

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 植物學科

第一名

052105

**怪稻棘得一利用 CRISPR-Cas9 探討水稻癒傷
組織生產疫苗次單位蛋白的潛力**

學校名稱：桃園市立武陵高級中等學校

作者： 高二 黃柏瑜 高二 楊子恩 高二 黎廷緯	指導老師： 陳姿吟
---	------------------

關鍵詞：Rice MYBS2、S protein RBD、CRISPR-
Cas9

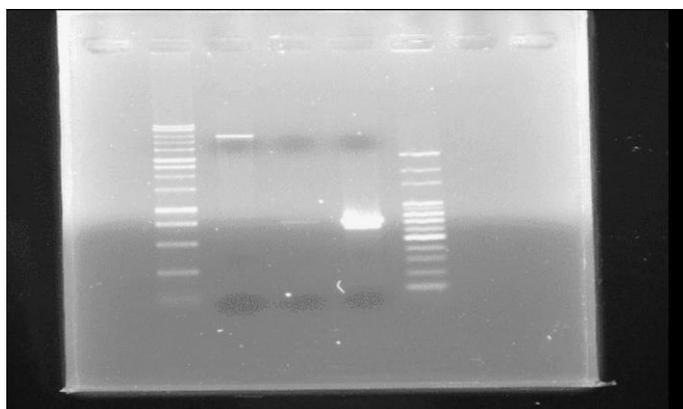
得獎感言

怪稻棘得-在科展的過程中探尋科學研究的魅力

今年參與的第 62 屆中小學科學展覽會，從去年開始的實驗研究，到桃園市初賽與全國複賽的成果展現與口頭發表，以至於最後的頒獎典禮與總統接見，毫無疑問，對我們而言是十分難得並且極其寶貴的人生經驗。

在參與本屆科展的過程當中，除了在實驗進行的階段中學到了許多於從事實驗時所需要留意的細節與研究內容的相關知識之外，我們也在準備口頭簡報的過程之中，藉著重複的練習及與輔導教授們的線上會議，試圖透過精簡卻不失正確性的闡述方式，更完善的將我們的研究成果予以展現。準備報告的過程中，為了進一步培養彼此的默契，我們也學會傾聽、學會欣賞，並在團隊合作中，追求自身的成長。另外，在報告時，要隨時準備好應付教授的提問，這也很大幅度訓練了我們的臨場反應。在高度壓力下沙盤推演，並積極地自問自答，並看見自身的蛻變。十分幸運的是，這些在準備過程中所付出的時間與心力，都以有形或無形的形式，回饋到了我們自身。

非常感謝蔡皇龍教授與劉阜果教授，從參展以來不吝於在報告準備過程給予我們協助與輔導，使我們得以從專業的建議中獲得助益，也非常感謝 62 屆全國科展的主辦單位以及為我們評審的諸位教授，願意提供一個讓我們展現研究成果的舞台並賦予我們這份榮譽。在科學研究的路途上，雖然存在許多尚未明瞭的事物與挑戰，然而也正是這些未知，不停地吸引著我們精益求精，豐富自己的科學實力，以開拓知識的疆界為目標邁進。



電泳照片



癒傷組織



頒獎合照

摘要

本研究以水稻細胞生產新冠病毒（SARS-CoV-2）的棘蛋白（Spike protein），證明植物表現系統生產疫苗次單位蛋白的潛力。病毒棘蛋白可與人類細胞表面的血管收縮素轉化酶 2（ACE2）結合進而感染宿主細胞，因此重組棘蛋白可發展為次單位疫苗。我們將棘蛋白的受體結合結構域（Receptor Binding Domain; RBD）基因序列，經過水稻密碼子最佳化（Rice codon Optimized）後藉由專一性基因編輯技術 CRISPR-Cas9 轉殖進入植物水稻基因組 α -澱粉酶（ α -Amylase）序列中的第一段內含子（Intron 1），使 RBD 能與 α -Amylase 共表現並分泌至細胞外。再利用水稻 MYBS2 缺陷株特性，使轉 RBD 基因癒傷組織在糖缺乏誘導（Sugar starvation）下大量表現並分泌 RBD 蛋白至培養基中，最終藉快篩檢驗 RBD 是否被正確表現且具有抗原性，進而證明以植物細胞大量生產可供作疫苗來源 RBD 蛋白的潛力。

壹、前言

一、研究動機

因應新冠肺炎疫情，全球藥廠已有多款不同類型疫苗開發完成。其中蛋白次單位疫苗具有較高的安全性且更能引發專一性免疫反應，也由於蛋白質較 RNA 穩定使其運輸與儲存門檻較低，更利於落後地區使用以提高疫苗覆蓋率。

蛋白次單位疫苗可利用原核界的大腸桿菌（*E. coli*）、真菌界的酵母菌（Yeast）以及目前的主流動物細胞生產。台灣的高端疫苗生物製劑股份有限公司（Medigen Vaccine Biologics Corporation, MVC）與美國 Novavax 公司所研發的 SARS-CoV-2 疫苗（簡稱新冠疫苗）即是利用哺乳類中華倉鼠的卵巢細胞（Chinese hamster ovary cell, CHO cell）所生產的蛋白作為疫苗。藉由基因重組與基因轉殖技術，使 CHO 細胞帶有新型冠狀病毒的 RBD 序列，進而表現出 RBD 蛋白作為疫苗。

然而哺乳類動物細胞雖為目前最被廣泛使用的表現系統，但仍然存在著缺點。首先，在演化上人類與倉鼠的親源關係很近，使得倉鼠可能帶原人類病毒（例如 2022 年 1 月香港因倉鼠帶有 SARS-CoV-2 而大規模撲殺），若使用的倉鼠來源 CHO 細胞受到病毒汙染，可能因接種被汙染疫苗而導致疾病傳播，再者，新聞上多次出現因相信蛋白次單位疫苗為「動物產品」而礙於宗教或個人因素不願意施打，但如果我們能使用植物細胞（例如水稻細胞）作為蛋白表現系統，則能夠避免上述缺點。此外植物細胞雖然同樣是真核細胞，但培養成本遠低於動物細胞，可表達出正確結構的蛋白外亦可降低生產成本利於商業化發展。近來亦有

以水稻細胞為表現系統的例子，例如：有藥廠利用水稻細胞生產臨床用的人類白蛋白（Human albumin）或是在越南有利用水稻生產富含類胡蘿蔔素的稻米。在本研究我們利用水稻癒傷組織優於動物細胞能持續進行組織培養的特性，並藉由 CRISPR-Cas9 基因編輯技術將新冠病毒 RBD 基因接在 α -Amylase 基因後，使 RBD 能隨 α -Amylase 大量表現並分泌至培養基而無須為了得到 RBD 蛋白破壞 callus，因此可藉由多次誘導蛋白表現，而達到大量且持續生產植物來源 RBD 蛋白的目的。

二、研究目的

- （一）利用水稻癒傷組織表現 RBD 蛋白，建立植物來源疫苗生產系統。
- （二）將 RBD 序列進行水稻密碼子最佳化（Rice codon Optimized），使 RBD 蛋白在水稻癒傷組織相較於未最佳化序列能夠順利表現並提高產量，以利商業化應用。
- （三）利用 CRISPR-Cas9 專一性，將 RBD 基因插入特定位置，使 RBD 蛋白與水稻 α -Amylase 共表現並隨之分泌至培養基中，達到無須破壞 callus 即可在培養基中取得分泌型 RBD 蛋白，提高純化效率並降低生產成本。
- （四）藉由水稻 MYBS2 缺陷株特性，抑制 α -Amylase 負調控機制，提高 RBD 蛋白表現量，達到商業化量產植物來源疫苗的目的。

三、文獻回顧

- （一）Genomic Safe Harbors; GSHs

意指某一物種經過基因全定序之後清楚瞭解其基因序列，因此可以在不影響其正常生理下將目標基因插入的特定安全位置。

- （二）CRISPR-Cas9 基因編輯技術

CRISPR-Cas9 源自於細菌的免疫機制，當細菌第一次受到病毒（噬菌體）感染時，會將病毒遺留的 DNA 片段加到自己的 CRISPR 序列中的間隔（圖一中白色標示間格位置）成為一段自己的基因：



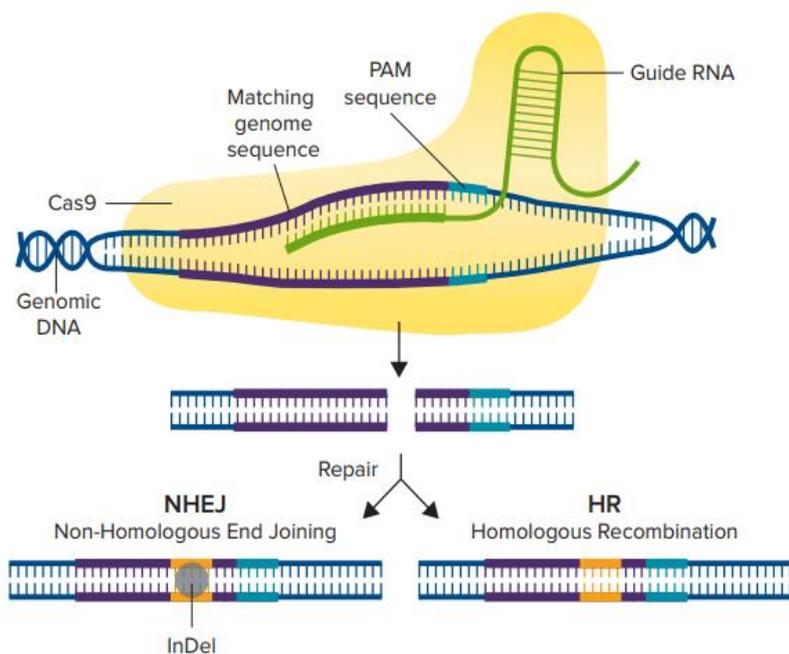
圖一、CRISPR/Cas 序列示意圖

而第二次受相同病毒感染時 CRISPR/Cas 會找出此 DNA 序列並轉為 RNA（crRNA），crRNA 會與 Cas 基因本身的 trans-activating CRISPR RNA（tracrRNA）結合成 guide RNA

(gRNA) 辨認互補的病毒 DNA 序列，進而誘導 Cas 蛋白切割病毒所帶的基因，破壞病毒 DNA 達到免疫機制的的作用。

CRISPR/Cas 系統可分為 3 型，分別為 Type1~3，相較於 Type1 及 Type3 需多種 Cas 蛋白的參與以及複雜的機轉，Type2 (即 CRISPR-Cas9) 僅需要一種 Cas 蛋白 (即 Cas 9)，故大多實驗室皆選擇 CRISPR-Cas9 作為基因編輯的工具。比起傳統隨機插入目標細胞基因組的基因轉殖方式，在提供適當 guide RNA 時，CRISPR-Cas9 能提供更準確且更有效率的基因插入 (Knock-In) 機制，機制如下:

1. Cas9 蛋白與 guide RNA 形成一個複合體，由 guide RNA 上的序列辨識 DNA 的特定序列 (Protospacer 序列) 並附著於其上。
2. 緊鄰在 Protospacer 後的三個核苷酸 (PAM) 被 Cas 蛋白辨認後切割緊鄰的雙股 DNA。
3. 藉由細胞自行的基因修復機制將剪切後的兩片段連同欲轉殖的基因 (下圖二橘色部分) 被併入目標細胞的基因序列中，完成基因插入 (Knock-In)



圖二、CRISPR-Cas9 系統 Knock-In 機制示意圖

而本實驗則設計一段序列，如下圖三：



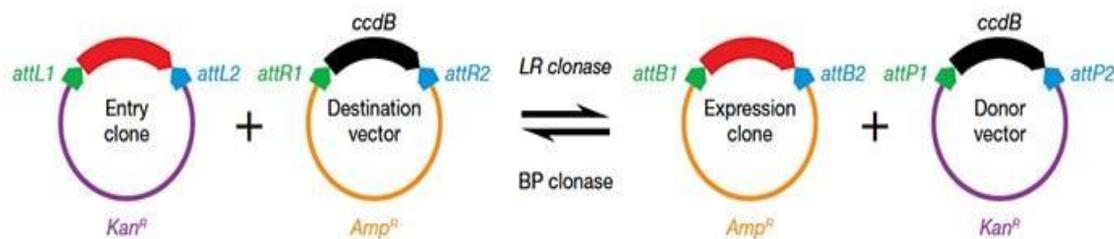
圖三、本實驗構築載體表現序列示意圖

上圖三中綠色區域 (標示 α -Amy8 者) 即為出現於 α -Amylase8 intron 1 中可為 gRNA 所辨識的一段序列，於是當我們將這段基因連同 Cas9- α -Amy8 vector (圖八本研究構

築載體所示) 送入 callus 時, Cas9 會藉由 gRNA 的引導辨識水稻基因組 α -Amylase8 intron 1 以及兩段綠色的序列 (上圖標示 α -Amy8) 並進行切割, 再藉由細胞本身的修補機制將中間的片段 (使用紅色圈起來的部分) 併入水稻基因 α -Amylase8 intron 1 中, 完成 KNOCK-IN 的步驟。本實驗設計序列 (圖三) 同 Cas9- α -Amy3 vector 送入 callus 時, 會以相同機制將兩段 α -Amy3 (黃色) 之間的片段併入水稻基因 α -Amylase3 intron 1。

(三) Gateway System

Gateway System 能夠藉由 BP/LR reaction 的雙向反應將目標 DNA 片段轉殖進入目標載體:

