

奈瑟氏菌表面抗原基因轉殖至水稻之研究

劉芯瑄¹ 曾夢蛟² 楊秋英² 郭純德¹ 尤進欽^{1*}

1. 國立宜蘭大學園藝學系
2. 國立中興大學園藝學系及分子生物學研究所

摘要

奈瑟氏淋病雙球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)是常見的傳染疾病，且仍是全世界主要的問題。成人通常經由性接觸傳染淋菌。由於抗生素濫用，造成抗藥性淋病增加。因此，利用疫苗抗原選殖至可食用轉殖植物使成爲口服性疫苗，將是一個新興的運送系統。本試驗將分離自奈瑟氏菌表面抗原基因(Ag473)構築以肌動蛋白(actin)啓動子驅動之植物轉殖載體，並利用農桿菌法轉殖至水稻真核表達系統中表現。本研究的目的爲轉殖 Ag473 至水稻系統的建立，及探討目標蛋白於水稻品種中之表現情形。

本實驗之轉殖材料是以水稻(台梗 8 號)子葉盤誘導的癒傷組織。將再生的癒傷組織藉由農桿菌轉移後以 kanamycin 初步篩選。轉型存活之再生植株萃取其 RNA 進行 RT-PCR 分析，確定插入水稻染色體的 Ag473 基因正常轉錄成 mRNA。再利用 Ag473 抗體蛋白進行葉片與種子的西方墨點分析，確認轉殖水稻正確的合成與累積目標蛋白。Ag473 蛋白之表現量以再生水稻種子進行分析，約佔總可溶性蛋白的 0.36~0.41%。子代分析上，轉殖再生水稻 T₁ 後裔進行 RT-PCR 分析，均可檢測到 Ag473 RNA 之訊號，顯示目標基因高度穩定遺傳至後代。因此，本實驗建議水稻可做爲奈瑟氏菌表面抗原(Ag473)基因表達的理想候選者。

關鍵詞：奈瑟氏菌、表面抗原、水稻、食用疫苗

Studies on the Surface Antigenic Gene of *Neisseria gonorrhoeae* Transferred into Rice (*Oryza sativa* L.)

Hsin-Hsuan Liu¹ Menq-Jiau Tseng² Chiou-Ying Yang² Chun-Teh Kuo¹ Jinn-Chin Yiu^{1,*}

1. Department of Horticulture, National Ilan University
2. Department of Horticulture and Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University

Abstract

Neisseria gonorrhoeae is a common infectious disease of humans and has remained a major problem world-wide. *N. gonorrhoeae* commonly transmits in adults through sex contact. Antibiotic-resistant *N. gonorrhoeae* highly emerges through the abuse of antibiotic. The cloning of antigen into edible transgenic plants is a promising delivery system for oral vaccines. The plant nuclear expression vector with overproduction of Ag473 gene driven by actin promoter was constructed. *Agrobacterium tumefaciens* containing the Ag473 expression constructs was used to transform rice. The objective of this study is to establish *Agrobacterium* transformation of Ag473 rice, and to evaluate the expression of targeted protein in rice.

The scutellar-derived embryogenic calli of original rice of variety ('TK8') were used in this study. Regenerated plant transformed with Ag473 gene via *Agrobacterium* were selected using kanamycin. Transcription RNA of Ag473 gene was

examined by reverse transcription RT-PCR. Western blot analysis using antiserum against Ag473 was carried out to determine the expression of protein in transgenic rice cells. The Ag473 protein specifically expressed and accumulated in seeds was at a level of 0.36~0.41% of the total seed protein in transgenic plants. Stable integration and expressing RNA of the Ag473 gene in T₁ progeny were confirmed by RT-PCR. These results suggested that the transgenic rice cells with expression of Ag473 protein were the ideal candidates.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, surface antigen, rice, edible vaccine

*Corresponding author E-mail: jcyiu@niu.edu.tw

前 言

奈瑟氏淋病雙球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)是個流傳很久的疾病，其自然寄主為人類。在漫長的演化過程中使得此雙球菌能躲避人體免疫系統，順利的在人體內進行其生命週期。淋菌可以自由的開啓或關閉膜表面蛋白抗原基因的表達產生細菌的相變，且在人群流行傳播過程中就具有發生表面抗原微變異的能力。這些幾乎是所有淋菌表面抗原的共同特點，給人們製備淋菌疫苗、進行淋病預防造成相當大的障礙。

目前對於淋菌之治療方法無論口服或注射皆以抗生素之藥物為主，無有效疫苗之生產。雖然抗生素的應用治癒了許多受淋病致病原感染的患者，但由於抗生素的普遍及過度使用，使得許多淋病雙球菌菌株開始產生抗藥性，造成超淋病的產生。在 1977 年抗青黴素淋菌(PPNG)於東南亞國家出現後，其他國家也陸續發現。而臺灣抗青黴素淋菌達 33%以上。之後抗四環黴素、抗 Cefoxitin (孢子黴素)及抗 Spectinomycin (觀黴素)抗生素淋菌相繼出現，且持續增加。因此，研發疫苗將勢在必行。

人們為了抵抗流傳下來之淋病性傳染疾病，也曾經研製過疫苗，並用黑猩猩做免疫試驗，但結果並不理想 (Arko *et al.*, 1976)。於是，學者們朝向奈瑟氏菌外膜蛋白進行研究，如：菌毛(Pilin)。但利用菌毛作為疫苗發展並不理想，主要原因為抗原變異度大(Lambden *et al.*, 1980)。轉往其它的研究方向，膜孔蛋白(porin)於淋菌中含量最高，約 60%，為外膜蛋白主要組成成分，所有淋菌表面均有表現(Zak *et al.*, 1984)，其抗原變異不大。研究發現，porin 可使動物和人類產生免疫反應(Wetzler *et al.*, 1992)。另外，Yamasaki 等人(2005)指出，淋菌的脂寡糖(lipo-oligo-saccharide, LOS)上含有表面抗原結合位，且具有發展疫苗抵抗奈瑟氏淋菌的潛力。但由於 LOS 具有毒性，無法直接應用於人類。因此，轉而將它注射入小鼠，再由小鼠分離單株抗體，所獲得之(MAb)2C7 單株抗體相似於淋菌之 LOS 上之表面抗原結合位。實驗證實，此(MAb)2C7 於人體中可誘導免疫反應。

奈瑟氏菌表面蛋白 A (*Neisseria surface Protein A*,

NspA)的研究方面。Martin 等人(1997)指出，腦膜炎外膜蛋白存在一種低分子量蛋白，稱為 NspA，研究發現將此基因抗原構築於 *E. coli*，純化出蛋白後應用於小鼠，以進行感染腦膜炎抗性試驗，發現小鼠可產生 NspA-專一性單株抗體，避免腦膜炎的攻擊。1999 年 Plante 等人成功的從奈瑟氏淋菌中選殖定序出淋菌的 *nspA* 基因，發現此抗原基因於菌株間之同源性高達 98%。與腦膜炎之 *nspA* 基因同源性高達 93%。NspA 具有高度之保留性，持續表達且暴露於細胞表面，以此作為抗原生產疫苗將有很大的潛力。在腦膜炎之研究方面已進入人體試驗的階段。Halpern 等人(2007)將腦膜炎之 NspA 使用於健康之成年人，研究發現可於志願者體內產生抗奈瑟氏菌表面蛋白 A (rNspA)之抗體。在淋菌 NspA 之研究方面，目前僅利用 *E. coli* 表現 NspA 蛋白的階段，並無免疫相關之研究。因此，在免疫發展上仍具有很大之空間。

