

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
縮寫表.....	3
緒論.....	4
材料與方法.....	8
實驗結果.....	13
分析與討論.....	18
參考文獻.....	21
表格與圖片.....	27
表一 專一引子對序列資料.....	27
表二 <i>UBQ3</i> 與 <i>UBQ4</i> 轉植株之 GUS 定量結果.....	28
表三 阿拉伯芥聚泛素基因序列之相似片段數目.....	29
表四 <i>UBQ3</i> 與 <i>UBQ4</i> 內插子之相異序列.....	30
表五 <i>UBQ3</i> 與 <i>UBQ4</i> 內插子序列之強化訊息分析.....	31
表六 聚泛素基因表現之微陣列資料分析.....	32
圖一 泛素化作用機制.....	33
圖二 阿拉伯芥聚泛素基因與泛素延伸基因之結構.....	34
圖三 <i>UBQ3</i> 啟動子連接不同組合五端未轉譯區域/內插子之構築序列... ..	35
圖四 <i>UBQ4</i> 啟動子連接不同組合五端未轉譯區域/內插子之構築序列... ..	36
圖五 比對阿拉伯芥聚泛素基因之五端未轉譯區域序列.....	37
圖六 內插子調控序列 UIE1 之序列資訊、相似度與位置.....	38
圖七 內插子調控序列 UIE2 之序列資訊、相似度與位置.....	39
圖八 內插子調控序列 UIE3 之序列資訊、相似度與位置.....	40
圖九 內插子序列與總蛋白質之交互作用結果.....	41
圖十 UIE1 之總蛋白質競爭實驗結果.....	42
圖十一 UIE2 之總蛋白質競爭實驗結果.....	43
圖十二 UIE3 之總蛋白質競爭實驗結果.....	44
圖十三 溫度對阿拉伯芥 <i>UBQ3</i> 和 <i>UBQ4</i> 基因表現的影響.....	45
圖十四 藍光與紅光對 <i>UBQ3</i> 和 <i>UBQ4</i> 基因表現的影響.....	46
圖十五 黑暗處理對 <i>UBQ3</i> 和 <i>UBQ4</i> 基因表現的影響.....	47
圖十六 紫外線(UV-B)處理對 <i>UBQ3</i> 和 <i>UBQ4</i> 基因表現的影響.....	48
附錄一 阿拉伯芥泛素基因家族.....	49
附錄二 14 天齡含 U3.1、U3.2 或 U3.3 序列的不同品系轉植株之 GUS 染色結果	50
附錄三 14 天齡含 U4.1、U4.4 或 U4.5 序列的不同品系轉植株之 GUS 染色結果	51
附錄四 14 天齡含 U4.2、U4.3 或 U4.6 序列的不同品系轉植株之 GUS 染色結果	52

摘要

泛素(ubiquitin)是普遍存在於真核生物體中的小型蛋白質。在不同的生物體中，其序列與結構皆有高度的保守性，是調控許多訊息傳遞功能的重要蛋白質。阿拉伯芥含有許多種類的泛素基因，其中一種為聚泛素基因(polyubiquitin genes)。阿拉伯芥共有五個聚泛素基因，分別為 *UBQ3*、*UBQ4*、*UBQ10*、*UBQ11* 與 *UBQ14*。而 *UBQ3* 與 *UBQ4* 是旁系同源的聚泛素基因，但是在發育過程中卻有不同的基因表現方式。因此本實驗以研究 *UBQ3* 與 *UBQ4* 的組織表現差異與找尋調控基因表現因子、調控序列為研究目標。從轉殖植物偵測報導基因(GUS)的活性，發現 *UBQ3* 與 *UBQ4* 在營養器官的表現位置沒有明顯不同，但是在花朵內卻有顯著的表現差異，這代表在生殖生長階段，*UBQ3* 與 *UBQ4* 的表現是受不同的途徑調控。另外，更詳細地分析轉殖植物的報導基因表現後，發現內插子序列是調節 *UBQ3* 與 *UBQ4* 基因表現量最主要的因素：它會增強 *UBQ3* 的表現量，卻抑制 *UBQ4* 的表現。但序列分析及電泳膠遲緩實驗亦證明 *UBQ3* 及 *UBQ4* 的內插子序列仍共享二條順式作用序列。最後藉由給予阿拉伯芥不同光線與溫度的環境刺激，發現只有 *UBQ3* 的基因表現量會因紅光、藍光、黑暗與紫外線的刺激而增加，而 *UBQ4* 的基因表現量並不受光線或溫度的刺激而改變，表示 *UBQ3* 的表現會受光線所調控，*UBQ4* 則否。綜合以上結果，在不同發育時期或在不同環境因子下生長，影響 *UBQ3* 與 *UBQ4* 基因表現差異的主要因素是轉錄調節。

Abstract

Ubiquitin is a small protein existing in all eukaryotes with a conserved sequence and structure. It has been found to play important roles in controlling cellular signal transduction. In Arabidopsis, ubiquitins are primarily encoded by five polyubiquitin genes, including *UBQ3*, *UBQ4*, *UBQ10*, *UBQ11*, and *UBQ14*. *UBQ3* and *UBQ4* are the paralogous polyubiquitin genes, however, they express differentially through various developmental stages. Thus, in this study, we first investigated the spatial expression profile of *UBQ3* and *UBQ4*, and the regulatory mechanisms of gene expression. GUS activity assay in transgenic plants revealed that *UBQ3* and *UBQ4* were expressed at the same locations in vegetative tissues, but the expression patterns varied in reproductive tissues. Therefore, we suggest that *UBQ3* and *UBQ4* are differentially expressed in reproductive tissues due to different regulatory pathways. Further studies indicated that intron sequence play an important role in regulating the expression of *UBQ3* and *UBQ4* in *planta*: it enhances the transcript level of *UBQ3*, but represses that of *UBQ4*. Nevertheless, sequence analyses and EMSA experiments revealed that intron sequences of *UBQ3* and *UBQ4* still share two conserved cis-acting elements. Finally, Arabidopsis seedlings were treated under different light wavelength and temperature conditions. We found that *UBQ3* increases transcript levels in dark, red light, blue light, and ultraviolet rays, but *UBQ4* remains similar transcript levels under these treatments. In conclusion, the differential expression of *UBQ3* and *UBQ4* is predominantly regulated at the transcriptional levels during reproductive development and under various environmental factors, such as light and temperature.

縮寫表

aa	Amino acid
bp	Base pair
β-ME	β-Mercaptoethanol
DNase I	Deoxyribonuclease I
dsDNA	Double strand deoxyribonucleic acid
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
<i>GLP3</i>	<i>Germin-like protein 3</i>
GUS	Beta-glucuronidase
HY5	Hypocotyl 5
HYH	HY5 homolog
KCl	Potassium chloride
MS medium	Murashige and Skoog medium
NaCl	Sodium chloride
Na ₂ CO ₃	Sodium carbonate
RNase inhibitor	<i>Ribonuclease inhibitor</i>
<i>RPL40</i>	<i>60S ribosomal protein L40</i>
<i>RPS27</i>	<i>40S ribosomal protein S27</i>
TBE	Tris-borate/EDTA
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
TRIzol	TRI Reagent
Tween 20	Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate
Ub	Ubiquitin
<i>UBQ</i>	Ubiquitin gene
UV-A and B	Ultraviolet radiation A and B

緒論

細胞內的蛋白質在合成後，需要接受不同的轉譯後修飾作用(post-translational modifications)，才具有生物活性，進而影響生物體的生理及發育過程。二十世紀後期，許多蛋白質的共價修飾機制已被廣泛研究，例如甲基化作用(methylation)、磷酸化作用(phosphorylation)、乙醯化作用(acetylation)，或是醣化作用(glycosylation)。自1942年開始，蛋白質降解作用開始被關注後，在多方的研究下，一種新的修飾機制—泛素化作用(ubiquitylation)被學者發現並逐漸受到重視。泛素(ubiquitin，簡稱Ub)是1974年自胸腺生長素(thymopoietin)中被分離出來(Goldstein, 1974)，之後的研究指出泛素會普遍存在於真核生物體內的所有細胞中，因而得名(Schlessinger, *et al.*, 1975)。而泛素化的作用機制直到1983年，由Hershko、Ciechanover和Rose等三人發現了催化泛素化的三類酵素，泛素激活酵素(Ub-activating enzyme, E1)、泛素接合酵素(Ub-conjugating enzyme, E2)和泛素連接酶(Ub protein ligase, E3)，才有了突破性的發展(Hershko *et al.*, 1983)。

泛素是由76個胺基酸所組成的小分子蛋白質，在高溫的環境下非常穩定(heat-stable)，且其胺基酸序列具有高度的保守性。因泛素在真核生物中(例如動物、植物、酵母菌)，最多只有三個胺基酸的差別(Catic and Ploegh, 2005)，且所有植物細胞內的泛素分子序列皆相同(Callis *et al.*, 1995)，由此特性可推測泛素在細胞內扮演極重要的角色。另外，泛素結構中的兩種胺基酸對泛素作用機制有主要的影響，分別為甘胺酸(glycine, Gly)和離胺酸(lysine, Lys)。位於泛素羧基端(C-terminus)第76位置的甘胺酸，會與將被泛素化的目標蛋白(target protein)或另一個泛素之離胺酸，做共價結合反應(covalent binding)，以進行泛素化作用。而泛素共包含七個離胺酸，分別位於第6、11、27、29、33、48與63的位置，當Gly76與另一個泛素的離胺酸做鍵結時，若與不同位置的離胺酸鍵結，將會形成不同形式的泛素長鏈(ubiquitin chain)，使被泛素化的目標蛋白在細胞中有不同的命運(Chau *et al.*, 1989, Galan and Haguenaer-Tsapis, 1997)。

蛋白質泛素化修飾的機制，是由三類酵素所執行(圖一)。首先，一個泛素分子會經由ATP提供能量，共價鍵結至E1的半胱胺酸(cysteine, Cys)上，經由此動作，會使泛素分子活化，才得以進行泛素化修飾；接著，E1會將此泛素轉鍵結至E2的Cys硫原子上，而E2的功能是催化泛素分子與蛋白受質之間的泛素化修飾作

用；最後，E2會經由具專一性的E3提供間接或直接的協助，將泛素上的Gly76用共價鍵結的方式，連接至蛋白受質(substrate)的Lys上。此泛素化反應可重複進行數次，使下一個泛素分子可加到受質的其他Lys上，或是加到前一個泛素分子的Lys上，形成泛素長鏈。若泛素長鏈的形成方式，是由泛素的Gly76共價鍵結至前一個泛素的Lys48位置，長鏈會呈現鋸齒般的形狀，則此受質會被送至26S蛋白酶體(26S proteasome)進行降解反應(proteolysis, Chau *et al.*, 1989, Finley *et al.*, 1994, Glickman and Ciechanover, 2002)；但若是共價鍵結至Lys63的位置，長鏈則為直線形，而此泛素化受質可參與調控其他生物功能，例如植物頂端優勢(Apical dominance, Yin *et al.*, 2007)、哺乳動物的核酸修復(DNA repair, Hoegge *et al.*, 2002)、胞噬作用(endocytosis, Galan and Haguenaer-Tsapis, 1997)與各類細胞信息傳遞(signal transduction, Fisk and Yaffe, 1999)等。另外，若泛素分子鍵結至其他位置的lysine上，目前對此未能確切了解其參與之功能，仍待繼續研究釐清。而已被泛素化的受質，亦可經由泛素專一酵素(ubiquitin-specific proteases)的作用，進行去泛素反應(deubiquitylation)，並回收泛素以重複使用(Finley and Chau, 1991, Hershko and ciechanover, 1992)。

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)、植物荷爾蒙作用(del Pozo *et al.*, 1998, Gray *et al.*, 1999, Schwechheimer *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2002, Yin *et al.* 2007)、結構錯誤蛋白質的降解(degradation of abnormal protein, Hershko *et al.*, 1984)、生物時鐘(biological clock, Patton *et al.*, 1998)、花的發育(flower development, Ni *et al.*, 2004, Chae *et al.*, 2008)、自交不親合性(self-incompatibility, Lai *et al.*, 2002)、抗病機制(disease resistance, Tornero *et al.*, 2002)、細胞週期(cell cycles, Bai *et al.*, 1996)與概日韻律(circadian rhythm, Imaizumi *et al.*, 2003)。第一個被證明為泛素受質的植物蛋白質是光敏素(phytochrome, Shanklin *et al.*, 1987)，當光敏素(尤其是PhyA)收到紅光訊息而活化，會立即啟動細胞內的信息傳遞途徑，引發各種生理反應。而活化後的光敏素將在短時間內被泛素鍵結，再送到26S蛋白酶體中進行降解。而後有研究者再進一步發現，和光敏素有關的兩個重要轉錄因子HY5 (hypocotyl 5)與HYH (HY5 homolog)會受泛素調控其作用機制(Osterlund *et al.*, 2000)。植物生長素(auxin)等植物荷爾蒙亦在近年內，由不同的實驗室闡明其活性會受到泛素影響(del Pozo *et al.*, 1998,

Schwechheimer *et al.*, 2001, Yin *et al.*, 2007)。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)，亦被證明在細胞內的數量會受到泛素調節(Imaizumi *et al.*, 2003)。

聚泛素基因(polyubiquitin genes)與泛素延伸基因(ubiquitin extension genes)是泛素基因家族其中的兩類(Özkaynak *et al.*, 1984)，而聚泛素基因是細胞內泛素的主要提供者(supplier)。聚泛素基因是由數個泛素編碼序列(Ub coding sequence，一條泛素編碼序列是228 bp)以兩兩相接的方式組合而成。當此基因被轉錄並轉譯後，會形成一條由數個泛素連接而成的多胜肽(polypeptide)，再由泛素水解酵素(Ub hydrolase)切割出數個由76個胺基酸所組成的成熟泛素(mature Ub)。而泛素延伸基因則是由單一泛素編碼序列加上一個可轉錄轉譯出核糖蛋白(ribosomal protein)的序列所組成。待轉譯完成後，再藉由泛素水解酵素切割分開。所產生的核糖蛋白可能為52或是81個胺基酸，生合成後將分別送往核糖體之不同次單位(subunit)內作用。

在阿拉伯芥基因體中，有五種聚泛素基因及四種泛素延伸基因(Burke *et al.*, 1988, Callis *et al.*, 1990，見圖二)調控泛素分子蛋白之生合成。依演化造成的不同序列特徵，泛素延伸基因可分成二類，分別為*UBQ1/UBQ2* (AT3G52590/AT2G36170)及*UBQ5/UBQ6/UBQ5/6 like* (AT3G62250/AT2G47110/AT1G23410)，而聚泛素基因也可分為二類：一類為*UBQ3/UBQ4* (AT5G03240/AT5G20620)，另一類為*UBQ10/UBQ11/ UBQ14* (AT4G05320/AT4G05050/AT4G02890)。聚泛素基因分類的特徵是各基因所生成之泛素，其羧基端會帶有不同的胺基酸，*UBQ3/UBQ4*接有絲胺酸(serine, Ser)和苯基丙胺酸(Phenylalanine, Phe)，而另一類只接有苯基丙胺酸(Phenylalanine, Phe)。此五種聚泛素基因各自具有不同數量的重覆泛素編碼序列，*UBQ3*與*UBQ14*各有四組重複，*UBQ4*有五組，*UBQ10*最多，有六組，而*UBQ11*最少，只有三組。

聚泛素基因*UBQ3*和*UBQ4*都位於阿拉伯芥的第五對染色體上，而且他們具有相似的基因結構且生成之泛素羧基端有相同的胺基酸(圖二)，但這二者的基因表現模式卻不相同。從研究結果中發現，在六周齡的阿拉伯芥中，*UBQ3*的整體表

現量高於*UBQ4*數倍(Sun and Callis, 1997)。進一步以植物組織分析，發現*UBQ3*和*UBQ4*在組織內的表現比例也不相同；*UBQ3*在營養組織中的表現量皆高，但在生殖組織中較低；而*UBQ4*除了在花的表現量較高外，在其他部份皆較低(Sun and Callis, 1997)。另外，*UBQ3*的基因轉錄量(transcript level)會受到黑暗與紫外線(UV-B)的影響而促進(Sun and Callis, 1997；Brosché *et al.*, 2002)，但*UBQ4*的表現不受這些光源所調控，而且直到目前為止，仍未找到調控*UBQ4*基因表現的環境因素。從以上種種結果，可推測*UBQ3*和*UBQ4*二者的表現方式的確藉由不同因子所調控。此外，Norris在1993年發現內插子(intron)會影響聚泛素基因的表現，不過當時只取*UBQ3*、*UBQ10*與*UBQ11*作為研究目標，所以目前仍不清楚*UBQ4*與*UBQ14*的表現是否也受內插子所影響。

