

第二章 水稻 (*Oryza sativa* L.) 分泌性蛋白質 Osm30 的生化及功能分析

Biochemical and functional characterization of rice (*Oryza sativa* L.) Osm30 secretory protein

第一節 摘要

本研究自水稻的懸浮細胞培養液中，分離出一分子量為 30 kDa，且具有水解 glycol chitin 活性之蛋白質 (Osm30)。經由蛋白質 N 端胺基酸微定序分析及基因選殖的結果顯示，Osm30 為水稻的第 III 型幾丁質酶家族的一員。將 *Osm30* 基因轉形並表現於大腸桿菌時，可觀察到細菌生長被抑制的情形，推測 Osm30 可能具有溶菌酶的活性。在水稻細胞懸浮培養的過程中，*Osm30* 的 mRNA 會因繼代培養而有暫時性增加表現的情形，但其在細胞內的蛋白質含量則相對穩定，而在培養液中，Osm30 蛋白質則是隨著培養天數增加而持續累積，顯示 Osm30 蛋白質具有高度穩定性。當以四種病原真菌，包括：*Rhizoctonia solani*、*Sarocladium oryzae*、*Gibberella fujikuroi* 和 *Bipolaris oryzae*，感染水稻細胞時，均會誘導增加 *Osm30* 的表現量，顯示 Osm30 可能在水稻的抗菌防禦機制中扮演相關角色。甲基茉莉酸 (MeJA)、離層酸 (ABA) 和水楊酸 (SA) 為已知和植物防禦機制有關的生長調節劑，當以這些生長調節劑對水稻細胞進行處理時，MeJA 與 ABA 可誘導 *Osm30* 的表現，但是 SA 的處理則不影響 *Osm30* 的表現。此外，我們也在 *Osm30* 基因的起動子區域發現與 JA 和 ABA 相關的轉錄調控位。根據上述資料，我們推測 Osm30 為一具有幾丁質酶和溶菌酶雙重酵素活性的蛋白質，在水稻細胞內平常只有基礎量的表現，但當病原入侵時，可能經由 JA 或和 ABA 啟動的訊息傳遞途徑來激發 *Osm30* 的表現，以強化植物的防禦機制。

Abstract

A 30-kDa protein secreted by suspension-cultured rice cells (Osm30) was identified with activity of cleaving glycol chitin. Furthermore, data of amino acid microsequencing and gene cloning confirmed that *Osm30* is a member of rice Class III chitinase gene family. Over-expression of recombinant Osm30 in *E. coli* resulted in a retarded growth of the bacteria, suggesting Osm30 might possess lysozyme activity of the Family 18 glycosyl hydrolase. Upon transfer of rice cells to fresh culture medium, *Osm30* transcripts display a transient expression pattern in rice cells. However, Osm30 protein maintains a constant level in rice cells and is constitutively secreted into the medium. These results suggest that Osm30 protein is highly stable *in vivo* and *in vitro*. Inoculation of any of the four fungal pathogens, including *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Gibberella fujikuroi*, and *Bipolaris oryzae* can cause an elevation of the expression levels of *Osm30* in rice cells, indicating that Osm30 may play a role in plant defense mechanism against fungal infection. Among the growth regulators that are known to be involved in plant defense mechanisms, MeJA and ABA are able to upregulate the *Osm30* expression levels, but SA is not. In addition, there are several JA- and ABA-responsive *cis*-acting elements identified in the promoter regions of the *Osm30* gene. In summary, Osm30 appears to be a protein with both chitinase and lysozyme activities. Suspension-cultured rice cells express *Osm30* at a basal level prior to pathogen infection. Upon pathogen infection, rice cells raise the expression level of *Osm30*, probably via JA and/or ABA-initiated signal transductional pathway(s), to augment cellular defense mechanism.

第二節 緒言

經過長期的演化，植物衍生出多重防禦反應來抵禦病原菌的入侵，這些反應包括強化細胞壁結構、產生植物殺菌素 (phytoalexins)，及表現各種「病原相關蛋白質 (pathogenesis-related proteins, PR proteins)」。PR proteins 的基本特性是會受到病原菌的誘導而表現。此外，PR proteins 亦會受多種其他生物性和非生物性因子的影響：前者如誘引劑和植物生長調節劑；後者如乾旱、高鹽、受傷、和重金屬等環境因子 (Kasprzewska, 2003)。PR proteins 的表現是植物防禦機制中很重要的環節，部份 PR proteins，如 β -1,3-醣苷酶 (β -1,3-glucanase) 已被證實可水解病原菌的細胞壁成份，而直接抑制病原菌的生長 (Collinge *et al.*, 1993)；另有一些 PR proteins，如 PR-1、chitinase、osmotin、peroxidase、PR10、thionin 和 SAR8.2 等，則可參與植物的過敏反應 (hypersensitive reaction, HR) 和系統性抗病反應 (Systemic acquired resistance, SAR)，間接減緩病原菌在植物體內的擴張 (Ryals *et al.*, 1996; Lee and Hwang, 2005)。

在植物體內，幾丁質酶是 PR proteins 的成員之一，該酵素的主要受質為由乙醯葡萄糖胺 GlcNAc 組成的幾丁質。目前植物體內已知含有多種幾丁質酶的同功酵素，依據其水解受質的機制不同，這些幾丁質酶被分別歸類為醣苷水解酵素的第 18 或 19 族，而其中第 18 族的醣苷水解酵素除了具有幾丁質酶的特性之外，亦常含有溶菌酶 (lysozyme) 的活性 (Collinge *et al.*, 1993; Meins *et al.*, 1994)。

除了上述的分類之外，也有學者依其胺基酸序列的相似度和結構的特性，將植物的幾丁質酶區分為五型 (Collinge *et al.*, 1993; Neuhaus *et al.*, 1996; Patil *et al.*, 2000)；其中第 I、II 和 IV 型幾丁質酶的胺基酸序列相似度較高，且在作用機制的分類上，都被歸類為醣苷水解酵素的第 19 族成員 (Henrissat, 1991)。第 I 型幾丁質酶的 N 端含有一段長約 40 個胺基酸，且富含 cysteine 殘基的幾丁質鍵結區；第 II 型幾丁質酶缺乏 N 端的幾丁質鍵結區，但在其他區域的胺基酸序列，則與第 I 型幾丁質酶有高度相似性；第 IV 型幾丁質酶則保留有 N 端幾丁質鍵結區，且其他序列亦與第 I 型幾丁質酶相似，但是其中有四個區域發生胺基酸的缺失，導致其分子量比第 I 型幾丁質酶為小。植物的第 III 和 V 型幾丁質酶的胺基酸序列與第 I、II 和 IV 型幾丁質酶完全不同，然而卻與細菌和真菌的幾丁質酶序列有某種程度的相似性，並且都包含有兩段與酵素活性有關的保守序列：

「SXXG」和「DXXDXDXE」(Henrissat, 1991)；第 V 型幾丁質酶最早是在菸草分離出，胺基酸序列與細菌的幾丁質外切酶有局部的相似度，但其長度通常較植物第 III 型幾丁質酶為長 (Melchers *et al.*, 1994)。依照水解受質的機制，植物的第 III 和 V 型幾丁質酶都被歸類為第 18 族的糖苷水解酵素 (Collinge *et al.*, 1993)。

目前水稻幾丁質酶的相關研究多以第 I 型同功酶為對象 (Zhu and Lamb 1991; Kim *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Takakura *et al.*, 2000; Truong *et al.*, 2003; Rakwal *et al.*, 2004)。相較之下，第 III 型同功酶雖已有許多 EST clones 被鑑定出來 (Nagasaki *et al.*, 1997)，但進一步的基礎研究報導則仍十分有限。本研究於水稻分泌的蛋白質中，鑑定出 Osm30 是一個第 III 型的幾丁質酶，並針對其生化特性及生理功能進行分析探討。

第三節 材料與方法

一、植物材料與培養

(一) 水稻細胞的懸浮培養方法

水稻 (*Oryza sativa* L., cv. TN5) 的懸浮培養細胞是從水稻未成熟胚所誘導成的癒傷組織培養而來 (Yu *et al.*, 1991)。懸浮細胞的繼代培養方法，是將 1 ml 的水稻細胞加入於 49 ml 含 3% (w/v) 蔗糖和 10 μ M 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) 的 Murashige 和 Skoog (MS) 液態培養基 (Murashige and Skoog, 1962) 中，再移置於黑暗和 26°C 的培養箱中，以 120 rpm 轉速進行震盪培養，每週繼代培養一次。

(二) 真菌感染試驗

真菌感染試驗是以培養第七天的細胞為材料，取 5 ml 細胞加入 45 ml 新鮮的 MS 培養液，接著以接種針挑取真菌菌絲 (註)，包括：引發秧苗立枯病 (Sheath blight 又稱稻紋枯病) 的 *Rhizoctonia solani*、葉鞘腐敗病 (Sheath rot) 的 *Sarocladium oryzae*、稻徒長病 (Bakanae disease) 的 *Gibberella fujikuroi* 和胡麻葉斑病 (Brown spot) 的 *Bipolaris oryzae*，分別接種入培養液中。培養 12 小時後，收集細胞並萃取其 RNA，以進行北方轉漬分析。另外也收集真菌感染實驗第 3 天的細胞培養液，進行西方免疫轉漬分析。

註：感謝農業試驗所張義璋研究員提供以上菌株，並指導真菌的培養方法。

真菌的培養與保存

以接種針挑取含菌絲的洋菜膠塊或菌核，放置於 PDA 培養基 (附錄三) 上，於室溫下，光照培養 3-4 天，直至菌絲佈滿培養皿。保存於 4°C 冰箱中，每兩週繼代培養一次。

(三) 各種植物生長調節劑的處理

各種植物生長調節劑的試驗，是在繼代培養 6 小時後的水稻細胞，分別加入水楊酸 (SA)、甲基茉莉酸 (MeJA) 和離層酸 (ABA) 至其最終濃度分別為 300 μM 、30 μM 和 50 μM ，並以等體積的酒精溶劑處理為對照組，分別在處理 0、6、18 和 30 小時後，收集細胞，以進行 RNA 的萃取與北方轉漬分析。

二、水稻分泌性蛋白質的收集與蛋白質 N 端胺基酸微定序

(一) 水稻分泌性蛋白質的收集與定量

1. 蛋白質的收集

收集七天齡水稻細胞的培養液，加入硫酸銨至 80%飽和度，以沉澱濃縮蛋白質。之後，將該蛋白質樣品回溶至含 20 mM Tris-Cl, pH 6.8 和 10 mM NaCl 的溶液中，此即「AmS」樣品。針對水稻懸浮培養第七天的培養液，我們也收集硫酸銨濃度為 60-80%飽和度時沉澱的蛋白質樣品，在以低鹽溶液 (20 mM Na-acetate, pH 5.2, 10 mM NaCl) 回溶後，於相同的低鹽溶液中，在 4°C 下進行透析，隨後以 Pharmacia 的 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system 用 Mono S column (Amersham Pharmacia 17-0547-01) 進行離子交換反應。不吸附於 Mono S 管柱而直接流出的蛋白質樣品，即視為「MonoS-」樣品。

2. 蛋白質的定量

採用 Bradford (1976) 的方法，將蛋白質樣品經適當稀釋使其最後體積為 1 ml，再加入等量之 Bradford 試劑 [0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250, 4.7% (v/v) ethanol, 8.5% (v/v) phosphoric acid]，混合均勻後，於室溫下靜置 10 分鐘，隨後測定溶液在波長 595 nm 之吸光度 (A_{595})。蛋白質含量的計算方式是先利用已知濃度 (5-25 $\mu\text{g/ml}$) 之牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 與

Bradford試劑進行反應，並依其結果繪出標準曲線圖，再藉此標準曲線推算其他樣品之蛋白質含量。

(二) 蛋白質 N 端胺基酸微定序

胺基酸微定序分析是將蛋白質樣品加入適量的 SDS sample buffer [62.5 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.025% (w/v) bromophenol blue] 後，進行 12% (w/v) SDS-gel 電泳分離 (Laemmli, 1970)，隨後將電泳分離的蛋白質轉漬至 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上，並外送以 ABI 477A/120A protein/peptide sequencer 進行 N 端的胺基酸微定序。詳細步驟如下：