雖然傳統疫苗控制了世界上不少地區的主要疾病，但還是具有許多缺點及副作用。因此，如何改良這些疫苗的缺失，以獲得更經濟、安全、有效、穩定性高且使用方便的疫苗，一直是科學家們追求的目標。近二十多年來，許多分子生物學家及免疫學研究人員積極開發新型疫苗如：標記疫苗、載體疫苗、DNA 疫苗、次單位疫苗等，其中又以次單位疫苗中的基因轉殖植物性疫苗具有獨特優勢(Streatfield and Howard, 2003; Sala *et al.*, 2003)。

植物生產疫苗應用在人類方面，第一個成功的次單位疫苗為B型肝炎表面抗原於菸草中表達(Mason *et al.*, 1992)，這也是首次應用於植物的例子。轉殖水稻生產疫苗之應用方面，抗原生產是以感染人類之病原菌為主。Gu 等人(2006)將幽門螺桿菌尿素酶UreB亞單位基因轉殖至水稻中。經PCR、RT-PCR和西方墨點分析結果顯示UreB重組蛋白於轉殖水稻中累積和表現。Takagi 等人(2007)將複合T細胞抗原決定位轉殖至水稻中，結果指出目標蛋白之表現量約佔總可溶性蛋白的5%，將轉殖水稻餵食老鼠後發現可誘導小鼠黏膜表達過敏原專一T細胞抗原決定位，提高對花粉過敏原之忍受性。Yang 等人(2007)將新城疫病毒表面融合醣蛋白(fusion glycoprotein)，經農桿菌轉殖至水稻中，其結果顯示目標蛋白於轉殖植株中累積。將葉片與種子所萃取之目標蛋白注射於小鼠，發現可誘導血清產生NDV專一性抗體。

研究也發現水稻所生產之融合醣蛋白能使小鼠持續產生專一性抗體。

本試驗希望藉由農桿菌基因轉移法將分離自奈瑟氏菌表面抗原基因(Ag473)，轉殖至植物表達系統中，運用植物之獨特優勢(細胞全能性)及真核表達系統表達 Ag473 目標蛋白。Ag473 為楊秋英博士實驗室新近發現的一個普遍存在於奈瑟氏菌屬之蛋白質(劉伊倫，2005)，包括：奈瑟氏腦膜炎雙球菌及奈瑟氏淋病雙球菌。此蛋白帶有 7 個氨基酸的串聯重複序列(tandem repeat)，而具有成為疫苗潛力的表面脂蛋白質。經由探討其在發炎反應中扮演的角色發現，Ag473 或許在感染時期參與了對宿主免疫反應的調控(張君銘，2006)。本實驗擬以世界許多國家的主要糧食作物水稻做為主要植物表達系統，利用基因轉殖的方式將功能性基因(Ag473)轉殖至水稻中，生產對人體疾病預防有幫助之蛋白，以

發展植物性疫苗，並提高水稻的附加價值。本試驗目的是將分離自奈瑟氏菌表面抗原基因(Ag473)構築於 actin 啟動子驅動之植物轉殖載體中，並以農桿菌法轉殖這些質體至水稻真核表達系統中表現，以建立 Ag473 轉殖水稻的系統，並偵測目標蛋白於水稻中的表現情形。

材料與方法

一、試驗材料

轉基因之植物材料為水稻(*Oryza sativa* L. sub. *japonica*)之‘台稈 8 號’(TK8)品種。基因轉殖之質體由中興大學分子生物學研究所楊秋英老師所提供，以 actin 啟動子驅動 Ag473 基因(325 bp)，並外加包含 6 個 His Tag 之序列(50 bp) (簡稱 Ag473H)，命名為 pKaAgnH(圖 1)。

pKaAgnH

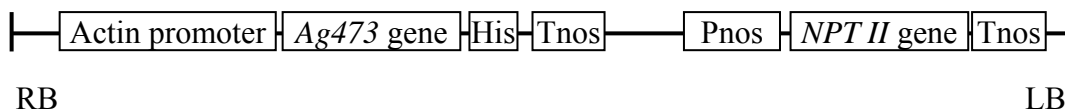


圖 1 二元載體包含 Ag473 基因的 T-DNA 構造區域。於 pKaAgnH 中，Ag473 的片段以 actin 啟動子驅動。His 代表含 6 個 His tag。

Fig. 1 The structure of T-DNA region of binary vectors containing Ag473 gene. The DNA fragment coding for the Ag473 was placed under the control of actin promoter in pKaAgnH. His represented the tagged protein containing 6-His tag. The neomycin phosphotransferase gene (*npt II*) was used for the selection of transformants. RB and LB represented right border and left border, respectively; Pnos and Tnos represented promoter and terminator of nopaline synthase.

二、試驗方法

(一)植物之轉型

1. 三親交配

三親交配的方法主要參考尤等人(1996)。分別混合 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404、*E. coli* strain HB101 含 pRK2013 質體(helper strain)與 *E. coli* strain HB101 含構築之質體(pKaAgnH)，其長出之菌落為帶有 pKaAgnH 之農桿菌。

將 LBA4404 培養於 5ml 含有 100 mg/l Streptomycin 之 LB 培養液，於 28°C 培育 12-36 小時。另外 HB101/pRK2013 和 HB101/pKaAgnH 則分別培養於 5ml 含 100 mg/l kanamycin 之 LB 培養液，於 37°C 培育 12 小時。待三種菌液在光電比色計波長 600 nm 的讀值約 0.6-0.8 時，各取 1 ml 菌液混合、離心，將沈澱之菌體懸浮於 2 ml 之 10 mM MgSO₄。此懸浮液經過濾將菌體收集於濾膜，將濾膜置於 LB 固體培養基上，於 28°C 隔夜培養後，以 2 ml 之 10 mM MgSO₄ 將濾膜上之菌體沖下，取菌塗佈於含 50 mg/l kanamycin 及 100 mg/l streptomycin 之 M9 medium (2 mM Na₂HPO₄·7H₂O、20 mM KH₂PO₄、8 mM NaCl、40 mM NH₄Cl、0.2% glucose、2 mM

MgSO₄、0.1 mM CaCl₂)。於 28°C 中培養 2-3 天，長出之菌落即為三親交配後之農桿菌，可做為感染轉移之用。

2. 農桿菌感染與植株再生

(1)水稻癒傷組織的誘導

將成熟之水稻種子除去外殼，經 70%酒精浸泡 3 分鐘與 2.5%次氯酸鈉浸泡 30 分鐘之表面滅菌後，無菌播種於含有 2%蔗糖、2 mg/l 之 2,4-D 與 0.8%之洋菜膠的 MS (Sigma, M5524)基本培養基。培養條件為 25°C 黑暗中培養。取無菌播種後 5 天的子葉盤，經繼代培養於含 2%蔗糖、2 mg/l 之 2,4-D 與 0.8%之洋菜膠的 N6 (Sigma, C1416)基本培養基，誘導癒傷組織。每 2 週繼代培養一次，4 週後做為農桿菌基因轉移之材料。

