

## 含降血脂機能性胜肽 VVYP 基因轉殖至水稻 葉綠體之研究

李家宇<sup>1)</sup> 傳承泰<sup>2)</sup> 潘怡君<sup>3)</sup>  
尤進欽<sup>4)</sup> 曾夢蛟<sup>5)</sup>

關鍵字：水稻、葉綠體基因轉移、VVYP 胜肽、降血脂

**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具有：增加轉殖基因大量表現，不會造成基因污染、基因靜寂及插入位置效應，與較細胞核基因轉移穩定等優點；因此開發葉綠體基因轉殖技術為近代生物技術的主力研發工作。本研究計畫以 *daao* 及 *aadA* 基因作為篩選標誌基因，轉移經改造過含多套組 VVYP 之大豆儲藏性蛋白基因 (*Gy5-9VVYP*、*7Sb-7VVYP*、*15VVYP*) 至水稻葉綠體中。

本研究之目的為探討利用水稻葉綠體為非耐抗生素篩選標誌基因的生物反應器，大量生產降血脂機能性胜肽 VVYP 的可行性，以提高水稻之保健功效及附加經濟價值。本研究已完成構築攜帶有多套 VVYP 胜肽為目標基因 (*Gy5-9VVYP*、*7Sb-7VVYP*、*15VVYP*)，*daao/aadA* 為篩選標誌基因之水稻葉綠體轉殖載體，並以基因槍法將所構築之基因轉殖到水稻葉綠體葉片。以 D-alanine 或 spectinomycin 篩選轉殖培植體並誘導再生成水稻植株。轉殖再生植株 T0 及 T1 葉片之 PCR 及 RT-PCR 分析之結果顯示，轉殖之改造 VVYP 基因已存在於轉殖及之葉綠體基因組，並表現其 mRNA。

- 
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
  - 2) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
  - 3) 國立中興大學園藝學系助理教授。
  - 4) 國立宜蘭大學園藝學系教授。
  - 5) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

## 前 言

稻米為台灣重要農作物，是臺灣栽培面積最廣的農作物（行政院農業委員會，2014）。而國人的飲食習慣在近年來來有極大的變化，米飯的食用量減少，其原因包括消費者認為吃飯容易發胖、飲食選擇多樣性等等因素，使得臺灣稻米需求量逐年下降。並且臺灣農民皆為小地耕種，生產成本高，又因為加入世界貿易組織，市場開放，水稻的經濟價值面臨重大的壓力，使得近年耕地面積逐漸降低，而近幾年政府意識到糧食安全的問題，「推動在地消費，提振國產米食」措施，自 100 年起開始推動實施，促使臺灣稻米種植面積逐漸回升。除此之外賦予水稻新的附加價值，利用水稻當作生物反應器來生產高經濟價值生產工業、食品、飼料及醫藥方面的產品，成為另一個提升水稻價值之有效途徑。

近年來，由於國人在日常飲食中攝取了過高的油脂，導致高血脂症 (hyperlipidemia)患者不斷增加，如何有效控制血液中脂類濃度以維護身體健康，是現代人所需面對的問題。Kagawa *et al.* (1996)發現球蛋白 (globin) 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) 可以抑制小腸對三酸甘油酯的吸收，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。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。

由於，內生性大豆蛋白所含之有活性的多胜肽的套數很低、腸胃道的消化酵素很難準確的切出有活性的多胜肽。中興大學的「開發基因轉殖大豆做為生物反應器」研究團隊，曾經將大豆儲藏性蛋白 (glycinin 和  $\beta$ -conglycinin) 基因改造設計多個 VVYP 套組，並將前後胺基酸殘基之序列做適當之設計，使方便消化道蛋白酶之剪切 (許等，2013)。如此，經攝食此基因改造大豆後，即能獲得足量的 VVYP，對抑制腸道脂肪吸收將可發揮較大的效果。

植物葉綠體基因轉殖具有：增加轉殖基因大量表現，母系遺傳不會造成基因污染、不會有基因靜寂，且較細胞核基因轉移穩定等優點。因此開發葉綠體基因轉殖技術為近代生物技術的主力研發工作。我們實驗室以 *gus* 報導基因建立了甘藍 (Liu *et al.*, 2007) 及水稻 (Liu and Tseng, 2005) 的葉綠體基因轉殖系統。我們將 *bt* 抗蟲蛋白基因 *cry1Ab* 導入甘藍葉綠體中，*bt* 蛋白在甘藍葉片的表現可達 11.1% 的總可溶性蛋白，遠高於核基因轉殖的 0.8%，大幅度提升甘藍對於小菜蛾的抗性 (Liu *et al.*, 2008)。

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，以 D 型胺基酸氧化酵素 (*daao*) 基因作為篩選標誌基因，將此改造過含多套組 VVYP 之大豆儲藏性蛋白 (glycinin 和  $\beta$ -conglycinin) 基因及僅含 15 套組 VVYP (包括消化道蛋白酶切位) 胜肽的基因，轉移至水稻葉綠體中。本研究之目的為探討利用水稻葉綠體為非耐抗生素篩選標誌基因的生物反應器，大量生產降血脂機能性胜肽 VVYP 的可行性，以提高水稻之經濟效益，增進國人建康福祉。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

#### (一)、基因轉殖植物材料

本實驗以水稻 (*Oryza sativa* L. sub. Japonica)'台農 67 號'(TN67)品種為基因轉殖的材料。將稻穀除去外殼後，以 75%酒精滅菌 2 分鐘，以無菌水漂洗 1 次，再以 2%次氯酸鈉滅菌 10 分鐘，以無菌水漂洗 5 次。無菌播種於含有 2 mg/L 之 2,4D、3% 蔗糖、500 mg/L Casamino Acids、500 mg/L L-glutamine、400 mg/L MES hydrate、0.3% gelrite 的 N6 基本培養基 (Chu *et al.*, 1975)，培養在 27°C、光期 14 小時與暗期 10 小時的生長箱。培養 2 週後，將子葉盤與癒傷組織一起切下，進行基因槍轟擊。