綜合上述，這篇論文我們以阿拉伯芥中的*UBQ3*和*UBQ4*基因為實驗目標，藉由偵測轉殖株內報導基因的活性，研究這二者的表現位置是否不同。此外，我們將繼續研究內插子是否影響聚泛素基因*UBQ3*和*UBQ4*的表現，並更進一步探討在同時失去內插子與五端未轉譯區域(5'-UTR)時，這二個基因的表現量差異。另一方面，我們利用基因序列比對軟體，分析*UBQ3*和*UBQ4*的啟動子(promoter)、五端未轉譯區域和內插子序列的相似與相異處，以找出影響基因表現的序列片段。最後，給予各年齡層阿拉伯芥不同的環境處理，藉由測量植物體內*UBQ3*和*UBQ4*的轉錄量，以了解這二者的表現是否會受環境因子調控，且進一步探討結果背後所代表的生理意義。

研究材料與方法

(一) 消毒與栽培阿拉伯芥種子

取適量野生型種子(Columbia ecotype)以75%的酒精震盪清洗10分鐘後，加入含有0.5%界面活性劑(Twin 20)的1.5%漂白水溶液，震盪清洗10分鐘，最後用滅菌水洗去殘留的試劑。清洗完畢後，將種子浸泡在滅菌水中，於4°C存放48小時，以達到春化的效果。經過48小時後，即可將種子種植於MS培養基上(Murashige and Skoog, 1962)，接受恆溫22°C、光照16小時、黑暗8小時的生長環境。待生長至適當年齡後，即可供實驗使用。

(二) 選殖UBQ3和UBQ4的啟動子序列、五端未轉譯區域及內插子序列

自阿拉伯芥資料庫TAIR (The Arabidopsis information resource)取得UBQ3和UBQ4的啟動子、五端未轉譯區域及內插子序列資料。依序列資料設計專一引子對(表一)，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) Pst I (Takara)與BamH I (Takara)接入載體pBlueScript SK⁻中。再利用熱刺激的方式，將帶有目標序列的載體轉殖入大腸桿菌(DH5 α)。經選殖及定序分析為正確者，才得以於後續實驗使用。

(三) 轉殖目標調控序列

將選殖出之目標序列(見圖三A與圖四A)，利用限制酵素Pst I (Takara)與BamH I (Takara)黏接至含有GUS (葡萄糖酸苷酶, Beta-glucuronidase)報導基因(reporter gene)的binary vector (pCAMBIA 1391Z)中，再利用農桿菌作媒介，以花序沾黏法(floral dipping, Clough and Bent, 1998)感染阿拉伯芥。待阿拉伯芥開花後收集種子，利用含有抗生素(hygromycin)的MS培養基做篩選，以挑選出轉殖成功的植株。此外，並詳細記錄轉殖株的型態與發芽率，供後續實驗參考。

(四) 偵測報導基因活性

(1) 組織染色

每個轉殖品系各取6~10顆種子進行消毒與春化程序，後將其栽植於具有抗生素(hygromycin)篩選能力的MS培養基中，以日長16小時，夜長8小時，恆溫22°C的環境下培養。14天後，將植株裝進含有GUS染劑(50

mM sodium phosphate pH7.2, 0.5 % Triton X-100, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.5 mM potassium ferricyanide, 2 mM X-gluc, Jefferson *et al.*, 1987)的 1.5 mL 離心管內，後放入真空乾燥皿中，進行 10 分鐘的真空抽氣。接著將實驗品放在 37°C 的環境下反應，待 16 小時後，以 95%酒精洗去染劑並加入固定液(0.1 M sodium phosphate pH7.2, 0.1 % formaldehyde, 0.1 % triton X-100, 0.1 % β -ME)，保存於室溫。花朵與植株染色步驟大致相同，但花朵須先浸泡於冰丙酮 20 分鐘，以清水沖洗後再浸泡於染劑中。

(2)細胞液萃取與定量

將消毒並春化完成之轉殖株種子栽培於具有抗生素(hygromycin)篩選能力的MS培養基中，以日長16小時，夜長8小時，恆溫22°C的環境下培養。14天後，將幼苗的地上部與地下部分開，以液態氮冷凍之後，藉由組織均質機(tissue homogenizer, Kurabo, SH-48)磨碎組織。將組織粉末溶入200 μ L GUS萃取溶液(Promega, reporter lysis buffer)中，後以4°C，13200 rpm的速度離心10分鐘，取上清液測量總蛋白(total protein)濃度後置於-80°C保存，供後續實驗使用。Jefferson等人在1987年的研究指出，GUS在水解 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide (4-MUG)之後，4-MUG會產生一帶有螢光特性的產物，4-methyl umbelliferone (4-MU)。因此，可以藉由偵測4-MU的方式，了解GUS的表現量。取2 μ L GUS萃取液與50 μ L的1 mM 4-MUG溶液(溶解於GUS萃取溶液內)，在37°C且避光的環境下反應10分鐘。當時間結束後，加入148 μ L的0.2 M Na₂CO₃以停止反應，接著利用螢光分析儀 (Molecular Devices, SpectraMax Gemini XPS)給予激發波長(Excitation wavelength) 365 nm與反射波長(Emission wavelength) 455 nm的環境偵測數值並加以計算。在本實驗中，所轉殖的每一種基因序列都各磨取四至六棵幼苗，而每一個樣品，都做三重複實驗。

(五) 尋找UBQ3和UBQ4基因之相似與相異序列

取五種聚泛素基因 UBQ3、UBQ4、UBQ10、UBQ11 與 UBQ14 之啓動子、五端未轉譯區域及內插子序列資訊，分別以 MEME (Multiple em and motif elicitation, Bailey and Gribskov 1998)軟體比對，分析其序列有何相似

處，並且利用 Weblogo 網路軟體分析序列之相似度(Crooks *et al.*, 2004)，最後再由相似序列的結果分析序列相異處。

(六) 計算基因內插子強化訊息(Enhancing Signals)

2008年Rose等人發表一可鑑別阿拉伯芥與水稻內插子強化訊息的公式稱為IMEter (intron-mediated enhancement discriminator)，我們藉此公式計算UBQ3與UBQ4之內插子序列，並以分析結果作為尋找內插子強化訊息序列的參考。

(七) 萃取阿拉伯芥總蛋白質(total protein)

如Fan and Dong (2002)之實驗方法，將22天齡的野生型(Columbia ecotype)植株葉片，以液態氮冷凍之研鉢與杵研磨成粉末。後取4 g粉末加入2 mL總蛋白質萃取溶液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % glycerol)中，急速震盪30秒，使粉末與溶液充分混合後，以4°C，13200 rpm的速度離心15分鐘。待離心完畢，取上清液偵測濃度並分裝至數管，保存於-20°C備用。

(八) 冷光標定核苷酸序列

取得MEME軟體所分析出的序列，合成正向(foward)與反向(reverse)單股寡核酸引子後，以滅菌水配製為100 μM的溶液，保存於-20°C備用。後將單股寡核酸稀釋至5 pmol，使用Biotin-N¹¹-CTP (Perkin-Elmer, NEL538001EA)做標記，成為20 fmol的冷光標記單股寡核酸。接下來，將正向與反向已標定之寡核酸放入65°C水浴槽內，緩慢的降至室溫，以獲得40 fmol雙股核苷酸(dsDNA)，供實驗使用。

(九) 電泳膠遲緩分析(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

將5~40 fmol冷光標記之雙股核苷酸、5 μg總蛋白、2.5 % glycerol、1 μg poly dI-dC與binding buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM DTT)混合後，於室溫下反應20分鐘。將樣品加入loading dye後，用6% DNA retardation gel (invitrogen)與0.5x TBE buffer以15安培、50伏特跑140分鐘。跑膠完成後，經由轉漬系統以380安培、100伏特的環境，將膠轉漬至nylon memberane (Amersham, RPN303B)。最後，利用冷光呈色套組顯色(Pierce, 89880)，再以螢冷光即時影像分析系統(Fujifilm, LAS3000)擷取圖像結果。

(十) 微陣列資料分析(microarray data analysis)

為了解其他學者發表的微陣列資料(microarray data)，故利用網路資料庫Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004)取得有關於UBQ3和UBQ4的基因表現數據並加以計算分析，以了解UBQ3和UBQ4的基因表現方式。

(十一) 環境刺激實驗

(1) 溫度處理

取已消毒並春化完成之野生型種子種植於蓋有賽路芬膜(cellophane)的垂直MS培養基中，以日長16小時、夜長8小時與22°C的恆溫環境下生長。待植株生長至第7、14、21與28天時，在白光照射的環境下分別以10°C、22°C或37°C等不同溫度環境中處理2小時，並給予2小時恢復期。後將整株植物以液態氮冷凍收集，保存於-80°C。而每一種處理皆各重覆進行三次。

(2) 光線處理

本實驗共設計四種光線處理，為紅光、藍光、紫外線(UV-B)與黑暗處理。紅光或藍光處理是取已消毒並春化完成之野生型種子種植於蓋有賽路芬膜的垂直MS培養基中，以日長16小時、夜長8小時並給予22°C恆溫的環境下生長。待阿拉伯芥成長至第6、13、20與27天時，在22°C的環境下，分別提供紅光或藍光二種不同的光線處理(15 $\mu\text{Mol}/\text{M}^2/\text{sec}$) 24小時，後在相同的光環境下將植株葉片以液態氮冷凍收集，保存於-80°C。另外，UV-B處理是將已消毒並春化完成之野生型種子種植於水平MS培養基中，待阿拉伯芥生長至第7、14、21與28天時，直接暴露於UV-B光線(320 nm)下2小時，後於綠光環境中將植株葉片以液態氮冷凍收集，保存於-80°C。黑暗處理則是取種植於水平MS培養基的第6、13、20與27天齡的阿拉伯芥，在22°C的溫度下給予植株24小時黑暗環境，後於綠光環境中將植株葉片以液態氮冷凍收集，保存於-80°C。以上各組實驗皆另有白光照射處理(15 $\mu\text{Mol}/\text{M}^2/\text{sec}$)的阿拉伯芥作為對照組，且每一種處理都重覆進行三次。

(十二) 抽取並純化阿拉伯芥RNA

利用TRIzol試劑(Invitrogen, Chomczynski and Sacchi, 1987)抽取經過環境處理之阿拉伯芥的total RNA。將1 g組織以液態氮冷凍之研鉢與杵磨碎後，倒入5 mL的TRIzol試劑中反應，接著加入2 mL氯仿(chloroform)分離出蛋白質後，以4°C，4500 rpm的速度離心30分鐘並取出上清液。將上清

液加入裝有2.5 mL異丙醇(isopropyl alcohol)的離心管中，促使RNA沉澱。10分鐘後，利用離心的方式取得RNA，再以75 %酒精洗去雜質。最後將RNA回溶於適量的DEPC (diethyl pyrocarbonate)水中，偵測濃度並以2 %瓊脂膠 (agarose gel)檢查品質，後儲存於-80°C備用。此外，純化total RNA的實驗方式參考自Takara DNase I操作步驟。取20 µg的total RNA加入DNase I buffer、4 units DNase I (RNase free, Takara)、20 units RNase inhibitor (Takara)與適量的DEPC水，混合均勻後，將混合液放置於37°C反應30分鐘。待反應結束後，利用酚/氯仿(phenol/ chloroform)去除酵素活性，再以酒精沉澱的方式以獲得純粹之total RNA。待完成濃度測定後，保存於-80°C備用。

(十三) 合成cDNA (complementary DNA)

取5 µg total RNA加入15 mM oligo dT₁₉-N與適量DEPC水，使體積成14 µL，放入72°C反應10分鐘。後置於冰上並加入20 unite RT (reverse transcriptase, Promega)、RT buffer和10mM dNTP，在42°C的環境下反應1小時使RT作用。接著於72°C反應15分鐘使酵素失活，後保存於-20°C備用。而cDNA的品質則利用PCR的技術以*Actin7*之專一引子對(表一)做檢測。

(十四) 反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcription-PCR, RT-PCR)

以cDNA當做模板，*UBQ10*的表現量做對照，使用*UBQ3*專一引子對F3和R3與*UBQ4*專一引子對F3和R4(表一)進行PCR實驗，檢測*UBQ3*和*UBQ4*的轉錄量。其PCR條件設定為94°C 30秒、57°C 20秒、72°C 20秒為一個循環，*UBQ3*與*UBQ10*設定進行20個循環，*UBQ4*進行25個循環。PCR實驗完成後，取9µL PCR產物加入1µL 10x loading dye，以2 %瓊脂膠搭配0.5x TBE溶液跑膠。膠片使用Sybr green I (Invitrogen)呈色，以螢冷光即時影像分析系統(Fujifilm, LAS3000)擷取圖像並加以分析。在本研究中每個實驗組皆重複三次以上的RT-PCR實驗。

實驗結果

(一)在阿拉伯芥中，*UBQ3*和*UBQ4*基因的表現部位與表現量

(1) *UBQ3*和*UBQ4*的基因表現部位分析

阿拉伯芥的聚泛素基因具有非常一致的基因結構方式，都是由啟動子接上五端未轉譯區域後，再連接一個內插子，而內插子會直接連結轉譯序列(coding sequences)。實驗中所構築的質體是將報導基因葡萄糖酸苷酶(Beta- glucuronidase reporter gene，簡稱GUS)連接於*UBQ3*和*UBQ4*的啟動子、五端未轉譯區域及內插子序列之後(圖三A與圖四A)。利用花序沾黏法(Clough and Bent, 1998)，將構築的質體轉殖入植物體中。因此可藉由偵測GUS活性，了解*UBQ3*和*UBQ4*的基因表現位置與表現量。利用抗生素篩選的方式，我們於轉殖*UBQ3*啟動子(1129 bp)加上五端未轉譯區域(89 bp)及內插子(375 bp)完整序列(U3.1)實驗中，取得插入不同基因體位置的三個同型結合子(homozygous)轉殖株，分別命名為U3.1-1、U3.1-2與U3.1-3；缺少內插子(U3.2)的轉殖實驗，只篩選出一同型結合子轉殖株(U3.2-1)，所以加入一異型結合子轉殖株(heterzygous, U3.2-2)進行分析；只取啟動子序列(U3.3)的轉殖實驗共篩選出二個插入不同基因體位置同型結合子轉殖株，命名為U3.3-1與U3.3-2，另外並加入一個異型結合子轉殖株(U3.3-3)進行實驗分析。

而轉殖*UBQ4*啟動子(160 bp)加上五端未轉譯區域(95 bp)及內插子(385 bp)完整序列(U4.1)實驗中，取得插入不同基因體位置的二個同型結合子轉殖株，分別命名為U4.1-1與U4.1-2；缺少內插子(U4.4)的轉殖實驗，篩選出二個插入不同基因體位置的同型結合子轉殖株，命名為U4.4-1與U4.4-2；只取啟動子序列(U4.5)的轉殖實驗共篩選出二個同型結合子轉殖株，命名為U4.5-1與U4.5-2，另外並加入一異型結合子轉殖株進行實驗分析。此外，為避免TAIR網站錯估*UBQ4*的啟動子序列長度，所以我們多構築一組質體是包含*UBQ4*前方基因Germin-like protein 3 (*GLP3*)之三端未轉譯區域，加上*UBQ4*之啟動子、五端未轉譯區域及內插子序列的轉殖植株。加入*GLP3*三端未轉譯區域(211 bp)之*UBQ4*啟動子加上五端未轉譯區域及內插子完整序列(U4.2)的轉殖實驗中，取得插入不同基因體位

置的二個同型結合子轉植株，分別命名為U4.2-1與U4.2-2；缺少內插子(U4.3)的轉殖實驗，篩選出二個插入不同基因體位置的同型結合子轉植株，命名為U4.3-1與U4.3-2；取啟動子序列(U4.6)的轉殖實驗共篩選出二個插入不同基因體位置的同型結合子轉植株，命名為U4.6-1與U4.6-2。

