

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

博士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

水稻蔗糖合成酶 R<sub>SuS1</sub> 之研究：

受糖調控之基因表現與細胞內定位

Studies on Rice Sucrose Synthase 1:

Sugar-Modulated Gene Expression and

Subcellular Localization

The seal of National Taiwan University is a circular emblem. It features a central design with a bell and a book, surrounded by the university's name in Chinese characters: '國立臺灣大學' at the top and '愛·學·勵·品' at the bottom. The name '張睿哲' is printed in the center of the seal.

張睿哲

Jui-Che Chang

指導教授：王愛玉 博士

Advisor: Ai-Yu Wu, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

## 目 錄

目錄	I
縮寫表	VII
中文摘要	IX
Abstract	X

**第一章 研究背景 1**

1. 醣類的來源與運輸	1
2. 與糖相關之訊息傳導途徑	1
2.1 糖在調節基因表現的角色	1
2.2 糖訊息傳導途徑	2
2.3 糖與其它因子訊息傳導途徑的關聯	3
3. 受糖調控基因之調控因子	5
3.1 Sugar-responsive elements	5
3.2 <i>Trans</i> -acting factors	5
3.2.1 SPF1, STK, ASML1, SUSIBA2 與 TERF	5
3.2.2. Pura	6
4. 酵素在催化活性外的其他功能	8
4.1 Hexokinase	9
4.2 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	10
4.3 Enolase 1	10
4.4 Lactate dehydrogenase	11
5. 本論文之研究基礎與目的	12
5.1 蔗糖合成酶	12
5.2 蔗糖合成酶異構酶	12
5.3 糖濃度對蔗糖合成酶基因表現之影響	13
5.4 蔗糖合成酶之細胞內定位	14
5.5 本研究室在蔗糖合成酶之研究成果	14

5.6 本論文研究之緣起與目的	16
5.7 本論文之研究主題	17
5.7.1. 建立 <i>RSus1</i> 基因表現之調控機制	17
5.7.1.1 尋找 <i>RSus1</i> 基因啓動子上游可能與糖調控有關的 <i>cis</i> -acting elements	17
5.7.1.2 尋找與 <i>cis</i> -acting elements 作用的蛋白質	18
5.7.1.3 <i>Trans</i> -acting factors 之基因選殖與功能分析	18
5.7.2. 探討 <i>RSuS1</i> 是否進入細胞核	18

## 第二章 材料與方法 20

### 1. 實驗材料 20

1.1 水稻懸浮培養細胞及種子	20
1.2 洋蔥	20
1.3 質體	20
1.4 菌種	21
1.5 藥品	22
1.5.1 一般化學藥品	22
1.5.2 放射性藥品	22
1.6 核酸剪切及修飾酵素	22



### 2. 實驗儀器設備 22

2.1 核酸電泳	22
2.2 蛋白質電泳	22
2.2.1 迷你電泳系統	22
2.2.2 DNA-蛋白質複合體電泳系統	22
2.3 離心機	23
2.4 其他儀器	23

### 3. 實驗方法 24

3.1 水稻懸浮培養細胞之培養	24
-----------------	----

3.1.1	小量培養	24
3.1.2	不同糖類及蛋白質合成抑制劑 cycloheximide 之處理	24
3.2	DNA 之抽取、擴增與分析	24
3.2.1	質體 DNA 之小量分離	24
3.2.2	聚合酶連鎖反應	25
3.2.3	DNA 之限制酶切割	25
3.2.4	DNA 瓊脂糖膠體電泳法	26
3.2.5	DNA 片段之分離與純化	26
3.2.6	DNA 接合反應	27
3.3	重組質體之建構	27
3.4	質體之轉形	29
3.4.1	Competent cells 之製備 (氯化鈣法)	29
3.4.2	大腸桿菌之轉形	30
3.5	RNA 之抽取與分析	30
3.5.1	Total RNA 抽取	30
3.5.2	RNA 甲醛瓊脂糖膠體電泳	31
3.6	DNA 探針之製備	31
3.6.1	DNA 探針片段之合成	31
3.6.2	DNA 探針片段之標幟	32
3.6.3	DNA 探針片段之純化	32
3.7	DNA-蛋白質交互作用之分析	33
3.7.1	核蛋白質之抽取與分析	33
3.7.1.1	核蛋白質之抽取	33
3.7.1.2	免疫共沉澱法	34
3.7.1.3	以 Percoll 梯度超高速離心進行細胞核純化及核蛋白質之抽取	34
3.7.1.4	蛋白質定量	35
3.7.1.5	蛋白質膠體電泳	35

3.7.1.6 蛋白質染色	36
3.7.1.7 蛋白質轉印	36
3.7.1.8 免疫呈色法	36
3.7.2 DNA 競爭片段之合成	37
3.7.3 膠體電泳遲滯分析法	39
3.7.4 DNA 親和膠體層析法	40
3.7.5 Southwestern 分析	40
3.7.6 蛋白質身份鑑定	41
3.8 <i>OsPura</i> cDNA 之選殖	41
3.8.1 反轉錄反應	41
3.8.2 <i>OsPura</i> cDNA 之擴增	42
3.9 重組 <i>OsPura</i> 蛋白質之表現及純化	42
3.9.1 表現質體建構	43
3.9.2 小量培養	43
3.9.3 親和膠體層析法	43
3.10 <i>OsPura</i> 之 real-time RT-PCR 分析	44
3.11 粒子槍基因轉殖	45
3.11.1 植物材料之準備	46
3.11.2 金粒子之製作	46
3.11.3 具 DNA 覆著之金粒子製備	46
3.11.4 粒子槍操作	46
3.10.5 螢光顯微鏡觀察	47
3.12 水稻原生質體之短暫表現與免疫定位分析	48
3.12.1 原生質體之製備	48
3.12.2 PEG 轉形法	48
3.12.3 Co-transformation assay	49
3.12.4 細胞免疫定位分析	51

## 第三章 結果與討論 52

1. 核蛋白質與 *RSuS1* 啟動子上蔗糖調控區域之交互作用 52
  - 1.1 DNA 片段 A-3 與核蛋白質結合之情形 52
  - 1.2 DNA 片段 A-3-2 序列之分析 53
  - 1.3 與 DNA 片段 A-3-2 序列結合蛋白質之純化 53
  - 1.4 *OsPura* cDNA 之選殖與 *OsPura* 蛋白質結構模擬 56
  - 1.5 重組 *OsPura* 蛋白質之表現、純化與 DNA 結合能力之探討 57
  - 1.6 利用水稻原生質體進行 transactivation 分析 59
  - 1.7 以 real-time RT-PCR 探討 *OsPura* 基因是否可受蔗糖誘導 59
  - 1.8 討論 60
2. 水稻蔗糖合成酶在細胞中的定位 64
  - 2.1 核蛋白質之抽取與檢定 64
    - 2.1.1 初步鑑定位於細胞質及細胞核之 *RSuS* 蛋白質 64
    - 2.1.2 Percoll 梯度法純化核蛋白質 65
  - 2.2 *sGFP-RSuS1* 融合蛋白質在細胞中的定位 65
    - 2.2.1 洋蔥表皮細胞表現之 *sGFP-RSuS1* 融合蛋白質 65
    - 2.2.2 洋蔥表皮細胞表現之 *sGFP-RSuS1* 縮減融合蛋白質 66
    - 2.2.3 水稻原生質體系統表現 *GFP-RSuS1* 融合蛋白質 66
  - 2.3 *RSuS* 蛋白質之細胞內免疫染色 67
  - 2.4 分析細胞質與細胞核之 *RSuS* 蛋白質 67
    - 2.4.1 免疫沉澱法純化 *RSuS* 蛋白質 67
    - 2.4.2 細胞核 *RSuS* 蛋白質之角色 68
  - 2.5 討論 68

## 第四章 結論與未來研究方向 71

1. 結論 71
2. 未來研究方向 72
  - 2.1 OsPura $\alpha$  之相關研究 72
  - 2.2 RSuS1 可能扮演的角色 72
    - 2.2.1 與 RSuS 具交互作用的核蛋白質 73
    - 2.2.2 RSuS 可能參與的調控角色 73

## 第五章 參考文獻 74

圖表 87

附圖 127



## 縮寫表

縮寫	全名
ABA	abscisic acid
Amp	ampicillin
ADP	adenosine 5'-diphosphate
ADPG	adenosine 5'-diphosphoglucose
APS	ammonium persulfate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CBR	Coomassie Brilliant Blue R
cDNA	complementary DNA
CHX	cycloheximide
CI	chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1
2-4 D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
DEPC	diethylpyrocarbonate
dNTP	deoxynucleoside 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EC	enzyme commission
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
EtBr	ethidium bromide
GUS	$\beta$ -glucuronidase
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HXK	hexokinase
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IPTG	isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside



kb	kelobase pair
kDa	kelo Dalton
4-MU	4-methylumbelliferone
4-MUG	4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NOSter	nopaline synthase terminator
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCI	phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PEG	polyethylene glycol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
psi	pounds/square inch
PVDF	polyvinylidene fluoride
RNA	ribonucleic acid
RSuS	rice sucrose synthase
S	Svedberg
SDS	sodium dodecyl sulfate
sGFP	synthetic green fluorescent protein
<i>Sh</i>	<i>shrunk</i>
SNF1	sucrose non-fermenting 1
SnRK1	SNF1-related kinase
SURE	sucrose-responsive element
TLC	thin-layer chromatography
TR	tandem repeat
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
UDP	uridine 5'-diphosphate
UDPG	uridine 5'-diphosphoglucose

## 中文摘要

蔗糖合成酶催化蔗糖與 UDP 形成果糖與 UDPG 的可逆反應。水稻中有至少六種蔗糖合成酶基因，其中 *RSus1* 的表現在轉錄層次上會受蔗糖誘導。爲了瞭解 *RSus1* 基因表現受蔗糖調控的機制，本研究以水稻懸浮培養細胞 (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) 爲材料，探討細胞以蔗糖或甘露醇處理後所抽取得之核蛋白質，是否與 *RSus1* 基因 5' 端的調控區域之間有交互作用。由電泳遲滯分析的結果得知，主要的蛋白質結合區域位於 *RSus1* 之啓動子轉錄起始點上游 -1045 ~ -1007 (命名爲 A-3-2)。A-3-2 序列中富含 purine，且有四個 GCGGCG elements。我們從水稻懸浮培養細胞中，純化出一個可直接與 A-3-2 專一結合的蛋白質。其屬於 purine-rich DNA 結合蛋白質，將之命名爲 OsPura。OsPura 與阿拉伯芥 Pura-1 之蛋白質序列同質性達 73%，且其預測之蛋白質結構與果蠅 Pura 相似。利用大腸桿菌表現重組 OsPura 蛋白質後，進一步以膠體電泳遲滯分析，結果顯示重組 OsPura 蛋白質可與 DNA 片段 A-3-2 產生交互作用。此外，將兩重覆之 A-3-2 片段接於 CaMV 35S minimal 啓動子前端，並對水稻懸浮培養細胞進行轉形。結果顯示，細胞在蔗糖誘存在下，OsPura 可增強報導基因 *GUS* 之表現。以蔗糖培養的細胞中，OsPura 與 A-3-2 間有較佳的結合；然而，*OsPura* mRNA 之累積量卻不受蔗糖存在與否而影響。由這部份的研究結果得知，OsPura 參與 *RSus1* 基因受蔗糖誘導的調控，但可能還需有其他蛋白質共同參與。

本論文第二部份的研究是探討 RSuS1 蛋白質在細胞中的定位。以西方轉印分析法及免疫共沉澱法，偵測出細胞質與細胞核中皆存在 RSuS。以洋蔥表皮細胞與水稻原生質體進行 sGFP-RSuS 融合蛋白質短暫表現分析，以及對水稻原生質體進行免疫定位的實驗結果，進一步證實 RSuS1 可以進入細胞核中。此外，我們發現磷酸化修飾，並不會影響 RSuS 於細胞質或細胞核的分布。另一方面，利用 DNA 親和層析法純化 A-3-2 結合蛋白質時，發現 RSuS 可能存於其中。因此，推測 RSuS 可能參與調控 *RSus1* 基因表現，但仍需進一步的研究。

關鍵詞：電泳遲滯分析、啓動子、蔗糖誘導表現、免疫共沉澱法、洋蔥表皮細胞、水稻原生質體

## Abstract

Sucrose synthase catalyzes the reversible conversion of sucrose and UDP into fructose and UDPG. The enzyme is encoded by at least six differentially expressed genes in rice. Among the six genes, the *RSus1* gene is transcriptionally induced by sucrose. To gain insight into the mechanisms underlying the sucrose-mediated regulation of *RSus1* expression, the interactions between the 5' regulatory region of *RSus1* and the nuclear proteins, which were isolated from suspension-cultured cells of rice (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) under sucrose and mannitol treatments, were investigated. The results of electrophoresis mobility shift assay suggested that the major protein-binding region was between -1045 bp and -1007 bp upstream the transcription initiation site of *RSus1*. This region, designated A-3-2, was rich in purine bases and contained four GCGGCG-repeat elements. A protein that specifically and directly interacted with A-3-2 was isolated from the suspension-cultured cells of rice and was subsequently identified as a purine-rich DNA binding protein. The amino acid sequence of this protein, OsPura, exhibited 73% identity with the Arabidopsis Pura-1 protein, and its modeled structure resembled the structure of Pura in *Drosophila*. Recombinant OsPura expressed and purified from *E. coli* was demonstrated to have DNA-binding activity and to interact with A-3-2 specifically. Moreover, OsPura was able to enhance sucrose-induced expression of the  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) reporter gene, which was transcriptionally fused to two copies of a DNA fragment containing A-3-2 and the CaMV 35S minimal promoter, *in vivo*. The level of OsPura bound to A-3-2 was higher in cells cultured in the presence of sucrose; however, the level of *OsPura* mRNA in cells was not affected by sucrose. The results of this study demonstrate that OsPura participates in the regulation of *RSus1* expression in response to sucrose; nevertheless, it may require other partner proteins for full function

In the second part of this study, I investigated the subcellular localization of RSuS proteins. The proteins were detected in both the cytoplasm and the nucleus by using immunoprecipitation and western analysis. The results of transient expression of sGFP-RSuS1 fusion protein in the onion epidermal cells and in the protoplasts of rice cells, and immunolocalization analysis of RSuS proteins in rice cells further confirmed the presence of RSuS proteins in nuclei. Moreover, phosphorylation of RSuS proteins did not affect their distributions in cytosol and nuclei. Presence of

RSuS in the fraction of A-3-2-binding proteins, which were purified by DNA-affinity chromatography, suggested that RSuS may participate in the modulation of *RSus1* gene expression; however, it requires further investigation.

Key words : electrophoresis mobility shift assay, promoter, sucrose-induced, immunoprecipitation, onion epidermal cells, protoplasts of rice cells



# 第一章 研究背景

## 1. 醣類的來源與運輸

蔗糖在高等植物的合成，主要是藉由成熟的葉進行光合作用，固定二氧化碳而產生。藉由光合作用合成的蔗糖，除了提供葉部本身的需求之外，也經由韌皮部 (phloem) 運送至一些積貯器官 (sink organs, 如根、果實、種子等儲存性器官) 以提供能量及碳骨架的來源。蔗糖從來源組織送到積貯組織的過程會受到高度的調節。當積貯組織對糖的需求高時，葉中光合作用會加速進行，以滿足需求；相反的，當積貯組織對糖的需求降低，來源組織中糖的生產便會受到抑制 (Godt *et al.*, 1995; Koch, 1996; Rolland *et al.*, 2006; Smith and Stitt, 2007)。

## 2. 與糖相關之訊息傳導途徑

### 2.1 糖在調節基因表現的角色

糖除了提供能量及碳骨架外，也可扮演訊息分子及調節的角色，如蔗糖或蔗糖經分解後之單醣 (葡萄糖，果糖)，會因濃度不同而影響不同基因表現，進而直接或間接影響植物體面對環境逆境的適應、細胞分化、光合作用或開花時間點決定等 (Ramon *et al.*, 2008; and references therein)。其中與植物多醣類合成、貯存、分解或蔗糖合成及代謝相關酵素的基因，其表現大多會受到蔗糖或可代謝糖的誘導或抑制，例如：胡蘿蔔 (*Daucus carota*) 的蔗糖轉化酶 (invertase) (Sturm *et al.*, 1995)，馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) (Salanoubat and Belliard, 1989; Fu *et al.*, 1995) 和水稻 (*Oryza sativa*) (Karrer and Rodriguez, 1992; Huang *et al.*, 1996; Liao and Wang, 2003) 的蔗糖合成酶 (sucrose synthase)，馬鈴薯 (Müller-Röber *et al.*, 1990) 和阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) (Lunn *et al.*, 2006) 的 ADPG 焦磷解酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase)、結合性澱粉合成酶 (granule-bound starch synthase) (Visser *et al.*, 1991)、澱粉磷解酶

(starch phosphorylase) (St. Pierre and Brisson, 1995) 及阿拉伯芥的  $\beta$ -澱粉酶 ( $\beta$ -amylase) (Mita *et al.*, 1995) 等酵素之基因表現都會受到糖之誘導表現；而水稻懸浮細胞 (suspension cells) 或胚中的  $\alpha$ -澱粉酶 ( $\alpha$ -amylase) (Yu *et al.*, 1991, 1996)、藜 (*Chenopodium rubrum*) 葉片中的澱粉磷解酶 (Krapp and Stitt, 1994)、玉米蔗糖合成酶異構基因 *Sh1* (Koch *et al.*, 1992) 及蔗糖轉化酶之異構基因 (Koch *et al.*, 1995) 等則受糖抑制基因表現。

## 2.2 糖訊息傳導途徑

糖影響基因表現的整個過程可分為：糖感應 (sugar sensing)、訊息傳導 (signal transduction) 及最後的目標基因表現 (target gene expression)。糖引發訊息傳導方面所扮演的角色與植物荷爾蒙類似，而差別在於植物荷爾蒙所需的濃度通常在 nM- $\mu$ M 即可發揮作用，而糖的濃度卻要達到 mM 才能夠產生效應。植物對糖的感應可能開始於糖分子本身與感應器 (sensor) 之間的交互作用，而已知感應途徑包括六碳糖激酶 (hexokinase, HK) 之感應系統 (hexokinase-dependent pathway)、六碳糖膜感應器 (membrane sensors) 之感應系統 (hexose-dependent but hexokinase-independent pathway) 及蔗糖專一性之感應系統 (sucrose-dependent pathway) (Smeekens and Rook, 1997; Smeekens, 1998; Gibson, 2000; Koch, *et al.*, 2000; Smeekens, 2000; Ho *et al.*, 2001; Ramon *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2009)。

糖感應後的訊息傳導，可藉由一些分子來負責訊息的傳導，例如代謝產物 (例如丙酮酸) (Ho *et al.*, 2001)、激酶 (kinases)、去磷酸酶 (phosphatases)、鈣離子濃度、攜鈣素 (calmodulin) 等 (Koch, 1996; Yu, 1999; Gibson, 2000; Koch *et al.*, 2000; Smeekens, 2000)，藉由這些分子參與之一連串的訊息傳導，進而調控目標基因的表現。

## 2.3 糖與其它因子訊息傳導途徑的關聯

隨著阿拉伯芥基因體學的進展，使研究學者有更多的資訊，許多突變株也被篩選出來。而對於以突變株來進行糖訊息傳導的研究，所採取的主要篩選策略主要可分為：(1) 於阿拉伯芥幼苗生長及發育時期外加高濃度糖的處理，來篩選生長不受影響及受影響的突變株。例如針對 *gin* (glucose insensitive), *sis* (sugar insensitive) 及 *sig* (sucrose insensitive growth) 等，這類 sugar insensitive 突變株可正常生長在高於正常糖濃度下的培養基；反之 *glo* (glucose oversensitive), *gss* (glucose supersensitive), *sss* (sucrose supersensitive) 等，這些屬於 sugar hypersensitive 突變株，則會造成植株生長停止。(2) 將可受糖誘導或抑制的基因啓動子接上報導基因，轉殖至不同突變株中後，以報導基因所產生的正或負反應對突變株進行篩選。另外，將植株經限糖後再以蔗糖處理，利用微陣列的分析來觀察其轉錄體的改變，此外，在蛋白質層次上也觀察到某些酵素活性及代謝受到波動 (Osuna *et al.*, 2007)。

藉由這些突變株的研究，使得我們對與糖相關訊息傳導途徑有進一步的瞭解，然而卻還有絕大部分之分子參與機制仍然未知。儘管如此，卻也發現糖訊息傳遞途徑不僅是單純只與糖分子有關，也牽連了其它植物分子的訊息傳遞，形成複雜的訊息傳遞網絡。經由研究的歸納，其可能與植物荷爾蒙、環境刺激及代謝作用等訊息傳遞途徑間，有密不可分的交集 (Ramon *et al.*, 2008; Hanson and Smeekens, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Smeekens *et al.*, 2010; Van den ende *et al.*, 2010)。

上述這些現象也說明了早期所發現一些非醣類代謝相關基因，其基因表現會受到糖調控的可能原因。如馬鈴薯塊莖中的貯存性蛋白質 patatin (Rocha-Sosa *et al.*, 1989; Wenzler *et al.*, 1989)、甘藷 (*Ipomoea batatas*) 塊根中主要的兩種貯存性蛋白質 sporamin (Hattori *et al.*, 1991)、大豆中屬於貯存性蛋白質的 lipoygenase (Mason *et al.*, 1992) 等也會受到糖濃度改變而影響基因表

現。此外，一些與植物防禦相關的基因，如：proteinase inhibitor II (Johnson and Ryan, 1990; Kim *et al.*, 1991)、chalcone synthase (Tsukaya *et al.*, 1991)、hrp (hypersensitive reaction and pathogenicity) 相關基因 (Schulte and Bonas, 1992)、lipoxygenase (Johnson and Ryan, 1990; Sadka *et al.*, 1994)、pathogenesis-related (PR) 基因 (Herbers *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 2000) 及 dark-inducible (*DIN*) 基因 (Fujiki *et al.*, 2001) 等其基因表現皆會受到糖的誘導。

近年來的研究發現阿拉伯芥中與胺基酸代謝相關的 *asparagine synthetase1* 與 *proline dehydrogenase2* 基因會因蔗糖的存在抑制了轉錄因子 *bZIP11* 基因的轉譯，進而抑制其基因表現 (Hanson *et al.*, 2008)。近年來也發現，在阿拉伯芥中發現與酵母菌中 sucrose non-fermenting 1 (SNF1) 蛋白質激酶同源的 KIN10/11，其為連結不同來源之訊息傳導的主要樞紐 (Baena-Gonzalez, *et al.*, 2007; Baena-Gonzalez and Sheen, 2008)，隨後也證實 glucose 與 ABA 間過敏反應的協同關係 (Hanson *et al.*, 2009)。阿拉伯芥中一些花青素生合成的相關基因可受糖誘導，ABA 與茉莉酸會增進基因表現，而吉貝素則會抑制其受糖誘導 (Loreti *et al.*, 2008)。在水稻中也發現 calcineurin B-like interacting protein kinase 15 (CIPK15)，為厭氧與缺糖環境下訊息傳導途徑的連結者 (Lee, *et al.*, 2009)。在阿拉伯芥 sugar-insensitive (*sis3*) 突變株中發現與蛋白質泛素化降解相關的 RING E3 ligase 也可能連結與糖相關的訊息途徑 (Vierstra, 2009; Huang *et al.*, 2010)。

釐清植物細胞內所有的訊息傳導途徑是植物生化與生理學者的主要目標，藉由蛋白質在細胞內定位的資訊、蛋白質複合體的分析、蛋白質間交互作用、轉譯後修飾作用與研究蛋白質活性和穩定性等，這些大量蛋白質體資料庫的建立，可造就我們對於細胞內分子傳導機制的了解。此外，DNA 與 RNA 資料庫的進展，及電腦分析工具的強化，將幫助我們預測不同訊息傳導分子的角色定義。整合各方面的資訊，將幫助我們闡明現今持續發現的這些功能性基



因，當然這些必須以現有或設計新的突變株來達成目標 (Sheen, 2010)。

### 3. 受糖調控基因之調控因子

#### 3.1 Sugar-responsive elements

以 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 軟體搜尋的結果，發現有至少五種不同形式的植物糖調控相關之 *cis*-acting elements 被提出，包括馬鈴薯 *patatin* 基因啓動子上之 SURE (sugar-responsive element)(Grierson *et al.*, 1994)、甘藷 *sporamin* 與  $\beta$ -*amylase* 基因啓動子上之 SP8 (Ishiguro and Nakamura, 1994; Sun, *et al.*, 2003)、甘藷  $\beta$ -*amylase* 基因啓動子上之 TGGACGG (Maeo *et al.*, 2001; Masaki *et al.*, 2005)、G-box (Giuliano *et al.*, 1988) 及 B-box (Grierson *et al.*, 1994; Zourelidou *et al.*, 2002) elements 等。其中 G-box (Giuliano *et al.*, 1988) 除了爲 sugar-responsive element 外，也可藉由 PIF3 (Martinez-Garcia *et al.*, 2000) 及 HY5 (Chattopadhyay *et al.*, 1998) 兩種轉錄因子來調控 phytochrome-mediated 相關基因的表現。此外在 1993 年，由 Pla 等人所提出的 ABA-responsive element (CCACGTGG) 與 G-box (CACGTG) 的序列非常相似。再者，甘藷  $\beta$ -*amylase* 基因亦可由 ABA 所誘導表現 (Ohto *et al.*, 1992)，及菸草中的  $\beta$ -*phaseolin* 基因除受 ABA 誘導表現外亦可受外加的蔗糖所誘導 (Bustos *et al.*, 1998)。

#### 3.2 *Trans*-acting factors

##### 3.2.1 SPF1, STK, ASML1, SUSIBA2 與 TERF

由於與糖調控之 *cis*-elements 所知不如與荷爾蒙相關的 *cis*-elements 多，以致在搜尋與糖調控基因表現的 *trans*-acting factors 方面，相關的研究並不多，SPF1 及 STK 兩類蛋白質爲最早被提出者。SPF1 是在甘藷 *sporamin* 與  $\beta$ -*amylase* 基因啓動子的研究中，被發現能與 SP8 element 專一性結合的 *trans*-acting factor (Ishiguro and Nakamura, 1994)，爲受蔗糖誘導

所表現的 repressor。之後由 Masaki (2005) 等人同樣在甘藷 *sporamin* 基因發現與 TGGACGG 相似的 carbohydrate metabolite signal responsive element (CMSRE)；於同時，Morikami 等人也發現與 CMSRE 專一結合的活化子 ASML1，可活化 *sporamin* 及  $\beta$ -amylase 基因表現。

1997 年 Kim 等人在黃瓜 (cucumber) 的 cDNA 庫中找出與 SPF1 同源的蛋白質。另一類 STK 轉錄因子則在馬鈴薯中發現，其可專一性辨認 *patatin* 基因啓動子上的 B-box，且爲此基因之 activator (Zourelidou *et al.*, 2002)。之後 Sun 等人 (2003)，也在大麥 (barley) 中找到 SUSIBA2，屬於 WRKY 家族，不僅可與 SURE 結合，也可與 W-box 產生交互作用。2009 年 Li 等人在菸草中發現與乙烯反應相關的因子 TERF，不僅可與 GCC box 及 DRE (dehydration responsive element) 結合，也會與 SURE 及 W-box 產生交互作用。由 SUSIBA2 及 TERF 的發現，說明了轉錄因子可能不只扮演單一種誘導調控因子的角色。此外，在阿拉伯芥中的研究也發現，屬於 bZip 中之 S1 class 這類轉錄因子也會受到蔗糖而抑制表現，因而間接抑制了其下游基因的表現，如 bZip1, -2, -11, -44 及 -53 (Hanson, *et al.*, 2009)。

### 3.2.2. Pura

除上述 *Trans-acting factors* 外，在本研究中發現可結合在水稻 *RSus1* 啓動子區域，進而參與調控 *RSus1* 基因受糖誘導表現的蛋白質 OsPura (詳見第三章)。OsPura 屬於 purine-rich element-binding protein superfamily 的一員。

#### (1) 動物中的 Pura

Pura 最早是在人類細胞所找到 (Bergemann *et al.*, 1992)。也陸續在鼠類、果蠅等不同物種中找到同源蛋白質 (Gallia *et al.*, 2000)。Pura 具有多功能的角色，除了可與 DNA 及 RNA 結合外，也參與 DNA 的複製和轉錄，以及 mRNA 的轉譯 (White *et al.*, 2009)。Pura 在胺基酸序列上的特性也不

同於其他 DNA 結合蛋白質。人類 Pura 是由 322 個胺基酸所組成，在靠近 N 端的部份存在連續 18 個 Gly 殘基，而中間只穿插一個 Ser；在序列中間部份則存在 3 段由 23 個多數為鹼性胺基酸所組成的 class I repeats，而在此 3 段 repeats 間則分別穿插由 26 個多數為酸性胺基酸所組成的 2 段 class II repeats；而在靠近 C 端的部份則存在 Psycho motif 及 Glu-Gln rich 的區域。Psycho motif 中除了包含由 amphipathic 胺基酸所構成的  $\alpha$ -helix 外，還有可被 casein kinase II 磷酸化的 Ser275 (Bergemann *et al.*, 1992)。此外，整個蛋白質結構中 Gly-rich 的區域被推測可能為 helix-destabilizing domain，而 class I repeats 與 Gln-rich 的區域則被認為可能與 DNA 結合及調控轉錄有關 (Gallia *et al.*, 2000; Liu and Johnson, 2002; White *et al.*, 2009)。

除了 Pura 外，同屬 Pur 蛋白質家族的成員，還有之後被發現的 Pur $\beta$  及 Pur $\gamma$ 。以人類為例，兩者與 Pura 在胺基酸序列上仍具有 50-70 % 的相似度，但 Pur $\beta$  缺乏 Gln-rich 的區域、第 2 段 class II repeat 中多出一些 glycine 以及 Psycho motif 中缺少可被 Casein kinase II 磷酸化的 Ser 等；Pur $\gamma$  則在 N 端有較大的差異，且第 2 段 class II repeat 中多出 23 個胺基酸，此外 Pur $\gamma$  中則具有 Pura 及 Pur $\beta$  所缺乏的 nuclear localization signal (NLS)。而目前尚未發現人類細胞中的 Pura 與 Pur $\beta$  蛋白質有其他 isoforms，而 Pur $\gamma$  則發現兩種 isoforms。

Pura 除了與核酸結合外，也可和許多與細胞調控相關的蛋白質間產生交互作用，包括 retinoblastoma protein (視網膜母細胞瘤蛋白)、E2F-1, YB-1, Cdk2, Cdk9 等轉錄因子，說明了 Pura 在細胞週期 (cell cycle) 與致癌基因的調控上扮演重要的角色 (White *et al.*, 2009)。

## (2) 植物中的 Pura

到目前為止，Pura 在植物的研究上所知相當有限，僅有在阿拉伯芥中的相關研究被發表。在阿拉伯芥 *eEF1A* 基因的啓動子上，存在一種與 telomere

序列相似的 *cis*-element (*telo*-boxes)，以此 DNA 序列(5'-AAACCCTAA-3') 為探針，利用 *southwestern screening* 法對阿拉伯芥 cDNA expression library 進行選殖，得到可與 *telo*-boxes 結合的 AtPurα (Tremousaygue *et al.*, 1999)。此外，*PCNA-2* (*proliferating cellular nuclear antigen*) 基因之啓動子上除有 *telo*-boxes 外，還含有 *site II motif*。利用 *yeast two-hybrid* 研究發現，AtPurα 可與專一辨識 *site II motif* 的轉錄因子 At-TCP20 產生交互作用；此外，AtPurα 本身亦可形成 *homodimer*。目前也尚未發現阿拉伯芥中有其他 Purα isoforms。而 AtPurα 在胺基酸序列上仍保有與動物 Purα 類似的特徵，其在 N 端也具 *glycine-rich* 的區域，且在 *class I repeats* 也有很高的相似度，然而 *class II repeats* 則與動物差異較大。此外，AtPurα 在 C 端缺乏 *Glu-Gln rich* 的區域。AtPurα 本身並無 NLS，磷酸化可能為調控 AtPurα 進出細胞核的主要修飾。以阿拉伯芥核蛋白質進行 *Phosphoproteomic analysis* 的結果發現，核中的 AtPurα 在 Ser207 有被磷酸化的現象 (Jones *et al.*, 2009)。

#### 4. 酵素在催化活性外的其他功能

隨著基因體定序的迅速發展，下一步階段的目標，即是瞭解不同基因究竟可以轉錄、轉譯出哪些產物，以及這些產物所扮有的功能為何。然而真正可能轉譯出的蛋白質數量，卻遠遠低於預期。這樣的結果，可能是由於 *gene fusion*, *mRNA alternative splicing* 或 *multiple proteolytic fragments* 等所造成；除上述之外，也有單一種蛋白質具有兩種以上不同的功能，此類蛋白質被稱為 *moonlighting proteins* (Jeffery, 1999; Jeffery, 2003; Huberts, *et al.*, 2010)。

糖解作用 (*glycolysis*) 為生物體中醣類代謝的重要反應，有許多酵素參與其中，如 *hexokinase* (HK), *enolase* (ENO), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPD), *glucose-6-phosphate isomerase* (GPI) 等。而近年來的研究顯示，在某些物種中一些糖解酵素可能具有其它非酵素的的功能，包括：轉錄調控

(transcriptional regulation)、細胞能動性的刺激 (stimulation of cell motility) 及細胞凋亡的調控 (regulation of apoptosis) 等。這些糖解酵素的不同功能，可能除了參與原有的代謝途徑外，也直接連結了代謝感應器 (metabolic sensors) 與轉錄調控 (Kim and Dang, 2005)。

#### 4.1 Hexokinase

HK 為糖解作用第一步的反應酵素，可將葡萄糖磷酸化成 glucose-6-phosphate 且為不可逆反應。在酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 中，可利用的能量來源很多，然而葡萄糖是最具能量轉換效率的碳源。葡萄糖在酵母菌中也參與了抑制葡萄糖代謝相關的基因的工作 (Trumbly, 1992)。它能抑制 *HXK1* (hexokinase) 與 *GLK1* (glucokinase) 基因的表現，卻不抑制 *HXK2* (hexokinase 2)。然而在 *HXK2* 缺乏的突變株 (*hvk2*) 中，葡萄糖卻失去抑制 *HXK1* 與 *GLK1* 的功能，推測 *HXK2* 可能參與抑制的過程 (Diderich *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 1995 and 1996; Niederacher and Entian, 1991; Rodriguez *et al.*, 2001)。另有研究發現 *HXK2* 亦存在於細胞核，且為葡萄糖抑制 *HXK1*, *GLK1* 及 *SUC2* (sucrose transporter) 等基因表現所必需 (Herrero *et al.*, 1998)。在整個葡萄糖抑制基因表現過程中，所參與專一性的轉錄因子 Mig1 及 Med8，兩者皆可與 *HXK2* 產生交互作用 (Ahuatzi *et al.*, 2004; de la Cera *et al.*, 2002)。以 Mig1 為例，當細胞中葡萄糖濃度高時，Mig1 會受 phosphatase 去磷酸化後，進入到細胞核中。此時，Mig1 便結合至啟動子的調控區上，隨後 *HXK2* 與 Mig1 結合，同時吸引更多的 repressors 一起抑制目標基因的轉錄。除此之外，*HXK2* 也直接參與 *galactokinase 1* 的轉錄調控及藉由磷酸化 Reg1 後，調控蛋白質激酶 Snf1 的表現 (Jiang and Carlson, 1996; Vincent *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2000)。這些研究皆闡明 *HXK2* 在糖解及轉錄調控具雙功能的角色。

## 4.2 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GAPD 在糖解中可催化 glyceraldehyde-3-phosphate 成 1,3-bisphosphoglycerate，同時還原  $\text{NAD}^+$  得到 NADH。GAPD 與 DNA 或 RNA 間也有結合能力 (Grosse *et al.*, 1986; Nagy *et al.*, 2000; Perucho *et al.*, 1980)。Sirover 在 1999 年已經證實 GAPD 在生理及病理的過程中，扮演著調控基因的角色。在 2004 年 Sundararaj 等人的研究中指出，GAPD 參與 DNA 的修復，並且與 telomeric DNA 的結合有關。GAPD 在 cell cycle 中也扮演 coactivator 的角色 (Zheng *et al.*, 2003)。此外，在其他的研究中也指出 GAPD 可與 RNA 結合，包括 rRNA、某些 mRNAs 的非轉譯區及許多病毒的 RNAs (Choudhary *et al.*, 2000; De *et al.*, 1996; Dollenmaier and Weitz, 2003; Schultz *et al.*, 1996; Sioud and Jespersen, 1996)。儘管對 GAPD-RNA interaction 的認知並不多，但 GAPD 與病毒的 RNA 間的專一性結合能力，可能調控病毒基因的轉錄與轉譯。再者，GAPD 也與膜融合 (membrane fusion)、磷酸化及 nuclear RNA 的輸出等過程有關 (Sirover, 1999)。

## 4.3 Enolase 1

在小鼠中，MBP-1 (*Myc promoter-binding protein-1*) 為一大小約 35-38 kDa 的轉錄抑制子，其可結合至 *MYC* P2 的啓動子上進而抑制 *MYC* (*MYC* 蛋白質為一種 oncogene 的轉錄因子) 的表現 (Ray *et al.*, 1995)。近年來發現 *MBP-1* 基因的 CDS 與 *ENO1* (蛋白質大小約 48 kDa) 的相似度高達 95 % 以上 (Subramanian and Miller, 2000)，顯示 *MBP-1* 可能為 *ENO1* mRNA 發生 alternative splicing 後的產物。在阿拉伯芥中 STZ/ZAT10 為一受冷誘導而快速累積的轉錄抑制子，enolase 可藉著結合至其基因的啓動子上，進而抑制基因的表現 (Lee *et al.*, 2002)。另有研究發現 *ENO1* 與 phosphoglycerate kinase (PGK) 可在宿主 (host) 受 Sendai virus 感染後，結合其他因子形成 active transcription initiation complex 以增強病毒基因的轉錄 (Ogino *et al.*, 2001)。

#### 4.4 Lactate dehydrogenase

除上述三種酵素外，lactate dehydrogenase (LDH) 也被發現可能參與轉錄調控。LDH 由兩種不同之次單元體 (A 與 B) 組成的四元體，可將糖解作用產生的丙酮酸轉換成乳酸，同時將 NADH 氧化得到 NAD<sup>+</sup>。在許多生物體中 LDH-A 被發現是一種單股 DNA 結合蛋白質 (ssDNA-binding protein) (Cattaneo *et al.*, 1985; Grosse, *et al.*, 1986)，也屬於 DNA-helix-destabilizing protein 的一類，可能參與基因轉錄 (Williams *et al.*, 1985)。LDH-A 與 ssDNA 結合的能力會因為輔酶 NADH 的參與而喪失，主要是由於 NADH 會競爭 LDH-A 上與 ssDNA 的結合區域，進而改變蛋白質構形。LDH-A and LDH-B 在 cell cycle 中也扮演 coactivator 的角色 (Zheng *et al.*, 2003)。藉由這些結果顯示，LDH 極可能參與基因轉錄或 DNA 的複製。也有一些研究指出，許多糖解作用相關酵素在 tyrosine residues 上的磷酸化可能會影響其在細胞中的定位 (Cooper *et al.*, 1984)。在小鼠細胞 (PC12 pheochromocytoma cell line) 中已經發現 LDH-A 在 Tyr238 的磷酸化可決定蛋白質進入細胞核。儘管 Tyr238 在 LDH-A 的組成只佔 0.5%，卻是決定 LDH-A 構形的關鍵點 (Zhong and Howard, 1990)。

除了上述這些與醣代謝相關的酵素外，在酵母菌與動物中還有許多已知的 moonlighting proteins。然而 moonlighting proteins 在植物中相關研究並不多，除了上述阿拉伯芥 elolase 外，還包括蕃茄中的一種 cysteine protease，其可調控 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase 的基因表現 (Matarasso *et al.*, 2005)，以及阿拉伯芥 phospholipase AtsPLA<sub>2</sub>- $\alpha$ ，可藉由與轉錄因子 AtMYB30 結合，進而抑制下游 HR (hypersensitive response) 相關基因的表現 (Froidure *et al.*, 2010)。

## 5. 本論文之研究基礎與目的

### 5.1 蔗糖合成酶

蔗糖合成酶 (Sucrose synthase, UDP-D-glucose:D-fructose 2- $\alpha$ -glucosyl transferase, EC 2.4.1.13, 以下簡稱 SuS) 一般為四元體，由不同之次單元體可組成同質四元體 (homotetramers) 或異質四元體 (heterotetramers)，次單元體分子量介於 70-100 kDa 之間。SuS 為植物中參與蔗糖代謝的重要酵素之一，它可催化  $\text{NDP-D-glucose} + \text{D-fructose} \rightleftharpoons \text{sucrose} + \text{NDP}$  之可逆反應。一般認為，SuS 在植物體內主要催化蔗糖分解方向的反應，對 UDP 的親和性較高，分解蔗糖之產物可供糖解作用產生能量，並供細胞壁多醣類及儲存性多醣類之生合成使用 (Ruan *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1997; Chourey *et al.*, 1998; Pozueta-Romero *et al.*, 1999; Sturm *et al.*, 1999; Winter and Huber, 2000; Koch, 2004; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010; Kleczkowski *et al.* 2010)。在將蔗糖導向巨分子生合成之途徑中，SuS 扮演重要角色。

### 5.2 蔗糖合成酶異構酶

多數植物都有兩種以上的 SuS 異構酶存在，由兩種或兩種以上的基因所表現。例如：小麥 (Larsen *et al.*, 1985)、大麥 (Sánchez de la Hoz *et al.*, 1992; Martinez de Ilarduya *et al.*, 1993; Guerin and Carbonero, 1997)、高粱 (Chourey *et al.*, 1991)、甘蔗 (Buczynski *et al.*, 1993)、馬鈴薯 (Fu and Park, 1995)、胡蘿蔔 (Sebkova *et al.*, 1995; Sturm *et al.*, 1999)、蕃茄 (Wang *et al.*, 1994)、甜菜 (Hesse and Willmitzer, 1996)、豌豆 (Barratt *et al.*, 2001)、柑橘 (Komatsu, *et al.*, 2002)、玉米 (Carlson *et al.*, 2002) 等植物都被發現至少有兩種以上的 *Sus* 基因。至目前為止，水稻中發現存在六種 *Sus* 基因，後來發現的 RSuS4 表現在穀實中，而 RSuS5 及 RSuS6 表現量較低主要分布於成熟葉 (Hirose *et al.*, 2008)；在 2011年 Cho 等人發現 RSuS7，其與 RSuS5 只有九個核苷酸的不同。而阿拉



伯芥中亦存在六種 *Sus* 基因，其表現亦具有組織專一性 (Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007)。

不同來源之 *SuS* 具有高度保留的胺基酸序列及相似之生化特性，不同 *Sus* 基因具其發育及組織特異性，在不同的組織器官及生長時期有不同的表現情形 (Arai *et al.*, 1992; Fu and Park, 1995; Sturm *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Carlson *et al.*, 2002; Baud *et al.*, 2004; Hirose *et al.*, 2008)，而這些差異通常會在轉錄、後轉錄或轉譯等不同層次顯現出來。

### 5.3 糖濃度對蔗糖合成酶基因表現之影響

*Sus* 基因會受到糖濃度調控，然而 *Sus* 異構基因表現受糖影響的情形隨植物不同、異構基因不同而有所不同。例如玉米粒中的胚、糊粉層、basal endosperm transfer cells 及玉米其它各組織中，均有表現的 *Sus1* 基因，會受到糖之誘導而表現量增加，而 *Sh1* 基因卻在限糖的情形下有最大表現；改變糖濃度亦會改變兩者在根尖的分布情形 (Koch, 1996; Koch *et al.*, 1992)。

藜 (*Chenopodium rubrum*) 之懸浮培養細胞中，*Sus* 也受蔗糖誘導而表現 (Godt *et al.*, 1995)。當培養基中蔗糖濃度增加時，扁豆子葉 *Sus* mRNA 的表現量也隨之升高，而在開花受粉後的種皮及子葉中，*Sus* mRNA 的表現量會上升，同時，其蔗糖及澱粉的含量高峰與 *Sus* mRNA 的表現高峰出現的時間一致 (Heim *et al.*, 1993)。

馬鈴薯 *Sus4* 基因的表現亦受到蔗糖的誘導 (Salanoubat and Belliard, 1989; Fu *et al.*, 1995a; Fu and Park, 1995)，將斷莖後之馬鈴薯置於黑暗中以高濃度蔗糖溶液培養，發現莖部會由於澱粉累積而膨脹 (Salanoubat and Belliard, 1989)。

水稻的 *RSus1* mRNA 的表現同樣也會受到蔗糖的誘導 (Huang *et al.*, 1996; Liao and Wang, 2003)，以專一性抗體對不同濃度蔗糖培養的水稻白化苗進行分析結果發現，葉中 *RSuS1* 蛋白質的量會隨著蔗糖濃度的增加而增加，在 2%~

4% 蔗糖濃度培養的葉中含量最高；RSuS2 蛋白質含量的變化則不若 RSuS1 明顯 (高及王，1999)。

#### 5.4 蔗糖合成酶之細胞內定位

SuS 蛋白質已知主要分布於細胞質，但在不同胞器中也有其分布，如質體 (Núñez *et al.*, 2008)、細胞膜 (Hardin *et al.*, 2006)、液泡 (Etxeberria and Gonzalez, 2003 ; Wang *et al.*, 2009)、細胞壁 (Persia *et al.*, 2008)、粒線體以及細胞核 (Subbaiah *et al.*, 2006)。對於膜結合型的 SuS 蛋白質的功能，研究指向與纖維素合成相關或可與 actin cytoskeleton 結合 (Amor *et al.*, 1995; Winter *et al.*, 1997; Komina *et al.*, 2002)。存在於粒線體的 SuS，在厭氧的狀況下會與 voltage-dependant anion channel 結合，被推測可能參與粒線體的溶質進出調控；對於細胞核中的 SuS 所知甚少，被推測厭氧會促使 SuS 進核 (Subbaiah *et al.*, 2006; 2007)。

