

序論

近年來隨著生物科技的發展，重組 DNA 和基因轉殖技術漸漸成為作物改良以及植物基因功能研究的重要技術。許多研究利用農桿菌(*Agrobacteria*)感染以及粒子轟擊(particle bombardment)的方法，產生了許多在科學研究或農業上有用的基因轉殖植物。在進行基因轉殖時，常需要構築正確且易於表現的載體，一些能使基因強而穩定表現的啟動子，如花椰菜鑲嵌病毒(CaMV)的 35S 啟動子(promoter)以及玉米的泛素(Ubi1)基因的啟動子，就被廣泛的利用在植物的基因轉殖技術中。然而外來基因對植物的生長發育可能造成傷害，因此若能了解啟動子上是否可能具有特定器官表現或受環境所調控的基因序列，或研究可能與其產生交互作用的轉錄調節因子(transcription factors)，都將有助未來研究者在構築載體時，選擇最適合的啟動子，以期達到最好的基因轉殖效果。

在生物體內，轉錄調節因子是基因表現重要的調控者，基因的轉錄效率被促進或抑制，常與轉錄調節因子結合在專一性的啟動子區域有關，此區域稱為順式作用元素(cis-acting elements)。研究轉錄調節因子與其相對應在順式作用元素的交互作用，將有助於讓我們了解更多基因調控的可能機制。許多研究顯示，轉錄調節因子在生物的生長發育與生物感受環境的變化等反應中，扮演關鍵性的角色。

泛素(Ub)是由七十六個胺基酸所組成的球狀蛋白質，廣泛地存在於所有真核細胞中。泛素具有非常保守的胺基酸序列，其最後的四個 C 端胺基酸(Leu-Arg-Gly-Gly)會形成一個延伸結構，能專一性的鍵結至其受質蛋白(substrate)或另一泛素分子的離胺酸(Lysine)上，這種泛素共價性連結至其受質的作用稱為泛素化作用(ubiquitylation)，藉由不同的鍵結方式，泛素可以參與細胞中不同的生理調控，包括控制細胞週期(Pagano, 1997)、蛋白質降解(Rechesteiner, 1987)或影響染色質結構(Barsoum and Varshavsky, 1985)、DNA 配對(Koken et al., 1996)及參與對逆境反應的過程(Finley et al., 1987)(圖一)。

泛素參與蛋白質的降解作用(proteolysis)，是目前最被廣泛研究的泛素功能。其

作用機制主要是將聚泛素鏈(polyubiquitin chain)鍵結到在細胞裡將要被降解的目標蛋白質上，作為蛋白質降解的訊號，再以泛素/26S 蛋白酶體系統(ubiquitin/26S proteasome system, UPS)，進行目標蛋白質的分解。細胞中有三類酵素，分別是泛素活化酵素(ubiquitin activating enzyme, E1)、泛素結合酵素(ubiquitin conjugating enzyme, E2)、以及泛素聯結酵素(ubiquitin protein ligase, E3)參與這個降解的途徑 (圖一)。藉由泛素參與的蛋白質降解作用，細胞可以淘汰不需要或結構已損壞的蛋白質。此外，泛素亦參與調控細胞內特定蛋白質的功能，甚至影響基因表現。在動物的免疫反應中，泛素甚至可以刺激 B 細胞和 T 細胞的分化，也與細胞干擾素(interferon)所調節的免疫反應有關。組蛋白 Histone H2A 是第一個被發現受泛素修飾的真核細胞蛋白質，H2A 被泛素修飾後，會使得組蛋白 H3 上的 Lys-27 被甲基化，進而影響染色質結構(chromatin conformation)而抑制轉錄作用；此外，受泛素修飾的 H2B 會因間接使得 RNA polymerase II 的 CTD (C-terminal domain)上的絲胺酸 (serine) 無法被磷酸化而抑制轉錄延長(transcription elongation, Weake and Workman, 2008)，許多泛素修飾的機制與基因表現調節有關。

泛素化作用亦廣泛的存在高等植物細胞中。以阿拉伯芥為例，此修飾系統已被證實能調控光型態發生(photomorphogenesis, Hofmann and Bucher, 1998)、結構錯誤蛋白質的降解(Hershko et al., 1984)、生物時鐘(Patton et al., 1998)、花的發育(Ni et al., 2004)、自交不親合性(self-incompatibility, Lai et al., 2002)、抗病機制(Tornero et al., 2002)、細胞週期(Bai et al., 1996)與概日韻律(Imaizumi et al., 2003)等。第一個被證明是泛素受質的植物蛋白是光敏素(phytochrome, Shanklin et al., 1987)。當光敏素(尤其是 PhyA)收到紅光訊息而活化時，會立即啟動細胞內的信息傳遞途徑(signal transduction pathway)，引發各種生物反應。但是，活化後的光敏素將在短時間內被泛素鍵結，再送到 26S 蛋白質解體中進行降解。近年來由不同的實驗室的研究中，也發現許多植物荷爾蒙活性會受到泛素影響，如植物生長素(auxin, Pozo et al., 1998, Schwechheimer et al., 2001)、吉貝素(Gibberellin acid, Fenget et al., 2008)、茉莉酸(Jasmonic acid, Daisuke et al., 2007)、離層素(Abscisic acid, Zhang et al., 2007)以及乙烯(ethylene, Wang et al., 2009)等。另外，在植物細胞內負責調控概日韻律(circadian

rhythm)及花器基因(floral- identity gene)表現的一個重要轉錄因子 CONSTANS (CO)，亦被證明其在細胞內的含量會受到泛素的調節而改變(Imaizumi et al., 2003)。在植物生長發育過程中，可觀察到的頂端優勢(apical dominance, Yin et al., 2007)亦受泛素化作用的調控。

幾乎所有的真核生物皆含有數個泛素基因，泛素蛋白質可由兩種基因轉錄轉譯出來，分別是泛素延伸基因(ubiquitin extension/fusion gene)和聚泛素基因(polyubiquitin gene)。泛素延伸基因合成一個泛素的胜肽序列(76 aa)及一段含 52 個胺基酸(ribosomal protein L40)，或是 76-81 個胺基酸的核糖蛋白質(ribosomal protein S27)。而聚泛素基因則是長度 228 bp 的泛素保守序列會連續重複相接，但重複次數不等。這兩種形式的基因都會轉譯出 polyprotein precursor，再經由泛素水解酵素(Ub hydrolase)切割成單一且具有功能的泛素分子。

先前的研究顯示，阿拉伯芥基因體中共有五個聚泛素基因(Callis et al., 1995; Sun and Callis, 1997)。此五個基因依其延伸的末端胺基酸序列可分為兩群(圖二)：*UBQ3/UBQ4*(AT5G03240/AT5G20620)以及 *UBQ10/UBQ11/UBQ14*(AT4G05320/AT4G05050/AT4G02890)，其中以 *UBQ10* 基因擁有最多的重複次數。且從微陣列資料庫中(圖三)可知在 *UBQ10/UBQ11/UBQ14* 這群基因中，*UBQ10* 具有強而穩定的基因表現量。因此，本研究以含有 *UBQ10* 的阿拉伯芥聚泛素基因群 *UBQ10/UBQ11/UBQ14* 為主要目標。實驗中構築啟動子連接不同組合的 5'端非轉譯區域以及內插子之序列，進行基因轉殖，再利用轉殖植物中報導基因 LUC(luciferase)的表現量的差異，分析這些基因的調控是否會受啟動子、5'端非轉譯區域(5'UTR)以及內插子(intron)序列中存在的順式作用元素所影響。此外，將植株以不同環境因子處理，如高溫處理(heat shock)、低溫處理(chilling)以及光照處理後，分析聚泛素基因的表現差異，進而了解不同環境因子對該基因表現可能的影響。最後，以 MEME 等軟體工具分析 *UBQ10/UBQ11/UBQ14* 的啟動子序列，找出調控此群基因可能的順式作用元素，期待對這群基因的基因調控有更進一步的了解。

研究材料與方法

1. 消毒與種植阿拉伯芥種子

取野生型阿拉伯芥種子(Columbia-0 ecotype)置於微量離心管，以 70%酒精消毒 10 分鐘後，吸除酒精。加入含 0.5% Tween20 的 1.5 %漂白水(Clorox, Oakland,CA, USA)消毒 10 分鐘，吸除漂白水，再以無菌水清洗種子 3 次並吸除無菌水。將消毒好的種子置於 4°C 春化 2 至 3 天。經消毒及春化的種子置於無菌操作台內，以無菌水清洗 3 次後，加入 0.1% agar 充分懸浮種子，再將種子均勻分佈在 MS 培養基(1X Murashing and Skoog salt mixture, Gamborg's vitamin, 2 % sucrose, Murashige and Skoog, 1962)，以 3M 透氣膠帶封口，置於生長箱，以日夜恆溫 22°C，光照週期為長日照 16 小時光照 8 小時黑暗，培養 14 天。

2. *UBQ10*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 之序列搜尋與分析

從阿拉伯芥資料庫 TAIR(The *Arabidopsis* information resource，<http://www.arabidopsis.org/index>)取得 *UBQ10*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 之序列資料，將此序列利用資料庫 PLACE(A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements，<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index>)、AtProbe(Arabidopsis thaliana Promoter Binding Element Database，<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/atprobe>)、和 AGRIS(The Arabidopsis Gene Regulatory Information Server，<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>)，尋找已知順式作用元素，並用序列分析軟體 MEME(Multiple EM for Motif Elicitation，<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/motif/meme/meme.html>)分析各序列，統整出順式作用元素。

3. 目標選殖及定序

從阿拉伯芥資料庫 TAIR 取得 *UBQ10*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 之啟動子、5'端非轉譯區域以及內插子的序列資料。針對各基因設計一系列不同組合的 5'端非轉譯區域及內插子序列的專一引子對，利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR, ABI, 9700)放大目標序列後，利用限制酵素(restriction enzymes)*Kpn* I(Takara)以及 *Sal*

I(Takara)或 *Cla* I(Takara)切點，將純化的 PCR 產物接黏至載體 pBlueScript SK⁻，以下列混合液

Reagents	Volume(μ L)
2X ligation buffer	5
pBlueScript SK ⁻ vetor	0.5
Ligase(Promega)	0.5
PCR product	2
ddH ₂ O	2
Total volume	10

於室溫 2 小時反應，製備 LB 固體培養基，其中含 50 μ g/mL 的抗生素 Amp、200 μ g/mL 的 IPTG 和 20 μ g/mL 的 X-Gal。取 4 μ L 的接合產物加至 50 μ L DH5 α 的勝任細胞(competent cell)，以熱休克 42°C 進行 45 秒，吸取 1/2 體積的菌液至 LB 固體培養基，置於 37°C 培養箱 16 小時，選取在培養基呈現白色之菌種送定序，將含已選殖基因片段的菌種送至定序服務實驗室進行定序。經定序分析確認為正確者，利用限制酵素切位將完整的啟動子連接一系列不同組合的 5'端非轉譯區域及內插子序列構築如圖四。

4. 不同環境因子之處理

(1) 溫度

取已消毒並春化完成的野生型種子種植於 MS 培養基中，培養於日長 16 小時、夜長 8 小時和 22°C 恆溫環境。待植株生長至第 7、14、21 與 28 天時，於白光的照射下分別以 10°C、22°C 或 37°C 等不同溫度環境下處理 2 小時。之後將整株植物以液態氮冷凍收集，保存於-80°C。

(2) 黑暗

取已消毒並春化完成的野生型種子種植於 MS 培養基中，培養於日長 16 小時、夜長 8 小時和 22°C 恆溫環境。將成長至第 6、13、20 與 27 天大的阿拉伯芥，在 22°C 的環境下，給予植株 24 小時黑暗環境，並以白光(15 μ Mol/m²/sec)照射處理的植株作為對照組。之後在綠光的環境下將植株葉片以液態氮冷凍收集，

保存於-80°C。

(3) 紫外線 UV-B

取已消毒並春化完成的野生型種子種植於 MS 培養基中，培養於日長 16 小時、夜長 8 小時和 22°C 恆溫環境。將成長至第 6、13、20 與 27 天大的阿拉伯芥，在 22°C 的環境下，讓植株直接暴露在 UV-B 光線(320 nm)下 2 小時，並以白光(15 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)照射處理的植株作為對照組。之後在綠光的環境下將植株葉片以液態氮冷凍收集，保存於-80°C。

(4) 紅光、藍光

取已消毒並春化完成的野生型種子種植於 MS 培養基中，培養於 24 小時黑暗、22°C 恆溫環境。將成長至第 4 天大的阿拉伯芥白化苗，在 22°C 的環境下，給予植株紅光或藍光(15 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)兩種不同的光線處理 24 小時，並以白光(15 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)照射處理的植株作為對照組。之後在綠光的環境下將植株葉片以液態氮冷凍收集，保存於-80°C。

5. 核糖核酸(RNA)之抽取

利用 TriZol 試劑(Invitrogen, Chomczynski and Sacchi, 1987)抽取經不同環境處理的阿拉伯芥的 RNA。將 0.2 克的植物組織自 -80°C 冰箱取出，放入研鉢(需先倒入液態氮預冷)內，加入液態氮將組織磨成粉狀，再加入 1 mL TriZol 後，震盪使之充份混合，置於室溫 5 分鐘。再加入 0.2 mL 氯仿(chloroform, CHCl_3)置於室溫 3 分鐘，期間不定時震盪，分離出蛋白質後，以 4°C、13200 rpm 離心 15 分鐘，取上清液並加入 0.5 mL 異丙醇(isopropanol)，使 RNA 沈澱，靜置室溫 10 分鐘，再高速離心 10 分鐘。之後除去上清液，再加入 75%酒精去除雜質，離心沉澱物置於室溫乾燥後，接著加入 100 μL DEPC 處理過的水，回溶 RNA，測定 RNA 濃度之後，保存於-80°C。

6. RNA 的定量

取不同處理過後的植物組織所抽取出來的 RNA 各取 2 μL ，以 10 mM Tris (pH = 8)稀釋至 100 μL ，然後以分光光度儀(spectrophotometry, Eppendorf)測定 OD_{260} 及 OD_{280} 讀值($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值必須介於 1.8-2.2 之間為佳)，以公式 $\text{OD}_{260} \times 40$ 稀釋倍數

