

## 構築多套組 VVYP (Val-Val-Tyr-Pro) 基因之 甘藍葉綠體轉殖載體

傅 承 泰<sup>1)</sup> 潘 怡 君<sup>2)</sup> 曾 夢 蛟<sup>3)</sup>

關鍵字：甘藍、葉綠體基因轉殖、VVYP 胜肽

**摘要：** VVYP 胜肽 (Val-Val-Tyr-Pro) 能抑制消化道對於脂肪的吸收，以及增強肝臟中三酸甘油酯水解酵素的活性，因此能快速清理體內脂肪以達到降血脂的效果。植物葉綠體基因轉殖有以下優點：1. 葉綠體轉殖基因表現量高於核轉殖。2. 葉綠體基因組為母系遺傳不會基因漂流。3. 目前沒有報告指出有基因沉默和插入位置效應的問題。本研究完成構築攜帶有多套 VVYP 胜肽為目標基因 (Gy5-9VVYP、7sb-7VVYP、15VVYP) 之甘藍葉綠體轉殖載體。

### 前 言

日常的飲食中如果攝取高油脂類食品過量，會導致高血脂症 (hyperlipidemia)，嚴重影響人體健康。如何有效控制血液中脂類濃度，是維護身體健康所需面對的問題。Kagawa 等人在 1996 報告中發現球蛋白經由酸性水解酶分解所得 VVYP 胜肽鏈，具有抑制血清中三酸甘油酯 (triglyceride) 升高的功效。當攝取高脂肪食物後，若加入 VVYP 胜肽 (Val-Val-Tyr-Pro) 可以抑制三酸甘油酯在小腸中被吸收，增強肝中三酸甘油酯水解酵素活性，快速清理體內脂肪，達降低血脂濃度及減肥功效。要達到預防心臟血管疾病或是肥胖，降低血清中三酸甘油酯較降低膽固醇來得重要。在日本包括森永製菓公司等，已將 VVYP 胜肽加入飲料中做為餐後預防血清中三酸甘油酯上升的機能性飲料。

本研究以葉綠體基因轉移技術具有大量表現外源基因的優勢，將改造過含多套組 VVYP 之大豆儲藏性蛋白 (glycinin 和  $\beta$ -conglycinin) 基因及僅含多套組 VVYP (包括消化道

---

1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。

2) 國立中興大學園藝系副教授。

3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

蛋白酶之剪切位)胜肽的基因，構築到甘藍葉綠體轉殖載體，以應用於轉移至甘藍葉綠體中。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

本試驗以'初秋'(K-Y cross)甘藍 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)為試驗材料。甘藍初秋無菌播種為取適量甘藍種子加入酒精 75%搖晃 2 分鐘，以無菌水洗滌三次。加入 1%漂白水搖晃 15 分鐘，以無菌水洗滌五次。播種於 MS (Murashige and Skoog) B5 維他命培養基中，培養溫度為 25°C 光週期為 16 小時日照，8 小時黑暗。

### 二、試驗方法

#### (一)、甘藍葉綠體轉殖載體之選殖

##### 1. 植物總 DNA 萃取

取 0.1 g 之葉片以 Plant Genomic DNA Purification Kit DP022 萃取總 DNA。

##### 2. 小量質體 DNA 萃取

挑取單一菌落 (single colony) 接種於 5 mL 的 LB 液體培養基中加入抗生素 100 ppm ampicillin，置於 37°C 震盪培養 12~16 小時。採用 GeneMark™ High-speed plasmid mini kit 進行萃取。先將培養過夜的菌液分裝在 1.5 mL 的離心管中以小型離心機離心，去除上清液並加入 200 µL PD1 buffer，震盪懸浮。加入 200 µL PD2 buffer，上下顛倒離心管使之混合後靜置 2 分鐘，再加入 300 µL PD3 buffer，上下顛倒離心管使之混合後以小型離心機離心 3 分鐘。吸取上清液至 PD column，再以小型離心機離心 2 分鐘，去除下層液體，加入 400 µL W1 buffer，離心 2 分鐘。去除下層液體，加入 600 µL Wash buffer，離心 2 分鐘。去除下層液體，再離心 5 分鐘，將 PD column 換至新的微量離心管，加入 50 µL Elution buffer，靜置 2 分鐘，以小型離心機離心 2 分鐘，貯存於 -20°C 中。

##### 3. 引子設計與聚合酵素鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

###### (1) 增幅甘藍 *trnI* 基因：

核酸引子 1、2 分別為 5'-GGGCCTTGACACACCG-3'、5'-CTGGGCCATCCTGGATTGA-3'，可產生出 1,265 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，51°C、30 秒，72°C、30 秒，30 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 5 µL 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

###### (2) 增幅甘藍 *trnA* 基因：

核酸引子 3、4 分別為 5'-CTGCGCCAAGGAAAAGAATATAAGA-3'、5'-AGCTTTGTATCGGCTAAGTCCA-3'，可產生出 963 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，51°C、30 秒，72°C、30 秒，30 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 5 µL 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(3) 增幅 *Prrn+aada* 基因片段：

核酸引子 12、13 分別為 5'- GATATCGCTCCCCGCCGTCGTTC -3'、5'- TCTAGAC CCGGGGAATTCTATTTAAATTTATTTGCCGACTACCTTGGTG -3'，可產生出 952 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，62.7°C、30 秒，72°C、30 秒，30 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 5 μL 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(4) 偵測 *psbA* 啟動子片段：

核酸引子 14、15 分別為 5'- ATTTAAATGTATATAGATTCGTTTA -3'、5'- GAATTC GGTAATAATCC TTGGTTT -3'，可產生出 209 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，38.6°C、30 秒，72°C、30 秒，30 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 5 μL 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(5) 偵測 *GUS* 基因片段：

核酸引子 16、18 分別為 5'- CTACTGGAATTCGGGAGGGATTTATGTTACGTCCTG TAGAAACCC -3'、5'- GATTCTCCCGGGTTATTGTTTGCCCTCCCT -3'，可產生出 1,823 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，61.2°C、30 秒，72°C、30 秒，30 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 5 μL 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(6) 偵測 *GUS* 基因片段：

核酸引子 17、18 分別為 5'- CTACTGGAATTCATGTTACGTCCTGTAGAAACCC -3'、5'- GATTCT CCCGGGTTATTGTTTGCCCTCCCT -3'，可產生出 1,823 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，61.2°C、30 秒，72°C、30 秒，30 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 5 μL 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(7) 偵測 *7sb* 基因片段：

核酸引子分別為 23、24 分別為 5'- GATCTGCAATTGATGATGAGAGTGCGGTTTC CTT -3'、5'- GATTCTCCCGGGTCAGTGGTGGTGGT GGTGGT -3'，可產生出 1,458 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，60°C、30 秒，72°C、30 秒，35 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 5 μL 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(8) 偵測 *7sb* 基因片段：

核酸引子 *7sb*-3759bp、*rna23s*-3759bp 分別為 5'- TGGGAACTGT TTTCCTGGCATC -3'、5'- AACGCATTTCCGGGAGAACCC -3'，可產生出 3,759 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，56°C、30 秒，72°C、4 分鐘，35 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 10 μL 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(9) 偵測 *gy5* 基因片段：

