

開發基因轉殖水稻生產轉穀氨醯胺酵素 (Transglutaminase, TGA)之研究

劉穎¹⁾ 楊明德²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：水稻、轉穀氨醯胺酵素、生物反應器

摘要：轉穀氨醯胺酵素 (transglutaminase, TGA) 會使蛋白濃縮液形成膠體化，因此在食品加工上有相當高的應用價值及潛力；例如：在漢堡、肉丸、魚漿、豆腐、植物蛋白粉末等可以改善其彈性、質地、口感、風味，並可增加儲存壽命。本研究已完成將放線菌 *Streptomyces kentuckense* 中篩選出的轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*) 構築到植物轉殖載體，利用農桿菌轉移法將 pBI121-S.K-tga (CaMV35S 啟動子)、pBI131-S.K-tga (*rbcS* 啟動子)、pGlo-S.K-tga (*globlin* 啟動子)、pOle-S.K-tga (*oleosin* 啟動子) 等質體之 *tga* 基因轉移到'台農 67 號'水稻癒傷組織，並誘導再生成植株。四種組合之轉殖均已獲得再生植株，轉殖植株以 PCR、南方墨點、RT-PCR 及西方墨點雜交分析，其結果顯示 *tga* 基因已存在於轉殖之水稻植株基因組中，且可正確表現 *tga* mRNA，並表現出 TGA 酵素蛋白。

前 言

轉穀氨醯胺酵素 (transglutaminase，以下簡稱 TGase) 廣泛分佈於大部分的動物組織和體液，並且與許多生命現象有關，如血液凝固、傷口癒合、表皮角質化與紅血球細胞膜變硬等 (Aeschlimann and Pausson, 1994)。據報導，轉穀氨醯胺酵素也與細胞分化、生長和增生的調節有關。除了動物之外，轉穀氨醯胺酵素也存在於植物 (Icekson and Apelbaum, 1987)、魚類 (Araki and Seki, 1993) 及微生物 (Ando *et al.*, 1989) 中。轉穀氨醯胺酵素會使

1) 國立中興大學分子生物學研究所碩士班研究生。

2) 國立中興大學分子生物學研究所副教授。

3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

蛋白濃縮液形成膠體化，因此在食品加工上有相當高的應用價值及潛力 (Motoki and Segura, 1994)。例如：在漢堡、肉丸、魚漿、豆腐、植物蛋白粉末等可以改善其彈性、質地、口感、風味，並可增加儲存壽命。目前轉穀氨醯胺酵素大多自動物肝臟中分離純化取得，為鈣依存酵素 (calcium-dependent) (Kumazawa *et al.*, 1996)，需要有 Ca^{2+} 存在下方具有酵素活性，但由於來源取得不易且分離純化過程複雜，使得轉穀氨醯胺酵素的價格相當高，一單位約為八十美元，因此限制了其在食品加工上的應用。

傳統上從動物來源的 TGase 若要達到商業性量產的目標實在是不符合經濟效益的原則，於是從微生物著手，尋找能生產 TGase 的菌株以達到量產的目的。近年來則發現放線菌屬 *Streptovorticillium* sp. 和 *Streptomyces* sp. 能生產出微生物轉穀氨醯胺酵素 (microbial transglutaminase; MTGase)，也具催化 GL 鍵結 ϵ -(γ -glutamyl) lysine 形成的能力，其最大特徵是不具鈣依存性，即使在無 Ca^{2+} 存在下，也具酵素活性 (Motoki *et al.*, 1984)。中興大學分子生物研究所楊明德博士實驗室已由放線菌 *Streptomyces kentuckense* 中篩選出轉穀氨醯胺酵素基因 (*tga*)。我們希望藉由植物生物反應器來生產 TGase，使 TGase 更具安全性、符合經濟性，更能被廣泛使用。本研究乃嘗試將 *tga* 基因分別黏接至水稻種子特有之啟動子鹽溶性球蛋白基因 (*globulin*) 及油膜蛋白基因 (*oleosin*) 之啟動子與 CaMV35S 及 *rbcS* 啟動子上，利用農桿菌基因轉移的方式，轉殖到'台農 67 號'水稻中。本研究之目的為建立以轉殖水稻為生物反應器之系統，並探討利用水稻生產轉穀氨醯胺酵素之可行性。

材料與方法

一、植物試驗材料

本實驗所採用的植物材料為水稻 (*Oryza sativa* L. sub. japonica) '台農 67 號水稻' (TN67) 作為農桿菌基因轉殖的試驗材料。無菌播種是將水稻種子以 70% 酒精經 3 分鐘及商業漂白劑 2.5% Clorox，震動消毒 30 分鐘，再以無菌水洗滌四次藉以去除漂白劑。將消毒過的種子播在 NB 培養基 [N6 major salts, B5 minor salts and vitamins, 30g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 00 mg/L proline, 500 mg/L glutamine, 300 mg/L casein hydrolysate (pH5.8), 2.6 g/L phytigel] 中，26°C 黑暗培養 18-21 天。切取再生培植體的擬胚組織移至新鮮的 NB 培養基中，26°C 黑暗培養 10-15 天。

