

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所



碩士論文

Institute of Plant Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

阿拉伯芥 FIN219 與 FHY1 的交互作用對遠紅光和茉莉
酸訊息傳遞的影響

The effects of FIN219 and FHY1 interaction on far-red
light and jasmonate signal integration in *Arabidopsis*
thaliana

賴建瑋

Chien-Wei Lai

指導教授：謝旭亮 博士

Adviser: Hsu-Liang Hsieh, Ph.D.

中華民國一百零二年七月

July, 2013

誌謝

這篇致謝雖然不像文天祥正氣歌一般令人動容，卻也是我嘔心瀝血的肺腑之言。兩年的日子過的真快，真的要感謝太多人了，首先是我的指導老師謝旭亮老師，當初在選擇指導教授時感謝您肯收留我這一問三不知的門外漢，雖然我常常讓您生氣到語無倫次使用方言，還是很感謝您對不才弟子的栽培與支持，俗話說一日為師、終身為父、我對您的尊敬與崇拜就像那滔滔江水般滾滾不息！也謝謝幫我校稿的張英峯老師 鄭秋萍老師 鄭石通老師 符宏勇老師 感謝您們的協助才讓這本論文得以順利誕生。另外就是實驗室的各位同仁給予我相當大的幫助，感謝 919 的所有夥伴們 全宇宙最萌的研究生懷如、正齡、輸送隊長漢威、語安、好基友蕭蔚金龍、儷璘、思儀、瑾玟、紫煥、佑華、翊郢給了我很多實驗上的幫忙與鼓勵。特別要感謝蕙禎跟旻潔這兩位好同學的幫忙，平常少一根筋的我常常帶給妳們很多麻煩，謝謝妳們對我的協助與幫助，跟妳們在一起真的是讓我受益良多跟你們當同學真是三生有幸、大恩大德沒齒難忘。也感謝 9 樓植科所所有學長姐學弟妹及同學們的協助，更謝謝 905 和 913 讓我到處串門子。你們讓我在這兩年裡等級提升很多。成為一個雄壯威武、頂天立地的男子漢。

另外要謝謝的是揚宗跟書帆，當初剛進實驗室什麼都不懂，迷失在人生的道路上，但你們就像一盞明燈指引著我前進，帶領我發現名為植物科學的新大陸。也要感謝人生導師孟淳對我在各方面的幫助，也常鼓勵我繼續前進，帶我翱翔在無邊無際的知識天空裡，沒有你們就沒有今天的我。多謝靳家的 pen8 跟勤政，「ありがとう 李安-pen8 勤政」，我不會忘記跟你們一起吃飯飯跟出團的快樂時光！感謝 Swadhin 對我實驗上的協助及常常請我吃神秘美味的印度咖哩，讓我頭好壯壯，考試都拿 100 分，我不會忘記你的美味咖哩與台印友好的友誼。還要特別謝謝 草精靈，陪我走過喜怒哀樂，讓我可以找人討拍拍發牢騷，妳真的是在我植科所最大的收穫（當然這句話不能在 meeting 上講出來）能夠認識妳我真的很開心！！謝謝妳對我的支持與鼓勵，讓我能夠順利過關。

最後要謝謝無怨無悔支持我的爸媽及老弟，從小到大給予我鼓勵關懷，讓我在求學時衣食無缺無憂無慮，也謝謝台北的姨婆與阿嬤能讓我有個棲身之處，我愛你們。更要謝謝為我犧牲生命的無數阿拉伯芥們，希望你們能夠安息，早日投胎，然後記住下輩子不要再當阿拉伯芥了。

「今天我畢業ㄟ！」

目錄

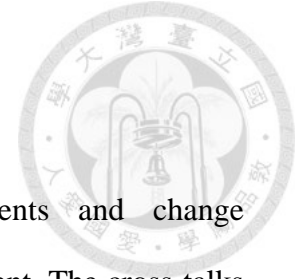
目錄.....	1
摘要.....	3
Abstract.....	4
縮寫對照表.....	5
前言.....	7
一、緒論.....	7
二、光敏素.....	7
三、植物的光訊息傳遞因子.....	9
四、 <i>FIN219</i> 基因.....	10
五、 <i>FHY1</i> 基因.....	11
六、 <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 在光訊息傳遞下的關係.....	12
七、研究目標.....	13
實驗材料與方法.....	14
一、植物材料.....	14
二、下胚軸檢測.....	14
三、根長檢測.....	14
四、花青素與葉綠素檢測.....	15
五、RNA 表現量分析.....	15
六、融合蛋白質誘導純化及西方式點墨分析 (Western blot).....	15
七、Pull-Down 與共免疫沉澱法 (Coimmunoprecipitation Assay co-IP).....	16
八、阿拉伯芥原生質體 (protoplast) 的分離和轉殖.....	16
結果.....	17
一、 <i>fin219-2/fhy1-T(dm)</i> 雙突變株生理性狀分析.....	17
1. <i>fin219-2/fhy1-T</i> 雙突變株在遠紅光下呈現更不敏感的下胚軸性狀.....	17
2. <i>dm</i> 雙突變株在遠紅光及 MeJA 處理下亦呈現更不敏感的下胚軸外表型.....	17
3. <i>dm</i> 雙突變株在 MeJA 處理下具有較不敏感的根部外表型.....	18
4. 大量表現 <i>FIN219</i> 在 <i>fhy1-1</i> 突變體的遺傳背景時，在弱遠紅光(或 MeJA)處理下可 rescue 其遺傳背景的突變體下的外表型.....	18
5. 大量表現 <i>FHY1</i> 在 <i>fin219-2</i> 突變體的遺傳背景時在弱遠紅光下(或甲基茉莉酸處理下)下可完全 rescue 遺傳背景的外表型.....	19
二、 <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 間的交互作用.....	19
1. 利用 Pull-down 方法證實 <i>FIN219</i> 可利用其 C 端和 <i>FHY1</i> 進行交互作用.....	19
2. 利用共免疫沉澱法 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP) 驗證 <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 在植物體中具有交互作用.....	20
三、 <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 之間的調控關係.....	20

1. <i>FHY1</i> 的蛋白質表現量在 <i>fin219-2</i> 中增加， <i>FIN219</i> 的蛋白質表現量在 <i>fhy1-T</i> 中增加	21
2. 檢測在 <i>FIN219 OE/fhy1-1</i> #18-5-S1 轉殖株及 <i>35S::FHY1/fin219-2</i> #33-1 轉殖株中 JA 反應相關基因的表現量發現與在 <i>pGR::FIN219</i> 、 <i>FHY1OE</i> 中呈現相同的趨勢。	21
四. <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 經遠紅光及 MeJA 處理後對對基因表現與生理性狀的影響	22
1. <i>FIN219</i> 及 <i>FHY1</i> 對於遠紅光及 MeJA 處理下的基因表現量影響	22
2. <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 在遠紅光和 MeJA 處理的情況下皆能促進花青素的累積	23
3. <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 參與遠紅光阻斷葉綠素生合成的作用(FR blocking of greening)	23
五. <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 對於 <i>PHYA</i> 入核的影響	23
1. 相較於野生型， <i>fhy1-T</i> 、 <i>dm</i> 及 <i>FIN219 OE/fhy1-1</i> (#18-5-S1) 其 <i>PHYA</i> 在細胞核中的累積量無論是在黑暗或遠紅光照射下都呈現增加的現象	24
2. 相較於野生型， <i>35S::FHY1OE</i> 、 <i>35S::FHY1/fin219-2</i> 其 <i>PHYA</i> 的累積量在黑暗或遠紅光照射時都呈現上升的現象	24
討論	25
一、 <i>FIN219</i> 大量表現可部分回復 <i>fhy1-1</i> 突變株的外表型， <i>FHY1</i> 大量表現也可部分回復 <i>fin219-2</i> 突變株的外表型	25
二、 <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 在基因與蛋白質層次上的調控關係	25
三、遠紅光與 MeJA 處理下 <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 之間調控對植物外表型的影響	26
四、 <i>FIN219</i> 和 <i>FHY1</i> 會共同競爭 <i>PHYA</i> ，使 <i>PHYA</i> 入核的情況有所改變	28
結果圖片	30
參考文獻	45
附錄一、實驗操作詳細流程與藥品配方	51
附錄二、PCR 相關資訊	62

摘要

植物可隨時偵測周圍環境，並相應地改變自己的生理代謝，生長和發育。對於控制植物的光形態發生，光和各種激素之間的交互作用是不可缺少的。在幼苗時期時 FIN219 參與 phyA 所調控的遠紅光訊息傳遞路徑，同時和 JAR1 位於同一基因座上，是參與茉莉酸訊息傳遞的重要因子。FHY1 基因則是遠紅光訊息傳遞下游的正向調控者，同時也扮演著將 PHYA 帶入細胞核中的角色。前人研究指出 FHY1 和 FIN219 在遠紅光下具有某些程度的交互作用。然而對於其詳細分子機制及遺傳背景的作用依然有很多不清楚的地方。這裡我們發現在 *FIN219* 大量表現在 *fhy1-1* 或 *FHY1* 大量表現在 *fin219-2* 時皆可部分 rescue 其突變株較為抽長的下胚軸。利用 pull-down 和共免疫沉澱法 (Co-Immunoprecipitation) 證明兩者在光照下才會產生交互作用，並證實 FIN219 是以 C 端和 FHY1 進行交互作用。另外利用西方點墨法及反轉錄 PCR (reverse transcription-PCR) 檢測，發現 FIN219 和 FHY1 會互相抑制對方的表現量。此外，在甲基茉莉酸 (MeJA) 處理的實驗中，也顯示兩者參與茉莉酸所調控的一些生理反應，包括花青素的累積。觀察 PHYA-GFP 於細胞內的位置，可發現在 FIN219 大量表現時，PHYA 不易進入細胞核，可能由於 FIN219 會和 PHYA 競爭 FHY1，導致 PHYA 進核的比例下降。因此，本論文的研究結果顯示 FIN219 與 FHY1 彼此交互作用，造成互相拮抗的效果，以調控阿拉芥 PHYA 所引發的光形態發生，以及茉莉酸訊息傳遞。

Abstract



Plants continuously monitor their surrounding environments and change accordingly their physiological metabolism, growth and development. The cross-talks between light and various hormones are essential for controlling plant photomorphogenesis. During the seedling stage, FAR-RED INSENSITIVE 219 (FIN219) was involved in phytochrome A-mediated far-red (FR) light signaling and JA responses in Arabidopsis. Far-red Elongated Hypocotyl 1 (FHY1), a positive regulator of FR signaling, is required for FR-regulated nuclear accumulation of phyA. Previous study showed that FIN219 and FHY1 interacted genetically under FR light. However, the molecular mechanisms underlying the genetic interaction between FIN219 and FHY1 remain largely unknown. Here, we found that over-expression of either FIN219 in *fhy1-1* or FHY1 in *fin219-2* mutants can partially rescue their respective long-hypocotyl phenotypes. Using pull-down and co-immunoprecipitation (Co-IP) assays demonstrated that FIN219 and FHY1 interacted with each other. Moreover, the C-terminal region of FIN219 is responsible for the interaction with FHY1. Besides, FIN219 and FHY1 was antagonistic to each other at their transcript and protein levels. Further MeJA-treated experiments revealed that FIN219 and FHY1 were involved in the regulation of MeJA-mediated responses, including anthocyanin accumulation. In subcellular localization studies, FIN219 and PHYA may compete for FHY1, leading to decreased nuclear import of PHYA. Taken together, these data indicate that FIN219 and FHY1 interact with each other, and their mutual repression regulates phyA-mediated photomorphogenesis and JA signaling pathway in Arabidopsis.

縮寫表



cDNA	complementary DNA
DEPC	diethylpyrocarbonate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine tetra acetic acid
EtBr	ethidium bromide
FAR1	Far-red-impaired response 1
FHY1	Far-red elongated hypocotyls protein 1
HFR1	Long hypocotyls in far-red light
His	Histidine
HY5	Long hypocotyls 5
JA	Jasmonic acid
JAR1	Jasmonic insensitive 1
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
kD	kilo dalton
LB	Luria-Bertani
MS	Murashige and Skoog
OD	optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
phyA	Phytochrome A
phyB	Phytochrome B
phyC	Phytochrome C
phyD	Phytochrome D

phyE	Phytochorme E
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RT	Reverse transcription
rpm	round per minute
MeJA	Methyl jasmonic acid
OE	Overexpressor
SDS	Sodiumdodecyl sulfate
TEMED	NNNN-tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UBQ10	Ubiquitin 10





前言

一、緒論

光對於植物生長與發育而言，是不可或缺的環境因子，不僅提供光合作用所需的能源，也調控了許多植物生長發育的機制，例如種子萌芽、子葉的張合、莖幹的延長、葉綠素的累積、向性、氣孔開合、日夜韻律（circadian rhythm）、開花週期等等。因此經過千萬年來植物對於光的感應演化出一套非常特別的機制，利用特化的光接受體（photoreceptors）來感受光照與光強度的變化。光接受體存在著許多不同的家族成員，負責不同波長光源的接收，在植物中目前已知吸收光譜分布在藍光及紅光，其中包含主要吸收紅光到遠紅光波長（600~750 nm）的光敏素（phytochrome）及主要吸收藍光（380-500nm）、UV-A（320~400）波長的隱花色素（cryptochromes）和向光素（phototropins）及控制 UV-B（280~320 nm）的光接受體（Kendrick and Kronenberg, 1994; Deng and Quail, 1999; Briggs and Christie, 2002; Wang and Deng, 2003），由這些光接受體分工合作接收並傳遞光訊息，調控植物內各種相關基因及蛋白質的表現，而特別在萌芽初期植物對光的接受特別靈敏，依據生長時所受到的光照處理，可分為光型態發生及暗型態發生兩種型態。在光照下所發生的光型態，具有較短的下胚軸，子葉呈現展開且葉綠素累積較為明顯；而暗型態則是相反的情況，不僅具有較細長的下胚軸，子葉白化且閉合呈吊鉤狀（Wei et al., 1994）。故目前研究光訊息傳遞皆以觀察幼苗為主。

二、光敏素 Phytochrome (Phys)

光敏素是紅光及遠紅光接受體，依據功能目前在阿拉伯芥已知存在 5 個光敏

素基因 (*PHYA~PHYE*)，所轉譯出的光敏素蛋白質大小約為 125 KD (Clack et al., 1994)。就其功能性可分為 N 端和 C 端來看，在 N 端上具有能和光色素 (chromophore) 結合並具有感應光源的功能 (Montgomery and Lagarias, 2002)。C 端則具有結合成二聚體 (dimer) 的結構及訊息的傳遞相關 (Cherry 1993; Smith, 2000; Fankhauser, 2001)，當光敏素行使其功能時會形成同型二聚體 (homodimer)，並利用 N 端所結合的光色素來感應光源。光敏素存在著兩種不同構型: Pr 及 Pfr 型態，其中 Pr 型態不具有活性，主要是吸收外在環境的紅光，當吸收紅光後就會轉變為具有活性的 Pfr 型態，其所吸收主要的是遠紅光，當吸收遠紅光後又會回復成 Pr 型態 (Whitelam, 1998; Smith, 2000; Quail, 2002)。PhyA 是光敏素中研究較為清楚的，早期利用燕麥進行的研究中發現光敏素是一種 Ser/Thr 磷酸酶 (Ser/Thr kinase) (McMicheal and Lagarias, 1990; Colon-Carmona et al., 2000)，除了可將受質磷酸化進行訊息傳遞外 (Fankhauser and Chory, 1999)，PhyA 也可受到光照而自行進行磷酸化作用而造成結構上的改變 (Lapko, 1997; Yeh and Lagarias, 1998)，藉此調控 PhyA 的活性。

近年來藉由螢光蛋白融合技術，得知光敏素在細胞中的位置主要受光照調控，黑暗時在有較多的光敏素存在於細胞質中，而在光照下則會轉移到細胞核中 (Kircher et al., 2002)。光敏素可分為「光穩定型」與「光分解型」兩種。phyB 到 phyE 是屬於光中穩定的蛋白質，光照射下主要以 Pfr 形態存在 (Clack et al., 1994)；phyA 的 Pfr 形態則為光分解型，必須在黑暗中才能穩定存在 (Wagner et al., 1996)。根據主要功能來看，phyA 和 phyB 會影響幼苗的去白化 (de-etiolation) 及種子的萌發，當種子受到微弱的光照處理後就可以促進萌芽；phyC 在初生葉的細胞生長扮演特殊的調控角色 (Qin et al., 1997)；phyD 與 phyE 則參與節間伸長作用機制與開花時期的控制 (Robson et al., 1993; Devlin et al., 1997)；phyE 則影響種子萌發 (Hennig et al., 2002)。



