

胺基端醯化胺基酸消旋酵素(N-acylamino acid racemase, NAAAR)基因轉殖至水稻(*Oryza sativa* L.)之研究

陳俊麟¹⁾ 許文輝²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：消旋酵素基因、水稻、基因轉殖

摘要：本試驗將篩選自抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)的胺基端醯化胺基酸消旋酵素(N-acylamino acid racemase, NAAAR)基因，構築至分別具有CaMV35S、*rbcS*、*globulin* 或 *oleosin* 等啟動子的植物轉殖載體上，再以農桿菌法轉殖至'台農 67 號'水稻癒傷組織中，誘導再生植株。試驗結果顯示所有轉殖載體均有再生植株，4種質體之再生率介於2.5%~9.5%之間，平均再生率為5.8%。經PCR初步篩選，大部份的轉殖植株均具有*naaar*基因，4種質體之轉殖率介於74%~95%之間，平均轉殖率為85%。南方墨點分析之結果顯示四種質體之*naaar*基因已轉殖到再生水稻，並已插入其染色體組DNA中。北方墨點及西方墨點分析pKcnaaar及pKrnaaar之轉殖再生水稻顯示轉殖之*naaar*基因可在再生水稻葉片中轉譯出*naaar* mRNA，並表現NAAAR酵素(racemase)。試驗結果顯示利用*naaar*基因轉殖，以水稻來生產消旋酵素是可行的。

前 言

根據統計，近年來高血壓相關疾病已是國人十大死因之一，台灣地區40歲以上的人口，每百人約有二十人罹患高血壓疾病(王, 2000)。西元2000年IMS report 資料顯示全世界醫藥市場以心臟血管用藥市場最大，約為251億美金。血管收縮素轉換酵素抑制劑

-
- 1) 中州技術學院景觀設計系助理教授。
 - 2) 國立中興大學分子生物學研究所教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

(angiotensin converting enzyme inhibitor; ACEI) 是目前治療高血壓的口服降血壓藥物中新一代的血管疾病用藥(Brunner *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1986)。據 IMS report 資料顯示，西元 2002 年 ACEI 藥物在全球醫藥市場排名第九位，達 78 億美金。ACE 抑制劑的功能是抑制 ACE，達到降低 ACE 所引起的血壓升高的效果(Dibianco, 1986)。在臨床的表現除降低血壓外，可減輕左心室肥大，降低心肌梗塞與充血性心衰竭的發生。是為控制心血管疾病藥物中較具發展潛力的藥物之一。

ACE 抑制劑組成的胺基酸中，alanine、proline 及 L-homophenyl- alanine(L-HPA)是最常出現的共通性胺基酸。其中 alanine 與 proline 均是天然可取得的胺基酸，而 L-HPA 則為非天然之旋光性胺基酸，較不易取得。在 L-HPA 的生產上，以往多則是以化學方法行之(Xie *et al.*, 2000)。除了費時、價格昂貴與對環境會產生污染等問題，都是生產時須面對的課題。所以利用生物技術以酵素方法來生產可降低生產成本與污染問題並達經濟效益。

以酵素方法生產 L-HPA，除了可利用 L-hydantoinase 與 L-N-carbamoylase 之催化反應方法外(Hu *et al.*, 2003)。亦可利用 N-acylamino acid 或 N-carbamoylamino acid 在 L-aminoacylase、L-aminopeptidase 或 L-N-carbamoylase 作用進行轉換，此反應需搭配 N-acylamino acid racemase(NAAAR)的作用，否則 D-型原料無法轉換成可利用的 L-型原料。若無 NAAAR 的參與反應，其轉換率多不超過 50%，顯示 NAAAR 在 L-HPA 生產具有提高其原料轉換率、大幅降低成本的關鍵性角色。

水稻為世界三大糧食作物之一，亦是本省的主要糧食作物，近年由於西方速食主義盛行，國人米食實用量逐年下降，造成稻米生產過剩。又因土地物價節節升高，造成生產成本提高，農民收入減少。再者加入 WTO 後，省產稻米將面對進口稻米強烈競爭的威脅。所以提高稻米的附加價值是一非常重要之課題。而近來利用生物技術進行植物品種改良，以植物作為生物反應器來生產高價值的酵素或蛋白質，對提高稻米的附加價值是一非常可行方法。所以本研究將 *naaar* 基因轉殖至水稻，以水稻種子專一性的 *globulin*、*oleosin* 基因啟動子及 CaMV35S 與 *rbcS* 啟動子驅使 *naaar* 基因表現，期望使 NAAAR 大量累積於水稻種子或植株中，進而純化 NAAAR，作為醫葯工業用酵素的重要來源。藉此將可增加水稻的利用，提高其附加價值，使水稻在農業產業開拓新的契機，亦可藉此提昇台灣生技產業之水準。

材料及方法

一、實驗材料：

(一)、植物材料

本試驗以'台農 67 號'水稻(*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) (TN 67)作為基因轉移的植物材料。'台農 67 號'水稻成熟種子經無菌處理後，播種於含 3% 蔗糖、2 mg/L 的 2,4-D 與 0.3%

水晶洋菜(gelrite)的 N6 基礎培養基(Chu *et al.*, 1975)誘導癒傷組織，培養條件為 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，16 小時光週期，每二週繼代一次，以作為農桿菌基因轉移之材料。

(二)、轉移之基因

本試驗將篩選自抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)中的 *naaar* 基因(國立中興大學分子生物研究所許文輝教授所提供)(Wang *et al.*, 2004)分別黏接於 CaMV35S、*rbcS*、*globulin* 或 *oleosin* 啟動子與 NOS 終結子間，構築 *naaar* 基因轉殖載體 pKcnaaar (CaMV35S 啟動子)、pKrnaaar (*rbcS* 啟動子)、pKgnaaar (*globulin* 啟動子) 及 pKonaaar (*oleosin* 啟動子)，以作為農桿菌基因轉移之用。

二、實驗方法：

(一)、三親交配 (Triparental mating)

