

利用螢光顯微鏡檢測轉基因作物篩檢標誌～ 綠色螢光蛋白技術之建立

沈翰祖¹ 孫永偉¹ 廖玉珠² 陳駿季³

前言

在甫進入 21 世紀的今天，「生物技術」是繼「半導體與光電」之後，又一新興的產業，也是我政府全力推動的重點發展科技，「基因轉殖」技術是近年全球熱門的「生物技術」領域中的重要項目。基因轉殖是將某具有特殊功能的基因以人為的方式送進目標生物的細胞內，且使該基因於完整生物體上表現。在進行基因轉移的同時，將一些能明顯並迅速表現的基因當做篩檢標誌，同時轉入目標生物，能協助研究人員及早將轉基因成功的細胞或組織篩檢出來，綠色螢光蛋白（green fluorescent protein, GFP）即可達此一功能。

利用篩檢標誌檢測轉基因作物

由於基因轉殖的目標物常是細胞或組織，均需要經過組織再生、成長等階段，若再等待其長成為成熟個體並觀察所有的再生小植株之外在表現，需耗費許多操作時間；若針對每一個轉基因個體分離其 DNA 或 RNA 等進行聚合酵素鏈鎖反應（PCR）、南方墨點（Southern blot）、北方墨點

（Northern blot）……等分析，又更需耗費許多藥劑成本，因此，可利用對某些物質有抗性的基因，包括抗某種抗生素（例如 npt II 基因抗 kanamycin、aadA 基因，抗 spectinomycin）或抗某種殺草劑（例如 bar 基因抗殺草劑 Bialaphos）等的基因、或在細胞或組織中經一些催化或激發等處理，會有呈色表現的基因（如 gus 基因染色後表現藍色、激發螢光表現之綠色螢光蛋白（GFP）基因等），來當作一種篩檢標誌，並將這類的基因與目標基因共同送入欲轉殖之細胞中，即能在短期間篩選出基因轉殖成功之細胞、組織或幼植株等，進一步達到縮減初期分析之數量與培養時間等目的，此類基因稱為「報導基因」（Reporter gene）或「篩檢標誌」（Select marker）。

綠色螢光蛋白與檢測原理

綠色螢光蛋白篩檢標誌是利用特定波長的光激發某種蛋白質，進而產生螢光反應的原理來進行篩檢處理。在自然界中有許多會發光的生物包括螢光菌、螢火蟲、水母等會發出一種生物冷光（bioluminescence），其中最常被利用的是一種水母綠色螢光蛋

¹行政院農業委員會種苗改良繁殖場 助理研究員

²行政院農業委員會種苗改良繁殖場 技佐

³行政院農業委員會種苗改良繁殖場 副研究員兼課長

白，其最大特點是在於本身散發的綠色螢光，只需以 450-500nm 左右波長之光線照射即可持續激發其產生綠色螢光，且 GFP 對於轉殖對象的細胞不會造成傷害。

進行基因轉移時，同時將 GFP 基因轉入作物細胞與組織中，待其產生癒傷組織後，以螢光立體顯微鏡檢測 GFP 表現，該顯微鏡配有超高壓汞燈（含電源供應器）、螢光激發器、固定波長之螢光濾鏡、數位影像照相裝置、電腦等。螢光激發器照射之螢光經過螢光濾鏡後只會產生波長 460-500nm 的激發光（Excitation）照射在篩檢之樣本上，再產生波長 500-560nm 的散射光（Emission），進而以數位影像照相裝置來紀錄其表現，由於所激發散射出的螢光亮度均非常的微弱，又依不同作物、組織、樣品大小等，各有不同的曝光時間（數十秒到十多分鐘的差距），一般多為 5-10 分鐘之間。在拍攝的場所需完全黑暗（連電腦螢幕均須關閉），以免干擾螢光的激發與長時間的曝光，在分析轉殖之組織後，需以完全相同的曝光條件分析對照組織（未轉殖之組織），

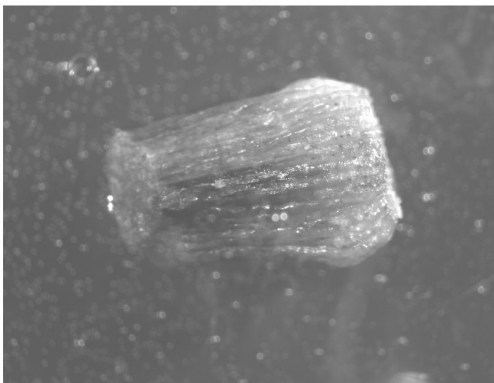
因為綠色的細胞在照射時本身會有微量的螢光反應（即為背景值），而轉殖組織之螢光表現量需明顯大於對照組織，方可確定是 GFP 的表現。