從GUS染色結果發現，在營養生長時期(14日齡幼苗)的轉植株中，*UBQ3* (U3.1-1與U3.1-2)和*UBQ4* (U4.1-1與U4.1-2)在根、莖、葉都有相當強的表現，而且表現位置並沒有明顯的差異(圖三B與圖四B)，不過在轉植株成熟葉片與成熟根組織中的表現，發現*UBQ3*的表現量比*UBQ4*高，這結果與前人所得的基因表現結果相符合。以野生型的GUS定量結果為基準，發現U3.1與U4.1在葉片的相對GUS表現量都較根部強(表二)。另外，自包含*GLP3*基因三端未轉譯區域加上*UBQ4*啟動子、五端未轉譯區域及內插子序列的轉殖植株染色結果發現，U4.1與U4.2在表現位置上並沒有差異(圖四B，U4.2-1、U4.1-1與U4.1-2)，但是加上*GLP3*基因三端未轉譯區域使得GUS表現量倍增(表二，U4.2)。但是在生殖生長時期，自花朵組織的染色結果發現，*UBQ3*和*UBQ4*的表現部位開始出現相異處(圖三C與圖四C)。從GUS染色結果發現，*UBQ3*在萼片、花絲、花藥與柱頭頂端有表現(圖三C，U3.1-1、U3.1-2)，而*UBQ4*在萼片、花絲與柱頭頂端也有表現，但不會在花藥表現(圖四C，U4.1-1、U4.1-2)。

(2) 五端未轉譯區域及內插子序列對*UBQ3*和*UBQ4*基因表現的影響

1993年Norris以transient assay分析，*UBQ3*、*UBQ10*與*UBQ11*等聚泛素基因失去內插子後，其基因表現量會明顯下降。所以本實驗除了以轉殖植物再次確定內插子對*UBQ3*基因表現的影響力外，並更進一步研究在同時失去內插子與五端未轉譯區域的情況下，*UBQ3*與*UBQ4*的基因表現能力是否會不同。當*UBQ3*缺乏內插子的情況下，基因在葉及根中的表現大幅下降，降至原表現量的2.5%與5%(表二與圖三B、C，U3.1與U3.2)。再進一步減去五端未轉譯區域後，*UBQ3*的表現量依然持續下降(表二與圖三B、C，U3.3)。不過去除內插子的*UBQ4*，在葉及根的表現量有明顯增加近5倍及2.4倍(表二，U4.1與U4.4)。但進一步去除五端未轉譯區域後，*UBQ4*的基因表現量與去除內插子轉植株相比，表現量下降60%與70%(表二，U4.4與U4.5)。另外，加上*GLP3*基因三端未轉譯區域後，*UBQ4*

的基因表現能力明顯提升6倍(表二，U4.1與U4.2)。

(二) 調控*UBQ3*與*UBQ4*基因表現的序列片段

為更精準的找出調控*UBQ3*與*UBQ4*基因表現的順式作用元素(cis-acting elements)，我們使用網路資料庫MEME比對聚泛素基因啟動子、五端未轉譯區域與內插子之相似序列。從分析結果發現，聚泛素基因的啟動子、五端未轉譯區域與內插子中，有許多相似的序列，長度自10~50bp不等(表三)。其中以五端未轉譯區域的相似度最高(圖五)。接著，我們挑選三段在*UBQ3*與*UBQ4*啟動子內的相似序列，以蛋白質黏合實驗分析(protein binding test)序列是否為順式作用元素。但很可惜的，這三個啟動子相似序列並不會和蛋白質有交互作用。另外，我們在內插子中也比對出多個相似序列，命名為ubiquitin intron element 1-3 (UIE1-3)。UIE1是*UBQ3*與*UBQ4*的相似序列，位於內插子中段，由數個連續的嘧啶(pyrimidine)T所組成(圖六)；UIE2是五個聚泛素基因*UBQ3*、*UBQ4*、*UBQ10*、*UBQ11*與*UBQ14*的相似序列，位於內插子後段(圖七)；而UIE3是*UBQ3*與*UBQ4*的相似序列，位於內插子末端(圖八)。UIE1與UIE3片段是依據*UBQ3*內插子序列設計，而UIE2是依據*UBQ4*內插子的序列設計。後以蛋白質黏合實驗分析，發現此三個片段與總蛋白質會有交互作用(圖九)，表示UIE1-3可能為順式作用元素。為了驗證UIE1-3是順式作用元素，我們利用相同序列但沒有標定冷光的雙股核苷酸與標定冷光的雙股核苷酸做蛋白質競爭實驗。若有競爭的表現，可確定這序列與蛋白質之間有專一的黏合性。從結果發現，UIE1與UIE2冷光標定之雙股核苷酸與蛋白質的黏合表現，會隨著競爭比例的增加而減少，且分別在125倍與625倍的競爭情況下，黏合的表現會完全消失，表示這兩者與蛋白質有專一性的交互作用，為順式作用元素(圖十與十一)。但UIE3冷光標定之雙股核苷酸與蛋白質的黏合表現並不會隨著競爭比例的增加而減少，且競爭比例直到625倍，冷光標定之雙股核苷酸與蛋白質黏合的表現仍未完全消失(圖十二)，表示UIE3缺乏與蛋白質交互作用的專一性，所以此序列不是順式作用元素。

藉由比對出的內插子相似序列，我們在扣除相似序列片段之後，另外找出*UBQ3*與*UBQ4*的內插子序列上四個相異的片段(表四)。這些相異片

段是否會造成UBQ3與UBQ4的表現差異，則有待未來進一步研究。

現在已有許多研究發現內插子會調控基因的表現量，但並不清楚是由哪些片段調控基因的表現，所以我們利用網路軟體IMEter計算UBQ3與UBQ4的內插子序列是否可能帶有強化訊息序列(enhancer)存在。若所得之數值越高，則表示此序列帶有強化訊息的機率越高。從結果發現，UBQ3內插子序列中第1~100 bp與第201~350 bp的序列最可能帶有強化訊息序列；而UBQ4內插子序列在第1~200 bp序列中可能有強化訊息序列的存在(表五)。

(三) 影響UBQ3與UBQ4基因表現的環境因素

自網路資料庫Genevestigator取得聚泛素基因的微陣列資料並加以計算分析，發現UBQ3、UBQ4、UBQ10、UBQ11與UBQ14這五種阿拉伯芥聚泛素基因的表現量都相當穩定，其中UBQ10的表現量最不容易受環境因子與其他基因影響，會持續穩定表現；但是UBQ3的表現量稍受環境因子與其他基因影響(表六)。

另外，本實驗設計給予阿拉伯芥植株不同的溫度與光線刺激，利用偵測UBQ3與UBQ4的轉錄量，以分析UBQ3與UBQ4的基因表現是否受溫度與光線調控。

(1) 溫度處理

本實驗為了解UBQ3與UBQ4的基因表現是否受溫度調控，所以將7、14、21與28日齡的阿拉伯芥植株放置於37°C、22°C或10°C的環境，處理二小時，以觀察UBQ3與UBQ4的基因表現量是否有變化。與22°C處理的植株比較，在高溫環境中，UBQ3的表現皆有下降，且有顯著差異，尤其以7天齡植株的表現最明顯(圖十三A)，但低溫無法調控UBQ3的表現量(圖十三A)。而高溫對UBQ4的表現沒有顯著影響(圖十三B)，不過在低溫環境下雖然UBQ4的表現於28天齡植株中有顯著增加，但觀察UBQ4在低溫下的整體表現後，我們認為UBQ4的表現量並不受低溫所調控(圖十三B)。

(2) 光線處理

在1997年Sun和Callis發表的文章中發現於黑暗環境下生長的七天齡阿拉伯芥，相較於白光環境下生長的植株，UBQ3的表現量提高1.8至3.7

倍；之後在2002年Brosché的研究中發現，28天齡的阿拉伯芥接受紫外線(UV-B)的刺激後，*UBQ3*的基因表現量比在紫外線(UV-A)的環境下增加1.4~9.6倍。所以本實驗將繼續研究光線是否會調控*UBQ3*的基因表現量，並進一步探討光線是否也會調控*UBQ4*的基因表現量。

(a) 藍光與紅光處理

取第6、13、20與27天齡的阿拉伯芥植株，分別給予藍光或紅光處理24小時，並以白光處理作為對照組。從實驗結果發現，*UBQ3*會接收藍光與紅光的刺激而提高表現量，藍光約提高1.5倍，紅光約1.3~1.5倍(圖十四A)。而*UBQ3*的基因表現在藍光處理下，以7天與21天齡植株的增加比例最明顯；在紅光處理下，以7天齡最明顯(圖十四A)。但是*UBQ4*的表現量並沒有因藍光和紅光處理而增加(圖十四B)。

(b) 黑暗處理

目前已知在黑暗環境下生長的七天齡阿拉伯芥中，*UBQ3*的表現量會增加1.8~3.7倍(Sun and Callis, 1997)。所以本實驗想進一步了解，是否在不同年齡的阿拉伯芥中，*UBQ3*的表現都會受黑暗調控，並且研究黑暗是否也調控*UBQ4*的表現。取第6、13、20與27天齡的阿拉伯芥，給予24小時的黑暗處理，並以白光處理作為對照組。經實驗分析，發現於黑暗的環境下，*UBQ3*的表現在所有年齡的阿拉伯芥中都有明顯的增加，約1.5~2倍，且以7天齡幼苗的表現最明顯(圖十五A)。而*UBQ4*在第7、14與21天齡的植株中也有增加，但並沒有顯著差異(圖十五B)。

(c) 紫外線(UV-B)處理

在2002年Brosché發表的論文中，利用北方墨點法(Northern blot)實驗發現28天齡的阿拉伯芥*UBQ3*的表現量會受UV-B的刺激而增加1.4~9.6倍。而本實驗將研究在不同年齡層的阿拉伯芥中，*UBQ3*的表現量是否都會受UV-B所調控外，並一同探討*UBQ4*的表現量是否也會受UV-B調控。從實驗結果發現，在各年齡層的阿拉伯芥中，*UBQ3*都會受UV-B調控而增加表現量，約1.1~1.6倍，尤其在第7、14與28天齡的阿拉伯芥植株中，有顯著差異(圖十六A)；但是*UBQ4*的表現量則完全不受UV-B的刺激而改變(圖十六B)。

分析與討論

阿拉伯芥中的泛素基因自1988年被發現後(Burke *et.al.*, 1988)，直至20年後的今天，雖已有不少相關的研究結果(Norris *et.al.*, 1993, Callis *et.al.*, 1995, Sun and Callis, 1997)，但仍有許多問題尚未釐清。本研究將目標鎖定於UBQ3與UBQ4這二個聚泛素基因，藉由實驗結果分析此二者的表現方式，以進一步探討這二者基因表現與調控機制的相同與相異處。

利用偵測轉植株的GUS表現方式(圖三與圖四B)，我們發現在營養時期的阿拉伯芥UBQ3與UBQ4的表現位置並沒有明顯的不同，但是UBQ3在成熟組織的表現量明顯高於UBQ4。不過到達生殖生長時期，這二個基因在花朵的表現部位卻出現相異處(圖三與圖四C)，這可能代表UBQ3與UBQ4在營養生長時期所接受的調控機制是相似的。但隨著年齡的增長，植物進入生殖生長時期之後，UBQ3和UBQ4開始接受不同的機制所調控，使它們的表現位置出現歧異處。

1993年Norris以transient assay的方式發現內插子會影響UBQ3、UBQ10與UBQ11等聚泛素基因的表現，而本實驗設計以完整的啟動子序列搭配不同序列組合(五端未轉譯區域/內插子)的UBQ3和UBQ4，利用偵測轉植株的GUS表現量，研究內插子的存在是否會改變UBQ3和UBQ4的表現量。從實驗證明無論在營養生長或是生殖生長時期，UBQ3的確會因為內插子的消失導致基因表現降低(表二與圖三B、C，U3.1與U3.2)，而進一步缺少五端未轉譯區域後，UBQ3基因表現依然持續減少(表二與圖三B、C，U3.3)。表示UBQ3在植株中的表現會受內插子與五端未轉譯區域所調控，且以內插子的影響力較大。所以我們推測UBQ3的內插子有增強子(enhancer)的存在，能增加基因的表現量。

此外，我們發現UBQ4的表現也會受到內插子與五端未轉譯區域所影響(表二)。當內插子消失時，UBQ4的基因表現量明顯增加近5倍(表二U4.1與U4.4)，這表示內插子在UBQ4的表現中扮演抑制子(silencer)的角色，和在UBQ3相反。不過進一步缺少五端未轉譯區域後，UBQ4的表現也會下降(表二U4.5)，代表五端未轉譯區域在UBQ3和UBQ4中具有類似的功能。另外，加入GLP3三端未轉譯區域的UBQ4啟動子片段，其表現量明顯高於只有

*UBQ4*的啟動子片段(表二U4.1與U4.2)。這結果代表*GLP3*三端未轉譯區域會強化*UBQ4*的表現，且強度高過內插子所造成的抑制作用。不過很可惜的是，在*UBQ4*的轉植實驗中，我們獲得的轉植株品系數量太少，所以要確定*UBQ4*內插子與*GLP3*三端未轉譯區域的調控能力，就需要更多品系的轉植株佐證。

Sun和Callis在1997年利用北方墨點法(Northern blot)分析，發現在六週齡的阿拉伯芥中，*UBQ3*在營養組織內的基因表現量，是*UBQ4*的2.7倍。但是在GUS染色實驗卻看到*UBQ4*的表現量較預期高(圖四B、C，U4.1與U4.2)，且從GUS量化的結果看來，也有一樣的趨勢(表二U4.1與U4.2)，所以我們推測轉植株與內生性的*UBQ4*基因表現量並不相同。自Carter等人在1998的研究中以演化的角度推測，*UBQ4*的上游基因*GLP3*，可能會影響*UBQ4*的表現能力。而我們推測因*GLP3*是一個接近*UBQ4*且持續大量表現的基因，所以參與轉錄的因子會傾向與*GLP3*的啟動子序列黏合，因而減少與*UBQ4*啟動子序列黏合的機會，使*UBQ4*的表現量低落。為了解內生*UBQ4*是否會受*GLP3*基因影響，未來可構築一包含*GLP3*全長的*UBQ4*質體，利用基因槍的方式將質體轉入阿拉伯芥中。利用報導基因的表現，確定*UBQ4*的基因表現是否會受*GLP3*影響。但從另一方面分析，GUS的表現為DNA序列經轉錄轉譯後的結果，在*UBQ4*轉植株中所得到的GUS表現結果，或許和*UBQ4*在阿拉伯芥的轉譯結果相同。所以雖然*UBQ4*的轉錄量低，但是卻可擁有較穩定的蛋白質表現，這或許代表有後轉譯作用(post-translation)參與調節所影響。

雖然從轉殖植物的GUS表現結果發現，內插子對*UBQ3*與*UBQ4*的表現具有相反的影響力(表二、圖三與圖四)。不過從聚泛素基因的序列比對結果，了解*UBQ3*與*UBQ4*的內插子序列有六個相似片段(表三)，而且經由蛋白質黏合與競爭實驗的結果，我們得到二段內插子順式作用元素，UIE1與UIE2(圖六與圖七)。所以我們認為*UBQ3*與*UBQ4*的內插子應有部份相同的功能。在蛋白質競爭實驗中UIE3未顯示與蛋白質鍵結的專一性(圖十二)，所以我們不認為UIE3是個順式作用元素。而UIE3為何會出現不具有專一性的黏合？我們認為可能因序列中包含數個不連續的嘧啶CT片段，容易與蛋白質產生交互作用，因而導致序列與蛋白質產生不專一性的黏合。此外，我們找出四段*UBQ3*和*UBQ4*的內插子相異序列(表四)，因*UBQ3*和*UBQ4*內插子對基因表現有不同的影響力，所以這四段相異序列中或許有決定內插子功能的重

要調控序列。另外，自IMEter的分析結果發現，*UBQ3*的內插子序列在第1~100bp可能有強化訊息的存在(表五)，而*UBQ3*內插子第一個相異序列的位置即位於此範圍中(表四)，而且這個片段在*UBQ10*、*UBQ11*與*UBQ14*中皆存在，只有*UBQ4*沒有，所以這序列可能是*UBQ3*內插子中的增強子。