#### 二、基因轉殖載體構築

本研究所使用的改造 Gy5-9V (pGy5-v23-4)、改造 7sβ-7V (pSbsnp-v5)及 15VVYP 之基因，前兩者由中興大學楊明德老師實驗室所提供，第三者由生工有限公司 (MDBio, Inc., 臺北市) (<http://www.mdbio.com.tw>)合成 15 套連續 VVYP 基因。本研究將改造之 Gy5-9V、7sβC-7v 及 15vvyp 基因構築到適用於基因槍轟擊法的基因轉殖載體。構築策略為將 Gy5-9V、改造 7sβC-7V 利用含有限制酵素 *Sma*I 及 *Eco*RI 切位的引子以 PCR 增幅，及 15VVYP 基因合成時添加限制酵素 *Sma*I 及 *Eco*RI 切位，接在葉綠體啟動子 *Prm* 的下游，再導入篩選基因 *aadA* 及 *daa*o，最後將片段以水稻葉綠體轉殖通用載體 pASCC202 為載體構築成 pMT92-gy5-9V-A、pMT92-gy5-9V-D、pMT92-7Sb-7V-A、pMT92-7Sb-7V-D、pMT92-15VVYP-A、pMT92-15VVYP-D 等六個水稻葉綠體轉殖載體，如圖 1。

#### 四、基因槍轉殖方法

##### (一)、金粒子(0.6 μm gold particle, Bio-Rad)的滅菌與清洗

秤取 50 mg 金粒子於微量離心管中，加入 1 ml 70%酒精，高速震盪 2 分鐘後，以 600 g 離心 30 秒去上清，加入 1 ml 無菌水，高速震盪 2 分鐘後，以 600 g 離心 30 秒去上清。重複清洗三次後加入 850 μl 的 50% glycerol，高速震盪 1 分鐘後，均勻分裝成每管 50 μl，儲存於-20°C 備用。

##### (二)、金粒子披覆轉殖載體 DNA

取 2.5 mg/50 μl，加入 10 μg 轉殖載體 DNA，混合均勻後，慢速加入 50 μl 2.5 M 氯化鈣溶液，均勻混合後再加入 20 μl 0.1 M spermidine，混合均勻後室溫靜置 10 分鐘。再以 600 g 離心 10 秒鐘後去上清液，加入 150 μl 無水酒精混合均勻後，再以 600 g 離心 10 秒鐘後去上清液，最後加入 55 μl 無水酒精混合均勻。

##### (三)、基因槍轟擊

本實驗以 Bio-Rad 公司所研發的基因槍型號 Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System 進行基因槍轟擊。首先以 70%酒精擦拭無菌操作台與基因槍室內，將微載片、壓力膜 (1100 psi)、鐵網等基因槍耗材以 95%之酒精潤濕後，將微載片與 macrocarrier holder

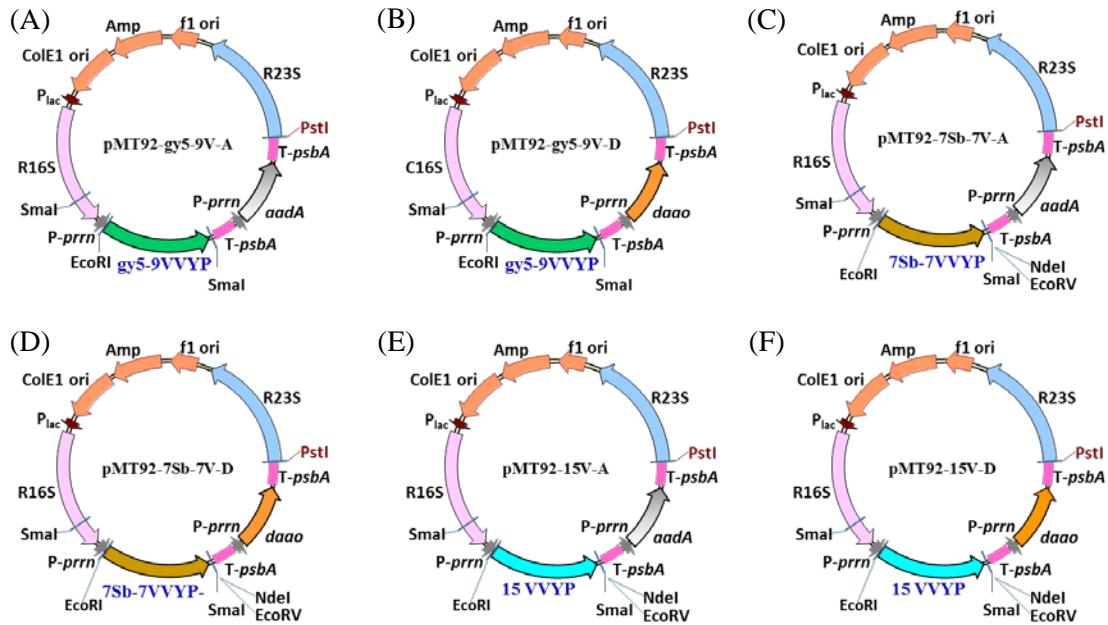


圖 1、水稻葉綠體轉殖載體 (A) pMT92-gy5-9V-A、(B) pMT92-gy5-9V-D、(C) pMT92-7sb-7V-A、(D) pMT92-7sb-7V-D、(E) pMT92-15V-A 和(F) pMT92-gy5-15V-D 質體圖譜。  
Fig. 1. Plasmid maps of rice transplastomic vectors: (A) pMT92-gy5-9V-A, (B) pMT92-gy5-9V-D, (C) pMT92-7sb-7V-A, (D) pMT92-7sb-7V-D, (E) pMT92-15V-A, and (F) pMT92-gy5-15V-D.

組裝完成置於無菌擦手紙上備用，將 spacer rings 與 stopping screen support 組裝後，開啟 UV 燈照射 15 分鐘。將氮氣瓶開啟升壓高至 1100 psi 以上後開啟真空幫浦，開啟抽氣馬達及基因槍開關後即可準備轟擊。將 10  $\mu$ l DNA-coated gold particles 均勻塗抹在組裝好的 macrocarrier-macrocarrier Holder 的中心，待金粒子內酒精揮發乾後，將所有基因槍零件組裝至基因槍室內，再將準備之培植體，置於槍口正下方的塑膠盤上，調整微載片與培植體至 6 公分之距離準備轟擊。轟擊時將按下抽真空按鈕使基因槍室內達到 27~28 in Hg，再按下加壓開關引入氮氣累積至 1100 psi 時便會使壓力膜爆破，將微載片上帶有 DNA 之金粒子轟擊至培植體。轟擊後，卸除真空壓力，取出培植體，待所有培植體轟擊完後，關閉氮氣瓶關，抽真空進行空槍擊發，待壓力表皆為 0 時，鬆開壓力閥，關閉馬達與基因槍。