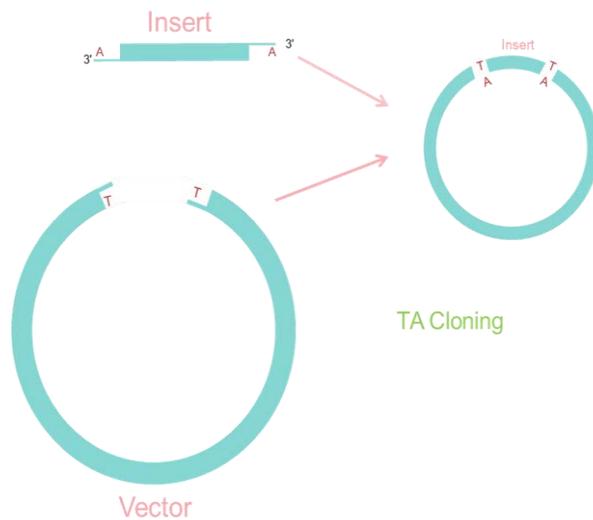


圖四、Gateway System 的基因轉殖機制

如上圖, 質體中的 attL 端 (左右各一段, 分別為 attL1 以及 attL2) 會與 attR (同上) 端進行反應, 其中個別位於兩段序列中的目標基因片段會進行互換, 即基因片段會轉移位於不同的質體上。如圖四, 原本位於 Kan^R 質體上的紅色目標基因片段在進行 LR reaction 之後會轉移到 Amp^R 質體上, 反之 $ccdB$ 亦然, 而質體上的序列亦會產生改變原本的 attL 轉變為 attP, 而 attR 則是轉為 attB, 而逆反應 BP reaction 則相反, Gateway Cloning 技術有別於傳統的基因編輯需要限制酶的切割以及 T4 酵素進行基因接合 (Ligation) 的作用, 只需要適當的反應便能成功轉殖基因, 進行有效的基因編輯。本實驗藉由建構含有目標基因片段 (Rice Codon S Protein-RBD) 的 Entry vector, 並進行 LR reaction 將其轉入含有抗生素篩選標誌 (selection marker) 的 destination vector 中, 以建構 Expression clone, 並利用基因槍將其送入水稻癒傷組織中進行非專一性基因插入, 以作為 CRISPR-Cas9 專一性編輯的對照組。

(四) TA cloning

TA cloning 是藉由載體與目標基因末端的胸腺嘧啶(T)以及腺嘌呤(A)互補配對，進行基因轉殖：



圖五、TA cloning 的載體構築示意圖

此實驗技術可分為兩部分：

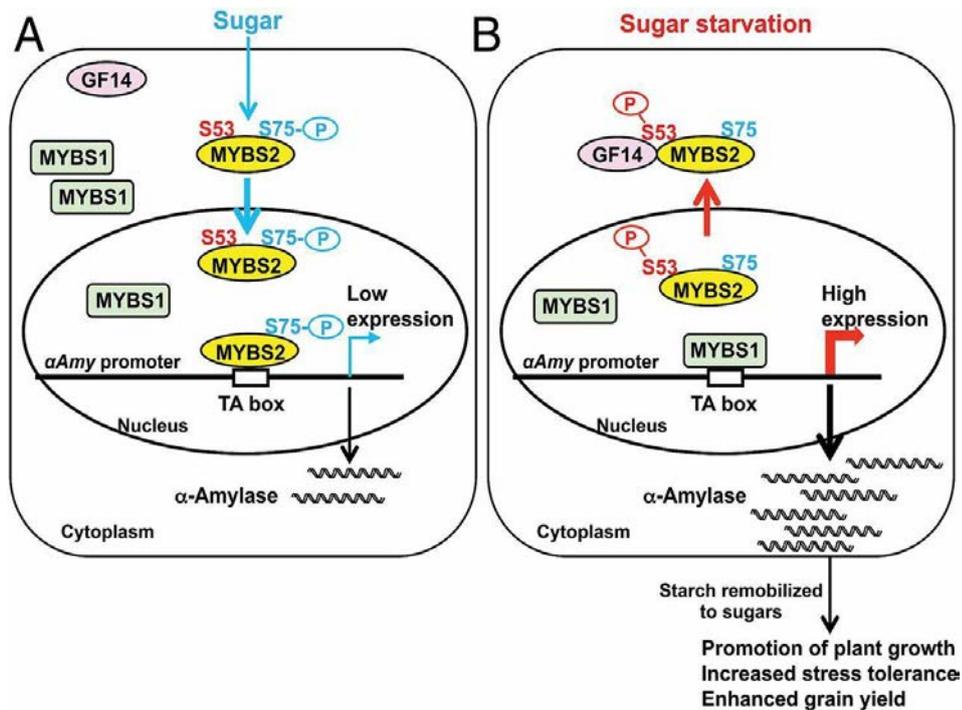
1. 建構目標基因：使用聚合酶連鎖反應（PCR）放大目標片段，而其中 PCR 選用的 DNA 聚合酶（Taq polymerase）在 DNA 3'-5'端不具有外切活性，使得目標基因會在 3'端多加入一個腺嘌呤（A）的鹼基（兩端皆是如此）。
2. 建構載體：首先，將載體以能夠製造平滑切位的限制酶切割，進行質體的線性化，並利用末端去氧核苷酸轉移酶（Terminal deoxynucleotidyl transferase 簡稱 TdT）在 3'末端加入一個 2',3'-雙脫氧三磷酸胸苷(ddTP)的鹼基（為確保只能在 3'末端加入），本實驗使用市售的商業化 T&A 質體。

TA cloning 有別於傳統的 cloning 技術，不仰賴 DNA 限制酶以及 DNA 接合酶的特性使其相較於他種技術較為便利，但缺點是 TA cloning 的基因轉殖不具有方向性（如圖五所示），因此基因轉殖後需再確認插入基因的方向正確性。

(五) MYBS2

MYBS2 蛋白與 MYBS1 蛋白均為轉錄調控因子蛋白，調控著 α -Amylase 的蛋白表現量（包括 α -Amylase3 與 α -Amylase8），當糖分供應充足時（高糖環境）MYBS2（負調控因子）會被活化並結合在 α -Amylase 的啟動子(α -Amy promoter)上，而成為 MYBS1（正調控因子）的競爭性抑制物，使得 α -Amylase 的表現受到抑制，進而使 α -Amylase 表現量降低。相反的，當糖分缺少時，MYBS2 則會與 GF14 蛋白結合，導致 MYBS2 對於 α -Amy promoter 的活性大幅降低，而同時 MYBS1 也因無競爭物而更容

易結合於 α -Amy promoter 之上，使得 α -Amylase 基因大量表現，進而使 α -Amylase 表現量提高，作用機制見下圖六。



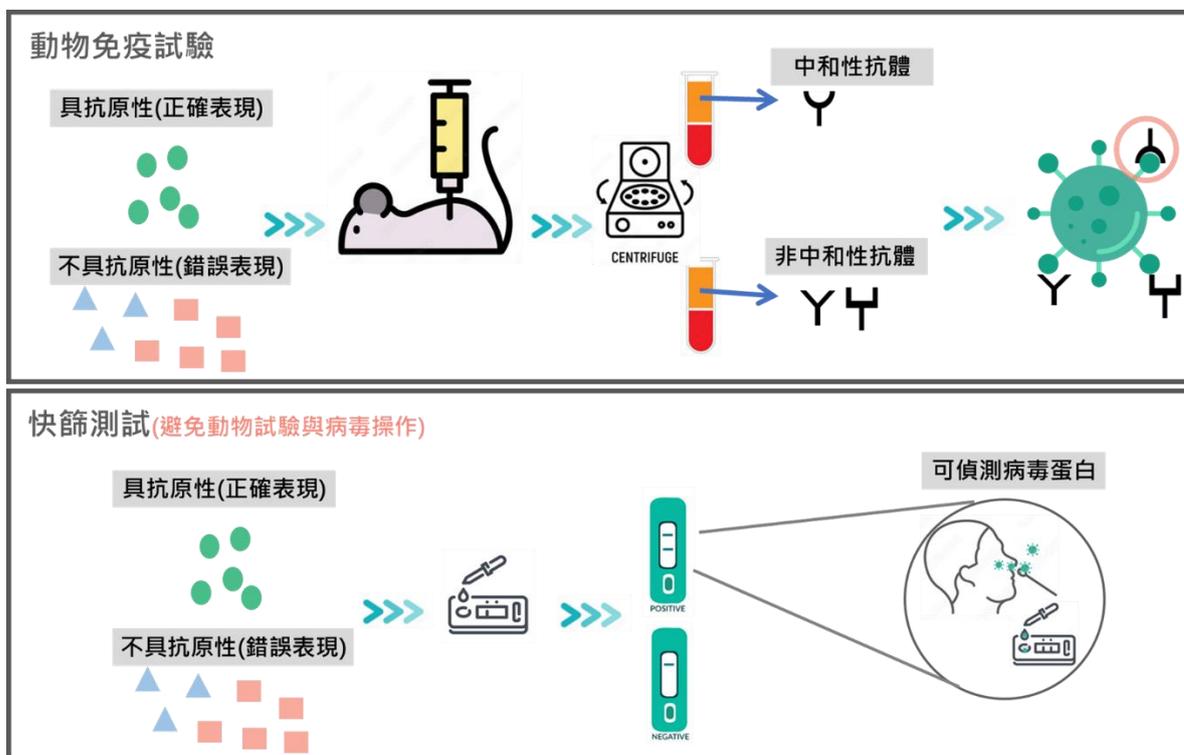
圖六、MYBS1/2 蛋白於含糖環境調控機制圖

本實驗藉由 CRISPR-Cas9 的基因編輯技術，破壞野生型水稻癒傷組織（WT）中的 MYBS2 表現序列，產生了 Cas9-MYBS2 Knock-out callus（本研究中簡稱為 Cas9-MYBS2 callus），使得當我們將目標基因（ α -Amy8,3-Rice codon S-Protein）轉殖進入 α -Amy promoter 之後能夠大量的表現，使得本研究中的基因轉殖 Cas9-MYBS2 callus 能夠在有糖培養條件下持續生長並同時分泌出 RBD 蛋白，達成連續式培養與持續生產目標蛋白。

（六）蛋白表現測定與抗原性分析

本研究利用快篩試劑進行 RBD 蛋白表現測定及抗原性分析。原預計以動物免疫試驗進行免疫抗原性測試，但為避免活體動物試驗及活病毒中和性試驗，與指導教授商討後，改以市售具醫材販售許可的抗原快篩試劑進行測試（圖七），利用快篩測試有兩項優點：

1. 快速偵測棘蛋白是否表現
2. 若快篩可偵測到植物系統分泌的蛋白，代表所生產與病毒所帶蛋白高度相似，推測具有抗原性。



圖七、利用快篩測試取代動物試驗進行抗原性評估

貳、研究設備與器材

一、實驗室儀器

基因槍	熱循環儀	培養箱(26.5 for callus;37 for bac)
Chemical hood	離心機	定溫離心機
水浴槽	無菌操作台	通風櫃
電泳槽	ELISA Reader	

表一、實驗室儀器

二、實驗器具

微量吸管	分度吸量管	tips
Eppendorf	PCR tube	拭鏡紙
研鉢與杵	Pipetman	培養皿

表二、實驗器具

三、各類溶液

NaOAc (3M)

Isopropyl Alcohol (異丙醇 IPA)

EtOH(75%)

Tris-HCl pH 8.0(1M)

EDTA(0.5M)

NaCl(5M)

SDS(100mM, 20%)

β -mercaptoethanol(2-巰基乙醇)

CaCl₂

spermidine(亞精胺)

TENS

四、水稻癒傷組織培養基（野生型與 MYBS-2 突變型使用）

（一）Callus Induction Medium II(癒傷組織用)

MS salt	4.3g/L
MS vitamins(1000X)	1mL/L
酪蛋白胺基酸(casein)	0.3g/L
蔗糖	30 g/L
L-脯胺酸	0.3g/L
2,4-D	0.4g/L
pH 值調整至 5.8，以 RO 水加至 1L 繼續加入以下藥劑	
Gelrite	3.5g/L
加熱至 121°C 15 分鐘	

表三、Callus Induction Medium II 配方

（二）N6D-CH+培養基(癒傷組織用)

N6 salt	3.95g/L
N6 vitamins(1000X)	1mL/L
酪蛋白胺基酸(casein)	0.3g/L
L-脯胺酸	2.878g/L
肌醇	0.1g/L
七水合硫酸亞鐵	0.0278g/L
蔗糖	30 g/L

2,4-D	0.4g/L
pH 值調整至 5.8，以 RO 水加至 1L 繼續加入以下藥劑	
Gelrite	3.5g/L
加熱至 121°C 15 分鐘，待冷卻至 60°C 後繼續加入以下抗生素	
Cefotaxime(250mg/mL)	1mL
Hygromycin(50mg/500 μ L)	500 μ L

表四、N6D-CH+培養基配方

五、Lysogeny broth 培養基（大腸桿菌用）

40g LB/公升水

抗生素(Kanamycin)

六、PCR solution

表中所標示為每管 PCR Tube 所需之份量

DNA(樣本)	2 μ L
10X PCR Buffer	2 μ L
10mM dNTP	0.8 μ L
Primer-F(依實驗要求設計)	0.8 μ L
Primer-R(依實驗要求設計)	0.8 μ L
Taq	0.2 μ L
MgCl ₂	0.8 μ L
ddH ₂ O	12.6 μ L

