

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學系

碩士論文

Department of Horticulture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

香蕉果實後熟相關基因 *MhDnaJ* 之啟動子活性

與基因功能分析

Analysis of Promoter Activity and Gene Function on
the Fruit Ripening-associated Gene *MhDnaJ* from Banana



甘祥佑

Hsiang-You Kan

指導教授：黃鵬林 博士

杜宜殷 博士

Advisors: Pung-Ling Huang, Dr. Rer. Nat.

Yi-Yin Do, Ph.D.

中華民國一百年七月

July, 2011

中文摘要

香蕉 (*Musa spp.*) 為大型單子葉草本植物，是臺灣重要的經濟作物。本研究針對香蕉果實後熟相關 *MhDnaJ* 基因，進行過量表達 (overexpression)、基因默化 (RNA interference, RNAi)、蛋白質定位 (protein localization) 及啟動子活性分析 (promoter activity analysis)，以瞭解香蕉果實後熟相關蛋白質 MhDnaJ 之功能及其啟動子之表現特性。蛋白質定位質體以 2 X CaMV 35S 啟動子驅動 MhDnaJ 融合綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)，分別以阿拉伯芥原生質體轉殖與基因槍法轉殖至洋蔥表皮細胞，進行暫時性表現分析，以共軛焦顯微鏡觀察，MhDnaJ::GFP 融合蛋白於細胞核內表達。*MhDnaJ* 啟動子引導報導基因 *GUS* 之菸草轉殖植株，經南方氏雜交分析確認均為轉殖株，於 T1 轉殖株播種後 5-30 天啟動子皆無表現，進一步分析菸草 R1 轉殖株花序與果實不同生長發育階段之啟動子活性，顯示 *MhDnaJ* 啟動子於柱頭發育早期 (stages 2-4) 與後期 (stage 8)、雄蕊發育後期 (stages 8-9) 與果實發育早期 (stages 10-11) 表現，顯示啟動子活性於花器表現。不同非生物性逆境與生長調節劑誘導處理，皆無法誘導啟動子表現。

關鍵字：香蕉、熱休克蛋白質、J 蛋白質、阿拉伯芥原生質體、啟動子活性分析。

Abstract

Banana (*Musa* spp.), the largest herbaceous monocot flowering plant, is an important crop in Taiwan. This research aims to understand gene function of banana ripening-associated gene *MhDnaJ* by employing gene overexpression studies and gene silencing through RNA interference strategy. Furthermore, the localization of MhDnaJ protein and promoter activity were studied. *MhDnaJ* cDNA was fused with green fluorescence protein gene driven by 2 X CaMV 35S promoter, transformed to *Arabidopsis* protoplasts and onion epidermal cells, then analyzed by confocal fluorescence microscopy for protein localization. The MhDnaJ protein was found to be localized in the nucleus as evidenced by green fluorescence. Twelve putative transgenic tobacco plants containing promoter construct were confirmed by Southern blot analysis. No expression of *MhDnaJ* promoter was detected in 5 to 30 day-old plants, but was found to be expressed in flower (pistil: stages 2-4, 8; stamen: stages 8-9) and fruit (stages 10-11) as detected by GUS histochemical staining. None of the abiotic stresses or any plant growth regulators could induce *MhDnaJ* promoter activity.

Keywords: Banana, Heat shock protein, J-protein, *Arabidopsis* protoplast, promoter activity analysis.

內容索引

中文摘要	I
Abstract	II
圖目次	VI
表目次	VII
壹、前言	1
貳、前人研究	2
一、熱休克蛋白質	2
二、熱休克蛋白質之種類與特性	3
三、植物熱休克蛋白質之作用機制	5
四、植物熱休克蛋白質之功能分析	6
五、熱休克蛋白質 Hsp40 (DnaJ /J-protein)	10
參、材料與方法	13
一、試驗材料	13
(一) 菌種材料	13
(二) 植物材料	13
(三) 質體材料	13
二、試驗方法	17
(一) 基因啟動子與胺基酸序列構分析	17
1. 基因啟動子序列分析	17
2. 胺基酸序列分析	17
(二) 轉殖質體之構築	20
1. 質體 DNA 之小量製備	20
2. DNA 片段回收	20
3. 連接反應	20
4. 大腸桿菌勝任細胞之製備	21
5. 轉型反應	21

6. 聚合酶連鎖反應.....	22
7. DNA 5' 末端突出補平反應.....	22
8. DNA 3' 末端突出切平反應.....	22
9. DNA 定序.....	23
(三) 質體 DNA 之大量製備.....	23
(四) 阿拉伯芥原生質體轉殖.....	24
1. 原生質體之抽取.....	24
2. 原生質體之轉殖.....	24
(五) 基因槍法暫時性表現.....	25
1. 微粒子製備與 DNA 包裹.....	25
2. 洋蔥表皮細胞之基因轉殖.....	25
(六) 農桿菌轉型.....	26
1. 農桿菌勝任細胞之製備.....	26
2. 電穿孔轉型反應.....	26
3. 農桿菌質體 DNA 之小量製備.....	27
(七) 阿拉伯芥基因轉殖及轉殖株篩選.....	28
1. 阿拉伯芥花序浸潤轉殖法.....	28
2. 轉殖株之篩選.....	29
(八) 菸草基因轉殖及轉殖株篩選.....	29
1. 菸草葉圓片轉殖法.....	29
2. 轉殖株之篩選與再生.....	30
(九) 擬轉殖株之分析.....	30
1. 基因組 DNA 之抽取.....	30
2. 樣品製備.....	31
3. 探針製備.....	31
4. 南方氏雜交分析.....	32
5. GUS 活性組織化學染色法.....	32

(十) 轉殖株之啟動子活性與誘導分析.....	33
1. 無菌播種.....	33
2. 不同發育階段之啟動子活性分析.....	33
3. 不同非生物性逆境誘導處理.....	33
4. 不同生長調節劑誘導處理.....	34
肆、結果.....	36
一、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因結構分析.....	36
(一) 香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因序列分析.....	36
(二) 香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因啟動子序列分析.....	36
二、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因功能分析.....	46
三、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 蛋白質定位分析.....	46
四、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因啟動子活性分析.....	49
(一) 菸草轉殖株基因完整性與基因拷貝數之分子驗證.....	49
(二) 菸草轉殖株不同發育階段之啟動子活性分析.....	49
(三) 不同非生物性逆境與生長調節劑誘導之菸草轉殖株啟動子 活性分析.....	55
伍、討論.....	61
一、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因結構分析.....	61
(一) 香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因序列分析.....	61
(二) 香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因啟動子序列分析.....	63
二、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 蛋白質定位分析.....	65
三、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 啟動子活性分析.....	67
陸、結語.....	68
柒、參考文獻.....	69