本試驗所使用的農桿菌品系為 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404)。Help strain 為含 pRK2013 質體的 HB101。依據 Rogers 等人(1988)，將農桿菌培養於 5 ml 含 Streptomycin(100 ppm)之 LB 培養液，於 28°C 培養 12-36 小時。而 HB101/pRK2013 和 HB101/(pKcnaaar、pKrnaaar、pKgnaaar、及 pKonaaar)則分別培養於 5 ml 含 kanamycin (50 ppm)之 LB 培養液，於 37°C 培養 12 小時。待三種菌液於光電比色計波長 600 nm 的讀值為 0.6-0.8 時，各取 1 ml 菌液混合、離心，將沉澱之菌體懸浮於 2 ml 之 10 mM MgSO_4 。此懸浮液經過濾將濾液收集於濾膜(ImmobilonTM- Ny⁺)，將濾膜置於 LB 固體培養基上，於 28°C 下隔夜培養後以 2 ml、10 mM MgSO_4 將濾膜上之菌體沖下，取少量菌液均勻塗佈於含有 50 ppm kanamycin 及 100 ppm streptomycin 之 M9 minimal medium (2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mM KH_2PO_4 , 8 mM NaCl, 40 mM NH_4Cl , 0.02% glucose, 2 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2)。於 28°C 中培養 2-3 天，長出之菌落即為三親交配之農桿菌，可作為感染及基因轉移之用。

(二)、聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

以目標基因為模板，並加入 *Taq* DNA polymerase(1 U) (MBI)、 $10\times$ buffer(1 \times)、dNTP (0.2 mM)、 MgCl_2 (1.25 mM)、引子 (0.375 μM)，再加入去離子水，使最終體積為 25 μl 。反應時置於 DNA 聚合連鎖反應器中(Px2 Thermal cycler; ThermoHybaid)。本試驗總共設計有 2 條引子：P402-1：5'-GGATCCATGGCCATACTGG-3'，P402-2：5'-ACCGCCGAGTAGTGTTCCGA-3'，用以偵測 *naaar* 基因。PCR 反應條件為以 94°C 、30 秒， 61°C 、30 秒及 72°C 、1 分鐘，共計 30 個循環。反應後以 1.5% 的洋菜電泳膠片分析。

(三)、農桿菌基因轉移方法

主要是參考 Zhang 等人(1996)的方法再予以修飾而成。將經消毒的水稻成熟種子，無菌播種於 N6-D 培養基(Chu *et al.*, 1975)中，誘導 10~14 天後的癒傷組織作為農桿菌感染之材料。置於 N6-D 培養液內含 O.D_{600} 值約為 0.8~1.0 的農桿菌液，感染 30 分鐘後，置於已滅菌過的衛生紙上吸乾感染液，再置於 N6-AS (acetosyringone，以 DMSO 或甲醇溶解) 培養基中，於 28°C 下避光共同培養三天，再以含有 1,000 ppm 的 carbenicillin 之 N6-D 培

養液浸泡 15 分鐘三次後，置於已滅菌過的衛生紙上吸乾，再將癒傷組織培養於含有 500 ppm 之 carbenicillin 與 100 ppm 之 G-418 的 MS 再生培養基上，每二週繼代培養一次，待長出枝梢後，換至 250 ppm 之 carbenicillin 與 100 ppm 之 G-418 的 MS 培養基上，待植株稍大後移至 MS 發根培養基上誘導發根並予以健化，最後移至瓶外定植培養。

(四)、DNA 的操作、轉殖植物之南方及北方墨點雜交分析

E. coli、質體 DNA 的萃取、DNA 片段的回收及黏接、*E. coli* 宿主勝任細胞 (competent cells) 的製備、質體轉形作用、PCR 偵測轉殖的基因、探針製備、植物染色體 DNA 及 RNA 的備製、南方及北方墨點雜交分析等方法，參照陳與曾(2001)之方法。

(五)、植物可溶性蛋白之萃取及西方墨點法分析

1. 植物可溶性蛋白之萃取

取適當的水稻葉片組織 1 g 以液態氮研磨成粉末狀，加入適量之蛋白質萃取緩衝液 (50 mM Na₂CO₃, pH 9.5, 100 mM NaCl, 0.05% Triton X-100, 0.05% Tween-20, 1 mM PMSF, 1% β-mercaptoethanol, 1 μM leupetin)，混合均勻後，置入 1.5 ml 微量離心管，以液態氮急速冷凍，迅速放置於 37°C 水浴，待其解凍後，再以液態氮冷凍，重複兩次後，置於冰上 10 分鐘，以 13,000 rpm 於 4°C 離心 20 分鐘，上清液經 miracloth 過濾，濾液即可用於蛋白質濃度測定及蛋白質電泳分析，貯存於 -20°C 即可。

2. 蛋白質濃度測定

可溶性蛋白質濃度係利用 Bio-Rad protein Assay kit (Bio-Rad) 來測定，取 50 μl 之樣品，加入稀釋 10 倍的蛋白質染劑 (Bio-Rad) 5 ml，混合均勻，於室溫下反應 5 分鐘，以光譜分析儀 (Hitachi U-2001) 分析蛋白質於 595 nm 之吸收值，再代入以不同濃度的 BSA 所測得的 OD₅₉₅ 吸收值做出的標準曲線，即可計算溶液中蛋白質含量。

3. 蛋白質膠體電泳分析 (SDS-PAGE)

以 Mini-Protein III Cell (Bio-Rad) 系統進行電泳分析，配製 10% polyacrylamide gel (10% acrylamide, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% AP, 0.08% TEMED) 為 resolution gel，及 5% polyacrylamide gel (5% acrylamide, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% AP, 0.08% TEMED) 為 Stacking gel。取欲分析之蛋白質萃取液 (80 μg) 與等體積之 2× loading buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue) 混合均勻。經 100°C 水浴 10 分鐘，置於冰上冷卻，將樣品注入每一個膠體槽內。以固定電壓 70 伏特分離 30 分鐘，再將電壓改為 140 伏特，繼續通電 1 小時。將凝膠以 Coomassive Brilliant Blue R-250 染色 30 分鐘後，以 destaining solution I (500 ml methanol, 100 ml acetic acid, 400 ml dd H₂O) 褪染至背景完全褪去，以玻璃紙密封後，風乾保存。

4. 西方墨點分析

將經 SDS 膠體電泳分離後之膠片，以 TEB buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) 清洗 20 分鐘，以濕式法 (Mini Trans-Blot Electrophoretic cell, Bio-Rad) 將海綿、