計算出 RNA 濃度。

7. 以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應(Reverse transcription-PCR, RT-PCR)追蹤各種泛素基因的表現

(1) cDNA(complementary DNA)的合成

取各個不同處理後的組織 RNA 5 μg ，分別加入 1 μL oligo-dT primer(10 mM)，再加二次水補到 10 μL ，置於 70°C 乾浴槽 5 分鐘，然後置於冰上 5 分鐘。接著各管加入下列藥品試劑：

Reagents	Volume(μL)	Final conc.
5X M-MLV RT 5X Buffer(Promaga)	4	1X
10 mM dNTP (dNTP 包含 dATP, dCTP, dGTP, 和 dTTP)	2	1mM
200 U/ μL M-MLV RT RNase H(-) Point Mutant(Promaga)	1	10 U/ μL

加 DEPC-treated water 至總體積 20 μL 。

混合均勻後放入 42°C 水浴槽反應 1 個小時，之後置於 70°C 乾浴槽 5 分鐘，完成後置於冰上，或長久保存於-20°C 冰箱。

(2) 聚合酶鏈鎖反應(PCR)

在 0.2 mL 之微量離心管中，分別加入下列試劑(共分兩個部分)：

第一部分

Reagents	Volume(μL)	Final conc.
Template DNA	0.5	-
dNTP(10 mM)	0.2	0.08 mM
10X PCR buffer	1.5	1X
Tag DNA polymerase(5U/ μL)	0.2	0.04 U/ μL
ddH ₂ O(10mM)	12.6	-
Total volume(10mM)	15.0	-

第二部分

Reagents	Volume(μ L)	Final conc.
Forward primer(10 μ M)	0.5	0.5 mM
Reverse primer(10 μ M)	0.5	0.5 mM
10X PCR buffer	1.0	1X
ddH ₂ O	8.0	-
Total volume	10.0	-

混合後短暫離心。在 PCR 反應器上設定 PCR 反應條件：

溫度	時間	Cycle 數
94°C	2 分鐘	1
94°C	30 秒	20
60°C	30 秒	
72°C	30 秒	
72°C	2 分鐘	1

將微量離心管置於 PCR 反應器 ABI 9700(ABI)，依設定之時間與溫度進行反應。PCR 反應後，各取 5 μ L 反應產物進行洋菜膠體電泳分析。

(3) 洋菜膠體電泳分析(Agarose gel electrophoresis)

取 0.3 克 agarose，加入 30 mL 之 0.5 倍 TBE buffer，於微波爐內加熱至溶解，待溫度下降約至 55°C，倒入膠台，靜置凝固。將 PCR product 和 1/10 體積之 10X loading buffer 混合，置入樣品槽，於 100 伏特下電泳約 15 分鐘，之後置於 50 mL 含 SYBER Green 的 TBE buffer。以 SYBER Green 標記 DNA，約 20 分鐘，最後使用 Fuji LAS-3000 Image Analyzer 偵測每一基因表現量。

(4) 定量

用軟體 Image Gauge Ver. 4.0 (Fuji Photo Film Co., Ltd.)定量。再以 UBQ5 量當控制組，計算基因表現差異並繪圖。

8. PDS-1000 基因槍操作

(1) 製備金粉

將 25 mg 金粉置入 1.5 mL 離心管，加入絕對酒精，高速震盪 1-2 分鐘，10000 rpm 離心 1 分鐘，重複三次，倒掉上清液，加入 1 mL 無菌水，震盪數秒，10000 rpm 離心 1 分鐘，重複清洗兩次。加入 1 mL 無菌水，分裝成每管 50 μ L，儲存於 -20°C 備用。

(2) 轟擊準備工作

將巨攜圓盤(macrocarriers)、巨攜圓盤支撐物(holder)、停止屏(stopping screen)、破裂圓盤(rupture disk)浸泡在絕對酒精中作表面消毒，晾乾備用。

(3) 製備轟擊用子彈

取清洗過的金粉，加入 5 μ L DNA(1 μ g/ μ L)以微量吸注器混合。加入 50 μ L 2.5 M CaCl_2 ，以微量吸注器混合，加入 20 μ L 0.1 M spermidine，以震盪器混合 3 分鐘後，10000 rpm 離心 10 秒，倒掉上清液，以 250 μ L 絕對酒精清洗二次，10000 rpm 離心 10 秒，倒掉上清液，加入 60 到 70 μ L 絕對酒精，混合均勻，5 μ L 滴在巨攜圓盤上。

(4) 轟擊操作

將氮氣桶鋼瓶上閥門打開，調整壓力錶前黑色旋鈕至適當壓力(至少較所需壓力高 200 psi)，將各物件在射擊腔(chamber)內組合，調整目標植物與巨攜帶子之間的距離。關上射擊腔，抽真空至所需真空度(最小 25 英吋 Hg)後，Hold 住使壓力固定。一直壓住 Fire 鈕直到破裂圓盤破裂且壓力值達零才放開以進行轟擊。最後釋放射擊腔之真空度，待射擊腔恢復壓力，取出目標植物及所有件。重複步驟 (2) 到步驟 (4)，直到所有實驗材料轟擊完。

9. 報導基因之活性測試

使用 Luciferase Assay System (Promega) 萃取植物萃取液。將植物葉片樣本自 MS 培養基取出，放入需先倒入液態氮預冷的研鉢內，以液態氮將組織磨成粉狀後放入 1.5 mL 的微量離心管，再加入 50 μ L 1 倍的 Lysis Buffer (Promega)後，震盪使之充份混合。以 13200 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至新離心管中，置於冰上保持活性，完成萃取液的萃取，每組實驗均重複三次。

(1) LUC 活性測定

各樣本取 20 μL 萃取液放入白色 96 孔微量盤中，並放 20 μL 1 倍的 Lysis Buffer 當作背景值(Blank)。以冷光儀(SpectraMax L, Molecular Devices)在每孔注入 100 μL Luciferase assay substace (promega)，並以 Luminescence Single Wavelength 激發並偵測各樣本 LUC 的活性。將各樣本的 LUC 數值減去 1 倍的 Lysis Buffer 背景值數值，以作為 LUC 的活性。

(2) GUS 活性測定

各樣本取 5 μL 萃取液加 50 μL 1mM 4-MUG(溶於 1X Lysis Buffer)放入黑色 96 孔微量盤中，放入 37°C 且避光的環境下反應 10 分鐘後，加入 145 μL 0.2M Na_2CO_3 以中止反應。利用螢光儀(Molecular Devices, SpectraMax GEMINI XPS)以激發波長 365 nm 的光激發樣本，並偵測反射波長 455 nm 的數值。同時製作不同濃度的 4-MU 作為標準曲線(Standard)。由 4-MU 的標準曲線公式，計算出各樣本的 GUS 濃度。

4-MU 標準曲線濃度：

1 μM 4-MU(μL)	0.2M Na_2CO_3 (μL)	Conc. (nM)
0	200	0
10	190	50
20	180	100
30	170	150
40	160	200
80	120	400
100	100	500

(3) 總蛋白質(total protein)濃度測定

各樣本取 1 μL 萃取液加 9 μL 無菌水放入透明 96 孔微量盤中，並製作不同濃度的 BSA 作為標準曲線。各孔中加入 200 μL 1X protein assay buffer (Bio-Rad)反應 10 分鐘。以分光光度計(FLx800, BioTek)發出 595 nm 的波長測定。將各樣本的數據減去濃度為 0 的 BSA 背景值數據，並帶入 BSA 的標準曲線公式，計算出各樣本的蛋白質濃度。

BSA 標準曲線濃度：

ddH ₂ O(μL)	1X Lysis Buffer(μL)	BSA (μL)	Conc. (μg/μL)
9	1	0	0
8	1	1	2
7	1	2	4
6	1	3	6
5	1	4	8
4	1	5	10

(4) GUS 和 LUC 數據計算

計算 GUS 活性(GUS activity(pmole/min/μg))所使用之公式

$$\text{GUS 活性} = \frac{\text{GUS 濃度(nM)} \times 0.2 \text{ (反應體積(mL))}}{10 \text{ (反應時間(min))} \times \text{蛋白質總量(μg)}}$$

計算相同體積的 LUC 比 GUS 的值，分析不同的 *UBQ10/UBQ11/UBQ14* 上游調控序列影響阿拉伯芥葉片中的報導基因之 LUC 對 GUS 比值，判斷各片段影響報導基因的表現程度，找出 *UBQ10/UBQ11/UBQ14* 啟動子上，影響基因表現的關鍵序列。

10. 總蛋白質(total protein)萃取

使用實驗方法參考Fan and Dong(2002)，以研鉢和杵及液態氮將20天野生型植株葉片磨成粉末。取4 g粉末加至2 mL總蛋白質萃取液(extraction buffer, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, and protease inhibitor)，強力震盪使粉末與溶液均勻混和，以13200 rpm，4 °C 離心15分鐘，離心完畢，收集上清液並測量蛋白質濃度，儲存於-20°C備用。

11. 膠體電泳位移分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

(1) 順式作用元素寡核苷酸(oligonucleotide)的設計

A. 設計Ub promoter element 1(UPE1)

前置引子(forward primer)：

5'-TTAGCTATTGCTTCACCGCCTTAGCTTTCTCGTGACCTAGTCGTCCTCG

-3'

反置引子(reverse primer)：

5'-CGAGGACGACTAGGTCACGAGAAAGCTAAGGCGGTGAAGCAATAGCT
AA-3'

B.設計Ub promoter element 2(UPE2)

前置引子：

5'-CTCAACCTAA AAATAAGGCAATTAGCCAAAAACAACCTTGC -3'

反置引子：

5'-GCAAAGTTGTTTTTGGCTAATTGCCTTATTTTTAGGTTGAG-3'

C.設計Ub promoter element 3(UPE3)

前置引子：

5'-CAGTAATAAAA CGGCGTCAAAGTGGTTGCAGCCGGCAC-3'

反置引子：

5'-GTGCCGGCTGCAACCACTTTGACGCCGTTTATTACTG-3'

(2) 以Biotin-N¹¹-CTP標記順式作用元素寡核苷酸

計算單股5 pmol寡核苷酸的量(5 pmol = 165ng*N; N=length)。加入無菌水，5 μL biotin-N¹¹-CTP (5 μM)，10 μL 5X TdT buffer，0.3 μL Terminal deoxynucleotidyl Transferase (30 U/μL)(Promaga, USA)，總體積為50 μL。37°C反應30分鐘，加入2.5 μL 0.2 M EDTA終止反應。加入等體積50 μL Chloroform震盪，震盪後以13200 rpm離心2分鐘，吸取上層水溶液至500 μL微量離心管，置於-20°C保存。

(3) 順式作用元素寡核苷酸與總蛋白質結合反應

結合反應中，反應溶液總體積為20 μL包含2 μL Biotin-N¹¹-CTP標記DNA (20 fmol/μL)、2 μL 10X binding buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM KCl, 10 mM DTT)、1 μL 50% glycerol、5 ng總蛋白質或是1ng核蛋白質，最後補水至20 μL。在室溫下反應20分鐘。

(4) 聚丙醯胺膠片進行電泳

待室溫反應20分鐘後，加入10X loading dye，以聚丙醯胺膠片進行電泳分析 (Novex 6% DNA Retardation gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。拔去膠片上的

齒梳後，置於直立式電泳槽，倒滿0.5X TBE電泳緩衝液。以固定電壓100伏特及固定電流15毫安培進行電泳1小時。

(5) 膠片轉移

待電泳結束後將膠片上的DNA轉移至尼龍膜(nylon membrane)。將膠片置於0.5X TBE buffer，在轉漬器上負極依序放入2片海綿片、2片3MM濾紙(Whatman)、膠片、尼龍膜、2片3MM、2片海綿，海綿片及3MM濾紙需事先吸飽0.5X TBE buffer。轉漬器放入電泳槽後，倒滿0.5X TBE buffer，以固定電壓100伏特及固定電流380毫安培進行轉移30分鐘。取出尼龍膜，使用UV crosslinker以 120 mJ/cm^2 固定至少1分鐘，使DNA固定於膜上。

(6) 化學冷光呈色套裝工具(Chemiluminescence Nucleic Acid Detection Module, PIERCE, Rockford, IL, USA)偵測標記DNA。

A. 將尼龍膜浸於10 mL blocking buffer中，在室溫下搖晃15分鐘。再將尼龍膜浸於10 mL 含有33.3 μL Streptavidin-Horse Radish Peroxidase Conjugate的blocking buffer中，在室溫下搖晃15分鐘。取出尼龍膜，以1X wash buffer (1 X Phosphate Buffered Saline, pH 7.4; 0.05 % Tween 20; 0.1 % SDS)清洗3次，每次5分鐘，再浸於substrate equilibration buffer中5分鐘，並輕輕搖晃。

B. 混勻 1 ml Luminol/Enhancer solution 及 1 ml Stable peroxide solution，並均勻分配在尼龍膜上，反應 5 分鐘。以 CCD (LAS3000, FUJIFILM, Japan)之化學冷光濾片偵測。