二、試驗方法

(一)、基因轉移的基因及組合

本實驗作為大豆基因轉移之基因是由 *Streptomyces kentuckense* 中篩選出的轉穀氨醯胺酵素基因 *tga*。其轉移的質體有以 CaMV35S 為啟動子的 pBI121-*tga*-His，以 *rbcS* 啟動子的 pBI131-*tga*-His，以 *globulin* 啟動子的 pGlo-*tga*-His 及以 *oleosin* 啟動子的 pOle-*tga*-His，等共有四種轉殖載體。轉殖的農桿菌品系為 *Agrobacterium tumefaciens*

(LBA4404)。

(二)、轉築載體之構築

1. pGEMT easy 之轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)

將由楊明德博士實驗室所贈之 pET21d-S.K-*tga* 以引子對 sktga-BamHI、sktga-His 增幅出 1.0 *tga* 片段，接至 pGEMT easy 質體上，即為含有 *Streptomyces kentuckense* 之轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)的轉殖載體 pGEMT-*tga*-His。

2. CaMV35S 啟動子之轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)

將 pGEMT-*tga*-His 以限制酵素 BamHI、SacI 切割，接至帶有 CaMV35S 啟動子的 pBI121 質體上，即為含有 CaMV35S 啟動子及 *Streptomyces kentuckense* 之轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)的轉殖載體 pBI121-*tga*-His。

3. *rbcS* 啟動子之轉穀氨醯胺酵素基因 (*tga*)

將 pGEMT-*tga*-His 以限制酵素 BamHI、SacI 切割，接至帶有 *rbcS* 啟動子的 pBI131 質體上，即為含有 *rbcS* 啟動子及 *Streptomyces kentuckense* 之轉穀氨醯胺酵素基因 (*tga*) 的轉殖載體 pBI131-*tga*-His。

4. Globulin 啟動子之轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)

將 pGEMT-*tga*-His 以限制酵素 BamHI、SacI 切割，接至帶有 globulin 啟動子的 pkGp7GUS 質體上，即為含有 globulin 啟動子及 *Streptomyces kentuckense* 之轉穀氨醯胺酵素基因 (*tga*) 的轉殖載體 pGlo-*tga*-His。

5. Oleosin 啟動子之轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)

將 pGlo-*tga*-His 以限制酵素 BamHI、EcoRI 切割，接至帶有 oleosin 啟動子的 pkOp7GUS 質體上，即為含有 oleosin 啟動子及 *Streptomyces kentuckense* 之轉穀氨醯胺酵素基因 (*tga*) 的轉殖載體 pOle-*tga*-His。

(三)、農桿菌基因轉移

將三親交配後所得的農桿菌接種於 50 ppm kanamycin 及 100 ppm streptomycin 之 M9 minimal medium，於 28°C 培養 18-36 小時 (OD₆₀₀ 0.8~1.0)。取此農桿菌液離心後以感染培養液 CCL 重新懸浮 [R2 major and minor salts, vitamins and iron source (Ohira *et al.* 1973), 2.5 mg/L 2,4-D, 10g/L glucose (pH5.2), 100 μM acetosyringone]。同時取 50-100 個 embryogenic nodular units 浸在 25ml 菌液中 10-15min。以滅過菌的紙巾吸乾，置於 CCS media [CCL, 7g/L agarose) 中，10 units/plate, 26°C 黑暗培養 3 天。移至含抗生素的 BCS 培養基 [Medium B, 30 g/L maltose, 1mg/l 2,4-D, 5mM Alanine, 10mM proline, 500 mg/L carbenicillin, 50mg/L G418, 2g/L gelrite (pH5.8)]，5-7 units/plate, 26°C，光週期 16hr，培養 14 天。此時 callus 轉成深棕色，表面有棕色透明小突起。將 callus 移到 BCR 培養基 [Medium B, 30g/l maltose, 30g/l sorbitol, 2 mg/L kinetin, 0.02mg/L NAA, 2.5mM (NH₄)₂SO₄, 250 mg/L carbenicillin, 50mg/L G418, 4 g/L gelrite (pH5.8)]。每 2 周更換一次培養基。長出乳白色分裂狀 callus，表面光滑乾燥。約一個月後芽稍再生並發根，將芽體移至 BCR 培養基直行瓶中，約 2 週健

化後移至瓶外培養。

(四)、DNA 的操作、轉殖植物之南方及北方墨點雜交、蛋白質電泳分析

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、探針備製、南方及北方墨點雜交分析、蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE) 等方法，參照陳與曾(2001)之方法。

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

利用 PCR 技術複製構築基因片段或用以偵測轉殖基因是否轉入水稻中。以轉殖水稻和未轉殖之對照組植株葉片 DNA (200 ng) 或目標基因為模版，PCR 反應量為 25 μ l，包含有 1 X reaction buffer (TaKaRa)、0.2 mM dNTPs、0.2 μ M primers 及 0.5 U Extag™ DNA polymerase (Toyobo, Japan)。反應時置於 DNA 聚合連鎖反應器 (Gene Amp PCR system 2400; Perkin Elmer) 中。偵測 *tga* 基因的引子為 5'-CATATGGACTCCGACGACAGGGTCCA CCCTCC-3' 及 5'-CTCGAGCGGCCAGCCCTGCTTTACCTTGTC-3'，反應的流程為 94°C，1 分鐘、52°C，1.5 分鐘、72°C，1.5 分鐘，共計 30 個 cycle。反應完畢後，取 5~8 μ l 終產物，於 1.2% 之洋菜膠上進行電泳分析。