(2)轉殖基因植株的再生

將這些感染後的癒傷組織培養於 RE1-Hm 培養基(劉，2003)，此培養基之成份為 MS 培養基加上 2 mg/l BA、1 mg/l NAA、0.2% casamino acid、3% sorbitol、3% sucrose、0.4% gelrite，每 2 週繼代一次。待長出枝梢後，換至 RE1-Hm 培養基(含 75 mg/l kanamycin)直至發根。再移至 MS 基本培養基含 150 mg/l kanamycin、0.2% casamino acid、3% sorbitol、3% sucrose、0.4% gelrite 健

化，最後移至瓶外培養，並採收種子。

(二)再生植株分子層次分析

1. 植物 RNA 之萃取

利用 RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN)來進行 RNA 萃取。秤取 100 mg 樣品加入液態氮磨成粉狀。加入 450 μ l buffer RLT，振盪混合後，置於 56°C 水浴 3 分鐘。將混合液裝入 QIA shredder spin column，以 10,000 \times g 離心 2 分鐘收集過濾液。將離心管所收集之濾液，吸至新的離心管中，加入 0.5 倍體積的酒精(~100%)，混合後移至 RNeasy mini column，以 8,000 \times g 離心 15 秒並丟棄離心下液體。加入 700 μ l buffer PW1 至 RNeasy column，以 8,000 \times g 離心 15 秒，丟棄離心下液體。加入 500 μ l buffer RPE 至 RNeasy column，以 8,000 \times g 離心 15 秒，丟棄離心下液體。再加入 500 μ l buffer RPE 至 RNeasy column，以 8,000 \times g 離心 2 分鐘，丟棄離心下液體。將 RNeasy column 置於新的 1.5 ml 離心管，加入 30 μ l 之 RNase-free water。以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，收集 RNA，置於-20°C 中保存。

2. RT-PCR 分析

利用 QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN)來進行試驗。以轉殖(轉殖系 27、28、30)及未轉殖植物的葉片 RNA (2 μ g)為樣品，RT-PCR 總反應體積為 25 μ l，包含有 1X QIAGEN OneStep RT-PCR buffer、400 μ M dNTP Mix、20 μ M primers 及 1 μ l QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix，以 RNase-free water 定量。反應置於 My cycler™ Thermal Cycler (BIO-RAD)進行反應。偵測 *Ag473* 基因之引子為 5'-GGATCCCATGAAAAATTATT GATTGCCGCAATG-3' (*Agn1*)5'-AAGCTTGCGGCATC TTTCATTTTGTCTGCCG-3' (*Agn2*)。反轉錄作用反應條件：50°C 30 分鐘，1 個 cycle。初始 PCR 活化條件：95°C 15 分鐘，1 個 cycle，再進行 94°C 1 分鐘，50°C 1 分鐘，72°C 1 分鐘，30 個 cycle，最後 72°C 10 分鐘。反應完畢後，取產物 10 μ l 於 2% 之洋菜膠上進行電泳分析。

3. 植物總可溶性蛋白質萃取

(1)葉片總可溶性蛋白質萃取

秤取樣品 0.5 g，以液態氮研磨，加入 600 μ l 萃取液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5)，於 10,000 \times g 離心 15 分鐘後取上清液，即可用於蛋白質電泳分析及蛋白質濃度測定。

(2)種子總可溶性蛋白質萃取

將種子去殼並秤取 0.5 g，加入液態氮研磨，加入 400 μ l 萃取液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5)，於 10,000 \times g 離心 15 分鐘後取上清液，即可用於蛋白質電泳分析及蛋白質濃度測定。

4. 粗蛋白含量測定

利用 Bio-Rad Protein assay kit (Bradford, 1976)的方法。取 40 μ l 粗蛋白加入稀釋成 1X Bradford assay reagent 2 ml 混合，以 O.D.₅₉₅ 測吸收光值，之後與 BSA 所建立之標準曲線做比較，定出粗蛋白標準含量。

5. *E. coli* 粗蛋白萃取

將 *Ag473* 基因表現載體(pET-21 *Ag473*)轉型至

HB101 菌體中表現。挑取單一菌落接種至含有 50 μ g/ml kanamycin 之 5 ml LB 液體培養液中，置於 37°C 震盪培養 8-10 小時。培養後取 20 μ l 菌液接種入含有 50 μ g/ml kanamycin 之 5 ml LB 培養液，37°C 震盪培養，待 OD₆₀₀ 介於 0.7-0.9 時，加入 1 M IPTG 誘導基因大量表現。於 37°C 震盪培養 8 小時後，取 3 ml 菌液，以 4,000 \times g 離心 5 分鐘。將回收之菌體以 40 μ l 2X buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 5% 2-mercaptoethanol; 20% glycerol; 0.2% bromophenol blue)和 40 μ l 無菌水均勻混合，經 100°C 水浴 10 分鐘後，置冰上待用。

6. 西方墨點分析

將萃取之蛋白質注入每一膠體槽。電泳是以 4% stacking gel 以及 15% resolving gel 之 SDS-PAGE 電泳分離(BIO-RAD)。使用 50V 電壓，通電 30 分鐘。當 bromophenol blue 移動到 resolving gel，再將電壓改為 100 伏特，繼續通電 2.5 小時。電泳完成後，馬上以溼式法(BIO-RAD)使用 400 mA 電流 30 分鐘，將膠體上之蛋白轉至 PVDF paper。轉漬之 PVDF paper 置於含有 5%脫脂奶粉之 50 ml PBST (0.5% Tween-20, PBS) blocking，室溫震盪 30 分鐘，再用 PBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。加入 PBST 稀釋 500 倍之 10 ml Ag473 抗體，室溫震盪 1 小時，再以 PBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。隨後加入使用 PBST 稀釋 3000 倍之 goat anti-mouse IgG-AP，室溫震盪 1 小時。再用 PBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。最後加入用 AP buffer 稀釋 100 倍之 NBT/BCIP stock solution 5 ml 呈色，震盪至條帶出現。

7. 轉殖植物 *Ag473* 蛋白之純化

利用Novagen的His Bind kit來進行試驗。將轉殖植物(轉殖系27、28、30)總可溶性蛋白萃取出，分別加入預先準備之Ni²⁺金屬親和性管柱(Ni²⁺金屬親和性管柱使用前先加入2 ml His-Bind resin, 6 ml無菌水, 6 ml binding buffer, pH 7.8, 並使液體流出, 待樹脂完全沉澱)。再加入樣品體積(植物萃取出之總可溶性蛋白) 6倍之binding buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.8), 待液體完全流出。加入wash buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 6.0), 將與樹脂非特異性結合的蛋白質洗去(流出之液體OD₂₈₀<0.01)。最後加入6倍樣品體積且不同濃度之elute buffer (10 mM imidazole, 20 mM imidazole, 100 mM imidazole, 150 mM imidazole)將重組蛋白沖提出來，利用Bio-Rad Protein Assay Kit，定出純化蛋白標準含量。

