

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系



碩士論文

Department of Agronomy

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

水稻花藥專一性啟動子之分析

Analysis of Rice Anther-Specific Promoter

楊哲嘉

Zhe-Jia Yang

指導教授：常玉強 博士

Advisor: Yuh-Chyang Charng, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July, 2016



致謝

時光荏苒，轉眼兩年的碩士班生活就要劃下句點，在這段期間，承蒙很多人的鼓勵與幫助，讓我得以順利完成這本論文。首先，要感謝指導老師常玉強老師，從大三進入實驗室開始，老師總是耐心教導並適時提供協助。感謝口試委員杜鎮老師與黃文達老師細心審閱論文並在口試時提供寶貴的意見，使這本論文更加完善。

謝謝實驗室琇淳學姊細心教導，並且在我遇到實驗難題時不厭其煩地協助我解決，並且總能切中問題的核心。謝謝峻愷學長、好青學姊、書維學長、心潔學姊、孟軒學長、龍欣學姊以及瑋泓同學，不僅在實驗操作上提供建議，也讓每次的實驗室聚餐充滿歡笑。謝謝學妹欣怡及怡文，協助實驗的進行。

除了實驗室之外，也謝謝 B99 與 R03 同學們在課業及生活上的支持，特別是敬屏、松翰、聖凱、羽晨、爾傑、鎧蔚，時而互相吐槽時而互相打氣，提供繼續往前的動力。謝謝系館提供我休息喘口氣的其他實驗室，R215、R308 以及 R315，尤其是 R315 丘原、纈琪、薇云、皓鈞、博雅，有大家在的 R315 是調劑生活的最佳去處。

感謝家人們的支持及鼓勵，讓我無後顧之憂地專注在學校研究與學習，才得以順利完成這本論文。最後感謝求學過程中所有曾經幫助、鼓勵、督促過我的人，讓我可以繼續前進，完成碩士學位，謝謝。

中文摘要



本研究自 SBS 轉錄體資料庫中選取一水稻花藥專一表現之基因(*Os08g43240*), 在其基因 5'端上游設計專一性引子, 以 PCR 方式擴增 1.5 kb 啟動子序列, 命名為 P19 啟動子。將啟動子序列自 5'端刪除為 1.2 kb、0.9 kb、0.6 kb、0.3 kb 片段, 分別接上含有報導基因 GUS 的 C1301 載體, 轉殖於水稻及菸草當中, 並以組織化學染色法分析轉殖兩種植物中 P19 啟動子表現的組織專一性。結果發現, P19 啟動子可以驅動 GUS 基因在水稻及菸草花藥組織中大量表現。根據序列刪減分析, 推測兩者的主要花藥發育調控序列不同, 水稻位於-300 bp 至-600 bp 片段中; 菸草則位於-300 bp 片段之內。另外, 在-1500 bp 至-2000 bp 片段則可能存在物種專一性的調控序列, 調控基因表現與否。除了花藥組織之外, P19 基因尚可驅動 GUS 基因於水稻的內穎、外穎、柱頭以及鱗被表現; 菸草也可在花萼、花瓣、柱頭、花柱、花絲、葉片等組織偵測到 GUS 活性。水稻在內外穎、鱗被的染色結果分別與菸草花萼、花瓣的結果相似; 雌性生殖器官也得到相似的表現結果, GUS 基因表現於柱頭而不在子房表現, 顯示 P19 啟動子在兩植物中對於上述器官的發育調節機制類似。較不一致的基因表現出現在葉片組織, 水稻的葉片除了 600 bp 片段啟動子之轉植株葉緣受刻傷逆境誘導之外, 其他均無明顯 GUS 表現; 菸草的葉片則大多有 GUS 表現, 顯示單雙子葉植物的葉片發育調控機制不同。綜合以上結果, P19 啟動子主要驅動基因表現在花藥中, 未來期望將 P19 啟動子應用於轉位子的基因鈎取系統當中, 藉此增進基因鈎取系統的生殖細胞專一性轉位。

英文摘要



In this study, a putative anther-specific promoter was cloned from a rice anther-specific gene (*Os08g43240*) based on SBS transcription database. Specific primers were designed to clone 1.5 kb upstream sequences of the target gene by PCR. The amplified putative promoter was named P19 promoter. Series deletion was conducted from 5' end of the promoter to acquire 1.2 kb, 0.9 kb, 0.6 kb and 0.3kb promoter fragments, which were individually ligated to GUS reporter gene in C1301vector and then introduced into rice and tobacco. Histochemical analysis was conducted to characterize the expression patterns of the series deletion promoters. The result of staining showed that P19-GUS expression was observed in anther, lemma, palea, stigma and lodicule of transgenic rice, while in anther, filament, sepal, petal, stigma and style of transgenic tobacco. The deletion analysis showed that the regulatory sequence of anther may be located in the region between -300 and -600 bp in transgenic rice and inside -300 bp in transgenic tobacco. In addition, a species-specific regulatory sequence of anther-specific expression may be located between -1500 and -2000 bp of P19 promoter. The GUS expression patterns in lemma, palea and lodicule of transgenic rice were similar to those in sepal and petal of transgenic tobacco. The same phenomena were also observed in pistils of transgenic rice and transgenic tobacco, which indicated that the developmental mechanisms of these tissues may be directed by P19 promoter in similar ways. Nevertheless, the GUS activities were detected in most all transgenic tobacco leaves while the activities were detected only by wounding treated transgenic rice leaves. The leaves staining results showed that the regulatory mechanism may be different between monocot rice and dicot tobacco. In conclusion, P19 promoter directs gene expression mostly in anthers, and it is considered to be a potential promoter to enhance germinal transposition in transposon gene tagging system.

目錄



致謝	i
中文摘要	ii
英文摘要	iii
圖目錄	v
表目錄	vi
附錄目錄	vii
縮寫字對照表	viii
前言	1
文獻回顧	2
實驗設計與流程	15
材料方法	16
結果	27
討論	31
未來展望	35
參考文獻	36

圖目錄



圖 一、P19-C1301 序列刪減系統之構築流程	49
圖 二、以限制酵素分析 P19 啟動子序列插入方向	50
圖 三、以 PCR 方式檢測 P19-C1301 序列刪減系統水稻及菸草轉殖系植株	51
圖 四、P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖系花藥 GUS 染色結果	52
圖 五、P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖系葉片 GUS 染色結果	53
圖 六、P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖系花藥 GUS 染色結果	54
圖 七、P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖系花苞 GUS 染色結果	55
圖 八、P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖系葉片 GUS 染色結果	56

表目錄



表 一、P19-C1301 序列刪減系統所獲得之轉殖株情形.....	57
表 二、P19-C1301 序列刪減系統於水稻之表現情形.....	58
表 三、P19-C1301 序列刪減系統於菸草花藥之表現情形.....	59
表 四、P19-C1301 序列刪減系統於菸草其他組織之表現情形.....	60

附錄目錄



附錄 一、 <i>Os08g43240</i> 基因於水稻花藥發育及各組織轉錄體分析結果.....	61
附錄 二、P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖系花藥 GUS 染色結果.....	62
附錄 三、P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖系花藥 GUS 染色結果.....	63
附錄 四、本試驗使用之引子一覽表.....	64
附錄 五、本試驗使用之培養基配製方法.....	65
附錄 六、本試驗使用之藥品來源.....	69

縮寫字對照表



縮寫	全名
P19	Promoter 19
AS	Acetosyringone
BA	6-Benzyladenine
bp	Base pair (s)
DNA	Deoxyribonucleotide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
gus	β -glucuronidase gene
hpt	Hygromycin phosphotransferase gene
kb	Kilobase (s)
MPSS	Massive parallel sequencing
NAA	α -Naphthaleneacetic acid
NaOAc	Sodium acetate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleotide
SBS	Sequencing by synthesis
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TPM	Transcripts per million
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
WT	Wild type
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide



前言

啟動子可以透過不同的調控序列結合 RNA 聚合酶或轉錄因子等蛋白質，調控基因表現的時期、部位以及表現量。基因工程操作上可以針對不同實驗需求選擇適當的啟動子，增進效率。依啟動子的表現特性可以將啟動子分為持續性啟動子、誘導性啟動子以及組織專一性啟動子。其中，組織專一性啟動子具有時空專一性，可以將外源基因表現於特定的器官或組織當中，確保目標性狀的表現位置。花藥專一性啟動子可以調控基因專一表現在花藥組織當中，主要有以下兩種應用方式：其一是表現致死基因，創造基因工程的雄不稔植株，降低作物雜交時的操作手續；另一應用是表現轉位酶基因，運用於基因鈎取系統，促進轉位子的生殖細胞專一性轉位。

根據水稻花藥 SBS 轉錄體資料庫，水稻具有一些花藥專一性表現的基因，推測這些基因的啟動子可能具有花藥專一性啟動子的特性。因此，本試驗自水稻花藥 SBS 轉錄體資料庫中挑選一個花藥專一表現的基因，其表現時期主要在花粉細胞減數分裂時期，期望透過分析此基因的啟動子表現形態，選殖出可作用於水稻及菸草之花藥專一性啟動子，並進一步應用於轉位子之基因鈎取系統。

文獻回顧



1. 啟動子

啟動子 (promoter) 是基因上游的一段 DNA 序列，可以透過結合 RNA 轉錄酶以及轉錄因子等蛋白質，啟動基因表現並調控表現的時期、部位以及強度。根據啟動子序列特性可以分為核心啟動子 (core promoter) 與近端啟動子 (proximal promoter) 兩種 (Butler & Kadonaga, 2001)。

核心啟動子具有 TATA box (TATAA)、CAAT box (GGCCAATCT) 以及 GC box (GGGCGG) 等調控序列，是啟動基因表現必須的片段。TATA box 序列可以受 RNA 聚合酶辨識，啟動基因轉錄 (Wasylyk *et al.*, 1980; Smale & Kadonaga, 2003)。CAAT box 以及 GC box 則可以與增強子 (enhancer) 或轉錄因子結合，調控基因的表現強度 (Dorsch-Häsler *et al.*, 1985; Everett *et al.*, 1983)。近端啟動子則可和其他專一性轉錄因子結合，調控基因的專一性表現 (Edlund *et al.*, 1985; Maniatis *et al.*, 1987)。

另外，依照啟動子的表現特性，也可以將啟動子分為持續性啟動子、誘導性啟動子以及組織專一性啟動子 (Sharma & Sharma, 2009)。

1-1. 持續性啟動子

持續性啟動子 (constitutive promoter) 不受發育時期或環境等條件影響，能夠持續且穩定地控制基因在大多數部位表現。基因工程中最常使用的持續性啟動子有花椰菜鑲嵌病毒 35S (CaMV35S, cauliflower mosaic virus 35S) 啟動子、農桿菌胭脂鹼合成酶 (nos, nopaline synthetase) 啟動子以及水稻肌動蛋白 (actin) 啟動子。

CaMV35S 啟動子最早是從受花椰菜鑲嵌病毒感染的蕪菁中選殖而出 (Odell *et al.*, 1985)，能在多種植物中表達，如菸草、牽牛花 (Benfey & Chua, 1990)、阿拉伯芥 (Wilkinson *et al.*, 1997) 等。CaMV35S 啟動子可以分為兩個表現區域 (domain)，A 區域的位置在 -90 bp 至 +8 bp，在胚根、胚乳以及根部等部位表現最強；B 區域



的位置在-343 bp 到-90 bp，在子葉、胚以及葉片等部位表現最強，但是兩個區域都能在轉植株的大部分組織表現 (Benfey *et al.*, 1989)。

胭脂鹼是胺基酸的衍生物，由 nos 合成後提供農桿菌氮源 (Bomhoff *et al.*, 1976)。結構分析顯示，最多只需要 88 bp 啟動子片段就能達到 nos 啟動子的最大表現量，並且在-76 bp 位置的 CAAT box 可以促進基因表現量 (Shaw *et al.*, 1984)。nos 啟動子廣泛運用於啟動轉殖植物的篩選標記 (selection marker) 基因表現 (Herrera-Estrella *et al.*, 1983)。


肌動蛋白是真核生物的細胞骨架重要構成要素，參與植物細胞的細胞質流、胞器移動、細胞分裂、細胞延長等生理活動 (Staiger & Schliwa, 1987)。水稻具有四種肌動蛋白基因 (McElroy *et al.*, 1990a)，其中，Act 1 (Actin 1) 基因上游 1.3 kb 片段被選殖為 actin 啟動子，適合用於單子葉植物的基因轉殖 (McElroy *et al.*, 1990b)。Act 1 基因具有聚 dA-dT (poly dA-dT) 以及 CCAA 五聚體 (CCAA pentamer) 序列，前者扮演正向調控角色；後者則扮演負向調控角色 (Wang *et al.*, 1992)。

以上列舉的持續性啟動子皆被廣泛地運用於基因工程的操作，以期達到大量且穩定的外源基因表現。但是，使用持續性啟動子表現外源基因卻可能導致細胞死亡 (Glick & Whitney, 1987)、干擾植物體內代謝 (Glick, 1995)、發育遲緩 (Kasuga *et al.*, 1999) 等異常生理現象。

1-2. 誘導性啟動子

誘導性啟動子 (inducible promoter) 是指在受到特定環境誘導條件下會提高基因表現量的啟動子。一般以誘導條件命名啟動子，而誘導條件則可分為物理性及化學性兩種。

物理誘導性啟動子的誘導條件可以是光線、高溫等物理因子。光誘導性啟動子的來源一般和受光調控的生理反應有關，如光合作用的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶



/加氧酶 (RuBisCO, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)，其小分子次單元 (rbcS, RuBisCO small subunit) 基因，即是常見的光誘導性啟動子來源。水稻與番茄 rbcS 啟動子可受光線誘導，在水稻葉肉細胞表現 (Kyoizuka *et al.*, 1993)。大豆 rbcS 啟動子 (SRS 1) 與牽牛花 rbcS (SSU11A) 啟動子皆能受光誘導表現，並且可在牽牛花葉片表現 (Shirley *et al.*, 1987)。受高溫誘導的熱誘導啟動子通常來自熱休克蛋白 (HSP, heat shock protein) 基因的啟動子片段。大豆的兩個 HSP 基因 (Gmhsp17.3-B、Gmhsp7.5-E) 被廣泛運用於熱逆境 (40°C) 下的基因誘導。序列分析顯示，兩個 hsp 基因皆含有一段由兩個熱休克調控序列 (HSE, heat shock element) 重疊而成的片段，可以增強熱逆境下基因的表現 (Czarnecka *et al.*, 1989; Schöffl *et al.*, 1989)。

化學誘導性啟動子會在施加特定化學藥劑後啟動基因表現，最廣泛使用的藥劑為植物生長調節劑 (plant growth regulator)。植物受病原侵襲後，為了防禦病原，會啟動病程相關蛋白質 (PR, pathogenesis-related proteins) 基因合成 PR 蛋白。其中，菸草 PR-1a 基因的啟動子序列可以受水楊酸 (SA, salicylic acid) 誘導 (Ohshima *et al.*, 1990)，而序列分析顯示，PR-1a 啟動子的 -689 bp 到 -643 bp 序列是接收 SA 訊號的區域 (Van de Rhee *et al.*, 1990)。除了 SA 之外，離層酸 (ABA, abscisic acid) 也是常用來啟動化學誘導的植物生長調節劑，ABA 主要調控植物在乾旱逆境下的生理反應。在乾旱逆境下，阿拉伯芥中有一群 RD (responsive to desiccation) 基因明顯受乾旱逆境誘導表現 (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992)，其中，rd29A 基因的啟動子可以受 ABA 誘導表現 (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1993)。rd29A 啟動子的序列上含有三個調控序列，兩個乾旱調控序列 (DRE, dehydration responsive element) 及一個 ABA 調控序列 (ABRE, ABA responsive element)，ABA 的訊號主要透過 ABRE 啟動基因表現 (Narusaka *et al.*, 2003)。

誘導性啟動子可以透過在指定部位施加誘導條件來避免外源基因在全株大量表現。但是其誘導條件具有閾值 (threshold) 差異，以熱誘導啟動子為例，適合的



誘導溫度閾值隨著植物物種、種植季節有所差異 (Feder & Hofmann, 1999)，難以準確地控制外源基因表現。

1-3. 組織專一性啟動子

組織專一性啟動子 (tissue-specific promoter) 可以調控基因在特定組織表現，大多與組織的形成或發育有關。可能有兩種序列造成組織專一性啟動子具有時空的專一性，一種是透過啟動子的調控序列結合特定轉錄因子控制基因表現部位 (Fujiwara & Beachy, 1994)；另一種則是透過特定序列的表觀遺傳 (epigenetics) 調控，與增強子結合並啟動基因表現 (Ong & Corces, 2011)。目前已知有根、莖、葉、種子等不同組織專一性啟動子。