#### 五、植株再生與抗生素篩選

轟擊後之愈傷組織於暗室培養 1 天後放至含有篩選藥劑的再生培養基(4.4 g/L Murashige and Skoog medium、300 mg/L Casamino Acids、15 g/L maltose、15 g/L sorbitol、3 mg/L 6-Benzylaminopurine 0.5 mg/L Indole-3-Acetic Acid、0.2 mg/L Thidiazuron、4g/L

gelrite、pH 值 5.8)，篩選藥劑 D-alanine 及 streptomycin 添加濃度為 150 ppm，每兩週繼代一次，直到誘導出芽體後。再提高 D-alanine 及 streptomycin 濃度至 300 ppm 兩週後，將芽體與愈傷組織分開移入含有篩選藥劑的發根培養基 (2.2 g/L Murashige and Skoog medium、0.25 g/L MES hydrate、15 g/L sucrose、0.5 mg/L 1-naphthylacetic acid、8 g/L gelrite、pH 值 5.8。篩選藥劑 D-alanine 添加濃度為 100 ppm，及 streptomycin 添加濃度為 100 ppm。誘導發根。約兩週誘導出根部後，移出瓶外定植於田土，先套上塑膠袋保濕，直到植物健化後移除塑膠袋，放置溫室。

#### 六、擬轉殖植株分析

##### (一)、擬轉殖植物 genomic DNA 萃取

本試驗利用 GeneMark 的 Plant Genomic DNA Purification Kit 萃取 genomic DNA。

##### (二)、聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

利用 PCR 技術增幅目標基因片段以檢測擬轉殖植株是否帶有目標基因。以葉片 genomic DNA 為模板。置於 DNA 聚合酶鏈鎖反應器中進行 PCR 反應。各基因偵測方式分述如下：

偵測 *gy5-9V* 基因 1、2 引子，分別為 5'-AATCCTTGTTCTCCCCCTTG-3' 及 5'-CTCTCTCTCTTTCTTCCCTTTG-3'，可增幅出 1483 bp 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘; 94°C 30 秒; 60°C 30 秒; 72°C 90 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1% 之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *7sb-7V* 基因 3、4 引子，分別為 5'-TTCCCTTACTCCCCCTCCTTC-3' 及 5'-ACTCCTACAACCTTCACCCT-3'，可增幅出 1053 bp 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘; 94°C 30 秒; 60°C 30 秒; 72°C 60 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1% 之洋菜膠上進行電泳分析。

偵測 *15VVYP* 基因 5、6 引子，分別為 5'-GGATATCGGATCCCCGGGTTA-3' 及 5'-TGGATAAGAGGCTCGTGGGA-3'，可增幅出 386 bp 片段。反應流程為 94°C 2 分鐘; 94°C 30 秒; 60°C 30 秒; 72°C 30 秒，共進行 35 個 cycles，最後再進行 72°C 10 分鐘 1 個 cycle。反應完畢後，取終產物 8 µl 於 1% 之洋菜膠上進行電泳分析。

##### (三)、擬轉殖植物 total RNA 萃取

利用 Faith Technology 的 The One™ RNA Reagent 萃取，首先將剛採取 0.1 g 的植物葉片置於研鉢中、加入液態氮以研杵充分研磨將組織磨細，將樣品粉末置入 1.5 ml 離心管，加入 0.2 ml chloroform 充分混勻 15 秒，室溫下靜置 3 分鐘，離心 12,000 g 15 分鐘 4°C，取上清液移至新的 1.5 ml 離心管加入 0.25 ml 的 isopropanol 和 0.25 ml De-PSG Solution 溫和混勻室溫下 10 分鐘，離心 12,000 g 10 分鐘 4°C 去除上清液，加入 75% 酒精，vortex 把 pellet 懸起，離心 12,000g 5 分鐘 4°C，去除酒精，靜置 5 到 10 分鐘使酒精揮發，回溶 RNA，儲存於 -70°C 備用。以光譜儀測定其 O.D. 260 與 O.D. 280 吸光值，估算 RNA 濃度。

##### (四)、擬轉殖植物 cDNA 備製與 RT-PCR

以 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific)，以植物葉片 total RNA 為模板，使其終濃度為 0.1 ng ~5 µg 之間，加入 1 µl Oligo (dT)<sub>18</sub> primer，再以去離子水補滿至反應體積為 12 µl，移至 65 °C 處理 5 分鐘，移至冰上依序加入 1 倍的 Reaction Buffer、20 U RiboLock RNase Inhibitor、1 mM dNTP Mix、200 U RevertAid M-MuLV reverse transcriptase。置於聚合酶鏈鎖反應器 (Peltier Thermal cycler, PTC-200; MJ Research, INC) 中進行反應。反應流程為，42°C 60 分鐘，緊接著 72°C 10 分鐘，反應合成 cDNA，長期儲存於 -70°C 備用。進行 RT-PCR 時以 cDNA 作為模板進行 PCR 工作。

## 結 果

一、構築帶有改造 9 套 VVYP-Gy5 (glycine subunit 5)、7 套 VVYP-7Sb ( $\beta$  conglycinin  $\beta$ subunit) 大豆蛋白基因及 15 套 VVYP 基因為目標基因，*daao* 或 *aadA* 為篩選標誌基因之水稻葉綠體轉殖載體

本研究先期參與「開發基因轉殖大豆做為生物反應器」研究團隊，分析 Gy5 (glycine subunit 5) 及 7Sb ( $\beta$  conglycinin  $\beta$ subunit) 蛋白之三維結構，尋找出不會影響其蛋白構形的替換位置，置入多個 VVYP 套組，此構想為防止表現改造蛋白被分解，及有利其在植物體內蓄積。置換位置是經由各種 bioinformatic database 與結構模擬應用軟體的使用，將 Gy5 及 7Sb 蛋白的序列與已建構立體結構之相似蛋白的序列比較，尋找具有結構上高度彈性的 loop 區域，而此區域都遠離其他 subunits 而不會有 interaction，適合當作生物活性肽的接入位置。並在 VVYP 的前後，安排可以被 trypsin 搭配 carboxypeptidase B 蛋白酶剪切出 VVYP 肽的胺基酸殘基，此構想為攝食後方便消化道蛋白酶之剪切，立即發生作用 (許等，2013)。

先前研究將含有 9 套 VVYP 序列置換入 Gy5 基因的 pSK-gy5-v23-4 (楊明德老師實驗室構築)，本研究以帶有 *SmaI* 及 *EcoRI* 限制酶切位之引子增幅 Gy5-v23-4 (1,686 bp)，隨後置入 pGEM-T easy 成為 pGEM-Teasy gy5-v23-4，進行核酸序列定序，其結果與預期相同，帶有目標之 9 套 VVYP，且尾端具 HIS-Tag。含有 7 套 VVYP 序列置換入 7Sb 基因的 pET21-7Sbsnp-v57 以帶有 *SmaI* 限制酶切位之引子增幅 7Sbsnp-v57 (1,458 bp)，隨後置入 pGEM-T easy 成為 pGem-Teasy 7Sbsnp-v57，進行核酸序列定序，其結果與預期相同，帶有目標之 7 套 VVYP，且尾端具 HIS-Tag。