核酸引子 25、26 分別為 5'- GAATTCATGGGGAAGC CCTTCTTCAC -3'、5'- CCCGG

GTTAGTG GTGG TGGTGGTGGT -3'，可產生出 1,686 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，63.2°C、30 秒，72°C、30 秒，35 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 5  $\mu$ L 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(10) 偵測 *gy5* 基因片段：

核酸引子 Gy5-3884bp、*rna23s*-3884bp 分別為 5'- GTTCAACGAG TGCCAACTCAAC -3'、5'- CCTAACCACTCA TCCGCT -3'，可產生出 3,884 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，59°C、30 秒，72°C、240 秒，35 個 cycle；72°C、10 分鐘，1 個 cycle。取 10  $\mu$ L 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(11) 偵測 *gy5* 基因片段：

核酸引子 Gy5-9v D、Gy5-9v R 分別為 5'- AATCCTTGTTCTCCCCCTTG -3'、5'- CTC TCTCTCTTCTTCCCTTTG -3'，可產生出 1,483 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、30 秒，56°C、15 秒，72°C、45 秒，50 個 cycle；72°C、1.5 分鐘，1 個 cycle。取 10  $\mu$ L 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(12) 偵測 *gy5* 基因片段：

核酸引子 Gy5-F-808、Gy5-R-808 分別為 5'- GCATTTCCGGGA TGTCCTGA -3'、5'- GTGGTTCTTGTTGTTCCGGGC -3'，可產生出 808 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘；95°C、20 秒，58°C、15 秒，72°C、45 秒，50 個 cycle；72°C、45 秒，1 個 cycle。取 10  $\mu$ L 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

(13) 偵測 *aada* 基因片段：

核酸引子 3P、3M 分別為 5'- AAAACCCGTCCTCAGTTCGGATTGC -3'、5'- CCGCG TTGTTTCATCAAGCCTTACG -3'，可產生出 1,688 bp 片段，反應的流程為 95°C、3 分鐘，1 個 cycle；95°C、20 秒，67°C、15 秒，72°C、51 秒，40 個 cycle；72°C、2 分鐘，1 個 cycle。取 10  $\mu$ L 終產物於 1% 之 agarose gel 上進行電泳分析。

#### 4. TA 選殖

甘藍之 *trnI* 與 *trnA* 基因片段以 PCR 增幅出之產物，參照 pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector System 說明書實驗流程並構築到質體 pGEM®-T，以進行後續之 DNA 定序與載體構築。

(1) pGEM-T-C,*trnI*

質體 pGEM®-T 連接上甘藍 *trnI* 基因片段 PCR 產物。

(2) pGEM-T-C,*trnA*

質體 pGEM®-T 連接上甘藍 *trnA* 基因片段 PCR 產物。

(3) pGEM-T-*Prrn+aada*

質體 pGEM®-T 連接上 *Prrn+aada* 基因片段 PCR 產物。

(4) pGEM-T-*PpsbA*+5'UTR

質體 pGEM®-T 連接上 *psbA* 啟動子片段 PCR 產物。

## (二)、*E. coli* 勝任細胞熱休克轉型

本試驗使用 ECOS™101 勝任細胞[DH5 $\alpha$ ] (Yeastern Biotech)進行熱休克轉型。依序將 2  $\mu$ L ligation mixture or 1  $\mu$ L plasmid DNA 加入 25  $\mu$ L 的勝任細胞中，vortex 1 秒混合。放置冰上 5 分鐘。42°C 熱休克 45 秒。放置冰上備用。取菌液加到含有抗生素的 LB plate，以三角玻棒將菌液塗均勻。放置 37°C 過夜。

## (三)、基因定序

將定序基因構築上 pGEMR-T 或 pGEMR-T Easy Vector 並轉型到大腸桿菌 DH5 $\alpha$  後取得有單一菌落的 plate。送給明欣生物科技有限公司進行基因定序。使用引子為 M13F(-21): 5'- TGTAACGACGGCCAGT -3'與 SP6:5'- TATTTAGGTGACACTATAG -3'。

## (四)、含有轉殖載體的大腸桿菌抗生素抗性試驗

將勝任細胞 C41、HB101、DH5 $\alpha$  和 BL21 或含有轉殖載體 pMT91t-*psbA-GUS*、pMT91t-*psbA-15vryp*、pMT91t-*psbA-gy5* 和 pMT91t-*psbA-7sb-7v* 的大腸桿菌 (DH5 $\alpha$  和 HB101)單一菌落接種於 5 mL 的 LB 液體培養基中加入抗生素 100 ppm Spectinomycin，置於 37°C 培養 12~16 小時。使用接種環沾取菌液塗在含有 100 ppm Spectinomycin 的 LB 菌盤上過夜培養。

## (五)、大腸桿菌可溶與不可溶蛋白萃取

含有葉綠體轉殖載體 pMT91t-*PpsbA*、pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v* 和 pMT91t-*PpsbA-15vryp* 的大腸桿菌 (Rosetta™)。單一菌落接種於 5 mL 的 TB 液體培養基 (添加 100 ppm Ampicillin 和 34 ppm Chloramphenicol) 37°C 隔夜後取 50  $\mu$ L 菌液轉養到 5 mL 的 TB 液體培養基 (添加 100 ppm Ampicillin 和 34 ppm Chloramphenicol) 37°C 培養 8 小時。菌液以 4°C 12,000 rpm 離心 20 分鐘去除上清，加入與菌液等體積的 buffer A (PBS buffer) 回溶懸浮 pellet，以超音波破菌 (打 2 秒停 10 秒共 20 分鐘)直到液體澄清。破菌粗萃蛋白液以 4°C 12,000 rpm 離心 20 分鐘取上清液為可溶性蛋白 (Soluble part)。加入等體積 buffer B (2M urea) 回溶懸浮洗滌 pellet 以 4°C 12,000 rpm 離心 20 分鐘去除上清液。加入少量 buffer C (6M urea) 回溶懸浮 pellet 此為不可溶的部分 (insoluble part)，4°C 搖晃隔夜。可溶與不可溶蛋白放置 -20°C 保存。

## (六)、Bradford 法測定蛋白濃度

標準曲線繪製，首先將 BSA (Bovine serum albumin) 配製不同濃度 (0、25、15、10、5、2.5、1  $\mu$ g/mL)。取 800  $\mu$ L 不同濃度之 BSA 再加入 200  $\mu$ L Bradford dye 混合，室溫靜置 5 分鐘後測下的吸光值。

將含有葉綠體轉殖載體 pMT91t-*PpsbA*、pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v* 和 pMT91t-*PpsbA-15vryp* 的大腸桿菌 (Rosetta™) 的可溶蛋白稀釋 80~160 倍或不可溶蛋白稀釋 30 倍並以 Bradford 法測濃度。Blank (空白組) 為萃取用的 buffer 混合 Bradford dye。