表五、PCR 配方

七、液態氮

八、轉殖用相關載體與酵素

YTA、PET28a vector、T4 ligase、cutsmart buffer

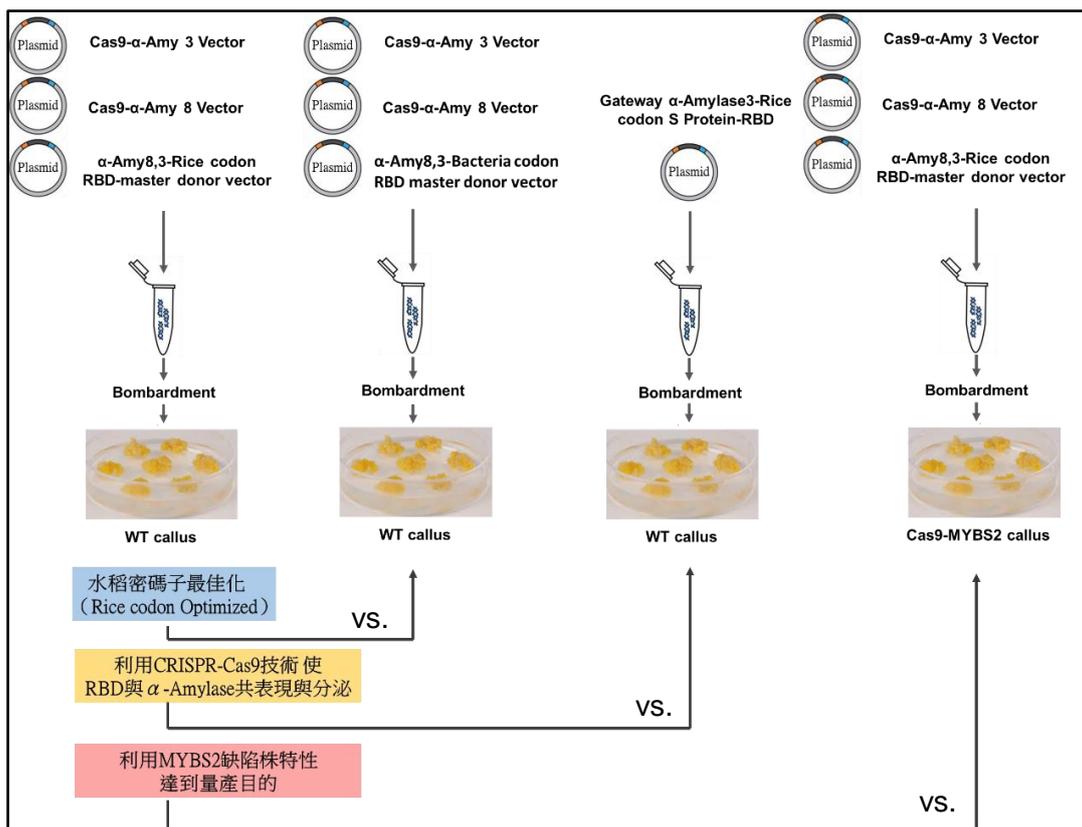
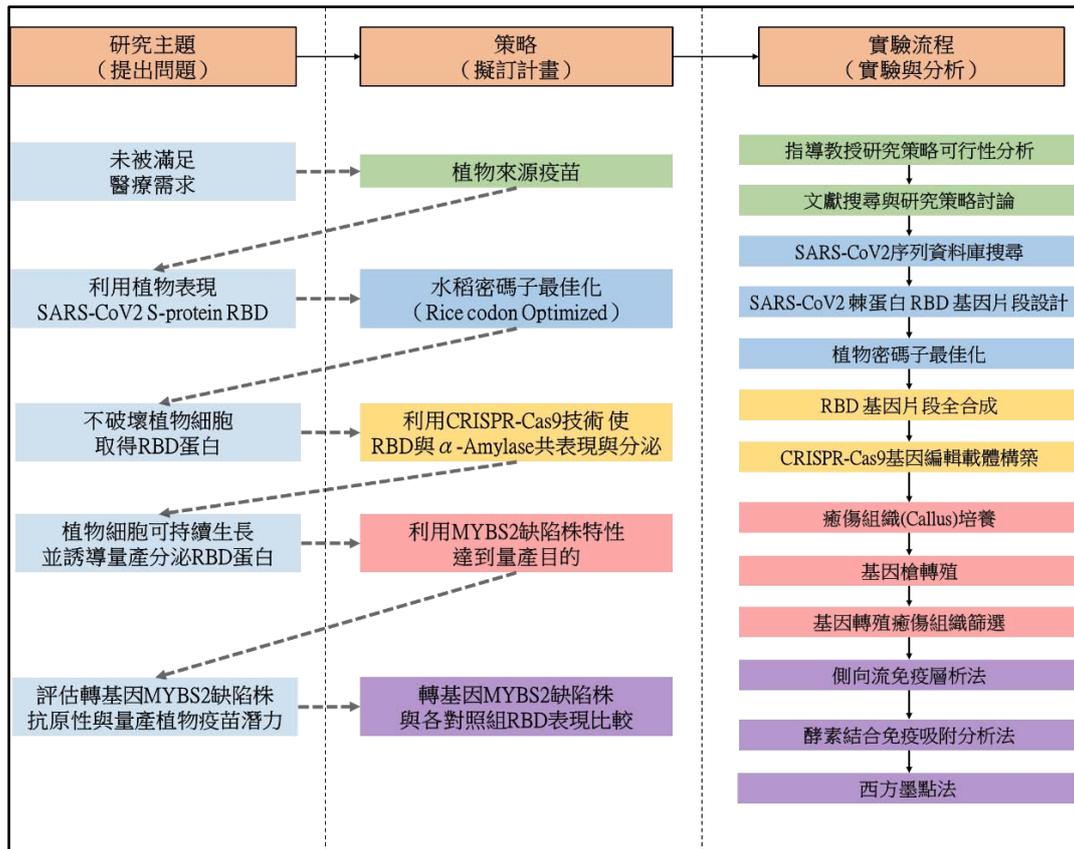
Restriction enzyme：AscI, NotI

COVID-19 RBD 序列(委託廠商建構)：分別以植物慣用密碼子及細菌慣用密碼子建構

九、S 蛋白偵測快篩試劑（購自台灣尖端先進生技醫藥股份有限公司）

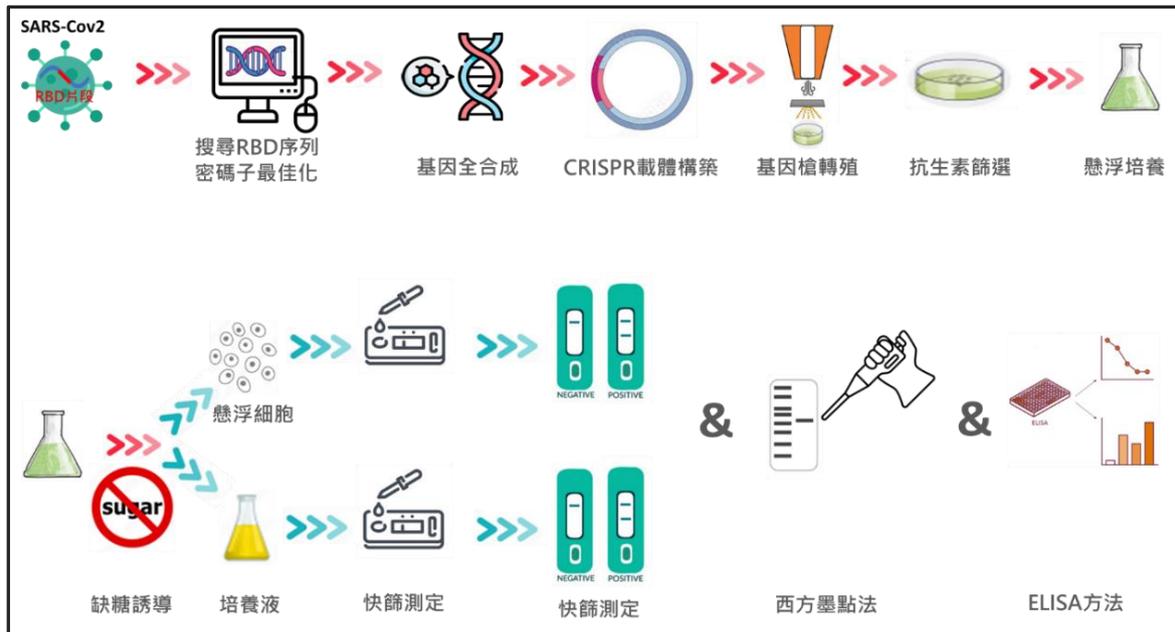
參、研究過程及方法

一、研究設計與流程圖



圖八、研究設計與流程圖

二、實驗流程



圖九、實驗流程

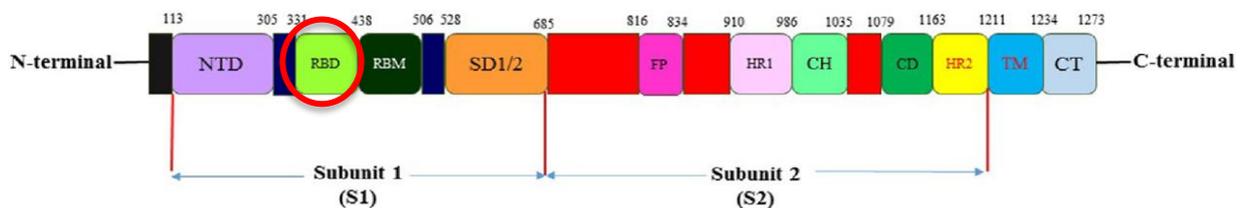
三、研究方法：建構質體

(一) α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor 載體的建構

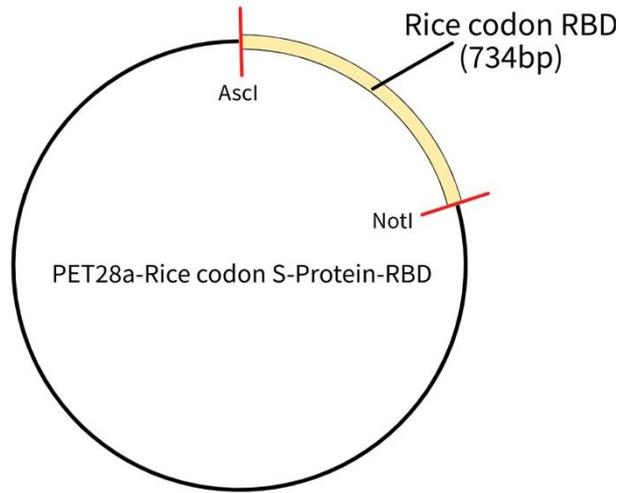
1. 取得欲進行 Ligation 的片段

(1) Rice codon S-Protein-RBD 基因片段

i. 取得 SARS-Cov2 棘蛋白中的 RBD 序列（圖十中使用紅色標記處）並將其藉由電腦軟體將其修正為水稻慣用密碼子（rice-codon optimize）並交予廠商進行全合成（圖十一）。



圖十、新冠病毒棘蛋白基因序列



圖十一、pET28a-Rice codon S protein-RBD (廠商全合成)

ii.以限制酶 AscI 及 NotI 進行切割

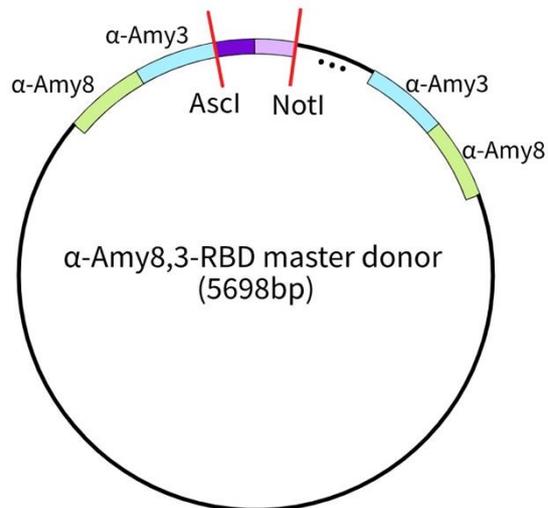
試劑	體積 (μL)
pET28a-RBD (圖十一)	20
Cutsmart buffer	15
AscI	6
NotI	6
ddWater	146
置於 37°C 水浴中過夜	

表六、PET28a-RBD 使用限制酶 AscI 及 NotI 的切割條件

iii.放入膠體中進行電泳分離兩片段，將小片段（圖二十九中以黃色標記 734bp 處）切下並使用 TENS 復溶。

(2) 限制酶切割 α -Amy8,3-RBD master donor vector (AscI, NotI digest Donor vector)

i.請廠商建構 α -Amy8,3-RBD master donor vector (圖十二)



圖十二、 α -Amy8,3-RBD master donor vector

ii.以 AscI 及 NotI 進行切割

試劑	體積 (μL)
Donor vector (圖十二)	20
Cutsmart buffer	20
AscI	6
NotI	6
ddWater	146
置於 37°C 水浴中過夜	

表七、Donor vector 使用限制酶 AscI 及 NotI 的切割條件

iii.放入膠體中進行電泳分離兩片段，將大片段（圖三十中以黃色標記 5698bp 處）切下並使用 TENS 復溶

2. 將取下的 2 片段進行 T4 Ligation

試劑	體積 (μL)
Rice codon S-Protein-RBD	3 (in TENS)
AscI, NotI digest Donor vector	5 (in TENS)
T4 DNA Ligase	1
T4 Ligase	1
置於 37°C 水浴中過夜	

表八、使用 T4 接合酶進行質體片段接合的條件

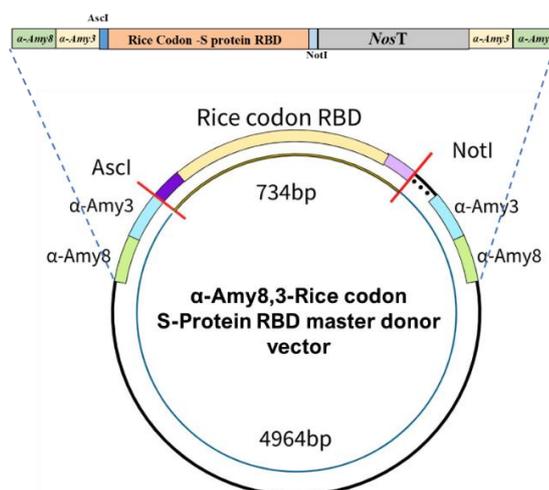
3. 將接合完的質體利用熱休克 (Heat Shock) 轉殖進入大腸桿菌 (DH5- α) 並使用含有卡納黴素 (Kanamycin) 的 Lysogeny broth 培養基培養，篩選出轉殖成功菌株並培養至形成菌落。

4. 挑選菌落進行質體萃取 (palsmid extraction)

5. 以限制酶 NotI+AscI 處理 (條件同表六) 之後進行電泳以確認是否成功轉殖

(1) 若 Ligation 成功，有 734bp (圖十三紅色切位之間) 與 4964bp 兩種長度的片段出現

(2) 若 Ligation 失敗，只會出現 5698bp 片段 (圖十二)



圖十三、 α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor

6. 將 Ligation 成功的質體（圖三十一）交由廠商進行核酸定序，確認序列正確

(二) α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor 載體的建構

1. 對於細菌慣用密碼子組合的載體，先以聚合酶鏈鎖反應（PCR）放大 Bacteria codon S protein-RBD 核酸片段，再藉由 TA cloning 方式將上述 PCR 產物插入至 YTA 質體產生 YTA-Bacteria codon S-Protein，接著以與建構 α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor 相同的步驟處理