3MM 濾紙、PVDF paper (Hybond-C extra)、膠體，3MM 濾紙及海綿由正極至負極依序排放，置入含轉移緩衝液 (transfer buffer) (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% Methanol, pH 8.3) 的裝置內。以 70 伏特，200 毫安培電流於低溫下轉漬 2 小時，再將 PVDF paper 置於 30 ml blocking buffer (5% non-fat dried milk, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.05% Tween-20) 室溫下輕度震盪 1 小時，更換新的 blocking buffer，加入適當濃度 (1/10000) 的一級抗體 [primary antibody, polyclonal (rabbit) anti-N-acylamino acid racemase Antibody]，於室溫下迴旋震盪 2 小時，再以 TTBS buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20) 清洗 10 分鐘 3 次，再將 PVDF paper 放入含適量濃度 (1/10000) 的二級抗體 [secondary antibody, anti-rabbit IgG, AP conjugated] 於室溫下迴旋震盪，至少 2 小時後，以 TTBS buffer 清洗 10 分鐘 3 次，使用 NBT/BCIP Kit (PIRECE) 進行酵素呈色反應約 1 分鐘後，以清水洗淨終止呈色反應，再將膜瀝乾保存。

結 果

一、構築植物轉殖載體

本試驗將篩選自抗輻射奇異球菌(*Deinococcus radiodurans*)中的 *naaar* 基因(國立中興大學分子生物研究所許文輝教授所提供)分別黏接於 CaMV35S、*rbcS*、*globulin* 或 *oleosin* 啟動子與 NOS 終結子間，構築 *naaar* 基因轉殖載體 pKcnaaar、pKrnaaar、pKgnaaar 及 pKonaaar，以作為農桿菌基因轉移之用。

1. CaMV 35S 啟動子之 *naaar* 基因

以 *Bam*HI 與 *Hind*III 將 pQE-*naaar* 之 1.1 kb 的 *naaar* 片段切下，黏合至中間載體 pBK-CMV 成為 pBK-CMV-*naaar*；再以 *Bam*HI 與 *Xba*I 切割中間載體 pBK-CMV-*naaar*，之 *naaar* 基因片段，與 pBluescript 載體進行黏合反應，形成另一中間載體 pBlue-*naaar*；最後以 *Bam*HI 與 *Sac*I 切下 pBlue-*naaar* 之 *naaar* 基因片段，接至 pBI121 質體，置換 GUS 基因，即為含有 CaMV35S 啟動子及 *naaar* 基因的植物轉殖載體 pKcnaaar (圖 1A)。

2. *rbcS* 啟動子之 *naaar* 基因

將上述載體 pBlue-*naaar* 以 *Bam*HI 與 *Sac*I 作用切下 *naaar* 基因片段，接至 pBI131 質體，置換 GUS 基因，即為含有 *rbcS* 啟動子及 *naaar* 基因的植物轉殖載體 pKrnaaar (圖 1B)。

3. *globulin* 啟動子之 *naaar* 基因

將載體 pBlue-*naaar* 以 *Bam*HI 與 *Sac*I 作用切下 *naaar* 基因片段，接至 pKgSOD 質體，置換 SOD 基因，即為含有 *globulin* 啟動子及 *naaar* 基因的植物轉殖載體 pKgnaaar (圖 1C)。

4. *oleosin* 啟動子之 *naaar* 基因

將已完成構築之 pKcnaaar 以 *Bam*HI 與 *Eco*RI 切下 *naaar* 基因片段，黏合至 pKoSOD 置換 SOD 基因，即為含有 *oleosin* 啟動子及 *naaar* 基因的植物轉殖載體 pKonaaar (圖 1D)。

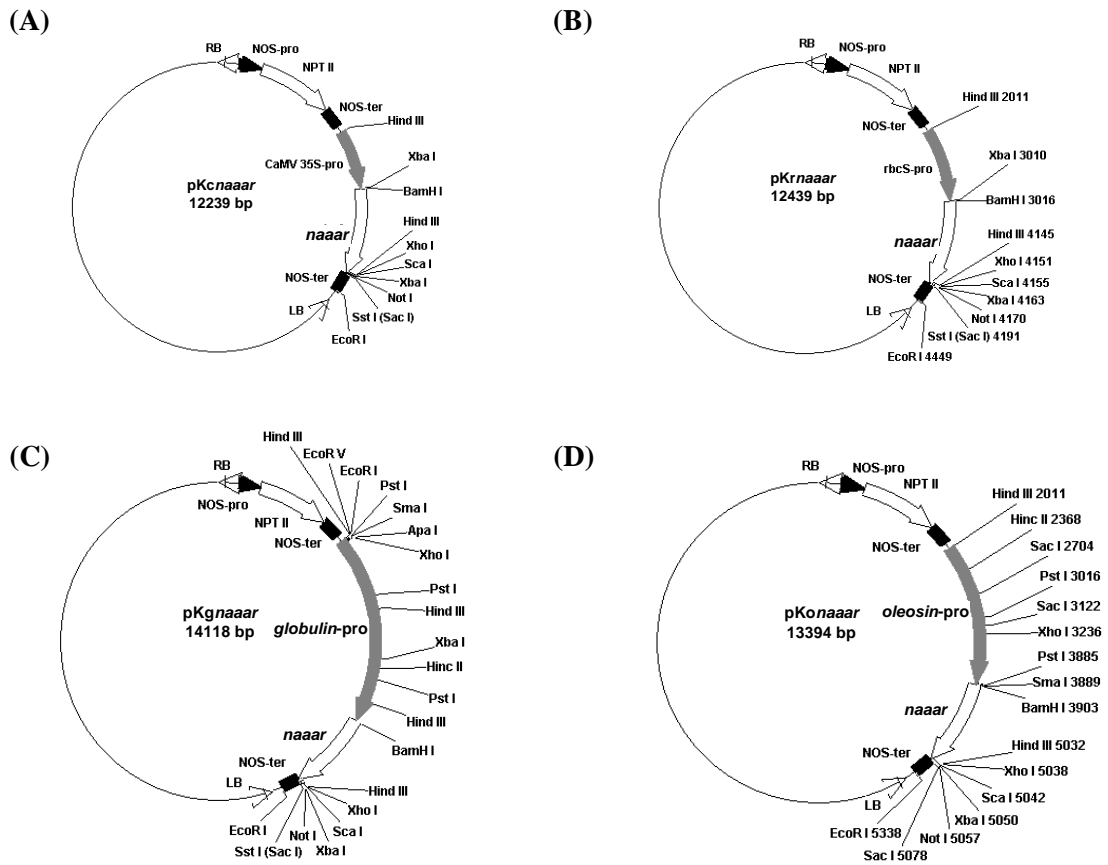


圖 1. 轉殖載體 pKcnaaar (A)、pKrnaaar (B)、pKgnaaar (C)與 pKonaaar (D)之限制酵素圖譜。pKcnaaar 攜帶以 CaMV35S 為啟動子的 *naaar* 基因。pKrnaaar 攜帶以 *rbcS* 為啟動子的 *naaar* 基因。pKgnaaar 攜帶以 *globulin* 為啟動子的 *naaar* 基因。pKcnaaar 攜帶以 *oleosin* 為啟動子的 *naaar* 基因。

