

# 書 報 研 讀

題目：A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato

利用轉位子在蕃茄中大量釣取基因及啟動子

作者：Rafael Meissner, Veronique Chague, Qianho Zhu,  
Eyal Emmanuel, Yonatan Elkind, Avraham A. Levy

出處：The Plant Journal (2000)22(3), 265-274

指導老師：常玉強助理教授

報告學生：莊函寧

報告日期：89 年 9 月 27 日

報告時間：上午 11 時 10 分

報告地點：農藝館 112 室

## 摘要：

作者以玉米的 *Ac/Ds* 轉位子插入小型蕃茄品種 Micro-Tom 中，使蕃茄突變。本文即以此為背景，介紹了一個可分析蕃茄基因組的新方法。在 2932 個 F3 families 蕃茄中，有跳躍的 *Ds*，且性質穩定者用以作為外表型突變的選拔。在此之中，有 10 個 families 有明顯的外表型變異，但只有一個有偵測到 *Ds* 的存在。此外，作者發展了用螢火蟲冷光報導基因來調取啟動子 (promoter trapping)，及利用 GUS 來調取強化子 (enhancer trapping)。本篇也證實了冷光酵素 (luciferase) 基因為不具破壞性的報導基因，可用來鑑定、分離及體細胞的再生。運用上述方法可對突變的表現作定期的追蹤以及定量可誘導的基因。在 108 個做冷光活性選拔的 families 中，花中有 55% 的冷光活性，果實中有 11%，種子中只有 4%。由此推測，可能有很高比例的 *Ds* 插入基因中。藉由分析 *Ds* 附近的序列，發現在 50 個有 *Ds* 插入的基因中有 28 個與已知道功能的基因，或不太清楚功能的 ESTs 相似。總之，在此所談到的 2932 個 lines 中，每個 line 包含了 2~3 個 *Ds* 的插入，這表示本次實驗共約有 7500 個 *Ds* 的插入蕃茄的基因中。藉此可大量分析蕃茄中的基因功能及啟動子 (promoter) 的區域分離。這個方法在未來將會有很大的利用空間。

## 前言：

在順向遺傳學 (forward genetics) [註：也就是傳統的遺傳學中，由突變株去找出有興趣的性狀，繼而找出控制此性狀之基因的方法] 或逆向遺傳學 (reverse genetics) [註：也就是現代分子遺傳學中，由已知序列，藉由比對資料庫、後代植株表現，去定義出基因的方法]，極需要一種能有效分析基因功能的方法。如利用「自然的轉位子」插入所造成的突變。這類方法曾利

用於玉米及牽牛花的研究上。而阿拉伯芥的研究則利用農桿菌來導入一段 T-DNA 或是導入一段外來物種的轉位子如玉米的 *Ac/Ds* 及 *En/Spm*。近年來已有人提出在阿拉伯芥中，轉位子插入位置的相關資料，這更能快速分析 knockouts 的性狀[註：由突變株找出基因的方法]。在蕃茄中，大多插入性的突變是由 *Ac/Ds* 所致。這些因子具有活性，且其在蕃茄中的跳躍型式也有前人研究提及。一些和 *Ac/Ds* 一起分離出的蕃茄基因如：*Cf-4* 及 *Cf-9* 控制了蕃茄對不同 *Cladosporium fulvum* 種的抗性；*Dwarf* 是細胞色素  $P_{450}$  的同源基因；*DCL* 調控葉綠素的分化發展；*feebly gene* 則調控植株的代謝及發生。上述這些基因都是經由目標性的鈎取基因(target tagging)或分析 *Ac/Ds* 跳躍位置兩旁基因及找出與 *Ds* 相連結的基因來做基因鈎取 (gene-tagged)。儘管蕃茄在鈎取基因的運用上還算成功，仍須發展更有效率的方法於順向及逆向遺傳學的研究中。特別是針對蕃茄 ESTs 這種有已知序列但未確定功能的基因。之前也有人提出：小型品種 Micro-Tom 由於體型小、生命週期短又易於轉殖的特性加上轉入的 *Ac/Ds* 具有高活性，因此很適合做大量突變的實驗。

另一個插入性突變的運用是在移動因子（即 T-DNA 或轉位子）內接上一個報導基因 (reporter gene)，以找尋基因及強化子或啟動子。強化子的偵測可藉由將一個報導基因及一個活性較弱的啟動子置於一移動因子之中，當這段移動因子插到一個強化子附近時，可活化活性較弱的啟動子，使報導基因能夠表現。而啟動子的偵測可藉由將一個無啟動子(promoterless)的報導基因於一移動因子之中，當這段移動因子以正確方向插入一個啟動子下游附近時，報導基因就會表現。不管是鈎取強化子或鈎取基因 (gene-trapping)的方法都可以找出基因，再藉由外表型的突變可偵測到轉錄調控的現象。許多鈎取基因或鈎取啟動子的植物都利用 GUS 當作報導基因，但 GUS 在染色時有一個問題，就是染色及褪染[註：以酒精處理除去葉

綠素]的步驟會傷害植物。而無害報導基因如一螢光或冷光基因，在目前鈎取基因的運用上仍未普及。

本實驗，作者在 2932 個 families 中挑選具有插入穩定 *Ds* 的蕃茄來做產量的分析。接著檢測其外表型的突變及利用冷光酵素基因、GUS 基因來做鈎取基因或鈎取強化子的偵測。結果有高頻率的冷光被偵測到。接著又分析轉位子附近的序列，發現 *Ds* 容易插入基因中。本篇論文就以如何利用上述方法分析番茄中的基因來作探討。

## 結果：

### 收集有插入 *Ds* 的植株

用來準備插入在 Micro-Tom 的構築 (constructs) 如圖 1 所示。在此之中，*Ds378-GUS* 是當做鈎取強化子的工具，而 *Bam35S-Ac* 是一個穩定轉位酶 (transposase) 的來源。先前已有人提出這些在轉入 Micro-Tom 後都具有活性。*Ds251-LUC* 則是具有冷光報導基因的構築，當轉殖入 Micro-Tom 中可鈎取基因。這些構築包含了 NPT II gene，可用來當做轉殖標誌 (marker) 或當做插入基因 (re-insertion) 的標誌。NAM 會影響 *iaaH* 基因，用此特性當做 negative selection marker 以選取沒有轉入 *Bam35S-Ac* 的植株。植株中 *ALS* 基因與其啟動子間含有 *Ds* 時，只能抗 100 p.p.b 的 chlorosulfuron，一但 *Ds* 跳離時，植株可因 *ALS* 基因的表現，抗 chlorosulfuron 的濃度可提高至 3 p.p.m。