(1) Bacteria codon S-Protein-RBD

i. 以 AscI 及 NotI 進行切割

試劑	體積 (μ L)
YTA-Bacteria codon S-Protein	20
Cutsmart buffer	15
AscI	4.5
NotI	4.5
ddWater	106
置於 37°C 水浴中 4 小時	

表九、YTA-Bacteria codon S-Protein 使用限制酶 AscI 及 NotI 的切割條件

ii. 放入膠體中進行電泳分離兩片段，將小片段（圖三十二中以黃色標示 734bp 處）切下並使用 TENS 復溶

(2) 限制酶切割 α -Amy8,3-RBD master donor vector (AscI, NotI digest Donor vector)

限制酶 AscI 及 NotI 的切割條件同表七。

2. 將取下的 2 片段進行 T4 Ligation

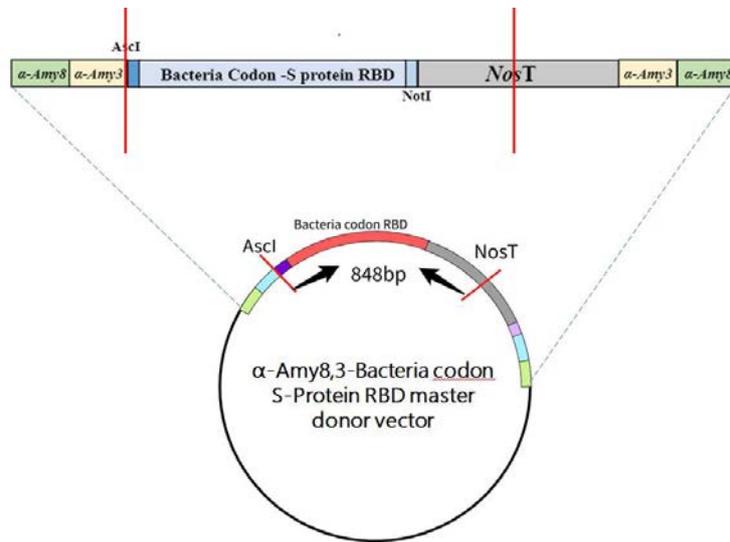
Ligation	體積 (μ L)
YTA-Bacteria codon S-Protein	5
AscI, NotI digest Donor vector	5
T4 DNA Ligase	1
T4 Ligase	1
置於 16°C 水浴中過夜	

表十、使用 T4 接合酶進行質體片段接合的條件

3. 分別以限制酶以及 PCR 並電泳檢查

(1) 以 AscI-bacteria sequence 作為 forward primer, Nos Terminator 作為 reverse primer 進行 PCR 後以膠體電泳進行篩選（圖三十三）

預期長度：848bp（圖十四紅線標示 PCR 產物）



圖十四、以 PCR 檢查 α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor

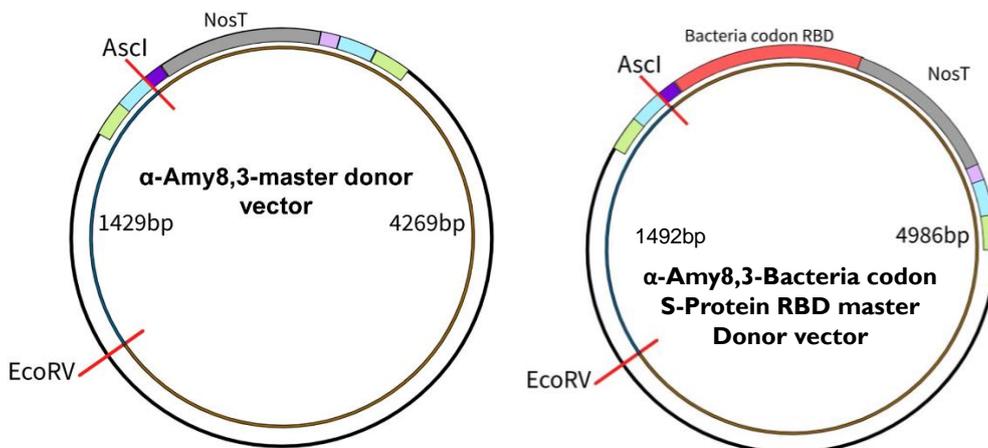
(2) 以限制酶 EcoRV+Ascl 處理之後進行電泳以確認是否成功轉殖 (圖三十四) :

- i. 若 Ligation 成功，應有 4986bp 與 1492bp 兩種長度的序列出現 (圖十五右)
- ii. 若 Ligation 失敗，則會出現 4269 bp 與 1429 bp 兩種序列 (圖十五左)

試劑	體積 (μ L)
Master donor (圖十五左)	20
Cutsmart buffer	15
Ascl	4.5
EcoRV	4.5
ddWater	106
置於 37°C 水浴中 4 小時	

表十一、 α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor

使用限制酶 Ascl 及 EcoRV 的切割條件



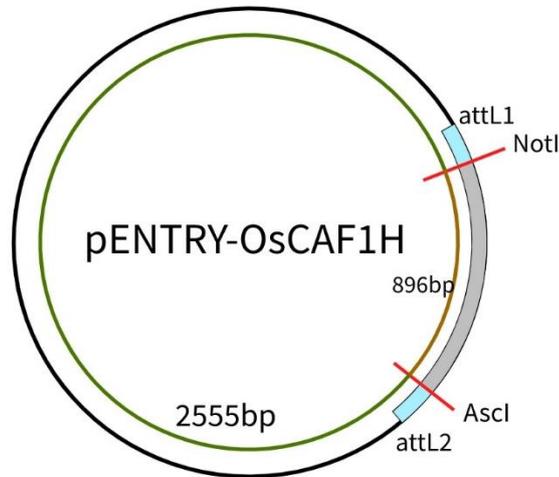
圖十五、 α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor 限制酶切割位置

4. 將構築完的質體利用熱休克 (Heat Shock) 轉殖進入大腸桿菌 (DH5- α) 使用含有卡納黴素 (Kanamycin) 的 Lysogeny broth 培養基培養，篩選出成功轉殖者
5. 將 Ligation 成功的質體交由廠商進行核酸定序，確認序列正確

(三) Gateway Cloning System 載體的建構

1. 取得欲進行 Ligation 的片段

- (1) ENTRY Vector：以 NotI 與 AscI（條件同表七）對實驗室提供之 pEntry-OsCAF1H 進行限制酶切割並進行核酸電泳，可得到圖十六中所示 2555bp 片段（圖三十五中以黃色標記 2555bp 處）。



圖十六、Entry vector (pENTRY OsCAF1H)

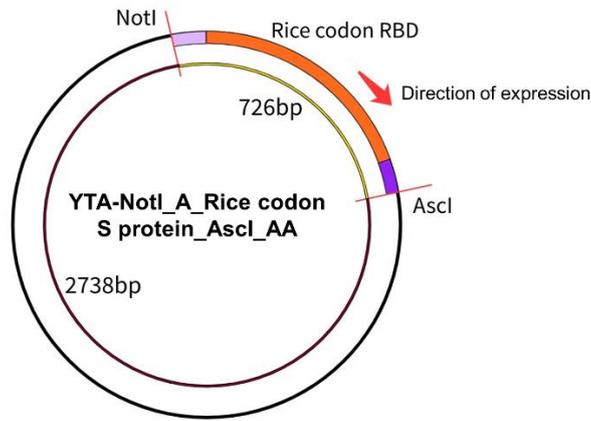
(2) 建構 YTA-NotI_A_Rice codon S protein_AscI_AA

- i. 因為 pENTRY Vector 的 OsCAF1H（圖十六中灰色片段，目標基因嵌入位置）中靠近 attL1 端的切位為 NotI（如圖十七）但我們的 Rice codon S protein RBD 的序中起始密碼子位於靠近 AscI 的一端，所以在進行 LR reaction 時序列會呈反向，以致於無法表達，於是我們設計一段以 NotI 為首的 Forward primer 以及一段以 AscI 為尾的 reverse primer 進行 PCR



圖十七、OsCAF1H 及 attL1/2 的方向（目標基因嵌入位置）

- ii. 將 PCR 後的片段與 T&A 質體進行 TA cloning
iii. 將合成完的質體利用熱休克（Heat Shock）轉殖進入 DH5 α 並進行培養
iv. 挑選菌落進行 MINI extraction，得 YTA-NotI_A_Rice codon S protein_AscI_AA（圖十八）



圖十八、YTA-NotI_A_Rice codon S protein_AscI_AA

(3) Rice Codon- S Protein 來源:

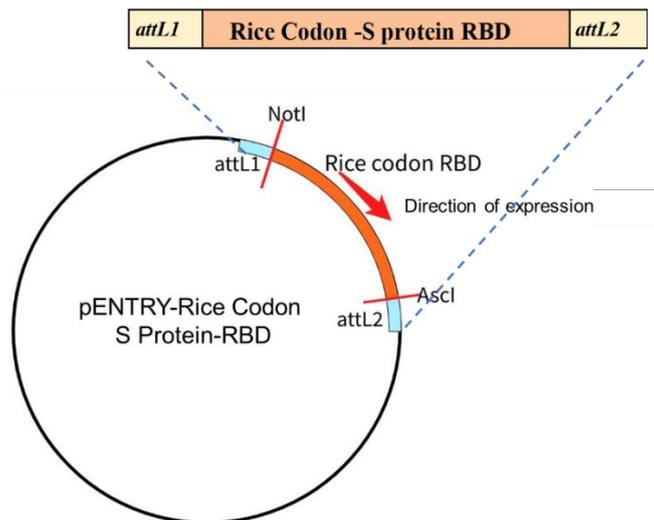
- i.以 NotI and AscI 進行切割 (因兩切位位於 attL1/2 之中)
- ii.以 NotI and AscI (condition 同表六) 進行切割並進行電泳 (圖三十六)
- iii.將小片段 734bp (Rice codon S protein 即 RBD, 圖十八中橘色片段) 切下並復溶

2. 建構 pENTRY- Rice Codon S Protein-RBD

Rice Codon- S Protein 以及 ENTRY Vector 進行 T4 ligation, 得 pENTRY- Rice Codon S Protein-RBD (圖十九)

試劑	體積 (μL)
Entry vector (圖十五)	3
Rice codon S protein	5
T4 DNA Ligase	1
T4 Ligase	1
置於 16°C 水浴中 4 小時	

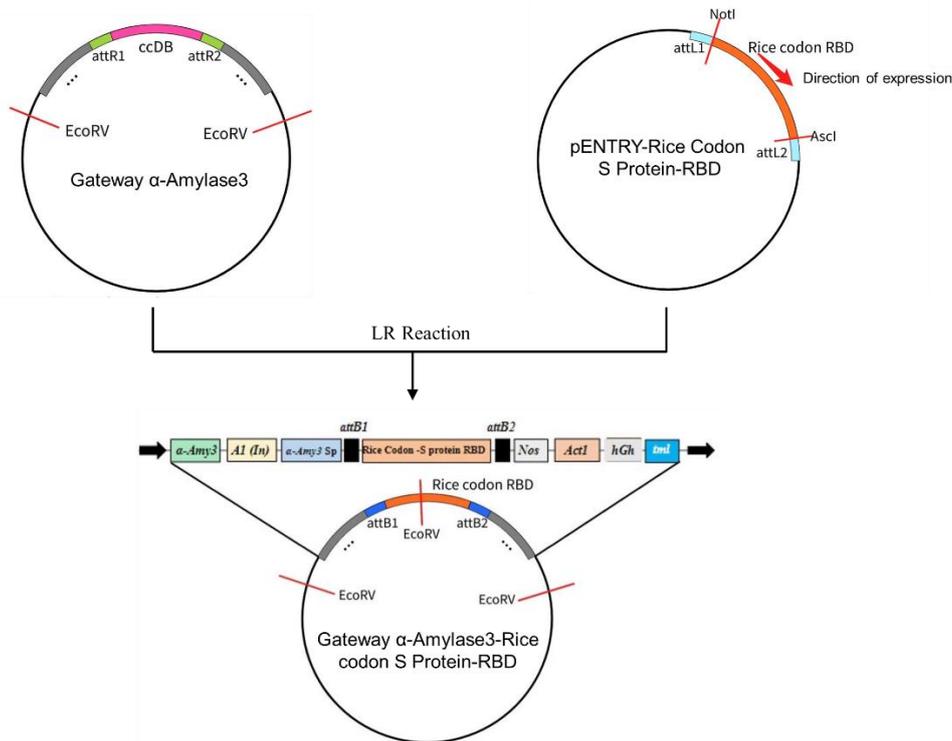
表十二、使用 T4 接合酶進行質體片段接合的條件



圖十九、pENTRY-Rice Codon S Protein-RBD

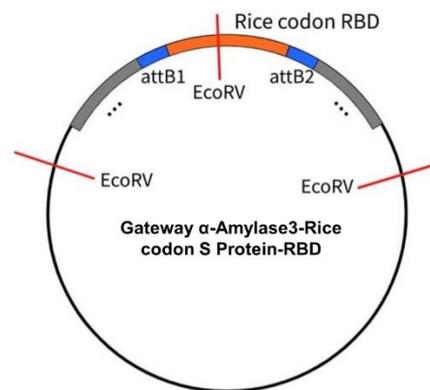
3. 建構 Gateway α -Amylase3-Rice codon S Protein-RBD

將 pEntry-Rice Codon S Protein-RBD 以及 Gateway α Amylase3 進行 LR reaction (圖二十)



圖二十、Gateway α -Amylase3-Rice codon S Protein-RBD 的建構 (LR reaction)

4. 以限制酶處理再進行電泳檢驗結果:以 Gateway α -Amylase3 作為控制組進行電泳, 若 LR reaction 成功進行, 則應出現一個額外的 EcoRV 切割位 (圖二十一所示), 藉此篩選成功進行 LR reaction 者 (圖三十七以紅色標記)

