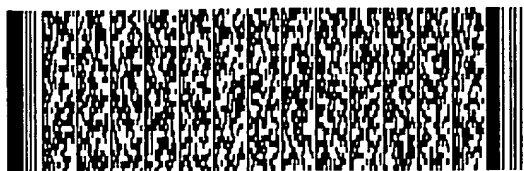


申請日期： 92/11/28	IPC分類
申請案號： 92/33635	C12N 15/63

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	於穀類植物穀粒外皮表現外源蛋白質之方法
	英 文	
二、 發明人 (共3人)	姓 名 (中文)	1. 李滋泰 2. 陳良築 3. 曾志正
	姓 名 (英文)	1. 2. 3.
	國 籍 (中英文)	1. 中華民國 TW 2. 中華民國 TW 3. 中華民國 TW
	住居所 (中 文)	1. 高雄縣橋頭鄉仕隆路122號 2. 台中市南區南平一街31號7F-2 3. 台中市國光路250號
	住居所 (英 文)	1. 2. 3.
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓 名 (中文)	1. 國立中興大學
	名稱或 姓 名 (英文)	1.
	國 籍 (中英文)	1. 中華民國 TW
	住居所 (營業所) (中 文)	1. 台中市國光路250號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英 文)	1.
	代表人 (中文)	1. 顏聰
	代表人 (英文)	1.



一、本案已向

國家(地區)申請專利

申請日期

案號

主張專利法第二十四條第一項優先權

無

二、☐主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間

日期：

四、☐有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☒熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

五、發明說明 (1)

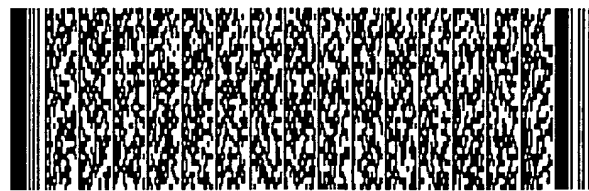
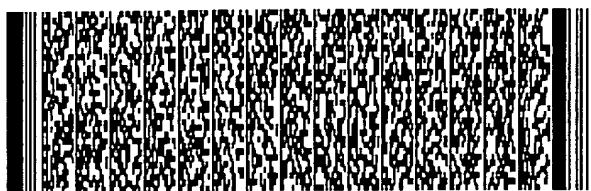
[發明技術領域概述]

本發明係關於一種於穀類植物種子外皮特異性表現外源蛋白質之方法，包含有(1)將外源蛋白基因或其片段操作連結至植物油體膜蛋白基因啟動子區域，(2)將所得包含外源蛋白基因或其片段操作連結至植物油體膜蛋白基因啟動子之卡匣的表現載體轉殖至植物中，及(3)使該轉殖植物特異地於富含油體成份之種子外皮中表現該外源蛋白質。

於另一層面上，本發明亦關於一種用以於穀類植物穀粒外皮特異表現外源蛋白質之表現載體，其特徵為包含植物油體膜蛋白基因啟動子區域、外源蛋白基因（全長或其片段）、及標記基因。

[發明背景]

已知植物種子中含有眾多的油脂以備發芽之用，這些油脂主要以三酸甘油酯(triacylglycerol)的型式，被儲存在植物細胞的油體(oil body)胞器中因為油脂是疏水性的，所以油體係被一層磷脂質(phospholipid)包圍，此磷脂質層外鑲滿一種獨特的蛋白質叫油體膜蛋白(oleosin)，以及三種尚未被研究清楚的微量蛋白質。目前所有研究過的被子植物均含有兩種油體膜蛋白的同功蛋白(isoforms)，分子量分佈在15-24kDa之間，玉米及水稻油體構造膜蛋白基因之核酸序列已被定出，並推測得其蛋白構造（參見，范氏與黃氏，1987，J. Biol. Chem.



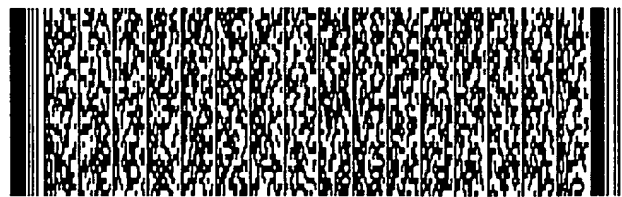
五、發明說明 (2)

262:112757-11279 ; 及陳等人, 1996, plant physiol. 110:714)。

油體膜蛋白乃種子油體表面含量最豐富的蛋白質，是一種構造蛋白，其功能為保護油體之完整性，以利此胞器於細胞質內能長期儲存，並保持穩定的構造。油體膜蛋白構造可分為三區：N-端區、中間疏水區、及C-端區。中間疏水區由約70個非親水性胺基酸組成，是目前在自然界發現的蛋白質中，擁有最長的疏水性氨基酸序列（范氏與黃氏，1987，J. Biol. Chem. 262:112757-11279；曾氏等人，1992，J. Biol. Chem. 267:15626-15634）。