F1 種子是由含轉位酶的植株 (*Bam35S-Ac*) 分別和兩種含 *Ds* 植株 (12 個獨立的 *Ds378-GUS* 及 15 個獨立的 *Ds251-LUC*) 雜交而得。利用南方式墨點法 (southern blotting) 來決定轉殖株中 *Ds* 插入的數量。結果指出，依植株的不同，插入數量有 1~7 個的差異 (此篇未顯示數據)。然而由含

*Ds251-LUC* 的雜交而得的 F1 種子皆可生長。但與含 *Ds378-GUS* 植株雜交所得的 F1 種子只有一個可正常生長，其他都有胚發育不全的現象，至於原因為何仍不得而知。

此後作者又在 F1 植株生長環境中提高 chlorosulfuron 濃度[目的：篩選出含已跳躍 *Ds* 的植株]，與含 *Ds* 植株親本於同環境下比較，由此可得知 F1 植株內 *Ds* 的活性。本實驗於 F1 種子的發芽環境中加入大於 100 p.p.b 的 chlorosulfuron，依其發芽及生長程度與親本比較，來決定各植株間的 *Ds* 活性。而另一個活性測試是偵測 F1 植株中轉入 GUS 或 LUC 的活性，此在親代中偵測不出（此數據未顯示）。

和 *Ds-GUS* 及 *Ds-LUC* 雜交的植株共產生了 1768 個 F1，個別都對 100 p.p.b 的 chlorosulfuron 有抗性，且每個 F1 都可生長成植株，並可個別收種子。得到的種子發芽成 F2 幼苗，可經由以下篩選決定是否具有穩定跳躍因子：1.由 *ALS* 基因的表現推測 *Ds* 是否跳離，2.從植株對 Hygromycin 及 Kanamycin 的抗性來了解已跳離的 *Ds* 是否插入到染色體中，3.*Ds* 的穩定性則由對 Nam 抗性來做決定。經由這些篩選，19005 個由 *Ds-GUS* 雜交所得的 F2 幼芽，有 1451 個通過篩選，佔了 7.6%。而 20619 個由 *Ds-GUS* 雜交所得的 F2 幼苗中，有 1481 個通過篩選，佔了 7.2%。

上述的每個植株都可以視為一獨立的跳躍事件，此可由多數 *Ds* 從不同 F1 植株而來所證實。F1 植株會產生大於一個穩定跳躍的幼苗。南方式墨點法分析指出，約一半這種例子的姊妹系有獨立的跳躍事件發生。就 *Ds* 跳離比例率而言，約一半跳離的 *Ds* 不會重新插入 DNA 中，而且轉位西每是利用 NAM 篩選的[不含轉位西每構造的，對 NAM 會有抗性]（F2 後裔經由 NAM 選拔後，只有 1/4 存活下來），這顯示了 *Ds* 會有高比例的跳離，其範圍約在 60%左右（ $7.5 \times 2 \times 4$ ）。

若在 F1 植株中發生跳躍，而且其雌雄配子皆有遺傳到此特性，則可以

在 F2 中發現隱性的突變。儘管作者對於這類例子（稍後提及的細胞色素突變即是一例）已有探究，但本篇目標仍著重選拔 F3 families 中的突變。F3 的種子是由已通過先前篩選的 2932 (1451+1481) 個 F2 植株中獲得，作者依各 F2 植株分別收集其種子，且種子依各個 families 播種，並對各個生長出的外表型突變做篩選。2932 個 families 中，每個 family 約種 13 株，而全部種植的情形記錄如下：其中 18863 (1451× 13) 個 F3 植株是由 1451 株不同的 F2 (*Ds378-GUS*× *Bam35S-Ac*) 雜交而來。另外 19253 (1481× 13) 個 F3 植株是由 1481 株不同的 F2 (*Ds251-LUC*× *Bam35S-Ac*) 雜交所得。

### 突變篩選

上述而來的 F3 families 經由目測觀察外表型來做篩選。作者共發現了 10 個突變，其中 5 個是和 *Ds-GUS* 雜交而來；另外 5 個則是和 *Ds-LUC* 雜交而來。所含 6 個是葉綠素的突變（圖 2 之 c、d）；兩個是類似 TYLCV 感染植株的症狀（葉黃及葉捲曲的病毒）（圖 2 之 b）；一個是類似過敏的反應（此未顯示）；一個是子葉狹小，且植株成熟時期幾乎沒有葉子（圖 2 之 e-g），而那些無葉突變種的花有 4 個子房柄和柱頭結合一起（未顯示資料）。10 個突變中的 8 個符合 3:1 的分離率，這顯示了突變是由單一隱性配子所造成。作者利用南方式墨點法去偵測突變是否由於 *Ds* 插入而造成，作法是由每個突變 families 萃取 13 個個體的 DNA，用酵素處理、用吸墨法及用 *Ds* 當探針作分析。此後為了區別同型結合顯性及異型結合顯性，作者分別收集同一 family 中 13 株植株的種子，並且個別種下，以觀察下一代表現。在十個外表型突變中，只有葉綠素突變株（如圖 2 之 h, i），才有 *Ds* 因子和突變外表型一起分離的現象（此未顯示資料）。

### 藉由 LUC 報導基因做非侵略性的釣取基因

由 *Ds*-LUC 親代衍生出 108 個 F3 families，可藉 CCD camera 顯影偵測 LUC 在不同植株器官表現，也可針對冷光 (luminescence) 在幼苗、花、及幼果中的表現作篩選。此外也可看到冷光在不同部位的表現，如在胚軸、花藥、或花萼、或果實中 (圖 3)。在幼苗、果實、花中，光訊號的發生頻度分別是 4%、11%、55%。有器官專一性的訊號 (如只在花、只在果實、或只在種子) 發生頻度分別為 48%、2%、1%。GUS 在染色時會對植物造成傷害；但 LUC 是無害，而且是非破壞性的報導基因 (non-invasive reporter gene)，這特性開啟了許多研究的領域，如重新產生體細胞部份、及時找到基因的表現，或分析可誘導的基因。這類相關應用的例子將於下列提及。