## (七)、SDS-PAGE 蛋白電泳分析大腸桿菌

配製 SDS-PAGE gel 鑄膠器與電泳槽體是使用 Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad)，

首先組裝製膠容器，組裝完成後以水測漏後，加入 Resolving Gel 溶液，再加入 ddH<sub>2</sub>O 壓平靜置 1 小時，確定凝固後，倒掉 ddH<sub>2</sub>O 再以濾紙吸乾殘水。加入 Stacking gel 溶液並插入齒梳，靜置半小時，移除齒梳。備製完成的 SDS-PAGE gel 放入電泳槽並加入 running buffer。將含有葉綠體轉殖載體 pMT91t-*PpsbA*、pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v* 和 pMT91t-*PpsbA-15vvyp* 的大腸桿菌 (Rosetta™) 萃取的可溶與不可溶蛋白以 Bradford 法定量後，加入適量 4 倍 sample loading buffer 混合放入沸水中 10~15 分鐘。取 20 μL 樣品進行 SDS-PAGE 電泳，電壓設定為 70V 25 分鐘接著 140V 1 小時 40 分鐘。完成電泳後小心取出膠片用 coomassie brilliant blue 染劑染色至少 30 分鐘後用 Methanol: acetic acid solution 退染。

(八)、點漬法 (spot-blot) 偵測含有轉殖載體的大腸桿菌之目標基因表現情形

備製 PVDF 膜，首先將其浸泡 Methanol 15 秒，取出泡水 2 分鐘，取出浸泡 TOWBIN buffer 備用。接下來在桌面放一張紙中上面依序放上一張乾的濾紙 (WhatmanR 3MM)、一張潤濕的濾紙 (泡過 TOWBIN buffer) 最後放上 PVDF 膜 (必須與下面的濾紙貼合)。將含有葉綠體轉殖載體 pMT91t-*PpsbA*、pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v* 和 pMT91t-*PpsbA-15vvyp* 的大腸桿菌 (Rosetta™) 萃取的可溶與不可溶蛋白以 Bradford 法定量後。將各蛋白濃度稀釋到接近 (不可溶蛋白樣本在 0.3 μg/μL 以下，可溶蛋白在 0.5 μg/μL)。取 5 μL 之可溶與不可溶蛋白溶液滴在 PVDF 膜上。等待樣本被吸收後將膜放在一張乾的濾紙上吸乾。將此膜加入 blocking buffer 室溫搖晃 1 小時。倒掉 blocking buffer。加入 10 mL blocking buffer 與 5 μL 一級抗體 (2,000 倍稀釋 Anti-His tag (Novagen70796)) 放置 4°C 搖晃隔夜。TTBS 洗滌 3 次每次 10 分鐘。加入 10 mL blocking buffer 與 0.25 μL 二級抗體 (40000 倍稀釋 Goat anti-Mouse IgG (H+L), HRP (Merck ap124) 未加甘油)。TTBS 洗滌 3 次每次 10 分鐘。將膜加入 ECL 溶液 (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate P36599) 放置室溫 5 分鐘，去除溶液。以冷螢光數位影像分析儀 (Kodak GEL LOGIC 1500 SYSTEM) 偵測螢光。

## 結 果

### 一、甘藍葉綠體轉殖載體構築與分析

#### (一)、植物總 DNA 萃取

為確認植物總 DNA 之萃取是否成功，將萃取自'初秋'甘藍葉片之總 DNA 原液以電泳膠片進行分析 (圖 1A)，結果顯示成功萃取獲得'初秋'甘藍 DNA。

(二)、甘藍 *trnI/trnA*、*Prrm+aada*、甘藍 *psbA* 啟動子、改造之大豆 *Gy5-9V*、改造之大豆 *7sβ-7V* 及 15 套 VVYP 胜肽等基因之選殖、分析及確認

#### 1. 選殖'初秋'甘藍 *trnI/trnA* 基因片段及分析

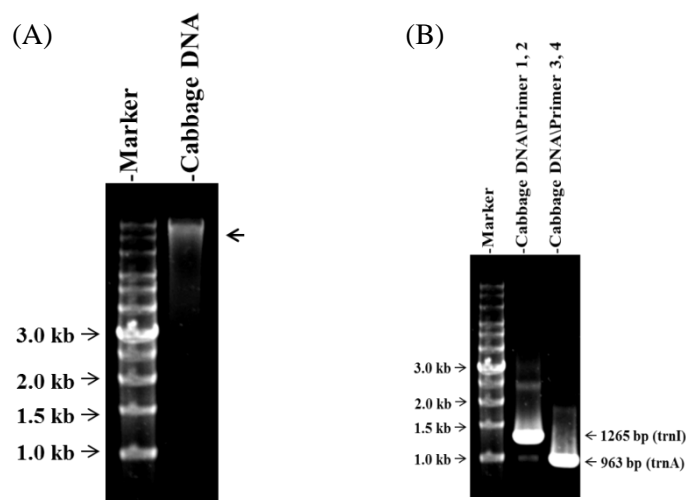


圖 1. 萃取'初秋'甘藍 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)葉片的基因組 DNA (A)及使用核酸引子 1/2 與引子 3/4 進行聚合酵素鍊鎖反應，增幅 *trnI* (1,265 bp)及 *trnA* (963 bp)基因序列片段 (B)，以電泳膠片分析的情形。

Fig. 1. Gel electrophoresis analysis of genomic DNA extracted from 'KY-Cross' cabbage leaves (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) (A), and PCR products of *trnI* (1,265 bp) and *trnA* (963 bp) genes amplified from cabbage DNA using primer 1/2 and primer 3/4, respectively (B).

以'初秋'甘藍基因組 DNA 為範本，使用核酸引子 1/2、3/4 進行聚合酶連鎖反應增幅之產物，以電泳膠片分析 *trnI* 1,265 bp 和 *trnA* 963 bp 基因序列片段。試驗結果顯示各個基因都有正確片段大小(圖 1B)。

將 pGEM-T 載體分別接上 PCR 產物 *trnI* 1,265 bp 和 *trnA* 963 bp 基因序列片段，以限制酵素 *PstI* 與 *ApaI* 切割，以電泳膠片分析。pGEM-T-C, *trnI* 以限制酵素 *PstI* 及 *ApaI* 切割產生 3,000 bp, 903 bp, 362 bp。pGEM-T-C, *trnA* 以限制酵素 *PstI* 及 *ApaI* 切割產生 963 bp。試驗結果顯示 *trnI* 和 *trnA* 的 PCR 產物已成功接上 pGEM-T 載體。

將載體 pGEM-T C, *trnI* 和 pGEM-T-C, *trnA*、交由明欣生技公司進行甘藍 *trnI/trnA* 基因片段之核酸序列定序，選殖之'初秋'甘藍的葉綠體 *trnI* 及 *trnA* 基因之核酸序列。選殖之'初秋'甘藍的葉綠體 *trnI* 及 *trnA* 基因與已發表之'C1176'甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata* cultivar C1176, GenBank: KR233156.1)葉綠體基因組核酸序列，以軟體 vector NTI AlignX 進行序列比對，分析結果顯示核酸序列的一致性 (identity positions)分別為 98.5%與 99.9%。