1. 蛋白質的電泳分析

(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

製備電泳膠片：

- (1) 組裝鑄膠器 (Hoefer)，以製備 4 片 0.75-mm 厚的 12% SDS polyacrylamide gel (12% separating gel, 4% stacking gel)。
- (2) 注入 12% separating gel [每 30 ml，取 10.1 ml H₂O, 7.5 ml 1.5 M Tris-Cl, pH 8.8, 0.3 ml 10% (w/v) SDS, 12 ml 30% (w/v) acrylamide, 150 µl 20% (w/v) ammonium persulfate (APS), 15 µl N,N,N,'N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)] 後，於膠液上方注入 150 µl water-saturated *n*-butanol，約 40 分鐘後聚膠完成，倒掉 *n*-butanol，以去離子水沖洗。
- (3) 插入 10-well comb，注入 4% stacking gel (每 20 ml，取 12.2 ml H₂O, 5 ml 0.5 M Tris-Cl, pH 6.8, 0.2 ml 10% SDS, 2.7 ml 30% acrylamide, 100 µl 20% APS, 10 µl TEMED)，約 40 分鐘後聚膠完成，以濕紙巾和保鮮膜包裹後置於 4°C 冰箱保存。

電泳：

- (1) 將已聚膠之膠體組裝於垂直電泳槽 (Hoefer Scientific Ins., Mighty Small II SE250)，拔掉 comb，並且注入 SDS running buffer [25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3]，及確定電泳槽不滲漏。

- (2) 將待測之蛋白質樣品及蛋白質分子量標準品 (BDH 442642L) 溶入 SDS sample buffer，置於沸水浴中加熱 3 分鐘，將蛋白質樣品分別注入樣品槽中。
- (3) 插上電源供應器，以固定電壓 120 伏特進行電泳，直到染劑達膠片底部約 0.5 公分處。

蛋白質電泳膠片的染色方法：

- (1) 小心地將完成電泳的膠片取下，置於 CBB 染劑 [0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), 50% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid] 中染色 30 分鐘。
- (2) 30 分鐘後，將染劑倒掉 (可過濾回收再使用)，加入 25 ml 一級退染液 [50% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid] 退染約 10 分鐘後，換成 25 ml 二級退染液 [5% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid]，直至蛋白質色帶均能清楚顯示。
- (3) 將退染後的膠片置入膠體保存液中 [4% (v/v) glycerol, 5% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid] 約 30 分鐘，將膠片夾入兩層年糕紙中間，以口字形護膠板和文書夾固定之，將其置於抽風櫥中乾燥後，即可取下保存。

2. 電泳轉漬 (Electroblotting)

小心地將完成電泳的電泳膠片取下，放在一層 PVDF 上方 (免疫染色分析時則是使用硝化纖維膜)，膠片上方與 PVDF 下方各放一層濾紙，以海綿片與轉漬夾將其固定後，放入含 Electroblotting buffer [25 mM Tris, 200 mM glycine, 20% (v/v) methanol] 的轉漬槽 (Hoefer Scientific Ins., TE22) 中，以固定電壓 40 伏特進行電泳轉漬 30 分鐘。

將 PVDF 膜取出，以 CBB 染劑 [0.2% (w/v) CBB R-250, 50% (v/v) methanol] 染色 1-3 分鐘後，以 50% (v/v) methanol 沖洗多餘的染劑後，再以無菌水清洗膜，隨後置於無菌操作台上風乾。隨後切下欲定序的蛋白質片段，以進行蛋白質的 N 端胺基酸微定序。

三、幾丁質酶的膠體活性分析 (Zymogram)

膠體上幾丁質酶的活性染色是利用含 0.1% (w/v) glycol chitin 的 8% native gel [8% (w/v) acrylamide:bisacrylamide (29:1), 25 mM NaHCO₃, pH 10] 來進行分析。在樣品槽中注入蛋白質樣品後，以固定電壓 125 V 進行電泳 1.5 小時。電泳完成後，將膠片以 50 mM 醋酸鈉緩衝液 (pH 5.0)，在室溫下以 50 rpm 轉速搖洗 20 分鐘，並在更換醋酸鈉溶液後，置於 37°C 下進行反應兩小時，隨後按照 Morimoto *et al.* (1997) 的方法，以 0.1% (w/v) 剛果紅染劑進行染色 15 分鐘後，再以 1 M NaCl 終止反應。

四、Osm30 cDNA 的 PCR 選殖及序列分析

本實驗室先前已完成繼代培養後第五天的水稻懸浮培養細胞 cDNA library (λ TriplEx, Clonetch 6162-1) 的建構 (李, 1997)。利用 Sambrook *et al.* (1989) 的方法萃取 cDNA library 的 λ DNA，以做為 PCR 反應之模板。Osm30-F 引子 (5'-CTCGGATCC ATG GCT GCT AAT AAG CTC -3'，底線為 *Bam* HI 切點，ATG 為轉譯起始密碼) 和 Osm30-R 引子 (5'-CTCAAGCTT GAC GCT GCT CTT CAC CTG -3'，底線為 *Hind* III 切點) 可將相當於水稻 Os01g47040 基因之 coding sequence (CDS) 片段選殖出。

(一) λ DNA 之萃取

1. 以接種環挑取大腸桿菌 XL1-Blue MRA (P2) 單一菌落，接種於 200 ml LB/MgSO₄ 培養液中，於 37°C 下，以 200 rpm 震盪培養過夜。
2. 加入 8 ml 噬菌體溶液 (amplified cDNA library) 後，於 37°C 下，以 200 rpm 震盪培養 10 分鐘。
3. 每 25 ml phage/*E. coli* 溶液加入含有 250 ml LB/MgSO₄ 的 1-L 錐形瓶中，共八瓶。於 37°C 下，以 200 rpm 震盪培養過夜。
4. 加入 chloroform 至終濃度為 2% (v/v)，於 37°C 下，以 200 rpm 震盪反應 10 分鐘。將噬菌體溶液倒入 500-ml 離心管中，離心 (4,000 g) 10 分鐘，保留上清液。
5. 加入 0.2 ml RNase A，於室溫下攪拌 30 分鐘後，加 NaCl 至其最終濃度為 1 M，於 4°C 下，攪拌 1 小時。隨後離心 (11,000 g) 10 分鐘，保留上清液。

6. 加入 PEG8000 至其最終濃度為 10% (w/v)，於 4°C 下，攪拌 1 小時或至完全溶解。隨後離心 (11,000 g) 10 分鐘，保留沉澱物。
7. 以 20 ml 1X λ dilution buffer (0.1M NaCl, 10 mM MgSO₄, 35 mM Tris, pH 7.5, 0.01% gelatin) 回溶噬菌體後，加入等體積的chloroform，劇烈震盪 30 秒。隨後離心 (4,000 g) 15 分鐘，保留上層液。
8. 每 1 ml 噬菌體溶液加入 0.75 g CsCl，溶解後，分裝至兩個超高速離心管，於溶液上方補滿礦物油，並秤重平衡後，用熱熔器將離心管封口。
9. 以超高速離心機 Beckman L8 ultracentrifuge Ti 70.1 rotor，於 20°C 下，以 38,600 rpm 轉速離心 24 小時。
10. 離心完成後，以 5-ml 無菌針筒將白色的噬菌體層吸取出，並放入透析袋內，以 500 ml STM 透析液 (10 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂) 進行透析 3 小時，每小時更換一次透析液。
11. 將噬菌體溶液吸取出，並加入 0.5 M EDTA 至其最終濃度為 20 mM，隨後加 20 mg/ml proteinase K 至其終濃度為 50 μ g/ml，加 10% SDS 至其終濃度為 0.5%，混合均勻後，置於 50°C 反應 1 小時。
12. 以等體積 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 和 chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 各萃取 λ DNA 一次，以 5,000 g 離心 5 分鐘後，保留上層液。
13. 加入 1/10 體積 3 M 醋酸鈉溶液 (pH 7.0)，及 2.5 倍體積之酒精，混合均勻後可看見白色絲狀物。
14. 將絲狀物勾出放至 1 ml 75% 酒精中，以 16,000 g 離心 5 分鐘後，保留沉澱物，再以 100% 酒精清洗沉澱物一次，隨後將 λ DNA 風乾。
15. 以 0.5 ml TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA) 回溶 λ DNA，並取一小部分稀釋 1000 倍後，以 Pharmacia GeneQuant II 光度計測定其 A₂₆₀ 與 A₂₈₀，並計算 DNA 濃度。

(二) 聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)

加入 1 μ l 模板 DNA (1-10 ng λ DNA)、2 μ l 10X Taq buffer、1 μ l 10 μ M 5'端引子、1 μ l 10 μ M 3'端引子、0.4 μ l 10 mM dNTPs、0.5 μ l Taq DNA polymerase (2 U/ μ l)，以無菌水調整至總體積 20 μ l。

PCR 的條件依序為 95°C/5 min, 95°C/45 s、57°C/30 s 和 72°C/70 s 十次循環，及 95°C/45 s、55°C/30 s 和 72°C/70 s 二十次循環，最後再以 72°C 反應 10 分鐘。

將 PCR 獲得 Osm30 的 cDNA 片段，以限制酵素切割後，轉接至 pBluescript II (KS+) 載體 (pBS)，並轉形至大腸桿菌株 XL1-Blue，隨後外送生技公司進行 DNA 定序分析。

(三) 限制酵素反應

分別取適量的載體 DNA (vector) 及欲殖入的 DNA 片段 (insert)，加入合適的限制酵素緩衝液，再以 DNA (μg) : 酵素 (units) = 1 : 5 的比例，加入適量限制酵素，並以無菌水補足總體積，混合均勻後，置於 37°C 水浴中，反應 1 小時以上。

(四) DNA 的電泳分析

1. 製備瓊脂膠體：秤取 0.4 g 瓊脂 (agarose)，加入盛有 40 ml TAE buffer [40 mM Tris-acetate, 1mM M EDTA, pH 8.0] 的 125-ml 錐形瓶內，將錐形瓶蓋上保鮮膜，置於微波爐中加熱使瓊脂溶解。
2. 待膠體冷卻至約 50-60°C 時，加入 2 μl 10 mg/ml Ethidium bromide (EtBr)，混合均勻後倒入鑄膠器聚膠 30 分鐘以上。
3. 將膠體放入水平電泳槽 (Hybaid 038916) 內，加入 TAE buffer 至蓋過膠體。
4. 在欲分析的 DNA 樣品中加入 1/5 倍體積的 6 X DNA loading buffer [0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol, 30% (v/v) glycerol in H₂O] 後，注入膠體樣品槽中，隨後在陽極槽內加 5 μl EtBr (10 mg/ml)，以固定電壓 100 伏特進行電泳分離 1 小時。
5. 在紫外燈下觀察電泳分離結果，並且以熱感應照相裝置照相。

(五) 以離心管柱純化瓊脂膠體內的 DNA

(Viogene gel extraction kit, EG1001)

1. 以一乾淨的刀片自瓊脂膠片上將載體 DNA 及欲殖入的基因片段切下，分別放入微量離心管中。

2. 各加入 0.5 ml Buffer GEX 後，將此管置於 60°C 水浴中反應 10 分鐘，使膠體完全溶解。
3. 將以上的樣品加入於 DNA 純化管柱中，離心 (16,000 g) 1 分鐘。倒掉 2-ml 收集管內之溶液，將管柱放回同一收集管。
4. 加 0.5 ml Wash I Buffer 至管柱內，隨後離心 (16,000 g) 1 分鐘。倒掉 2-ml 收集管內之溶液，將管柱放回同一收集管。
5. 加 0.7 ml Wash II Buffer 至管柱內，離心 (16,000 g) 1 分鐘。
6. 倒棄收集管內的溶液，並且再度離心 (160,000 g) 1 分鐘。
7. 將管柱放入一乾淨的 1.5-ml 微量離心管內。
8. 取 30 μ l 無菌水加入管柱中，靜置 1 分鐘後，離心 (16,000 g) 1 分鐘。
9. 以 Pharmacia GeneQuant II 光度計測定純化之 DNA 濃度。

(六) DNA 之接合反應

取 0.1 μ g 酵素切割完全的質體 DNA，再加入適量之 insert DNA，使 insert DNA : plasmid vector 的分子數比約為 3 : 1 ~ 10 : 1。之後，加入 2 μ l 10X T4 DNA ligase buffer [1X T4 DNA ligase buffer: 50 mM Tris-Cl, pH 7.8 at RT, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g/ml BSA]，0.2 μ l T4 DNA ligase (NEB)，並加水使其總體積為 20 μ l。將以上樣品置於 16°C 水浴中過夜進行接合反應。反應完成後，置於 65°C 下處理 10 分鐘，以去除 T4 DNA ligase 之酵素活性，並備為細菌轉形 (transformation) 時使用。