#### 5.5 本研究室在蔗糖合成酶之研究成果

本研究室長期以水稻 *RSus1-RSus3* 為研究主題，其基因及 cDNA 均已被選殖出並定出基因結構 (Wang *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1996)。這三種 *RSus* 基因在水稻不同組織中的表現不盡相同，其中 *RSus1* 與 *RSus2* 在大部份組織普遍皆有表現，且為白化苗、懸浮培養細胞中的 RSuS 主要來源，而 *RSus3* 的表現則有穀實專一性 (Huang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999)。三種 *RSus* 異構基因在水稻穀實發育的不同時期，表現情形有所差異：在水稻開花授粉後，種子開始充填之前期 *RSus1* 即大量表現，但隨著穀實成熟而表現量遞減；*RSus3* 則在穀實充實中期時才有大量表現；*RSus2* 則傾向恆常表現。由這些結果推測，RSuS1 在種子預備充填時參與了運送糖至胚乳的過程，提供蔗糖轉運所需的能量，而存在胚乳中的 RSuS3，則將來自葉部的蔗糖分

解，以提供種子填充時胚乳中澱粉及細胞壁多醣類合成所需的基質，RSuS2 則可能扮演 housekeeping 的角色，維持細胞基本的生長代謝 (Wang *et al.*, 1999)。

以水稻懸浮培養細胞為材料，添加蔗糖、葡萄糖或果糖於培養基中，*RSus1* mRNA 的累積量會增加，而其調控過程中與六碳糖激酶無關，但需要糖所誘導的新合成蛋白質參與。*RSus1* mRNA 雖然在缺糖的狀況下無法被偵測到，但 RSuS1 蛋白質在缺糖下能穩定存在。而 *RSus2* mRNA 無論在糖存在與否，都有累積的現象，亦同樣需要新合成蛋白質參與。在缺糖的情況下 RSuS2 的蛋白質量會隨著時間而增加 (廖憶純，2002；Liao and Wang, 2003)。

水稻白化苗的 SuS 在 *in vivo* 及 *in vitro* 的情況下皆可被磷酸化。由水稻白化苗中純化出的四種  $Mn^{2+}$ -dependent 蛋白質激酶 (RPK1~RPK4)，在 *in vitro* 的情況下，可對大腸桿菌表現之 RSuS1 的 Ser15 及 Ser170 進行磷酸化修飾 (Tsai and Wang, 2003)。此外，分別在大腸桿菌表現出重組突變 RSuS1 蛋白質，分析其酵素活性發現，Ser15 及 Ser170 之磷酸化對 RSuS1 之活性有相反的影響，當 Ser15 磷酸化時，蔗糖分解對蔗糖合成的比活性比率 (specific-activity ratio) 下降，但 Ser170 磷酸化時比率卻增加，顯示不同 Ser 位置的磷酸化可調節 RSuS1 酵素的活性與催化反應的方向 (蔡承佳，2003)。

由 Triton X-114 分層實驗發現，RSuS1、RSuS2 及 RSuS3 皆有膜結合形式蛋白質存在；RPK2 可對 RSuS3 進行磷酸化修飾但對其蔗糖分解方向活性沒有改變 (黃德宜，2003)。

本研究室由綠竹筍的 cDNA 庫中也篩選到四株 *BoSus* cDNA，分別命名 *BoSus1-4*，其中 *BoSus1* 及 *BoSus3* 有極高序列同質性，而 *BoSus2* 及 *BoSus4* 亦如此。此四種基因在綠竹各組織部位都有表現，但表現量不同。將四種異構基因送入大腸桿菌表現重組蛋白質，由酵素動力學的研究顯示，兩序列相似性極高的 *BoSuS* 異構酶對蔗糖  $K_m$  相似，但對 UDP 的  $K_m$  卻不同。此外，也發現其與 *BoSus* mRNA 與 *BoSuS* 的表現量變化趨勢與竹筍生長速度呈正相關 (Chiu *et al.*, 2006)。

## 5.6 本論文研究之緣起與目的

由先前的研究已知 *RSus1* 基因的表現會因蔗糖濃度的增加而提升 (Huang *et al.*, 1996; 高及王, 1999; Lino and Wang, 2003)。王增興 (1995) 研究水稻 SuS 異構基因的調控序列指出, *RSus1* 基因啓動子區域中有三段出現二次的重複序列 (tandem repeat; TR) (附圖一), 第一段重複序列 (TR1) 長 43 bp, 位於 -1083 ~ -1041 及 -624 ~ -582, 二段序列中只有 3 bp 的差異; 第二段重複序列 (TR2) 長達 125 bp, 分別位於 -890 ~ -749 及 -520 ~ -396, 其中在 -890 ~ -749 多出 18 bp 且幾乎全是 G/A 的插入序列; 第三段重複序列 (TR3) 長 33 bp, 位於 -713 ~ -681 及 -394 ~ -362, 此二段序列中只有 2 bp 的差異。這些特殊的結構並不存在於 *RSus2* 及 *RSus3* 啓動子區域中, 因而或許與 *RSuS1* 的表現受蔗糖濃度調控有關。

廖憶純 (2002) 將 *RSus1* 啓動子上游作適當的 deletion, 得到的 DNA 片段與 GUS 基因融合, 以粒子槍法轉殖至水稻懸浮培養細胞, 分析 GUS 活性 (附圖二)。由實驗結果發現 intron 1 的存在為 *RSuS1* 基因表現所必需, 但是否與蔗糖調控相關則需進一步探討。而 *RSus1* 3' flanking sequence 與 intron 1 同時存在的情形下, GUS 表現的活性並沒有較只包含 intron 1 時高, 反而是下降的情形, 此外亦發現 *RSus1* 的 3' flanking sequence 對於 *RSus1* 基因受蔗糖誘導表現或增強 *RSus1* 基因的表現無顯著的影響。由 *RSus1* 5' flanking sequence deletion 質體於細胞中的 GUS 短暫性表現分析實驗結果顯示, *RSus1* 啓動子上與蔗糖調控有關的關鍵區域應位於 -1117 ~ -958 與 -656 ~ -571 的片段上, 而這二個片段都包含了 TR1, 而將其分別稱為 TR1U (U: upstream) 與 TR1D (D: downstream)。之後為瞭解核蛋白質與 TR1U 及 TR1D 之交互作用, 進行膠體電泳遲滯分析 (gel mobility shift assay) 實驗, 結果顯示, 核蛋白質與 TR1D 並無專一性結合。且進一步的競爭抑制實驗顯示, 核蛋白質與其中的 -1083 ~ -1041 (TR1U-2) 及 -1040 ~ -958 (TR1U-3) 有專一性結合, 但以與

TR1U-3 的結合力較強，因此推測這些片段可能就是與調控 *RSus1* 基因表現相關的蛋白質 (*trans-acting factors*) 的結合區域。

茲於 2004 年針對 *RSus1* 啓動子上游區域 -1117 ~ -954 (TRFN)，分別利用膠體電泳遲滯分析實驗與足跡實驗 (附圖三)，來探討其與核蛋白質之交互作用。在膠體電泳遲滯分析實驗中，以 DNA 片段 TRFN 爲探針，另以 TRFN 上不同區域之 DNA 片段 (A, B 及 C) 作爲競爭者，與由蔗糖或甘露醇培養之細胞抽出的核蛋白質進行膠體電泳遲滯分析。之後再分別以 A, B, C 爲探針，n0 三段 DNA 片段上不同區域的序列爲競爭者進行膠體電泳遲滯分析，由結果得知 DNA 片段 A-2, A-3(=B-1), B-3, C-3 可皆與細胞經蔗糖處理或無所抽得之核蛋白質產生交互作用 (附圖四)。此外，以 TRFN 爲探針與核蛋白質進行足跡實驗分析的結果發現，其形成之足跡區域爲 -1051 ~ -1012 及 -1066 ~ -1047。整合兩者結果得知，*RSus1* 啓動子上可能與蔗糖調控有關的關鍵區域應位於 -1083 ~ -1041 (A-2) 或 -1059 ~ -954 (A-3)，其中後者在膠體電泳遲滯分析實驗之結果顯示，與核蛋白質的結合力較強。本論文以水稻懸浮培養細胞以及白化苗爲材料，尋找 *RSus1* 基因啓動子上與糖調控有關的主要序列及其調控蛋白質，希望釐清 *RSus1* 在整個糖訊息傳導過程中的調控機制。此外，也探討 *RSuS1* 蛋白質於細胞中的定位，並研究其是否扮演酵素催化外的其他角色。

## 5.7 本論文之研究主題

### 5.7.1. 建立 *RSus1* 基因表現之調控機制

#### 5.7.1.1 尋找 *RSus1* 基因啓動子上游可能與糖調控有關的 *cis-acting elements*

由先前的研究得知 *RSus1* 啓動子上可能與蔗糖調控有關之區域爲 -1059 ~ -954 (A-3)，將其細分成四個 DNA 片段來找出與蛋白質作用較強的區域。利用 A-3 爲探針並以四段 DNA 片段或經突變之 A-3 爲競爭

者，與由蔗糖或甘露醇培養細胞抽取之核蛋白質，進行膠體電泳遲滯分析。

### 5.7.1.2 尋找與 *cis-acting elements* 作用的蛋白質

以所找到與蔗糖調控表現有關的 *cis-acting elements* 為探針並且在 5' 端標定 biotin，將此 *cis-acting elements* 先固定在帶有 streptavidin 膠體上，之後通入核蛋白質，以親和性膠體層析法，純化專一性結合之核蛋白質。之後再以 southwestern blot 來確定主要的結合蛋白色帶，再利用 MALDI-TOF 將此蛋白色帶進行身份鑑定。

### 5.7.1.3 *Trans-acting factors* 之基因選殖與功能分析

確定蛋白質身分後，設計引子以水稻懸浮培養細胞所得之 cDNA 為模版，進行 cDNA 轉殖。之後再以 pET16b 為表現載體利用大腸桿菌為宿主，進行重組蛋白質的表現。將所得之重組蛋白質與 *cis-acting element* 以膠體電泳遲滯分析進行 *in vitro* binding assay; 再分別建立報導基因上游帶有 *cis-acting element* 與可表現 *Trans-acting factor* 的兩種質體，以 co-transformation assay 進行 *in vivo* 分析。

此外，利用 quantitative real-time RT-PCR 探討水稻懸浮培養細胞在蔗糖培養不同時間下，*trans-acting factor* 基因表現量是否受誘導。

## 5.7.2. 探討 RSuS1 是否進入細胞核

先前廖憶純在水稻懸浮培養細胞的核蛋白質中，以 RSuS1 的多株抗體進行免疫染色的實驗，發現有正反應的訊號 (2002, 結果未發表)，說明 RSuS1 可能存在於細胞核。此外，Subbaiah 等人在 2006 年亦發現，玉米中的 SuS1 及 SH1 會因為缺氧逆境而使其在細胞核的量增多。依據這些發現，本研究將水稻細胞不同分劃之蛋白質以免疫染色及免疫沉澱進行分析。此外，再以 *RSus* 基因融合 *sGFP* 為報導基因及細胞免疫染色法，來觀察 RSuS 在細胞

中的定位，來確認核蛋白質中是否真的有 RSuS 的存在，並探討 RSuS 進入細胞核的可能機制。



## 第二章 材料與方法

### 1. 實驗材料

#### 1.1 水稻懸浮培養細胞及種子

台農 67 號水稻 (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67) 懸浮培養細胞與種子，分別由本校農藝系劉麗飛教授及農業試驗所霧峰分所提供。

#### 1.2 洋蔥

購自彰化縣伸港鄉農會。

#### 1.3 質體

pRS1E :

*RSus1* promoter (1117 bp)-exon 1-pBI121-GUS-NOSter 片段，以 *HindIII* / *EcoRI* 選殖於質體 pBluescript II SK(-) 上所得之重組質體，其大小為 3.6 kb (即 pS2-2, 顏, 1994)。

pRS1TR1-3 :

*RSus1* promoter (-1117 ~ -620) 片段，以 *HindIII* 選殖於質體 pBluescript II SK(-) 上所得之重組質體，其大小為 3,459 bp (張, 2004)。

pHBT95sGFP :

pUC18 上帶有一段約 1.3 kb 之 CaMV 35S promoter::*C4PPDK1*-enhancer::*sGFP* 片段，其中 *C4PPDK1*-enhancer 包含玉米 *C4PPDK* 基因之啓動子以及 5' 端非轉譯區域 (5'UTR)，此種混合型啓動子與單獨使用 CaMV 35S 相比，可使報導基因的表現增加 15 倍 (Sheen et al., 1995)。報導基因 sGFP 與野生型 GFP



之差別為 Ser65 改為 Thr，N 端的 Met1 之後多了一個 Val，以及 His231 改為 Leu (Sheen *al et.*, 1995)。

pET-SuS1：

pET17b 上帶有完整 *RSus1* ORF 序列 (Sayion *et al.*, 1999)。

pYCL：

pET17b 上帶有完整 *RSus2* ORF 序列 (Sayion *et al.*, 1999)。

pBI221：

pUC19 的 *HindIII/EcoRI* 切位上帶有一段約 3 kb 之 CaMV 35S promoter-GUS-NOSTer 片段。

pTrcHisA-BoPAL1：

pTrcHisA 上帶有完整 *BoPall* ORF 序列 (Hsieh, 2010)。

pMTC301：

以 35S 啟動子表現 firefly *luciferase* 基因 (中央研究院余淑美研究員提供)。

## 1.4 菌種

以大腸桿菌 *Escherichia coli* JM109 作為質體增殖、保存之宿主。其基因型 (genotype) 為  $e14^-$  ( $McrA^-$ ) *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1*  $\Delta$  (*lac-proAB*) [ $F^+$  *traD36 proAB lacI<sup>q</sup> Z*  $\Delta$  *M15*]。

以大腸桿菌 *Escherichia coli* BLR ( $\lambda$ DE3) 作為表現重組蛋白質 OsPura $\alpha$  之宿主。其基因型為  $F^-$  *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm*  $\Delta$  (*srl-recA*) 306::*Tn10* ( $Tc^R$ )。

## 1.5 藥品

### 1.5.1 一般化學藥品

大部分購自 Merck、Sigma、ICN 或 Amresco 等公司。

### 1.5.2 放射性藥品

放射線  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP 及  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP，為 NEN 公司之產品。

## 1.6 核酸剪切及修飾酵素

大多購自 New England BioLabs, Roche Molecular Biochemicals 或 Promega Life Science (Promega) 等公司。

## 2. 實驗儀器設備

### 2.1 核酸電泳

迷你電泳槽、鑄膠器：Cosmo Bio Company Mupid II。

### 2.2 蛋白質電泳

#### 2.2.1 迷你電泳系統

迷你電泳槽：Hofer Mighty Small SE 250。

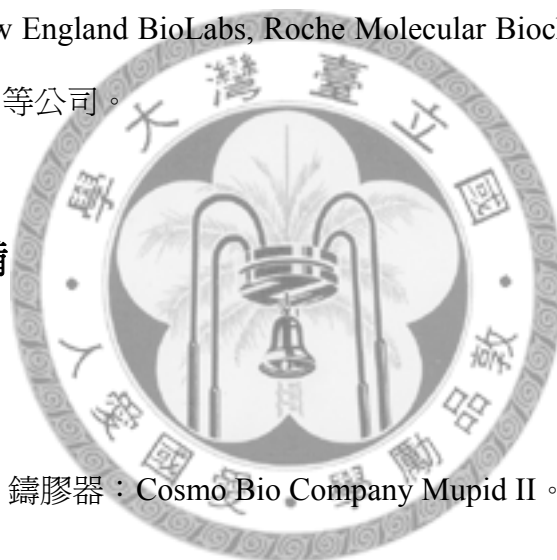
鑄膠器：Hofer SE 245、SE 400。

電源供應器：Hofer PS 250。

#### 2.2.2 DNA-蛋白質複合體電泳系統

電泳槽：Owl 039865。

電源供應器：BRL Model 4000。



## 2.3 離心機

超高速離心機：Hitachi himac SCP 70H。

冷凍微量離心機：Hitachi himac CF 15D。

冷凍離心機：Hitachi himac CR 22。

桌上型微量離心機：Kubota KM-15200。

桌上型離心機：Kubota KN-70。

真空乾燥離心機：Savant SC-110。

## 2.4 其他儀器

核酸濃度分析儀：Pharmacia GENE QUANT RNA/DNA Calculator。

UV transilluminator：Fotodyne Foto UV26。

影像分析儀：Fuji BAS1000。

乾式恆溫槽：Scinics EC-201。

PCR 恆溫控制器：Progene、Biometra。

恆溫培養箱：TKS OS1511R。

pH meter：Radiometer copenhagen PHM93。

ELISA 光度計：Dynatech MR5000。

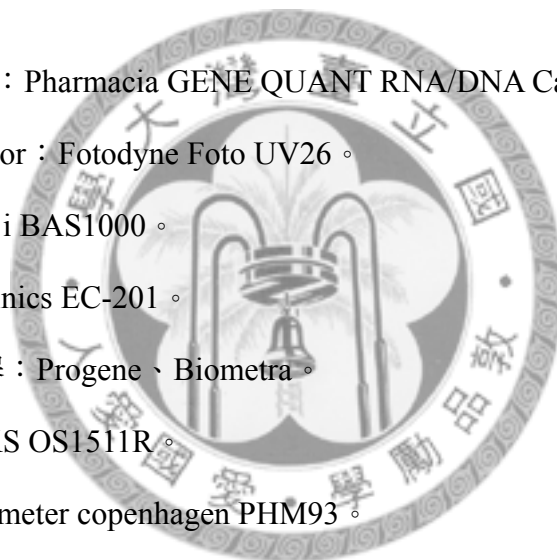
閃爍計數器：Beckman LS5000 CE。

膠片乾燥機：Bio-Rad Model 583。

粒子槍：Bio-Rad PDS-1000/He。

螢光顯微鏡：Olympus BX50，CCD 系統為 Olympus DP70。

共軛焦顯微鏡：Leica TCS SP5



### 3. 實驗方法

#### 3.1 水稻懸浮培養細胞之培養

##### 3.1.1 小量培養

每 30 mL N6 液態培養基 [每升成分為 4 g N6 (CHU) basal salt mixture (Sigma C1416); 1 g Casamino acid; 0.5 mg Nicotinic acid; 1 mg Thiamine HCl; 0.5 mg Pyridoxine HCl; 2 mg 2,4-D; 30 g Sucrose; pH 5.8 ] ( Chu *et al.*, 1975) 裝於 125 mL 錐形瓶中，加入 1 mL 細胞，於 25 °C 下以 120 rpm 速度避光震盪培養，每隔五至七天挑選較小之細胞團粒進行繼代培養。

##### 3.1.2 不同糖類及蛋白質合成抑制劑 cycloheximide 之處理

為避免基因表現受到細胞內糖之影響，因此在進行糖處理之前，先以相同莫耳濃度之甘露醇取代 N6 培養基中的蔗糖，並以之使細胞飢餓 48 hr，再以 cycloheximide (CHX) 處理 30 min，之後再以含蔗糖或甘露醇之 N6 培養基培養，培養時間隨不同實驗而異。

#### 3.2 DNA 之抽取、擴增與分析

##### 3.2.1 質體 DNA 之小量分離 (Birnboim *et al.*, 1979)

將帶有質體 DNA 之大腸桿菌接種於含適當抗生素之 LB 液態培養基 (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) 中，於 37 °C 下震盪培養過夜。取 3 mL 菌液於微量離心管中，以 3,000 g 離心 2 min 後倒去上清，加入 1 mL 1× STE (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)，振盪打散菌體後以同法離心，並吸去殘留液體。加入 0.1 mL MP I (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM glucose) 重新懸濁菌體，再慢慢加入 0.2 mL MP II (0.2 N NaOH, 1% SDS)，上下輕輕搖動混合均勻，接著加入 0.15 mL MP III (3 M potassium acetate,

pH 5.2)，混合均勻，置冰浴 10 min 後，於 4 °C 下以 10,000 g 離心 5 min，之後吸取上清液至另一離心管，加入等體積 PCI [(phenol/chloroform/isoamyl alcohol, 25:24:1 (v/v/v))，震盪混勻後，於室溫下以 10,000 g 離心 10 min。吸取上層水溶液至另一離心管，加入 2 倍體積之絕對酒精混勻後，置於 -20 °C 30 min 後，於 4 °C 下以 10,000 g 離心 10 min。倒去上清，將沈澱以 1 mL 70 % 酒精清洗，以同法離心 1 min，重複兩次。將殘留之液體吸取乾淨，沉澱乾燥後以 30  $\mu$ L TE-8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) 溶解，再加入 1  $\mu$ L RNase A (1 mg/mL) 於 37 °C 反應 30 min 後，即可進行限制酶切割或瓊脂糖膠體電泳分析等實驗。

### 3.2.2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction)

取 0.1 mL 微量離心管，加入反應溶液，包含：100 ng 模版 DNA，100 ng forward primer，100 ng reverse primer，0.1 mM dNTPs，2.5 unit *Accu* pfu DNA polymerase (Yeastern Biotech)，1  $\times$  反應緩衝液 (10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA) 及 2-4 mM MgCl<sub>2</sub>)，最後加入無菌水至總體積為 50  $\mu$ L，加入一滴礦物油 (mineral oil, Sigma M-3516)，置入 PCR 恆溫控制器中進行反應，其反應條件為：

Step 1 Denaturation : 95 °C , 3 min

Step 2 Denaturation : 95 °C , 1 min

Step 3 Annealing : 依每對引子設定特定鍊合溫度 , 20-60 sec

Step 4 Elongation : 68 °C , 反應時間依片段大小而定 (0.5 kb/min)

Step 5 Elongation : 68 °C , 10 min

重複 Step 2 至 Step 4，進行 30~35 cycles。

### 3.2.3 DNA 之限制酶切割

將 DNA 與欲使用之限制酶，依廠商所提供之反應緩衝液及建議之最佳條件進

行反應，最後以 65 °C 加熱 20 min 終止反應，具熱安定性的酵素則以 EDTA (終濃度為 10 mM) 或 PCI 處理之。

### 3.2.4 DNA 瓊脂糖膠體電泳法

秤取適當量之瓊脂糖 (agarose) 粉末，加入 1×TAE 電泳緩衝液 (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)，以微波爐加熱溶解，待膠體降溫至未凝膠前，倒入鑄膠器中。DNA 樣品加入 10× 電泳追蹤染劑 (50% glycerol, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, pH 8.0) 後，注入電泳膠體樣品槽內，以 50 V 或 100 V 的電壓進行電泳。待追蹤染劑移動至膠體約三分之二處時，即停止電泳，之後以 ethidium bromide (EtBr) 染色 10 min、以水脫色 30 min 後，以 UV transilluminator 觀察結果。

### 3.2.5 DNA 片段之分離與純化

經限制酶切割完全的質體 DNA 或 PCR 產物，以電泳分離後，在 UV transilluminator box 上觀察目標 DNA 片段所在位置，以刀片將目標片段之膠體切下，分裝於微量離心管中 (每管約 200 ng)，以 PROMEGA 公司所出產之 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 進行純化，方法如下：於各管加入 0.2 mL Membrane Binding Solution 置於 60 °C 之恆溫槽 5-10 min，且每 1-2 min 搖晃一次，直至膠體全部溶解為止。待降至室溫後，將溶液注入 SV Minicolumn 中，以 16,000 g 離心 1 min，倒去濾液。加入 0.7 mL Membrane Wash Solution，以 16,000 g 離心 30-60 sec，倒去濾液，再加入 0.5 mL Membrane Wash Solution，同上離心，倒去濾液，最後離心 3 min 去除殘留的酒精。將管柱置於另一微量離心管中，加入 60 °C 預熱之 TE 緩衝液 30-50  $\mu$ L 於膜上，靜置 1 min 以上，以 16,000 g 離心 3 min，濾液部分即為溶離之目標 DNA 片段。

### 3.2.6 DNA 接合反應

將純化後之質體 DNA (vector) 與欲接入片段 DNA (insert) 以不同的莫耳數比混合 (vector:insert=1:1, 1:3, 1:6, 總 DNA 量不超過 100 ng), 加入 1  $\mu$ L 10 $\times$ ligation buffer (300 mM Tris-HCl, pH 7.8; 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP), 1  $\mu$ L T4 DNA ligase (1 unit/ $\mu$ L, Invitrogen), 以無菌水調整體積至 20  $\mu$ L, 於 14  $^{\circ}$ C 進行反應 16 hr。

### 3.3 重組質體之建構

pGRS1 (圖一) :

以 pHBT95sGFP 為模版, *sGFP* 基因以 PCR 方式進行增殖, 並設計引子對 (G-F-HI 與 G-R-NdeI, 表一), 去除其終止碼。再與由質體 pET-RSus1 酶切下 *RSus1* 基因之 ORF, 以 *Bam*HI / *Nde*I / *Not*I 選殖於質體 pHBT95sGFP, 其大小約為 6.9 kb。

pRS1G :

由 *RSus1* 基因之 ORF 設計帶有 *Bam*HI 之引子對 (RS1-F-HI 與 RS1-R-HI, 表一), 以 PCR 增殖後, 選殖於質體 pHBT95sGFP, 其大小約為 6.5 kb。

pGBoPAL1 (圖二) :

以 pTrcHisA-BoPAL1 為模版, 由 *BoPal1* 基因之 ORF 設計帶有 *Bsr*GI 及 *Not*I 之引子對 (BoPal1-F-GI 與 BoPal1-R-NotI, 表一), 選殖於質體 pHBT95sGFP, 其大小約為 6.2 kb。

pGRS1-N309 (圖三) :

以 pGRS1 為模版, 並由 pGRS1 設計引子對 (G-F-HI 與 RS1-R927, 表一),

可增殖出 *sGFP* 基因接合 *RSus1* 基因之部分 ORF 片段 (由起始碼至 927 nt 並給於終止碼), 以 *Bam*HI 切位及 blunt end, 選殖於質體 pHBT95sGFP, 其大小約為 4.9 kb。

pGRS1-NM (圖四) :

由 pGRS1 設計引子對 (G-F-HI 與 RS1-R1821, 表一), *sGFP* 基因與 *RSus1* 基因之部分 ORF 片段 (由起始碼至 1821 nt 並給於終止碼), 以一端切位為 *Bam*HI, 另一端為 *Not*I, 選殖於質體 pHBT95sGFP, 其大小約為 5.8 kb。

pGRS1-M (圖五) :

*sGFP* 基因以 PCR 方式進行增殖, 重新設計引子對 (G-F-HI 與 G-R, 表一), 去除其終止碼。再與以 pET-R*Sus1* 為模版, 同樣經 PCR 增殖 (引子對 RS1-F928 與 RS1-R1821-*Not*I, 表一) 之 *RSus1* 基因之部分 ORF 片段 (由 928 nt 至 1821 nt 並給於終止碼), 以 *Bam*HI / blunt end / *Not*I 選殖於質體 pHBT95sGFP, 其大小約為 4.9 kb。

pGRS1-MC (圖六) :

*sGFP* 基因以 PCR 方式進行增殖, 重新設計引子對 (G-F-HI 與 G-R, 表一), 去除其終止碼。再與以 pGRS1 為模版, 同樣經 PCR 增殖 (引子對 RS1-F928 與 pHBT-R, 表一) 之 *RSus1* 基因之部分 ORF 片段 (由 928 nt 至 2451 nt), 以 *Bam*HI / blunt end / *Not*I 選殖於質體 pHBT95sGFP, 其大小約為 6 kb。

pGRS1-C209 (圖七) :

*sGFP* 基因以 PCR 方式進行增殖, 重新設計引子對 (G-F-HI 與 G-R, 表一), 去除其終止碼。再選殖於經 *Bam*HI 與 *Hpa*I 酶切後之 pGRS1 (包含 *RSus1* 基因之 1822 nt 至 2451 nt), 其大小約為 5.1 kb。



pET16b-OsPurα :

將 *OsPurα* 基因之 ORF，以 *NdeI* / *BamHI* 選殖於質體 pET16b，其大小約為 6.6 kb (詳見 3.9.1)。

pHBT-Flag-OsPurα (effector plasmid) :

將 *OsPurα* 基因之 ORF，以 PCR 法於 5' 端加入 Flag codon，再以 blunt end / *NotI* 選殖於 pUC18 上帶有一段約 0.6 kb 之 CaMV 35S::*C4PPDK1*-enhancer 片段 (詳見 3.12.3)。

p2× A-3-m35S-GUS (reporter plasmid) (圖八) :

*RSusI* promoter (-1059 ~ -954) 片段及 minimal 90 bp 之 CaMV 35S promoter，以 *PstI* / blunt end / *BamHI* 選殖於質體 pBI221 (以 *PstI* 及 *BamHI* 移除 35S promoter)，可得 pA-3-35Smin-GUS。再將 *RSusI* promoter (-1059 ~ -954) 片段，以 *HindIII* / blunt end 選殖於質體 pA-3-35Smin-GUS (以 *PstI* 酶切後，T4 DNA polymerase 進 fill-in，再以 *HindIII* 酶切)，可得 p2× A-3-m35S-GUS (詳見 3.12.3)。

### 3.4 質體之轉形 (Hanahan, 1985)

#### 3.4.1 Competent cells 之製備 (氯化鈣法)

取大腸桿菌菌株 JM109 或 BLR ( $\lambda$ DE3)，接種至 SOB 固態培養基 (2% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.5% Bacto agar, pH 7.0, 倒入培養皿前加入 1 M  $MgSO_4$  及 1 M  $MgCl_2$  之混合溶液，使  $Mg^{2+}$  最終濃度為 10 mM)，於 37 °C 下倒置培養 12 至 16 hr。

計算欲轉形之樣品數，每 10 mL 培養液可供 2 個轉形反應。取適量 SOB 液態培養基 (2% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM

KCl, pH 7.0, 使用前加入  $Mg^{2+}$  溶液使最終濃度為 10 mM) 置於 250 mL 之無菌錐形瓶中, 另取 1 mL SOB 裝於微量離心管中, 從 SOB 固態培養基上挑選 4~6 個菌落, 置入 1 mL SOB 微量離心管中將菌體打散, 再接入適量 SOB 液態培養基中, 於 37 °C 下振盪培養 2~3 hr, 直到  $A_{600}$  約為 0.4~0.6 左右。將菌液收集於離心管中, 於 4 °C 下, 以 750-1,000 g 離心 10-15 min。倒去上清, 加入 1/3 菌液體積之冰冷 0.1 M  $CaCl_2$  溶液, 混合均勻後, 置冰浴中 20 min, 離心收集菌體, 倒去上清, 如此重複 2 至 3 次可增加轉形效率。最後加入 1/25 菌液體積之冰冷 0.1 M  $CaCl_2$  溶液, 混合均勻, competent cells 即製備完成。

### 3.4.2 大腸桿菌之轉形

取接合反應後之 DNA 樣品 (10  $\mu$ L) 裝於微量離心管中, 每個樣品加入 200  $\mu$ L competent cells, 震盪混合後, 置冰浴中 20-40 min, 接著以 42 °C 加熱 90 sec, 迅速置冰浴 2 min, 之後加入 800  $\mu$ L SOC (SOB 加入 Glucose 使最終濃度為 20 mM) 混合後, 於 37 °C 振盪培養 1 hr。取 200  $\mu$ L 菌液塗抹在含適當抗生素之 LB 固態培養基上, 於 37 °C 下倒置培養 16-20 hr。

## 3.5 RNA 之抽取與分析

### 3.5.1 Total RNA 抽取

取 50-100 mg 研磨後之懸浮培養細胞粉末, 加入 1 mL TRIzol (Invitrogen) 混合均勻, 於室溫反應 5 min, 於 4 °C 下以 12,000 g 離心 10 min。取上清加入 200  $\mu$ L 氯仿, 劇烈搖動離心管 15 sec, 置於室溫 2-3 min 後, 於 4 °C 下以 12,000 g 離心 15 min。吸取上清液至另一離心管, 加入 0.5 mL 異丙醇, 置於室溫 10 min 後, 同上條件離心 10 min。將沉澱以 1 mL 75% 酒精洗一次, 於 4 °C 下以 7,500 g 離心 5 min, 去殘留液體。將沉澱置於無菌操作台吹乾, 加入適量之以 diethylpyrocarbonate (DEPC) 處理過的水 ( $H_2O$ /DEPC), 於 60 °C 反應 10

min，以幫助 RNA 溶解，溶解後的 RNA 儲存於 -80 °C。

### 3.5.2 RNA 甲醛瓊脂糖膠體電泳 (Lehrach *et al.*, 1977)

秤取 0.26 g 瓊脂糖粉末，加入 24.65 mL 之 1×MOPS (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0) 以微波爐加熱溶解，待回溫至 55 °C 後，再加入 5.35 mL 之 37 % 甲醛 (使最終濃度為 6.6 %)，混勻後倒入鑄膠器。取 15 µg RNA 樣品，加入最終濃度為 6.6 % 甲醛 (formaldehyde)、50 % 甲醯胺 (formamide) 及 1×MOPS，於 65 °C 加熱 15 min 後置於冰浴中。電泳前加入 10x 電泳追蹤染劑 (50% glycerol, 1 mM EDTA, 0.4% bromophenol blue, 0.4% xylene cyanol) 與 0.5 µg EtBr 混合均勻。將配製完成之甲醛瓊脂糖膠體置入電泳槽內，加入電泳緩衝液 (1×MOPS) 至覆蓋過膠體。加入 RNA 樣品後，以 50 伏特進行電泳，待染劑泳動達膠體三分之二處即可停止電泳，以 UV transilluminator 觀察結果。

## 3.6 DNA 探針之製備

### 3.6.1 DNA 探針片段之合成

用於膠體電泳遲滯分析之 DNA 探針片段，均以 PCR 合成，各探針包含之序列、PCR 所用的模版、引子及反應鍊合溫度分別如下：

(1) TRFN : *RSus1* promoter (-1117 ~ -750) 片段，其中包含 TR1

(tandem repeat 1)、TR2 及 TR3。

模版：pRS1TR1-3

引子：Forward (-1117 to -1098)

5'-AGGCAAGCTTAGGAGGAGCA

Reverse (-769 to -750)

5'-GAGAGAAACGGCTGTGTAAG

鍊合溫度：57 °C

註：斜體表示經修改的核苷酸，限制酶 (*Hind*III) 切割位則以底線標示。

(2) A-3 : *RSus1* promoter (-1059 ~ -954) 片段

模版：pRS1TR1-3

引子：Forward (-1059 to -1041)

5'- AACTTGGGAGGAGTAGGAG

Reverse (-954 to -973)

5'- GCTGAAGCTTGTCCCAGGCT

鍊合溫度：57 °C

### 3.6.2 DNA 探針片段之標幟

取 ~10 pmol 經純化的 DNA 片段，加入 4  $\mu$ L 10 $\times$  buffer (700 mM Tris-HCl, pH 7.6; 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT) 以無菌水加至總體積為 40  $\mu$ L，於 70 °C 加熱 5 min 後移入冰浴。加入預冷之 PEG-8,000 使終濃度為 5%、20 units T4 nucleotide kinase (BioLabs, M0201S) 及 10 pmole [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (10 mCi/mL, 6000 Ci/mmol)，於 37 °C 進行反應 30 min 後，以 65 °C 加熱 20 min 終止反應。

### 3.6.3 DNA 探針片段之純化

採用 MicroSpin G-50 HR column (GE 27-5330-01) 進行，利用 gel filtration 原理來去除游離之 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 或 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dNTP，而每一 MicroSpin S-200 HR Column 之樣品最適體積為 25-50  $\mu$ L。管柱事先以 735 g 離心 1 min，去除管柱中多餘的溶液後，將標幟完成之樣品加至膠體上方，再以 735 g 離心 2 min，收集流出液，即為純化之探針。

### 3.7 DNA-蛋白質交互作用之分析

#### 3.7.1 核蛋白質之抽取與分析

##### 3.7.1.1 核蛋白質之抽取 (Mitsunaga *et al.*, 1994)

在抽取水稻懸浮培養細胞之核蛋白質前，先將細胞繼代培養三天且饑餓 48 hr 後 (3.1.2 節)，分別以含有蔗糖 (12.5 mM 蔗糖及 87.5 mM 甘露醇) 及不含蔗糖 (含 100 mM 甘露醇) 之 N6 液態培養基培養 16 hr，細胞以濾紙過濾，繼以吸水紙吸去多餘培養基後，秤取 10 g 細胞，以液態氮急速冷凍後研磨成粉末，加入 200 mL 均質緩衝液 [homogenization buffer; 100 mM mannitol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.9; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.1% Nonidet P-40, 5 mM DTT, 1 mM PMSF (Lu *et al.*, 1998)] 攪拌均勻，將此均質液先以四層脫脂紗布過濾後 (可將紗布稍加擰乾)，濾液再以孔徑 80  $\mu\text{m}$  的尼龍網 (nylon mesh) 過濾 (以重力過濾即可，勿施壓擰乾)。濾液於 4 °C 以 3,300 g 離心 20 min，小心吸去上清液後 (沉澱容易打散)，加入已預冷之 100 mL 均質緩衝液懸浮沉澱，如上述條件離心後，將上清液儘可能吸除。沉澱懸濁於 9 mL 之細胞核萃取緩衝液 (nuclear extraction buffer; 10 mM Tris-HCl, pH 7.9; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 25% glycerol, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) 後，再緩慢滴入 1 mL 5 M NaCl，使終濃度為 0.5 M，並緩和攪拌以打破細胞核。30 min 後於 4 °C 下以 25,000 g 離心 30 min。吸取上清液於透析袋 (molecular weight cut-off: 3,500) 中，以預冷之 4 L 透析緩衝液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9; 100 mM KCl, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 20% glycerol, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) 於 4 °C 進行透析，於 5 hr 後更換緩衝液，繼續透析 12 hr。透析後之核蛋白質萃取液再於 4 °C 下以 25,000 g 離心 30 min，吸取上清液以 Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 ( molecular weight cut-off: 10,000) 濃縮至約 1 mL 後 (核蛋白質濃度約 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )，分裝至微量離心管中，立即以液態氮凍結，置於 -80 °C 貯存。

### 3.7.1.2 免疫共沉澱法

取 0.1 g protein A Sepharose (GE, 17-0780-01)，以 2 mL 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 潤濕，靜置冰上 2 hr。在 4 °C 下以 1,000 g 低速離心 1 min，去除上清，以免疫共沉澱緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 15 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0.1% TX-100) 清洗四次。最後懸浮於免疫共沉澱緩衝液中，使 Protein A Sepharose 濃度為 100 mg/mL，並加入最終濃度為 1 mM sodium azide 用以抑菌，最後存於 4 °C 冰箱中備用。

取蛋白質樣本 200 µg，加入 10 µL anti-RSuS1 多株抗體、2× 免疫共沉澱緩衝液 250 µL，以及新鮮配製之 PMSF 與 DTT 使最終濃度皆為 1 mM，最後以二次水補至 500 µL，於 4 °C 翻轉反應過夜。在 4 °C 下以 12,000 g 離心 10 min，取上清加入 50 µL protein A Sepharose 溶液，於 4 °C 翻轉反應 3 hr。之後以低速離心 1 min，去除上清液，再以免疫共沉澱緩衝液反覆清洗膠體三次。加入 25 µL 2× 樣品緩衝液 (125 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, pH 6.8) 於膠體中，以 100 °C 加熱 10 min，離心後取上清進行電泳分析。

### 3.7.1.3 以 Percoll 梯度超高速離心進行細胞核純化及核蛋白質之抽取

(修改自 Gaudino and Pikaard, 1997)

抽取水稻懸浮培養細胞之培養與均質同 3.7.1.1。而均質液以四層脫脂紗布及孔徑 80 µm 的尼龍網過濾後，濾液於攪拌的狀態中緩慢滴入 10 % Triton X-100 使終濃度為 0.5 %，以破壞其他胞器之膜，接著再以孔徑 20 µm 的尼龍網進行過濾後，濾液於 4 °C 以 14,000 g 離心 15 min。沉澱以 9.5 mL 之核回溶緩衝液 (1 M sucrose; 50 mM Tris-HCl, pH 7.9; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 10 µM 2-mercapoethanol; 0.2 µM PMSF) 先懸浮再加入 0.5 mL 100% Percoll solution (34.23 g sucrose; 5 mL 之 1 M Tris-HCl, pH 7.9; 0.5 mL

之 1 M MgCl<sub>2</sub>; 0.5 mL 之 1 M KCl; 34 μL 之 14.3 M 2-mercaptoethanol; 100 μL 之 2 mM PMSF)。將此核懸浮液緩慢加至 Percoll 梯度溶液 [15%, 30%, 45%, 60% 各 10 mL (由 100 % Percoll solution 稀釋後而得)] 上層，先以 2,000 g 懸壁式離心 10 min 再以 8,000 g 離心 20 min 後，於 30% 與 45% 之介面及 45% 與 60% 之介面可收得細胞核。將收集得之細胞核加入 5 倍體積之核萃取緩衝液，混合均勻，於 4 °C 以 1,500 g 離心 10 min。沉澱懸濁於 9 mL 之細胞核萃取緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.9; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 25 % glycerol, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) 後，再緩慢滴入 1 mL 之 5 M NaCl，使終濃度為 0.5 M，緩和攪拌以打破細胞核。而其後步驟同 3.7.1.1。

#### 3.7.1.4 蛋白質定量 (Bradford, 1976)

在 96 槽微量滴定盤中操作，每槽加入 50 μL 適當稀釋之蛋白質溶液，再加入 200 μL Coomassie Brilliant Blue G-250 試劑 (Protein assay dye reagent concentrate, Bio-Rad 500-0006，稀釋 4 倍後使用)，靜置 10 min，測定 A<sub>570 nm</sub>。同時以牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, Sigma)，作標準曲線。

#### 3.7.1.5 蛋白質膠體電泳

將蛋白質樣品液加入等體積的 2×樣品緩衝液 (125 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, pH 6.8) 及 1/5 體積追蹤染劑 [10% (w/v) bromophenol blue, 50% glycerol]，混合均勻，於 100 °C 沸水浴中加熱 5 min 後，置冰浴中 1 min。取 25 μL 之樣品注入膠片 (12.5% SDS-PAGE) 之樣品槽。以電泳緩衝液 (90 mM Tris base, 80 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.4) 進行電泳 (固定電壓 120 V)，待追蹤染劑

泳動出膠體外後即停止電泳。

### 3.7.1.6 蛋白質染色

將電泳完畢的膠片浸入 CBR 染色液 [0.75 g Coomassie brilliant blue R-250, Sigma) 溶於 250 mL 甲醇後，再加入 250 mL 二次水及 50 mL 醋酸] 中，震盪 30 min 後倒出染色液，接著以脫色液 (10% acetic acid, 20% methanol) 脫色，待膠片背景完全透明後，進行膠片乾燥。

### 3.7.1.7 蛋白質轉印

將電泳後之膠體浸入轉印緩衝液 (25 mM Tris-Cl, 0.192 M glycine, pH 8.3, 10 % methanol) 中平衡 10 min，同時將 PVDF (Immobilon PVDF transfer membrane, Millipore IPVH 00010) 先以甲醇浸潤 1-2 sec 潤濕後，再泡入轉印緩衝液中平衡後待用。切兩張稍大的濾紙，以轉印緩衝液潤濕後使用。取卡夾，先墊一片多孔性海綿，上鋪一張濾紙，再小心鋪上 PVDF。PVDF 上滴數滴緩衝液後，鋪上膠片，再蓋一層濾紙，中間不可有氣泡，把整個膠片卡夾裝好。置入已放有轉印緩衝液的轉印槽中，PVDF 面向正極，膠片面向負極，以 400 mA 電流進行轉印 1 hr。

### 3.7.1.8 免疫呈色法

將轉印後的 PVDF 膜浸在 6 M Urea-PBST [6 M Urea, 130 mM NaCl, 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 % (v/v) Tween-20]。(進行 Native-PAGE 時，則不必經過 6 M Urea-PBST 清洗)。於室溫緩慢震盪 1 h 後，以 PBST 洗三次，每次 10 min。加入 10 mL NET [0.25 % gelatin, 0.15 M NaCl, 5.0 mM EDTA, 50 mM Tris base, 0.05 % (v/v) Tween 20]，於室溫下反應 1 hr。加入以 NET 稀釋後之一次抗體，於室溫中反應 1 hr。再以 PBST 洗三次，每次 10 min。



加入以 NET 稀釋後之二次抗體，於室溫反應 1 hr。再以 PBST 洗三次，每次 10 min。將轉印膜以 PBS (130 mM NaCl, 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) 潤洗後，以 DAB 溶液 [取 DAB (diaminobenzidine, Sigma) 6 mg 溶於 9 mL PBS，與 1 mL 0.3 % (w/v) CoCl<sub>2</sub> 混合液，再加入 10 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] 呈色。在背景加深前倒去 DAB，以水沖洗數次後晾乾；或將轉印膜以 ECL (PIERCE) 呈色：取等量體積之 A 液與 B 液混合後加至膜上，之後再以 x-ray film 進行冷光顯影。

### 3.7.2 DNA 競爭片段之合成

小於 40 bp 以下之 DNA 片段委託廠商合成。將廠商合成之單股 DNA 片段，取相同莫耳數之互補 DNA 片段於微量離心管中混合均勻，以 100 °C 加熱 10 min 後，關閉電源，靜置冷卻至室溫，即得互補股相互黏合之 DNA。合成之片段序列及其於 *RSusI* 啟動子上之位置如下：

#### (1) A-3-1

*RSusI* promoter -1064 ~ -1032

5'-AGGCGAACTTGGGAGGAGTAGGAGCGGCGGCGG-3'

3'-TCCGCTTGAACCTCCTCATCCTCGCCGCGCC-5'

#### (2) A-3-2

*RSusI* promoter -1045 ~ -1007

5'-AGGAGCGGCGGCGGCGGGTGAGCGGCGGCGGCGACAAC-3'

3'-TCCTCGCCGCGCCGCCCCACTCGCGCCGCGCCGCTGTTG-5'

#### (3) A-3-3

*RSusI* promoter -1011 ~ -977

5'-ACAACAGGCGAGTGTAGGAGGAGCGTCGGCAGTGG-3'

3'-TGTTGTCCGCTCACATCCTCCTCGCAGCCGTCACC-5'

(4) A-3-4

*RSusI* promoter -981~ -954

5'-AGTGGGCGAGCCTGGGACAAGCGGCAGC-3'