圖目次

圖一、基因過量表現分析之質體 pGKUMhDnaJ 構築策略	15
圖二、基因默化分析之質體 pGKUsiMhDnaJ 與 pGKmCsiMhDnaJ 構築 策略	16
圖三、蛋白質定位分析之質體 pGKU35STJgfp 構築流程.....	18
圖四、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因功能分析表現質體之構築示意圖.....	19
圖五、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因之核苷酸及演繹胺基酸序列.....	39
圖六、不同作物之 DnaJ 胺基酸序列比較.....	43
圖七、不同作物之 DnaJ 胺基酸序列親緣性分析.....	45
圖八、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 蛋白質於阿拉伯芥原生質體之細胞內定位.....	50
圖九、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 蛋白質於洋蔥表皮細胞之細胞內定位.....	52
圖十、菸草 <i>MhDnaJ_{pro}::GUS</i> 擬轉殖株南方氏雜交分析.....	53
圖十一、菸草 <i>MhDnaJ_{pro}::GUS</i> 擬轉殖株之基因拷貝數分析.....	54
圖十二、菸草 <i>MhDnaJ_{pro}::GUS</i> 轉殖株不同發育天數之啟動子活性分析....	56
圖十三、菸草 <i>MhDnaJ_{pro}::GUS</i> 轉殖株花朵發育階段之啟動子活性分析....	57
圖十四、菸草 <i>MhDnaJ_{pro}::GUS</i> 轉殖株果實發育階段之啟動子活性分析....	58
圖十五、菸草 <i>MhDnaJ_{pro}::GUS</i> 轉殖株逆境誘導之啟動子活性分析.....	59
圖十六、菸草 <i>MhDnaJ_{pro}::GUS</i> 轉殖株以植物生長調節劑誘導之啟動子 活性分析	60
圖十七、不同作物 <i>DnaJ</i> 基因結構比較	62

表目次

表一、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因之顯子與隱子連接部位核苷酸及胺基酸序列.....	41
表二、香蕉、阿拉伯芥、水稻、楊樹、蓖麻、葡萄與玉米 <i>DnaJ</i> 胺基酸 序列相似性	42
表三、香蕉 <i>MhDnaJ</i> 基因之啟動子序列分析	47
表四、不同作物 <i>DnaJ</i> 啟動子區域反應序列之比較	66



壹、前言

香蕉 (*Musa* spp.) 屬芭蕉科 (Musaceae)、芭蕉屬 (*Eumusa*)，大型單子葉草本植物，為一年生之果樹，是臺灣重要的經濟作物，亦是亞洲、非洲與拉丁美洲日常飲食中非常重要的主食 (邱和許，2005)。香蕉富含多種維生素、鉀和鎂，能防止血壓上升及肌肉痙攣，具消除疲勞、助消化、止瀉、美容、減肥及預防便秘等功效。

本實驗室從仙人蕉第三級後熟果實 cDNA 庫與基因組庫篩選得到之基因，其演譯之胺基酸序列經 NCBI 網站資料庫序列比對分析，與熱休克蛋白質 DnaJ 有較高的同源性，將其命名為 MhDnaJ。

為瞭解香蕉果實後熟相關基因 *MhDnaJ* 之啟動子活性與基因功能，本論文分別以 CaMV 35S 啟動子驅動 *MhDnaJ* 基因及 RNA 干擾構築，經農桿菌媒介法轉殖於阿拉伯芥與菸草，進行基因功能分析觀察轉殖株外觀性狀、受不同生長調節劑及非生物性逆境處理之影響；以 2 X CaMV 35S 啟動子驅動 *MhDnaJ::GFP* 融合蛋白，經轉殖至阿拉伯芥原生質體及洋蔥表皮細胞，進行暫時性蛋白質定位分析，另外轉殖於菸草與阿拉伯芥，進行穩定性定位分析；以香蕉 *MhDnaJ* 啟動子驅動 *GUS* 報導基因，轉殖於菸草與阿拉伯芥，觀察轉殖株於不同發育階段啟動子之表現，並以不同生長調節劑及非生物性逆境進行誘導處理，分析啟動子活性。

貳、前人研究

一、熱休克蛋白質

陸生植物為固著生長，必須被動接受所有環境因子，因此在逆境下具有多種機制以維持細胞內的平衡 (Rajan and D'Silva, 2009)，伴護蛋白 (chaperones) 的作用為植物逆境反應機制之一，當植株暴露在溫度高於最適生長溫度 5-10°C 時，會大量合成蛋白質，稱為熱休克蛋白質 (heat shock proteins, Hsps)，此時大量累積的熱休克蛋白質，會使植物產生特殊的生理反應，即稱為熱休克反應 (heat shock response, HSR) (Baniwal et al., 2004; Kotak et al., 2007)。

逆境發生時會使植物細胞內蛋白質變性，變性的蛋白質會相互凝集，使蛋白質失去功能，甚至造成植株死亡，而熱休克蛋白質具有將凝集的變性蛋白質分離、並且對變性的蛋白質進行重新摺疊，維持細胞內蛋白質的結構，使逆境下變性的蛋白質恢復正常的功能，提高植株於逆境下的耐受性，增加植物的存活率 (Wang et al., 2004)。

熱休克反應最早發現於對果蠅幼蟲的研究，觀察到將果蠅幼蟲移至高溫時 (25→30°C)，其巨大唾液腺染色體會形成新的膨脹處 (puff) (Rittossa, 1962)，後來證實此區域的轉錄作用旺盛，部分新轉錄的 mRNAs 會轉譯合成熱休克蛋白質 (Tissieres et al, 1974)。