從比對聚泛素基因序列之相似度發現，*UBQ10*、*UBQ11*和*UBQ14*的啟動子之間有較多的相似序列(表三)，與*UBQ3*和*UBQ4*相似的序列較少，這資訊與利用基因結構分類聚泛素基因的結果相似。而聚泛素基因的五端未轉譯區域序列都非常相似(表三與圖五)，且從轉殖植物的GUS表現，得知五端未轉譯區域對*UBQ3*與*UBQ4*的影響是一致的(表二，U3.3與U4.5)。自此結果推測，這五種聚泛素基因之間的表現差異性，主要還是受到啟動子所影響，內插子與五端未轉譯區域為輔。

在酵母菌中，聚泛素基因的表現會受高溫影響而改變(Finley *et al.*, 1987)，在本實驗雖然也發現*UBQ3*和*UBQ4*會受到高溫影響而改變表現量(圖十三)，但結果與已發表的研究並不吻合(Sun and Callis, 1997)。研究發現泛素基因會受熱誘導而提高表現量(Finley *et al.*, 1987, Sun and Callis, 1997)，但在本實驗中卻發現*UBQ3*和*UBQ4*的表現會因高溫刺激而下降，這或許因為溫度處理的實驗設計是將阿拉伯芥種植於垂直式培養基上，並覆蓋一層賽路芬膜，導致水分的通透性較差而增加其他變因，使結果與已發表的研究不同。

在光線實驗中，發現藍光、紅光，黑暗與紫外線都會使*UBQ3*的基因表現量增加(圖十四A、十五A與十六A)，但*UBQ4*的表現並不受這些光線所調控(圖十四B、十五B與十六B)。在這四種光線中，以黑暗對*UBQ3*最有影響力(圖十五A)。在黑暗的環境下，*UBQ3*的表現明顯增加，這表示白光會抑制*UBQ3*的表現。而藍光、紅光與紫外線的刺激也會提高*UBQ3*的表現量，所以我們推測*UBQ3*會參與多種和光調控有關的生理作用。

本研究找出*UBQ3*與*UBQ4*基因表現的組織差異性、內在調控因子(內插子與五端未轉譯區域)與環境調控因子(光線與溫度)，並且獲得內插子序列中二段順式作用元素，不過仍有許多疑問需要實驗去證明。希望在不久的未來，就能釐清這些問題，獲得更多新知。

參考文獻

1. **Bachmair, A., Novatchkova, M., Potuschak, T., and Eisenhaber, F.** (2001). Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *TRENDS in Plant Science*. **6**, 463-470.
2. **Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (1996). Skp1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*. **86**: 263-274.
3. **Bailey, T.L., and Gribskov, M.** (1998). Methods and statistics for combining motif match scores. *Journal of computational biology*. **5**: 211-221.
4. **Brosché, M., Schuler, M.A., Kalbina, I., Connor, L., and Strid, Å.** (2002). Gene regulation by low level UV-B radiation: identification by DNA array analysis. *Photochemical and photobiological sciences*. **1**: 656-664.
5. **Burke, T.J., Callis, J., and Vierstra, R.D.** (1988). Characterization of a polyubiquitin gene from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and general genetics*. **213**:435-443.
6. **Callis, J., Raasch, J.A., and Vierstra, R.D.** (1990). Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco. *Journal of biological chemistry*. **265**: 12486-12493.
7. **Callis, J., Carpenter, T., Sun, C.W., and Vierstrat, R.D.** (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics*. **139**: 921-939.
8. **Carter, C., Graham, R.A., and Thornburg, R.W.** (1998). *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant molecular biology*. **38**: 929-943.
9. **Catic, A., and Ploegh, H.L.** (2005). Ubiquitin - conserved protein or selfish gene? *Trends in biochemical sciences*. **30**: 600-604.

10. **Chae, E., Tan, Q.K.G., Hill, T.A., and Irish, V.F.** (2008). An Arabidopsis F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development*. **135**: 1235-1245.
11. **Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A.** (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*. **243**: 1576-1583.
12. **Chomczynski, P., and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. **162**: 156-159.
13. **Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*. **16**: 735-743.
14. **Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E.** (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*. **14**: 1188-1190.
15. **Fan, W.H., and Dong, X.N.** (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *The plant cell*. **14**: 1377-1389.
16. **Finley, D., Özkaynak, E., and Varshavsky, A.** (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*. **48**: 1035-1046.
17. **Finley, D., and Chau, V.** (1991). Ubiquitination. *Annual review of cell biology*. **7**: 25-69.
18. **Finley, D., Sadis, S., Monia, B.P., Boucher, P., Ecker, D.J., Crooke, S.T., and Chau, V.** (1994). Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Molecular and cell biology*. **14**: 5501-5509.

19. **Fisk, H.A., and Yaffe, M.P.** (1999). A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell biology*. **145**: 1199-208.
20. **Galan, J.M., and Haguenuer-Tsapis, R.** (1997). Ubiquitin Lys63 is involved in ubiquitination and endocytosis of a yeast plasma membrane protein. *The EMBO journal*. **16**: 5847-54.
21. **Glickman, M.H., and Ciechanover, A.** (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*. **82**: 373-428.
22. **Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., and Boyse, E.A.** (1974). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte- differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **72**: 11-15.
23. **Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H., and Estelle, M.** (1999). Identification of an SCF ubiquitin ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and development*. **13**: 1678-1691.
24. **Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A.** (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system: resolution, affinity purification and role in protein breakdown. *The journal of biological chemistry*. **258**: 8206-8214.
25. **Hershko, A., Leshinsky, E., Ganoth, D., and Heller, H.** (1984). ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proceedings of the national academy of sciences*. **81**: 1619-1623.
26. **Hershko, A., and Ciechanover, A.** (1992). The ubiquitin system. *Annual review of clinical biochemistry*. **61**: 761-807.
27. **Hochstrasser, M.** (2006). Lingering mysteries of Ubiquitin-Chain assembly. *Cell*. **124**: 27-34.
28. **Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S.** (2002).

- RAD6- dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. **419**: 135-41.
29. **Hofmann, K., and Bucher, P.** (1998). The PCI domain: a common theme in three multi-protein complexes. *Trends in Biochemical Sciences*. **23**: 204-205.
 30. **Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., and Kay, S.A.** (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*. **426**: 302-306.
 31. **Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS-fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*. **6**: 3901-3907.
 32. **Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., and 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.
 33. **Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. **15**: 473-497.
 34. **Ni, W., Xie, D., Hobbie, L., Feng, B., Zhao, D., Akkara, J., and Ma, H.** (2004). Regulation of flower development in *Arabidopsis* by SCF complexes. *Plant physiology*. **134**: 1574-1585.
 35. **Norris, S.R., Meyer, S.E., and 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.
 36. **Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W.** (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*. **405**: 462-466.
 37. **Özkaynak, E., Finley, D., and Varshavsky, A.** (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature*. **312**: 663-666.

38. **Patton, E.E., Willems, A.R., and Tyers, M.** (1998). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends in genetics*. **14**: 236-243.
39. **del Pozo, J.C., Timpfe, C., Tan, S., Callis, J., and Estelle, M.** (1998). The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science*. **280**: 1760-1763.
40. **Rose, A.B., Elfersi, T., Parra, G., and Korf, I.** (2008). Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression. *The plant cell*. **20**: 543-551.
41. **Schlessinger, D.H., Goldstein, G., and Niall, H.D.** (1975). The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry*. **14**: 2214-2218.
42. **Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W.L., Lyapina, S., Deshaies, R.J., Gray, W.M., Estelle, M., and Deng, X.W.** (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR1} in mediating auxin response. *Science*. **292**: 1379- 1382.
43. **Shanklin, J., Jabben, M., and Vierstra, R.D.** (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.
44. **Sun, C.W., and Callis, J.** (1997). Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes. *The plant journal*. **11**: 1017-1027.
45. **Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., and Dangl, J.L.** (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.
46. **Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D.** (2002). The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. The plant cell. **14**: 1919-1935.
47. **Yin, X.J., Volk, S., Ljung, K., Mehlmer, N., Dolezal, K., Ditengou, F., Hanano, S., Davis, S.J., Schmelzer, E., Sandberg, G., Teige, M., Palme, K., Pickart, C. and Bachmair, A.** (2007). Ubiquitin lysine 63 chain-forming ligases regulate apical dominance in Arabidopsis. The plant cell. **19**: 1898-1911.
48. **Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant physiology. **136**: 2621-2632.

表格與圖片

名稱	序列內容	目的
UBQ3 F2	gcctgcagGTCGGGCAACAAAATCCTG	放大P,5,I序列
UBQ3 F3	GGATGGTCGCACACTTGCAG	進行RT-PCR實驗
UBQ3 R1	gcggatccCTGAAATAAAACAATAGAACAAGTAG	放大P,5,I序列
UBQ3 R2	gcggatccGAAAGAGAGAGTCGCGAGAG	放大P,5序列
UBQ3 R3	CGTTACAAGCCCAAACGAAGG	進行RT-PCR實驗
UBQ3 R4	gcggatccGAATTATTATCTTCCACACGAAG	放大P序列
UBQ4 F1	gcctgcagCTCGACATTTGCACTAATAAGC	放大P,5,I序列
UBQ4 F2	gcctgcagGCTTCTCTTAGTTTCATTGTTC	放大3,P,5,I序列
UBQ4 F3	CAGATATTTGTGAAGACCCTTAC	進行RT-PCR實驗
UBQ4 R1	gcggatccCTGCGAAGGAAGAGAGCAAG	放大P,5,I序列
UBQ4 R3	gcggatccCTTGAAAGAGAGAATCGTTCG	放大P,5序列
UBQ4 R4	GTTGAAACAGCAACCAAAGGTTC	進行RT-PCR實驗
UBQ4 R5	gcggatccGATAATACTTCGCTAGAAAATAG	放大P序列
UBQ10 F1	CTTCGTCAAGACTTTGACCG	進行RT-PCR實驗
UBQ10 R1	CTTCTTAAGCATAACAGAGACGAG	進行RT-PCR實驗
Actin7 F1	GGAAGCTCCTGGAATCCATG	進行RT-PCR實驗
Actin7 R1	GACAAGACACACTTAGAAGC	進行RT-PCR實驗
HSP70 F1	GATGCAATCGACCAAGCTATTG	進行RT-PCR實驗
HSP70 R1	CTTTCATAGGTCAGAGCGAG	進行RT-PCR實驗

表一 專一引子對序列資料

專一引子對序列資料包含名稱、序列內容與實驗目的。名稱欄內 F 代表正向引子，R 代表反向引子。序列內容中的大寫字母為目標基因序列，小寫字母為限制酵素序列。實驗目的欄內 P 代表啟動子，5 表示五端未轉譯區域，I 表示內插子，3 表示三端未轉譯區域。

Leaves			Roots		
Name	Gus activity Mean \pm Stander Error	Fold change	Name	Gus activity Mean \pm Stander Error	Fold change
U3.1	24.07 \pm 1.87	80.2	U3.1	40.19 \pm 3.13	19.6
U3.2	0.65 \pm 0.05	2.1	U3.2	2.08 \pm 0.16	1.01
U3.3	0.4 \pm 0.02	1.3	U3.3	1.96 \pm 0.15	0.95
U4.1	4.67 \pm 0.69	15.5	U4.1	6.36 \pm 0.41	3.1
U4.4	22.43 \pm 3.18	74.7	U4.4	15.36 \pm 0.49	7.5
U4.5	7.78 \pm 1.74	25.9	U4.5	4.97 \pm 0.89	2.4
U4.2	30.45 \pm 2.2	101.5	U4.2	28.76 \pm 2.1	14.02
U4.3	15.81 \pm 0.76	52.7	U4.3	11.27 \pm 0.25	5.5
U4.6	14.61 \pm 2.53	48.7	U4.6	10.74 \pm 1.84	5.2
Col.	0.30 \pm 0.019	1	Col.	2.05 \pm 0.12	1

表二 *UBQ3* 與 *UBQ4* 轉植株之 GUS 定量結果

利用偵測轉植株所表現的 GUS 活性，研究 *UBQ3* 與 *UBQ4* 的基因表現除了受啟動子調控以外，內插子與五端未轉譯區域是否也有調控的能力。實驗使用 14 日齡之轉植株，將根與葉片分開測定，各品系皆各使用 4~6 株，野生型(Col.)則使用 3 株。而每株樣品皆重複測定 3 次後，計算 GUS 活性(GUS activity)的平均值(mean)與標準誤差(stander error)，實驗結果單位為 pmol /min / μ g protein。並以野生型 GUS 活性做基準，分析 *UBQ3* 與 *UBQ4* 轉植株 GUS 活性的表現(Fold change，轉植株/野生型)。

Promoter	<i>UBQ3</i>	<i>UBQ4</i>	<i>UBQ10</i>	<i>UBQ11</i>	<i>UBQ14</i>
<i>UBQ3</i>		8	14	10	12
<i>UBQ4</i>			8	8	8
<i>UBQ10</i>				21	31
<i>UBQ11</i>					16
<i>UBQ14</i>					
5'-UTR	<i>UBQ3</i>	<i>UBQ4</i>	<i>UBQ10</i>	<i>UBQ11</i>	<i>UBQ14</i>
<i>UBQ3</i>		2	2	2	2
<i>UBQ4</i>			3	2	2
<i>UBQ10</i>				2	2
<i>UBQ11</i>					2
<i>UBQ14</i>					
Intron	<i>UBQ3</i>	<i>UBQ4</i>	<i>UBQ10</i>	<i>UBQ11</i>	<i>UBQ14</i>
<i>UBQ3</i>		4	4	4	4
<i>UBQ4</i>			6	6	6
<i>UBQ10</i>				6	6
<i>UBQ11</i>					6
<i>UBQ14</i>					

表三 阿拉伯芥聚泛素基因序列之相似片段數目

五個聚泛素基因序列分為啟動子(Promoter)、五端未轉譯區域(5'-UTR)與內插子(Intron)三部份作比對，後計算其相似序列的片段數目。啟動子相似片段的長度自 10~45 bp 不等，五端未轉譯區域為 11~49 bp，內插子為 11~40 bp。

	位置	基因	序列資訊
1	4~30 bp	<i>UBQ3</i>	tattttctgattcttttgttttgat
	4~30 bp	<i>UBQ4</i>	cctgtttctctattgttattctatt
2	61~140 bp	<i>UBQ3</i>	gattattgaatctttgtataaattgctttgacaatattgttcgttcgtaatccagcttctaattttgcctgatt
	61~140 bp	<i>UBQ4</i>	tgtatgatgtccttggatgattgaatcgggaaattattgattccgtttcatctatgcttttctcgattctttgattat
3	175~251 bp	<i>UBQ3</i>	taatttctgcttgattgtgaaattaggattttcaaggacgatctattcaattttgtgtttctttgttcgattc
	170~246 bp	<i>UBQ4</i>	actaagatctctcaattcgtagttcgtcaggttttatgttttagtgatctttgtttgataagaagtaatatcg
4	306~376 bp	<i>UBQ3</i>	ttctcttacggcttttgatttggtatatgttcgctgattggtttctacttgttctattgtttatttcag
	316~386 bp	<i>UBQ4</i>	gatttcttatcacagttctagtttggtattttgctgatcgattactacttgcctctctccttcgcag

表四 *UBQ3*與*UBQ4*內插子之相異序列

利用MEME軟體比對出*UBQ3*與*UBQ4*內插子序列相似處後，扣除其相似處，得到四組內插子序列相異處，並將這四組序列的資訊與所在位置整理成表。

	<i>UBQ3</i>	<i>UBQ4</i>
1~100 bp	18.95	20.81
101~200 bp	9.339	21.36
201~300 bp	25.303	11.033
301~ end	8.28	8.966
50~150 bp	9.4	17.897
150~250 bp	14.055	13.548
250~350 bp	20.386	11.529