(七) 細菌的轉形

1. 勝任細胞的製備

以接種環挑取大腸桿菌 XL1-Blue (註) 單一菌落，接種於 5 ml 含有 15 mg/l tetracycline 的 LB/tet 培養液，於 37°C 以 200 rpm 震盪培養 12-16 小時。隨後將菌液倒入含 500 ml LB/tet 培養液的 2-L 錐形瓶內，繼續於 37°C 以 200 rpm 震盪培養 4-6 小時，至菌液在 600 nm 波長的吸光值 $A_{600} = 0.5-1.0$ 。

將培養好的細菌液置於冰上 15 分鐘，隨後於 4°C 下，離心 (2,000 g) 10 分鐘，倒棄上清液。以 200 ml 冰的無菌水懸浮菌體沈澱物後，於 4°C 下，離心 (2,000

g) 10 分鐘，倒棄上清液。以 40 ml 冰的 10% (v/v) 無菌甘油回溶菌體沈澱物後，於 4°C 下，離心 (2,000 g) 10 分鐘，倒棄上清液。以 3 ml 冰的 10% (v/v) 無菌甘油回溶菌體沈澱物。

將菌液每 40 μ l 分裝於一微量離心管中，以液態氮急速冷凍後，保存於 -80°C 凍箱中備用。

註：重組蛋白質表現菌株 BL21 (DE3) 的勝任細胞的製備時不添加抗生素，其餘步驟相同。

2. 電穿孔法轉形 (Electroporation)

從 70 %酒精中取出一個 0.1-cm 電極小管，於無菌操作台中風乾，隨後置於冰上預冷。於冰上解凍一管 40 μ l 的細菌勝任細胞。取 1 μ l DNA 接合反應樣品加入勝任細胞中，混合均勻後，轉移至電極小管，於 *E. coli* Pulser™ (BioRad Cat. No. 165-2102)，以 25 μ F, 200 Ω , 1.25 kV 的條件進行電擊 (約 5 msec)。隨後，加入 1 ml LB 培養液，以微量吸管輕輕地混合均勻後，吸出至培養管中，於 37°C 以 200 rpm 震盪培養 1 小時。以 L 型玻棒將 50 μ l 菌液塗佈於含合適抗生素 (pBluescript II 載體使用 50 mg/l ampicillin；pET24 載體使用 50 mg/l kanamycin) 的 LB 固體培養基，於 37°C 培養 16 小時。

(八) 鹼性溶菌法純化細菌質體 DNA

利用鹼性溶菌法萃取細菌之質體 DNA (Sambrook et al., 1989)。

挑取單一菌落接種於 3 ml 含適量抗生素之 LB 培養液，同時也畫線培養在含抗生素之 LB 固態培養基上，並置於 37°C 培養箱中過夜培養。吸取 1.5 ml 菌液到 1.5-ml 微量離心管內，在 4°C 下，離心 (16,000 g) 3 分鐘。

吸掉上清液，以冰冷的 100 μ l Solution I [50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl, pH 8.0 at RT] 懸浮沈澱的菌體後，置於室溫下反應 5 分鐘。加入 200 μ l 新鮮配製的 Solution II [0.2 M NaOH, 1% SDS]，輕輕地混合 4-6 次後，置於冰浴中反應 10 分鐘。加入 150 μ l 冰冷的 Solution III [3 M potassium acetate, pH 4.8 或 3 M sodium acetate, pH 4.8]，輕輕地混合均勻後，置於冰浴中反應 10 分鐘。隨後於 4°C 下離心 (16,000 g) 10 分鐘。

吸取上清液至一乾淨的 1.5-ml 微量離心管內，加入等體積之異丙醇，混合均勻後，置於-20°C 下反應 15 分鐘。隨後於 4°C 下，離心 (16,000 g) 15 分鐘，倒掉上清液。以 200 μ l 冰冷的 70%酒精及冰冷的 100%酒精各清洗一次質體 DNA 沈澱物後，將此微量離心管倒置於無菌操作台上，風乾 15 分鐘。

以 20 μ l TE buffer [10 mM Tris-Cl, pH 8.0 at RT, 1 mM EDTA] 回溶沈澱的 DNA，並加入 0.2 μ l RNase A (10 mg/ml)，置於 37°C 水浴中，反應 10 分鐘。取 1~2 μ l DNA 以 0.8% (w/v) 瓊脂膠體電泳分析，以初步檢查該菌落中質體 DNA 的大小，再進一步以適當的酵素切割，以篩選出正確的菌落。

(九) 大腸桿菌菌體的保存

將欲保存的菌體以含適當抗生素的 LB 培養液，於 37°C 培養以 200 rpm 震盪培養 12~16 hr。將菌液保存於最終濃度 16 % (v/v) 甘油中，以液態氮急速冷凍後，置於-80°C 凍箱中備用。

五、北方轉漬分析

我們利用 Hot phenol 的方法 (Verwoerd *et al.*, 1989)，萃取各種不同處理的水稻細胞 RNA。取 20 μ g RNA 進行 1% agarose-formaldehyde gel 電泳分離、轉漬至尼龍 (nylon) 膜上 (Sambrook *et al.*, 1989)、再以 UV cross-linker 將 RNA 固定後，利用 AlkPhos Direct™ Labeling and Detection Systems (Amersham Biosciences #RPN3690) 進行 *Osm30* 探針的螢光標定，隨後將尼龍膜與製備好的螢光探針，在 65°C 下，進行雜和反應 12-16 小時，接著於相同溫度下，以 1x SSC, 0.1% SDS 和 0.5x SSC, 0.1% SDS 清洗尼龍膜各一次，每次 15 分鐘。隨後按照 Gene Images CDP-star detection modules 產品手冊 (Amersham Biosciences) 上的方法進行呈色反應。

(一) RNA 之萃取與純化

1. 秤取 1 g 水稻細胞於研鉢內，以液態氮急速冷凍後研磨成粉末狀。
2. 研磨後的細胞碎片移置於離心管中，加入 2.5 ml 預溫至 80°C 之研磨液 [0.1 M LiCl, 0.1 M Tris-Cl, pH 8.0 at RT, 0.01 M EDTA, 1% (w/v) SDS；

使用前加入等體積之 acid phenol (pH 4.0)]，混合 30 秒後，再置於 80°C 水浴中，反應 5 分鐘。

3. 隨後，加入 2.5 ml acid phenol，上下翻轉離心管，混合 2 分鐘後，離心 (10,000 g) 10 分鐘，將上層液轉移至乾淨的離心管內。
4. 加入 2.5 ml acid phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)，上下翻轉離心管，混合 2 分鐘後，離心 (10,000 g) 10 分鐘，再將上層液轉移至乾淨的離心管內。
5. 加入 2.5 ml chloroform/isoamyl alcohol (24:1)，上下翻轉離心管，混合 2 分鐘後，離心 (10,000 g) 10 分鐘，再將上層液轉移至乾淨的離心管內。
6. 加入等體積之 4 M LiCl (2.5 ml)，置於-20 下 8~10 小時。
7. 在 4°C 下，離心 (2,0000 g) 30 分鐘，倒棄上清液。加入 1 ml 2 M LiCl，樣品混合後，再離心 (20,000 g) 5 分鐘，保留沈澱物。
8. 以 0.4 ml DEPC-treated H₂O 溶解沈澱物，並移置於 1.5-ml 微量離心管中，離心 (20,000 g) 5 分鐘。
9. 吸取上清液至乾淨的微量離心管中，加入 0.04 ml 3 M sodium acetate (pH 5.2, in DEPC-treated H₂O) 和 1.1 ml 100% 酒精，混合均勻後，置於 -20 下反應 2 小時。
10. 於 4°C 下，離心 (16,000 g) 30 分鐘，倒掉上清液。加入 0.2 ml 冰冷的 70% 酒精以清洗 RNA 沈澱物，隨後離心 (16,000 g) 2 分鐘，並吸掉上清液。同法，再以 0.2 ml 冰冷的 100% 酒精清洗 RNA 沈澱一次。
11. 將離心管倒置於無菌操作台上，風乾 15 分鐘。此為 total RNA 樣品，保存於 -20°C 凍箱中。

(二) RNA 的電泳分析

製備膠體 [1% (w/v) agarose, 8% (v/v) formaldehyde gel in 10 mM NaPO₄ buffer, pH 6.8]：秤取 0.8 g 瓊脂 (agarose)，加入盛有 60.8 ml DEPC-H₂O 和 1.6 ml 1 M sodium phosphate buffer [1 M NaPO₄：每公升含 97 g NaH₂PO₄ 及 44 g Na₂HPO₄，其酸鹼值為 pH 6.0，加水稀釋使濃度為 10 mM 時，酸鹼值為 pH 6.8] 的 250-ml 錐形瓶中，將錐形瓶蓋上保鮮膜後，置於微波爐中加熱，使瓊脂溶解，將以上的錐形瓶置於室溫下，待膠體冷卻至約 60°C 時，加入

17.6 ml 37% formaldehyde (HCHO)，混合均勻後，倒入水平電泳鑄膠器 (Hybaid 038916) 中，聚膠 30 分鐘以上。

將 20 μ g RNA 樣品溶入 10 μ l RNA sample buffer [50% (v/v) formamide, 10% (v/v) HCHO, 40 mM NaPO₄ (pH 6.8), 10 mM EDTA, 200 μ g/ml ethidium bromide (EtBr)]，加 DEPC-H₂O 至總體積為 20 μ l，將以上的 RNA 樣品置於 65°C 水浴中，反應 5 分鐘後，迅速放冰上。再加入 4 μ l 5X RNA loading buffer [50% (v/v) glycerol, 5 mM NaPO₄ (pH 6.8), 0.1% (w/v) bromophenol blue] 混合均勻。

在水平電泳槽 (Hybaid 038916) 內注滿 running buffer [10 mM NaPO₄ (pH 6.8), 8% HCHO]，將膠體放入槽內，注入欲分析的 RNA 樣品到膠體樣品槽中，以固定電壓 80 V 進行電泳分離 1 小時。電泳完成後，在紫外燈下觀察電泳分離結果，並且以熱感應照相裝置照相。

(三) RNA 的轉漬與分析

1. RNA 之轉漬

- (1) 裁取合適大小的尼龍膜 (Magna Graph nylon transfer membrane MSI, NJOHY00010) 和兩張無菌濾紙，以 DEPC-treated 10X SSC [1.5 M NaCl, 0.15 M sodium-citrate, pH 7.0 at RT, 0.1% (v/v) DEPC-treated; autoclaved] 浸潤 30 分鐘。
- (2) 以 50 % 酒精沖洗核酸轉漬槽 (Biometra, VB21) 的白色多孔板，隨後以 DEPC-treated H₂O 沖洗整套轉漬槽。
- (3) 將 RNA 電泳分離後的膠體放入無菌的玻璃盒，在室溫下以 DEPC-treated H₂O 搖晃清洗 (50 rpm) 15 分鐘。再以 DEPC-treated 10X SSC 浸潤 5 分鐘，重複兩次此步驟，並準備進行 RNA 樣品的轉漬。
- (4) 組裝好的核酸轉漬槽後，小心地將 RNA 膠體置於尼龍膜上，並截角標記。以 DEPC-treated 10X SSC 為轉漬溶液，進行抽氣轉漬 (500 mbar) 1 小時。取出含有 RNA 樣品的尼龍膜，以 DEPC-treated 2X SSC 沖洗後，進行 30 秒 UV light cross-link，隨後將尼龍膜置於 80°C 烘箱中烘乾 1 小時。

2. 預雜合反應

將尼龍膜置於 65°C 預熱的 hybridization buffer [5X SSC, 0.1% (w/v) SDS, 5% (w/v) Dextran sulfate, 1/20 X liquid block (Amersham, 1047882)]，於雜合管中進行預雜合反應 (prehybridization) 30 分鐘。