結果

1. 不同長度 *UBQ10* 上游序列(-2044 至+389)片段對報導基因表現的影響

阿拉伯芥的聚泛素基因群具有一致性的基因結構(圖四A)，自5'端始由啟動子序列，後接5'端非轉譯區域及一內插子，再緊接數個轉譯Ub蛋白質的編碼序列。為了解調控*UBQ10*的機制，將*UBQ10*的2044 bp長之啟動子序列做啟動子序列遞減，並加上5'端非轉譯區域(+1至+85)和內插子序列(+86至+389)，形成七種組合的上游序列pUB10-1到pUB10-7(圖五B)。這七條序列後面接上LUC報導基因，再以CaMV 35S啟動子所驅動的報導基因GUS作為載體量的控制(圖四B)。藉由基因槍將質體送入植物細胞後，再偵測報導基因的表現量，分析序列片段對驅動報導基因轉錄的效率。上游遞減序列圖示如圖五B，相對應之報導基因表現量如圖五C。由分析報導基因之表現量可知pUB10-1(-2044至+389)有最大量的啟動子活性。啟動子依序由-2044遞減至-1849，可發現pUB10-3(-1849至+389)的報導基因表現為pUB10-1的46%，顯示此區域可能有正向調控片段位於其中。而pUB10-3、pUB10-4(-1747至+389)、pUB10-5(-1434至+389)和pUB10-6(-731至+389)這幾個質體的報導基因表現平穩，可能沒有重要的調控序列位於其中。而分析pUB10-6與pUB10-7(-118至+389)的報導基因表現量可知pUB10-6的報導基因表現量為pUB10-7的12倍，可能在此序列中有核心啟動子序列(core promoter sequence)位於其中，序列遞減後使得基因轉錄的效率大為下降。除此之外，另外構築不同長度啟動子序列後面皆接上5'端非轉譯區域(+1至+85)，內插子(+86至+389)以及增加一個Ub編碼序列(coding sequence, +390至+617)。比較pUB10-8(-2044至+617)、pUB10-9(-1948至+617)以及pUB10-10(-1849至+617)可得知序列-2044到-1849的存在的確影響報導基因的表現量。但pUB10-8、pUB10-9以及pUB10-10若與pUB10-1、pUB10-2、pUB10-3相比較，則可發現在上由序列後增加了一個Ub的編碼序列，在驅動報導基因的轉錄效率上，並沒有顯著的影響。

2. 不同長度*UBQ11*上游序列(-1046至+426)片段對報導基因表現的影響

將不同長度的啟動子片段(-1046至-1)加上5'端非轉譯區域(+1至+92)接上報導基因後(圖六)，偵測不同片段對報導基因轉錄的影響。pUB11-3(-557至+92)的報導基

因表現為pUB11-1(-1046至+92)及pUB11-2 (-798至+92)的8倍、pUB11-4(-258至+92)的3倍(圖六B)，顯示-798至-557之間有一負向調控序列，而-577至-258之間有一正向調控序列。此結果在由5'端遞減的啟動子序列、5'端非轉譯區域(+1至+92)以及內插子(+93至+426)所組成的質體中pUB11-5(-1046至+426)、pUB11-6 (-557至+426)、pUB11-7 (-258至+426)，也有相同的結果，但因為內插子的影響而使得pUB11-5、pUB11-6、pUB11-7的報導基因表現都較pUB11-1、pUB11-3、pUB11-4為高，這也符合前人內插子會使基因表現上升的結果(Norris, 1993)。

3. 不同長度UBQ14上游序列(-714至+364)片段對報導基因表現的影響

構築UBQ14上游序列包含不同長度啟動子序列以及5'端非轉譯區域(+1至+67)，序列後接LUC報導基因以及控制組構築如圖七B。分析報導基因表現量，發現pUB14-1(-714至+67)的啟動子活性表現是pUB14-2(-342至+67)、pUB14-3 (-244至+67)、pUB14-4(-123至+67)的啟動子活性的2.1倍，而pUB14-2、pUB14-3、pUB14-4之間的啟動子活性表現並無明顯差異。表示缺少-714和-324間的390bp之序列片段，會使得報導基因的表現量下降，應有一正向調控序列位於其中。進一步比較UBQ14的內插子序列對基因表現的影響(圖七C)，顯示pUB14-5(-714至+364)和pUB14-7 (-342至+364)在增加了內插子序列之後，報導基因表現上升了約1.8倍，而由pUB14-6 (-636至+364)和pUB14-5相比報導基因表現下降，得知-714到-636之間有一正向調控序列，此序列片段應是UBQ14上游調控序列中，影響基因表現的關鍵序列。

4. UPE1、UPE2及UPE3為UBQ10/UBQ11/UBQ14啟動子上的保守序列

為了對UBQ10/UBQ11/UBQ14啟動子上可能的調控序列有進一步的了解，以MEME軟體分析此三基因2 Kb左右的啟動子上是否有任何相似序列。結果發現3個保守序列UPE1~3(Ub promoter element 1~3)，並由Weblogo排出保守序列(圖八~圖十)。利用測試蛋白質核酸結合的膠體電泳位移分析(EMSA)檢驗，當蛋白質核酸具有結合能力時，其分子量明顯增加，在膠片上可以看出移動延遲，由EMSA實驗發現UPE1~3皆會與總蛋白質有交互作用(圖十一)。另一方面，利用PLACE順式作用元素資料庫比對UPE1、UPE2以及UPE3序列，發現三個序列上有一些已知的順式作用元素，整理

如表四。

5. 溫度處理對*UBQ10/UBQ11/UBQ14*基因表現的影響

溫度對植物而言是屬於一種非生物性的逆境，會導致植物生長和發育受阻，進一步的影響作物的產量，為了解高溫以及低溫的處理對*UBQ10/UBQ11/UBQ14*基因表現的影響。取種於MS培養基上7天、14天、21天以及28天的阿拉伯芥植株，置於37°C、22°C和10°C的環境下進行不同溫度的處理二小時之後抽取RNA，進行RT-PCR實驗以了解各基因的表現情形。各植株與22°C處理的植株相比較，在37°C的高溫處理中，*UBQ14*的基因表現略為上升(圖十二)、而*UBQ11*則是略為下降。在10°C的低溫處理中，除了*UBQ10*的基因表現量穩定，而*UBQ11*和*UBQ14*都有顯著的上升，其中以28天齡的植株最為明顯。

6. 光對*UBQ10/UBQ11/UBQ14*基因表現的影響

對植物而言，光是影響其生長發育重要的環境因子。光可以促進植物萌芽、開花等重要生理功能。取種於MS培養基上6天、13天、20天以及27天的阿拉伯芥植株，將植株置於24小時黑暗的環境下，並以正常生長於白光下的植株作為對照組。結果如圖十三，24小時黑暗處理後，*UBQ10*和*UBQ11*的基因表現在不同天齡的植株與對照組並沒有顯著的差異，而*UBQ14*與對照組相較，則是略微的下降。

7. 紫外線(UV-B)對*UBQ10/UBQ11/UBQ14*基因表現的影響

為了解UV-B對*UBQ10/UBQ11/UBQ14*基因的基因表現有所影響，取種於MS培養基上7天、14天、21天以及28天的阿拉伯芥植株，將植株直接至於UV-B光線下二小時，於綠光中收取植株，並抽取RNA，同時以再白光下正常生長的植株作為控制組。由圖十四可觀察出*UBQ10*以及*UBQ11*在UV-B處理後，與控制組相比較，7天、14天、21天以及28天齡的植株都沒有顯著差異，而*UBQ14*的基因表現則隨著植株的成長，表現量逐漸降低。

8. 紅光與藍光對*UBQ10/UBQ11/UBQ14*基因表現的影響

為了解紅光與藍光對此三基因之影響，本研究使用再黑暗中成長至四天齡的白化苗植株，將植株至於白光、紅光以及藍光下二十四小時，並於綠光中收取植株、抽取RNA，同時以黑暗下的白化植株作為控制組，比較白光、紅光以及藍光對泛素基因的影響。由圖十五可觀察出*UBQ10/UBQ11/UBQ14*在白光、紅光以及藍光處理後，基因表現都沒有顯著差異，而在此*UBQ3*在藍光處理後基因表現下降；*UBQ4*在紅光處理後基因表現下降則為二正對照組。

討論

本研究針對影響*UBQ10/UBQ11/UBQ14*轉錄效率的啟動子做5'端的序列遞減分析。首先，比較pUB10-1和pUB10-8、pUB10-2和pUB10-9的轉殖細胞內LUC/GUS比值，可發現增加228 bp的Ub編碼序列，對驅動報導基因的表現並沒有明顯的影響。其次，內插子的存在會提高此三泛素基因啟動子的轉錄效率。而由先前的研究得知(Norris, 1993)以同樣實驗方法發現內插子的存在對*UBQ10*以及*UBQ11*的基因表現會有促進的作用，我們的結果與之相符。一般而言，以transient assay的方式常會提高啟動子轉錄效率約2-3倍，而在其他用原生質體(protoplast)的研究中，內插子則可以促進基因表現30-800倍(Bhattacharyya et al., 2003; Kim et al., 2006)。在轉譯起始點(translation start site)之前的內插子稱為引領內插子(leader intron)，不單影響基因表現量，也和基因的組織特異(tissue-specific)表現有關(Graciela et al., 2005)。至於*UBQ10/UBQ11/UBQ14*的內插子影響了哪些組織的特定表現，未來則需要利用農桿菌轉殖以獲得穩定轉殖植株，才能觀察到更多的資訊。此外，將此三基因可能的調控區域與使用軟體比對到的保守區比較(附圖一)，則發現*UBQ10*可能的正向調控區段與UPE1相符；*UBQ11*可能的正向調控區段與UPE3相符，說明此區段可能含有真正的順勢作用元素。

為了解在聚泛素基因的基因群中，是否有更合適做為基因功能研究的控制組基因。因此自網路微陣列資料庫GENESTIGATOR中，取得五個聚泛素基因以及五個泛素延伸基因資訊，加以計算分析(表三)。發現聚泛素家族基因的表現量都相當的穩定，其中以*UBQ10*表現量最穩定，而泛素延伸基因中則以*UBQ5/UBQ6*的表現最為穩定，但因為*UBQ5*和*UBQ6*的基因序列相似度過高，以致於微陣列的實驗方式無法區分，然而，本研究搜尋已發表的研究觀察出*UBQ5*也是一個常用的控制組基因。綜合上述，我們認為除了*UBQ10*之外，*UBQ5*也是一個當作控制組的一個基因。

在研究不同環境因子與阿拉伯芥基因表現的實驗中，經高溫處理後，*UBQ11*以及*UBQ14*呈現受熱誘導而基因表現量略為上升的現象，此結果和已發表的結果大致相符(Sun and Callis, 1997)。而在低溫處理後，則發現*UBQ11*和*UBQ14*的基因表現

量上升，而*UBQ11*的結果與微陣列資料庫GENEVESTIGATOR中的資料符合。這可能是因為低溫的影響使細胞內部有不同程度的代謝失常，包括蛋白質合成量減低、光合作用和呼吸作用趨緩、細胞結構受損等，使得聚泛素基因的表現量上升。此外，由於低溫處理的基因表現受C-repeat binding factor (CBF) expression 1 (ICE1)所促進，而ICE1不僅為受泛素化所降解之蛋白質，亦為一受SUMO (small ubiquitin-related modifier) E3 ligase之受質(Chinnusamy V., et al, 2007)。許多轉錄後的調控機制也在參與在植物遇冷的反應。而在紅光以及藍光的處理中，本研究使用四天齡之白化苗，以二十四小時之紅光與藍光照射，其中*UBQ3*以及*UBQ4*分別為正對照組，此結果與張(2009)紅光與藍光皆使*UBQ3*基因表現上升，而*UBQ4*則不受紅藍光之影響不同，這可能是因為張所使用的植株為在正常環境下生長，再處理紅光與藍光二十四小時，而本實驗則使用白化苗，在黑暗環境下生長之白化苗，受環境壓力使得基因表現和細胞生理都與正常環境成長之植株有不同的表現。

從比對此三聚泛素基因的序列相似度發現，在內插子的部分，有三個相似序列(附圖二)，皆位於三基因內插子相似位置。其中第三個相似序列為五個聚泛素基因所共有的保守序列，且命名為UIE2(ubiquitin intron element 2)(張, 2009)。在5'端非轉譯區的比對方面，則有三個相似序列(附圖三)，此三相似序列與張(2009)比對出五聚泛素基因共有的相似序列有所不同，張比出之相似片段為5'端非轉譯區序列+1至+45的相似序列和+50至+60的相似序列，而本研究所比對出的第一和第三個相似序列為此三聚泛素基因所共有，第二相似序列則只有*UBQ10*和*UBQ11*共有。在此比對中可以發現聚泛素基因內插子序列的保守性較高，而5'端非轉譯區則可能因為不同分群而有所差異，而其中相似序列是否有著共同的調控機制，不相似的序列是否有著特殊的個別調控機制，仍有待實驗加以證實。

若*UBQ10/UBQ11/UBQ14*這群基因受相同轉錄因子所調控，則基因的啟動子區域需具有共同的保守序列，如此，這一群基因才能在相同時期被啟動。以生物資訊軟體MEME比對分析*UBQ10/UBQ11/UBQ14*基因啟動子上的保守序列，再交叉比對已知的順式元素資料庫的，找到三條未知的順式作用元素，UPE1、UPE2以及UPE3。

經由EMSA實驗已證實UPE1、UPE2以及UPE3為具有蛋白質結合能力的核苷酸序列，然而此結合能力則仍需實驗證明是否為專一結合。

以 PLACE 網站作序列的比對發現 UPE1、UPE2 以及 UPE3 都具有 Dof 蛋白質鍵結的核心位置(表四)。Dof 蛋白質可調控 C4 光合磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(*C4 photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase, C4PEPC*)基因的表現，也會促進細胞正磷酸雙激酶(*cytosolic orthophosphate dikinase, cyPPDK*)基因和非光合性 PEPC (non-photosynthetic PEPC)基因的轉錄量(Yanagisawa, 2000)，因此 Dof 蛋白質應為一促進基因表現蛋白質。UPE2 和 UPE3 另外共有的順勢作用元素為 T box。T box 最初是從阿拉伯芥 *GAPB(chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit)*基因啟動子序列上所發現的的順勢作用元素，其被突變會使得受光活化基因(light-activated gene)的轉錄量下降(Chan et al., 2001)。UPE1 和 UPE3 共有的順勢作用元素 W-box 為稻米 *Amy32b* 基因啟動子序列上所發現的順勢作用元素，為 WRKY proteins 的鍵結位置。在稻米的吉貝素訊息傳遞路徑中，WRKY71 為一轉錄抑制者(repressor)(Zhang et al., 2004)。除此之外各保守序列擁有的個別順勢作用元素，UPE1 有 CAAT 啟動子保守序列、CBF1 鍵結位、GTGA 鍵結位、REalpha 鍵結位、低溫反應關鍵序列(low temperature responsive element, LTRE)等。UPE2 有 CAAT 啟動子保守序列和 SEF4 鍵結位。UPE3 擁有 CACT 鍵結位以及 CaMV 35S promoter 也具有 ASF-1 鍵結位。綜合上述，影響 *UBQ10/UBQ11/UBQ14* 基因表現的可能因子有很多，需要更多的實驗加以證實。