## 2. *Prrn+aada* 基因片段之增幅

以質體 pKM-*aada* 為範本使用核酸引子 12、13 進行 PCR 反應，增幅之產物以電泳膠片分析可獲得 *Prrn+aada* 基因片段 952 bp。

### 3. 甘藍 *psbA* 啟動子片段之選殖及分析

以'初秋'甘藍基因組 DNA 為範本使用核酸引子 14、15 進行 PCR 反應增幅之產物，以電泳膠片分析可獲得 *psbA* 啟動子片段 209 bp。將載體 pGEM-T-*PpsbA*+5'UTR 交由明欣生技公司進行 *psbA* 啟動子片段之核酸序列定序。選殖之'初秋'甘藍的葉綠體 *PpsbA*+5'UTR 啟動子 DNA 片段與已發表之'C1176'甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata* cultivar C1176, GenBank: KR233156.1) 葉綠體基因組核酸序列比對結果顯示核酸序列的一致性 (identity positions) 為 100%。

### 4. 改造之大豆 *Gy5-9V* (p*Gy5-v23-4*) 基因之確認

將載體 pMT91t-*psbA-gy5* 交由明欣生技公司進行 Glycinin 改造蛋白基因定序。將大豆 *Gy5-9V* (p*Gy5-v23-4*) 基因定序結果改造與已發表之大豆 *Gy5* 基因 (GenBank: NM\_001249747.3) 的核酸序列比對結果顯示核酸序列的一致性 (identity positions) 為 91.0%。改造之大豆 *Gy5-9V* (p*Gy5-v23-4*) 基因與已發表之大豆 *Gy5* 基因 (GenBank: NM\_001249747.3) 的轉譯胺基酸序列比對結果顯示胺基酸序列的一致性 (identity positions) 為 90.0%。轉譯胺基酸序列分析也確認存在 9 個 VVYP 及位置。

### 5. 改造之大豆 *7sβ-7V* (p*Sbsnp-v5*) 基因之確認

將載體 pMT91t-*psbA-7sb* 交由明欣生技公司進行  $\beta$ -conglycinin 改造蛋白基因定序。將改造之大豆 *7sβ-7V* (p*Sbsnp-v5*) 基因與已發表之大豆 *7sβ* 基因 (GenBank: NM\_001249943.2) 的核酸序列比對結果顯示核酸序列的一致性 (identity positions) 為 90.1%。改造之大豆 *7sβ-7V* (p*Sbsnp-v5*) 基因與已發表之大豆 *7sβ* 基因 (GenBank: NM\_001249943.2) 的轉譯胺基酸序列比對結果顯示胺基酸序列的一致性 (identity positions) 為 89.5%。轉譯胺基酸序列分析同時確認存在 7 個 VVYP 及位置。

### 6. 15 套 VVYP 胜肽之備製

15 套 VVYP 胜肽之核酸序列是委託生工有限公司 (MDBio, Inc. Taiwan) 進行全基因合成。15 套 VVYP 基因之核酸及轉譯胺基酸序列，其上並設計有 trypsin 及 carboxylpeptidase B 等蛋白酵素作用之位置、*EcoRI* 及 *SmaI* 限制酵素切接位置、His tag。

#### (三)、甘藍葉綠體轉殖載體構築及確認

pMT91t-*PpsbA* 葉綠體轉殖中間載體之構築流程如圖 2 所示。pMT91t-*psbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v* 與 pMT91t-*psbA-15vvyp* 葉綠體轉殖載體之構築流程如圖 4 所示。

#### 1. pMT91t

將質體 pKM-*aada* 與 pGEM-T-C,*trnI* 以限制酵素 *SalI* 和 *EcoRV* 進行切割後將 *trnI* 基因片段構築至 pKM-*aada* 載體上，獲得之中間載體以及 pGEM-T-C,*trnA*，再以限制酵素 *PstI* 和 *SacII* 進行切割後將 *trnA* 基因片段構築至中間載體，進而獲得質體 pMT91t0 (圖 2)。再將 pMT91t0 質體與 pGEM-T-*Prrn+aada* 以限制酵素 *XbaI* 和 *EcoRV* 進行切割後將 *Prrn+aada* 基因片段構築至 pMT91t0 質體上以獲得新增切位之 pMT91t 以利進行後續實驗 (圖 2)。



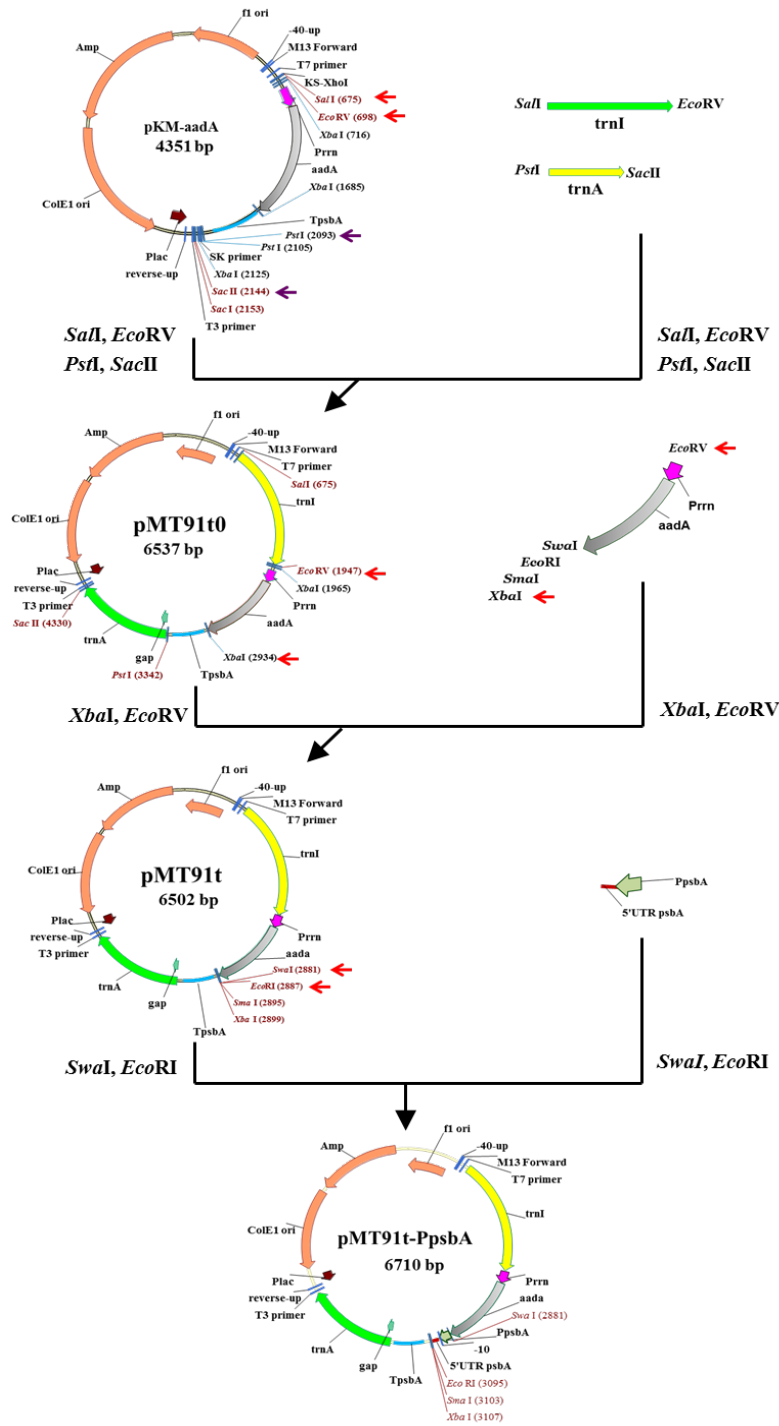


圖 2. pMT91t-PpsbA 葉綠體轉殖中間載體之構築流程圖。

Fig. 2. Construction scheme of intermediate vector of chloroplast transformation pMT91t-PpsbA.

