 與 *Sac* I 切位，PCR 產物為 2 kb。為便於利用 GST (Glutathione S-transferase) 蛋白表現系統製備蘇力菌毒素蛋白，首先將基因選殖入 pUNG 質體⁽²⁾ 的 *Nco* I 與 *Sac* I 切位之間，取代原來的 GUS 基因，得到 pUN-IC⁽¹⁾。質體 pUN-IC 上 *cry1C* 基因的 *Nco* I 切位上游有一 *Bam*HI 切位，基因尾端的 *Sac* I 切位下游則有一 *Eco*RI 切位，便於將 *cry1C* 基因選殖入 pGEX-3X 質體 (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, England) 的 *Bam*HI 與 *Eco*RI 之間，得到質體 pGEX-IC，使 *cry1C* 基因與 GST 蛋白基因形成融合蛋白 (fusion protein) 基因⁽¹⁾。利用 pGEX 5' 定序引子與 pGEX 3' 定序引子 (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, England) 進行定序，確定接合後的融合蛋白基因可以表現。

本試驗 *cry1C* 基因源自蘇力菌 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD229 菌株⁽⁸⁾，全長約 4 kb，經 PCR 分離出的基因片段為編碼蛋白 N 端毒性的區域，完成定序可正確地確認基因之分類。利用 pGEX 5' 定序引子與 pGEX 3' 定序引子定出 *Cry1C* 蛋白 N 端與 C 端之核酸序列，另設計引子 1C-F (5'-CATATAATCGATTACGGAGAGACTT AAC-3') 與引子 1C-R (5'-CTATATCCTTCG CGAGGTGGCACAC-3') (圖三)，以俾完成雙股定序。完成定序之基因全長 1,986 bp (圖三)，可編碼成 661 個氨基酸，預估分子量為 74.3 kDa。經過比對，與已知的 *cry1Ca5* (GenBank accession no. X96682) 相同⁽¹³⁾，僅因 28SstIC 引子設計之故，使第 1,983 個核苷酸由 T 變成 G，亦致使蛋白的第 661 個氨基酸由天門冬胺酸 (Aspartic acid, D) 變成麩胺酸 (Glutamic acid, E)。



圖四、共同轉殖菸草之轉基因鑑定。(a) 共同轉殖菸草細胞內的 *cryIA(c)* 與 *cryIC* 基因，以及基因組成與相對位置圖譜。轉殖細胞核 (nuclear transgenic, Nu-TG) 的 *cryIA(c)* 基因表現區域片段長度共約 4.1 kb。轉入 *cryIC* 基因的目標位置為葉綠體 *rbcL* 與 *accD* 基因之間，(a) 中 WT 顯示未轉殖菸草葉綠體 *rbcL* 與 *accD* 基因的相對位置、南方墨漬法探針 *Pst* I – *Xho* I 片段之位置，以及基因附近之 *Hind* III 片段長度。(a) 中 Pt-TG 則顯示轉殖葉綠體 (plastid transgenic, Pt-TG) 的 *cryIC* 基因與其它基因之相對位置，以及造成重組後 *Hind* III 片段之改變。(b) 利用混合引子 syn-1Ac-F、syn1Ac-R、1C-F、1C-R 進行 PCR 檢定，得到 499 bp 之產物 (PCR-Ac) 與 598 bp 之產物 (PCR-C)，各產物之相對位置標示於(a)圖。(c) 南方墨漬法確認共同轉殖菸草同時含有 *cryIA(c)* 與 *cryIC* 基因。所有 DNA 樣品皆切以 *Hind* III 限

制酶。以 499 bp 之 PCR 產物 PCR-Ac 作為同位素標定探針，偵測 *cryIA(c)* 基因之存在。以未轉殖菸草 (WT) 葉綠體 *rbcL* 與 *accD* 基因間的 *Pst* I – *Xho* I 片段作為同位素標定探針，偵測 *cryIC* 基因之存在。樣品編號 1 : Nt-Ac/C-1, 2 : Nt-Ac/C-2, 3 : Nt-Ac/C-3, WT : 未轉殖菸草。圖(b)分子量標誌 M : 100 bp DNA ladder (GIBCO BRL, Life Technologies, MD, USA), 圖(c)之分子量標誌分別為 1 kb DNA ladder (圖(c)上, GIBCO BRL) 與 λ DNA/*Hind* III 片段 (圖(c)下)。