由 *Ds*-LUC 和有轉位酉每的植株雜交而來的 F1 做顯影，可用於冷光

(luminescent) 部份的鑑定 (identify)，而此部分就是插入到基因中的區域。如本實驗子葉部份會放出特別強的光訊號，在生長的情形下切除，重新產生一株成熟的植株。之後，再把重新長成的植株中所有器官去做篩選，可發現所有器官都有冷光的表現 (如圖 4)。此植株所鈎取的啟動子，似乎是植物本身的，其再長成的植株和 35S-luciferase positive control 植株放在一起比較時，其啟動能力比 35S-promoter 強。其中一個 F3 幼苗拿來做根部冷光活性的偵測。可發現冷光表現的形式非常特別，是位在根尖上面的延長圈 (圖 5 之 a、b)。用手把含冷光的根彎進水平位置，且進一步將幼苗垂直種在培養皿上，24 小時後再重新照相一次。由於地心引力會造成根向下彎，基因活性可再移到彎曲及延長部份 (圖 5 之 c、d)。這顯示了基因表現可隨著時間到達。為了證實是否在 108 個 F3 測試 families 中可鈎取 (trapped) 到特別在高溫或低溫情況下可受到誘導的啟動子。作者在正常情況下，對幼苗照相，在 30 小時 4°C 處理後以室溫回復 12 小時後照相，及 20 小時 42°C 處理後，室溫回復 12 小時後重新照相。4 個幼苗確定在正常情況下生長 (每天 16 小時 25°C 處理)，可看到有光的放射；兩個在低溫處理後關掉啟

動子；一個在高溫處理後關掉啟動子。在這測試中沒有啟動子是在高溫或低溫的情況下會提高調控能力的。

### 釣取強化子

70 個由 *Ds378-GUS* × *Bam35-Ac* 而來的 F2 果實，且經穩定 *Ds* 選拔的，用來做 GUS 活性的選拔。四個果實確定有 GUS 的染色，且是以不同形式表現：有在維管束細胞中表現（圖 6a）；有經由整個果皮的表現（圖 6b）或僅在外果皮表現的（圖 6c、d）。這些植株的後裔進一步做其它的研究，如：GUS 活性是否受限於果實，或亦可在其他組織測得。結果顯示，其中兩個品系（lines）（圖 6a、b），GUS 活性只有在果實中表現；另外兩個（6c、d）亦在根莖葉中發現（未顯示出資料）。在此實驗中，negative 在使用染色情況下沒有顯示顏色。有趣的是，在果實中可看到呈現一個藍色的梯度（如圖 6c、d），這個梯度在下一代的測試中仍可看到）。

### *Ds* 插入位置之序列～

由高頻率的釣取基因而展現冷光（LUC）的現象推測，可能有多個 *Ds* 插入(insertion copy number)或是 *Ds* 易插入到基因中。在實驗中，複製數目（copy number）由 108 個 F3 *Ds*-LUC families 取 30 個做南方式墨點法分析可得。平均而言，在 F2 有穩定 *Ds* 所產生的 F3 植株中，平均每個 families 有 2-3 個 *Ds* 的插入（真正範圍由 1-4 都有）。總共而言，108 個 F3 families 產生了共約 250 個 *Ds* 的插入。在這些之中，由 *Ds* 附近的序列去測試 *Ds* 是否容易插入到基因中。由 inverse PCR 所做而來的 50 個 DNA 片段之序列分析整理於表 2。在 50 個 *Ds* 附近序列中，16 個和已知道功能的基因類似、12 個和不確定功能的 ESTs 相似、6 個和 T-DNA 部份一樣、16 個由分析得知和基因庫資料比對沒有太大的相似性。只有 3 個序列（#2、#5、#7）和



蕃茄已知的基因幾乎相同（在誤差範圍內），這指出了，由序列插入位置的不同，可找到新的蕃茄基因。

## 討論：

### 順向及逆向遺傳學和 *Micro-Tom Ac/Ds* 系統

本文介紹了一個在蕃茄中可大量製造插入性突變的方法。先前在蕃茄中發展插入性突變所做的努力多著重在目標性的鈎取基因(target transposon tagging)。這裡所介紹的這個系統非常適合在大族群作非目標性的基因鈎取(non-targeted tagging)。然而，鈎取(tagged)到突變株的基因之比率非常低。鈎取效率低的原因可能是由於 *Ds* 的活性強(會跳躍的比例約在 60%)，以及跳到基因中的 *Ds* 隨即又會跳回原來 T-DNA 中。這裡介紹的 2932 個有穩定插入 *Ds* 因子的 F3 品系中(38000 株植株)，約含 7500 個 *Ds* 因子插入(平均每一品系有 2-3 個)，這對逆向遺傳學的發展可能會有相當大的助益。作者估算了一下，發現約有一半的轉位會發生在基因上。所以 2932 個 F3 品系粗略計算約含 3000 個突變基因。

然而，這之中只有 10 個 families 有發現明顯的外表型突變，仔細的分析這些植株，包括去測量數量性狀。猜想，在植株生長期間，此族群因該能偵測到許多變化，就這點而言，對順向遺傳學可能大有幫助。

由插入位置的序列去猜測，由於 *Ac/Ds* 所造成插入性的突變容易插入到基因中，這對蕃茄發展逆向遺傳學可能大有幫助。由於蕃茄基因組比阿拉伯芥大 10 倍，但基因數目卻和阿拉伯芥差不多，故蕃茄平均基因密度比阿拉伯芥低很多。不過大多數插入的位置(50 個中的 28 個)和辨識區域相符合(如已知的基因或 ESTs)。換句話說即轉位子有插入辨識區域的趨勢。如本次實驗中有 28 個序列和已知的基因或 ESTs 有顯著的相似性，只有 3 個

和已知蕃茄基因（如 *feebly* 基因、*rDNA*、及產生蛋白酶抑制劑（*proteinase*）的基因）完全相同。至於其他序列則和阿拉伯芥、蕃茄或其他植物物種中其他基因或 ESTs 相似但非完全相同。這顯示了 *Ds* 插入位置的序列對於找尋新基因而言是相當有效的工具。有趣的是，*Ac/Ds* 常跳到類似的區域中，如 *Pi transporter*、*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter*、*ABC transporter* 這三個基因都是位於同一區域，由 *Ds* 插入所找尋到的。另外，*feebly* 基因也是由釣取 *Ac/Ds* 在類似區域所分離出的。由分離上面三個基因的位置猜想 *Ac/Ds* 很可能常插入同一個範圍中（*hot-spot*）。但本實驗的 *feebly* 基因是由於插入相同區域，但不同於 *hot-spot* 範圍的位置上。