田間收穫的稻穀，經加工脫去穀殼後就是糙米；糙米碾去米糠層保留住胚芽就是所謂的胚芽米；糙米碾去米糠層及胚芽，剩下的胚乳就是精白米。糙米包含有表皮，胚芽，胚乳等，分別佔總重量的5%，3%及92%，亦即，米糠（或鼓糖＝表皮＋胚芽）占8%，精白米占92%。其中所含的營養成份主要在米糠中，如維生素、檸檬酸含量在表皮為29%，胚芽為66%，這都在米糠中，而胚乳即精白米中只有5%。就是說95%的營養成份在米糠中，只吃精白米的人失去了攝取95%營養成份的機會。另外每一粒稻米中約有0.7-3%的脂肪存在米糠中，得以提煉米糠油。胚芽是植物發芽的部份，富含蛋白質，脂肪、維生素B，礦物質。而米粒中所含72-79%的醣則儲存在胚乳中，是提供熱量的主要來源。

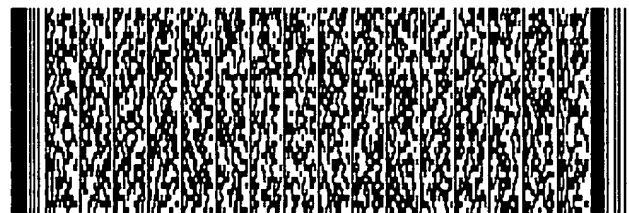
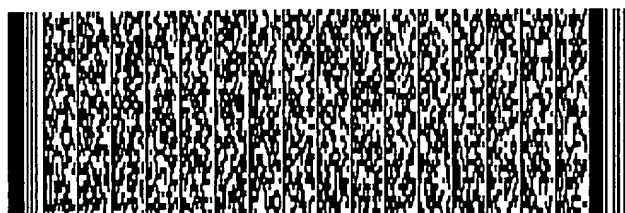
糙米含豐富的蛋白質、纖維素(是精白米的兩倍)、礦



五、發明說明 (3)

物質、鐵質及維生素B1、B2及B3，能淨化血管，促進新陳代謝、幫助消化及清理腸胃，對於多肉少菜的人來說，多吃也不會發胖，無疑是一個喜訊。。有關健康飲食的研究亦顯示，長期進食糙米，有助將毒素（例如食物添加劑、農藥及放射性物質等）排出體外。此外，糙米更能平衡血糖、防止尿酸過高。

稻穀的外殼俗稱「粗糠」，去掉粗糠的稻穀叫「糙米」，糙米外表有一層薄薄的皮，這層皮及胚芽合稱「米糠」，米糠中富含油類物質，主要為油體，可以拿來製油，而製出來的油就叫做「米糠油」。米糠油中不飽和脂肪酸含量高達80%以上，還含有維生素E、卵磷脂、維生素D、胡蘿蔔素和植物固醇等多種營養成分。長期食用米糠油可降低血脂，降低血清膽固醇，防治心血管疾病，促進新陳代謝（含抗氧化之物質），調節腦功能和生殖功能。就傳統中醫詮釋上，米糠可補中益氣、養心貯神。由於米之油主要存在於米糠中，以油體方式儲存，所以推論米糠中必定含有大量之油體膜蛋白，因此吾人便推論油體膜蛋白能專一地表現於米糠中。依此推論，本案申請人遂利用稻米油體膜蛋白18 kD基因啟動子攜帶芝麻種子2S清蛋白基因做為報導基因，使該2S清蛋白專一表現於水稻之米糠中。進而，根據本發明利用油體膜蛋白基因啟動子，使外源蛋白質特異地表現在植物穀粒（穀類）具有油體成份之外皮上的方法，不但可提升穀物之營養及附加價值，且能在利用植物做為生物反應器生產外源蛋白時，大



五、發明說明 (4)

大減低生產成本，並改善由原核微生物表現外源蛋白可能因未能進行轉譯後修飾而造成蛋白質失去活性之問題。

[內容]

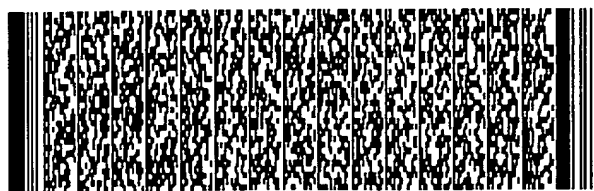
於本發明之一項具體實施例中，係以水稻油體膜蛋白18 kD基因啟動子攜帶芝麻種子2S清蛋白基因，將所製得之表現載體轉殖至水稻植物中，使該外源2S清蛋白基因特異地於轉殖水稻穀粒的外皮（即米糠，主要為糊粉層與胚芽）中表現，並藉以生產富含甲硫胺酸蛋白之稻米，且延續表現至其子代中。

[圖式之簡要說明]

圖1列示，野生型與轉殖基因水稻植株進行南方點墨法 (Southern blot)(A)、北方點墨法 (Northern blot) (B) 及西方點墨法 (Western blot)(C) 之鑑定結果。於南方點墨法及西方點墨法圖示中，WT代表野生型(wild type)；而A1、A3、A4及A9分別為具代表性之水稻轉植株。

圖2列示，針對萃取自A4-6轉殖水稻株之根、莖、葉與穀粒之總體RNA進行北方點墨分析的結果。各列皆加樣10 μ g總體RNA，於轉漬後將膜與含有S2SA編碼序列之³²P-標記探針進行雜交。