由構築不同長度的啟動子序列經粒子轟擊入葉肉細胞，測試報導基因的活性後發現，在 *UBQ10/UBQ11/UBQ14* 的啟動子序列中，各自有不同的調控區段。而由 MEME 的比對結果中，則發現了此三基因具有共有的保守序列，顯示 *UBQ10/UBQ11/UBQ14* 的基因表現仍會受到特定蛋白質共同調控。未來可進一步以轉殖植物尋找此三基因的啟動子是否有組織特異性，或是以交換內插子序列研究，內插子對基因轉錄的效率，甚至以酵母菌單雜交(yeast one-hybrid)的方式找到其他與順勢作用元素結合的蛋白質。截至目前為止，本研究了解的只有複雜基因調控中的一小

部分，更多的疑問仍需要靠更多的實驗加以證明。

參考文獻

- Amin J., Ananthan J., Voellmy R.** (1988). Key features of heat shock regulatory elements. *Molecular Cell Biology* 8, 3761-3769.
- Bachmair A., Novatchkova M., Potuschak T., Eisenhaber F.** (2001). Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sciences* 6, 463-470.
- Bai C., Sen P., Hofmann K., Ma L., Goebel M., Harper JW., Elledge SJ.** (1996). Skp1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-274.
- Barsoum J., Varshavsky A.** (1985). Preferential localization of variant nucleosomes near the 5'-end of the mouse dihydrofolate Reductase Gene. *Journal of Biology Chemistry* 260, 7688-7697.
- Bhattacharyya S., Pattanaik S., Maiti IB.** (2003). Intron-mediated enhancement of gene expression in transgenic plants using chimeric constructs composed of the Peanut chlorotic streak virus (PCISV) promoter-leader and the antisense orientation of PCISV ORF VII (p7R). *Planta* 218, 115-124.
- Callis J., Carpenter T., Sun CW., Vierstra R.** (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* 139, 921-939.
- Callis J., Raasch J., Vierstra R.D.** (1990). Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana* : structure, localization and expression of their promoters in transgenic tobacco. *Journal of Biology Chemistry* 265, 12486-12493.
- Chan CS., Guo L., Shih MC.** (2001). Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 46, 131-141.
- Chang HY., Sun CW.** (2009). Expression analyses of Arabidopsis polyubiquitin genes *UBQ3* and *UBQ4*. Master thesis. National Taiwan Normal University.
- Chinnusamy V., Zhu JH., Zhu JK.** (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *TRENDS in Plant Science* 12, 1380-1385.
- Christensen A.H., Sharrok R.A., Quail P.H.** (1992). Maize polyubiquitin genes : structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter

- activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18, 675-689.
- Daisuke H., Shu H., Yoshinori J., Nobuyuki Y., Shigehito T., Hideki T.** (2007). The LeATL6-associated ubiquitin/proteasome system may contribute to fungal elicitor-activated defense response via the jasmonic acid-dependent signaling pathway in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 72-81.
- Fenget S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L., Yu L., Iglesias-Pedraz JM., Kircher S., Schafer E., Fu X., Fan LM., Deng XW.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451, 475-479.
- Finley D., Ozkaynak E., Varshavsky A.** (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48, 1035-1046.
- Graciela C.** (2005). The leader intron of *Arabidopsis thaliana* genes encoding cytochrome oxidase subunit 5c promotes high-level expression by increasing transcript abundance and translation efficiency. *Journal of Experimental Botany* 56, 2563-2571.
- Hershko A., Leshinsky E., Ganoth D., Heller H.** (1984). ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 1619-1623.
- Hochstrasser M.** (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual Review of Genetics* 30, 405-439.
- Hoffman N.E., Ko K., Milkowski D., Pichersky E.** (1991). Isolation and characterization of tomato cDNA and genomic clones encoding the ubiquitin gene *ubi3*. *Plant Molecular Biology* 17, 1189-1201.
- Hofmann K., Bucher P.** (1998). The PCI domain: a common theme in three multi-protein complexes. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 204-205.
- Ibarra-Molero B., Makhatadze GI., Sanchez-Ruiz JM.** (1999). Cold denaturation of ubiquitin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1429, 384-390.
- Imaizumi T., Tran H.G., Swartz T.E., Briggs W.R., Kay S.A.** (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426, 302-306.

- Koken MH., Hoogerbrugge JW., Jasper D., Wit J., Willemsen R., Roest HP., Grootegoed JA., Hoeijmakers JH.** (1996). Expression of the ubiquitin-conjugating DNA repair enzymes HHR6A and B suggests a role in spermatogenesis and chromatin modification. *Developmental Biology* 173, 119-132.
- Kim MJ., Kim H., Shin JS., Chung CH., Ohlrogge JB., Suh MC.**(2006). Seed-specific expression of sesame microsomal oleic acid desaturase is controlled by combinatorial properties between negative cis-regulatory elements in the SeFAD2 promoter and enhancers in the 5'-UTR intron. *Molecular Genetics and Genomics* 276, 351–368.
- Kyozaka J., Fujimoto H., Izawa T., Shimamoto K.** (1991). Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize Adh1 promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Molecular Genetics and Genomics* 228, 40-48.
- Lai Z., Ma W., Han B., Liang L., Zhang Y., Hong G., Xue Y.** (2002). An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology* 50, 29-42.
- Ma JF., Goto S., Tamai K., Ichii M.** (2001). Role of root hairs and lateral roots in silicon uptake by rice. *Plant Physiology* 127, 1773-1780.
- Moon J., Parry G., Estelle M.** (2004). The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Plant Development. *The Plant Cell* 16, 3181-3195.
- Murashige T., Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Ni W., Xie D., Hobbie L., Feng B., Zhao D., Akkara J., Ma H.** (2004). Regulation of Flower Development in *Arabidopsis* by SCF Complexes. *Plant Physiology* 134, 1574-1585.
- Norris SR., Meyer SE., Callis J.** (1993). The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology* 21, 895-906.
- Pagano M. (1997). Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB Journal* 11, 1067-1075.
- Patton EE., Willems AR., Tyers M.** (1998). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't skip the F-box hypothesis. *Trends in genetics* 14, 236-243.

- Philip Z., Matthias HH., Hennig L., Gruissem W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136, 2621-2632.
- Pozo JC., Timpte C., Tan S., Callis J., Estelle M.** (1998). The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in Arabidopsis. *Science*. 280, 1760-1763.
- Rechsteiner M.** (1987). Natural substrates of the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 66, 615-618.
- Rose AB., Elfersi T., Parra G., Korf I.** (2008). Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression. *The Plant Cell* 20, 543-551.
- Schwechheimer C., Serino G., Callis J., Crosby WL., Lyapina S., Deshaies RJ., Gray WM., Estelle M., Deng XW.** (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* 292, 1379-1382.
- Shanklin J., Jabben M., Vierstra RD.** (1987). Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: identification of possible intermediates of phytochrome degradation. *The proceedings of the national academy of sciences* 84, 359-363.
- Singh MB., Xu H. Bhalla PL., Zhang Z., Swoboda I., Russell SD.** (2002). Developmental expression of polyubiquitin genes and distribution of ubiquitinated proteins in generative and sperm cells. *Sex Plant Reproduction* 14, 325-329.
- Sivamani E., Qu R.** (2006). Expression enhancement of a rice polyubiquitin gene promoter. *Plant Molecular Biology* 60, 225-239.
- Sun CW., Callis J.** (1997). Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes. *Plant Journal* 11, 1017-1027.
- Sun CW., Griffen S., Callis J.** (1997). A model for the evolution of polyubiquitin genes from the study of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant Molecular Biology* 34, 745-758.
- Tornero P., Merritt P., Sadanandom A., Shirasu K., Innes RW., Dangl JL.** (2002). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in Arabidopsis, and

their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *The Plant Cell* 14, 1005-1015.

Wang J., Jiang J., Oard J. (2000). Structure, expression and promoter activity of two polyubiquitin genes from rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Science* 156, 201-211.

Wang X., Kong H., Ma H. (2009). F-box proteins regulate ethylene signaling and more. *Genes & Development* 23, 391-396.

WeakeVM., Workman JL. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Molecular Cell* 29, 653-663.

Yanagisawa S. (2000). Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *The Plant Journal* 21, 281-288.

Yin XJ., Volk S., Ljung K., Mehlmer N., Dolezal K., Ditengou F., Hanano S., Davis SJ., Schmelzer E., Sandberg G., Teige M., Palme K., Pickart C., Bachmair A. (2007). Ubiquitin lysine 63 chain-forming ligases regulate apical dominance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 1898-1911.

Zhang YY., Xie Q. (2007). Ubiquitination in abscisic acid-related pathway. *Journal of Integrative Plant Biology* 49, 87-93.

表格與圖片

表一. *UBQ10*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 基因之啟動子作一連串刪除使用引子資料表(一)

名稱	限制酵素切點	序列(5'-3')
UBQ14-F2	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCACCATCCCATATTAATATCGATTC
UBQ14-F3	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCATGCTCATTCGTAATCGAAATC
UBQ14-F4	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGCGATGTGGGACATTGTACAC
UBQ14-F5	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCAATTGTATTAATGCTTCTATTCTGG
UBQ14-F6	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGGATTTAACTCCTAGTTCTATCGC
UBQ14-F7	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCATACTATCCCATGTTATTATCCAC
UBQ14-F8	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCTAAGATTTCTCTCGCAGTATATC
UBQ14-F9	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCCAAACCCGTCCTACCATATAAC
UBQ14-F10	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCAATATCGACCCAAAATTCATCATTG
UBQ14-F11	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGATTTTTCTATAATATATCGTCTCG
UBQ14-F12	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCTCCGAGTAAAATCGGATAACTATT
UBQ14-F13	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCAGGATCCGAACAGAGTTAAAC
UBQ14-F14	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCATTATCTTCAAAAACCTCCTACAAAATG
UBQ14-F15	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCATGGGTAACGGTTCAATATGATC
UBQ14-F16	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGCTCTAATAACCGGGACGATAG
UBQ14-F17	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGTAAAAGTTACGTGTCAAGCTTTG
UBQ14-F18	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCCTAAGACCTATTCTTCTTCACA
UBQ14-R2	<i>Sal</i> I	CGCGTCGACCTTGATCCCGATTGAGAGATTTGA
UBQ14-R3	<i>Sal</i> I	CGCGTCGACCTGTAATTCACAAAAAACTGAGA
UBQ14-R4	<i>Sal</i> I	CGCGTCGACACCACCACGGAGCCTGAGAAC
UBQ11-F2	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCGCCATTTTCAATATCACGGTCC
UBQ11-F3	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCAGTACCAAAGAGTTGCTTCATG
UBQ11-F4	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGAACTTGATTGGGATCATTTACTG
UBQ11-F5	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCTGAATGTCCACCTGAATCCTTG
UBQ11-F16	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGAATGGGTGAGAGACGAATGCC
UBQ11-F17	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGTGTGATACTGATGTAACTGTG
UBQ11-F18	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGTAGACGCTGCTTGAACTTAAAG

表一. *UBQ10*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 基因之啟動子作一連串刪除使用引子資料表(二)

名稱	限制酵素切點	序列(5'-3')
UBQ11-F19	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCCGAGTCAAATGTGTTGTGTG
UBQ11-F20	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGATTTATCTGCATCAAATGCTTTC
UBQ11-F21	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCACTTGTGAACCTTACACAAAGG
UBQ11-F22	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGACAAACAAAACCCATCTCTTTCAG
UBQ11-F23	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGATCTCATCTAATGGTAATTCAAC
UBQ11-F24	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCAACCTTTCGCGTGTGAACAACGC
UBQ11-R2	<i>Sal</i> I	CGCGTCGACCTTGATCACGGTTGAGAGATTTG
UBQ11-R3	<i>Sal</i> I	CGCGTCGACCTGTTAATCAGAAAAACCGAGA
UBQ10-F2	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCTTCTGGCCCTTAAGTCACAATG
UBQ10-F3	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGAATCGGGATAATGACAGCACAG
UBQ10-F4	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGAGACTTGTTCCACCACTTGATAC
UBQ10-R2	<i>Cla</i> I	CCATCGATCTTGATCACGGTAGAGAGAATTG
UBQ10-R3	<i>Cla</i> I	CCATCGATCTGTTAATCAGAAAACTCAGAT
UBQ10-R4	<i>Cla</i> I	CCATCGATAACCACCACGGAGCCTGAGGA
UBQ10-R5	<i>Cla</i> I	CCATCGATAATCTGCATAACCACCACGGAGCCTGAGGA
UBQ10-F5	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGTGGATTTTATCCTATTTGTAGGTG
UBQ10-F6	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCAGCGATCAAGCTTCTCTTATAAG
UBQ10-F7	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGAAATCTCATTGCAACATCAAATGG
UBQ10-F8	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGGCTCAACAACAACTTTCCATTC
UBQ10-F9	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGAATACAACCTTTAGATCATAATTCTC
UBQ10-F10	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGATACTTTATGTCTTGGATAATTGG
UBQ10-F11	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCATAACACCTTCCCTGTATGATC
UBQ10-F12	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGTGGTGGAGCTTCCCATGTTTC
UBQ10-F13	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCCTTACTAATACCTCATTGGTTCC
UBQ10-F14	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGGACTAAAGCCTCCACATTCTTC
UBQ10-F15	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCATAGCGAACTTATTCAAAGAATG
UBQ10-F16	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGGACCAGGCCCAAATAAGATC
UBQ10-F17	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCACAATATGTTATACGATAAAGAAG
UBQ10-F18	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCACGAAATACGCTTCAATGCAGTG
UBQ10-F19	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCCGTAACGATCGTTAAATCTCAACG
UBQ10-F20	<i>Kpn</i> I	GGGGTACCGCACACACGAGTCGTGTTTATC