插入到 T-DNA 中反而對發展逆向遺傳學無幫助的比率在 50 個中有 6 個。這個頻率（12%）和阿拉伯芥中報告的數值非常的接近。蕃茄基因組計算一下含 20000-30000 個基因，約一半的 *Ds* 會插入到基因之中。大約估計一下若有 200000-300000 個 *Ds* 的插入到各染色體中，這個方法大概可以找出約 90% 的蕃茄基因。

#### 由釣取基因探測基因組

在蕃茄中，之前並未提到釣取強化子及釣取啟動子的應用。在未來這對於從果實中分離轉錄的調控部份，將會特別的有用。例如可採用由阿拉伯芥釣取（*trapping*）系統而來的根或葉的啟動子，且保留其專一性。然而，漿果的結構、新陳代謝、及發育形式和角果不同，所以調控因子可能會有些不同。

非破壞性的釣取基因在植物中運用的並不廣。本實驗用到的螢火蟲的冷光基因（*LUC*），它為一種敏感且非破壞性的報導基因，和 *GUS* 比較而言，*LUC* 有較多的優勢。如在植物中，它沒有內生的背景，且在利用上較方便（在植物組織上施用 20 分鐘後，還可對植株做冷光（*luminescence*）的

選拔。再者，非破壞性的鈎取基因開啟了許多研究的領域，如分離可誘導的啟動子、對於突變基因的後續表現可及時追蹤、以及重新產生鈎取到結果的體細胞。這在未來可處理不能經由種子繁殖的物種或找尋稀有物種的基因表現（每一個葉子都有表現原來植株的部份）可能會有幫助。用冷光酵素鈎取基因的主要限制是需要有專用的照相系統，一個暗室，及高花費的材料。令人驚訝的是，這次實驗中，大部分的植株有冷光表現。→108 個 families 中選拔到了 65 個（約 60%）（如表 1）。為了解釋這現象，作者假設這裡用到的無啟動子系統是非常有效，且 *Ds*-luciferase 容易插入到基因中。利用無啟動子及接近 T-DNA 端的報導基因，以及 T-DNA 的 構築鈎取基因的方法先前也有利用過。由於 *Ac/Ds* 兩尾端都有 ATGs 的出現，因而使得結構內報導基因的訊息無法轉錄；也因此無啟動子的方法不能使用。因此，有一個 GUS 上游有 intron 加上一個 splice acceptor site 的基因鈎取系統因此發展。

在本實驗中，高頻率的冷光表現顯示了並未有效鈎取到接近轉位子 5' 端 T-DNA 的 ATGs。這可能有一個有利的核酸背景，因而使得由 luciferase ORF 的 ATGs 或其他不知機制的轉錄優先開始而造成。高比率的冷光植物與 *Ds* 易插入基因所顯示的序列資料一致。在此不瞭解為何在花中會有高頻率的冷光訊號；這可能反應了在花朵中比其他器官有更多基因的表現、或在花中基因的表現比在其它器官強，而在此對於其它器官的微弱訊號作者並未去偵測。再者，可能在花中比果實中或根中還有較多的 ATP（光的放射以及催化 luciferin 需要 ATP）。總之，利用小型蕃茄以及易插入基因的 *Ac/Ds*，使 Micro-Tom 的 *Ac/Ds* 系統可以製造大量的插入，以便於蕃茄的逆向遺傳學及啟動子區域分離的運用。分析插入位置的序列可有效地分析蕃茄中的新基因。後來再分析這些基因隱性同型結合的突變，這對基因功能的瞭解將會有很大的幫助。

## 實驗方法：

### 轉殖構築(*constructs transformation*)

*Ds378-GUS* 及 *Bam35S-Ac* 的構築由 Nina Fedoroff 所提供，而 *Ds251-LUC* 的建構將由下列描述的方法建構之。這個構築由先前所介紹的方法轉入蕃茄中。

### *Ds251-LUC* 質粒構造(*construction of plasmid Ds251-LUC*)

*Ds251-LUC* 是為了在冷光酵素基因存在下釣取啟動子所建構的。為了這個目的，在質體 378*Ds-GUS* 中由 *Asp718* 所切下來的 10kb 片段被選殖入 PUC19 的相同位置中，產生一個新的質體稱為 PAA1-18。在 PAA1-18 中切下 378*Ds-GUS* 片段中 *Ds* 因子內部的 *MscI-PacI* 部份，此作法連帶切除了 *Ac* 啟動子及 *GUS* 及 *HPT* 基因。切下來的這個片段由無啟動子的螢火蟲冷光基因和 *NPT II* 基因結合在一起的片段所取代，所產生的這個新質體我們稱之為 p22-8。冷光基因由 PJD301 構造的 *salI-bglIII* 片段獲得，這是由 Virginia Walbot 所提供，及由 Luehrson 等人指導。*NPT II* 基因來自質體 PGA492 的 2.3 kb *sacII-cla I* 片段。在 p22-8 中新的 *Ds* 裡，5'端無啟動子的冷光基因和 *Ac* 5'端第 251 個核甘酸下游的 p22-8 的 *Asp718* 片段連接。包含 *ALS* excision cassette 及新的 *Ds-LUC* 片段被選殖入含 *NPT II* 及 *HindIII-ClaI* 片段之 SLJ525 binary vector 的 polylinker 中。此產生的 *Ds251-LUC* 質體如圖之 1 所示。

### *GUS* 染色

在 F2 植物中，*GUS* 活性依 Jefferson 等人所介紹的組織化學方法再經過些許調整所決定。F2 植株果實由濃度 0.5mg 的 X-Gluc

(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid; Duchefa), 再加入 100mM pH8.0 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (phosphate buffer)、15mMEDTA、5mM ferrocyanide、5mM ferricyanide、及 20% methanol 所染色。詳細方法依 Beeckman 及 Engler 在 1994 年所提出的方法去做。

### 冷光基因的選拔(*luciferase screening*)

用在暗室所用的極低光照相機照下植物組織以用來做冷光之選拔。作者選用 IPLAB 這套軟體做影像的處理及表現。植物組織加上 1mM beetleluciferin (promega) 及 0.01% Triton 在暗室下用 luciferin 持續處理 20 分鐘, 以克服葉綠素自然螢光的放射。而培養於基質中前 3 小時由 CCD 可偵測到生物冷光。