將質體 pMT91t0 以限制酵素 *SaII* 和 *EcoRV* 進行切割後可獲得 5,265 bp、1,265 bp 片段，以限制酵素 *PstI* 和 *SacII* 進行切割後可獲得 5,567 bp、963 bp 片段 (圖 3A)，證實 *trnI* 與 *trnA* 基因片段已構築成功到載體。再將 pMT91t 質體以限制酵素 *EcoRI* 和 *EcoRV* 進行切割後可獲得 5,562 bp、940 bp 片段 (圖 3)，證實 *Prrn+aada* 基因片段已構築至 pMT91t 質體上以並獲得新增切位。

## 2. pMT91t-PpsbA

將質體 pMT91t 與 pGEM-T-PpsbA+5'UTR 以限制酵素 *SwaI* 和 *EcoRI* 進行切割後將 *psbA* 啟動子片段構築至 pMT91t 載體上，獲得質體 pMT91t-PpsbA (圖 2)。將質體 pMT91t-PpsbA 以限制酵素 *SwaI* 和 *EcoRI* 進行切割後後可獲得 6,496 bp、214 bp 片段 (圖 3C)，證實 *psbA* 啟動子已成功構築到載體。

## 3. pMT91t-psbA-gy5

將質體 pMT91t-PpsbA 與 *Gy5-9v* 基因片段之 PCR 產物以限制酵素 *SmaI* 和 *EcoRI* 進行切割後將 *Gy5* 基因片段構築至 pMT91t-PpsbA 載體上，獲得質體 pMT91t-psbA-gy5 (圖 4)。將質體 pMT91t-psbA-gy5 以限制酵素 *SmaI* 和 *EcoRI* 進行切割後後可獲得 67,026 bp、1,694 bp 片段 (圖 5A)，證實 *Gy5-9v* 基因片段已成功構築到載體。

## 4. pMT91t-psbA-7sb

將質體 pMT91t-PpsbA 與 *7sb-7v* 基因片段 PCR 產物以限制酵素 *SmaI* 和 *EcoRI* 進行切割後將 *7sb-7v* 基因片段構築至 pMT91t-PpsbA 載體上，獲得質體 pMT91t-psbA-7sb-7v (圖 4)。將質體 pMT91t-PpsbA-7sb-7v 以限制酵素 *XbaI* 進行切割後可獲得 7,243 bp、925 bp 片段 (圖 5B)。證實 *7sb* 基因片段已成功構築到載體。

## 5. pMT91t-psbA-15vryp

將質體 pMT91t-PpsbA 與 15 套 VVYP 胜肽 15vryp 基因片段之 PCR 產物以限制酵素 *SmaI* 和 *EcoRI* 進行切割後將 15vryp 基因片段構築至 pMT91t-PpsbA 載體上，獲得質體 pMT91t-psbA-15vryp (圖 4)。將質體 pMT91t-psbA-15vryp 以限制酵素 *SmaI* 和 *EcoRI* 進行切割後後可獲得 6,702 bp、260 bp 片段 (圖 5C)。證實 15 套 VVYP 胜肽(15vryp)基因片段已成功構築到載體。

### (四)、含甘藍葉綠體轉殖載體的大腸桿菌之抗生素抗性及表現蛋白分析

大腸桿菌攜帶或不攜帶轉殖載體 pMT91t-psbA-gy5-9v、pMT91t-psbA-7sb-7v、pMT91t-psbA-15vryp 或 pMT91t-psbA-GUS 等質體，培養於含有或無 100 ppm Spectinomycin 之 LB 培養基。試驗結果顯示只有攜帶葉綠體轉殖載體的大腸桿菌，能正常生長 (圖 6A)，但攜帶有載體 pMT91t-psbA-7sb-7v 的大腸桿菌生長緩慢菌落數也較少；不攜帶葉綠體轉殖載體的大腸桿菌則無法生長 (圖 6B)，無轉殖載體的大腸桿菌培養於無 Spectinomycin 之 LB 培養基則生長良好 (圖 6C)。試驗結果顯示 *aada* 篩選基因有正常表現。

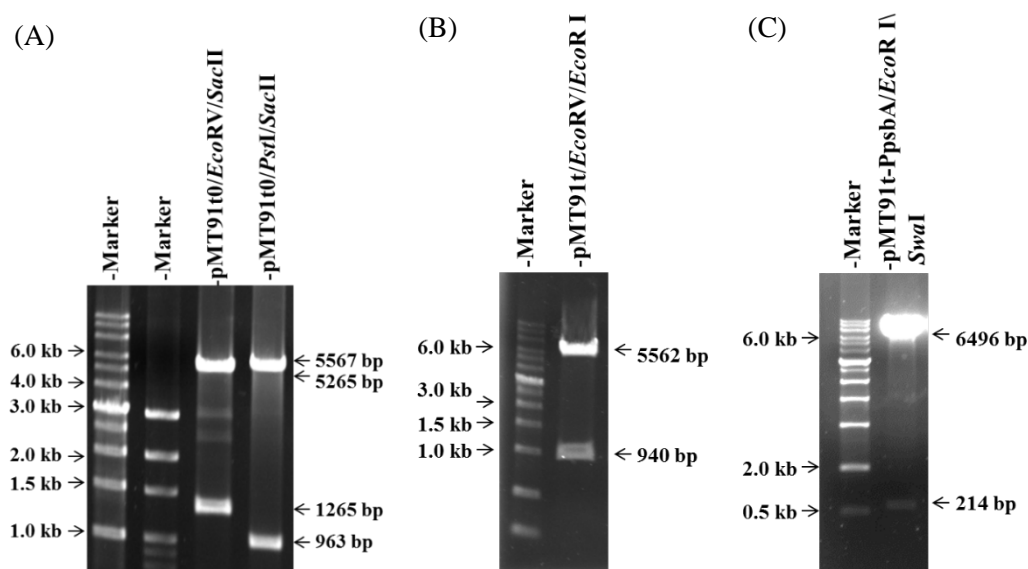


圖 3. pMT91t0 (A)、pMT91t (B)及 pMT91t-PpsbA (C)葉綠體轉殖載體之 DNA 分別以限制酵素 *EcoRV/SaI* 與 *PstI/SacII* (A)、*EcoRV/EcoRI* (B)及 *EcoRI/SwaI* (C)切割後，以電泳膠片分析載體之正確性。

Fig. 3. Identification of pMT91t0 (A), pMT91t (B) and pMT91t-PpsbA (C) vectors by *EcoRV/SacII*, *PstI/SacII* (A), *EcoRV/EcoRI* (B), and *EcoRI/SwaI* (C) restriction endonuclease digestion.