Fig. 4. PCR and Southern blot analyses of *cryIA(c)* and *cryIC* genes in the co-transformed transgenic tobaccos. (a) A schematic diagram with *cryIA(c)* and *cryIC* gene cassettes inserted in the nuclear and plastid genomes are shown. The relative gene organizations in the plastid genome for the non-transformed (wild type, WT) and the transformed tobaccos (plastid-transgenic, Pt-TG) are also shown. The length of the synthetic *cryIA(c)* gene expression cassette transformed into the nucleus (nuclear transgenic, Nu-TG) is about 4.1 kb. The *cryIC* gene was expected to be targeted into the intergenic region of *rbcL* and *accD* genes of tobaccos chloroplast. The expected length of the *Hind* III DNA fragments for the non-transformed and the transformed tobaccos are indicated. The 2.2 kb *Pst* I–*Xho* I plastid DNA fragment used as the probe in Southern blotting and the size and position of PCR-amplified DNA fragments for *cryIA(c)* and *cryIC* genes are indicated above each diagram. (b) The transgenic tobaccos were assayed by multiplex PCR using four mixed primers. A 499-bp product (PCR-Ac) amplified from the *cryIA(c)* gene using primers syn1Ac-F and syn1Ac-R, and a 598-bp product (PCR-C) amplified from *cryIC* gene using primers 1C-F and 1C-R are indicated by the arrows. (c) Southern blot analyses for *cryIA(c)* and *cryIC* genes in transgenic tobaccos. All genomic DNA samples were digested with *Hind* III, then probed with the PCR-Ac fragment amplified from the *cryIA(c)* gene for detecting the integrity of the synthetic *cryIA(c)* gene (upper panel) or probed with the *Pst* I–*Xho* I plastid DNA fragment for integration of the *cryIC* gene into the plastid genome (lower panel). The hybridized DNA fragments with the expected size shown in (a) are indicated by arrows. The molecular weights were measured using a 100-bp DNA ladder (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) in (b), and by a 1-kb DNA ladder (GIBCO BRL, upper panel) or λ DNA/*Hind* III fragments (lower panel) in (c). Numbers 1, 2, and 3 in (b) and (c) indicate the three individual transgenic plants Nt-Ac/C-1, -2, and -3, respectively.

共同轉殖菸草之鑑定

經由組織培養篩選得到之抗性植株，先使用複合式 PCR (multiplex PCR) 進行初步之確認。*cryIA(c)* 基因的檢驗是利用 PCR 引子對 syn1Ac-F 與 syn1Ac-R, *cryIC* 基因之鑑定是利用 PCR 引子對 1C-F 與 1C-R。共同轉殖菸草若含檢定標的 *cryIA(c)* 基因，可得 499 bp 之片段，位置在 *cryIA(c)*

基因的尾端 (圖四 a)；若含 *cryIC* 基因，可得 598 bp 之片段，位置在 *cryIC* 基因的中段 (圖四 a)。使用具 Spc^r 、 Hyg^r 雙抗性的共同轉殖菸草總量 DNA 作為模板，將上述 4 條引子同時加入 PCR 反應中，產物經過 2% 瓊膠電泳，可得到 499 bp 之片段 (PCR-Ac) 與 598 bp 之片段 (PCR-C)，初步證明菸草 Nt-Ac/C-1、-2、-3 同時含有

cryIA(c) 與 *cryIC* 基因 (圖四 b)。進一步利用南方墨漬法證明植物基因組內確實含有抗蟲基因。*cryIA(c)* 基因的鑑定係利用 PCR 引子對 *syn1Ac-F* 與 *syn1Ac-R* 所得到 499 bp 的 PCR-Ac 片段作為探針 (圖四 a)。*cryIC* 基因之鑑定則利用包含部分葉綠體 *rbcL* 與 *accD* 基因的 *Pst I - Xho I* 片段作為探針，長約 2.2 kb (圖四 a)。抽取菸草 Nt-Ac/C-1、-2、-3 與未轉殖菸草 (WT) 的總量 DNA，切以 *Hind III* 限制酶，經 1.2% 瓊膠片電泳、轉漬與雜交反應，偵測出 4.1 kb 位置的訊號，是包含 2.02 kb 的玉米 ubiquitin 基因啟動子、人工合成之 *cryIA(c)* 基因、260 bp 之 NOS 終止子，全長 4.1 kb 的片段，顯示菸草 Nt-Ac/C-1、-2、-3 含有 *cryIA(c)* 基因，未轉殖菸草則無訊號 (圖四 c 上)。利用葉綠體基因 *Pst I - Xho I* 片段作為探針，可偵測到未轉殖菸草的 *Hind III* 片段，長度約 11.5 kb。抗 *Spc* 的基因 *aadA* 與 *cryIC* 基因插入菸草葉綠體的基因組中，若插入預期的 *rbcL* 與 *accD* 基因之間，則可被葉綠體基因 *Pst I - Xho I* 片段之探針偵測出 2 個 *Hind III* 片段，分別是 8.2 kb 與 7.1 kb，係