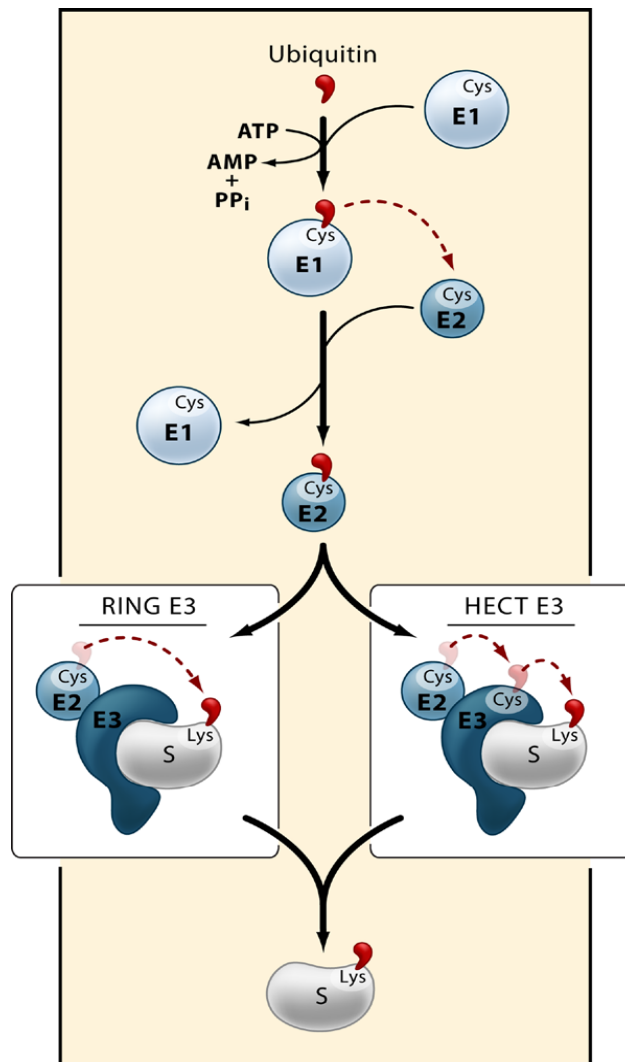
表五 *UBQ3*與*UBQ4*內插子序列之強化訊息分析

已有研究證明許多基因的內插子序列含有增強基因表現的強化訊息，所以我們利用IMEter分析*UBQ3*與*UBQ4*的內插子序列是否有強化訊息存在。取*UBQ3*與*UBQ4*的內插子序列，分為七份，以每段長度約100 bp進行分析，並將所得之數值整理為表。分析結果的數值越高者，表示序列帶有強化訊息的機率越高。在*UBQ3*的內插子序列中，以第1~100 bp與200~350 bp的位置帶有強化訊息的機率最高，而*UBQ4*的第100~200 bp內插子序列的機率最高。

	Mutant Mean \pm Stander Error	Stimulus Mean \pm Stander Error
<i>UBQ3</i>	1.25 \pm 0.09	1.2 \pm 0.06
<i>UBQ4</i>	1.08 \pm 0.024	1.07 \pm 0.023
<i>UBQ10</i>	1.03 \pm 0.014	1.01 \pm 0.012
<i>UBQ11</i>	1.11 \pm 0.04	1.14 \pm 0.03
<i>UBQ14</i>	1.02 \pm 0.02	1.11 \pm 0.025

表六 聚泛素基因表現之微陣列資料分析

微陣列資料是聚泛素基因在不同突變株(mutant)中或接受環境刺激(stimulus)後的表現，扣除對照組所得的比值(Ratio)。我們整理所得的數值並計算平均值(mean)與標準誤(stander error)，並從結果分析聚泛素基因的表現。基因表現的分數以1為標準值，當平均值越高或越低，代表此基因的表現量越容易受外在因素的影響或其他基因的改變而有波動；標準誤越大，代表基因表現量的變異性越大。在此分析中，所有聚泛素基因的表現量都相當穩定，但是聚泛素基因中*UBQ3*的表現量最容易受到其他因素所影響；而*UBQ10*則是表現最穩定的聚泛素基因。



(Hochstrasser M., 2006)

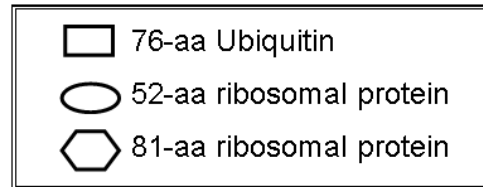
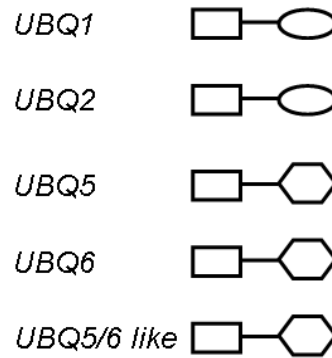
圖一 泛素化作用機制

首先，泛素羧基端上的甘胺酸會和泛素激活酵素(E1)的半胱胺酸結合，促使泛素活化。接著，泛素接合酵素(E2)，會取代E1與泛素結合，讓E1恢復原本的狀態以再次進行活化泛素的工作。之後，泛素連接酶(E3)會和帶有泛素的E2接合，幫助泛素鍵結到蛋白受質(S)上。而E3分為二種，一種是RING (Really Interesting New Gene) E3，另一種為HECT (Homologous to E6AP C-Terminus) E3。RING E3只幫助E2和蛋白受質接合，泛素會直接從E2轉移到蛋白受質上；但若是和HECT E3作用，泛素會先從E2接到E3上後，再與蛋白受質接合，以進行泛素化作用。

(A) 聚泛素基因

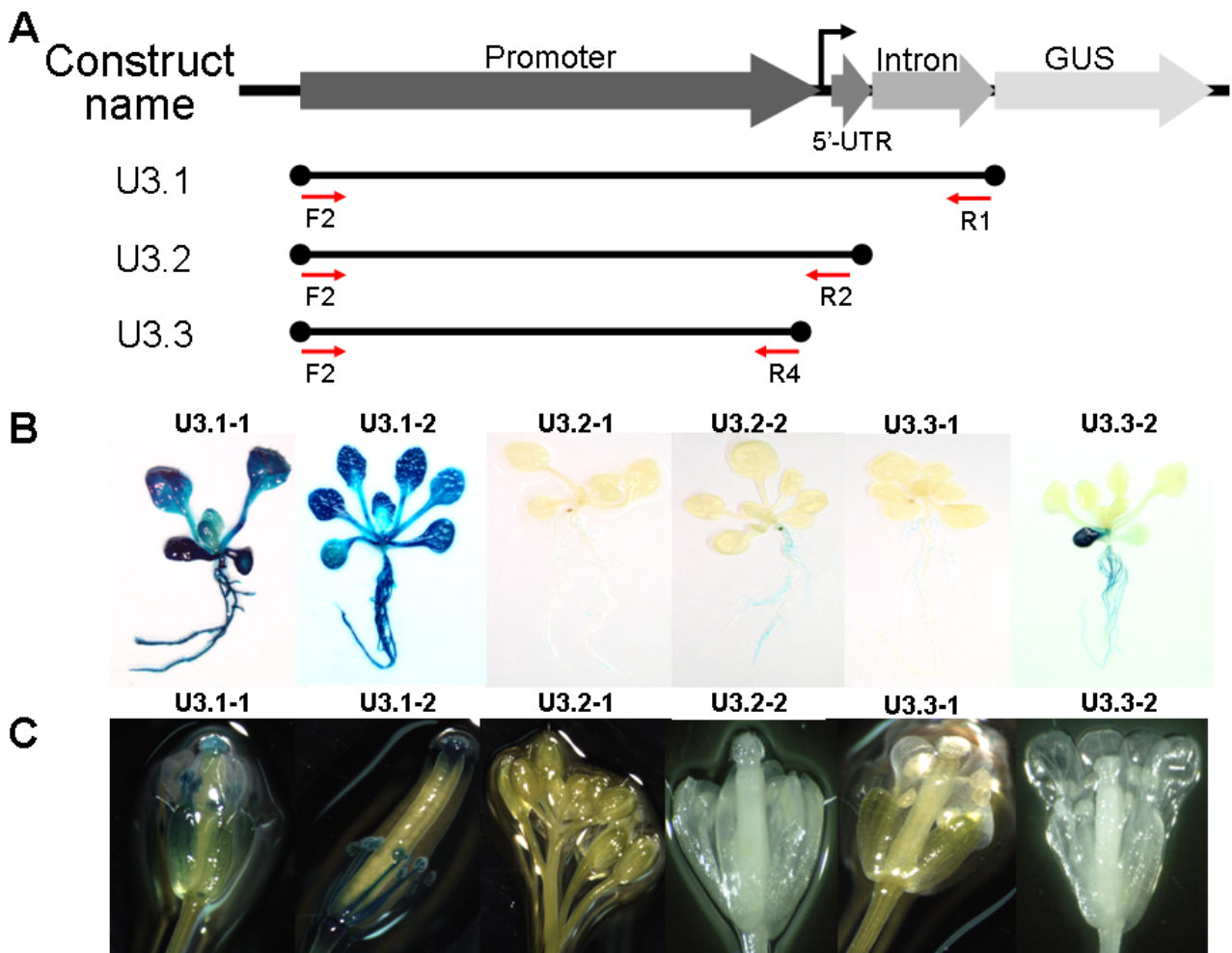


(B) 泛素延伸基因



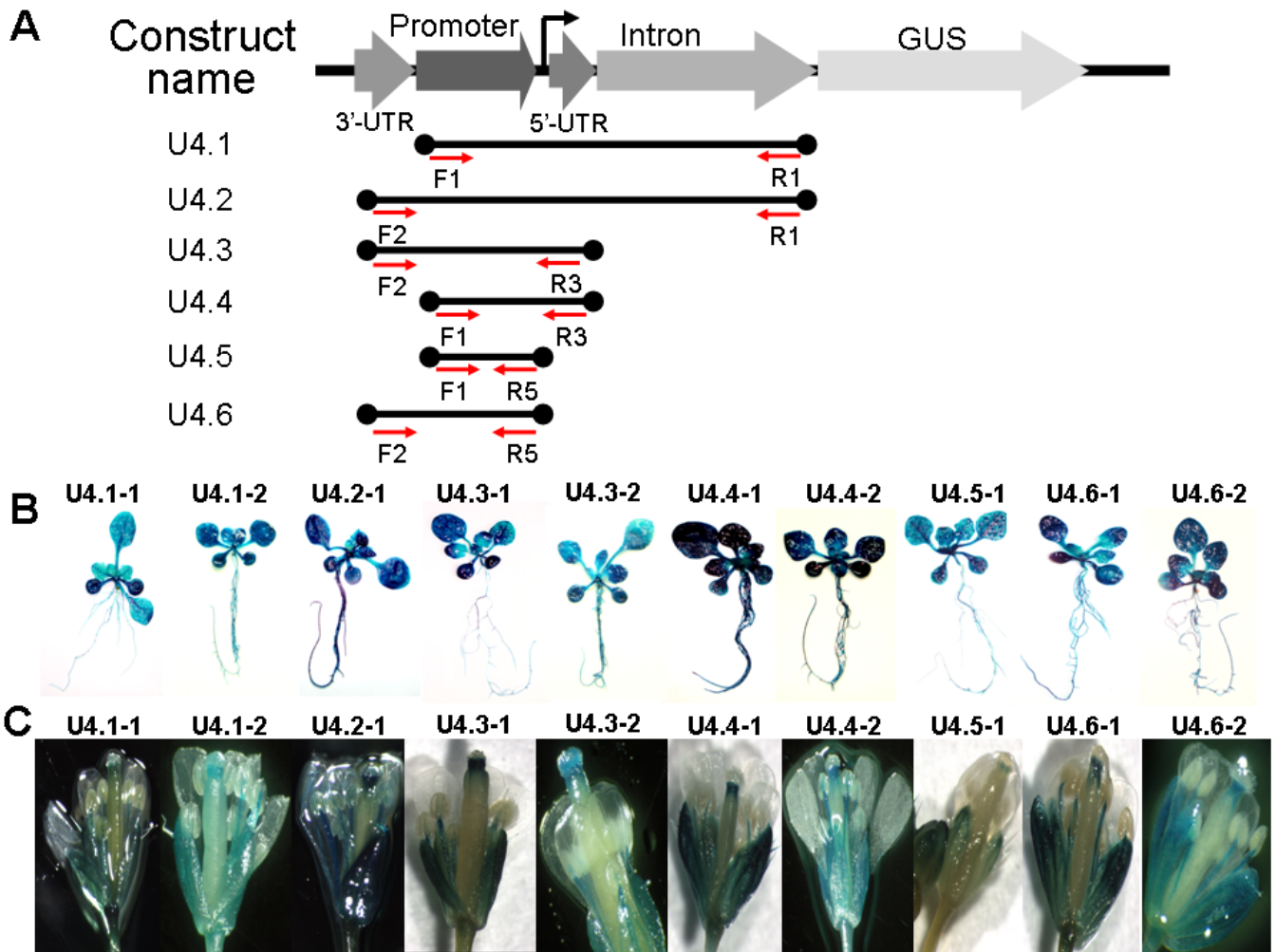
圖二 阿拉伯芥聚泛素基因與泛素延伸基因之結構

阿拉伯芥中共包含五個聚泛素基因(*UBQ3*、*UBQ4*、*UBQ10*、*UBQ11*與*UBQ14*)與五個泛素延伸基因(*UBQ1*、*UBQ2*、*UBQ5*、*UBQ6*與*UBQ5/6 like*)。(A)聚泛素基因是重複2個以上的泛素序列所組成，聚泛素基因分類的特徵是各基因所生成蛋白質之羧基端會帶有不同的胺基酸，*UBQ3/UBQ4*接有絲胺酸(*serine, S*)和苯基丙胺酸(*phenylalanine, F*)，而另一類只接有苯基丙胺酸(*phenylalanine, F*)。(B)泛素延伸基因是由一個泛素基因接著一個形成核糖蛋白(*ribosome protein*)的序列所組成。這一類可以再分成二種，第一種是泛素序列接一個形成52個胺基酸的核糖蛋白基因，稱為*RPL40 (60S ribosomal protein L40)*，而另一種則是形成一個81個胺基酸核糖蛋白，稱為*RPS27 (40S ribosomal protein S27)*。



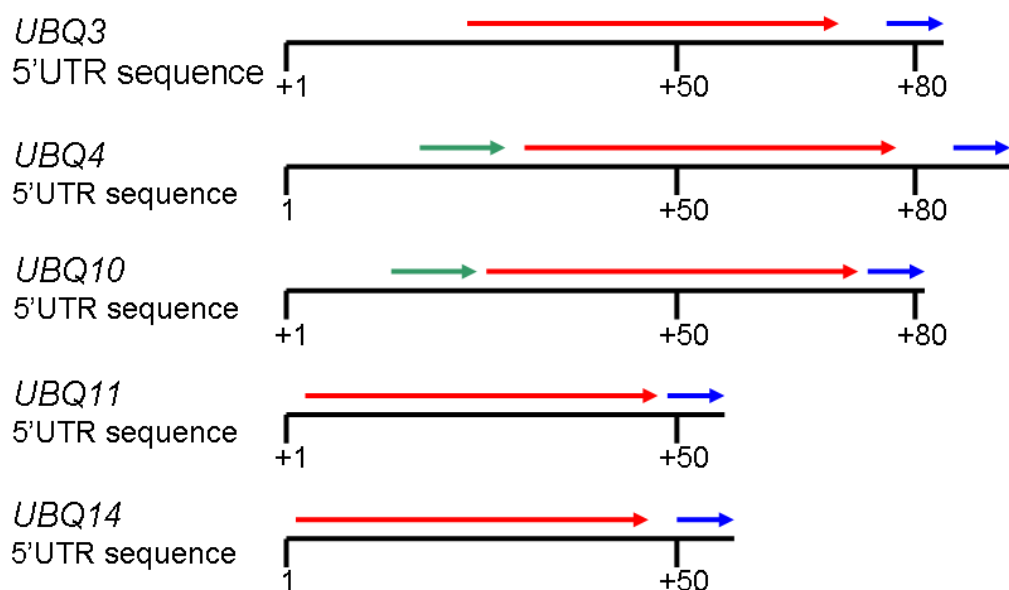
圖三 *UBQ3* 啟動子連接不同組合五端未轉譯區域/內插子之構築序列

A: 研究五端未轉譯區域/內插子是否會影響 *UBQ3* 基因表現所構築的三種不同質體。U3.1 為全長，U3.2 為去除內插子序列，而 U3.3 則是只有啟動子序列之質體。紅色箭頭為目標序列的引子。B: 各質體所篩選出之 14 日齡轉殖株，經由 GUS 染色後的結果，其編號所代表的質體內容與 A 相同。U3.1-1/U3.1-2 都是轉殖 U3.1 序列的轉殖株，但因插於不同基因體(genome)位置中，所以加上編號區別，而 U3.2-1/U3.2-2、U3.3-1/U3.3-2 也是相同原因。*UBQ3* 在植物全株幾乎都有表現，但去除內插子後，表現量有明顯的下降。再進一步去除五端未轉譯區域後，仍維持與去除內插子相似的表現量。C: 各轉殖株的花朵組織，經由 GUS 染色後的結果，其編號所代表的質體內容與 A 相同。*UBQ3* 會在萼片、花絲、花藥與柱頭等部份表現。但去除內插子後，在花朵上的表現幾乎完全消失。且進一步去除五端未轉譯區域後，仍維持與去除內插子相似的表現量。