3. 探針的製備

- (1) 以 PCR 方式放大欲分析的基因片段後，以 1 % agarose DNA 電泳分離 DNA 樣品。
- (2) 於紫外燈下觀察電泳分離結果，切下 DNA 樣品並以 Viogene gel extraction kit (EG1001) 純化 DNA 並定量。
- (3) 預先取出 nucleotide mix [5X stock solution of fluorescein-11-dUTP, dATP, dCTP, dGTP and dTTP in Tris-HCl, pH 7.8, 2-mercaptoethanol and MgCl₂]、random primer (random nonamers, Amersham #RPN3520) 於冰上解凍。
- (4) 取出 100 ng / 20 µl DNA 於沸水浴反應 5 分鐘，隨即置於冰上 2 分鐘。加入 14 µl 無菌水、10 µl nucleotide mix、5 µl random primer 及 1 µl Klenow enzyme (5 units/µl)，使總體積達 50µl，混合均勻後，置於 37°C 水浴反應 1 小時。
- (5) 反應完成後，加入 2 µl 0.5 M EDTA，使 EDTA 最後濃度達到 20 mM，每 5.5 µl 分裝成一管，保存於 -20°C 凍箱中。

4. 雜合反應

取適量的探針 (5.5 µl, 9 ng / µl)，加入 20 µl TE buffer，於沸水浴反應 5 分鐘，隨即置於冰上 2 分鐘。將探針加入預雜合後的雜合管中，混合均勻，於 65°C 下進行雜合反應 (hybridization) 3 小時至過夜。

5. 螢光訊號的偵測

- (1) 以 50 ml Primary stringency wash [1X SSC, 0.1 % SDS] 於 65°C 搖洗 15 分鐘。
- (2) 以 50 ml Secondary stringency wash [0.1X SSC, 0.1 % SDS] 於 65°C 搖洗 15

- 分鐘。
- (3) 取出 Nylon 膜置於無菌玻璃盒中，加入 1X Blocking solution [1/10 liquid block (Amersham, 1059304) in buffer A (0.1 M Tris, 0.3 M NaCl, pH 9.5 at RT, autoclaved)]，於室溫下以轉速 50 rpm，震盪反應 1 小時。
 - (4) 將尼龍膜置於石蠟膜上，滴加抗體溶液 [每 10 ml buffer A 加入 0.05 g BSA 及 2 μ l Anti-fluorescein-AP (Amersham, 1064285)]，靜置反應 1 小時。
 - (5) 取出尼龍膜以含有 0.3 % Tween 20 的 buffer A 搖晃清洗 10 分鐘，並重複此步驟三次。
 - (6) 將尼龍膜置於石蠟膜上，加入 CDP-StarTM detection reagent (Amersham, NIF 1229)，靜置反應 5 分鐘。
 - (7) 滴去多餘的 detection reagent 後，將尼龍膜放入透明塑膠袋，並以封口機封口，固定於 HypercassetteTM (Amersham, RPN 11642; 18 x 24cm) 中。
 - (8) 於暗房中，裁取合適大小的底片，置於尼龍膜上，壓片 1 小時至過夜（需視不同的狀況調整壓片時間）。
 - (9) 沖洗底片。

六、Osm30 多株抗體的製備

(一) 重組蛋白質的萃取與純化

1. 重組蛋白質的誘導表現與萃取

將 *Osm30* CDS 轉接至表現載體 pET24a (Novagen)，並轉形至 *E. coli* XL1-Blue 後進行定序確認序列正確無誤之後，純化質體 DNA，並轉形至 BL21 (DE3) 菌株，以 0.4 mM isopropyl- β -d-thiogalactoside (IPTG) 誘導重組蛋白質表現。詳細步驟如下：

- (1) 挑取單一菌落接種於 3 ml LB 培養液，置於 37°C 培養箱中震盪培養過夜。
- (2) 隨後取 1 ml 菌液加至含 100 ml LB 的 500-ml 錐形瓶中，置於 37°C 培養箱中震盪培養 3-4 小時，直至其 $A_{600} = 0.5-0.6$ 。
- (3) 加 0.4 ml 0.1 M IPTG 至菌液，繼續培養 1-3 小時。

- (4) 將菌液倒入離心管中，在 4°C 下，離心 (5,000 g) 5 分鐘，保留沉澱物。
- (5) 以 4 ml 冰的 1X Binding buffer 懸浮菌體，隨後以超音波破膜機進行蛋白質的萃取，設定功率為 40%，每震盪 20 秒後，置於冰上 10 秒，一共震盪 10 次。
- (6) 將萃取液倒離心管中，在 4°C 下，離心 (20,000 g) 20 分鐘，保留上清液 (可溶性蛋白質) 及沉澱物 (含細菌包涵體)。
- (7) 再以 1X Binding buffer 萃取一次，此次離心後只保留沉澱物。
- (8) 加入 2 ml 含有 6 M urea 的 1X Binding buffer，將沉澱物再懸浮後，置於 4°C 下，以 50 rpm 震盪反應 1-12 小時，將包涵體內的蛋白質溶出。

2. 重組蛋白質的純化

利用 Osm30 重組蛋白質的 C 端含 (His)₆ tag 的特性，以鎳離子吸附管柱進行純化。以下為細菌包涵體內重組蛋白質的純化步驟：

(1) 各種緩衝溶液

- a. 8X Binding Buffer:
40 mM imidazole , 4 M NaCl , 160 mM Tris-HCl pH 7.9
- b. 8X Wash Buffer:
480 mM imidazole , 4 M NaCl , 160 mM Tris-HCl pH 7.9
- c. 4X Elute Buffer:
4 M imidazole , 2 M NaCl , 80 mM Tris-HCl pH 7.9
- d. 4X Strip Buffer:
400 mM EDTA , 2 M NaCl , 80 mM Tris-HCl pH 7.9
- e. 8X Charge Buffer:
400 mM NiSO₄

(2) 製備鎳離子親和性管柱

- a. 利用以 0.45 μM 濾膜過濾的去離子水，並以此製備 1X Charge buffer、1X Binding buffer，及含有 6 M urea 的 1X Binding buffer 和 1X Elute Buffer。
- b. 輕輕的搖晃 His•Bind resin 直至樹脂膠粒完全懸浮，以截口的玻璃滴管吸取 His•Bind resin 至含有 6 ml 去離子水的空管柱中，直至其體積達 2 ml，以重力滴流方式，使其儲存溶液 (20% EtOH) 自管柱中排除。

- c. 隨後依序以 6 ml 去離子水、10 ml 1X Charge buffer 和 6 ml 含 6 M urea 的 1X Binding buffer 處理管柱。

(3) 重組蛋白質的純化

- a. 將利用含 6 M urea 的 1X Binding buffer 所萃取的細菌包涵體蛋白質以 0.45 μ m 濾膜過濾之後，注入樹脂上方，利用重力滴流，直至樹脂液面。
- b. 以 20 ml 含 6 M urea 的 1X Binding buffer，以重力滴流方式，將不與 His•Bind resin 結合的蛋白質洗出。
- c. 再以 12 ml 20 mM imidazole buffer (每 15 ml 含有 11 ml 1X Binding buffer with 6 M urea 和 4 ml 1X Wash Buffer with 6M urea)，清洗管柱。
- d. 隨後以含 6 M urea 的 12 ml 1X Elute Buffer 將與 His•Bind resin 結合的蛋白質流洗出 (elute)，每 1 ml 收集一管，以進行後序分析。
- e. 以 6 ml 1X Strip buffer 清洗管柱後，可重新製備管柱。

(二) 多株抗體的製備

接著將純化後的 Osm30 重組蛋白質以 12% SDS gel 進行電泳分離，並以 Coomassie Brilliant Blue 染色後，切下 30 kDa 的蛋白質帶，以電析法 (electroelution) 收取膠內的蛋白質，並以此純化後的 Osm30 重組蛋白 (約 200 μ g) 為抗原，再添加完全佐劑 (Freund's complete adjuvant, Sigma F-5881) 並混合成乳糜狀後，對紐西蘭白兔進行免疫注射；一個月後，再取 200 μ g Osm30 重組蛋白，添加不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant, Sigma F-5506)，並進行第二次注射；兩週後，進行第三次注射。於第三次注射的三天後收集兔血，並分離血清，血清中即含有可辨識 Osm30 的抗體 (RA-Osm30)，抗體效價檢測結果，決定以稀釋 30,000 倍來進行後續的西方免疫轉漬分析。

1. 以電析法自蛋白質電泳膠片純化蛋白質

(Protein electroelution from SDS gel)

- (1) 自 CBB 染色並退染後的膠片上，切下目標蛋白質，放置於培養皿上並加入 10 ml 去離子水，於 4°C 下震盪清洗 30 分鐘，重複此清洗步驟共 5 次。
- (2) 將膠片切成約 1 mm³ 小塊，吸除多餘的水分。

- (3) 將透析膜圓片 (註) 置於 elution cell (CBS Scientific, Electro-eluter concentrator #ECU-040) 上, 確認不會滲漏後, 將含蛋白質的小膠塊至入 loading well (粗孔端) 中, 加入 soaking buffer (100 mM NH_4HCO_3 , 2% (w/v) SDS) 至剛好覆蓋膠塊, 浸泡 3-5 小時後, 在於上方小心的加入 elution buffer [50 mM NH_4HCO_3 , 0.1% (w/v) SDS]。
- (4) 將 elution cell 移入含有 elution buffer 的 elution tank 電泳槽中, 並確定 elution cell 與 elution tank 之間無氣泡。
- (5) 利用 peristaltic pump (流速約 2-3 ml/min) 控制電泳槽內的溶液循環。並以固定電壓 50 伏特 (電流約 2 mA) 通電 12-16 小時。
- (6) 關掉電源後, 將槽內溶液換成 dialysis buffer [10 mM NH_4HCO_3 , 0.02% (w/v) SDS], 以固定電壓 80 伏特 (電流約 2 mA) 通電 16-24 小時。
- (7) 以玻璃滴管將含有藍色 (含 CBB) 的蛋白質溶液自 elution cell 的 collection well 內吸出。
- (8) 將蛋白質溶液吸入透析袋中, 並於室溫下, 以 500 ml PBS (8.24 mM Na_2HPO_4 , 1.76 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, pH 7.4) 進行透析 6 小時, 共 4 次。
- (9) 取一小部分已透析後的蛋白質溶液, 加入 SDS sample buffer, 與已知含量的 carbonic anhydrase (Sigma C-2273, 29 kDa) 一起進行 SDS-PAGE, 以 CBB 染色後, 以 Pharmacia Biotech 公司的 Image Master VDS 系統, 進行掃描與定量。

註：透析膜圓片之前處理

將透析膜 (Spectra/Por membranes MWCO 12-14,000) 置於 1% (w/v) NH_4HCO_3 溶液中, 於 60°C 水浴中, 加熱處理 1 小時之後, 以去離子水沖洗 5 次。隨後將膜置入 0.1% (w/v) SDS 溶液中, 於 60°C 水浴中, 加熱處理 1 小時後, 以去離子水沖洗 5 次。以直徑 1.5 cm 的打孔器將透析膜裁成圓片狀, 再以去離子水沖洗 5 次後, 保存於 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) sodium azide 溶液中。

七、西方免疫轉漬分析

將蛋白質樣品以 SDS-PAGE (Laemmli, 1970) 分離後，轉漬到硝化纖維膜 (nitrocellulose membrane) 上，隨後進行免疫染色。第一級抗體為多株抗體 RA-Osm30 (稀釋 30,000 倍)，並以未進行免疫注射的兔血清 (NIR, non-immune rabbit serum) 當做對照；第二級和第三級抗體分別使用 Goat anti-Rabbit IgG (GAR, Sigma R-2004) 和 alkaline phosphatase-conjugated Rabbit anti-Goat IgG (RAG-AP, Sigma A-4187)，最後加入受質 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP) 和 nitro blue tetrazolium (NBT) 呈色。