因插入的 *aadA* 與 *cryIC* 基因間多出 1 個 *Hind III* 切位，使得上述未轉殖菸草葉綠體的 11.5 kb 之 *Hind III* 片段變成 2 個 *Hind III* 片段 (圖四 a)。由圖四 c 之下圖可知菸草 Nt-Ac/C-1、-2、-3 含有 *cryIC* 基因。南方墨漬法的訊號證明菸草 Nt-Ac/C-1、-2、-3 為同時含有 *cryIA(c)* 與 *cryIC* 基因的共同轉殖菸草。

cryIA(c) 與 *cryIC* 基因分別造成之殺蟲效果

蘇力菌毒素基因 *cryI* 系列的殺蟲效果係主要針對鱗翅目之幼蟲，*cryI* 系列中各分類基因又有特別的目標昆蟲⁽³⁰⁾，其中 *cryIA(c)* 基因對蕃茄夜蛾的幼蟲特別有效，而 *cryIC* 基因則對斜紋夜盜蛾的幼蟲特別有效，故將共同轉殖菸草 Nt-Ac/C-1、-2、-3 分別餵食斜紋夜盜蛾與蕃茄夜蛾幼蟲，以便觀察殺蟲效力。

共同轉殖菸草 Nt-Ac/C-1、-2 在餵食試驗的 24 h 後，即造成 20% 與 56% 的斜紋夜盜蛾三齡初幼蟲之死亡率 (表一)，同時更換未轉殖之菸草葉片供存活的幼蟲取食，餵食試驗的 48 h 後，取食過 3 株共同轉殖

表一、含雙蘇力菌毒素基因 *cryIA(c)* 與 *cryIC* 之共同轉殖菸草對斜紋夜盜幼蟲¹⁾ 之殺蟲效力

Table 1. Insecticidal efficacy of the transgenic tobaccos co-transformed with the synthetic *cryIA(c)* and *cryIC* genes against larvae of the tobacco cut worm (*Spodoptera litura*)¹⁾

Plants	Mortality (%) ²⁾				Weight increased ³⁾ (%) after 96 h
	Hours after treatment				
	24 h	48 h	72 h	96 h	
Nt-Ac/C-1	20	100	—	—	—
Nt-Ac/C-2	56	100	—	—	—
Nt-Ac/C-3	0	100	—	—	—
WT ⁴⁾	0	0	0	20	224.0 ± 10.4

¹⁾ Early 3rd instar larvae were used.

²⁾ An average of 1 larva per 20 cm² of leaf area and 3 replicates for each assay were applied in this study. Tested leaves were soaked in water to keep them fresh.

³⁾ The weight of surviving larvae was measured at the beginning and the end of treatment.

⁴⁾ WT, wild-type tobacco.

表二、含雙蘇力菌毒素基因 *cryIA(c)* 與 *cryIC* 之共同轉殖菸草對番茄夜蛾（玉米穗蟲）幼蟲¹⁾之殺蟲效力

Table 1. Insecticidal efficacy of the transgenic tobaccos co-transformed with the synthetic *cryIA(c)* and *cryIC* genes against larvae of the tomato fruit worm (*Helicoverpa armigera*)¹⁾

Plants	Mortality (%) ²⁾				Weight increased ²⁾ (%) after 96 h
	Hours after treatment				
	24 h	48 h	72 h	96 h	
Nt-Ac/C-1	0	0	0	25	+ 41.5 ± 12.5
Nt-Ac/C-2	0	9	18	27	+ 51.7 ± 10.7
Nt-Ac/C-3	17	17	17	33	+ 10.6 ± 6.8
WT ²⁾	0	0	0	17	+ 255.0 ± 18.2

¹⁾ Late 3rd instar larvae were used.

²⁾ As described in Table 1.

菸草之幼蟲全部死亡，死亡率達 100%（表一）。作為對照組的未轉殖菸草（WT）則幾乎不影響斜紋夜盜蛾幼蟲的取食能力，只有在餵食試驗的 96 h 後，出現無預期的 20% 自然死亡率，其存活的幼蟲平均體重增加 224%（表一）。由此顯示位於葉綠體基因組內的 *cryIC* 基因可快速導致斜紋夜盜蛾幼蟲的死亡。

在餵食蕃茄夜蛾三齡末幼蟲方面，共同轉殖菸草 Nt-Ac/C-3 在餵食試驗的 24 h 後，可造成 17% 的死亡率，96 h 後死亡率為 33%。共同轉殖菸草 Nt-Ac/C-2 在餵食試驗的 48 h 後，造成 9% 的死亡率，72 h 後死亡率為 18%，96 h 後增為 27%。共同轉殖菸草 Nt-Ac/C-1 則在餵食試驗的 96 h 後，才造成 25% 的死亡率。3 株共同轉殖菸草對蕃茄夜蛾幼蟲所造成的死亡率約在 25 - 33%，若評估對照組 WT 所造成的自然死亡率 17%，則估計共同轉殖菸草中的 *cryIA(c)* 基因僅能造成 20% 以下的蕃茄夜蛾幼蟲死亡率；然而，估計幼蟲取食菸葉 96 h 後體重之變化，明顯觀察出取食共同轉殖菸草之蕃茄夜蛾幼蟲，其平均體重增加率僅為 10.6 - 51.7%，是對照組幼蟲平均體重增加率（255%）的 4 - 20%，顯示蕃