其它種類之螢光蛋白

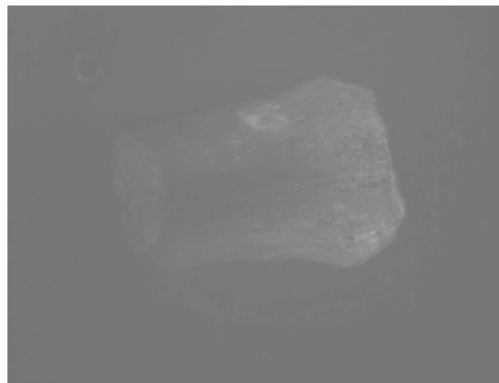
除了 GFP 以外，尚可利用紅色螢光蛋白（Red fluorescent protein, RFP）、黃色螢光蛋白（Yellow fluorescent protein, YFP）與青色螢光蛋白（Cyan fluorescent protein, CFP）進行相關研究。

螢光蛋白激發波長的相關資料如下：

（1）紅色螢光蛋白（RFP）在波長 558nm 左右的激發光照射在篩檢之樣本上，會產生波長約 583nm 的散射光；（2）黃色螢光蛋白（YFP）在波長 513nm 左右的激發光照射在篩檢之樣本上，會產生波長約 527nm 的散射光；（3）青色螢光蛋白（CFP）在波長 416-453nm 左右的激發光照射在篩檢之樣本上，會產生波長約 380-475nm 的散射光。然而，不同波長的激發光，均需配合專屬的螢光濾鏡才可達到。



圖一 彩葉芋葉柄未經基因轉移者之組織



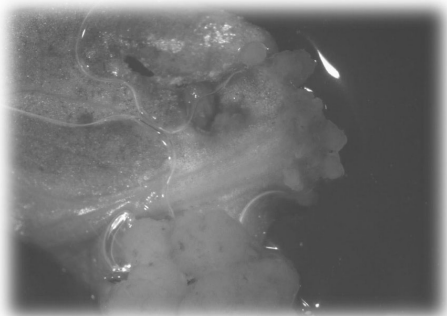
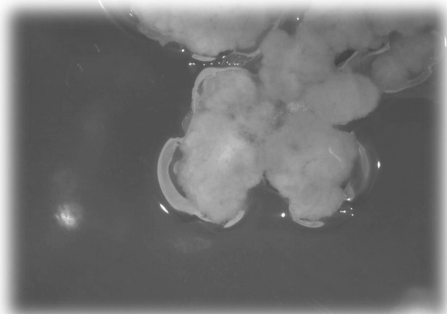
圖二 彩葉芋葉柄未經基因轉移者之組織以螢光顯微鏡檢測其篩檢標誌 GFP，僅有微綠色螢光反應，為其背景值

結論

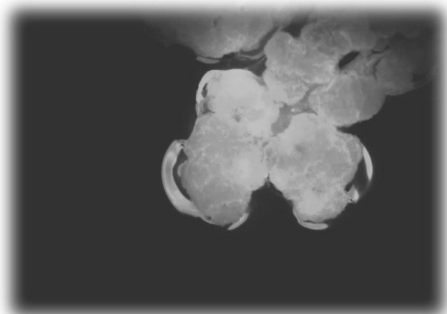
基因轉殖配合此一檢測技術，可大幅減少後續分析樣本之數量且完全不會傷害樣本組織，實為一優良之初期篩檢方式。

附註：本研究是以彩葉芋 Freida Hemple 品種經農桿菌法進行花色基因轉移(包括 DFR、F3H 基因及其反義基因)與未經基因

轉移者誘導之癒傷組織以螢光顯微鏡檢測其篩檢標誌 GFP，具有綠色螢光反應。螢光立體顯微鏡為 Nikon SMZ1500 型、超高壓汞燈為 Nikon C-SHG1 型、螢光激發器為 Nikon P-FLA Fluorescence Attachment 型、固定波長之螢光濾鏡為 Nikon GFP(R)-BP 型、數位影像照相裝置為 CoolSNAP- Pro™ Digital Kits 型。



圖三 彩葉芋葉柄轉移花色基因(包括 DFR、F3H 基因及其反義基因)之癒傷組織



圖四 彩葉芋葉柄轉移花色基因(包括 DFR、F3H 基因及其反義基因)之癒傷組織以螢光顯微鏡檢測其篩檢標誌 GFP，具有綠色螢光反應