圖3列示，於A4-6轉殖基因水稻種子中S2SA之免疫染色結果。(A)係將萃取自轉殖基因水稻之完整穀粒、研



五、發明說明 (5)

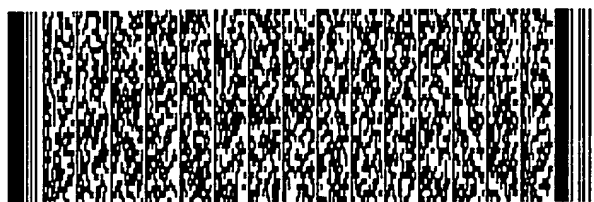
製米（精白米）及米糠之蛋白質使用抗S2SA之大次單位的抗體進行西方點墨分析。(B)係將得自野生型(WT)與轉殖水稻植株之米粒切半並進行類似於西方點墨法之免疫組織印染。(C)為於光學顯微鏡下進行轉殖水稻種子表層之免疫組織染色結果，其中E：表皮；P：果皮；T：管細胞；S：種皮；N：核細胞；A/E：糊粉層與胚乳之外層。圖中之橫線代表50 μm 。

[發明說明]

為確保清楚且一致性瞭解本說明書及申請專利範圍，遂提供下列定義：

油體膜蛋白：為植物種子中覆蓋在用於儲存油的胞器（油體）表面的特有蛋白質。油體膜蛋白為一低分子量鹼性蛋白質，分子量約15-26 kD，佔油體總量的1-4%，主要功能在於維持油體之立體結構。已知在稻米油體中存在有兩種油體膜蛋白同功蛋白，16 kD及18 kD同功蛋白，彼等之cDNA序列已揭示於陳氏等人，Plant Physiol. 110:714 (1996)。

芝麻種子2S清蛋白基因：芝麻種子中含量豐富的儲存蛋白2S清蛋白(2S albumin)（佔總蛋白質之20-25%）為富含甲硫胺酸之蛋白質，其完整基因序列已被選殖出，參見例如，戴等人，Agri. Food Chem.，47: 4932-4938



五、發明說明 (6)

(1999)。本發明內文所述之芝麻種子2S清蛋白基因，係指其完整基因序列或其部份DNA片段。

表現：意指植物內源基因或轉殖基因之轉錄及/或轉譯作用。

標記基因：意指編碼可選擇或可篩檢特徵之基因。

操作鍵聯或/相連結：所稱係將調節性DNA序列與編碼RNA或蛋白質之DNA序列"操作鍵聯"或"相連結"，惟若該二種序列互相適合而使該調節性DNA序列能影響該編碼序列之表現。

植物：意指任何植物，尤其係指種子植物。

啟動子：意指引發所相連結DNA序列開始進行轉錄之DNA序列。啟動子區域亦可包括作用為基因表現之調節子的元件，例如激活子、增強子、及/或抑制子，且可包括5'-非經轉譯前導序列之全部或部份。

轉殖作用：意指將核酸導入細胞中之作用。尤其，其係指將DNA分子穩定整合至所興趣生物體之基因組中。

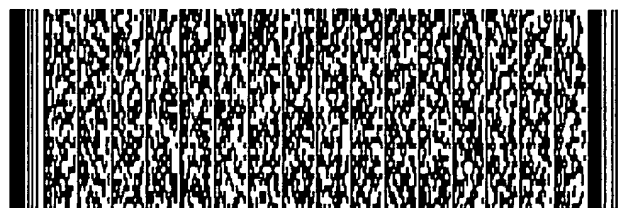
本發明之另一項目的在於，提供包含本發明重組表現載體之轉殖植物。因此，本發明亦關於具有藉由下文所述任一種轉殖方法所獲得之含高甲硫胺酸蛋白的植物細胞、衍生自此類植物細胞之植株、植物材料、衍生自此類



五、發明說明 (7)

植株之子代或種子、以及其農業產品（如米糠及加工食品等）。

本發明之於植物種子外皮特異表現外源蛋白質的重組表現載體，可藉由許多該項技藝已熟知之方法導入植物細胞中。習於該項技藝人士應瞭解，此類方法之選擇可基於所標定供轉殖之植物類型，亦即單子葉或雙子葉。供轉殖植物細胞之適宜方法包括顯微注射（克洛斯威等人，1986，*Biotechnology* 4:320-334）、電穿孔（雷格斯與貝斯，1986，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，83: 5602-5606）、農桿菌-所介導之轉殖作用（英其等人，1988，*Biotechnology*，6:915-922；EP 0 853 675）、直接基因轉殖（帕茲卡斯基等人，4，*EMBO J.* 3:2717-2722）、及使用亞格瑟斯股份有限公司，麥迪遜，威斯康辛及杜邦股份有限公司，威明頓，迪拉維販售之裝置進行的發射粒子加速作用（參見，例如，美國專利4,945,050及麥蓋柏等人，*Biotechnology* 6:923-926）。欲受轉殖之細胞可為已分化之葉部細胞、胚細胞、或其他類型之細胞。於原生質體之直接轉殖中，可藉由使用化學試劑或電場完成將外源性遺傳物質攝入原生質體中。然後可將外源物質整合至宿主細胞核之基因組中。將前述工作於雙子葉煙草植株中（帕茲卡斯基等人，1984，*EMBO J.* 3:2717-2722；波庫茲等人，1985，*Molecular Genetics* 199:169-177），或於單子葉植物（例如）小麥、黑裸麥（義大利黑麥草）、玉米、及黑墨西哥甜玉米之原生質體進行轉殖，使外源