茄夜蛾幼蟲在取食共同轉殖菸草後，食慾受到影響，取食能力變差。

討 論

在植物體內表現蘇力菌 ICP，以達害蟲防治之目的，在現代農業科技中具有相當重要的應用價值。隨著轉殖與組織培養技術的開發與改良，已然可達成原核與真核生物間之基因交流。生物間基因密碼對應之氨基酸種類雖然大致相同，但原核與真核生物基因密碼使用率卻迥然不同⁽⁴³⁾，雖然低使用率之基因密碼未必能阻礙轉基因之表現⁽⁶³⁾，然而修飾蘇力菌基因的密碼子足以提昇抗蟲基因在轉基因植物之表現⁽⁴⁹⁾。原核基因序列上的某些特別區域有可能在植物體內造成 mRNA 表現受阻或 mRNA 穩定性變差。在轉基因植物表現蘇力菌 ICP 基因的報導中曾顯示 AU 含量較高的 mRNA 容易產生轉錄早熟中斷或 mRNA 遭快速分解之不穩定現象^(21, 46)，修飾基因密碼子有可能是因為改變了對 mRNA 表現或穩定性造成影響的序列，再輔以密碼子使用效率之提昇，才能提高轉殖作物之抗蟲效果；亦即

將 AT 含量較高的基因加以修飾，使 G+C% 提高可減少轉錄早熟中斷或 mRNA 遭快速分解之不穩定現象發生，使 mRNA 穩定性增加，進而造成殺蟲效果提高，原先的密碼使用率之提昇則未必是改善殺蟲效果的主要因素^(20, 21, 44)。

比較野生型的 *cryIaCl* 與人工合成的 *cryIA(c)* 基因之 N 端毒性蛋白之核酸序列，在幾乎相同的氨基酸序列下，野生型的 *cryIaCl* 基因 G+C% 為 37.3%，本試驗使用人工合成的 *cryIA(c)* 基因 G+C% 則達 47.7%，另一基因序號 AF023672 的人工合成 *cryIA(c)* 基因 G+C% 更達 64.1%，除觀察密碼變異頻率之外，蒐尋各基因中有可能造成轉錄早熟中斷的序列 AATAAT⁽²¹⁾，發現野生型的 *cryIaCl* 基因上有 3 處，分別位於自轉譯起始密碼子 ATG 算起的核苷酸位址 960 - 965、1126 - 1131、1387 - 1392，而人工合成的基因則無。蒐尋在菸草中會造成 mRNA 不穩定的 AUUUA 序列⁽⁴⁶⁾，發現野生型的 *cryIaCl* 基因中有 10 處，分別位於自 ATG 算起的核苷酸位址 325 - 329、497 - 501、503 - 507、584 - 588、693 - 697、799 - 803、1275 - 1279、1383 - 1387、1476 - 1480，以及 1812 - 1816。人工合成基因則已將這些位置完全修飾，故轉殖人工合成基因 *cryIA(c)* 至菸草，在 mRNA 穩定性方面應無虞。分析另一共同轉殖的野生型 *cryIC* 基因，估算其 G+C% 為 36.6%，且序列中有 4 處可能造成轉錄早熟中斷的 AATAAT 序列，在菸草中會造成 mRNA 不穩定的 AUUUA 序列則有 13 處，將其轉殖入菸草葉綠體，所得之轉殖植株殺蟲效率在 48 h 後即達到 100%，顯示 AU 含量較高的蘇力菌毒素基因 mRNA 在葉綠體中不容易產生轉錄早熟中斷或 mRNA 遭快速分解之不穩定現象。在共同轉殖菸草中的人工合成 *cryIA(c)* 基因造成 25 - 33% 的低死亡率，有可能因基因表現量低，而未能致蟲於死，但受試幼蟲體重增加率僅為對照組

之 4 - 20%，此結果可能是因為人工合成 *cryIA(c)* 基因持續表現低量的 ICP 或者是 ICP 的穩定性好，所以即使在低量表現的情況下，仍能影響受試幼蟲之食慾，使其取食能力變差。