轉殖載體 pMT91t-*psbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v*、pMT91t-*psbA-15vryp* 上的目標基因都是用 *psbA* 啟動子控制表現。萃取攜帶有這些轉殖載體的大腸桿菌之可溶和不可溶蛋白並定量，在 SDS-PAGE 電泳分離後以 coomassie brilliant blue 染色結果與對照組相比並無明顯差異 (圖 7)。但攜帶有 pMT91t-*psbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v* 和 pMT91t-*psbA-15vryp* 載體載體之大腸桿菌，其蛋白經斑點轉漬 (spot blot) 後與 Anti-His Tag 抗體進行雜交反應之螢光分析結果顯示，與 Glycinin 改造蛋白 C 端的 his-taq 有雜交反應，以在不可溶蛋白的部分較強，但可溶蛋白形的部分亦有低量的雜交反應 (圖 8)。偵測到 his-taq 的雜交反應，間接證實目標基因蛋白 (15 套 vryp 胜肽、Gy5-9v 和 7sb-7v 基因) 連結於 *psbA* 啟動子之下游能正常表現蛋白於大腸桿菌中。

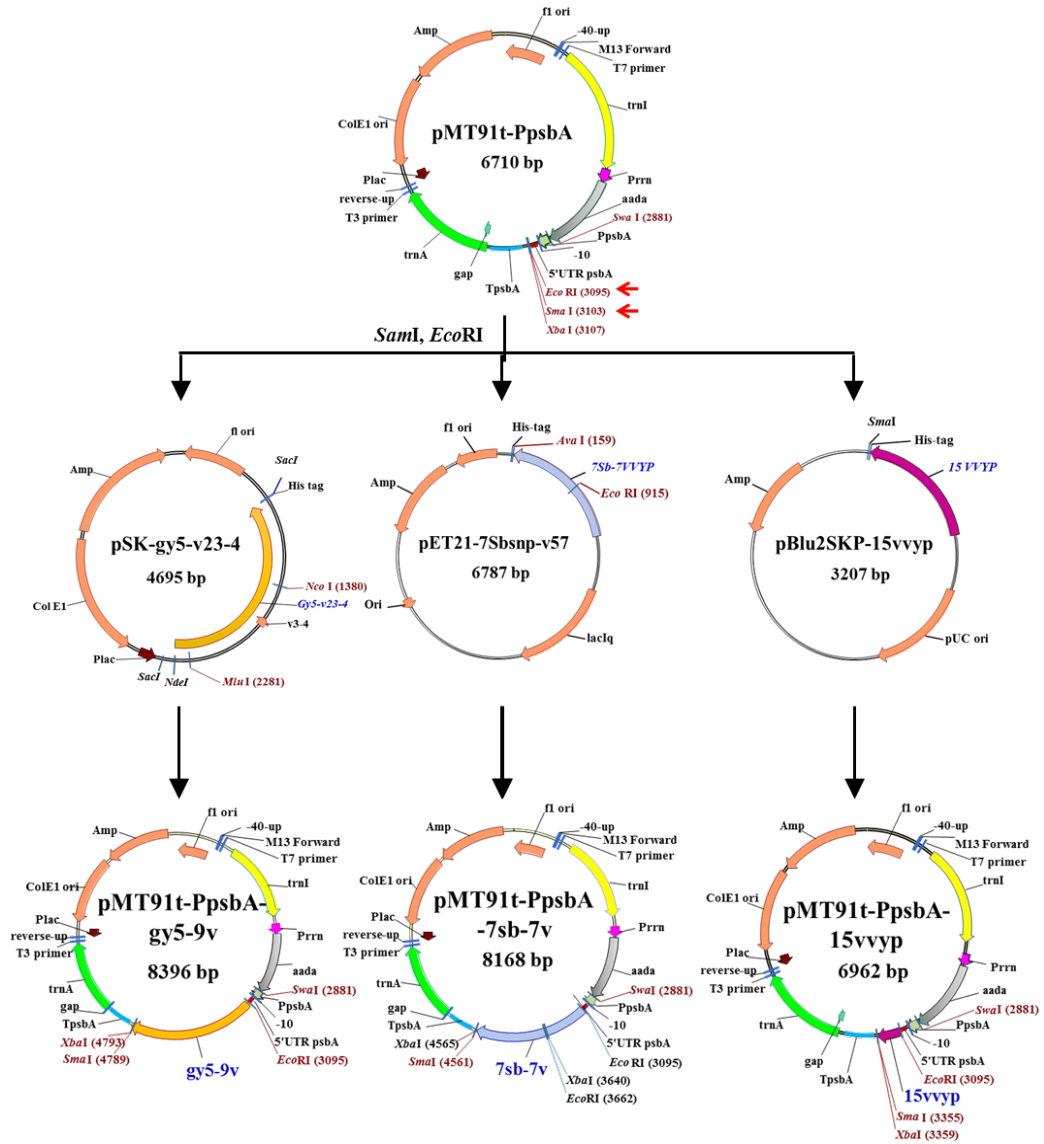


圖 4. pMT91t-*psbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v* 與 pMT91t-*psbA-15vvyp* 葉綠體轉殖載體之構築流程圖。

Fig. 4. Construction scheme of chloroplast transformation vector of pMT91t-*psbA-gy5-9v*, pMT91t-*psbA-7sb-7v*, and pMT91t-*psbA-15vvyp*.