3'-TCACCCGCTCGGACCCTGTTTCGCCGTCG-5'

以下各片段為 DNA 片段 A-3-2 經改變部分核苷酸後所得之序列

(5) A-3-2-M1

5'-AGGAT**TATTAT**GCGGCGGGTGAGCGCGGCGGGCGACAAC-3'

3'-TCCT**ATAAT**ACGCCGCCACTCGCGCCGCGCCGCTGTTG-5'

註：粗斜體表示經修改的核苷酸。

(6) A-3-2-M2

5'-AGGAGCGGCG**TATTAT**GGTGAGCGCGGCGGGCGACAAC-3'

3'-TCCTCGCCGC**ATAAT**ACCACTCGCGCCGCGCCGCTGTTG-5'

(7) A-3-2-M3

5'-AGGAGCGGCGGCGGGTGAGCG**ATTAT**CGGCGACAAC-3'

3'-TCCTCGCCGCCGCCGCCACTCGCT**TAAT**AGCCGCTGTTG-5'

(8) A-3-2-M4

5'-AGGAGCGGCGGCGGGTGAGCGGCG**ATTAT**ACAAC-3'

3'-TCCTCGCCGCCGCCGCCACTCGCGCCGCT**TAAT**ATGTTG-5'

(9) A-3-2-M5

5'-AGGAT**TATTAT**GCGGCGGGTGAGCG**ATTAT**CGGCGACAAC-3'

3'-TCCT**ATAAT**ACGCCGCCACTCGCT**TAAT**AGCCGCTGTTG-5'

(10) A-3-2-M6

5'-AGGAT**TATTAT**GCGGCGGGTGAGCGGCG**ATTAT**ACAAC-3'

3'-TCCT**ATAAT**ACGCCGCCACTCGCGCCGCT**TAAT**ATGTTG-5'

(11) A-3-2-M7

5'-AGGAGCGGCG**TATTAT**GGTGAGCG**ATTAT**CGGCGACAAC-3'

3'-TCCTCGCCGC**ATAAT**ACCACTCGCT**TAAT**AGCCGCTGTTG-5'

(12) A-3-2-M8

5'-AGGAGCGGCG**TATTAT**GGTGAGCGGGCG**ATTAT**ACAAC-3'

3'-TCCTCGCCGC**ATAAT**ACCACTCGCGCCGCT**TAAT**ATGTTG-5'

(13) A-3-2-M9

5'-AGGAGCGGCGGGCGGGCG**TTTGATAT**CGGCGGGCGACAAC-3'

3'-TCCTCGCCGCCCGCCG**AACTAT**AGCCGCGCCGCTGTTG-5'

(14) A-3-2-M10

5'-AGGAT**TATTATTATTAT**GGTGAGCGGGCGGGCGACAAC-3'

3'-TCCT**ATAATAATAAT**ACCACTCGCGCCGCGCCGCTGTTG-5'

(15) A-3-2-M11

5'-AGGAGCGGCGGGCGGGTGAGCG**ATTATATTAT**ACAAC-3'

3'-TCCTCGCCGCCCGCCCACTCGCT**TAATATAAT**ATGTTG-5'

(16) A-3-2-M12

5'-AGGAT**TATTATTATTAT**GGTGAGCG**ATTATATTAT**ACAAC-3'

3'-TCCT**ATAATAATAAT**ACCACTCGCT**TAATATAAT**ATGTTG-5'

### 3.7.3 膠體電泳遲滯分析法 (Gel-retardation Assay; Electrophoretic Mobility Shift Assay) (Revzin, 1987; Fried, 1989)

30  $\mu$ L 反應液中包含：17 mM Hepes-KOH, pH 7.9; 60 mM KCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.12 mM EDTA, 17 % glycerol, 1.2 mM DTT, 0.6 mM PMSF, 2  $\mu$ g poly (dI-dC) (GE 27-7880), 6  $\mu$ g 核蛋白質及 2 ng 探針 DNA，並視實驗需求加入不

同含量的競爭 DNA，混合均勻，於室溫下靜置 20 min (Mikami *et al.*, 1987)。

製備 12×14×0.15 公分之原態 5% 聚丙烯醯胺膠體 (acrylamide: *N,N'*-methylene bis-acrylamide = 29:1)，以 0.5×TBE 電泳緩衝液 (45 mM Tris-HCl, pH 8.3; 45 mM boric acid; 1 mM EDTA)，於 4 °C 下，以 100 V 預跑 1 hr，接著將上述反應液加入樣品槽中，以 200 V 進行電泳，待追蹤染劑泳動至適當位置後 (第一條為 bromophenol blue，泳動所代表位置為 65 bp)，停止電泳。將膠片覆蓋濾紙上，於膠片乾燥機中乾燥後 (80 °C, 30 min)，以 X-ray 底片或 IP 板進行自動放射顯影。

### 3.7.4 DNA 親和膠體層析法

Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) 為一種磁性聚苯乙烯的磁珠，其表面是以共價鍵結合上 Streptavidin，可與帶有 biotin 的 DNA 產生專一性結合，因此可用來進行 DNA 結合蛋白質之純化。純化方法依 Invitrogen 操作手冊建議方法進行。取 200 pmol 具有 biotin 連結之 DNA 片段 A-3-2 (委託廠商合成 biotin 連結在 5' 端) 與 1 mg 的 Dynabeads 混合，取核蛋白質 1 mg 先與 0.1 μg/μL poly(dI-dC) 於冰上反應 10 min，以結合緩衝液 (17 mM Hepes-KOH, pH 7.9; 60 mM KCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.12 mM EDTA, 17% glycerol, 1.2 mM DTT, 0.6 mM PMSF) 調整至體積 500 μL，加入 2 mg 的已結合 DNA 磁珠於 4 °C 反應 30 min。利用磁座將磁珠吸附住後，去除上清，加入 1 mL 反應緩衝液懸浮磁珠，再同上列用磁座吸附磁珠，移除上清，以去除非專一性之結合物，此清洗步驟共重複 6 次。最後利用溶離緩衝液 (結合緩衝液中另加入 500 mM NaCl) 將結合蛋白質溶離出。

### 3.7.5 Southwestern 分析 (Nature Protocols 2008 (3), 51 – 58)

將上述純化的核蛋白質進行 12.5% SDS-PAGE 電泳後，將蛋白質轉印至

PVDF 膜，於 Urea-Buffer (即上述結合緩衝液中另加 6 M Urea) 中進行反應 3 hr，其間每小時更換一次緩衝液。以結合緩衝液進行洗滌三次，每次 10 min。以復性緩衝液 (結合緩衝液另加 5 % non-fat milk) 於室溫反應過夜。更換復性緩衝液並加入放射線標識之探針 (DNA 片段 A-3-2) 20 pmol ( $2.0 \times 10^7$  cpm)，於室溫下以 50 rpm 震盪反應過夜。以沖洗緩衝液 (結合緩衝液中另加 0.25 % non-fat milk) 進行洗滌 3 次，每次 15 min。待轉印膜乾燥後，以 IP 板進行放射顯影。

### 3.7.6 蛋白質身份鑑定

由親和層析與 southwestern blot 結果得到的候選蛋白質的身份鑑定，是委託本院共同儀器中心進行 in gel digestion 及中研院生化所進行 MALDI-TOF-MS 分析，結果以 Mascot Search (<http://www.matrixscience.com/>) 進行序列比對。

## 3.8 *OsPura* cDNA 之選殖

### 3.8.1 反轉錄反應

由水稻懸浮培養細胞抽 total RNA 並以電泳分析檢定品質後，以 SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen) 進行反轉錄反應。取 5  $\mu$ g RNA 加入 1  $\mu$ L 之 50  $\mu$ M oligo-dT<sub>12-18</sub> primer 及 1  $\mu$ L 之 10 mM dNTP，以 H<sub>2</sub>O/DEPC 調整至 10  $\mu$ L，於 65°C 反應 5 min 後，置於冰上至少 1 min。加入 10  $\mu$ L 混合反應液 (2x RT buffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 200 U SuperScript reverse transcriptase)，於 50°C 下反應 50 min 後，以 85°C 加熱 5 min 終止反應，即可得到 cDNA。

### 3.8.2 *OsPura* cDNA 之擴增

*OsPura* 基因之 ORF 全長是分別從 cDNA 及 genomic DNA 增殖得到兩段部份長度，再以 PCR 增殖得到全長。所用模版及引子如下：

(1) *OsPura* (101 nt ~ 927 nt)

模版：cDNA

引子：Forward (101 nt to 117 nt)

5'-ACGTGGAGCTCGTCAGC

Reverse (927 nt to 907 nt)

5'-TCATCTCTGACTGGACTCCAC

鍊合溫度：62 °C

(2) *OsPura* (1 nt ~ 154 nt)

模版：genomic DNA

引子：Forward (1 nt to 12 nt)

5'-ATGGACGGCGGC

Reverse (154 nt to 134 nt)

5'-CGAAGTAGAACAGCTTGTGCT

鍊合溫度：59 °C

註：以 Phusion DNA polymerase (FINNZYMES) 進行增殖。

### 3.9 重組 *OsPura* 蛋白質之表現及純化

重組 *OsPura* 蛋白質是以 pET16b 為表現質體，利用大腸桿菌 BLR( $\lambda$ DE3) 為宿主進行表現。因質體上帶有一段 His-tag 的序列，可使表現出之重組蛋白質為 His-tag::*OsPura* 融合蛋白質，之後可以 Metal Affinity Resin 進行純化。

### 3.9.1 表現質體建構

將 OsPura 之 ORF 以 *Nde*I 及 *Bam*HI 接入表現質體 pET16b，所需 DNA 片段以 PCR 合成，模版及引子如下：

模版：OsPura ORF

引子：Forward

5'-**CGTCATATGGACGGCGGC**

Reverse (154 nt to 134 nt)

5'-**CGTGGATCCTCATCTCTGACTGGACTCCAC**

鍊合溫度：72 °C

註：粗體表示外加的核苷酸，限制酶切位則以底線標示。

### 3.9.2 小量培養

將帶有可表現重組 OsPura 質體之菌株，培養於 2x YT (1.6 % Bacto-tryptone, 1 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 100 mg/mL ampicillin, pH 7.0) 液體培養基，以 150 rpm 於 37 °C 震盪培養 12 hr。將培養過之菌液加入 50 倍體積 (v/v) 之新鮮的 2xYT，培養至 OD<sub>600</sub> 為 0.5 ~ 0.6 後，加入 IPTG 最終濃度為 1 mM，繼續於 37 °C 震盪培養 3 hr。以 800 g 離心 10 min。收集菌體，再以超音波細胞破碎機進行破菌，之後以 12,000 g 離心 30 min，上清即為可溶性蛋白質。

### 3.9.3 親和膠體層析法

取適量之 TALON Metal Affinity Resin 膠體加入層析管柱中，加入 10 倍膠體體積之二次水進行流洗，再以平衡緩衝液 (50 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl, pH 7) 流洗 10 倍體積。將上述破菌離心後之上清液加入管柱中，封住管柱上下方出口，於 4 °C 翻轉反應 1 hr。待未結合之蛋白質流出後，先以 20 倍

膠體體積流洗後，再以含 50 mM imidazole 之平衡緩衝液流洗 20 倍膠體體積，最後再以 5 倍膠體體積之溶離緩衝液 (50 mM sodium phosphate, 150 mM imidazole, 0.3 M NaCl, pH 7) 將目標蛋白質溶離下，每管收集 1 mL，進行蛋白質電泳及膠體遲滯分析。

### 3.10 *OsPura* 之 real-time RT-PCR 分析

利用 real-time RT-PCR 將分別對蔗糖及甘露醇培養所得之細胞，偵測 *OsPura* 之基因在轉錄層次是否受蔗糖誘導。

本實驗以已知可受蔗糖誘導之 *RSus1* 基因為正控制組，且以 *eEF1 $\alpha$*  基因為內生性控制組 (internal control)。分別以 *RSus1* 與 *eEF1- $\alpha$*  之 3'-UTR 序列設計引子對，而 *OsPura* 則以序列中之保守區域進行設計 (利用 Primer Express V2.0, Applied Biosystems 軟體輔助設計)。

各基因之引子對如下：

*RSus1* forward primer: 5'-CAACATCTCAGGCTGAGACTC

*RSus1* reverse primer: 5'-CCAAATTCAATCGACCTTAC

*eEF1- $\alpha$*  forward primer: 5'-CTGCTCGCAATGTGCACTATGT

*eEF1- $\alpha$*  reverse primer: 5'-GCATTCCAAAACAGCCGATG

*OsPura* forward primer: 5'-GGTTGATTTGCCTCCTCAGGA

*OsPura* reverse primer: 5'-ACCCCTGTTGTTGCTTCCAAG

以 KAPA BIOSYSTEMS 公司之 SYBR FAST 2 $\times$  qPCR Master Mix 為主要反應液，取 10  $\mu$ L 反應液加入經稀釋 10 倍所得之各 cDNA 5  $\mu$ L【進行 RT-PCR 前，RNA 先以 TURBO DNA-free kit (Ambion) 去除 DNA】，以及各



引子對 2.5  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{M}$ )，總體積共 20  $\mu\text{L}$ 。混合均勻後，以 ABI prism 7000 sequence detector system 進行 PCR 反應，條件如下：

Step 1 Activation : 95  $^{\circ}\text{C}$  , 3 min

Step 2 Denaturation : 95  $^{\circ}\text{C}$  , 3 sec

Step 3 Annealing 與 elongation : 60  $^{\circ}\text{C}$  , 31 sec

重複 step 2 至 step 3，進行 40 cycles。

以螢光訊號偵測 PCR 反應，當 PCR 進入 geometric phase 且其效率為 100%時，定義此 cycle 數為  $C_T$  (threshold cycle) 值。依 2006 年 Dorak 所提之計算方法為主，本實驗之計算法如下：

$$\Delta C_T = C_{T \text{ target gene}} - C_{T \text{ internal control gene}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ treated}} - \Delta C_{T \text{ 3d}}$$

$$\text{mRNA abundance} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\text{Relative fold change in gene expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

(Treated 表示經蔗糖或甘露醇處理不同時間後；3d 表示繼代培養 3 天後的水稻懸浮培養細胞)

### 3.11 粒子槍基因轉殖

將外來基因轉殖至植物體的方法有很多種，可依目的不同選取不同的轉殖方法，本研究的目的在於觀察 RSuS1 蛋白質於細胞中分佈情形，故先以粒子槍來進行短暫表現。粒子槍基因轉殖法是將 DNA 覆著於細微的金或鎢粒子上，再以高壓衝力將粒子撞擊到細胞內，同時 DNA 也被送入細胞，接著以顯微鏡觀察細胞中報導基因-綠螢光蛋白質 (GFP)，即可得知 RSuS 蛋白質於細胞內之定位。

### 3.11.1 植物材料之準備

本實驗以洋蔥作為短暫表現分析之材料，將新鮮洋蔥洗淨後，於無菌操作檯中進行實驗。切除頭尾後，取其第三層鱗莖以內較年輕之細胞，使用鑷子將內層的表皮撕下，每片長寬約 2.5 公分大小，置於含 4 % agar 之固態 N6 培養基上，於 25 °C 避光培養 12 hr。

### 3.11.2 金粒子之製作

取 60 mg 金粉粒子 (直徑 1.0  $\mu\text{m}$ ) 至 1.5 mL 微量離心管中，加 1 mL 新鮮配製的 70 % 酒精，劇烈震盪 5 min 後靜置 15 min。於室溫離心 (10,000 g, 5 sec) 後吸去上清液。沈澱加入 1 mL 無菌水，震盪 1 min 後靜置 1 min 再離心 (10,000 g, 5 sec)，吸去上清液，重複無菌水處理的步驟二次，沈澱以 1 mL 50 % 無菌甘油混合均勻 (金粒子濃度約為 60 mg/mL)，分裝成每管 50  $\mu\text{L}$  (約 3 mg)，保存在 -20 °C 備用。

### 3.11.3 具 DNA 覆著之金粒子製備

取上述處理過的金粒子一管，加入 5  $\mu\text{L}$  欲轉殖之質體 DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )、20  $\mu\text{L}$  之 0.1 M spermidine (Sigma) 和 50  $\mu\text{L}$  之 2.5 M  $\text{CaCl}_2$ ，震盪 3 min 後靜置 1 min，於室溫離心 (10,000 g, 2 sec) 後吸去上清液，以 140  $\mu\text{L}$  之 70% 酒精洗滌沈澱，不震盪，隨後吸去上清液，再加入 140  $\mu\text{L}$  絕對酒精洗滌沈澱物，不震盪，隨後吸去上清，接著加入 50  $\mu\text{L}$  絕對酒精，溫和震盪使金粒子懸浮於溶液中。

### 3.11.4 粒子槍操作

參照 Bio-Rad PDS-1000/He 操作手冊進行。將粒子槍的金屬組件 (rupture

disk retaining cap, macrocarrier cover lid, macrocarrier holder, spring-ring, fixed nest, stopping screen support, spacer rings) 及消耗組件 (rupture disk, macrocarrier, stopping screen) 浸泡於 75 % 酒精 30 min 後，於無菌操作檯中晾乾，粒子槍的真空室也用 75 % 酒精擦拭以保持無菌狀態。用 macrocarrier insertion tool 將 macrocarrier 壓進 macrocarrier holder 中，吸取已覆著好質體 DNA 的金粒子 6.6  $\mu$ L，均勻塗抹在 macrocarrier 上，待其揮發至乾。組裝各項組件：調整 stopping screen 的高度，使 macrocarrier 的 travel distance 為 11 mm；選擇 1350 psi 的 rupture disk；rupture disk retaining cap 與 micorcarrier launch assembly 間的距離為 1/4 inch；轉殖材料與 micorcarrier launch assembly 的距離為 9 cm；組裝完成後將擊發室抽真空至 26 mmHg，進行粒子射擊，每一洋蔥切片進行三次射擊，並作二重複。

射擊後之表皮細胞，置於含 4 % agar 之固態 N6 培養基上，於 25°C 避光培養 16 - 24 hr，之後以螢光顯微鏡進行觀察。

### 3.11.5 螢光顯微鏡觀察

螢光顯微鏡的照明光必須選擇特定波長的激發光，照射在樣本上使其產生螢光，之後須在激發光與所散發螢光之混合光線中。將螢光分離出來以利觀察。因此，在特定波長的選擇中，濾鏡系統極為重要，可用於對特殊波長的光進行篩選。

在觀察轉殖洋蔥表皮細胞之前，先以固定液 (PBS 中含 1 % paraformaldehyde)，進行固定 5-10 min，之後再以 PBS 將固定液洗去。接著以 DAPI (1  $\mu$ g/mL) 進行細胞核染色 5 min、以 PBS 退染 10 min，之後將表皮細胞取至載玻片上，加滴水後小心蓋上蓋玻片，盡量避免氣泡產生。以 Olympus BX50 螢光顯微鏡進行觀察，使用濾鏡系統 (exciter filter: D425/40x, dichroic mirror: 460DCLP, emitter filter: D505/40m) 觀察 GFP 表現的情形。觀察 DAPI

之濾鏡組為 Olympus U-MWU2 (exciter filter: 330-385 nm, dichroic mirror: 400 nm, emitter filter: 420 nm)。

### 3.12 水稻原生質體之短暫表現與免疫定位分析

#### 3.12.1 原生質體之製備

成熟水稻種子以 1% 次氯酸鈉消毒 1 hr 後，以自來水洗去殘留的消毒水，之後將種子浸泡於自來水中，在 37 °C 避光催芽 2 天，並每天更換新的自來水。將發芽的種子培養置於 25°C，光照時間為 16 hr 光照/ 8 hr 黑暗之。待水稻幼苗生長約 14 天後，取其莖、葉做為分離原生質體之材料。將莖、葉細切至約 0.1 mm 大小並浸泡於酵素混合液 (0.6 M mannitol; 10 mM MES, pH 5.7; 2% Cellulase RS; 1% Macerozyme; 0.1% BSA; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) 中，於 25 °C 避光反應，以先 40 rpm 震盪反應 3.5 hr 後，再以 80 rpm 震盪反應 30 min。將反應液以 50  $\mu$ m 尼龍網 (nylon mesh) 過濾，濾液以 250 g 離心 5 min。移除上清後，將沉澱小心懸浮於緩衝液 A (0.6 M mannitol; 10 mM MES, pH 5.7) 至最終體積 2 mL。將懸浮後之原生質體緩慢加入至裝有 5 mL 緩衝液 B (20 % sucrose; 10 mM MES, pH 5.7) 之離心管溶液上，以 40 g 離心 10 min。離心後，取上層完整的原生質體，加入 10 mL W5 溶液 (154 mM NaCl; 125 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 2 mM MES, pH 5.7) 進行清洗，之後以 250 g 離心 5 min，重複兩次。之後將沉澱懸浮於 10 mL W5 溶液，冰浴 30 min。將原生質體置換至 MMg 溶液 (0.6 M mannitol; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 4 mM MES, pH 5.7) 且調整細胞密度至  $5 \times 10^6$  個/ mL，冰浴 10 min，即可準備轉形。

#### 3.12.2 PEG 轉形法

取 100  $\mu$ L 原生質體加入 10  $\mu$ L 質體 DNA (約 10  $\mu$ g)，混合均勻，加入 110  $\mu$ L 40 % PEG 溶液 [0.6 M mannitol, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 40% (v/v) PEG

4000]，混勻後，於 23 °C 下反應 19 min。之後加入 1 mL W5 溶液，混勻後以 250 g 離心 5 min，沉澱以 3 mL 培養液 (0.4 M mannitol; 4 mM KCl; 4 mM MES, pH 5.7) 小心懸浮，並將細胞移至 Falcon 六孔細胞培養盤，於 25 °C 避光培養 18-24 hr，以雷射共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5) 進行觀察。

### 3.12.3 Co-transformation assay

實驗所需之 reporter 質體及 effector 質體，其建構所需之 DNA 片段 A-3 (*Pst*I / blunt end 與 *Hind*III / blunt end) 及 DNA 片段 Flag-OsPura (blunt / *Not*I) 由 PCR 合成，模版及引子如下：

#### (1) A-3 (*Pst*I / blunt end)

模版：pRS1EI

引子：Forward

5'-AACTGCAGAGGAGTAGGA

Reverse

5'-GCTGCCGCTTGTCCCAGG

鍊合溫度：52 °C

#### (2) A-3 (*Hind*III / blunt end)

模版：pRS1EI

引子：Forward

5'-CGAAGCTTGGAGGAGTAGGAAG

Reverse

5'-GCTGCCGCTTGTCCCAGG

鍊合溫度：52 °C

#### (3) Flag-OsPura (blunt / *Not*I)

模版：pET16b-OsPura

引子：Forward-1

5'-CGACGATAAGATGGACGGCGGC

Reverse

5'-CGGGCGGCCGCTCATCTCTGACTGGACTCC

AC

Forward-2 (以 forward-1 及 reverse 所得產物為模版)

5'-ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAT

GGACGG

鍊合溫度：72 °C

註：粗體及斜體分別表示，外加及改變的核苷酸，限制酶切位則以底線標示；以 Phusion DNA polymerase (FINNZYMES) 進行增殖。

(1) 及 (2) 所得之 DNA 片段接入 pBI221 質體 (圖十一)；DNA 片段 (3) 以 blunt end 及 *NotI* 接合至帶有相對應接合點 (blunt end 由 *BamHI* 經 Fill-in 而得) 之 pHBT 表現載體中，作為 effector 質體。

各取 10  $\mu$ L reporter 質體與 effector 質體，及作為 internal control 之 MTC301 質體 1  $\mu$ L，以 PEG 法共同轉入水稻原生質體。只轉入 pm35S-GUS 或 reporter 質體之實驗組別，以 pUC19 補足至相同 DNA 量。轉形之步驟同 3.11.2 節，最終將轉形後之細胞分別置於含 0.4 M sucrose 或 0.4 M mannitol 之 3 mL 培養液，培養 18 hr。之後以 12,000 g 離心 10 sec，收集細胞，去上清後，加入 250  $\mu$ L 之細胞萃取緩衝液 (100 mM  $K_2HPO_4$ , pH 7.8; 1 mM EDTA; 7 mM  $\beta$ -mercaptoethanol; 1% Triton X-100; 10% glycerol)，震盪破細胞後，可冷凍至 -80 °C，待測 GUS 及 luciferase 活性。

以 4-MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide) 粉末 (Sigma M-9130) 配製 GUS 分析緩衝液 (50 mM  $K_2HPO_4$ , pH 7.0; 1 mM EDTA; 7 mM

$\beta$ -mercaptoethanol; 0.1% Triton X-100; 0.1% SDS; 1 mM 4-MUG)。取 180  $\mu$ L GUS 分析緩衝液加入 20  $\mu$ L 細胞萃取液，混勻後，於 37 °C 進行反應，分別於 2, 10, 20, 30 min 後取 20  $\mu$ L 反應液加入 180  $\mu$ L 終止液 (0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )，於黑色不透光之 96 孔微量盤中以 DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter) 進行偵測。經 GUS 作用後之 4-MUG 可生成 4-MU，可受波長 355 nm 光激發，於 460nm 產生螢光。另以 0-100 nM 之 4-MU (溶於終止液) 作為標準曲線。

Luciferase 酵素活性主要以 Promega 公司出品之 One-Glo™ Luciferase Assay System 進行測試，取 50  $\mu$ L 細胞萃取液加入 50  $\mu$ L 基質液，將混合液加入 96 孔微量白盤，同樣利用 DTX 880 Multimode Detector 進行冷光偵測。所得之 GUS 活性以 luciferase 活性進行標準化 (normalization)，實驗經三次獨立實驗，每次實驗進行三重複。

#### 3.12.4 細胞免疫定位分析

由 3.11.1 節所得之完整原生質體，加入 20 倍體積之固定液 (3.7% formaldehyde; 0.6 M mannitol; PBS, pH 7.0) 於室溫下固定 1 hr。經 250 g 離心 5 min 後，沉澱以 PBS 清洗，重複兩次，之後以 blocking 溶液 (PBS, 1% BSA) 反應 30 min。一次抗體以 blocking 溶液稀釋後，於 4 °C 震盪反應過夜。以 blocking 溶液清洗 5 次，每次 10 min。加入 Fluor488 標定之二次抗體 (Molecular Probes, USA)，於室溫下反應 30 min。同樣以 blocking 溶液清洗 5 次，每次 10 min。接著以 DAPI (1  $\mu$ g/mL) 進行細胞核染色 1 min、退染 10 min，以雷射共軛焦顯微鏡進行觀察。

## 第三章 結果與討論

### 1. 核蛋白質與 *RSus1* 啟動子上蔗糖調控區域之交互作用

*RSus1* 基因啟動子區域中有三段出現二次的重複序列，而這些特殊的結構是 *RSus1* 啟動子區域中所特有，並不出現於 *RSus2* 及 *RSus3*，因而我們推測這或許與 *RSus1* 的表現受蔗糖濃度調控有關。廖 (2002) 將 *RSus1* 啟動子上游作不同長度的縮減 (deletion) 後，與 GUS 基因融合，利用粒子槍法轉殖至水稻懸浮培養細胞，結果顯示 *RSus1* 基因的表現受蔗糖誘導的情形，會因 -1117 ~ -958 與 -656 ~ -571 的兩片段被縮減後，受誘導的程度明顯下降，而這二個片段都包含了 TR1 (附圖二)。以膠體電泳遲滯實驗分析後，顯示 -1117 ~ -958 此片段與核蛋白質間之親和力較強。本人在碩士班時期，為了更進一步瞭解核蛋白質與 *RSus1* 啟動子上 -1117 ~ -958 片段附近區域之結合情形，分別將 DNA 片段 TRFN (-1117 ~ -750)，A (-1117 ~ -954)，B (-1059 ~ -842) 及 C (-908 ~ -750) 進行放射線標幟作為探針，並以 TRFN 上不同區域之 DNA 片段為競爭者，與由蔗糖或甘露醇培養之細胞抽出的核蛋白質進行膠體電泳遲滯分析 (附圖三、四)；另一方面也利用 DNA 片段 TRFN 與核蛋白質進行足跡實驗 (張，2004)，整合兩項結果顯示，DNA 片段 A-3 (-1059 ~ -954) 為最可能影響 *RSus1* 基因受糖誘導所需之區域，因此便針對此區域進行後續探討。

#### 1.1 DNA 片段 A-3 與核蛋白質結合之情形

以 PCR 法合成 DNA 片段 A-3 (圖九) 並進行放射線標幟作為探針，與經蔗糖及甘露醇培養之細胞的核蛋白質進行電泳膠體遲滯分析，並以未經放射線標幟的 DNA 片段 (以下簡稱 cold DNA)，包括 A-3 及其上不同區域的序列 A-3-1, A-3-2, A-3-3, A-3-4 (圖九) 作為競爭者。在不含競爭者情況下，無論細胞以蔗糖培養與否，皆可以觀察到三種 DNA-蛋白質複合體的色帶 (圖十 A



及 B，第 2 行，A-3-P1, A-3-P2 及 A-3-P3)。Cold A-3 可與探針 A-3 競爭結合蛋白質 (圖十 A 及 B，第 3 行)。Cold A-3-1, A-3-3 及 A-3-4 皆不能與探針 A-3 競爭 A-3-P1 色帶中之蛋白質的結合，然而卻可使 A-3-P2 色帶消失及 A-3-P3 之色帶減弱 (圖十 A 及 B，第 4-5, 10-12, 13-15 行)。Cold A-3-2 則可對探針 A-3 與蛋白質之結合造成競爭性抑制，使 A-3-P1 及 A-3-P2 之色帶消失，其中增加 A-3-2 的量至 400 倍，則抑制現象更顯著 (圖十 A 及 B，第 7-9 行)。因此，我們認為 A-3-P1 主要是針對 A-3-2 的區域進行結合。而不論何種競爭者 DNA 皆可與 A-3-P2 結合，表示此處的蛋白質不僅可與 DNA 結合，也有可能是各蛋白質形成蛋白質複合體後，促使 DNA 以 loop 型式存在。而位於 A-3-P3 的色帶，不論四種競爭者皆不能使色帶消失，推測其可能與 DNA 間缺乏專一性結合。

綜合上述結果，可知 A-3 片段可能存在多個蛋白質結合區域。而具有 39 bp 的 A-3-2 片段 (-1045 ~ -1007)，其 5' 端含有屬於 TR1 的 5 bp，且可能含有至少一個蛋白質的結合區域。而位於 A-3 片段的蛋白質結合區域中，可能存在可調控基因的 *cis-elements*。雖然從 A-3 的序列中並無發現任何具保守性，且亦無可受糖誘導相關的 motif，但由 A-3-2 序列中 (5'-AGGAGCGGCGGCGGCGGGTGAGCGGCGGCGGCGACAAC-3') 卻存在特有的 purine rich (27/39 bases) 及高比例的 GC bases (82%)。

## 1.2 DNA 片段 A-3-2 序列之分析

A-3-2 之序列可發現除了富含 purine 及 GC 外，序列之排列存在高度的重複性，其中 GCGGCG 序列出現四次重複。分別將這四重複的序列，命名為 I, II, IV 及 V 區，其中相連接處則為 III (圖十一，Wt)。依次將這五個區域分別進行序列改變，共得 12 條具不同突變的 DNA 序列。

以 DNA 片段 A-3 為探針，與經蔗糖及甘露醇培養之細胞的核蛋白質進行電泳膠體遲滯分析，並分別以 A-3, A-3-2 及突變之 DNA 片段 M1 ~ M12, 作為競爭者。在不含競爭者情況下，無論細胞以蔗糖培養與否，皆可以觀察到三種 DNA-蛋白質複合體的色帶 (圖十二、十三及十四，第 2 行及第 9 行，A-3-P1, A-3-P2 及 A-3-P3)。Cold A-3 可與探針 A-3 競爭結合蛋白質 (圖十二、十三及十四，第 3 行)，Cold A-3-2 則可對探針 A-3 與蛋白質之結合造成競爭性抑制使 A-3-P1 及 A-3-P2 之色帶消失 (圖十二、十三及十四，第 4 行及第 10 行)。突變之 DNA 片段 M1 可對探針 A-3 與蛋白質之結合造成競爭性抑制 (圖十二，第 5 及 11 行)，使 A-3-P1 之色帶減少與 A-3-P2 之色帶消失；M2 則使 A-3-P1 與 A-3-P2 之色帶減少 (圖十二，第 6 及 12 行)；M3 亦可使 A-3-P1 與 A-3-P2 之色帶消失 (圖十二，第 7 及 13 行)；M4 可使 A-3-P1 與 A-3-P2 之色帶減少 (圖十二，第 8 及 14 行)；M5 使 A-3-P1 之色帶減少 (圖十三，第 5 及 11 行)；M6 使 A-3-P2 之色帶消失 (圖十三，第 6 及 12 行)，但以蔗糖培養所得的核蛋白質形成之 DNA-蛋白質複合體 A-3-P1 之色帶則減少 (圖十三，第 6 行)；M7 使 A-3-P1 之色帶減少 (圖十三，第 7 及 13 行)；M8 使以蔗糖培養所得的核蛋白質形成之 DNA-蛋白質複合體 A-3-P1 之色帶減少 (圖十三，第 8 行)；M9 使 A-3-P1 之色帶減少 (圖十四，第 5 及 11 行)；M10 使 A-3-P1 之色帶減少 (圖十四，第 6 及 12 行)；M11 與 M12 皆使以蔗糖培養所得的核蛋白質形成之 DNA-蛋白質複合體 A-3-P1 之色帶減少 (圖十四，第 7 及 8 行)，而 M11 與以甘露醇培養所得的核蛋白質形成之 DNA-蛋白質複合體 A-3-P1 之色帶亦減少 (圖十四，第 13 行)。綜合以上結果可知 (表二)，當 I, II, IV 及 V 區中，任兩個區域改變時，會影響色帶 A-3-P2 處之蛋白質與 DNA 的結合 (除 M6 片段外)；而 III 區改變時也會影響色帶 A-3-P2。對於色帶 A-3-P1 處之蛋白質與 DNA 的結合，不論對於糖誘導與否所得的核蛋白質，會因為 V 區的改變而受最大的影響。此外，III 區會與糖誘導所得的核蛋白質之結合力大於無糖誘導所得的核

蛋白質 (圖十四, 第 12 及 14 行)。

### 1.3 與 DNA 片段 A-3-2 序列結合蛋白質之純化

由先前足跡實驗 (張, 2004) 及上述的結果顯示 A-3-2 為 *RSus1* promoter 主要的蛋白質結合區域之一, 於是以 A-3-2 為誘餌片段, 利用 DNA 親和層析法從蔗糖或甘露醇培養之細胞的核蛋白質 (分別簡稱 S/NP 及 M/NP) 來純化與其結合之蛋白質。實驗分成兩組進行, 一組是將兩種核蛋白質分別直接與 biotin-labeled A-3-2 進行親和層析, 另一組則是將核蛋白質先以未標識之 DNA 片段 A-3-2 (作為競爭者) 反應後, 再與 biotin-labeled A-3-2 進行親和層析。由圖十五 A 之 SDS-PAGE 分析結果顯示, 不論兩種核蛋白質在純化過程中是否與競爭者 DNA 先結合, 經親和層析純化的蛋白質色帶皆很複雜, 其中在 70 kDa, 38 kDa 及 26 kDa 處之色帶較明顯 (圖十五 A)。然而, 在純化的過程中, 曾試圖提高結合及流洗緩衝液的嚴苛度, 期望可以去除一些非專一性結合的現象, 但也同樣造成目標結合蛋白質的流失。於是我們進一步以放射線標識之 A-3-2 為探針, 進行 southwestern blot 來確認專一結合的蛋白質, 結果顯示兩組實驗中的四個樣品皆在 35 kDa 處有明顯的色帶 (圖十五 B), 而 S/NP 及 M/NP 在沒有競爭 DNA 片段存在下, 在 P2 及 P1 處也有主要及次要色帶 (圖十五 B, 第 1, 3 行), 其中 S/NP 組的色帶較 M/NP 為明顯。而當加入競爭者 DNA 後, P2 及 P1 處的色帶皆消失 (圖十五 B, 第 2, 4 行), 顯示此探針 A-3-2 與此兩蛋白質之結合具專一性; 此外 P1 及 P2 處的蛋白質可能受蔗糖誘導而產生, 或在含有蔗糖的條件下會提高與 A-3-2 的結合。

將 S/NP 及 M/NP 兩實驗組之 P1 及 P2 處的色帶從膠片上切下 (圖十五 A, 第 1, 3 行), 並以 MALDI-TOF-MS 進行蛋白質身份鑑定。經 Mascot Search (<http://www.matrixscience.com/>) 中的 Peptide Mass Fingerprint 分析, 以

NCBI nr 資料庫進行比對，S/NP 實驗組之 P2 分析結果顯示分數較高的前三者為 hypothetical protein OsI\_01264 [*Oryza sativa* Indica Group] (GI:218187924)、PUR Alpha-1 [*Zea mays*] (GI:226509164) 及 Purine rich element binding protein B-like [*Oryza sativa* Japonica Group] (GI:56783985) (圖十六 A, 箭頭處)，且其序列涵蓋率 (sequence coverage) 分別為 49%、44% 及 40% (圖十六 B, C 及 D)。此蛋白質與阿拉伯芥中發現的 Pura-1 在序列上相似，因此將其命名為 OsPura。而 S/NP 實驗組之 P1 與 M/NP 實驗組分析之結果，有可能因蛋白質量過少，因而比對不到候選蛋白質。

#### 1.4 *OsPura* cDNA 之選殖與 *OsPura* 蛋白質結構模擬

由水稻懸浮培養細胞抽取而來的 total RNA，經反轉錄為 cDNA 後，針對 *OsPura* 基因之兩端設計專一性引子 (第二章 3.8.2 節) 試圖夾出完整的 ORF。由於 *OsPura* 基因 5' 端前 100 bp 具 GC rich 的特性，經多次實驗後仍缺乏 5' 端，無法得到完整全長，推測可能在反轉錄反應的過程中 mRNA 容易形成二級結構而致。於是另外以 gnomonic DNA 為模板，並重新設計引子 (第二章 3.8.2 節)，針對基因 5' 端前 154 bp 進行增殖，之後再以 PCR 得到完整 927 bp 的 ORF。

此 ORF 表現出的蛋白質產物具有 308 個胺基酸 (圖十七)，推測其分子量約為 33.3 kDa。其序列與 Indica 物種之 OsI\_01264 間只有一個胺基酸的差異。與其他物種之 Pur 蛋白質序列比對，OsPura 與阿拉伯芥 AtPura-1 之序列同質性 (identities) 為 73%，相似度 (similarity) 為 86%；與玉米 Pura-1 序列同質性及相似度為最高，分別為 97% 及 98%。由胺基酸序列分析的結果顯示，OsPura 在其 N 端具有 glycine-rich 的特性，且整段序列中帶有 3 個 purine-rich element binding motifs，即 PUR repeats (圖十八，A)。

爲了進一步探討 OsPur $\alpha$  蛋白質的結構，我們將此蛋白質的全長序列以 BLAST 的方式，在 PDB (Protein Data Bank) 試圖找尋適合進行結構模擬的模版。在 UniProtKB database 中，找到與 OsPur $\alpha$  序列同質性較高且同時有已知結構資訊的候選蛋白質，分別爲 *Drosophila melanogaster* Pur- $\alpha$  (PDB 3K44), tryptophanyl-tRNA synthetase (PDB 3M5W), a double-stranded RNA-activated protein kinase (PDB 1X48), SET-binding factor 1 (PDB 1V5U)。但後三者只有在小片段的比對中，才能與 OsPur $\alpha$  序列有較高的同質性。我們從中挑選比對分數最高的 *Drosophila* Pur- $\alpha$  (PDB 3K44) (Graebisch *et al.*, 2009) 作爲結構模擬的模版。*DmPur- $\alpha$*  也具有三個 PUR repeats。PDB 3K44 爲包含 *DmPur- $\alpha$*  序列中前兩個 Pur repeats (41-185 amino acid residues) 的結構。爲改善序列比對的正確性，我們同時將全長序列之 *Drosophila* Pur- $\alpha$  及 AtPur $\alpha$ ，加入 OsPur $\alpha$  與 3K44 的比對行列中，以 Discovery Studio 2.1 進行 alignment (圖十八 A)。圖十八 B 爲 OsPur $\alpha$  蛋白質結構模擬的結果，OsPur $\alpha$  結構模擬區域之序列 (residues D34-L168) 與 *Drosophila* Pur- $\alpha$  (residues E41-N185) 序列相似度達 54%。依據 PDB 3K44 爲模版，OsPur $\alpha$  (34-168) 之分子模型呈現 whirly-like 折疊狀且由八個 beta-sheets 與兩個 alpha-helices 所組成。而 PDB 3K44 與 OsPur $\alpha$  (34-168) 之間，存在兩個差異較大的區域爲連接 alpha-helices 的兩個 loops，分別位於 Helix 1 (D90-T95) 以及 Helix 2 (G144-E148)。

### 1.5 重組 OsPur $\alpha$ 蛋白質之表現、純化與 DNA 結合能力之探討

將 OsPur $\alpha$  ORF 選殖入表現載體 pET16b 中，並轉形至大腸桿菌 BRL ( $\lambda$ DE3) 中，以表現重組 OsPur $\alpha$  蛋白質 (以下簡稱 reOsPur $\alpha$ ；表現條件見第二章)。以親和膠體純化後，溶離出之蛋白質以 12% SDS-PAGE 分析，再以 anti-His tag 抗體進行免疫呈色結果顯示，除了在預期分子量之處有一主要色帶

(圖十九箭頭處) 外，也有一個泳動率較低的次要色帶被共同純化出。經 MALDI-TOF-MS 進行蛋白質身份鑑定的結果顯示，主要色帶為 reOsPurα 而次要色帶為 dihydrolipoamide dehydrogenase，為催化 lipoamide 變成 dihydrolipoamide 的酵素，後者並不影響後續電泳遲滯分析的實驗。

為瞭解 reOsPurα 蛋白質是否具有與 DNA 片段 A-3-2 結合的能力，將放射線標幟的 A-3-2 與 reOsPurα 蛋白質進行膠體電泳遲滯分析。另外，將 pET16b 質體轉入大腸桿菌 BRL ( $\lambda$ DE3)，以與誘導及純化 reOsPurα 的相同條件進行誘導表現及純化，並收集同樣分割管數的蛋白質樣本做為負控制組。在不合競爭者 DNA 情況下，分別加入 0.05  $\mu$ g 及 0.1  $\mu$ g 的 reOsPurα，可以觀察到單一之 DNA-蛋白質複合體的色帶 (圖二十，第 2, 3 行，A-3-2-P)。加入 cold A-3-2 時，可與探針 A-3-2 競爭與 reOsPurα 之結合 (圖二十，第 4 - 6 行)，且當 cold A-3-2 量為探針量的 100 倍時，則抑制現象更顯著 (圖二十，第 6 行)，而 pET16b 質體轉形入大腸桿菌表現所得的蛋白質，則不會與探針 A-3-2 產生電泳遲滯色帶 (圖二十，第 7 及 8 行)，說明了 reOsPurα 與 A-3-2 的結合具專一性。

此外利用前述 1.2 所合成之 A-3-2 突變序列為競爭者，將放射線標幟的 A-3-2 與 reOsPurα 蛋白質進行膠體電泳遲滯分析。同上述在不合競爭者 DNA 情況下，加入 0.1  $\mu$ g 的 reOsPurα，可以觀察到單一之 DNA-蛋白質複合體的色帶 (圖二十一，第 2 行，A-3-2-P)。加入不同 cold M1 ~ M12 為競爭者，當加入量為探針之 100 倍時，競爭者 M3 及 M11 會使色帶有顯著的減弱 (圖二十一，第 6, 14 行，A-3-2-P)，其餘減弱較不明顯 (圖二十一，第 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 行，A-3-2-P)。此結果說明，reOsPurα 主要結合至 A-3-2 上 I 及 II 的區域，而與 IV 區域結合的可能性較低。

## 1.6 利用水稻原生質體進行 *transactivation* 分析

由上述實驗結果得知，在 *in vitro* 下，*reOsPura* 確實可與 DNA 片段 A-3-2 結合，為進一步證實 *OsPura* 在植物細胞中是否具 *transactivation* 的功能，因而進行以下實驗。將 *OsPura* 之完整 ORF 以 PCR 方式於 5' 端接上可表現 Flag tag 的序列，再選殖至 pHBT 表現載體中，當作 effector plasmid (圖二十二 A)。此外，建構帶有兩重複的 DNA 片段 A-3 接合 35S minimal promoter 及 *GUS* 基因，作為 reporter plasmid (圖二十二 A)。將建構好之各質體分別依不同實驗組共轉入原生質體中，之後分別培養於含蔗糖及甘露醇的培養基。經轉形之各實驗組細胞，將其全蛋白質利用 SDS-PAGE 進行分離後，再以 anti-Flag tag 的抗體進行免疫呈色，以確認 effector 蛋白質有被表現 (圖二十二 B)。圖二十二 C 的實驗結果顯示，在蔗糖存在的條件下 *OsPura* 可活化 A-3::35S minimal promoter 進而增加 *GUS* 的活性。反觀若在 35S minimal promoter 或 A-3::35S minimal promoter 分別單獨存在下，即使在含蔗糖的培養條件下 *GUS* 的活性並無明顯增強。這些結果說明水稻原生質體細胞在蔗糖存在的條件下，*OsPura* 可以結合於啟動子上的 A-3 進而增進基因表現。

## 1.7 以 real-time RT-PCR 探討 *OsPura* 基因是否可受蔗糖誘導

由 1.5 及 1.6 的結果中可知，*OsPura* 蛋白質在 *in vitro* 下確實可與 A-3-2 產生專一性的交互作用；且當水稻細胞受蔗糖處理後，*OsPura* 會結合至 *RSus1* 基因啟動子上游 A-3 的區域，進而增強下游基因的表現。因此，我們進一步想探討 *OsPura* 基因是否可受到蔗糖的誘導，於是利用 real-time RT-PCR 先從基因轉錄層次來觀察。將水稻懸浮培養細胞於進行實驗前三天進行繼代，之後飢餓 48 小時，再分別以蔗糖及甘露醇處理後，於 1 h, 3 h, 6 h 及 12 h 收取細胞。抽取 RNA 及合成 cDNA 後，以針對 *RSus1*, *OsPura* 及

