

亮不亮？有關係！---螢火蟲的冷光基因在轉殖植物上的應用

The usage of luciferase gene from firefly for transformed plants

農藝系助理教授常玉強

*筆者找不到 luciferase gene 正確的中文翻譯，暫時譯為冷光基因；Luciferin 譯為冷光素。

為什麼要用螢火蟲的冷光？

來自螢火蟲的 *luc* 基因是用來研究植物基因表現的新工具。*luc* 基因的產物為 LUC 酵素 (luciferase)，該酵素可分解冷光素 (luciferin)，進而發光。LUC 酵素進行反應時需要 ATP，分解冷光素時產生波長 560nm 的黃藍光。螢火蟲之 *luc* 基因的編碼 DNA 序列 (cDNA) 已於 1985 年被 de Wet 等人選殖出，並可在細菌、植物及動物細胞中表現而發光。

上述 *luc* 基因的 cDNA，若單獨轉殖入細胞是不會表現的；只有當結合在一個啟動子 (promoter) 之後才有可能發光。因此，*luc* 基因可作為研究啟動子的工具--即作為「報導基因」：報導啟動子的表現量、表現時間及表現的組織特異性 (圖一)。「報導基因」有許多種，最常用的包括：*gus* 基因 (表現藍色)；*gfp* 基因 (表現螢光)；*luc* 基因 (表現冷光)。*gus* 報導基因的優點為可精確顯示啟動子在單一細胞的表現，並可以測定啟動子的表現量；缺點是測定時必須將植物細胞殺死。*gfp* 報導基因則克服了 *gus* 報導基因的缺點：可在活體細胞中測定啟動子的活性；但缺點是無法精確的進行定量分析 (檢測啟動子的表現量)。*luc* 報導基因則兼具前述兩者的優點，並無兩者的缺點：即一方面可在活體細胞中測定啟動子的活性 (經由 luciferase 活性的「報導」)，另一方面又可非常精密的檢測啟動子的表現量。更重要的是：luciferase (*luc* 報導基因的產物) 的反應是一個非常專一的反應 (圖二)，在不含 *luc* 基因的植物體中不會有類似的反應曲線。因此，即使某種植物本身含有會發出波長 560nm 的化合物，測定 luciferase 時也不會受到誤導。



圖一：PR-1a 啟動子的組織特異性。只在植物「節」(白色箭頭)及主根(紅色箭頭)的部分表現；報導基因為 *gus* 基因，因此啟動子有活性的組織呈現藍色，但因執行檢測時必須除去葉綠素，因此其他組織均呈透明，受檢測的植物也死了。

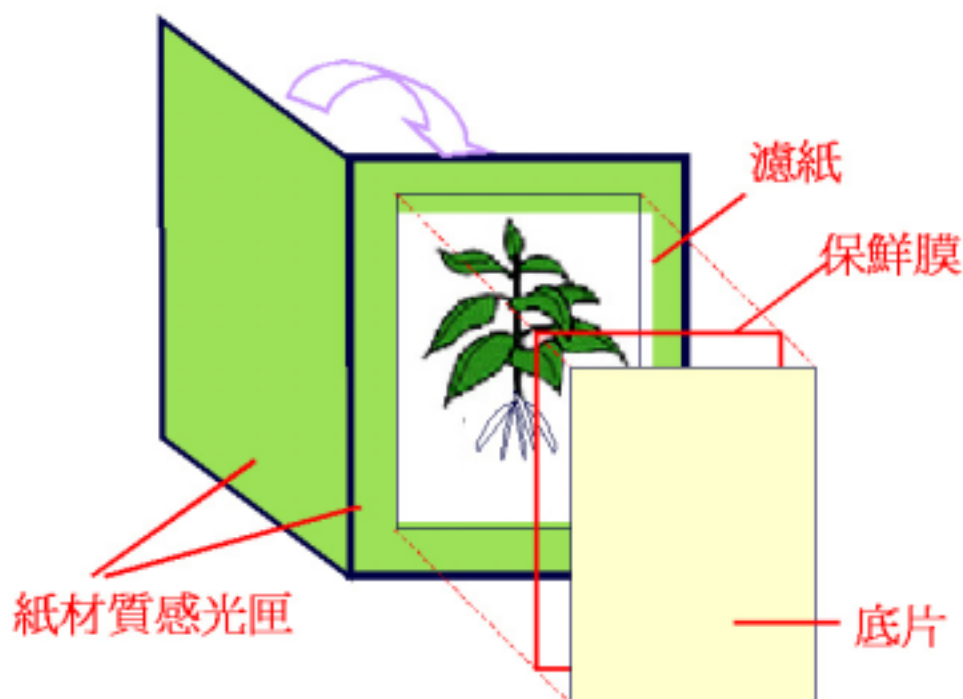


圖二：luciferase 活性的檢測是非常靈敏且具有專一性。IC 植物不含 *luc* 基因，活性數值為 39 (紅色框)；IK 植物含 *luc* 基因，活性數值為 189497。每一樣品測定時間為 2 秒，每 0.1 秒讀一次數據並由 * 顯示當時活性，據此 IK 植物之活性在 0.5 秒時達到最高其後遞減。螢火蟲的 luciferase-luciferin 反應均應顯示類似的反應曲線，IC 植物未顯示反應曲線，因此活性數值 39 是無效的，稱為背景值。