(六)、轉殖植物之 TGA 酵素活性分析

TGA 酵素活性測定參考 Folk(1970) 之 colorimetric hydroxamate method，其反應液中含有 700 μ l 之 0.1 M triacetate buffer (pH 6.0)，50 μ l 之 2 M hydroxylamine，150 μ l 之 0.1 M N- α -carbobenzoxglycine (CBZ)，再與 100 μ l 之粗酵素溶液混合，於 37°C 水浴槽反應 10 分鐘後，加入 1ml 之 15% trichloroacetic acid - 5% FeCl₃ 溶液終止反應。以離心機 6,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液，以分光光度計 (Hitach U-200) 測定波長 525 nm 之吸光值。

結 果

一、構築植物轉殖載體

本試驗所使用之原始載體共計有：pBI121-GUS 此質體帶有 CaMV35S 啟動子及報導基因 *gus* (Clontech)，pBI131-GUS 此質體帶有 *rbcS* 啟動子及報導基因 *gus*，pKGp7GUS 此質體帶有 globlin 啟動子 (27G) 及報導基因 *gus*，pKOleGUS 此質體帶有 oleosin 啟動子 (16JG) 及報導基因 *gus*。以上的轉殖載體中均含有抗 kanamycin 之 *npt II* 篩選標誌基因，故構築及篩選過程中均可使用 kanamycin 進行篩選。轉殖載體的構築，主要是將篩選自 *Streptomyces kentuckense* 的 *tga* 基因 (*S.K-tga*) 經轉換至不同載體以獲得適當限制酵素切位後，再將基因插入上述載體中，置換 *gus* 基因，即為所構築之載體。構築完成之載體如圖 1 所示，包括：pBI121-*tga*-His (圖 1A)、pBI131-*tga*-His (圖 1B)、pGlo-*tga*-His (圖 1C)、pOle-*tga*-His (圖 1D)。四個載體經限制酵素及引子對確認後，進行三親交配將質體送入農桿菌中，再進行農桿菌基因轉移。

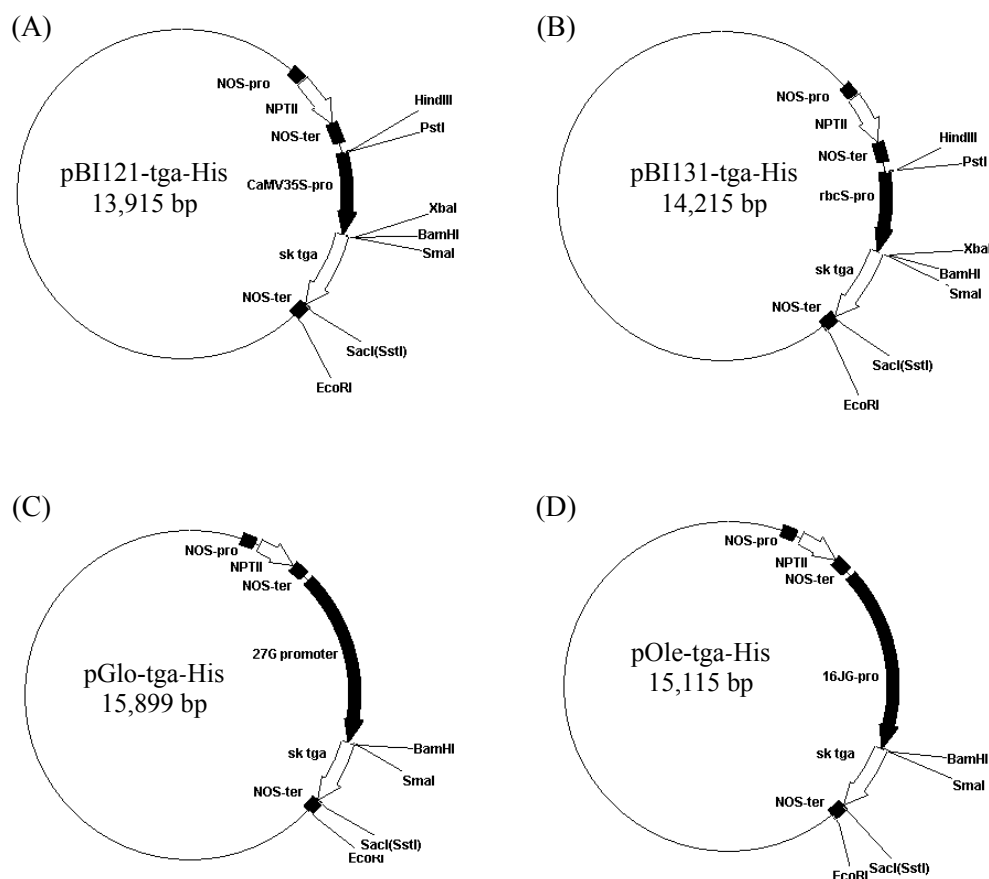


圖 1. pBI121-tga-His (A)、pBI131-tga-His (B)、pGlo-tga-His (C)及 pOle-tga-His (D)之限制酶圖譜。

Fig. 1. Restriction maps of the pBI121-tga-His (A), pBI131-tga-His (B), pGlo-tga-His (C), and pOle-tga-His (D).