Fig. 1. Restriction maps of pKcnaaar (A)、pKrnaaar (B)、pKgnaaar (C) and pKonaaar (D) vectors. The *naaar* gene driven by the CaMV35S, *rbcS*, *globulin*, and *oleosin* promoter was included in the pKcnaaar, pKrnaaar, pKgnaaar, and pKonaaar vector, respectively.

二、轉殖載體的分析

本試驗構築完成之轉殖載體分別為 pKcnaaar、pKrnaaar、pKgnaaar 與 pKonaaar，共有 4 個。載體構築完成後以限制酵素檢驗後，再經三親交配，將質體送入農桿菌中，以 PCR 檢測後，即進行基因轉移。

1. 轉殖載體構築完成後之確認分析

將構築完成的轉殖載體，分別以不同的限制酵素組合，進行切割，以電泳分離，觀察其構築的正確性。電泳分析結果確認構築之轉殖載體的正確性(data not shown)。

2. 三親交配後之農桿菌的轉殖載體之分析

將上述構築完成之植物轉殖載體，利用三親交配方式將其分別送至農桿菌 LBA4404 中，以 streptomycin 與 kanamycin 二種抗生素於 M9 培養基上進行農桿菌篩選。篩選後獲得之農桿菌，經 28°C 液體培養二天後，抽取質體 DNA，利用 PCR 方式檢驗獲得之農桿菌是否分別具有這些轉殖載體。分析結果顯示以 P402-1 及 P402-2 為引子及以在四種轉型之農桿菌的 pKcnaaar、pKrnaaar、pKonaaar 與 pKgnaaar 質體 DNA 為模板所進行之 PCR 反應都可偵測到 402 bp 條帶，與以 naaar 之 DNA(pQE30-naaar)為模板之結果相同，顯示四種農桿菌轉殖載體均攜帶有 naaar 基因(圖 2)。

三、naaar 基因轉殖到水稻

(一) 農桿菌感染及水稻再生

將培養 2~3 週(約 2~4 mm)之'台農 67 號'水稻癒傷組織，分別感染攜帶 pKcnaaar (CaMV35 啟動子)、pKrnaaar(*rbcS* 啟動子)、pKonaaar(*oleosin* 啟動子)與 pKgnaaar(*globulin*

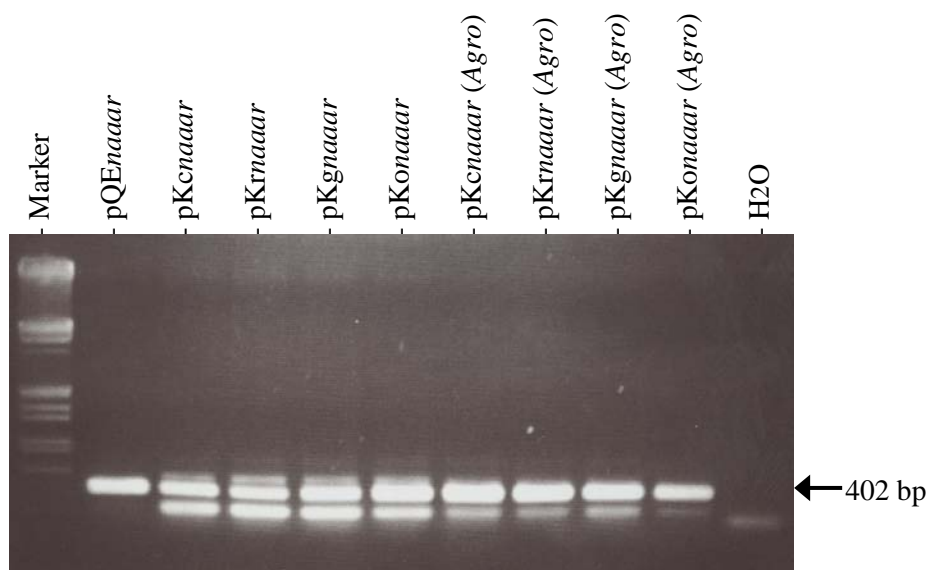


圖 2. 經三親交配後之農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404/ pKgnaaar、/pKonaaar、/pKcnaaar 及/pKrnaaar)，以 PCR 檢測 naaar 基因的情形。

Fig. 2. PCR analysis of *gus* gene in *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/ pKgnaaar, /pKonaaar, /pKcnaaar, and /pKrnaaar) after tri-parental mating. A partial fragment of *naaar* gene (402 bp) was amplified from a plasmid DNA and analyzed by electrophoresis. Agro: *Agrobacterium*.