植物熱休克蛋白質於 1980 年代才開始進行研究，在高溫逆境下，大豆及菸草組織培養細胞與大豆白化幼苗，細胞內正常的蛋白質合成會被抑制，進而誘導合成新的蛋白質，這一類的蛋白質與 Rittossa (1962) 研究果蠅幼蟲巨大唾液腺染色體所合成的蛋白質為同一類，即為熱休克的蛋白質 (Barnett et al., 1980; Key et al., 1981)。

目前已知熱休克蛋白質參與細胞內蛋白質摺疊、運輸、分解、調節蛋

白質的活性與防止蛋白質的凝集，另外可以幫助因逆境導致變性及不正常凝集的蛋白質重新摺疊，以維持細胞內蛋白質的結構，使其恢復正常功能，並且參與多種植物逆境之調控 (Baniwal et al., 2004; Vinocur and Altman, 2005; Wang et al., 2004)。

二、熱休克蛋白質之種類與特性

熱休克蛋白質廣泛存在各種生物體中，胺基酸序列具有高度的同源性，根據其分子量及序列相似性可區分為兩大類：高分子量熱休克蛋白質 (high-molecular-mass heat shock proteins, HMM Hsps)，分子量約為 60-110 kDa，包括 Hsp110、Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40 等；低分子量熱休克蛋白質 (low-molecular-mass heat shock proteins, LMM HSPs)，又稱為小分子量熱休克蛋白質 (small heat shock proteins, sHsps)，分子量約為 15-42 kDa (Vierling, 1991)。

(一) sHsps

植物具多種 sHSP，種類繁多、變異性較大，但 C 端胺基酸序列相似性高，具約 90 個胺基酸保守序列，稱為 α -crystallin domain，而根據其在細胞內不同部位，可分為六類：第一類及第二類位於細胞質中；第三類位於葉綠體內；第四類位於內質網上；第五類位於內質網以外的內膜系統中；第六類則位於粒線體內。sHSP 結構為六聚體，主要功能是與變性的蛋白質結合，防止其相互凝集，並促使 HSP70 對其進行重新摺疊，使變性蛋白質恢復正常功能 (Haslbeck, 2002; Wang et al., 2004)。

(二) Hsp40/DnaJ/J-protein

Hsp40 (DnaJ/J-protein) 熱休克蛋白質因都具有 J-domain 故又稱為

J-protein，根據胺基酸序列的差異又可分為四類 (type I-IV)，type I為最典型的 J-protein，具有 J-domain, G/F region, zinc-finger domain, C-terminal domain；type II的J-protein缺少zinc-finger domain；type III的J-protein只具有 J-domain；而type IV為最新一類的J-protein稱為J-like proteins (JLPs) (Rajan and D'Silva, 2009)。Type I的J-protein C端胺基酸序列相似性高，具約70個胺基酸保守序列，稱為 J domain，能與Hsp70/DnaK之ATPase domain結合幫助Hsp70對變性蛋白質進行重新摺疊。此外，第一型與第二類具peptide-binding fragments能與變性蛋白質結合，並將其轉交給Hsp70之功能，而其中第一類在peptide-binding fragments 內具有Zinc finger motif，能防止變性的蛋白質的相互凝集 (Fink, 1999; Li et al., 2009; Rajan and D'Silva, 2009)。

(三) Hsp60/GroE

Hsp60/GroE 為六聚體的雙環結構，主要可以分為兩類，第一類為 GroE chaperonins，發現於細菌、粒線體及葉綠體內；第二類為 CCT chaperonins，發現於古細菌 (Archaea) 及原核生物細胞質中。Hsp60/GroE 能對新合成的蛋白質進行摺疊，亦能對變性的蛋白質進行重新摺疊 (Bukau and Horwich, 1998; Wang et al., 2004)。

(四) Hsp70/DnaK

Hsp70/DnaK 之 N 端胺基酸序列相似性高，具 44 kDa ATPase domain，而 C 端具有約 25 kDa 的 peptide-binding domain，主要功能為對新合成的蛋白質進行摺疊、對變性蛋白質重新摺疊及負調控熱逆境轉錄因子 (heat stress transcription factors, Hsfs) 的活性 (Wang et al., 2004; Li et al., 2009)。

(五) Hsp90

胺基酸序列 N 端具有 ATPase domain，在所有真核生物中還具有 charged domain，能與變性的蛋白質結合，Hsp90 能對變性的蛋白質進行重新摺疊，另外還具有負調控熱逆境轉錄因子的能力 (Prodromou et al., 1997; Picard, 2002)。

(六) Hsp100/ClpB

Hsp100/ClpB 為六聚體雙環結構，根據 nucleotide binding domain (或稱 ATP-binding domain) 分兩類：第一類有兩個 nucleotide binding domains；第二類只有一個 nucleotide binding domain，主要的功能為將凝集的變性蛋白質分離，再藉由 Hsp70/DnaK 進行重新摺疊或是由 protease 將其分解 (Lee et al., 2003; Bösl et al., 2006)。

三、植物熱休克蛋白質之作用機制

當植物遭遇非生物性逆境時，會使細胞內蛋白質變性、相互凝集在一起，此時會引起熱休克反應，細胞內的熱休克蛋白質大量合成，並開始作用。植物體內參與逆境反應的主要六類熱休克蛋白質為 Hsp70 (DnaK/Ssa)、J-protein/Hsp40 (DnaJ/Ydj1)；Hsp60 (GroEL)；Hsp90；Hsp100 (Clp) 與 small Hsp (sHsp) (Rajan and D'Silva, 2009)。

Hsp90 負調控熱逆境轉錄因子 (heat stress transcription factors, Hsfs)，當逆境發生時，Hsp90 會與熱逆境轉錄因子分離，與變性蛋白質結合進行重新摺疊，使熱逆境轉錄因子活化，形成三聚體並與熱休克蛋白質基因啟動子內 heat stress promoter elements (HSE) 之迴文序列結合，熱逆境轉錄因子磷酸化後促進 mRNA 轉錄，轉譯合成熱休克蛋白質，合成過多的 Hsp70 會進入核內與熱逆境轉錄因子結合進行負調控，使三聚體分離成單體，或是進一步將其分解 (Morimito, 1993; Yamada and Nishimura, 2008)；sHsp 會與