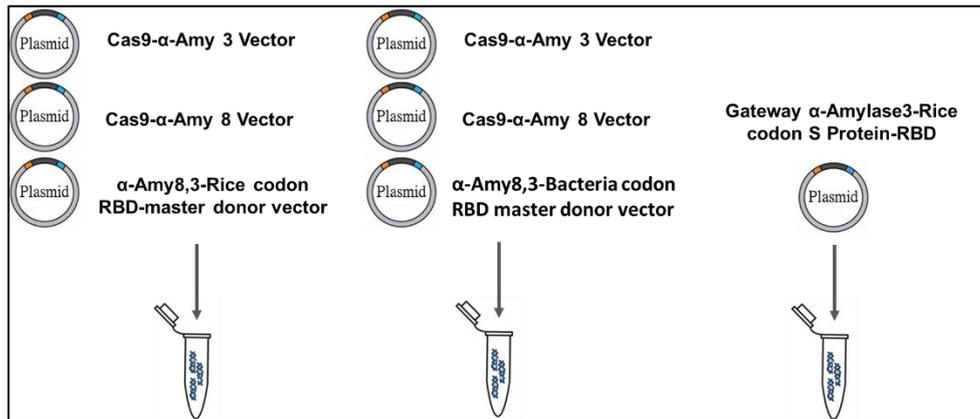


圖二十一、Gateway α -Amylase3-Rice codon S Protein-RBD EcoRV 限制酶切割位

四、研究方法：基因轉殖

- (一) 癒傷組織培養：取野生種水稻與 Cas9-MYBS2 突變種水稻的癒傷組織於 Callus Induction Medium II 培養基中

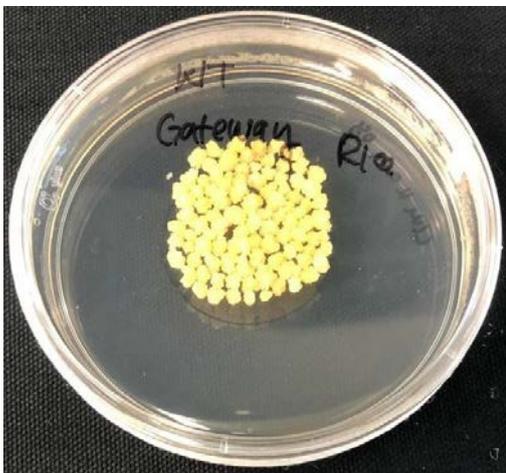
(二) 基因槍鎢粉載體製備：



圖二十二、各轉殖組基因槍鎢粉載體製備表示圖

(三) 基因槍轉殖：

將健康的癒傷組織集中於培養皿中央區域（圖二十三以 Gateway system 為例），並以基因槍（圖二十四）轟擊癒傷組織



圖二十三、癒傷組織



圖二十四、基因槍

(四) 癒傷組織轉殖後處理：

1. 將培養皿以鋁箔紙包覆後放入培養箱並靜置 3 天，以利其吸收含有基因的微粒（圖二十五及二十六）



圖二十五、培養箱設定的條件



圖二十六、癒傷組織吸收微粒

2. 將其中的癒傷組織各自分離後改置於含有潮黴素（Hygromycin）的 N6D-CH+培養基中（表四），經兩週培養篩選後，因 Cas9- α -Amy 8 Vector, Cas9- α -Amy3 Vector 含有抗 Hygromycin 的基因，故可篩選有成功表現 Cas9 基因之癒傷組織
3. 將仍存活的癒傷組織（圖三十八以紅色圈起者）取出培養繼續培養以用於後續實驗（圖二十七）



圖二十七、將癒傷組織分離後分開培養

五、研究方法：RBD 蛋白表現與測定

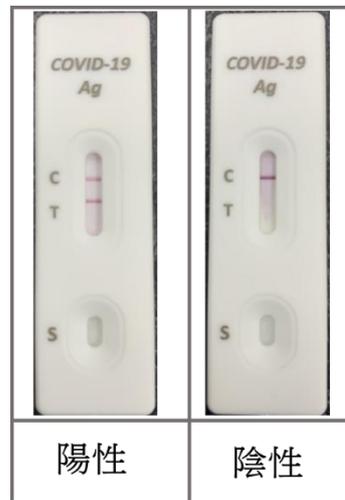
（一）蛋白表現

1. 將培養中癒傷組織馴化培養（Cell Adaptation Culture）成懸浮細胞後，以糖缺乏誘導（Sugar starvation）誘導以進行 RBD 蛋白表現，收取癒傷組織後，以液態氮處理並均質化後，以蛋白萃取液提取所含蛋白後以蛋白濃縮管柱濃縮後冷藏備用（組織蛋白萃取液）。
2. 收取培養中懸浮細胞之培養液，以蛋白濃縮管柱濃縮後冷藏備用（含 RBD 培養液）。

（二）蛋白測定

1. 快篩試劑測試

分別將各組取得之組織蛋白萃取液與含 RBD 培養液，取 10ul 加入 SARS-CoV2 棘蛋白快篩試劑中，靜置 10 分鐘後紀錄結果，結果可為陰性或陽性，陰性代表快篩試劑無偵測到棘蛋白存在，推論蛋白無表現或表現錯誤。陽性表示偵測到棘蛋白存在，即植物懸浮細胞有正確表現 RBD 蛋白，如下圖二十八所示。



圖二十八、快篩試劑結果判定，C/T 位置均有訊號為陽性，C 有訊號而 T 無訊號為陰性

2. ELISA

分別將各組取得之組織蛋白萃取液與含 RBD 培養液，以 ELISA 定量方法進行吸光值測定。

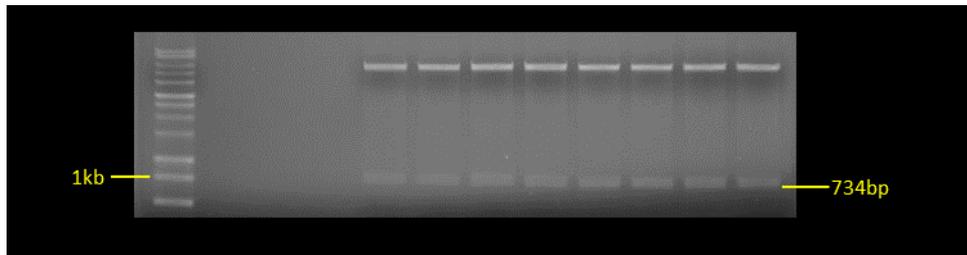
3. 西方墨點法

分別將各組取得之組織蛋白萃取液與含 RBD 培養液，以西方墨點法進行測試。

肆、研究結果

一、 α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor

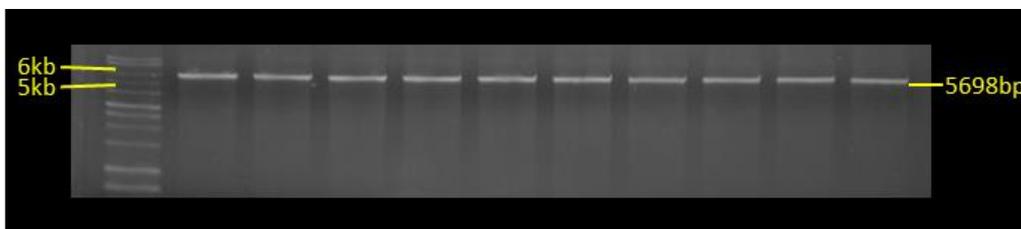
(一) PET28a-Rice codon S-Protein-RBD (圖十一)



圖二十九、將 PET28a-Rice codon S-Protein-RBD 使用 AscI 及 NotI 切割的結果

圖中所標記 734bp 者即為含有本實驗目標基因(Rice codon RBD)的片段 (圖十一黃色標記部分)，將用於後續建構質體的步驟

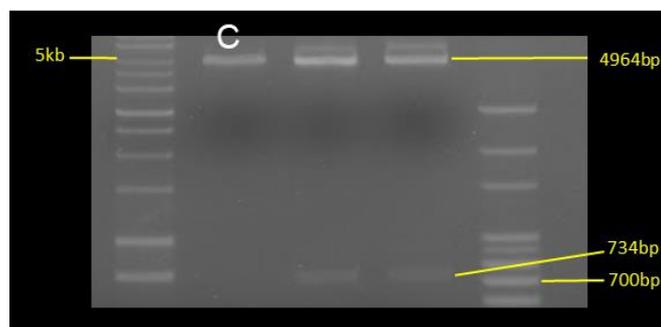
(二) α -Amy8,3-RBD master donor vector (圖十二)



圖三十、將 α -Amy8,3-RBD master donor vector 使用 AscI 及 NotI 切割的結果

圖中所標記 5698bp 者即為含有本實驗目標基因 (α -Amy8,3-RBD master donor vector) 的片段 (圖十二紅色切位以外)，將用於後續建構質體的步驟

(三) T4 ligation 後以限制酶 NotI 與 AscI 檢查

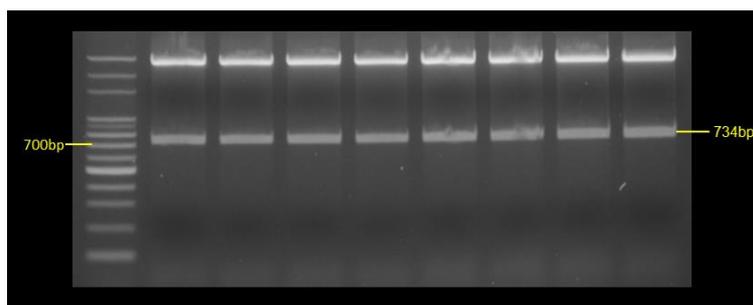


圖三十一、將 T4 ligation 後的產物 (α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor) 使用 AscI 及 NotI 切割的結果

C 為控制組 (圖十二, α -Amy8,3-RBD master donor vector) 而成功 ligation 的產物 (圖十三, α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor) 將使膠體電泳檢驗結果出現 734bp 的片段。圖中產物符合要求，將其送至廠商定序

二、細菌慣用密碼子載體

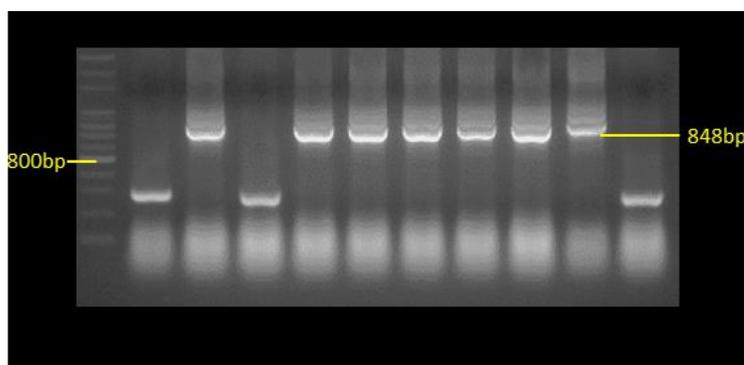
(一) YTA-Bacteria codon S-Protein



圖三十二、將 YTA-Bacteria codon S-Protein 使用 AscI 及 NotI 切割的結果

圖中所標記 734bp 者即為含有本實驗目標基因 (Bacteria codon RBD) 的片段，將用於後續建構質體的步驟

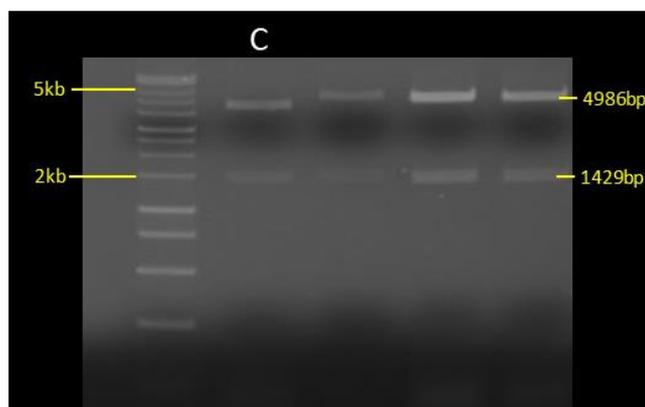
(二) T4 ligation 後進行 PCR 再以膠體電泳檢驗結果：



圖三十三、將 T4 ligation 後的產物 (α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor) 使用設計引子 PCR 並電泳

若成功 ligation，將出現長 848bp 的片段 (圖十五以紅色標記處)

(三) T4 ligation 後以限制酶 EcoRV 與 AscI 檢查

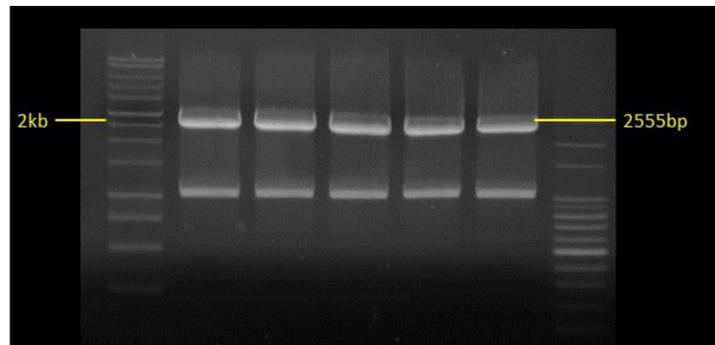


圖三十四、將 T4 ligation 後的產物 (α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor) 使用 AscI 及 EcoRV 切割的結果

C 為控制組（圖十二， α -Amy8,3-RBD master donor vector）而成功 ligation 的產物（圖十五， α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor）將使膠體電泳檢驗結果出現 4986bp 以及 1429bp 兩片段。圖中產物符合要求，將其送至廠商定序