8. T1 代轉殖基因植株之種植與鑑定

將經西方墨點鑑定呈正反應之 T₀ 種子(轉殖系 27、28、30)進行 T₁ 後裔遺傳分析與基因檢測，選取不同轉殖品系 T₀ 代種子 10 顆，去除種皮並於 9 cm 培養皿中培養，發芽後(約一星期)移至 3 吋盆栽培，再定植於溫室中。待長成植株，分別分離植株葉片之 RNA 進行 RT-PCR 分析，其葉片 RNA 之萃取與 RT-PCR 檢測分析之方法與 T₀ 相同。

結果

一、轉基因植株之再生情形

經農桿菌基因轉移 3 週後癒傷組織開始有葉綠素產生(圖 2A)。隨著繼代次數增加，原本產生葉綠素之癒傷組織逐漸伸長形成芽鞘(圖 2B)。將形成芽鞘之癒傷組織個別移至以 RE1 為培養基之試管中誘導發根，並且以 75 mg/l kanamycin 進行第一次篩選(圖 2C)。根系形成後再移置含 150 mg/l kanamycin 之 MS 培養基中進行第二

次篩選，並健化根系(圖 2D)。篩選後存活之植株移出瓶外，種植於 3 吋盆中馴化(圖 2E)。最後定植至溫室中使其生長及採收種子(圖 2F、G)。種子從播種、癒傷組織再生至轉殖再生株移置溫室定植，整個再生之流程約需 6 個月。癒傷組織再生成植株的比率約為 2.3% (資料未顯示)。

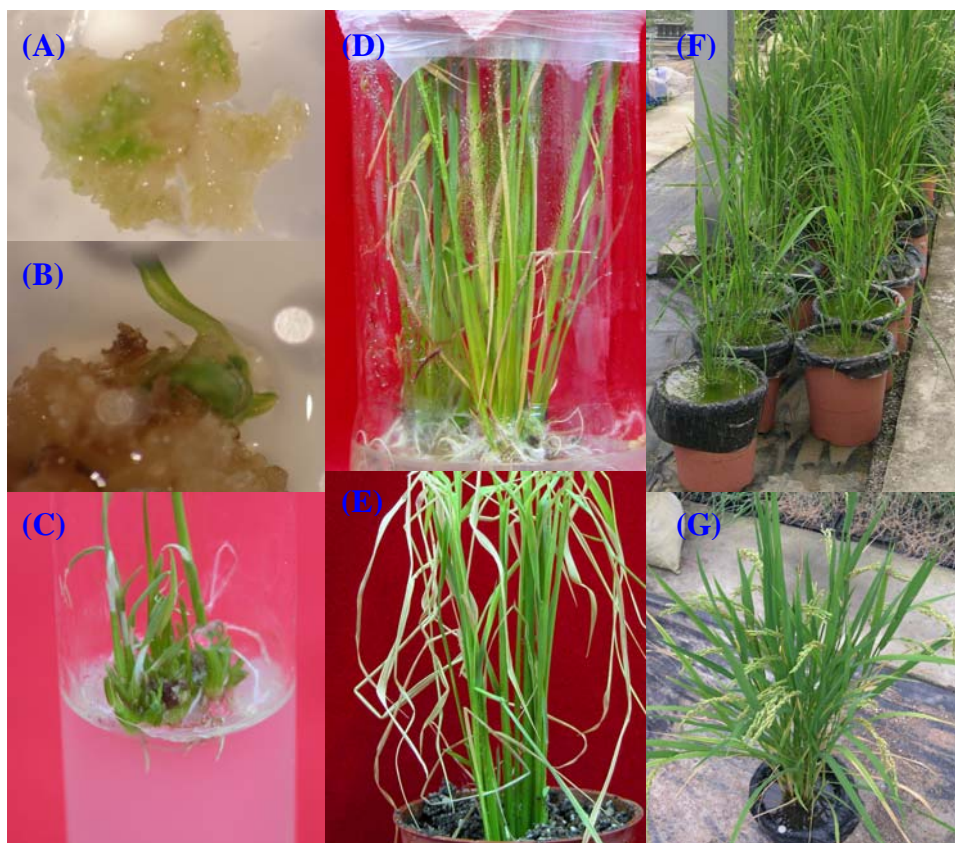


圖 2 台稔 8 號水稻以農桿菌法進行基因轉殖再生情形。(A)繼代培養 3 週後癒傷組織開始產生葉綠素；(B)產生葉綠素之癒傷組織開始誘導成芽鞘；(C)於發根培養基中形成根系，並且以 75 mg/l kanamycin 進行第一次篩選；(D)以 150 mg/l kanamycin 進行第二次篩選；(E)移出瓶外健化；(F)溫室定植且(G)結穗。

Fig. 2 Regeneration of transgenic rice was obtained through Agrobacterium-mediate transformation method.(A) chlorophyll began to be produced from callus after subculture three week on RE1 medium; (B) shoots began to be induced from chlorophyll-containing callus; (C) induced shoots generated root system on rooting medium with 75 mg/l kanamycin; (D) second selection on MS medium with 150 mg/l kanamycin; (E) plant hardening; (F) in greenhouse; (G) normal growth and grain.

二、轉殖再生水稻之篩選分析

1. RT-PCR 分析

選取經 PCR 反應分析呈現正反應之轉殖再生水稻(資料未顯示)，萃取葉片總 RNA，再以 Ag473 基因之特定引子(Agn1 和 Agn2)進行 RT-PCR 反應分析。圖 3 為台稔 8 號轉殖 pKaAgnH 質體之水稻再生植株分析情

形。除了水及未轉殖植株無條帶產生，其餘轉殖 pKaAgnH 質體之再生水稻於 325 bp 位置處都有條帶出現。

2. 轉殖植株葉片西方墨點分析

圖 4 為台稔 8 號轉殖再生水稻之分析情形，將所獲得之總可溶性蛋白與 Ag473 抗體雜合，皆有 Ag473

抗體雜交之呈色反應，與加 IPTG 誘發經轉型之 HB101 的 pET-21Ag473 所產生之雜交條帶相符，而未轉殖植株無此雜交條帶。由西方墨點雜交分析結果顯示，經由農桿菌轉殖之水稻，可進一步證明插入之 Ag473 基因可轉

譯成 Ag473 蛋白。經農桿菌轉殖 pKaAgnH 之再生水稻 (台梗 8 號) 藉由 RT-PCR 及葉片西方墨點篩選分析之結果顯示，再生植株確定轉殖成功率約為 75% (資料未顯示)。