啟動子)等質體的農桿菌。感染後將癒傷組織培養置於含有 500 ppm 之 carbenicillin 的 MS 再生培養基 (圖 3A)，並以 100 ppm G418 抗生素進行初次篩選，每二週繼代培養一次；待長出枝梢後 (圖 3B)，換至 250 ppm 之 carbenicillin 的再生培養基上，持續以 100 ppm G418 抗生素進行篩選，篩選約 2~4 週；待植株稍大後移至 MS 發根培養基上誘導發根並予以健化(圖 3C)，最後移至瓶外定植培養 (圖 3D)。大部分轉殖水稻，生長良好並抽穗(圖 3E)。本實驗共獲得具抗生素抗性之植株計有：pKcnaaar 有 20 株、pKrnaaar 有 40 株、pKgnaaar 有 50 株與 pKonaaar 有 76 株；再生率分別為 2.5%、5%、6.25%與 9.5%(表 1)，平均再生率為 5.8%。

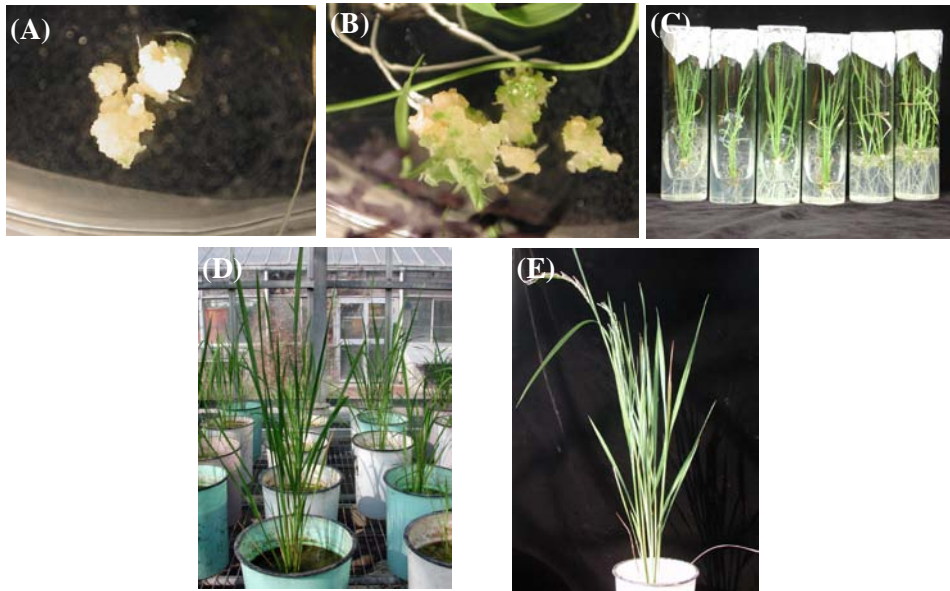


圖 3. '台農 67 號'水稻經農桿菌感染後再生之情形。(A)水稻成熟胚誘導之癒傷組織增生；(B)芽梢發生；(C)以 G418 篩選轉殖水稻植株；(D)定植；(E)抽穗。

Fig. 3. Regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) after *Agrobacterium* transformation. (A)Amplification of calli induced from the embryo of mature seeds; (B)shoot formation; (C)selection of transformed plantlets by G418, (D)regenerated plants, (E)spike.

表 1. 不同啟動子的 *naaar* 基因(pKcnaaar, pKrnaaar, pKgnaaar, pKonaaar)轉移至'台農 67 號'水稻癒傷組織，經誘導再生的情形。

Table 1. Regeneration of 'TN 67' rice from calli after transformation via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) transformed with pKcnaaar, pKrnaaar, pKgnaaar, pKonaaar harbouring with *naaar* gene driven by different promoters.

質體(啟動子) Plasmid (Promoter)	感染培植體數 No. of infected explants	再生植株數目 No. of regenerated plantlets resistant to G-418	再生百分率 Regenerated percentage (%)
pKcnaaar (CaMV35S)	800	20	2.5
pKrnaaar (<i>rbcS</i>)	800	40	5
pKgnaaar (Globulin)	800	50	6.25
pKonaaar (oleosin)	800	76	9.5

(二) 轉殖水稻植株之基因及蛋白表現分析

1. 聚合酵素連鎖反應(PCR)分析轉殖植株

萃取經 G418 篩選之再生水稻葉片之 DNA 作為模板，以 *naaar* 基因設計之引子(P402-1 及 P402-2)，進行 PCR 反應。若為具轉殖 *naaar* 之再生植株，在電泳膠片可顯現 402 bp 之條帶，而對照組與未轉移成功之植株則無此條帶。圖 4 為 PCR 反應檢驗轉殖 *naaar* 的轉殖水稻之電泳分析結果，顯示包括四種啟動子的 *naaar* 轉殖水稻植株葉片 DNA 均可偵測到預期之 402 bp 的 *naaar* 基因片段。經 PCR 初步篩選轉殖植株：轉移 pKcnaaar，共獲得 4 株轉殖水稻，轉殖率為 80%(4/5)；轉移 pKrnaaar，共獲得 14 株轉殖水稻，轉殖率為 74%(14/19)；轉移 pKgnaaar，共獲得 21 株轉殖水稻，轉殖率為 91%(21/23)；轉移 pKonaaar，共獲得 37 株轉殖水稻，轉殖率為 95%(37/39) (表 2)，四種質體之平均轉質率為 85%。

2. 南方墨點分析轉殖植株

經過 PCR 初步分析確認後，選取 PCR 正反應之'台農 67 號'水稻轉殖再生植株，萃取其基因組 DNA，以 *Bam*HI/*Sac* I 作用後，經電泳分離並轉漬至 Zeta-probe membrane(Bio-Rad) 後，以 *naaar* 基因片段(1.1 kb)為探針進行南方墨點雜交分析，其結果如圖 5 所示。試驗結果顯示轉殖 pKcnaaar、pKrnaaar、pKgnaaar 及 pKonaaar 的再生水稻，在 1.1 kb 的位

置均有雜交的訊號，而對照組及未轉移植株則沒有雜交訊號。但是有部份植株之雜交訊號非常弱，再將有正反應的植株進行北方墨點分析以檢測 RNA。

3. 轉殖植株之北方墨點分析

經過南方墨點分析後，選取南方墨點分析呈正反應之'台農 67 號'水稻轉殖再生植株的葉片，萃取其總 RNA，經電泳分離並轉漬至 Zeta-probe membrane (Bio-Rad)後，以 *naaar* 基因片段(1.1 kb)為探針進行北方墨點雜交分析。試驗結果顯示，在轉殖 pKcnaaar 或 pKrnaaar 的再生水稻葉片，在 1.1 kb 的位置均有雜交的訊號，而對照組未轉移植株則沒有雜交訊號(圖 6)。轉殖 pKgnaaar 或 pKonaaar 之轉殖植株的葉片 RNA 則沒有雜交訊號(data not shown)。