本研究將 Gy5-v23-4 (9 套 VVYP)、Sbsnp-v57 (7 套 VVYP) 及 15 套合成的 VVYP 基因構築於適用於水稻葉綠體基因轉殖之植物基因轉殖載體，主要構築策略為將 Gy5-v23-4、7Sbsnp-v57 及 15VVYP 基因分別利用含有限制酶 *SmaI/EcoRI* 切位之引子以 PCR 增幅後，接於 *Prn* 啟動子之下游，後將此片段接入 pZ-AadA2 或 pZ-DaO2，導入篩選標誌基因，最後再構築於載體 pASCC202，形成帶有目標之 Gy5-9VVYP、7Sb-7VVYP 或 15VVYP

基因與篩選基因 *aadA* 或 *daao* 及側翼序列為水稻 16S (C16S) 與 23S (C23S) RNA 基因片段作為基因重組位置之 pMT92-gy5-9V-A、pMT92-gy5-9V-D、pMT92-7Sb-7V-A、pMT92-7Sb-7V-D、pMT92-15V-A、pMT92-15V-D 等六個轉殖載體 (圖 1)，並以限制酵素、PCR 和 RT-PCR 確認其正確性(圖 2)。

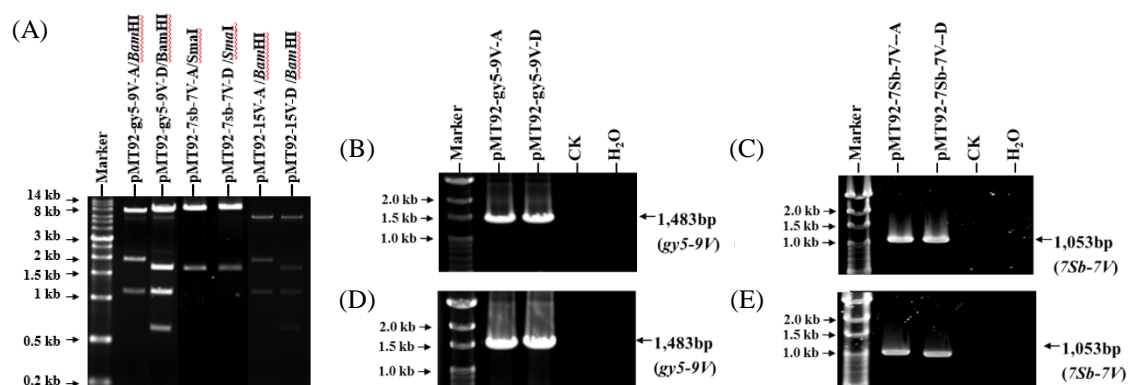


圖 2、以限制酵素切割(A)分別確認六種轉殖載體及 PCR(B、C)、RT-PCR(D、E)分析 *E. coli* DH5 $\alpha$ /pMT92-gy5-9V-A、/pMT92-gy5-9V-D、/pMT92-7Sb-7V-A、/pMT92-7Sb-7V-D 等菌株之 *gy5-9V* (A、C)、*7Sb-7V* (B、D) 基因及其 mRNA 之情形。

Fig. 2. Six transfer vectors were confirmed by enzyme digestion, and detections of *gy5-9V* (A, C) and *7Sb-7V* (B, D) genes and its mRNA in *E. coli* DH5 $\alpha$ /pMT92-gy5-9V-A, /pMT92-gy5-9V-D, /pMT92-7Sb-7V-A, /pMT92-7Sb-7V-D by PCR (A, B) and RT-PCR (C, D).

## 二、誘導水稻癒傷組織、基因槍轉殖、篩選及再生水稻植株

本研究是將目標基因利用基因槍轟擊，轉殖到水稻癒傷組織，利用標誌基因以 streptomycin 或 D-alanine 篩選擬轉殖培植體，再誘導再生植株。首先，將「台農 67 號」水稻，無菌播種於培養皿誘導癒傷組織。培養 2 週後，將子葉盤誘導出的癒傷組織切下，移至新的播種培養基使癒傷組織增殖。2 週後，將癒傷組織集中排成直徑 2 公分的同心圓，隔天以基因槍將轉殖載體轟擊到水稻癒傷組織。依照轉殖載體所攜帶的抗篩選藥劑基因，將轟擊過後的癒傷組織移入含有 150 ppm streptomycin 或 D-alanine 的再生培養基中，再生時間 2~3 個月，未轉殖成功的植株逐漸褐化或是白化，成功再生的植株則呈現青綠色。再生植株生長到 4 公分左右時，置入含有 100 ppm 的 streptomycin 或 D-alanine 發根培養基，誘導發根。根系生長正常之植株移出培養瓶外定植於塑膠杯中並套袋健化，隨後換入塑膠盆移至溫室種植。大多數的擬轉殖植株生長正常，且能正常抽穗與結實。

## 三、轉殖再生水稻 T0、T1 植株之基因分析

轉殖株 T0、T1 含有 *gy5-9V*、*7Sb-7V*、*15VVYP* 基因的水稻植株之 PCR 分析，是萃取水稻葉片的總 DNA，經 PCR 方式以引子 1、2、引子 3、4、引子 5、6，分別偵測轉殖株是否含有 *gy5-9V*、*7Sb-7V*、*15VVYP* 等基因，經電泳膠片分離 PCR 產物分析結果如下。

T0 代擬轉殖株：*gy5-9V-A* 轉殖系共 2 株擬轉殖株，有 2 株可偵測到目標基因 *gy5-9V*。*gy5-9V-D* 轉殖系共獲得 21 株擬轉殖株有 6 株可偵測到目標基因 *gy5-9V*。*7Sb-7V-A* 轉殖系共 8 株擬轉殖株有 1 株檢測到目標基因 *7Sb-7V*。*7Sb-7V-D* 轉殖系共 4 株擬轉殖株有 2 株檢測到目標基因 *7Sb-7V*。*15VVYP-A* 轉殖系共 8 株擬轉殖株，其中有 1 株檢測到目標基因 *15VVYP*。*15VVYP-D* 共 7 株擬轉殖株其中有 6 株檢測到目標基因 *15VVYP* (圖 3)。