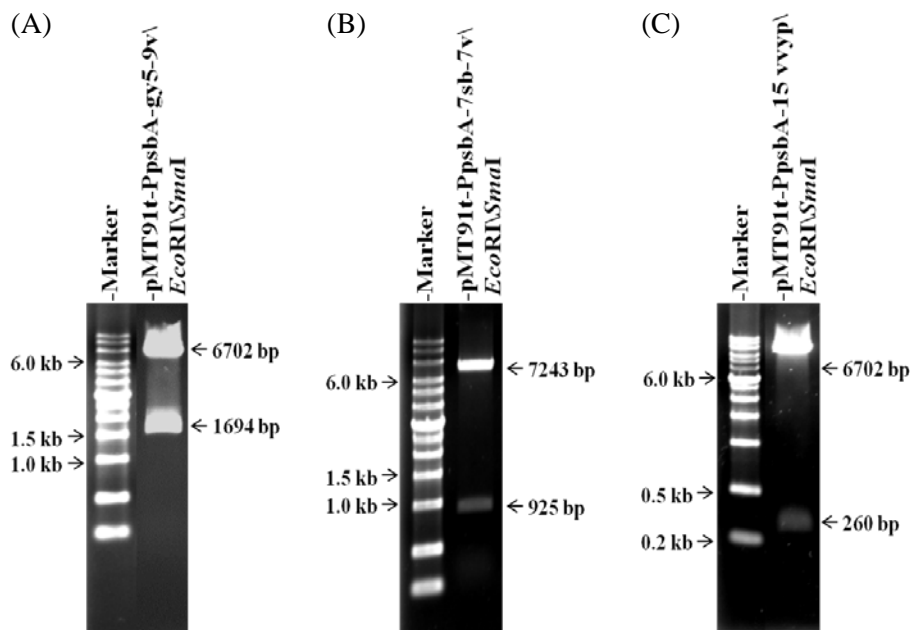


圖 5. pMT91t-*psbA-gy5-9v* (A)、pMT91t-*psbA-7sb-7v* (B)與 pMT91t-*psbA-15vvyp* (C)綠體轉殖載體之 DNA 以限制酵素 *EcoRI/SmaI* 切割後，以電泳膠片分析載體之正確性。

Fig. 5. Identification of pMT91t-*psbA-gy5-9v* (A), pMT91t-*psbA-7sb-7v* (B), and pMT91t-*psbA-15vvyp* (C)chloroplast transformation vectors by *EcoRI/SmaI* restriction endonuclease digestion.

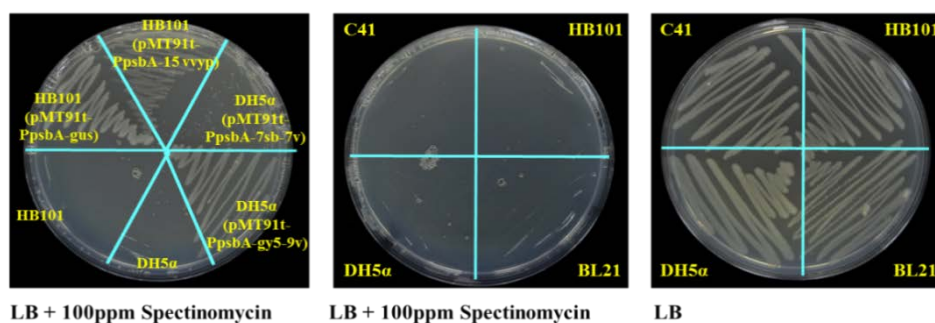


圖 6. 攜帶 pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*、pMT91t-*psbA-7sb-7v*、pMT91t-*PpsbA-15 vvyp* 及 pMT91t-*PpsbA-GUS* 等質體 (A)或不攜帶質體 (B、C)之大腸桿菌株 (*E. coli* DH5α、HB101、C41、BL21)培養於 LB 培養基，在含 100 ppm Spectinomycin (A、B)，或未含抗生素 (C)之生長情形。

Fig. 6. The growth of *E. coli* (DH5α, HB101、C41、BL21)harboring the pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*, pMT91t-*psbA-7sb-7v*, pMT91t-*PpsbA-15 vvyp*, and pMT91t-*PpsbA-GUS* plasmids (A) or without plasmid (B) cultivated in the LB medium containing 100 ppm Spectinomycin (A, B), or without antibiotics (C).

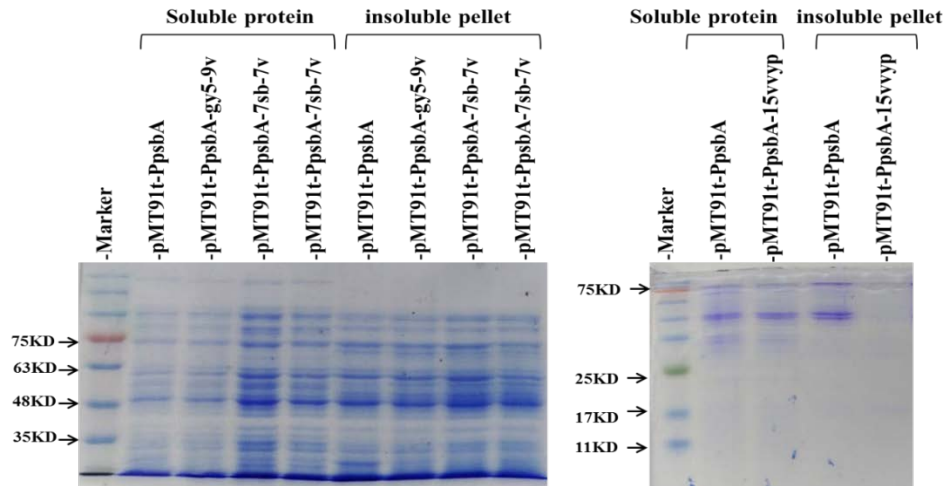


圖 7. 萃取大腸桿菌 *E. coli*/Rosetta™/pMT91t-*PpsbA*、/pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*、/pMT91t-*PpsbA-7sb-7v* 與 pMT91t-*PpsbA-15vvyp* 等菌株之可溶性蛋白及不可溶沉澱蛋白，經 SDS-PAGE 電泳膠片分離之情形。

Fig. 7. SDS-PAGE analysis of soluble protein and insoluble pellet extracted from *E. coli*/Rosetta™/pMT91t-*PpsbA*, /pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*, /pMT91t-*PpsbA-7sb-7v*, and /pMT91t-*PpsbA-15vvyp* strains.

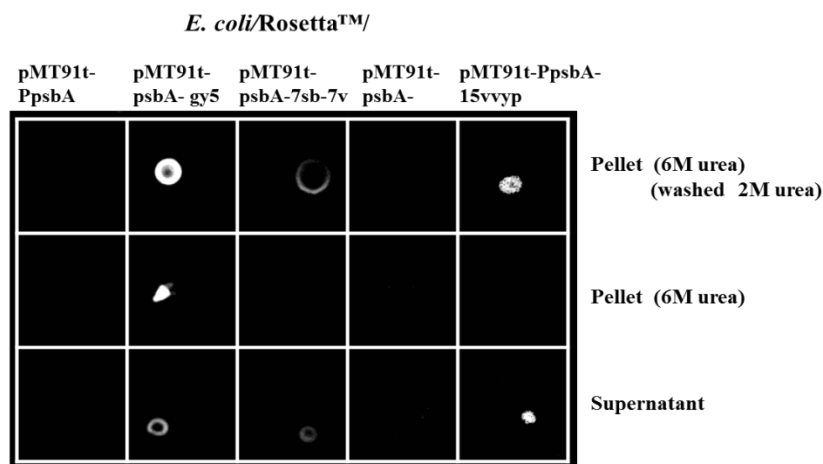


圖 8. 萃取大腸桿菌 *E. coli*/Rosetta™/pMT91t-*PpsbA*、/pMT91t-*PpsbA-gy5-9v*、/pMT91t-*PpsbA-7sb-7v* 與 pMT91t-*PpsbA-15vvyp* 等菌株之上層液可溶性蛋白及不可溶沉澱蛋白，經斑點轉漬 (spot blot) 後與 Anti-His Tag Antibody 進行雜交反應之情形。一級抗體 2000 倍稀釋：Anti-His tag (Novagen 70796)。二級抗體 2,000 倍稀釋：Goat anti-Mouse IgG (H+L)，HRP (Invitrogen 31430)。

Fig. 8. Spot blot hybridization of supernatant soluble protein and insoluble pellet extracted from *E. coli*/Rosetta™/pMT91t-PpsbA, /pMT91t-PpsbA-gy5-9v, /pMT91t-PpsbA-7sb-7v, and /pMT91t-PpsbA-15vvyp strains. Primary antibody Anti-His tag (Novagen 70796)1:2000 dilution. Secondary antibody Goat anti-Mouse IgG (H+L). HRP (Invitrogen 31430) 1:2,000 dilution.