*eEF1 $\alpha$*  之基因專一性引子對進行 real-time PCR。*RSus1* 已知可受蔗糖誘導表現，故以其作為正控制組之；*eEF1 $\alpha$*  則為恆常表現基因。在蔗糖存在下，*RSus1* mRNA 量隨時間增長累積量增加，而甘露醇的實驗組則無此現象（圖二十三 B）。然而，*OsPura* 則不論蔗糖存在與否，其 mRNA 的累積量似乎不受影響（圖二十三 A）。由此實驗結果可知，*OsPura* 基因並不會受蔗糖誘導表現。然而，在參與調控 *RSus1* 基因表現時，*OsPura* 是否有轉譯後修飾或有其它可受糖誘導蛋白質的協助，將是之後探討的重點。

## 1.8 討論

由圖十的結果顯示，DNA 片段 A-3 與蔗糖或甘露醇培養細胞之核蛋白質可形成三個泳動率不同的 DNA-蛋白質複合體，其中 A-3-P3 的量大於 A-3-P2 及 A-3-P1。再以 cold A-3-1, A-3-2, A-3-3, A-3-4 四段 DNA 作為競爭者的實驗中發現，cold A-3-1, A-3-2, A-3-3 及 A-3-4 四者與 A-3 競爭 A-3-P2 複合體的形成。此外，A-3-2 除對 A-3-P2 競爭外，對於 A-3-P1 複合體的形成也有明顯的競爭。雖然四種競爭者 DNA 與 A-3-P1 及 A-3-P2 皆有競爭的情形產生，但先前的實驗結果，以 TRFN (-1117 ~ -750) 為探針，DNA 片段 A (-1117 ~ -954) 為競爭者的條件下，在膠體電泳遲滯分析的結果顯示，其主要的競爭為泳動率最低的色帶（附圖四，第 4 至 7 行）；而足跡實驗的區域也在 -1051 ~ -1012（張，2004），接近 A-3-2 (-1045 ~ -1007)。

藉由先前各結果：(1) 廖 (2002) 利用 cycloheximide (CHX) 抑制轉譯作用，來探討瞭解 *RSus* 基因受糖誘導表現是否需要新合成 (*de novo*) 之蛋白質參與的實驗，顯示蔗糖誘導 *RSus1* 基因的表現，是需要新合成的蛋白質參與（附圖五）；(2) 以 DNA 片段 A 及 B 為探針，來與蔗糖及甘露醇培養細胞進行膠體電泳遲滯分析的結果得知，與蔗糖或甘露醇培養細胞之核蛋白質所產生在泳動率最低之 DNA-蛋白質複合體的泳動情形不同，推測以甘露醇培養之



DNA-蛋白質複合體中，可能為不同的核蛋白質 (附圖六，第二、三行及第七、八行)；(3) 由培養細胞期間添加 CHX 與否的實驗可知，以糖誘導 *RSus1* 基因轉錄的過程中，可能是需要一些受糖誘導表現的核蛋白質參與 (附圖六，第四、五行及第九、十行)。整合以上實驗結果可知，DNA 片段 A-3 與蔗糖或甘露醇培養細胞之核蛋白質所形成三個泳動率不同的 DNA-蛋白質複合體中，A-3-P1 的 DNA-蛋白質複合體中，可能存在受糖誘導而新合成的蛋白質。由蔗糖或甘露醇培養的細胞所純化之核蛋白質，在 A-3-P1 的 DNA-蛋白質複合體皆可被 A-3 所競爭，由此推測在兩個不同的蛋白質複合體中，可能有相同的 DNA-binding protein。由圖十二與圖二十一的結果顯示，A-3-2 上之 IV 區經突變後，仍然不影響與核蛋白質或 reOsPur $\alpha$  的結合。這表示 IV 區並非 A-3-2 上與蛋白質結合的位置，且亦非 reOsPur $\alpha$  的主要結合位置。然而由圖十五 B 的結果說明，A-3-2 上具有至少兩個以上之蛋白質結合位點。

由圖十五的結果顯示，A-3-2 與蔗糖或甘露醇培養細胞之核蛋白質皆在分子量 38 kDa 處有主要的蛋白質色帶，經蛋白質身份鑑定的結果顯示為 purine-rich 結合蛋白質 — OsPur $\alpha$ 。位於 *RSus1* 基因啓動子上游 -1117 ~ -958 上存在一段 39 bp 的 purine-rich 序列，不論在 *in vitro* 或 *in vivo*，皆可與 OsPur $\alpha$  作用。將 OsPur $\alpha$  進行序列分析的結果，其屬於 PUR 蛋白質家族的一員，其序列主要區域除包含三個 PUR repeats 外，在其 N 端也存有 glycine-rich 的特徵，而這類 PUR 蛋白質家族常見於高等真核細胞中 (Gallia *et al.*, 2000; White *et al.*, 2009)。動物中的 Pur $\alpha$  可專一性的結合至帶有 purine-rich element 的 DNA 或 RNA 上，且可能參與 DNA 的複製，基因轉錄的正或負調控，轉譯以及控制細胞週期 (Gallia *et al.*, 2000; White *et al.*, 2009)。

阿拉伯芥之 AtPur $\alpha$ -1，其主要的結合區域為 *eEFLA* 基因上游的 *telo-box* (5'-AAACCCTAA-3')，且與調控細胞週期有關。雖然 OsPur $\alpha$  與 AtPur $\alpha$ -1 的序列相似度有 71.1%，但位於 *RSus1* 啓動子上游可與 OsPur $\alpha$  結合的 A-3-2

序列上並沒有 *telo box*。儘管如此，我們卻在 A-3-2 中發現 GGN 重複序列特徵，而此特徵為已知哺乳類或果蠅細胞中 *Pur $\alpha$*  專一結合的序列 (Haas *et al.*, 1995; Kelm *et al.*, 1997; Sadakata *et al.*, 2000; Shimotai *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 1995; Zambrano *et al.*, 1997)。雖然 *AtPur $\alpha$ -1* 與 *OsPur $\alpha$*  各有不同的目標 DNA 結合序列，但以 *Drosophila Pur $\alpha$*  為模版進行序列比對及蛋白質結構模擬的結果發現，兩者前兩個 PUR repeats 的主要序列，*AtPur $\alpha$ -1* (residues D28-L161) 與 *OsPur $\alpha$*  (residues D34-L168) 結構相似度卻很高 (圖十八 C)。Grasbsch 等人在 2009 年時發現，*Drosophila Pur $\alpha$*  上的前兩個 PUR repeats，彼此在結構上具有很高的同質性且兩者間會產生交互作用，進而形成具核酸結合功能的 PUR domain。而 PUR domain 主要是藉由其 beta-sheets 表面的區域與核酸結合。Grasbsch 等人進一步將前 PUR repeats I 及 II 上之第四個 strands 上的 R80 及 R158 進行突變，結果發現突變導致此蛋白質失去與 ssDNA 或 RNA 結合的能力。這兩個 arginine 殘基也同樣保留在 *OsPur $\alpha$*  與 *AtPur $\alpha$ -1* 的序列中。由上述這些現象，我們推測在不同 *Pur $\alpha$*  中具保守性的 nucleic acid-binding domain 以及參與 nucleic acid-binding 的胺基酸殘基，決定了 *Pur $\alpha$*  與 purine-rich elements 間的結合能力；然而，不同物種的 *Pur $\alpha$*  蛋白質對不同 DNA 序列的專一性，可能是由蛋白質上其它的胺基酸殘基或序列所決定。圖十八 A 的結果顯示，*OsPur $\alpha$*  與 *AtPur $\alpha$ -1* 在兩個 PUR repeats 上的四個 beta-sheets 都具有高度同質性，然而兩蛋白質間最大的序列差異，在於 *AtPur $\alpha$ -1* 上 G160-V178 與 *OsPur $\alpha$*  上 R167-S190，也就是位於 PUR repeats II 與 III 間的序列，而此區域則不存在於 *Drosophila Pur $\alpha$*  中。是否具有較大變異性的這段序列，是決定 *Pur $\alpha$*  與 DNA 結合序列專一性的因素，將是未來可探討的重點。

除了上述蛋白質上變異性序列所造成的影響外，我們認為植物中的 *Pur- $\alpha$*  蛋白質能結合至其目標 DNA 序列，可能需要其他蛋白質經由直接或間接的與 *Pur- $\alpha$*  產生結合後才能完成。此點推論主要是依據以下幾點觀察：(1) *AtPur $\alpha$ -1*

會藉由與轉錄因子 *AtE2F-a* 與 *At-TCP20* 的結合後，活化下游基因表現 (Rossignol *et al.*, 2002; Trémousaygue *et al.*, 2003)。(2) 位於 *RSus1* 啟動子上游的 A-3-2，可能並非 *OsPura* 唯一的結合位置。主要是因為在水稻其他基因的 5'-flanking region，也有發現 *telo box* 或 *GGN repeats* 的存在 (Gaspin *et al.*, 2010)。(3) 在本研究中，圖十五 B 中的 P1 處發現另一蛋白質也可與 A-3-2 產生結合，且某些未與 A-3-2 有直接交互作用的蛋白質，在進行 A-3-2 結合蛋白質純化時，同時亦被共同純化出 (圖十五 A)。這也說明了，其中一些蛋白質可能藉由與 *OsPura* 的結合來共同參與調控 *RSus1* 基因表現。

圖二十二 C 結果顯示，以 A-3::35S minimal promoter 來驅動報導基因 GUS 表現時，當細胞在蔗糖存在下，*OsPura* 的確會增加 GUS 的表現量。然而在圖三 B 的結果中，不論在蔗糖或甘露糖處理細胞後所得之核蛋白質中，皆有偵測到 *OsPura*；real-time RT-PCR 的結果 (圖二十三) 顯示 *OsPura* 並非受蔗糖誘導表現的基因。儘管 *OsPura* 在轉錄層次上並不會受到蔗糖誘導，但在甘露醇處理的實驗組中可以發現，*OsPura* 與 A-3-2 的結合確實有降低 (圖十五 B)。由這些發現推測，細胞在蔗糖培養的條件下，*OsPura* 與 A-3-2 間的結合能力會提高，或者增加 *OsPura* 進入細胞核的量會增加，後者的論點藉由 transactivation assay 的結果可得印證：當水稻細胞內轉入外來帶有 A-3-2 的 reporter 質體時，內生性 *OsPura* 的含量可能不足以增進可受蔗糖誘導之報導基因的表現。因此，必須同時轉入可過量表現 *OsPura* 的質體後，才能觀察出報導基因受蔗糖誘導的結果。此外，雖然 *RSus1* 基因在水稻中只存有一個拷貝數 (Hirose *et al.*, 2008)，但 *RSus1* 啟動子上的 A-3-2 可能並不是 *OsPura* 唯一的結合序列。因此，*OsPura* 固然可因為細胞中蔗糖的濃度上升而使進入細胞核，進而增強 *RSus1* 基因表現，或許還有其他可以調控 *OsPura* 是否進核的因素。

然而，細胞在接受糖訊息後，*OsPura* 進入細胞核的調控機制為何？在 2009 年 Jones 等人曾提出，*AtPura-1* 進入核可能是受到磷酸化的修飾。利用

NetPhos 2.0 Server 的分析軟體，對 OsPurα 進行可能受磷酸化之胺基酸分析，結果顯示有七個可能受磷酸化的 serine residues，且分數達 0.95 以上，而這些胺基酸也同樣保留於 AtPurα-1 中。因此我們推測細胞在受蔗糖處理後，OsPurα 可能受到轉譯後修飾，此修飾不僅可促使其進入細胞核，亦可能穩定蛋白質的功能。然而除了轉譯後修飾外，OsPurα 也有可能藉由與受糖誘導的蛋白質結合後，來幫助 OsPurα 進入細胞核。

## 2. 水稻蔗糖合成酶在細胞中的定位

本實驗室先前將水稻懸浮培養細胞的核蛋白質進行電泳及轉印，以 RSuS1 的多株抗體進行免疫染色的實驗，發現有正反應的訊號，說明 RSuS1 可能存在於細胞核 (廖，2002，結果未發表)。由於在細胞質中也存在大量的 RSuS，因此，為了進一步證實先前在細胞核蛋白質萃取液中存在的 RSuS1，並非來自細胞質的污染，於是利用 percoll 梯度溶液試圖先純化出細胞核後，再進行核蛋白質的萃取。另一方面，也以 *RSus* 基因融合 *sGFP* 為報導基因，於洋蔥表皮細胞以及水稻細胞進行短暫表現，以及以 RSuS1 抗體進行細胞免疫染色分析，來觀察 RSuS 在細胞中的定位，藉此希望能確認 RSuS1 存在核中的可能性。

### 2.1 核蛋白質之抽取與檢定

#### 2.1.1 初步鑑定位於細胞質及細胞核之 RSuS 蛋白質

將水稻懸浮細胞經液態氮研磨後，以低速離心分離出細胞核，經 NaCl 破核後，分別將細胞質蛋白質及核蛋白質進行 SDS-PAGE，以 CBR 染色或轉印至 PVDF 膜後，再分別以 RSuS1 多株抗體、 $\alpha$ -tubulin 抗體 (Sigma T6074) 及 Histone H1 抗體 (SANTA CRUZ sc-8030) 進行偵測。圖二十四顯示以 RSuS1 多株抗體進行免疫染色後顯示，除了細胞質與重組蛋白質 rRSuS3 在 90 kDa 處有色帶外，核蛋白質也有偵測到 RSuS 的存在。進一

步以  $\alpha$ -tubulin 抗體進行免疫染色後發現，原本分布於細胞質 tubulin 確實於 50 kDa 處有產生色帶，在核蛋白質分割中則未被偵測到，這也表示所純化之核蛋白質並無受到細胞質的污染。最後以 Histone H1 抗體來檢驗核蛋白質，可發現 Histone H1 在核蛋白質中確實可被偵測出。

### 2.1.2 Percoll 梯度法純化核蛋白質

此外，進一步以 Percoll 梯度法純化細胞核 (第二章)。將純化之細胞核中蛋白質進行 SDS-PAGE 及免疫轉漬染色分析，結果顯示以不論有無蔗糖培養之細胞，蛋白質色帶皆很複雜 (圖二十五 A)，其中核蛋白質在 48 kDa 處及 63 kDa 處之色帶較明顯 (圖二十五 A，第 1 及 2 行)，重組 R<sub>SuS1</sub> 蛋白質則在 90 kDa 處 (圖二十五 A，第 3 行)。以 R<sub>SuS1</sub> 的多株抗體偵測的結果顯示，不論有無蔗糖培養之細胞所抽得的核蛋白質，在 90 kDa 處可得兩個色帶 (圖二十五 B，第 1 及 2 行)，而在 63 kDa 處色帶可能為降解的 R<sub>SuS</sub> 或非專一性的色帶 (圖二十五 B，第 1 及 2 行)。

## 2.2 sGFP-R<sub>SuS1</sub> 融合蛋白質在細胞中的定位

### 2.2.1 洋蔥表皮細胞表現之 sGFP-R<sub>SuS1</sub> 融合蛋白質

首先建構表現所需的質體 pGRS1 及 pGBoPAL1 (圖一及二)。後者可表現 sGFP 與綠竹苯丙胺酸脫氨裂解酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 之融合蛋白質，PAL 只表現於細胞質中，作為負控制組。利用粒子槍轉殖法，將兩種質體轉殖入洋蔥表皮細胞中進行短暫表現。此外，也將質體 pHBT95sGFP 轉殖入洋蔥表皮細胞內，表現 sGFP 當作另一控制組，並將轉殖後的細胞於培養 24 h 後以螢光顯微鏡進行觀察，圖二十六結果顯示 sGFP 在細胞質及細胞核中皆有分佈。以質體 pGRS1 及 pGBoPAL1 進行轉殖，同樣在 24 h 培養時間下進行觀察，結果顯示 GFP-R<sub>SuS1</sub> 融合蛋白質分佈

位置在細胞質及細胞核；而 GFP-BoPAL1 則只分佈於細胞質中。

### 2.2.2 洋蔥表皮細胞表現之 sGFP-RSuS1 縮減融合蛋白質

由 2.2.1 節的結果得知，除在細胞質中，RSuS1 也存在細胞核中。爲了進一步瞭解 RSuS1 中決定進入細胞核的序列爲何，於是利用縮減 *RSus1* 基因來表現不同區域片段的 RSuS1 蛋白質。首先建構表現所需的各個質體 pGRS1-N309, pGRS1-NM, pGRS1-M, pGRS1-MC 及 pGRS1-C209，各質體轉殖入洋蔥表皮細胞後，可表現出之 sGFP-RSuS1 融合蛋白質的片段大小及位置，如圖二十七 A 所示。

利用各質體於洋蔥表皮細胞進行短暫表現，並以螢光顯微鏡觀察的結果顯示，除了質體 pGRS1-MC 不表現外，其他各個 sGFP-RSuS1 縮減融合蛋白質，在細胞質及細胞核均存在 (圖二十七 B)。

### 2.2.3 水稻原生質體系統表現 GFP-RSuS1 融合蛋白質

將 2.2.1 所建構之表現質體 pGRS1 及 pGBoPAL1，利用 PEG 轉形法以水稻葉及莖取得之原生質體進行短暫表現，來觀察 RSuS1 在細胞的分佈情形，並同時轉入 mcherry-NLS 的質體來標示核的位置。在進行轉形後 22 h 以螢光顯微鏡進行觀察，圖二十八結果顯示 sGFP 在細胞質及細胞核中皆有分佈；利用質體 pGRS1 及 pGBoPAL1 進行短暫表現的結果，顯示 sGFP-RSuS1 融合蛋白質分佈位置在細胞質及細胞核，而 sGFP-BoPAL1 則分佈於細胞質。進一步利用共軛焦顯微鏡對細胞於細胞核附近以 1  $\mu\text{m}$  的焦距差進行平面切片掃描，觀察細胞核內綠螢光分布的情形，結果顯示 GFP-RSuS1 (圖二十九) 融合蛋白質在細胞核的累積量較 GFP-BoPAL1 多 (圖三十)。此外，另建構表現質體 pRS1G，其可表現 RSuS1-sGFP 融合蛋白質，也與 sGFP-RSuS1 得到相同的結果。

## 2.3 RSuS 蛋白質之細胞內免疫染色

由水稻葉及莖取得之原生質體經過固定後，分別以 RSuS1 的多株抗體及單株抗體進行反應，再以帶有綠色螢光的二次抗體反應，以了解原態 RSuS 蛋白質是否會進細胞核中。此外，也以 BoPAL1 多株抗體來作為負控制組。以共軛焦顯微鏡觀察的結果顯示，RSuS 在細胞質較多，細胞核亦有，但相對較少 (圖三十一 A 及 B)。而以 BoPAL1 多株抗體所偵測的結果顯示，綠螢光累積在細胞質，在細胞核中則不存在 (圖三十一 C)。

## 2.4 分析細胞質與細胞核之 RSuS 蛋白質

### 2.4.1 免疫沉澱法純化 RSuS 蛋白質

以 RSuS1 多株抗體，對細胞質蛋白質及核蛋白質進行免疫沉澱，將沉澱下的蛋白質進行 SDS-PAGE，以 CBR 染色或轉印至 PVDF 膜後，再以 RSuS1 的多株抗體進行偵測。結果顯示不論於細胞質或細胞核分割所得之蛋白質，皆可沉澱下 RSuS 蛋白質 (圖三十二)。進一步將位於 90 kDa 處之色帶切下，並以 LC-MS-MS 進行蛋白質身分鑑定。經 Mascot Search 中 MS/MS Ion Search 分析，以 NCBI 資料庫進行比對，細胞質之 RSuS 主要包括 RSuS1, RSuS2 及 RSuS4，而核蛋白質之 RSuS 異構酶為 RSuS1 及 RSuS2。此外，我們亦觀察位於細胞質及細胞核之 RSuS 是否有磷酸化修飾。分別以 phospho-Ser, phospho-Thr 及 phospho-Tyr 三種抗體，對經免疫沉澱純化之 RSuS 進行免疫染色分析，結果顯示不論是細胞質或細胞核之 RSuS，皆可偵測到微弱的磷酸化色帶，說明了少部分 RSuS 的確有受磷酸化 (結果未表)。然而由 LC-MS-MS 的結果中，並無發現有磷酸化的現象，推測可能是受磷酸化之 RSuS 量太少所致。

## 2.4.2 細胞核 RSuS 蛋白質之角色

由上述各結果顯示，RSuS 確實可進入細胞核，於是我們進一步想瞭解 RSuS 在細胞核中的功能。有鑒於細胞中某些位於細胞膜上的 receptor 在接受 ligand 後，會進入細胞核中調控某些基因的表現。因此，我們聯想到位於細胞膜上且可與蔗糖、果糖結合的 RSuS 有可能也具有類似的功能，而進入到細胞核中。另一方面在好奇心的驅使下，我們想瞭解 RSuS 是否參與調控本身的基因表現。利用前述 1.3 純化出能與 A-3-2 之結合之蛋白質，利用 RSuS1 多株抗體為一抗進行 western 分析。結果顯示，在 S/NP 的實驗組中，不論有無加入競爭者 DNA，皆可偵測到 RSuS 的色帶，而 M/NP 組並無 RSuS 色帶產生 (圖三十三)。此結果說明 S/NP 及 M/NP 中，結合至 A-3-2 的蛋白質複合體中，可能由某些不同的蛋白質組成，而 RSuS 就是其中之一。

## 2.5 討論

利用水稻懸浮培養細胞純化得到的核蛋白質，以 RSuS1 的多株抗體進行免疫呈色，可偵測到 RSuS (圖二十四及二十五)，說明 RSuS 除了存在細胞質外，也可能被運送到細胞核。更進一步利用 GFP 為報導基因，於洋蔥表皮細胞進行短暫表現分析的結果中，也顯示細胞質、細胞膜以及細胞核中都有 RSuS1 的分佈 (圖二十六)。GFP 本身之所以能夠利用擴散作用，透過核孔進入細胞核，主要是由於其分子量小於 30 kDa (Wang and Brattain, 2007)。目前所知蛋白質進入核中的可能因素包括：一、在胺基酸序列上具有核膜受體所能辨識的 NLS。但對 RSuS1 進行序列分析的結果得知，序列中並無已知的 NLS 存在。二、蛋白質藉由與其他因子的結合而被送入核中。但由 RSuS1 經縮減後之各個融合蛋白質的觀察，顯示 RSuS1 不會因為序列被縮減後，而使得分佈於細胞質或細胞核的 RSuS1 有明顯改變，唯一不同的是 GRS1-C209 綠螢光表現



量較低，而 GRS1-MC 可能是形成的融合蛋白質不穩定所以無法觀察出綠螢光 (圖二十七)。由縮減實驗的結果似乎無法解釋，RSuS1 如何進入細胞核。推測另外可能之原因為：一、縮減後之蛋白質可能仍包含與其他 carrier protein 能辨識的區域，所以能進入核。二、曾有文獻指出，若蛋白質分子量小於 110 kDa 以下，皆可經由擴散作用進入核 (Wang and Brattain, 2007)。縮減後的融合蛋白質分子量大約介於 49 kDa ~ 93 kDa 間，有可能是藉由擴散作用進入核中。然而考慮到 sGFP-RSuS1 之分子量約 116 kDa，爲了排除其藉由擴散入核的可能性，於是曾表現 2×sGFP-RSuS1 的融合蛋白質於洋蔥表皮細胞，結果顯示此分子量增大的融合蛋白質亦能進入細胞核中 (結果未表)。另一方面分子量與 sGFP-RSuS1 相近之 sGFP-BoPAL1，並不會進入細胞核中。進一步利用水稻細胞短暫表現系統觀察 sGFP-RSuS1，亦可在細胞質及核中發現 (圖二十八，二十九)。以 RSuS1 的多株抗體及單株抗體進行免疫定位，也都可偵測出 RSuS 存在核中 (圖三十一)。上述不同實驗結果支持 RSuS1 確實存在於細胞核中。以免疫沉澱 (圖三十二) 及蛋白質身分鑑定的結果，說明並非所有的 RSuS 異構酶皆可進入細胞核中，如 RSuS4 只在細胞質被偵測出，卻不存於細胞核中。此外，由三種不同磷酸化抗體進行免疫染色的結果，說明位於細胞質及細胞核的 RSuS 都有受磷酸化修飾，因此調控 RSuS 進入細胞核與否，磷酸化修飾似乎不是影響的原因。此外，由圖三十三結果可知，在含蔗糖的條件下，RSuS 可能參與 *RSus1* 基因的表現。然而，在實驗過程中，即使添加競爭者 DNA 片段 A-3-2，亦不能使 RSuS 色帶消失 (圖三十三，第二行)。另一方面圖十五 B 的結果顯示，在 90 kDa (RSuS 單元體分子量) 附近並沒有偵測到可與 A-3-2 直接結合的色帶。這兩次實驗結果說明：一、RSuS 並非與 A-3-2 直接結合；二、RSuS 可能是與其他蛋白質或 Streptavidin 親和性磁珠非專一性結合。然而從圖二十五結果中可知，在沒有這糖誘導的核蛋白質 (M/NP) 中也含有 RSuS。但圖三十三 M/NP 的實驗組，並無 RSuS 的色帶產生，說明了 S/NP 實驗組所觀察的 RSuS 色帶可能具有意義，且不可能是 RSuS 與磁珠間非專一

性結合。爲了探討 RSuS 是否參與此 DNA-蛋白質複合體，我們進一步利用免疫共沉澱法來分析 RSuS 與 OsPura $\alpha$  間是否具交互作用。於核蛋白質中外加 reOsPura $\alpha$ ，藉此觀察核中 RSuS 與 reOsPura $\alpha$ ，是否可被 RSuS1 多株抗體共同沉澱出。然而，以 His-tag 抗體進行免疫呈色結果中，偵測不到 reOsPura $\alpha$  (結果未表)。在假設 RSuS 與 reOsPura $\alpha$  間會產生交互作用的前提下，這結果說明，兩者間可能是間接結合，需要另外的蛋白質參與；或者，必須有 DNA 存在下，RSuS 與 reOsPura $\alpha$  才會產生交互作用。

SuS 能進入細胞核的現象，也曾於玉米中被發現 (Subbaiah *et al.*, 2006)。玉米中有三種 SuS 異構酶，其中 SuS1 與 SH1 可能也存在於粒線體及細胞核，而粒線體中的 SuS 可與 voltage-dependent anion channel (VDAC) 產生作用。相同的研究團隊在 2007 年時推測，於厭氧逆境下粒線體中之 SuS 可能會因爲 VDAC 的 de-oligomerization，而釋出至細胞質轉而進入細胞核。當細胞核累積 SuS 時，會導致 cell death pathway 造成幼苗根尖死亡 (Subbaiah *et al.*)。但至目前爲止，尙未有直接證據顯示此推測。

植物中與醣類代謝相關之蛋白質，除了 SuS 外， $\beta$ -amylase-like 蛋白質也會進入細胞核。2011 年 Reinhold 等人，於阿拉伯芥中發現轉錄因子 BZR1-BAM (BAM7 與 BAM8)，其序列上除了有  $\beta$ -amylase 上可與受質結合的區域外，亦含有 BRASSINAZOLE RESISTANT1-type DNA binding domains。然而這兩個蛋白質雖有與 maltose 結合能力，卻不具酵素活性。其功能除可調控下游基因表現外，被推測可能爲糖感應蛋白質。此外，先前也有文獻指出許多參與糖解作用的酵素，在調控基因表現方面扮演重要的角色 (簡介於第一章)。

RSuS 進入細胞核的機制爲何？是否具有酵素以外的功能？膜結合型或細胞質的 RSuS，除了有催化蔗糖降解的功能外，是否有類似  $\beta$ -amylase-like 蛋白質般可以感應細胞內糖的訊息，進入到細胞核中，扮演訊息傳導者進而調控基因表現？將是未來重要的課題。

## 第四章 結論與未來研究方向

### 1. 結論

當水稻細胞接受到蔗糖的訊息後，會使得下游一些基因受到誘導表現，其中本論文的研究主角 *RSus1* 基因，也會受蔗糖誘導表現。爲了探討 *RSus1* 基因受蔗糖調控的機制，我們先從 *RSus1* 基因啓動子上著手，希望能找尋受糖誘導相關的 *cis-elements*。由先前廖 (2002) 對 *RSus1* 啓動子進行縮減分析的結果中，我們鎖定 sugar-responsive elements 應位於基因上游 -1117 至 -958 的區域。之後，經由電泳遲滯分析及 DNA 足跡實驗的結果 (張，2004)，進一步確認 -1045 至 -1007 爲主要的蛋白質結合調控區。於是利用此 DNA 片段爲誘餌，從經蔗糖或甘露醇培養之水稻懸浮培養細胞之核蛋白質中，找到專一結合的蛋白質 — OsPura。由 OsPura 蛋白質序列分析的結果，瞭解此結合蛋白質主要與 purine-rich 的 DNA 序列結合，而 A-3-2 的序列中含有 69% 之 purine bases，正符合此特徵。進一步觀察 A-3-2，發現具有四段重複的 GCGGCG 序列，藉由對 A-3-2 序列進行突變及 southwestern 分析的結果，說明 A-3-2 可能具有一個以上的蛋白質結合區域。以已知的 *DmPura* (3K44) 蛋白質結構爲模版，從中對 OsPura 進行結構模擬，得知此蛋白質由三段  $4\times(\beta\text{-sheet})-(\alpha\text{-helix})$  所組成。以大腸桿菌表現所得之重組 OsPura 蛋白質來探討其與 DNA 間的交互作用，得知在 *in vitro* 可與 A-3-2 有專一性的結合。而利用水稻原生質體爲表現系統，可以發現在含蔗糖的條件下，OsPura 確實可以結合至 A-3，進而增強基因表現。然而，從 real-time RT-PCR 的結果，發現 *OsPura* 基因本身並不受蔗糖誘導表現。說明 OsPura 可能受轉譯後修飾，或者還有其他因子參與 *RSus1* 基因受糖誘導表現的調控。

由許多學者的研究結果已知，RSuS 主要分布在細胞質中，且扮演分解蔗糖的角色。本研究利用 *in vitro* 及 *in vivo* 的實驗證實，除了在細胞質外 RSuS1 也會進入細胞核中。由於 RSuS1 蛋白質序列中並無已知的 NLS，我們試圖想瞭

解 R $SuS1$  進入蛋白質的機制。有相關的研究指出，磷酸化會影響 R $SuS$  在細胞中的分布。然而，我們的結果顯示不論細胞質或細胞核的 R $SuS$  似乎都有磷酸化的現象。除此之外，在純化 DNA 片段 A-3-2 的結合蛋白質時，我們意外地發現，整個調控 *RSus1* 基因表現的蛋白質複合體中，似乎有 R $SuS$  的參與。然而，此部分的結果有其矛盾之處，還有待進一步的釐清。

## 2. 未來研究方向

### 2.1 OsPur $\alpha$ 之相關研究

由 real-time RT-PCR 的結果得知，OsPur $\alpha$  並非可受蔗糖誘導的基因。從 southwestern 分析及 transactivation 分析的結果中，A-3-2 與 OsPur $\alpha$  之間會產生交互作用，且當細胞經蔗糖處理後，兩者結合能力大於以甘露醇處理。如此說明在蔗糖存在與否，OsPur $\alpha$  應該有到受不同的轉譯後修飾。從阿拉伯芥 AtPur $\alpha$  的例子 (Jones *et al.*, 2009) 及經軟體分析 OsPur $\alpha$  序列中可能磷酸化的胺基酸殘基，皆顯示 OsPur $\alpha$  具磷酸化修飾的可能性。此外，亦可利用免疫共沉澱法或 pull-down 分析等方法，收尋 A-3-2 DNA-蛋白質複合體中與 OsPur $\alpha$  有直接或間接結合的蛋白質。由 Grasbsch 等人 (2009) 提出，DmPur $\alpha$  蛋白質序列中 R80 及 R158，可能是影響 DmPur $\alpha$  與 DNA 間結合的關鍵胺基酸。因此也可將 OsPur $\alpha$  進行點突變，來探討其與 DNA 間的交互作用。再者，由於 OsPur $\alpha$  蛋白質序列上並無已知的 NLS，因此可研究調控 OsPur $\alpha$  進入細胞核的機制。

### 2.2 R $SuS1$ 可能扮演的角色

利用 *RSus1* 基因融合 *GFP* 基因，於洋蔥表皮細胞及水稻原生質體進行短暫表現，及免疫細胞定位染色的實驗，皆說明細胞核中有 R $SuS1$  的存在。因此，進一步確認 R $SuS1$  進入細胞核的方式及目的，將是討論的重點。由於以

DNA 片段 A-3-2 進行親和層析實驗所溶離出的蛋白質複合體，經 Western 轉印後以 RSuS1 多株抗體進行免疫呈色分析時，意外發現 RSuS 色帶。是否意味著，RSuS 蛋白質如同一些糖解作用中的酵素般，扮演調控基因的角色，未來將可從此進行探討。

### 2.2.1 與 RSuS 具交互作用的核蛋白質

可利用 RSuS1 多株抗體在對核蛋白質進行免疫共沉澱。再以 A-3-2 為探針，進行 Southwestern blot 來觀察 OsPurA 是否可被偵測出，即可初步證明 RSuS 蛋白質是否參與 *RSus1* 基因調控。此外，免疫共沉澱下的蛋白質色帶，亦可進行定序鑑定其身份

利用 RSuS1 以共價結合於 CNBr-activated Sepharose 膠體，以此管柱對核蛋白質進行純化，期望能找出與 RSuS1 一起調控基因表現的蛋白質或帶其進入細胞核的蛋白質。

### 2.2.2 RSuS 可能參與的調控角色

若找出能與 RSuS1 可能參與的調控基因為何，將有助於了解其在核中的定位。然而由水稻懸浮培養細胞抽取 genomic DNA，與重組 RSuS1，進行 nitrocellulose filter binding assay 的結果，似乎說明 RSuS1 與 DNA 之間並無直接交互作用 (結果未表)。

未來可進一步以不同方法探討，假設 RSuS 與 DNA 有直接或間接作用的情況下，可在 *in vivo* 中進行 chromatin immunoprecipitation (ChIP) 實驗。

## 第五章 參考文獻

- Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T., Moreno, F. (2004) The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* **279**: 14440–14446
- Amor, Y., Haigler, C. H., Johnson, S., Wainscott, M., Delmer, D. P. 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9353–9357
- Angeles-Núñez J. G., Tiessen A. (2010) *Arabidopsis* sucrose synthase 2 and 3 modulate metabolic homeostasis and direct carbon towards starch synthesis in developing seeds. *Planta* **232**: 701-718
- Arai, M., Mori, H. and Imaseki, H. (1992) Expression of the gene for sucrose synthase during growth of mung bean seedlings. *Plant Cell Physiol.* **33**:503-506
- Barratt, D. H. P., Barber, L., Kruger, N. J., Smith, A. M., Wang, T. L., Martin, C. (2001) Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol.* **127**: 655-664.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., Sheen, J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938-942
- Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* **13**: 474-482
- Baud, S., Vaultier, M. N., Rochat, C. (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **55**: 397-409
- Bergemann, A. D., Ma, Z. W., Johnson, E. M. (1992) Sequence of cDNA comprising the human pur gene and sequence-specific single-stranded-DNA-binding properties of the encoded protein. *Mol. Cell Biol.* **12**: 5673-5682
- Bieniawska, Z., Barratt, D. H. P., Garlick, A. P., Thole, V., Kruger, N. J., Martin, C., Zrenner, R., Smith, A. M. (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant J.* **49**: 810-828
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brattain, M. G., Wang, R. W. (2007) The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa. *Febs Lett* **581**: 3164-3170
- Buczynski, S. R., Thom, M., Chourey, P., Maretzki, A. (1993) Tissue distribution and characterization of sucrose synthase isozymes in sugarcane. *J. Plant Physiol.* **142**: 641-646.
- Bustos, M. M., Iyer, M., Gagliardi, S. J. (1998). Induction of a  $\beta$ -phaseolin promoter by exogenous abscisic acid in tobacco: Developmental regulation and modulation by external sucrose and  $\text{Ca}^{2+}$  ions. *Plant Mol. Biol.* **37**: 265–274.

- Carlson, S. J., Chourey, P. S., Helentjaris, T., Datta, R.** (2002) Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene. *Plant Mol. Biol.* **49**: 15-29.
- Cattaneo, A., Biocca S., Corvaja N., Calissano P.** (1985) Nuclear localization of a lactic dehydrogenase with single-stranded DNA-binding properties. *Exp. Cell Res.* **161**: 130-140
- Chattopadhyay, S., Ang, L. H., Puente, P., Deng, X. W., Wei, N.** (1998). Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* **10**: 673-683.
- Cho, J.-I., Kim, H.-B., Kim, C.-Y., Hahn, T.-R., Jeon, J.-S.** (2011) Identification and characterization of the duplicate rice sucrose synthase genes OsSUS5 and OsSUS7 which are associated with the plasma membrane. *Molecules and Cells* **31**: 553-561
- Choudhary, S., De, B. P., Banerjee, A. K.** (2000) Specific phosphorylated forms of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase associate with human parainfluenza virus type 3 and inhibit viral transcription in vitro. *J. Virol.* **74**: 3634-3641
- Chourey, P. S., Taliercio, E. W., Kane, E. J.** (1991) Tissue-specific expression and anaerobically induced posttranscriptional modulation of sucrose synthase genes in *Sorghum bicolor* M. *Plant Physiol.* **96**: 485-490.
- Chourey, P. S., Taliercio, E. W., Carlson, S. J., Ruan, Y. -L.** (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 88-96
- Chiu, W. B., Lin, C. H., Chang, C.J., Hsieh, M. H., Wang, A.Y.** (2006) Molecular characterization and expression of four cDNAs encoding sucrose synthase from green bamboo *Bambusa oldhamii*. *New Phytol.* **170**: 53-63
- Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y.** (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* **16**: 659-688.
- Cooper, J. A. Esch, F. S., Taylor, S. S., Hunter, T.** (1984) Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **259**: 7835-7841
- De la Cera, T., Herrero, P., Moreno-Herrero, F., Chaves, R. S., Moreno, F.** (2002) Mediator factor Med8p interacts with the hexokinase 2: implication in the glucose signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **319**: 703-714
- De, B.P., Gupta, S., Zhao, H., Drazba, J. A., Banerjee, A. K.** (1996) Specific interaction in vitro and in vivo of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and LA protein with cis-acting RNAs of human parainfluenza virus type 3. *J. Biol. Chem.* **271**: 24728-24735
- Diderich, J. A., Raamsdonk, L. M., Kruckeberg, A.L., Berden, J. A., Van Dam, K.** (2001) Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *Appl. Environ. Microbiol.*

67: 1587–1593

- Dollenmaier, G., Weitz, M.** (2003) Interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with secondary and tertiary RNA structural elements of the hepatitis A virus 30 translated and non-translated regions. *J. Gen. Virol.* **84**: 403–414
- Dorak, M. T. (Ed)** (2006) Real-time PCR. UK: Taylor & Francis Group.
- Ettxeberria, E., Gonzalez, P.** 2003. Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole. *J. Exp. Bot.* **54**: 1407–1414.
- Fried, M.** (1989) Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis* **10**: 366-376.
- Froidure S., Canonne J., Daniel X., Jauneau A., Briere C., Roby D., Rivas S.** (2010) AtsPLA2-alpha nuclear relocalization by the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 leads to repression of the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 15281-15286
- Fu, H., Park, W. D.** (1995) Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* **7**: 1369-1385.
- Fu, H., Kim, S. Y., Park, W. D.** (1995a) High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* **7**: 1387-1394.
- Fu, H., Kim, S. Y., Park, W. D.** (1995b) A potato *Sus3* sucrose synthase gene contains a context-dependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects. *Plant Cell* **7**: 1395-1403.
- Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I., Watanabe, A.** (2001). Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol. Plant.* **111**: 345–352.
- Gallia G. L., Johnson E. M., Khalili K.** (2000) Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucl. Acids Res.* **28**: 3197-3205
- Gaspin, C., Rami, J. F., Lescure, B.** (2010) Distribution of short interstitial telomere motifs in two plant genomes: putative origin and function. *BMC Plant Biol.* **10**: 283
- Gaudino R. J., Pikaard C. S.** (1997) Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **272**: 6799-6804
- Gibson, S. I.** (2000) Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol.* **124**: 1532-1539.
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V. S., Timko, M. P., Scolnic, P. A., Cashmore, A. R.** (1988). An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7089–7093.



- Godt, D. E., Riegel, A., Roitsh, T.** (1995) Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink tissue specific expression in plants. *J. Plant Physiol.* **146**: 231-238.
- Graebisch, A., Roche, S., Niessing, D.** (2009) X-ray structure of Pur- $\alpha$  reveals a Whirly-like fold and an unusual nucleic-acid binding surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 18521-18526
- Grierson, C., Du, J. -S., Zabala, M., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M. and Bevan, M.** (1994) Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* **5**: 815-826.
- Grosse, F., Nasheuer, H. P., Scholtissek, S., Schomburg, U.** (1986) Lactate dehydrogenase and glyceraldehydephosphate dehydrogenase are single-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase- $\alpha$ -primase complex. *Eur. J. Biochem.* **160**: 459-467
- Guerin, J., Carbonero, P.** (1997) The spatial distribution of sucrose synthase isozymes in barley. *Plant Physiol.* **114**: 55-62.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning*, Vol. I, D.M. Glover ed, IRL Press, Oxford, pp109-135.
- Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M. M., Smeekens, S.** (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *Plant J.* **53**: 935-949
- Hanson J., Smeekens S.** (2009) Sugar perception and signaling--an update. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 562-567
- Hardin, S. C., Winter, H., Huber, S. C.** 2004. Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity. *Plant Physiol.* **134**: 1427-1438
- Haas, S., Thatikunta, P., Steplewski, A., Johnson, E. M., Khalili, K., Amini, S.** (1995) A 39-kD DNA-binding protein from mouse brain stimulates transcription of myelin basic protein gene in oligodendrocytic cells. *J. Cell Biol.* **130**: 1171-1179
- Hattori, T., Fukumoto, H., Nakagawa, S., Nakamura, K.** (1991) Sucrose-induced expression of genes coding for the tuberous root storage protein, sporamin, of sweet potato in leaves and petioles. *Plant Cell Physiol.* **32**: 79-86.
- Heim, U., Weber, H., Baumlein, H., Wobus, U.** (1993) A sucrose synthase gene of *Vicia faba*: Expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* **191**: 394-401.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W. B., Metraux, J. P., Sonnewald, U.** (1996). Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: Possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* **8**: 793-803.
- Herrero, P., Galíndez J., Ruiz N., Martínez-Campa C., Moreno F.** (1995) Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes. *Yeast* **11**: 137-144

- Herrero, P., Ramírez M., Martínez-Campa C., Moreno F.** (1996) Identification and characterisation of two transcriptional repressor elements within the coding sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 gene. *Nucl. Acids Res.* **24**: 1822–1828
- Herrero, P., Martínez-Campa C., Moreno F.** (1998) The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **434**: 71–76
- Hesse, H., Willmitzer, L.** (1996) Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* **30**: 863-872.
- Hirose T, Scofield G. N., Terao T.** (2008) An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice. *Plant Science* **174**: 534-543
- Ho, S. -L., Chao, Y. -C., Tong, W. -F., Yu, S. -M.** (2001) Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol.* **125**: 877-890.
- Huang, J. -W., Chen, J. -T., Yu, W. -P., Shyur, L. -F., Wang, A. -Y., Sung, H. -Y., Lee, P. -D., Su, J. -C.** (1996) Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expression. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 233-239.
- Huang, Y., Li, C. Y., Pattison, D. L., Gray, W. M., Park, S., Gibson, S. I.** (2010) SUGARINSENSITIVE3, a RING E3 ligase, is a new player in plant sugar response. *Plant Physiol.* **152**: 1889–1900
- Huberts D. H., van der Klei I. J.** (2010) Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Bba-Mol Cell Res.* **1803**: 520-525
- Hwang, Y. -S., Karrer, E. E., Thomas, B. R., Chen, L., Rodriguez, R. L.** (1998) Three *cis*-elements required for rice  $\alpha$ -amylase *Amy3D* expression during sugar starvation. *Plant Mol. Biol.* **36**: 331-341.
- Ishiguro, S., Nakamura, K.** (1994) Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and  $\alpha$ -amylase from sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 563-571.
- Jeffery, C. J.** (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 8-11
- Jeffery, C. J.** (2003) Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.* **19**: 415-417
- Jeffery, C. J.** (2009) Moonlighting proteins-an update. *Mol. Biosyst* **5**: 345-350
- Jiang, R., Carlson, M.** (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* **10**: 3105–3115
- Johnson, R., Ryan, C. A.** (1990) Wound-inducible potato inhibitor II genes: enhancement of expression by sucrose. *Plant Mol. Biol.* **14**: 527-536.
- Jones, A. M., MacLean D., Studholme, D. J., Serna-Sanz, A., Andreasson, E., Rathjen, J. P., Peck, S. C.** (2009) Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from *Arabidopsis thaliana*. *J. Proteomics* **72**:

439-451

- Karrer, E. E., Rodriguez, R. L.** (1992) Metabolic regulation of rice  $\alpha$ -amylase and sucrose synthase genes in planta. *Plant J.* **2**: 517-523.
- Kelm, R. J., Elder, P. K., Strauch, A. R., Getz, M. J.** (1997) Sequence of cDNAs encoding components of vascular actin single-stranded DNA-binding factor 2 establish identity to Pur $\alpha$  and Pur $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **272**: 26727-26733
- Kim, D. J., Smith, S. M., Leaver, C. J.** (1997). A cDNA encoding a putative SPF1-type DNA-binding protein from cucumber. *Gene* **185**: 265–269.
- Kim J. W., Dang C. V.** (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 142-150
- Kim, S. R., Costa, M. A., An, G.** (1991) Sugar response element enhances wound response of potato proteinase inhibitor II promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **17**: 973-983.
- Kim, S. Y., May, G. D., Park, W. D.** (1994) Nuclear protein factors binding to a class I patatin promoter region are tuber-specific and sucrose-inducible. *Plant Mol. Biol.* **26**: 603-615.
- Kleczkowski L. A., Kunz S., Wilczynska M.** (2010) Mechanisms of UDP-glucose synthesis in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **29**: 191 - 203
- Koch, K. E.** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 235-246
- Koch, K. E., Nolte, K. D., Duke, E. R., McCarty, D. R., Avigne, W. T.** (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* **4**: 59-69.
- Koch, K. E., Wu, Y., Xu, J.** (1996) Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. *J. Exp. Bot.* **47** (special issue): 1179-1185.
- Koch, K. E., Xu, J., Duke, E. R., McCarty, D. R., Yuan, C. X., Tan, B. C., Avigne, W. T.** (1995) Sucrose provides a long distance signal for coarse control of genes affecting its metabolism. *In Sucrose Metabolism, Biochemistry, and Molecular Biology*, H.G. Pontis, G. Salerno, E. Echeverria, eds, American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 266-277.
- Koch, K. E., Ying, Z., Wu, Y., Avigne, W. T.** (2000) Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *J. Exp. Bot.* **51** (special issue): 417-427.
- Komatsu, A., Moriguchi, T., Koyama, K., Omura, M., Akihama, T.** (2002) Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationship. *J. Exp. Bot.* **53**: 61-71.
- Komina, O., Zhou, Y., Sarath, G., Chollet, R.** 2002. In vivo and in vitro phosphorylation of membrane and soluble forms of soybean nodule sucrose synthase. *Plant Physiol.* **129**: 1664–1673
- Krapp, A., Stitt, M.** (1994) Influence of high-carbohydrate content on the activity of plastidic and cytosolic isoenzyme pairs in photosynthetic tissue. *Plant Cell Environ.* **17**: 861-866.