三、植物的光訊息傳遞因子

從光接受體感測到光源後，接著會由下游的光訊息傳遞因子進行一連串的訊息傳遞作用，主要是藉由檢測外表型來推測這些因子的功用。例如在遠紅光下，若是將 *phyA* 基因進行突變，則會使植物無法接受到遠紅光或是使參與在遠紅光訊息傳遞的下游因子無法正常發揮作用，而使的植物的外表型呈現如同暗型態發生的模樣。同樣以 *PhyA* 為例，參與在其遠紅光訊息傳遞下的成員目前已知有 *EIDI* (Buche et al., 2000; Zhou et al., 2002)、*FAR1* (Hudson et al., 1999)、*FHY1/PAT3* (Zeidler et al., 2001)、*FHY3* (Wang and Deng, 2002)、*FIN2* (Soh et al., 1998)、*FIN219* (Hsieh et al., 2000)、*PAT1* (Bolte et al., 2000)、*LAF1* (Ballesteros et al., 2001)、*LAF3* (Hare et al., 2003)、*SPA1* (Hoecker et al., 1998; Hoecker et al., 1999)、*SUB1* (Guo et al., 2001)等。除此之外還有名為 *COP/DET/FUS* 這類參與在訊息傳遞下游的多效基因，是各種不同光訊息傳遞的會合點。另外，光訊息傳遞工作中需要泛素 (ubiquitine) 分解系統的參與，主要調控泛素分解系統的蛋白質是 COP1 (Seo et al., 2004)。HY5 蛋白質是光訊息傳遞途徑中下游成員，也是一個轉錄因子，在有光照的情況之下會誘導光形態發生相關基因的活化。HY5 蛋白質是由 COP1 所促進泛素系統分解的對象之一 (Holm et al., 2002)。黑暗時，COP1 由細胞質進入細胞核，形成 COP1-泛素複合體，進一步分解 HY5，而導致暗型態發生 (Osterlund et al., 2000)。近年研究指出，PHYA 與 COP1 訊息傳遞因子有直接相關。PHYA 訊息傳遞的負調控因子 SPA1，可直接與 COP1 結合並調控其活性 (Hoecker et al., 1999; Saijo et al., 2003)，故 PHYA 很可能藉由 SPA1 等蛋白質來調控 COP1 的活性，影響泛素分解系統的功用。而在光照下 *phyA* 則會由 Pr 型態轉變為 Pfr 型態進入細胞核中 (Kircher et al., 1999; Nagy and Schäfer, 2002)，執行光訊息的傳遞；同時 COP1 則會轉移到細胞質 (von Arnim et al., 1997)，釋放 HY5，使 HY5 可以連

接到下游轉錄因子，進而促進光型態的發生。

四、*FIN219* 基因

FAR-RED INSENSITIVE (FIN219) 是藉由可抑制 *cop1-6* 突變株的性狀篩選而來，專一在遠紅光下具有不敏感的外表型。由於 *cop1-6* 的幼苗植株在黑暗中呈現如同光型態發生時短縮下胚軸的外表型，使用 EMS 突變劑處理並篩選出在黑暗中呈現子葉閉合的及含有較為抽長的下胚軸的基因外抑制體新突變株 2A9，再將 2A9 側交至阿拉伯芥野生型的背景，最後獲得了遠紅光下的突變體 *fin219* (Hsieh et al., 2000)。*FIN219* 蛋白質的胺基酸序列，在其 N 端和 C 端各包含一個 coiled-coil domain，而 coiled-coil domain 廣泛被研究是一個蛋白質和蛋白質之間發生交互作用的區段 (Lupas, 1996)。更進一步研究發現以酵母菌雙雜交、pull-down、雙分子螢光互補方法和共免疫沉澱法證明了 *FIN219* 和 *COP1* 蛋白質間的交互作用。大量表現 *FIN219* 的轉植株可導致無論是在黑暗或遠紅光下皆可表現較短的下胚軸，此外其內部 *HY5* 的蛋白質量也大幅的上升，相反的在 *fin219-2* 下，*HY5* 的累積量則會呈現大幅下降的現象，證明 *FIN219* 可以提升 *HY5* 的穩定性 (Wang et al., 2011)。

近年研究在茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 的訊息傳遞下發現 *FIN219* 和 *JAR1* (jasmonate insensitive 1) 位於同一基因座上，*JAR1* 具有能將茉莉酸接上異白胺酸 (Isoleucine, Ile) 的酵素活性，使其成為具有活性的 JA-Ile 型態，進而促進下游茉莉酸訊息傳遞反應 (Staswick and Tiryaki, 2004)。茉莉酸是一種植物用來抵禦外在傷害或疾病的賀爾蒙，是由亞麻酸 (linolenic acid) 合成 (Schaller et al., 2005)，當植物受到病蟲害或物理性傷害時，茉莉酸會被大量誘導產生，促進植物的防禦能力。此外茉莉酸也會影響植物的生長與發育，例如下胚軸及根部的生長、果實成熟、老化現象 (Staswick et al., 1992; Wasternack, 2007)。在 JA 的訊息傳遞過程下主要是由 *COI1* (CORONATINE INSENSITIVE 1) 所進行調控，*COI1* 主要是由 F-box 所構成的 E3 ubiquitin ligase，主要是進行蛋白

質降解的協助者 (Xie et al., 1998)。而 COI1 的最主要目標就是將一群名稱為 JAZs (JASMONATE-ZIM-DOMAI PROTEIN) 的蛋白質進行接上泛素使其降解，JAZs 因具有 ZIM (Zinc-finger inflorescence meristem) 而得名。JAZs 在 JA 訊息傳遞下扮演著附調控者的角色，會藉由結合上 MYC2 並抑制其活性，MYC2 為一 bHLH (basic helix-loop-helix) 轉錄因子，JAZs 會與 MYC2 結合併抑制其轉錄活性，使下游 JA 訊息傳遞相關基因無法順利表現。然而當植物受到外在損傷或病蟲害時，會使體內 JA 合成量大幅上升，並經由 FIN219 (JAR1) 活化成具活性的 JA-Ile，使其能被 COI1 辨認結合，當 COI1 被活化後則會進一步結合上 JAZs 並使其降解，這時 MYC2 等轉錄因子便可促進下游對 JA 訊息傳遞相關基因轉錄 (Andrea et al., 2009)。此外對於光與茉莉酸之間是否在著交互作用是目前許多人研究的議題之一，目前發現在遮陰作用 (Shade-avoidance responses) 時植株受到低比率的紅光：遠紅光 (Low R:FR) 照射下，會負調控 *ERF1*、*PDF1.2* 及 *ASA1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE α 1*) 等對 JA 訊息傳遞相關基因並使植株呈現對疾病較無抵抗力的現象 (Ignacio et al., 2012)。

五、*FHY1* 基因

FHY1 基因最早發現是參與在遠紅光訊息傳遞路徑下 (Whitelam et al., 1993)。*fhy1* 突變株在遠紅光中則會表現出類似暗反應較不敏感且白化的下胚軸型態，且子葉閉合，但在其他光源下生長狀況則與野生型的相同；而在大量表現 *FHY1* 的轉植株則會有過敏感的外表型。初步研究發現，*FHY1* 基因的表現量會受到光照和 *FHY3* 影響，在黑暗中生長的植物 *FHY1* 的基因表現量較多，在受到光照後則會分解 (Densnos et al., 2001)。後來研究顯示發現，不僅 *FHY1* 基因，同樣蛋白質的表現量也會受光照而減少，而在幼苗時期 *FHY1* 蛋白質累積量最多，隨著往後的生長蛋白質累積則會逐漸下降 (Shen et al., 2005)。

在更進一步的研究發現 *PHYA* 在細胞核中的累積需要藉由 *FHY1* 的協助 (Hiltbrunner et al., 2005)，另一方面利用 pull down、酵母菌雙雜合法、雙

分子螢光互補系統及共免疫沉澱法證實 FHY1 和 PHYA 會進行交互作用，且主要是由 FHY1 的 C 端和 PHYA 的 N 端進行交互作用 (Hiltbrunner et al., 2005; Shen et al., 2009)，原因是在 FHY1 在 N 端的區域含有一段 NLS (nuclear localization sequence) 和 NES (nuclear exclusion sequence)；實驗發現 NES 上的突變會造成 FHY1 滯留在細胞核中，證實 FHY1 上的 NLS 和 NES 皆具有進出核的功用 (Zeidler et al., 2004)。利用後續的研究也指出，phyA-GFP 在 *fhy1-1* 突變株中受到遠紅光照射並無法順利累積 (Hiltbrunner et al., 2005)，顯示在 PHYA 的入核的確需要 FHY1 的存在。FHY1 在植物中存在一個被磷酸化的形式，而磷酸化型式的 FHY1 的產生也需要 phyA 存在才行 (Shen et al., 2009)。另外在照射紅光時會促進 FHY1 的磷酸化，進而將 PHYA 帶離細胞核，降低 PHYA 在核內的累積量 (Chen et al., 2012)。

在阿拉伯芥中有一個序列上與 FHY1 相似的蛋白質—FHL (FHY1-like)，與 FHY1 具有部分功能互補的功能，胺基酸相同程度約為 26.0%，相似點在於 FHY1 N 端的 NES 與 NLS 片段，及 C 端可與 phyA 形成交互作用的片段，另外研究也顯示 FHY1 除了自身可形成 homodimer 之外，也會與 FHL 形成 heterodimer，證實 FHL 可與 FHY1 共同參與在 phyA 進核的調控作用中 (Zhou et al., 2005; Genoud et al., 2008; Shen et al., 2009)

六、FIN219 和 FHY1 在光訊息傳遞下的關係

由於前人研究發現，將 *fin219* 突變株與 *fhy1-1* 突變株進行雜交後所產生的後代 *fin219/fhy1-1* 異型合子雙突變株 (*fin219/+; fhy1/+*)，在遠紅光處理下比起親代 *fin219* 異型合子突變株或 *fhy1-1* 異型合子突變株具有更加延長的下胚軸，呈現像親代同型合子突變株的外表型；但其實 FIN219 與 FHY1 並非位於同一個基因座 (locus)，彼此之間也不具有互補的功用，暗示兩者之間可能具有非等位非互補 (nonallelic noncomplementation) 的關係 (Hsieh et al., 2000)。這現象表示兩者之間在同一條訊息傳遞路徑下存在著某些程度的關聯，可能存在著某

種程度的交互作用。

七、研究目標

先前研究中指出，FIN219 和 FHY1 具有非等位非互補的特性，暗示兩者間可能存在著非常緊密的關係，此外根據前人曾經使用酵母菌雙雜合法，雙分子螢光互補方法證明 FHY1 與 FIN219 之間確實存在交互作用，確定 FHY1 藉由其 N 端與 FIN219 進行交互作用，且交互作用的位置在細胞核或細胞質皆有表現(Li, Unpublished data)。因此我們想更進一步利用 pull-down 及共免疫沉澱法來更加確認兩者間的交互作用以及在何種情況下才會發生交互作用。另外也藉由觀測外表型探討兩者間的交互作用在遠紅光訊息傳遞下造成什麼影響，此外由於 FIN219 為一茉莉酸訊息傳遞下的重要因子，而 FHY1 則為在遠紅光訊息傳遞下的重要因子。已知 FIN219 和 FHY1 會交互作用的前提下，在不同強度的遠紅光下是否會影響到茉莉酸的訊息傳遞路徑。由於 FIN219 和 FHY1 根據前人研究指出皆能與 PHYA 產生交互作用，故也想探討兩者間的交互作用是否會影響 PHYA 的入核進而影響基因表現量及外表型的改變。

實驗材料與方法



一、植物材料

實驗中所使用的植物材料是阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)，主要含有野生型 Columbia (Col-0) 以及光訊息下游傳遞因子的突變株。*fin219-2* (SALK_059774) 和 *fhy1-T* (SALK_046828) 突變株則是從 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (Ohio State University, Columbus) 購得的 T3 及 T4 世代背景為 Col-0 的種子。pPZP22 是由本實驗室所構築，簡稱 36B3-5，其中包含完整的 FIN219 基因及自身啟動子，將其轉入 *fhy1-1* 突變株的背景中，得到 *36B3-5/fhy1-1* 以下簡稱為 *FIN219 OE/fhy1-1*，*FIN219* 大量表現在 *fhy1-1* 情況下的轉植株。另外利用 *FHY1* 接入 pCambia1390-35S-cmyc 中並轉殖入阿拉伯芥野生型 Columbia (Col-0)，利用其 35S promoter 特性可使植株大量表現出帶有 c-myc tag 之 FHY1-cmyc 融合蛋白質，使用編號為 #26 以下簡稱為 *FHY1OE*。

二、下胚軸檢測

先用 30% 漂白水浸泡新鮮種子並震盪 7 分鐘後，以無菌水洗 5 次，將 30 顆種子點在含有 1% 蔗糖的 GM 培養基上，置於 4°C 黑暗下春化處理三天，移至白光生長箱發芽生長 16 小時，後將其移入所需光源之生長箱（白光、遠紅光、紅光、藍光、黑暗）培養三天後拿出，將下胚軸推平後照相並利用 image J 測量其下胚軸長度。

三、根長檢測

先用 30% 漂白水浸泡新鮮種子並震盪 7 分鐘後，以無菌水洗 5 次，將 10 顆種子點在含有 1% 蔗糖的 GM 培養基上，置於 4°C 黑暗下春化處理三天，移至白光生長箱發芽生長五天後，將其移至根長測試的培養基上，垂直放置 5 天後照相

並利用 image J 測量根長長度。

四、花青素與葉綠素檢測

花青素的萃取方法是將生長三天的幼苗 (n=80)，稱取其鮮重後用液態氮磨碎，加入 600 μ l 的萃取液 (methanol plus 1% HCl)，放入 4°C 黑暗搖晃 16 小時，隔天取出後再加入 400 μ l 無菌水及 400 μ l chloroform，均勻混勻後離心 13000 rpm 15 分鐘，取上清液至新管，利用分光光度計測量 530 nm 及 657 nm 的吸光值，代入 $A_{530}-0.33A_{657}$ 即可 (Kim et al., 2003)。

測量葉綠素的方法為將生長三天的幼苗 (n=80)，移入白光生長箱兩天，稱取其鮮重後用液態氮磨碎，加入 1ml 的 95% 酒精，移入 4°C 黑暗 16 小時，再離心取上清液至新的離心管，利用分光光度計測量 664.2 nm 及 648.6 nm 的吸光值，將所得的兩數值相加即可 (Kim et al., 2003)。

五、RNA 表現量分析

參照 Eppie-tube RNA 萃取法(Wadsworth et al., 1988)，收取所需條件下的植物樣本抽取 RNA 後以 DNase (RQ1 DNase, Promega)去除 RNA 中殘存的 DNA，之後從其中取 2 μ g 的 RNA，利用 RT PCR (cat. 4390778, ABI)及即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 的方式來檢測目標基因在經光照和甲基茉莉酸處理下表現量的差異，所使用的引子 (primers)序列見附錄二。

六、融合蛋白質誘導純化及西方式點墨分析 (Western blot)

挑選出欲進行純化融合蛋白質之菌落接種至 10 ml 的 LB 培養液中以 37°C 120 rpm 搖晃培養 12~16 小時，接著取出 2 ml 菌液以放大 100 倍的方式放入 200 ml LB 培養液中 37°C 120 rpm 搖晃培養至 O.D 600=0.4~0.6 之間，接著加入最終濃度為 1 mM 的 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) 再度以 37°C 120 rpm 搖晃培養 3 小時，將其離心 13000 rpm 4°C 10 分鐘去除上清液，加入含

有溶菌酶 (lysozyme) 的破菌用溶液 20 ml 回溶沉澱菌塊，並以超音波震盪方式將細菌細胞壁打破使蛋白質流出，並用適合融合蛋白質上的 tag beads 進行純化。

取生長三天下的植物體幼苗約 200 mg 用液態氮研磨後加 200 μ l 蛋白質萃取液，以 13000 rpm 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘後取上清液，並重複此步驟一次確保蛋白質的純度，接著以每個樣品加入約 100 μ g 總蛋白質進行 SDS-PAGE 電泳分析，之後以 120 伏特 80 分鐘轉印蛋白質到 PVDF 膜上，之後參照 (Parks and Quail 1993; Ang et al. 1998) 進行抗體辨識。

七、Pull-Down 與共免疫沉澱法 (Coimmunoprecipitation Assay co-IP)

Pull-down 參照 (Saijo et al., 2003; Chen et al., 2007) 所使用之方法，利用純化出含有 tag 的融合蛋白質 5 μ g 進行實驗，置於 binding buffer (50 mM Tris pH=7.5、100mM NaCl、0.2% glycerol、0.6% Triton X-100、0.5 mM β -mercaptoethanol) 中 4 $^{\circ}$ C 搖晃約一小時後取出清洗後進行西方點墨法分析。

共免疫沉澱法 (Coimmunoprecipitation Assay co-IP) 將萃取出之植物蛋白質參照 (Chen et al., 2007) 進行分析，將磁珠與抗體結合後放入蛋白質並置於 grinding 溶液中 4 $^{\circ}$ C 搖晃約四小時後取出清洗磁珠進行西方點墨法分析。

八、阿拉伯芥原生質體(protoplast)的抽取和轉殖

選取短日照(光照時間 8 小時)未抽花芽之阿拉伯芥葉片，將葉片用手術刀片切成睫毛狀，酵素溶液 (1% cellulose R10, 0.25 % macerozyme R10, 0.4 M mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES (pH5.7), 10 mM CaCl₂, 5 mM β -ME, 0.1% BSA) 中作用分解細胞壁，使原生質體釋出，計算數量後使用 PEG 溶液 (0.2 M mannitol, 0.1M CaCl₂, 40% PEG4000)進行 plasmid 轉殖 (transfection)，最後在適當條件下培養超過 16 小時後即可觀察結果 (Yoo et al., 2007)，詳細實驗流程見附錄一。



結果

前人研究指出，*fin219-2* 突變株和 *fhy1-1* 突變株雜交所產生的 F1 子代，具有非等位非互補性 (nonallelic nonvcomplementayion) 關係 (Hsieh et al., 2000)。觀察 F1 子代經遠紅光照射後，其下胚軸長度較野生型及 *fin219*、*fhy1-1* 的異型合子突變株為長，意味著 *FIN219* 和 *FHY1* 可能共同參與在遠紅光的訊息傳遞途徑。此外，*FIN219* 在 JA 訊息傳遞下扮演著活化者的角色 (Staswick and Tiriyaki, 2004)，為了確認 *FHY1* 是否也會參與在 *FIN219* 所調控的 JA 訊息傳遞，故對下胚軸長度及部分甲基茉莉酸 (Methyl jasmonate 以下簡稱 MeJA) 造成的生理性狀進行檢測。