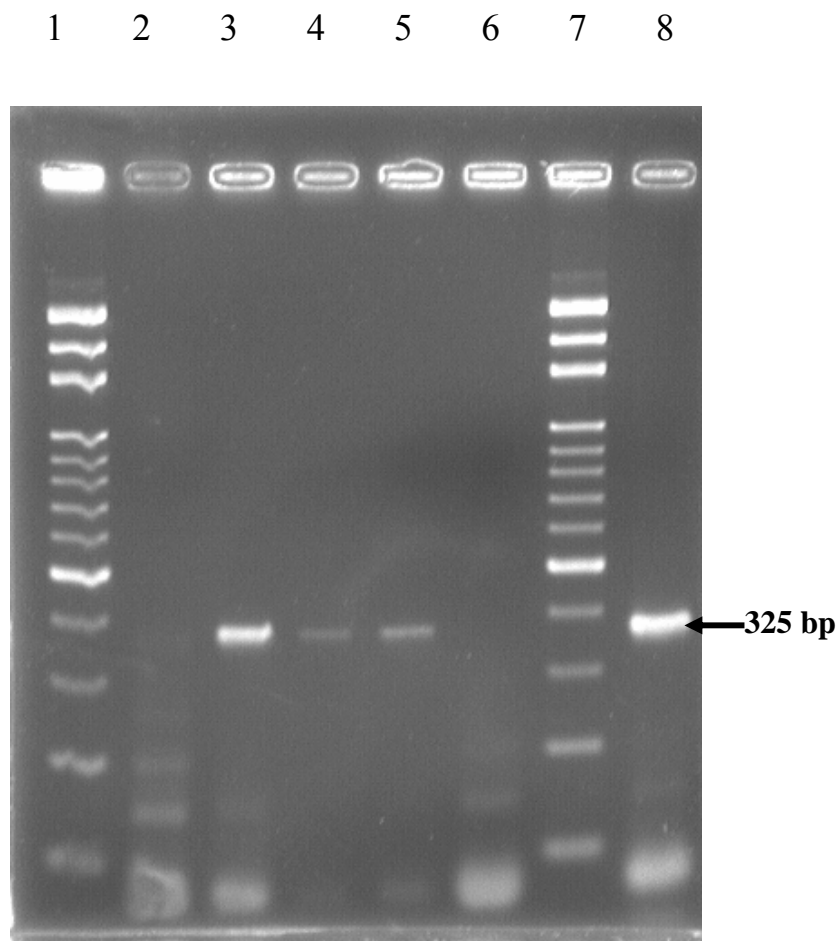


圖 3 轉移 Ag473H 基因之台梗 8 號水稻葉片萃取之 RNA，經 RT-PCR 反應之產物在電泳膠片上分離之情形；1 和 7：Gen-100 DNA Ladder (100~3000 bp)；2：未轉殖水稻(CK)；3~5：轉殖 pKaAgnH 再生水稻(27、28、30)；6：H₂O；8：質體 pKaAgnH。

Fig. 3 RT-PCR analysis of transformed rice (TK8) from the leaves RNA of regenerated plants with *Agn1* and *Agn2* primers. Two micro-gram aliquot of total RNA each sample was used for cDNA synthesis. Well 1 and 7: Gen-100 DNA Ladder (100~3000 bp); 2: non-transformed rice (CK); 3~5: pKaAgnH transformed rice (27, 28, 30); 6: H₂O; 8: pKaAgnH from *E. coli*.

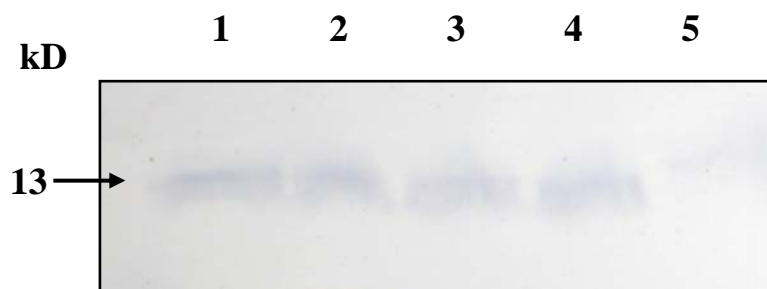


圖 4 轉移 *Ag473H* 基因之水稻葉片萃取之總可溶性蛋白，經西方墨點雜交分析 *Ag473* 蛋白之情形。1：細菌的 *Ag473*；2~4：轉殖 *pKaAgnH* 再生水稻(27、28、30)；5：未轉殖水稻。

Fig. 4 Western blot analysis of *Ag473* expressed in leaf tissue of transgenic rice plants. The amount of loaded total soluble protein extracted from rice tissue in each well was 40 μg . The amount of loaded bacterial recombinant *Ag473* was 10 μg . 1: bacterial *Ag473*; 2~4: *pKaAgnH* transformed rice (27, 28, 30); 5: non-transformed rice (CK)

3. 種子西方墨點分析

選取經 RT-PCR 及葉片西方墨點分析呈正反應之轉殖再生水稻，分離種子之總可溶性蛋白，取 80 μg 進行西方墨點分析。如圖 5 所示，編號 9 為未轉殖‘台梗 8 號’水稻植株，而編號 3~8 為轉殖 *pKaAgnH* 再生植株種子所萃取之總可溶性蛋白。經西方墨點分析，結果證明有 *Ag473* 抗體雜交之呈色反應，而未轉殖植株此雜交條帶亦不明顯。此可更進一步證明 *Ag473* 蛋白不僅於葉片表現，在轉殖再生水稻種子中亦有高度的表現情形。

4. 轉殖植株 *Ag473* 蛋白含量測定

圖 6 為轉殖植株 *Ag473* 蛋白濃度測定情形，結果顯示轉殖品系 27 植株之種子總可溶性蛋白為 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，種子中 *Ag473* 蛋白之含量為 16.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，約佔其總可溶性蛋白的 0.41%。而品系 28 及 30 植株之種子總可溶性蛋白為 3800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，種子中 *Ag473* 蛋白之含量分別為 14.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 13.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，約佔其總可溶性蛋白的 0.37% 及 0.36%。

5. T_1 代轉殖基因植株之種植與鑑定

選取經 RT-PCR 及西方墨點鑑定，確定已轉殖成功之水稻植株，採收其種子，供 T_1 後裔遺傳分析與基因檢測用。圖 7 為‘台梗 8 號’轉殖帶有 *Ag473H* 基因質體之水稻再生植株 T_1 後裔分析情形。結果指出，經轉殖帶有 *Ag473H* 質體之 T_1 水稻與質體 *pKaAgnH* 經由 *Ag473* 基因之特定引子(*Agn1* 及 *Agn2*)進行檢驗，皆於 325 bp 位置處出現 *Ag473* 片段條帶，而未轉殖植株 CK 與無菌水(H_2O)則無此條帶。證實轉殖的 *Ag473* 基因可遺傳至下一代。