- Larsen, A. E., Salerno, G. L., Points, H. G. (1985) Sucrose synthase from wheat leaves. Comparison with the wheat germ enzyme. *Physiol. Plant.* **67**: 37-42.
- Lee, H., Guo, Y., Ohta, M., Xiong, L., Stevenson, B., Zhu, J. K. (2002) LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.* **21**: 2692–2702
- Lee, K. W., Chen, P. W., Lu, C. A., Chen, S., Ho, T. H., Yu, S. M. (2009) Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Sci. Signal* **2**: ra61
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing condition, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751.
- Li, A., Zhang, Z., Wang, X. C., Huang, R. (2009) Ethylene response factor TERF1 enhances glucose sensitivity in tobacco through activating the expression of sugar-related genes. *J. Integr Plant Biol.* **51**: 184-193
- Liao, Y. -C., Wang, A. -Y. (2003) Sugar-modulated gene expression of sucrose synthase in suspension-cultured cells of rice. *Physiol. Plant.* **118** : 319~327.
- Liu, H., Johnson, E. M. (2002) Distinct proteins encoded by alternative transcripts of the PURG gene, located contrapodal to WRN on chromosome 8, determined by differential termination/polyadenylation. *Nucl. Acids Res.* **30**: 2417-2426
- Loreti, E, Povero, G., Novi, G., Solfanelli, C., Alpi, A., Perati, P. (2008) Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in Arabidopsis. *New Phytol.* **179**: 1004–1016
- Lu, C. A., Lim, E. -K. and Yu, S. -M. (1998) Sugar response sequence in the promoter of a rice  $\alpha$ -amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *J. Biol. Chem.* **273**: 10120-10131.
- Lunn, J. E., Feil, R., Hendriks, J. H. M., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W. R., Carillo, P., Stitt, M. (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in Arabidopsis thaliana. *Biochem. J.* **397**: 139–148
- Maeo, K., Tomiya, T., Hayashi, K., Akaike, M., Morikami, A., Ishiguro, S., Nakamura, K. (2001). Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for  $\alpha$ -amylase of sweet potato. *Plant Mol. Biol.* **46**: 627–637
- Martinez de Ilarduya, O., Vicente-Carbajosa, J., Sánchez de la Hoz, P., Carbonero, P. (1993) Sucrose synthase genes in barley cDNA: cloning of the *Ss2* type and tissue-specific expression of *Ss1* and *Ss2*. *FEBS Lett.* **320**: 177-181.
- Martinez-Garcia, J. F., Huq, E., Quail, P. H. (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**: 859–863.
- Masaki, T., Mitsui, N., Tsukagoshi, H., Nishii, T., Morikami, A., Nakamura, K. (2005) ACTIVATOR of Spo(min)::LUC1/WRINKLED1 of Arabidopsis thaliana transactivates sugar-inducible promoters. *Plant Cell*

- Physiol. **46**: 547-556
- Mason, H., Dewald, D. B., Creelman, R. A., Mullet J. E.** (1992) Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. *Plant Physiol.* **98**: 859-867.
- Matarasso, N., Schuster, S., Avni, A.** (2005) A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression. *Plant Cell* **17**: 1205-1216
- Mikami, K., Tabata, T., Kawata, T., Nakayama, T., Iwabuchi, M.** (1987) Nuclear protein(s) binding to the conserved DNA hexameric sequence postulated to regulate transcription of wheat histone genes. *FEBS Lett.* **223**: 273-278.
- Mita, S., Susuki-Fujii, K., Nakamura, K.** (1995) Sugar-inducible expression of a gene for  $\alpha$ -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**: 895-904.
- Mitsunaga, S., Rodriguez, R. L., Yamaguchi, J.** (1994) Sequence-specific interactions of a nuclear protein factor with the promoter region of a rice gene for  $\alpha$ -amylase, *RAmy3D*. *Nucl. Acids Res.* **22**: 1948-1953.
- Morikami, A., Matsunaga, R., Tanaka, Y., Suzuki, S., Mano, S., Nakamura, K.** (2005) Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco. *Mol. Genet. Gen.* **272**: 690-699
- Müller-Röber, B. T., Ko mann, J., Hannah, L. C., Willmitzer, L., Sonnewald, U.** (1990) One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 136-146.
- Nagy, E., Henics, T., Eckert, M., Miseta, A., Lightowlers, R. N., Kellermayer, M.** (2000) Identification of the NAD(C)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 253-260
- Niederacher, D., Entian, K. D.** (1991) Characterization of Hex2 protein, a negative regulatory element necessary for glucose repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **200**: 311-319
- Núñez, J. G. A., Kronenberger, J., Wuilléme, S., Lepiniec, L., Rochat, C.** 2008. Study of AtSUS2 localization in seeds reveals a strong association with plastids. *Plant Cell Physiol* **49**: 1621-1626.
- Ogino, T., Yamadera, T., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Mizumoto, K.** (2001) Enolase, a cellular glycolytic enzyme, is required for efficient transcription of Sendai virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 447-455
- Ohto, M., Nakamura-Kito, K., Nakamura, K.** (1992). Induction of expression of genes coding for sporamin and  $\alpha$ -amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiol.* **99**: 422-427.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Höhne, M., Günter, M., Kamlage, B., Trethewey, R., Scheible, W.R., Stütt, M.** (2007). Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **49**: 463-491.

- Persia, D., Cai, G., Del Casino, C., Faleri, C., Willemse, M. T., Cresti, M. 2008. Sucrose synthase is associated with the cell wall of tobacco pollen tubes. *Plant Physiol.* **147**: 1603–1618.
- Perucho, M., Salas, J., Salas, M. L (1980) Study of the interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **606**: 181–195
- Pla, M., Vilardell, J., Guiltinan, M. J., Marcotte, W. R., Niogret, M. F., Quatrano, R. S., Pages, M. (1993). The *cis*-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28*. *Plant Mol. Biol.* **21**: 259–266.
- Ramon, M., Rolland, F., Sheen, J. (2008) Sugar Sensing and Signaling. *The Arabidopsis Book*
- Ray, R. B., Steele, R., Seftor, E., Hendrix, M. (1995) Human breast carcinoma cells transfected with the gene encoding a c-myc promoter-binding protein (MBP-1) inhibits tumors in nude mice. *Cancer Res.* **55**: 3747–3751
- Reinhold, H., Soyk, S., Šimková, K., Hostettler, C., Marafino, J., Mainiero, S., Vaughan, C. K., Monroe, J. D., Zeeman, S. C. (2011)  $\beta$ -Amylase-Like Proteins Function as Transcription Factors in Arabidopsis, Controlling Shoot Growth and Development. *The Plant Cell Online* **23**: 1391-1403
- Revzin, A. (1987) Gel electrophoresis assays for DNA-protein interactions. *BioTechniques* **7**: 346-355.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J., Willmitzer, L. (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* **8**: 23-29.
- Rodriguez, A. De La Cera, T., Herrero, P., Moreno, F. (2001) The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **355**: 625–631
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 675-709
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., Gonzalez, J. A., Hilal, M., Prado, F. E. (2009) Soluble sugars--metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signal Behav.* **4**: 388-393
- Rose, A. B., Last, R. L. (1997) Introns act post-transcriptionally to increase expression of the *Arabidopsis thaliana* tryptophan pathway gene *PAT1*. *Plant J.* **11**: 455-464.
- Rossignol, P., Stevens, R., Perennes, C., Jasinski, S., Cella, R., Tremousaygue, D., Bergounioux, C. (2002) AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce *Arabidopsis* leaf cells to re-enter S phase. *Mol. Genet. Gen.* **266**: 995-1003
- Ruan, Y-L, Chourey, P. S., Delmer, D.P., Perez-Grau, L. (1997) The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed. *Plant Physiol.* **115**: 375-385.
- Sadakata, T., Kuo, C. H., Ichikawa, H., Nishikawa, E., Niu, S. Y., Kumamaru, E., Miki, N. (2000) Pura, a single-stranded DNA binding protein, suppresses the enhancer activity of cAMP response element (CRE). *Mol. Brain Res.* **77**: 47-54

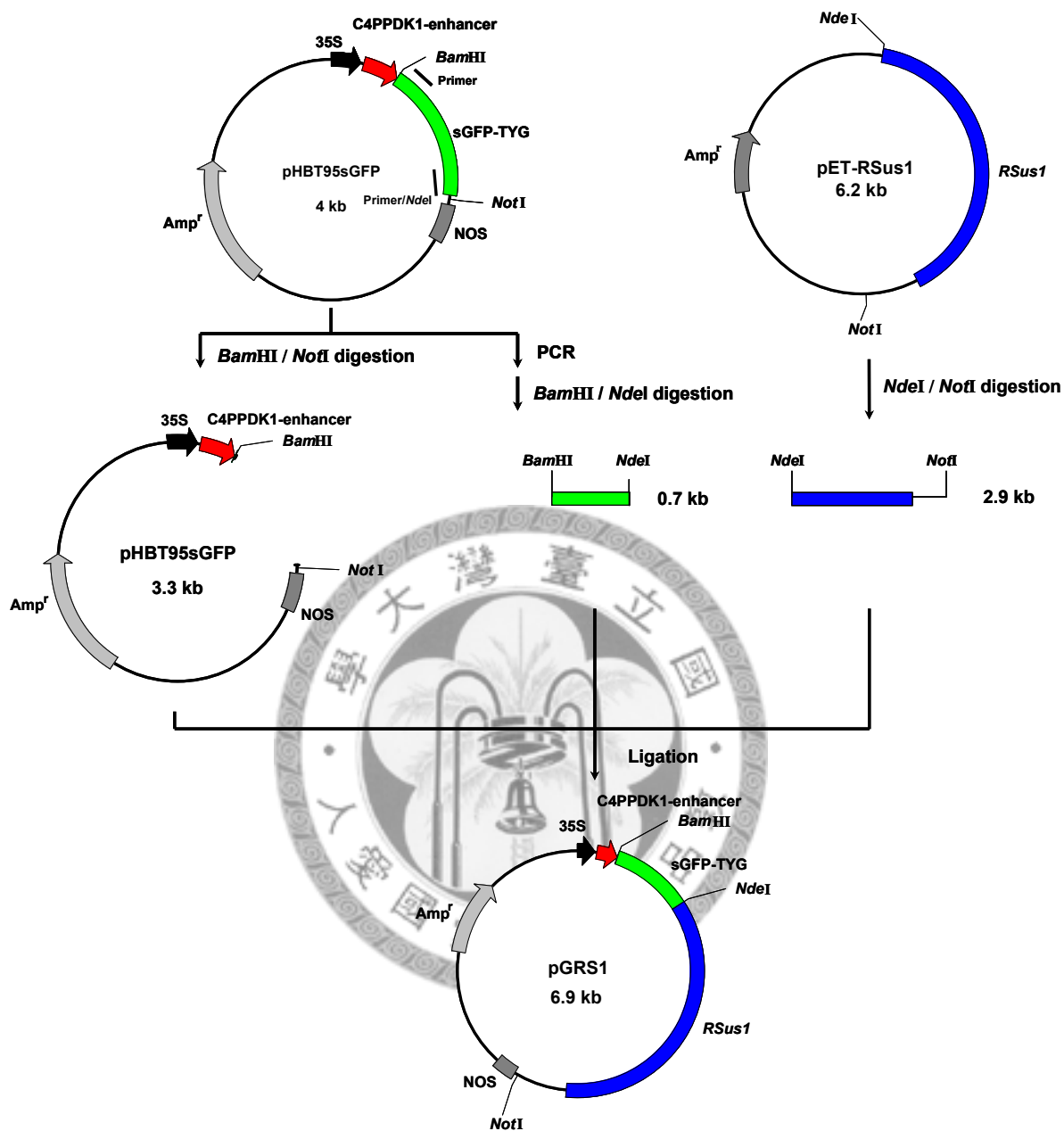
- Sadka, A., DeWald, D. B., May, G. D., Park, W. D., Mullet, J. E. (1994). Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. *Plant Cell* **6**: 737–749.
- Salanoubat, M., Belliard, G. (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* **84**: 181-185.
- Sánchez de la Hoz, P., Vicente-Carbajosa, J., Mena, M., Carbonero, P. (1992) Homologous sucrose synthase genes in barley (*Hordeum vulgare*) and located in chromosomes 7H (syn. 1) and 2H. *FEBS Lett.* **310**: 46-50.
- Sanz, P. Alms, G. R., Haystead, T. A., Carlson, M. (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1321–1328
- Schulte, R., Bonas U. (1992) A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acids. *Plant Cell* **4**: 79-86.
- Schultz, D. E., Hardin, C. C., Lemon, S. M. (1996) Specific interaction of glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J. Biol. Chem.* **271**: 14134–14142
- Sebkova, V., Unger, C., Hardegger, M. and Sturm, A. (1995) Biochemical, physiological, and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*. *Plant Physiol.* **108**: 75-83.
- Sheen, J., Hwang, Seong., Niwa, Y., Kobayashi, H., Galbraith, D. W. (1995) Green-fluorescent protein as new vital marker in plant cells. *Plant J.* **8**: 777-784.
- Shimotai, Y., Minami, H., Saitoh, Y., Onodera, Y., Mishima, Y., Kelm, Jr. R.J., Tsutsumi, K-i. (2006) A binding site for Pur $\alpha$  and Pur $\beta$  is structurally unstable and is required for replication in vivo from the rat aldolase B origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 517-525
- Sioud, M., Jespersen, L. (1996) Enhancement of hammerhead ribozyme catalysis by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **257**: 775–789
- Sirover, M. A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1432**: 159–184
- Smeekens, S. C. M. (1998) Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 230-234.
- Smeekens, S. C. M. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 49-81.
- Smeekens, S. C. M., Rook, F. (1997) Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.* **115**: 7-13.
- Smeekens, S., Wind, J., Hanson, J. (2010) Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* **71**: 1610-1614
- Smith, A. M., Stitt, M. (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* **30**: 1126-1149
- St. Pierre, B., Brisson, N. (1995) Induction of the plastidic starch-phosphorylase gene in potato storage sink tissue: effect of sucrose and evidence for coordinated regulation of phosphorylase and starch biosynthetic genes. *Planta* **195**: 339-344.

- Sturm, A.** (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* **121**: 1-7.
- Sturm, A., Lienhard, S., Schatt, S., Hardegger, M.** (1999) Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Mol. Biol.* **39**: 349-360.
- Sturm, A., Sebkova, V., Lorenz, K., Hardegger, M., Leinhard, S., Unger, C.** (1995) Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isozymes of acid  $\alpha$ -fructofuranosidase in carrot. *Planta* **195**: 601-610.
- Subbaiah, C. C., Huber, S. C., Sachs, M. M., Rhoads, D.** (2007) Sucrose synthase expanding protein function. *Plant Signaling Behav.* **2**:28-29
- Subbaiah, C. C., Palaniappan, A., Duncan, K., Rhoads, D. M., Huber, S. C., Sachs, M. M.** (2006) Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize. *J. Biol. Chem.* **281**: 15625-15635
- Subramanian, A. and Miller, D. M.** (2000) Structural analysis of alphaenolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J. Biol. Chem.* **275**: 5958–5965
- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Boren, M., Ahlandsberg, S., Jansson, C.** (2003) A novel WRKY transcription factor, *susiba2*, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter. *Plant Cell*, **15**: 2076-2092
- Sundararaj, K. P. Wood, R. E., Ponnusamy, S., Salas, A. M., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L. M., Hannun, Y. A., Ogretmen, B.** (2004) Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **279**: 6152–6162
- Sun, S., Stoflet, E. S., Cogan, J. G., Strauch, A. R., Getz, M. J.** (1995) Negative regulation of the vascular smooth-muscle  $\alpha$ -actin gene in fibroblasts and myoblasts : disruption of enhancer function by sequence-specific single-stranded-DNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**: 2429-2436
- Trémoussaygue, D., Garnier, L., Bardet, C., Dabos, P., Hervé, C., Lescure, B.** (2003) Internal telomeric repeats and ‘TCP domain’ protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.* **33**: 957-966
- Tremoussaygue, D., Manevski, A., Bardet, C., Lescure, N., Lescure, B.** (1999) Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J.* **20**: 553-561
- Tsai, Z. -C., Wang, A. -Y.** (2003) Identification of rice manganese-dependent protein kinases that phosphorylate sucrose synthase at multiple serine residues. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **44**:141-150
- Tsukaya, H., Ohshima, T., Naito, S., Chino, M., Komeda, Y. J. -P. P.** (1991) Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **97**: 1414-1421.



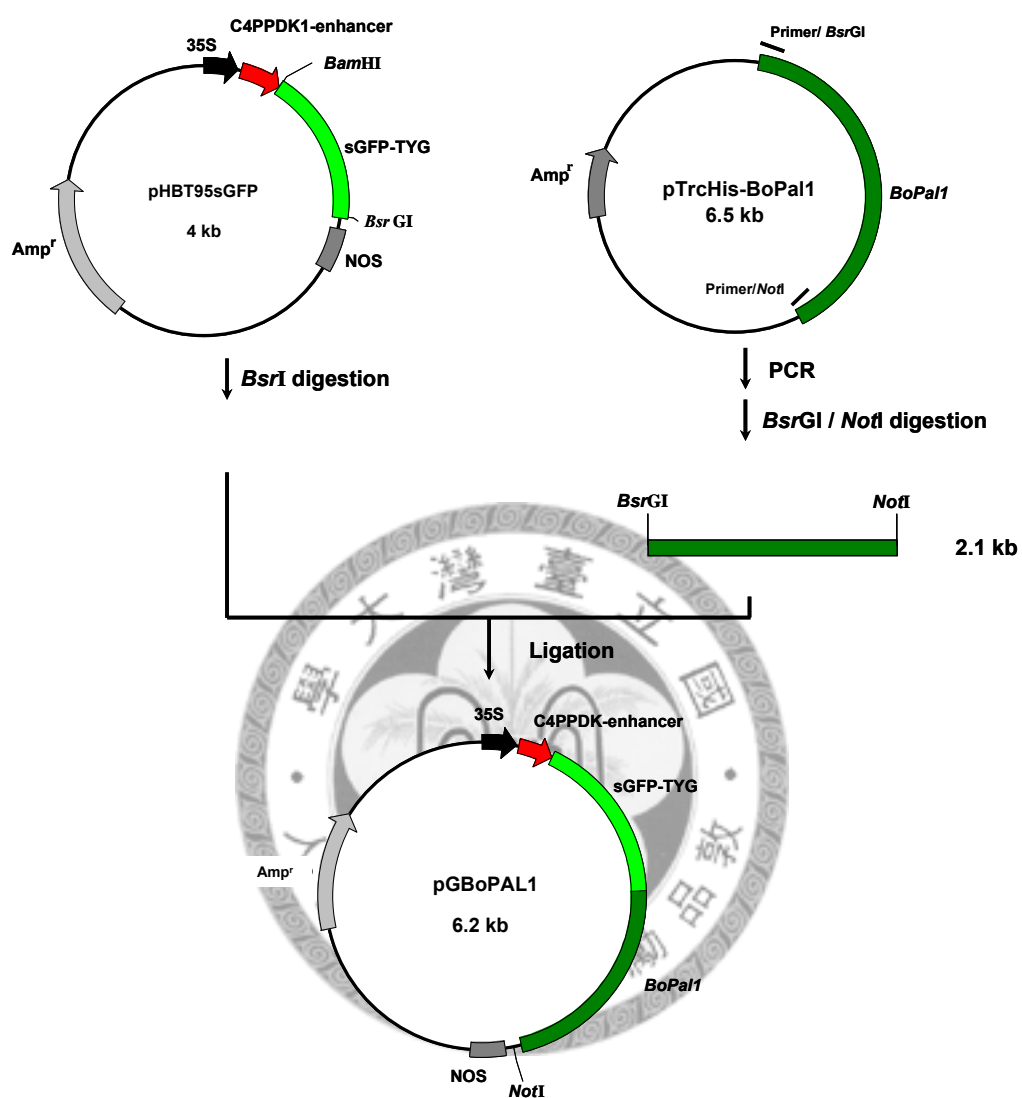
- Van den Ende, W., Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F.** (2010) Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *Febs J.* **277**: 2022-2037
- Vierstra, R.** (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 385–397
- Vincent, O. Townley, R., Kuchin, S., Carlson, M.** (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* **15**: 1104–1114
- Visser, R. G. F., Stolte, A. and Jacobsen, E.** (1991) Expression of a chimeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants. *Plant Mol. Biol.* **17**: 691-699.
- Wang, A. -Y., Yu, W. -P., Juang, R. -H., Sung, H. -Y., Su, J. -C.** (1992) Presence of three rice sucrose synthase genes as revealed by cloning and sequencing of cDNA. *Plant Mol. Biol.* **19**: 881-885.
- Wang, A. -Y., Kao, M. -H., Yang, W. -H., Sayion, Y., Liu, L. -F., Lee P. -D., Su, J. -C.** (1999) Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. *Plant Cell Physiol.* **40**: 800-807.
- Wang, F., Smith, A. G., Brenner, M. L.** (1994) Temporal and spatial expression pattern of sucrose synthase during tomato fruit development. *Plant Physiol.* **104**: 535-540.
- Wang, X. Q., Huang, W. D., Zhan, J. C.** 2009. Effects of low light on phloem ultrastructure and subcellular localization of sucrose synthase in *Prunus persica* L. var. nectarina. *Russian J. Plant Physiol.* **56**: 462–469.
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U.** (1997) Sugar import and metabolism during seed development, *Trend Plant Sci.* **2**: 169-174
- Wenzler, H. C., Mignery, G., Fisher, L., Park, W.** (1989) Sucrose-regulated expression of chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **13**: 347-354.
- White, M. K., Johnson, E. M., Khalili, K.** (2009) Multiple roles for Puralpha in cellular and viral regulation. *Cell Cycle* **8**: 1-7
- Williams, K.R., Reddigari, S., Patel, G.L.** (1985) Identification of a nucleic acid helixdestabilizing protein from rat liver as lactate dehydrogenase-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 5260–5264
- Winter, H., Huber, J. L., Huber, S. C.** (1997) Membrane association of sucrose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Lett.* **420**: 151-155.
- Winter, H., Huber, S. C.** (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**: 253-289.
- Xiao, W., Sheen, J., Jang, J. C.** (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* **44**: 451–461.
- Yu, S. -M., Kuo, Y. -H., Sheu, Y. -J., Liu, L. -F.** (1991) Metabolic depression of  $\alpha$ -amylase gene expression in suspension-cultured cells of rice. *J. Biol. Chem.* **266**: 21131-21137.

- Yu, S. -M., Lee, Y. -C., Fang, S. -C., Chan, M. -T., Hwa, S. -F., Liu, L. -F. (1996) Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of  $\alpha$ -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. *Plant Mol. Biol.* **30**: 1277-1289.
- Yu, W. -P., Wang, A. -Y., Juang, R. -H., Sung, H. -Y., Su, J. -C. (1992) Isolation of rice sucrose synthase cDNA and genomic DNA. *Plant Mol. Biol.* **18**:139-142.
- Zambrano, N., DeRenzi, S., Minopoli, G., Faraonio, R., Donini, V., Scaloni, A., Cimino, F., Russo, T. (1997) DNA-binding protein Pura and transcription factor YY1 function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter. *Biochem. J.* **328**: 293-300
- Zheng, L., Roeder, R. G., Luo, Y. (2003) S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**: 255–266
- Zhong, X. H., Howard, B. D. (1990) Phosphotyrosine-containing lactate dehydrogenase is restricted to the nuclei of PC12 pheochromocytoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 770–776
- Zourelidou, M., de Torres-Zabala, M., Smith, C., Bevan, M. W. (2002). Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *Plant J.* **30**: 489–497.
- 王增興 (1995) 水稻蔗糖合成酶異構基因調控序列之結構與功能分析，博士論文，國立台灣大學農業化學研究所。
- 余維平 (1989) 水稻蔗糖合成酶基因結構之研究，博士論文，國立台灣大學農業化學研究所。
- 高茂涵, 王愛玉 (1999) 蔗糖、光照及溫度對水稻白化苗蔗糖合成異構酶含量之影響，*中國農業化學會誌* **37**: 207-214。
- 黃德宜 (2003) 水稻蔗糖合成酶 *RSus3* 基因表現與酵素功能之探討，博士論文，國立台灣大學農業化學研究所。
- 張睿哲 (2004) 水稻蔗糖合成酶 *RSus1* 基因調控區域中 *cis-elements* 之探討，碩士論文，國立台灣大學微生物與生化學研究所。
- 廖憶純 (2002) 水稻懸浮培養細胞中蔗糖合成酶基因表現受糖調控之研究，博士論文，國立台灣大學農業化學研究所。
- 蔡承佳 (2003) 蛋白質磷酸化對水稻蔗糖合成酶酵素功能及基因表現的影響，博士論文，國立台灣大學農業化學研究所。



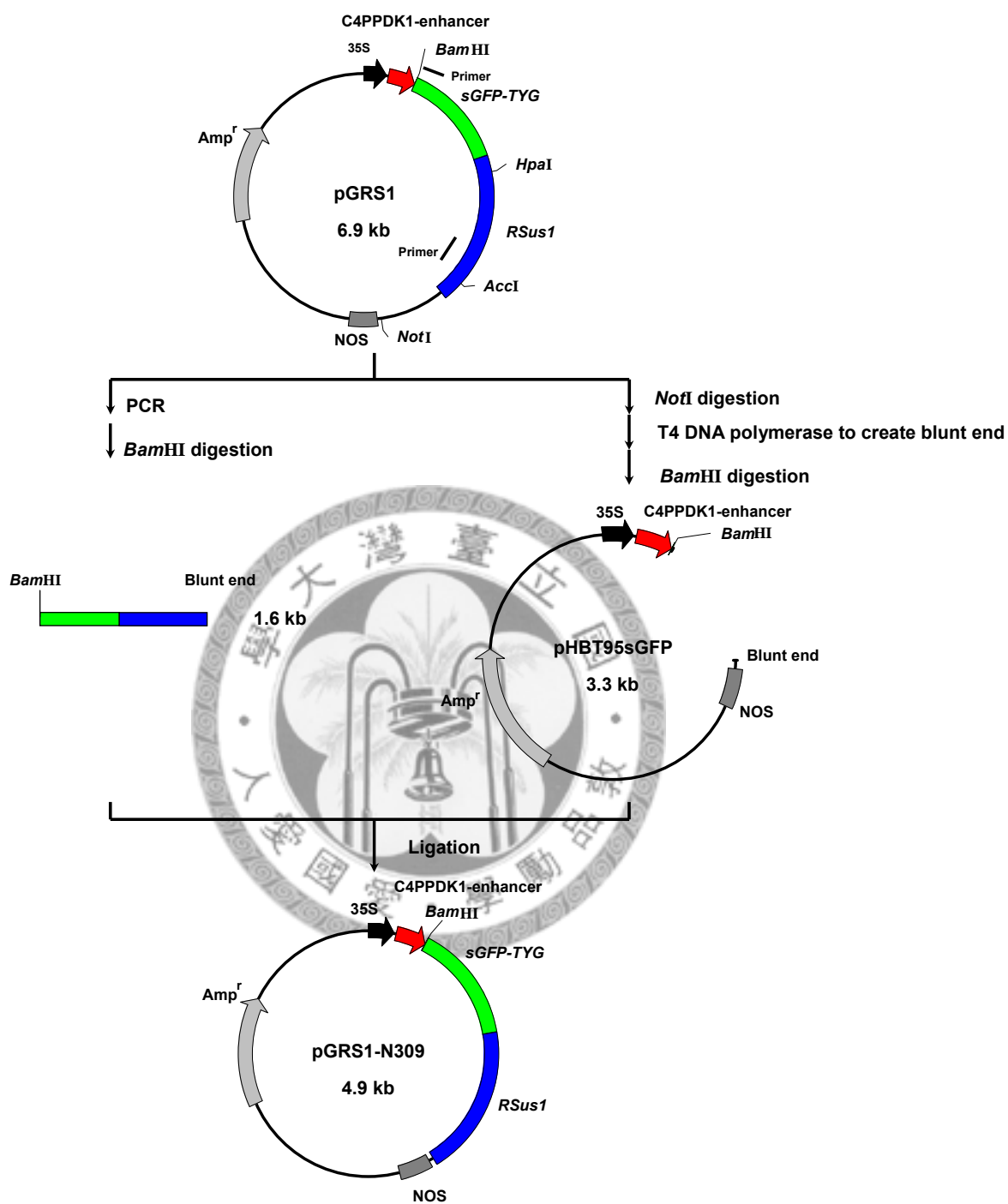
圖一、質體 pGRS1 的建構策略。

Fig. 1 Construction strategy of plasmid pGRS1



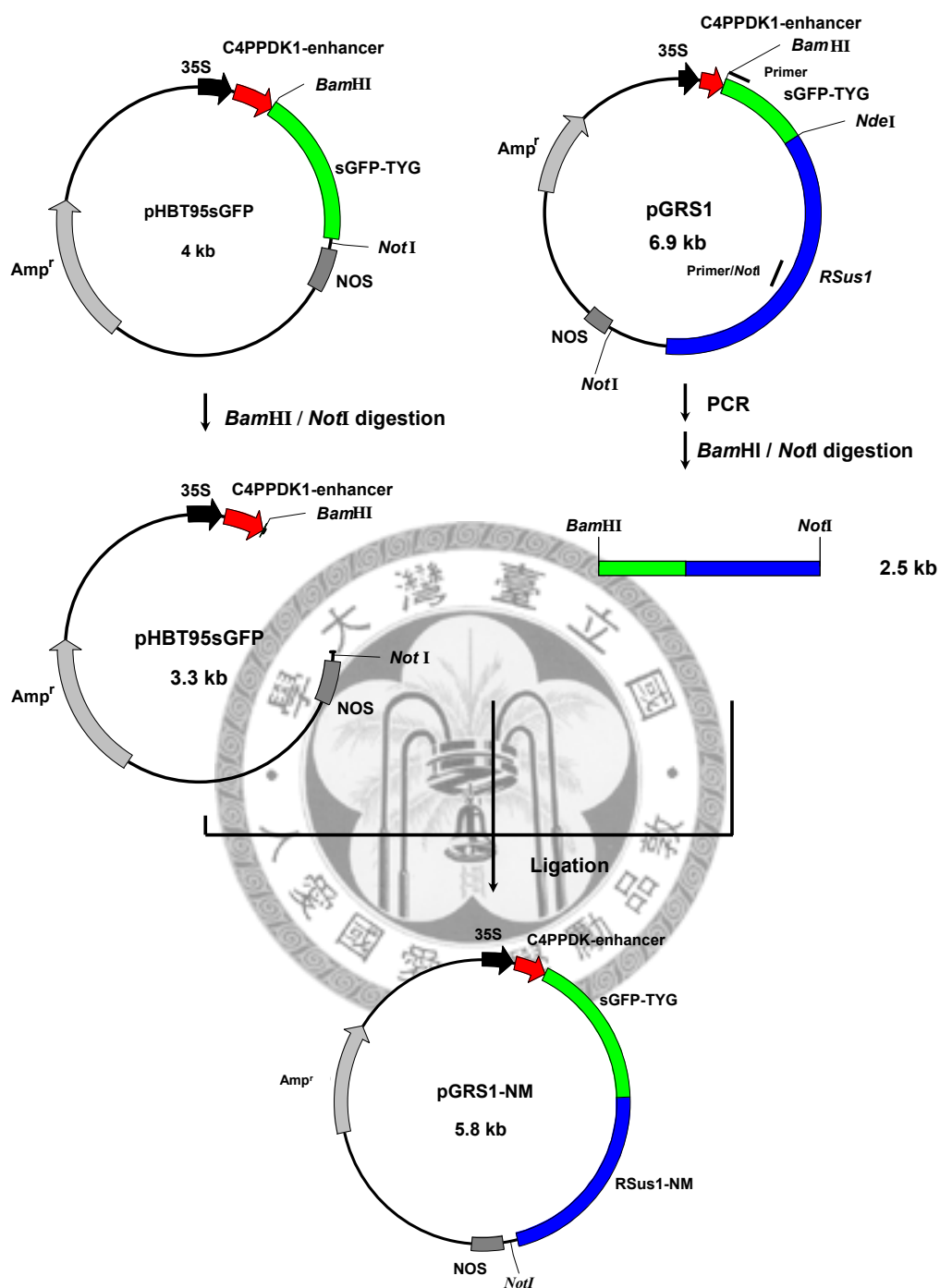
圖二、質體 pGBoPAL1 的建構策略。

Fig. 2 Construction strategy of plasmid pGBoPAL1



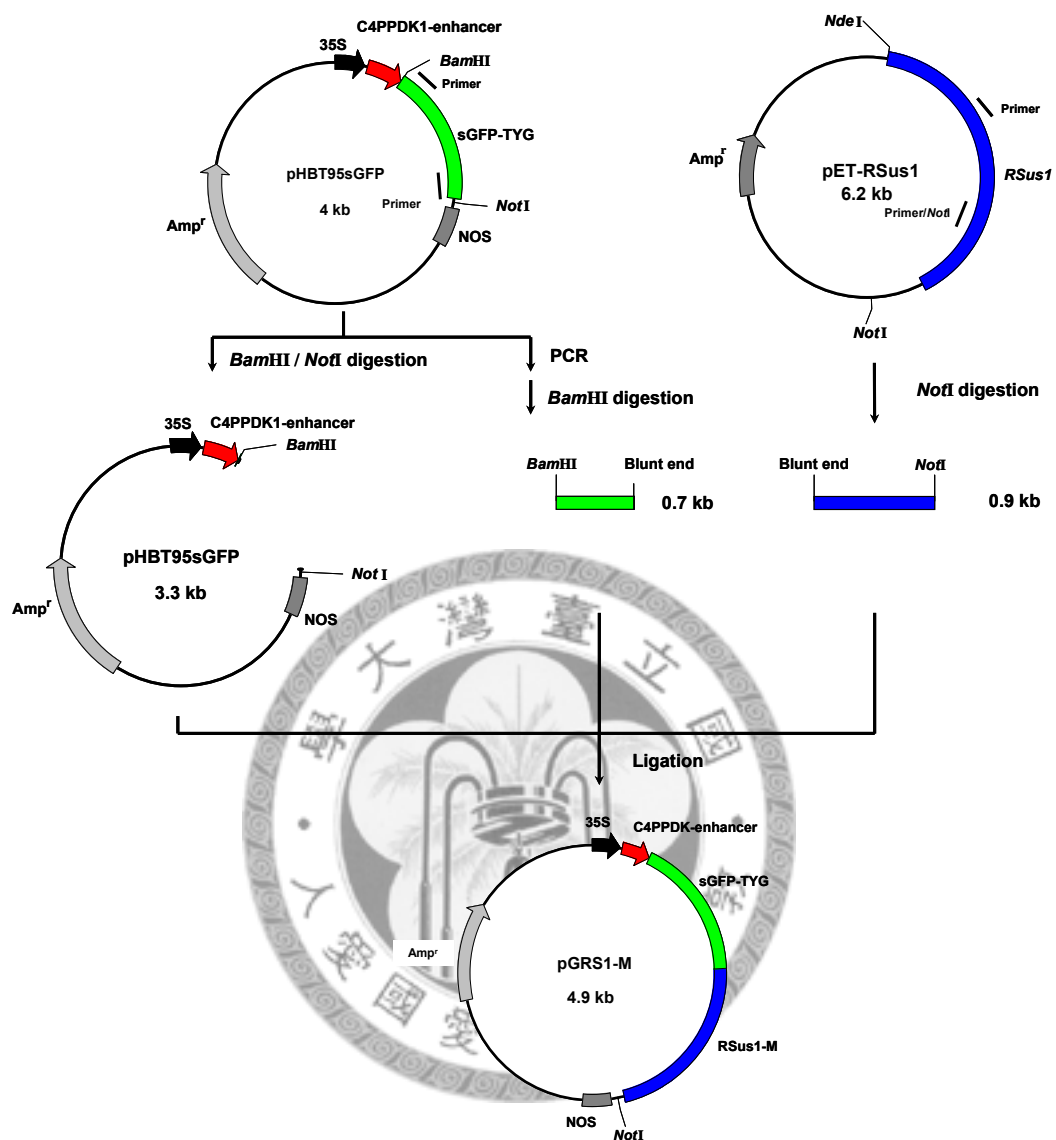
圖三、質體 pGRS1- N309 的建構策略。

Fig. 3 Construction strategy of plasmid pGRS1- N309



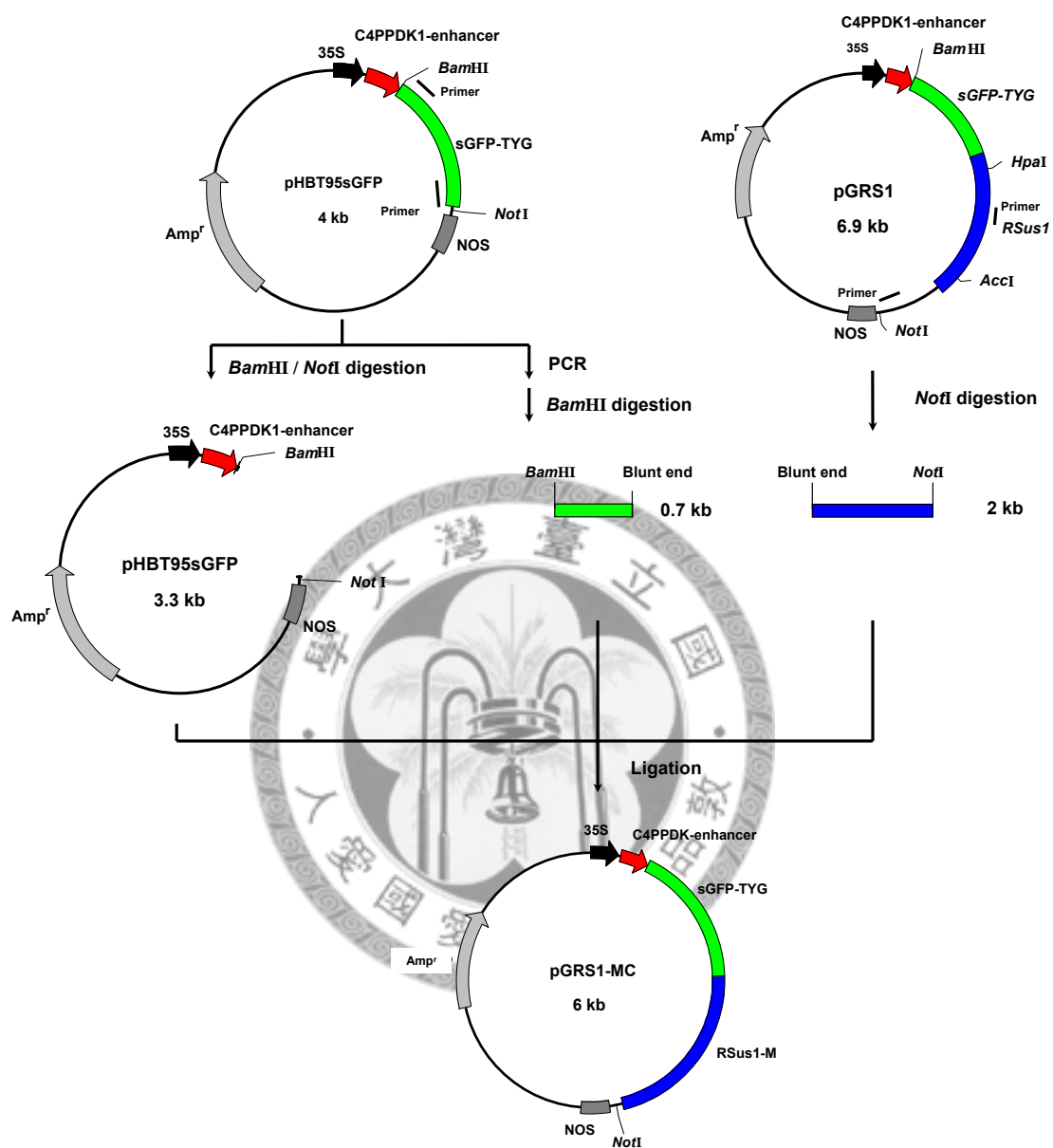
圖四、質體 pGRS1- NM 的建構策略

Fig. 4 Construction strategy of plasmid pGRS1- MN



圖五、質體 pGRS1- M 的建構策略。

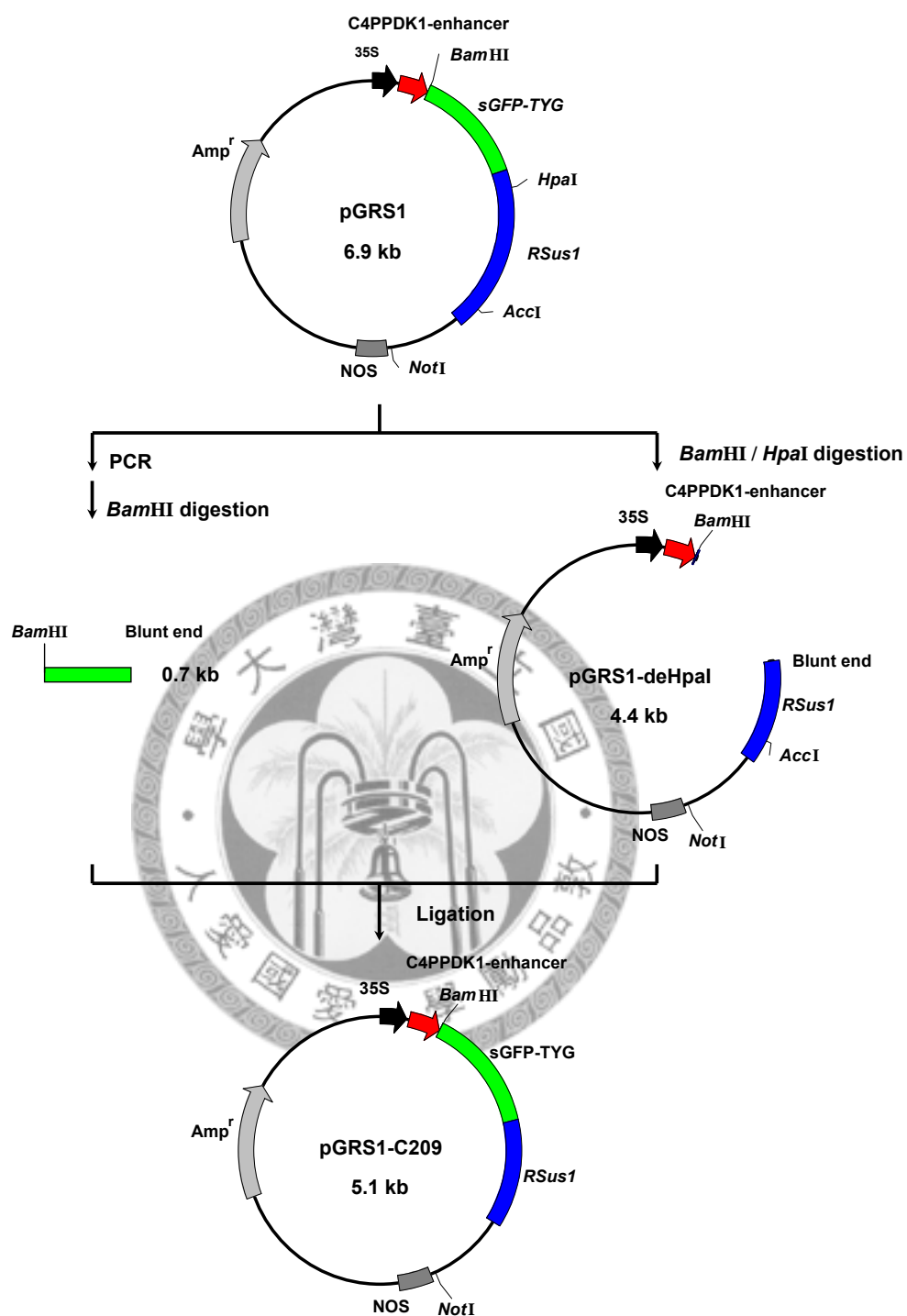
Fig. 5 Construction strategy of plasmid pGRS1 - M