三、Gateway cloning system

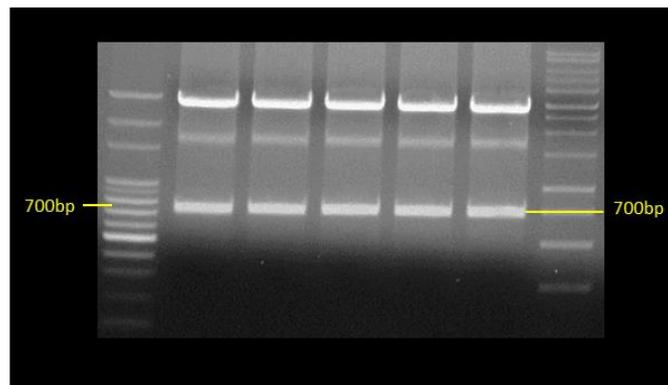
（一）Entry vector（圖十六）



圖三十五、將 pENTRY vector 使用 AscI 及 NotI 切割的結果

其中長 2555bp 者為建構 Entry vector 所需的片段(圖十六中除了灰色部分以外的質體)，將其以 TENS 復溶以用於後續實驗

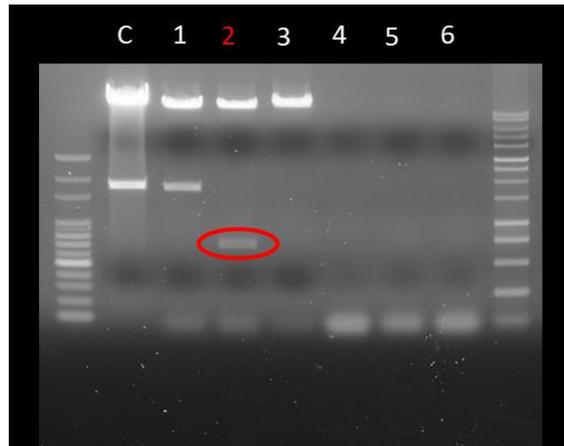
（二）YTA-Rice Codon- S Protein（圖十八）：



圖三十五、將使用 YTA-Rice Codon- S Protein AscI 及 NotI 切割的結果

其中標示 726bp 者為目標基因序列(圖十八中橘色部分)，將用於 Entry vector 的建構

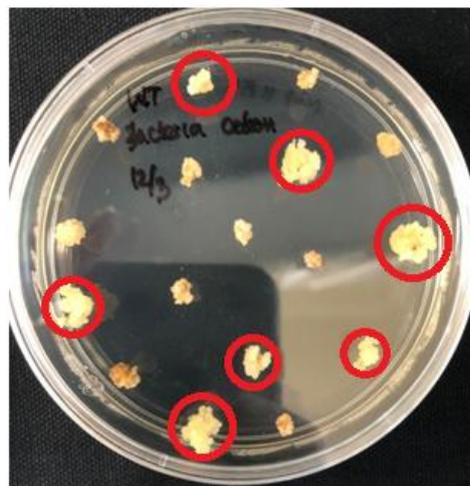
(三) LR reaction 後以限制酶 EcoRV 檢查：



圖三十七、將 LR reaction 後的產物 (Gateway α -Amylase3-Rice codon S Protein-RBD) 使用 EcoRV 切割的結果

C 為控制組 (Gateway α -Amylase3，圖二十左上角)，若 LR Reaction 正常進行，則會產生額外的 EcoRV 切割位，故 2 號產物為成功進行 LR reaction 的質體 (Gateway α -Amylase3-Rice codon S Protein-RBD)

四、基因槍轉殖後篩選



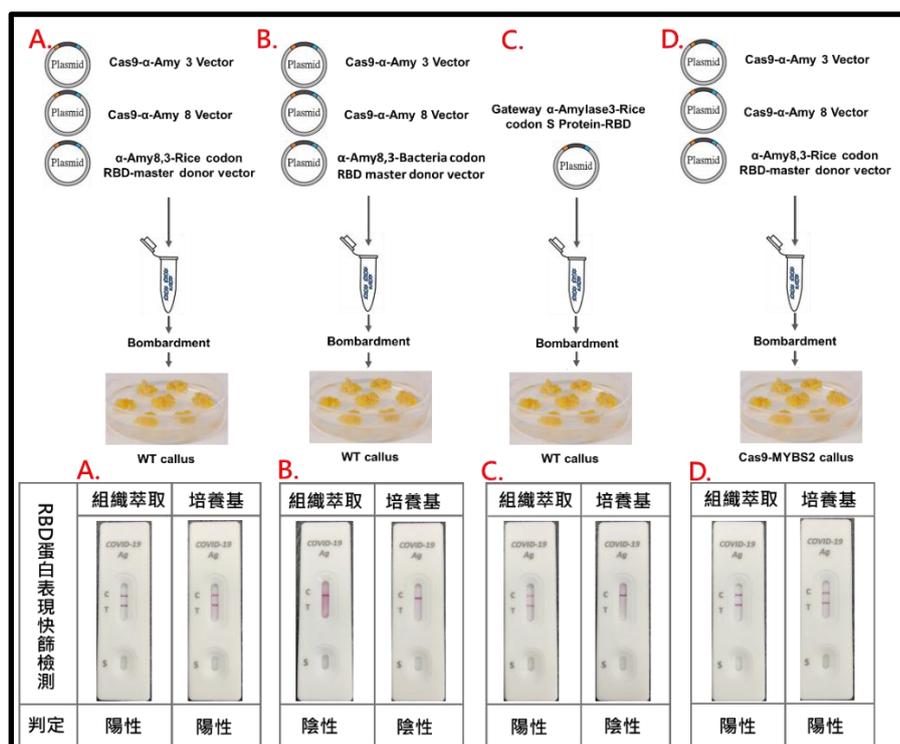
圖三十八、將轉殖後的 callus 於含有 Hygromycin 的培養基兩週後的結果

圖三十八中用紅色標記者為上存活者，代表 Cas9- α -Amy 8 Vector, Cas9- α -Amy3 Vector 有成功殖入並表現，藉此判斷目標基因有機會遷入目標位置 (α -Amy 8 以及 α -Amy3 的 intron 1)，將其分開進行培養

五、轉殖癒傷組織蛋白表現測試

(一) 快篩試驗

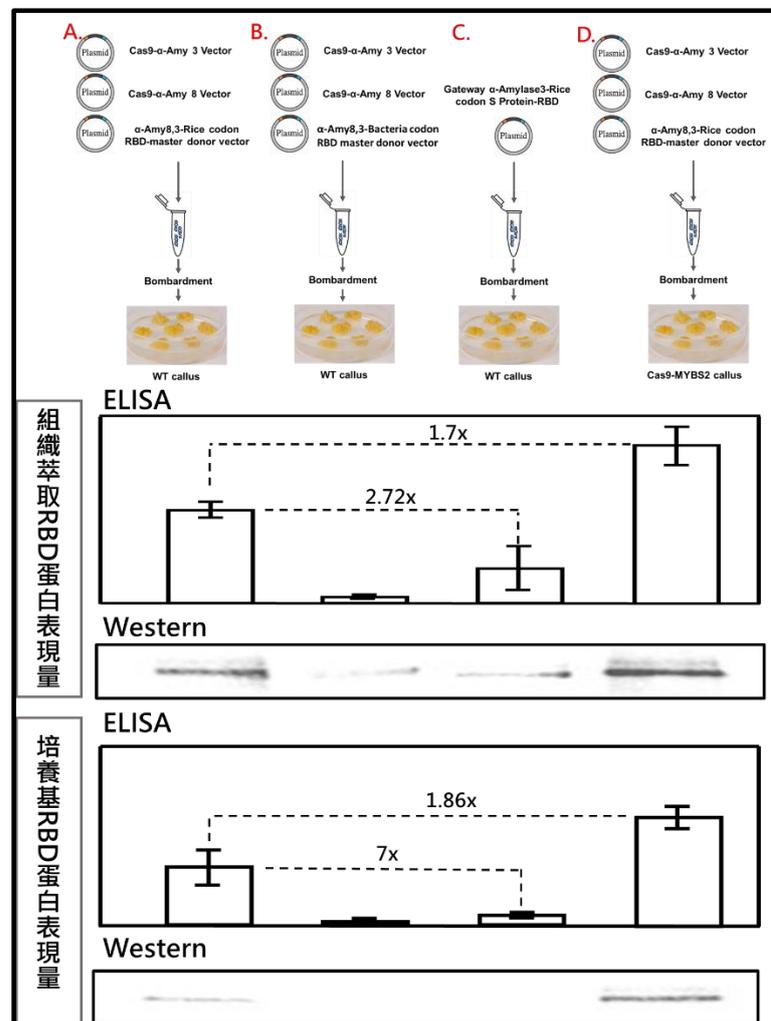
1. 目標基因經水稻密碼子最佳化 (Codon Optimization)，因 SARS-CoV-2 可在人類細胞中進行轉錄及轉譯，進而大量複製。然而不同物種間會有偏好密碼子和不偏好密碼子的差異，藉由將目標基因序列利用生物資訊工具轉變為植物所偏好的密碼子，可在不改變氨基酸序列 (一級結構) 的前提下使目標基因正常表現或達到更佳表現量。本組 (下圖 A 組) 為經過水稻密碼子最佳化之細胞內蛋白表現與蛋白是否分泌至胞外 (培養基)，藉由快篩試劑之檢驗結果。可見到在細胞內與培養基皆偵測到蛋白存在。
2. 下圖 B 組為原始病毒序列未經過水稻密碼子最佳化組別，藉由快篩試劑之檢驗結果。可見到在細胞內與培養基皆未偵測到蛋白存在或表現量低於快篩試劑檢驗極限，與 A 組相較，可知經水稻密碼子最佳化之後可順利表現蛋白並提高蛋白表現量。
3. 下圖 C 組為使用非專一性轉殖技術 (Gateway system) 之結果，在組織萃取中可偵測到蛋白存在，然而培養基未偵測到蛋白存在或蛋白量低於快篩試劑檢驗極限，需由更靈敏的 ELISA 或 Western 方法確認。
4. 下圖 D 組轉殖基因與 A 組相同，但轉殖目標改為水稻 MYBS2 缺陷株，同樣可在組織萃取與培養基中偵測到 RBD 蛋白。



圖三十九、各組轉殖後的 callus 蛋白表現定性測試結果

(二) 蛋白表現量試驗 (ELISA 與 Western 方法)

1. 目標基因經水稻密碼子最佳化，下圖 A 組可見到無論在 ELISA 或 Western 均可見到在細胞內與培養基皆偵測到 RBD 蛋白存在。
2. 下圖 B 組為原始病毒序列未經過水稻密碼子最佳化組別，藉由 ELISA 或 Western 之結果，細胞內僅有極低的表現量而培養基未偵測到蛋白存在，其 ELISA 讀值可視為背景值，與 A 組相較可知 A 組因密碼子最佳化而可以順利表現於組織中並分泌到培養基。
3. 下圖 C 組為使用非專一性轉殖技術 (Gateway system) 之結果，在組織萃取中可偵測到蛋白存在，而培養基僅有少量 RBD 蛋白，與 A 組相較在組織中 A 組 RBD 蛋白濃度為 C 組的 2.72 倍，培養基中濃度 A 組則為 C 組的 7 倍。
4. 下圖 D 組轉殖基因與 A 組相同，但轉殖目標改為水稻 MYBS2 缺陷株，與 A 組相較在組織中 D 組 RBD 蛋白濃度為 A 組的 1.7 倍，培養基中濃度 D 組則為 A 組的 1.86 倍。



圖四十、各組轉殖後的 callus 蛋白表現量測試結果

伍、討論

本研究構築一系列可於植物細胞內表現 RBD 蛋白的 CRISPR-Cas9 及 Gateway 系統基因編輯載體，並分別透過限制酶切割或 PCR 方法證明載體構築的正確性，之後，以基因槍將構築好的基因編輯載體送入 callus 後，藉由 Selection marker 篩選出成功轉殖者，最後將癒傷組織馴化成為懸浮培養細胞後，進行缺糖誘導 RBD 蛋白表現。而後分別對培養基以及組織萃取液，以快篩試劑測得各組 RBD 蛋白表現情形，並分別以 ELISA 與 Western blotting 方法比較表現量，由所得結果進行以下討論：

- 一、本實驗藉由將 α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor vector (含 CRISPR 載體) 和 α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor vector (含 CRISPR 載體) 轉殖進入 WT callus 進行蛋白表現比較，證明植物密碼子最佳化 (Rice codon Optimized) 是必須的。藉由植物密碼子最佳化可使得水稻癒傷組織順利表現出 RBD 蛋白，而未最佳化的組別蛋白僅有極少量表現，其表現量低於快篩靈敏度，而使快篩呈現陰性，需藉由更靈敏的 ELISA 與 Western 方法才可偵測到少量表現。
- 二、本研究藉由將 α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor vector (含 CRISPR 載體) 和 Gateway α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD 轉殖進入 WT callus 進行蛋白表現，證明了在水稻細胞中將 RBD 蛋白與 α -Amylase 共表現而分泌到培養基中的策略是可行的，此策略有三個優點 1.無須破壞轉殖細胞就可取得 RBD 蛋白 2.純化培養基中的 RBD 蛋白困難度與成本都遠低於從組織萃取物中純化 3.由於 α -Amylase 會受到糖缺乏而誘導表現，因此可先大量培養懸浮細胞後，再藉由缺糖調控大量表現 RBD 蛋白。
- 三、由上述 2 可知藉由 CRISPR-Cas9 或 Gateway 均可使 RBD 蛋白與 α -Amylase 共表現，然而 Gateway 系統因非專一性編輯，無法像 CRISPR-Cas9 系統直接將 RBD 基因插入到水稻細胞原有的 α -Amylase Intron 1，Gateway 系統必須在轉殖載體構築包含 α -Amylase 啟動子的基因組，而 ELISA 與 Western 結果可知 CRISPR-Cas9 系統的 RBD 表現量遠高於 Gateway 系統，推測是水稻細胞更傾向使用原有的啟動子而非外送的啟動子，造成了表現量的顯著差異，而由於表現量的差異也使得分泌到培養基的蛋白量有顯著差異。因此，本研究結果得知，若要藉由植物細胞生產 RBD 蛋白，且因純化與生產考量需藉由 α -Amylase 共表現將 RBD 蛋白分泌至培養基中，在基因編輯與轉殖系統的選擇上利用專一性的 CRISPR-Cas9 系統顯然更優於非專一的 Gateway 系統。
- 四、藉由將 α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor vector (含 CRISPR 載體) 分別轉殖進入 WT callus 以及 MYBS2 缺陷株 callus 進行蛋白表現比較，藉由快篩測試得知兩者無論在組織萃取或培養基均可以得到 RBD 蛋白，但進一步以 ELISA 與 Western 進行蛋