表二. RT-PCR實驗所使用的引子資料表

名稱	序列(5'-3')	預測放大序列長度
UBQ14-F1	TTTCGTGAAGACTCTCACTGG	256 bp
UBQ14-R1	ACTTCTTCTGATTCATAACAGAGATAA	
UBQ11-F1	CACTCTTGAAGTTGAGAGCTC	240 bp
UBQ11-R1	ATACATGAACTTGGTTCAGTAACC	
UBQ10-F1	CTTCGTCAAGACTTTGACCG	251 bp
UBQ10-R1	CTTCTTAAGCATAACAGAGACGAG	
UBQ5-F1	GGTGGTGCTAAGAAGAGGAAGA	254 bp
UBQ5-R1	GATCAAGCTTCAACTCCTTCTT	
PP2A F1	GTGGCCAAAATGATGCAATCTC	270 bp
PP2A R1	CAATGGTCACGTACGTGTAAAG	
eIF-1A-1F	GATAATAATGATGATGACTATGTTG	217 bp
eIF-1A-1R	CTTATGCAACAAGAACACCAAG	
CBF2-F1	GACGTGTCCTTATGGAGCTATTA	131 bp
CBF2-R1	CCATTTACATTCGTTTCTCACAAC	

表三. 阿拉伯芥泛素基因之微陣列資料分析

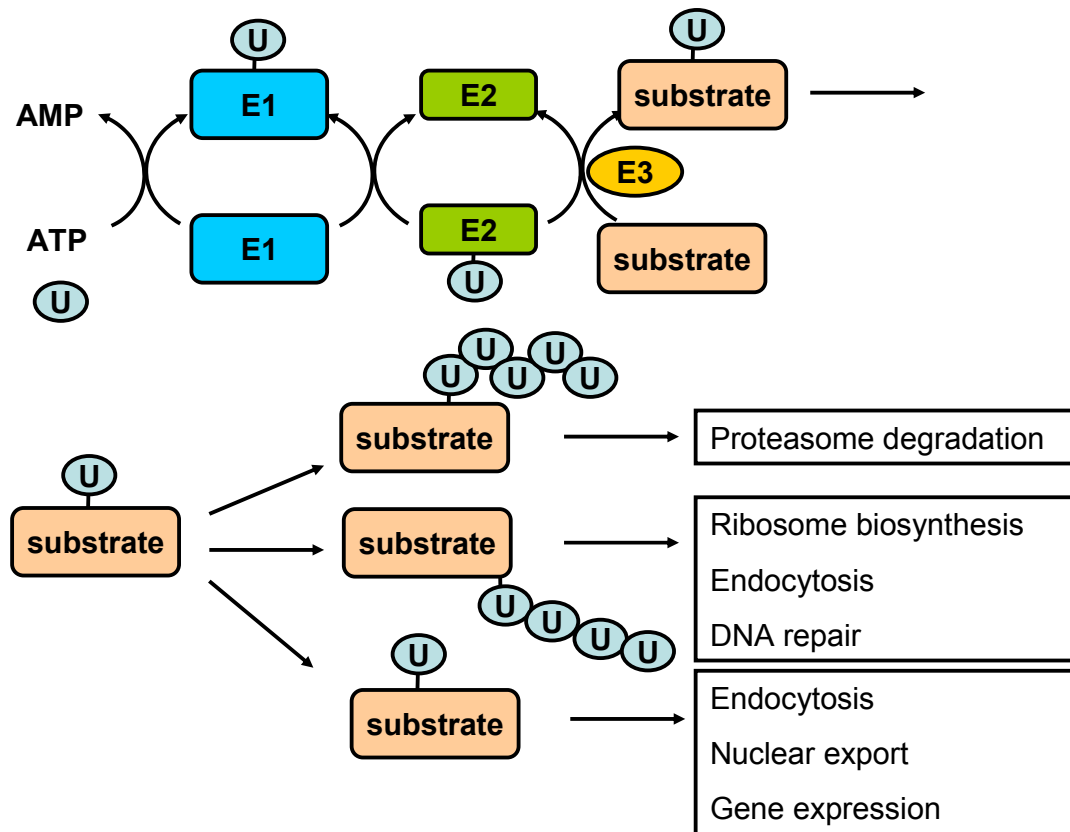
取自於GENEVESTIGATOR資料庫的微陣列資料，可分為在不同突變株(mutant)和接受不同環境處理(stimulus)之後，各基因的表現情況，以1為標準值。將取得的數值計算平均值(mean)以及標準誤(standard error)，平均值愈趨近於1，標準誤愈小，則表示此基因的表現愈穩定。

Name	Accession Number	Mutant Mean \pm Standard Error	Stimulus Mean \pm Standard Error
<i>UBQ3</i>	BAH19791	1.25 \pm 0.09	1.2 \pm 0.06
<i>UBQ4</i>	BAF00213	1.08 \pm 0.024	1.07 \pm 0.023
<i>UBQ10</i>	CAB81074	1.03 \pm 0.014	1.01 \pm 0.012
<i>UBQ11</i>	CAB81047	1.11 \pm 0.04	1.14 \pm 0.03
<i>UBQ14</i>	BAH19554	1.02 \pm 0.02	1.11 \pm 0.025
<i>UBQ1</i>	AAK59652	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.013
<i>UBQ2</i>	AAM15407	1.01 \pm 0.016	0.97 \pm 0.017
<i>UBQ5/UBQ6</i>	BAE98979/AAC34235	1.00 \pm 0.009	1.01 \pm 0.014
<i>UBQ5/6 like</i>	ABD59101	1.15 \pm 0.06	1.02 \pm 0.052

表四. UPE1、UPE2以及UPE3序列在PLACE比對出的已知順式作用元素

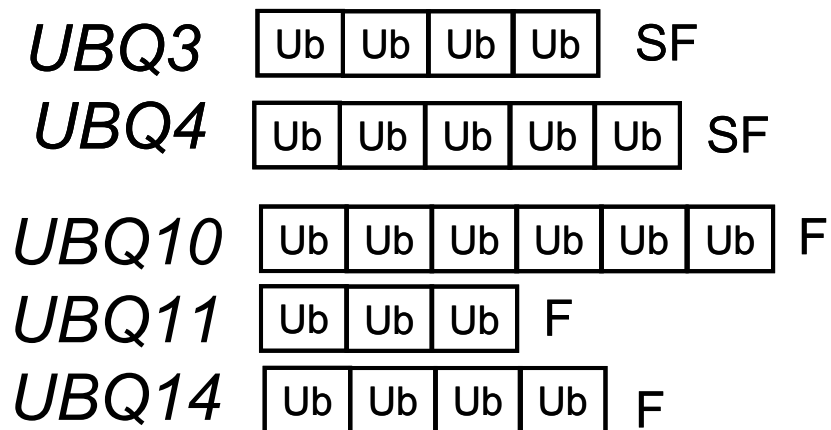
由MEME比對出UBQ10/UBQ11/UBQ14啟動子上的保守序列，再比較PLACE資料庫中已知的順式作用元素序列。

UPE1	Factor or Site Name	Loc.(Str.)	Signal Sequence
	CAATBOX1	7 (-)	CAAT
	CBFHV	35 (+)	RYCGAC
	DOFCOREZM	25 (-)	AAAG
	DRE2COREZMRAB17	35 (+)	ACCGAC
	DRECRTCOREAT	35 (+)	RCCGAC
	GTGANTG10	32 (+)	GTGA
	GTGANTG10	13 (-)	GTGA
	LTRECOREATCOR15	36 (+)	CCGAC
	MYB1AT	2 (-)	WAACCA
	POLLEN1LELAT52	26 (-)	AGAAA
	REALPHALGLHCB21	1 (-)	AACCAA
	RHERPATEXPA7	30 (-)	KCACGW
	WBOXNTERF3	33 (+)	TGACY
	WRKY71OS	33 (+)	TGAC
UPE2	CAATBOX1	9 (+)	CAAT
	DOFCOREZM	26 (-)	AAAG
	SEF4MOTIFGM7S	17 (-)	RTTTTTR
	TATABOX5	1 (-)	TTATTT
	TBOXATGAPB	25 (+)	ACTTTG
UPE3	ASF1MOTIFCAMV	4 (-)	TGACG
	CACTFTPPCA1	10 (-)	YACT
	DOFCOREZM	8 (+)	AAAG
	TBOXATGAPB	7 (-)	ACTTTG
	WBOXATNPR1	5 (-)	TTGAC
	WRKY71OS	5 (-)	TGAC



圖一. 泛素化機制

泛素蛋白質上的甘胺酸會與泛素活化酵素(E1)的半胱胺酸結合，使泛素活化，泛素結合酵素(E2)會取代 E1 和泛素結合，泛素聯結酵素(E3)會和有與泛素鍵結的 E2 結合使泛素鍵結到蛋白受質(substrate)上。參與在不同生理反應的受質常鍵結不同種形式的 Ub 或是 Ub 鏈。Ⓢ 表示為 Ub protein。

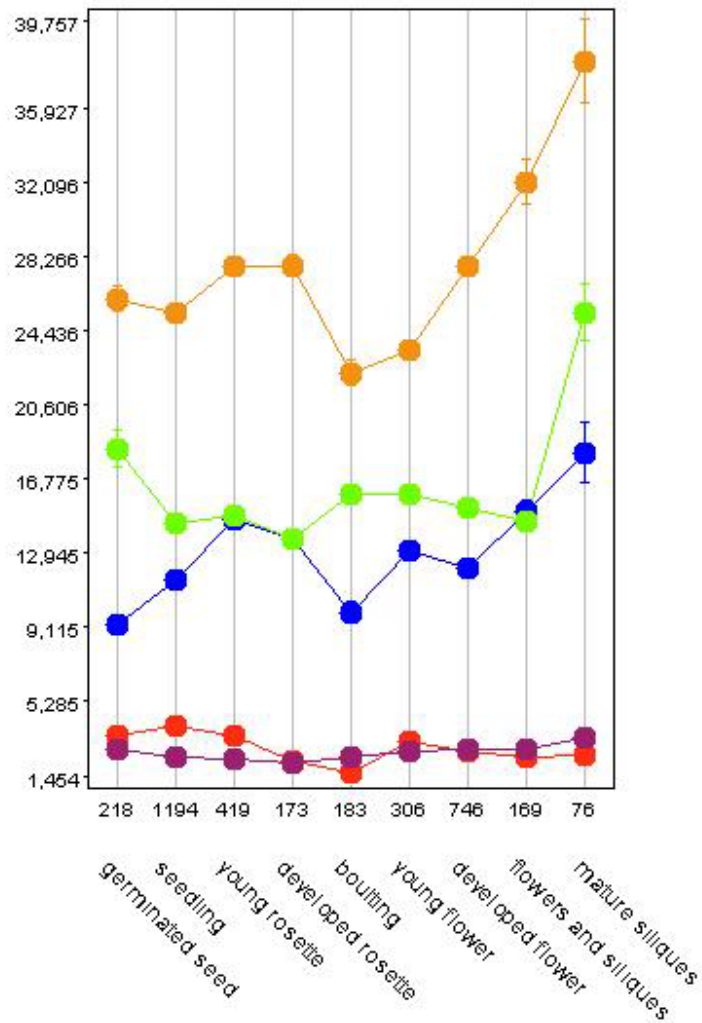


圖二. 阿拉伯芥聚泛素基因之結構

阿拉伯芥中共有五個聚泛素基因，聚泛素基因根據其延伸的胺基酸可分為兩群，*UBQ3/UBQ4* 延伸胺基酸為絲胺酸和苯丙胺酸為第一群，*UBQ10/UBQ11/UBQ14* 延伸胺基酸為苯丙胺酸為第二群。

Ub

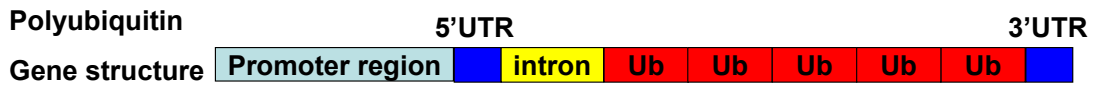
表示為 ubiquitin coding sequence、S 為絲胺酸(serine)、F 為苯丙胺酸(phenylalanine)。



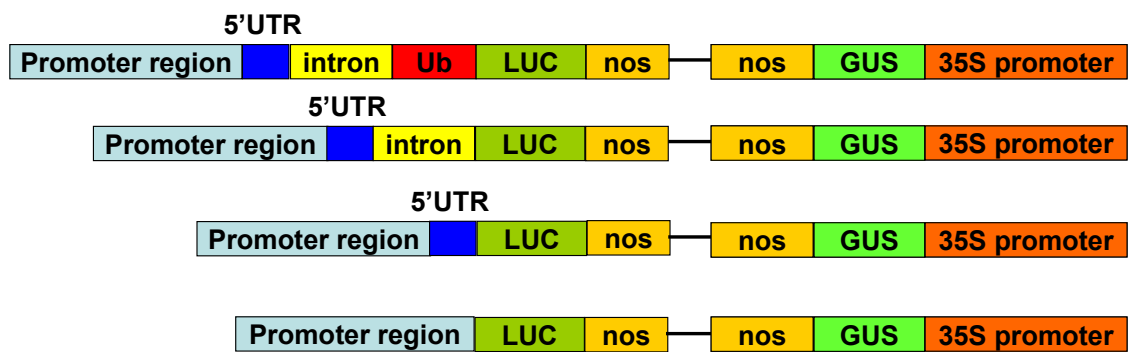
圖三. *UBQ11*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 的基因表現

由 GENEVESTIGATOR 網站所得之資料，在阿拉伯芥中的每個生長時期，都以 *UBQ10* 的基因表現量為最高。圖示 *UBQ3*(●)、*UBQ4*(●)、*UBQ10*(●)、*UBQ11*(●)and *UBQ14*(●)。