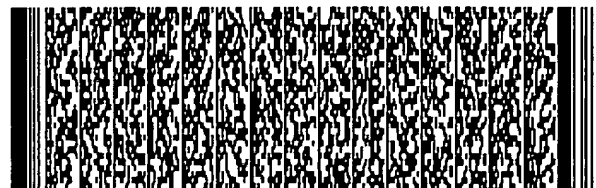
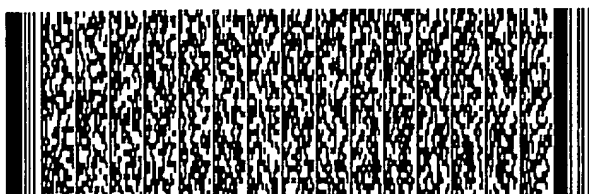
五、發明說明 (8)

DNA 併入且轉送至子代植株中。稻米之轉殖可藉由使用原生質體或粒子轟擊之直接基因轉殖技術完成。專利申請案 EP 0 332 581 描述用於產生、轉殖及再生 Pooideae 原生質體之技術。此等技術使能轉殖所有 Pooideae 屬植物，包括鴨茅及小麥。故根據本發明所構築得之植物表現載體可（例如）根據習知植物轉殖方法導入稻米癒傷組織，從其誘導根及葉之分化，然後可轉移至盆中栽種，藉此獲得經轉殖之稻米。

於本發明之一項具體實施例中，係以水稻為轉殖植物，並以農桿菌轉殖法，將包含由水稻油體膜蛋白 18 kD 基因啟動子所攜帶之芝麻種子 2S 清蛋白基因的表現載體轉殖至水稻胚體癒傷組織中，並使該經轉殖之癒傷組織分化、再生、生長成為完整植株。此經轉殖之水稻可於其種子之米糠，特異地表現該 2S 清蛋白基因，並生產具高甲硫胺酸之蛋白質的米粒，極富高營養價值。

[實施例]

本發明將以下述實施例，進一步說明本發明之技術內容，然而所列之實施例僅作說明之用，而無意於限定本發明之範圍。任何習知該項技藝人士，皆可根據本發明及具體實施例所述，在不偏離本發明精神及範圍下，作任意修飾及更改，惟仍應涵括於本發明之範圍內。



五、發明說明 (9)

實施例1. 基因轉殖的植物材料

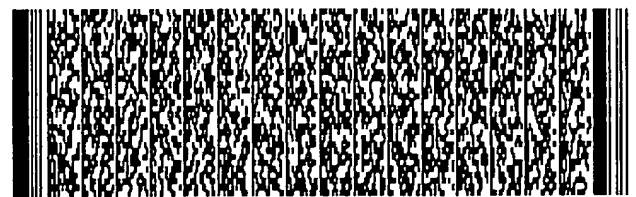
選取水稻台農67號授粉後15-20天乳熟期的穀粒，剝除內外穎後，將種子以70%酒精洗滌，再於1%次氯酸鈉溶液中以超音波震盪消毒15-20分鐘，並以無菌水沖洗三次。將滅菌後的種子播於CIM培養基(Callus Induction Medium)上。將培養盤放置於28 °C，24小時全光照的生長箱，培養10-14天，誘導癒傷組織生成。在進行農桿菌轉殖感染前二至三天，將誘導出之癒傷組織，以滅過菌之解剖刀，切成直徑約2-3 mm的小細胞團，並繼代培養於新的CIM培養基上，此材料即為適合接受農桿菌感染之材料。

實施例2. 表現載體之構築

以pCAMBIA 1300 (Accession NO: AF234296) 載體進行含有受水稻油體膜蛋白18 kD基因啟動子所調控芝麻種子2S基因表現卡匣轉殖之構築。首先以含有2S基因全長之載體為模板，於該基因之兩端各設計一條引子(5'-端引子及3'-端引子)，以聚合酶鏈鎖反應(PCR)合成具有2S全長基因之DNA片段。之後，以限制酶 (HindIII與EcoRI) 切割，接入經相同限制酶切割之pOle質體(含有油體膜蛋白蛋白(基因啟動子)中，即完成表現載體之構築，所得之表現載體命名為質體pOle-2S。

實施例3. 表現載體至農桿菌之轉殖作用

取電穿孔儀專用容器(BTX, ElectroSquarePorator

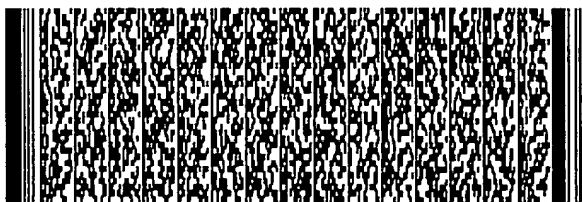


五、發明說明 (10)