免疫染色詳細步驟如下：

1. 將電泳轉漬完成後的硝化纖維膜以 ponceau S 染劑 [0.2% (w/v) ponceau S (Sigma P-3504), 3% (v/v) trichloroacetic acid] 進行染色 1-3 分鐘，以去離子水沖洗去除多餘的染劑後，以紅色原子筆畫線標記該膜，再以去離子水將染劑完全退出。
2. 在室溫下將硝化纖維膜浸泡於Blocking溶液 [1% (w/v) BSA, 0.02% (w/v) NaN₃ in PBS] 中一小時，或於 4°C 下反應過夜。
3. Blocking溶液處理後，以Washing溶液 [10 mM Tris-Cl, pH 8.0 at RT, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.02% (w/v) NaN₃] 清洗硝化纖維膜。
4. 一級抗體反應：先將由兔子生產可辨認Osm30 之多株抗體以Diluent溶液 [1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.02% (w/v) NaN₃ in PBS] 稀釋 30,000 倍，滴加於硝化纖維膜上，置於室溫反應 1 小時。
5. 以 Washing 溶液進行震盪清洗兩次，每次 10 分鐘。
6. 二級抗體反應：滴加 1 µg/ml GAR，置於室溫下反應 1 小時。
7. 以 Washing 溶液進行震盪清洗反應兩次，每次 10 分鐘。
8. 三級抗體反應：滴加稀釋 30,000 倍之 RAG-AP，置於室溫下反應 1 小時。
9. 以 Washing 溶液進行震盪清洗兩次，每次 10 分鐘。
10. 以Substrate buffer (0.1 M Tris-Cl, 0.1 M NaCl, 5mM MgCl₂, pH 9.5 at RT)，並進行震盪反應，15 分鐘。
11. 呈色：將鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 的受質溶液 [每 10 ml Subatrate buffer 加入 33 µl 的 50 mg/ml BCIP in dimethylformamide (DMF)]

和 66 μ l 的 50 mg/ml NBT in 70% (v/v) DMF] 加注於硝化纖維膜，並於室溫下呈色反應 5 至 30 分鐘。

12. 呈色後，以大量的去離子水洗去多餘的受質，以停止反應，並將硝化纖維膜置於吸水紙上，使其自然風乾。

八、細菌生長曲線之測定

將pCAMBIA1302 載體中的水母綠螢光蛋白基因 (Green fluorescent protein, GFP) 以PCR方法選殖並轉接至pBS和pET24b載體上，利用的PCR引子分別為：GFP-1, 5'-CAGGGATCCG AGT AAA GGA GAA GA -3' (底線為Bam HI切點) 和 GFP-2, 5'-CTCAAGCTT GTA TAG TTC ATC CAT G -3' (底線為Hind III切點)。隨後將pBS、GFP/pBS和Osm30/pBS等三種載體分別轉形入*E. coli* XL1-Blue菌株，而GFP/pET24b和Osm30/pET24a也分別轉形入*E. coli* BL21 (DE3) 菌株中。前培養是分別挑取單一菌株至 3 ml含合適抗生素 (pBS和pET24 載體分別使用 50 mg/L ampicillin和 50 mg/L kanamycin) 的LB培養液中，在 37°C以 200 rpm轉速震盪過夜培養；預培養是取 40 μ l培養過夜的菌液，加至 3 ml LB培養液中，培養至菌液在 600 nm波長下的吸光值 (A_{600}) 介於 0.5-0.6 之間；根據統計 A_{600} 為 1 時，菌液中含有 10^9 個細菌，換算預培養的菌液濃度後，各取 10^8 個細菌，培養至 2.5 ml LB培養液中，在 37°C以 200 rpm轉速震盪培養，並在培養過程的不同時間，測定含各種不同載體的菌株之 A_{600} ，並分別繪出細菌的相對生長曲線。

第四節 結果

一、水稻細胞分泌性蛋白質的收集與幾丁質酶的活性分析

在本研究中，我們利用加入硫酸銨至 80%飽和度，將水稻懸浮細胞培養液中的蛋白質沉澱濃縮 (AmS)，隨後以低鹽緩衝液進行透析，再以 Mono S 陽離子交換管柱進行蛋白質的吸附；不吸附而直接流過 Mono S 管柱的蛋白質則視為「Mono S-」樣品。相較於 AmS 樣品，在 Mono S-的樣品中，有些蛋白質的含量增加，例如 34-kDa 和 15~18-kDa 蛋白質，有些蛋白質則是含量減少，例如 33-kDa 蛋白質 (圖一 A)。而在進行幾丁質酶之膠體活性分析時，如圖一 B 所示，在 AmS 樣品中，僅有兩個可水解 glycol chitin 的蛋白質呈現；但在 Mono S-樣品中，則

有三個蛋白質呈現此一特性。將這些可水解 glycol chitin 的蛋白質帶自活性膠體上切下，並進行 SDS-PAGE 電泳分析，結果顯示這些蛋白質的分子量分別為 34、30 和 15 kDa (data not shown)。其中分子量為 30-kDa 的蛋白質 (Osm30)，是在 MonoS-樣品中，新增加具有水解幾丁質活性的蛋白質 (圖一 B，Osm30)。將多張幾丁質酶活性膠上含 Osm30 蛋白質的膠帶切下，進行 SDS-PAGE 電泳後，轉漬到 PVDF 膜上，再進行蛋白質 N 端胺基酸微定序，結果 (圖一 C) 顯示被分泌到培養液中的 Osm30 蛋白質，其從 N 端開始的 19 個胺基酸序列為『GDIAYWYWGQN GDEXS LADA』，其中有一個胺基酸無法判讀以 X 表示，經與 GenBank 資料庫進行序列比對 (BLASTP) 後得知，Osm30 的 N 端胺基酸序列與植物的第 III 型幾丁質酶有高度相似性。

二、*Osm30* 基因之選殖

水稻第 III 型幾丁質酶是由多個基因組成的基因家族，我們在 Gramene 水稻基因組資料庫中共可找到 32 個具有第 III 型幾丁質酶保守序列的相關基因。爲了要確定 *Osm30* 爲家族中的哪一個成員，我們利用蛋白質 N 端胺基酸微定序的結果，設計 PCR 之 5'端引子，再以先前備妥的水稻懸浮培養細胞 cDNA library 之 DNA 作爲模版，將 *Osm30* 的 cDNA 序列選殖入 pBS 載體中，並進行定序分析以確認其核酸序列。

PCR選殖的結果得到一含 825 bp核苷酸的cDNA片段 (圖二，核苷酸 79-903 bp)，經送入資料庫進行序列比對分析 (Blastn)，結果顯示*Osm30* 的序列與 GenBank資料庫中登錄編號爲D55713 (Nagasaki *et al.*, 1997) 的cDNA比較，除了短少從 5'端開始的 78 個核苷酸序列之外，兩者其他部份的序列完全相同。由於 *Osm30* 爲一被分泌到培養液中的蛋白質，故推測D55713 與*Osm30* 其實爲同一個基因，而D55713 5'端多出來的 78 bp應爲生成*Osm30* 蛋白質之分泌訊息序列的基因片段。而在水稻基因組資料庫中搜尋的結果則顯示，*Osm30* 基因是位於水稻第一對染色體上 (Os01g47040)。此外，*Osm30* 的序列中含有第 18 族糖苷水解酵素所特有的兩段與活性有關之保守區位：「SXXG」—「₉₈ VKVILSIGG₁₀₆」和「DXXDXDE」—「₁₄₅ LDGVDFDIE₁₅₃」(圖二，繪實線區域)。

由於 *Osm30* 在蛋白質層次的表現分析，需要有抗體作爲檢測的探針，因此，我們利用大腸桿菌 BL21 (DE3) 來表現 *Osm30* 重組蛋白質，再藉鎳離子吸附管

柱純化重組蛋白質。由於鎳離子吸附管柱純化出的 *Osm30* 重組蛋白質樣品，仍含有少數不相干的蛋白質，為確保 *Osm30* 抗原的純度，我們將鎳離子吸附管柱純化的 *Osm30* 重組蛋白質樣品，進行 SDS-PAGE 分離，並在染色後，切下含 *Osm30* 重組蛋白質的膠條，經回收蛋白質並定量後，對兩隻紐西蘭白兔分別進行一系列的免疫注射。免疫注射完成後，抽取白兔的血液，並分離血球，隨後將血清進行系列稀釋，以檢測抗體的效價範圍。結果顯示稀釋了十萬倍的抗血清，仍可檢測到含量約 30 ng 的 *Osm30* 蛋白質。在後續的實驗中，我們利用三萬倍的抗體稀釋液，來進行免疫轉漬分析試驗，以檢測水稻細胞中 *Osm30* 蛋白質的表現情形。

三、*Osm30* 在水稻細胞的生理表現情形

北方轉漬分析的結果顯示 (圖三 A)，*Osm30* 的 mRNA 在水稻細胞進行繼代培養後的 3-12 小時之間會被誘導增加表現，隨後表現量逐漸降低，於培養 3-7 天時已降低到幾乎無法被偵測的含量。西方轉漬分析的結果則顯示，在懸浮培養的過程中，水稻細胞內的 *Osm30* 蛋白質呈現持續且穩定的表現 (圖三 B)；而在培養過程中，其在培養液內的含量則隨培養天數的增加而持續累積 (圖三 B)。

四、真菌感染會增加 *Osm30* 表現

已知許多種植物之幾丁質酶在真菌感染、誘引劑，或其他多種逆境因子的刺激而誘導表現 (Collinge *et al.*, 1993; Patil *et al.*, 2000)。為了解真菌病原菌是否會誘導 *Osm30* 基因的表現，我們在水稻細胞繼代培養時，於懸浮培養液中分別接種 4 種水稻的病原菌：*Rhizoctonia solani*、*Sarocladium oryzae*、*Gibberella fujikuroi* 和 *Bipolaris oryzae*。處理 12 小時後，收集水稻細胞，並萃取其 RNA 以進行北方轉漬分析，同時收集培養液，以分析 *Osm30* 蛋白質的分泌量。結果發現，上述的四種病原菌都會使 *Osm30* 幾丁質酶基因增強表現 (圖四 A)；其中以 *G. fujikuroi* 的誘導效果最佳，*B. oryzae*、*S. oryzae* 和 *R. solani* 依序次之。而西方免疫轉漬分析的結果也顯示，感染病原菌三天後的水稻細胞培養液中，含有比對照組較高的 *Osm30* 蛋白質含量 (圖四 B)。

五、*Osm30* 重組蛋白質會抑制細菌生長

我們利用了兩種不同型態的載體來裝載 *Osm30* 的 CDS (coding sequence 不含分泌訊息序列)：選殖型載體 pBS 和表現型載體 pET24，並分別將其轉形到大腸桿菌的選殖型菌株 XL1-Blue 和表現型菌株 BL21 (DE3) 中，並以空載體 (pBS) 和裝載了 GFP 的載體 (GFP/pBS 和 GFP/pET24b) 當做對照。先以等量菌數開始培養，並在不同的培養時間，測量細菌濃度的變化，再繪出細菌的生長曲線如圖五。在選殖型載體的試驗組中，轉形 *Osm30*/pBS 的 XL1-Blue 菌株在培養 10 小時之後，生長曲線已達飽和；而轉形 pBS 空載體或 GFP/pBS 的兩個 XL1-Blue 菌株的生長曲線一致，生長曲線都在第 20 小時才達到飽和；此外，實驗組轉形 *Osm30*/pBS 的 XL1-Blue 菌液的飽和濃度只有對照組的 70% (圖五 A)。在表現型載體的試驗組中，轉形 *Osm30*/pET24a 的 BL21 (DE3) 菌株的最高生長濃度也比轉形 GFP/pET24b 對照組的最高生長濃度低許多 (圖五 B)，亦只有對照組的 70%。

六、*Osm30* 基因的表現受到 MeJA 和 ABA 之調控

Osm30 的 mRNA 在水稻細胞繼代培養後的 3-12 小時內有增加表現的情形 (圖三 A)，我們於是選擇在繼代培養第 6 小時，分別添加不同的植物生長調節劑，以觀察這些植物生長調節劑是否會影響 *Osm30* 基因的表現。生長調節劑的處理時，若使用太低濃度，無法獲得有效的反應，但是若以太高濃度來處理時，會對水稻細胞產生毒害，使其褐化甚至死亡。因此，我們參考相關文獻，並進行有效濃度的測定實驗後 (data not shown)，決定選擇以 30 μ M MeJA、300 μ M SA 和 50 μ M ABA 來對水稻細胞進行處理；由於這些生長調節劑是以酒精為溶劑，我們以同體積的酒精來處理水稻細胞，以當作對照組。

在各種生長調節劑處理 6、18 和 30 小時之後，分別收集水稻細胞，並萃取 RNA，以進行北方轉漬分析 (圖六，12、24 和 36)。結果顯示，未處理組、酒精處理組和 ABA 處理組的水稻細胞內，*Osm30* 的表現都是在繼代培養後的第 12 小時達最高峰，隨後逐漸減少，但是 ABA 處理組的最高表現量比未處理組的為高；而在 MeJA 的處理組中，其 *Osm30* 的表現高峰被往後延伸至繼代培養後的第 24 小時 (圖六)。另外，SA 處理的結果則顯示，*Osm30* 表現量與酒精處理的對照組無顯著差異 (data not shown)。