人工合成基因 *cryIA(c)* 已去除影響 mRNA 穩定度之因子，故由基因靜默與啟動子效能方面檢討基因低量的表現。由於共同轉殖菸草是經由粒子轟擊法所得，進入菸草細胞內的 *cryIA(c)* 基因數有可能超過 1 個，但是目前已知基因高拷貝數或者是 cytosines 的甲基化 (methylation) 皆不是造成植物轉基因靜默的主因，而是進入細胞內的基因能否保持完整，才是造成基因靜默的主要因素之一⁽³⁶⁾。因此，製備 3 株共同轉殖菸草之總量 DNA，切以 *Hind* III 限制酶，則因玉米 ubiquitin 基因啟動子、人工合成之 *cryIA(c)* 基因，以及 NOS 終止子，包含在全長 4.1 kb 的片段中，配合使用 PCR 放大的部分人工合成 *cryIA(c)* 基因片段作為探針，若可偵測進入菸草細胞的含 *cryIA(c)* 基因之片段為 4.1 kb，則表示人工合成之 *cryIA(c)* 基因仍保持完整。由圖四 c 上圖可知在南方墨漬法的偵測下，細胞內的人工合成之 *cryIA(c)* 基因仍保持完整，且並未觀察出有大於或小於 4.1 kb 之片段。除了相同基因在構築時形成連鎖陣列 (concatameric array) 會造成轉基因靜默之外⁽²⁶⁾，質體上構築的單一轉基因片段進入細胞後自動形成連鎖陣列而造成轉基因靜默的機會幾乎沒有。在位置效應 (position effect) 的考量方面，已知轉基因插入不同的位置將影響該基因的表現⁽²²⁾，若插入的核染色質 (chromatin) 區域為無轉錄活性，則基因不易表現。由於位置效應有可能造成轉基因低量的表現，本試驗得到的 3 株共同轉殖菸草，殺蟲效率皆在 25 - 33% 左右，顯示轉基因植物的表現量皆很低，有可能是因位置效應所造成。另外，檢視其它有可

能造成受試幼蟲低死亡率、低成長率的因素，尚有基因啟動子效能較差之原因。

轉殖質體 pCAM-Ac 上的 *cryIA(c)* 基因使用玉米 ubiquitin 啟動子，在水稻的轉殖上，所得轉植株 91RM-44 能在 4 - 5 天內造成二化螟蟲 (striped stem borer) 或一點螟蟲 (yellow stem borer) 幼蟲達 100% 的死亡率⁽¹¹⁾。在利用玉米原生體 (protoplast) 的電穿孔 (electroporation) 短暫試驗 (transient assay) 中，顯示使用 ubiquitin 啟動子轉錄 CAT (chloramphenicol acetyl transferase) 基因，所得之 CAT 酵素活性較使用 CaMV35S 啟動子的 CAT 酵素活性高出 10 倍，但是若利用菸草原生體測試 ubiquitin 啟動子的效率，則顯示其效率僅達 CaMV35S 啟動子的十分之一以下⁽¹²⁾。將 ubiquitin 啟動子連同人工合成的 *cryIA(c)* 基因轉入菸草中，育成的轉殖植株殺蟲效率亦偏低，佐證了利用原生體的短暫試驗之結果。因此推論共同轉殖菸草 Nt-Ac/C-1、Nt-Ac/C-2、Nt-Ac/C-3 對蕃茄夜蛾的致死率低，應是單子葉植物的啟動子在雙子葉植物中表現效率不彰所致。

目前在轉基因植物中最常利用的啟動子是植物病毒的啟動子，例如 CaMV35S 啟動子。在商品化的轉殖作物中亦常使用，例如轉殖 ICP 基因之抗蟲玉米、抗殺草劑之 RR (Roundup Ready) 大豆，或耐運送與儲存之 FlavrSavr 蕃茄 (已停產)。雖然在風險評估上，將植物病毒的啟動子插入植物染色體內並不容易因他種病毒感染轉殖作物而發生病毒間核酸分子之重組，進而產生危害植物更嚴重的病毒，或甚至經由食物鏈而造成動物新病毒之發生⁽³¹⁾，然而缺失基因 VI 的 CaMV 病毒進入帶有基因 VI 的轉殖油菜而發生分子間重組現象，使 CaMV 病毒活化的例子⁽²⁵⁾，以及針對 CaMV35S 啟動子造成轉基因植物安全性的爭議⁽²⁹⁾，在未來有可能影響利用植物體作為生物反應器的商業研究，而改

以選擇植物本身轉錄、轉譯調控機制的改良，或者是葉綠體基因轉殖，作為植物體大量表現外來基因的安全性考量^(15, 16)。

葉綠體基因轉殖技術發展約 10 年，在抗蟲^(3, 19, 37, 41)、抗殺草劑⁽¹⁷⁾，以及藥用蛋白的基因表現上⁽⁵⁴⁾，均獲有成功經驗。目前已知轉移至葉綠體的抗蟲基因有 *cryIA(c)*^(3, 41) 與 *cry2Aa2*^(19, 37)，可使菸草青蟲 (*Heliothis virescens*)、玉米穗蟲 (*Helicoverpa zea*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 造成 100% 的死亡率。本試驗構築適用的葉綠體轉殖載體 pN-IC101，載體上有不含結晶蛋白區域的 *cryIC* 基因，在共同轉殖下，*cryIC* 基因插入菸草葉綠體中 (圖四)。將轉殖植株葉片餵食斜紋夜盜蛾 (*Spodoptera litura*) 幼蟲，在 2 天後即造成 100% 死亡率，顯示葉綠體是 ICP 的優良表現場所。