A

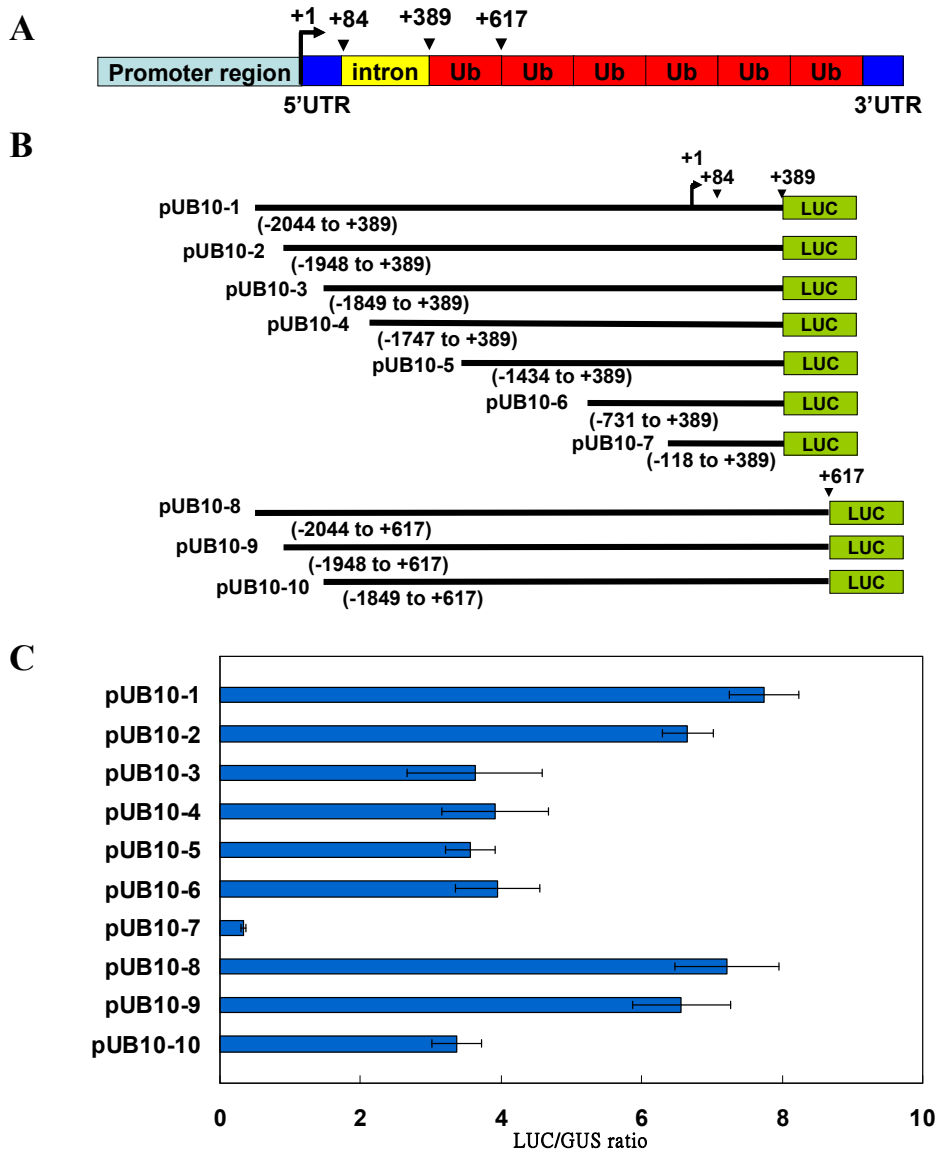


B



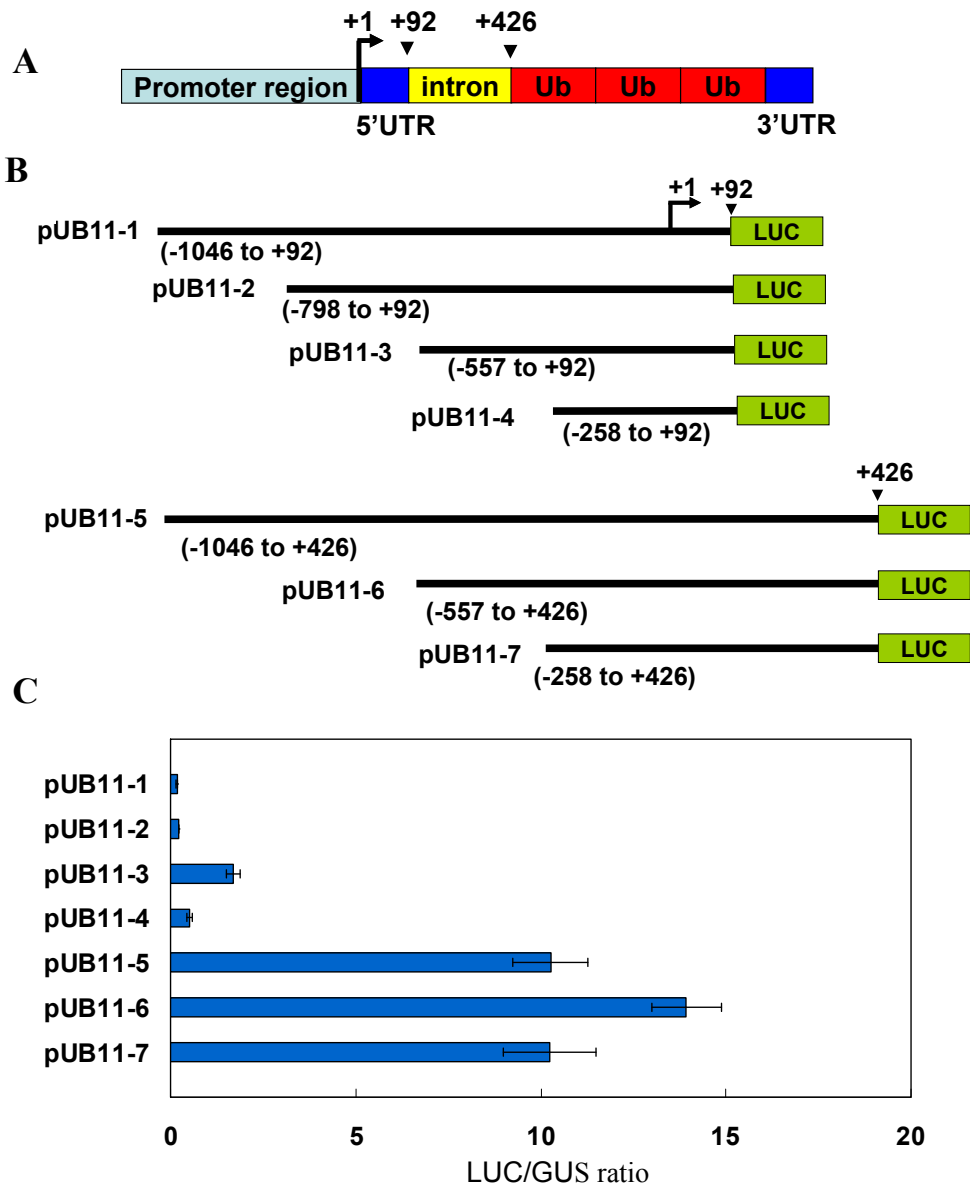
圖四. 聚泛素基因的基因結構以及不同組合的調節序列質體構築構築

- A. 聚泛素基因的共同結構次序是啟動子序列，5'端非轉譯區，唯一的內插子，以及緊接在內插子後的 Ub 編碼序列(coding sequence)。
- B. 組合上游序列的不同區段，並接上 LUC 報導基因。在同一質體內亦含有 CaMV 35S 啟動子所驅動的 GUS 作為控制組。



圖五. *UBQ10* 啟動子刪減之活性分析

- A. 圖示 *UBQ10* 基因結構。+1 代表轉錄起始點。
- B. 圖示構築不同長度的上游序列，後面接上 LUC 報導基因，LUC 之後的序列構築如圖四 B。pUB10-1 到 pUB10-7 為不同長度啟動子序列加上 5'端非轉譯區以及內插子序列，pUB10-8 到 pUB10-10 為不同長度啟動子序列加上 5'端非轉譯區、內插子序列以及一個 Ub 編碼序列。
- C. *UBQ10* 啟動子活性分析，計算 LUC/GUS 比值與標準誤差(standard error)，其中以 GUS 活性為控制組。每次實驗均重複三次。

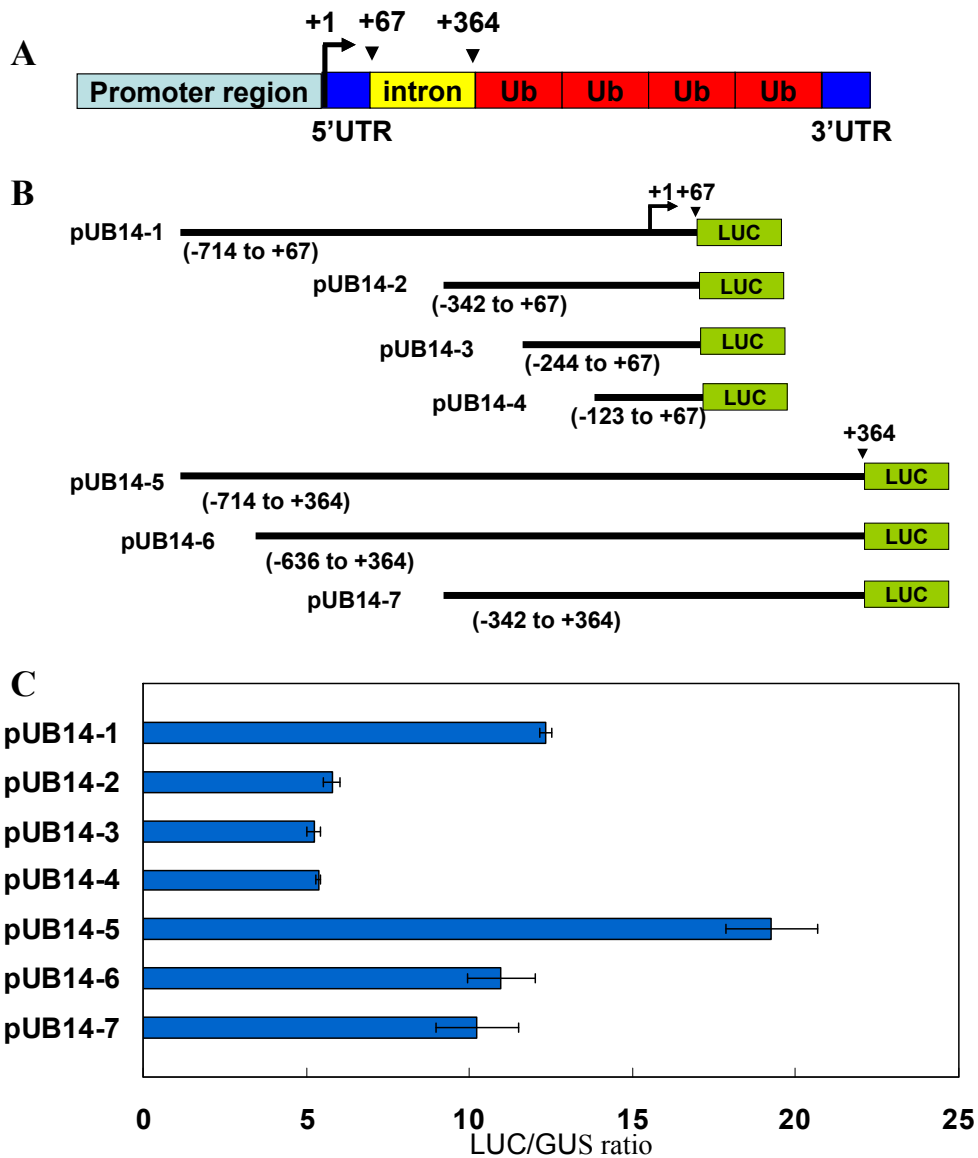


圖六. *UBQ11* 啟動子刪減之活性分析

A. 圖示 *UBQ11* 基因結構。+1 代表轉錄起始點。

B. 圖示構築不同長度的上游序列，後面接上 LUC 報導基因，LUC 之後的序列構築如圖四 B。pUB11-1 到 pUB11-4 為不同長度啟動子序列加上 5'端非轉譯區，pUB11-5 到 pUB11-7 為不同長度啟動子序列加上 5'端非轉譯區和內插子序列。

C. *UBQ11* 啟動子活性分析，計算 LUC/GUS 比值與標準誤差，其中以 GUS 活性為控制組。每次實驗均重複三次。



圖七. *UBQ14* 啟動子刪減之活性分析

A. 圖示 *UBQ14* 基因結構。+1 代表轉錄起始點。

B. 圖示構築不同長度的上游序列，後面接上 LUC 報導基因，LUC 之後的序列構築如圖四 B。pUB14-1 到 pUB14-4 為不同長度啟動子序列加上 5'端非轉譯區，pUB14-5 到 pUB14-7 為不同長度啟動子序列加上 5'端非轉譯區和內插子序列。

