

含降血脂機能性多勝?汕鈎稽]番茄之育成

林煌展、游志文

E-mail: 9511398@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究運用mutagenesis技術，變更番茄ammonium transporter (Amt1)基因之DNA序列，使其所轉譯之胺基酸序列與VVYP相近者變更為VVYP，藉由番茄大量表現富含降血脂機能性多勝?向VYP之蛋白。首先將已構築完成於pGEM-T載體上的Amt1 cDNA，進行DNA序列改造，使其所轉譯胺基酸序列可分別含有一個、兩個及三個LVVYPW勝?戊 C。改造後之Amt1基因構築於植物表現載體pBI121上，藉由農桿菌將基因轉殖入番茄與菸草植株。隨後再利用genomic PCR與RT-PCR (reverse transcription-PCR)，鑑定番茄及菸草轉基因株系確實攜帶改造之Amt1基因並可表現mRNA。亦分析其蛋白質表現量情形，以推估內含之活性勝?向VYP含量，以做為未來動物老鼠餵食試驗之憑據。

關鍵詞：番茄、overlapping PCR、勝?式B血脂、基因轉殖

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii 中文摘要
要.....	iv 英文摘要.....
謝.....	vi 目
錄.....	viii 圖目
錄.....	xiii 表目錄.....
第一章 前言.....	1 1.1 飲食與高血脂症之關係.....
高血脂症與疾病之關係.....	1 1.3 降血脂藥物的市場.....
向VYP之重要性.....	2 1.4 機能性勝?向VYP之重要性.....
望.....	3 1.5 利用植物為生物反應器生產外源性蛋白.....
料.....	4 1.6 研究目的及展望.....
種.....	6 第二章 材料與方法.....
.....	7 2.1 實驗材料.....
.....	7 2.1.1 轉殖材料.....
.....	7 2.1.3 實驗藥品.....
.....	8 2.1.4.1 構築載體(cloning vector).....
.....	8 2.1.4.2 表現載體(expression vector).....
2.1.5 培養基.....	8 2.1.5.1 菌類培養基.....
基.....	8 2.1.5.2 菸草植株培養
.....	9 2.1.5.3 番茄植株培養基.....
.....	10 2.1.6 植物荷爾蒙.....
2.1.6.1 生長素 (auxin，如 -naphthalene-acetic acid, NAA) 母液之配製.....	11 2.1.6.2 細胞分裂素 (如6-benzylaminopurine, BA ; kinetin) 母液之配製.....
.....	11 2.1.7 抗生素母液之配製.....
緩衝液及試劑.....	12 2.1.8 其他緩衝液及試劑.....
) DNA之小量製備.....	12 2.2 實驗方法.....
.....	14 2.2.1 以試劑組萃取小量質體DNA.....
體DNA.....	15 2.2.3 以試劑組萃取大量質
.....	16 2.2.4 overlapping PCR.....
；PCR)	16 2.2.5 聚合?一噓礮犧部]polymerase chain reaction
.....	18 2.2.6 瓊脂凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis)...
.....	19 2.2.7 DNA 片段的回收及純化.....
.....	20 2.2.8 限制酵素剪切 (enzyme digestion)
.....	20 2.2.9 pGEM-T / Amt1質體之構築.....
.....	21 2.2.10 勝任細胞(competent cell)之製備.....
.....	21 2.2.10.1 大腸桿菌化學法勝任細胞之製備..21
2.2.10.2 大腸桿菌電勝任細胞之製備.....	22 2.2.10.3 農桿菌電勝任細胞之製備.....
.....	23 2.2.11 轉型作用 (transformation)
.....	23 2.2.11.1 化學法轉型作用.....
.....	23 2.2.11.2 大腸桿菌電穿孔法轉型作用.....
.....	24 2.2.11.3
以IPTG與X-gal之系統篩選pGEM-T / Amt1質體.....	24 2.2.11.4 農桿菌電穿孔法轉型作用.....
.....	25 2.2.12 pBI121/Amt1質體構築.....
.....	25 2.2.13 菌落聚合?一噓礮犧部]Colony PCR)
.....	26 2.2.14 核酸定序.....
.....	27 2.2.15 菸草基因轉殖.....
.....	27 2.2.15.1 菸草的基因轉殖與再生培養.....
.....	27 2.2.15.2 農桿菌培養與預處理.....
.....	28 2.2.15.3 轉基因菸草之發根及馴化處理....
殖.....	28 2.2.16 農桿菌培養.....
.....	29 2.2.16.1 番茄無菌播種及培殖體預處理.....
.....	29 2.2.16.2 農桿菌培養.....
2.2.16.3 以農桿菌法進行基因轉殖番茄.....	29 2.2.16.5 轉基因菸草植株馴化處理.....
.....	30 2.2.16.4 再生芽體誘導.....
.....	31 2.2.17 轉基因株系之分子分析.....
.....	31 2.2.17.1 植物基因組DNA抽取法 (試劑組) ..
.....	32 2.2.17.2 植物基因組DNA抽取法 (傳統法) ..
.....	33 2.2.17.3 聚合?一噓礮犧傳痔w轉基因植株..33
.....	33 2.2.17.4 植物Total RNA抽取法.....
.....	34 2.2.17.5 甲醛變性瓊脂凝膠電泳.....
.....	35 2.2.17.6 逆轉錄酵素 - 聚合酵素鏈鎖反應..36
.....	36 2.2.18 轉基因株系表現外源性蛋白質之分析.....
.....	37 2.2.18.1 植物蛋白質抽取法.....
.....	37 2.2.18.2 蛋白質含量之測定.....