富含脯氨酸蛋白質 (PRP, proline-rich proteins) 為細胞壁的結構蛋白之一，大豆的 PRP 蛋白 (SbPRP 1) 的表現部位主要在根部。分離 SbPRP 1 基因的 5'端 1.1 kb 片段為 SbPRP 1 啟動子，可以驅使基因專一性表現在菸草以及豇豆 (cowpea) 根部的頂端 (apical region) 以及延長區 (elongating region) 的表皮細胞。啟動子序列的-1080 bp 到-623 bp 位置為結合根專一性轉錄因子的主要調控序列 (Suzuki *et al.*, 1993)。

苯丙氨酸氨裂解酶 (PAL, phenylalanine ammonia-lyase) 是木質素 (lignin) 合成的重要基因，主要表現在植物的微管束組織當中。將菜豆 (common bean) 的 PAL 2 基因啟動子-1173 bp 到+158 bp 片段分離為 PAL 2 啟動子，可以驅使基因在菸草莖部微管束組織表現。序列分析顯示，在啟動子序列-135 bp 到-119 bp 區段內，具有抑制韌皮部組織基因表現的調控序列；而-289 bp 到-74 bp 區段的序列為莖部木質部組織的調控序列 (Leyva *et al.*, 1992)。

丙酮酸磷酸雙激酶 (PPDK, pyruvate orthophosphate dikinase) 是催化丙酮酸 (pyruvate) 變成磷酸烯醇丙酮酸 (PEP, phosphoenolpyruvate) 的酵素，扮演 C4 植物光合作用的速率限制酵素，主要在 C4 植物的葉肉細胞表現。分離玉米 PPDK 基因



-1032 bp到+71 bp片段為PPDK啟動子，可驅使基因在水稻的葉肉細胞表現，顯示PPDK啟動子具有葉肉組織的專一性，且可以運用於C3植物 (Matsuoka *et al.*, 1993)。

大豆的7S種子儲存蛋白(伴大豆球蛋白, conglycinin)為大豆種子中的儲存性球蛋白(storage globulin)之一。將其結構中 α' 次單元的合成基因上游-828 bp到-79 bp啟動子片段分離為 α' 啟動子，可驅使基因在菸草種子中專一表現。 α' 啟動子在序列的-257 bp到-79 bp具有一段增強子片段；而在-245 bp以及-57 bp位置具有可以與轉錄因子結合的RY調控序列(CATGCAT)，使得 α' 啟動子具有種子專一性(Fujiwara & Beachy, 1994)。

2. 花藥專一性啟動子

雄蕊(stamen)是開花植物的雄性生殖器官，在結構上可分為花藥(anther)以及花絲(filament)兩部分。花藥是頂端膨大的囊狀組織，發育成熟後可釋放花粉(pollen)，進行有性繁殖；花絲連接花藥與植株，提供花藥發育所需的養分(Scott *et al.*, 2004)。植物在營養生長轉變為生殖生長的過程需要特定的基因調控，研究顯示在玉米花藥發育過程中，具有6%的基因是專一表現於花藥當中(Sari-Gorla *et al.*, 1986)，其啟動子即可能是花藥專一性啟動子。

2-1. 花藥發育過程

花藥的發育可以分為兩個主要的階段，第一個階段為花藥組織的分化到小孢子母細胞(microsporocyte)減數分裂成小孢子(microspore)；第二個階段則是花粉分化、花藥膨大並且開裂釋放花粉(Goldberg *et al.*, 1993)。

受到賀爾蒙訊號誘導後，表皮細胞下方會產生孢原細胞(archesporial cells)，並且持續平周分裂(periclinal division)產生初級壁細胞(primary parietal cells)和初級造孢細胞(primary sporogenous cells)。初級壁細胞再經兩次平周分裂產生中間層(middle layer)以及絨氈層(tapetum)；初級造孢細胞則會細胞分裂為次級造



胞細胞 (secondary parietal cells)，再經一次細胞分裂產生小孢子母細胞。小孢子母細胞在減數分裂過程中，會逐漸變為二分體 (dyad)、四分體 (tetrad)，最後四分體細胞外的胼胝質 (callose) 降解，小孢子彼此分離。


小孢子經過不對稱細胞分裂後，形成較大的營養細胞 (vegetative cells) 和較小的生殖細胞 (generative cells)，為二核花粉 (bicellular pollen) 時期。此時花粉逐漸累積澱粉，花藥逐漸膨大，隨後生殖細胞進行第二次細胞分裂，產生兩個精細胞 (sperm)，此為成熟花粉期，最後花藥壁開裂，釋出花粉粒 (Koltunow *et al.*, 1990; 馮等人, 2001; 李貴節, 2011)。

2-2. 菸草花藥專一性啟動子

菸草的 TA29 啟動子是目前研究最透徹的花藥專一性啟動子之一。TA29 基因全長 936 bp (Seurinck *et al.*, 1990)，主要表現在花藥的絨氈層當中，且表現時期在小孢子減數分裂前開始，之後慢慢遞減，在第一次細胞分裂後停止表現，推測其基因功能與合成花粉外壁 (pollen exine) 蛋白有關 (Goldberg, 1988; Schrauwen *et al.*, 1996)。序列分析顯示，TA29 啟動子序列的 -207 bp 到 -85 bp 片段為花藥專一性之調控片段，可能可以與花藥專一性的轉錄因子結合，啟動基因表現 (Koltunow *et al.*, 1990)。

除了 TA29 之外，Ntp303 也是菸草的花藥專一性啟動子。Ntp303 蛋白為 69 kDa 的醣蛋白 (glycoprotein)，主要表現在花粉以及花粉管當中，且表現時期從二核花粉時期至花粉管發育時期，推測其功能可能與雄性細胞細胞膜上的訊息傳導有關 (Wittink *et al.*, 2000)。序列分析顯示，Ntp303 啟動子的 -103 bp 到 -86 bp 片段以及 -86 bp 到 -59 bp 皆能驅使基因專一表現於花粉，其中，-94 bp 到 -89 bp 區域的 DNA 序列 (AAATGA)，可能是花藥專一性的調控序列 (Weterings *et al.*, 1995)。

2-3. 水稻花藥專一性啟動子



水稻的 RTS (rice tapetum-specific) 啟動子是最常用於基因工程的水稻花藥專一性啟動子。RTS 基因主要在水稻的絨氈層細胞表現，從減數分裂時期開始，到開花前停止表現。序列分析顯示，RTS 啟動子具有 GAATTTGTTA (-223 bp 到-214 bp) 以及其他多個 GTGA、AGAAA 序列，可能與花藥專一性表現有關 (Luo *et al.*, 2006)。而實際實驗顯示，RTS 啟動子的花藥專一表現片段可能位於-1228 bp 到-783 bp 之間 (陸桂華、張景六，2000)。

Osg6B 是水稻的另一個花藥專一性啟動子。Osg6B 蛋白為脂質轉移蛋白 (lipid transfer protein)，在花藥發育過程的功能為合成花粉外壁 (Zhang *et al.*, 2010)。Osg6B 基因專一表現在絨氈層當中，時期從單核期到三核期 (Yokoi *et al.*, 1997)。序列分析顯示，Osg6B 啟動子的專一性調控序列可能在-1273 bp 到-1095 bp 之間 (Tsuchiya *et al.*, 1994)。

本實驗室亦針對水稻之花藥專一性啟動子進行研究，水稻的 P13、P41 啟動子表現時期分別在減數分裂以及小孢子期，可以在水稻及菸草的花藥、及阿拉伯芥幼苗表現 (劉峻愷，2012)。而水稻的 P124、P128 啟動子的表現時期皆為細胞分裂至成熟花粉，P124 啟動子可以在水稻的花藥維管束、內外穎及阿拉伯芥的花藥表現、P128 啟動子則在花藥上表現 (賴好青，2012)。另外，水稻之 Os1 及 Os128 啟動子主要表現在單核期至成熟花粉期；Os41 啟動子則主要在二核花粉期至成熟花粉期表現，皆能在水稻及菸草之花藥表現 (楊琇淳，2015)。

除了以上列舉的兩種作物之外，還有其他植物具有花藥專一性啟動子，如玉米的 Zm13 啟動子 (Hanson *et al.*, 1989)、番茄的 LAT52 啟動子 (Twell *et al.*, 1989) 以及阿拉伯芥的 A9 啟動子 (Scott *et al.*, 1991) 等。

3. 花藥專一性啟動子之應用

花藥專一性啟動子可以控制外源基因在花藥中表達，主要的功能有基因工程雄不稔以及基因鈎取 (gene tagging) 兩種。



3-1. 雄不稔

雄不稔為植物雄性生殖器官發育過程中，遭受異常基因調控，導致無法產生正常花藥、花粉等生殖細胞的現象。雄不稔性狀在作物育種有極大的應用價值，主要有利雜交種子 (hybrid seed) 的生產，除此之外，也可以控制轉基因作物的基因流布 (transgene flow) (Hague *et al.*, 2012)。

利用花藥專一性啟動子表現致死基因 (lethal gene) 即可創造雄不稔植株。常用的致死基因為核糖核酸水解酶 (RNase, ribonuclease) Barnase (Nishimura & Nomura, 1959)。菸草 TA29 啟動子接上 Barnase 基因後，可運用於創造多種植物的雄不稔植株，如菸草、油菜 (Mariani *et al.*, 1990)、番茄 (張等人, 1998)、苜蓿 (Rosellini *et al.*, 2001) 等作物。TA29 啟動子驅使致死基因表現在絨氈層當中，使得絨氈層細胞提早降解，無法提供花粉細胞足夠養分，因此轉殖作物大多無法產生正常花粉或者產生少量但不具活性的花粉 (Mariani *et al.*, 1990)。水稻的 RTS 啟動子接上 Barnase 基因後，也可以應用於創造水稻、匍匐翦股穎 (creeping bentgrass) 以及阿拉伯芥的雄不稔植株 (Luo *et al.*, 2006)。

除了致死基因以外，利用花藥專一性啟動子表現花藥基因的反義股 RNA (antisense RNA)，也可以透過 RNA 干擾 (RNAi, RNA interference) 影響花藥基因的正常表現，產生雄不稔植株。水稻的 RTS 啟動子接上 RTS 基因的反義股 RNA 並進行基因轉殖後，即可得到無花粉活性的雄不稔水稻植株 (Luo *et al.*, 2006)。

3-2. 基因鈎取

基因鈎取是一種利用外源已知序列 DNA 插入染色體產生突變體，並且利用已知序列往外解密插入位點附近 DNA 序列，進而連結基因序列與功能的研究方法。外源已知序列可以是 T-DNA (transferred DNA) (Koncz *et al.*, 1989) 或轉位子 (transposon) (Gierl & Saedler, 1992)。



3-2.1 轉位子之基因鈎取系統


轉位子是染色體中一段可以移動的 DNA 序列，其移動的機制是轉位酶 (transposase) 辨識轉位子的末端重複序列 (TIR, terminal inverted repeat) 後，將其剪下，插入染色體的新位點當中。最常用於基因鈎取的轉位子為 *Ac/Ds* (Activator / Dissociation) 系統，其中 *Ac* 為轉位酶，*Ds* 為轉位子，*Ac* 轉位酶基因表現後能夠使 *Ds* 轉位並插入新位點 (Müller-Neumann *et al.*, 1984)。應用轉位子於基因鈎取時，須注意轉位子轉位的時間，若轉位在體細胞 (somatic cell) 發生轉位時，其突變性狀就無法透過生殖細胞遺傳至後代。而如果轉位現象發生在減數分裂前的生殖細胞當中，則後代的突變性狀單一；最後，若轉位在生殖細胞減數分裂後轉位，就可以得到大量且性狀多樣的突變後代 (Firek *et al.*, 1996)。

3-2.2 花藥啟動子基因鈎取系統

花藥轉一性啟動子可以控制基因專一表現在花藥當中，若將花藥專一性啟動子接上轉位酶，就能控制轉位酶表現的時期，減少體細胞轉位的發生。以下為幾個利用花藥專一性啟動子調控轉位酶表現的例子：

將查爾酮異構酶 A₂ 啟動子 (CHI A₂, chalcone isomerase A) 以及查爾酮異構酶 B 啟動子 (CHI B, chalcone isomerase B) (van Tunen *et al.*, 1990) 兩個在生殖時期專一表現的啟動子接上 *Ac* 轉位酶，分析 *Ds* 轉位子轉位效率。結果發現，在成熟花粉表現的 CHI A₂ 啟動子無法驅使 *Ds* 轉位，而在未成熟花藥表現的 CHI B 啟動子則可以降低體細胞轉位的發生，顯示應選用花藥發育早期的啟動子調控轉位酶 (Rommens *et al.*, 1992)。

以小孢子至成熟花粉時期專一表現的阿拉伯芥 *apg* 啟動子 (Roberts *et al.*, 1993) 接上 *Ac* 轉位酶，結果發現，在轉殖菸草後代中並沒有體細胞轉位現象，顯示 *apg* 啟動子可以控制啟動子的轉位時期。但是，啟動子的轉位效率僅 0.3%，可能是選擇性剪切位點造成效率不佳 (Firek *et al.*, 1996)。



LIM 10 以及 LIM 18 (Lily message Induced at Meiosis) 為百合減數時期專一表現的啟動子 (Kobayashi *et al.*, 1994)。將兩個啟動子分別接上 *Ac* 轉位酶後，LIM 10 啟動子可以達到完全的生殖細胞轉位，LIM 18 啟動子則是有部分體細胞轉位，但是兩者的轉位效率皆只有 1% (Morita *et al.*, 2003)。

阿拉伯芥的 AtSCP 啟動子 (Oh *et al.*, 2010) 以及金魚草 (*Antirrhinum*) 的 AmDEFH125 啟動子 (Zachgo *et al.*, 1997) 的表現時期皆為小孢子至成熟花粉時期。分別接上 *Ac* 轉位酶後，轉殖於馬鈴薯當中，結果顯示，AtSCP 啟動子的體細胞轉位率為 33% (2/6)；而 AmDEFH125 啟動子的體細胞轉位率為 7.7% (1/13) (Lu *et al.*, 2015)。

3-2.3. 轉位子的反劑量效應

最早對於轉位酶拷貝數 (copy number) 與轉位子轉為效率的研究指出，若玉米穀粒中的 *Ac* 轉位酶拷貝數從一份提高至三份，則 *Ds* 轉位子轉位效率會下降，並且轉位的時間也會延遲 (McClintock, 1948)。而進一步探討轉位酶拷貝數與基因表現可以發現，隨著轉位酶拷貝數增加，基因的表現量與蛋白質含量也跟著增加，顯示轉位酶拷貝數對於轉位效率屬於轉譯後調控 (post-translational regulation) (Kunze *et al.*, 1987; Fußwinkel *et al.*, 1991)。然而在阿拉伯芥以及菸草當中，當 *Ac* 轉位酶拷貝數從一份提高至兩份，轉位的效率卻會提高 (Dean *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 1993)。除了轉位酶拷貝數的研究之外，轉位酶表現量也會影響轉位效率。若以持續性啟動子 CaMV35S 啟動子表現轉位酶基因，雖然基因的表現量增加，但是轉位效率卻會下降 (Scofield *et al.*, 1993)。

根據以上轉位酶與轉位效率的實驗結果，學者提出了反劑量效應 (inverse dosage effect) 模型，嘗試解釋兩者之間的關係。此模型認為能夠促進轉位子轉位的轉位酶蛋白質含量有高、低兩個門檻，轉位酶含量只有在兩個門檻之間才能使轉位子成功轉位，並且隨著物種不同會有不同的門檻值 (Scofield *et al.*, 1993)。而



進一步針對高門檻抑制轉位效率的研究指出，過量的轉位酶會在細胞核內凝聚成沒有活性的蛋白質，無法驅使轉位子有效轉位 (Heinlein *et al.*, 1994)。

4. 啟動子分析方法

啟動子可以調控基因的表現時期、部位以及強度，因此，在利用啟動子進行基因工程之前，必須先對啟動子的表現特性進行分析，才能達到良好的實驗結果。

以下介紹幾種常見的啟動子分析方法。


4-1. 蛋白質結合

啟動子會和 RNA 聚合酶以及轉錄因子等蛋白質結合，啟動並調控基因的表現，因此，具體分析啟動子的蛋白質結合位點序列以及結合的蛋白質種類，有助於了解轉錄因子對於啟動子的調控機制 (王等人, 2015)。

去氧核糖核酸水解酶足跡 (DNase footprinting) 是一種透過電泳分析蛋白質結合 DNA 的技術。利用 DNase 處理雙股，可以將 DNA 剪切成單一的核苷酸 (nucleotide)，但是當 DNA 與蛋白質結合後，便無法被 DNase 辨識，電泳後則會留下空白的足跡，解讀空白足跡的序列就可以得知與蛋白質結合的 DNA 序列 (Galas & Schmitz, 1978)。以此足跡法分析 CaMV35S 啟動子可以發現，ASF 轉錄因子可以和啟動子的 TGACG 序列結合，調控 CaMV35S 啟動子在菸草根部的專一表現 (Lam *et al.*, 1989)。