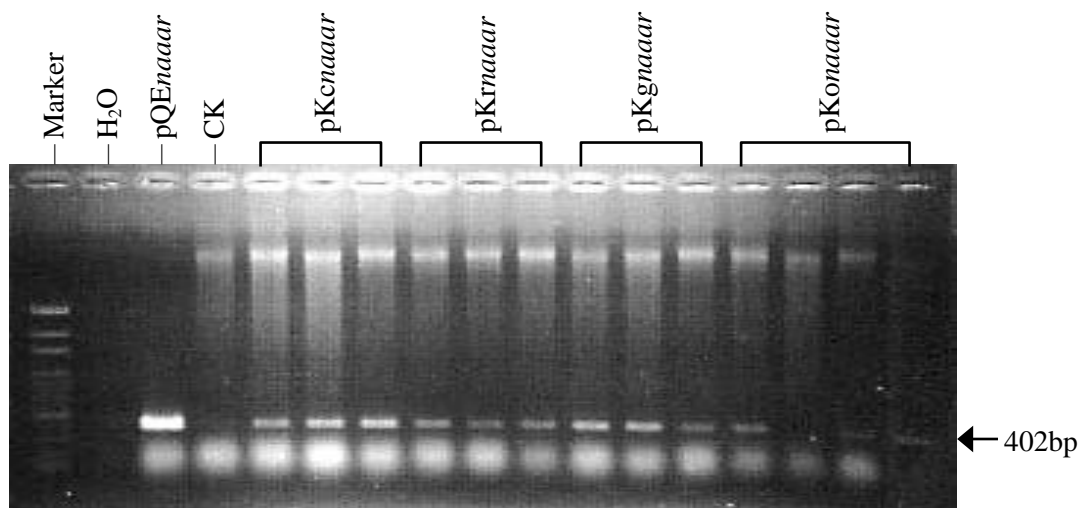


圖 4. 以農桿菌轉殖 *naaar* 基因之再生'台農 67 號'水稻植株，其 DNA 經 PCR 反應之產物在電泳膠片上分離 *naaar* 基因之情形。

Fig. 4. PCR analysis of the *naaar* gene in regenerated "TN67" rice after transformation of *naaar* gene via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) transformed with pKcnaaar, pKrnaaar, pKgnaaar, and pKonaaar. A partial fragment of *naaar*(402 bp) was amplified from a leaf DNA of regenerated rice and analyzed by electrophoresis.

表 2. 轉移具不同啟動子的 *naaar* 基因(pKcnaaar, pKrnaaar, pKgnaaar, and pKonaaar)的再生'台農 67 號'水稻，其葉片 DNA 經 PCR 反應，分析 *naaar* 基因之綜合結果。

Table 2. Transformation frequency of the *naaar* gene in regenerated 'TN 67' rice from calli transformation of *naaar* gene via *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain harbouring with *naaar* gene driven by different promoters.

質體(啟動子) Plasmid (Promoter)	檢測植株數 Tested Plants (A)	PCR 呈正反應之植 株數 PCR + (B)	轉殖率 Transformation frequency (B/A)
pKcnaaar (CaMV35S)	5	4	80%
pKrnaaar (<i>rbcS</i>)	19	14	74%
pKgnaaar (Globulin)	23	21	91%
pKonaaar (oleosin)	39	37	95%

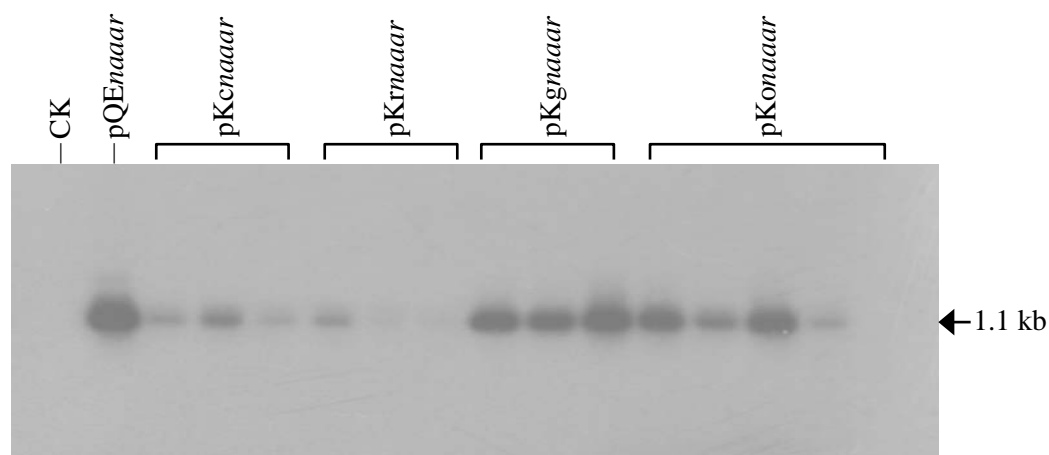


圖 5. 轉移具不同啟動子的 *naaar* 基因(pKcnaaar, pKrnaaar, pKgnaaar, and pKonaaar)的再生'台農 67 號'水稻，其葉片 DNA 經南方墨點雜交分析之情形。

Fig. 5. Southern analysis of the *naaar* gene in regenerated 'TN67' rice after transformation of *naaar* gene via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) transformed with pKcnaaar, pKrnaaar, pKgnaaar, and pKonaaar. The gene of *naaar* (1.1 kb) from a leaf DNA of regenerated rice was hybridized with isotope-labeled probe.

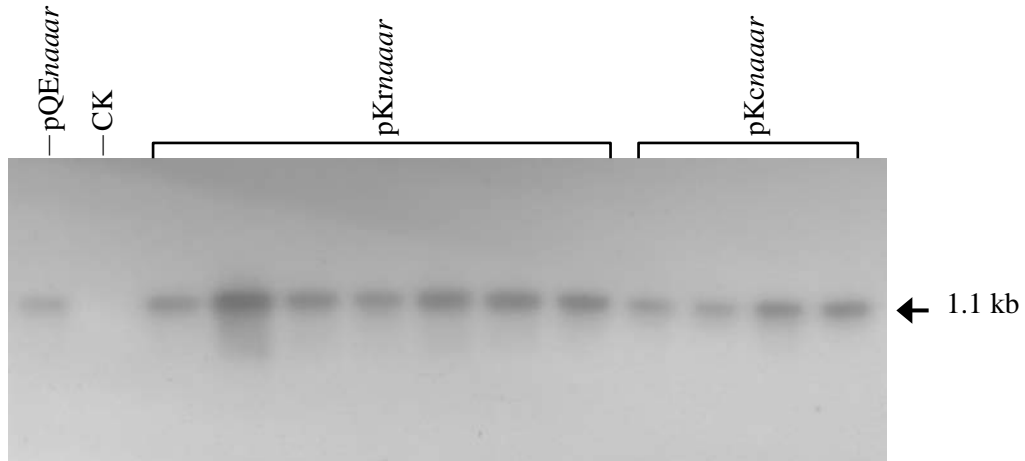


圖 6. 轉移具不同啟動子的 *naaar* 基因(pKcnaaar, pKrnaaar)的再生'台農 67 號'水稻，其葉片 RNA 經北方墨點雜交分析之情形。