由於夜蛾科的蛾類 *Spodoptera* 在農業上屬於危害嚴重的害蟲，而 Cry1C 殺蟲蛋白是 Cry1 類型的蘇力菌 ICP 中，對夜蛾害蟲 *Spodoptera* 最具殺傷力的 ICP 種類⁽³³⁾。目前已知的 *cryIC* 基因種類有 10 種⁽¹⁴⁾，圖三顯示的 *cryIC* 基因是由 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD229 分離，構築於 pSB744 質體上，原認定核酸序列與 *cryICa1* 相同^(8, 13)，利用可信度較高的核酸自動定序儀進行更精確的雙向定序，發現共同轉殖菸草中的 *cryIC* 基因與 *cryICa5* 完全相同，僅因 PCR 引子設計之故，使第 661 個氨基酸天門冬胺酸密碼子 GAU 變成 GAG，氨基酸則變更為麩胺酸。圖四的南方墨漬法顯示，構築於葉綠體轉殖載體的 *cryIC* 基因經由葉綠體同源核酸序列的重組，已插入菸草葉綠體 *rbcL* 與 *accD* 之間，並由 *rbcL* 的啟動子與 *E. coli* 的 *tha* 終止子調控轉錄，表現的蛋白對三齡的斜紋夜盜蛾幼蟲造成 100% 的致死效果，至於基因表現的分子分析則待進一步詳察。

與共同轉入植物細胞的人工合成基因

cryIA(c) 比較，轉入葉綠體的 *cryIC* 基因 G+C% 較低，序列中存在有 4 處可能造成轉錄早熟中斷的 AATAAT 序列，會造成 mRNA 不穩定的 AUUUA 序列也有 13 處，由 *cryIC* 基因呈現顯著的殺蟲效果顯示真核系統的 RNA 成熟機制應不存在於葉綠體中。此外，單一葉綠體內自然存在著高拷貝數的葉綠體基因組，顯示插入的外來基因即使隨著葉綠體基因組的複製而形成高拷貝數，也不致有基因靜默的現象發生。總之，共同轉殖菸草品系展示了利用粒子轟擊法可將不同目標的轉殖質體送入植物細胞的不同部位，同時進行 ICP 基因的表現，並證明葉綠體實為原核基因在植物系統中表現的最佳場所。

謝 辭

承蒙 行政院農委會計劃（編號：86 科技-1.1-糧-31(4)）之部分經費補助。國立陽明大學翟建富教授提供質體 pSB744、澳洲坎培拉（Canberra）市 CAMBIA 機構（Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture）之 Dr. Jefferson 提供質體 pCAMBIA1300、美國康乃爾（Cornell）大學之 Dr. D. B. Stern 提供質體 pNT1 與 pJS25、加拿大渥太華（Ottawa）大學之 Dr. I. Altosaar 提供質體 pUBC 及並授權使用合成基因 *cryIAc* 之序列、國立中興大學楊明德副教授提供質體 pUC4-KSAC、國立中興大學生物科技發展中心之核酸定序實驗室陳惠宜小姐協助基因定序工作，謹此誌謝。

引 用 文 獻

1. 陳彥宇。1995。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因在轉基因植物表現之研究。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。84 頁。
2. 陳鵬文。1992。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因之分離及應用。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。80 頁。
3. 張中林、任延國、沈燕新、山松、范國昌、吳祥甫、錢凱先、沈桂芳。2000。蘇云金芽孢（Bt）桿菌晶體毒蛋白基因在菸草葉綠體中的表達。遺傳學報 27：270-277。
4. 趙存友、袁正強、秦紅敏、田穎川。2001。轉雙抗蟲基因菸草的研究。生物工程學報 17：273-277。
5. Adang, M. J., Staver, M. J., Rocheleau, T. A., Leighton, J., Barker, R. F., and Thompson, D. V. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.
6. Bechtel, D. B., and Bulla, L. A. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 127: 1472-1481.
7. Carozzi, N. B., Warren, G. W., Desai, N., Jayne, S. M., Lotstein, R., Rice, D. A., Evola, S., and Koziel, M. G. 1992. Expression of a chimeric CaMV 35S *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 20: 539-548.
8. Chak, K. F., Tseng, M. Y., and Yamamoto, T. 1994. Expression of the crystal protein gene under the control of the α -amylase promoter in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2304-2310.
9. Chen, L. J., Liang, Y. J., Jeng, S. T., Orozco, E. M., Gumpert, R. I., Lin, C. H. and Yang, M. T. 1995. Transcription termination at the *Escherichia coli* *th*