變性的蛋白質緊密地結合，防止發生凝集作用，再經由 Hsp70 進行重新摺疊 (Haslbeck, 2002); Hsp100/Clps 能將已經凝集在一起的變性蛋白質分離，再經由 Hsp70/Hsp40 進行重新摺疊，或是藉由與 protease 將其直接分解 (Doyle and Wickner, 2008); Hsp40 上的 peptide-binding fragments 與變性蛋白質結合後，將變性蛋白質轉交給 Hsp70，而 Hsp40 之 C 端的 J domain 會與 Hsp70 之 N 端的 ATPase domain 結合，促使 Hsp70 對變性的蛋白質進行重新摺疊 (Wang et al., 2004); 此外 Hsp60/GroE 也具有對變性的蛋白質進行重新摺疊的能力，變性蛋白質進入 GroEL 雙環結構中，藉由 GroES 的輔助，GroEL 雙環結構內 ATP 轉變成 ADP 並對變性的蛋白質進行重新摺疊，最後 GroES 和環內的蛋白質被彈射出去，但變性的蛋白質可能在未完全重新摺疊的情況下被彈射出去，於是會再一次進入 GroEL 雙環結構內進行摺疊 (Bukau and Horwich, 1998; Kusmierczyk and Martin, 2001)。植物在逆境下由不同的熱休克蛋白質共同作用，維持細胞內蛋白質結構，以發揮正常功能，增加耐逆境的能力。

四、植物熱休克蛋白質之功能分析

在一般生長情況下熱休克蛋白質 Hsp70、Hsp60 與 Hsp40 參與細胞內新生蛋白質的摺疊 (Martin and Hartl, 1993) 與運輸 (Baniwal et al., 2004)，在逆境發生時熱休克蛋白質大量表達，穩定細胞內蛋白質結構。

(一) 高溫逆境下植物熱休克蛋白質之基因表現

1. 番茄 *HsfA1a*

番茄熱逆境轉錄因子 *HsfA1a*，分別構築過量表達 *HsfA1a* 與基因默化質體，轉殖進入番茄並分析 *HsfA1a* 對高溫逆境的影響，轉殖株以 1 小時 45°C 高溫處理後，基因默化之轉殖株死亡，當處理溫度提高到 1 小時 51°C

時，番茄未轉植株也死亡，但過量表達之轉植株仍可正常生長；於番茄果實後熟以 42°C 高溫處理 2 天，基因默化之轉植株果實無法正常後熟，結果顯示過量表達 HsfA1a 之番茄轉植株具有較高耐熱性，番茄 *HsfA1a* 對於植株耐熱逆境的能力扮演重要角色 (Baniwal et al., 2004)。

2. 番茄 *LeHSP100/ClpB*

番茄葉綠體 *LeHSP100/ClpB* 經過 2 小時 38°C 高溫處理後大量表達，利用基因默化技術，構築反義 (antisense) 基因，轉殖進入番茄進行進行高溫處理，先以 2 小時 38°C 處理，再以 2 小時 46°C 處理後於 28°C 繼續生長，14 天後轉植株明顯枯萎，21 天後死亡，顯示番茄轉植株因無法表達 *LeHSP100/ClpB*，導致植株在高溫逆境處理後死亡 (Yang et al., 2006)。

3. 阿拉伯芥 *Hsp101*

過量表達 *AtHsp101* 之阿拉伯芥轉植株，在經過 45°C 60 分鐘處理後未轉植株幾乎死亡，結果顯示轉植株在高溫處理後生長情形都較未轉植株好；基因默化 *AtHsp101* 之阿拉伯芥轉植株，先以 38°C 處理 90 分鐘後再處理 45°C 2 小時，於 22°C 生長六天後，基因默化轉植株幾乎全數死亡，顯示轉植株於無法正常表達 *Hsp101* 使耐熱性降低 (Queitsch et al., 2000)。

4. 阿拉伯芥 *Hsp90.3*

過量表達 *AtHsp90.3* 之阿拉伯芥轉植株種子，在室溫下於潮溼的濾紙上吸水 18 小時，再處理 51°C 30 分鐘後於 22°C 下發芽，轉植株與未轉植株的發芽率無明顯差異，但轉植株發芽天數明顯延後，顯示其種子對熱敏感；兩週大的阿拉伯芥轉植株，以 45°C 處理後轉植株耐熱性較差。由於 *Hsp90* 會負調控 Hsfs，故過量表達 *AtHsp90.3* 使 Hsfs 於逆境下無法正常作用，導

致轉殖珠耐熱性較低 (Xu et al., 2010)。

5. 阿拉伯芥 *BOB1*

阿拉伯芥 *BOB1* 為 sHsp，在經過 1-3 小時 37°C 處理後，於根與莖會大量的表現。將阿拉伯芥 *BOB1* 與報導基因 *GFP* 連接後轉殖於阿拉伯芥，分析其蛋白表達，結果顯示 *BOB1* 位於細胞質，在高溫下形成 heat shock granules，可防止因高溫變性的蛋白凝集；阿拉伯芥突變株 *bob1-3* 種子發芽之耐熱性較野生型 Col-O 差，但突變株在轉殖 *BOB1:GFP* 後因 *BOB1* 能正常表達，種子發芽之耐熱性也提高；而突變株 *bob1-3* 在經過 60 分鐘 45°C 處理後死亡，結果顯示阿拉伯芥突變株 *bob1-3* 因無法合成 sHSP，導致植株的耐熱性較差，在高溫逆境處理後死亡。阿拉伯芥 sHsp *BOB1* 可防止因高溫變性的蛋白凝集，而突變株 *bob1-3* 在經過 60 分鐘 45°C 處理後，結果顯示因其基因功能失效，導致植株無法抵抗熱逆境 (Perez et al., 2009)。

6. 葡萄 *HSG*

葡萄 *HSG* 為 sHsp，過量表達葡萄 *HSG* 之轉殖株於 22°C 暗處理 4 天後，以 37°C 處理 1 小時、22°C 處理 1 小時，再處理高溫 45°C 1 小時，於 22°C 生長 13 天，未轉殖株有枯萎現象，21 天後轉殖株生長良好，而未轉殖株死亡，但若以以 37°C 處理 1 小時、22°C 處理 2 天，再處理高溫 45°C 1 小時，轉殖株的耐熱性差，顯示葡萄 *HSG* 需要一段時間累積，瞬間高溫仍會造成植株受到傷害 (Kobayashi et al., 2010)。