Fig. 6. Northern analysis of the *naaar* gene in regenerated "TN67" rice after transformation of *naaar* gene via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) transformed with pKcnaaar, pKrnaaar. The transcript of *naaar* (1.1 kb) from a leaf RNA of regenerated rice was hybridized with isotope-labeled probe.

4. 轉殖植株之西方墨點分析

經北方墨點分析後，選取北方墨點呈正反應的'台農 67 號'水稻轉殖 pKcnaaar 及 pKrnaaar 再生植株葉片，萃取其可溶性蛋白質，經電泳分離並轉漬至 PVDF paper (Immobilon-P; MILLIPORE)後，以 1/10000 濃度的 N-acylamino acid racemase 一級抗體與 1/10000 濃度的 anti-rabbit IgG 二級抗體(AP conjugated)進行西方墨點分析。試驗結果顯示在選取之轉殖 pKcnaaar 或 pKrnaaar 的再生水稻葉片蛋白質，與純化之 racemase 蛋白質在同一位置(44 kDa)均有雜交的訊號(圖 7)，而對照組植株則沒有雜交訊號。本研究結果證實利用農桿菌基因轉殖法，可將 *naaar* 基因轉移到水稻染色體中，並表現 *naaar* RNA 及 racemase 蛋白，顯示以轉殖水稻來生產消旋酵素是可行的。

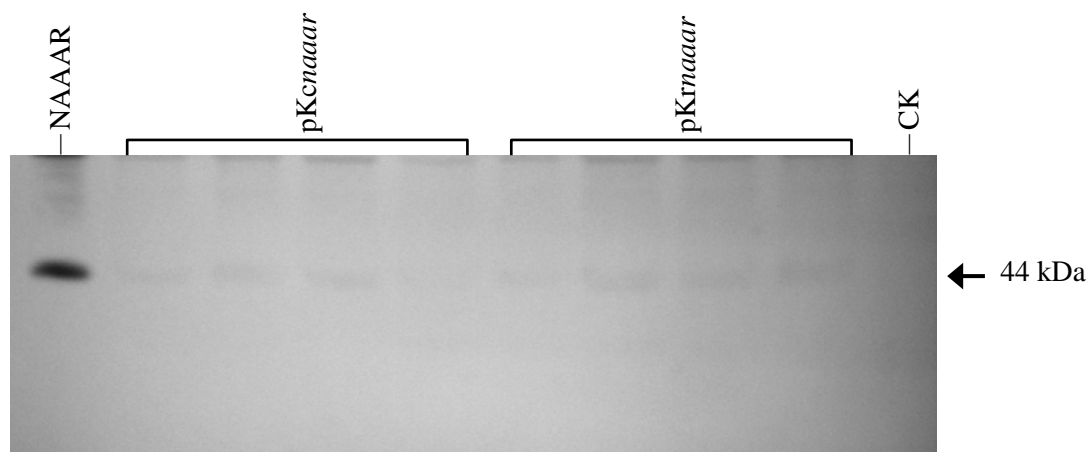


圖 7. 轉移具不同啟動子的 *naaar* 基因(pKcnaaar, pKrnaaar)的再生'台農 67 號'水稻，其葉片蛋白質經 native gel 電泳分析後，進行西方墨點分析之情形。

Fig. 7. Western analysis of the *naaar* gene in regenerated "TN67" rice via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404/pKcnaaar, /pKrnaaar) mediated transformation. The part of NAAAR from soluble protein of regenerated rice was reacted with anti-NAAAR antibody from rabbit.

討 論

本試驗將 *naaar* 基因黏接至分別具有 CaMV35S、*rbcS*、*globulin* 或 *oleosin* 啟動子的植物轉殖載體，成為 pKcnaaar、pKrnaaar、pKgnaaar 及 pKonaaar。四個質體以限制酵素切割後，確認所構築正確無誤。並以三親交配送入農桿菌中，以設計的二個引子 P402-1(*naaar* 基因, +136~+155)及 P402-1(*naaar* 基因, +537~+518)偵測 *naaar* 基因片段(402 bp)，經 PCR 檢測後，結果顯示基因確實存在農桿菌中(圖 2)。四個質體均具有 *npt II* 基因可抗 G-418，因此以 G-418 作為篩選轉殖植株之藥劑，可降低藥劑使用濃度與再生植株異常的機率 (Ayres and Park, 1994)。

以具有 pKcnaaar、pKrnaaar、pKonaaar 與 pKgnaaar 等 4 個質體的農桿菌，感染癒傷組織並培養誘導再生植株，均獲得具 G418 抗性之再生植株，4 種質體之再生率分別為 2.5%、5%、6.25%與 9.5%(表 1)，平均再生率為 5.8%。轉殖植株生長正常(圖 3)，並無 kanamycin 篩選之轉殖植株白化或異常之現象(Ayres and Park, 1994)。再生率較 Chan 等人(1993)所報導之 1.6%為高，但比 Hiei 等人(1994)的 10-30%為低。

轉殖之水稻再生植株，以設計之引子 P402-1(*naaar* 基因, +136~+155)及 P402-1(*naaar* 基因, +537~+518)偵測 *naaar* 基因，估計合成之 402 bp 片段。試驗結果顯示四種質體轉殖