討 論

一、構築基因轉移之載體系統

本試驗將分離自奈瑟氏菌表面抗原基因(*Ag473*)構

築於以 *actin* 為啟動子之植物轉殖載體中。構築之質體均含有以 NOS 為啟動子之 kanamycin 抗性基因(*NPTII*) (Ni *et al.*, 1995)，方便早期抗生素(kanamycin)篩選轉殖植株之用。而 *Ag473H* 為 *Ag473* 基因片段後面帶有六個組氨酸(6xHis-Tag)，其目的為方便日後轉殖植株之轉殖目標蛋白(*Ag473*)的純化。His-Tag 屬於親合性標籤之一。親合性標籤使用之優點：1. 它不具有生物化學特性和功能；2. 能增加蛋白質之收穫量(Sun *et al.*, 2005)；3. 保護蛋白質水解(Tang *et al.*, 1997)；4. 促進蛋白質摺疊(Kou *et al.*, 2007)；5. 保護融合蛋白之抗原性(Mayer *et al.*, 2004)等。此外，親合純化所回收之目標蛋白可高達 90% 以上。因此，本實驗即選用親合性標籤 His-Tag 作為純化目標蛋白之工具。

二、藉由農桿菌基因轉移法將基因轉移至植株之再生情形

本實驗所選用之基因轉殖植物為世界許多國家的主要糧食作物水稻，做為主要植物表達系統，利用農桿菌轉移技術將功能性基因(*Ag473*)轉殖至水稻種子所誘導的癒傷組織中使之再生。雖然農桿菌轉移法插入之外源基因在植物染色體之穩定性優於其他轉殖法(Walden and Wingender, 1995)，可以提供一個精確的轉殖機制來把轉殖 DNA 送到寄主裡面去。但亦有其缺點，其無法有效控制插入基因之數量與位置(Gelvin, 2003)。因此，再生過程之初期篩選使用不同濃度 kanamycin 進行二次篩選(圖 2)。抗生素 kanamycin 篩選使用濃度是參考劉(2003)水稻再生系統建立之方法，但篩選之階段有所差異。劉(2003)初步篩選為經農桿菌感染後之癒傷組織，二次篩選於誘導發根之階段。而本試驗將初步篩選延後至誘導發根之階段，二次篩選皆於誘導發根之時期，其再生存活率可提高。

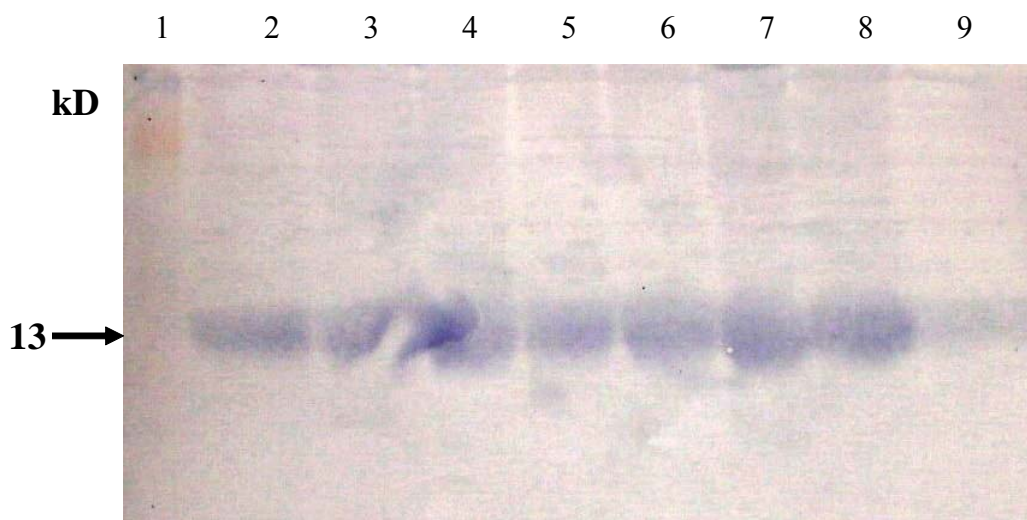


圖 5 轉移 *Ag473H* 基因之水稻種子萃取之總可溶性蛋白，經西方墨點雜交分析 *Ag473* 蛋白之情形。1: Marker (RPN 800); 2: 細菌的 *Ag473*; pKaAgnH 轉殖稻, 3, 4: TK8-27; 5, 6: TK8-28; 7, 8: TK8-30; 9: 未轉殖台梗 8 號水稻

Fig. 5 Western blot analysis of *Ag473* expressed in seed tissue of transgenic rice plants. The amount of loaded total soluble protein extracted from rice tissue in each well was 80 μ g. The amount of loaded bacterial recombinant *Ag473* was 10 μ g. 1: Marker (RPN 800); 2: bacterial *Ag473*; pKaAgnH transformed rice, 3, 4: TK8-27; 5, 6: TK8-28; 7, 8: TK8-30; 9: non-transformed TK8 rice (CK).

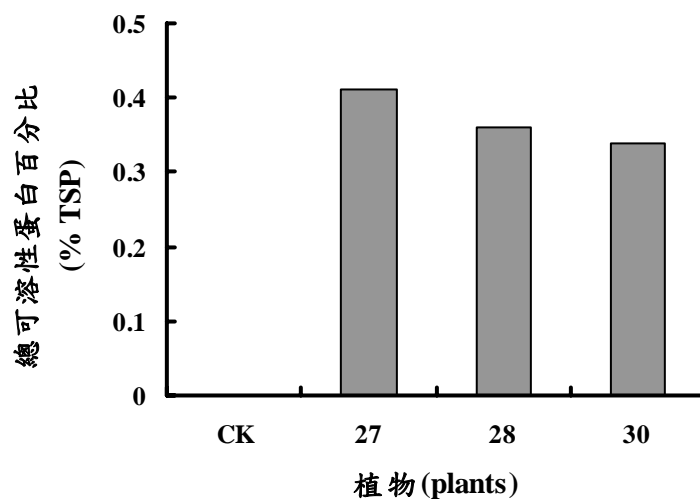


圖 6 轉殖植株種子 *Ag473* 佔總可溶性蛋白(total soluble protein, TSP)百分比。數字為轉殖植株品系。CK: 未轉殖水稻。

Fig. 6 The percentage of recombinant *Ag473* to the total soluble protein (% TSP) accumulated in the seeds of rice transformants. Number indicates different transgenic rice lines. CK, untransformed rice.