(二) 低溫逆境下植物熱休克蛋白質之基因表現

過量表達 *ApDnaK* (Hsp70) 之白楊轉殖株，於 4°C 處理 4 天後，再以 -15°C 處理 10 天，再於 4°C 處理 5 天後，於 25/22°C 生長，兩棵轉殖株之 Fv/Fm

值 0.38 ± 0.06 與 0.37 ± 0.11 都高於未轉殖株 0.17 ± 0.04 ，顯示過量表達 *ApDnaK* 之白楊轉殖株具有較佳之耐低溫逆境之能力 (Takabe et al., 2008)。

(三) 乾旱逆境下植物熱休克蛋白質之基因表現

1. 阿拉伯芥 *At-HSP17.6*

阿拉伯芥之未轉殖株於乾旱處理 14 天後死亡，但過量表達 *At-HSP17.6* 之阿拉伯芥轉殖株在經過 17 天的乾旱處理後仍可正常生長，結果顯示過量表達 *At-HSP17.6* 之阿拉伯芥轉殖株具有較高耐旱性 (Sun et al., 2001)。

2. 水稻 *sHSP17.7*

水稻在經過 24 小時 42°C 高溫處理後，能明顯地提高耐旱性，而未經高溫處理的植株於乾旱處理 6 天後幾乎全數死亡，分析後顯示高溫處理使其 *sHSP17.7* 含量增加，於是過量表達稻米 *sHSP17.7* 進行分析，經過 6 天乾旱處理後轉殖株約有 50% 存活率，而未轉殖株全數死亡，顯示過量表達稻米 *sHSP17.7* 之轉殖株具有較高耐旱性 (Sato and Yokoya, 2008)。

3. 白楊 *ApDnaK*

過量表達 *ApDnaK* 之白楊轉殖株，經過 6 天停水乾旱處理，恢復供水 6 天，未轉殖株整株枯萎死亡，再繼續 6 天停水乾旱處理，恢復供水 6 天，兩棵轉殖株葉片嚴重枯萎，但莖部仍然未枯萎，顯示過量表達 *ApDnaK* 之白楊轉殖株具有較佳之耐乾旱逆境之能力 (Takabe et al., 2008)。

(四) 鹽份逆境下植物熱休克蛋白質之基因表現

1. 阿拉伯芥 *At-HSP17.6*

過量表達 *At-HSP17.6* 阿拉伯芥以 75 mM 之 NaCl 處理 3 週後轉殖株全數存活，未轉殖株死亡率約 50%，而在處理後轉殖株鮮重也高於未轉殖

株，結果顯示過量表達 *At-HSP17.6* 之阿拉伯芥轉殖株具有較高耐旱性及耐鹽性 (Sun et al., 2001)。

2. 白楊 *ApDnaK*

過量表達 *ApDnaK* 之白楊轉殖株，以 0.48 M NaCl 處理 24 小時，以 2000 倍 HYPONEX 灌溉 24-72 小時，兩棵轉殖株在 72 小時後葉片都有枯黃情形，但未轉殖株整株枯萎死亡，顯示過量表達 *ApDnaK* 之白楊轉殖株具有較佳之耐鹽份逆境之能力 (Takabe et al., 2008)。

(五) 重金屬逆境下植物熱休克蛋白質之基因表現

過量表達小麥 *TaHsfA4a* 之水稻轉殖株，於處理 200 μ M CdCl₂ 兩週後，兩轉殖株株高為 8 與 10 公分，明顯的高於未轉殖株的 5 公分，而兩轉殖株植株內 *MT-I-1a* 表現量增加，顯示過量表達小麥 *TaHsfA4a* 能促進植株內合成金屬硫蛋白 (metallothionein)；基因默化 *TaHsfA4a* 之水稻轉殖株，則在處理 150 μ M CdCl₂ 兩週後，不論植株鮮重與株高都低於未轉殖株，顯示默化 *TaHsfA4a* 後植株對重金屬鎘離子耐受性降低 (Shim et al., 2009)。

五、熱休克蛋白質 Hsp40 (DnaJ /J-protein)

(一) J-protein蛋白質結構

1. J-domain

J-domain是根據大腸桿菌DnaJ而命名，由約70個高度保守胺基酸序列組成 (Cheetham and Caplan, 1998)，具有四個 α -helices (helice I-IV) 的二級結構，包含兩個較短的helice I, IV與兩反方向平行的helice II, III，而在helice II後由組胺酸 (Histidine)、脯胺酸 (Proline) 與天門冬胺酸 (Aspartic acid) 所組成的HPD motif，為J-domain最重要的保守區域，主要的功能為活化Hsp70 (DnaK/Ssa) 的 ATPase domain (Tsai and Douglas, 1996)，協助 Hsp70

(DnaK/Ssa) 對蛋白質進行摺疊與運輸。

2. G/F region

於type I及II之J-domain後由甘胺酸與苯丙胺酸組成的G/F region功能尚未確認，而type I之G/F region具有約40-50個胺基酸，較type II 70-120個胺基酸少，由DnaJ NMR結構推測G/F region具有良好的可塑性，能使J-domain精確地與Hsp70的ATPase domain作用 (Craig et al., 2006; Cheetham and Caplan, 1998; Martinez-Yamout et al., 2000)。

3. Zinc-finger domain

Zinc-finger domain由四個重複的CXXCXG motif並分成兩組，中心由鋅離子所構成 (Martinez-Yamout et al., 2000)，只有type I的J-protein有zinc-finger domain，其功能為與變性的蛋白質結合幫助Hsp70進行蛋白質重新摺疊 (Lu and Cyr, 1998)。

4. C-terminal domain

J-domain保守性最低的區域為C-terminal domain，其具有兩個 β -sheets與一個短 α -helix形成 β -sandwich構造，能使J-domain形成二聚體結構，C-terminal domain具有與受質結合的能力，另外，形成二聚體結構時能提供一個封閉的結構，使Hsp70在此結構內作用 (Li et al., 2003)。

(二) J-protein之基因功能分析

於抗逆境的研究，表達*DnaJ*之大腸桿菌能於含0.5 mM NaCl之LB培養基上生長。阿拉伯芥*DnaJ*表達於根、莖、葉、花及果莢，但不同植株部位表達情形不同，其中以葉片表達量最高，根部表達量最低，而過量表達*AtDnaJ*之阿拉伯芥轉植株，花序數比未轉植株多，葉片較大，葉緣呈鋸齒狀及葉背