T820)，加入40 μ l 勝任細胞（農桿菌），同時加入如實施例1所述製得之表現載體p01e-2S之純化DNA，進行電穿孔轉殖作用。將經電穿孔轉殖作用後之農桿菌菌體塗抹於含抗生素的固體培養基，於28℃下培養2天。挑單一菌落培養於3 ml含適當抗生素之LB培養液中，於28℃培養24小時後，取300 μ l之菌液離心，去上清液，加入50 μ l之TE緩衝液劇烈振盪，充分混合菌體，取5 μ l菌液以如實施例2中所述之5'-端引子(20 μ M)、3'-端引子(20 μ M)進行聚合酶鏈鎖反應（進程式：第一次95℃，5分鐘；接著95℃，60秒；62℃，60秒；72℃，45秒經30次循環；及最後72℃，10分鐘），再以電泳分析PCR之產物，以確認農桿菌中含有送入之質體。

實施例4. 農桿菌-介導之基因轉殖

將如實施例3中所述製得之經轉殖農桿菌培養於含kanamycin (50 μ g/ml)及hygromycin (50 μ g/ml)之培養液中，經於28℃下培養36小時後，加入無菌之20%葡萄糖溶液及無菌之Acetosyringone (100 μ M)進行繼代培養，至OD600= 0.6-0.8，將菌液於4℃下離心，去上清液，以AAM液體培養基、20%葡萄糖溶液及100 μ M AS小心回溶菌團，再將如實施例1所述之癒傷組織浸於此菌液中進行感染作用，取出感染後癒傷組織放置於2N6-AS培養基，於28℃黑暗培養7小時。共同培養後將癒傷組織取出，以AA2液體培養基輕微搖晃洗滌，重覆三次，最後一次以含有



五、發明說明 (11)

250 $\mu\text{g/ml}$ 之 cefotaxime 溶液洗一次，以殺除附著在癒傷組織表面之農桿菌。將此感染後之癒傷組織移至含有 hygromycin (250 $\mu\text{g/ml}$) 之 2N6-CH 培養基，全光照培養 4 天後，再移至新的 RS-CH 培養基，於 30 $^{\circ}\text{C}$ ，24 小時光照繼續培養，10-12 天繼代培養一次，直至長出綠芽，根系發育健全後，移至含有 RSCH 培養基之再生試管，直至植株健壯後，移至田間溫室栽培。

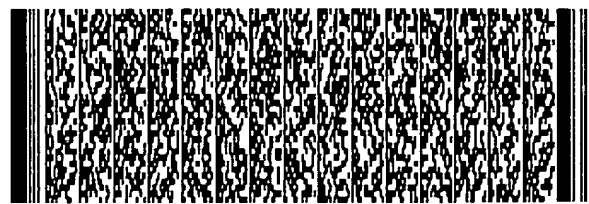
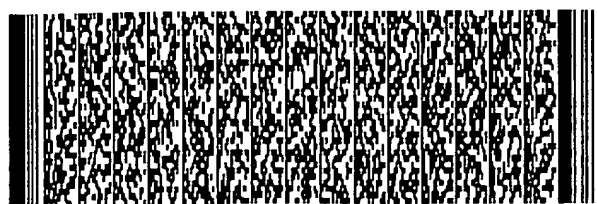
實施例 5. 轉殖水稻之南方墨點分析

取適量經純化之水稻基因組 DNA (15 μg) 以限制酶 Hind III-EcoR I. 剪切，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下完全作用反應。將其於 1% 之洋菜瓊脂膠體進行電泳，分離各長短不同之 DNA 片段。其後將膠體上之 DNA 片段進行轉漬到 Hybond-N+ 膜 (Amersham Pharmacia Biotech. Inc.) 上，並以經放射性 (α -32P) 標定之 2S 基因編碼片段作為探針進行南方點墨分析。

於圖 1(A) 之南方點墨分析結果中，在選用限制酶針對其中 4 株轉殖水稻 (A1、A3、A4、A9) 之整個基因組 DNA 同時以 Hind III 與 EcoRI 限制酶進行裁切，則可切下整段表現載體 (約 2 Kb)，故由結果顯示，此 2S 基因的確有插入水稻之基因組中。

實施例 6. 轉殖水稻之北方墨點分析

萃取水稻組織之 RNA 樣本，並利用分光光譜吸收儀定



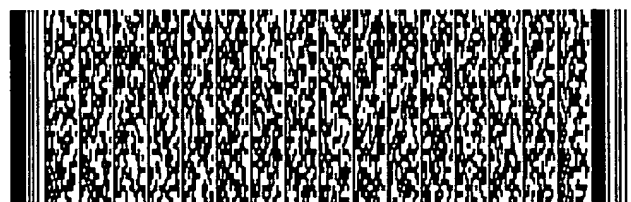
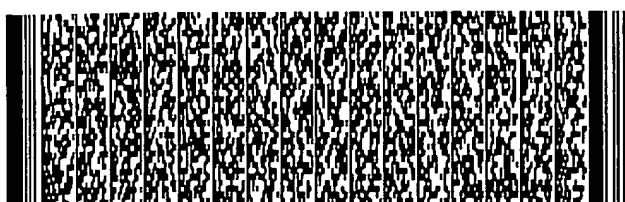
五、發明說明 (12)