T1 代擬轉殖株：*gy5-9V-A* 轉殖系的 5 個子代中有 2 株檢測到目標基因 *gy5-9V*。*gy5-9V-D* 轉殖系的 21 個子代中有 12 株檢測到目標基因 *gy5-9V*。*7Sb-7V-A* 轉殖系的 56 個子代中有 23 株檢測到目標基因 *7Sb-7V*。*7Sb-7V-D* 轉殖系的 33 個子代中有 8 株檢測到目標基因 *7Sb-7V*。*15VVYP-A* 轉殖系的 13 個子代中有 3 株檢測到目標基因 *15VVYP*。*15VVYP-D* 轉殖系的 13 個子代中有 3 株檢測到目標基因 *15VVYP* (圖 4)。

轉殖水稻植株之 RT-PCR 分析方法是萃取 T0 水稻總 RNA 後經反轉錄成 cDNA，經 PCR 方式以引子 1、2、引子 3、4、引子 5、6，分別偵測轉殖株是否含有 *gy5-9V*、*7Sb-7V*、*15VVYP* 等基因的 mRNA。試驗結果經電泳膠片分離 PCR 產物後顯示，*gy5-9V-A* 轉殖株 T0 可檢測到 1 株目標基因 *gy5-9V*。*gy5-9V-D* 轉殖株 T0 可檢測到 6 株目標基因 *gy5-9V*。*7Sb-7V-A* 轉殖株 T0 可檢測到 2 株目標基因 *7Sb-7V*。*7Sb-7V-D* 轉殖株 T0 可檢測到 1 株目標基因 *7Sb-7V*。*15VVYP-A* 轉殖株 T0 可檢測到 2 株目標基因 *15VVYP*。*15VVYP-D* 轉殖株 T0 可檢測到 3 株目標基因 *15VVYP* (圖 5)。

## 討 論

### 一、六種轉殖載體之構築

本試驗共構築了六種適用於水稻葉綠體基因轉殖載體 pMT92-*gy5-9V-A*、pMT92-*gy5-9V-D*、pMT92-*7sb-7V-A*、pMT92-*7sb-7V-D*、pMT92-*15VVYP-A* 及 pMT92-*15VVYP-D*。六種轉殖載體均經過限制酵素切割，確認載體及基因片段大小的正確性，可供後續轉殖水稻實驗所使用。而在本次試驗中，易發生的狀況是由於質體重組所造成構築的失敗，解決方法可以是改用其他菌系，本研究後期構築所使用的為 HB101，或是在轉型作用時使用 28°C 低溫培養，使大腸桿菌以較慢的速度繁殖，增加其穩定性以解決問題。

### 二、誘導水稻癒傷組織、基因槍轉殖、篩選及再生水稻植株

本研究使用水稻癒傷組織作為轉殖之培植體，經由基因槍轟擊之後，使用 streptomycin 篩選濃度是參考本實驗室學長傳承泰的碩士論文研究及其建議 (傅等, 2012)。由於 Maliga 等人報導 (1998) 若根部細胞轉殖成功也會表現轉殖基因，因此發根時也添加 streptomycin



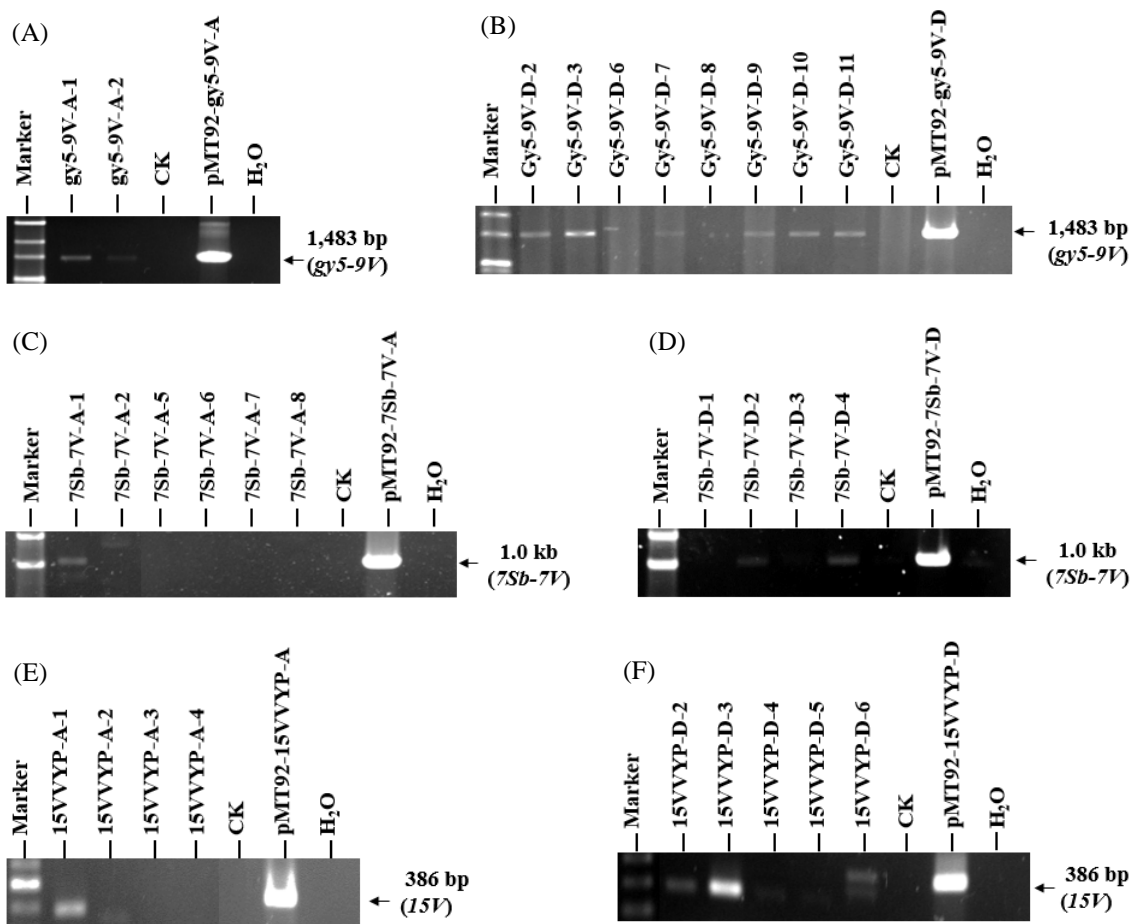


圖 3、以 PCR 分析擬轉殖水稻的 T0 葉片，*gy5-9V*-A (A)、*gy5-9V*-D(B)偵測 *gy5-9V* (1.5 kb)，*7Sb-7V*-A(C)、*7Sb-7V*-D(D)偵測 *7Sb-7V* (1.0 kb)，*15V*-A(E)、*15V*-D(F)偵測 *15V* (386 bp)基因的情形。CK：未轉殖水稻。

Fig. 3. PCR analysis of *gy5-9V* (A, B), *7Sb-7V* (C, D), and *15V* (E, F) genes in T0 putative *gy5-9V*-A, *gy5-9V*-D, *7Sb-7V*-A, *7Sb-7V*-D, *15V*-A, and *15V*-D transplastomic rice. The parts of *gy5-9V* (1.5 kb), *7Sb-7V* (1.0 kb) and *15V* (386 bp) gene sequences were amplified from T0 leaves DNA using *aadA* and *15V* primers, then analyzed by electrophoresis. CK: untransformed rice.