缺少絨毛等特徵，而於120 mM NaCl鹽逆境處理，根長是未轉殖株的1.25倍長，顯示轉殖株具有較高之耐鹽性 (Zhao et al. 2010)。此外，阿拉伯芥DNAJ HOMOLOG 3 (J3) 參與開花訊息的調控，阿拉伯芥*j3*突變株與基因默化轉殖株都比未轉殖株晚開花 (Shen et al., 2011)。



參、材料與方法

一、試驗材料

(一) 菌種材料

1. 基因構築使用之勝任細胞菌種為 *Escherichia coli* (JM109)。
2. 轉殖使用之農桿菌菌種為 *Agrobacterium tumefaciens* 品系之 LBA4404 (Hoeckema et al., 1983) 與 EHA105 (Elizabeth et al., 1986)。

(二) 植物材料

1. 阿拉伯芥基因轉殖之材料為 *Arabidopsis thaliana* L. ecotype Columbia。
2. 菸草基因轉殖之材料為無菌播種之 *Nicotiana tabacum* L. cv. W38。
3. 蛋白質定位暫時性表現分析材料為洋蔥 (*Allium cepa* L.) 鱗莖表皮組織。

(三) 質體材料

1. 過量表現分析質體

依 pMACS38 之轉譯起始點 (transcription start site) 前序列，設計含有限制酶 *NcoI* 切位之引子 (primer) DnaJF (5'-TAACCATGGGACCGGCGT-3')，與引子 M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') 共同進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，得到 958 bp 之片段。此片段經 *NdeI* 酶切後進行 5' 末端突出補平處理，再經 *NcoI* 酶切，回收 175 bp 之產物，另外 pGKUa 經 *SacI* 酶切後進行 3' 末端突出切平處理，再經 *NcoI* 酶切，回收 5520 bp 之產物，將兩回收片段以適當比例混合，進行 DNA 接合反應，得到中間質體 pGKMhDnaJ-1。中間質體 pGKMhDnaJ-1 與 PCR 片段分別經 *NcoI* 酶切，回收 5695 bp 與 492 bp 之產物，將兩回收片段以適當比例混合，

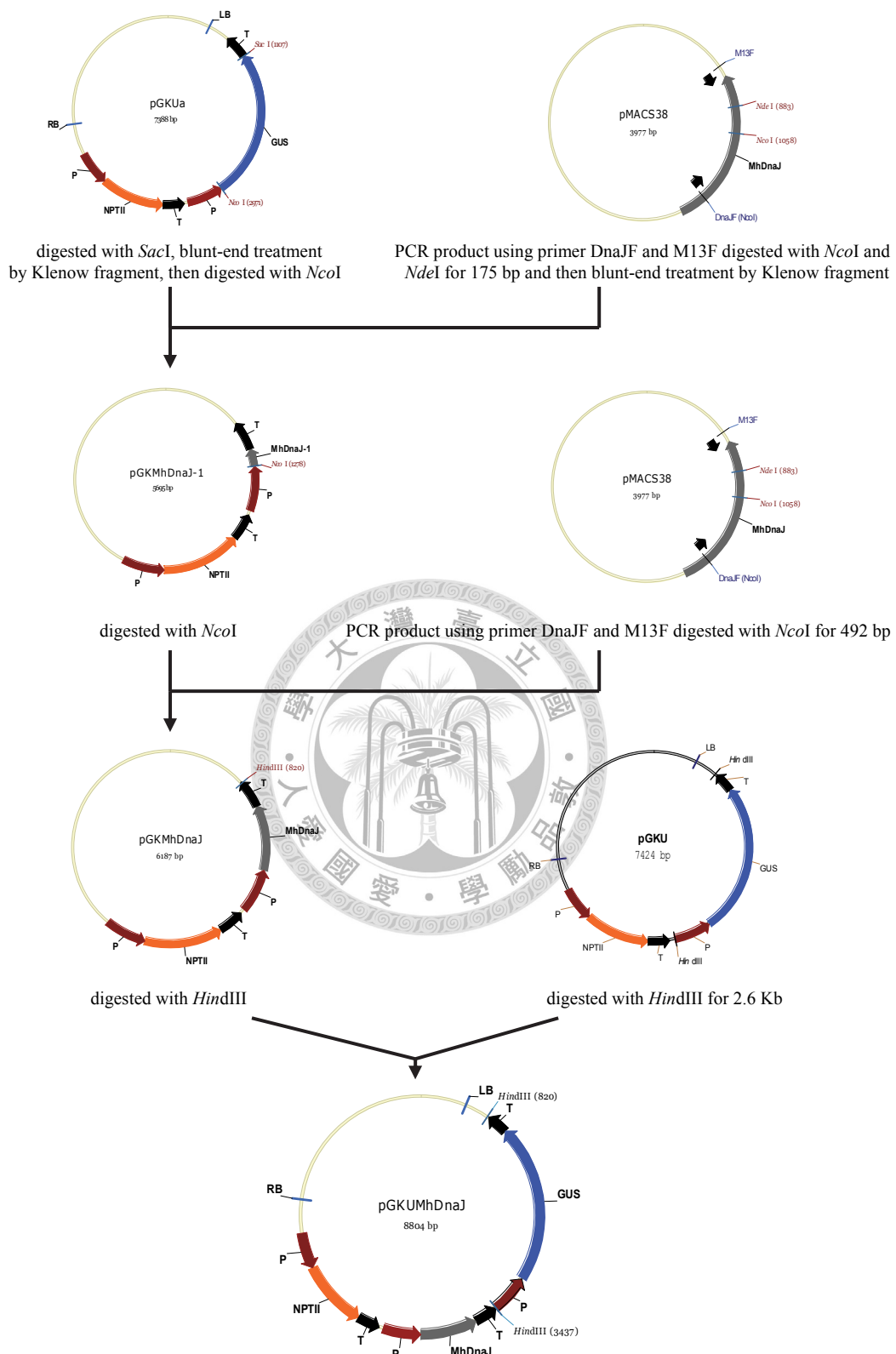
進行 DNA 接合反應，得到質體 pGKMhDnaJ。pGKMhDnaJ 與 pGKU 分別經 *Hind*III 酶切，回收 6187 bp 與 2617 bp 之產物，將兩回收片段以適當比例混合，進行 DNA 接合反應，得到轉殖質體 pGKUMhDnaJ (圖一)。