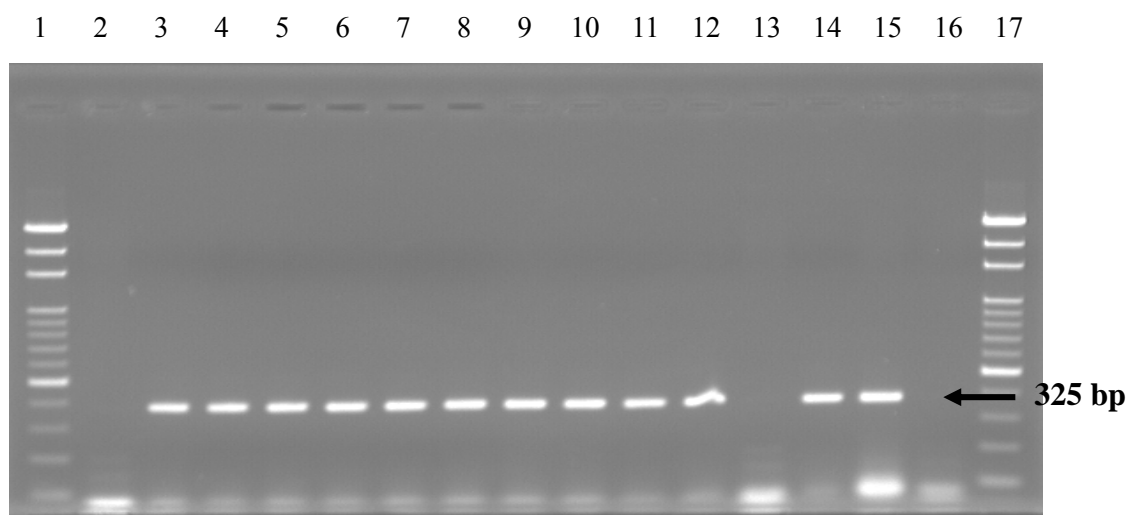


圖 7 台梗 8 號 轉移含 *Ag473H* 之 T_1 代水稻葉片之萃取 RNA，經 RT-PCR 反應之產物在電泳膠片上分離的情形。1 和 17：Gen-100 DNA Ladder (100~3000 bp)；2：TK8 未轉殖水稻(CK)；pKaAgnH 轉殖稻，3~5：TK8-27；6~8：TK8-28；9~12：TK8-30；14~15：質體 pKaAgnH；16：H₂O。

Fig. 7 RT-PCR analysis of the leaves RNA from T_1 progeny transformed rice (TK8) with *Agn1* and *Agn2* primers. Well 1 and 17: Gen-100 DNA Ladder (100~3000 bp); 2: TK8 non-transformed rice; pKaAgnH transformed rice, 3~5: TK8-27; 6~8: TK8-28; 9~12: TK8-30; 14~15: pKaAgnH from *E. coli*; 16: H₂O.

三、轉殖再生水稻之篩選分析

為了證實基因轉殖之目標基因能否正確轉譯出目標蛋白，因此將經 RT-PCR 分析呈正反應之轉殖再生水稻，萃取葉片與種子中之總可溶性蛋白，進行西方墨點分析，觀察目標蛋白質之表現情形。肌動蛋白(Actin)啟動子方面，肌動蛋白為所有真核生物細胞骨架主要構成要素，並且參予主要細胞運作過程。在植物，肌動蛋白皆由複合基因家族所譯碼來的，在基因分類上具有高度保留性。這些基因家族是如何形成並且為何保留於被子植物，其原因尚不清楚(McDowell *et al.*, 1996)。但肌動蛋白於植物體內具有高度動態變化的特性，在植物形態發生(細胞分裂和伸長)上具有高度調節的作用(Dong *et al.*, 2001)，因此肌動蛋白啟動子具有可持續驅動目標基因高度表現的特性。Zhang 等人(1991)發現將水稻肌動蛋白基因(*Act1*)調控活性的 5'區域接上 *gus* 基因並轉殖於水稻中發現，此啟動子驅動 *gus* 基因大量表現。其轉殖水稻組織中之 GUS 蛋白可佔總可溶性蛋白的 3%。在本試驗中轉殖 *Act1* 啟動子驅動 pKaAgnH 的再生水稻，葉片總可溶性蛋白經西方墨點分析發現，皆可產生有效蛋白(Ag473)(圖 4, 5)。

本試驗之轉基因水稻穀粒蛋白含量測定中發現，具有高度目標蛋白(Ag473)之表現，約佔穀粒總可溶性蛋白的 0.36~0.41% (圖 6)。相較 Takagi 等人(2007)將複合 T 細胞抗原決定位轉殖至水稻中的 5%，本試驗之目標蛋白表現量較低，其原因可能與啟動子之種類有關。Takagi 等人(2007)所使用之啟動子為穀蛋白(*GluB-1*)。穀蛋白於水稻種子中佔 80% 以上，因此，擁有很強的基因啟動能力(Takaiwa *et al.*, 1987)。Yang 等人(2007)以穀蛋白啟動子

驅動新城疫病毒表面融合醣蛋白(fusion glycoprotein)，經農桿菌轉殖至水稻中，結果顯示葉片與種子的目標蛋白平均表現量約佔總可溶性蛋白的 0.25~0.55%。相較其他作物，本試驗的轉殖 Ag473 蛋白則含量較高。如：Gomez 等人(2000)將腸胃炎病毒(TGEV)的醣蛋白 S 應用於馬鈴薯，其轉殖馬鈴薯塊莖中之 TGEV 的醣蛋白 S 表現量約佔總可溶性蛋白的 0.02%~0.07%。轉殖菸草中所獲得之 TGEV 的醣蛋白 S 表現量約佔葉片總可溶性蛋白 0.1%~0.2% (Tuboly *et al.*, 2000)。Huang 等人(2006)將家禽裏奧病毒 σ 蛋白轉殖至苜蓿之蛋白表現結果， σ C 蛋白量佔總可溶性蛋白的 0.007%。由此可說明同種基因運用於不同作物間或不同基因應用於相同作物間，其目標蛋白之表現量有明顯差異。研究中也發現，未轉殖水稻與轉殖水稻之總可溶性蛋白含量上非常相似，顯示轉殖水稻內之總可溶性蛋白含量未改變，只增加目標蛋白(Ag473)之含量，此結果與玉米轉殖不耐熱毒素 B 次單基因(LT-B)之結果相似(Woodard *et al.*, 2003)。

Mason 等人(1992)將 B 型肝炎表面抗原轉殖於菸草指出，菸草所生產之 B 型肝炎表面抗原類病毒粒子(VLP)與商業上之酵母菌生產的相似，但其表現量很低，約 0.0002~0.0006%。低量目標蛋白之表達，常為基因轉殖植物發展疫苗之主要障礙，在其他之轉殖系統中亦有報告指出(Matsumura *et al.*, 2002; Streatfield and Howard, 2003)。但在轉殖水稻之研究中發現，其目標蛋白之表達，無論是在 Takagi 等人(2007)將複合 T 細胞抗原決定位轉殖至水稻的研究或是本試驗奈瑟氏表面抗原基因 Ag473 之轉殖研究，皆可發現高度之目標基因表現。

口服蛋白質疫苗必須在消化吸收後仍具有抗原特性

才有利用的潛力。轉殖馬鈴薯塊莖經小鼠口服後發現，植物中所表現之 B 型肝炎抗原能刺激小鼠血清中 IgG 大幅提高，由此可證明除了酵母取得疫苗外，馬鈴薯表現 B 型肝炎抗原為另一個理想候選者(Richter *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2001)，這也顯示植物疫苗的口服傳遞具有很大潛力。馬鈴薯塊莖產生之抗原經小規模人體臨床試驗，經口服後顯示是安全且會產生免疫能力(Thanavala *et al.*, 2005)。水稻為許多國家之主要糧食作物，利用水稻發展人類食用疫苗將為日後研發管道之理想候選者。未來，我們將純化來自水稻的 Ag473 注射老鼠或直接以轉殖水稻餵食老鼠，並與細菌所生產的 Ag473 做比較，測試老鼠是否有免疫反應，使 Ag473 的功能更加明確。

致 謝

本研究承農委會農糧署經費補助(95 農科-6.1.3-糧-Z1-(1))，特申謝忱。

參考文獻

尤進欽、曾夢蛟、陳良築。1996。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因轉移到青花菜、花椰菜及小白菜。中國園藝 42 (4): 312-330。

張君銘。2006。腦膜炎雙球菌表面脂蛋白 Ag473 之功能分析及其抗原決定位之界定。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。61pp。

劉伊倫。2005。腦膜炎雙球菌表面抗原 Ag473 之功能及免疫特性分析。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。63pp。

劉程煒。2003。水稻農桿菌基因轉殖系統與甘藍及水稻葉綠體基因轉殖系統之建立及應用。國立中興大學園藝學系博士論文第 2-4 章。

Arko, R. J., W. P. Duncan, W. J. Brown, W. L. Peacock, and T. Tomizawa. 1976. Immunity in infection with *Neisseria gonorrhoeae*. J. Infect. Dis. 133: 441-447.