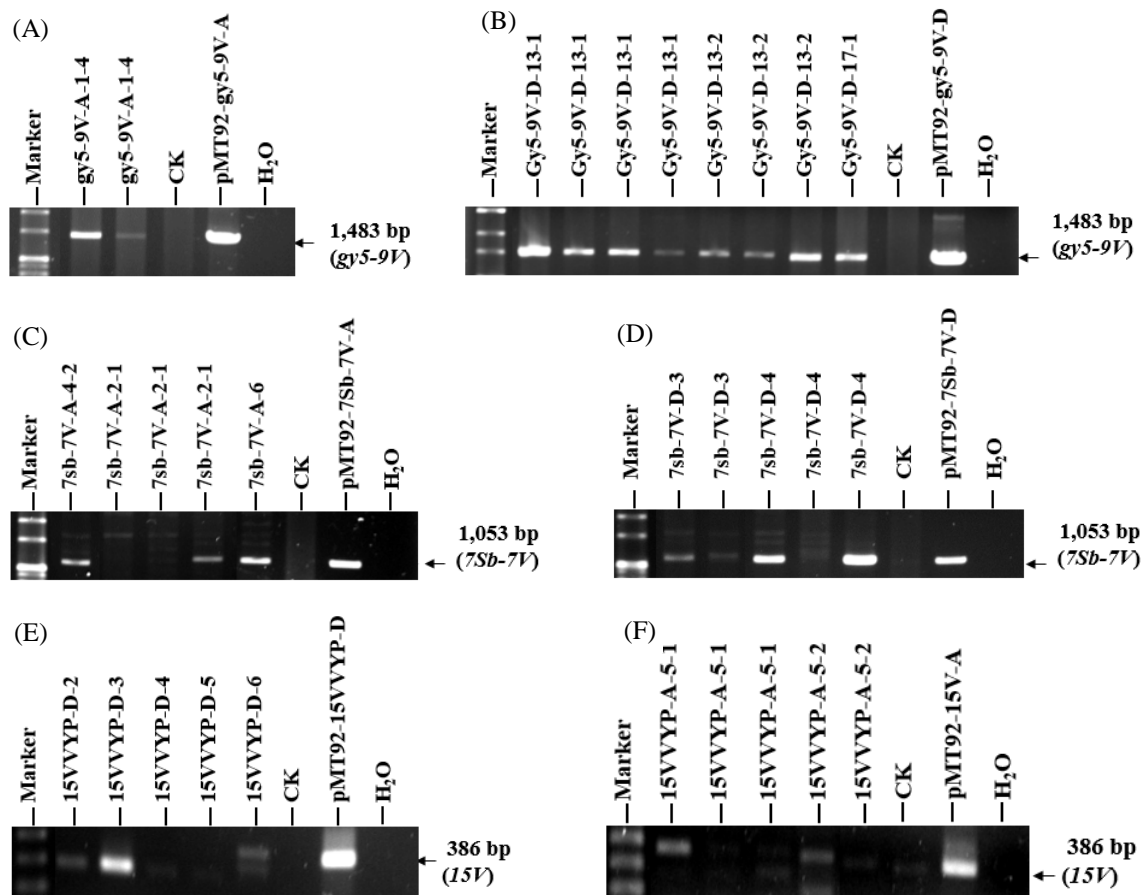


圖 4、以 PCR 分析擬轉殖水稻的 T1 葉片，*gy5-9V*-A (A)、*gy5-9V*-D(B)偵測 *gy5-9V* (1.5 kb) ，*7Sb-7V*-A(C)、*7Sb-7V*-D(D)偵測 *7Sb-7V* (1.0 kb) ，*15V*-A(E)、*15V*-D(F)偵測 *15V* (386 bp)基因的情形。CK：未轉殖水稻。

Fig. 4. PCR analysis of *gy5-9V* (A, B), *7Sb-7V* (C, D), and *15V* (E, F) genes in T0 putative *gy5-9V*-A, *gy5-9V*-D, *7Sb-7V*-A, *7Sb-7V*-D , *15V*-A, and *15V*-D transplastomic rice. The parts of *gy5-9V* (1.5 kb), *7Sb-7V* (1.0 kb) and *15V* (386 bp) gene sequences were amplified from T1 leaves DNA using *aadA* and *15V* primers, then analyzed by electrophoresis. CK: untransformed rice.