二、轉穀氨醯胺酵素基因 (*tga*) 轉殖到水稻

(一)、農桿菌感染及水稻癒傷組織再生

水稻基因轉移的質體有以 CaMV35S 為啟動子的 pBI121-tga-His，以 rbcS 啟動子的 pBI131-tga-His，以 globulin 啟動子的 pGlo-tga-His 及以 oleosin 啟動子的 pOle-tga-His 等四種含 *tga* 基因之轉殖載體。'台農 67 號'水稻種子於無菌培養基中發芽 7 天後(圖 2A)，切取無菌苗之癒傷組織進行農桿菌感染(圖 2B)，感染後種植於 BCR 培養基(圖 2C)，每二週繼代一次。待誘導出癒傷組織後(圖 2D)，在相同的 BCR 培養基可誘導出芽體(圖 2E)。待芽梢抽長約 2~3 公分即可移至 BCR 直行瓶培養基上誘導發根並予以健化，最後移至瓶外溫室定植培養(圖 2F)。本試驗所得的大部分轉殖水稻，均生長良好可正常結穗 (圖 2G)。

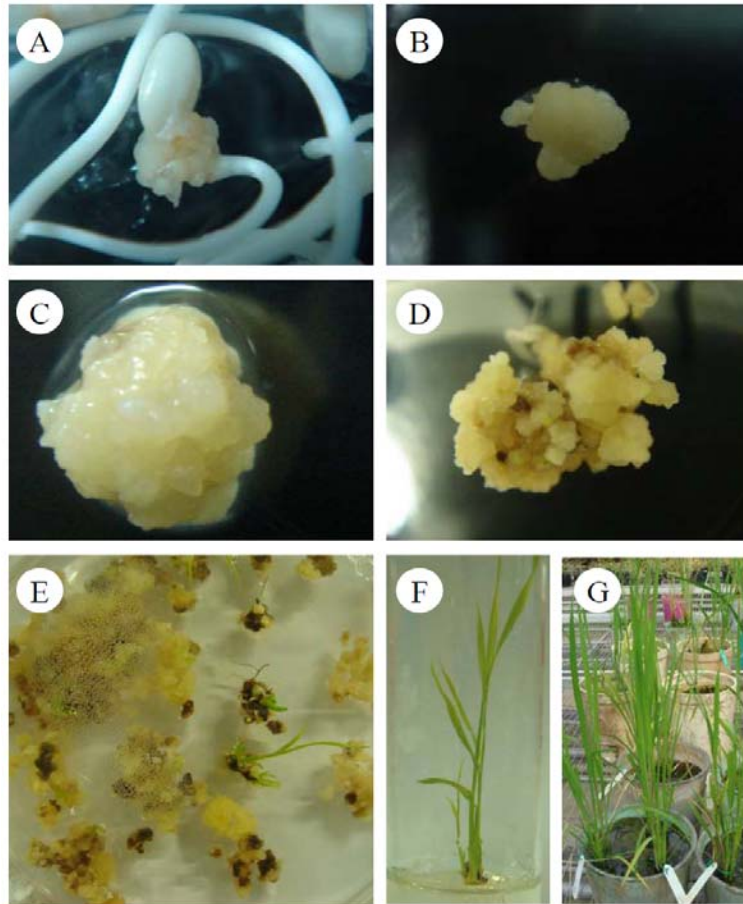


圖 2. '台農 67 號' 水稻經農桿菌感染後再生之情形。(A) 水稻種子於無菌培養基中發芽 7 天後之情形；(B) 無菌苗之癒傷組織；(C) 癒傷組織經農桿菌感染後之情形；(D) 感染後的癒傷組織增生；(E)、癒傷組織芽稍再生；(F) 於直行瓶內繼代培養誘導成株；(G) 溫室定植。

Fig. 2. Regeneration of 'TN No. 67' rice (*Oryza sativa* L. sub. japonica) after *Agrobacterium* transformation. (A) Rice seeds germinated *in vitro* in NB medium for 7 days; (B) The callus of TN67 rice; (C) Callus after inoculation with *Agrobacterium*; (D) Induction of callus formation; (E), Shoots regeneration from calli; (F) Subculture of rice plantlets; (G), Plants are transferred to the soil and grown to maturity in the greenhouse.

(二)、聚合酶連鎖反應分析轉殖植株

因為四種轉殖載體上均帶有 *nptII* 基因，因此先以 PCR 分析轉殖植株是否含有 *nptII* 基因，以輔助轉殖植株的篩選。圖 3 為以 PCR 分析轉殖水稻葉片之 *nptII* 基因的一個代表性例子，圖中顯示經電泳膠片分離 PCR 產物後，大多轉殖植株可獲得清晰、明顯的 *nptII* 片段 (0.35 kb)，但是有些轉殖植株的條帶則較淡或無，未轉殖植株則無條帶 (圖 3)。

萃取水稻轉殖植株葉片之 DNA，以 *tga* 基因特定設計之引子 (sktga-1 及 sktga-2)，進行 PCR 反應。若再生植株有轉殖之 *tga* 基因，則可在電泳膠片上顯現出 1.0 kb 之條帶，而對照組及未轉移成功之植株則無此條帶產生。經 PCR 初步篩選轉殖植株，共獲得 3 株 CaMV35S-*tga*-His 轉殖水稻、5 株 *rbcS*-*tga*-His 轉殖水稻，3 株 *Glo*-*tga*-His 轉殖水稻、3 株 *pOle*-*tga*-His 轉殖水稻。