一、*fin219-2/fhy1-T (dm)* 雙突變株生理性狀分析

1. *fin219-2/fhy1-T* 雙突變株在遠紅光下呈現更不敏感的下胚軸性狀

使用前人研究所留下來的 *fin219-2/fhy1-T #26* 同型合子的雙突變株 (F4 世代進行生理性狀的分析 (以下簡稱 *dm*)，發現在弱遠紅光 (光強度 $1.5 \mu \text{mol/m}^2\text{s}$) 下，*dm* 雙突變株比起其親代 *fin219-2* 和 *fhy1-T* 個別突變株，下胚軸有更為延長的情形 (圖一 A、C；圖二 A、C)，暗示 *FIN219* 和 *FHY1* 兩者作用在遠紅光平行傳遞路徑且共同調控下胚軸的長度；而強遠紅光 ($10 \mu \text{mol/m}^2\text{s}$) 下的 *dm* 雙突變株，其外表型較類似 *fhy1* 突變體 (*fhy1-T*)，表示在強遠紅光下 *FHY1* 可能作用在訊息傳遞路徑的下游，而 *FIN219* 則位在 *FHY1* 的上游 (圖一 C；圖二 C)。

2. *dm* 雙突變株在遠紅光及 MeJA 處理下亦呈現更不敏感的下胚軸外表型

FN219 是一個 JA 結合酵素酶，且由上述得知 *FIN219* 和 *FHY1* 兩者可能存在遺傳調控關係，為了進一步了解 *FHY1* 是否參與在 JA 的訊息傳遞。故進行了遠紅光下處理 MeJA 來檢測下胚軸的長度。加入 MeJA 處理後，可以發現在弱遠紅光及甲基茉莉酸共同處理下，*dm* 雙突變株的下胚軸長度類似 *fin219-2* (圖一 B; 圖二 B)。而在強遠紅光及甲基茉莉酸共同處理下，*dm* 雙突變株則會比 *fin219-2* 和 *fhy1-T* 親代突變株下胚軸更為延長 (圖 1D; 圖 2D)。此結果顯示在弱遠紅光下添加 MeJA 時 *FIN219* (茉莉酸訊息) 對下胚軸長度扮演較為重要的角色，而在強遠紅光下經過 MeJA 處理後 *FIN219* 和 *FHY1* 兩者的功能具有加成的效果。

3. *dm* 雙突變株在 MeJA 處理下具有較不敏感的根部外表型

前人研究指出，JA 會影響植物的根部發育 (Zhang et al., 2007)，因此以加入 MeJA 的培養基種植突變株及轉植株之種子，觀察根部發育狀況。未加入 MeJA 時，大量表現 *FIN219* (*pGR::FIN219*) 轉植株具有較短根部外表型，其餘轉植株則呈現與野生型類似的外表型 (圖三 A)；加入 MeJA 後發現，除了 *fin219-2* 與 *dm* 雙突變株的對於 MeJA 較不敏感長外，其餘植株都具有根長變短、較敏感的現象 (圖三 B)。表示 *FIN219* 與 *FHY1* 兩者也具有對根長共同調控的功用，而在 MeJA 處理時 *FIN219* 扮演調控根長生長較為重要的角色。

4. 大量表現 *FIN219* 在 *fhy1-1* 突變體的遺傳背景時，在弱遠紅光(或 MeJA)處理下可 rescue 其遺傳背景的突變體下的外表型

為了進一步釐清在遠紅光與 MeJA 訊息傳遞下 *FHY1* 與 *FIN219* 的調控關係，使用前人研究 (Jang, 2005) 所建構的 *36B3-5/fhy1-1* 轉植株。*36B3-5* 含有 *FIN219* 啟動子和其完整 genomic DNA 的轉殖載體，故能大量表現 *FIN219*。在 *fhy1-1* 突變株的背景中，選用編號 #18-5-S1 的轉植株進行實驗。在弱遠紅光照射的情況下，#18-5-S1 其轉植株下胚軸長度類似野生型。顯示大量表現 *FIN219* 在 *FHY1* 突變體可 rescue 下胚軸的長度 (圖一 A)。而在加入 MeJA 後，也可觀察到同樣的

現象 (圖一 B)。而在強遠紅光與 MeJA 下 #18-5-S1 可部分 rescue 下胚軸的外表型。另外在觀察根部時，加入 MeJA 後，發現 #18-5-S1 的轉植株也可 rescue 根長的外表型 (圖三 B)。



5. 大量表現 *FHY1* 在 *fin219-2* 突變體的遺傳背景時在弱遠紅光下(或甲基茉莉酸處理下)下可完全 rescue 遺傳背景的外表型

另一方面，也使用大量表現 *FHY1* 在 *fin219-2* 突變株的遺傳背景，觀察轉植株在遠紅光或甲基茉莉酸處理下的外表型。利用前人篩選出的 *35S::FHY1/fin219-2* 編號 #33-1 轉植株進行此項實驗。發現在弱遠紅光 (或 MeJA 處理下)，可以使原本在 *dm* 雙突變株的下胚軸及根長有縮短的現象 (圖一 A-B；圖二 A-B) 另外在強遠紅光下 #33-1 此轉植株 #33-1 可 rescue 其遺傳背景 *fin219-2* 的外表型。然而在強遠紅光與茉莉酸存在背景下，此轉植株 #33-1 則無法 rescue 其 *fin219-2* 的外表型。除此之外觀察根部發現轉植株 #33-1 只能部分 rescue 其遺傳背景 *fin219-2* 根部對於 MeJA 反應的外表型。

二、FIN219 和 FHY1 間的交互作用

1. 利用 Pull-down 方法證實 FIN219 可利用其 C 端和 FHY1 進行交互作用

由於 *dm* 雙突變株在弱遠紅光及 MeJA 下呈現出比個別母本更不敏感的外表型，暗示這兩個參與在遠紅光及 MeJA 訊息傳遞路徑中的正向調控者彼此之間可能藉著某種調控關係，共同調控其下胚軸的外表型。因此我們推測 FIN219 和 FHY1 可能會發生交互作用。前人研究初步發現利用酵母菌雙雜交方法 (Yeast two-hybrid) 顯示 FIN219 和 FHY1 具有交互作用，為了更進一步分析兩者交互作用所需之片段，分別表達 FIN219 全長的重組蛋白 (GST-FIN219F)、N 端片段 (GST-FIN219N)、C 端片段 (GST-FIN219C) 及可表達 FHY1 全長的重組蛋白

(HIS-FHY1F)、N 端片段 (HIS-FHY1N)、C 端片段 (HIS-FHY1C) 進行 *In vitro* 的 pull-down 實驗。結果發現 FIN219 可利用其全長和 FHY1 全長及 N 端片段進行交互作用 (圖四 A)；利用 FIN219 N 端片段進行實驗，則無法和 FHY1 有任何交互作用 (圖四 B)；而使用 FIN219C 端片段，則仍可觀察到和 FHY1 全長具有交互作用 (圖四 C)。此結果證實 FIN219 可藉由其 C 端片段，和 FHY1 蛋白質進行交互作用。

2. 利用共免疫沉澱法 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP) 驗證 FIN219 和 FHY1 在植物體中具有交互作用

為了進一步證實 FIN219 和 FHY1 是否可在植物體內具有交互作用因此利用共免疫沉澱法 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP)，在不同光照條件，以及不同 MeJA 濃度下檢測在植物體中，FIN219 和 FHY1 是否仍會發生交互作用。抽取阿拉伯芥野生型 (Col-0) 和 FHY1 大量表現 (*FHY1OE c-myc tag #2-6*) 的植株蛋白質進行共免疫沉澱分析。由於先前實驗室並未有 FHY1 的抗體可供檢測，故採用接上 c-myc tag 的 *FHY1OE* 轉植株進行蛋白質表現量的檢測(圖五 A)可發現 FIN219 在黑暗下的表現量較多且 MeJA 可促進 FIN219 的表現量，而在其他光源下則呈現較少的現象。而 FHY1 在黑暗中及遠紅光下表現較多，而在加入 MeJA 則會降低其表現量。有趣的是 FHY1 在藍光下可受到 MeJA 誘導表現，而在紅光下則無此現象。確認蛋白質表現量後，即利用此轉植株進行共免疫沉澱。結果顯示 FIN219 和 FHY1 蛋白質在植物體受到遠紅光、紅光、藍光照射後，皆可進行交互作用(圖五 B)。但在甲基茉莉酸處理後，於遠紅光和藍光下的交互作用，則有減低的現象；而紅光下交互作用則有增強的現象(圖五 B)。取得 FHY1 單株抗體後，便利用野生型再次進行相同的實驗，則可獲得和第一次實驗相同的結果(圖六 B)。

三、FIN219 和 FHY1 之間的調控關係

1. FHY1 的蛋白質表現量在 *fin219-2* 中增加，FIN219 的蛋白質表現量在 *fhy1-T* 中增加。

由於FIN219與FHY1皆為遠紅光訊息傳遞中的正調控者且彼此之間具有交互作用，為了更進一步了解兩者間調控關係，利用西方點墨法(western blotting)比較野生型和 *fin219-2* 與 *fhy1-T* 在遠紅光 (光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 處理三天的幼苗中 FHY1 與 FIN219 蛋白質表現量；結果發現相較於野生型，*fin219-2* 中 FHY1 的蛋白質表現量會增加，*fhy1-T* 中 FIN219 蛋白質表現量也呈現增加的現象。表示 FHY1 與 FIN219 兩者之間可能會互相抑制。同樣這種蛋白質互相抑制的情況也能在其他轉植株 *pGR::FIN219*、*FHY1OE*、*36B3-5/fhy1-1* (#18-5-S1)、*35S::FHY1/fin219-2*(#33-1) 中發現(圖七 A)。尤其 #18-5-S1 與 *pGR::FIN219* 相比較發現 FIN219 在 #18-5-S1 表量特別多更加證實 FHY1 可以負調控 FIN219 的表現量。(圖七 A) 此外在檢測添加 $50 \mu\text{M}$ MeJA 情況下的蛋白質表現量，也會發現相同的結果(圖七 B)。

然而在另一方面檢測在遠紅光(光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)處理三天下，*FHY1* 在 *pGR::FIN219* 中基因的表現量，發現 *FHY1* 基因如同蛋白質表現量在 *pGR::FIN219* 中會呈現較野生型中減少的現象，在 *FHY1OE* 中也可以發現 *FIN219* 表現量減少的現象。表示不僅是蛋白質，而且在基因方面 *FIN219* 與 *FHY1* 具有彼此互相抑制的現象(圖七 C)。

2. 檢測在 *FIN219 OE/fhy1-1* #18-5-S1 轉植株及 *35S::FHY1/fin219-2* #33-1 轉植株中 JA 反應相關基因的表現量發現與在 *pGR::FIN219*、*FHY1OE* 中呈現相同的趨勢。

同時檢測在 #18-5-S1 及 #33-1 的基因表現量 (圖八) 可以發現到和 *pGR::FIN219*、*FHY1OE* 時存在著類似的現象，其 JA 反應相關基因 *JAZ1*、*JAZ2* 及 *VSP1* 在經過 MeJA 處理下亦呈現較多的現象。而檢測 *PIF1* 及 *PIF3*，PIF

(Phy-interacting basic helix-loop-helix transcription factor) 為光型態發生的抑制者在黑暗時會抑制葉綠素的生合成及促進下胚軸的延長，在植物受到光照時則會被 26S proteasome 進行降解。進而導致光型態的發生 (Hui et al., 2005)，發現其表現量和野生型並無相差，表示 *FIN219* 及 *FHY1* 所參與的遠紅光及 JA 訊息傳遞與 PIFs 較無關聯性。這邊可以得知在 *FIN219* 或是 *FHY1* 單獨存在的情況下植株內的遠紅光及 JA 訊息傳遞仍然可以發揮部分的效用。

四、*FIN219* 和 *FHY1* 經遠紅光及 MeJA 處理後對基因表現與生理性狀的影響

1. *FIN219* 及 *FHY1* 對於遠紅光及 MeJA 處理下的基因表現量影響

FIN219 和 *FHY1* 在植物中會發生交互作用，為了進一步探討兩者間對遠紅光及 MeJA 訊息傳遞之影響，便比較了各轉殖株在強 ($10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 或弱 ($1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 遠紅光及甲基茉莉酸處理下各基因的表現量，結果發現在野生型或是各種突變株在經過甲基茉莉酸處理過後，在強或弱遠紅光下，發現 *JAZ1* 和 *JAZ2* 基因之表現量有上升的現象。在 *pGR::FIN219* 和 *35S::FHY1OE*，*JAZ1* 和 *JAZ2* 上升的比例最為明顯 (圖九 A、B)；而在觀察 *JAZ3* 的表現量時，則是 *fin219-2* 和 *FHY1OE* 在處理甲基茉莉酸後上升比例最為明顯 (圖九 C)，由此可知，*FIN219* 和 *FHY1* 在茉莉酸訊息傳遞下，對 *JAZ1* 和 *JAZ2* 基因表現有促進效果；在調控 *JAZ3* 的表現時，*FIN219* 扮演抑制 *JAZ3* 基因表現的角色，而 *FHY1* 則扮演促進 *JAZ3* 基因表現的角色，兩者功能呈現相反的現象。檢測花青素累積相關基因 *CHS* (Chalcone synthase)，則可觀察到在 *pGR::FIN219* 和 *FHY1OE* 轉植株，在經過甲基茉莉酸處理後的情況下，相較於 *fin219-2* 與 *fhy1-T*，*CHS* 的表現量皆有上升 (圖九 D)，暗示 *FIN219* 和 *FHY1* 皆可促進花青素的累積。另外對於 *MYC2* 及 *VSP1*

(VEGETATIVE STORAGE PROTEIN)進行檢測後發現這兩個基因除了在 *fhy1-T* 及 *dm* 這兩個突變株外其餘植株的基因表現量皆會因為外加 MeJA 的影響而上升。另外利用 RT-PCR 對相同的基因進行重複檢測，得到和 real-time PCR 相同的趨勢。顯示 *FIN219* 與 *FHY1* 兩者具有可以在植物體受到 MeJA 處理時，促進 JA 相關基因表現的功能。

2. *FIN219* 和 *FHY1* 在遠紅光和 MeJA 處理的情況下皆能促進花青素的累積

進一步檢測 *dm* 雙突變株對於遠紅光所調控的生理性狀的反應，如花青素的累積和遠紅光阻斷葉綠素合成的作用 (Barnes et al., 1996)。檢測在黑暗及不同強度遠紅光下，加入甲基茉莉酸前後的花青素累積量，發現到無論是在黑暗或遠紅光，未經甲基茉莉酸處理的情況下，*fin219-2*、*fhy1-T*、*dm* 雙突變株的花青素累積量相較於其他植株有明顯的下降 (圖十一 A、B、C)。而在經過 MeJA 處理下，在黑暗時除了前面敘述到的突變株外其餘植株並不會有顯著的差異 (圖十一 A)，但在強與弱遠紅光經 MeJA 處理時則可看到 *pGR::FIN219* 和 *FHY1OE* 的轉植株具有較高花青素的累積量 (圖十一 B、C)。暗示在強與弱遠紅光下經 MeJA 處理時 *FIN219* 與 *FHY1* 可能扮演促花青素累積的角色。

3. *FIN219* 和 *FHY1* 參與遠紅光阻斷葉綠素合成的作用 (FR blockage of greening)

由於 *FIN219* 和 *FHY1* 參與在遠紅光訊息傳遞下的調控路徑中，在弱遠紅光處理下可發現 *fin219-2*、*fhy1-T*、*dm* 突變株皆具有葉綠素累積量較高的情形 (圖十一 D) 而 *FHY1OE* 中，葉綠素含量則最低，其次是 *35S::FHY1/fin219-2* (#33-1) 的轉植株。表示 *FIN219* 和 *FHY1* 可能會造成葉綠素累積量的下降。

五、*FIN219* 和 *FHY1* 對於 *PHYA* 入核的影響

1. 相較於野生型，*fhy1-T*、*dm* 及 *FIN219 OE/fhy1-1 (#18-5-S1)* 其 PHYA 在細胞核中的累積量無論是在黑暗或遠紅光照射下都呈現增加的現象

為了進一步確認 *FIN219* 和 *FHY1* 交互作用是否會影響到 *PHYA* 的入核，利用接上 GFP (green fluorescent protein) 的 *PHYA* 轉入原生質體中，觀察其發螢光的位置是位於何處，在野生型的背景下 (圖十二 A) 可觀察到無論是在黑暗或是遠紅光 (光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 處理 1 小時下 GFP-*PHYA* 在細胞質及細胞核皆有累積的現象，而在 *pGR::FIN219* (圖十三 A) 的情況下則會看到 *PHYA* 多半累積在細胞質而在核內累積的量較少，至於在 *fhy1-T*、*dm* (圖十二 C、D) 及 *FIN219 OE/fhy1-1 (#18-5-S1)* (圖十三 C) 則由於 *FHY1* 被突變掉後導致其協助 *PHYA* 入核的功能喪失，故無法看到 *PHYA* 在核內累積的現象。

2. 相較於野生型，*35S::FHY1OE*、*35S::FHY1/fin219-2* 其 *PHYA* 在細胞核中的累積量在黑暗或遠紅光照射時都呈現增加的現象