.....37 2.2.18.3 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳.....	38 第三章 結果與討論.....	39 3.1 利
用Overlapping PCR技術改造Amt1 gene..	39 3.2 構築pGEM-T/Amt1質體.....	40 3.3 AMT1蛋白質結構之
分析.....	41 3.4 構築植物表現載體pBI121/Amt1.....	42 3.5 載體pBI121/Amt1轉型至農桿
菌.....	42 3.6 基因轉殖菸草之育成.....	43 3.6.1 菸草轉殖Amt1基
因.....	43 3.6.2 菸草轉基因株系馴化及健化.....	45 3.6.3 菸草轉基因株系之分子分
析.....	45 3.7 基因轉殖番茄之育成.....	46 3.7.1 番茄轉殖Amt1基
因.....	46 3.7.2 番茄轉基因株系馴化及健化.....	48 3.7.3 番茄轉基因株系之分子分
析.....	48 3.8 轉基因株系表現外源性蛋白質之分析.....	50 第四章 結
論.....	51 參考文獻.....	81 附錄
一、Amt1蛋白3D結構預測.....	84 附錄二、Amt1蛋白3D結構預	
測.....	85 圖目錄 圖一 番茄Amt1基因改造第二個位置的產物片段以0.8% agarose gel電泳分析之	
結果.....	53 圖二 番茄Amt1基因改造第三個位置的產物片段以0.8% agarose gel電泳分析之結	
果.....	54 圖三 pGEM-T/Amt1質體之構築策略示意圖.....	55 圖四 pGEM-T/Amt1質
體之構築鑑定.....	56 圖五 pGEM-T/Amt1質體構築定序結果.....	57 圖六 番茄Amt1蛋白質之二級
結構.....	59 圖七 番茄Amt1蛋白質之二級結構預測突變的位置.....	60 圖八 pBI121/Amt1
質體之構築策略示意圖.....	61 圖九 利用PCR鑑定構築的pBI121/Amt1表現載體.....	62 圖十 利用PCR判
定pBI121/Amt1有無轉型至農桿菌當中..	63 圖十一 菸草農桿菌轉殖法.....	64 圖十二 芽體水
浸化之情形.....	65 圖十三 轉殖株之繁衍.....	66 圖十四
溫室栽培之轉基因菸草植株.....	67 圖十五 抽取擬轉基因菸草基因組DNA進行NPT 基因之偵測.....	68 圖十六 RT-PCR偵測擬轉基因菸草Amt1 mRNA表現情形.....
	68 圖十六 RT-PCR偵測擬轉基因菸草Amt1 mRNA表現情形.....	69 圖十七
69 圖十七 番茄農桿菌轉殖法.....	70 圖十八 番茄轉殖株之繁衍.....	71
70 圖十八 番茄轉殖株之繁衍.....	72 圖二十 轉基因番茄之馴化處理.....	
71 圖十九 誘導轉基因番茄根系發育.....	72 圖二十 轉基因番茄之馴化處理.....	
....73 圖二十一 轉基因番茄開花與結果.....	74 圖二十二 抽取擬轉基因番茄基因組DNA進行NPT 基因	
之偵測.....	74 圖二十二 抽取擬轉基因番茄基因組DNA進行NPT 基因	之偵測.....
75 圖二十三 RT-PCR偵測擬轉基因番茄Amt1 mRNA表現情形.....	75 圖二十三 RT-PCR偵測擬轉基因番茄Amt1 mRNA表現情形.....	76
76 圖二十四 SDS-PAGE分析轉基因菸草AMT1蛋白質表現情形...77 圖二十五 SDS-PAGE分析轉基因番茄AMT1蛋白質表現情形...78 表目錄 表一 菌種特性及來源.....	77 圖二十五 SDS-PAGE分析轉基因番茄AMT1蛋白質表現情形...78 表目錄 表一 菌種特性及來源.....	79 表二 overlapping PCR原理.....
80		