2. 基因默化分析質體

依據 *MhDnaJ* 與 *AtDnaJ* 核苷酸序列比對結果，設計含有限制酶 *Bam*HI 與 *Sal*I 切位之寡核苷酸引子 (oligonucleotides primers) siMhDnaJ-S (5'-GATCCGAAGGTCTCGAGCTTGATACTTCAAGAGAGTATCAAGCTCGAGACCTTCTTTTTG-3') 與 siMhDnaJ-AS (5'-TCGACAAAAAGAAGGTCTCGAGCTTGATACTCTCTTGAAGTATCAAGCTCGAGACCTTCG-3')，兩引子進行黏合反應，得到 60 bp 之產物。pGK6-5i-s-1 經 *Bam*HI 與 *Sal*I 酶切共同酶切，回收 5275 bp 之產物，將此兩回收片段以適當比例混合，進行 DNA 接合反應，得到中間質體 pGKsiMhDnaJ。pGKU 與 pU35STmCherry 分別經 *Hind*III 酶切，回收 2617 bp 與 1902 bp 之產物，另外中間質體 pGKsiMhDnaJ 經 *Hind*III 酶切，回收 5335 bp，分別將回收片段以適當比例混合，進行 DNA 接合反應，得到轉殖質體 pGKUsiMhDnaJ 與 pGKmCsiMhDnaJ (圖二)。

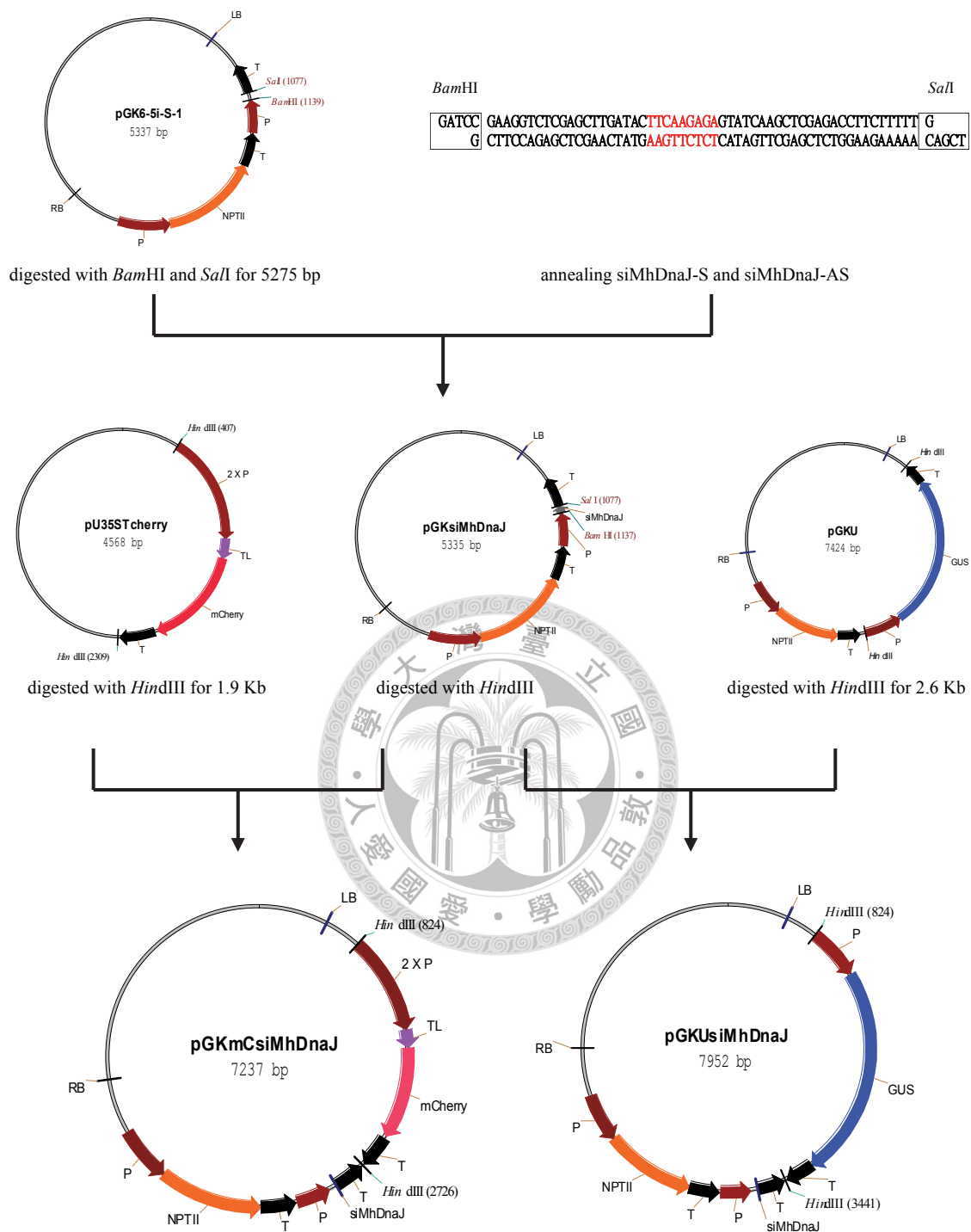
3. 蛋白質定位分析質體

依 pMACS38 之轉譯起始點前與轉譯終止碼 (stop codon) 後序列，設計含有限制酶 *Nco*I 切位之引子 DnaJF (5'-TAACCATGGGACCGGCGT-3') 與 DnaJ3 (5'-TACAGCTTCATCATCATCGTC-3')，共同進行聚合酶連鎖反應，得到 648 bp 之片段，此片段經 *Nco*I 酶切，回收 160 bp 之產物。依 pU35STgfp 之轉譯起始點前序列，設計引子 5GFP (5'-ATGGGTAAAGGAGAAGAACT-3')，與引子 35S polyA ter (5'-CTACTCACACATTATTCTGG-3') 共同進行聚合酶連鎖反應，得到 802



圖一、基因過量表現分析之質體pGKUMhDnaJ構築策略

Fig. 1. The construction strategy of plasmid pGKUMhDnaJ for gene overexpression. GUS: β -glucuronidase gene. LB: Left border. NPTII: neomycin phosphotransferase II gene. P: CaMV 35S promoter. RB: Right border. T: nopaline synthase terminator sequence.