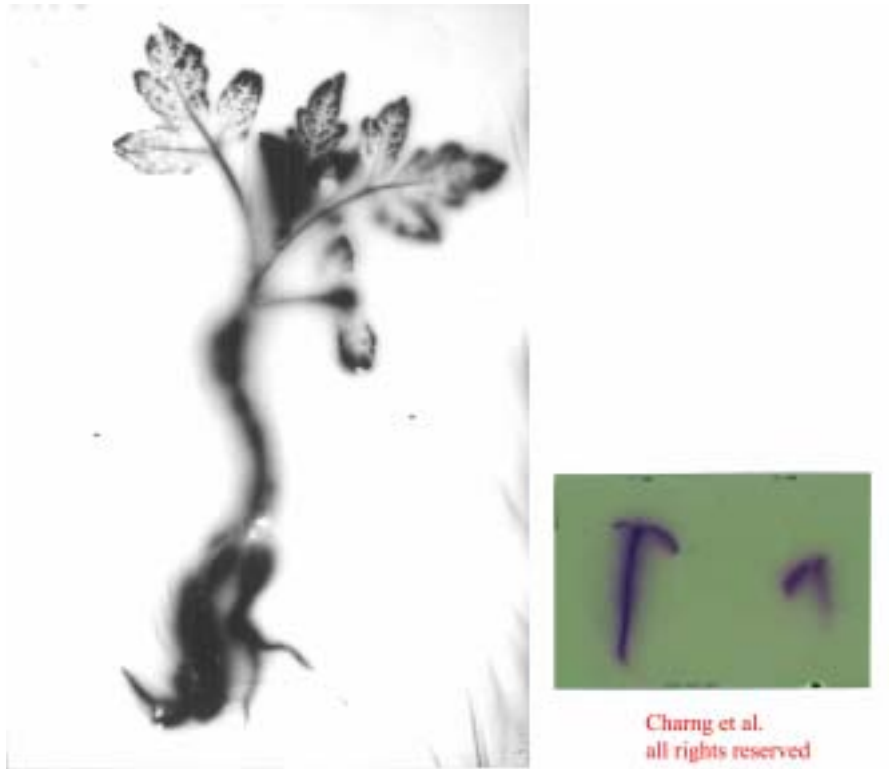
如何測定螢火蟲的冷光？

一、活體內測定 (*in vivo* Assay)

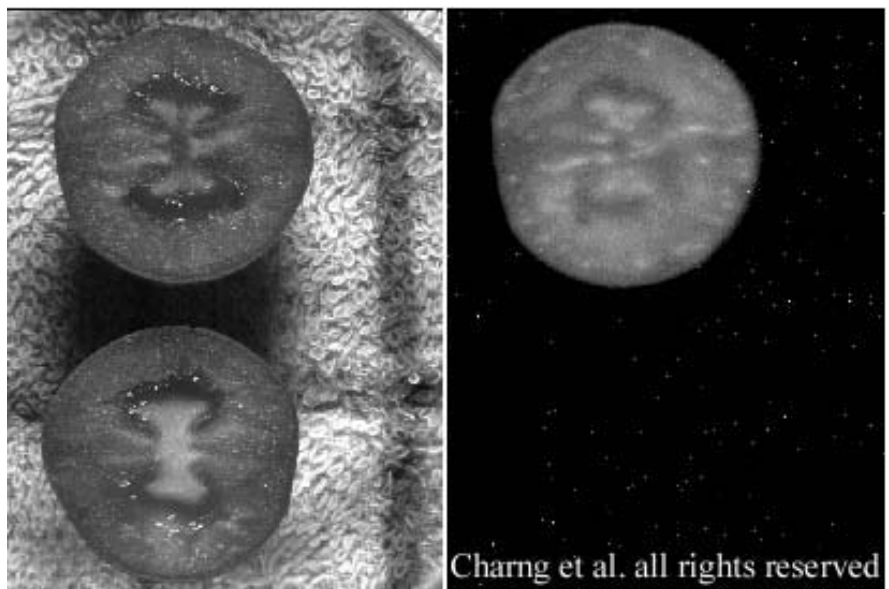
上述 luciferase 的活性可在活體細胞中測定。將含有 *luc* 基因的植物以含 0.4 mM 冷光素噴灑或以水耕 (含 0.4 mM 冷光素) 方式處理，約 10 分鐘後植物即可發光。最原始的活體測定是用感光底片來測定 (既然它會發光)。但是植物是立體的，底片是平面的，如何感光？訣竅乃比照作標本的方法如圖三：將植物整理約成平面一樣 (寬度約 0.5 公分)，置於保濕的濾紙上，以保鮮膜包覆。比照一般壓片方式，在黑暗中壓上感光底片並且置於紙作的壓片匣中 (金屬壓片匣空間小容易將植物夾死)。曝光一定時間後 (5 分鐘至 2 小時，依啟動子強弱而定)，以一般方式沖洗底片。影像顯示植物之何種器官 (或組織) 有 luciferase 的活性——亦即啟動子的活性 (圖四)。用感光底片來測定 luciferase 的活性的缺點可由圖四中蕃茄之發光影像顯示出來：當整棵植物發光強度相同時，愈接近底片的組織，所發的光愈容易被底片偵測；愈遠離底片的組織，所發的光愈不易被底片偵測發光強度愈強。因此，用感光底片來偵測冷光的方法，只能證明發光的組織具有活性，不能證明未偵測到冷光的組織就不具有活性。一個改善的方法就是使用攝影機並結合影像處理系統來偵測冷光，為了避免光害，測定時必須在全暗的環境，測定結果如圖四所示。