電泳遷移率實驗 (EMSA, electrophoretic mobility shift assay) 也是透過電泳分析蛋白質結合的技術。將蛋白質與啟動子 DNA 片段均勻混合後，以電泳分析 DNA 片段大小，若 DNA 片段明顯泳動較慢，則表示該片段與蛋白質結合，造成分子量增加，可以後續回收片段進行分析 (Garner & Revzin, 1986)。以 EMSA 分析菸草的 PAL2 啟動子，結果顯示，啟動子序列中具有三個 AC 調控序列會與 Myb 蛋白質結合，調控啟動子的表現組織專一性 (Hatton *et al.*, 1995)。

酵母菌單雜交法 (yeast one-hybrid system) 是一種可以偵測 DNA 序列與蛋白質



質結合的技術。應用在啟動子分析時，將啟動子的序列分成不同的小片段，並且接上 GAL4 蛋白的 DNA 結合區域 (BD, DNA-binding domain)，再將欲分析的蛋白質基因序列接上 GAL4 蛋白的 DNA 活化區域 (AD, DNA-activation domain)。若欲分析的蛋白質與啟動子序列結合，BD 和 AD 就會結合，進而啟動下游的基因表現，因此可以透過偵測基因表現確定蛋白質是否參與啟動子的調控過程 (Li & Herskowitz, 1993)。以酵母菌單雜交法分析紅蘿蔔的 Dc3 啟動子，找到了 DPBF1 以及 DPBF2 兩個轉錄因子，其結合序列為 ACACNNG，可能與種子專一表現有關 (Kim *et al.*, 1997)。

4-2. 報導基因

證實啟動子與轉錄因子結合後，接著必須研究轉錄因子調控的生理反應，其中一種研究方式是利用序列刪減法 (serial deletion analysis) 將啟動子分為不同小片段，接上報導基因觀察該片段驅使報導基因表現的時間以及部位。

β -葡萄糖醛酸甙酶 (GUS, β -glucuronidase) 是一種酸水解酶 (acid hydrolase)，可以水解多種 β -葡萄糖醛酸甙 (β -glucuronide)。大腸桿菌的 GUS 基因是最常用的報導基因之一 (Jefferson *et al.*, 1986)，偵測基因表現時必須施加受質 (substrate)，如 X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide)，GUS 蛋白分解 X-gluc，其產物隨後被氧化，產生藍色化合物，藉此判讀啟動子的表現特性 (Jefferson, 1987)。

冷光酵素 (LUC, luciferase) 是自螢火蟲中選殖而出的報導基因，其作用機制是分解冷光素 (luciferin) 並且放出 560 nm 波長的光線。除了冷光素之外，必須還有三磷酸腺苷 (ATP, adenosine triphosphate) 以及氧氣才能完成反應，除了用於偵測啟動子表現之外，也可用於定量細胞中的 ATP 含量 (Deluca & McElroy, 1978; Ow *et al.*, 1986)。

綠螢光蛋白 (GFP, green fluorescent protein) 最早從水母中分離出來 (Morise *et al.*, 1974)，後續被應用於轉殖基因的報導基因。因為 GFP 蛋白不是酵素，因此不

需要添加受質或輔酶，只需光照就可以放出 509 nm 波長的綠光，偵測此綠光即可分析啟動子的表現形式 (Chalfie *et al.*, 1994)。



4-3. 生物資訊

利用實際實驗得到啟動子調控序列與啟動子表現特性的關係之後，就可以透過生物資訊 (bioinformatics) 歸納整理，提供未知啟動子表現的預測依據。以下為兩個常見的植物啟動子分析數據庫：

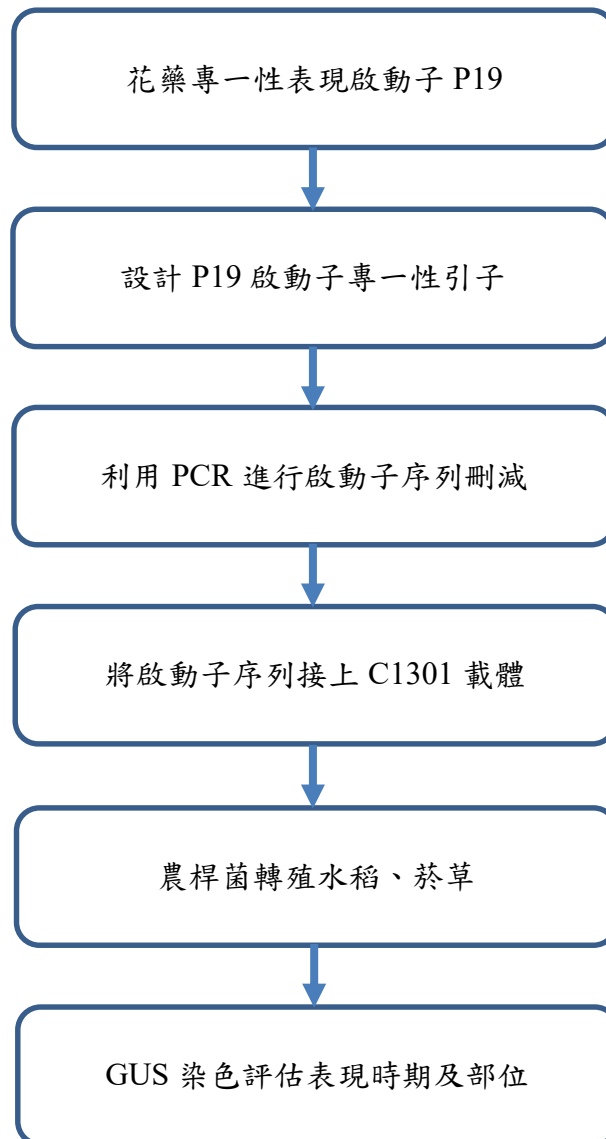
PLACE (plant cis-acting element) 數據庫主要收集維管束植物的調控序列，也包括一些非植物物種的調控序列 (Higo *et al.*, 1999)。

PlantCARE (plant cis-acting regulatory element) 數據庫除了植物的調控序列以外，也包含植物的增強子以及抑制子 (repressor) (Lescot *et al.*, 2002)。

實驗設計與流程



本實驗自水稻花藥SBS轉錄體資料庫 (Huang *et al.*, 2009) 中篩選花粉減數分裂時期具有高TPM值的*Os08g43240*基因，根據基因序列設計啟動子專一性引子，並利用PCR進行啟動子序列刪減，將啟動子片段刪減為1200 bp、900 bp、600 bp以及300 bp。將上述刪減後的啟動子片段接上C1301載體，並透過農桿菌分別轉殖到水稻及菸草。在轉殖水稻及轉殖菸草的花藥發育時期以GUS染色評估P19啟動子表現的時間以及部位專一性。



材料方法



1. 啟動子 DNA 序列取得

自水稻花藥SBS轉錄體資料庫 (Huang *et al.*, 2009) 中篩選花粉細胞減數分裂時期具有高TPM值的*Os08g43240*基因，並根據NCBI水稻基因體資料庫取得基因上游1.5 kb的DNA序列，設計啟動子專一性引子，利用PCR選殖出啟動子DNA序列片段。

1-1. 減數分裂時期 P19 啟動子選殖

1. 針對 *Os08g43240* 基因上游 DNA 序列設計專一性引子 p19F、p19R，並以水稻染色體 DNA 為模板，進行 PCR 反應，擴增出 1.5kb 片段啟動子序列。
2. PCR 條件如下：

溫度設定	循環數
94°C 30 秒	1
94°C 30 秒、50°C 30 秒和 68°C 1 分鐘	30
68°C 5 分鐘	1

3. 將擴增出的 1.5kb 啟動子序列以 T4 DNA 接合酶接入 pGEM®-T easy vector。
4. 依照啟動子接入 pGEM®-T easy vector 之方向性，分為正向 (forward) 以及反向 (reverse)。利用 *HincII* 處理 P19 質體後經電泳分析，將切出 4314 bp 以及 203 bp 的質體命名為 P19-1500F；將切出 3154 bp 以及 1363 bp 的質體命名為 P19-1500R。

1-2. P19 啟動子之序列刪減分析

1. 在 P19 啟動子序列長度 1200 bp、900 bp、600 bp、300 bp 位置設計專一性正向引子，命名為 1200F、900F、600F、300F，並以 p19R 作為反向引子，以 P19-1500F 質體為模板，利用 PCR 擴增出 1200 bp、900 bp、600 bp、300 bp 之 P19 啟動



- 子片段。
2. 將擴增出的 1200 bp 啟動子片段利用 T4 DNA 接合酶接入 pGEM®-T easy vector。利用 *HincII* 處理質體後經電泳分析，將切出 4014 bp 以及 203 bp 的質體命名為 P19-1200F；將切出 3154 bp 以及 1063 bp 的質體命名為 P19-1200R。
 3. 將擴增出的 900bp 啟動子片段利用 T4 DNA 接合酶接入 pGEM®-T easy vector。利用 *HincII* 處理質體後經電泳分析，將切出 3714 bp 以及 203 bp 的質體命名為 P19-900F；將切出 3154 bp 以及 763 bp 的質體命名為 P19-900R。
 4. 將擴增出的 600bp 啟動子片段利用 T4 DNA 接合酶接入 pGEM®-T easy vector。利用 *HincII* 處理質體後經電泳分析，將切出 3414 bp 以及 203 bp 的質體命名為 P19-600F；將切出 3154 bp 以及 463 bp 的質體命名為 P19-600R。
 5. 將擴增出的 300bp 啟動子片段利用 T4 DNA 接合酶接入 pGEM®-T easy vector。利用 *SphI* 處理質體後經電泳分析，將切出 3215 bp、98 bp 以及 4 bp 的質體命名為 P19-300F；將切出 3041 bp、272 bp 以及 4 bp 的質體命名為 P19-300R。

2. 質體的構築

本試驗將 P19 啟動子的不同長度片段構築於 pCAMBIA-1301 (C1301) 報導基因表現載體中，詳細構築流程敘述如下。

2-1. P19-C1301 報導基因表現載體系統構築流程

P19-C1301 之構築主要包含四個部分：持續表現之 CaMV35S 啟動子、植物篩選標誌 *hpt* 基因、P19 啟動子片段以及報導基因 *gus*。

1. 將 C1301 質體以 *PstI* 和 *NcoI* 處理，切除表達報導基因 *gus* 的 CaMV35S 啟動子，以膠體回收法回收 11079 bp 載體片段備用，並將載體片段命名為 C1301 *PstI*/*NcoI*。
2. 將質體 P19-1200F 以 *PstI* 和 *NcoI* 處理，切下 1253 bp P19 啟動子片段，以膠體回收法回收後，利用 T4 DNA 接合酶與 C1301 *PstI*/*NcoI* 片段黏合，將質體命



名為 P19-1200-1301。

3. 將質體 P19-900F 以 *Pst*I 和 *Nco*I 處理，切下 953 bp P19 啟動子片段，以膠體回收法回收後，利用 T4 DNA 接合酶與 C1301 *Pst*I / *Nco*I 片段黏合，將質體命名為 P19-900-1301。
4. 將質體 P19-600F 以 *Pst*I 和 *Nco*I 處理，切下 653 bp P19 啟動子片段，以膠體回收法回收後，利用 T4 DNA 接合酶與 C1301 *Pst*I / *Nco*I 片段黏合，將質體命名為 P19-600-1301。
5. 將質體 P19-300F 以 *Pst*I 和 *Nco*I 處理，切下 353 bp P19 啟動子片段，以膠體回收法回收後，利用 T4 DNA 接合酶與 C1301 *Pst*I / *Nco*I 片段黏合，將質體命名為 P19-300-1301。

2-2. 黏接反應

1. 利用適當限制酵素切開試驗所需之 DNA 片段，使其端點成為黏頭端 (sticky end)。
2. 以電泳分離 DNA 片段後利用膠體回收法回收目標 DNA 片段。
3. 加入 1 μ L T4 DNA 接合酶與 10X 接合緩衝液 (ligation buffer)，進行載體與插入片段的黏合反應。
4. 將反應液放置 4°C 16 小時以上。

2-3. 大腸桿菌勝任細胞製備

1. 挑選大腸桿菌 (*Escherichia coli* strain XL1-Blue) 單一菌落，接種於 5 mL LB 液體培養基中，於 37°C 下震盪培養 12~16 小時。
2. 將 5 mL 菌液倒入 500 mL 的液體 LB 培養基 (含 10 μ g/mL tetracycline) 中，在 37°C 震盪培養至 OD₆₀₀ = 0.8~1.0。
3. 將菌液置於冰浴中 15 分鐘。



4. 將菌液倒入 50 mL 離心管中，以 4°C，4500 rpm 離心 7 分鐘。
5. 倒去上清液，將離心管置於冰浴中，以 50 mL 的冰冷無菌二次水，懸浮沉澱的菌體。
6. 重複步驟 4.與 5.兩次。
7. 倒去上清液，加入 50 mL 冰冷的 10% 甘油懸浮菌體。
8. 以 4°C，4500 rpm 離心 7 分鐘。
9. 倒去上清液，加入與細菌等體積的 10% 甘油懸浮菌體。
10. 取 40 μ L 菌液分裝至 1.5 mL 微量離心管中，並立刻置於液態氮中急速冷凍，保存於-80°C 冰箱備用。

2-4. 大腸桿菌轉形

1. 取 1 μ L 質體 DNA 加入 40 μ L 勝任細胞中，置於冰浴中 5 分鐘。
2. 將質體 DNA 與勝任細胞混合液放入預冷之電穿孔用電導管 (cuvette, Bio-Rad®)。
3. 選用電穿孔儀 (Bio-Rad® MicroPluser) 的 EC1 程式，將電導管放入電導槽中，按開始鍵完成電導過程後，立刻置於冰浴中。
4. 加入 1 mL LB 液體培養基，於 37°C 震盪培養 1 小時。
5. 取適當體積菌液塗在含適當抗生素之 LB 培養基上，於 37°C 培養 12~16 小時。

2-5. 大腸桿菌質體 DNA 萃取與純化

1. 挑取固體培養基上單一菌落，培養於含適當抗生素之 3 mL 液體培養基中，於 37°C 培養 12~16 小時。
2. 吸取 1.5 mL 菌液至 1.5 mL 微量離心管，離心 8000 rpm 1 分鐘，倒去上清液，重複此步驟兩次。
3. 加 200 μ L 的 Solution I (25 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、50 mM glucose) 至微



- 量離心管中，以震盪器懸浮沉澱的菌體。
4. 加 200 μL 的 Solution II (0.2 N NaOH、1% (w/v) SDS) 至微量離心管中，以來回混合之方式混合均勻。
 5. 加 200 μL 的 Solution III (5 M potassium acetate、acetic acid) 至微量離心管中，以來回混合之方式混合均勻，中和試液的 pH 值。
 6. 以 13000 rpm 離心 5 分鐘。
 7. 將上清液注入與收集管組合好的管柱中，放入離心機，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒去濾液。
 8. 加 600 μL Washing Solution 至管柱中，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒去濾液，重複此步驟一次。
 9. 以 13000 rpm 離心 10 分鐘，除去殘留酒精。
 10. 將管柱與新的 1.5 mL 微量離心管組合，加入 50 μL 的無菌二次水，靜置 2 分鐘。以 13000 rpm 離心 1 分鐘，將析出之 DNA 置於 4°C 冰箱冷藏或 -20°C 冰庫備用。

2-6. PCR 擴增產物之純化

1. 將 PCR 反應產物或酵素反應完全的 DNA 加 500 μL Binding Solution 均勻混合。
2. 注入與收集管組合好的管柱中，放入離心機，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒去濾液。
3. 在管柱中加入 700 μL Washing Solution，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒去濾液後重複此步驟一次。
4. 以 13000 rpm 離心 10 分鐘，除去殘留酒精。
5. 將管柱與新的 1.5 mL 微量離心管組合，加入 50 μL 的無菌二次水，靜置 2 分鐘。以 13000 rpm 離心 1 分鐘，將析出之 DNA 置於 4°C 冰箱冷藏或 -20°C 冰庫備用。

2-7. DNA 片段膠體回收



1. 以適當濃度的瓊脂膠片 (agarose) 在 TAE 緩衝溶液中進行電泳，分離不同 DNA 片段後，以溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 染色。染色後在 UV 燈下將目標 DNA 片段位置的瓊脂膠片切下，裝入 1.5 mL 微量離心管中。
2. 秤量每管膠體重量，加等體積的 Binding Solution。
3. 60°C 水浴加熱膠體，每 5 分鐘來回混合直到膠體完全溶解。
4. 將膠體溶液加入與收集管組合好的管柱中，放入離心機，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。
5. 倒去濾液，加入 500 μ L Binding Solution，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。
6. 倒去濾液，加入 700 μ L Washing Solution，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，重複此步驟一次。
7. 倒去濾液，再以 13000 rpm 離心 10 分鐘，除去殘留酒精。
8. 將管柱與新的 1.5 mL 微量離心管組合，加入 50 μ L 的無菌二次水，靜置 2 分鐘。以 13000 rpm 離心 1 分鐘，將析出之 DNA 置於 4°C 冰箱冷藏或 -20°C 冰庫備用。