利用相同條件檢測 *35S::FHY1OE*、*35S::FHY1/fin219-2 (#33-1)* 可以發現與上述相反的現象，在 *FHY1* 大量表現的情況下，可以看到在受到紅外光照射時，相較於野生型，*PHYA* 可以大量的累積在細胞核內。顯示 *FHY1* 大量表現的確有助於 *PHYA* 在細胞核中的累積量，故使得 *PHYA* 得以進行對下游光型態相關基因的調控，造成 *FHY1OE* 轉殖株下胚軸較為短小的現象。

討論



一、*FIN219* 大量表現可部分回復 *fhy1-1* 突變株的外表型，*FHY1* 大量表現也可部分回復 *fin219-2* 突變株的外表型

根據前人研究，得知 *FIN219* 和 *FHY1* 皆為遠紅光訊息傳遞下的調控因子，當其基因功能喪失時，對遠紅光的感受力會下降。其中 *FHY1* 可能為主要的調控角色，*fhy1-T* 無論在強或弱遠紅光下，下胚軸皆會較為抽長(圖一 A、C；圖二 A、C)。然而在強遠紅光下，*fin219-2* 的下胚軸外表型並無太大變化(圖一 C、D；圖二 C、D)，推測在強遠紅光下之光型態發生，主要由 *FHY1* 調控；而在弱遠紅光下則是由 *FIN219* 和 *FHY1* 共同調節。

根據研究結果發現，*FIN219* 大量表現在 *fhy1* 突變株中時，會造成較短的下胚軸，顯示 *FIN219* 可部分恢復 *fhy1* 對於遠紅光不敏感的外表型。另一方面，*FHY1* 大量表現在 *fin219-2* 的突變株時，也會造成較短的下胚軸，可以推測 *FIN219* 和 *FHY1* 在遠紅光訊息傳遞下，對植物下胚軸的生長性狀，兩者可能存在著調控的關係。

二、*FIN219* 和 *FHY1* 在基因與蛋白質層次上的調控關係

利用西方點墨法 (Western blotting) 研究在遠紅光及 MeJA 處理下的植株 *FIN219 OE/fhy1-1* (#18-5-S1) 這兩種 *FIN219* 大量表現的轉殖株其 *FHY1* 的蛋白質表現量有下降的現象；相反的在 *FHY1OE #2-6* 與 *35S::FHY1OE/fin219-2* (#33-1) 這兩個轉殖株下，相較於野生型，*FIN219* 的蛋白質表現量也會有下降的現象(圖七 A、B)，暗示 *FIN219* 和 *FHY1* 會彼此抑制對方的蛋白質表現量。另一方面利用 RT-PCR 檢測基因間的調控關係，亦發現兩者互相抑制。但由於 *FIN219* 並非一個轉錄因子，故 *FIN219* 和 *FHY1* 之間互相抑制的關係可能藉由第三者調控。前人研究中顯示在遠紅光照射時，*phyA-201* 突變株中的 *FHY1* 基因表現量上升，暗示 *PHYA* 的存在可能會導致 *FHY1* 的表現量下降 (Desnos et al., 2001)，根據實驗

室前人研究中，利用酵母菌雙雜交與 pull-down 分析之結果，也得知 phyA 和 FIN219 間的確會具有交互作用 (Chiou, 2008)。根據 FHY1 可以在照光時協助 PHYA 進入細胞核內的論點 (Hiltbrunner et al., 2005; Fankhauser and Chen, 2008)。

推測可能 FIN219 和 FHY1 彼此之間會互相去競爭與 PHYA 結合，若是 FIN219 大量表現時與 PHYA 的結合率就會上升，導致 FHY1 無法順利將 PHYA 帶入細胞核中，使 FHY1 的穩定性下降導致表現量降低。這邊研究的結果也存在著一個有趣的現象，比較 *FIN219* 大量表現 *pGR ::FIN219* 與 *FIN219 OE/fhy1-1 (#18-5-S1)* 的兩個轉植株，可以看到 *FIN219 OE/fhy1-1 (#18-5-S1)* 的 *FIN219* 表現量遠遠大於 *pGR::FIN219*，圖八的 RT-PCR 檢測下也能發現基因表現呈現相同結果，然而其在遠紅光及 MeJA 處理下的外表型卻呈現比 *pGR ::FIN219* 還要不敏感的現象，是否因為 FHY1 的存在與否會影響這種現象，是一個很值得探討的問題。

三、遠紅光與 MeJA 處理下 *FIN219* 和 *FHY1* 之間調控對植物外表型的影響

藉由下胚軸外表型，我們可以觀察到：在弱遠紅光照射時，*fin219-2* 與 *fhy1-T* 的下胚軸皆呈現比野生型較抽長的外表型；而在 *dm* 雙突變株下則具有更加抽長的下胚軸（圖一 A；圖二 A），前面敘述表示在弱遠紅光時下胚軸的長度主要是由 *FIN219* 和 *FHY1* 來共同調控。而在強遠紅光下，推測是由於在這時訊息傳遞路徑是 *FHY1* 位在 *FIN219* 的下游，由 *FHY1* 來扮演主要的調控角色，故在強遠紅光下 *fin219-2* 突變株對於下胚軸的影響較為不明顯，使得 *dm* 雙突變株較接近 *fhy1-T* 的外表型（圖一 C；圖二 C），而從蛋白質檢測的結果發現（圖七 A）在 *36B-3-5/fhy1-1(#18-5-S1)* 這個轉植株中，可偵測到雖然 *FIN219* 蛋白質大量表現；但由於缺乏 *FHY1*，導致下胚軸的長度無法回復至類似野生型的長度。而在 *35S::FHY1OE/fin219-2(#33-1)* 中，也呈現相同的情況，即使 *FHY1* 大量表現，沒有 *FIN219* 的存在，其下胚軸依然無法回復到類似野生型的長度。結果表示這兩

者必須共同作用，才能在遠紅光訊息傳遞下產生最明顯的影響。而經 MeJA 處理後，則有不同的情況。前人研究指出，*FIN219 (JARI)*除了參與在遠紅光訊息傳遞，也具有將 JA 接上異白胺酸 (Isoleucine, Ile)的酵素活性 (Hsieh et al., 2000; Staswick, 2002)。由於在 JA 訊息傳遞主要是以 *FIN219(JARI)*為主，推測 *FHY1* 在 JA 訊息傳遞可能扮演著輔助調控的角色。故在弱遠紅光下處理 MeJA，*fin219-2*的下胚軸長度無明顯縮短，植株呈現對 MeJA 不敏感的現象，表示；在 *fhy1-T*的情況，則因為缺少了 *FHY1* 這個輔助基因，導致下胚軸長度雖然對 MeJA 敏感，但卻無法比 *pGR::FIN219* 和 *35S::FHY1OE* 來的明顯；在 *36B-3-5/fhy1-1#18-5-S1*，因為缺乏 *FHY1*，即使在 *FIN219* 大量表現的情況下，依然無法完全回復下胚軸的性狀(圖一 C；圖二 C)。而在強遠紅光下處理 MeJA 時，可以發現到在 *fin219-2/fhy1-T* 下胚軸會呈現比親代各別突變株 *fin219-2* 和 *fhy1-T* 更加抽長的現象，這現象比在弱遠紅光處理 MeJA 時來的明顯許多，推測在強遠紅光加入 MeJA 時，*FHY1* 和 *FIN219* 兩者的功用會產生互相加成的現象(圖一 D；圖二 D)。另外在 Real-time 及 RT PCR 的結果(圖八、九、十)也顯示出在受到 MeJA 處理下，參與在 JA 訊息傳遞下的基因 *JAZ1*、*JAZ2*、*MYC2*、*VSP1* 基因的表現量會比未處理前較為上升。顯示出 *FHY1* 和 *FIN219* 的確會共同參與在遠紅光及 MeJA 的訊息傳遞下。而阿拉伯芥中遠紅光所調控的植物生長發育還有包含花青素的累積及阻斷葉綠素生合成的作用，在持續遠紅光下生長的幼苗無法合成葉綠素，在轉移到白光過後也無法完全完成綠化，這種情況稱為遠紅光阻斷葉綠素生合成的作用(FR block of greening)，主要是由 *phyA* 所引起(Chua et al., 1996)。若參與在 *phyA* 調控訊息傳遞路徑成員的突變則會不會有現象的發生，同時這樣的現象在添加蔗糖的情況下會被回復(Barnes et al., 1996)。因此在檢測葉綠素累積的實驗時可以發現(圖十一 D) *fin219-2*、*fhy1-T* 及 *dm* 雙突株葉綠素的累積量較野生型有上升的情形，在照射白光時綠化的速度也比較快。而在 *pGR::FIN219* 和 *35S::FHY1OE* 植株下葉綠素的累積量則會大幅下降，但 *#18-5-S1*

和#33-1卻可以稍微回復葉綠素的累積量。在花青素方面，在黑暗及不同強度遠紅光(光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 、 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)處理時皆可看到在 *fin219-2*、*fhy1-T* 及 *fin219-2/fhy1-T* 雙突株時相較野生型花青素累積量下降的情形。在(圖十一B、C)則可以看到經遠紅光處理時，*pGR::FIN219* 和 *35S::FHY1OE* 呈現花青素累積量上升，而在#18-5-S1 和#33-1 則會造成部分累積量下降的情形，在(圖十一B)弱遠紅光處理時，*35S::FHY1OE* 會造成花青素大量累積的現象，這情況在強遠紅光下(圖十一C)的 *pGR::FIN219* 也能發現，另外進行 MeJA 的處理下，可以看到花青素的累積量會呈現上升的現象。綜合以上結論推測 *FIN219* 及 *FHY1* 在遠紅光及 MeJA 處理下可能會促進花青素的累積；*FIN219* 主要是在強遠紅光、*FHY1* 則是在弱遠紅光，對於葉綠素則是會呈現抑制綠化的現象。因此由結果可知在遠紅光及 MeJA 處理下 *FIN219* 和 *FHY1* 會共同參與幼苗下胚軸延長的調控機制、花青素的累積和遠紅光阻斷葉綠素生合成的作用。

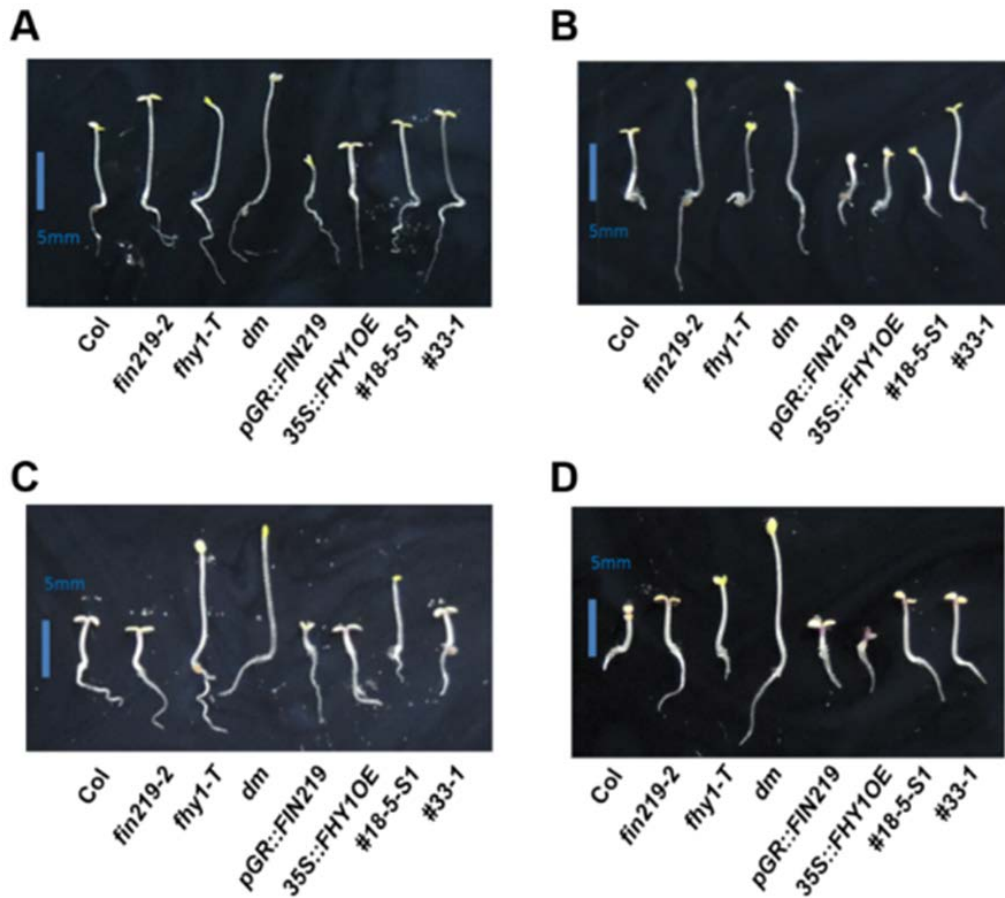
四、FIN219 和 FHY1 會共同競爭 PHYA，使 PHYA 入核的情況有所改變

經由先前討論提到，*FIN219* 和 *FHY1* 可能會共同競爭 *PHYA*，進而影響 *PHYA* 的入核。從結果(圖十二、十三)可以明確的看到在 *fin219-2* 突變株下，*PHYA* 在核內的累積量相較於野生型高出許多。而在 *35S::FHY1OE* 時可以看到 *PHYA* 大量累積在核中；但在 *pGR::FIN219* 時這種情況則會下降許多。顯示 *FIN219* 和 *FHY1* 兩者之間可能會互相競爭與 *PHYA* 的結合。根據實驗結果推論在野生型的狀況時 *FHY1* 和 *FIN219* 扮演著互相競爭與 *PHYA* 結合的角色故使得在核內核外都可看到 GFP 的螢光訊號。然而當 *FHY1* 蛋白質被大量表現時會提升其與 *PHYA* 的結合能力，使 *PHYA* 和 *FIN219* 結合率下降而使得其在核內累積量上升，進而造成其外表型短縮的現象。而在 *FIN219* 大量表現時則會使得 *PHYA* 無法與 *FHY1* 結合進而導致累積在細胞核外無法入核的現象，也可以驗證前面所提到當 *FIN219* 大量表現時 *FHY1* 由於無法入核表現量降低的說法。然而觀察卻發現在 *FIN219* 大量表現時下胚軸也具有短縮的現象，推測可能是由於 *FIN219* (*JAR1*)大量表現時促進植物

在 JA 的訊息傳遞較為敏感，故導致下胚軸短縮的現象。依照實驗室前人研究 (Li, 2010) 以阿拉伯芥原生質體為材料，利用雙分子螢光互補方法 (Bimolecular Fluorescence Complementation, *BiFC*)，檢測 FIN219 和 FHY1 是否會發生交互作用。將 FHY1 全長融合 YFP (Yellow fluorescent protein)N 端片段 (FHY1F-YFP^N) 及 FIN219 全長融合 YFP 的 C 端片段 (FIN219F-YFP^C)轉殖進入原生質體中，若兩個蛋白質會發生交互作用，則會出現 YFP 的訊號。結果顯示 FHY1 與 FIN219 交互作用的位置在細胞核，但也發現會同時出現在細胞質，同時進行不同光照的實驗發現，不論是培養在黑暗或遠紅光下的原生質體內皆有發生交互作用，黑暗中主要是發生在細胞核，而遠紅光下主要是細胞核及細胞質內皆有交互作用的情形，前人研究指出 phyA 累積在細胞核內的現象需要 FHY1 的協助 (Hiltbrunner et al., 2005)，FHY1 在其 N 端的區域各含有一段 NLS (nuclear localization sequence) 和 NES (nuclear exclusion sequence)；NLS 上的突變會使得 FHY1 只能表現在細胞質，NES 上的突變會造成 FHY1 只能停留在細胞核中，證明 NLS 和 NES 確實有使 FHY1 進核和出核的功能 (Zeidler et al., 2004)推測 FHY1 可利用這項特性使 FHY1 和 FIN219 進入核內。未來可以利用免疫沉澱的方式，證明 PHYA、FIN219、FHY1 是否能在植物體內形成複合體(complex)，此結果將可協助我們解釋遠紅光與茉莉酸訊息傳遞之整合。

未來可以利用表現出 PHYA、FIN219、FHY1 各蛋白質 N 端與 C 端的轉殖株利用共免疫沉澱法進行蛋白質交互作用的實驗，更進一步來驗證究竟這三者到底是藉由哪一個片段進行交互作用，或是利用 fractionation 技術分離出細胞核和細胞質，以比較不同蛋白質之間的表現量的差異。