圖六、質體 pGRS1- MC 的建構策略。

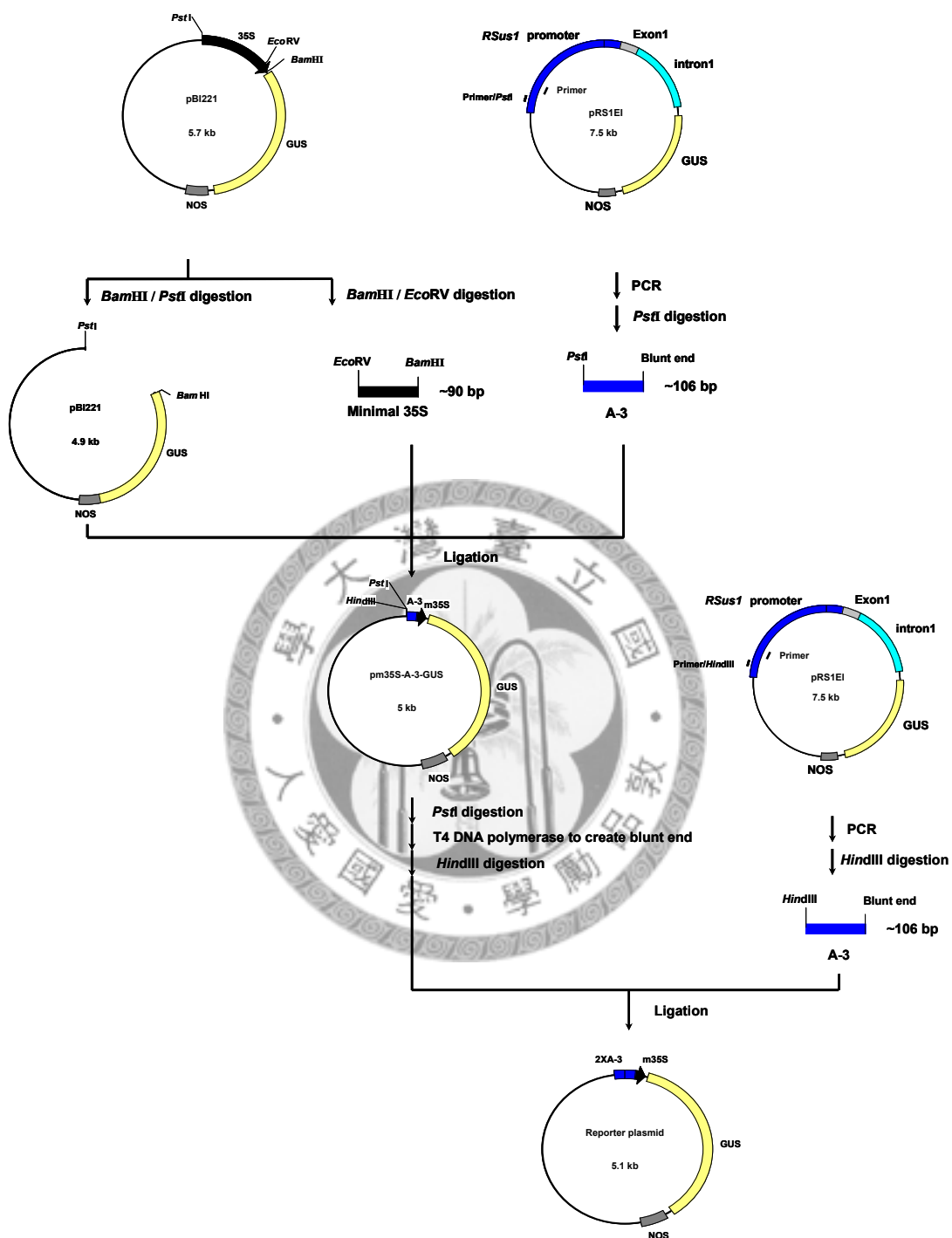
Fig. 6 Construction strategy of plasmid pGRS1- MC





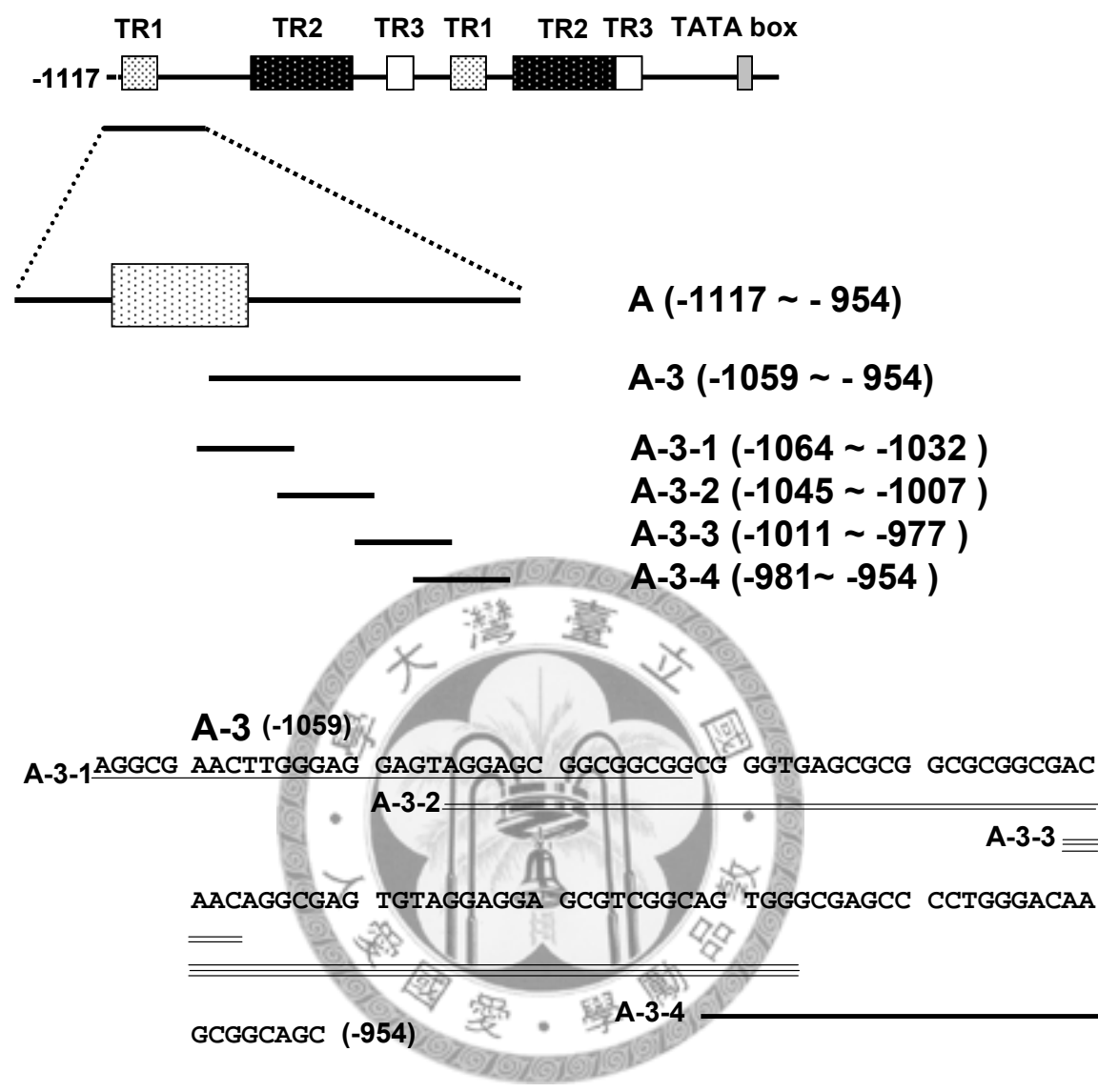
圖七、質體 pGRS1- C209 的建構策略。

Fig. 7 Construction strategy of plasmid pGRS1- C209



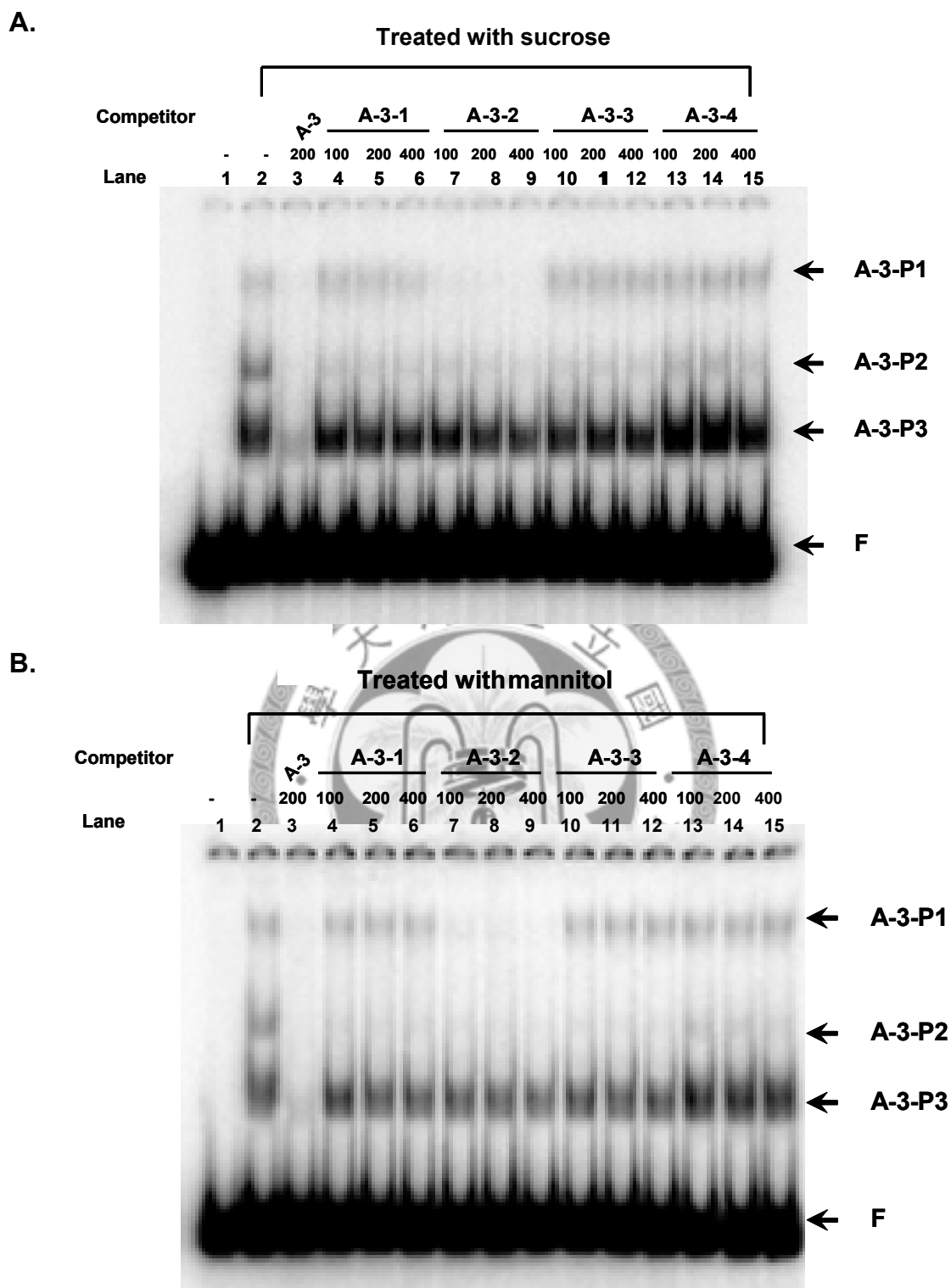
圖八、Reporter 質體的建構策略。

Fig. 8 Construction strategy of reporter plasmid



圖九、用於膠體遲滯實驗中之 DNA 片段 A-3 及寡核苷酸片段之序列，及其於 *RSus1* 啟動子上游之位置。

Fig. 9 The sequences of DNA fragments A-3 and oligonucleotides used in gel mobility shift assay and their positions in the upstream region of *RSus1* promoter.



圖十、以不同寡核苷酸片段為競爭者，以膠體電泳遲滯實驗檢驗 A-3 與細胞核蛋白質間之交互作用。由含蔗糖 (圖 A) 與甘露醇 (圖 B) 培養基培養 16 小時之水稻懸浮細胞抽取核蛋白質，與放射線標識之 A-3，進行電泳遲滯分析，每一行上之數字表示競爭者加入的量為探針量的 100, 200 或 400 倍 (w/w)，DNA-蛋白質複合體 (A-3-P) 與未結合之探針 (F) 之位置以箭頭表示。

**Fig. 10 Gel mobility shift assay of the DNA fragment A-3 with nuclear proteins in the presence of different competitor DNAs.** Nuclear proteins were extracted from rice suspension-cultured cells grown in medium containing sucrose (A) or mannitol (B) for 16 h. The radio-labeled A-3 was used as a probe for gel mobility shift assay. The number above each lane indicates the presence of 100-, 200- or 400-fold excess (w/w) of competitor DNA in the reaction. DNA-protein complexes (A-3-P) and free probe (F) are showed with arrows.

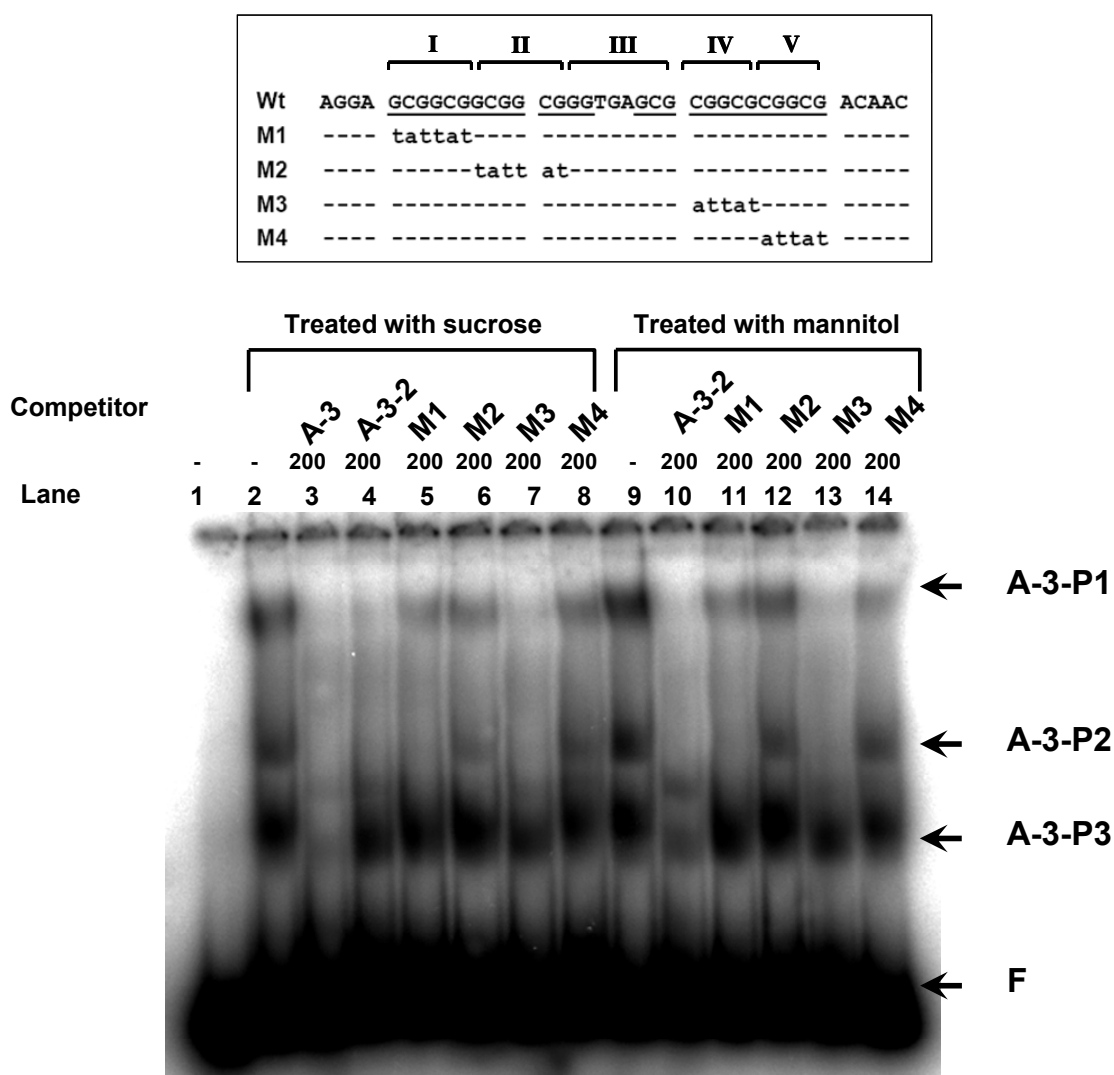


		I	II	III	IV	V
Wt	AGGA	<u>GCGGC</u> <u>GCGCGG</u>	<u>CGGGT</u> <u>GAGCG</u>	<u>CGGC</u> <u>GCGGCG</u>	ACAAC	
M1	----	tattat----	-----	-----	-----	-----
M2	----	-----tatt	at-----	-----	-----	-----
M3	----	-----	-----	attat----	-----	-----
M4	----	-----	-----	-----attat	-----	-----
M5	----	tattat----	-----	attat----	-----	-----
M6	----	tattat----	-----	-----attat	-----	-----
M7	----	-----tatt	at-----	attat----	-----	-----
M8	----	-----tatt	at-----	-----attat	-----	-----
M9	----	-----	--tt--tat	-----	-----	-----
M10	----	tattattatt	at-----	-----	-----	-----
M11	----	-----	-----	attatattat	-----	-----
M12	----	tattattatt	at-----	attatattat	-----	-----



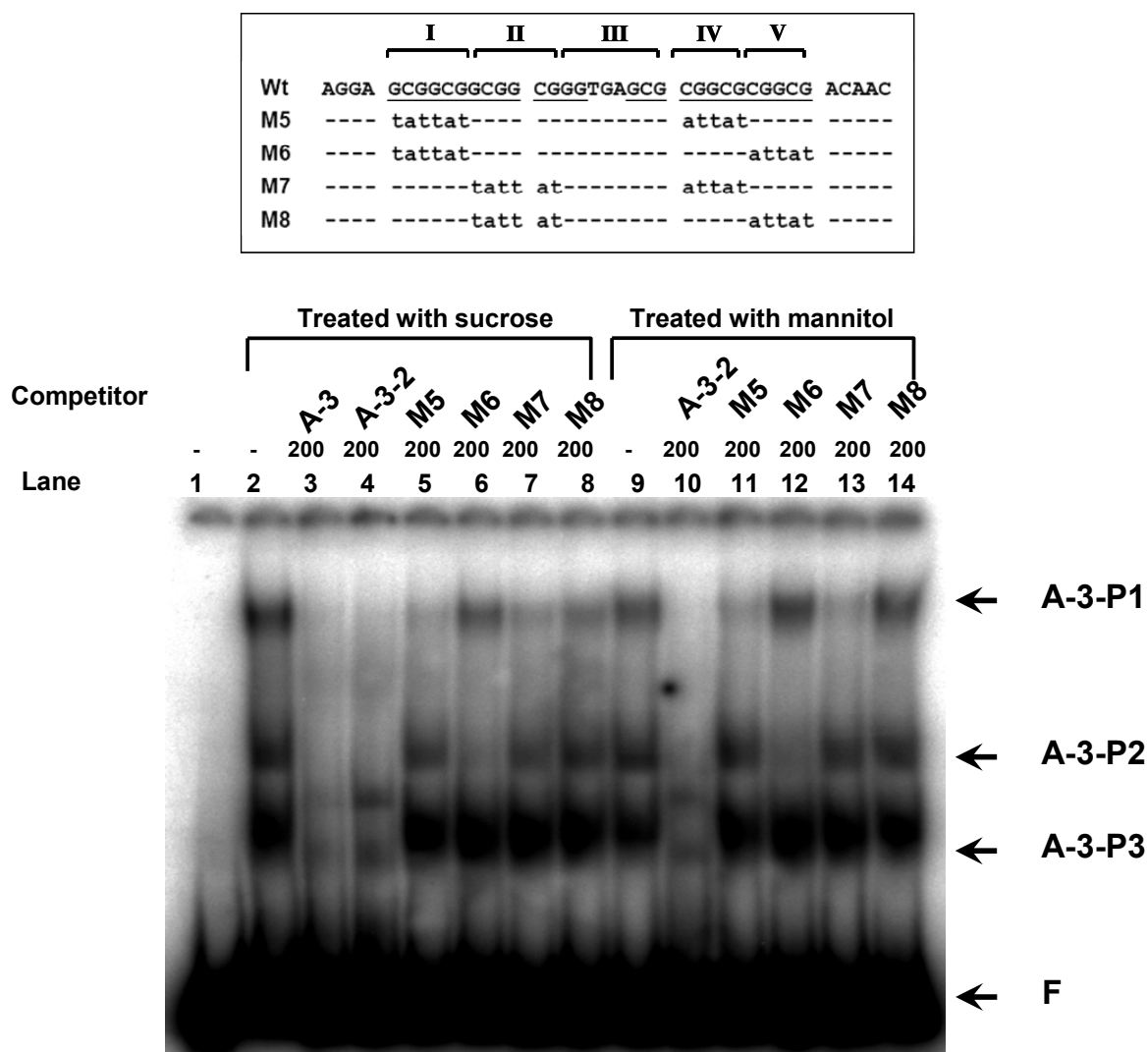
圖十一、DNA 片段 A-3-2 之序列與突變序列。小寫英文字體表經更改的核苷酸，I 至 V 表序列重複區域。

**Fig. 11** The original and mutant sequences of DNA fragments A-3-2. Modified nucleotides are showed in lower-case. The symbols of I to V mean repeat regions.



圖十二、以 M1, M2, M3 及 M4 為競爭者，以膠體電泳遲滯分析實驗檢驗 A-3 與細胞核蛋白質間之交互作用。由含蔗糖及甘露醇培養基培養 16 小時之水稻懸浮細胞抽取核蛋白質，與放射線標識之 DNA 片段 A-3 為探針，進行電泳遲滯分析。每一行上之數字表示 competitors 加入的量為探針量的 200 倍 (w/w)，DNA-蛋白質複合體 (A-3-P) 與未結合之探針 (F) 之位置以箭頭表示。

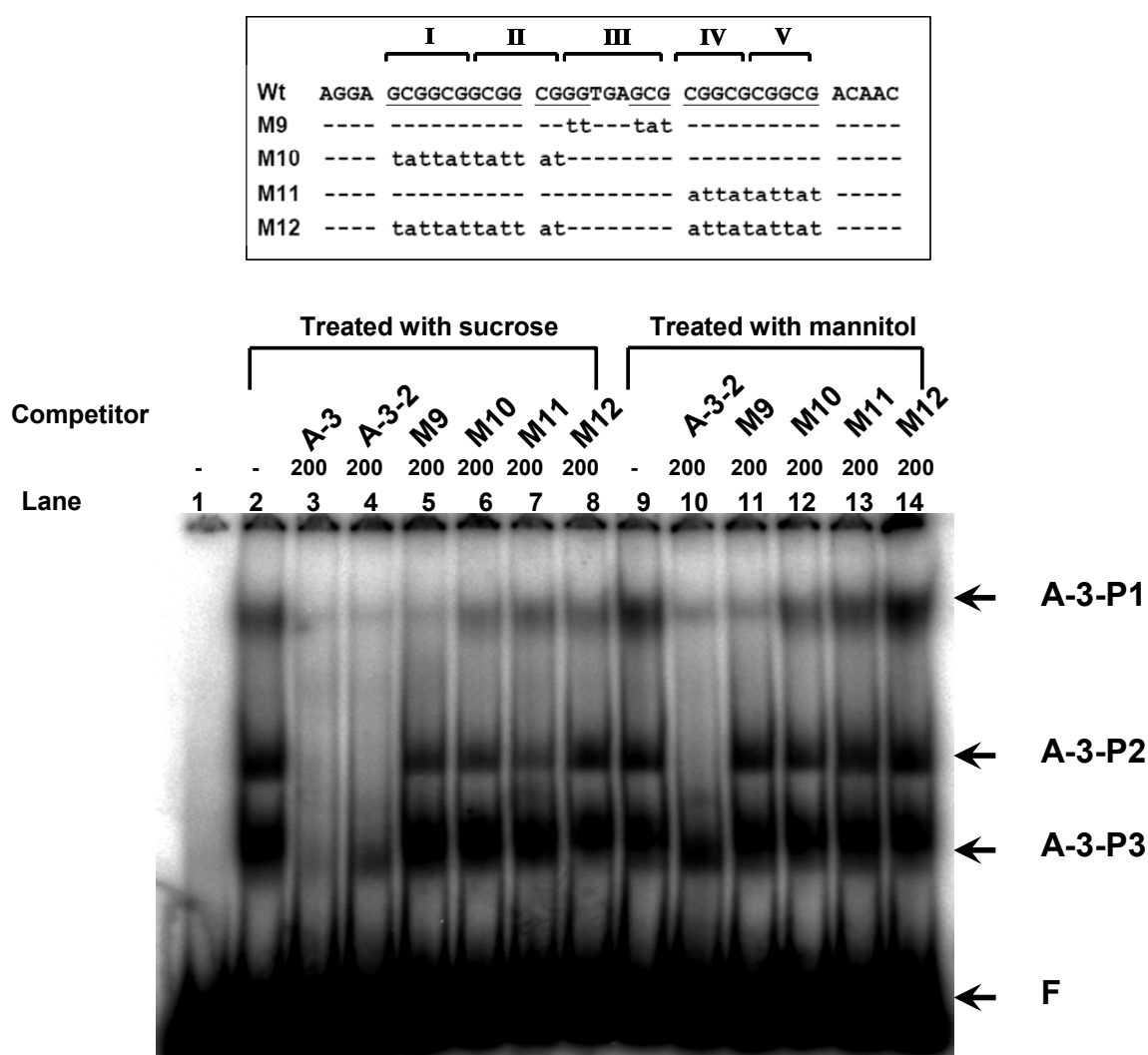
**Fig. 12 Gel mobility shift assay of the DNA fragment A-3 with nuclear proteins in the presence of competitor DNAs M1, M2, M3 and M4.** Nuclear proteins were extracted from rice suspension-cultured cells grown in medium containing sucrose or mannitol for 16 h. The radio-labeled A-3 was used as a probe for gel mobility shift assay. The number above each lane indicates the presence of 200-fold excess (w/w) of competitor DNA in the reaction. DNA-protein complexes (A-3-P) and free probe (F) are showed with arrows.



圖十三、以 M5, M6, M7 及 M8 為競爭者，以膠體電泳遲滯分析實驗檢驗 A-3 與細胞核蛋白質間之交互作用。由含蔗糖及甘露醇培養基培養 16 小時之水稻懸浮細胞抽取核蛋白質，與放射線標識之 DNA 片段 A-3 為探針，進行電泳遲滯分析。每一行上之數字表示 competitors 加入的量為探針量的 200 倍 (w/w)，DNA-蛋白質複合體 (A-3-P) 與未結合之探針 (F) 之位置以箭頭表示。

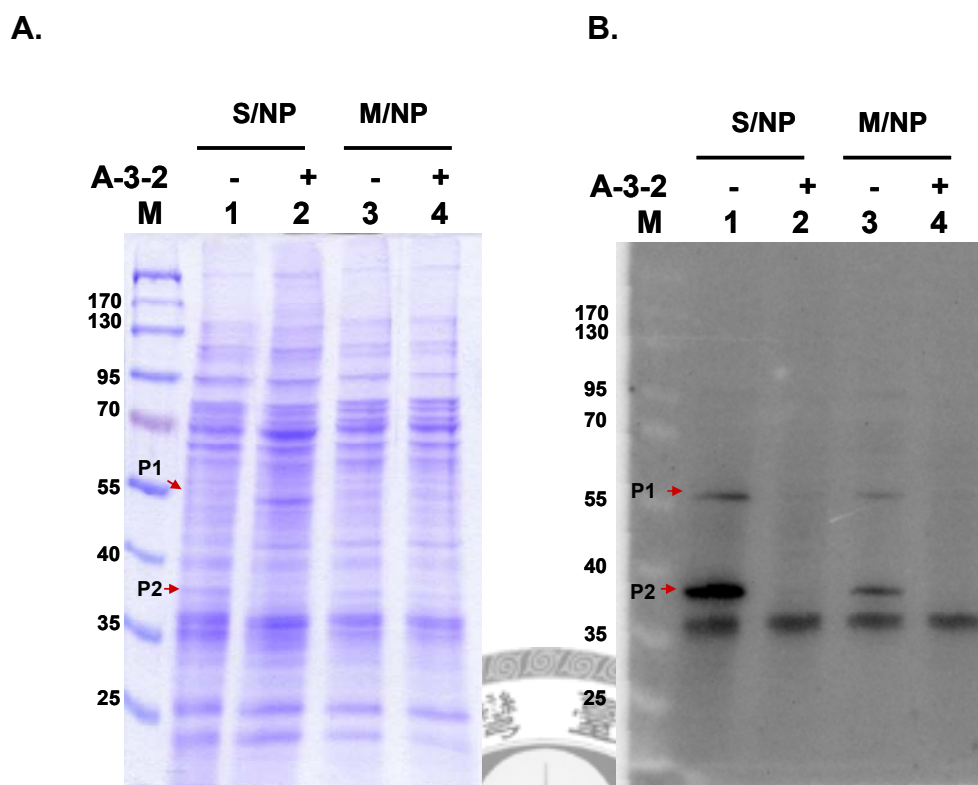
**Fig. 13 Gel mobility shift assay of the DNA fragment A-3 with nuclear proteins in the presence of competitor DNAs M5, M6, M7 and M8.** Nuclear proteins were extracted from rice suspension-cultured cells grown in medium containing sucrose or mannitol for 16 h. The radio-labeled A-3 was used as a probe for gel mobility shift assay. The number above each lane indicates the presence of 200-fold excess (w/w) of competitor DNA in the reaction. DNA-protein complexes (A-3-P) and free probe (F) are showed with arrows.





圖十四、以 M9, M10, M11 及 M12 為競爭者，以膠體電泳遲滯分析實驗檢驗 A-3 與細胞核蛋白質間之交互作用。由含蔗糖及甘露醇培養基培養 16 小時之水稻懸浮細胞抽取核蛋白質，與放射線標識之 DNA 片段 A-3 為探針，進行電泳遲滯分析。每一行上之數字表示 competitors 加入的量為探針量的 200 倍 (w/w)，DNA-蛋白質複合體 (A-3-P) 與未結合之探針 (F) 之位置以箭頭表示。

**Fig. 14 Gel mobility shift assay of the DNA fragment A-3 with nuclear proteins in the presence of competitor DNAs M9, M10, M11 and M12.** Nuclear proteins were extracted from rice suspension-cultured cells grown in medium containing sucrose or mannitol for 16 h. The radio-labeled A-3 was used as a probe for gel mobility shift assay. The number above each lane indicates the presence of 200-fold excess (w/w) of competitor DNA in the reaction. DNA-protein complexes (A-3-P) and free probe (F) are showed with arrows.

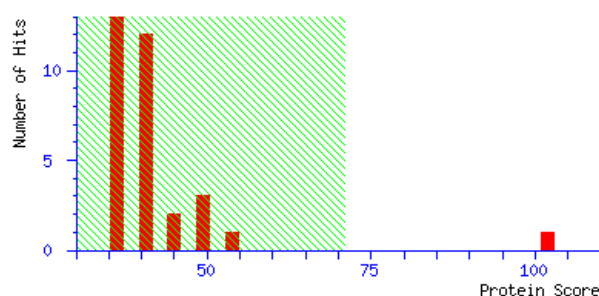


**圖十五、A-3-2 結合蛋白質之純化與分析。**由以含蔗糖 (S/NP) 與甘露醇 (M/NP) 培養基培養 16 小時之水稻懸浮細胞抽取核蛋白質，與已接合 DNA A-3-2 之膠體，進行親和純化之實驗，再以 12% SDS-PAGE 分析。圖 A 為 CBR 染色結果；圖 B 為以放射線標識之探針 A-3-2 進行 Southwestern blot 結果。每一行上之 “+,-” 表示 competitors A-3-2 加入或無。標準分子量 (M) 標於左側。箭頭表示可能之結合蛋白質，分別為 55 Da (P1) 及 38 kDa (P2)，將其切下並進行蛋白質身份鑑定。

**Fig. 15 Purification and analysis of the A-3-2-binding proteins.** Nuclear proteins were extracted from rice suspension-cultured cells grown in medium containing sucrose (S/NP) or mannitol (M/NP) for 16 h. The streptoavidin beads conjugated with the biotin-labeled A-3-2 DNA fragments were used for purification of DNA-binding proteins in the presence (+) or absence (-) of competitor DNA (unlabeled A-3-2). Proteins eluted from the beads were separated in 12% SDS-PAGE, after which the proteins in gel were stained with CBR (A) or transferred onto a PVDF membrane for southwestern analysis with probe A-3-2. Molecular weight markers (M) are shown at the left margin. Arrowheads indicate two bands of roughly 55 kDa (P1) and 38 kDa (P2) excised and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry.

## A.

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event.  
Protein scores greater than 71 are significant ( $p < 0.05$ ).



## Concise Protein Summary Report

Format As  [Help](#)

Significance threshold  $p <$   Max. number of hits

1. →	<a href="#">gi 218187924</a>	<b>Mass:</b> 33284	<b>Score:</b> <b>102</b>	<b>Expect:</b> 4.9e-05	<b>Matches:</b> 11
	hypothetical protein OsI_01264 [Oryza sativa Indica Group]				
→	<a href="#">gi 226509164</a>	<b>Mass:</b> 33385	<b>Score:</b> <b>87</b>	<b>Expect:</b> 0.0017	<b>Matches:</b> 10
	PUR ALPHA-1 [Zea mays]				
→	<a href="#">gi 56783985</a>	<b>Mass:</b> 36601	<b>Score:</b> <b>84</b>	<b>Expect:</b> 0.0034	<b>Matches:</b> 10
	purine rich element binding protein B -like [Oryza sativa Japonica Group]				
	<a href="#">gi 222618143</a>	<b>Mass:</b> 32519	<b>Score:</b> <b>74</b>	<b>Expect:</b> 0.031	<b>Matches:</b> 8
	hypothetical protein OsJ_01179 [Oryza sativa Japonica Group]				
	<a href="#">gi 297596480</a>	<b>Mass:</b> 32313	<b>Score:</b> <b>74</b>	<b>Expect:</b> 0.035	<b>Matches:</b> 9
	Os01g0260700 [Oryza sativa Japonica Group]				
	<a href="#">gi 226497542</a>	<b>Mass:</b> 33468	<b>Score:</b> <b>72</b>	<b>Expect:</b> 0.045	<b>Matches:</b> 9
	hypothetical protein LOC100274069 [Zea mays]				
	<a href="#">gi 242052495</a>	<b>Mass:</b> 33721	<b>Score:</b> 69	<b>Expect:</b> 0.1	<b>Matches:</b> 9

## B.

Match to: [gi|218187924](#) Score: 102 Expect: 4.9e-05  
**hypothetical protein OsI\_01264 [Oryza sativa Indica Group]**  
 Found in search of C:\Documents and Settings\JACK\My Documents\20090908 MALDI TOF\MI903266.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): 33284; Calculated pI value: 5.72  
 NCBI BLAST search of [gi|218187924](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Oryza sativa Indica Group](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Number of mass values searched: 50  
 Number of mass values matched: 11  
 Sequence Coverage: 49%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MDGGGGGGGG GGVNAGPGVA GGGGGGGGGG VGGDVELVSK TLQFEHKLFY
51 FDLKENPRGR YLKISEKTSA TRSTIIVPVA GVAMFLDLFD YYIRTDERDA
101 FSKELRLDTK VFFYDIGENK RGRFLKVSEA SVNRRNSTII VPAGSSGEEG
151 WEAFRNVLLE INNEASRLYV LPNHPNQHL EPPERLPGLS DDVGAGFIAG
201 HGSQSASGPE VDVERLVDLP PQEISGMGM SKVIRADQKR FFFDLGSNRR
251 GHYLRISEVA GADRSSIILP LSGLKQFHEM VGHFVDDMKD RLEGMTGANV
301 RTVESSQR

```

## C.

Match to: **gi|226509164** Score: **87** Expect: **0.0017**  
**PUR ALPHA-1 [Zea mays]**  
 Found in search of C:\Documents and Settings\JACK\My Documents\20090908 MALDI TOF\MI903266.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **33385**; Calculated pI value: **5.72**  
 NCBI BLAST search of [gi|226509164](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Zea mays](#)  
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
[gi|194697892](#) from [Zea mays](#)  
[gi|195635165](#) from [Zea mays](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Number of mass values searched: **50**  
 Number of mass values matched: **10**  
 Sequence Coverage: **44%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MDGGGGGGGG GGGVAGVMV GGGVPPGGGG GDVELVSKTL QFEHKLFYFD
51 LKENPRGRYL KISEKTSATR STIIVPIDGV AWFLDLFDYY IRTDERDVFS
101 KELRLQTRVF YFDIGENKR RFLKVSEASV HNRNRSTIIVP AGSSGEEGWE
151 AFRNVLLLEIN HEASRLYVLP NHPNQOHMEP PERLPGLSDD VGAGFIAGHG
201 SQSASGPEVD VERLVDLPPQ EEISGMGMSK VIRADQKRFF FDLGSNNRGH
251 YLRISEVAGV DRSSIILPLS GLKQFHEMVG HFVDIMKDRL EGMTGANVRT
301 VESSQR