2-8. 農桿菌轉形

1. 取 1 μ L 質體 DNA 和 40 μ L 的農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404) 懸液充分混合，注入預冷的電穿孔用電導管中。
2. 選用電穿孔儀 (Bio-Rad® MicroPluser) 的 Agr 程式，將電導管放入電導槽中，按開始鍵完成電導過程後，立刻置於冰浴中。
3. 加入 1 mL LB 液體培養基，於 28°C 震盪培養 1 小時。
4. 取 5~10 μ L 菌液塗在 LB 固體培養基上，於 28°C 培養 2 天。

2-9. 檢測農桿菌

1. 以牙籤挑起固體 LB 培養基上培養兩天的農桿菌單一菌落，在含有抗生素的新固體培養基上塗開，於 28°C 培養 1 天。



2. 菌落擴大後，以牙籤挑起，放入含有 20 μ L 無菌二次水之微量離心管中。
3. 以沸水加熱含有農桿菌之微量離心管 20 分鐘，使農桿菌細胞壁破裂，質體 DNA 溶於水中。
4. 以上述水溶液為模板，利用 PCR 方式檢測農桿菌質體。

3. 水稻基因轉殖

3-1. 誘導癒傷組織

1. 取水稻 (*Oryza sativa* cv. TNG67) 之成熟種子，去除內外穎後，以 70% 酒精震盪消毒 1 分鐘。
2. 倒去酒精，以 2% NaOCl、0.1% tween-20 震盪消毒 2 小時。
3. 在無菌操作台內以無菌二次水清洗至少 5 次，將漂白水洗淨後，移至 CIM 培養基上。
4. 在 28°C 全日照光周期環境下培養，長出癒傷組織後，移至新的 CIM 培養基。

3-2. 感染轉形

1. 感染前 2 天，以牙籤挑起培養基上已確認之農桿菌單一菌落，培養於 3 mL LB 液體培養基 (含 100 mg/L rifampicin、100 mg/L kanamycin)，於 28°C 培養 16 小時。
2. 將步驟 1 的菌液加入 50 mL LB 液體培養基 (含 100 mg/L rifampicin、100 mg/L kanamycin) 中，於 28°C 培養 16 小時。
3. 以 5000 rpm 離心菌液 5 分鐘，倒去上清液後，以 2N6 液體培養基懸浮沉澱菌體。
4. 將癒傷組織浸於步驟 3 的菌液當中。充分浸泡後，將癒傷組織均勻放於 2N6-AS 培養基上。
5. 以 28°C 黑暗培養至農桿菌覆蓋癒傷組織，需要約 2~4 天。



6. 以無菌水清洗癒傷組織 5 次，在 2N6 培養基（含 250 mg/L rifampicin）清洗 4 次，直到沒有菌絲殘留。置於震盪器上搖晃清洗（28°C，110 rpm）一段時間，重複數次。若液體仍呈混濁狀則需搖晃清洗過夜。

3-3. 篩選培養

1. 將清洗好的癒傷組織置於 2N6-CH 培養基上，以 28°C 全日照培養。
2. 每週將癒傷組織繼代至新的 2N6-CH 培養基上。約 4 週後可獲得帶有 hygromycin 抗性的水稻癒傷組織。
3. 將有增生現象的癒傷組織移至 CIM-CH 培養基上，以 28°C 全日照培養。

3-4. 分化培養

1. 將具有抗性的癒傷組織移至 RMG 分化培養基上，28°C 全日照培養。約 4 週後可以得到轉殖水稻幼苗。
2. 將水稻幼苗移至木村氏水耕液中，發根後即可移至土壤栽種。

4. 菸草基因轉殖

4-1. 無菌播種

1. 以 70% 酒精震盪消毒菸草（*Nicotiana tabacum* cv. W38）種子 1 分鐘。
2. 倒去酒精，以 2% NaOCl、0.1% tween-20 震盪消毒 15 分鐘。
3. 在無菌操作台內以無菌二次水清洗至少 5 次，將漂白水洗淨
4. 將消毒過的種子播種在 1/2MS 培養基上，以 26°C，16 小時光照/8 小時黑暗條件下培養。
5. 第一對葉展開後，移至 MS 培養基上培養。
6. 每個月繼代至新的 MS 培養基上。



4-2. 感染轉形

1. 避開中肋，將菸草展開葉剪成 0.5 cm x 0.5 cm 大小，平鋪在 TSM 培養基上培養 1 天。
2. 感染前 1 天，以牙籤挑起培養基上已確認之農桿菌單一菌落，培養於 5 mL LB 液體培養基（含 100 mg/L rifampicin、100 mg/L kanamycin），於 28°C 培養 16 小時。
3. 以 5000 rpm 離心菌液 5 分鐘，倒去上清液後，以 TSM 液體培養基懸浮沉澱菌體。
4. 將菌液倒入培養皿，並且將葉片浸泡在菌液中 5 分鐘。
5. 以無菌二次水清洗葉片 6 次後，利用無菌擦手紙吸乾葉片上水份，並將葉片移至 TSM 培養基上。

4-3. 篩選及分化培養

1. 於 TSM 培養基上培養 5 天後，將葉片移至 TSM-CH 培養基上。
2. 每週將葉片繼代至新的 TSM-CH 培養基上。約 4 週後，葉片葉緣開始長出癒傷組織。
3. 將癒傷組織移至新的 TSM-CH 培養基上。癒傷組織長出幼芽後，切下幼芽移至 TRM-C 培養基上。
4. 幼芽發根後即可移至培養土中栽種。

5. PCR 法檢測轉殖植株

5-1. 萃取植物染色體 DNA

1. 取植物葉片或癒傷組織，利用液態氮冷凍後，在研鉢中磨成粉末，置於 2 mL 離心管當中。
2. 加入 800 μ L 含有尿素的萃取緩衝溶液（7 M urea、0.3 M NaCl、50 mM Tris-HCl

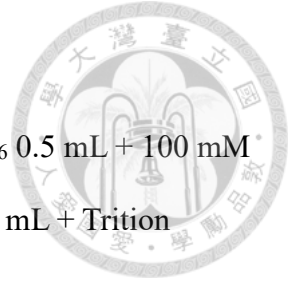


- pH 8.0、20 mM EDTA、1% sarcosine)，混合均勻後靜置 20 分鐘。
3. 以 8000 rpm 離心 1 分鐘，取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管中。
 4. 加入 350 μ L 酚 (phenol)，搖勻後靜置 5 分鐘。
 5. 加入 350 μ L 三氯甲烷 (chloroform)，搖勻後靜置 10 分鐘。
 6. 以 8000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管中。
 7. 加入 75 μ L 3 M NaOAc (pH5.2)、2 μ L RNase A 以及 750 μ L 異丙醇 (isopropanol)，混合均勻後於 -20 $^{\circ}$ C 靜置 20 分鐘。
 8. 於 4 $^{\circ}$ C，以 13000 rpm 離心 20 分鐘。
 9. 倒去上清液，加入 500 μ L 70% 酒精，沖洗沉澱物。
 10. 於 4 $^{\circ}$ C，以 13000 rpm 離心 5 分鐘。
 11. 倒去上清液，加入 500 μ L 95% 酒精，沖洗沉澱物。
 12. 於 4 $^{\circ}$ C，以 13000 rpm 離心 5 分鐘。
 13. 倒去上清液，並且利用真空抽氣抽乾液體 10 分鐘。
 14. 加入 50 μ L 的無菌二次水，將 DNA 置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏或 -20 $^{\circ}$ C 冰庫備用。

5-2. PCR 反應條件

1. 設計專一性引子 GUS500F、GUS500R 針對 P19-C1301 序列刪減系統之轉殖株進行 PCR 反應，檢測植株是否為轉殖系。
2. PCR 條件如下：

溫度設定	循環數
95 $^{\circ}$ C 5 分鐘	1
95 $^{\circ}$ C 5 分鐘、52 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘	35
72 $^{\circ}$ C 5 分鐘	1



6. GUS 染色

1. 將以下藥劑【1 M NaPO₄ (pH7.0) 10 mL + 100 mM K₃Fe(CN)₆ 0.5 mL + 100 mM K₄Fe(CN)₆ 3 mL + 10 mg/mL X-GlcA 10 mL + 0.5 mM EDTA 2 mL + Triton X-100 1 mL + H₂O 73.5 mL】配成 100 mL GUS 染劑。
2. 剪下欲染色之植物組織，進行適當剪切處理後，加入適量 GUS 染劑。
3. 使用真空抽氣 10 分鐘，使 GUS 染劑容易滲透入組織內。
4. 以 37°C 搖晃培養過夜。
5. 倒去 GUS 染劑，加入 70%酒精並放入 37°C 烘箱中搖晃。
6. 倒去酒精，重複以 70%酒精退去葉綠素顏色。

結果



1. P19-C1301 序列刪減系統之建構

本實驗自水稻花藥 SBS 轉錄體資料庫 (Huang *et al.*, 2009) 中挑選一水稻花藥專一表現之基因，並設計引子對擴增基因上游之啟動子片段。利用序列刪減法將啟動子刪減為 1200 bp、900 bp、600 bp 以及 300 bp 之片段，分別將上述刪減片段接上報導基因 GUS，分析啟動子的組成及調控序列位置。

1-1. P19-C1301 序列刪減系統

P19-C1301 序列刪減系統主要可以分為以下四部分：

1. P19 啟動子：為水稻 *Os08g43240* 基因之啟動子片段。將 P19 啟動子刪減成不同長度的片段，並取代 C1301 載體上的 CaMV35S 啟動子，負責啟動報導基因表現。
2. 報導基因 *gus*：此基因的產物為 β -葡萄糖醛酸甙酶 (GUS, β -glucuronidase)，在施加 X-gluc 後，GUS 蛋白會分解 X-gluc，其產物隨後被氧化，產生藍色化合物。將此報導基因建構於 P19 啟動子之後，可以藉此判讀啟動子表現特性。
3. CaMV35S 啟動子：為持續性啟動子，在此系統中負責啟動植物篩選標誌。
4. 植物篩選標誌基因 *hpt*：此基因產物為潮黴素磷酸轉移酶 (hygromycin phosphotransferase)，可使轉基因植物產生潮黴素抗性，利於轉殖時的篩選。

1-2. P19 啟動子之序列刪減

以水稻染色體 DNA 為模板，p19F、p19R 為 P19 啟動子之專一引子對，利用 PCR 擴增出 1.5 kb 之 P19 啟動子序列，接入載體當中。其後針對 P19 啟動子的不同長度片段設計四個正向引子 1200F、900F、600F 以及 300F，並搭配反向引子 p19R，利用 PCR 擴增 P19 啟動子 5'端缺失之 1200 bp、900 bp、600 bp 以及 300 bp 片段，分別接入載體中 (圖一)。以限制酵素分析接入片段之方向性，選取 P19-1200R、



P19-900R、P19-600R 以及 P19-300R (圖二)，利用 Nco I 以及 Pst I 切下 P19 啟動子片段，與 C1301 載體接合。

2. P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖與 PCR 檢測

完成 P19-C1301 序列刪減系統構築後，以水稻 TNG67 品種癒傷組織為材料，透過農桿菌菌株 LBA4404 將構築轉殖入水稻。以含 50 mg/L 的潮黴素培養基進行轉殖水稻篩選，得到水稻的轉殖植株。

為了檢測 P19-C1301 序列刪減系統的構築是否成功轉殖進入水稻基因體中，抽取潮黴素篩選後的水稻植株葉片 DNA，透過 PCR 分析外源基因。使用 gus 基因的專一性引子對 GUS500F、GUS500R 進行 PCR 反應，若可以成功擴增出 500 bp 片段則為成功轉殖的轉殖株 (圖三)，最終確認的轉殖株數目如表一所示。

3. P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖與 PCR 檢測

完成 P19-C1301 序列刪減系統構築後，以菸草 W38 品種葉片為材料，透過農桿菌菌株 LBA4404 將構築轉殖入菸草。以含 50 mg/L 的潮黴素培養基進行轉殖菸草篩選，得到菸草的轉殖植株。

為了檢測 P19-C1301 序列刪減系統的構築是否成功轉殖進入菸草基因體中，抽取潮黴素篩選後的菸草植株葉片 DNA，以 PCR 分析外源基因。使用 gus 基因的專一性引子對 GUS500F、GUS500R 進行 PCR 反應，若可以成功擴增出 500 bp 片段則為成功轉殖的轉殖株 (圖三)，最終確認的轉殖株數目如表一所示。

4. P19-C1301 序列刪減系統在水稻的表現結果

確認水稻的轉殖株後，在水稻的抽穗時期，剪下小穗以及葉片進行 GUS 染色。每組實驗至少進行 3 重複染色操作，並挑選各組最典型之結果展示。將水稻花藥發育依小穗長度分成三個時期，小穗長度 1 至 5 mm (RA1)、5 至 8 mm (RA2) 以及 8 至 9 mm (RA3)，分別為花藥發育的減數分裂期、小孢子期以及二核花粉


至成熟期 (馮等人, 2001)。除了四個刪除片段之外, 納入本實驗室先前轉殖之 P19-1500-1301 及 P19-2000-1301 轉殖水稻植株花藥一起評估 (附錄二), 另外, 由於 P19-900-1301 之轉殖菸草尚未開花, 因此無法列入評估。

水稻的花藥染色結果顯示 (圖四、表二), 在 RA1 皆無 GUS 表現, 到 RA2 只能在 1200 bp 的啟動子片段偵測到 GUS 活性; 而在 RA3 則可以在 600 bp 至 2000 bp 啟動子片段偵測到 GUS 活性。其他組織方面, RA3 時期可以在 300 bp、600 bp 及 1200 bp 啟動子片段的水稻內穎、外穎偵測到 GUS 活性。鱗被則是在 RA1 時期 300 bp、1200 bp, RA2 時期 300 bp、600 bp、900 bp 以及 RA3 時期 600 bp、1200 bp、2000 bp 啟動子片段有 GUS 表現。雌性生殖器官方面, 子房在各個發育時期以及各片段啟動子皆無 GUS 活性; 柱頭在 RA3 時期的 300 bp、600 bp 以及 2000 bp 啟動子片段有 GUS 活性。而葉片部分, 除了 600 bp 片段的葉緣部分以外, 其他啟動子片段的轉殖水稻皆沒有 GUS 表現 (圖五)。

5. P19-C1301 序列刪減系統在菸草的表現結果

確認菸草的轉植株後, 在菸草的開花時期, 剪下花苞以及葉片進行 GUS 染色。每組實驗至少進行 3 重複染色操作, 並挑選各組最典型之結果展示。將菸草花藥發育依花藥長度分成三個時期, 花藥長度 1.5 至 2.5 mm (TA1)、2.5 至 3.5 mm (TA2) 以及 4 mm (TA3), 分別為花藥發育的小孢子母細胞時期、小孢子時期以及二核花粉時期 (曹克浩, 2003)。除了四個刪除片段之外, 納入本實驗室先前轉殖之 P19-1500-1301 及 P19-2000-1301 轉殖菸草植株花藥一起評估 (附錄三), 另外, 由於 P19-900-1301 之轉殖菸草尚未開花, 因此無法列入評估。

菸草的花藥染色結果顯示 (圖六、表三), 在 TA1 皆無 GUS 表現, 到 TA2 可以在 300 到 1500 bp 的啟動子片段偵測到 GUS 活性; 而在 TA3 只能在 300 bp 及 600 bp 啟動子片段偵測到 GUS 活性, 其中, TA2 以及 TA3 偵測到的 GUS 活性皆隨著 P19 啟動子片段的增長而減弱。花苞中其他花器組織的染色結果顯示 (圖七、



表四)，300 bp、600 bp 及 1200 bp 啟動子片段的轉殖菸草都可以在花萼及花瓣偵測到 GUS 活性，而 300 bp 片段則可以在柱頭、花柱以及花絲偵測到 GUS 活性；600 bp 片段可以在柱頭以及花柱偵測到 GUS 活性。葉片的染色結果則可以發現，除了 300 bp 片段以外，可以在 600 bp、900 bp 以及 1200 bp 啟動子片段的轉殖菸草葉片葉緣偵測到 GUS 活性（圖八）。

討論



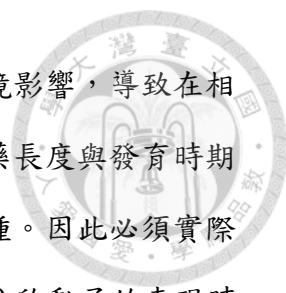
本試驗使用水稻花藥專一表現之 *Os08g43240* 基因，針對其 5' 端上游 1.5 kb 處設計引子對，擴增出基因啟動子並命名為 P19 啟動子。利用序列刪減法將 P19 啟動子自 5' 端刪減成 1200 bp、900 bp、600 bp 以及 300 bp 四個不同的片段，並分別接上報導基因 GUS，觀察啟動子各片段的表現情形。