## 討 論

### 一、甘藍葉綠體轉殖載體構築與分析

甘藍葉綠體轉殖載體，pMT91t-*psbA*-7sb-7v 和 pMT91t-*psbA*-15vvyp 載體於構築時，放置菌盤 37°C 培養所獲得單一菌落，經過 PCR 分析顯示大多是錯誤的，有質體重組的現象。在 Thermo Fisher's 和 New England Biolabs 公司的網站上所提供的 Cloning Troubleshooting Guide 有提到載體構築的目標基因如果有毒性或有重覆序列會導致獲得錯誤的質體，並建議用室溫培養菌落或更換菌系來解決此問題。推測可能是表現 7sb-7v 基因 ( $\beta$ -conglycinin 之  $\beta$ -subunit 基因)對大腸桿菌有毒性或是帶有 vvyp 高度重覆序列所導致。之後嘗試使用 HB101 菌系並將菌盤將放置室溫培養才獲得正確帶有 7sb 和 15vvyp 基因的葉綠體轉殖載體。但後續繼代培養發現攜帶有 pMT91t-*psbA*-7sb-7v 和 pMT91t-*psbA*-15vvyp 轉殖載體的大腸桿菌生長較攜帶有 pMT91t-*psbA*-gy5-9v 的緩慢。特別是 pMT91t-*psbA*-7sb-7v 需要放置室溫培養才能比較正常的生長，再次顯示表現 7sb-7v 基因對大腸桿菌生長有一定的影響。近年來研究人員發現 Glycinin 和  $\beta$ -conglycinin 有抗菌活性，且與抗生素青黴素 (penicillin) 相比較有接近或更高的抗菌效果 (Sitohy *et al.*, 2012)。推測此抗菌活性可能影響大腸桿菌生長。轉型 pMT91t-*psbA*-15vvyp 轉殖載體時，大腸桿菌如果使用菌系 DH5 $\alpha$  有發生過 15 套的 vvyp 序列缺失幾套的現象，推測也是高度重複序列所導致。

### 二、含甘藍葉綠體轉殖載體的大腸桿菌之抗生素抗性分析及表現蛋白分析

大腸桿菌帶有轉殖載體 pMT91t-*psbA*-gy5-9v、pMT91t-*psbA*-7sb-7v、pMT91t-*psbA*-15vvyp 或 pMT91t-*psbA*-GUS 都帶有 *aada* 篩選基因，且上游連接 *Prrn* 啟動子。因為葉綠體和大腸桿菌都是原核生物表現系統，藉由觀察大腸桿菌中轉殖載體篩選基因表現情況可以間接確認此篩選基因是否能在葉綠體正常表現。以 100 ppm Spectinomycin 處理攜帶有葉綠體轉殖載體大腸桿菌之結果證實 *aada* 篩選基因有正常表現 (圖 6)。但攜帶有載體 pMT91t-*psbA*-7sb-7v 的大腸桿菌生長緩慢菌落數也較少 (圖 6A)，可能原因是 7sb-7v 基因對大腸桿菌生長有一定的影響。

轉殖載體 pMT91t-*psbA*-gy5-9v、pMT91t-*psbA*-7sb-7v、pMT91t-*psbA*-15vvyp 上的目標基因都是用 *psbA* 啟動子控制表現。萃取帶有這些轉殖載體的大腸桿菌之可溶和不可溶蛋白並以 SDS-PAGE 分析結果與對照組相比並無明顯差異 (圖 7)，可能的原因是目標基因

蛋白表現量不夠多，*psbA* 啟動子上的 5'UTR 有多個 RBS (ribosome-binding site) 可供葉綠體表現系統辨識，但在大腸桿菌表現系統上則是研究不多的。且 5'UTR 上存在起始密碼子 (start codon: AUG) 在大腸桿菌表現系統上因缺乏葉綠體所表現的蛋白，可能導致 mRNA 構型不同導致提早轉譯。斑點轉漬 (spot blot) 分析帶有 pMT91t-*psbA*-*gy5-9v* 載體大腸桿菌表現之蛋白 *gy5-9v* 大多是在不可溶蛋白的形式產生與前人研究相似 (馮等人, 2008)。pMT91t-*psbA*-*7sb-7v* 載體大腸桿菌在可溶和不可溶蛋白只偵測到微弱表現量，推測原因是表現 *7sb-7v* 蛋白的大腸桿菌生長遲緩導致。

### 參 考 文 獻

- Kagawa, K., H. Matsutaka, C. Fukuhama, Y. Watanabe, and H. Fujino. 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 (20): 1745-1755.
- Liu, C. W., C. C. Lin, J. J. W. Chen, and M. J. Tseng. 2007. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 26 (10): 1733-1744.
- Liu, C. W., C. C. Lin, J. C. Yiu, J. J. W. Chen, and M. J. Tseng. 2008. Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin (*cry1Ab*) gene in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) chloroplasts confers high insecticidal efficacy against *Plutella xylostella*. *Theor. Appl. Genet.* 117 (1): 75-88.
- Sitohy, M. Z., S. A. Mahgoub, and A. O. Osman. 2012. *In vitro* and *in situ* antimicrobial action and mechanism of glycinin and its basic subunit. *Int. J. Food Microbiol.* 154 (1-2): 19-29.



## Construction of Cabbage Chloroplast Transformation Vectors Containing Multiset VVYP (Val-Val-Tyr-Pro) Gene

Cheng-Tai Fu<sup>1)</sup> I-Chun Pan<sup>2)</sup> Menq-Jiau Tseng<sup>3)</sup>

Key words: Cabbage, Chloroplast transformation, VVYP peptide

### Summary

VVYP peptide (Val-Val-Tyr-Pro) enhances the activity of triglyceride hydrolyzing enzymes in the liver and inhibits the absorption of fat by the digestive tract, so it can quickly reduce blood lipid. Plant chloroplast gene transfer has the following advantages: 1. chloroplast transgenic gene expression is higher than nuclear transfection, 2. chloroplast genome for maternal inheritance without gene drift, 3. there are no reports of gene silencing and insertion position effects problem. In this study, cabbage chloroplast transformation vectors containing multiset VVYP (Val-Val-Tyr-Pro) gene (*Gy5-9VVYP*, *7sb-7VVYP* and *15VVYP*) were constructed.

- 
- 1) Student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