量。取10 μ g 萃取自受粉後3-週齡成熟稻米種子的總體RNA 樣品進行電泳（含有2% formaldehyde 之1%的洋菜瓊脂膠體），待電泳完畢後，以50 mM NaOH 浸泡20分鐘，再以10X SSC 處理60分鐘。將處理過的膠體置於裝置好的轉漬器（Vacu-Aid, Hybaid）上，以10X SSC buffer 轉漬1.5 小時，將RNA 轉印製濕潤之Hybond-N+ 膜上，並以經放射性（ α - ^{32} P）標定之全長2S 基因片段作為探針進行南方點墨分析。

由圖1(B)之結果顯示，於不同之轉殖水稻植株中，均有芝麻種子2S RNA 之表現，故表示經轉殖入水稻之芝麻2S 基因，的確能夠在水稻細胞中進行轉錄作用（transcription）。

實施例7. 轉殖水稻之西方墨點分析

利用液態氮將水稻種子之米糠部分研磨成粉狀，加入適量蛋白質萃取液（50 mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1M NaCl），置於冰上10分鐘，以13000 rpm 於4℃離心20分鐘，取上清液即為水稻total protein，置於-20℃儲存，並以Protein assay kit（Bio-Rad）進行蛋白定量。將萃取得之水稻蛋白質進行膠體電泳分析（SDS-PAGE），接著將膠體上之蛋白質轉漬於硝化纖維膜上，並以重組2S 清蛋白大次單位注射母雞免疫所得之抗血清作為第一次抗體，以及結合HRP 酵素的二次抗體（HRP-共軛之山羊抗-雞IgG）進行西方點墨分析。由圖1(C)之結果顯示，針對所選之水



五、發明說明 (13)

稻轉植株品系均有芝麻2S蛋白質的表現；並且以西方點墨分析結果證實，於水稻轉植株之電泳圖中，較野生型額外多出之蛋白質片段（圖中標示為9 kD處）確實為芝麻種子2S清蛋白質（請參照Lee等人，Biosci. Biotechnol. Biochem.，2003，67(8)，1699-1705））。

實施例8. 轉殖水稻之組織特異性表現分析

選擇單一品系之轉殖水稻(A4-6)，進行不同組織部位之北方點墨分析，方法如實施例5所述，其目的為了解以水稻油體膜蛋白18 kD基因啟動子攜帶芝麻2S清蛋白基因，於轉殖水稻中之表現是否具有組織特異性。如圖2之結果顯示，此2S蛋白基因僅特異性地表現於穀粒（seed）部位，而於其他部位如根（root）、莖（stem）及葉（leaf）均未偵測到2S mRNA及蛋白質之表現。故此啟動子確實具有組織特異性。

另根據圖3(A)之結果發現，轉殖S2SA蛋白質主要表現於轉殖水稻穀粒之米糠中，而未被表現於由富含澱粉之胚乳細胞所組成的精白米中。免疫組織印染亦顯示，經表現之外源S2SA係定位於轉殖水稻穀粒的胚與外皮中（圖3B）。為進一步偵測S2SA於轉殖水稻穀粒表面各層之詳細分布情形，遂於光學顯微鏡下觀察其免疫組織染色。由圖3(C)之觀察結果指出，S2SA僅存在轉殖基因A4-6水稻米粒表面之糊粉層及胚乳外之數層細胞中。



五、發明說明 (14)

實施例9. 轉殖水稻米糠之含硫胺基酸含量分析

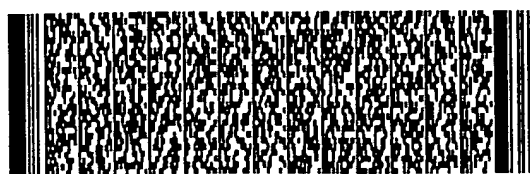
將自野生型植株及四株推定為轉植株系之稻米穀粒碾下之米糠，進行其含硫-胺基酸含量分析。結果列示於下表1中。

表1 一株野生型及四株轉植株系之稻米穀粒碾下的米糠中之含硫(S)胺基酸含量

胺基酸	野生型	轉植株系				SEM
		A1-7	A3-6	A4-6	A9-4	
Met	0.29 ^c	0.37 ^b	0.36 ^b	0.40 ^a	0.38 ^{ab}	0.017
Cys	0.26 ^b	0.40 ^a	0.39 ^a	0.42 ^a	0.42 ^a	0.014

a, b, c 同列中之平均值無相同字肩文字者為具有顯著差異。(P < 0.05)

SEM：平均值標準偏差



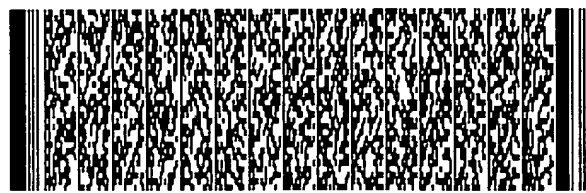
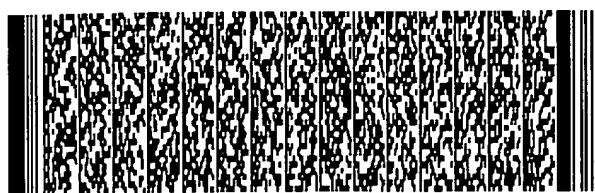
五、發明說明 (15)