1. *Os08g43240* 基因表現

根據 SBS 轉錄體資料庫 (Huang *et al.*, 2009) 顯示，*Os08g43240* 基因為水稻花藥發育減數分裂時期大量表現之基因，其表現量進入四分體時期時大幅下降，小孢子時期只剩下微弱表現，細胞分裂到成熟花粉時期則都沒有表現 (附錄一)。而根據水稻寡核苷酸陣列資料庫 (ROAD, rice oligonucleotide array database) (Cao *et al.*, 2012) 的晶片結果，*Os08g43240* 基因主要表現在花藥發育的 M1 到 M3 時期，為減數分裂開始到四分體時期，大致與 SBS 轉錄體資料相符。在組織專一性方面，從水稻 eFP (electronic fluorescent pictograph) 資料庫 (Patel *et al.*, 2012) 可以看出，*Os08g43240* 基因的表現位置集中在未成熟的穗，並不表現在葉片、根部及種子，但穗的表現時期主要在 P3 到 P5 時期，為減數分裂至小孢子時期，與前面兩者略微不同。水稻 MPSS 轉錄體資料庫 (Nobuta *et al.*, 2007) 中也可以看出，*Os08g43240* 基因只在水稻未成熟的穗表現，並且不會表現於子房、柱頭以及成熟花粉當中。

2. P19 啟動子於花藥之表現

由於水稻小穗及菸草花藥長度可以對應其花藥的發育狀態 (馮等人, 2001; 曹克浩, 2003)，因此分別採用水稻小穗長度及菸草花藥長度做為判斷花藥發育時期的依據。本次試驗的花藥染色結果發現，P19 啟動子主要驅動 GUS 基因在水稻花藥發育的 RA2、RA3 時期以及菸草的 TA2、TA3 時期表現，為小孢子期至成熟花粉期，與上述資料庫結果主要在減數分裂時期 (水稻 RA1 時期、菸草 TA1 與 TA2



時期中間)的結果不符。推測可能是(一)受到栽培條件或環境影響,導致在相同小穗或花藥長度下無法到達相同的發育階段(二)小穗或花藥長度與發育時期之對應可能有品種限制性,不能廣泛應用於所有水稻及菸草品種。因此必須實際觀察花粉細胞的狀態,才能判斷花粉的發育時期,準確判斷 P19 啟動子的表現時間。

在序列刪減的情況下,300 bp 啟動子在水稻中無法啟動 GUS 基因,卻可以在菸草中表現 GUS 活性,顯示兩個植物在花藥發育過程中主要依賴的調控序列可能不同。推測水稻主要依賴的花藥調控序列在-300 bp 至-600 bp 之間;菸草主要的調控序列則可能在-300 bp 之內。以 PLACE 分析 P19 啟動子序列,結果顯示,在-300 bp 至-600 bp 之間具有 POLLEN1LELAT52 (Bate & Twell, 1998) 及 GTGANTG10 (Rogers *et al.*, 2001) 兩個花藥專一性的調控序列,分別位於-588 bp 位置及-369 bp 位置,可能是參與水稻花藥專一性表現的主要調控序列;菸草則可能是利用-300 bp 內的 POLLEN1LELAT52 (-283 bp) 或 GTGANTG10 (-53 bp) 調控花藥專一性表現。

2000 bp 啟動子片段可以在水稻中表現 GUS 基因,卻無法在菸草中啟動 GUS 基因表現,可能是-1500 bp 至-2000 bp 片段具有物種專一性的花藥調控序列。前人將水稻種子專一性啟動子 Gt1 接上報導基因 GUS 並轉殖於菸草當中,發現菸草種子的專一性表現程度比水稻低。進一步使用序列刪減及 DNase 足跡法分析啟動子調控序列與蛋白質結合的情形,結果顯示,菸草中的轉錄因子無法與水稻種子專一性的調控序列結合,導致 GUS 基因表現量不高 (Zheng *et al.*, 1993)。對照本實驗的結果,即可推測-1500 bp 至-2000 bp 片段啟動子序列中可能存在水稻專一性花藥正調控序列或菸草專一性負調控序列。

啟動子調控表現量部分,在水稻 RA3 時期,600 bp、1200 bp、1500 bp 以及 2000 bp 啟動子片段驅動 GUS 基因的表現量大致相同,顯示至多只需要 600 bp 啟動子就能在水稻花藥中獲得同等表現。而在菸草的花藥染色結果中,不論在 TA2 或 TA3




時期，越長的片段 GUS 表現量越低，顯示-600 bp 至-1500 bp 可能另有較弱的菸草專一性花藥負調控序列，降低 GUS 基因在花藥中的表現量，但卻不至於完全抑制表現。

另外，菸草花藥的染色結果中，有部分花藥明顯褐化，導致觀察時不易判別染色結果，可以在 GUS 染劑中添加 10 至 100 M 的抗壞血酸 (ascorbate) 做為抗氧化劑 (antioxidant)，防止花藥褐化 (Gallagher, 1992)。

3. P19 啟動子於其他組織之表現

雖然上述資料庫皆顯示 *Os08g43240* 基因專一性表現在未成熟穗當中，但是實際實驗結果中，卻可以在水稻的內外穎、柱頭、鱗被、葉片以及菸草的花萼、花瓣、柱頭、花絲、葉片等組織中觀測到 GUS 基因表現。此一現象可能與資料庫的組織分類有關，在 MPSS 資料庫中，組織表現只區分種子、葉片、根、莖、花粉、柱頭及子房；在水稻 eFP 資料庫中，則區分為根、葉、種子以及分生組織。本次實驗結果的 P19-C1301 序列刪減系統轉殖水稻在上述部位除了柱頭之外，皆沒有 GUS 基因表現。MPSS 資料庫將柱頭與子房歸為同一組組織討論，對照本次水稻的實驗結果可以發現，在子房中皆沒有 GUS 基因表現而柱頭中有少許的 GUS 活性，可能資料庫將兩個組織合併分析之後，因為柱頭和子房的重量差異過大，導致柱頭的基因表現受到子房稀釋而無法被偵測。觀察 P19-C1301 序列刪減系統的水稻柱頭染色結果可看出，GUS 表現出現在 300 bp、600 bp 以及 2000 bp 啟動子片段；1200 bp 及 1500 bp 則沒有 GUS 活性，顯示在-600 bp 至-1500 bp 片段中可能存在柱頭的負調控序列，抑制基因表現，並且在-1500 bp 至-2000 bp 具有正調控序列回復基因表現。而本次實驗的菸草雌性生殖器官染色結果也與水稻相似，在子房皆無 GUS 活性，而柱頭及花柱可以偵測到 GUS 基因表現，且調控柱頭及花柱 GUS 表現的啟動子片段也為 300 bp 及 600 bp，顯示 P19 啟動子對於水稻及菸草的雌性生殖器官發育調控機制類似。



而資料庫中僅以未成熟穗泛指水稻生殖器官中的所有組織，詳細部位則只有花藥 SBS 轉錄體庫將花藥獨立區分出來，無法得知 *Os08g43240* 基因是否在其他花器部位中表現。本次實驗結果顯示，在水稻的內穎、外穎、鱗被與菸草的花萼、花瓣都可以偵測到 GUS 基因表現，且兩者的表現皆在 300 bp、600 bp 及 1200 bp 啟動子片段。根據前人透過突變體分析，發現水稻花器發育的調控基因與雙子葉植物的調控基因具有對應關係。可以將水稻的內穎、外穎對應到雙子葉植物的花萼；將水稻的鱗被對應到雙子葉植物的花瓣 (Yoshida & Nagato, 2011)。對照本試驗實驗結果可以發現，不僅相對應花器部位的 GUS 基因表現相同，序列刪減分析系統的片段表現結果也一致，顯示 P19 啟動子對於水稻內外穎、鱗被與菸草花萼、花瓣的發育調控機制類似。

水稻的葉片染色結果顯示，除了 600 bp 片段的葉片葉緣外，其他啟動子片段皆沒有 GUS 活性；而菸草的染色結果則是除了 300 bp 啟動子片段之外皆有 GUS 表現。分析 P19 啟動子序列發現，在 -144 bp 位置具有刻傷逆境 (wounding stress) 的調控序列 WBOXNTERF3 (Nishiuchi *et al.*, 2004)，在刻傷逆境下可能會誘導 GUS 基因表現。另外，前人研究發現若將單子葉植物的葉片專一性啟動子 *rbcS* 啟動子運用於雙子葉植物；或將雙子葉植物的 *rbcS* 啟動子運用於單子葉植物，都無法成功的表現在葉肉細胞當中，顯示葉片發育的調控序列在單雙子葉植物中具有不同的調控機制 (Schäffner & Sheen, 1991)。因此，菸草葉片的染色結果則可能是 P19 啟動子對於單子葉植物及雙子葉植物的葉片調控差異導致。

未來展望



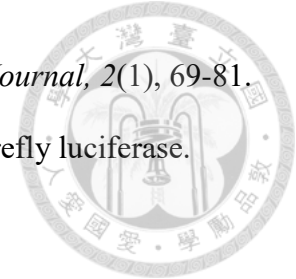
本試驗選殖出水稻的 P19 啟動子，並且透過報導基因 GUS 確定 P19 啟動子可以在水稻及菸草的花藥中大量表現，唯啟動子的表現時期仍需要進一步觀察花粉細胞發育狀態來判定。此外，本試驗建立的 P19-C1301 序列刪減系統中，900 bp 片段經多次轉殖後才獲得轉殖水稻及菸草，目前尚無花藥可以分析啟動子表現情形，無法準確分辨-600 bp 至-900 bp 以及-900 bp 至-1200 bp 兩個片段對水稻以及菸草花器的發育調控。因此未來應進行精細的花粉細胞發育時期判定，並且將 900 bp 的花藥及其他花器組織染色結果納入 P19-C1301 序列刪減系統，對 P19 啟動子進行完整的序列刪減分析。此外，也應該對已建立的序列刪減系統進行南方墨點分析 (Southern blot) 以及 TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR)，分別分析外源基因拷貝數以及插入位點的序列是否影響 GUS 基因表現，進而導致 P19 啟動子表現的誤判。

另外，若花粉細胞發育時期的判定結果主要在減數分裂時期或其後表現，即可將 P19 啟動子刪減系統接上轉位酶，運用於水稻以及菸草的轉位子基因鈎取系統，增進轉位子在生殖細胞的轉位專一性。因為轉位酶具有反劑量效應，且每個物種最適合的轉位閾值不同，因此必須實際接上轉位酶才能評估啟動子是否適用於基因鈎取系統。另外，因為本次試驗選用的兩種植物皆為花藥培養 (anther culture) 技術發展純熟之植物，啟動子於花藥細胞中驅使轉位子轉位後，再透過花藥培養即可有效且快速地創造同質結合突變株 (homozygous mutant)。

參考文獻



- Bate, N., & Twell, D. (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant molecular biology*, 37(5), 859-869.
- Benfey, P. N., & Chua, N.-H. (1990). The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, 250(4983), 959-966.
- Benfey, P. N., Ren, L., & Chua, N.-H. (1989). The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *The EMBO Journal*, 8(8), 2195.
- Bomhoff, G., Klapwijk, P. M., Kester, H. C., Schilperoort, R. A., Hernalsteens, J. P., & Schell, J. (1976). Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics MGG*, 145(2), 177-181.
- Butler, J. E. F., & Kadonaga, J. T. (2001). Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes & Development*, 15(19), 2515-2519. doi:10.1101/gad.924301
- Cao, P., Jung, K.-H., Choi, D., Hwang, D., Zhu, J., & Ronald, P. C. (2012). The rice oligonucleotide array database: an atlas of rice gene expression. *Rice*, 5(1), 1.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., & Prasher, D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Czarnecka, E., Key, J., & Gurley, W. B. (1989). Regulatory domains of the Gmhsp17. 5-E heat shock promoter of soybean. *Molecular and cellular biology*, 9(8), 3457-3463.
- Dean, C., Sjodin, C., Page, T., Jones, J., & Lister, C. (1992). Behaviour of the maize



- transposable element Ac in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2(1), 69-81.
- Deluca, M., & McElroy, W. (1978). Purification and properties of firefly luciferase. *Methods in enzymology*, 57, 3-15.
- Dorsch-Häsler, K., Keil, G. M., Weber, F., Jasin, M., Schaffner, W., & Koszinowski, U. H. (1985). A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(24), 8325-8329.
- Edlund, T., Walker, M. D., Barr, P. J., & Rutter, W. J. (1985). Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5'flanking elements. *Science*, 230(4728), 912-916.
- Everett, R., Baty, D., & Chambon, P. (1983). The repeated GC-rich motifs upstream from the TATA box are important elements of the SV40 early promoter. *Nucleic acids research*, 11(8), 2447-2464.
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1), 243-282.
- Firek, S., Martin, D. J., Roberts, M. R., Sturgess, F., Scott, R., & Draper, J. (1996). Gametophyte-specific transposition of the maize Ds element in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 10(3), 569-578.
- Fußwinkel, H., Schein, S., Courage, U., Starlinger, P., & Kunze, R. (1991). Detection and abundance of mRNA and protein encoded by transposable element Activator (Ac) in maize. *Molecular and General Genetics MGG*, 225(2), 186-192.
- Fujiwara, T., & Beachy, R. N. (1994). Tissue-specific and temporal regulation of a β -conglycinin gene: roles of the RY repeat and other cis-acting elements. *Plant molecular biology*, 24(2), 261-272.



- Galas, D. J., & Schmitz, A. (1978). DNAase footprinting a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic acids research*, 5(9), 3157-3170.
- Gallagher, S. R. (1992). *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression*: Academic Press.
- Garner, M. M., & Revzin, A. (1986). The use of gel electrophoresis to detect and study nucleic acid—protein interactions. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(10), 395-396.
- Gierl, A., & Saedler, H. (1992). Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant molecular biology*, 19(1), 39-49.
- Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology advances*, 13(2), 247-261.
- Glick, B. R., & Whitney, G. K. (1987). Factors affecting the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology*, 1(5), 277-282.
- Goldberg, R. B. (1988). Plants: novel developmental processes. *Science*, 24, 0.
- Goldberg, R. B., Beals, T. P., & Sanders, P. M. (1993). Anther development: basic principles and practical applications. *The Plant Cell*, 5(10), 1217.
- Hague, J. P., Dellaporta, S. L., Moreno, M. A., Longo, C., Nelson, K., & Kausch, A. P. (2012). Pollen Sterility—A Promising Approach to Gene Confinement and Breeding for Genetically Modified Bioenergy Crops. *Agriculture*, 2(4), 295-315.
- Hanson, D. D., Hamilton, D. A., Travis, J. L., Bashe, D. M., & Mascarenhas, J. P. (1989). Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays* and its expression. *The Plant Cell*, 1(2), 173-179.
- Hatton, D., Sablowski, R., Yung, M. H., Smith, C., Schuch, W., & Bevan, M. (1995). Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 7(6), 859-876.

Heinlem, M., Brattig, T., & Kunze, R. (1994). In vivo aggregation of maize Activator (Ac) transposase in nuclei of maize endosperm and *Petunia* protoplasts. *The Plant Journal*, 5(5), 705-714.

Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E., Hernalsteens, J.-P., Van Montagu, M., & Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal*, 2(6), 987.

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, 27(1), 297-300.

Huang, M.-D., Wei, F.-J., Wu, C.-C., Hsing, Y.-I. C., & Huang, A. H. (2009). Analyses of advanced rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. *Plant physiology*, 149(2), 694-707.

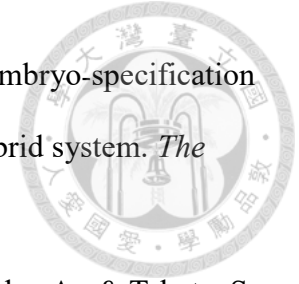
Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant molecular biology reporter*, 5(4), 387-405.

Jefferson, R. A., Burgess, S. M., & Hirsh, D. (1986). beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8447-8451.

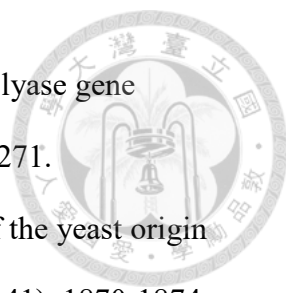
Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology*, 17(3), 287-291.


Keller, J., Jones, J. D., Harper, E., Lim, E., Carland, F., Ralston, E. J., & Dooner, H. K. (1993). Effects of gene dosage and sequence modification on the frequency and timing of transposition of the maize element Activator (Ac) in tobacco. *Plant molecular biology*, 21(1), 157-170.