```

## D.

Match to: **Q5NAR8\_ORYSA** Score: **85** Expect: **0.00078**  
**Purine rich element binding protein B-like.- Oryza sativa (japonica cultivar-group).**  
 Found in search of C:\Documents and Settings\JACK\My Documents\20090908 MALDI TOF\MI903266.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **36601**; Calculated pI value: **5.69**  
 NCBI BLAST search of [Q5NAR8\\_ORYSA](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Oryza sativa Japonica Group](#)  
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
[BAD81440](#) from [Oryza sativa Japonica Group](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Number of mass values searched: **50**  
 Number of mass values matched: **10**  
 Sequence Coverage: **40%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MDGGGGGGGG GGVMAGPGVA GGGGGGGGGG VGGDVELVSK TLQFEHKLFY
51 FDLKENPRGR YLKISEKTSS TRSTIIVPVA GVAVFLDLFD YYIRTDERDA
101 FSKELRLDTK VFYFDIGENK RGRFLKVSEA SVNNRSTII VPAGSSGEEG
151 WEAFRNVLL INNEASRLYV LPNHPNQVQE TIPFFDIFMK SQMTSSLNSC
201 HCIWQQHLEP PERLPGLSDD VGAGFIAGHG SQSASGPEVD VERLVDLPPQ
251 EEISGMGMSK VIRADQKRFF FDLGSNNRGH YLRISEVAGA DRSSIILPLS
301 GLKQFHEMVG HFVDIMKDRL EGMTGANVRT VESSQR

```

圖十六、DNA 片段 A-3-2 之結合蛋白質身分鑑定。由圖三所得之 38 kDa 之 A-3-2 結合蛋白質，進行 in-gel digestion 後，以 MALDI-TOF-MS 分析。將所得之胺基酸胜肽鍵的荷質比，以 Mascot Search 之 Peptide Mass Fingerprint 分析比對。圖 A 為以含蔗糖培養基之水稻懸浮細胞抽取的核蛋白質；圖 B, C 及 D 分別為分數較高之蛋白質序列。

**Fig. 16 Identification of the A-3-2-binding proteins by MALDI-TOF-MS analysis.** The 38 kDa A-3-2-binding protein shown in Fig. 3 was subjected to in-gel trypsin digestion and then analyzed by MALDI-TOF-MS. The charge/mass ratios of short peptides were analyzed with Peptide Mass Fingerprint in Mascot Search Software. A, proteins purified from rice suspension-cultured cells grown in medium containing sucrose. B, C and D, the amino acid sequences of candidate proteins with the higher scores.



1	ATGGACGGCGGGGGGGAGGAGGAGGAGGGCGGGGGCGTCATGGCGGGGCCCGGTGTCCGGGAGGGGGAGGAGGA	75
1	M D G G G G G G G G G G U M A G P G U A G G G G G	25
76	GGAGGGGAGGGCGGGCTTGGGGGCGACGTGGAGCTCGTCAGCAAGACGCTGCAGTTCCGAGCACAGCTGTTCTAC	150
26	G G G G G U G G D U E L U S K T L Q F E H K L F Y	50
151	TTCGATCTGAAGGAGAAGCCCGAGGGGAGGTACCTGAAGATCTCCGAGAAGACGCTCCTCCAGCGCTCCACCATC	225
51	F D L K E N P R G R Y L K I S E K T S S T R S T I	75
226	ATCGTCCCGTCCCGGGCGTCCGCTGGTTCCCTCGACCTCTTCGACTACTACATCCGCACCGACGAGCGCGACGCC	300
76	I U P U A G U A W F L D L F D Y Y I R T D E R D A	100
301	TTCAGCAAGGAGCTCCGCCTCGACACCAAGGTGTTCTACTTCGATATTGGGGAGAACAAGAGAGGGCGCTTCTCTC	375
101	F S K E L R L D T K U F Y F D I G E N K R G R F L	125
376	AAGGTATCAGAGGCATCTGTCAACAGAAACCGTAGTACAATCATTGTTCCGGCTGGTAGTTCTGGTGAAGAAGGT	450
126	K U S E A S U N R N R S T I I U P A G S S G E E G	150
451	TGGGAAGCATTGAGGAATGTATTGTTGGAATAAACCAATGAGGCTTCCCGACTTTATGTTCTACCAACCATCCT	525
151	W E A F R N U L L E I N N E A S R L Y U L P N H P	175
526	AATCAGCAACACTTGGAACTCCAGAGCGCCTTCCCTGGACTTTCGATGATGTTGGTGGCTGGATTATAGCTGGA	600
176	N Q Q H L E P P E R L P G L S D D U G A G F I A G	200
601	CATGGAAGTCAATCTGCTTCTGGACCAGAGGTAGATGTTGAAGCCCTGGTTGATTTGCCTCCTCAGGAAGAATT	675
201	H G S Q S A S G P E U D U E R L U D L P P Q E E I	225
676	AGTGGCATGGGCATGTCTAAGGTCATAAGGGCAGATCAAAAGAGGTTCTTCTTTGACCTTGGAAAGCAACACAGG	750
226	S G M G M S K U I R A D Q K R F F F D L G S N N R	250
751	GGTCATTACCTGAGGATTTCTGAGGTTGCTGGAGCTGATCGTTCGTCGATAATCTTGCCACTCTCCGGGTTGAAG	825
251	G H Y L R I S E U A G A D R S S I I L P L S G L K	275
826	CAATCCATGAAATGGTTGGCCACTTTGTAGATATAATGAAGGACAGGCTGGAAAGGGATGACGGGCGCGAACGTG	900
276	Q F H E M U G H F U D I M K D R L E G M T G A N U	300
901	CGCACAGTGGAGTCCAGTCAGAGATGA	927
301	R T U E S S Q R *	309

圖十七、OsPura 之核苷酸與胺基酸序列。

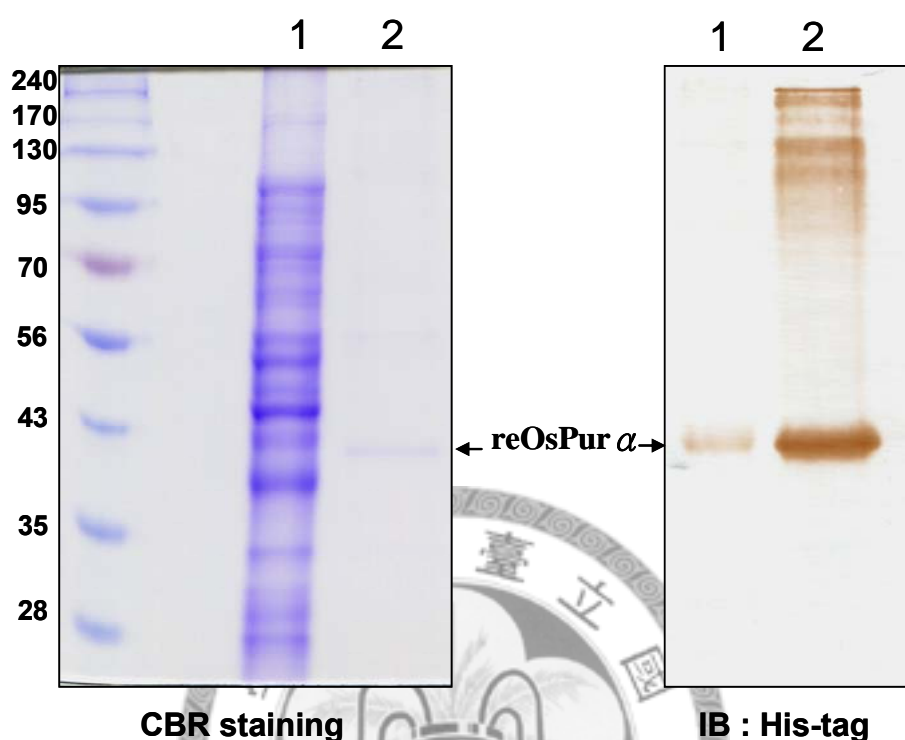
Fig. 17 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of OsPura.



同或相似胺基酸。PUR repeats I, II 及 III，分別以紫色、棕色及黑色線表示。綠色箭頭代表  $\beta$ -sheets 而 灰色方框代表  $\alpha$ -helices。圖 B 為 OsPur $\alpha$  之 Ribbon backbone model。蛋白質二級結構  $\alpha$ -helix 以紅色表示，而  $\beta$ -sheet 以藍色表示。由於緊連兩  $\alpha$ -helices 的兩個 loops，其 OsPur $\alpha$  與 3K44 之序列差異性較大，所以利用黃色標記。圖 C 為三種蛋白質 OsPur $\alpha$  (藍)、果蠅 3K44 (紅) 及 AtPur $\alpha$ -1 (綠) 結構疊合結果。

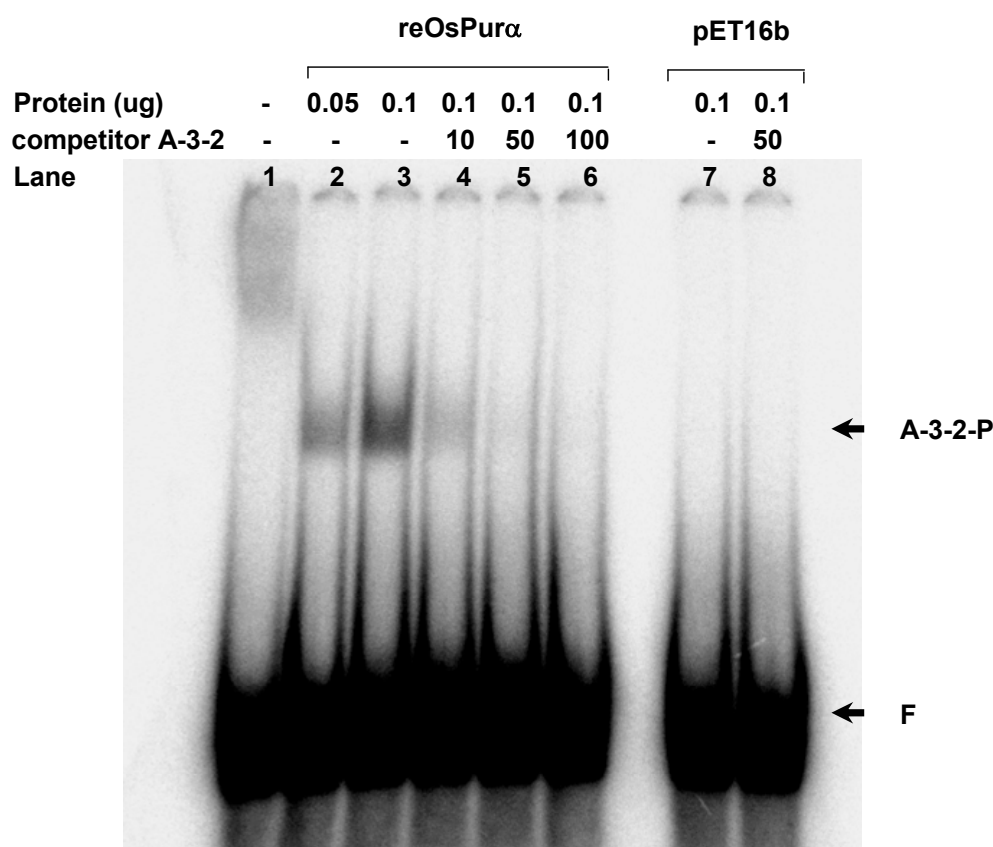
**Fig. 18 OsPur $\alpha$  molecular modeling.** A, Alignment of OsPur $\alpha$  amino acid sequence (Os) with the structure-determined region (residues 41-185) of Pur- $\alpha$  from *Drosophila* (3K44), full-length Pur- $\alpha$  from *Drosophila* (Dm) and full-length AtPur $\alpha$ -1 from *Arabidopsis* (At). The alignment was generated with Discovery Studio and was printed using the ESPript software (Gouet et al. 1999). In the alignment, the shaded and unshaded areas in the blue boxes represent identity and similarity, respectively. The purple, brown and black lines indicate PUR repeats I, II and III, respectively. Green arrows indicate  $\beta$ -sheets and grey boxes indicate  $\alpha$ -helices. B, Ribbon backbone model of OsPur $\alpha$ . The secondary structure is colored as red for  $\alpha$ -helix and blue for  $\beta$ -sheet. The most diversified sequences between OsPur $\alpha$  and 3K44 located in the two loops that connecting the two  $\alpha$ -helices are labeled by yellow. C, The modeled structure of OsPur $\alpha$  (blue) is superimposed with the crystallography-determined structure of 3K44 of Pur- $\alpha$  from *Drosophila* (red) and AtPur $\alpha$ -1 (green).





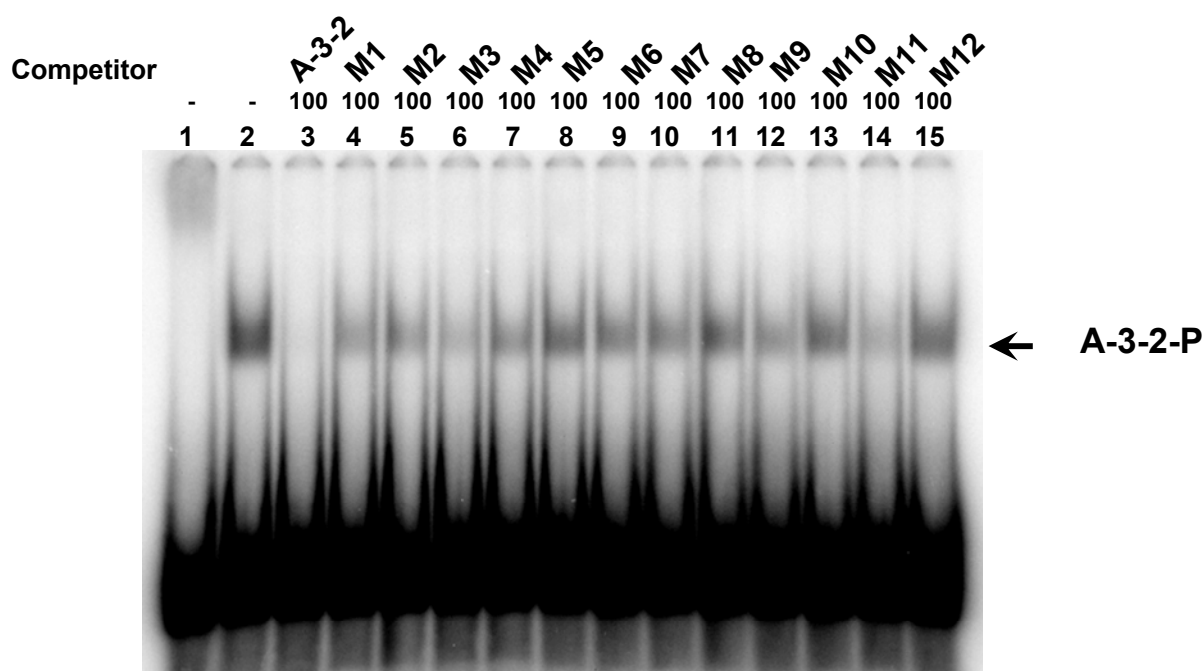
**圖十九、重組電白質 OsPur $\alpha$  之純化。**以 IPTG 誘導帶有質體 pET16b-OsPurA 之大腸桿菌，表現後破菌，將破菌液進行親和膠體層析，分別以 PBS 含 50 mM imidazole 流洗及 PBS 含 150 mM imidazole 溶離，再以 12 % SDS-PAGE 分析。左圖為 CBR 染色結果；右圖為 anti-His tag antibody 免疫呈色結果。Lane1 為粗抽蛋白質，Lane2 為經親和膠體層析後之分劃。標準分子量 (M) 標於左側。目標蛋白質以箭頭表示。

**Fig. 19 Purification of the recombinant OsPur $\alpha$  protein.** Cell lysates of IPTG-induced *E. coli* BLR(DE3) carrying plasmid pET16b-OsPurA were loaded onto a TALON metal affinity resin column, and then washed with PBS containing 50 mM imidazole. The proteins bound to the gel were eluted with PBS containing 150 mM imidazole, after which they were analyzed by 12% SDS-PAGE. The gel was stained with CBR (right panel) or immunoblotted with an anti-His tag antibody (left panel). Lane 1, crude extract; lane 2, eluted fraction after cobalt-based IMAC. M, molecular weight markers. Arrows indicate the recombinant OsPur $\alpha$ .



圖二十、DNA 片段 A-3-2 與重組 OsPura $\alpha$  蛋白質進行膠體電泳遲滯分析。以 pET16b-OsPura $\alpha$  或 pET16b 為表現質體利用大腸桿菌系統表現之重組蛋白質，經親和層析純化後，與以放射線標識之 A-3-2，進行電泳遲滯分析之實驗，每一行上之數字表示競爭者加入的量為探針量的 10, 50 或 100 倍 (w/w)，與加入之蛋白質量 0.05 或 0.1  $\mu\text{g}$ 。DNA-蛋白質複合體 (A-3-2-P) 與未結合之探針 (F) 之位置以箭頭表示。

**Fig. 20 Gel mobility shift assay of DNA fragment A-3-2 with the recombinant OsPura $\alpha$  protein.** The recombinant OsPura $\alpha$  protein (reOsPura $\alpha$ ) was purified from IPTG-induced *E. coli* BLR ( $\lambda$ DE3) carrying plasmid pET16b-OsPura $\alpha$  by affinity column. The radio-labeled A-3-2 was used as a probe in gel mobility shift assay. Proteins expressed by IPTG-induced *E. coli* BLR ( $\lambda$ DE3) carrying plasmid pET16b were also purified by affinity column and the proteins bound to the gel were used in gel mobility assay as a negative control (pET16b). The numbers above each lane indicate the presence of 10-, 50- or 100-fold excess (w/w) of competitor DNA (cold A-3-2) and the amount of proteins used, respectively. DNA-protein complexes and free probe (F) are indicated with arrows.



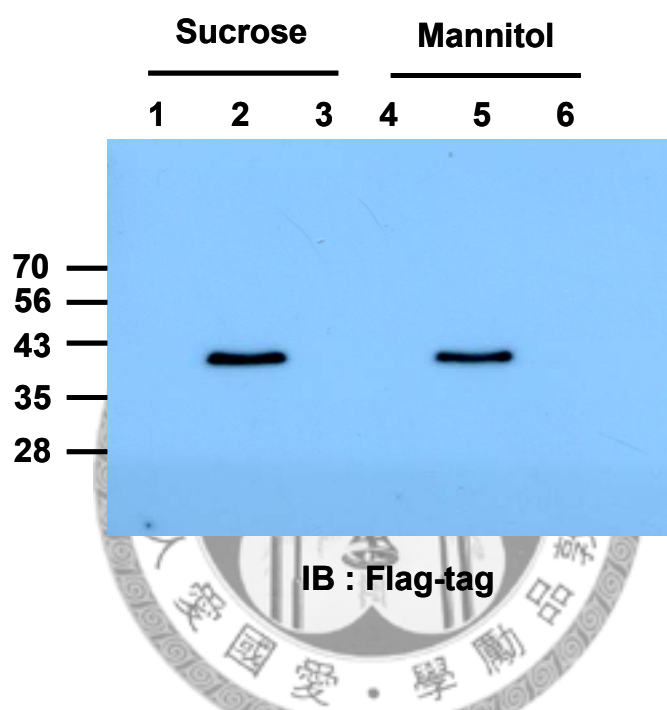
圖二十一、以 M1 至 M12 為競爭者，以膠體電泳遲滯分析實驗檢驗 A-3-2 與重組 OsPurα 蛋白質間之交互作用。以 pET16b-OsPurα 為表現質體利用大腸桿菌系統表現之重組蛋白質，經親和層析純化後，與以放射線標幟之 A-3-2，進行電泳遲滯分析之實驗，每一行上之數字表示競爭者加入的量為探針量 100 倍 (w/w)，與加入之蛋白質量 0.1 μg。DNA-蛋白質複合體 (A-3-2-P) 與未結合之探針 (F) 之位置以箭頭表示。

**Fig. 21 Gel mobility shift assay of DNA fragment A-3-2 with the recombinant OsPurα protein in the presence of competitor DNAs M1 to M12.** The recombinant OsPurα protein (reOsPurα) was purified from IPTG-induced *E. coli* BLR (λDE3) carrying plasmid pET16b-OsPurα by affinity column. The radio-labeled A-3-2 was used as a probe in gel mobility shift assay. The numbers above each lane indicate the presence of 10-, 50- or 100-fold excess (w/w) of competitor DNA (cold A-3-2) and the amount of proteins used, respectively. DNA-protein complexes and free probe (F) are indicated with arrows.

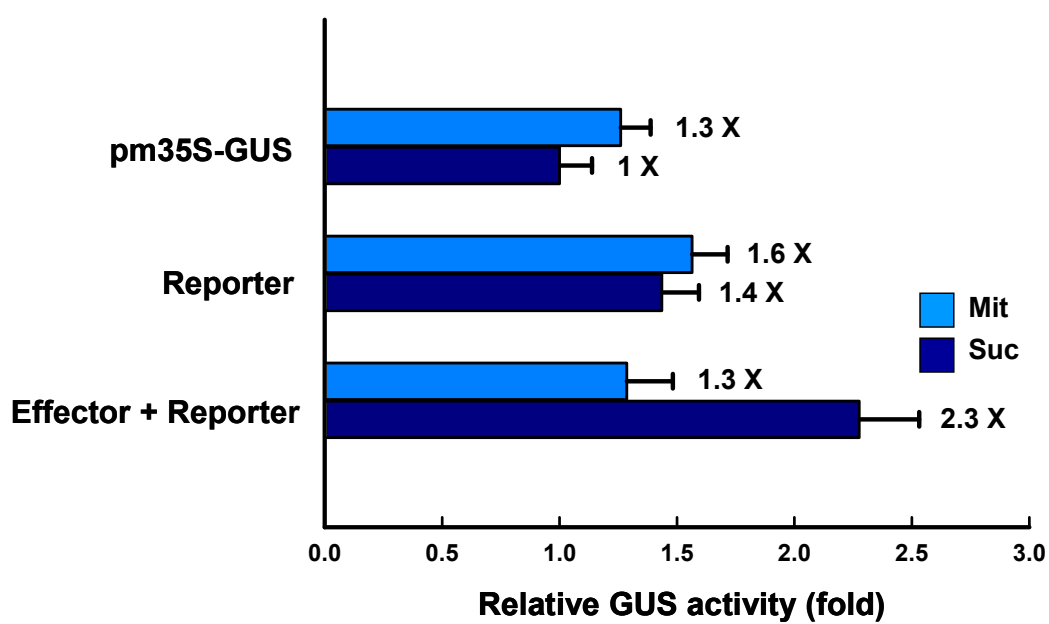
A.



B.

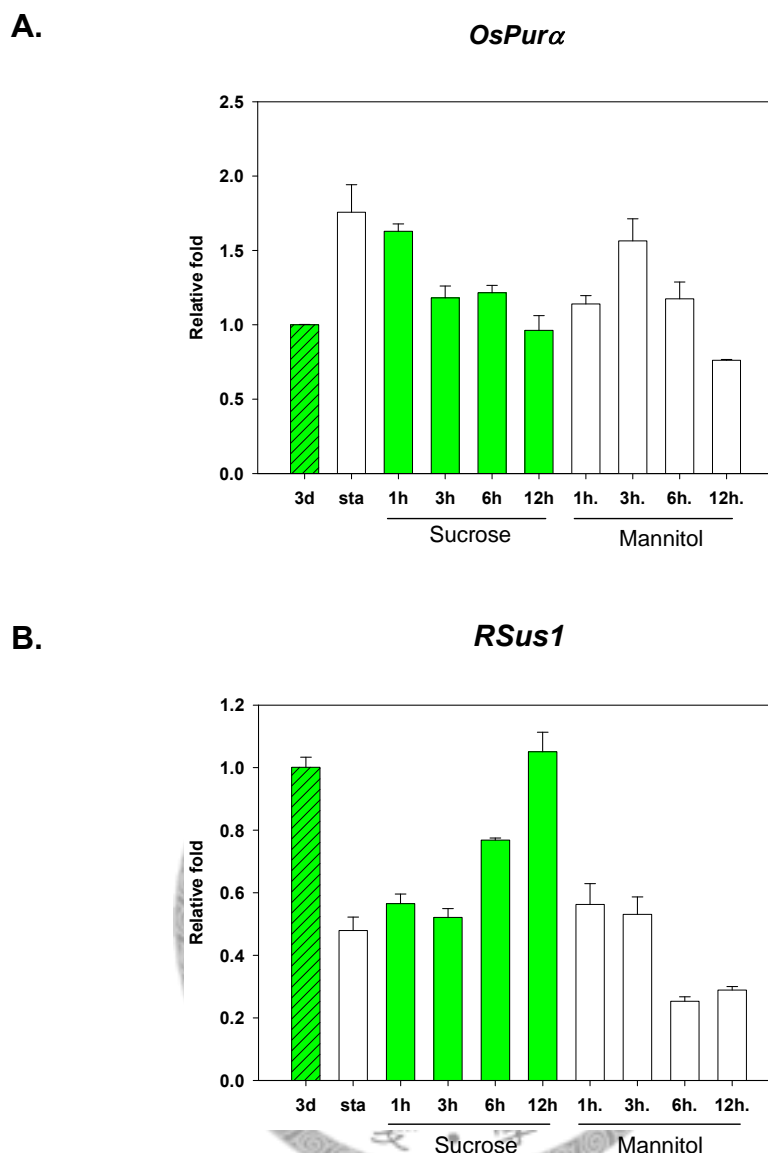


C.



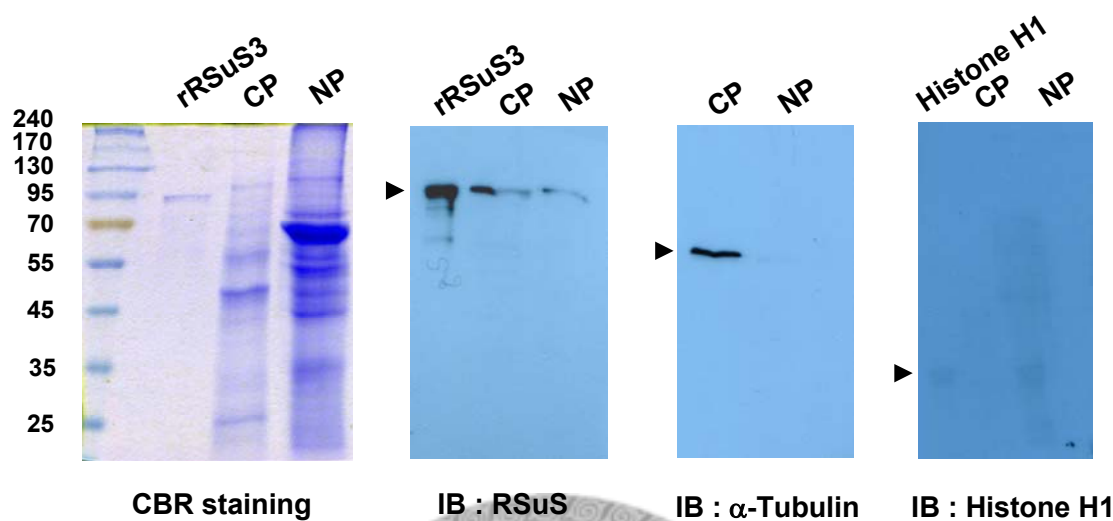
**圖二十二、在蔗糖存在下 OsPura 蛋白質對活化基因表現的影響。**圖 A 為用於短暫表現之各質體。CaMV 35S minimal promoter (CaMV 35S promoter 轉錄起始點前 90 bp) 以白色方框表示；DNA 片段 A-3 以六角方框表示；GUS 及 Flag-tagged OsPura 之表現序列，分別以灰色方框及灰色橢圓形表示；CaMV 35S promoter 及 NOSTer (3' terminator sequence of nopaline synthase)，分別以白色箭頭及黑色方框表示。圖 B 為原生質體經轉形後之免疫染色分析。由水稻白化苗分離而得之原生質體，分別轉入質體 pm35S-GUS (lanes 1 及 4)、reporter 質體及 effector 質體 (lanes 2 及 5) 或只轉 reporter 質體 (lanes 3 及 6)，之後置於含 0.4 M 之蔗糖或甘露醇之培養液中。將細胞蛋白質粗抽液以 12% SDS-PAGE 分離後，以 anti-Flag 抗體進行免疫染色。圖 C 為各質體分別依不同實驗組共轉入水稻原生質體。經 3 次獨立實驗的結果，將 GUS 活性除以 luciferase 活性後取平均值 (SD 以 error bar 表示)。Bar 上的數字代表以 pm35S-GUS (蔗糖培養) 為 1 倍時，各實驗組所代表的倍數。

**Fig. 22 Effect of OsPura protein on the activation of gene expression in the presence of sucrose.** (A) Schematic representation of the plasmids used in the transient expression assay. The white box indicates the minimal promoter of the cauliflower mosaic virus 35S promoter up to -90 bp relative to the transcription start site. The white hexagon depicts the A-3 fragment of the *RSusI* promoter. GUS (grey rectangle) and OsPura (grey ellipse) indicate the coding regions of  $\beta$ -glucuronidase and Flag-tagged rice Pura, respectively. CaMV35S (white arrow) indicates the promoter of cauliflower mosaic virus 35S. NOSTer (black rectangle) indicates the 3' terminator sequence of nopaline synthase. (B) Western analysis of the transformed protoplasts. The protoplasts isolated from etiolated rice seedlings were transformed with the pm35S-GUS plasmid (lanes 1 and 4), reporter and effector plasmids (lanes 2 and 5), or reporter plasmid (lanes 3 and 6) and then incubated in media containing 0.4 M sucrose or mannitol. Protoplast protein extracts were separated by 12% SDS-PAGE and were immunoblotted using an anti-Flag antibody. (C) Rice protoplasts were transformed with the plasmids indicated. The averages of GUS activity normalized by firefly luciferase activity obtained from three independent transformations are indicated with standard deviations. Numbers next to the error bars indicate the fold change of the activity compared to the pm35S-GUS transformed protoplasts cultured in sucrose-containing medium.



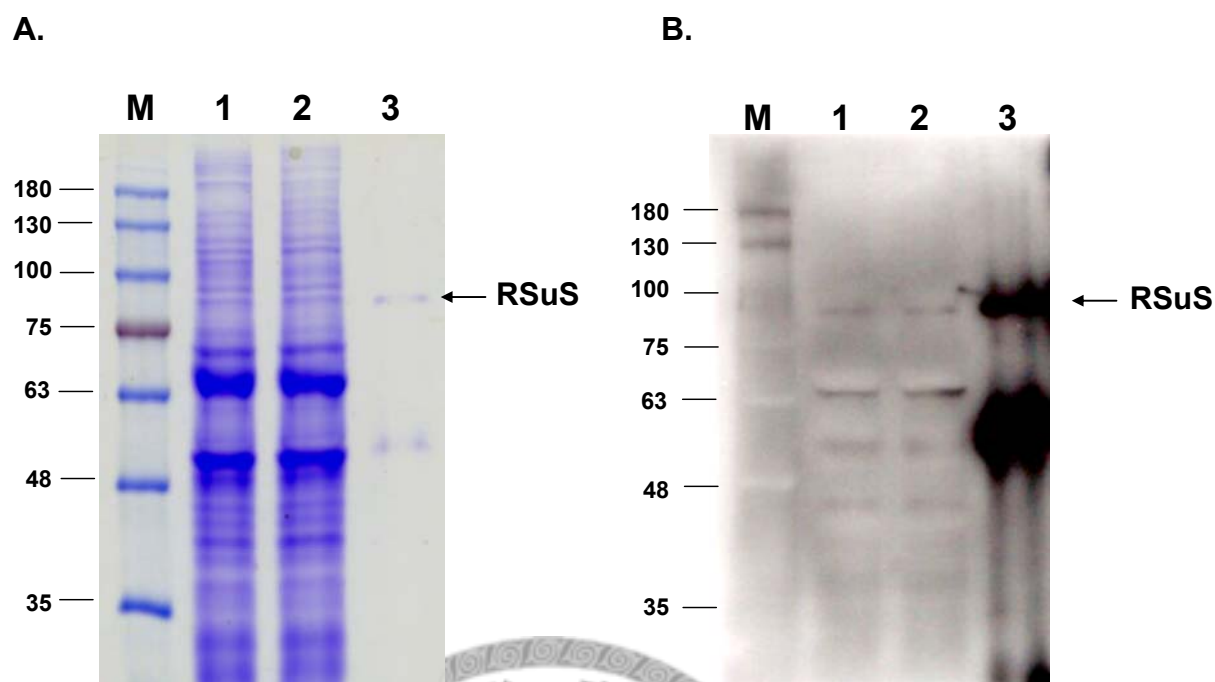
圖二十三、糖培養及飢餓培養細胞中，*OsPura* 及 *RSus1* mRNA 累積量於不同時間點之變化。將水稻懸浮培養細胞於進行實驗前三天進行繼代 (3d)，之後飢餓 48 小時 (sta)，再分別移至 12.5 mM 蔗糖或 100mM 甘露醇培養基培養 12 小時，於不同時間點取樣。收取細胞並抽取全部 RNA 之後，以 real-time RT-PCR 對 *OsPura* 及 *RSus1* 之基因表現狀態進行偵測。以繼代培養三天之細胞所測得的基因表現量為 100%。

**Fig.23 The time course analysis of changes in mRNA levels of *OsPura* and *RSus1* in sugar-depleted and sugar-fed.** 3-d-old cells were starved for 48 h (sta) and then transferred to media containing 12.5mM sucrose or 100 mM mannitol for 12 h. Cells were collected at various time intervals. Total RNA of the cells were isolated and analyzed by real-time RT-PCR. The mRNA levels of *RSus1* and *OsPura* in the 3-d-old cells were taken as 100%.



圖二十四、免疫轉漬染色檢驗水稻懸浮培養細胞之細胞質及細胞核蛋白質分劃。將細胞質 (CP) 及細胞核 (NP) 分劃所得之蛋白質，以 10% SDS-PAGE 分離後，以 CBR 染色或轉印至 PVDF 膜，再以可辨識 RSuS, human histone H1 及 sea urchin  $\alpha$ -tubulin 之不同抗體進行偵測。 $\alpha$ -tubulin 與 Histone H1 分別作為細胞質與細胞核分劃之標定蛋白質。CP 及 NP 分別表示細胞質及細胞核分劃之蛋白質，注入量為 5  $\mu$ g 及 20  $\mu$ g (依細胞內總蛋白質量而言，NP 注入之量約為 CP 的 190 倍)。箭頭分別標示 RSuS,  $\alpha$ -tubulin 及 histone H1 蛋白質色帶。rRSuS3 為經純化後之重組 RSuS3 蛋白質。

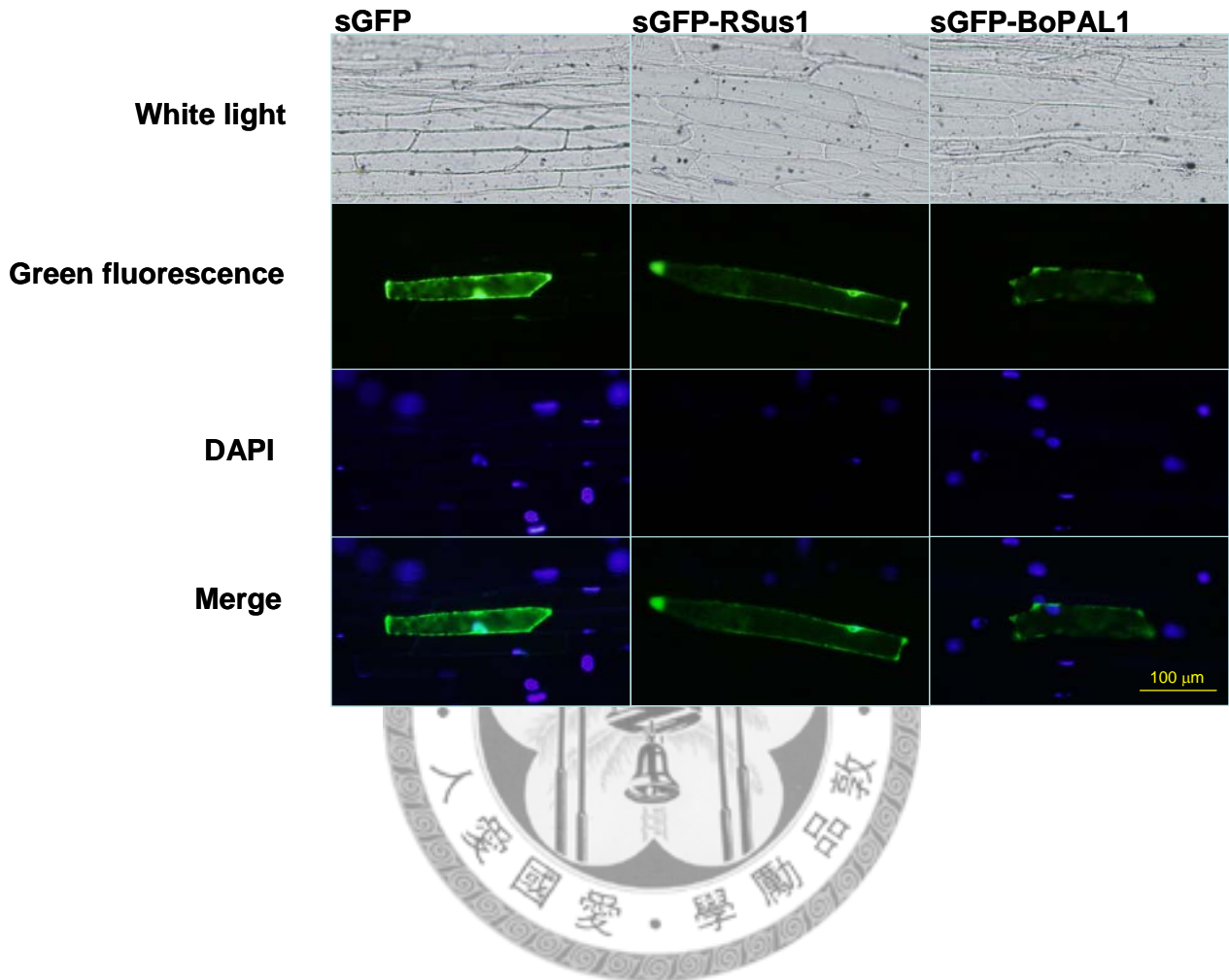
**Fig.24 Immunoblot analysis of RSuS in cytosolic and nuclear fractions of rice suspension-cultured cells.** The cytosolic proteins (CP) and nuclear proteins (NP) were separated on 10% SDS-PAGE and then stained with CBR or transferred to PVDF membranes. The membranes were immunodetected with antibodies against RSuS, human histone H1 and sea urchin  $\alpha$ -tubulin.  $\alpha$ -tubulin and Histone H1 are nuclear and cytoplasmic marker proteins, respectively. CP and NP mean cytosoloc proteins and NP nuclear proteins. Five and twenty  $\mu$ g of proteins were loaded in CP and NP, and NP were enriched approximately 190-fold compared to CP. The arrows mark RSuS,  $\alpha$ -tubulin and histone H1 bands, respectively. rRSuS3, purified recombinant RSuS3 protein.



**圖二十五、SDS-PAGE 分析與免疫染色檢定，Percoll 純化糖培養及飢餓培養細胞之核蛋白質。**以繼代培養三天且饑餓 48 小時之水稻懸浮細胞，分別以含蔗糖、甘露醇 N6 培養基，震盪培養 16 小時後，以 Percoll 純化其細胞核後抽取核蛋白質。取 10  $\mu\text{g}$  的核蛋白質及 0.5  $\mu\text{g}$  RSuS1 重組蛋白質進行實驗。圖 A 為蛋白質進行 10% SDS-PAGE 電泳後，膠片以 CBR 染色；圖 B 為轉印至 PVDF 膜以 RSuS1 polyclonal 抗體為一次抗體進行免疫呈色。Lane1 與 Lane2 表示含蔗糖及甘露醇培養後所得的可溶性核蛋白質 (soluble)，Lane3 為 RSuS1 重組蛋白質當作正控制組。標準分子量以 M 標示。

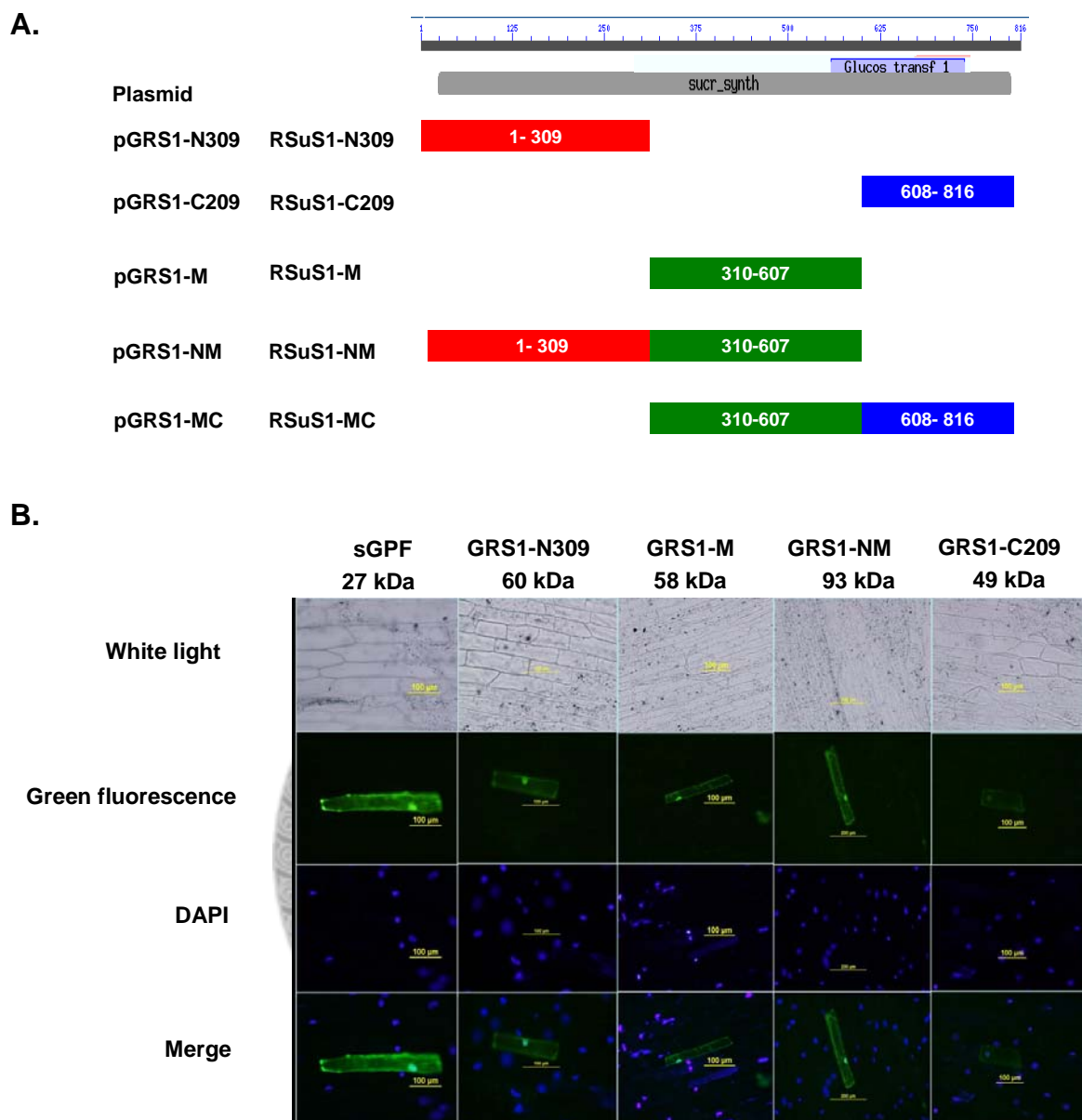