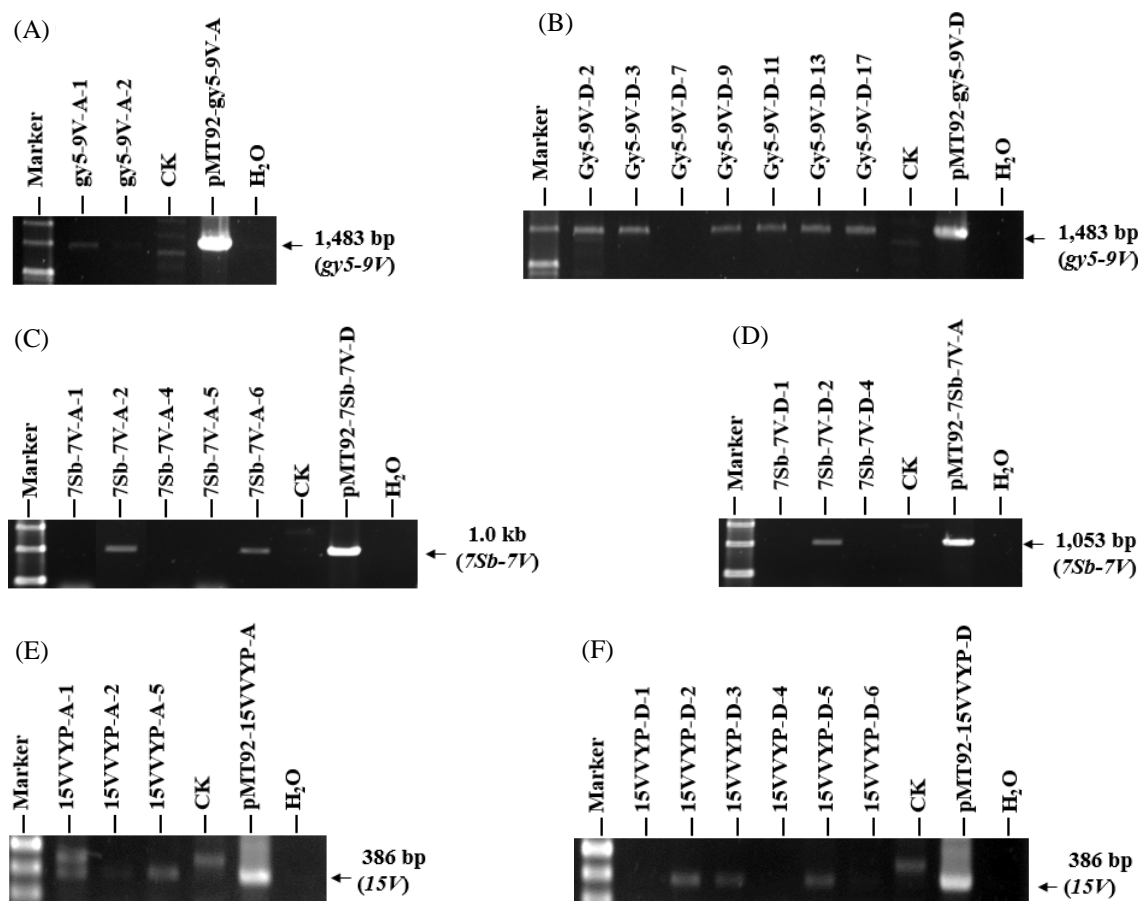


圖 5、以 RT-PCR 分析擬轉殖水稻的 T0 葉片，*gy5-9V*-A(A)、*gy5-9V*-D(B)偵測 *gy5-9V* (1.5 kb)，*7Sb-7V*-A(C)、*7Sb-7V*-D(D)偵測 *7Sb-7V* (1.0 kb)，*15V*-A(E)、*15V*-D(F)偵測 *15V* (386 bp)基因的情形。CK：未轉殖水稻。

Fig. 5. RT-PCR analysis of *gy5-9V* (A, B), *7Sb-7V* (C, D), and *15V* (E, F) genes in T0 putative *gy5-9V*-A, *gy5-9V*-D, *7Sb-7V*-A, *7Sb-7V*-D, *15V*-A, and *15V*-D transplastomic rice. The parts of *gy5-9V* (1.5 kb), *7Sb-7V* (1.0 kb) and *15V* (386 bp) gene sequences were amplified from T0 leaves DNA using *aadA* and *15V* primers, then analyzed by electrophoresis. CK: untransformed rice.

進行篩選。使用 streptomycin 會造成葉綠體死亡，進而產生白化癒傷組織和白化芽體，在篩選過程中若出現白化現象的水稻，則予以淘汰，僅保留始終鮮綠的芽體再進行發根，最終使用 streptomycin 篩選獲得 16 株擬轉植株。使用 D-alanine 篩選造成癒傷組織大量褐化並且死亡，少部分產生綠色芽體，將芽體放入含有 D-alanine 的發根培養基中，引發植株的大量死亡，推測可能原因是水稻在發根階段對 D-alanine 敏感，進而造成死亡，遂後續實驗再生的芽體在沒有 D-alanine 篩選壓力下進行發根，最終使用 D-alanine 篩選獲得 32 株擬轉植株。約 2~3 週後根系健全，將植株健化後移至溫室種植。

### 三、轉殖再生水稻植株之基因及表現分析

經由基因槍葉綠體轉殖後，癒傷組織經過篩選藥劑篩選後，共得 48 株擬轉殖植株，分別篩選 streptomycin 的再生植株有 16 株，篩選 D-Alanine 則有 32 株。

PCR 分析結果顯示，在轉殖 gy5-9V-A 的 2 株擬轉殖植株中，有 2 株可偵測到目標基因 gy5-9V。在 gy5-9V-D 共有 19 株擬轉殖植株，有 6 株 (gy5-9V-D-2、gy5-9V-D-3、gy5-9V-D-7、gy5-9V-D-9、gy5-9V-D-10、gy5-9V-D-11) 可以偵測到目標基因 gy5-9V，但卻只有 2 株 (gy5-9V-D-13、gy5-9V-D-17) 偵測到篩選基因 *daao*，並且倆倆基因間沒有關聯。

在 7sb-7V-A 的 8 株轉殖系中共有 2 株 (7sb-7V-A-1、7sb-7V-A-2) 檢測到目標基因 7sb-7V，而篩選基因 *aadA* 則有 5 株 (7sb-7V-A-1、7sb-7V-A-2、7sb-7V-A-4、7sb-7V-A-5、7sb-7V-A-6) 被檢測到。在轉殖 7sb-7V-D 的載體的 4 株擬轉殖植株中，共有 2 株 (7sb-7V-D-2、7sb-7V-D-4) 檢測到目標基因 7sb-7V，其篩選基因 *daao* 亦有檢測到。

15VVYP-A 的 6 個轉殖品系中，15VVYP-A-1 同時偵測到 15VVYP-*aadA*，偵測到 *aadA* 有 3 株 (15VVYP-A-1、15VVYP-A-2、15VVYP-A-5)。在 15VVYP-D 的 7 株擬轉殖植株中，2 株 (15VVYP-D-2、15VVYP-D-5) 同時偵測到 15VVYP-*daao*，偵測到 15VVYP 則有 3 株 (15VVYP-D-3、15VVYP-D-4、15VVYP-D-6)，而 *daao* 有 1 株 (15VVYP-D-1)。

本研究結果顯示篩選基因和目標基因同時被偵測到的機率低，是不符合預期。而在其 RT-PCR 分析中，結果顯示許多植株，在 DNA 層次沒有偵測到目標基因卻在 RNA 中被探測到，這種現象也是不符合預期的。推測可能原因為：(1) 葉綠體同質率低：造成在葉片萃取 DNA 時未能萃取到目標 DNA 或是萃取濃度過低，因而進行 PCR 分析時經過稀釋 DNA 或是添加 DNA 樣品時造成目標基因的缺乏而無法被偵測，(2) 引子設計不良導致檢測的靈敏度降低。此有待繁殖大量同質轉植葉綠體水稻後裔，進而分析轉殖水稻的葉綠體基因組成，調查其目標基因。