### 藉由大範圍 *inverse-PCR* 來分離跳躍因子附近部分

轉位子附近區域的分離, 是採用由 Mathur 等人所改變的大範圍 *inverse-PCR* 技術。Genomic DNA 是由一群 5-13 個有插入 *Ds* 的品系萃取。先準備 20 個 DNA 群, 每一群取 4 $\mu$ g 加 20-50 unit 限制酶每 *Spe* I、*Xba* I 或 *Asp*718 而總體積為 100 $\mu$ l 去隔夜反應。接著用 phenol chloroform 萃取及乙醇沈澱, DNA 再懸浮於 100 $\mu$ l 緩衝溶液中, 用 30 $\mu$ l 在 0.8% 洋菜膠 (agarose gel) 中跑電泳, 以確定是否有反應完全。其它的 70 $\mu$ l 加上 6 $\mu$ l T4 DNA 連接酶 (DNA ligase (Biolabs)), 而總體積為 500 $\mu$ l, 並於 16 $^{\circ}$ C 隔夜反應。反應結果會使 DNA 片段自己相接成環。再一次乙醇沈澱之後又加入緩衝液, 其中一半懸浮的 DNA 用兩群先前介紹對 *Ds* 5' 及 3' 端有專一性的引子 (primer) 做 PCR 的擴增。取 50 $\mu$ l 的樣品於 Expand Long Template PCR system 做 PCR。我們遵照供應者的建議使用緩衝液 (buffer) 3 號。第二群的擴增用第一次 PCR 產物, 混合稀釋 500 倍後取 2 $\mu$ l 來做。分離出的 PCR

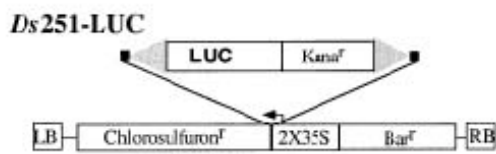
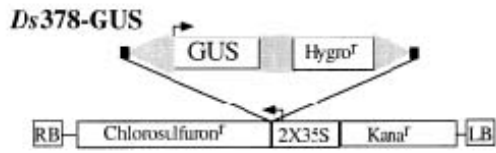
片段可直接當作模版 (template) 再加上 *Ds* 5' 及 *Ds* 3' 引子用來定序用；或 PGEM-T system 來做選殖用。序列送到 Nation center 的資料庫中，做為生物科技資訊，及送到 the Tigr Insitute 作為往後搜尋基因組或找尋同源種的資料。

## 謝誌

我們感謝 Yaron Sitrit 的幫助及參與討論。Efrat Rubin, X. Zhang, H.Rozen, A. Shipov 及 N. Avivi 的技術支援，及 G. Kazenelson 及 D. Avivi 在組織培養上的幫助。這個計畫由 European-Union to V.C.的 National Plant Genomen Center Program of Israreli Ministry of Science 及 a Training and Mobility of Researchers Marie Curie Postdoctoral fellowship 所贊助。

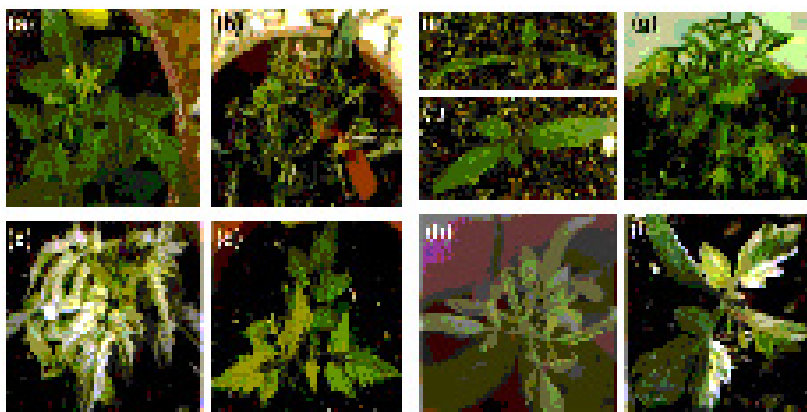


圖一.：轉殖到 Micro-Tom 品種中構造之模式圖。



*Bam35S-Ac* 及 *Ds378-GUS* 構造是為了鈎取啟動子之用。類似 *Ac* 序列的以灰色表示，其尾端相反方向的重複序列以灰色箭頭表示。在各自的 T-DNA 兩側有 RB 及 LB。在 *Ds378-GUS* 構造中的 GUS 基因有微弱的 *Ac* 啟動子。在 *Ds251-LUC* 中 luciferase 基因和由 1-251 無啟動子的 *Ac* 片段融合在一起。對 basta 有抗性的 ( $Bar^r$ )，對 kanamycin 有抗性的 ( $Kana^r$ )，或對 hygromycin 有抗性的 ( $Hygro^r$ ) 分別指 phosphinotricin, neomycin phosphotransferase，或 aminocyclitol phosphotransferase 基因。當 *Ds* 因子由 *Ds378-GUS* 或 *Ds251-LUC* 構造中跳開時，會活化了一個由阿拉伯芥突變而來的 acetolactate synthase 基因，因此對 chlorosulfuron 會有抗性 ( $chlorosulfuron^r$ )。對 naphthalene acetamide 敏感 ( $NAM^S$ ) 是指 indole acetic hydrolase (*iaaH*) 基因。