第五節 討論

植物細胞的懸浮培養系統中，在細胞馴化培養後，無組織特異性的問題，具有均質化的特性；且培養系統穩定，可控制相同的培養條件，包括固定溫度、溼度、氧氣供應和營養調控等條件；此外，實驗處理時，具有一致性的優點，用來當作試驗模式系統時，可以簡化試驗變因。例如：我們可在培養液中添加各種生物性或非生物性的調控因子，以分析其調節基因表現的情形。已有學者利用植物細胞的懸浮培養系統，進行基因調控的基礎研究，並從其中鑑定出具有應用性的蛋白質及啟動子。例如：Yu *et al.* (1991) 利用水稻細胞的懸浮培養系統發現 α -amylase 基因的表現會受醣分的代謝調控；而 α -amylase 基因的啟動子則被開發應用於導引異源基因的表現 (Chan *et al.*, 1994)。本實驗室選用水稻懸浮培養細胞之目的，主要想針對水稻細胞在懸浮培養過程中，所分泌出的蛋白質，進行一系列的功能性鑑定。我們先前的研究已發現有一些與植物抗病防禦機制有關的 PR 蛋白質，會被分泌至水稻細胞培養液中，例如：thaumatin-like protein 和第 I 型幾丁質酶等 (data not shown)，而本論文則主要針對一個新鑑定的第 III 型幾丁質酶，進行其生化特性和生理功能的探討。

已知植物的幾丁質酶是一個很大的基因家族，因此，我們嘗試用不同的分析方法，來檢測水稻細胞所表現的各種幾丁質酶。在以鹼性 (pH 10) 的酵素活性膠體對水稻細胞所分泌的全部蛋白質進行檢測時，我們發現其中有兩個較明顯的幾丁質酶活性位置 (圖一B)，若將這些水稻所分泌的蛋白質經以Mono S管柱吸附後，剩餘的蛋白質中則新增加一分子量為 30 kDa的幾丁質酶 (Osm30) (圖一B)。經由基因選殖的結果，我們發現Osm30 除了短少一段生成 26 個胺基酸的分泌序列之外，其餘序列與GenBank中登錄為D55713 (Nagasaki *et al.*, 1997) 的 cDNA clone完全一致。Osm30 若包含分泌序列，全長含有 301 個胺基酸，根據 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 上的軟體推算，Osm30 的分子量為 31 kDa；扣掉分泌序列的胜肽鏈，則估算出的分子量為 28.3 kDa，此結果與其在SDS-PAGE 上的 30 kDa有些差距，推測可能是由於轉譯後的修飾作用所造成；而醣化位的分析結果顯示，在Osm30 的C端胺基酸序列中，有一個可能的N-醣化位 (N-glycosylation site)：「₂₉₂ NFS ₂₉₄」 (圖二)，由此可推測Osm30 可能是在醣化作用後，導致其分子量增加為 30 kDa。此外，分泌於培養液中的Osm30 (不包含

分泌訊息)，其等電點為pI 4.1，顯示Osm30 為酸性幾丁質酶；在pH值比其等電點高的環境中，Osm30 的淨電荷為負值，因此不會吸附於陽離子交換管柱，且在pH 10 的native gel中可輕易地往陽極移動，並在活性膠上保有原來的結構，故可在膠上偵測到其幾丁質酶的活性。

Osm30 除了在酵素活性膠中呈現幾丁質酶的活性之外，我們也在其胺基酸序列中發現含有醣苷水解酵素第十八家族的兩段活性位置：「98 VKVILSIGG 106」和「145 LDGVDFDIE 153」(圖二)。已知植物第III和第V型幾丁質酶都是屬於醣苷水解酵素第十八家族的成員，雖然第V型幾丁質酶亦有此兩段保守區域，但其分子量比第III型幾丁質酶為大，介於 41-43 kDa之間 (Melchers *et al.*, 1994)，故Osm30 所呈現的序列特徵應屬於第III型的幾丁質酶。

此外，在利用微生物系統生產 Osm30 重組蛋白質，以供抗體生產的同時，我們觀察到，轉形 *Osm30* 基因的大腸桿菌之生長情形有被抑制的狀況。為了排除細菌生長被抑制，是否由於轉入的質體太大，或是因為生產重組蛋白質，過度消耗胞內養分，而導致細菌生長遲滯的可能性，我們除了利用空的載體 (pBS 和 pET24) 之外，也利用基因大小與 *Osm30* 相近的水母綠螢光蛋白質基因 (*GFP*, 732 bp) 作為對照組。我們選殖的 *Osm30* cDNA 全長僅有 903 bp，是在兩種載體能夠裝載的適當大小範圍之內，不應會影響細菌的生長；且由於 GFP 重組蛋白質在大腸桿菌 BL21 (DE3) 中的表現量比 *Osm30* 的表現量更多 (data not shown)，結果卻顯示，表現 GFP 重組蛋白質的大腸桿菌之生長速率與轉形空載體的對照組相近，因此，轉形 *Osm30* 的大腸桿菌之生長被抑制的情形，顯然是由於 *Osm30* 的活性所造成。此外，我們也利用結晶紫對細菌染色，並於光學顯微鏡下觀察細胞形態的情形。結果顯示，轉有 *Osm30* 基因的菌體，除了細胞數目減少之外，細胞外形更是明顯變長，推測可能是細胞分裂上出現問題 (data not shown)。Osm30 是如何對細菌的生長造成影響呢？有報導指出屬於醣苷水解酵素第 18 家族之植物第 III 型幾丁質酶，是具有雙重酵素活性的蛋白質，除了具有幾丁質酶的活性之外，也具有溶菌酶的酵素活性 (Collinge *et al.*, 1993; Meins *et al.*, 1994)。已知細菌並不產生幾丁質，故上述細菌生長被抑制的情形，應是受到 *Osm30* 的溶菌酶活性之影響。

在懸浮培養水稻細胞的過程中，*Osm30* 基因的表現呈現暫時性的表現情形 (圖三 A)：*Osm30* 的 mRNA 在更換新培養液後的 3-12 小時之內，會被誘導表現，

但到了 12 小時之後，表現量逐漸減少，到了第 3 天之後，*Osm30* 的表現量已降低到難以偵測的含量。相反的，在不同培養天數的水稻細胞中，*Osm30* 蛋白質的含量則始終維持恆定，並且也持續被分泌到培養液中 (圖三 B)。由於 *Osm30* 蛋白質的含量未因為 mRNA 的減少而改變，並且還能維持在有酵素活性的狀態 (圖一 B)，顯然 *Osm30* 的蛋白質結構在胞內、胞外的環境中都很穩定。

雖然在正常培養的條件下，水稻細胞中 *Osm30* 蛋白質的含量只有基礎量的表現；但當以四種病原菌：*Rhizoctonia solani*、*Sarocladium oryzae*、*Gibberella fujikuroi* 和 *Bipolaris oryzae* 感染水稻細胞時，雖然程度上會有所不同，但是無論在 RNA 或蛋白質層次上，*Osm30* 的表現量都有增加的現象 (圖四)，顯示病原菌的感染會誘導水稻細胞產生更多的幾丁質酶。

Osm30 在水稻細胞內到底有何生物功能呢？植物的幾丁質酶除了可水解真菌的幾丁質細胞壁外，也可能因作用後釋放出乙醯葡萄糖胺寡醣 (*N*-acetylglucosamine oligomer)，而誘發植物細胞產生植物殺菌素和表現 PR 蛋白質等，故有許多文獻報導，植物的幾丁質酶主要是參與植物的防禦反應 (Collinge *et al.*, 1993; Patil *et al.*, 2000)。其次，也有報導 (de Jong *et al.*, 1992) 指出，某些幾丁質酶的作用對象並非真菌的細胞壁，而是分解植物細胞的內生性受質，包括醣脂質 (glycolipids) 和醣蛋白 (glycoproteins) 等，而其水解產物則可能成為植物發育所需的訊息分子，例如：胡蘿蔔的酸性幾丁質酶在其體胚發育初期，即被認為扮演此一重要的角色 (de Jong *et al.*, 1992)。此外，有些具有幾丁質酶結構的蛋白質，在植物組織中會大量表現，但是卻無水解幾丁質的酵素活性，故推測其可能是扮演儲存性蛋白質的角色，例如：香蕉的類第 III 型幾丁質酶 (class III chitinase homolog)，在香蕉果實發育的初期會逐漸累積，達到總蛋白質量的 40%，但卻在果實成熟的過程中漸漸被消耗，以轉生成其他的蛋白質 (Peumans *et al.*, 2002)。

在本研究中，*Osm30* 蛋白質在經過 MonoS 陽離子交換管柱的分離之後，才被濃縮放大到可偵測活性的含量，顯然 *Osm30* 在水稻細胞內的表現量並不高，不像是儲存性蛋白質；而水稻細胞在懸浮培養時，細胞被控制在均質狀態，並無分化的需求，因此，*Osm30* 可能沒有參與產生發育訊息分子的功能。而根據其可水解 glycol chitin、可抑制細菌生長、會因更新培養液和因病原菌感染而被誘導表現等特徵，推測 *Osm30* 的功能角色應與水稻細胞的防禦與抗病機制有關。

植物被病原菌感染或受傷時，會產生誘引劑，來刺激植物體內產生相關的植物生長調節劑，例如 SA、JA 和乙烯，並主要藉由 JA 訊息傳遞路徑 [ethylene (elicitor)/JA-dependent pathway] 或 SA 訊息傳遞路徑 (SA-dependent pathway)，來調控防禦機制中相關基因的表現 (Pieterse and van Loon, 1999)。我們的實驗結果 (圖六) 顯示 *Osm30* 的表現會受到 MeJA 的誘導，但不受到 SA 的影響，推測 *Osm30* 可能是受 JA 而非 SA 訊息路徑所調控。

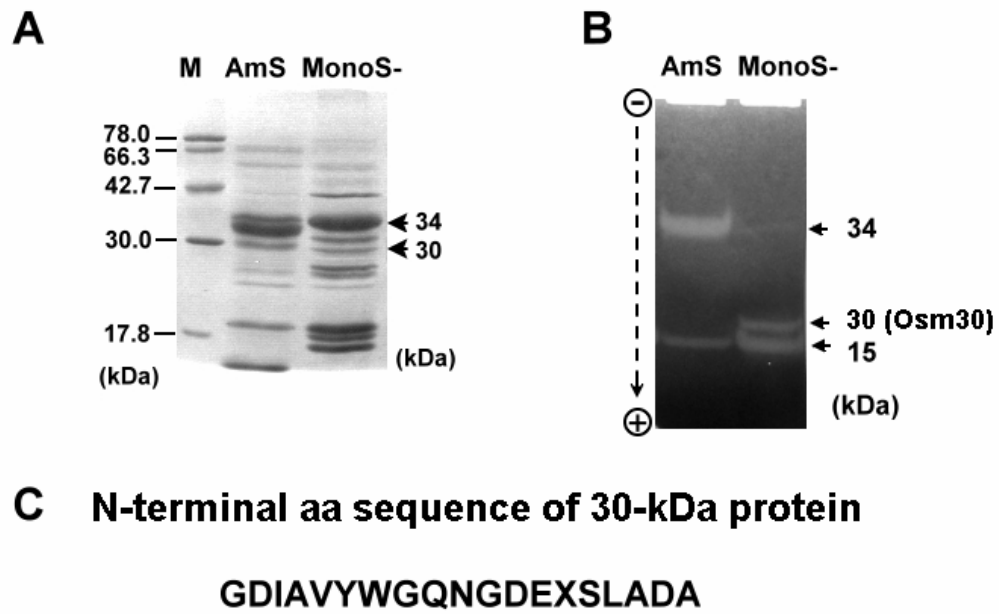
MeJA 和 ABA 處理水稻懸浮培養細胞後，雖然都會增加水稻細胞內 *Osm30* 的表現，但兩者之間的表現模式不同，MeJA 的處理會使水稻細胞內 *Osm30* 的表現時間延長，而 ABA 則是增加短時間內 *Osm30* 的表現量，故兩者對於 *Osm30* 基因的調控路徑不同。此外，一般認為 ABA 與環境逆境的訊息傳遞有關，以 ABA 處理水稻細胞後，會增加 *Osm30* 表現量的結果顯示，*Osm30* 除了可受到病原菌誘導之外，可能也受到環境逆境的調控。我們分析水稻基因組資料庫中 *Osm30* 基因的啟動子序列，發現其中含有數個與 JA 和 ABA 反應有關的轉錄調控位 (cis-acting element)，包括：兩個與 JA 調控路徑有關的 GCC-box (GCCGCC, -1005 和 -1100) (Fujimoto *et al.*, 2000)；一個與 ABA 和 JA 訊息路徑皆有關，且已證實可被 AREB (ABA-responsive element binding protein, bZIP) 及 Myc (bHLH) 轉錄因子所調控的 G-box (ACGTG, -600) (Abe *et al.*, 2003; Boter *et al.*, 2004)；及一個與低溫和乾旱逆境之調控路徑有關，可被 CBF1 等轉錄因子所調控的 DRE/CRT box (CCGAC, -1097) (Thomashow, 1999)。以上 *Osm30* 啟動子的轉錄調控位的分析結果，與我們先前進行的植物生長調節劑實驗 (圖六) 的結果一致。