綜合以上，轉殖再生植株 T0 及 T1 葉片之 PCR 及 RT-PCR 分析之結果顯示，轉殖之改造 VVYP 基因已存在於轉殖及之葉綠體基因組，並表現其 mRNA。因此本研究之初步結果顯示，利用水稻葉綠體為非耐抗生素篩選標誌基因的生物反應器，大量生產降血脂機能性胜肽 VVYP 將是可行的。

## 參 考 文 獻

- 許文輝、楊明德、陳良築、曾夢蛟、王強生、林金和、王雯靜。2013。用於降血脂之重組大豆儲藏性蛋白及其製備方法與應用。中華民國發明專利第 I392734 號。
- 傅承泰、楊明德、許文輝、曾夢蛟。2012。無篩選標誌基因之轉穀氨醯胺酵素基因轉殖水稻的研究。興大園藝 37(3): 39-51。
- Ahmad, N. and Z. Mukhtar. 2013. Green factories: plastids for the production of foreign proteins at high levels. *Gene Ther. Mol. Biol.* 15: 14-29.
- Dufourmantel, N., B. Pelissier, F. Garcon, G. Peltier, J. M. Ferullo, and G. Tissot. 2004. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol. Biol.* 55: 479-489.
- Hou, B. H., Y. H. Zhou, L. H. Wan, Z. L. Zhang, G. F. Shen, Z. H. Chen, and Z. M. Hu. 2003. Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Res.* 12: 111-114.
- 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: 1745-1755.
- Kang, T. J., N. H. Loc, M. O. Jang, Y. S. Jang, Y. S. Kim, J. E. Seo, and M. S. Yang. 2003. Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic Res.* 12: 683-691.
- Khan, M. S., and F. Nurjis. 2012. Synthesis and expression of recombinant interferon alpha-5 gene in tobacco chloroplasts, a non-edible plant. *Mol. Biol. Rep.* 39: 4391-4400.
- Kumar, D., A. Y. Mohd, P. Singh, M. Sardar, and N. B. Sarin. 2013. Modulation of antioxidant machinery in  $\alpha$ -tocopherol-enriched transgenic *Brassica juncea* plants tolerant to abiotic stress conditions. *Protoplasma* 250 :1079-1089.
- Lelivelt, C. L., M. S. McCabe, C. A. Newell, C. B. Desnoo, K. M. van Dun, I. Birch-Machin, J. C. Gray, K. H. Mills, and J. M. Nugent. 2005. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 58: 763-774.
- Lin, T. A., C. T. Fu, M. T. Yang, and M. J. Tseng. 2013. Transformation of lysozyme (*lys*) and holin (*hol*) genes to enhance diseases resistance in rice (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67). *Horticulture NCHU* 38(4): 37-48.
- Liu, C. W. and M. J. Tseng. 2005. Development a high-frequency method of plastid transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.). *Horticulture NCHU.* 30 (1): 27-37
- Liu, C. W., C. C. Lin, J. C. Yiu, J. J. W. Chen, and M. J. Tseng. 2008. Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin (*cryIAb*) gene in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) chloroplasts confers high insecticidal efficacy against *Plutella xylostella*. *Theor. Appl. Genet.*

117: 75-88.

- Madanala, R., V. Gupta, A. K. Pandey, S. Srivastava, V. Pandey, P. K. Singh, and R. Tuli. 2015. Tobacco chloroplasts as bioreactors for the production of recombinant superoxide dismutase in plants, an industrially useful enzyme. *Plant Mol. Biol. Rep.* 33 (4): 1107-1115.
- McBride, K. E., Z. Svab, D. J. Schaaf, P. S. Hogan, D. M. Stalker, P. Maliga, and N. B. Sarin. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Nat. Biotechnol.* 13: 362-365.
- Ohyama, K., H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi, and H. Ozeki. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of Liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Sikdar, S. R., G. Serino, S. Chaudhuri, and P. Maliga. 1998. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 18: 20-24.
- Svab, Z. and P. Maliga. 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 913-917.
- Rasouli, R., H. Honari, H. Alizadeh, M. Gorjian, M. Jalali, and M. Aalayi. 2014. Expression of protective antigen of *Bacillus anthracis* in Iranian variety of lettuce plastid (*Lactuca sativa* L.). *Middle-East J. Sci. Res.* 21 (10): 1855-1861.
- Ruf, S., M. Hermann, I. J. Berger, H. Carrer, and R. Bock. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19:870-875.
- Zhang, X. H., P. Keating, X. W. Wang, Y. H. Huang, J. Martin, J. X. Hartmann, and A. Liu. 2014. Production of functional native human interleukin-2 in tobacco chloroplasts. *Mol. Biotechnol.* 56(4): 369-376.
- Zou, Z., C. Eibl, and K. HU. 2003 The stem-loop region of the tobacco *psbA* 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. *Mol. Genet. Genomics* 269: 340-349

## Studies on Transformation of Functional Peptide VVYP Genes with Hypotriglyceridemic Action into Transplastomic Rice

Jia-Yu Lee <sup>1)</sup>    Chenh-Tai Fu <sup>2)</sup>    I-Chun Pan <sup>3)</sup>  
Jinn-Chin Yiu <sup>4)</sup>    Menq-Jiau Tseng <sup>5)</sup>

Key words: Rice, Chloroplast Gene Transformation, VVYP Peptide, Hypotriglyceridemic Action.

### Summary

Tetra-peptide, VVYP, is known to inhibit fat absorption in the digestive tract and to enhance the activity of hepatic triglyceride lipase to increase the clearance of body fat. Expression of foreign genes *via* chloroplast genomes offers several unique advantages, including high protein levels, expressing multiple genes in operons, transgene containment by maternal inheritance, as well as lack of gene silencing, position and pleiotropic effects.

In this study, *Gy5-9VVYP*,  *$\beta$ C-7VVYP* and *15VVYP* genes are transformed into the rice chloroplast by using *daao/aadA* gene as selectable marker gene. The objective of this study is to develop the rice chloroplast as a bioreactor for production of functional VVYP peptide with hypotriglyceridemic action. Chloroplast transformation vectors harboring the *VVYP* and *daao/aadA* genes had been constructed and transferred into the rice chloroplast *via* biolistic bombardment. The regenerated transplastomic plantlets were selected by D-alanine and spectinomycin. The results of PCR and RT-PCR analysis of T0 and T1 leaves indicated that the transformed genes are present in the chloroplast genome of transplastomic rice plants, and expressed its mRNA.

- 
- 1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 2) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University..
  - 3) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University..
  - 4) Professor, Department of Horticulture, National Ilan University.
  - 5) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.