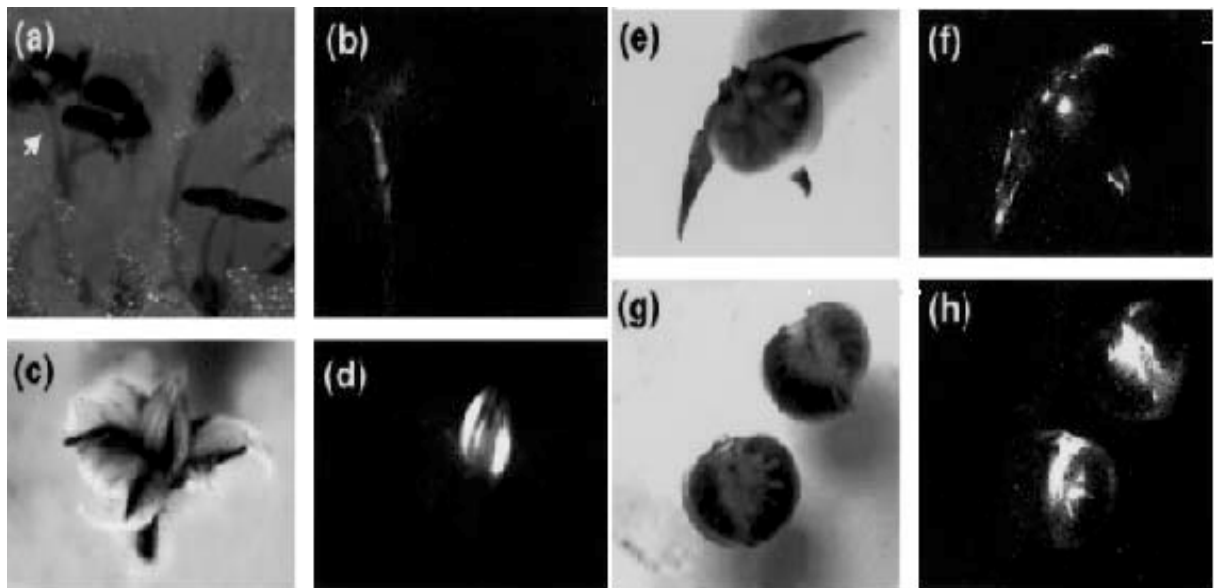
圖二：由 *Ac/Ds* 插入所造成的外表型突變。



(a)野生型；(b)類似造成蕃茄葉黃及葉子捲曲的病毒症狀；(c)因葉綠素突變

導致植珠產生白葉；(d)上部的新葉呈現黃色，而當成熟時會轉為綠色；(e)植株不正常生長，幼苗子葉和野生型比較略顯狹長；(f)野生型幼苗；(g)由(e)的幼苗生長後，幾乎無葉，若有葉子也顯的細長且硬，且花和子房融合在一起（此未顯示圖）；(h-i)在結果期可看到嚴重的黃萎病；(h)當缺乏轉位酉每時葉綠素會突變，而使葉子顏色變白；(i)當呈現轉位酉每時，同一植株上的各個枝桿顏色不盡相同，有的會呈現雜色。

圖三:經由偵測 LUC 報導基因所掉取到的基因之表現部分。



每一排都是由 *Ds-LUC* × *Bam35S-Ac* 雜交並含有穩定 *Ds* 跳躍因子的 F3 值株，其器官及經由冷光處理後所得的照片。左邊照片是於光線下所拍得的，右邊則是於黑暗中所拍攝的照片。

(a)垂直生長於平板洋菜培養基之幼苗；(b)其中一個個體胚軸表現冷光的情形；(c)花的照片；(d)在花藥中發現很強的冷光活性，在花柱中的活性較弱，而在花萼中沒有活性；(e)幼果的照片；(f)冷光活性只限於萼片；(g)兩個一半幼果的照片；(h)在果實的核心部分發現勝於其它部分的強冷光活性。



表一：在 108 個 F3 *Ds251-LUC families* 中有冷光表現的特定器官。

Table 1. Organ-specific patterns of luminescence in 108 F<sub>3</sub> *Ds251-LUC families*

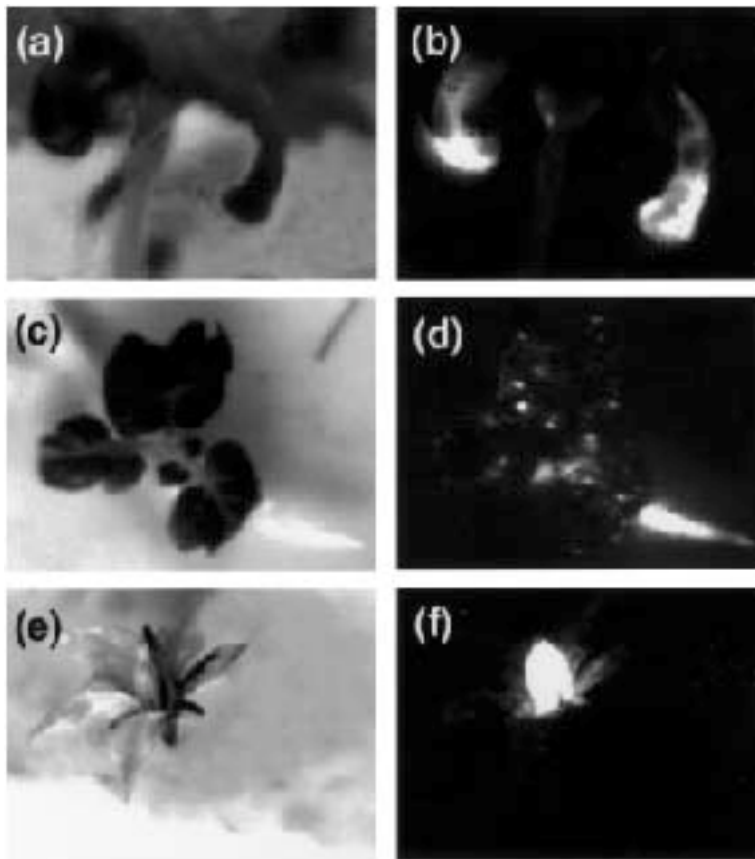
Organ	Organ-specific patterns of luminescence								Total (% luminescent)
	+	-	-	+	-	+	+	-	
Flowers	+	-	-	+	-	+	+	-	55
Fruits	+	+		+	+		+		17
Seedlings <sup>a</sup>	-	-	+	-	+	+	+	-	4
Total luminescent	59	2	1	7	2	0	1	43	60
% luminescent	48	2	1	6	2	0	1	40	

<sup>a</sup>Seedlings were grown in normal conditions or tested after cold or heat shock as described in the text. Two seedlings were shut off after cold treatment and one was shut off after the heat treatment.

- indicates that luminescence was observed; + indicates a lack of luminescence.