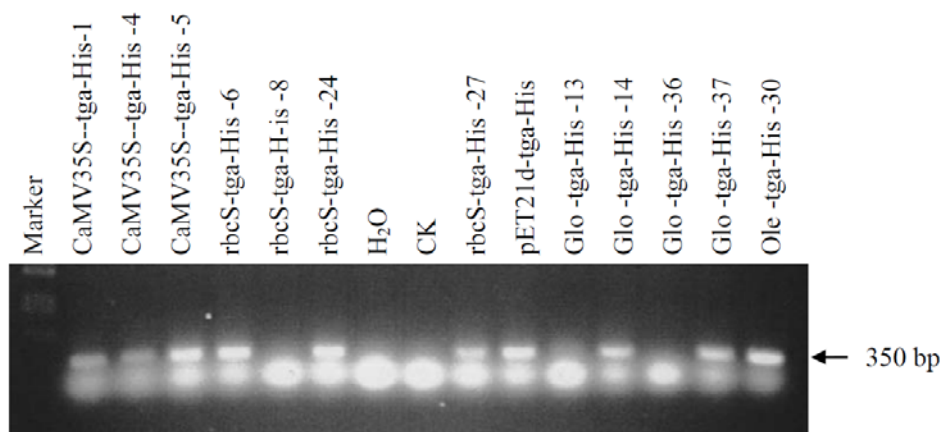


圖 3. 轉移 *tga* 基因之水稻葉片 DNA，經 PCR 反應，分析 *NPT II* 基因之情形。CK：未轉殖水稻。

Fig. 3. PCR analysis of *npt II* gene in transformed rice from leaf DNA. The part of *npt II* gene (350 bp) was amplified from a plasmid or DNA from plants and analyzed by electrophoresis. CK: non-transformed rice.

(二)、南方墨點雜交分析

選取 PCR 檢測為 *tga* 基因正反應之水稻轉殖植株，萃取其轉殖植株葉片之基因組 DNA，以 *Bam*HI/*Sac*I 限制酵素切割後，經 1.2% Agarose gel 分離轉漬至 Zeta-probe membrane 上，以 *tga* 基因為放射性探針，進行南方墨點雜交分析。結果如圖 4 中所示，轉殖水稻之 DNA 進行雜交反應後，在 1.0 kb 之位置均會出現雜交訊號，但是各轉殖植株間的雜交訊息的強弱有明顯的差異，對照組植株則沒有雜交訊號之出現，由此可得知，轉殖的 *tga* 基因已插入水稻之染色體組上。

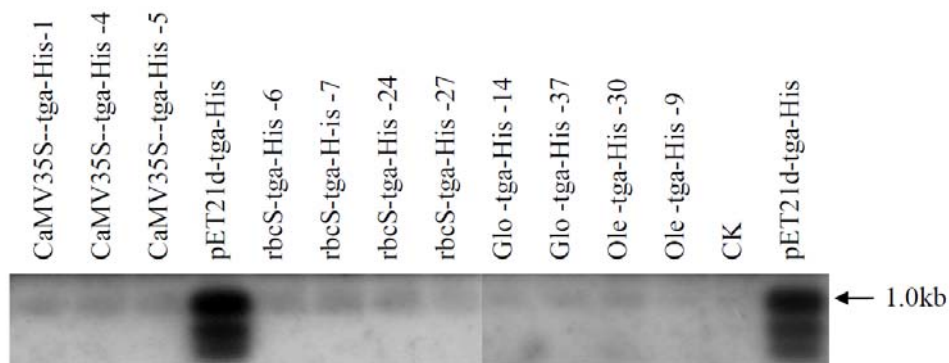


圖 4. 轉移 *tga* 基因之水稻葉片 DNA，經南方墨點雜交分析之情形。水稻葉片 DNA 以限制酵素 *Bam*HI/*Sac*I 進行切割，雜交時以 *tga* 基因片段為探針進行雜交反應。CK：未轉殖水稻。

Fig. 4. Analysis of *tga* gene in transformed rice by Southern blot hybridization. Plants DNA from each sample was digested with *Bam*HI/*Sac*I, and analyzed by electrophoresis. The ³²P-labelled *tga* fragment was added during the hybridization reaction. CK: non-transformed rice.

(三)、反轉錄聚合酵素連鎖反應分析

選取經 PCR 反應檢測以及經南方墨點雜交分析後，呈現正反應之水稻植株，萃取其葉片總 RNA，使用之 RT-PCR 系統為 Gene Mark One-Step RT-PCR Kit，進行反轉錄聚合酵素連鎖反應。最後取 10 μl PCR 反應產物以 1% agrose gel 進行電泳分離。結果顯示有預期 0.5 kb 的 *tga* 基因片段出現，而未經轉殖之對照組植株則沒有出現預期 0.5kb 的 *tga* 基因片段，因此推測 *tga* 基因已被轉移進入植物染色體組中，並能正常的表現 *tga* 基因之 mRNA (圖 5)。