白量分析，MYBS2 缺陷株在糖缺乏調控下表現量高於 WT，因此以商業化考量下，MYBS2 缺陷株更適合作為 RBD 生產用。

- 五、本實驗所得到的轉基因植株未來可藉由最佳化培養與誘導條件進一步提高產率，而使生產成本降低並更適合商業化
- 六、由快篩結果與 ELISA 及 Western 結果相比較下，快篩陽性組別確實在 ELISA 及 Western 試驗也得到蛋白表現量較高的結果，因此快篩測試可作為蛋白是否表現的快速測試方法。此外本研究目的要發展商業化植物來源疫苗生產系統，生產出的 RBD 需進一步進行動物免疫與病毒中和性測試，然而在近年來減少動物試驗的人道考量以及使用活病毒株進行中和試驗的硬體需求與風險考量下，利用快篩或相似的免疫測試可做為未來疫苗開發測試的方向。

陸、結論

- 一、本研究證明了利用水稻細胞生產植物來源 RBD 蛋白的可行性。
- 二、藉由將 RBD 基因序列進行水稻基因密碼子最佳化（Rice codon Optimized）可使得 RBD 蛋白順利在水稻細胞表現。
- 三、藉由 CRISPR-Cas9 或 Gateway 系統，均可以使 RBD 蛋白與 α -Amylase 在糖缺乏調控下共表現並分泌至培養基中。
- 四、藉由 CRISPR-Cas9 基因編輯方式，可將 RBD 基因序列轉殖進入植物水稻基因組 α -Amylase 序列中的第一段內含子（Intron 1），使其相較於 Gateway 系統外送包含 α -Amylase 啟動子的基因組的方式，能得到更高量的 RBD 蛋白。
- 五、本研究成功藉由 MYBS2 缺陷株特性，使水稻細胞能在糖缺乏調控下，相較於野生株有更高的 RBD 蛋白表現量。
- 六、藉由上述二～五的結論，我們建立了能持續生長並在糖缺乏調控下大量表現分泌型 RBD 蛋白的水稻表現系統，無須破壞細胞即可自培養基純化 RBD 蛋白，因此能持續生長且容易純化，具有商化價值。
- 七、本研究藉由快篩測試避免動物實驗與病毒中和性試驗，證明植物所分泌的 RBD 蛋白具有抗原性而有作為疫苗使用的潛力。
- 八、藉由上述六與七的結論，本研究建立了一個具商業化潛力的植物來源新冠病毒疫苗系統。

柒、參考文獻資料

- 一、Lu CA, Ho TH, Ho SL, Yu SM. ThreenovelMYBproteinswith one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression. *Plant Cell*. 2002 Aug;14(8):1963.
- 二、Dong OX, Yu S, Jain R, Zhang N, Duong PQ, Butler C, Li Y, Lipzen A, Martin JA, Barry KW, Schmutz J, Tian L, Ronald PC. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nat Commun*. 2020 Mar 4;11(1):1178.
- 三、Chen YS, Ho TD, Liu L, Lee DH, Lee CH, Chen YR, Lin SY, Lu CA, Yu SM. Sugar starvation-regulated MYBS2 and 14-3-3 protein interactions enhance plant growth, stress tolerance, and grain weight in rice. *Proc Natl Acad Sci*. 2019 Oct 22 ;116(43):21925.
- 四、Huang LF, Sinaga DS, Tan CC, Hsieh SM, Huang CH. Expression of Recombinant Human Octamer-Binding Transcription Factor 4 in Rice Suspension Cells. *Int. J Mol Sci*. 2021 Jan 30 ;22(3):1409.
- 五、Nguyen TM, Lu CA, Huang LF. Applications of CRISPR/Cas9 in a rice protein expression system via an intron-targeted insertion approach. *Plant Sci*. 2022 Feb ;315:111132.
- 六、Liu YK, Huang LF, Ho SL, Liao CY, Liu HY, Lai YH, Yu SM, Lu CA. Production of mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by gateway technology and transgenic rice cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 2012 May ;109(5):1239.

【評語】 052105

1. 本研究主要目的在利用 CRISPR-Cas9 的方法，探討以水稻癒傷組織生產新冠病毒（SARS-CoV-2）棘蛋白疫苗次單位蛋白的可能性。
2. 研究成果包括建立了能持續生長並在糖缺乏調控下大量表現分泌型 RBD 蛋白的水稻表現系統，無須破壞細胞即可自培養基純化 RBD 蛋白，未來具潛力以此系統產生植物來源之新冠病毒疫苗。
3. 本研究之實驗設計及成果分析皆明確，所得成果完成度高。
4. 團隊成員表達清晰，了解實驗進行過程。此外報告撰寫完整用心，值得肯定及鼓勵。
5. 具有未來應用性之潛力，但仍待進一步驗證。

作品簡報

怪稻棘得

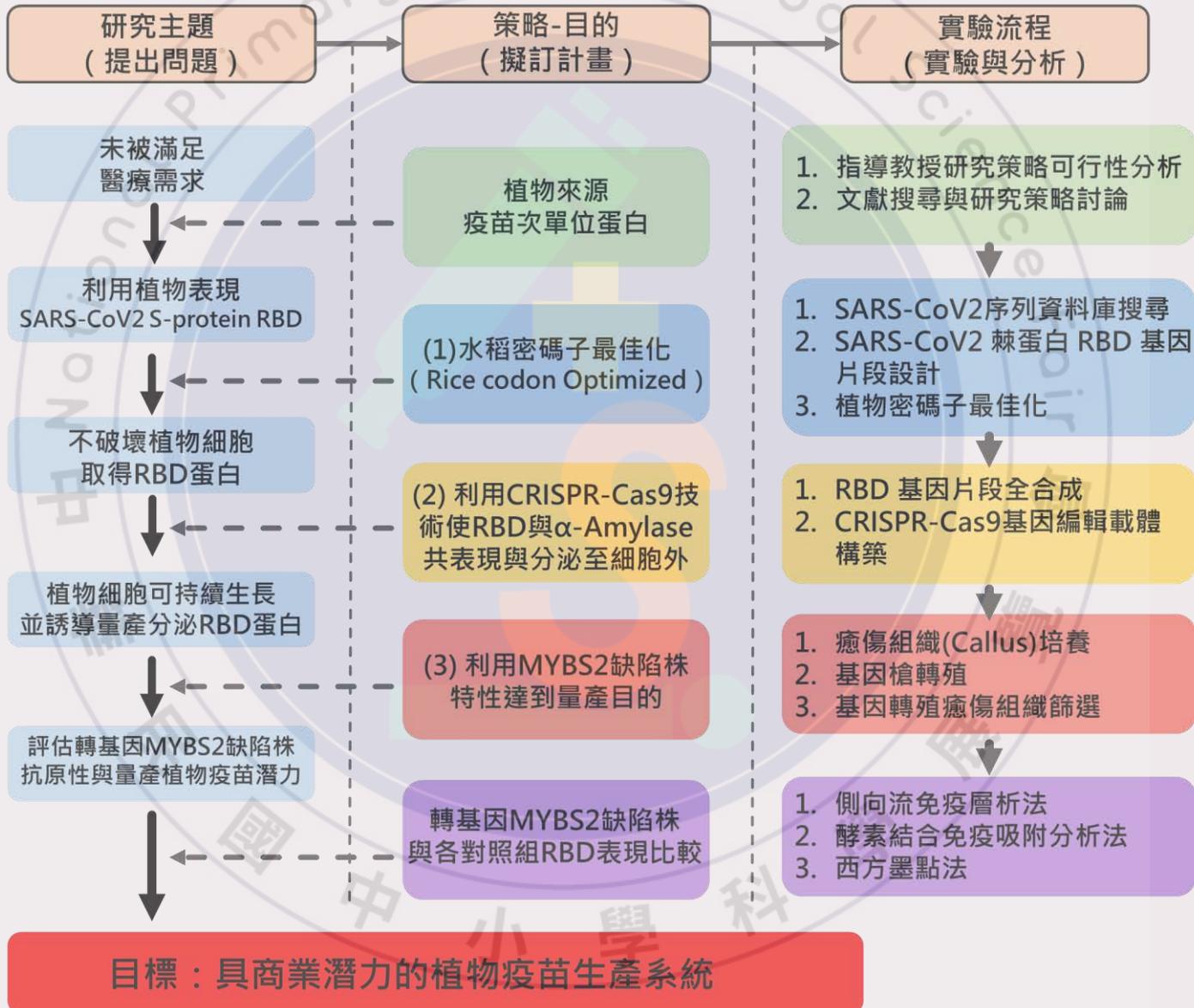
利用CRISPR-Cas9探討水稻癒傷
組織生產疫苗次單位蛋白的潛力

組別：高級中等學校組

科別：植物學科



- 自2019年底起，Covid-19疫情席捲全球。
- 為了控制疫情各國藥廠均投入疫苗開發。其中蛋白次單位疫苗安全疑慮、生產成本及保存要求均較低，更利於提高全球接種率。
- 然而次單位疫苗多利用動物細胞生產，因此有部分族群拒絕使用動物來源產品而拒絕施打。
- 因此本研究希望發展植物來源疫苗生產系統。



3

研究方法

密碼子最佳化與基因編輯

SARS-Cov2



搜尋RBD序列
密碼子最佳化



基因全合成



CRISPR載體構築



基因轉殖



基因槍轉殖



抗生素篩選



懸浮培養

蛋白表現 與 蛋白分析實驗



缺糖誘導



培養液



懸浮細胞



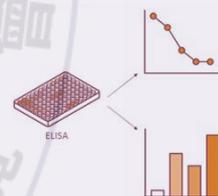
快篩測定



快篩測定



西方墨點法



ELISA方法

3

研究方法 (蛋白表現與 抗原性分析)

快篩測試 (確認蛋白表現且 RBD蛋白四級結構類似病毒)

蛋白結構正確
(適合發展疫苗)



結構錯誤 (不適合發展)



可偵測病毒蛋白

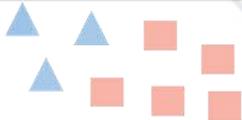


動物免疫試驗

蛋白結構正確
(適合發展疫苗)



結構錯誤 (不適合發展)



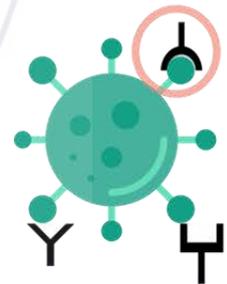
CENTRIFUGE



中和性抗體

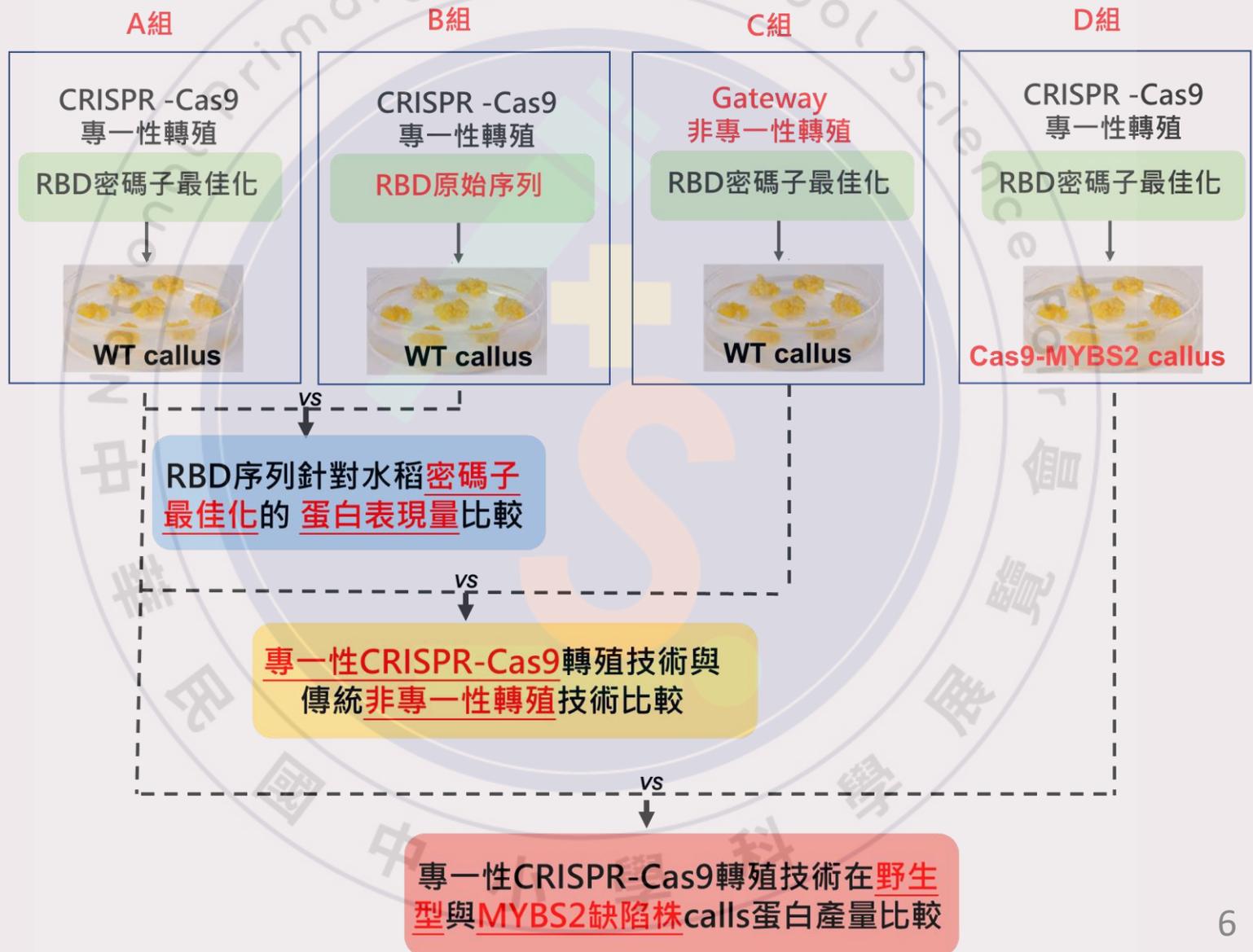


非中和性抗體



4

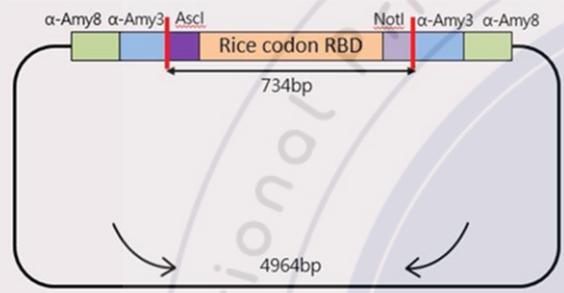
研究結果與討論 (實驗設計與分組)