<sup>a</sup>Seedlings 生長於正常環境或經過本文中所述的冷熱處理。在冷處理後，兩株幼苗啟動子停止作用。經過冷處理後，一株幼苗停止作用。

+表示可觀察到冷光。-表示缺乏冷光。

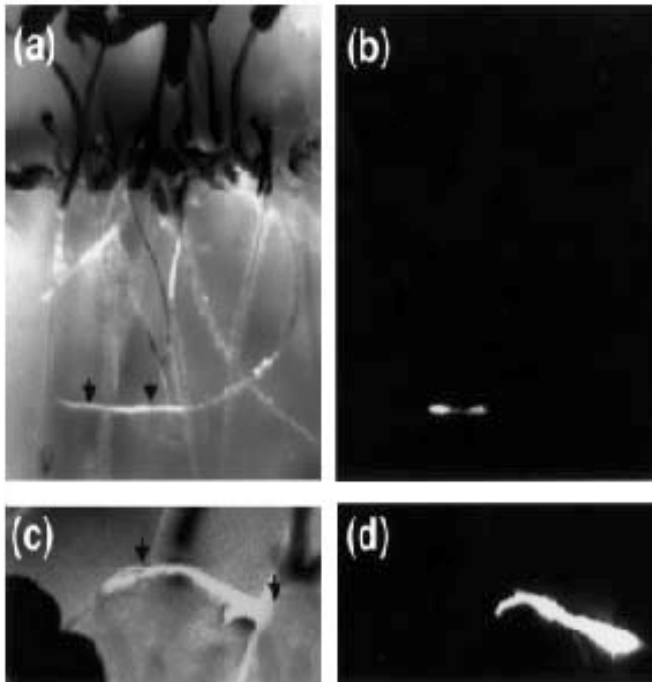


圖四：冷光的偵測。

(a, b)用冷光分析對植物是無破壞性的，可分離出有活性的組織，並把其培養成完整的植株，而這裡的組織是由 *Ds251-LUCx Bam35S-Ac* 雜交而來之 F1 幼苗的子葉所得。再生之後，將許多器官染色，許多地方皆可偵測到活性如 (c, d)根中；(e, f)花中；(g, h)幼果中；(i, h)成熟

果實中。

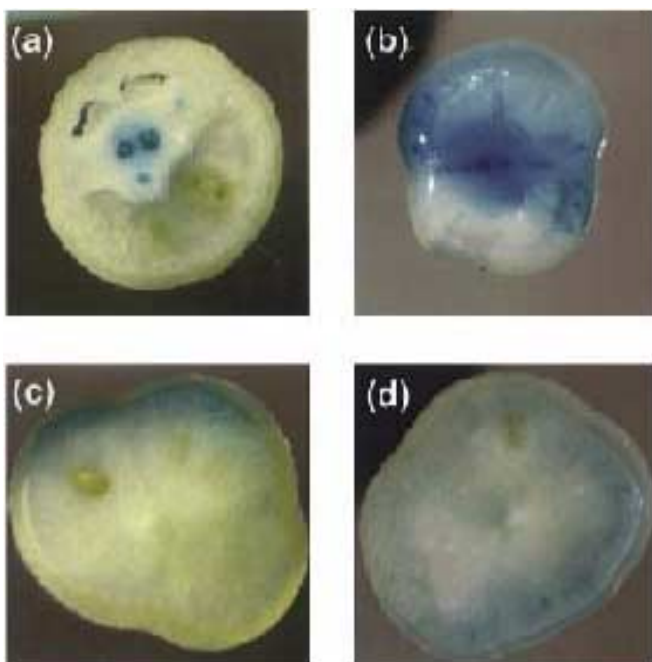
1 圖五：鈎取基因並及時追蹤其表現。



(a)蕃茄幼苗垂直生長，並且偵測其冷光；(b)在黑暗下偵測到有冷光表現於根冠下方的延長圈部分，箭頭指的是訊號處；(c)為了測試表現是否只限於延長區，所以把根壓成水平，並在 24 小時後再拍照，可在根捲曲部觀察到因為重力而使細胞拉長的現象；(d)冷光再一次受限於新形成的延長

區內。

圖六：由 *Ds378-GUS* × *Bam35S-Ac* 雜交而來的 F2 果實去做 X-Gluc 染色，圖上顯示許多染色區。



(a)有一個 line 的果實只染色於由細胞分裂而來的維管束細胞上；(b)另一個 line 於整個果皮中有染色；(c,d)只在外果皮中染色。

Table 2. Analysis of *Ds* flanking sequences

	No.	Nucleotide similarity	E <sup>a</sup>	Protein similarity	E <sup>b</sup>
Genes	1	<i>Medicago truncatula</i> Pi transporter, MITAF000355	2e-10	<i>A. thaliana</i> Pi transporter, U82331	1e-64
	2	<i>Solanum lycopersicum</i> feebly gene, U36644	6e-23	<i>S. lycopersicum</i> feebly prot, S70648	6e-05
	3	Tomato ovary EST 265E19	2e-15	<i>A. thaliana</i> hypothetical protein, AC002340	1e-04
	4	<i>Arabidopsis thaliana</i> sac1 gene, X95622	6e-07		
	5	<i>Lycopersicon esculentum</i> 9.04 kb rDNA, X52216	0		
	6			<i>Spirodela polyrrhiza</i> PDR5-like ABC, Z70524	1e-20
	7	<i>L. esculentum</i> auxin-induced proteinase inhibitor, L26128	2e-25		
	8			<i>D. radiodurans</i> hypothetical protein AE001961	9e-09
	9			<i>L. esculentum</i> polyprotein AF119040	6e-11
	10			<i>A. thaliana</i> putative Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanging protein, AF03539	4e-10
	11	Potato petalain pseudogene SB5B	5e-05		
	12	<i>Solanum tuberosum</i> mitochondrial, X93575	4e-03		
	13			<i>Anthoceros punctatus</i> photosystem I P <sub>700</sub> apoprotein A1, AB013664	9e-5
	14	Tomato EST 243854	4.6e-12	<i>A. thaliana</i> putative protein kinase, AC004260	9e-10
	15	<i>L. esculentum</i> ripening-related mRNA, X72734	0.004		
	16			<i>Oryza sativa</i> putative copia polyprotein, AC006248	1e-30
EST	17	Tomato EST246491	0.0049		
	18	Tomato EST 255819	2.6e-17		
	19	Tomato EST 251212	6.3e-05		
	20	Tomato EST 248200	5.5e-05		
	21	<i>A. thaliana</i> EST P94675	5e-05		
	22	Tomato EST 251212	1.2e-11		
	23	Tomato EST TC3415	0.0057		
	24	Tomato EST 246451	4.5e-03		
	25	Tomato EST 256245	1.2e-05		
	26	Tomato EST TC5532	0.004		
	27	Tomato EST 251016	1.5e-05		
	28	Tomato EST249346	1.2e-05		
In T-DNA		6 sequences			
Unknown		16 sequences			

表二：

E<sup>a</sup> (期望值 a)：符合以 BLASTN 程式搜尋出的序列資料之重要的統計門檻。

E<sup>b</sup> (期望值 b)：由 BLASTX 程式搜尋而得。

## 參考文獻

- Aarts, M.G.M., Dirkse, W.G., Stiekema, W.J. and Pereira, A. (1993) Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature*, **363**, 715-717.
- Aflalo, C. (1991) Biologically localized firefly luciferase : a tool to study cellular processes. *Int Rev Cytol.* **130**, 269-323 .
- An, G (1986) Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiol.* **81**, 86-91.
- Beekman, T. and Engler, G. (1994) An easy technique for the clearing of histochemically stained plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, 37-42.
- Bishop, G.J., Harrison, K. and Jones, J.D.G. (1996) The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P<sub>450</sub> family. *plant cell*, **8**, 959-969.