Braford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Dong, C.H., G. X. Xia, Y. Hong, S. Ramachandran, B. Kost, and N. H. Chua. 2001. ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis*. Plant Cell 13: 1333-1346.

Gelvin, S. B. 2003. Improving plant genetic engineering by manipulating the host. Trends Biotechnol. 21: 95-98.

Gomez, N., A. Wigdorovitz, S. Castanon, F. Gil, R. Ordas, M. V. Borca, and J. M. Escribano. 2000. Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus.

Arch. Virol. 145: 1725-1732.

Gu, Q., Ning H. J. Liu, and M. Zhu. 2006. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in transgenic rice. Biotechnol. Lett. 28: 1661-1666.

Halperin, S. A., J. M. Langley, B. Smith, P. Wunderli, L. Kaufmanb, A. Kimura, and D. Martin. 2007. Phase 1 first-in-human studies of the reactogenicity and immunogenicity of a recombinant meningococcal NspA vaccine in healthy adults. Vaccine 25: 450-457.

Huang, L. K., S. C. Liao, C. C. Chang, and H. J. Liu. 2006. Expression of avian reovirus σ protein in transgenic plants. J. Virol. Method 134: 217-222.

Kong, Q., L. Richter, Y. F. Yang, C. J. Arntzen, H. S. Mason, and Y. Thanavala. 2001. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 11539-11544.

Kou, G., S. Shi, H. Wang, M. Tan, J. Xue, D. Zhang, S. Hou, W. Qian, S. Wang, J. Dai, B. Li, and Y. Guo. 2007. Preparation and characterization of recombinant protein ScFv(CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 52: 131-138.

Lambden, P. R., J. N. Robertson, and P. J. Watt. 1980. Biological properties of two distinct pilus types produced by isogenic variants of *Neisseria gonorrhoeae* P9. J. Bacteriol. 141: 393-396.

Martin, D., N. Cadieux, J. Hamel, and B. R. Brodeur. 1997. Highly conserved *Neisseria gonorrhoeae* surface protein confers protection against experimental infection. J. Exp. Med. 185: 1173-1183.

Mason, H. S., D. Lam, and C. J. Arntzen. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 11745-11749.

Matsumura, T., N. Itchoda, and H. Tsunemitsu. 2002. Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. Arch. Virol. 147: 1263-1270.

Mayer, A., S. K. Sharma, B. Tolner, N. P. Minton, D. Purdy, P. Amlot, G. Tharakan, R. H. J. Begent, and K. A. Chester. 2004. Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: a step towards an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). Br. J. Cancer. 90: 2402-2410.

McDowell, J. M., S. Huang, E. C. McKinney, Y. Q. An, and R. B. Meagher. 1996. *Arabidopsis thaliana* contains ten actin genes encoding six ancient protein subclasses. Genetics 142: 587-602.

Ni, M., Cui D., J. Einstein, S. Narasimhulu, C. E. Vergara, and S. B. Gelvin. 1995. Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and

- mannopine synthase genes. *Plant J.* 7: 661-676.
- Plante, M., N. Cadieux, C. R. Rioux, J. Hamel, B. R. Brodeur, and D. Martin. 1999. Antigenic and molecular conservation of the gonococcal NspA protein. *Infect. Immun.* 67: 2855-2861.
- Richter, L. J., Y. Thanavala, C. J. Arntzen, and H. S. Mason. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* 18: 1167-1171.
- Sala, F., M. M. Rigano, A. Barbante, B. Basso, A. M. Walmsley, and S. Castiglione. 2003. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* 21: 803-808.
- Streatfield, S. J. and J. A. Howard. 2003. Plant-based vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33: 479-493.
- Sun, Q. M., L. L. Chen, L. Cao, L. Fang, C. Chen, and Z. C. Hua. 2005. An improved strategy for high-level production of human vasostatin 120-180. *Biotechnol. Prog.* 21: 1048-1052.
- Takagi, H., T. Hiroi, L. Yang, Y. Tada, Y. Yuki, K. Takamura, R. Ishimitsu, H. Kawauchi, H. Kiyono, and F. Takaiwa. 2007. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48: 17525-17530.
- Tang, W., Z. Y. Sun, R. Pannell, V. Gurewich, and J. N. Liu. 1997. An efficient system for production of recombinant urokinase-type plasminogen activator. *Protein Expr. Purif.* 11: 279-283.
- Thanavala, Y., M. Mahoney, S. Pal, A. Scott, L. Richter, N. Natarajan, P. Goodwin, C. J. Arntzen, and H. S. Mason. 2005. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 3378-3382.
- Tuboly, T., W. Yu, A. Bailey, S. Degrandis, S. Du, L. Erickson, and E. Nagy. 2000. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine.* 18: 2023-2028.
- Walden, R. and R. Wingender. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Trends Biotechnol.* 13: 324-331.
- Wetzler, L. M., M. S. Blake, K. Barry, and E. C. Gotschlich. 1992. Gonococcal porin vaccine evaluation: comparison of Por proteosomes, liposomes, and blebs isolated from rmp deletion mutants. *J. Infect. Dis.* 166: 551-555.
- Woodard, S. L., J. M. Mayor, M. R. Bailey, D. K. Barker, R. T. Love, and J. R. Lane. 2003. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 123-130.
- Yamasaki, R., T. Maruyama, U. Yabe, S. Asuka. 2005. Normal human sera contain bactericidal IgG that binds to the oligosaccharide epitope expressed within lipooligosaccharides of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Biochem.* 137: 487-494.
- Yang, Z., Q. Liu, Z. Pan, H. Yu, and X. Jiao. 2007. Expression of the fusion glycoprotein of newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 591-598.
- Zak, K., J. L. Diaz, D. Jackson, and J. E. Heckels. 1984. Antigenic variation during infection with *Neisseria gonorrhoeae*: detection of antibodies to surface proteins in sera of patients with gonorrhoea. *J. Infect. Dis.* 149: 166-174.
- Zhang, W., D. McElory, and R. Wu. 1991. Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plant. *Plant Cell* 3: 1155-1165.

96年08月17日投稿

96年11月28日接受