圖三：用感光底片來偵測冷光。只有當沒有 cooled CCD 攝影機時才使用這個方法。



圖四：含有 *luc* 基因的蕃茄用感光底片來偵測冷光。圖左：用黑白底片曝光；圖右：用彩色底片曝光，由於是負片，所以呈現紫色，顯示冷光應為互補色—黃綠色。



圖五：含有 *luc* 基因的兩種蕃茄轉殖株用 cooled CCD 攝影機偵測冷光。圖左：正常光照下之影像；圖右：黑暗下攝取之影像。結果顯示雖然兩種轉殖蕃茄均含有 *luc* 基因，但上面的轉殖蕃茄的啟動子才會在果實中表現。

二、活體外測定 (*in vitro* Assay)

上述活體內測定方法的缺點是無法精確的顯示活性的強弱 (定量分析) , 如欲做定量分析則必須使用活體外測定方法。如前所述, 冷光酵素-冷光素 (luciferase- luciferin) 的反應是一個非常專一又非常靈敏的反應。如果兩個啟動子的活性相差一萬倍, 也可以使用 *luc* 報導基因作定量分析。其測定大略分為三步: 一、從植物組織中萃取蛋白; 二、將蛋白混入 LUC 檢定緩衝液 (LUC assay buffer) ; 三、在黑暗中加入冷光素溶液。加入冷光素行後, 冷光強度將在第四分之一秒達到最高, 其後遞減。因此, 如欲精確測定冷光活性, 第三步驟時必須由機器執行並即時測定。雖然已發展出新技術, 可將前述活性遞減的現象延遲, 進而從容進行測試。但有時候欲判斷測定數據低的樣品究竟是背景質 (無活性) 或活性低, 可參考該樣品是否具有活性遞減軌跡的數據: 有遞減軌跡則為有活性, 無遞減軌跡則為背景質, 如圖二顯示。

結語及展望

- 一、 *luc* 報導基因分子生物學研究的好工具: 即一方面可在活體細胞中測定活性 (經由 luciferase 活性的「報導」), 另一方面又可作非常精密的定量分析。luciferase- luciferin 的反應是一個非常專一的反應, 在不含 *luc* 基因的植物體中不會有類似的反應曲線。因此, 測定時不會因背景質而誤導。
- 二、 使用攝影機並結合影像處理系統來偵測冷光 (即活體內測定), 目前大多用於植物組織或器官的冷光測定, 很少用於單一或少數細胞的冷光測定。未來發展重點在細胞級的冷光偵測, 並且針對樣品長時間追蹤偵測 (例如每小時偵測一次並持續 24 小時) 。

參考文獻

1. Howell SH, Ow DW, Schneider M: Use of the firefly luciferase gene as a reporter of gene expression in plants. In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds) Plant Molecular Biology Manual, pp. B8/1–B8/11. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1989).
2. Charng, Y.C., Pfitzner, A.J.P., Pfitzner, U.M., Charng-Chang, K.F., Tu, J. & Kuo, T.T. (2000) Construction of an inducible transposon, *INAc*, to develop a gene tagging system in higher plants. *Molecular Breeding* 6, 353-367.

3. Charng, Y.C., Ma, C. Tu, J. and Kuo. T.T. (1997) A 200-bp constructed inducible PR-1a promoter fusion to the *Ac* transposase gene drives higher transposition of a *Ds* element than the native PR-1a promoter fusion drives. *Plant Sci.* 130, 73-86.