結果顯示，相較於野生型植株穀粒中之含-硫胺基酸含量，該四株轉殖基因水稻穀粒中含有顯著較高的甲硫胺酸(Met)與半胱胺酸(Cys)含量。顯示，將S2SA導入轉殖水稻中，可使其米糠中之甲硫胺酸及半胱胺酸含量分別提高24-38%及50-62%。

綜合上述發明說明及例舉之實施例，利用水稻油體膜蛋白基因啟動子攜帶之芝麻種子2S清蛋白確實可特異地表現於轉殖水稻植物的穀粒外皮(米糠)中，而提高轉殖水稻米糠中之含-硫胺基酸含量。

因此，依據本發明之蛋白質特異性表現方法，可依所希望之目的，將所欲表現的外源蛋白質(例如高營養性蛋白、藥理性蛋白、抗體、酵素等)在植物穀粒油體膜蛋白基因啟動子調控下，特異地表現於轉殖基因植物之穀粒外皮，而所製得之植物穀粒或經研製而為副產物之穀粒外皮則可用於食品或飼料添加，作為素食者及食草性畜養動物之營養補給劑，在提高作物營養價值之同時亦可減低飼料成本，符合經濟效益。

因此，本發明係利用自然法則之高度創作，其能達成本發明之預期目的，本發明是為一種前所未見之設計，極具實用之功效，故以上創造已符合發明專利高度創作之要件，爰依法提起發明申請。

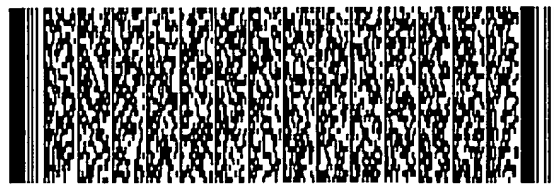
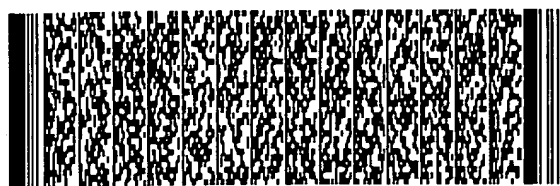


圖式簡單說明

圖1列示，野生型與轉殖基因水稻植株進行南方點墨法 (Southern blot)(A)、北方點墨法 (Northern blot) (B) 及西方點墨法 (Western blot)(C) 之鑑定結果。於南方點墨法及西方點墨法圖示中，WT代表野生型(wild type)；而A1、A3、A4及A9分別為具代表性之水稻轉植株。

圖2列示，針對萃取自A4-6轉殖水稻株之根、莖、葉與穀粒之總體RNA進行北方點墨分析的結果。各列皆加樣10 μ g 總體RNA，於轉漬後將膜與含有S2SA編碼序列之³²P-標記探針進行雜交。

圖3列示，於A4-6轉殖基因水稻種子中S2SA之免疫染色結果。(A)係將萃取自轉殖基因水稻之完整穀粒、研製米(精白米)及米糠之蛋白質使用抗S2SA之大次單位的抗體進行西方點墨分析。(B)係將得自野生型(WT)與轉殖水稻植株之米粒切半並進行類似於西方點墨法之免疫組織印染。(C)為於光學顯微鏡下進行轉殖水稻種子表層之免疫組織染色結果，其中E：表皮；P：果皮；T：管細胞；S：種皮；N：核細胞；A/E：糊粉層與胚乳之外層。圖中之橫線代表50 μ m。



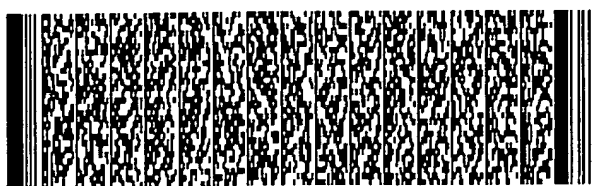
四、中文發明摘要 (發明名稱：於穀類植物穀粒外皮表現外源蛋白質之方法)

本發明係關於藉由將外源蛋白質基因以遺傳工程操作與植物(例如水稻)油體膜蛋白基因啟動子(oleosin promoter)連結，而於該特異性啟動子之操控下，使該外源蛋白質專一地表現於穀類植物穀粒外皮(例如稻米之米糠)的蛋白質表現方法。本發明亦包含於穀類植物種子外皮特異表現外源蛋白質之表現載體及其製法，其中該表現載體包含一種植物油體膜蛋白基因啟動子及外源蛋白質基因。