圖四 *UBQ4*啟動子連接不同組合五端末轉譯區域/內插子之構築序列

A:研究五端末轉譯區域/內插子是否會影響*UBQ4*基因表現所構築的六種不同質體。U4.1、U4.4與U4.5分別是全長、去除內插子與只有啟動子序列；U4.2、U4.3與U4.6則是全長、去除內插子與只有啟動子序列外，另加上前方之*GLP3*基因的三端末轉譯區域(3'UTR)。紅色箭頭為目標序列的引子。B:各質體所篩選出之14日齡轉植株，經由GUS染色後的結果，其編號所代表的質體內容與A相同。U4.1-1/U4.1-2都是轉殖U4.1序列的轉植株，但因插於不同基因體(genome)位置中，所以加上編號區別，而U4.3-1/U4.3-2、U4.4-1/U4.4-2、U4.6-1/U4.6-2也是相同原因。*UBQ4*的基因表現在營養組織中，無論是去除內插子或進一步去除五端末轉譯區域皆無明顯的影響。C:各轉植株的花朵組織，經由GUS染色後的結果。從圖片結果可發現，*UBQ4*會在柱頭、花絲、萼片與成熟的花瓣等部分表現。去除內插子與五端末轉譯區域後，沒有明顯影響*UBQ4*在花朵的表現。



圖五 比對阿拉伯芥聚泛素基因之五端未轉譯區域序列

將阿拉伯芥內的五個聚泛素基因之五端未轉譯區域序列利用MEME軟體分析，尋找相似的序列。圖中的箭頭各代表所找到的相似序列，並以其所在的位置(黑色線條代表核苷酸序列，下方數字為位置)作圖；相同顏色代表同一組相似序列。

A

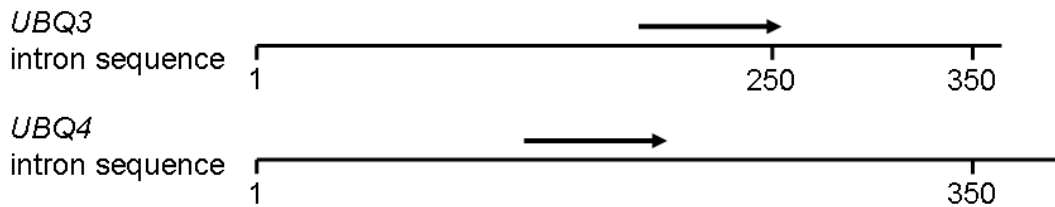
UIE1: TTTGTGTTTTCTTTGTTTCGATTCTCTCT

AGI	Name	Sequence
AT5G03240	UBQ3	TATTCAATT <u>TTTGTGTTTT</u> CTTTGTTTCGATTCTCTCTGTTTT
AT5g20620	UBQ4	TATCTCGAT <u>TTTATGATTT</u> TAGGAATACTAAGATCTCTCAAT

B



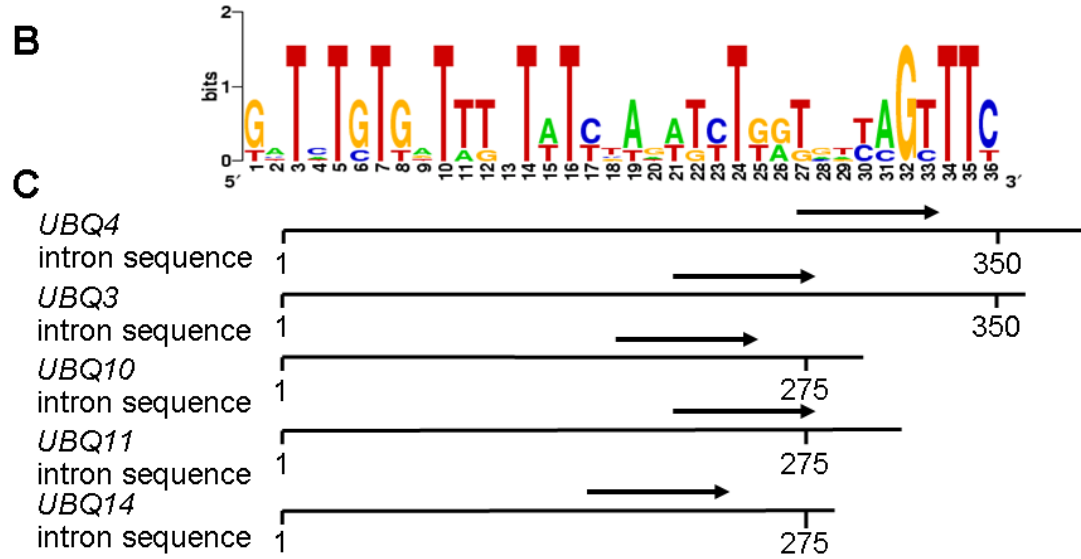
C



圖六 內插子調控序列UIE1之序列資訊、相似度與位置

A圖為ubiquitin intron element 1 (UIE1)的序列，下引線標記之核苷酸是被選定的順式作用元素序列。UIE1的相似序列較短，故加入後段18個核苷酸序列以增加長度。B圖為分析序列的相似度。C圖是標示UIE1序列在UBQ3/4內插子的相對位置。

A UIE2: GTTCTCTGGTTTGTTTTGATTTCTTATCACAGTTTC
UBQ4 TCAGTTCTCTGGTTTGTTTTGATTTCTTATCACAGTTTC TAGTTTG
UBQ3 TTC TCTCTGTTTTAGGTTTCTTATGTTTAGATCCGTTTC TCTTTGG
UBQ10 TTC GATTTGTGATTTCTATCTAGATCTGGTGTAGTTTC TAGTTTG
UBQ11 TTT GATCTGTGATTTTTATCTAGATTTGGTGTAGTTTC TTGTTTG
UBQ14 TCC GATATGTGATTTATATTAGATCTGGTGGTAGCTTT TTTAATC



圖七 內插子調控序列UIE2之序列資訊、相似度與位置

A圖為ubiquitin intron element 2 (UIE2)的序列，下引線標記之核苷酸是被選定的順式作用元素序列。B圖為分析序列的相似度。C圖是標示UIE2序列在*UBQ3*、*UBQ4*、*UBQ10*、*UBQ11*與*UBQ14*內插子的相對位置。

A

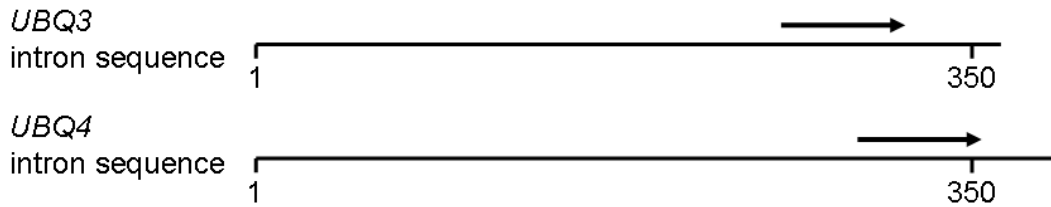
UIE3: GTTCGCTGATTGGTTTCTACTTGTTCTA

AGI	Name	Sequence
AT5G03240	UBQ3	GTATATGTTTC <u>GCTGATTGGTTTCTACTTGTTCT</u> ATTGTTTTA
AT5G20620	UBQ4	GGTTATTTTTT <u>GCTGATCGATTACTACTTGCTC</u> TCTTCCTTCG

B



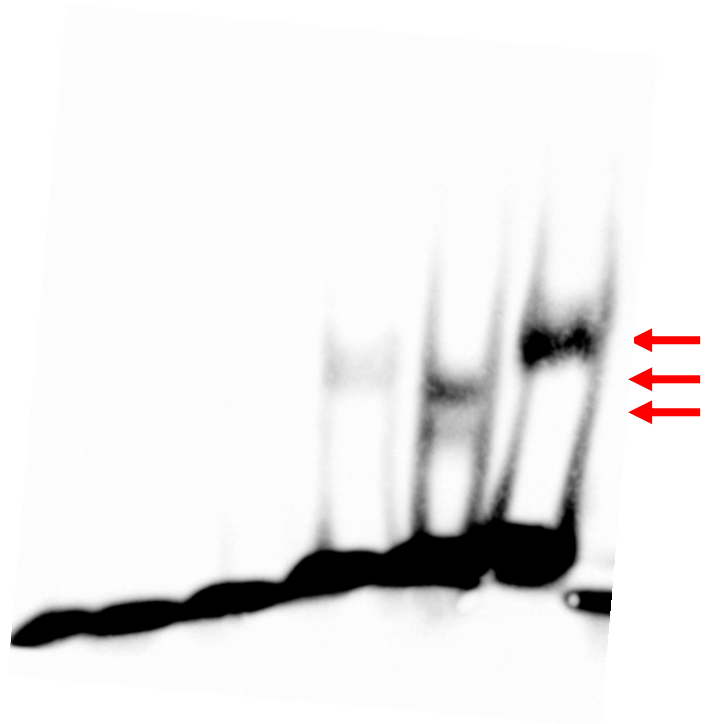
C



圖八 內插子調控序列UIE3之序列資訊、相似度與位置

A圖為ubiquitin intron element 3 (UIE3)的序列，下引線標記之核苷酸是被選定的順式作用元素序列，因UIE3的相似序列較短，故在前端加入4個與後端加入2個核苷酸序列增加長度。B圖為分析序列的相似度。C圖是標示UIE3序列在UBQ3/4內插子的相對位置。

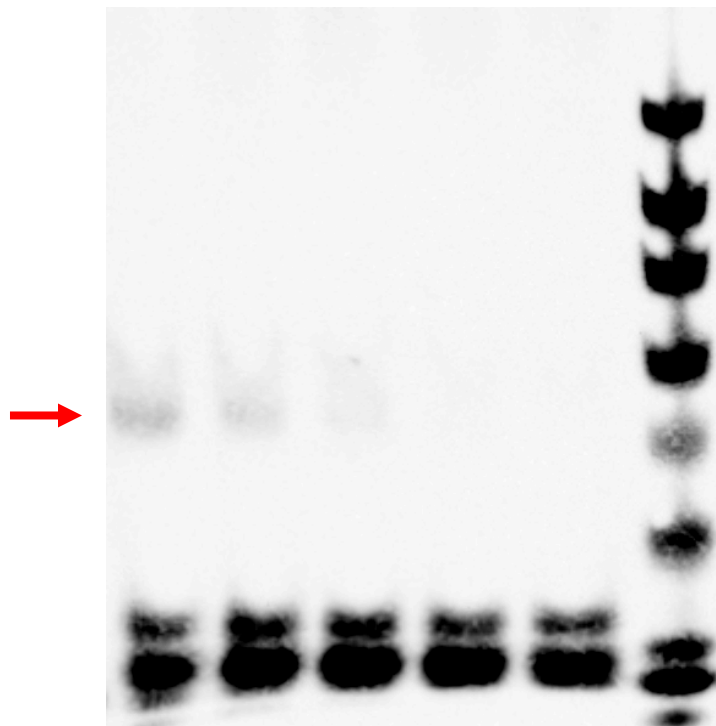
40 fmol labeled dsDNA	+	+	+	+	+	+
1 µg polydI/dC	+	+	+	+	+	+
5 µg total protein				+	+	+



圖九 內插子序列與總蛋白質之交互作用結果

圖自左開始，分別是 ubiquitin intron element 1 (UIE1,左一)、ubiquitin intron element 3 (UIE3,左二)與 ubiquitin intron element 2 (UIE2,左三)三個 cis-acting elements。後三者(左四、左五與左六)為 UIE1、UIE3 與 UIE2 與總蛋白交互作用之結果。紅色箭頭標示出這三個調控序列和蛋白質作用，使核苷酸序列位移的位置。

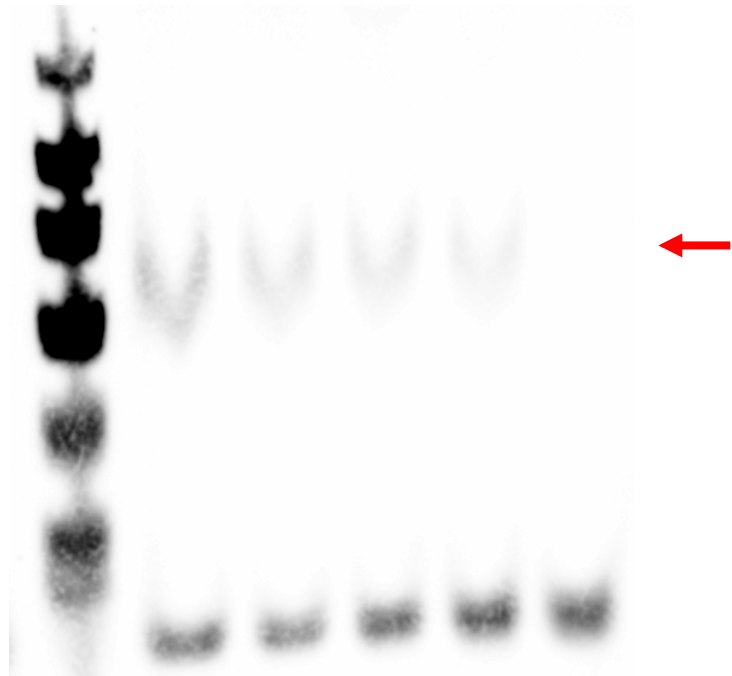
5 fmol labeled dsDNA	+	+	+	+	+
5x unlabeled dsDNA		+			
25x unlabeled dsDNA			+		
125x unlabeled dsDNA				+	
625x unlabeled dsDNA					+
1 µg polydI/dC	+	+	+	+	+
5 µg total protein	+	+	+	+	+



圖十 UIE1之總蛋白質競爭實驗結果

為證明UIE1是否真為順式作用元素，所以在核苷酸和總蛋白質的交互作用實驗中，加入5倍(左二)、25倍(左三)、125倍(左四)、625倍(左五)不等，沒有標記之雙股核苷酸參與實驗，觀察是否有競爭的情況發生；另外並做一組沒有競爭之實驗(左一)，作為對照。紅色箭頭標示為序列和蛋白質作用，使核苷酸序列位移的位置。從結果發現，加入沒有標記之雙股核苷酸參與實驗後，冷光標記之核苷酸序列位移的數量開始逐漸減少(左二至左三)，尤其至125倍(左四)時，核苷酸序列位移的現象完全消失，表示UIE1為一順式作用元素。

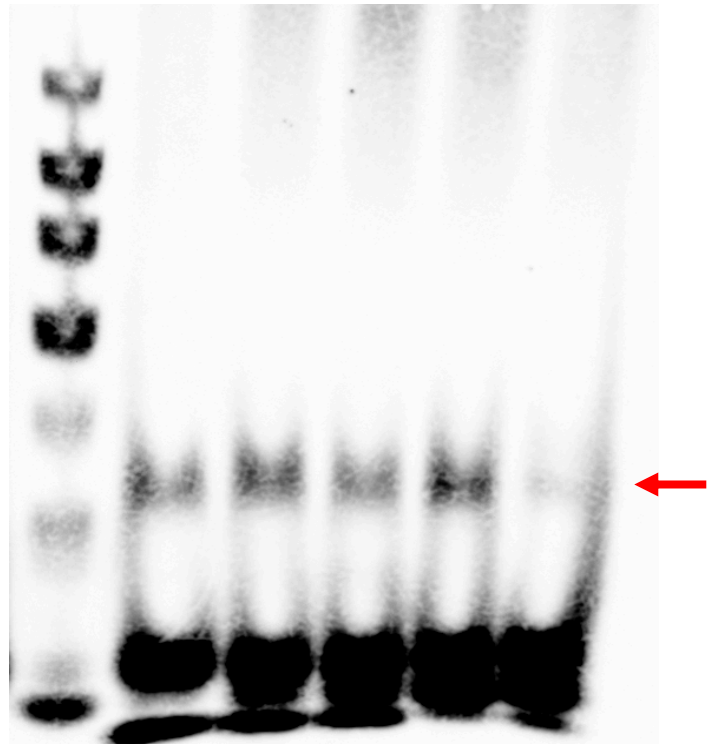
5 fmol labeled dsDNA	+	+	+	+	+
5x unlabeled dsDNA		+			
25x unlabeled dsDNA			+		
125x unlabeled dsDNA				+	
625x unlabeled dsDNA					+
1 μg polydI/dC	+	+	+	+	+
5 μg total protein	+	+	+	+	+