(四)、西方墨點法分析

選取經 PCR、南方墨點雜交及北方墨點雜交分析為正反應之 *CaMV35S-tga-His*、*rbcS-tga-His*、*Glo-tga-His*、*pOle-tga-His* 轉殖水稻植株，萃取其葉片總蛋白質，經 SDS-PAGE 分離後，以濕式法將膠體上之蛋白質轉漬至 PVDF membrane 上，加入稀釋 10,000 倍之 polyclonal anti- transglutaminase 抗體，進行西方墨點分析 TGA 酵素在轉殖植株中之表現情形。試驗結果顯示，供試之 *Glo-tga-His* 轉殖水稻其葉片蛋白質在 37 kDa 的位置有雜交訊號出現 (圖 6)，其餘的轉殖植株則無，但有其他大小片段的明顯雜配訊號，對照組植株則沒有雜交條帶。結果顯示出轉殖的 *tga* 基因已經成功轉殖進入到水稻染色體，並能表現出 TGA 蛋白質。

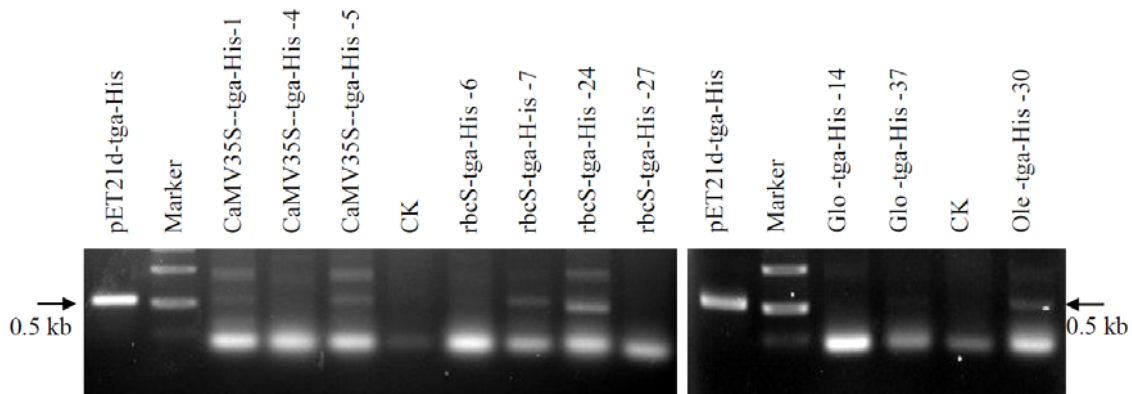


圖 5. 轉移 *tga* 基因之水稻葉片 RNA, 經反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 分析之情形。CK 對照組未轉殖水稻。

Fig. 5. Analysis of *tga* gene in transformed rice by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). CK: non-transformed rice.

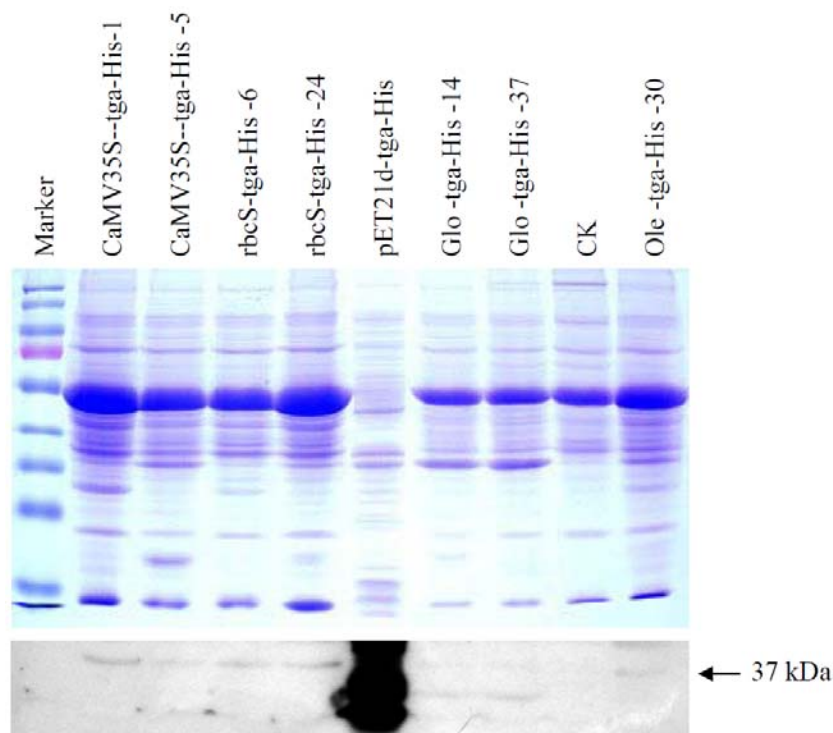


圖 6. 轉移 *tga* 基因之水稻葉片可溶性蛋白質經西方墨點雜交分析 TGA 蛋白質的情形。CK 對照組未轉殖水稻。

Fig. 6. Western blot hybridization of transglutaminase in leaves of *tga* gene transformed rice probe by rabbit polyclonal antitransglutaminase antibody. CK: non-transformed rice.