C. *UBQ14* 啟動子活性分析，計算 LUC/GUS 比值與標準誤差，其中以 GUS 活性為控制組。每次實驗均重複三次。

A

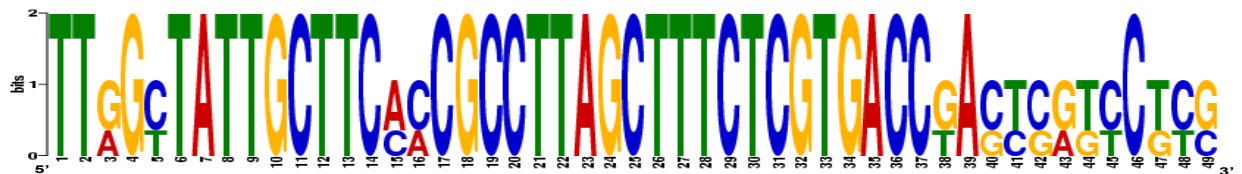
UPE1 : TTGGTTATTGCTTCACCGCCTTAGCTTTCTCGTGACCGACTCGTCCTCG

UBQ14 TGG TTGGTTATTGCTTCACCGCCTTAGCTTTCTCGTGACCGACTCGTCCTCG TCT

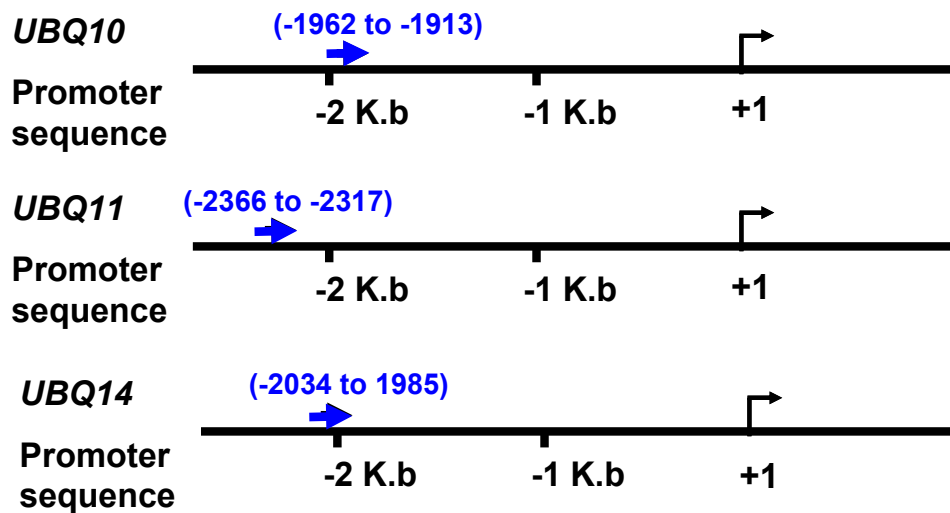
UBQ10 TTA TTAGCTATTGCTTCACCGCCTTAGCTTTCTCGTGACCTAGTCGTCTCG TCT

UBQ11 TAA TTGGCTATTGCTTCCACGCCTTAGCTTTCTCGTGACCGACCGAGTCGTC CTC

B



C



圖八. *UBQ10*, *UBQ11* 和 *UBQ14* 啟動子調控序列 1(UPE1)之序列及其相似度和位置

A. MEME比對出的UPE1序列。

B. 使用Weblogo排出UPE1的相似度，字形越大代表越保守。

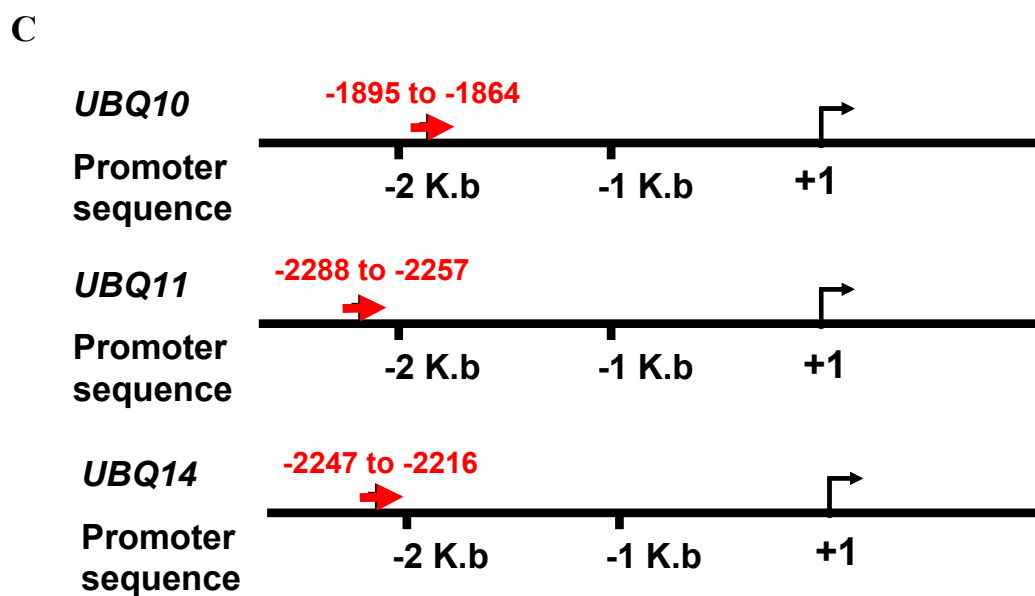
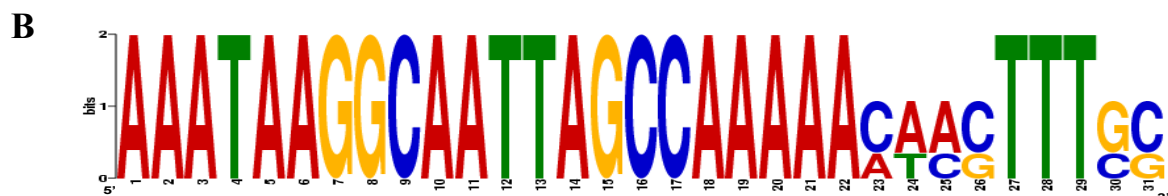
C. UPE1在*UBQ10*, *UBQ11*和*UBQ14*中的相對位置。

A UPE2 : **AAATAAGGCAATTAGCCAAAAACAAC**TTTGC

UBQ11 TAA **AAATAAGGCAATTAGCCAAAAACAAC**TTTGC GTGTGAACAA

UBQ10 TAA **AAATAAGGCAATTAGCCAAAAACAAC**TTTGC GTGTAAACAA

UBQ14 ATC **AAATAAGGCAATTAGCCAAAAAATCG**TTTTCG TGTA AAAAGTT



圖九. *UBQ10*, *UBQ11* 和 *UBQ14* 啟動子調控序列 2(UPE2)之序列及其相似度和位置

A. MEME比對出的UPE2序列。

B. 使用Weblogo排出UPE2的相似度，字形越大代表越保守。

C. UPE2在*UBQ10*, *UBQ11*和*UBQ14*中的相對位置。

A

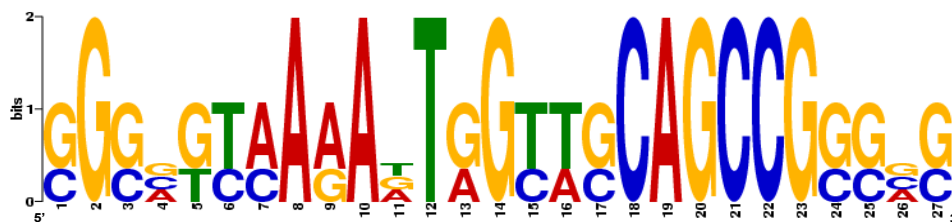
UPE3 : **CGGCGTCAAAGTGGTTGCAGCCGGCAC**

UBQ10 CAGTAATAAA **CGGCGTCAAAGTGGTTGCAGCCGGCAC** ACACGAGTCG

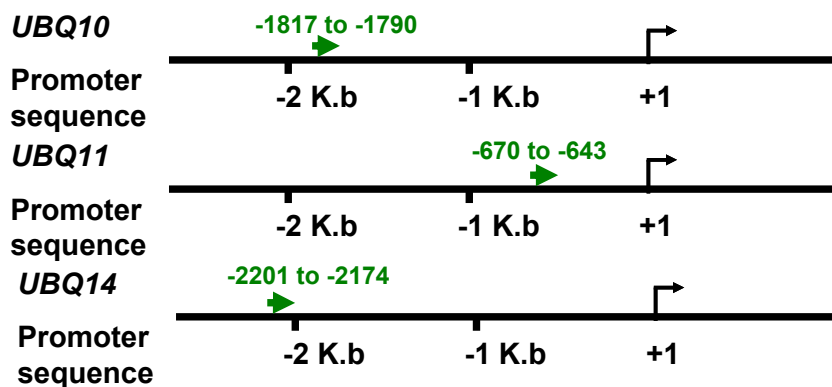
UBQ14 AGAAATAAAC **GGCGTTAAAATTGGTTGCAGCCGGCGGG** CACACGGATC

UBQ11 TTTCTTCCCC **GGGAGCAAGAATAGCACCAGCCGGGGCG** CATGAAGCAA

B



C



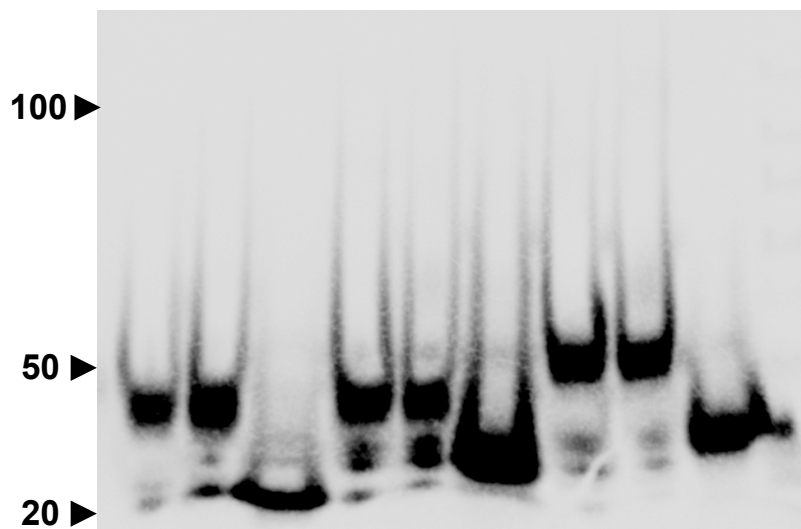
圖十. *UBQ10*, *UBQ11* 和 *UBQ14* 啟動子調控序列 3(UPE3)之序列及其相似度和位置

A. MEME比對出的UPE3序列。

B. 使用Weblogo排出UPE3的相似度，字形越大代表越保守。

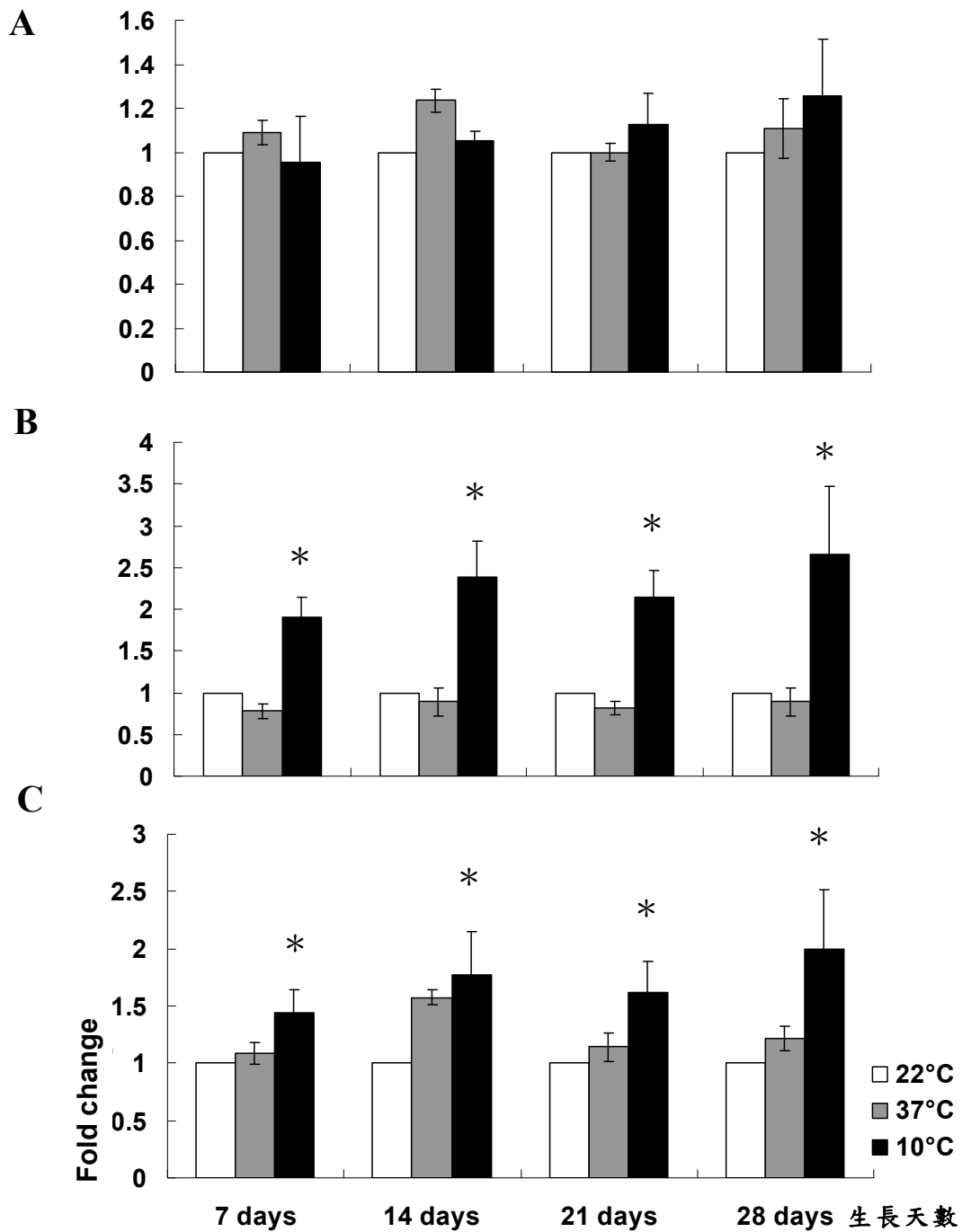
C. UPE3在*UBQ10*, *UBQ11*和*UBQ14*中的相對位置。

20 fmol labeled dsDNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 μg polydI-dC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 μg total protein	-	+	-	-	+	-	-	+	-
2 μg BSA	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	UPE3			UPE2			UPE1		