Kim, S. Y., Chung, H. J., & Thomas, T. L. (1997). Isolation of a novel class of bZIP



- transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *The Plant Journal*, 11(6), 1237-1251.
- Kobayashi, T., Kobayashi, E., Sato, S., Hotta, Y., Miyajima, N., Tanaka, A., & Tabata, S. (1994). Characterization of cDNAs induced in meiotic prophase in lily microsporocytes. *DNA Research*, 1(1), 15-26.
- Koltunow, A. M., Truettner, J., Cox, K. H., Wallroth, M., & Goldberg, R. B. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *The Plant Cell*, 2(12), 1201-1224.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G. P., & Schell, J. (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(21), 8467-8471.
- Kunze, R., Stochaj, U., Laufs, J., & Starlinger, P. (1987). Transcription of transposable element Activator (Ac) of *Zea mays* L. *The EMBO Journal*, 6(6), 1555.
- Kyozuka, J., McElroy, D., Hayakawa, T., Xie, Y., Wu, R., & Shimamoto, K. (1993). Light-regulated and cell-specific expression of tomato rbcS-gusA and rice rbcS-gusA fusion genes in transgenic rice. *Plant physiology*, 102(3), 991-1000.
- Lam, E., Benfey, P. N., Gilmartin, P. M., Fang, R.-X., & Chua, N.-H. (1989). Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(20), 7890-7894.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Leyva, A., Liang, X., Pintor-Toro, J. A., Dixon, R. A., & Lamb, C. J. (1992).

- 
- cis-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *The Plant Cell*, 4(3), 263-271.
- Li, J. J., & Herskowitz, I. (1993). Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science*, 262(5141), 1870-1874.
- Lu, N., Zhao, B., Pereira, A., Shulaev, V., & Veilleux, R. E. (2015). Anther culture induces transposable element movement in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(1), 361-366.
- Luo, H., Lee, J.-Y., Hu, Q., Nelson-Vasilchik, K., Eitas, T. K., Lickwar, C., Hodges, T. K. (2006). RTS, a rice anther-specific gene is required for male fertility and its promoter sequence directs tissue-specific gene expression in different plant species. *Plant molecular biology*, 62(3), 397-408.
- Müller-Neumann, M., Yoder, J., & Starlinger, P. (1984). The DNA sequence of the transposable element Ac of *Zea mays* L. *Molecular and General Genetics MGG*, 198(1), 19-24.
- Maniatis, T., Goodbourn, S., & Fischer, J. A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236(4806), 1237-1245.
- Mariani, C., Beuckeleer, M. D., Truettner, J., Leemans, J., & Goldberg, R. B. (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 347, 737-741.
- Matsuoka, M., Tada, Y., Fujimura, T., & Kano-Murakami, Y. (1993). Tissue-specific light-regulated expression directed by the promoter of a C4 gene, maize pyruvate, orthophosphate dikinase, in a C3 plant, rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20), 9586-9590.
- McClintock, B. (1948). Mutable loci in maize. *Carnegie Inst Wash Year Book*, 47, 155-169.
- McElroy, D., Rothenberg, M., Reece, K. S., & Wu, R. (1990a). Characterization of the

- 
- rice (*Oryza sativa*) actin gene family. *Plant molecular biology*, 15(2), 257-268.
- McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., & Wu, R. (1990b). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell*, 2(2), 163-171.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H., & Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13(12), 2656-2662.
- Morita, R., Hattori, Y., Yokoi, S., Takase, H., Minami, M., Hiratsuka, K., & Toriyama, K. (2003). Assessment of utility of meiosis-associated promoters of lily for induction of germinal Ds transposition in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, 44(6), 637-642.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal*, 34(2), 137-148.
- Nishimura, S., & Nomura, M. (1959). Ribonuclease of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry*, 46(2), 161-167.
- Nishiuchi, T., Shinshi, H., & Suzuki, K. (2004). Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 Gene by Wounding in Tobacco Leaves POSSIBLE INVOLVEMENT OF NtWRKYs AND AUTOREPRESSION. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55355-55361.
- Nobuta, K., Venu, R., Lu, C., Beló, A., Vemaraju, K., Kulkarni, K., Wang, G.-l. (2007). An expression atlas of rice mRNAs and small RNAs. *Nature biotechnology*, 25(4), 473-477.
- Odell, J. T., Nagy, F., & Chua, N.-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*.

Oh, S. A., Park, K. S., Twell, D., & Park, S. K. (2010). The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division. *The Plant Journal*, 64(5), 839-850.

Ohshima, M., Itoh, H., Matsuoka, M., Murakami, T., & Ohashi, Y. (1990). Analysis of stress-induced or salicylic acid-induced expression of the pathogenesis-related 1a protein gene in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 2(2), 95-106.

Ong, C.-T., & Corces, V. G. (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 12(4), 283-293.

Ow, D. W., Wood, K. V., & DeLuca, M. (1986). Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science*.


Patel, R. V., Nahal, H. K., Breit, R., & Provart, N. J. (2012). BAR expressolog identification: expression profile similarity ranking of homologous genes in plant species. *The Plant Journal*, 71(6), 1038-1050.

Roberts, M. R., Foster, G. D., Blundell, R. P., Robinson, S. W., Kumar, A., Draper, J., & Scott, R. (1993). Gametophytic and sporophytic expression of an antherspecific *Arabidopsis thaliana* gene. *The Plant Journal*, 3(1), 111-120.

Rogers, H., Bate, N., Combe, J., Sullivan, J., Sweetman, J., Swan, C., Twell, D. (2001). Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant molecular biology*, 45(5), 577-585.

Rommens, C. M., van Haaren, M. J., Buchel, A. S., Mol, J. N., van Tunen, A. J., Nijkamp, H. J. J., & Hille, J. (1992). Transactivation of Ds by Ac-transposase gene fusions in tobacco. *Molecular and General Genetics MGG*, 231(3), 433-441.

Rosellini, D., Pezzotti, M., & Veronesi, F. (2001). Characterization of transgenic male sterility in alfalfa. *Euphytica*, 118(3), 313-319.

- 
- Sari-Gorla, M., Frova, C., Binelli, G., & Ottaviano, E. (1986). The extent of gametophytic-sporophytic gene expression in maize. *Theoretical and applied genetics*, 72(1), 42-47.
- Schöffl, F., Rieping, M., Baumann, G., Bevan, M., & Angermüller, S. (1989). The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics MGG*, 217(2-3), 246-253.
- Schäffner, A. R., & Sheen, J. (1991). Maize rbcS promoter activity depends on sequence elements not found in dicot rbcS promoters. *The Plant Cell*, 3(9), 997-1012.
- Schrauwen, J., Mettenmeyer, T., Croes, A., & Wullems, G. (1996). Tapetum-specific genes: what role do they play in male gametophyte development? *Acta Botanica Neerlandica*, 45(1), 1-15.
- Scofield, S. R., English, J. J., & Jones, J. D. (1993). High level expression of the Activator transposase gene inhibits the excision of Dissociation in tobacco cotyledons. *Cell*, 75(3), 507-517.
- Scott, R., Dagless, E., Hodge, R., Paul, W., Soufleri, I., & Draper, J. (1991). Patterns of gene expression in developing anthers of Brassica napus. *Plant molecular biology*, 17(2), 195-207.
- Scott, R. J., Spielman, M., & Dickinson, H. G. (2004). Stamen structure and function. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S46-S60.
- Seurinck, J., Truettner, J., & Goldberg, R. B. (1990). The nucleotide sequence of an anther-specific gene. *Nucleic acids research*, 18(11), 3403.
- Sharma, A. K., & Sharma, M. K. (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology advances*, 27(6), 811-832.
- Shaw, C., Carter, G., & Watson, M. (1984). A functional map of the nopaline synthase promoter. *Nucleic acids research*, 12(20), 7831-7846.

Shirley, B., Berry-Lowe, S., Rogers, S., Flick, J., Horsch, R., Fraley, R., & Meagher, R. (1987). 5' proximal sequences of a soybean ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase small subunit gene direct light and phytochrome controlled transcription. *Nucleic acids research*, 15(16), 6501-6514.



Smale, S. T., & Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 449-479.

doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520

Staiger, C., & Schliwa, M. (1987). Actin localization and function in higher plants. *Protoplasma*, 141(1), 1-12.

Suzuki, H., Fowler, T., & Tierney, M. (1993). Deletion analysis and localization of SbPRP1, a soybean cell wall protein gene, in roots of transgenic tobacco and cowpea. *Plant molecular biology*, 21(1), 109-119.


Tsuchiya, T., Toriyama, K., Ejiri, S.-i., & Hinata, K. (1994). Molecular characterization of rice genes specifically expressed in the anther tapetum. *Plant molecular biology*, 26(6), 1737-1746.

Twell, D., Wing, R., Yamaguchi, J., & McCormick, S. (1989). Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Molecular and General Genetics MGG*, 217(2-3), 240-245.

Van de Rhee, M. D., Van Kan, J., González-Jaén, M. T., & Bol, J. F. (1990). Analysis of regulatory elements involved in the induction of two tobacco genes by salicylate treatment and virus infection. *The Plant Cell*, 2(4), 357-366.

van Tunen, A. J., Mur, L. A., Brouns, G. S., Rienstra, J.-D., Koes, R. E., & Mol, J. (1990). Pollen-and anther-specific chi promoters from petunia: tandem promoter regulation of the chiA gene. *The Plant Cell*, 2(5), 393-401.

Wang, Y., Zhang, W., Cao, J., McElroy, D., & Wu, R. (1992). Characterization of cis-acting elements regulating transcription from the promoter of a constitutively

- 
- active rice actin gene. *Molecular and cellular biology*, 12(8), 3399-3406.
- Wasylyk, B., Derbyshire, R., Guy, A., Molko, D., Roget, A., Téoule, R., & Chambon, P. (1980). Specific in vitro transcription of conalbumin gene is drastically decreased by single-point mutation in TATA box homology sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), 7024-7028.
- Weterings, K., Schrauwen, J., Wullems, G., & Twell, D. (1995). Functional dissection of the promoter of the pollen-specific gene NTP303 reveals a novel pollen-specific, and conserved cis-regulatory element. *The Plant Journal*, 8(1), 55-63.
- Wilkinson, J. E., Twell, D., & Lindsey, K. (1997). Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, 48(2), 265-275.
- Wittink, F. R., Knuiman, B., Derksen, J., Čapková, V., Twell, D., Schrauwen, J. A., & Wullems, G. J. (2000). The pollen-specific gene Ntp303 encodes a 69-kDa glycoprotein associated with the vegetative membranes and the cell wall. *Sexual Plant Reproduction*, 12(5), 276-284.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., & Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant and Cell Physiology*, 33(3), 217-224.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1993). Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Molecular and General Genetics MGG*, 236(2-3), 331-340.
- Yokoi, S., Tsuchiya, T., Toriyama, K., & Hinata, K. (1997). Tapetum-specific expression of the Osg6B promoter- β -glucuronidase gene in transgenic rice. *Plant Cell*



- Reports*, 16(6), 363-367.
- Yoshida, H., & Nagato, Y. (2011). Flower development in rice. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4719-4730.
- Zachgo, S., Saedler, H., & Schwarz-Sommer, Z. (1997). Pollen-specific expression of DEFH125, a MADS-box transcription factor in *Antirrhinum* with unusual features. *The Plant Journal*, 11(5), 1043-1050.
- Zhang, D., Liang, W., Yin, C., Zong, J., Gu, F., & Zhang, D. (2010). OsC6, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice. *Plant physiology*, 154(1), 149-162.
- Zheng, Z., Kawagoe, Y., Xiao, S., Li, Z., Okita, T., Hau, T. L., Murai, N. (1993). 5' distal and proximal cis-acting regulator elements are required for developmental control of a rice seed storage protein glutelin gene. *The Plant Journal*, 4(2), 357-366.
- 王秋岩、何淑雅、馬云、李俐娟、李斌元。(2015)。啟動子分析方法的研究進展。現代生物醫學進展(14), 2794-2800。
- 李貴節。(2011)。水稻花藥發育的細胞形態學精細分期。重慶師範大學學報：自然科學版, 28(3), 56-59。
- 張宏、王波、薛愛群、曹俊、李寶健、譚兆平、黃偉如。(1998)。雄性不育嵌合基因的構建及番茄轉化研究。遺傳, 20(3), 5-7。
- 曹克浩。(2003)。水稻 *Osg6B* 啟動子的序列和功能分析及大腸桿菌 *argE* 基因的克隆和對菸草的轉化。北京：中國農業大學。
- 陸桂華、張景六。(2000)。RTS 啟動子與 GUS 的嵌合基因在轉基因水稻花藥中的專一性表達。植物生理學報 (ISSN0257-4829), 26(2), 164-170。
- 馮九煥、盧永根、劉向東、徐雪賓。(2001)。水稻花粉發育過程及其分期。中國水稻科學, 15(1), 21-28。
- 楊琇淳。(2015)。構築生殖轉位系統生產同質結合突變體。臺灣大學農藝學研究所

學位論文, 1-98.

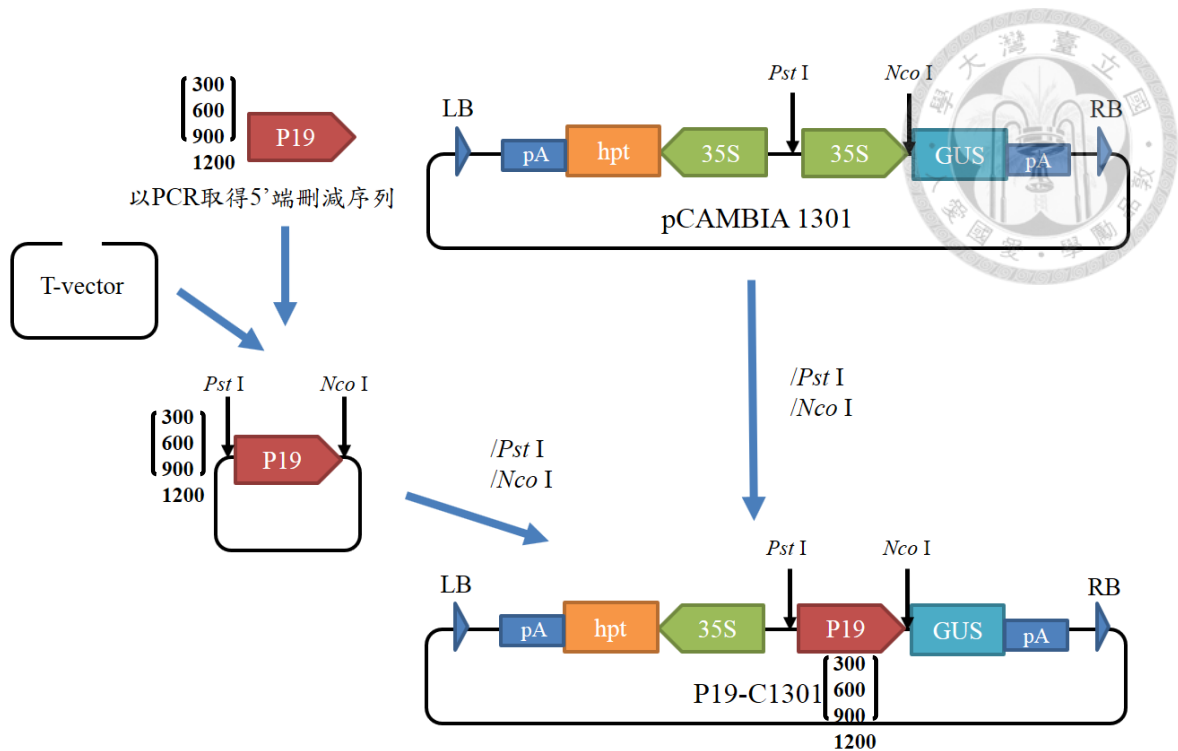
劉峻愷. (2012). 水稻花藥發育早期專一性啟動子之選殖與分析. 臺灣大學農藝學

研究所學位論文, 1-100.

賴好青. (2012). 水稻花粉專一啟動子之分析. 臺灣大學農藝學研究所學位論文,

1-85.