植株均可偵測到 402 bp 的 *naaar* 基因片段，轉殖率介於 74%~95% (表 2)，四種質體之平均轉質率為 85%。本研究結果也顯示並非所有之植株均是轉殖植株，這與許多水稻轉殖再生系統的研究，發現以 *nptII* 作為篩選的系統易出現再生植株異常與偽陽性之情形相似 (Ayres and Park, 1994)。選取 PCR 呈正反應之'台農 67 號'水稻轉殖再生植株，進行南方墨點分析，結果顯示四種質體的轉殖再生水稻，在 1.1 kb 的位置皆有雜交的訊號，證實 *naaar* 基因確實已插入轉殖植株的染色體組 DNA 中，而對照組及未轉移植株則沒有雜交現象。部份植株訊號微弱，其原因有待進一步探討。

經南方墨點分析後，選取呈正反應之'台農 67 號'水稻轉殖植株的葉片，進行北方墨點分析。試驗結果顯示，在轉殖 pKcnaaar 或 pKrnaaar 的再生水稻葉片，在 1.1 kb 的位置均有雜交的訊號(圖 6)，而對照組未轉移植株及轉殖 pKgnaaar 或 pKonaaar 之轉殖植株的葉片 RNA 則沒有雜交訊號。再將北方墨點呈正反應之'台農 67 號'水稻轉殖 pKcnaaar 及 pKrnaaar 再生植株葉片之蛋白質，進行西方墨點分析。試驗結果顯示，轉殖 pKcnaaar 或 pKrnaaar 的再生水稻葉片蛋白質，與純化之 racemase 蛋白質在 44 kDa 位置均有雜交的訊號(圖 7)，而對照組植株則無雜交訊號。上述結果顯示，在營養組織中 CaMV35S 及 *rbcS* 啟動子的轉殖載體具有基因表現的能力，與 CaMV35S 啟動子常被用來當做植物基因的啟動子，在許多植物組織中有很高的表現 (Benfey and Chua, 1990)及 *rbcS* 啟動子被認為是植物中是最強且最有效率之啟動子相似。而 *globulin* 及 *oleosin* 啟動子的轉殖載體不具基因表現的能力，與 *globulin* 及 *oleosin* 啟動子之基因在種子表現有關(蘇, 1996)。本研究結果證實利用農桿菌基因轉殖法，可將 *naaar* 基因轉移到水稻染色體中，並表現 *naaar* RNA 及 racemase，顯示以轉殖水稻來生產消旋酵素是可行的。

參 考 文 獻

- 陳一男、曾夢蛟。2001。過量表現番茄 hsc70-2 基因於甘藍之研究。興大園藝。26(3): 29-42。
- 王建楠。2000。基層醫療高血壓診治案例分析。台灣醫界 143-1。
- 蘇基和。1996。水稻胚特有基因(pRE13, pRE15, pRE18, pRE24, pRE27, pRE16J)之分析與 pRE27 及 pRE16J 殖系之染色體組 DNA 之選殖與分析。國立中興大學分子生物學研究所碩士論文。102 P。
- Ayres, N. M. and W. D. Park. 1994. Genetic transformation of rice. Critical Rev. Plant Sci. 13: 219-239.
- Benfey, P. N. and N.-H. Chua. 1990. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. Science 250: 959-966.
- Brunner, H. R., J. Nussberger, and B. Waeber. 1985. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition: a clinical point of view. J. Cardiovasc Pharmacol. 7 Suppl 4: S73-81.

- Chan, M. T., H. H. Chang, S. L. Ho, W. F. Tong, and S. M. Yu. 1993. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Mol. Biol.* 22: 491-506.
- Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Sci Sinica.* 18: 659-668.
- DiBianco, R. 1986. Adverse reaction with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Med. Toxicol.* 1: 122-141.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282.
- Hu, H. Y., W. H. Hsu, and H. R. Chien. 2003. Characterization and phylogenetic analysis of a thermostable N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase from *Bacillus kaustophilus* CCRC11223. *Arch Microbiol.* 179 (4): 250-257.
- Nelson, E. B., J. L. Pool, and A. A. Taylor. 1986. Pharmacology of angiotensin converting enzyme inhibitors. A review. *Am. J. Med.* 81 (4c): 13-8.
- Rogers, S. G., H. Klee, M. Byren, R. B. Horsch, and R. T. Fraey. 1988. Improved vector for plant transformation: expression cassette vector and new selectable marker. *Method in Enzymology.* Academic Press.
- Wang, W. C., W. C. Chiu, S. K. Hsu, C. L. Wu, C. Y. Chen, J. S. Liu, and W. H. Hsu. 2004. Structural basis for catalytic racemization and substrate specificity of an N-acylamino acid racemase homologue from *Deinococcus radiodurans*. *J. Mol. Biol.* 342 (1): 155-169.
- Xie, Y., R. Lou, Z. Li, A. Mi, and Y. Jiang. 2000. DPAMPP in catalytic asymmetric reactions: enantioselective synthesis of L-homophenylalanine. *Tetrahedron: Asymmetry* 11: 1487-1494.
- Zhang, S., L. Chen, R. Qu, P. Marmey, R. Beachy, and C. Fauquet. 1996. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* 15: 465-469.

Studies on Transformation of N-acylamino Acid Racemase Gene (*naaar*) into the Rice (*Oryza sativa* L.)

Jiun-Lin Chen¹⁾ Wen-Hwei Hsu²⁾ Menq-Jiau Tseng³⁾

Key words: N-acylamino acid racemase genes (*naaar*), Rice, Gene transformation

Summary

In this study, N-acylamino acid racemase gene (*naaar*) isolated from *Deinococcus radiodurans* was constructed into plant transformation vectors driven by CaMV35S, *rbcS*, *globulin*, or *oleosin* promoter, and transformed into the 'TN67' rice (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) via *Agrobacterium*-mediated transformation. The frequencies of regeneration in the *naaar* transformed plantlets of four kinds of vectors were between 2.5% to 9.5%, the average of regenerated frequency is 5.8%. A 402 bp fragment of *naaar* gene could be amplified from 74% to 95% transformed rice plants among four kinds of transformants by PCR analysis. The results of Southern, Northern, and Western blot hybridization indicated that the *naaar* gene had been transformed and inserted into the chromosome of rice, expressed *naaar* mRNA and translated NAAAR protein. The data show the feasibility of using rice plants as bioreactor to produce high-value-protein to increase the economic value of rice.

1) Assistant Professor, Department of Landscape Architecture, ChungChou Institute of Technology.

2) Professor, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.