討 論

一、構築植物轉殖載體

在本研究中為了嘗試以植物來正確表現*tga*基因，且探討TGA蛋白是否可以大量累積於水稻細胞內，藉此改善*tga*基因在*E. coli*表現時因產生inclusion body所造成的可溶性及活性低落之問題，並增加作物的附加經濟效益。故在本試驗中特別利用CaMV35S、*rbcS*、*globlin*、*oleosin*等四種不同啟動子，以期能篩選到*tga*基因在水稻那些組織表現最佳的啟動子，作為開發以水稻為生物反應器生產TGA酵素之用。CaMV35S啟動子在許多植物細胞中均可具有很高的轉錄表現而成為植物基因轉移最常被利用之啟動子(Schöff *et al.*, 1987)。Rubisco為光合作用碳固定及光呼吸第一個步驟的酵素，為世界上產量最多的蛋白質，約佔植物可溶性蛋白的50% (Kung, 1976)，因此*rbcS*被認為受光誘導之強表現啟動子。植物內含有油膜蛋白比例最高的是種子及果實，其中由內質網累積的油膜蛋白受到相當完全的保護，並不會因為乾燥或是復水而受到破壞 (Napier *et al.*, 1996)。本次試驗所使用的球蛋白 (*globlin*)及油膜蛋白 (*oleosin*)為種子特異性表現之啟動子，期望可在水稻種子中大量穩定的表現TGA酵素，供商業化生產萃取TGA酵素。

二、轉穀氨醯胺酵素基因(*tga*)轉殖到水稻

水稻轉殖系統以農桿菌轉殖為主流，其主要原因為其操作方法簡易、便宜等優點 (Walden and Wingender, 1995)。提高基因轉殖效率一直是許多研究者的主要目標，而農桿菌的轉殖效能高低，往往與農桿菌、植物與環境三個因素間的交互作用有關。農桿菌之品系、植物種類、基因型、培植體年齡及外加物質等等，都對轉殖效率有及重大的影響 (Wordragen and Dons, 1992; Zambre *et al.*, 2003)。利用添加物來增進農桿菌轉殖效率研究中，主要的兩個方向為：促進轉殖相關基因的活化，及調整培植體之生理狀態。在許多研究中發現，*acetosyringone* (AS)與農桿菌 *vir* 基因活化有關。某些植物上 AS 能提高轉殖效率如 Di 等人 (1996)及 Yan 等人 (2000)的大豆基因轉殖、Yamada 等人 (2001)紅豆轉殖和 Voisey 等人 (1994)的首蓆轉殖上，使用 AS 均能有效提高轉殖效能

利用抗生素能有效篩選基因轉殖植物，是影響基因轉殖成敗的重要因子，除利用 GUS、GFP 等報導基因作為早期偵測基因轉移的成功與否外，尚可利用添加抗生素在組織培養過程中早期篩選轉殖植株。所以使用 *NPT II* 基因作為篩選標誌，仍是目前植物基因轉殖時最常使用的基因。本試驗中亦發現 G418 對再生植株發根會有所影響，許多再生植株在移入發根誘導培養基時，不但不會發根而且生長緩慢，株高幾乎沒有改變，只有葉片生長，經過一段時間後基部開始產生褐化、葉片黃化等情形，此與 Xing 等人 (1999) 所報導的結果相符。作者認為是沒有基因轉移成功之再生植株在含有 G418 之培養基中無法發根，此問題可經由在芽體誘導期進行抗生素篩選，在進入發根階段則不添加抗生素，可使轉殖植株順利發根。

在組織培養過程中，容易產生農桿菌復發的情形，所以將其以液態農桿菌共培養 30

分鐘的時間，縮短成 7~10 分鐘可有效降低農桿菌復發的機率。

本研究已經可以成功獲得轉移轉穀氨醯胺酵素基因之水稻再生植株，但是所需之時間仍然過長，至少需要三個月以上的時間才能移出瓶外培養，而且在組織培養過程中容易有農桿菌復發的情形發生，造成培植體生長緩慢甚至褐化死亡，此問題雖已由降低農桿菌濃度及共培養的時間獲得良好改善，但仍需更進一步試驗建立一套更適合'台農 67 號'水稻之農桿菌基因轉殖的再生系統，以提高再生率及縮短獲得基因轉殖植株的再生時間。

三、轉殖水稻植株之基因及蛋白表現分析

本研究經由 PCR、南方墨點、RT-PCR 的檢測，均可明確證實轉移之 *tga* 基因存在於水稻轉殖再生植株中。因此本試驗的轉殖植株，均會在進行南方墨點分析後才可確認是否為轉殖植株。以南方墨點法來檢測轉殖植株中的轉穀氨醯胺酵素基因，主要是進一步確認基因的完整性，且此方法為最直接證明 *tga* 基因是否有成功轉殖進植物的染色體內。本試驗以限制酵素 *Bam*HI 及 *Sac* I 進行水稻葉片 DNA 限制酵素切割後，進行南方墨點分析，均可獲得預期大小之基因片段之雜交訊號，顯示轉殖植株的染色體基因組中轉穀氨醯胺酵素基因的完整性，而對照組植株則無雜交訊號出現 (圖 4)，此結果證實 *tga* 基因已成功轉移到水稻轉殖植株的染色體基因組中。

水稻轉殖植株已偵測到 *tga* 基因之 DNA 後需更進一步確認其在 RNA 層次上之表現，以避免只是將基因轉入而不表現之情形發生，故進行 RT-PCR 藉此證明轉殖植株可以正常表現 RNA。本試驗亦獲得有些轉殖再生植株再南方墨點雜交時呈現正反應，在反轉錄聚合酵素連鎖反應分析時有出現預期片段 0.5kb，但有許多的雜訊(圖 5)。對於造成此種結果之原因，是否因為 DNA 插入時被甲基化、重組 (Benfey and Chua, 1989)、截斷 (Bate *et al.*, 1990)，有待進一步深入探討。