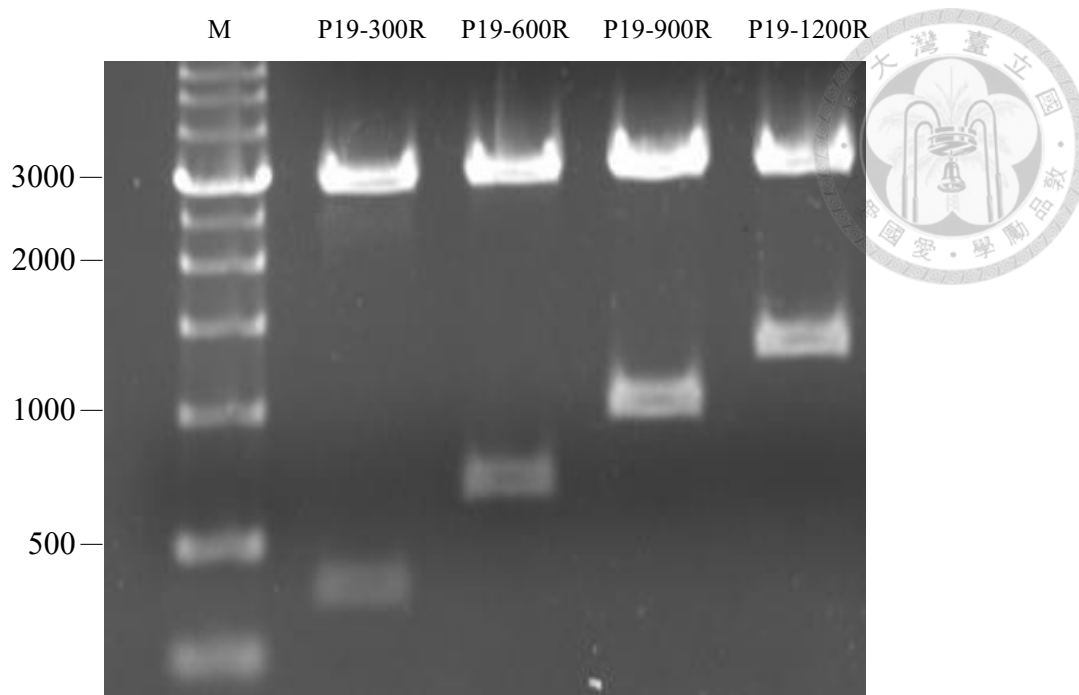




圖一、P19-C1301 序列刪減系統之構築流程

透過限制酶剪切將 P19 啟動子取代 pCambia 1301 載體上的 CaMV35S 啟動子，建構 P19-C1301 序列刪減構築。

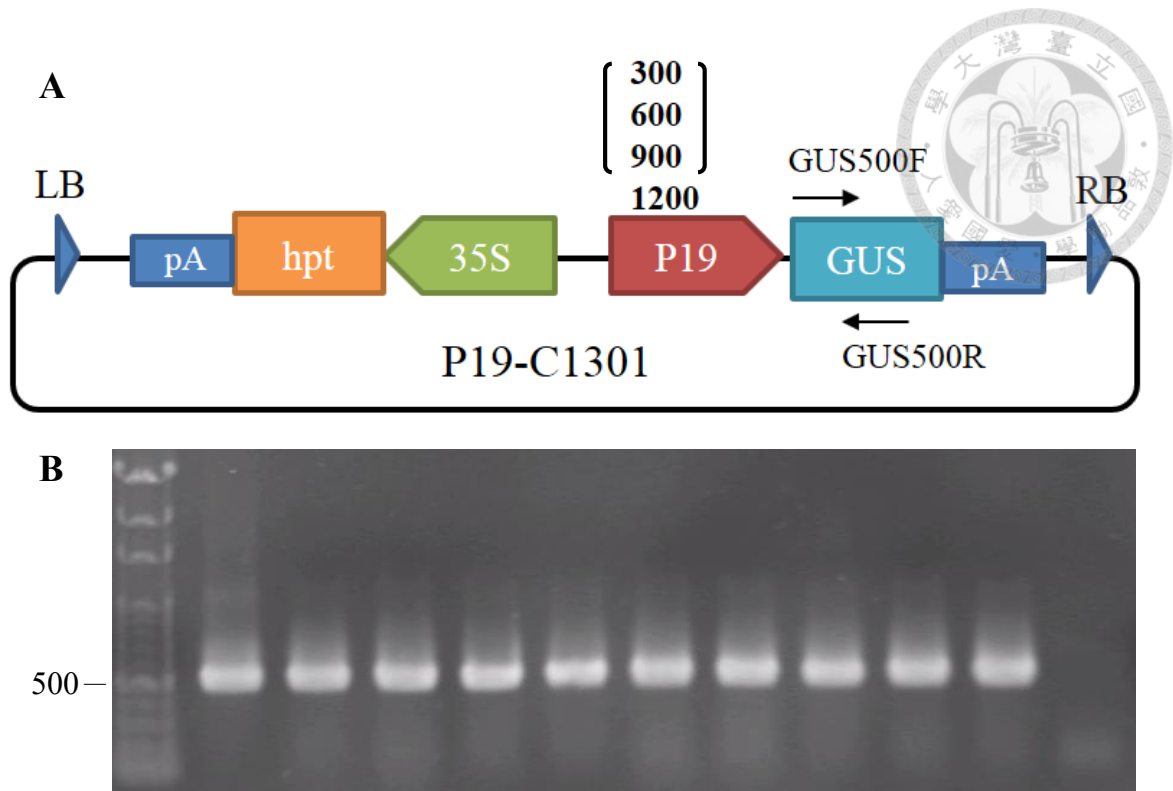
LB：左邊界 (left border)；RB：右邊界 (right border)；35S：CaMV35S 啟動子；P19：P19 啟動子片段；hpt：潮黴素轉移酶基因 (hygromycin phosphotransferase gene)；GUS： β -葡萄糖醛酸甙酶基因 (β -glucuronidase gene)；pA：多聚腺苷酸尾 (poly adenine tail)。



圖二、以限制酵素分析 P19 啟動子序列插入方向

以 *HincII* 處理 P19-1200 質體後經電泳分析，將切出 4014 bp 以及 203 bp 的質體命名為 P19-1200F；將切出 3154 bp 以及 1063 bp 的質體命名為 P19-1200R。以 *HincII* 處理 P19-900 質體後經電泳分析，將切出 3714 bp 以及 203 bp 的質體命名為 P19-900F；將切出 3154 bp 以及 763 bp 的質體命名為 P19-900R。以 *HincII* 處理 P19-600 質體後經電泳分析，將切出 3414 bp 以及 203 bp 的質體命名為 P19-1200F；將切出 3154 bp 以及 463 bp 的質體命名為 P19-600R。以 *SphI* 處理 P19-300 質體後經電泳分析，將切出 3215 bp、98 bp 以及 4 bp 的質體命名為 P19-300F；將切出 3041 bp、272 bp 以及 4 bp 的質體命名為 P19-300R。

M：1 kb 核酸標誌。



圖三、以 PCR 方式檢測 P19-C1301 序列刪減系統水稻及菸草轉殖系植株

抽取水稻及菸草轉殖系植株葉片之染色體 DNA，利用 GUS500F、GUS500R 引子對進行 PCR 反應，擴增出 500 bp 片段即為轉殖成功的植株。

A：P19-C1301 序列刪減系統構築及 GUS500F、GUS500R 引子對位置示意圖；

B：實際電泳膠圖。

LB：左邊界 (left border)；RB：右邊界 (right border)；35S：CaMV35S 啟動子；P19：P19 啟動子片段；hpt：潮黴素轉移酶基因 (hygromycin phosphotransferase gene)；GUS：β-葡萄糖醛酸甙酶基因 (β-glucuronidase gene)；pA：多聚腺苷酸尾 (poly adenine tail)。

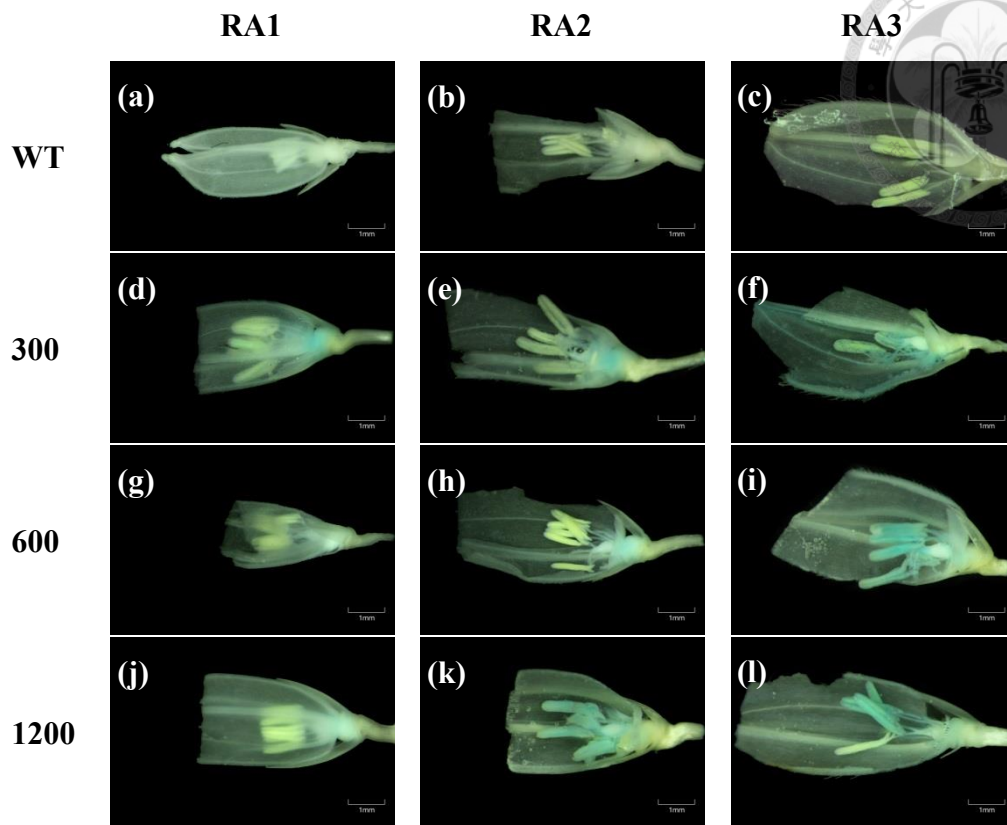


圖 四、P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖系花藥 GUS 染色結果

在水稻花藥發育時期挑選 P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖株小穗，進行 GUS 染色。

(a)至(c)為野生型水稻；(d)至(f)為 P19-300-1031；(g)至(i)為 P19-600-1031；(j)至(l)為 P19-1200-1031。(a)、(d)、(g)、(j)為 RA1 時期；(b)、(e)、(h)、(k)為 RA2 時期；(c)、(f)、(i)、(l)為 RA3 時期。

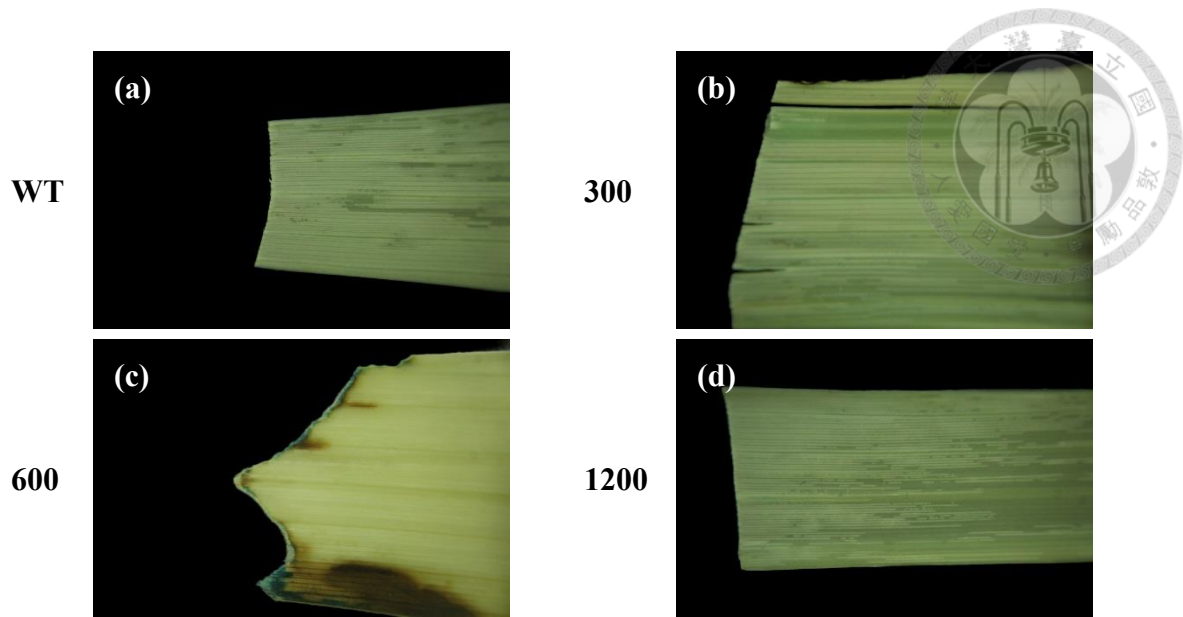
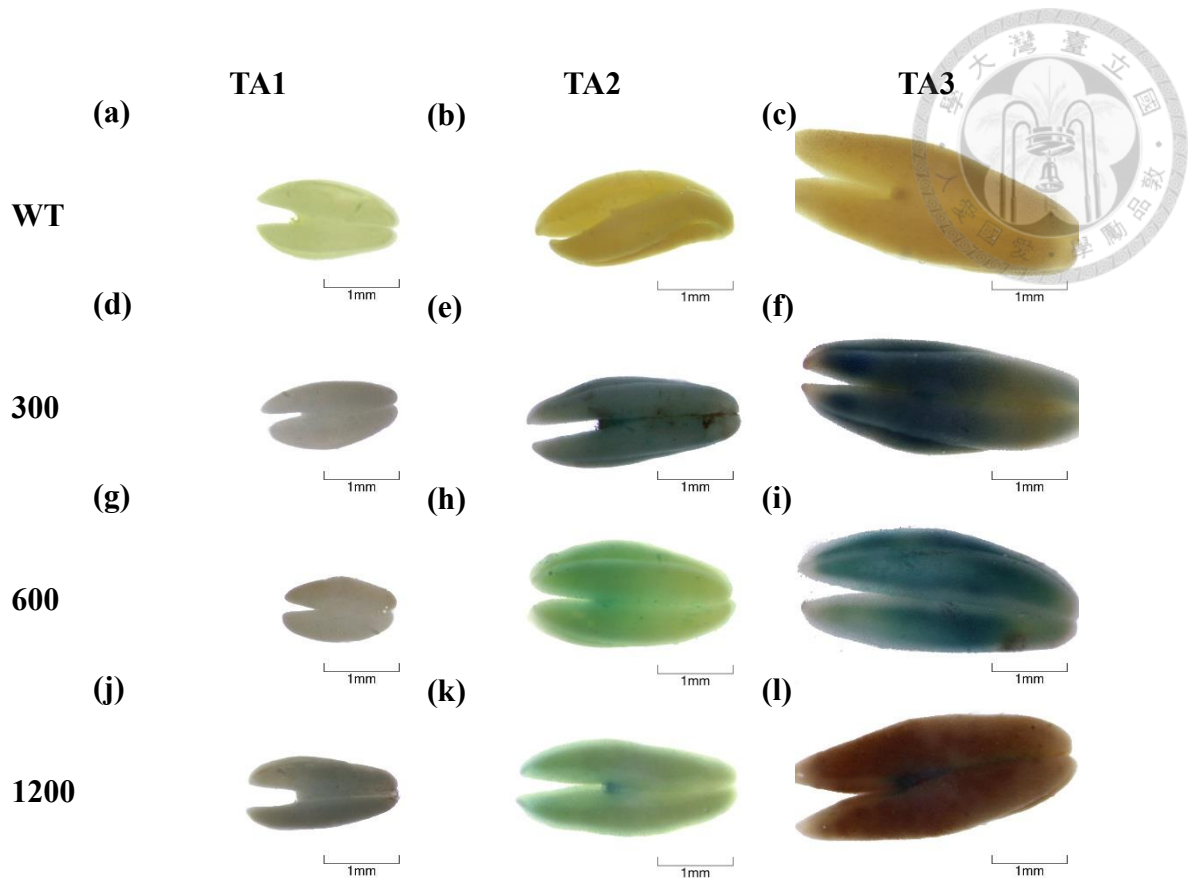


圖 五、P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖系葉片 GUS 染色結果

挑選 P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖株葉片，進行 GUS 染色。

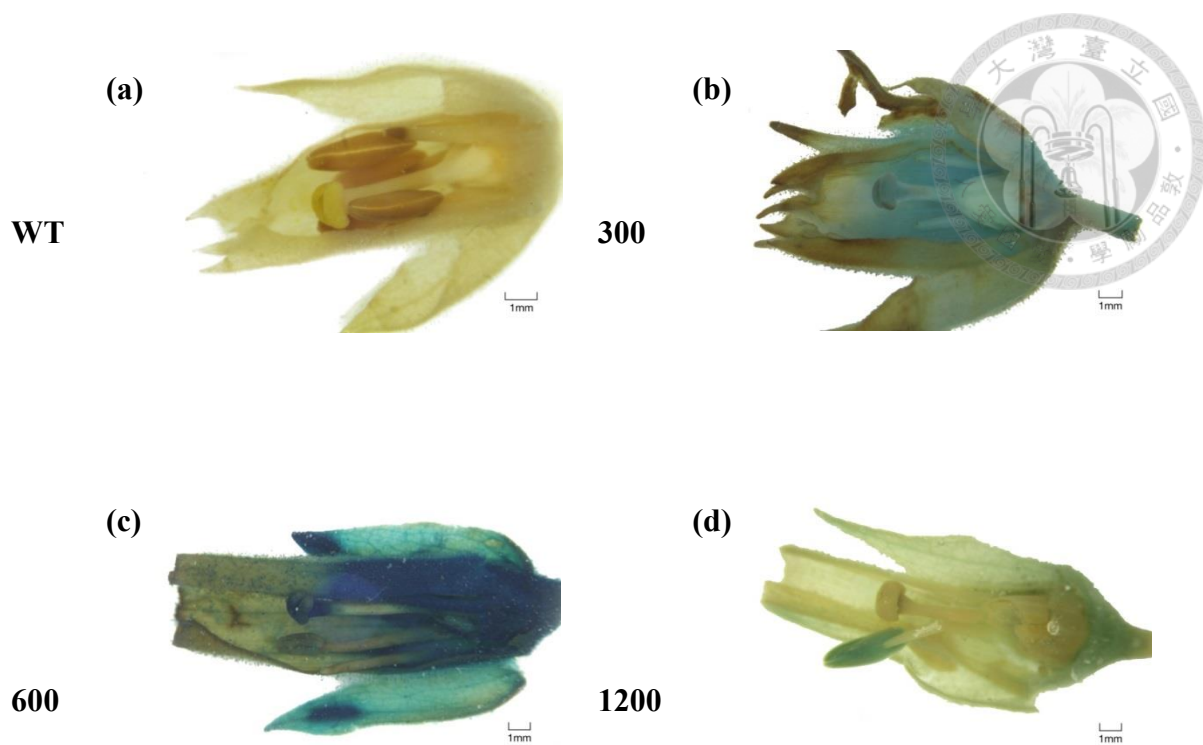
(a)為野生型水稻；(b)為 P19-300-1031；(c)為 P19-600-1031；(d)為 P19-1200-1031。