**Fig. 25 SDS-PAGE and western analysis of proteins in the nuclear purified from sucrose-fed and sucrose-depleted rice suspension-cultured cells.** The 3-day-old rice suspension-cultured cells were starved for 48 h and then were transferred to medium containing sucrose or mannitol for 16 h. Cells were collected and nuclei were isolated and purified by Percoll gradient ultracentrifugation. The nuclear proteins were subjected to 10% SDS-PAGE with CBR staining (A) and western blot analysis with anti-RSuS1 polyclonal antibodies (B). Lanes 1 and 2, ten  $\mu\text{g}$  of nuclear proteins isolated from sucrose-fed and sucrose-depleted cells, respectively; lane 3, 0.1  $\mu\text{g}$  of the recombinant RSuS1 protein expressed and purified from *E. coli*. Molecular weight markers (M) are showed at left margin.





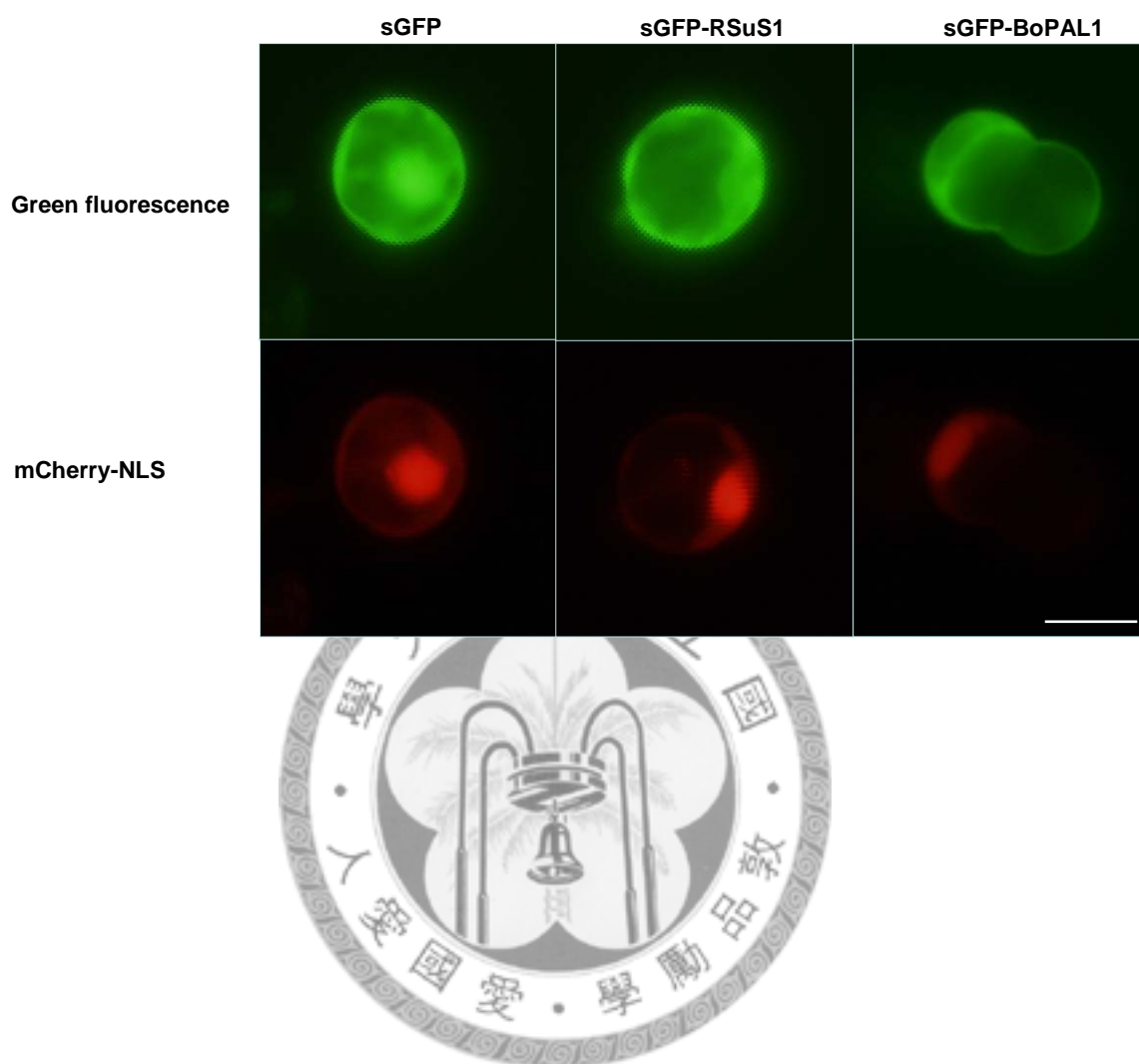
圖二十六、融合蛋白質 sGFP-RSuS1 與 sGFP-BoPAL1 在洋蔥細胞內的定位。質體 pHBT95sGFP, pGRS1 及 pGBoPAL1 皆以基因槍送入洋蔥表皮細胞進行短暫性表現，在轉殖後第 24 小時以螢光顯微鏡觀察各融合蛋白質 sGFP, sGFP-RSuS1 及 sGFP-BoPAL1。分別顯示出穿透光照射、綠螢光、DAPI 染色及疊合之影像。Bar = 100  $\mu$ m。

**Fig. 26 Cellular localization of sGFP-RSuS1 and sGFP-BoPAL1 fusion proteins in onion cells.** Plasmids pHBT95sGFP, pGRS1 and pGBoPAL1 were respectively introduced into onion epidermal cells via particle bombardment. The localization of sGFP, sGFP-RSuS1 and sGFP-BoPAL1 fusion proteins was visualized with a fluorescence microscopy at 24 h after bombardment. White light, green fluorescent and DAPI-stained images are shown. Bar = 100  $\mu$ m



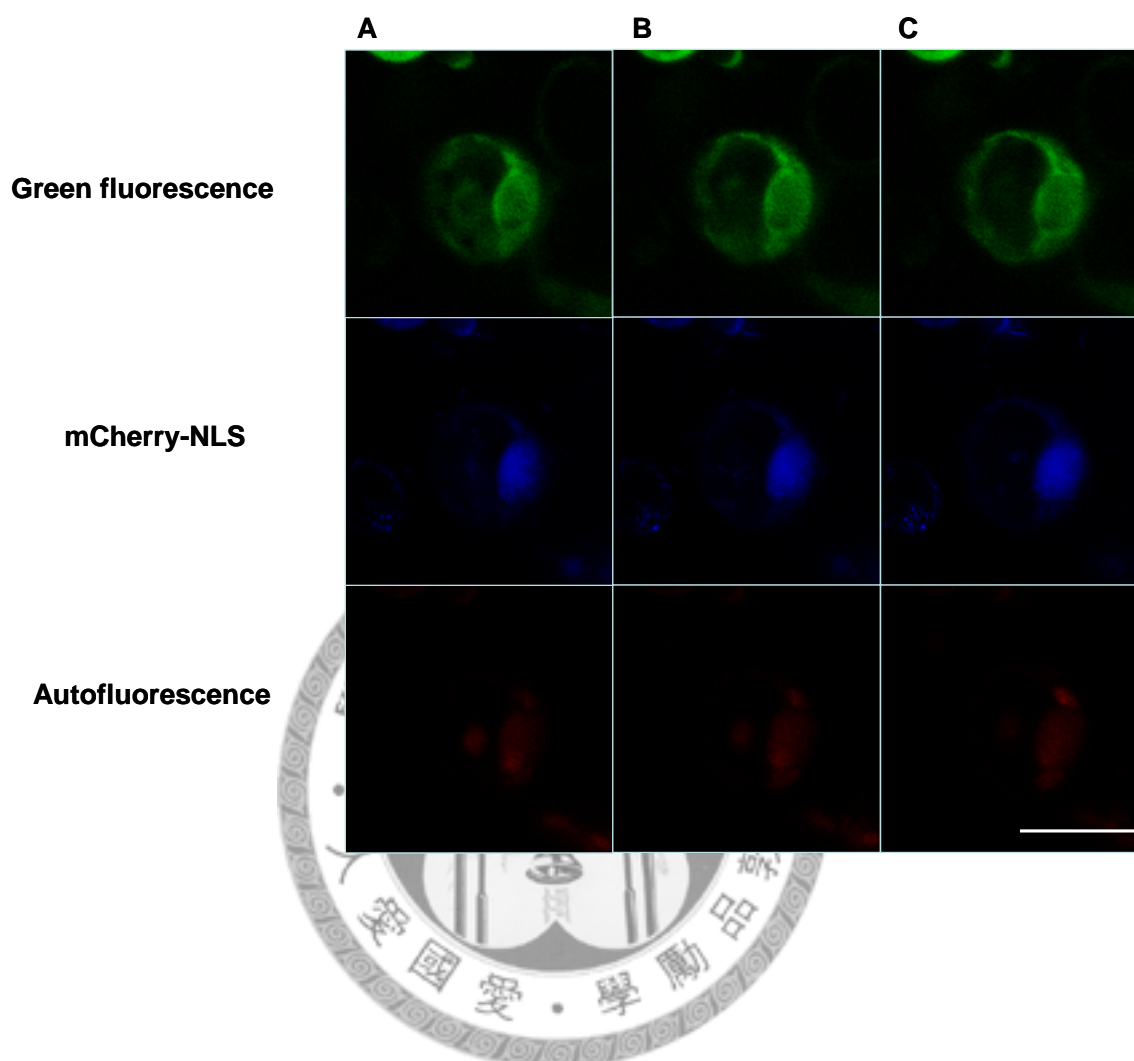
圖二十七、縮減後之 sGFP-RSuS1 融合蛋白質之洋蔥細胞內定位。圖 A 為 RSuS1 與其縮減蛋白質之簡圖。圖 B 為每種質體以基因槍送入洋蔥表皮細胞進行短暫性表現，在轉殖後第 18 小時以螢光顯微鏡觀察。分別顯示出穿透光照射、綠螢光及 DAPI 染色後之影像。

**Fig. 27 Cellular localization of sGFP-truncated RSuS1 fusion proteins in onion cells.** A, schematic diagram of RSuS1 and its truncated mutants. B, Expression plasmids carrying sGFP and sGFP fused with the truncated RSuS1 were respectively introduced into the onion epidermal cells via particle bombardment. The localization of sGFP and chimeric sGFP proteins was visualized with a fluorescence microscopy at 18 h after bombardment. Bright, green fluorescent and DAPI-stained images are shown.



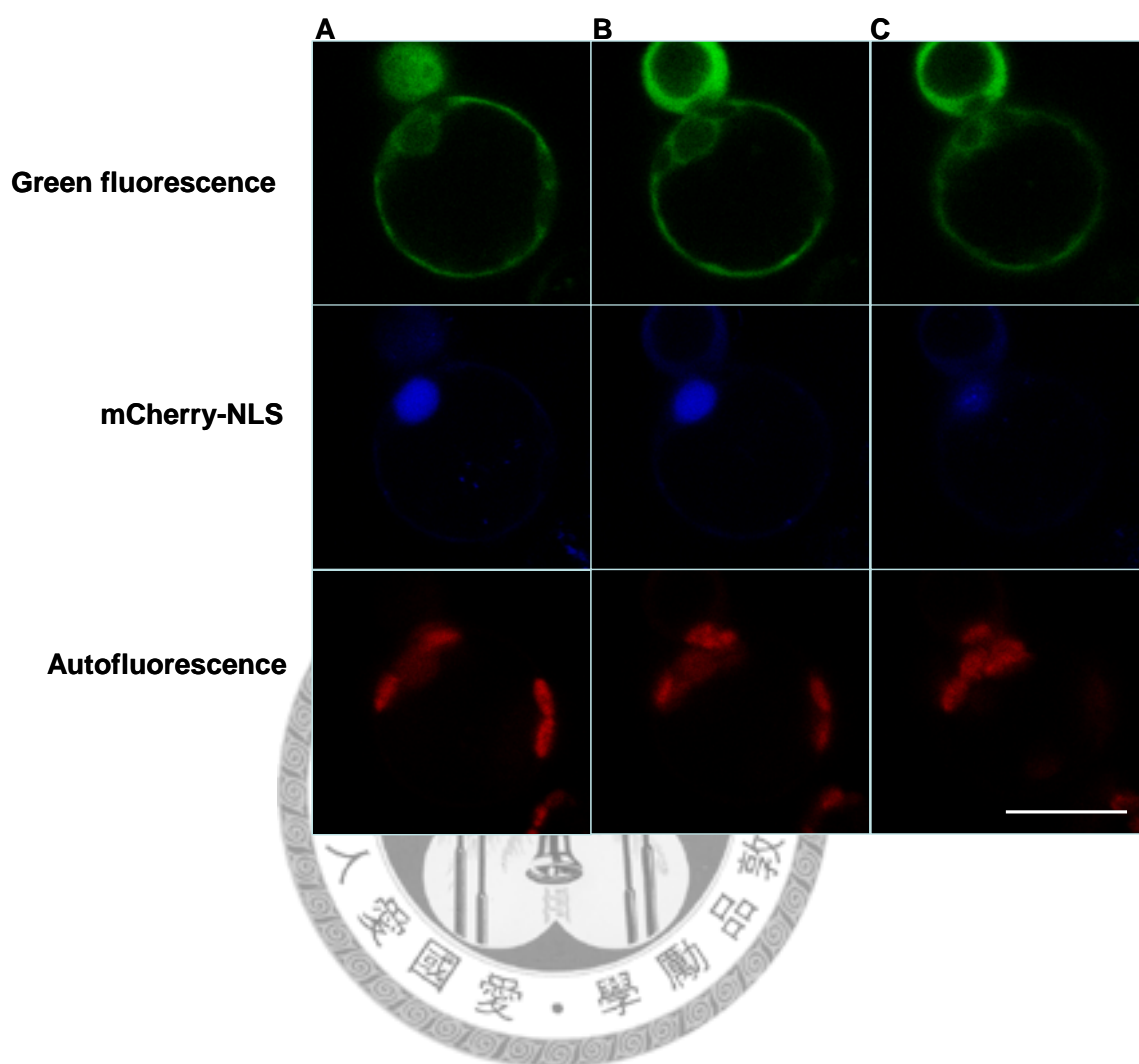
圖二十八、融合蛋白質 sGFP-RSuS1 與 sGFP-BoPAL1 在水稻細胞內的定位。質體 pHBT95sGFP, pGRS1 及 pGBoPAL1 皆以 PEG 法，與可表現 mCherry-NLS 之質體，分別共轉入水稻原生質體進行短暫性表現，在轉殖後第 22 小時以螢光顯微鏡觀察。分別顯示綠螢光及紅螢光蛋白質 (核) 之影像。Bar = 10  $\mu$ m

**Fig. 28 Cellular localization of sGFP-RSuS1 and sGFP-BoPAL1 fusion proteins in rice cells.** Plasmids pHBT95sGFP, pGRS1 and pGBoPAL1 were respectively transformed into the protoplasts of rice leaf cells. Construct expressing mCherry-NLS was cotransformed with the above plasmids into protoplasts for localization of nuclei. The cells were observed with a fluorescent microscopy at 22 h after cotransformation. Images of the green fluorescence of sGFP and the red fluorescence of mCherry-NLS are shown. Bar = 10  $\mu$ m



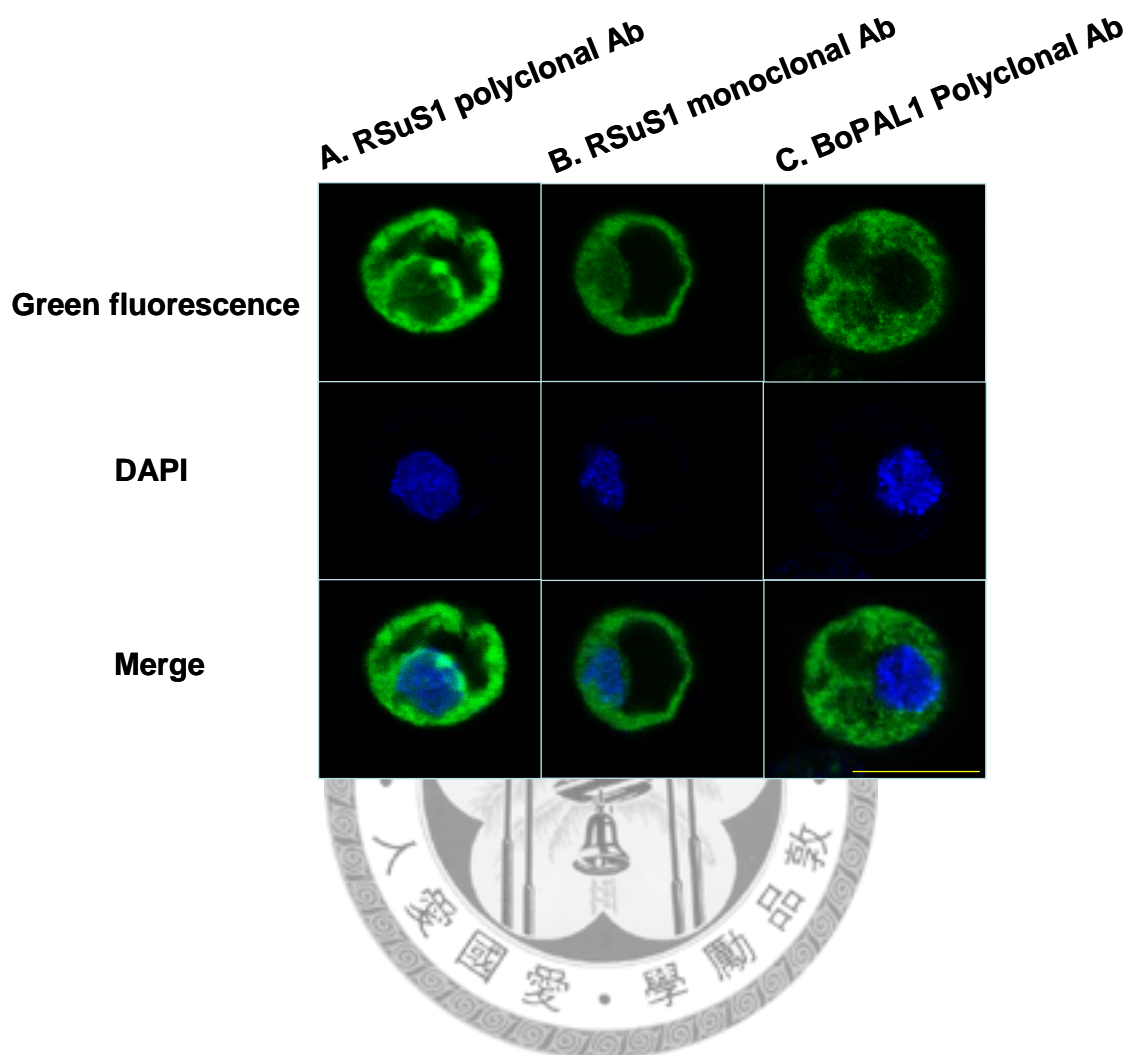
圖二十九、以雷射共軛焦顯微鏡觀察融合蛋白質 sGFP-RSuS1 在水稻細胞內的定位。以 PEG 法共轉入可表現 sGFP-RSuS1 及 mCherry-NLS 蛋白質之兩種質體。利用共軛焦顯微鏡於細胞核附近，調整 Z 軸進行不同焦距點觀察 (圖 A, B 及 C)。分別顯示綠螢光，藍螢光 (核) 及自發螢光之影像。Bar = 10  $\mu$ m

**Fig. 29 Detection of sGFP-RSuS1 fusion proteins in rice cells by confocal laser microscopy.** Rice protoplasts were cotransformed with sGFP-RSuS1 and mCherry-NLS constructs. The cells were observed with a confocal microscopy at 22 h after cotransformation. Nuclear images of different focus by different Z-stage (A, B and C). Images of green fluorescence, blue fluorescence and autofluorescence are shown. Bar = 10  $\mu$ m



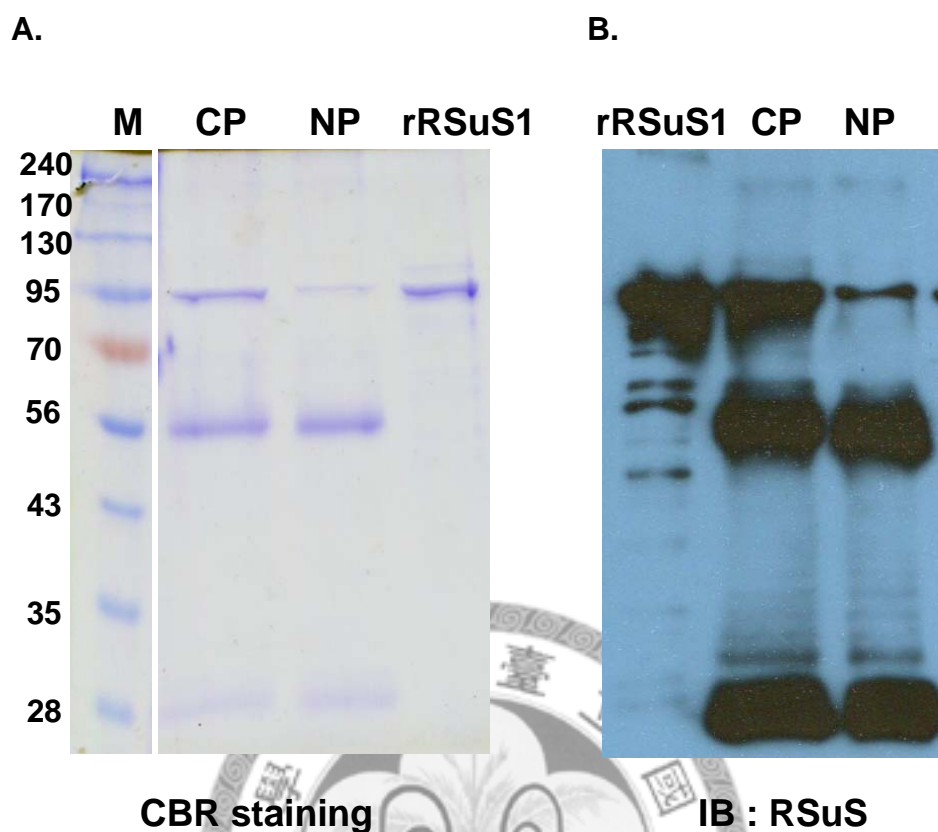
圖三十、以雷射共軛焦顯微鏡觀察融合蛋白質 BoPAL1 在細胞內的定位。以 PEG 法共轉入可表現 GFP-BoPAL1 及 mCherry-NLS 蛋白質之兩種質體。利用共軛焦顯微鏡於細胞核附近，調整 Z 軸進行不同焦距點觀察 (圖 A, B 及 C)。分別顯示綠螢光，藍螢光 (核) 及自發螢光之影像。Bar = 10  $\mu$ m

**Fig. 30 Detection of subcellular localization of sGFP-BoPAL1 by confocal laser microscopy.** Rice protoplasts were cotransformed with sGFP-BoPAL1 and mCherry-NLS constructs. The cells were observed with a confocal microscopy at 22 h after cotransformation. Nuclear images of different focus by different Z-stage (A, B and C). Images of green fluorescence, blue fluorescence and autofluorescence are shown. Bar = 10  $\mu$ m



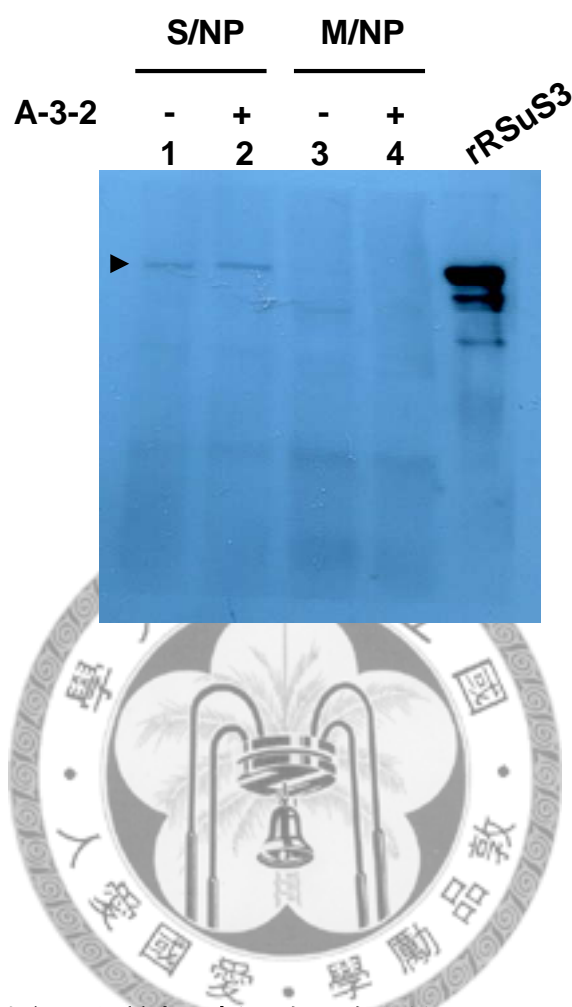
圖三十一、RSuS 與 PAL 之細胞免疫染色定位。先以三種一次抗體 RSuS1 polyclonal Ab, RSuS1 monoclonal Ab 及 BoPAL1 polyclonal Ab 分別對水稻細胞進行反應，再與結合 Alexa Fluor488 之二次抗體反應，以雷射共軛焦顯微鏡觀察。I, II 及 III 分別表示綠螢光，DAPI 染色及疊合影像。Bar = 10  $\mu$ m。

**Fig. 31 Immunolocalization of RSuS and PAL proteins in rice cells.** Rice protoplasts were incubated with a RSuS1 polyclonal antibody, a RSuS1 monoclonal antibody and a BoPAL1 polyclonal antibody, respectively, and then reacted with Alexa Fluor488-conjugated anti-mouse secondary antibodies. Images of green fluorescence (for Alexa Fluor488) and DAPI staining (for nuclei) are shown. Bar = 10  $\mu$ m



圖三十二、將水稻懸浮培養細胞之細胞質及細胞核蛋白質分割之 R<sub>SuS</sub> 進行免疫沉澱分析。將水稻懸浮細胞細胞質及細胞核分割所得之蛋白質，分別各取 200  $\mu\text{g}$ ，以 R<sub>SuS1</sub> 的多株抗體進行免疫共沉澱。圖 A 為蛋白質進行 10% SDS-PAGE 電泳後，膠片以 CBR 染色；圖 B 為轉印至 PVDF 膜以 R<sub>SuS1</sub> polyclonal 抗體為一次抗體進行免疫呈色。rRSuS1 為 R<sub>SuS1</sub> 重組蛋白質，標準分子量以 M 標示。

**Fig. 32 Immunoprecipitation of R<sub>SuS</sub> proteins from the cytosolic and nuclear fractions of rice suspension-cultured cells.** The cytosolic proteins (CP) and nuclear proteins (NP) were extracted from rice suspension-cultured cells. Two hundreds  $\mu\text{g}$  of cytosolic proteins and nuclear proteins were immunoprecipitated by anti-R<sub>SuS1</sub> polyclonal antibodies. The immunoprecipitated proteins were subjected to 10% SDS-PAGE with CBR staining (A) and western analysis with anti-R<sub>SuS1</sub> polyclonal antibodies (B). rRSuS1 means recombinant R<sub>SuS1</sub> proteins, and molecular weight markers (M) are showed at left margin.



**圖三十三、A-3-2 結合蛋白質之分析。**由以含蔗糖 (S/NP) 與甘露醇 (M/NP) 培養基培養 16 小時之水稻懸浮細胞抽取核蛋白質，與已接合 DNA A-3-2 之膠體，進行親和純化之實驗。以 12% SDS-PAGE 將蛋白質分離後，以 RSuS1 polyclonal 抗體為一次抗體進行免疫呈色。每一行上之 ”+, -“ 表示 competitors A-3-2 加入或無。箭頭表示 RSuS 蛋白質，rRSuS3 為 RSuS3 重組蛋白質。

**Fig. 32 Analysis of the A-3-2-binding proteins.** Nuclear proteins were extracted from rice suspension-cultured cells grown in medium containing sucrose (S/NP) or mannitol (M/NP) for 16 h. The streptoavidin beads conjugated with the biotin-labeled A-3-2 DNA fragments were used for purification of DNA-binding proteins in the presence (+) or absence (-) of competitor DNA (unlabeled A-3-2). Proteins eluted from the beads were separated in 12% SDS-PAGE, and western blot analysis with anti-RSuS1 polyclonal antibodies. Arrowhead indicates RSuS proteins, and rRSuS3 means recombinant RSuS3 proteins.



**Table 1. Primers used for amplification of GFP fusion genes. Modified nucleotides are shown in bold and restriction sites are underlined.**

<b>Name</b>	<b>sequence</b>
G-F-HI	5'- TCCGTGGATCCATGGTGA
G-R-NdeI	5'- <b>GGAATTC</b> <u>CATATG</u> CCTTGTACAGCTCGTCCAT
G-R	5'- CTTGTACAGCTCGTCCATG
RS1-F-HI	5'- <b>CGCGGATCC</b> ATGGGGGAAGCTGCCGGCGA
RS1-R-HI	5'- <b>CGCGGATCC</b> CCTTGTTCGACGGCTCGCCCT
BoPal1-F-GI	5'- <b>AGCTGTACA</b> AGATGCCGCGCGAGGATGGTCATGTT
BoPal1-R-NotI	5'- <b>CGGGCGGCCGCT</b> CAGCAGATGGGCAGTGGCTCGCC
RS1-R927	5'- CTAGACAACCTGCCCTCCA
RS1-R1821	5'- <b>CGGGCGGCCGCTTAA</b> ACCAGCTCTTGCAGGCGA
RS1-F928	5'- TACATTTTGGACCAAGTCCGT
RS1-R1821-NotI	5'- <b>CGGGCGGCCGCTTAA</b> ACCAGCTCTTGCAGGCGA
pHBT-R	5'- CGGCAACAGGATTCAATCTT



**Table 2 Summary of the gel mobility shift assay in the presence of A-3-2 mutant fragments as competitors**

Competitors	Mutated region	Effect on the A-3-P1 band	Effect on the A-3-P1 band
<b>M1</b>	<b>I</b>	<b>decreased</b>	<b>disappeared</b>
<b>M2</b>	<b>II</b>	<b>decreased</b>	<b>decreased</b>
<b>M3</b>	<b>IV</b>	<b>disappeared</b>	<b>disappeared</b>
<b>M4</b>	<b>V</b>	<b>decreased</b>	<b>decreased</b>
<b>M5</b>	<b>I,IV</b>	<b>decreased</b>	<b>no change</b>
<b>M6</b>	<b>I,V</b>	<b>decreased (Suc-NP) no change (Man-NP)</b>	<b>decreased</b>
<b>M7</b>	<b>II,IV</b>	<b>decreased</b>	<b>no change</b>
<b>M8</b>	<b>II,V</b>	<b>decreased (Suc-NP) no change (Man-NP)</b>	<b>no change</b>
<b>M9</b>	<b>III</b>	<b>decreased</b>	<b>no change</b>
<b>M10</b>	<b>I,II</b>	<b>decreased</b>	<b>no change</b>
<b>M11</b>	<b>IV,V</b>	<b>decreased (Suc-NP) no change (Man-NP)</b>	<b>no change</b>
<b>M12</b>	<b>I,II,IV,V</b>	<b>decreased (Suc-NP) no change (Man-NP)</b>	<b>no change</b>

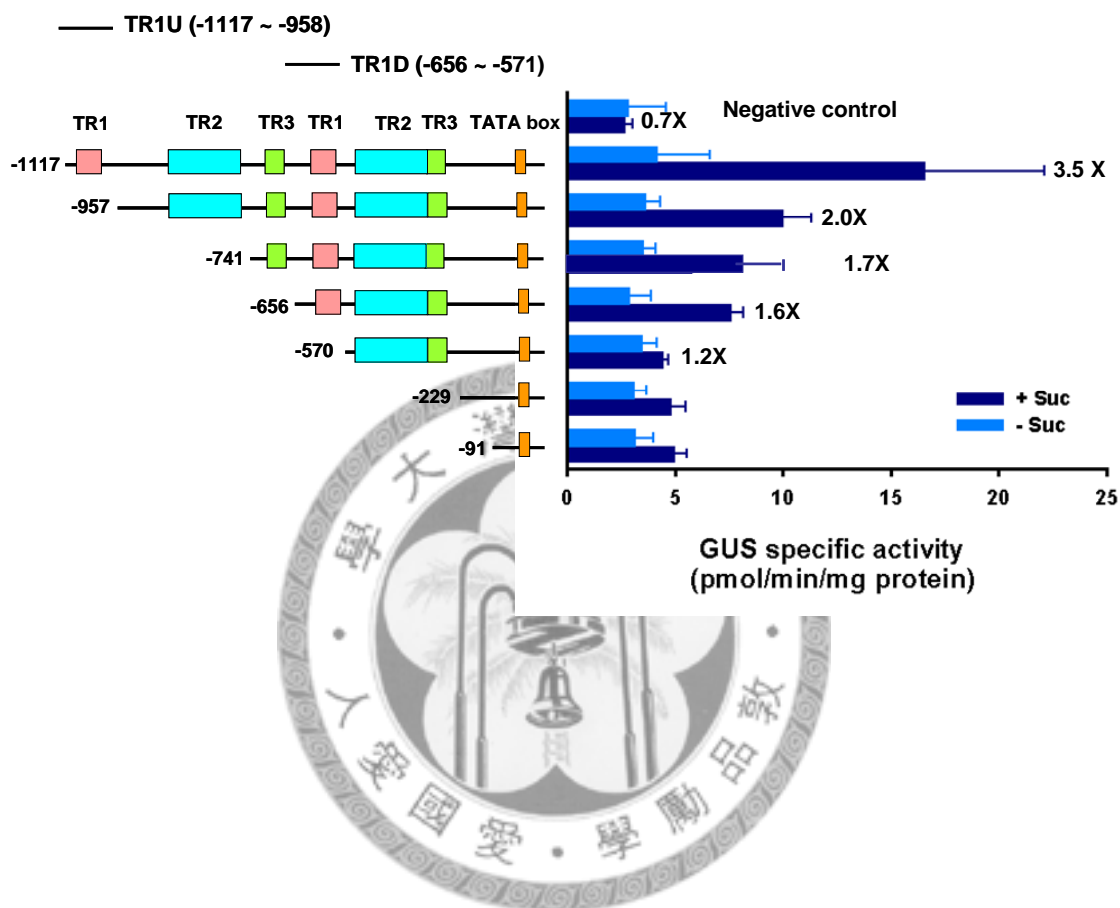
\* Nuclear proteins were extracted from rice suspension-cultured cells grown in medium containing sucrose (Suc-NP) or mannitol (Man-NP) for 16 h.

-1117 AGGCGA GCTTAGGAGG AGCAGCGGTG GCGAGCCCTG **TR1** GGAGGAGCGA  
 -1071 CGGCGGCAGG CGAACTTGGG AGGAGTAGGA GCGGCGGCGG CGGGTGAGCG  
 -1021 CGGCGCGGCG ACAACAGGCG AGTGTAGGAG GAGCGTCGGC AGTGGGCGAG  
 -971 CCTGGGACAA GCGGCAGCAG TGAAGGCGGG CGAGAGAAGG AGGAGCAGCG  
 -921 GCAAGCGAGC GCGGCGATGA CAAGTAAAGT **TR2** GCGGCGGCG GCGGGCGAGG  
 -871 TTGAAGGCGG CGGTTGAGAG TAGAGAGAGA AGAGAGAAAG AATGAGAGAG  
 -821 GGTGAAAAGG ATAAGGAAGA AAAAAAGAAA AAAATCAAAG GGTAGAACCG  
 -771 TACTTACACA GCCGTTTCTC TCTCCAATTC TCCCAGATAT AATAAAATAA  
 -721 TCTCGTGGT **TR3** GTCCAGCAAC TAATTACTAT TTTTTTGCGG TAATTAGTAG  
 -671 CGGCGCTGAC GGGCGAGCTT AGGAGGAGTA GCGGTGGTGA GCAAGTT**TR1** TGG  
 -621 GAGGAGCGAC GCGGCGGGC GAACCTGAGA GGAGTAGGAG TGACGATGGT  
 -571 GGGTGAGTGC GCGGGGCGGA GCGGCGACGA CGGGCGAGCG CAGGAGGAGG  
 -521 **TR2** TCGGCGGCA GCGGGCGAGG TTGAAGGCGT CGGTTGAGAA AGAATGAGAG  
 -471 AGGGAGGAAA GGATAAGGAA GAAAAAGAAA AAAAAAATCA AAGGGTAGAA  
 -421 CCGTACTTAC ACTGCCGTTT CTCTCTAGTG **TR3** TCCAGCAACT AATTACTAGT  
 -371 TTTTTACGGT GCCCTGCAGC AGAAACGCGT TACGGTGTCT CTTAGCTAAT  
 -321 TACACATTTT TTTATATCCG GTAGCAAATT TTACCAAAC AAAAGGCATG  
 -271 ATCTTTCTTT AAAAAGG AAAAAGG AACAAGCAAG AATCATACGA  
 -221 TGCAGCCGCT CCCTTGCTAG TACATGACGC CAACAATCCA ACATATACAT  
 -171 GCAAATAAAT CTATCCAAA ACCGGCACGA AATCAAAAGA AAAATTATCT  
 -121 GCTTGAGCTC ACCAACCATT TTTATATCGG CAATGGCGGA TGGGGGTAAC  
 -71 CCCACCGGCG AGCCGAGCC ACCTCGGCC CCTTCCTCGT **GTATAAATAA**  
**Exon 1**  
 -21 GGGCCCCGGC CATGGCAATC CTCGCACCAA TCCATTCCAC CTCCGTTAAC  
 30 CCCGTTTCGTT TTATTTGCGT <sup>+1</sup> TFACTTCGTT TCTTGGGAAG GCACTTCCTT  
 80 CCTCTTCCTA GGAAGGTAAT AAAGAAGAGC CTCCTCCTTC CTCCATGGAT  
**Intron 1**  
 130 AGATAGATCA ATGGGAGCTC TGCATTTCTT TTTCTCGTCT CTGTTCTGTT  
 180 CTTGGGTGTG TGTGTTTCACT GTTCTTGCTC ACCTAGAACT GTCGGTGGTG  
 230 CTGCTGCATA CCGAAATGCC GGTAATGGCG ATGATAATAT GAGCGCTCAT  
 280 GCTCATCCAT GCTGCCGGAA GGAACACGAT GACGGAATTT TTCTTGGAAT  
 330 CGCGAGTGAT TCGATCATGG GGGGAGGTCA TGCCAAAATTT TTTCTCCGGG  
 380 TTCATCGGAT TCAGAGGGGG AGGTGCTGCC TCTGAATGCA ATTGAGTGCA

430 CCTGAAACAG AA**AAAAGAAA** AAGAAACTCT GCTTCCTTTT TTTCTCTCTC  
 480 TTCATGCTCG TTCTTGCGTT AGGGGATAAT AATAAGCCGA GATCTAGTGA  
 530 ATATTTGGGG GGTTTAGCGA ACATGATCAT CGATAACGAC ATGGTGAGAT  
 580 CTAGTGGTGA TGATCTTGCT TCTGGATCTG GGGGTTTAGT TCAGCAAGCC  
 630 TGAAATTCTC ACCTGGGTTT AAGGTTTCTT TTATTTTTCT TTTTTCATCA  
 680 GATTGAAGTG GATAGAATGC TAGATCTAGT AATGTCCTAT GATTGTTTCT  
 730 CTTTCACCTG AATTTTTAAA AGCATTTTTG ATGATTTCTC TCTCTTTCTC  
 780 TCTCGGCTGA CAAGTTCATT GTCTTTATCC GTTCCTCTGC ATGTGCCTCT  
 830 GTCTCGGAGC TCGGCGACAG ACAGTCTGAC AGTTTTGGGT CCTGCTGCTA  
 880 ATGGCAGGGG TTAAATTTAT TTACCTTCAT AGTATTAATC TTCCTTGTTA  
 930 CTACCACTTA AATCATATTT TAAGATAAGA TTTAATTAAA TTACGCCGTG  
 980 TCAACGTTAA TGACCTCCTC CTTTGCCATG GCCAACAAGA AACCCCAATC  
 1030 CATCCCATGC TGGCCTCGTG CTCCGGAGGA GAGGAGAGGA GAGGAGAGGA  
 1080 GCTTGAATGC GTCACTCTTC GTTCCAGCTT TGCTGCTGCT AGCTTAGCTT  
 1130 CGATCTCAAC GGCTATGGGT GAGCTGGTGC AGCAAGAAGC GACGATCTTT  
 1180 TTCGTTGAAA CCATCGGATT GTTTTGGTGG TTTCTCTCCT CAGATCTGCA  
 1230 TAAATACGCG CCTACCCCGC TTCACCCAGT TCCTCGGTCC TCAGCCTGGA  
 1280 GCATCATTGT TCTTCCTCCC TCCCCTTCTC CATTGTTTGA TTCCTGTATG  
 1330 CTTCTCAGTC AATTATAGCT GCTATGTAGT CTTTTCTTTT TCTTTTCTTC  
 1380 TAGATTGCTT GTGAAAAGC TCGATTTTC TTTTCTTCC AGTGTTTGTC  
 1430 AAAGGCGTGG TTTTTGGTTG GGTTTATGG CTTGACTTTT TTTTTCTCTG  
 1480 GAGTGATTGT GTTACTGGG TCTGGATGTA TCTGATGATG GTGGTTGGTT  
 1530 GTGCACGCAG

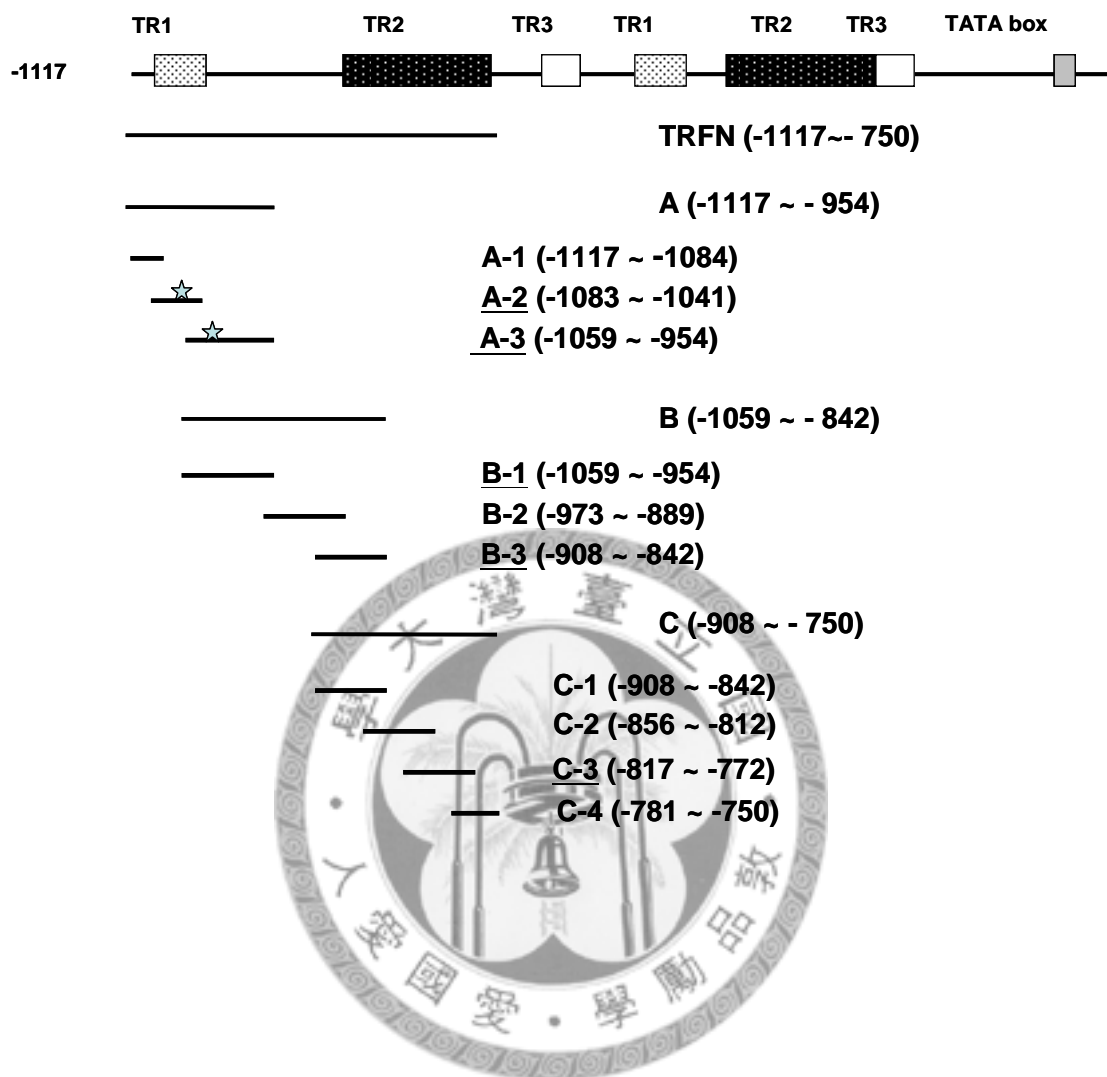
**附圖一、*RSus1* 基因啟動子區及其 exon 1、intron 1 之 DNA 序列。**

粗體字為 TATA box，劃底線為 exon 1，陰影部分分別為 tandem repeat 1 (TR1, TR2, TR3)，框線為與馬鈴薯 *patatin* 啟動子上 SURE1 (Grierson *et al.*, 1994) 同質性高的 *cis*-element，粗體加底下為 GCGGCG element。



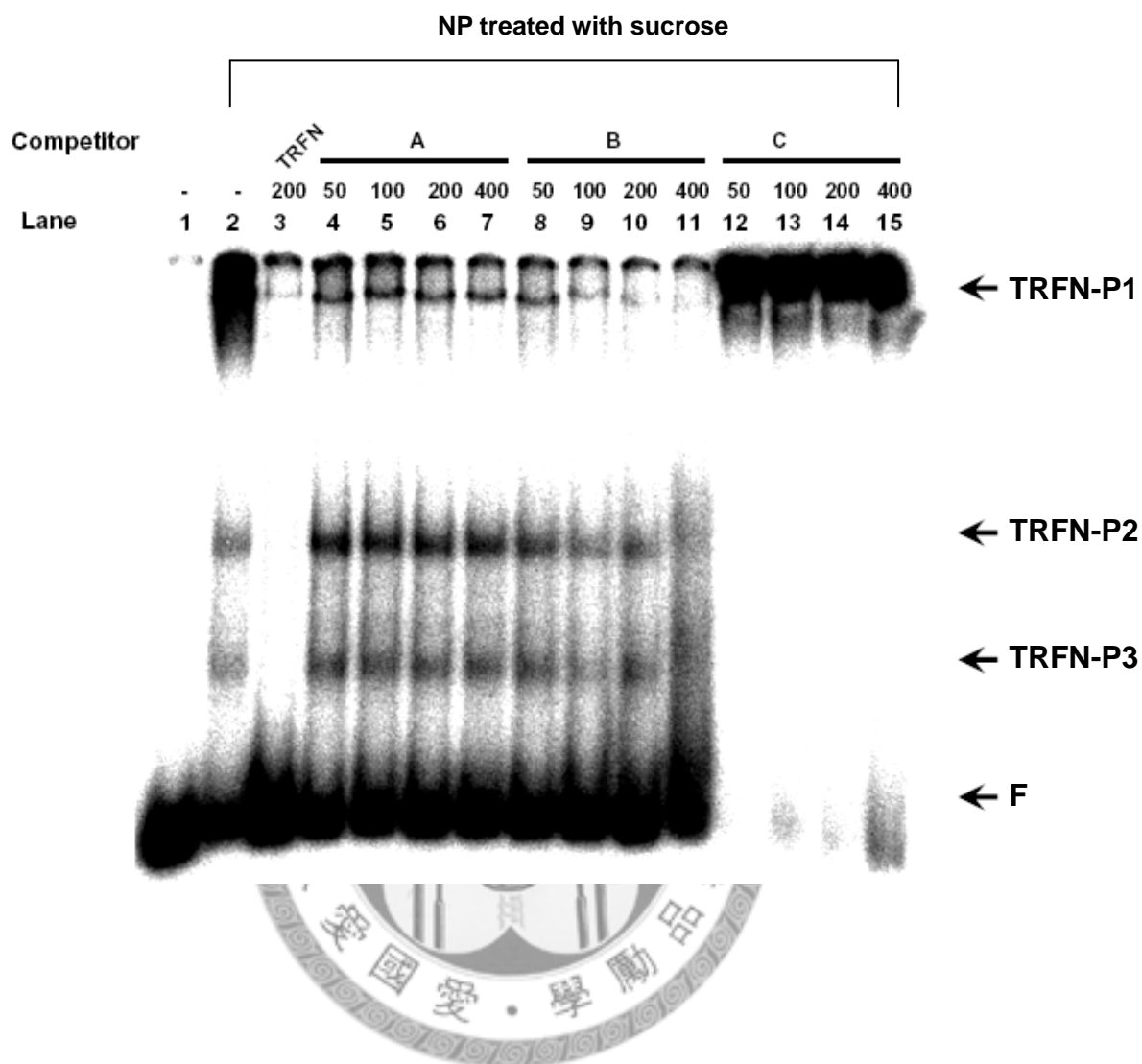
## 附圖二、*RSus1* 啟動子縮減之分析 (廖, 2002)。

將包含 *RSus1* 啟動子於 5'端縮減不同長度之質體，經由粒子槍對水稻懸浮細胞進行基因轉殖，轉殖後的細胞分為兩部分，分別於含有 12.5 mM 蔗糖及 87.5 mM 甘露醇 (■ +sucrose)，或含有 100 mM 甘露醇 (■ -sucrose) 的液體培養基中培養 18 小時，分析細胞中 GUS 的活性。TR 表示 tandem repeat. Negative control 表示射擊之 microcarries 上並無被覆質體 DAN，X 表示增加的倍數，Error bars 表示九次重複實驗標準偏差。



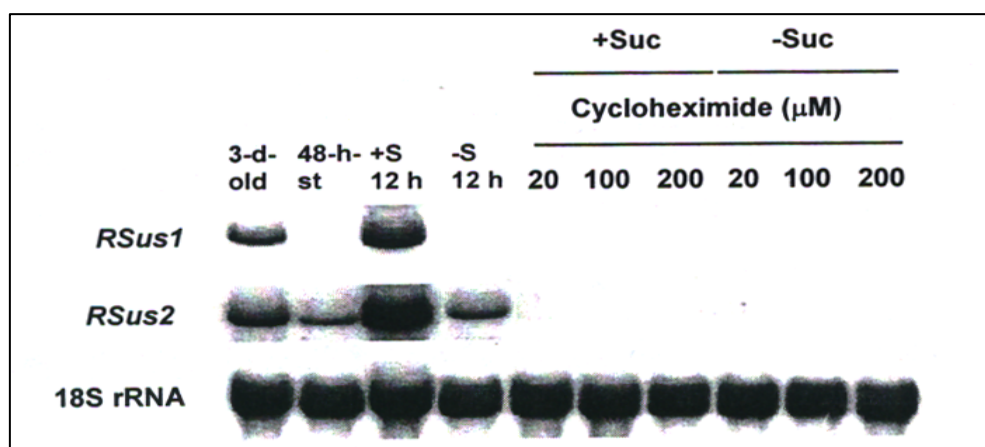
附圖三、先前研究中 DNA 片段 (探針及競爭 DNA) 之相對圖 (張, 2004)。

A-3 與 B-1 序列相同; B-3 與 C-1 序列相同; 劃底線的片段表示可能存在蛋白質結合序列; ☆ 表示在 DNA 足跡實驗中所得之足跡區所在處。



附圖四、以 A (-1117 ~ -954) , B (-1095 ~ -842) , C (-908 ~ -750) 為競爭 DNA, 檢驗 TRFN (-1117 ~ -750) 與細胞核蛋白質間之交互作用。

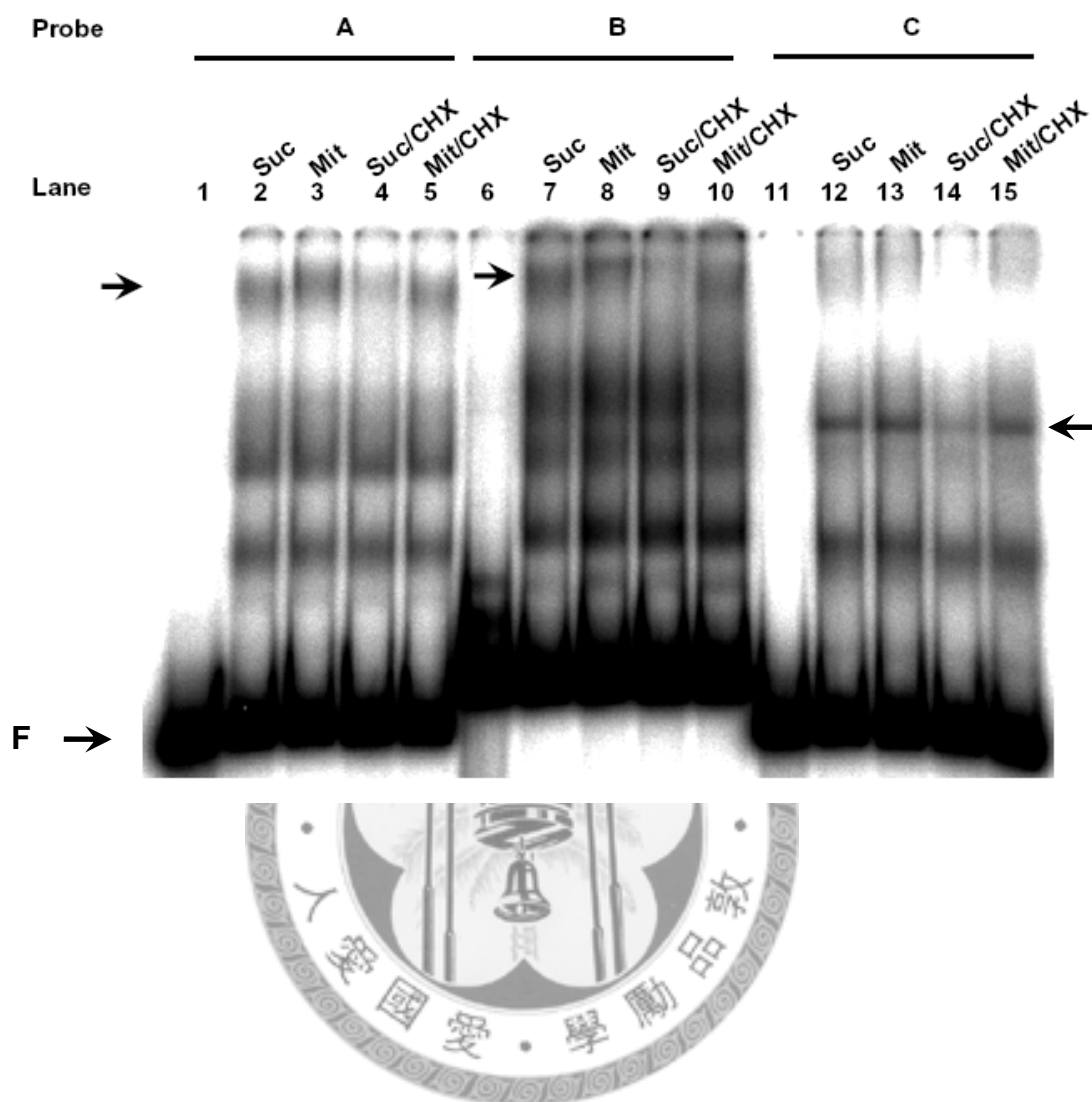
由以含蔗糖培養基培養 16 小時之水稻懸浮細胞抽取核蛋白質, 與以放射線標幟之 TRFN, 進行電泳遲滯分析之實驗, 每一行上之數字表示 competitors 加入的量為探針量的 50, 100, 200 或 400 倍 (w/w), DNA-蛋白質複合體 (TRFN-P) 與未結合之探針 (F) 之位置以箭頭表示。



附圖五、在含有蔗糖或不含蔗糖之培養基中，cycloheximide 對基因表現的影響。

將繼代培養三天且飢餓 48 時之水稻懸浮細胞 (48-h-st)，分成兩部分，一份分別以含有蔗糖 (+S, 12 h) 或不含蔗糖 (-S, 12 h) 之培養基培養 12 小時後取樣，另一份以含有 20 μM CHX 之無糖培養基培養 30 分鐘，再分別以含有 100 mM 蔗糖或 100 mM 甘露醇，以及不同濃度之 CHX (20, 100, 200 μM) 的培養基培養 11.5 小時後取樣，抽取細胞全部 RNA 進行甲醛洋菜膠體電泳 (15 μg RNA/lane)，northern 轉印後，同一轉印膜分次以放射線標幟之 *RSus1*、*RSus2* 專一性探針及 18S 探針進行雜合反應。





附圖六、以 DNA 片段 A (-1117 ~ -954), B (-1059 ~ -842), C (-908 ~ -750) 為探針，檢驗與以四種不同處理之細胞核蛋白質間之交互作用。

以繼代培養三天且饑餓 48 小時之水稻懸浮細胞，分別以含蔗糖 (Suc)、甘露醇 (Mit) 或分別添加最終濃度為 100  $\mu$ M CHX (Suc/CHX, Mit/CHX) 之 N6 培養基，震盪培養 16 小時後，抽取核蛋白質，以放射線標幟之 DNA 片段 A, B 及 C 為探針，進行電泳遲滯分析之實驗，DNA-蛋白質複合體以箭頭表示，未結合之探針 (F) 之位置。