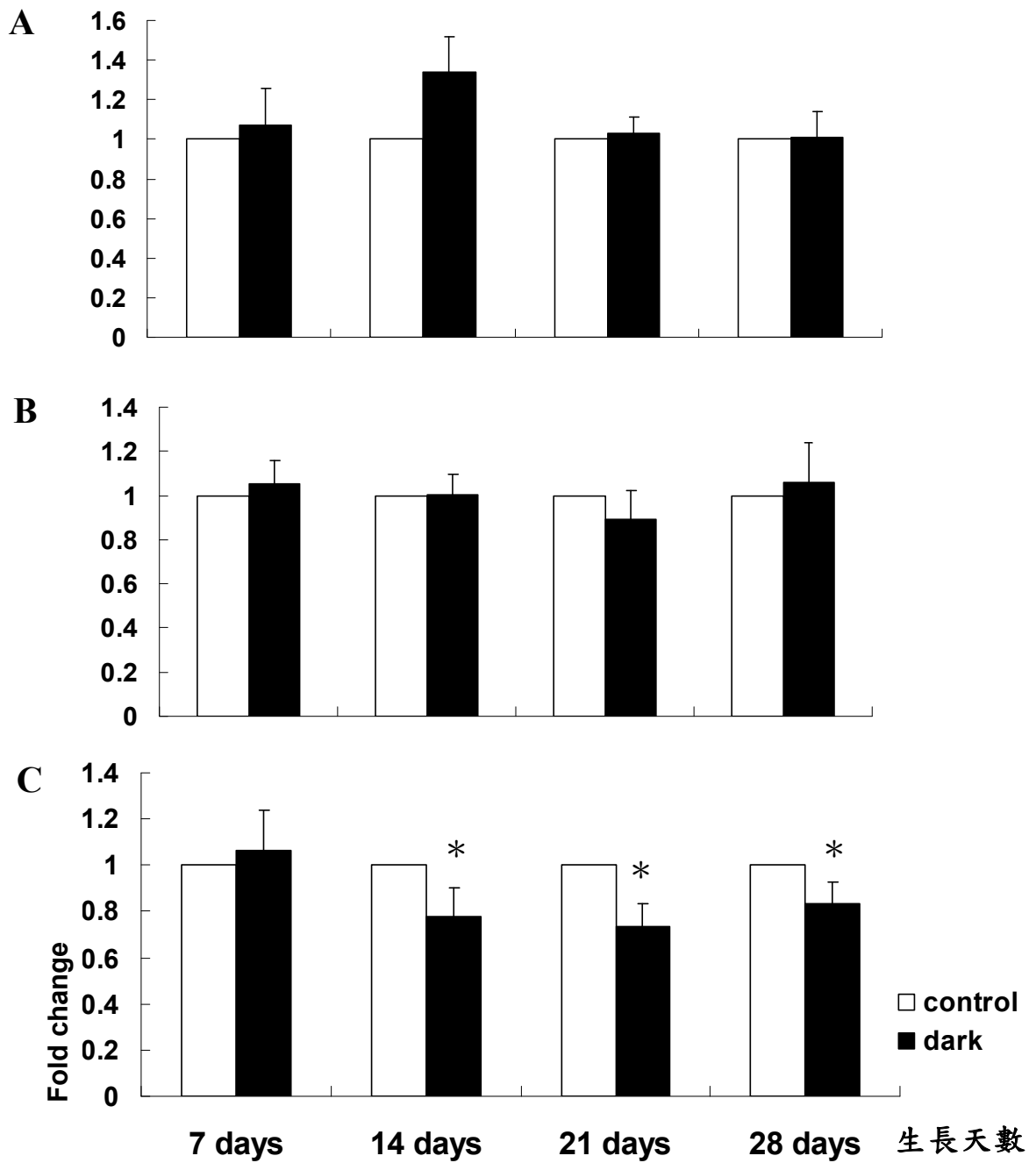
圖十一.啟動子序列與總蛋白質之交互作用

總蛋白質抽取自 20 天齡的阿拉伯芥植株。左側數字為 DNA marker。UPE1、UPE2 和 UPE3 皆使用 poly dI:dC 去除非專一性結合。



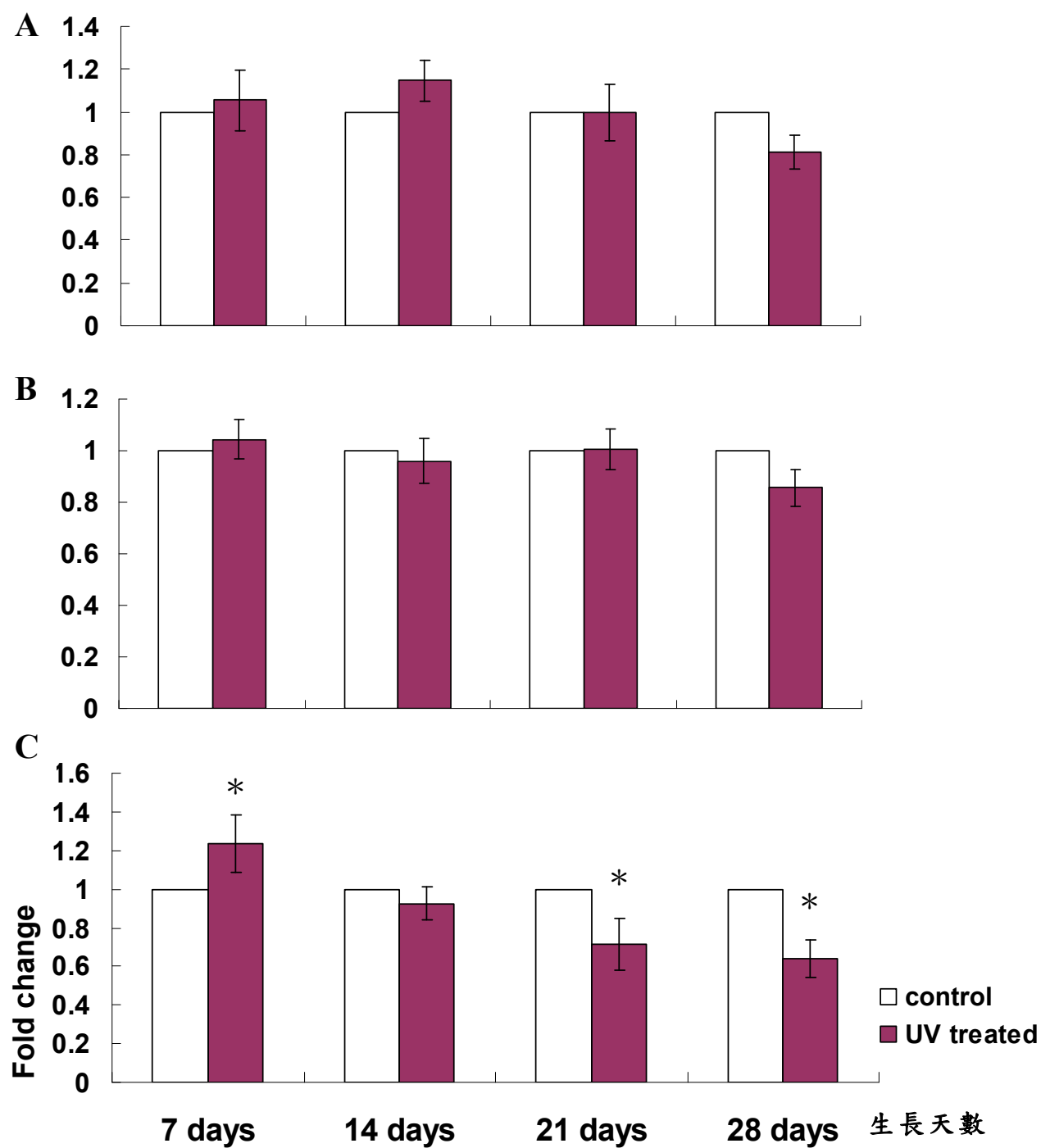
圖十二. 溫度對 *UBQ10*(A)、*UBQ11*(B)和 *UBQ14*(C)基因的基因表現情形

以 RT-PCR 分析阿拉伯芥植株在不同天齡以不同溫度處理後，各基因的基因表現量。數據分析以 22°C 作為對照組，*UBQ5* 作為內部控制組(internal control)，每組實驗均重複三次。*為顯著差異($P < 0.05$)。



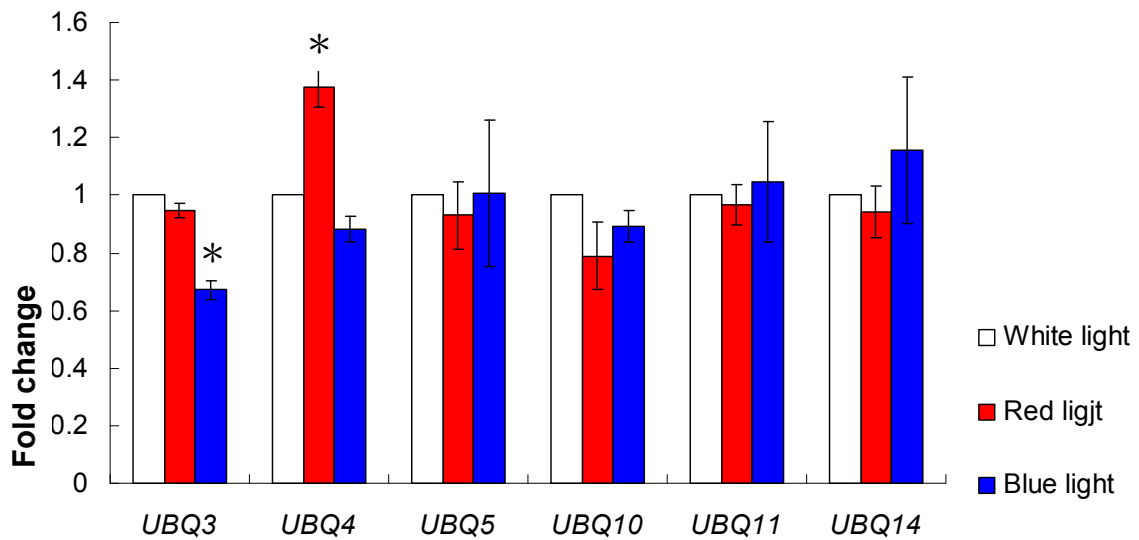
圖十三. 黑暗對 *UBQ10*(A)、*UBQ11*(B)和 *UBQ14*(C)基因的基因表現情形

以 RT-PCR 分析阿拉伯芥植株在不同天齡以黑暗處理 24 小時後，各基因的基因表現量。數據分析以白光作為對照組，*UBQ5* 作為內部控制組，每組實驗均重複三次。* 為顯著差異 ($P < 0.05$)。



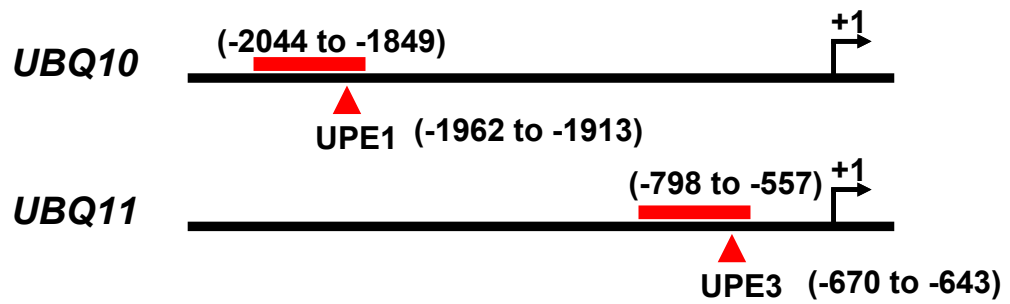
圖十四. 紫外光對 *UBQ10*(A)、*UBQ11*(B)和 *UBQ14*(C)基因的基因表現情形

以 RT-PCR 分析阿拉伯芥植株在不同天齡以紫外光處理二小時後，各基因的基因表現量。數據分析以 22°C 作為對照組，*UBQ5* 作為內部控制組，每組實驗均重複三次。*為顯著差異($P < 0.05$)。



圖十五. 紅光與藍光對 *UBQ10*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 基因的表現

以 RT-PCR 分析 4 天齡的阿拉伯芥白化苗植株以紅光和藍光處理 24 小時後，各泛素基因的基因表現量。數據分析以白光作為對照組，*PP2A* 作為內部控制組；*UBQ3* 以及 *UBQ4* 作為正控制組，每組實驗均重複三次。* 為顯著差異 ($P < 0.05$)。



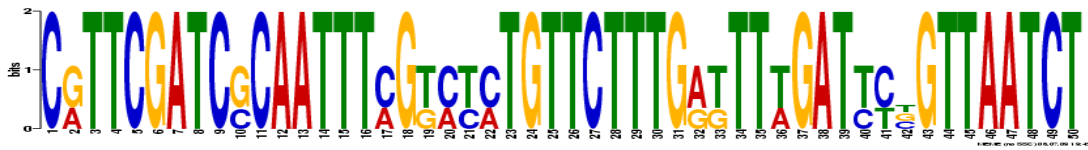
附圖一. *UBQ10* 以及 *UBQ11* 基因之調控序列

此二基因啟動子序列上可能之調控片段，黑線表啟動子序列，黑線上之紅線表以基因槍實驗所得之可能調控序列，黑線下之紅色箭號表以 MEME 分析軟體分析之啟動子保守序列相對位置。

A.

Name	Motifs
UBQ14	
UBQ11	
UBQ10	
SCALE	 1 25 50 75 100 125 150 175 200 225 250 275 300 325

B.



C.



D.



附圖二. *UBQ10*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 基因之內插子序列比對

將此三基因之內插子序列以 MEME 軟體分析，A 圖為序列相對位置，B 為 motif 1 的序列相似度；C 為 motif 2 的序列相似度；D 為 motif 3 的序列相似度。

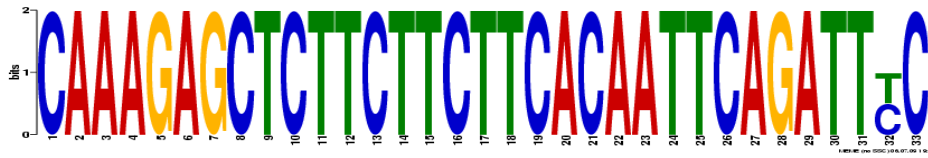
A.

Name	Motifs								
UBQ14									
UBQ11									
UBQ10									
SCALE	<table border="0"> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>25</td> <td>50</td> <td>75</td> </tr> </table>					1	25	50	75
1	25	50	75						

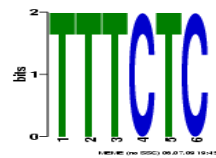
B.



C.



D.



附圖三. *UBQ10*、*UBQ11* 和 *UBQ14* 基因之 5'端非轉譯區序列比對

將此三基因之 5'端非轉譯區序列以 MEME 軟體分析，A 圖為序列相對位置，B 為 motif 1 的序列相似度；C 為 motif 2 的序列相似度；D 為 motif 3 的序列相似度。