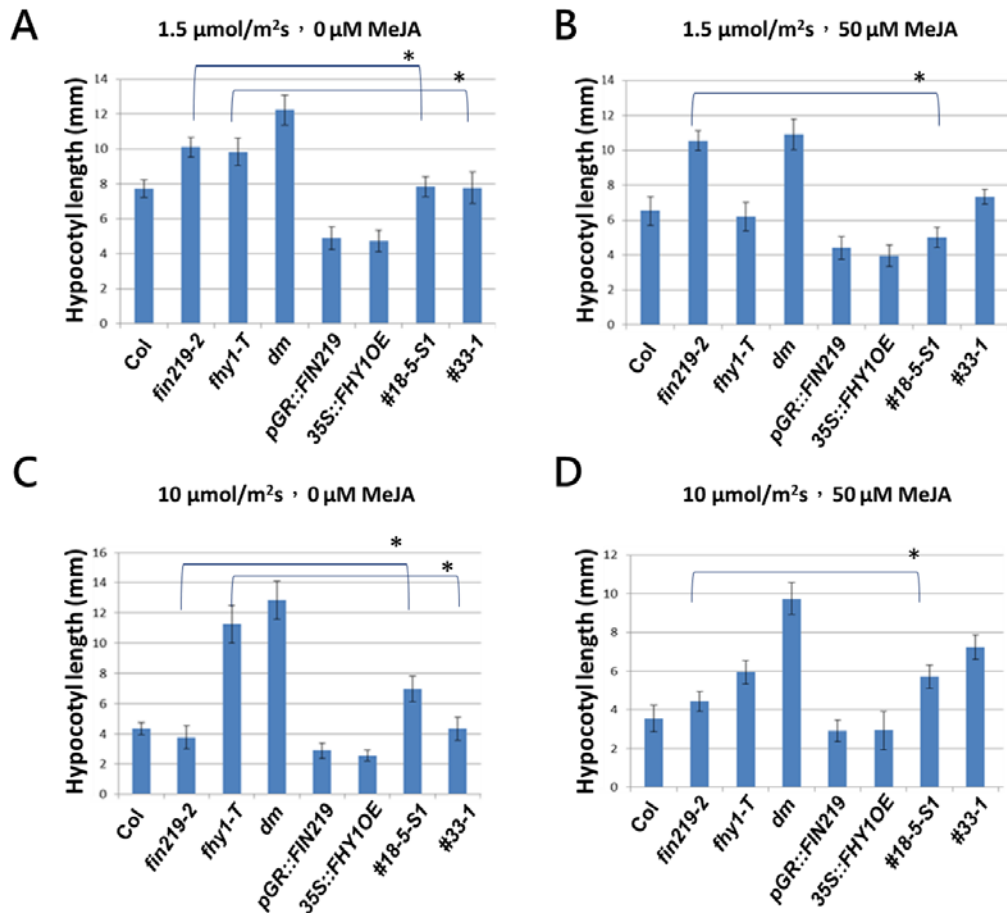
結果圖片



圖一、觀察各種轉植株和突變株不同強度遠紅光及甲基茉莉酸處理下生長三天的外表型。

將各植株種子於播種後，各別在不同光源下生長三天，其下胚軸長度數量化的統計結果($n \geq 30$)。pGR::FIN219 轉植株使用 $1 \mu\text{M}$ dexamethasone (DEX) 誘導 FIN219 大量表現。A-B: 弱遠紅光 ($1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 處理，C-D: 強遠紅光 ($10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 處理；A、C: $0 \mu\text{M}$ MeJA，B、D: $50 \mu\text{M}$ MeJA。生長三天後進行拍照。統計方法利用 Student's t-test ($n \geq 30$)，

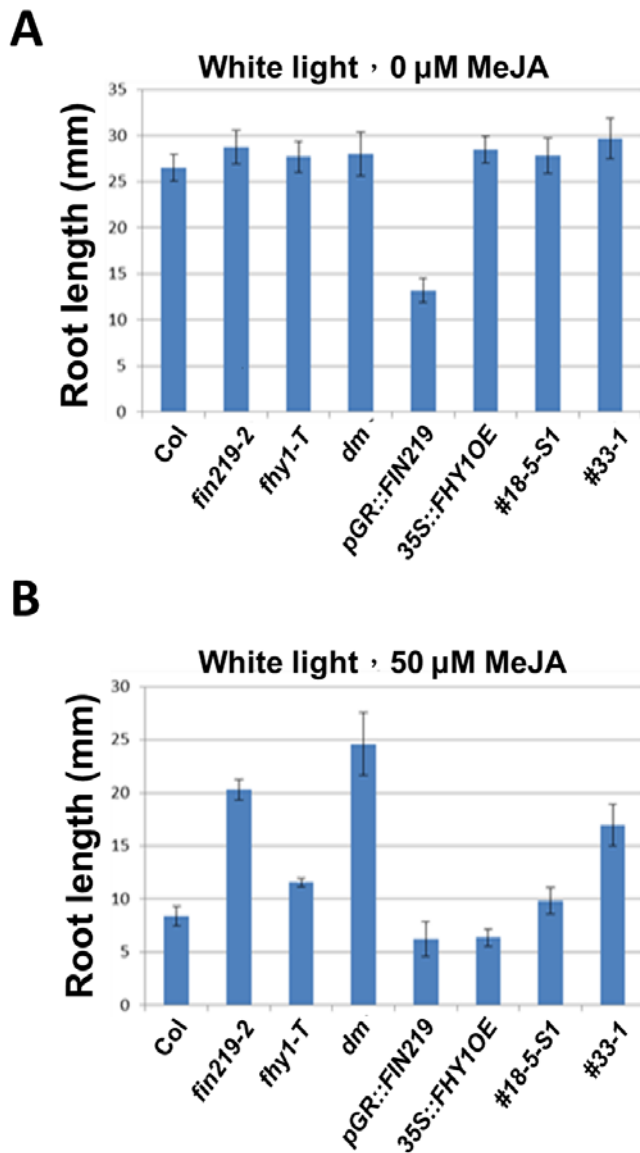
dm : *fin219-2/fhy1-T*、#18-5-S1 : #18-5-S1 : *36B3-5/fhy1-1* (36B3-5 為一個包含 FIN219 的啟動子和完整 FIN219 的 genomic DNA 的轉殖載體)；#33-1 : *35S::FHY1/fin219-2*



圖二、將轉殖株和突變株在不同強度遠紅光及甲基茉莉酸處理下生長三天的下胚軸長度數量化結果。

將各植株種子於播種後，各別在不同光源下生長三天，其下胚軸長度數量化的統計結果($n \geq 30$)。*pGR::FIN219* 轉殖株則使用 1 μM dexamethasone (DEX) 誘導 *FIN219* 大量表現。A-B: 弱遠紅光 (光強度 1.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 處理, C-D: 強遠紅光 (光強度 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 處理; A、C: 0 μM MeJA, B、D: 50 μM MeJA。以上皆為生長三天。統計方法利用 Student's t-test ($n \geq 30$), *fin219-2* 與 *#18-5-S1* 相比或 *fhy1-T* 與 *#33-1* 相比有顯著性差異, * 為 $p < 0.05$ 。

dm: *fin219-2/fhy1-T*、*#18-5-S1*: *36B3-5/fhy1-1* (*36B3-5* 為一個包含 *FIN219* 的啟動子和完整 *FIN219* 的 genomic DNA 的轉殖載體)、*#33-1*: *35S::FHY1/fin219-2*

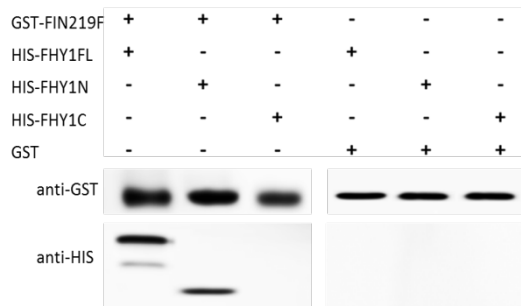


圖三、檢測在經過茉莉酸處理五天下，各突變株與轉殖株根長的外表型。

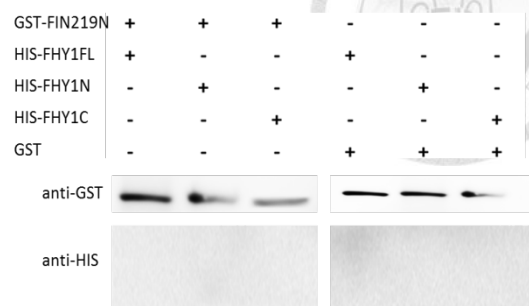
將各植株種子於播種後，各別在不同光源下生長三天，其下胚軸長度數量化的統計結果($n \geq 30$)。將培養基直立放立，移入植物後放到白光生長箱生長五天，觀察其根長外表型，MeJA 分別為 0 μM 與 50 μM ，其中 *pGR::FIN219* 轉殖株則使用 1 μM dexamethasone (DEX) 誘導 FIN219 大量表現。

其中 *dm:fin219-2/fhy1-T*、*#18-5-S1:36B3-5/fhy1-1* (36B3-5 為一個包含 FIN219 的啟動子和完整 FIN219 的 genomic DNA 的轉殖載體)、*#33-1:35S::FHY1/fin219-2*。

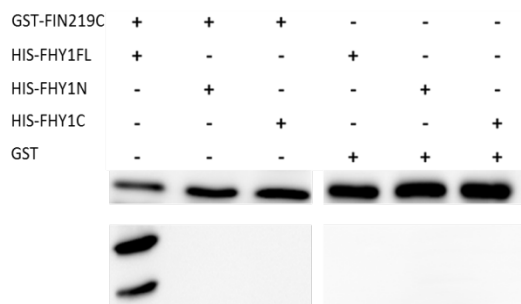
A



B



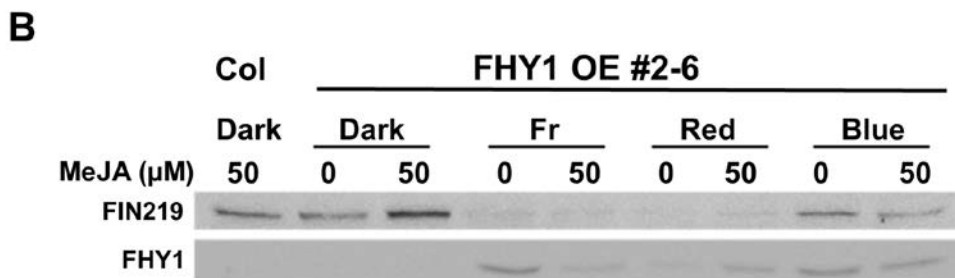
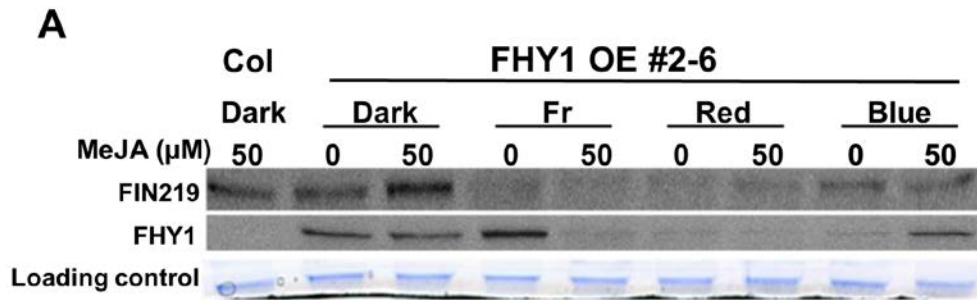
C



圖四、利用 pull-down 方式證明 FIN219 可利用其 C 端和 FHY1 進行交互作用

利用 pull-down 驗證 *FIN219* 全長來對 *FHY1* 各片段進行交互作用的檢測。

- 利用 *E.coli* 純化出融合 tag 的 GST-FIN219 蛋白質全長與 HIS-FHY1 蛋白質全長/N 端/C 端各片段進行 pull-down 實驗分析。各蛋白質總量為 5 μg 。
- 利用 *E.coli* 純化出融合 tag 的 GST-FIN219 蛋白質 N 端片段與 HIS-FHY1 蛋白質全長/N 端/C 端各片段進行 pull-down 實驗分析。各蛋白質總量為 5 μg 。
- 利用 *E.coli* 純化出融合 tag 的 GST-FIN219 蛋白質 C 端片段與 HIS-FHY1 蛋白質全長/N 端/C 端各片段進行 pull-down 實驗分析。各蛋白質總量為 5 μg 。

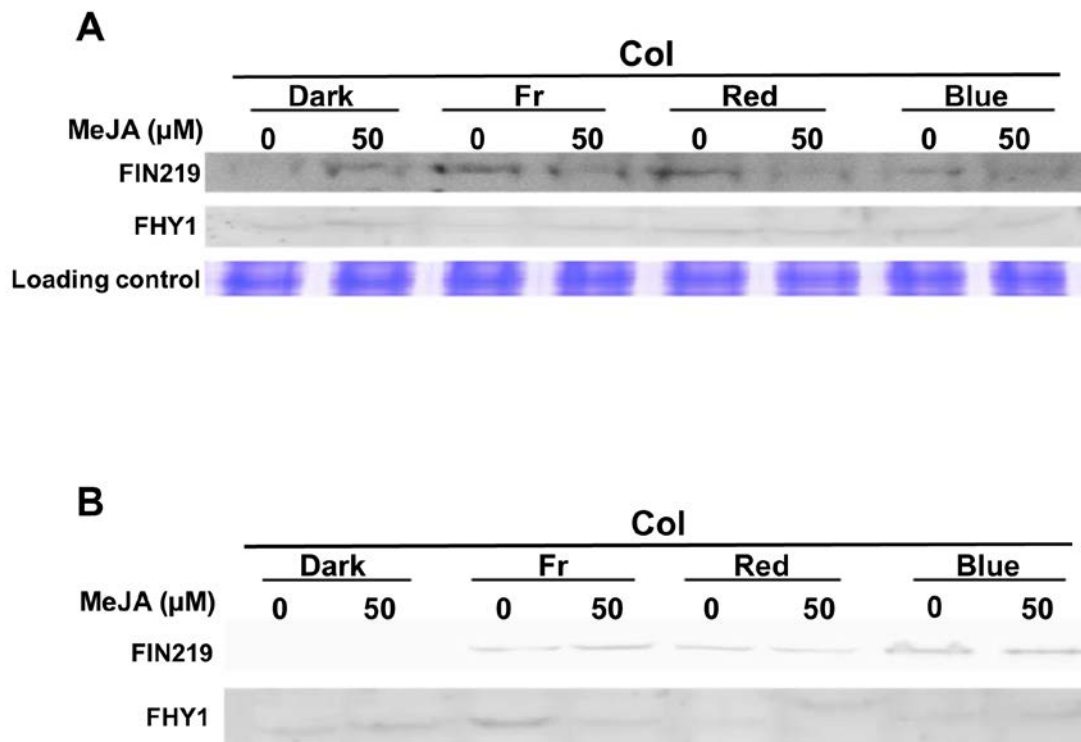


圖五、利用共免疫沉澱法驗證 FIN219 和 FHY1 蛋白質之間的交互作用。FIN219 和 FHY1 必須受到光照才能進行交互作用

利用在各種不同光源及光強度下生長三天的阿拉伯芥 Col 和 *FHY1OE* #2-6 (帶有 c-myc tag) 的幼苗。Dark: 黑暗, FR: 遠紅光 (光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), R: 紅光 (光強度 $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), B: 藍光 (光強度 $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)。除 Col 外個別處理 $0 \mu\text{M}$ 及 $50 \mu\text{M}$ MeJA。

A. 萃取幼苗蛋白質後各取 $80 \mu\text{g}$ 進行西方點墨法 (Western blotting), 檢測植物在接受不同光照及 MeJA 處理下的 FIN219 和 FHY1 蛋白質表現量。loading control 為 Coomassie Brilliant Blue 染色代表每個樣本所 loading 的量為一致的。所用抗體為 FIN219 的抗體及能辨識到 c-myc tag 的抗體。

B. 利用共免疫沉澱法 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP) 來檢測植物體內蛋白質之間的交互作用, 所使用的總量為 1.5mg 。所用抗體為 FIN219 的抗體接上 beads 並連接上 FIN219 後, 利用其能與 FHY1 結合的能力, 將 FHY1 給抓下來, 並進行 Western blotting 檢測。所用抗體為 FIN219 的抗體及能辨識到 c-myc 的抗體。

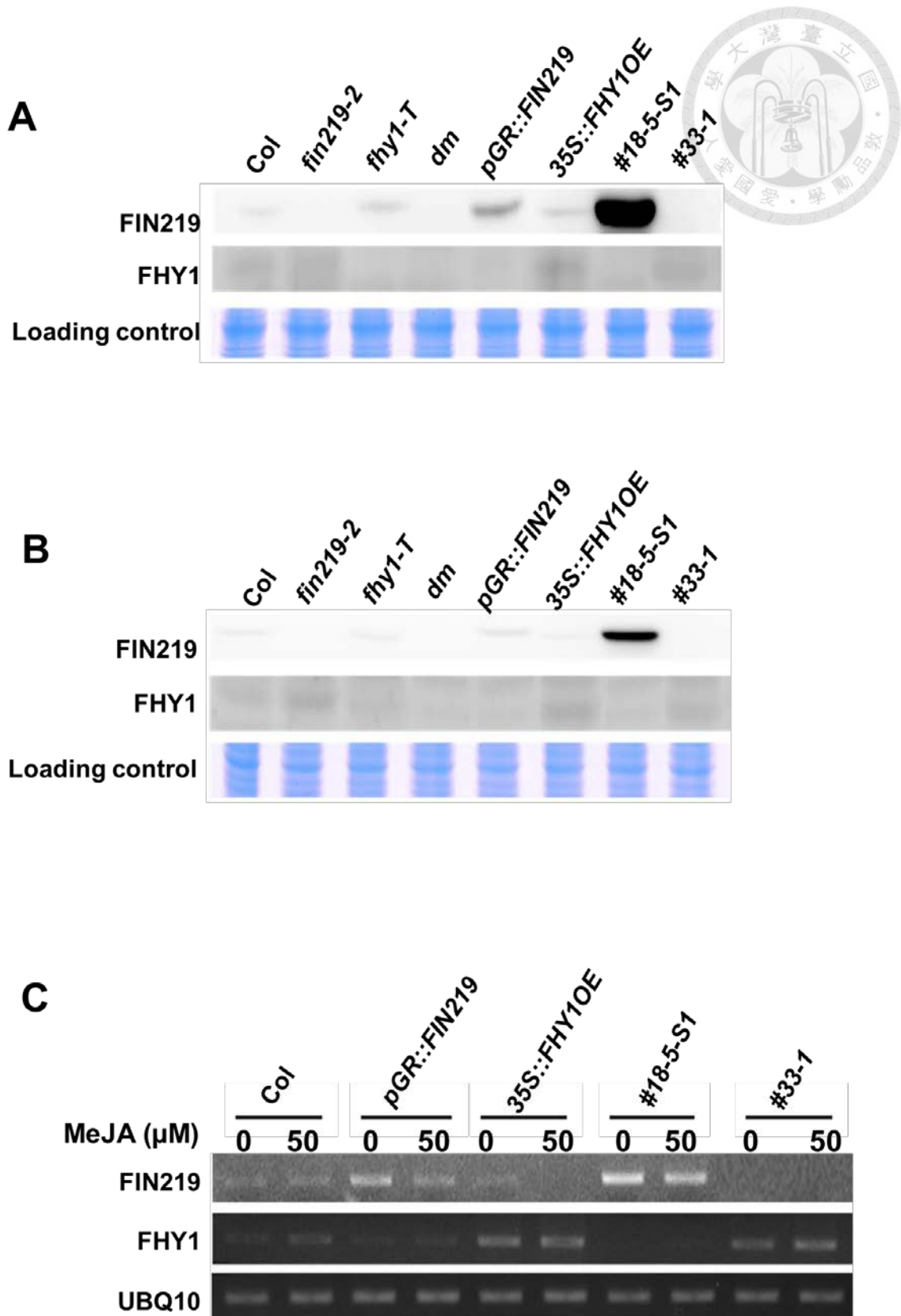


圖六、利用共免疫沉澱法驗證 FIN219 和 FHY1 蛋白質之間的交互作用。FIN219 和 FHY1 必須受到光照才能進行交互作用

利用在各種不同光源及光強度下生長三天的阿拉伯芥 Col 的幼苗。Dark: 黑暗，FR: 遠紅光 (光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)，R: 紅光 (光強度 $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)，B: 藍光 (光強度 $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)。除 Col 外個別處理 $0 \mu\text{M}$ 及 $50 \mu\text{M}$ MeJA。