圖六、P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖系花藥 GUS 染色結果

在菸草花藥發育時期挑選 P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖株花藥，進行 GUS 染色。

(a)至(c)為野生型菸草；(d)至(f)為 P19-300-1031；(g)至(i)為 P19-600-1031；(j)至(l)為 P19-1200-1031。(a)、(d)、(g)、(j)為 TA1 時期；(b)、(e)、(h)、(k)為 TA2 時期；(c)、(f)、(i)、(l)為 TA3 時期。



圖七、P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖系花苞 GUS 染色結果

在菸草花藥發育時期挑選 P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖株花苞，進行 GUS 染色。

(a)為野生型菸草；(b)為 P19-300-1031；(c)為 P19-600-1031；(d)為 P19-1200-1031。

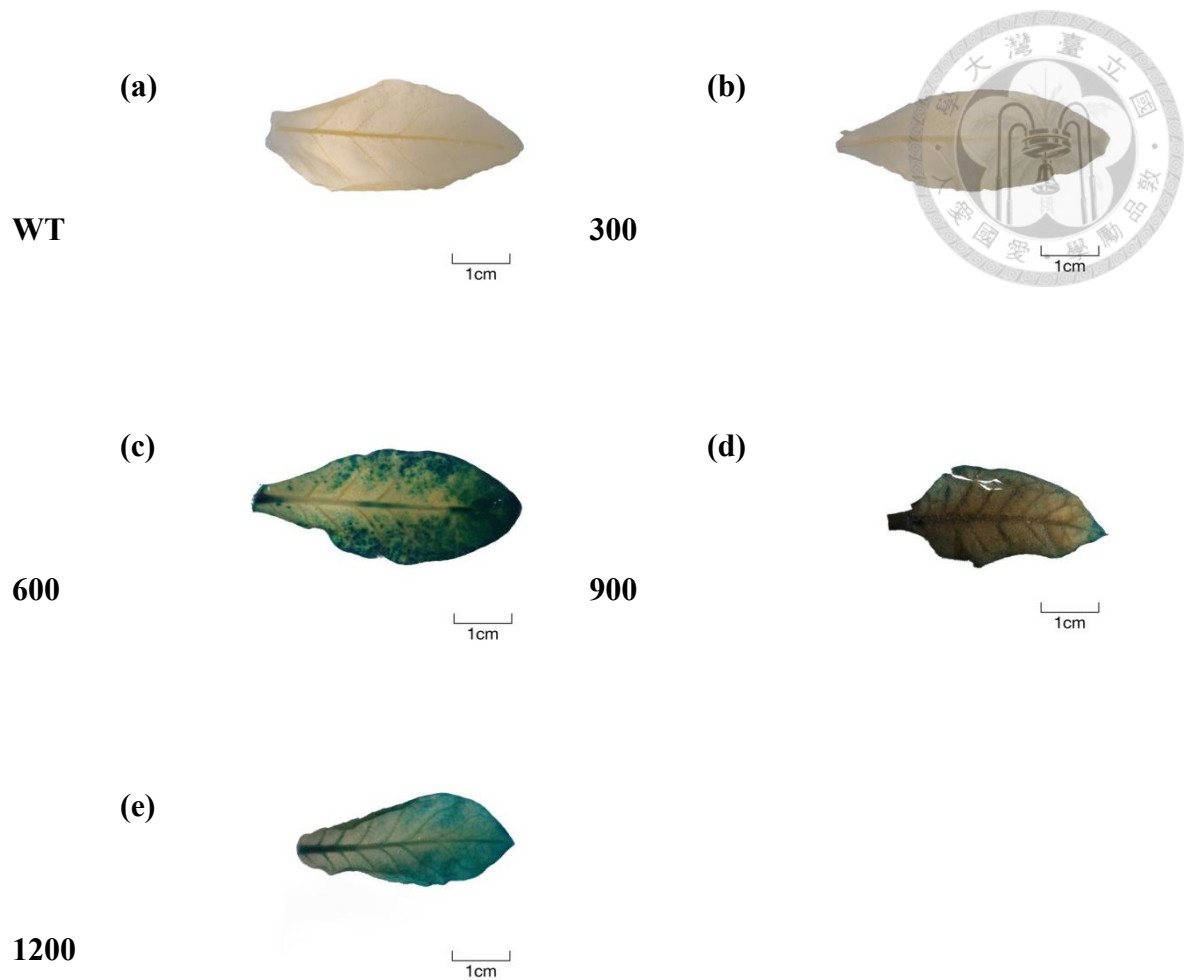


圖 八、P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖系葉片 GUS 染色結果

挑選 P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖株葉片，進行 GUS 染色。

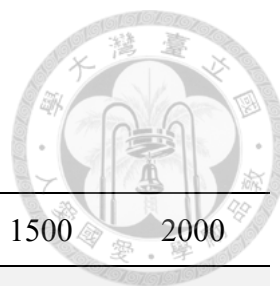
(a)為野生型菸草；(b)為 P19-300-1031；(c)為 P19-600-1031；(d)為 P19-900-1031；
(e)為 P19-1200-1031。



表一、P19-C1301 序列刪減系統所獲得之轉殖株情形

		轉殖系	轉殖株	種子收穫
水稻	P19-300-1301	4	11	0
	P19-600-1301	5	18	5
	P19-900-1301	2	6	0
	P19-1200-1301	10	10	7
菸草	P19-300-1301	13	18	1
	P19-600-1301	15	27	1
	P19-900-1301	2	2	0
	P19-1200-1301	8	9	0

利用農桿菌轉殖水稻及菸草，並以 PCR 反應確認轉殖株。



表二、P19-C1301 序列刪減系統於水稻之表現情形

		WT	300	600	1200	1500	2000
花藥	RA1	—	—	—	—	*	*
	RA2	—	—	—	+	*	*
	RA3	—	—	+	+	+	+
內外穎	RA1	—	—	—	—	*	*
	RA2	—	—	—	—	*	*
	RA3	—	+	+	+	—	—
子房	RA1	—	—	—	—	*	*
	RA2	—	—	—	—	*	*
	RA3	—	—	—	—	—	—
柱頭	RA1	—	—	—	—	*	*
	RA2	—	—	—	—	*	*
	RA3	—	+	+	—	—	+
鱗被	RA1	—	+	—	+	*	*
	RA2	—	+	+	+	*	*
	RA3	—	—	+	+	—	+
葉片		—	—	+	—	*	*

在水稻花藥發育時期挑選 P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖株葉片、小穗及花藥，進行 GUS 染色。

+：GUS 表現； —：GUS 未表現； *：未取樣。(整理自圖四、圖五、附錄二)

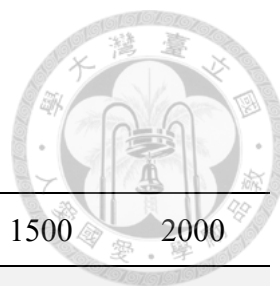


表 三、P19-C1301 序列刪減系統於菸草花藥之表現情形

		WT	300	600	1200	1500	2000
	TA1	—	—	—	—	—	—
花藥	TA2	—	+	+	+	+	—
	TA3	—	+	+	—	—	—

在菸草花藥發育時期挑選 P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖株花藥，進行 GUS 染色。

+：GUS 表現； —：GUS 未表現。(整理自圖六、附錄三)

表 四、P19-C1301 序列刪減系統於菸草其他組織之表現情形



	WT	300	600	900	1200
花萼	—	+	+	*	+
花瓣	—	+	+	*	+
柱頭	—	+	+	*	—
花柱	—	+	+	*	—
子房	—	—	—	*	—
花絲	—	+	—	*	—
葉片	—	—	+	+	+

在菸草花藥發育時期挑選 P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖株葉片及花苞，進行 GUS 染色。

+：GUS 表現； —：GUS 未表現； *：尚未開花。(整理自圖七、圖八)

附錄 一、*Os08g43240* 基因於水稻花藥發育及各組織轉錄體分析結果

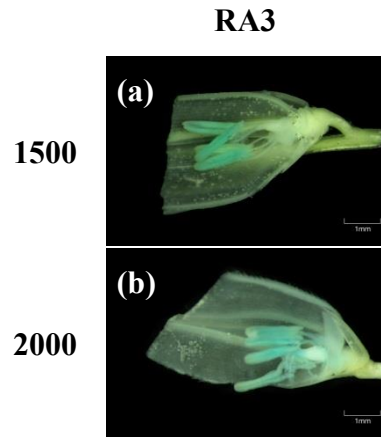


TIGR_gene	Annotation	SBS							MPSS								
		Developing anthers							Germin al seed	Young leaf	Young root	Mature leaf	Mature leaf	Stem	Immature panicle	Ovary & Pollen stigma	
		Meiosis	Tetrad	Early vacu	Late vacu	Mitosis	Mature pollen	pollen									
Os08g43240	Unknown protein	2752	182	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	154	0	0

Os08g43240 基因於 SBS 及 MPSS 兩個水稻轉錄體資料庫的分析結果 (Huang *et al.*, 2009)。

SBS : Sequencing By Synthesis ; MPSS : Massive Parallel Sequencing 。

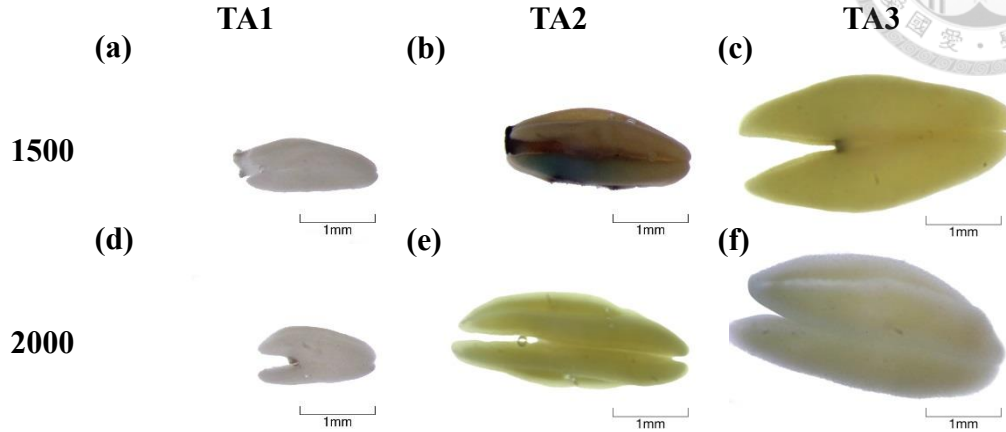
附錄 二、P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖系花藥 GUS 染色結果



在水稻花藥發育時期挑選 P19-C1301 序列刪減系統之水稻轉殖株小穗，進行 GUS 染色。

(a)為 RA3 時期 P19-1500-1301；(b)為 RA3 時期 P19-2000-1301。(楊等人，未發表資料)

附錄 三、P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉殖系花藥 GUS 染色結果



在菸草花藥發育時期挑選 P19-C1301 序列刪減系統之菸草轉植株花藥，進行 GUS 染色。

(a)至(c)為 P19-1500-1031；(d)至(f)為 P19-2000-1031。(a)、(d)為 TA1 時期；(b)、(e)為 TA2 時期；(c)、(f)為 TA3 時期。(楊等人，未發表資料)



附錄 四、本試驗使用之引子一覽表

PCR 擴增 P19 啟動子序列

引子名稱	序列
p19F	5'-GGGCCCCTATATAGTATTATTTTCAT-3'
1200F	5'- ATCTGATTTCCCTCTTAATT-3'
900F	5'- TTTTCCGTCCACCCAAAACC-3'
600F	5'- ACGACATCCACAGAAAAAAC-3'
300F	5'- ACTTTTAACTTTCATAAGAA-3'
p19R	5'-CGGCTTCGCTTAAGGCAGGCAGAGG-3'

檢測 P19-C1301 序列刪減系統轉殖水稻及菸草

引子名稱	序列
GUS500F	5'-GCAGATATTCGTAATTATGC-3'
GUS500R	5'-ACCTGTTGATCCGCATCA-3'

附錄 五、本試驗使用之培養基配製方法



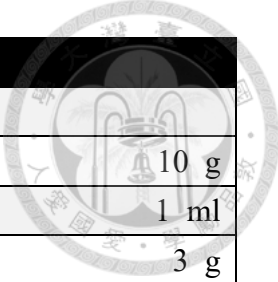
Tryptone	10 g
NaCl	5 g
Yeast extract	10 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

LB	
Bacto-Agar	15 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

Nicotinic acid	0.5 mg
Thiamine HCl	1 mg
Pyridoxin HCl	0.5 mg
Myo-inositol	100 mg
Add 2° H ₂ O to 1 L and store at 4°C	

N6 salts	3.98 g
Sucrose	30 g
N6 Vitamins (1000X)	1 ml
2,4-D	2 mg
Casamino acid (Casein)	1 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

2N6	
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	



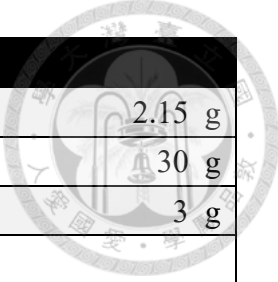
2N6	
Glucose	10 g
AS (0.2 M)	1 ml
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

2N6	
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	
Cefotaxime	250 mg
Hygromycin B	50 mg

2N6	
L-proline	2.8 g
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

CIM medium	
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	
Cefotaxime	250 mg
Hygromycin B	50 mg

N6 salts	3.98 g
N6 Vitamins (1000X)	1 ml
Sucrose	30 g
Glucose	5 g
Casamino acid (Casein)	300 mg
NAA	0.5 mg
Kinetin	5 mg
Myo-inositol	100 mg
Phytigel	4 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	



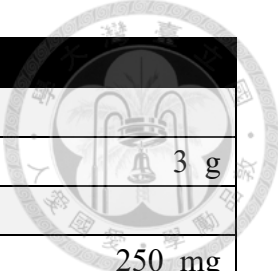
MS salts	2.15 g
Sucrose	30 g
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

MS salts	4.3 g
Sucrose	30 g
NAA	0.1 mg
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

Nicotinic acid	100 mg
Thiamine HCl	1 g
Pyridoxin	100 mg
Myo-inositol	10 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and store at 4°C	

MS salts	4.3 g
B5 Vitamins (1000X)	1 ml
Sucrose	30 g
NAA	0.1 mg
BA	1 mg
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

TSM	
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	



TSM	
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	
Cefotaxime	250 mg
Hygromycin B	50 mg

MS salts	4.3 g
B5 Vitamins (1000X)	1 ml
Sucrose	30 g
NAA	0.1 mg
Phytigel	3 g
Add 2° H ₂ O to 1 L and autoclave	

附錄 六、本試驗使用之藥品來源



酵素 (enzymes)

Restriction enzymes	New England Biolabs
RNase A	Roche
T4 DNA ligase	Roche
T4 DNA polymerase	Roche
Taq DNA polymerase	Roche

藥品 (chemicals)

Agarose	Lonza
AS	Aldrich Chem. Co.
BA	SIGMA
Becto-Agar	BD
Casamino acid	DIFCO
Cefotaxime	永信藥品
Glucose	SIGMA
Hygromycin B	生工
Kanamycin	SIGMA
Kinetin	SIGMA
L-Proline	SIGMA
MS salts	SIGMA
Myo-inositol	SIGMA
N6 salts	SIGMA
NAA	SIGMA
Nicotinic acid	SIGMA
Phytigel	SIGMA
Pyridoxin HCl	SIGMA
Rifampicin	SIGMA
Sucrose	SIGMA
Thiamine HCl	SIGMA
X-Gluc	SIGMA