**Carroll, B.J.V.I.K., Thomas, C.M., Bishop, G.J., Harrison, K., Scofield, S.R. and Jones, J.D.G.** (1995) Germinal transposition of the maize element Dissociation from T-DNA loci in tomato. *Genetics*, **139**, 427-420 .

**Fedoroff, N.V. and Smith, D.L.** (1993) A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **3**, 273-289.

**Feldman, K.A., Marks, M.D., Christianson, M.L. and Quatrano, R.S.** (1989) A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science*, **243**, 1351-1354 .

**Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Bouherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud J.B. and Sentenac, H.** (1989) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell*, **94**, 647-655.

**Gorbunova, V. and Levy, A.A.** (1997) Circularized *Ac/Ds* transposons: formation, structure and fate. *Genetics*, **145**, 1161-1169.

**Hwaly, J., Corr, C., DeYoung, J. and Baker, B.** (1993) Linked and unlinked transposition of a genetically marked *Dissociation* element in transgenic tomato. *Genetics*, **134**, 571-584.

**Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1997) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.

**Jones, D.A. Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. and Jones, J.D.G.** (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, **266**, 789-792 .

**Keddie, J.S., Carroll, B., Jones, J.D.G. and Gruissem, W.** (1996) The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO J.* **15**, 4208-4217.

**Knapp, S., Larondelle, Y., Robberg, M., Furtek, D. and Theres, K.** (1994) Transgenic tomato lines containing *Ds* elements at defined genomic positions as tools for targeted transposon tagging. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 666-673.

**Koes, R., Souer, E., van Houwelingen, A. et al.** (1995) Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, **92**, 8149-8153.

**Krysan, P.J., Young, J.C., Tax, F. and Sussman, M.R.** (1996) Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 8145-8150.

**Luehrsen, K., de Wet, J. and Walbot, V.** (1992) Transient expression analysis in plant using the luciferase reporter gene. *Methods Enzymol.* **216**, 397-414.

**Maes, T., De Keukeleire, P. and Gerats, T.** (1991) Plant tagnology. *Trends Plant Sci.* **4**, 90-96.

**Mather, J., Szabados, L., Schaefer, S., Grunenberg, B., Lossow, A., Jonas- Straube, E., Schell, J., Koncz, C. and Koncz-Kalman, z.** (1989) Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension. *Plant J.* **13**, 707-716.

**Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. and Levy, A.A.** (1997) A new model system for tomato genetics. *Plant J.* **12**, 1465-1472.

**Mena, M., Ambrose, B.A., Meeley, R.B., S.P., Yanosky, M.F. and Schmidt, R.J.** (1996) Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science*, **274**, 1537-1540.

**Osborne, B.I., Corr, C.A., Prince, J.P., Hehl, R., Tanksley, S.D., McCormick, S. and Baker, B.** (1991) *Ac* transposition from a T-DNA can generate linked and unlinked clusters of insertions in the tomato genome. *Genetics*, **129**, 833-844.

- Parinov, S., Sevugan, M., Ye., D., Yang, W.C., Kumaran, M. and Sundaresan, V.** (1999) Analysis of flanking sequences from Dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant cell*, **11**,2263-2270.
- Rommens, C.M.T., Rudenko, G.N., Dijwel, P.P., Vanhaaren, M.J.J., Owerkerk, P.B.F., Blok, K.M., Nijkamp, H.J.J. and Hille, J.** (1992) Characterization of the Ac/Ds behaviour in transgenic tomato plant using plasmid rescue. *Plant Mol. Biol.***20**, 61-70.
- Speulman, E., Metz, P.L.J., van Arkel, G., Hekkert, P.T.L., Stiekema, W.J. and Pereira, A.** (1999) A two-component Enhancer-Inhibitor transposon mutagenesis system for functional analysis of the Arabidopsis genome. *Plant Cell*, **11**,1853-1866.
- Sundaresan, V.** (1996) horizontal spread of transposon mutagenesis: new uses for old elements. *Trends Plant Sci.* **1**, 184-190.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, P., Haward, S., Dean, C., Jons, J.D.G., Ma, H. and Martienssen, R.** (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.***9**, 1797-1810.
- Takken, F., Schipper, D., Nijkamp, H. and Hille, J.**(1998) Identification and Ds-tagged isolation of gene at the *Cf-4* locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *Plant J.* **14**, 401-411.
- Thomas, C.M., Jones, D., English, J.J., Carroll, B.J., Bennetzen, J.L., Harrison, K., Burbidge, A., Bishop, G.J. and Jones, J.D.G.** (1994) Analysis of the chromosomal distribution of transposon- carrying T-DNA in tomato using inverse polymerase chain reaction. *Mol. Gen. Genet.***242**, 573-585.
- Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M.A., Murphy, G. and Jones, J.D.G.** (1999) Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *plant Cell*, **11**, 1841-1852.
- Van der Biezen, E., Brandwagt, B., van Leeuwen, W., Nijkamp, H. and Hille, J.**(1996) Identification and isolation of the *FEEBLY* gene from tomato by transposon tagging. *Mol.Gen. Genet.* **12**, 267-280.
- Walbot, V.** (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* **43**, 49-82.
- Wilson, C., Kurth Pearson, R., Bellen, H.J., O' Kane, C.J., Grossniklaus, U. and Gehring, W.J.** (1989) P-element- mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated gene in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**, 1301-1313.
- Wisman, E., Hartmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H. and Weisshaar, B.** (1998) Knock-out mutants from an *En-1* mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 12432-12437.
- Yoder, J., Palys, J., Albert, K. and Lassner, M.** (1988) Ac transposition in transgenic tomato plants. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 291-296.
- Yoder, J.I.** (1990) Rapid proliferation of the maize transposable element *Activator* in transgenic. *Plant Cell*, **2**, 723-730.