A. 萃取生長三天的幼苗蛋白質後各取 $80 \mu\text{g}$ 進行西方點墨法 (Western blotting)，檢測植物在接受不同光照及 MeJA 處理下的 FIN219 和 FHY1 蛋白質表現量，loading control 為 Coomassie Brilliant Blue 染色代表每個樣本所 loading 的量為一致的。所用抗體為 FIN219 的抗體及 FHY1 的抗體。

B. 利用共免疫沉澱法 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP) 來檢測植物體內蛋白質之間的交互作用，所使用的總量為 1.5mg 。所用抗體為 FHY1 的抗體，接上 beads，並連接上 FHY1 後，利用其能與 FIN219 結合的能力，將 FIN219 給抓下來，並進行 Western blotting 檢測。所用抗體為 FIN219 的抗體及能辨識到 FHY1 的抗體。



圖七、檢測在各轉殖株及突變株內 FIN219 與 FHY1 的蛋白質與基因表現量。發現 FIN219 和 FHY1 在基因與蛋白質方面具有互相抑制的現象

分別利用在遠紅光(光強度:1.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)生長三天的幼苗進行檢測，所採用的轉植株為 *36B3-5/fhy1-1 #18-5-S1* (*36B3-5* 為一個包含 *FIN219* 的啟動子和完整 *FIN219* 的 genomic DNA 的轉殖載體)及 *35S::FHY1/fin219-2 #33-1*。其中 *pGR::FIN219* 轉植株則使用 1 μM dexamethasone (DEX)誘導 *FIN219* 大量表現。

A-B. 萃取在遠紅光(光強度 1.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)生長三天的幼苗蛋白質，其中 B 外加 50 μM MeJA，利用西方點墨法(Western blotting)檢測植物總蛋白質中 *FHY1* 和 *FIN219* 的表現情形。每個樣本蛋白質的總量為 80 μg ，loading control 為 Coomassie Brilliant Blue 染色代表每個樣本所 loading 的量為一致的。所用抗體為 *FIN219* 的抗體及 *FHY1* 的抗體。

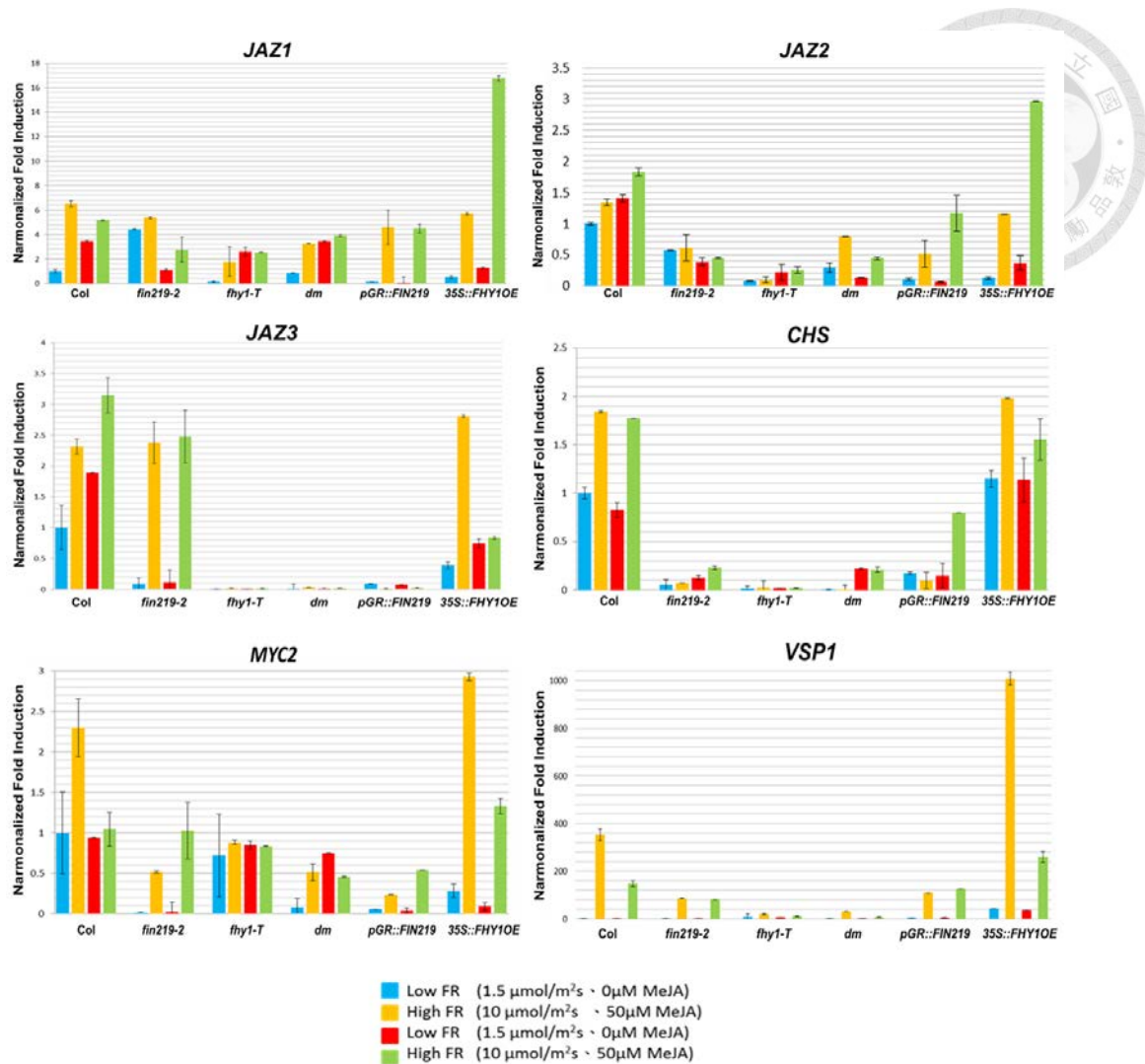
C. 萃取在遠紅光(光強度 1.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)生長三天的幼苗 RNA，轉變為 cDNA 後進行 RT-PCR 檢測 *FIN219* 和 *FHY1* 基因表現量，MeJA 處理分別為 0 μM 與 50 μM 。以 *UBQ10* 作為 loading control。

其中 *#18-5-S1*：*36B3-5/fhy1-1* (*36B3-5* 為一個包含 *FIN219* 的啟動子和完整 *FIN219* 的 genomic DNA 的轉殖載體)；*#33-1*：*35S::FHY1/fin219-2*

MeJA (μM)	Col		<i>pGR::FIN219</i>		<i>35S::FHY1OE</i>		<i>#18-5-S1</i>		<i>#33-1</i>	
	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50
<i>FIN219</i>	1	1.17	1.87	1.50	0.91	0.85	2.59	2.20	n.d	n.d
<i>FHY1</i>	1	2.29	0.89	1.05	5.31	5.20	n.d	n.d	2.82	3.81
<i>PIF1</i>	1	0.93	0.98	1	1.08	1.01	0.99	0.97	1.15	0.95
<i>PIF3</i>	1	1.03	0.99	1.01	1.3	1.07	1	1.06	1.1	1.07
<i>JAZ1</i>	1	1.69	0.11	1.75	0.13	1.82	0.39	1.65	0.18	1.88
<i>JAZ2</i>	1	0.97	0.49	1.38	0.58	1.7	0.55	1.65	0.5	1.46
<i>HY5</i>	1	1.41	2.44	1.78	1.89	1.72	2.87	2.56	1.68	1.74
<i>VSP1</i>	1	2.81	0.91	1.79	1.02	3.27	0.97	1.93	0.91	3.03
<i>UBQ10</i>										

圖八、利用 RT-PCR 檢測 *#18-5-S1* 及 *#33-1* 轉植株在遠紅光及外加 MeJA 情況下，參與光訊息傳遞及 JA 反應的相關基因表現量。

萃取在遠紅光(光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)生長三天，外加 MeJA $0 \mu\text{M}$ 及 $50 \mu\text{M}$ 之幼苗之 RNA，將其轉為 cDNA 後檢測其基因表現量。*PIF* ((PHY-interacting basic helix-loop-helix transcription factor) 為光型態發生之抑制基因。其中 *#18-5-S1* : *36B3-5/fhy1-1* (*36B3-5* 為一個包含 *FIN219* 的啟動子和完整 *FIN219* 的 genomic DNA 的轉殖載體) ; *#33-1* : *35S::FHY1/fin219-2*

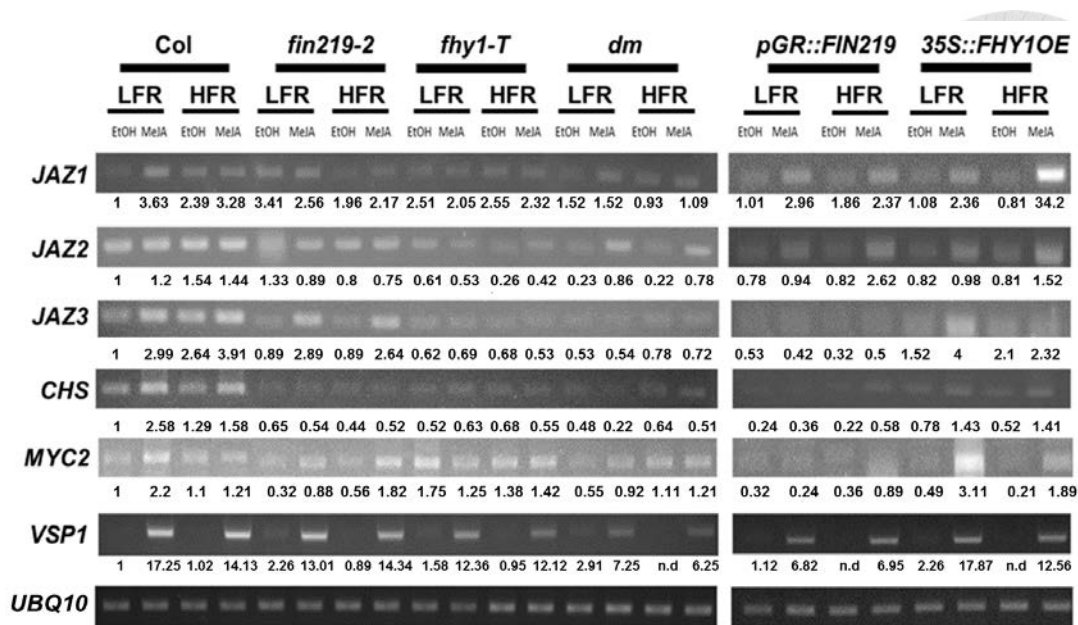


圖九、檢測遠紅光及外加 MeJA 情況下，FIN219 和 FHY1 調控 JA 反應相關基因的表現量，發現 JA 反應相關基因表現量可受到 MeJA 及遠紅光所影響

利用 real-time PCR 檢測 JA 反應相關基因。使用生長在弱遠紅光（光強度： $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ）及強遠紅光（光強度： $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ）三天的植株，並外加 $0 \mu\text{M}$ 及 $50 \mu\text{M}$ 濃度的 MeJA。A 圖所檢測為 JA 反應相關基因 *JAZ1* (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1)、B 圖所檢測為 JA 反應相關基因 *JAZ2* (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 2)、C 圖所檢測為 JA 反應相關基因 *JAZ3* (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 3)。D 圖所檢測為花青素生合成基因 *CHS* (Chalcone synthase)、E 圖所檢測為 JA 反應最下游的基因 *MYC2*、F 圖所檢測為會受 JA 或外在傷害誘導的基因 *VSP1* (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1)。

其中 *pGR::FIN219* 轉殖株則使用 1 μ M dexamethasone (DEX) 誘導 *FIN219* 大量表現。

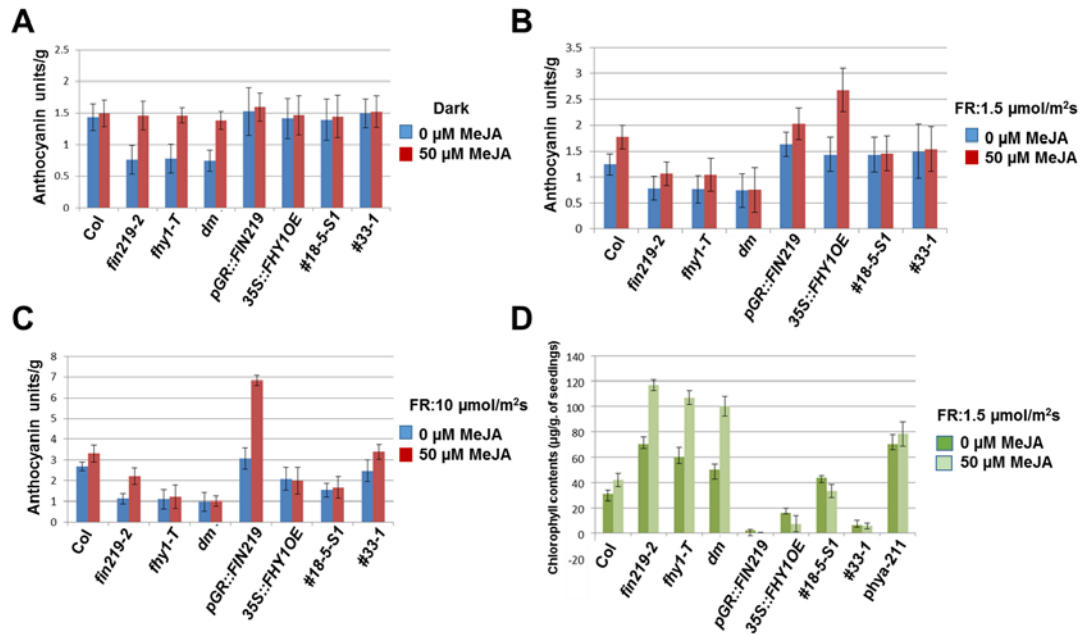




圖十、利用 RT-PCR 驗證 real-time PCR 的結果。

利用 RT-PCR 驗證前圖的結果，可發現與 real-time PCR 呈現相同的趨勢。使用生長在弱遠紅光（光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ LFR）及強遠紅光（光強度 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ HFR）三天的植株，MeJA 處理分別為 $0 \mu\text{M}$ 與 $50 \mu\text{M}$ 。以 *UBQ10* 作為 loading control。其中 *pGR::FIN219* 轉植株則使用 $1 \mu\text{M}$ dexamethasone (DEX) 誘導 *FIN219* 大量表現。

dm : *fin219-2/fhy1-T*、*#18-5-S1* : *36B3-5/fhy1-1* (*36B3-5* 為一個包含 *FIN219* 的啟動子和完整 *FIN219* 的 genomic DNA 的轉殖載體)、*#33-1* : *35S::FHY1/fin219-2*。



圖十一、各種轉殖株及突變株參與在遠紅光及 JA 訊息傳遞下葉綠素及花青素含量的檢測。*FIN219* 和 *FHY1* 可以促進花青素的累積但卻能抑制葉綠素的生合成