- terminator by spinach chloroplast RNA polymerase *in vitro* is influenced by downstream DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 23: 4690-4697.
10. Chen, L., Marmey, P., Taylor, N. J., Brizard, J. -P., Espinoza, C., D'Cruz, P., Huet, H., Zhang, S., de Kochko, A., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. 1998. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat. Biotechnol.* 16: 1060-1064.
 11. Cheng, X., Sardana, R., Kaplan, H., and Altosaar, I. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2767-2772.
 12. Chistensen, A. H., Sharrock, R. A., and Quail, P. H. 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
 13. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D. H. 1998. Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
 14. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., and Dean, D. H. 2002. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html (March, 12).
 15. Daniell, H. 1999. The next generation of genetically engineered crops for herbicide and insect resistance: containment of gene pollution and resistant insects. *AgBiotechNet* 1: 1-7.
 16. Daniell, H. 2000. Genetically modified food crops: current concerns and solutions for next generation crops. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 17: 327-352.
 17. Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S., and Lee, S. B. 1998. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat. Biotechnol.* 16: 345-348.
 18. Davey, M. R., Rech, E. L., and Mulligan, B. J. 1989. Direct DNA transfer to plant cells. *Plant Mol. Biol.* 13: 273-285.
 19. De Cosa, B., Moar, W., Lee, S. B., Miller, M., and Daniell, H. 2001. Overexpression of the Bt *cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.* 19: 71-74.
 20. De Rocher, E. J., Vargo-Gogola, T. C., Diehn, S. H., and Green, P. J. 1998. Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiol.* 117: 1445-1461.
 21. Diehn, S. H., Chiu, W. -L., De Rocher, E. J., and Green, P. J. 1998. Premature polyadenylation at multiple sites within a *Bacillus thuringiensis* toxin gene-coding region. *Plant Physiol.* 117: 1433-1443.
 22. Finer, J. J., Finer, K. R., and Ponappa, T. 1999. Particle bombardment mediated transformation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240: 59-80.
 23. Fischhoff, D. A., Bowditch, K. S., Perlak, F. J., Marrone, P. G., McCormick, S. M., Niedermeyer, J. G., Dean, D. A.,

- Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E. J., Rochester, D. E., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technol.* 5: 807-813.
24. Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Kyojuka, J., and Shimamoto, K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology (NY)* 11: 1151-1155.
25. Gal, S., Pisan, B., Hohn, T., Grimsley, N., and Hohn, B. 1992. Agroinfection of transgenic plants leads to viable cauliflower mosaic virus by intermolecular recombination. *Virology* 187: 525-533.
26. Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. I., and Whitelaw, E. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat. Genet.* 18: 56-59.
27. Hadi, M. Z., McMullen, M. D., and Finer, J. J. 1996. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 15: 500-505.
28. Heifetz, P. B. 2000. Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie* 82: 655-666.
29. Ho, M. -W., Ryan, A., and Cummins, J. 2000. Hazards of transgenic plants containing the cauliflower mosaic viral promoter: authors' reply to critiques of "The cauliflower mosaic viral promoter - a recipe for disaster?" *Microb. Ecol. Health Dis.* 12: 6-11.
30. Hofte, H., and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
31. Hull, R., Covey, S. N., and Dale, P. 2000. Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12: 1-5.
32. John, M. E., and Keller, G. 1996. Metabolic pathway engineering in cotton: biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 12768-12773.
33. Kalman, S., Kiehne, K. L., Libs, J. L., and Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131-1137.
34. Klee, H., Horsch, R., and Rogers, S. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 467-486.
35. Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivery of nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.
36. Kohli, A., Gahakwa, D., Vain, P., Laurie, D. A., and Chistou, P. 1999. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* 208: 88-97.
37. Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S. F., Gould, F., and Moar, W. J. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 1840-1845.

38. Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., and Kadwell, S. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technol.* 11: 194-200.
39. Maqbool, S. B., and Chistou, P. 1999. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Mol. Breed.* 5: 471-480.
40. Maqbool, S. B., Riazuddin, S., Loc, N. T., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A., and Chistou, P. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Mol. Breed.* 7: 85-93.
41. McBride, K. E., Svab, Z., Schaaf, D. J., Hogan, P. S., Stalker, D. M., and Maliga, P. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (NY)* 13: 362-365.
42. McLaren, J. S. 2000. Agricultural biotechnology: myth and measurement. *Mol. Diagn.* 5: 257-265.
43. Murray E. E., Lotzer, J., and Eberle, M. 1989. Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498.
44. Murray, E. E., Rocheleau, T., Eberle, M., Stock, C., Sekar, V., and Adang, M. 1991. Analysis of unstable RNA transcripts of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants and electroporated protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 16: 1035-1050.
45. Myasnik, M., Manasherob, R., Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Margalith, Y., and Barak, Z. 2001. Comparative sensitivity to UV-B radiation of two *Bacillus thuringiensis* subspecies and other *Bacillus* sp. *Curr. Microbiol.* 43: 140-143.
46. Ohme-Takagi, M., Taylor, C. B., Newman, T. C., and Green, P. J. 1993. The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11811-11815.
47. Parrott, W. A., All, J. N., Adang, M. J., Bailey, M. A., Boerma, H. R., and Stewart, C. N. Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 30P: 144-149.
48. Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., and Fischhoff, D. A. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technol.* 8: 939-943.
49. Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., and Fischhoff, D. A. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3324-3328.
50. Perlak, F. J., Stone, T. B., Muskopf, Y. M., Petersen, L. J., Parker, G. B., McPherson, S. A., Wyman, J., Love, S., Reed, G., and Bieber, D. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* 22: 313-321.
51. Russell, J. A., Roy, M. K., and Sanford, J.