參考文獻

- 何敏夫 (1998) 臨床化學第二版 , 合記圖書出版社 , 265-277。 Arab L. and Steck S. (2000) Lycopene and cardiovascular disease. Am. J. Clin. Nutr. 7:1691-1695. Austin MA (1989) Plasma triglyceride as a risk factor for coronary heart disease. Am. J. Epidemiol. 129:249-259. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram Quan ties of protein utilizing the principle of protein-dye bindings. Anal. Biochem. 72:248-254. Carroll KK, and Hamilton RMG (1975) Effect of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. J. Food Sci. 40:18-23. Castelli WP (1986) The triglyceride issue: A view from Framingham. Am. Heart J. 112:432-437. Coukell AJ, and Wilde MI (1998) Pravastatin: a pharmacoeconomic review of its use in primary and secondary prevention of coronary heart disease. Pharmacoconomics. 14:217-236. Gamborg OL, Miller RA, and Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158. Haim M, Benderly M, Brunner D, Behar S, Graff E, Reicher-Reiss H, and Goldbourt U (1999) Elevated serum triglyceride levels and long-term mortality in patients with coronary heart disease. Circulation. 100:475-482. Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580. Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, and Schilperoort RA (1983) Binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. Nature. 303:179-180. Istvan ES (2002) Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Am. Heart J. 144:27-32. Kagawa K, Matsutaka H, Fukuhama C, Watanabe Y, and Fujino H (1996) Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertriglyceridemia and val-val-tyr-pro, one of its constituents, possesses most superior effect. Life Sci. 58:1745-1755. Kagawa K, Matsutaka H, Fukuhama C, Fujino H, and Okuda H (1998) Suppressive effect of Globin digest on postprandial hyperlipidemia in male volunteers. J Nutr. 128:56-60. Ku HM and Tsay HS (1994b) Influence of subculture generation on the vitrification of carnation plantlets cultured in vitro. Jour. Agric. Res. China. 43:308-319. Ku HM, and Tsay HS (1994a) Effect of medium composition on the vitrification of carnation plantlets cultured in vitro. Jour. Agric. Res. China. 43:51-62. Mersereau M, Pazour GJ, and Das A (1990) Efficient transformation of Agrobacterium tumefaciens by electroporation. Gene. 90:149-51. Miwa M (2000) Development of functional foods based on physiological acyivity of amino acids and peptides in Japen. Biofactors. 12:161-165. Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497. Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, and Sugino Y (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. Nucl. Acids Res. 18:6169. Reusch RN, Hiske TW, and Sadoff HL (1986) Poly-beta-hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in Escherichia coli. J. Bacteriol. 168:553-562. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis

KB, and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487-491. Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Sugano M, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T, and Kimoto M (1988) The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*. 72:115-122. Tzfira T and Citovsky V (2002) Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by Agrobacterium. *Trends Cell Biol*. 12:121-129.