綜合以上結果，我們鑑定出 *Osm30* 是一個有水解 glycol chitin 和溶菌酶活性，且具有高度穩定性的酵素。平時該酵素在水稻細胞中維持一定的基礎表現量，當病原菌感染時，可能是經由 JA 或/和 ABA 的訊息路徑來調控激發其表現，以參與水稻細胞的抗病防禦機制。此外，在水稻植株方面，我們利用西方轉漬分析的結果顯示，*Osm30* 蛋白質在平時於枝系 (shoots) 和根系 (roots) 中即有基礎量的表現 (圖七)，而 *Osm30* 在水稻植物體中的調控情形，是否會與其在懸浮培養細胞中的情形一致，仍待進一步的探討。

目前水稻的第 I 型幾丁質酶已被應用轉殖於作物體內，以增進植物的抗病能力 (Datta *et al.*, 2001)。根據本論文的實驗結果，水稻細胞中的 *Osm30* 不但分子

結構穩定，還同時兼具幾丁質酶和溶菌酶的雙重酵素活性，相信該蛋白質更具有被應用於作物抗病育種的潛力。

第二章之圖、表



圖一、水稻細胞分泌性蛋白質的分析

圖一、水稻細胞分泌性蛋白質的分析

(A) 蛋白質的 12% SDS-PAGE 電泳結果。「AmS」為水稻細胞懸浮培養七天後之培養液，加入硫酸銨至 80%飽和度沉澱濃縮之蛋白質。「MonoS-」為相同的細胞培養液先收集 60-80%飽和度硫酸銨沉澱的蛋白質，再通過 Mono S 陽離子交換管柱進行蛋白質吸附，其中不吸附而直接流過的蛋白質樣品即為「MonoS-」。圖左「M」為蛋白質的標準分子量樣品 (BDH 442642L)。電泳完畢後，膠片以 Coomassie Brilliant Blue R-250 染色。(B) 水稻細胞分泌性蛋白質的幾丁質酶活性檢測結果。「AmS」及「MonoS-」的蛋白質樣品在含 glycol chitin 的 native gel 中電泳分離後，以剛果紅染色的結果。圖左的 (-) 與 (+) 分別代表陰極與陽極的方位。圖右的箭頭及旁側的數字代表有幾丁質酶活性的位置，及這些幾丁質酶再以 SDS-PAGE 推估出來的分子量。(C) 為 Osm30 分泌性蛋白質進行 N 端胺基酸微定序的結果。

Figure1. Analyses of the rice proteins secreted by suspension-cultured rice cells.

(A) Medium proteins collected from a 7-d-old suspension culture of rice cells were concentrated by adding ammonium sulfate to 80% saturation (AmS). The collected from the flow-through fraction was designated MonoS-. These protein samples were electrophoretically separated in a 12% SDS gel, followed by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. The molecular masses of protein marker (M; BDH 442642L) was labeled on the left. (B) Chitinase zymogram assay of medium proteins. Both AmS and Mono S- samples were electrophoretically separated in a native gel (pH 10) with 0.1% glycol chitin, incubated at 37°C for 2h, and stained with Congo red. The protein bands with chitinase activity were then excised and estimated for molecular masses, as shown in the right, in a different SDS gel. (C) The microsequencing result of the Osm30 secretory protein.


```

1  ATGGCTGCTAATAAGCTCAAGTTCTCCCTCTCCTTGCCTCTTCTCCTCGCCGGCATAGCCGTACCT 70
   M A A N K L K F S P L L A L F L L A G I A V T
71  CCCGTGCCGGCGACATCGCCGTGTACTGGGGCCAGAACGGCGACGAGGGCAGCCTGGCCGACGCCGCAA 140
   S R A G D I A V Y W G Q N G D E G S L A D A C N
141 CTCCGGCCTATACGGCTACGTTCATGGTCGCCTTCTCAGCACCTTCGGCAACGGCCAGACCCCTGTCTC 210
   S G L Y A Y V M V A F L S T F G N G Q T P V L
211 AACCTCGCCGGGCACTCGAACAAGCTCCGGCGGCTGCACCGGCCAGAGCTCGGACATCCAGACGTGCC 280
   N L A G H C E P S S G G C T G Q S S D I Q T C
281 AGTCGCTGGCGCTCAAGGTATCCTGTCCATCGGCGGCGGGCCGGCAGCTACGGGCTGTCTGTCACCCA 350
   Q S L G V K V I L S I G G G A G S Y G L S S T Q
351 GGACGCCAGGACGTGGCCGACTACCTGTGGAACAACCTTCTCGGCGGACAGCTCGGGCTCCGCGCGCTC 420
   D A Q D V A D Y L W N N F L G G S S G S R P L
421 GGGACGCCGCTGTGGACGGCGTCGACTTCGACATCGAGACCGGCAACCCGGCGCACTACGACGAGCTCG 490
   G D A V L D G V D F D I E T G N P A H Y D E L
491 CCACGTTCTGTTCGGGTACAGCGCGCAGGGGGGGCGGCAAGAAGGTGATCCTGACGGCGGCGCGCAGTG 560
   A T F L S P R Y S A Q N G D A S N L V S A W N T W
561 CCCCTACCCGGGACGCGTTCGCTGGGCGCGGCTGCAGACGGGCTGTTCGACAGCGTGTGGTGCAATTC 630
   P Y P D A S L G P A L Q T G L F D S V W V Q F
631 TACAACAACCCGCGTCCAGTACGCCAACGGCGACGCCAGCAACCTGGTGGCGCGTGGAAACAGTGGGA 700
   Y N N P P C Q Y A N G D A S N L V S A W N T W
701 CCGGCGGCGTTCAGCGCGGGAGCTTCTACGTTCGGCGTGCCGGCGGGGAGGCGCGGGGGAGCGGGTA 770
   T G G V S A G S F Y V G V P A A E A A A G S G Y
771 CGTGGCACCCGGCGACCTGACGTTCGGCGGTGCTCCCGCGTGCAGGGCAACGCCAAGTACGGCGGCATC 840
   V A P G D L T S A V L P A V Q G N A K Y G G I
841 ATGGTGTGGAAACCGGTTCTACGACGTGCAGAACAACCTCAGCAACCCAGGTGAAGAGCAGCGTC 903
   M V W N R F Y D V Q N N F S N Q V K S S V *

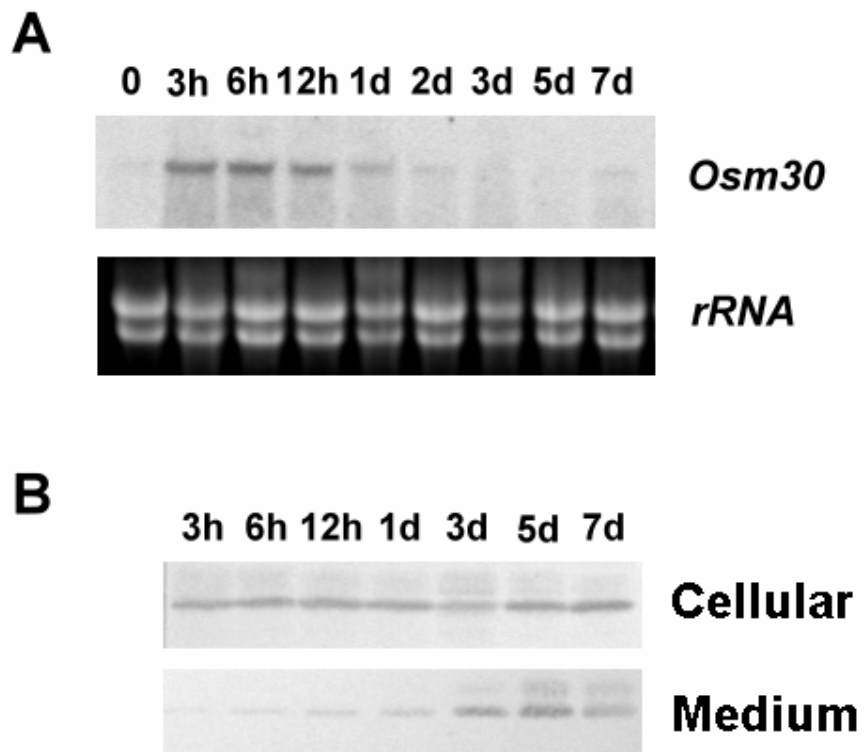
```

圖二、*Osm30* 的完整基因序列，與轉譯出之胺基酸序列

蛋白質全長為 301 個氨基酸 (核苷酸 1-903)，從 N 端開始的前 26 個胺基酸 (核苷酸 1-78 bp) 為分泌訊息序列，劃框處為分泌到培養液中的 *Osm30* 蛋白質進行 N 端胺基酸微定序所得的序列 (核苷酸 79-135 bp)。圖中兩段繪實線處為第 18 族糖苷水解酵素的兩段保守序列，▲為活性位，繪虛線處指出可能的 N-糖化位，「*」為轉譯終止密碼 (核苷酸 904-906)。

Figure 2. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *Osm30*.

The predicted amino acid sequence (301 aa) is shown below the nucleotide sequence (903 bp). The first 26 amino acids were predicted to be the secretory signal sequence and the box displays the N-terminal amino acid sequence of *Osm30*. The underlines indicate the conserved regions of glycosyl hydrolase family 18, the triangle show the active sites, a dotted line show the putative N-glycosylation site and asterisk show the stop codon.



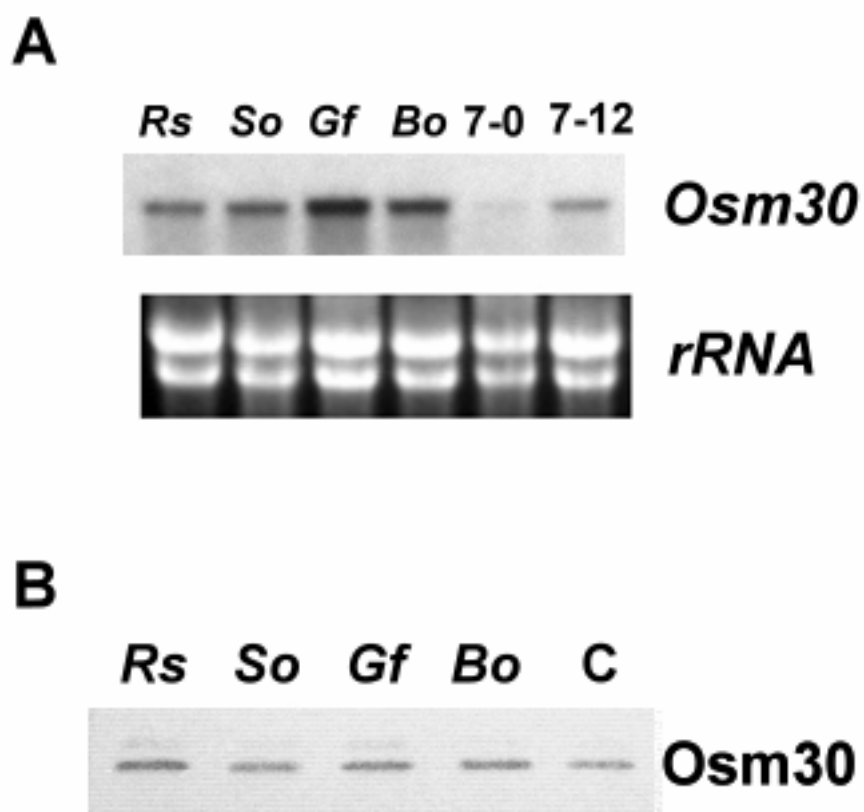
圖三、*Osm30* 在水稻懸浮培養細胞中的表現情形

圖三、*Osm30* 在水稻懸浮培養細胞中的表現情形

(A) 為 *Osm30* mRNA 的北方轉漬分析結果。「0」為已培養七天，準備進行繼代培養的細胞，「3 h」-「7 d」分別代表繼代培養後 3 小時到 7 天的細胞樣品，每個樣品都是加入 10 µg RNA，以 *Osm30* 的 cDNA 為探針，「rRNA」為 EtBr 染色的對照組。(B) 為 *Osm30* 蛋白質的西方轉漬分析結果。繼代培養後不同時間 (3 h - 7 d) 收集的細胞蛋白質 (Cellular) 或培養液蛋白質 (Medium) 先進行 12% SDS-PAGE，再以 RA-*Osm30* 抗血清進行免疫染色。使用未經過免疫注射的白兔抗血清 (NIR) 染色的對照組時均無反應訊號 (data not shown)。

Figure 3. Expression analyses of *Osm30* in suspension-cultured rice cells.