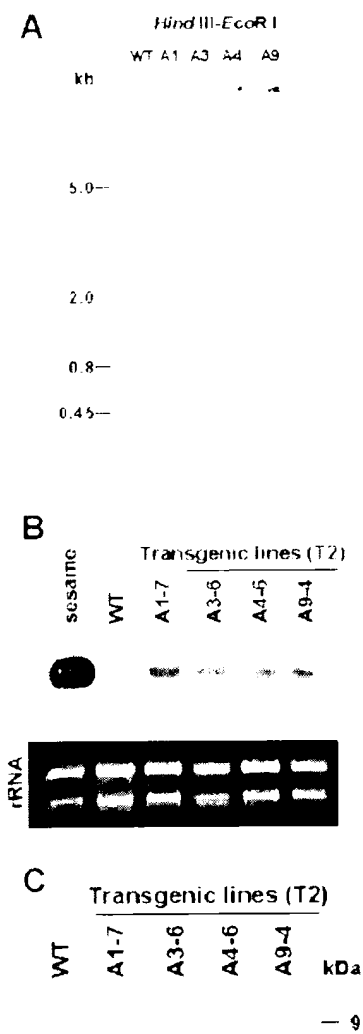
五、(一)、本案代表圖為：第___3__圖

(二)、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：

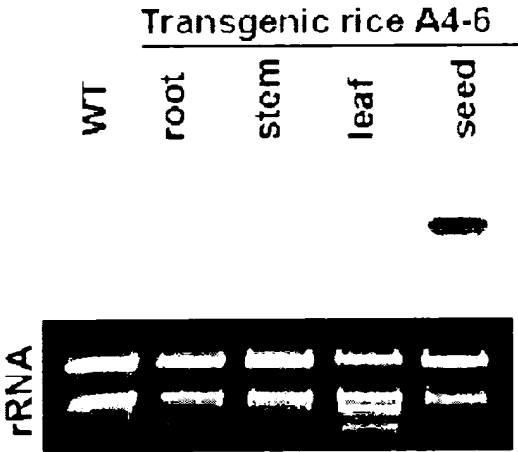
六、英文發明摘要 (發明名稱：)



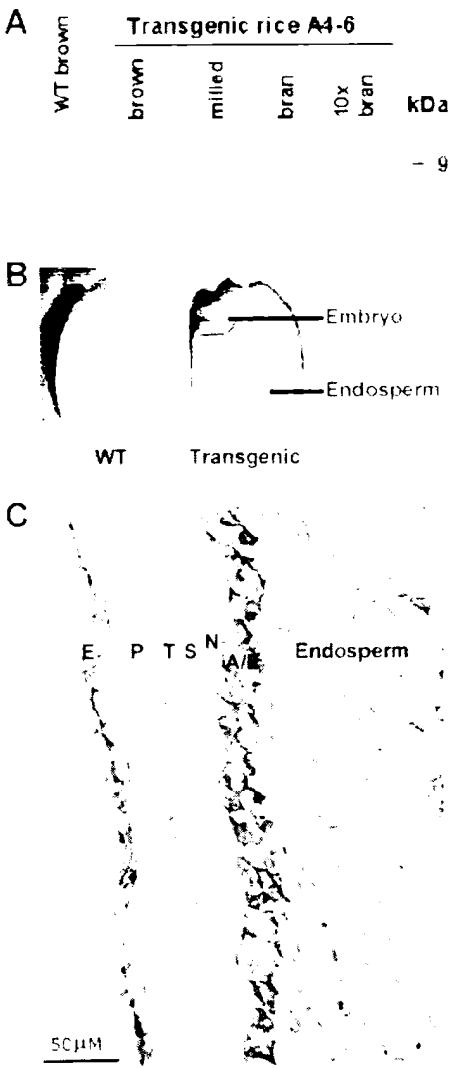
6. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該外源蛋白質為酵素。



第一圖



第二圖



第三圖

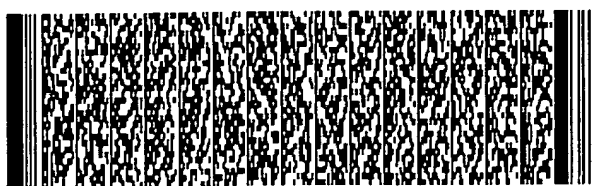
四、中文發明摘要 (發明名稱：於穀類植物穀粒外皮表現外源蛋白質之方法)

本發明係關於藉由將外源蛋白質基因以遺傳工程操作與植物(例如水稻)油體膜蛋白基因啟動子(oleosin promoter)連結，而於該特異性啟動子之操控下，使該外源蛋白質專一地表現於穀類植物穀粒外皮(例如稻米之米糠)的蛋白質表現方法。本發明亦包含於穀類植物種子外皮特異表現外源蛋白質之表現載體及其製法，其中該表現載體包含一種植物油體膜蛋白基因啟動子及外源蛋白質基因。

五、(一)、本案代表圖為：第___3__圖

(二)、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：

六、英文發明摘要 (發明名稱：)



99. 5. 27 修正
年 月 日 補充

公告本

99年 5月 27日 修正替換頁

六、申請專利範圍：

1. 一種於水稻種子外皮特異性表現外源蛋白質之方法，其包含：(1)將外源蛋白基因或其片段操作鍵聯至水稻油體膜蛋白 18 kD 基因啓動子區域，(2)將所得包含外源蛋白基因或其片段操作鍵聯至植物油體膜蛋白啓動子之卡匣的表現載體轉殖至水稻中，及(3)使該轉殖植物特異地於富含油體成份之種子外皮中表現該外源蛋白質。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該外源蛋白質爲高甲硫胺酸蛋白質。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該外源蛋白質爲芝麻種子 2S 清蛋白。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該外源蛋白質爲藥理性蛋白質。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該外源蛋白質爲抗體。