圖十一 UIE2之總蛋白質競爭實驗結果

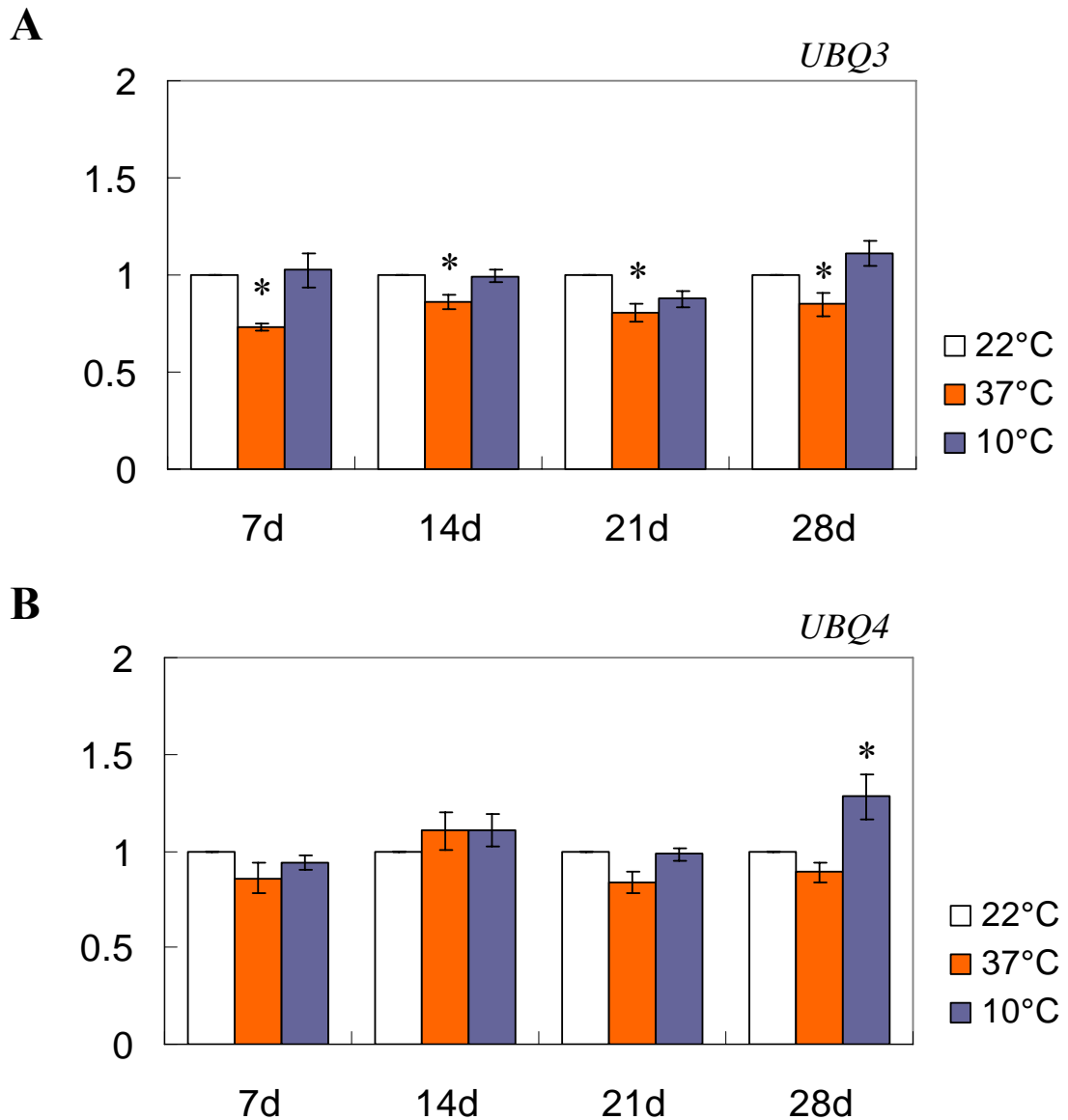
為證明UIE2是否真為順式作用元素，所以在核苷酸和總蛋白質的交互作用實驗中，加入5倍(左三)、25倍(左四)、125倍(左五)、625倍(左六)不等，沒有標記之雙股核苷酸參與實驗，觀察是否有競爭的情況發生；另外並做一組沒有競爭之實驗(左二)，作為對照。紅色箭頭標示為序列和蛋白質作用，使核苷酸序列位移的位置。從結果發現，加入沒有標記之雙股核苷酸參與實驗後，冷光標記之核苷酸序列位移的數量逐漸開始減少(左三至左五)，尤其至625倍(左六)時，核苷酸序列位移的現象完全消失，表示UIE2為一順式作用元素。

10 fmol labeled dsDNA	+	+	+	+	+
5x unlabeled dsDNA		+			
25x unlabeled dsDNA			+		
125x unlabeled dsDNA				+	
625x unlabeled dsDNA					+
1 μg polydI/dC	+	+	+	+	+
5 μg total protein	+	+	+	+	+



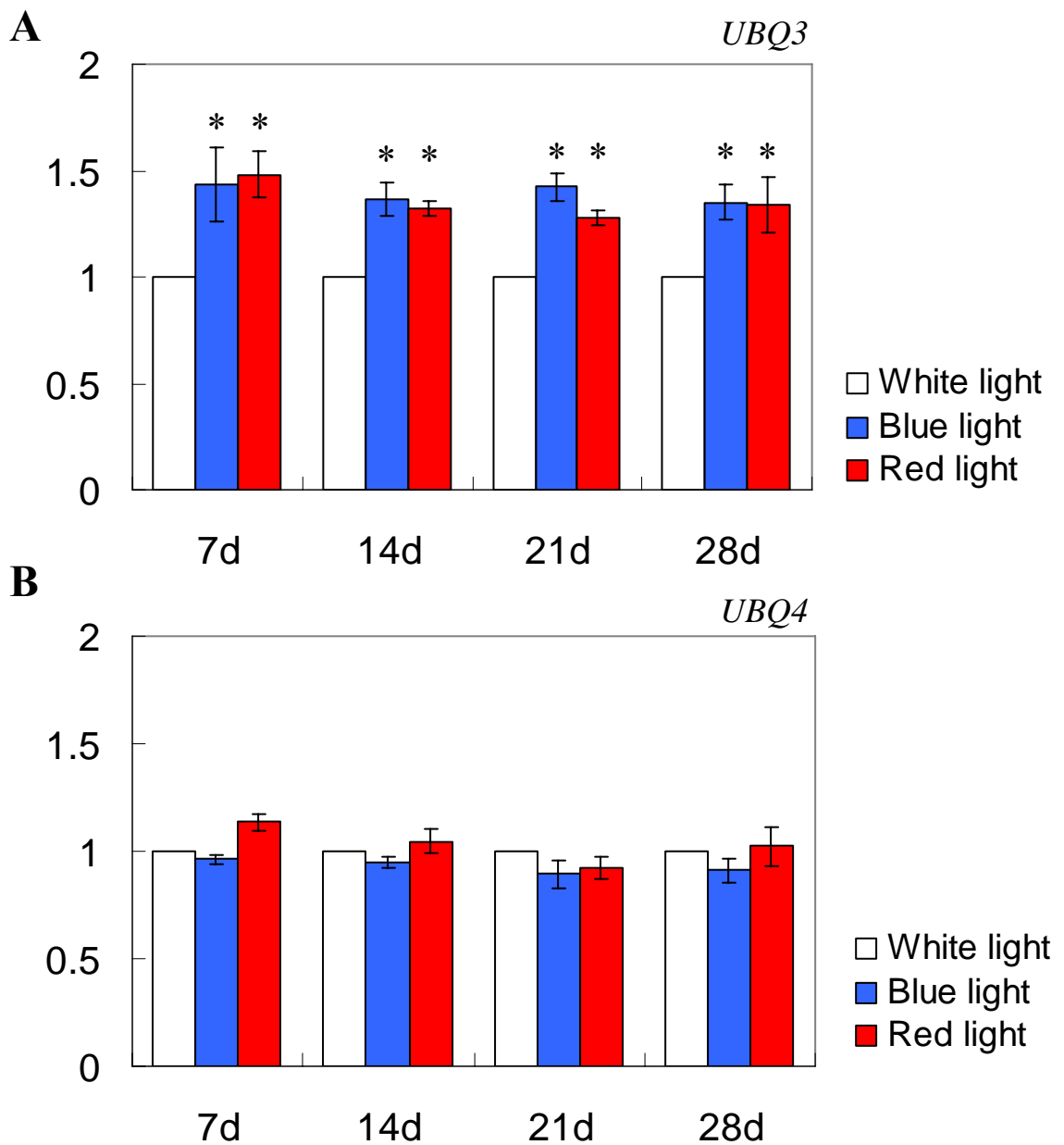
圖十二 UIE3之總蛋白質競爭實驗結果

為證明UIE3是否真為順式作用元素，所以在核苷酸和總蛋白質的交互作用實驗中，加入5倍(左三)、25倍(左四)、125倍(左五)、625倍(左六)不等，沒有標記之雙股核苷酸參與實驗，觀察是否有競爭的情況發生；另外並做一組沒有競爭之實驗(左二)，作為對照。紅色箭頭標示為序列和蛋白質作用，使核苷酸序列位移的位置。從結果發現，加入沒有標記之雙股核苷酸參與實驗後，冷光標記之核苷酸序列位移的數量並不會隨著競爭情況的增加而減少，直到625倍才明顯開始減少(左六)，且核苷酸序列位移的現象並未完全消失，這表示UIE3可能不是一順式作用元素。



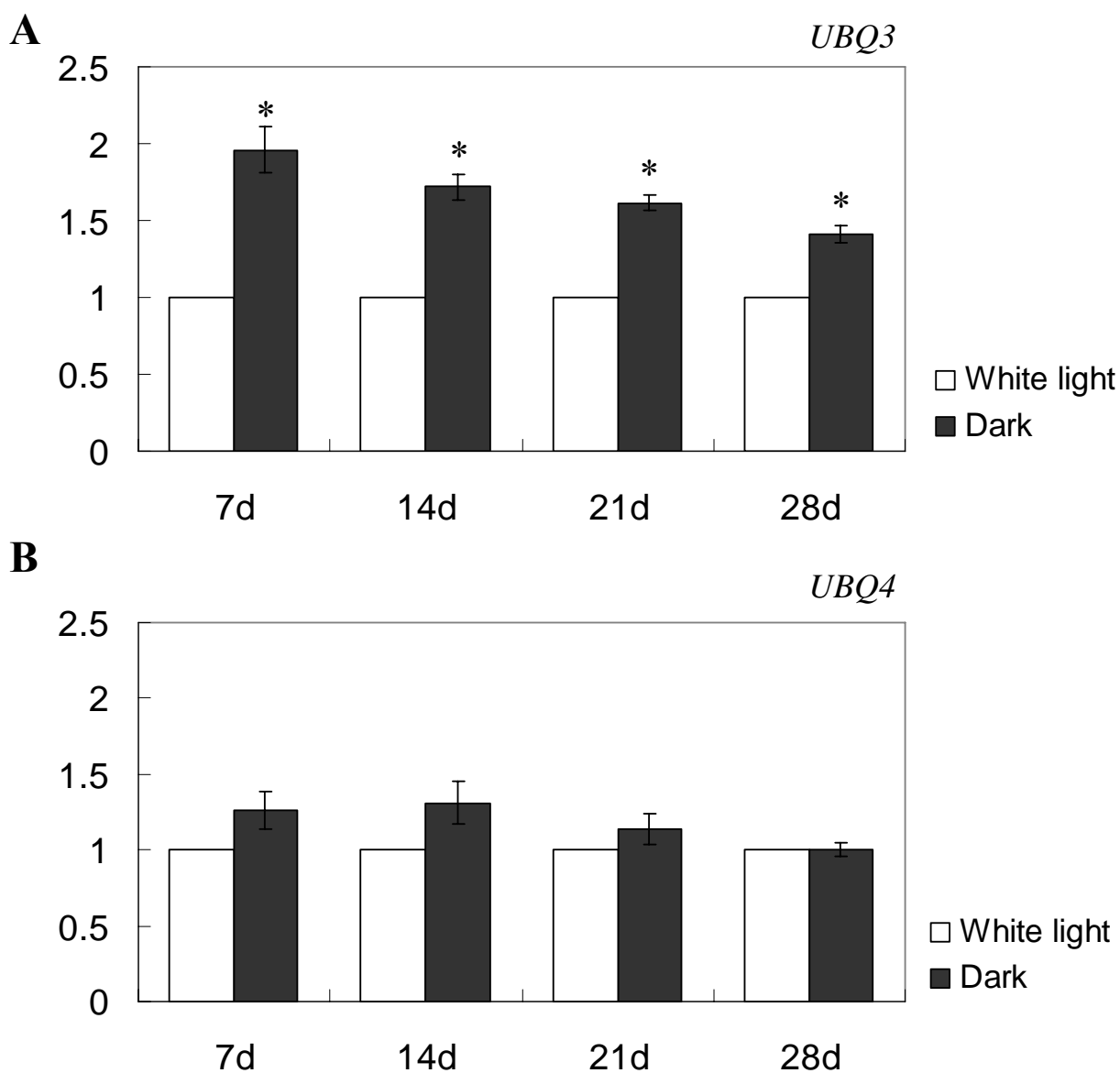
圖十三 溫度對阿拉伯芥 *UBQ3* 和 *UBQ4* 基因表現的影響

A 圖為 *UBQ3* 在 37°C、22°C 與 10°C 三種溫度處理後的基因表現量，而 B 圖為 *UBQ4* 的基因表現量。實驗共有三組實驗組，而每個實驗組皆重複二次以上的 RT-PCR 實驗。數據分析以 22°C 作為對照組，*UBQ10* 的表現作為內部控制組 (internal control)，以相對值的方式計算。結果資料是來自六次的數據作平均 (bar)，並計算其標準誤差值(error bar)，*為顯著差異(P<0.05)。