(A) Northern blot analysis of *Osm30* RNA. Total RNAs were extracted from rice cells of various times after subculturing. Ten microgram RNA from each of the extracted samples were loaded onto each lane of an agarose gel. After electrophoretical separation, the Northern blot analysis was performed using *Osm30* cDNA as probe. A duplicate gel stained with ethidium bromide was used as a control for RNA loading. (B) Western blot of *Osm30* protein. Cellular proteins (Cellular) and secreted proteins (Medium) were isolated from rice cells of different culturing times as indicated. After separation in a 12% SDS gel, proteins were electroblotted on to a nitrocellulose membrane and immunostained with rabbit anti *Osm30* antiserum. The negative control immunoblot stained with non-immune rabbit serum showed no reactive signal and is not shown here.



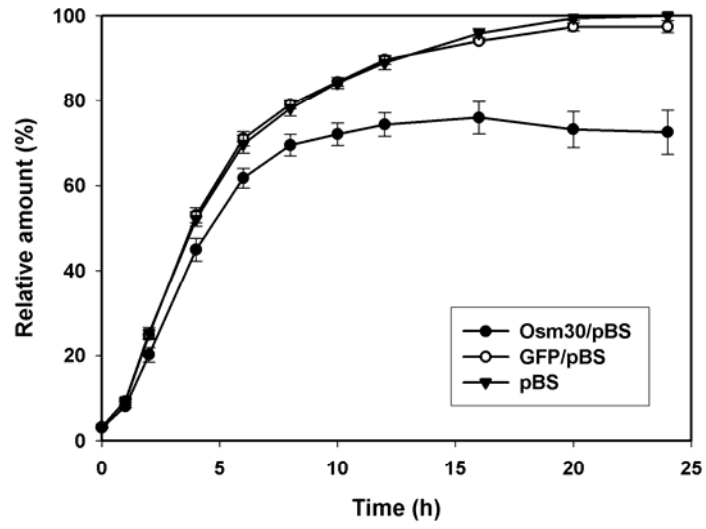
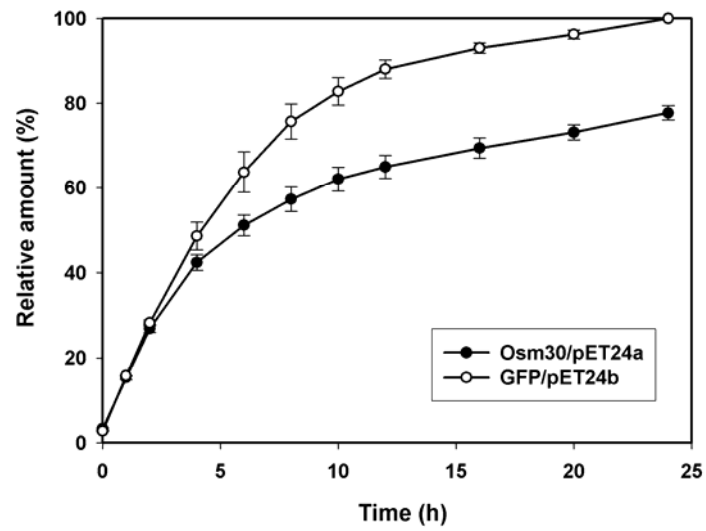
圖四、真菌感染後 *Osm30* 的表現情形

圖四、真菌感染後 *Osm30* 的表現情形

(A) 為懸浮培養的水稻細胞，在分別被 *Rhizoctonia solani* (Rs)、*Sarocladium oryzae* (So)、*Gibberella fujikuroi* (Gf) 和 *Bipolaris oryzae* (Bo) 感染 12 小時後，*Osm30* mRNA 的北方轉漬分析結果。「7-0」為感染處理前的水稻細胞，而「7-12」為未感染，但已繼代培養 12 小時後的水稻細胞。(B) 為水稻細胞在以各種真菌感染三天後，收集培養液進行西方免疫轉漬分析的結果。C 為未感染的對照組。

Figure 4. Fungal induction of the *Osm30* gene.

(A) Total RNAs were extracted from rice cells 12 h after infected with *Rhizoctonia solani* (Rs), *Sarocladium oryzae* (So), *Gibberella fujikuroi* (Gf) and *Bipolaris oryzae* (Bo), respectively. Each lane of an agarose gel was loaded with 10 µg extracted RNA. After electrophoresis and blotted RNA onto a nylon membrane, the Northern blot analysis was performed using an *Osm30* cDNA as a probe. Lane “7-0” represents the total RNA extracted from 7-d-old non-infected rice cells, while lane “7-12” represent the total RNA extracted from 0.5-d-old non-infected rice cells. Ethidium bromide staining of the RNA gel (rRNA) was used to show equal loading. (B) Western blot analysis of the secreted proteins that were collect from 3-d suspension-cultured medium of rice cells with or without (C) fungal infection. Proteins (10 µl per lane) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with antiserum raised against purified *Osm30* recombinant protein at a dilution of 1:30000 for 1 h.

A**B**

圖五、細菌轉形 *Osm30* 基因與 *GFP* 基因後的生長曲線比較

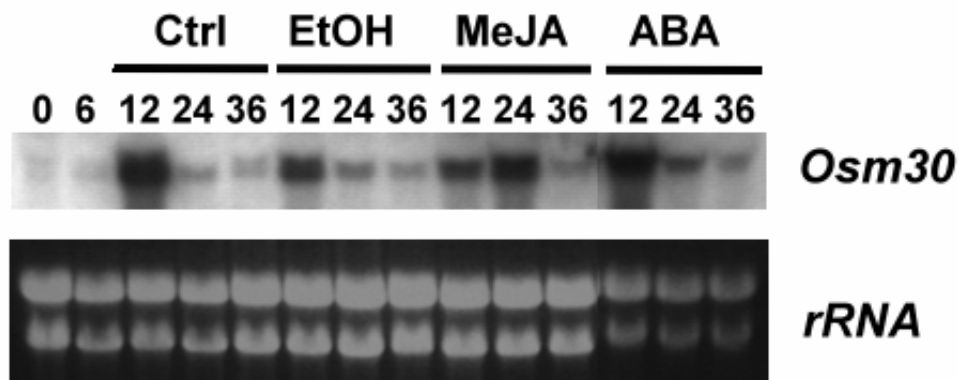
圖五、細菌轉形 *Osm30* 基因與 *GFP* 基因後的生長曲線比較

(A) 為 *E. coli* XL1-Blue 菌株，在分別轉形 pBlucscript II (pBS)、含 *Osm30* 的 pBlucscript II (Osm30/pBS) 及含 *GFP* 的 pBlucscript II (GFP/pBS) 後，其生長曲線的比較。縱座標的細胞相對含量是取以轉形 pBS 載體的細菌在培養 24 小時之 A_{600} 吸光值為 100%，繪出之生長取線圖顯示轉形含 *Osm30* 的載體會抑制細菌生長。

(B) 為 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株，在分別轉形含 *GFP* 的 pET24b 及含 *Osm30* 的 pET24a 後，其生長曲線的比較。以轉形 GFP/pET24b 細菌培養 24 小時之 A_{600} 吸光值為 100%，結果顯示 *Osm30* 會抑制細菌生長。

Figure 5. *Osm30* recombinant protein influenced the bacterial growth.

(A) pBlucscript II (pBS), Osm30/pBS and GFP/pBS were transformed into *E. coli* XL1-Blue. Measured the absorbance in 600 nm (A_{600}) during the culture period and draw the growth curve. The A_{600} value of XL1-Blue with pBS cultured 24-h showed 100% as the control. (B) pET24b/GFP and pET24a/Osm30 were transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The A_{600} value of BL21 (DE3) with GFP/pET24b cultured 24-h showed 100% as the control.

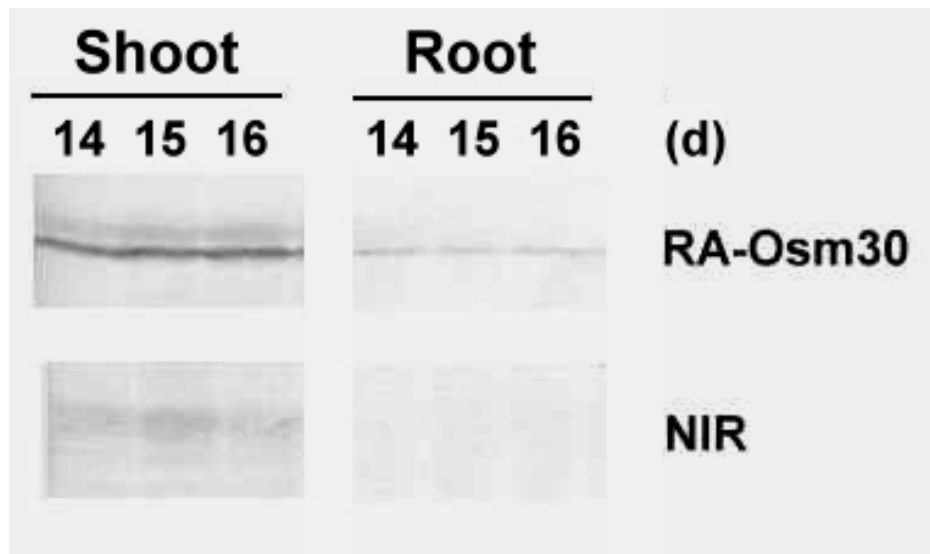


圖六、各種植物生長調節劑對 *Osm30* 基因表現之影響

將已培養 7-d 的水稻細胞 (0) 於進行繼代培養六小時後 (6)，分別加入 30 μ M MeJA、50 μ M ABA 及酒精 (EtOH)，並分別在 6、18 和 30 小時後 (相當於繼代培養後 12、24 和 36 小時)，萃取水稻細胞的 RNA，以 *Osm30* cDNA 為探針，進行北方轉漬分析。rRNA 代表電泳後 rRNA 經 EtBr 染色的結果。Ctrl 為未處理的對照組。

Figure 6. Northern blot analysis of *Osm30* gene in MeJA, ABA and ethanol treated suspension-cultured rice cells.

7-d cultured rice cells were transfer into fresh MS medium, 6 h later, treated with 30 μ M MeJA, 50 μ M ABA, ethanol (EtOH) or untreated (Ctrl) for 6, 18 or 30 hours (12, 24 and 36 h after subculture). RNA blots were hybridized with *Osm30* cDNA probe. Ethidium bromide staining of the RNA gel (rRNA) was used to show equal loading.



圖七、Osm30 在水稻植株中的表現情形

以與組織等重的 2 倍濃度 SDS-sample buffer 萃取 14-16 天大的水稻植株之枝系 (Shoot) 和根系 (Root) 的蛋白質，進行 12% SDS-PAGE 時，每個樣品槽注入 10 μ l 蛋白質樣品，再以 RA-Osm30 抗血清進行免疫染色。使用未經過免疫注射的白兔抗血清 (NIR) 染色的對照組。

Figure 7. Osm30 protein expressed in rice intact plant.

Equal fresh weight of 2X SDS-sample buffer was used to extract the total proteins from the shoots and roots of 14- to 16-d-old rice plants. Protein samples (10 μ l per lane) were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membrane. The blots were incubated with rabbit anti Osm30 antiserum (RA-Osm30) and non-immune rabbit serum (NIR) as negative control