本研究中最主要之目的在探討轉穀氨醯胺酵素基因能在水稻植株中表現 *tga* 基因，並累積 TGA 蛋白酵素，故選取基因檢測呈現正反應的水稻轉殖植株，萃取其葉片可溶性蛋白質，進行西方墨點分析 TGA 蛋白在轉殖植株中表現之情形。結果顯示在部份轉殖植株的蛋白樣品在 37 kDa 的位置上有一雜交訊號出現 (圖 6)，顯示 *tga* 基因可以再轉殖植株中穩定的表現 TGA 酵素，但其餘植株則是有非 37 kDa 大小的明顯雜配訊號，是否為 TGA 蛋白，更待檢測。至於 TGA 酵素活性，尚待再進一步分析。

綜合本研究結果顯示轉穀氨醯胺酵素基因除了可利用植物體做表現外，更可以植物作為生物反應器，來生產具有商機、實用及安全性高之轉穀氨醯胺酵素之可能性。本研究之基因轉殖水稻中 TGA 酵素活性的產率是否符合經濟效益，尚待分析遺傳穩定的大量轉殖植株後裔才可得知。

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。
- Ando, Y., S. Imamura, M. K. Owada, T. Kakunaga, and R. Kannagi. 1989. Cross-linking of lipocortin I and enhancement of its Ca²⁺ sensitivity by tissue transglutaminase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 944-951.
- Araki, H. and N. Seki. 1993. Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 59: 711-716.
- Bate, G. W., S. A. Carle, and W. C. Piastuch. 1990. Linear DNA introduced into carrot protoplasts by electroporation undergoes ligation and recircularization. *Plant Mol. Biol.* 14:899-908.
- Benfey, P. N. and N. H. Chua. 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244: 174-181.
- Di, R., V. Purcell, G. B. Collins, and S. A. Ghabril. 1996. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep.* 15: 746-750.
- Folk, J. E. 1970. Transglutaminase in "Methods in Enzymology", Tabor, H. and Tabor, C. W. (ed.), Vol. 182, pp.586-601.
- Icekson, I. and Apelbaum, A. Evidence for transglutaminase activity in tissue. 1987. *Plant Physiol.* 84: 972-974.
- Kumazawa, Y., K. Nakanishi, H. Yasueda, and M. Motoki. 1996. Purification and characterization of transglutaminase from walleye pollack liver. *Fisheries Sci.* 62: 959-964.
- Kung, S. D. 1976. Tobacco fraction 1 protein: a unique genetic marker. *Science* 191: 429-434.
- Motoki, M. and Seguro, K. 1994. Trends in Japanese soy protein research. *Inform.* 5: 308-313.
- Motoki, M., N. Nio, and K. Takinami. 1984. Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1257-1261.
- Napier, J. A., A. K. Stobart, and P. R. Shewry. 1996. The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol. Biol.* 31: 945-956.
- Schöff, F., M. Rieping, and G. Baumann. 1987. Constitutive transcription of a soybean heat shock gene by a cauliflower mosaic virus promoter in transgenic tobacco plants. *Dev. Genet.* 8: 365-374.
- Voisey, C. R., D. W. R. White, P. J. Wigley, C. N. Chilcott, P. G. McGregor, and D. R. Woodfield. 1994. Release of transgenic white clover plants expressing *Bacillus thuringiensis* genes: an ecological perspective. *Biocontrol Sci. Technol.* 4: 475-481.
- Walden, R. and R. Wingender 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Trends*

- Biotechnol. 13(9): 324-332.
- Wordragen, M. F. and H. J. M. Dons. 1992. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. Plant Mol. Biol. Rep. 10: 12-36.
- Yamada, T., M. Teraishi, K. Hattori, and M. Ishimoto. 2001. Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 47-54
- Yan, B., M. S. S. Reddy, and G.B. Collins. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. Plant Cell Reports 19: 1090-1097
- Zambre, M., N. Terryn, J. Clercq, M. De., S. Buck, W. Dillen, M. Van Montagu, D. Van Der Straeten and G. Angenon. 2003. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium* to plant cells. Planta 216: 580-586.

Development of Transgenic Rice for Producing Transglutaminase

Yin Liu¹⁾ Ming-Te Yang²⁾ Menq-Jiau Tseng³⁾

Key words: Rice, Transglutaminase, Bioreactor

Summary

Transglutaminase (TGA) is an enzyme capable of stabilizing protein assemblies by gamma-glutamyl-epsilon-lysine crosslinks. The specific function of transglutaminase allows their biotechnological application in the foodstuffs industry: fish products (surimi), processed meat and sausages, chesses and yoghurt, ice creams, gelatines, chocolate etc. because food texture, firmness, elasticity, or fat and salt content can be modified. In this study, the *tga* gene isolated from *Streptomyces kentuckense* was constructed into plant transformation vectors driven by CaMV 35S, *rbcS*, oleosin, and globulin promoter. The constructed genes were transferred into 'TN67' rice callus via *Agrobacterium*-mediated transformation. The regenerated plants were primary selected by G418. The results of PCR, Southern, RT-PCR and Western hybridization analysis indicated that the *tga* gene was present in the genome of transformed rice, and expressed *tga* mRNA and TGA protein with enzyme activity.

-
- 1) Graduate student in M.S. Program, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.
 - 2) Associate Professor, Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University.
 - 3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.