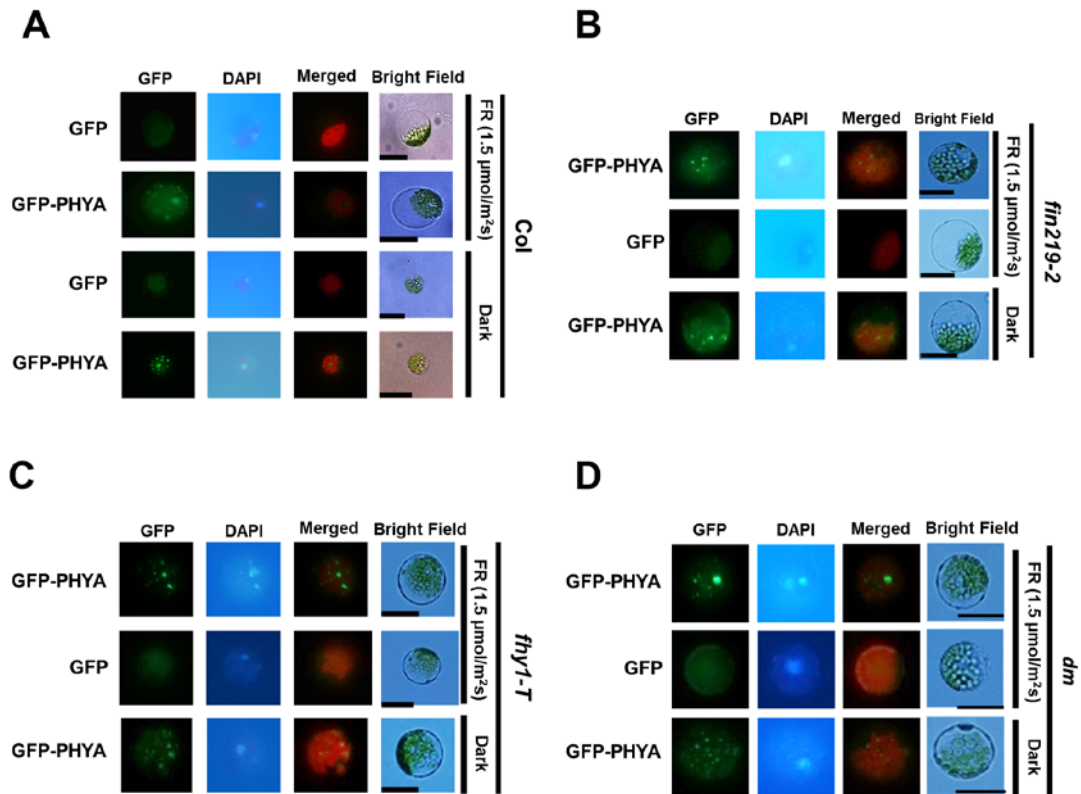
A. 檢測黑暗、外加 JA MeJA 0 μM 及 50 μM 處理下生長三天的幼苗，其花青素的含量。

B. 檢測遠紅光(光強度 1.5 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$)、外加 JA MeJA 0 μM 及 50 μM 處理下生長三天的幼苗，其花青素的含量

C. 檢測遠紅光(光強度:10 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$)、外加 JA MeJA 0 μM 及 50 μM 處理下生長三天的幼苗，其花青素的含量

D. 檢測遠紅光(光強度:1.5 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$)下生長三天後轉移至白光下生長兩天的幼苗，其葉綠素的含量。

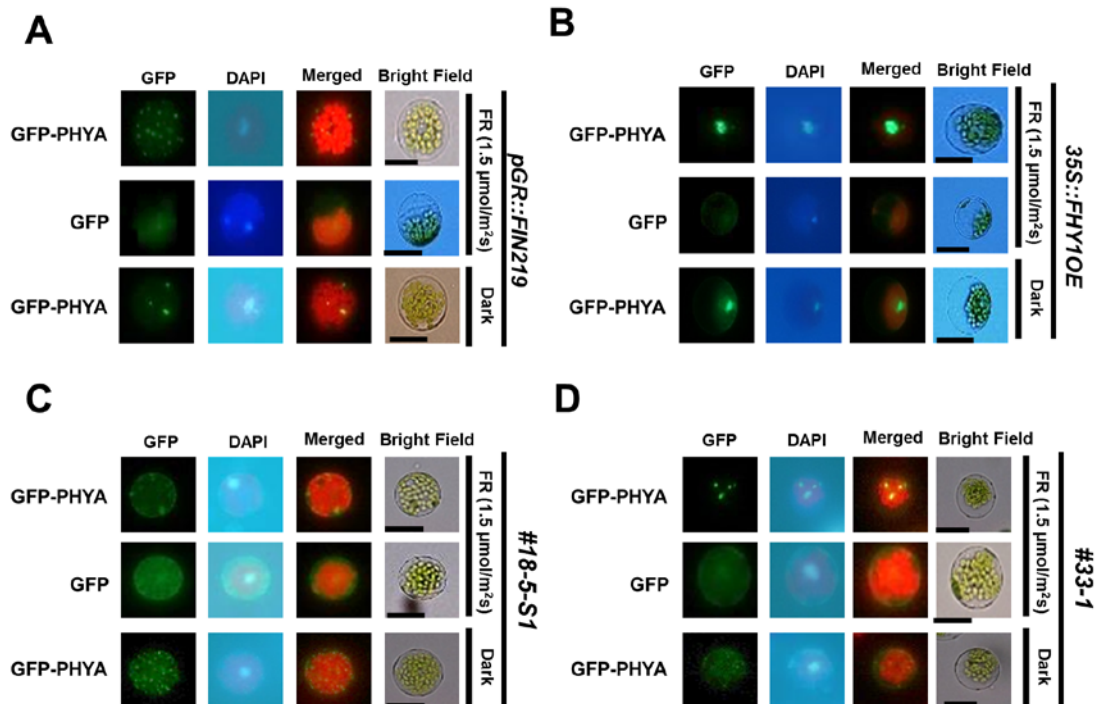
dm : *fin219-2/fhy1-T*、*#18-5-S1* : *36B3-5/fhy1-1* (36B3-5 為一個包含 *FIN219* 的啟動子和完整 *FIN219* 的 genomic DNA 的轉殖載體)、*#33-1* : *35S::FHY1/fin219-2*。



圖十二、觀察 GFP-PHYA 螢光蛋白質在野生型及 *fin219-2* 突變株、*fhy1-T* 突變株，與雙突變株的原生植體中細胞內的位置。FIN219 和 FHY1 會互相競爭 PHYA 使其在細胞內分佈產生變化

分別抽取抽取短日照生長條件下阿拉伯芥野生型及 *fin219-2* 突變株、*fhy1-T* 突變株、*dm* 雙突變株的原生植體，將 GFP-PHYA 轉入原生植體中，在黑暗中培養 16 小時，隔天分別進行 1 小時的黑暗及遠紅光(光強度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)光照處理，利用螢光顯微鏡觀察結果。圖 A 比例尺為 $50 \mu\text{m}$ ；圖 B、C、D 比例尺為 $20 \mu\text{m}$ 。

dm : *fin219-2/fhy1-T*



圖十三、觀察 GFP-PHYA 螢光蛋白質在 *pGR::FIN219* 轉殖株、*35S::FHY1OE* #2-6 轉殖株、*FIN219 OE/fhy1-1* #18-5-S1 轉殖株、*35S::FHY1/fin219-2* #33-1 轉殖株的原生質體中細胞內的位置。FIN219 和 FHY1 會互相競爭 PHYA 使其在細胞內分佈產生變化。

分別抽取短日照生長條件下，阿拉伯芥 *pGR::FIN219* 轉殖株、*35S::FHY1OE* #2-6 轉殖株、*FIN219 OE/fhy1-1* #18-5-S1 轉殖株、以及 *35S::FHY1/fin219-2* #33-1 轉殖株的原生質體，並將 GFP-PHYA 轉入其中，而 *pGR::FIN219* 轉殖株則使用 1 μM dexamethasone (DEX) 誘導 *FIN219* 大量表現，在黑暗中培養 16 小時，隔天分別進行 1 小時的黑暗及遠紅光(光強度 1.5 μmol/m²s)光照處理，利用螢光顯微鏡觀察結果。比例尺為 20 μm。

#18-5-S1 : *36B3-5/fhy1-1* (36B3-5 為一個包含 *FIN219* 的啟動子和完整 *FIN219* 的 genomic DNA 的轉殖載體)、#33-1 : *35S::FHY1/fin219-2*。

參考文獻



- Andrea Chini., Marta Boter., and Roberto Solano.** (2009). Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS Journal* **276**: 4682–4692.
- Ang, L.H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., and Deng, X.W.** (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol Cell* **1**: 213-222.
- Ballesteros, M.L., Bolle, C., Lois, L.M., Moore, J.M., Vielle-Calzada, J.P., Grossniklaus, U., and Chua, N.H.** (2001). LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes Dev* **15**: 2613-2625.
- Barnes, S.A., Nishizawa, N.K., Quaggio, R.B., Whitelam, G.C., and Chua, N.H.** (1996). Far-red light blocks greening of Arabidopsis seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell* **8**: 601-615.
- Briggs, W.R., and Christie, J.M.** (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**: 204-210.
- Bolle, C., Koncz, C., and Chua, N.H.** (2000). PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* **14**: 1269-1278.
- Buche, C., Poppe, C., Schafer, E., and Kretsch, T.** (2000). *eid1*: a new Arabidopsis mutant hypersensitive in phytochrome A-dependent high-irradiance responses. *Plant Cell* **12**: 547-558.
- Cherry, J.R., Hondred, D., Walker, J.M., Keller, J.M., Hershey, H.P., and Vierstra, R.D.** (1993). Carboxy-terminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity. *Plant Cell* **5**: 565-575.
- Chen IC, Huang IC, Liu MJ, Wang ZG, Chung SS, Hsieh HL** (2007) Glutathione S-transferase interacting with far-red insensitive 219 is involved in phytochrome A-mediated signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**: 1189–1202
- Clack, T., Mathews, S., and Sharrock, R.A.** (1994). The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* **25**: 413-427.
- Colon-Carmona, A., Chen, D.L., Yeh, K.C., and Abel, S.** (2000). Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiol* **124**, 1728-1738.

- Deng, X.W., and Quail, P.H.** (1999). Signalling in light-controlled development. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 121-129.
- Desnos, T., Puente, P., Whitelam, G.C., and Harberd, N.P.** (2001). FHY1: a phytochrome A-specific signal transducer. *Genes Dev* **15**: 2980-2990.
- Devlin, P.F., Somers, D.E., Quail, P.H., and Whitelam, G.C.** (1997). The *Brassica rapa* elongated internode (EIN) gene encodes phytochrome B. *Plant Mol Biol* **34**: 537-547.
- Fang Chen, Xiarong Shi, Liang Chen, Mingqiu Dai, Zhenzhen Zhou, Yunping Shen, Jigang Li, Gang Li, Ning Wei, and XingWang Deng.** (2012). Phosphorylation of FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 Is a Key Mechanism Defining Signaling Dynamics of Phytochrome A under Red and Far-Red Light in *Arabidopsis* **24**: 1907–1920.
- Fankhauser, C.** (2001). The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J Biol Chem* **276**: 11453-11456.
- Fankhauser, C., and Chory, J.** (1999). Light receptor kinases in plants! *Curr Biol* **9**: R123-126.
- Genoud, T., Schweizer, F., Tscheuschler, A., Debrieux, D., Casal, J.J., Schafer, E., Hiltbrunner, A., and Fankhauser, C.** (2008). FHY1 mediates nuclear import of the light-activated phytochrome A photoreceptor. *PLoS Genet* **4**: e1000143.
- Guo, H., Mockler, T., Duong, H., and Lin, C.** (2001). SUB1, an Arabidopsis Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* **291**: 487-490.
- Hare, P.D., Moller, S.G., Huang, L.F., and Chua, N.H.** (2003). LAF3, a novel factor required for normal phytochrome A signaling. *Plant Physiol* **133**: 1592-1604.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., and Schafer, E.** (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **128**: 194-200.
- Hiltbrunner, A., Viczian, A., Bury, E., Tscheuschler, A., Kircher, S., Toth, R., Honsberger, A., Nagy, F., Fankhauser, C., and Schafer, E.** (2005). Nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor requires FHY1. *Curr Biol* **15**: 2125-2130.
- Hoecker, U., Xu, Y., and Quail, P.H.** (1998). SPA1: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell* **10**: 19-33.
- Hoecker, U., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1999). SPA1, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science* **284**: 496-499.
- Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J., and Deng, X.W.** (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **16**: 1247-1259.

- Hsieh, H.L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.H., Matsui, M., Goodman, H., and Deng, X.W.** (2000). FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev* **14**: 1958-1970.
- Hudson, M., Ringli, C., Boylan, M.T., and Quail, P.H.** (1999). The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Genes Dev* **13**: 2017-2027.
- Hui Shen., Jennifer Moon and Enamul Huq .**(2005). PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in Arabidopsis. *Plant Journal* **44**: 1023–1035
- Ignacio Cerrudo., Mercedes M. Keller., Miriam D. Cargnel., Patricia V. Demkura., Mieke de Wit., Micaela S. Patitucci., Ronald Pierik., Corne M.J. Pieterse., and Carlos L. Ballare.** (2012). Low Red/Far-Red Ratios Reduce Arabidopsis Resistance to Botrytis cinerea and Jasmonate Responses via a COI1-JAZ10-Dependent, Salicylic Acid-Independent Mechanism. *Plant Physiol* **158**: 2042–2052.
- Jang, D.Y.** (2005). Investigation of functional relationship between FIN219 and FHY1 genes. NTU master thesis.
- Kendrick, R.E., and Kronenberg, G.H.M.** (1994). Photomorphogenesis in plants. 2nd ed (Dordrecht The Netherlands, Kluwer).
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schafer, E., and Nagy, F.** (1999). Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **11**: 1445-1456.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adam, E., Schafer, E., and Nagy, F.** (2002). Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* **14**: 1541-1555.
- Lapko, V.N., Jiang, X.Y., Smith, D.L., and Song, P.S.** (1997). Posttranslational modification of oat phytochrome A: phosphorylation of a specific serine in a multiple serine cluster. *Biochemistry* **36**: 10595-10599.
- Lupas, A.** (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**: 375-382.
- McMichael, R.W., Jr., and Lagarias, J.C.** (1990). Phosphopeptide mapping of Avena phytochrome phosphorylated by protein kinases in vitro. *Biochemistry* **29**: 3872-3878.
- Montgomery, B.L., and Lagarias, J.C.** (2002). Phytochrome ancestry: sensors of

bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**: 357-366.

- Nagy, F., and Schäfer, E.** (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 329-355.
- 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.
- Parks, B.M., and Quail, P.H.** (1993). hy8, a new class of arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* **5**: 39-48.
- Qin, M., Kuhn, R., Moran, S., and Quail, P.H.** (1997). Overexpressed phytochrome C has similar photosensory specificity to phytochrome B but a distinctive capacity to enhance primary leaf expansion. *Plant J* **12**: 1163-1172.
- Quail, P.H.** (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 85-93.
- Robson, P., Whitelam, G.C., and Smith, H.** (1993). Selected components of the Shade-Avoidance Syndrome Are Displayed in a normal manner in mutants of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa* deficient in Phytochrome B. *Plant Physiol* **102**: 1179-1184.
- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U., and Deng, X.W.** (2003). The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev* **17**: 2642-2647.
- Schaller, F., Schaller, A., and Stintzi, A.** (2005). Biosynthesis and Metabolism of Jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* **23**: 179-199.
- Seo, H.S., Watanabe, E., Tokutomi, S., Nagatani, A., and Chua, N.H.** (2004). Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev* **18**: 617-622.
- Shen, Y., Feng, S., Ma, L., Lin, R., Qu, L.J., Chen, Z., Wang, H., and Deng, X.W.** (2005). Arabidopsis FHY1 protein stability is regulated by light via phytochrome A and 26S proteasome. *Plant Physiol* **139**: 1234-1243.
- Shen, Y., Zhou, Z., Feng, S., Li, J., Tan-Wilson, A., Qu, L.J., Wang, H., and Deng, X.W.** (2009). Phytochrome A mediates rapid red light-induced phosphorylation of Arabidopsis FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 in a low fluence response. *Plant Cell* **21**: 494-506.
- Smith, H.** (2000). Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature* **407**: 585-591.
- Soh, M.S., Hong, S.H., Hanzawa, H., Furuya, M., and Nam, H.G.** (1998). Genetic identification of FIN2, a far red light-specific signaling component of

- Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 411-419.
- Staswick, P.E., and Tiryaki, I.** (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2117-2127.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6837-6840.
- Von Arnim, A.G., Osterlund, M.T., Kwok, S.F., and Deng, X.W.** (1997). Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **114**: 779-788.
- Wadsworth, G.J., Redinbaugh, M.G., and Scandalios, J.G.** (1988). A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. *Anal Biochem* **172**: 279-283.
- Wagner, D., Fairchild, C.D., Kuhn, R.M., and Quail, P.H.** (1996). Chromophore-bearing NH₂-terminal domains of phytochromes A and B determine their photosensory specificity and differential light lability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4011-4015.
- Wang, H., and Deng, X.W.** (2002). Arabidopsis FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. *EMBO J* **21**: 1339-1349.
- Wang, H., and Deng, X.W.** (2003). Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci* **8**: 172-178.
- Wang, J.G., Chen, C.H., Chien, C.T., and Hsieh, H.L.** (2011). FAR-RED INSENSITIVE219 modulates CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 activity via physical interaction to regulate hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **156**: 631-646.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* **100**: 681-697.
- Whitelam, G.C., Patel, S., and Devlin, P.F.** (1998). Phytochromes and photomorphogenesis in Arabidopsis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 1445-1453.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S., and Harberd, N.P.** (1993). Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* **5**: 757-768.
- Wei, N., Kwok, S.F., von Arnim, A.G., Lee, A., McNellis, T.W., Piekos, B., and Deng, X.W.** (1994). Arabidopsis COP8, COP10, and COP11 genes are involved in repression of photomorphogenic development in darkness. *Plant*

Cell **6**: 629-643.