- C. 1992. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* 98: 1050-1056.
52. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
53. Sardana, R., Dukhandjiev, S., Giband, M., Cheng, X., Cowan K., Sauder, C., and Altosaar, I. 1996. Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences *cryIA(b&c)* by expression in maize endosperm culture. *Plant Cell Rep.* 15: 677-681.
54. Staub, J. M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P. T., Hunter, P., Neha, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J. A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., and Russell, D. A. 2000. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* 18: 333-338.
55. Staub, J. M., and Maliga, P. 1992. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell* 4: 39-45.
56. Staub, J. M., and Maliga, P. 1993. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. *EMBO J.* 12: 601-606.
57. Stewart, C. N. Jr., Adang, M. J., All, J. N., Boerma, H. R., Cardineau, G., Tucker, D., and Parrott, W. A. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAC* gene. *Plant Physiol.* 112: 121-129.
58. Svab, Z., and Maliga, P. 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917.
59. Takeuchi, Y., Dotson, M., and Keen, N. T. 1992. Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Mol. Biol.* 18: 835-839.
60. Tang, K., Tinjuangjun, P., Xu, Y., Sun, X., Gatehouse, J. A., Ronald, P. C., Qi, H., Lu, X., Chistou, P., and Kohli, A. 1999. Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta* 208: 552-563.
61. Tang, W., Luo, X. Y., and Sanmuels, V. 2001. Gene silencing: double-stranded RNA mediated mRNA degradation and gene inactivation. *Cell Res.* 11: 181-186.
62. Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M., and Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37.
63. van Hoof, A., and Green, P. J. 1997. Rare codons are not sufficient to destabilize a reporter gene transcript in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 35: 383-387.
64. Wu, C. Y., Lin, C. H., and Chen, L. J. 1997. Identification of the transcription start site for the spinach chloroplast serine tRNA gene. *FEBS Lett.* 418: 157-161.

ABSTRACT

Lin, C. H.¹, Chang, M. L.¹, Tzeng, C. C.², and Chen, L. J.^{1*} 2002. **Co-transformation of the synthetic *cryIA(c)* and wild-type *cryIC* genes encoding *Bacillus thuringiensis* endotoxins into tobacco and their bipartite expression effects on insecticidal efficacy.** Plant Prot. Bull.44: 209-232 (¹Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC; ²Department of Biopesticide, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC)

Two *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) endotoxin genes, a synthetic *cryIA(c)* and a PCR-amplified *cryIC*, containing no C-terminal domain region responsible for crystallization, were cloned into plant transformation vectors pCAMBIA1300 and pCHL1 to form pCAM-Ac and pN-IC101, respectively. The resulting plasmids were delivered into tobacco plant cells by particle bombardment and subsequently screened for regenerated plants resistant to both hygromycin (Hyg) and spectinomycin (Sp). Three transgenic lines, Nt-Ac/C-1, -2, and -3, were obtained, and the coexistence of *cryIA(c)* and *cryIC* genes in each line was confirmed using PCR. Results of Southern blot assays further indicated the co-transformation of *cryIA(c)* and *cryIC* genes in each transgenic line. The hybridization pattern observed using a plastid DNA probe suggested that the *cryIC* gene was integrated into the plastid genome at the intergenic region of the *rbcL* and *accD* genes. The insecticidal activities of these two *Bt* genes in co-transformed transgenic lines were assessed by feeding transgenic plant leaves to third instar larvae of *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera*, respectively. The insecticidal efficacy against *S. litura*, caused by *cryIC* gene's product, was significant with a mortality rate of 100% at 48 hours after treatment. This implies the abundant expression of the *cryIC* gene in chloroplasts. Although the mortality rate (25%-33% at 96 hours after treatment) caused by the synthetic *cryIA(c)* gene's product was not significant among larvae of *H. armigera*, their weight increments (10.6%-51.7%) were much less than those of the control larvae (up to 255%). This observation again indicates that expression of the *cryIA(c)* gene in co-transformed tobacco provides a protection effect for transgenic plants against the larvae of *H. armigera*, although it is not as significant as that of *cryIC*. The different insecticidal efficacies of these two *Bt* genes may result from their different expression levels in two different genomes in plant cells. Our data therefore support the notion that the chloroplast is a better location for over-expression of *B. thuringiensis* endotoxin in the condition where no crystal is formed.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, insecticidal crystal protein, transgenic plant, co-transformation, nucleus, chloroplast)

*Corresponding author. E-mail: ljchen@dragon.nchu.edu.tw