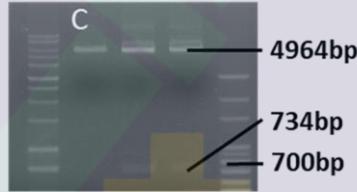
4

研究結果與討論 (載體建構)

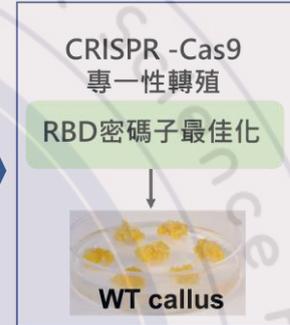
1. α -Amy8,3-Rice codon S-Protein RBD master donor 載體的建構



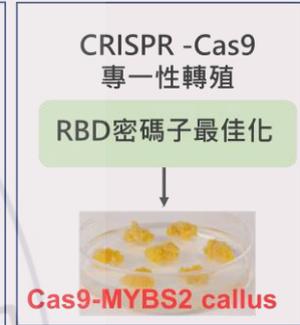
【檢驗】
限制酶切割後膠體電泳



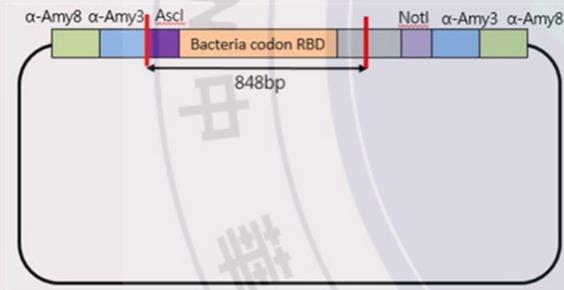
A組



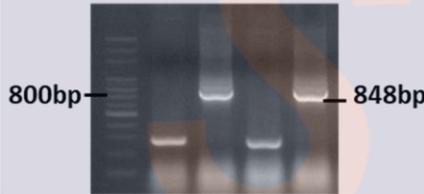
D組



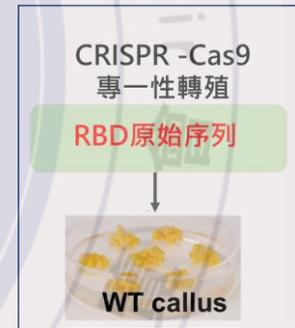
2. α -Amy8,3-Bacteria codon S-Protein RBD master donor 載體的建構



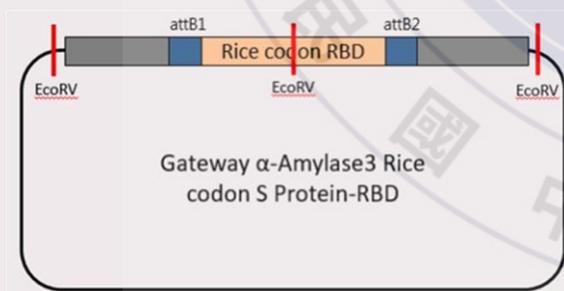
【檢驗】
PCR後膠體電泳



B組



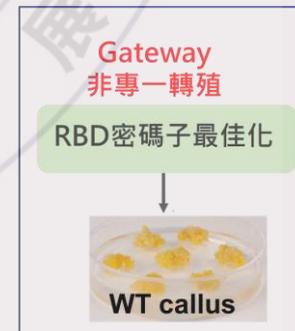
3. Gateway Cloning System 載體的建構



【檢驗】
限制酶切割後膠體電泳



C組



4

研究結果與討論 (A組 vs B組)

A組

B組

1. CRISPR -Cas9專一性轉殖
2. RBD密碼子最佳化
3. 野生型Callus

1. CRISPR -Cas9專一性轉殖
2. RBD原始序列
3. 野生型Callus

vs

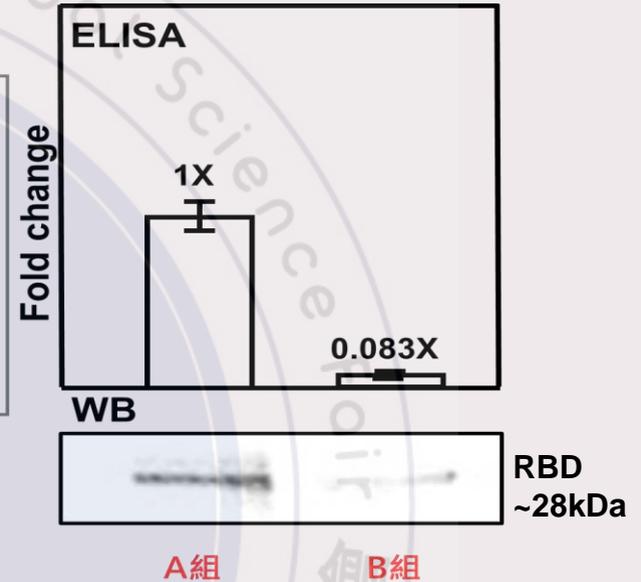
RBD序列針對水稻密碼子最佳化的蛋白表現量比較

A組

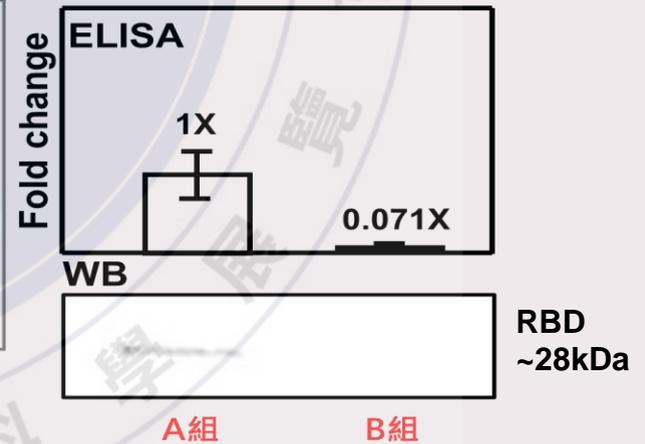
B組

蛋白表現快篩檢測	A組		B組	
	組織萃取	培養基	組織萃取	培養基
判定	陽性	陽性	陰性	陰性

組織萃取RBD蛋白表現量



培養基RBD蛋白表現量



將RBD序列密碼子最佳化，可提高在水稻細胞中的表現效率

4

研究結果與討論 (A組 vs C組)

A組

1. CRISPR -Cas9專一性轉殖
2. RBD密碼子最佳化
3. 野生型Callus

C組

1. Gateway非專一性轉殖
2. RBD原始序列
3. 野生型Callus

vs

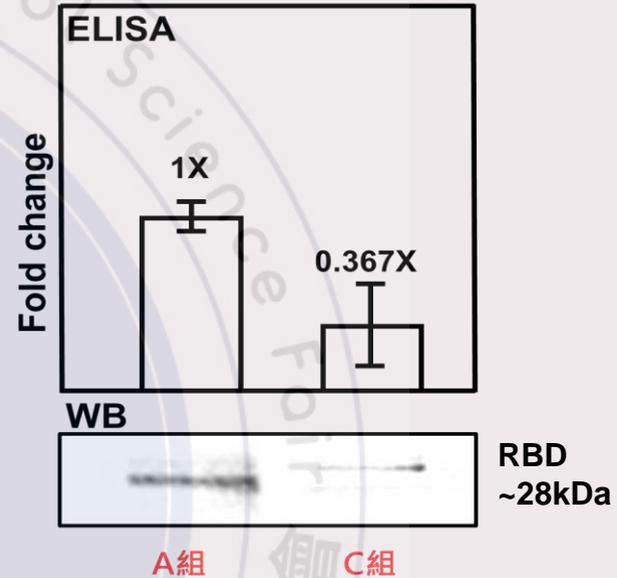
專一性CRISPR-Cas9轉殖技術與傳統非專一轉殖技術比較

A組

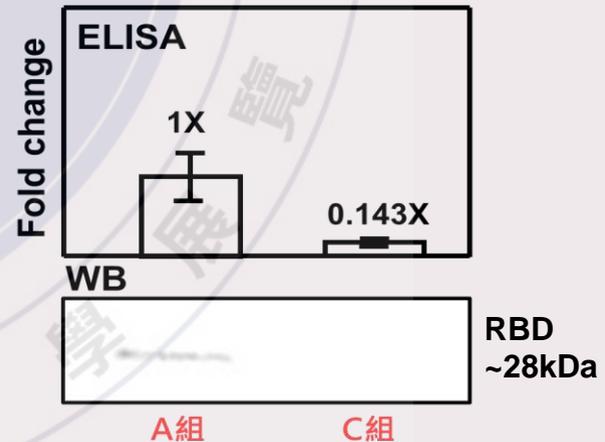
C組

蛋白表現快篩檢測	組織萃取		培養基	
				
判定	陽性	陽性	陽性	陰性

組織萃取RBD蛋白表現量



培養基RBD蛋白表現量



CRISPR專一性編輯，可將RBD基因插入特定位置，利於提高蛋白產量並分泌至胞外。

4

研究結果與討論 (A組 vs D組)

A組

1. CRISPR -Cas9專一性轉殖
2. RBD密碼子最佳化
3. 野生型Callus

D組

1. CRISPR -Cas9專一性轉殖
2. RBD密碼子最佳化
3. MYBS2缺陷株callus

vs

專一性CRISPR-Cas9轉殖技術在野生型與MYBS2缺陷株callus蛋白產量比較

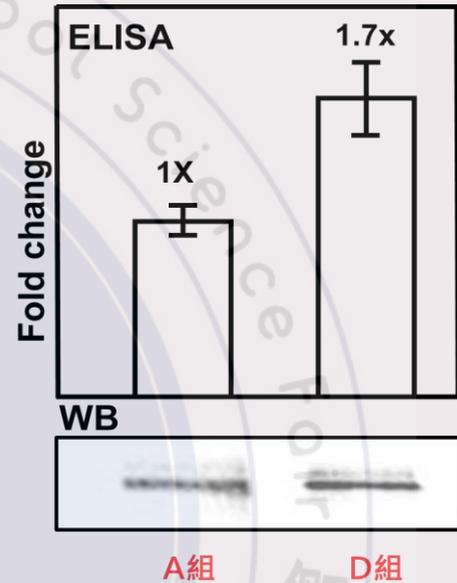
A組

蛋白表現快篩檢測	組織萃取	培養基
判定	陽性	陽性

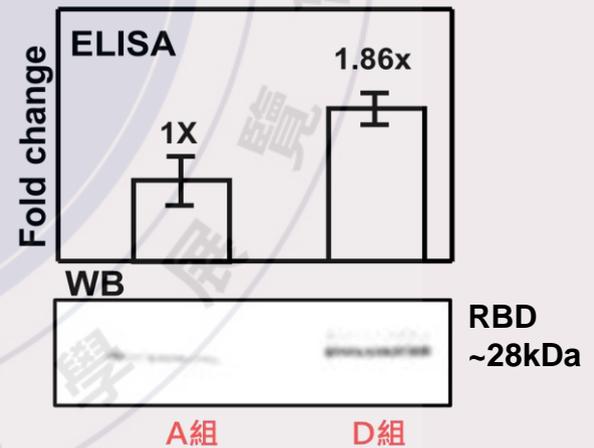
D組

蛋白表現快篩檢測	組織萃取	培養基
判定	陽性	陽性

組織萃取RBD蛋白表現量



培養基RBD蛋白表現量



相較於野生株，於MYBS2缺陷株中表現，可提高RBD蛋白產量

5 結論

1. 藉由RBD基因**密碼子最佳化**，可提高RBD蛋白在水稻細胞中**表現效率**。
2. CRISPR-Cas9基因編輯系統與Gateway系統，都可以使RBD蛋白受 α -Amylase promoter在糖缺乏調控下表現。
3. 利用**CRISPR-Cas9基因編輯**，可將RBD基因轉殖進入水稻 α -Amylase基因的 Intron 1，使其相較於包含 α -Amylase啟動子基因組的Gateway系統轉殖方式，有**更高的RBD蛋白表現量**並可**分泌至胞外**。
4. 本研究成功利用**MYBS2缺陷株**特性，**提高RBD蛋白表現量**。
5. 藉由上述1~4的結論，我們建立了具有商化潛力的植物RBD生產系統。
6. 本研究藉由**快篩測試避免動物實驗**，證明植物所分泌的RBD蛋白具有**正確結構**而有作為疫苗使用的潛力。
7. 藉由上述5~7的結論，本研究建立了一個具**商業化潛力**的植物來源**新冠病毒疫苗生產系統**。

6 未來展望

1. 調整懸浮培養條件，提高蛋白產量，並與其他表現系統比較產量。
2. 利用管柱層析方式純化水稻細胞表現的RBD蛋白。
3. 利用質譜儀確認RBD蛋白一級結構且是否有後修飾。
4. 搭配不同佐劑評估本系統作為商業化生產疫苗的潛力。

7 參考文獻

1. Chen YS, Ho TD, Liu L, Lee DH, Lee CH, Chen YR, Lin SY, Lu CA, Yu SM. Sugar starvation-regulated MYBS2 and 14-3-3 protein interactions enhance plant growth, stress tolerance, and grain weight in rice. *Proc Natl Acad Sci*. 2019 Oct 22 ;116(43):21925.
2. Nguyen TM, Lu CA, Huang LF. Applications of CRISPR/Cas9 in a rice protein expression system via an intron-targeted insertion approach. *Plant Sci*. 2022 Feb ;315:111132.
3. Liu YK, Huang LF, Ho SL, Liao CY, Liu HY, Lai YH, Yu SM, Lu CA. Production of mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by gateway technology and transgenic rice cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 2012 May ;109(5):1239.