- Xie DX., Feys BF., James S., Nieto-Rostro M., and Turner JG.**(1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. Science **280**: 1091-1094.
- Xue, R., and Zhang, B.** (2007). Increased endogenous methyl jasmonate altered leaf and root development in transgenic soybean plants. Genet Genomics **34** : 339-346.
- Yeh, K.C., and Lagarias, J.C.** (1998). Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 13976-13981.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J.** (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nat Protoc **2**: 1565-1572.
- Zeidler, M., Bolle, C., and Chua, N.H.** (2001). The phytochrome A specific signaling component PAT3 is a positive regulator of Arabidopsis photomorphogenesis. Plant Cell Physiol **42**: 1193-1200.
- Zeidler, M., Zhou, Q., Sarda, X., Yau, C.P., and Chua, N.H.** (2004). The nuclear localization signal and the C-terminal region of FHY1 are required for transmission of phytochrome A signals. Plant J **40**: 355-365.
- Zhou, Q., Hare, P.D., Yang, S.W., Zeidler, M., Huang, L.F., and Chua, N.H.** (2005). FHL is required for full phytochrome A signaling and shares overlapping functions with FHY1. Plant J **43**: 356-370.
- Zhou, Y.C., Dieterle, M., Buche, C., and Kretsch, T.** (2002). The negatively acting factors EID1 and SPA1 have distinct functions in phytochrome A-specific light signaling. Plant Physiol **128**: 1098-1108.

附錄一、實驗操作詳細流程與藥品配方



1. 阿拉伯芥種子消毒與培養

藥品：

消毒水：30%漂白水，無菌水

1% 或 0.3% Sucrose GM 培養基

步驟：

1. 新鮮種子以消毒水震盪消毒 7 分鐘，吸去消毒水，用無菌水洗滌 5 次。
將消毒後的種子撒播在培養皿上。
2. 放置於 4°C，春化處理 3 天，移至無菌操作檯內吹乾多餘的水分。
3. 若要處理不同光源，白光處理 12 小時，將其移入不同光源生長箱中。
4. 白光照射 5~7 天後，將幼苗種植於培養土中，並移至生長室內生長。

2. 阿拉伯芥 RNA 抽取及分析(RNA 藥品皆須滅菌 40 分鐘)

藥品：

Buffer A (4°C 保存)：

1 M Tris pH7.3

5 mM EDTA pH8.0

1% SDS

CI(Chloroform:isoamyl alcohol, 24:1)

Phenol, pH 4.3

6 M LiCl

2% KOAc

3 M LiCl

100% EtOH (-20°C 保存)

DEPC-H₂O

步驟:

1. 使用液態氮將植物組織以研杵及研鉢磨成粉末後，置於 1.5 ml 離心管中。
2. 加入 500 μ l (視材料多寡決定) Buffer A 震盪 30 秒，再加入 500 μ l Phenol 震盪 30 秒，以 4°C 13000 r.p.m 離心 20 分鐘，取上清液至新的離心管中。
3. 加入與上清液等體積的 Phenol，震盪 30 秒，以 4°C 13000 r.p.m 離心 20 分鐘，取上清液移至新的離心管。
4. 加入等體積的 Chloroform/isoamyl alcohol，震盪 30 秒，以 4°C 13000 r.p.m 離心 20 分鐘，取上清液移至新的離心管。
5. 加入等體積的 6 M LiCl 混合均勻，置於 -20°C 沉澱 30 分鐘或放置隔天。
6. 以 4°C 13000 r.p.m 離心 20 分鐘，倒掉上清液留下沉澱物。
7. 加入 150 μ l 3 M LiCl 清洗沉澱物，以室溫 13000 r.p.m 離心 10 分鐘。
8. 加入 150 μ l 3 M LiCl 清洗沉澱物，以室溫 13000 r.p.m 離心 10 分鐘。
9. 加入 150 μ l 2% KOAc，於 55°C 水浴槽內溶解沉澱物 10 分鐘。
10. 加入 2.5 倍體積的 100% 酒精，置於 4°C 30 分鐘使 RNA 沉澱。
12. 以 4°C 13000 r.p.m 離心 10 分鐘，倒掉上清液，用 SpeedVac 真空乾燥機約 3 分鐘使 RNA 乾燥，最後加入 50 μ l DEPC-H₂O 回溶。
13. 取 2 μ l total RNA，以 Nanodrop 檢測濃度，剩餘 RNA 置於 -80°C 冷凍保存。

DNAase 處理

藥品:

Phenol (pH 4.3) : chloroform (1:1, v/v)

RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Cat.# M6101)

DEPC-H₂O

10M NH₄OAc

100%酒精



步驟:

1. 取 15 μg total RNA 加入 DNase、DNase buffer 和 DEPC-H₂O, 總體積 100 μl 。
2. 37°C 作用 30 分鐘。
3. 加入 100 μl DEPC-H₂O 放大體積。
4. 加入 Phenol:chloroform (1:1, v/v), 震盪混合均勻, 以 4°C 13000 r. p. m. 離心 10 分鐘, 取上清液至新的離心管。
5. 加入 1/4 體積 10 M NH₄OAc、2.5 倍體積 100%酒精, 混合均勻於-20°C 冰箱靜置 30 分鐘。
6. 4°C 13000 r. p. m. 離心 20 分鐘, 去除上清液, 用真空乾燥機使 RNA 沉澱乾燥, 加入 10 μl DEPC-H₂O 回溶。
7. 取 1 μl 稀釋 200 倍檢測濃度後, 取 2 μg 跑 RNA 膠確認。

蛋白質相關實驗

一. 融合蛋白質的純化

藥品:

Ampicillin 的 LB 液體及固體培養基


1 M IPTG (isopropyl-D-thiogalactoside)

PBS 緩衝溶液

lysozyme (2mg/ml)

步驟:

1. 從培養皿中挑出單一菌落 (single colony), 接種至 8ml LB (須先加入 8 μl ampicillin), 37 °C 下培養隔夜。
2. 取 2ml 菌液, 加入 200ml LB 中, 120rpm 搖晃培養至 0. D600=0.4~0.6 之間
3. 加入濃度為 1 mM 的 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) 誘導蛋白質表現, 120rpm 三小時。

- 
5. 以 4°C，10000 rpm 離心 10 分鐘。
 6. 去除上清液，以 1/20 體積（約 25ml）PBS 溶液懸浮菌塊。
 7. 加入溶菌酶（lysozyme）
 8. 接著以超音波細胞打碎機將細菌打破。設定：以強度 3，持續打 20 秒後休息 10 秒為一回合，共重覆 20 回合。
 9. 以 4°C，13000rpm 離心 20 分鐘，收集上清液，至乾淨的離心管。
 10. 以 100°C 煮沸 5 分鐘使蛋白質變性後，進行 SDS-PAGE 電泳分離確定蛋白質有無誘導表現。
 11. 以專屬 tag 的 beads 進行純化

二. 植物蛋白質萃取

藥品：

50m M Tris pH 7.5

150mM NaCl

10mM Mg Cl₂

0.1% NP-40

1mM PMSF

100mM protease inhibitor

步驟：

1. 收取植物幼苗或者成株，以液態氮結凍。
2. 以預冷的研鉢將植物材料磨成細粉，再將粉末裝入離心管中。
3. 加入 200 μ 萃取液後，振盪 30 秒。
4. 以 4°C，13,000rpm 離心 10 分鐘後，將上清液移至新的離心管中。
5. 再以 4°C，13,000rpm 離心 10 分鐘取上清液，放在 -80°C 保存。

三. 蛋白質電泳分析

1. SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)



藥品：

1M Tris-HCl pH 6.8

1.5M Tris-HCl pH 8.8

10% SDS

TEMED

40% Acrylamide/Bis Solution, 29:1

10 % APS (Ammonium Persulfate)現配。

10% SDS

5X Running buffer (Tris-Glycine buffer)

2X SDS-PAGE 樣品緩衝液：

250 mM Tris-HCl (pH 6.8)

5% (-mercaptoethanol

4% SDS

20% glycerol

0.025% bromophenol blue

步驟：

1. 架好鑄膠台後，配置下層膠溶液(此處所用藥量為四片、10%膠為例)

H2O	15.9 ml
40% acrylamide mix	10 ml
10% SDS	0.4 ml
TEMED	0.016 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	10.0 ml
10% APS	0.4 ml

2. 當加入 10% APS 溶液開始凝固，迅速混勻將溶液倒入鑄膠台中，上層加 75%酒精覆蓋表面壓平液面，靜置 1 小時凝固。



3. 75%酒精倒掉，配製上層膠

H ₂ O	11.0 ml
40% acrylamide mix	2 ml
10% SDS	0.16 ml
TEMED	0.016 ml
1.5 M Tris (pH 6.8)	2.0 ml
10% APS	0.16 ml

4. 倒入上層膠在膠體並尚未開始凝結時就將齒梳插入定型。

5. 靜置 30 分鐘膠體凝結即可將膠片拆下使用

6. 電泳槽組裝完成後架上膠片，加入 200ml 1X running buffer。

6. 將 sample buffer 加入欲分析之蛋白質樣品，以 100°C 煮沸 8 分鐘，置於冰上冷卻後短暫離心，將樣品注入齒槽內(最大體積不宜超過 50 μ l)。

7. 接上電極，設定電壓 80 伏特 30 分鐘，接著 120 伏特 90 分鐘。

四. 西方墨點法(Western blot)

藥品:

10X Transferring buffer (pH 8.3):

30.3 g Tris (25 mM)

144 g Glycine (192 mM)

1X Transferring buffer(CAPS, 4°C 存放):

200 mM Methanol

100 ml 10X Transferring buffer

700 ml ddH₂O

10X PBS

PBST : 0.05% Tween 20 於 1X PBS 中

Blocking buffer(現配, 4°C 存放):

脫脂奶粉 5 g，PBST 100 ml

一次抗體：

二次抗體：視一次抗體決定使用種類

步驟：

1. 裁好與膠片大小一致的濾紙 2 張，PVDF 轉印膜 1 張。
2. 將膠片、濾紙及轉印膜浸泡在 CAPS 中潤濕(轉印膜須先以 100% methanol 潤濕，才可以放到 CAPS 中)。
3. 倒些許 CAPS 於電極板上。
4. 以鑷子夾取濾紙整齊鋪平在電極板上，再將轉印膜放在濾紙上。
5. 將膠片放在轉印膜上，再蓋上濾紙。
6. 將另一電極板蓋上，接上電源 150 伏特(V)400 毫安培(mA)轉印 1.5 小時。
7. 取出膜室溫浸泡在 blocking buffer 中搖晃 1 小時。
8. 倒掉 blocking buffer，加入 5 ml 新的 blocking buffer，再加入一次抗體，於 4°C 冷房搖晃反應至隔夜。
9. 倒掉 blocking buffer，用 PBST 清洗膜 3 次，每次搖晃 5 分鐘。
10. 倒掉 PBST，加入 5 ml blocking buffer，再加入二次抗體，於室溫搖晃反應一小時。
11. 倒掉 blocking buffer，用 PBST 清洗膜 3~5 次，每次搖晃 5 分鐘。
12. 將溶液倒去，加入呈色劑並進行影像分析，利用 LAS-3000 冷光偵測訊號。

五. Pull-down 實驗

藥品：

Binding buffer:

50 mM Tris (pH=7.5)

100 mM NaCl

0.2% glycerol





0.6% Triton X-100

0.5 mM β -mercaptoethanol

Washing buffer:

50 mM Tris (pH=7.5)

100 mM NaCl

0.6% Triton X-100

步驟:

1. 取 1mL 的 binding buffer，放入純化好帶有 tag 的蛋白質各取 5 μ g，放在 4 $^{\circ}$ C 冷房內使其均勻混合 1 小時。
2. 放入欲檢測 tag 之 beads 50 μ l，再度於冷房中混合 1 小時。
3. 利用小台離心機離心後後取上清液，並以 washing buffer 反覆清洗五次
4. 加入 2X SDS-PAGE 樣品緩衝液，以 100 $^{\circ}$ C 煮沸 8 分鐘，置於冰上冷卻後短暫離心，利用 SDS-PAGE 和西方點墨法進行之後的分析。

六. 共免疫沉澱法 (Coimmunoprecipitation Assay co-IP)

藥品:

Grinding buffer:

50 mM Tris-HCL (pH=5.7)

150 mM NaCl

10 mM MgCl₂

0.1% bovine serum albumin

0.1% Nonidet P-40

1 mM phenylemethanesulfonyl fluoride

1X Protease Inhibitor Cocktail

40 μ M MG132

步驟:

1. 取 1ml grinding buffer 並放入 20 μ l beads 與抗體 10 μ l 混合搖勻
2. 放入 2mg 植物總蛋白，並放置於冷房 4°C 搖四個小時
3. 利用小台離心機離心後後取上清液，重覆清洗五次
4. 加入 2X SDS-PAGE 樣品緩衝液，以 100°C 煮沸 8 分鐘，置於冰上冷卻後短暫離心，利用 SDS-PAGE 和西方點墨法進行之後的分析。



阿拉伯芥原生質體分離及轉殖

使用種植於短日照(10 小時光照 14 小時黑暗)環境下，尚未抽花芽的植株。

藥品(皆須經過 filter 過濾處理):

0.2 M MES (pH=5.7)

0.8 M mannitol (現配)

0.1 M Glucose

5 M NaCl

1 M CaCl₂· 2H₂O

2 M KCl

2 M MgCl₂· 6H₂O

Enzyme solution (現配):

1% Cellulase R10

0.25% Macerozyme R10

0.4 M Mannitol

20 mM KCl

20 mM MES (pH=5.7)

加熱至 55°C 10 分鐘，冷卻至室溫後再加入 10 mM CaCl₂

W5 solution (現配)

154 mM NaCl

125 mM CaCl₂



5 mM KCl

5 mM Glucose

2 mM MES (pH=5.7)

MMg solution (現配)

0.4 mM Mannitol

15 mM MgCl₂

4 mM MES (pH=5.7)

PEG solution (現配 難溶可利用隔水加熱幫助溶解)

40% PEG 4000

0.1 mM CaCl₂

0.2 mM Mannitol

步驟:

1. 配制藥品(現配)。
2. 將 enzyme solution 放入培養皿中(15 ml)。
3. 選取較健康葉片切下後，以刀片將葉片頭尾去除，葉身切成眼睫毛細絲狀放入 enzyme solution(葉背朝下)，以 50 r.p.m. 搖晃 3-5 小時。
4. 使用 mira-cross 過濾原生質體溶液(先用 W5 solution 潤濕)，平均分裝至圓底離心管，低速離心機 100 g 離心 3 分鐘。
5. 抽去上清液，以 W5 5ml 清洗，放冰上半小時後，低速離心機 100 g 離心 3 分鐘再次抽去上清液
6. 以適當 MMg solution 回溶，取 10 μ l 至血球計數器上計算原生質體的數目。使原生質體溶液濃度為 $3 \times 10^5 / 200 \mu$ l。
7. 將 10 μ g plasmid DNA、200 μ l 原生質體及 200 μ l、40% PEG solution 混合均勻(搖至無絲狀物)，靜置 10 分鐘。
9. 依序加入 200 μ l、400 μ l、600 μ l W5 solution 並依次搖勻，100 g 離心

3 分鐘，去上清液。

10. 以 1 ml W5 solution 回溶，加至六孔盤，以所需光照環境下培養超過 16 小時，以螢光顯微鏡觀察實驗結果。



附錄二、PCR 相關資訊



RT-PCR primer

Primer name	Primer sequence
UBQ10(RT-PCR)F	GATCTTTGCCGAAAAGAATTGGAGGATGGT
UBQ10(RT-PCR)R	CGACTTGTCAATTAGAAAAGAAAGAGATAACAGG
FIN219(RT-PCR)F	CTCGAGTTTATTCCTTTCACTGATGAATT
FIN219(RT-PCR)R	CTCGAGGTCATGGCTCACAAGAGG
FHY1(RT-PCR)F	AGCGTCGACATGATAGTTGCTGTGGAATCTC
FHY1(RT-PCR)R	AGCGGATCCACATCATGAGTGTAGAAAAGTAC
MYC2(RT-PCR)F	GATCTCCGGTGGTGTGCTC
MYC2(RT-PCR)R	GACGGGTCGTTCTCACCTTG
PIF1(RT-PCR)F	GCCGGTGAGGAACTTCATGA
PIF1(RT-PCR)R	GCGCTAGGACTTACCTGCGT
PIF3(RT-PCR)F	ATTCTCCACCACAAGCAAATC
PIF3(RT-PCR)R	CACGCAAGAAATCAGAGCAATATCC
HY5(RT-PCR)F	CTGATGCAAGCCTTTGATCTCCT
HY5(RT-PCR)R	ATTGACAATATTAGCTCTCACATCCC
VSP1(RT-PCR)F	GCATCTCATACTCAAGCCAAACG
VSP1(RT-PCR)R	GTGGTGCCAAAACGGCTACA
JAZ1(RT-PCR) F	CACCCTCAAGCCGTACCAAG
JAZ1(RT-PCR) R	GCAAGGGGATTTAGACAGGCG
JAZ2 F	GCCGAGTGTGGGACTTCTC
JAZ2 R	GGCTGACGTGAACCTCCATT
JAZ3 F	TCGTGCCTCTGTGATTCTTC

JAZ3 R	CCGTTTGTGCTACTTCCAGCTT
CHS(RT-PCR) F	CTGATGGACCTGCAGGCATCTTG
CHS(RT-PCR) R	GTGTCGCCCTCATCTTCTCTTCCTT
CHS F	ACGACAGGAGAAGGGTTGGA
CHS R	GAGAGGAACGCTGTGCAAGAC
MYC2 F	GGGCGTACTGGTGGTTA
MYC2 R	TCCCGAGTTCCAAGAGGTTTT
VSP1 F	CTACGAAGACTTTCTCCTATC
VSP1 R	AAGTTGAGATATCGGAAGAG