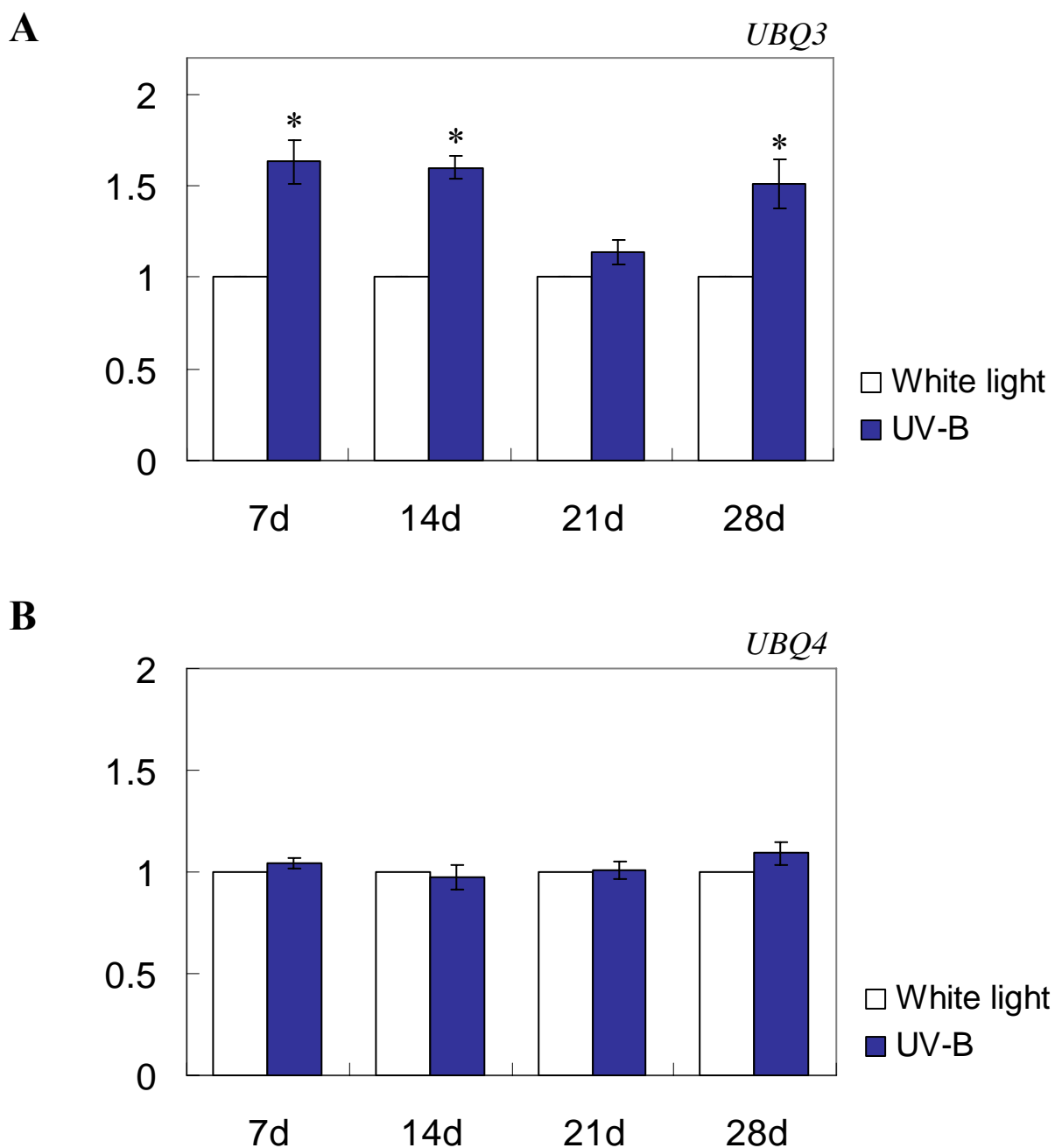
圖十四 藍光與紅光對*UBQ3*和*UBQ4*基因表現的影響

A圖為在藍光(Blue light)、紅光(Red light)與白光(White light)的環境下，*UBQ3*的基因表現結果，而B圖為*UBQ4*的基因表現結果。實驗共有三組實驗組，而每個實驗組皆重複二次以上的RT-PCR實驗。數據分析以白光作為對照組，*UBQ10*的表現作為內部控制組(internal control)，以相對值的方式計算；結果資料是來自四次的數據計算平均值(bar)，並計算其標準誤差值(error bar)，*為顯著差異($P < 0.05$)。



圖十五 黑暗處理對*UBQ3*和*UBQ4*基因表現的影響

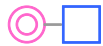




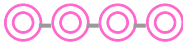












A圖為黑暗(dark)與白光(White light)處理後*UBQ3*的基因表現結果，而B圖則為*UBQ4*的基因表現結果。實驗共有三組實驗組，而每個實驗組皆重複二次以上的RT-PCR實驗。數據分析以白光(White light)作為對照組，*UBQ10*的表現作為內部控制組(internal control)，以相對值的方式計算；結果資料是來自五次的數據作平均(bar)，並計算其標準誤差值(error bar)，*為顯著差異($P < 0.05$)。



圖十六 紫外線(UV-B)處理對*UBQ3*和*UBQ4*基因表現的影響

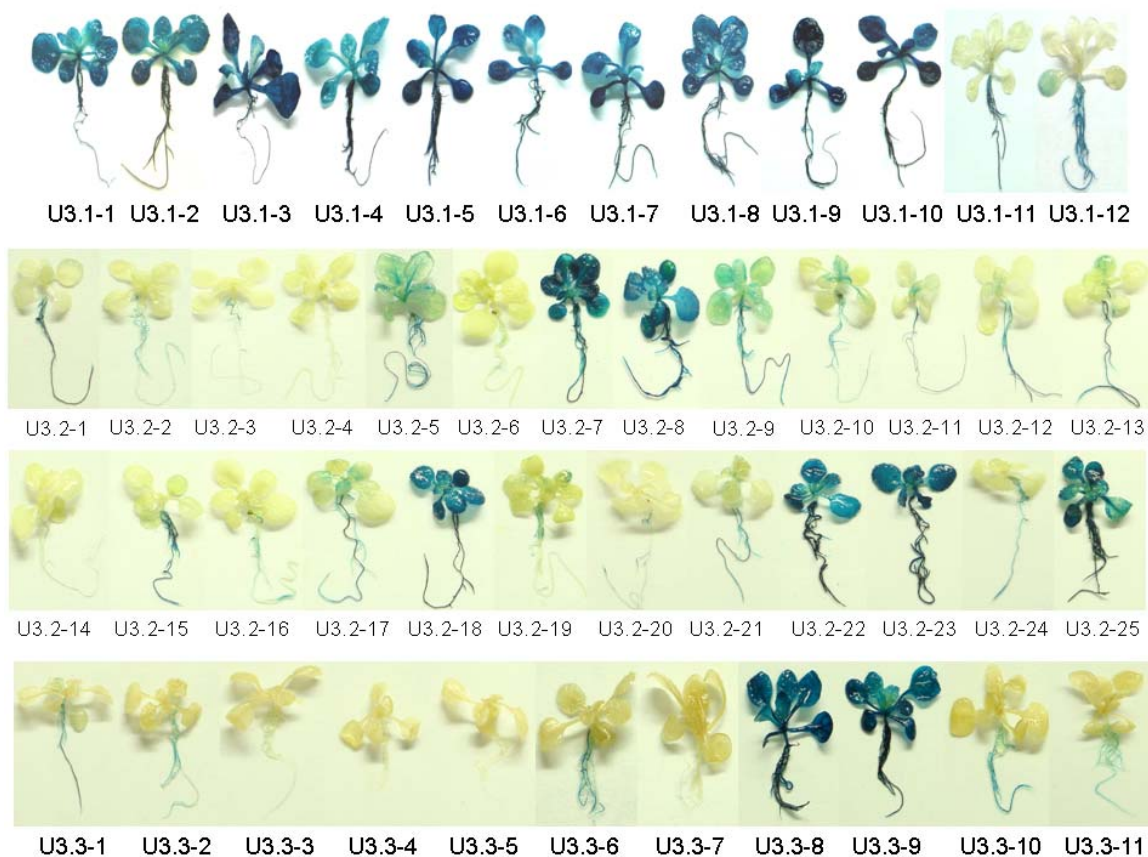
A圖為紫外線(UV-B)與白光(White light)處理後*UBQ3*的基因表現結果，B圖為*UBQ4*的基因表現結果。實驗共有三組實驗組，而每個實驗組皆重複二次以上的RT-PCR實驗。數據分析以白光(White light)作為對照組，*UBQ10*的表現作為內部控制組(internal control)，以相對值的方式計算；結果資料是來自五次的數據作平均(bar)，並計算其標準誤差值(error bar)，*為顯著差異($P < 0.05$)。

附錄

	AGI number	Name	Domain architecture
Ubiquitin extension genes	AT3G52590	<i>UBQ1</i>	
	AT2G36170	<i>UBQ2</i>	
	AT3G62250	<i>UBQ5</i>	
	AT2G47110	<i>UBQ6</i>	
	AT1G23410	<i>UBQ5/6 like</i>	
Polyubiquitin genes	AT5G03240	<i>UBQ3</i>	
	AT5G20620	<i>UBQ4</i>	
	AT4G05320	<i>UBQ10</i>	
	AT4G05050	<i>UBQ11</i>	
	AT4G02890	<i>UBQ14</i>	
Ubiquitin-like genes	AT1G31340	<i>RUB1/UBQ15</i>	
	AT2G35635	<i>RUB2/UBQ7</i>	
Pseudogenes	AT3G09790	<i>UBQ8</i>	
	AT5G37640	<i>UBQ9</i>	
	AT1G55060	<i>UBQ12</i>	
	AT1G65350	<i>UBQ13</i>	
	AT1G11980	<i>RUB3</i>	
	AT1G53930	T18A20.19	

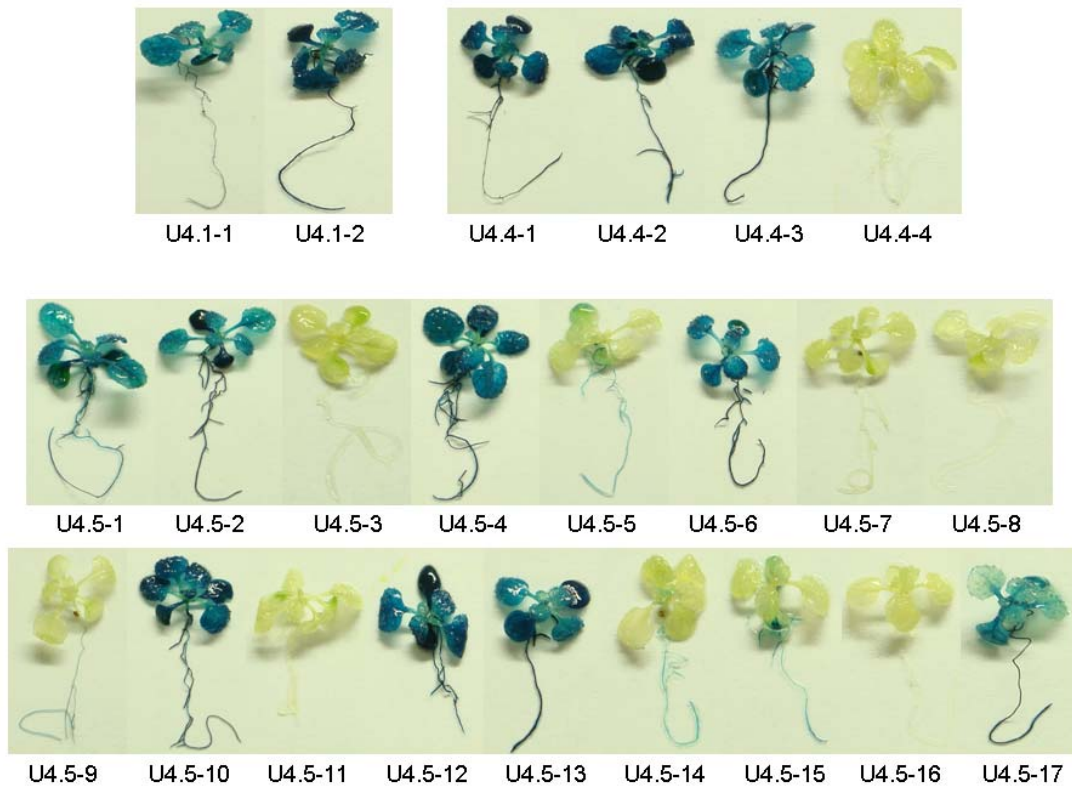
附錄一 阿拉伯芥泛素基因家族

本表參考自Bachmair等人於2001年提供的資料，並加入近年更新的相關資訊。泛素基因家族可以分為四類，分別為ubiquitin extension genes、polyubiquitin genes、ubiquitin-like genes與pseudogenes，它們擁有不同的基因結構方式。◎代表泛素，□為核糖蛋白RPL40，■代表核糖蛋白RPS27。不同顏色的○代表不同種類的RUB (related to ubiquitin)或SUMO (small ubiquitin-like modifiers)，◎為類泛素。



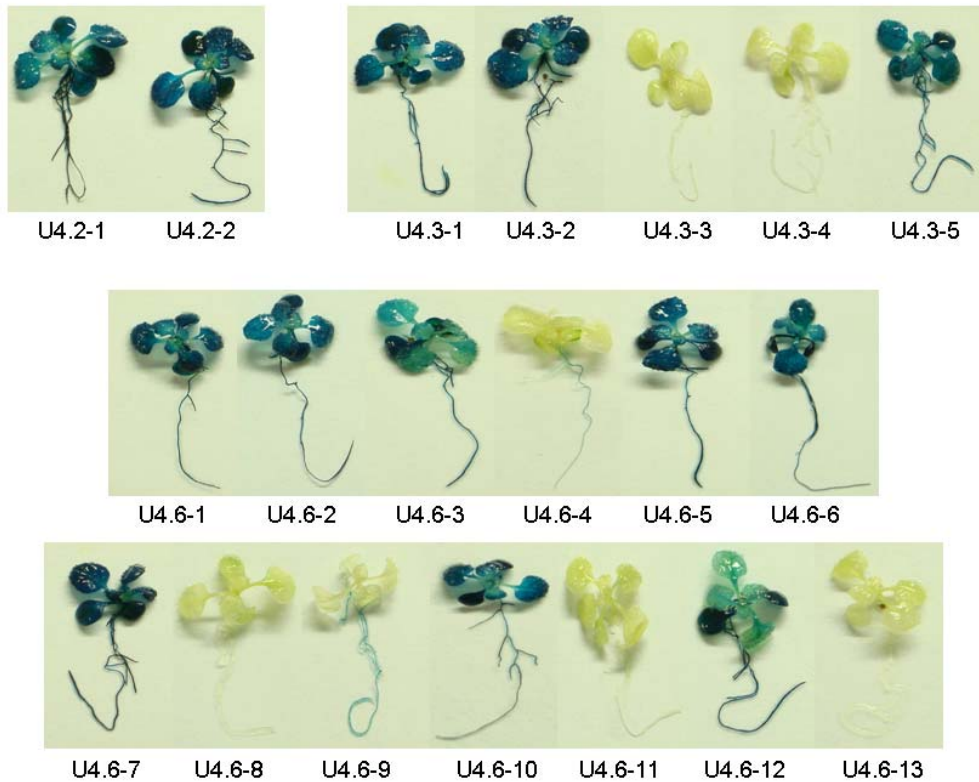
附錄二 14天齡含U3.1、U3.2或U3.3序列的不同品系轉殖株之GUS染色結果

各品系轉殖株皆已利用PCR技術確定目標質體有轉殖入阿拉伯芥的基因體中，其中U3.1共獲得12種插入不同基因體位置的轉殖株，U3.2獲得25種，而U3.3獲得11種。從染色結果發現，U3.1的10種品系轉殖株擁有相似的表現位置與表現量(U3.1-1~10)，不過有2種品系的表現量較低(U3.1-11與U3.1-12)，這可能是U3.1序列插入不同基因體位置所導致。相同的情況也發生在U3.2：17種品系有相似的表現量(U3.2-1~3、5~6、9~13、15~17、19~21與24)，另外有6種品系有較高的表現量(U3.2-7~8、18、22~23與25)，與2種品系不表現(U3.2-4與14)。而U3.3轉殖株有6種品系表現量相似(U3.3-1~3、6、10~11)，2種品系表現量較高(U3.3-8~9)與3種品系不表現(U3.3-4~5與7)。



附錄三 14天齡含U4.1、U4.4或U4.5序列的不同品系轉殖株之GUS染色結果

各品系轉殖株皆已利用PCR技術確定目標質體有轉殖入阿拉伯芥的基因體中，其中U4.1共獲得2種插入不同基因體位置的轉殖株，U4.4獲得4種，而U4.5獲得17種。從染色結果發現，U4.1的2種品系轉殖株之表現位置與表現量皆相似(U4.1-1與2)；而U4.4的3種品系轉殖株具有相似的表現位置與表現量(U4.4-1~3)，但有1種轉殖株品系不表現(U4.4-4)，這可能是U4.4序列插入不同基因體位置所導致。相同的情況也發生在U4.5：8種品系有相似的表現量(U4.5-1~2、4、6、10、12~13與17)，另外有4種品系的表現量較低(U4.5-5、9、14~15)，與5種品系不表現(U4.5-3、7~8、11與16)。



附錄四 14天齡含U4.2、U4.3或U4.6序列的不同品系轉殖株之GUS染色結果

各品系轉殖株皆已利用PCR技術確定目標質體有轉殖入阿拉伯芥的基因體中，其中U4.2共獲得2種插入不同基因體位置的轉殖株，U4.3獲得5種，而U4.6獲得13種。從染色結果發現，U4.2的2種品系轉殖株之表現位置與表現量皆相似(U4.2-1與2)；而U4.3的3種品系轉殖株具有相似的表現位置與表現量(U4.3-1~2與5)，但有2種轉殖株品系不表現(U4.3-3~4)，這可能是U4.3序列插入不同基因體位置所導致。相同的情況也發生在U4.6：8種品系有相似的表現量(U4.6-1~3、5~7、10與12)，另外有2種品系的表現量較低(U4.6-4與9)，與3種品系不表現(U4.6-8、11與13)。