圖二、基因默化分析之質體pGKUsiMhDnaJ與pGKmCsiMhDnaJ構築策略

Fig. 2. The construction strategy of plasmid pGKsiMhDnaJ and pGKmCsiMhDnaJ for gene silencing analysis. GUS: β -glucuronidase gene. LB: Left border. mCherry: modify cherry fluorescence protein. NPTII: neomycin phosphotransferase II gene. P: CaMV 35S promoter. 2 X P: 2-times CaMV 35S promoter. RB: Right border. T: nopaline synthase terminator sequence. TL: tobacco etch virus translation enhancer.

bp 之片段。此片段經 *Bam*HI 酶切後回收 718 bp 之產物。另外 pU35STgfp 經 *Nco*I 與 *Bam*HI 酶切共同酶切，回收 3809 bp 之產物，將此三回收片段以適當比例混合，進行 DNA 接合反應，得到中間質體 pU35STJgfp-1。pMACS38 以引子 DnaJF 與 DnaJ3，共同進行聚合酶連鎖反應，得到 648 bp 之片段，此片段經 *Nco*I 酶切，回收 492 bp 之產物。中間質體 pU35STJgfp-1 經 *Nco*I 酶切，回收 4686 bp，將兩回收片段以適當比例混合，進行 DNA 接合反應，得到質體 pU35STJgfp。pU35STJgfp 與 pGKUa 分別經 *Hind*III 酶切，回收 2512 bp 與 7388 bp 之產物，將兩回收片段以適當比例混合，進行 DNA 接合反應，得到轉殖質體 pGKU35STJgfp (圖三)。

4. 啟動子活性分析質體

pBI101-PMhDnaJ 質體全長 17 Kb，含有 *NOS* 啟動子調控之 *NPTII* 基因，MhDnaJ 啟動子調控之 *gusA* 基因，終結子均為 *NOS* terminator (圖四)。

二、試驗方法

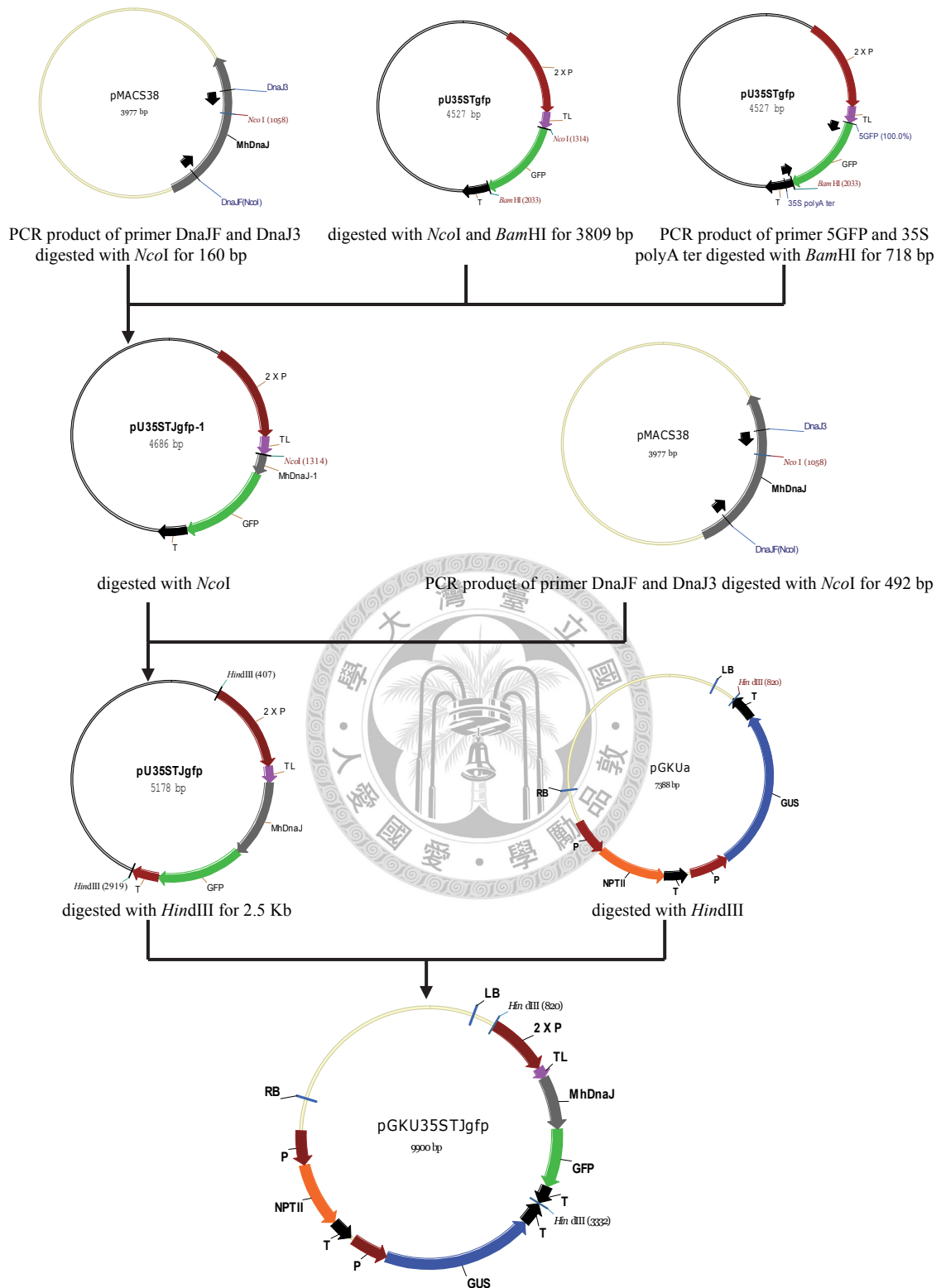
(一) 基因啟動子與胺基酸序列構分析

1. 基因啟動子序列分析

將 λMACS38 轉譯起始點上游之核苷酸序列，以 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 資料庫預測 TATA box 位置，與 TATA box 上游之 *cis*-acting element 位置。

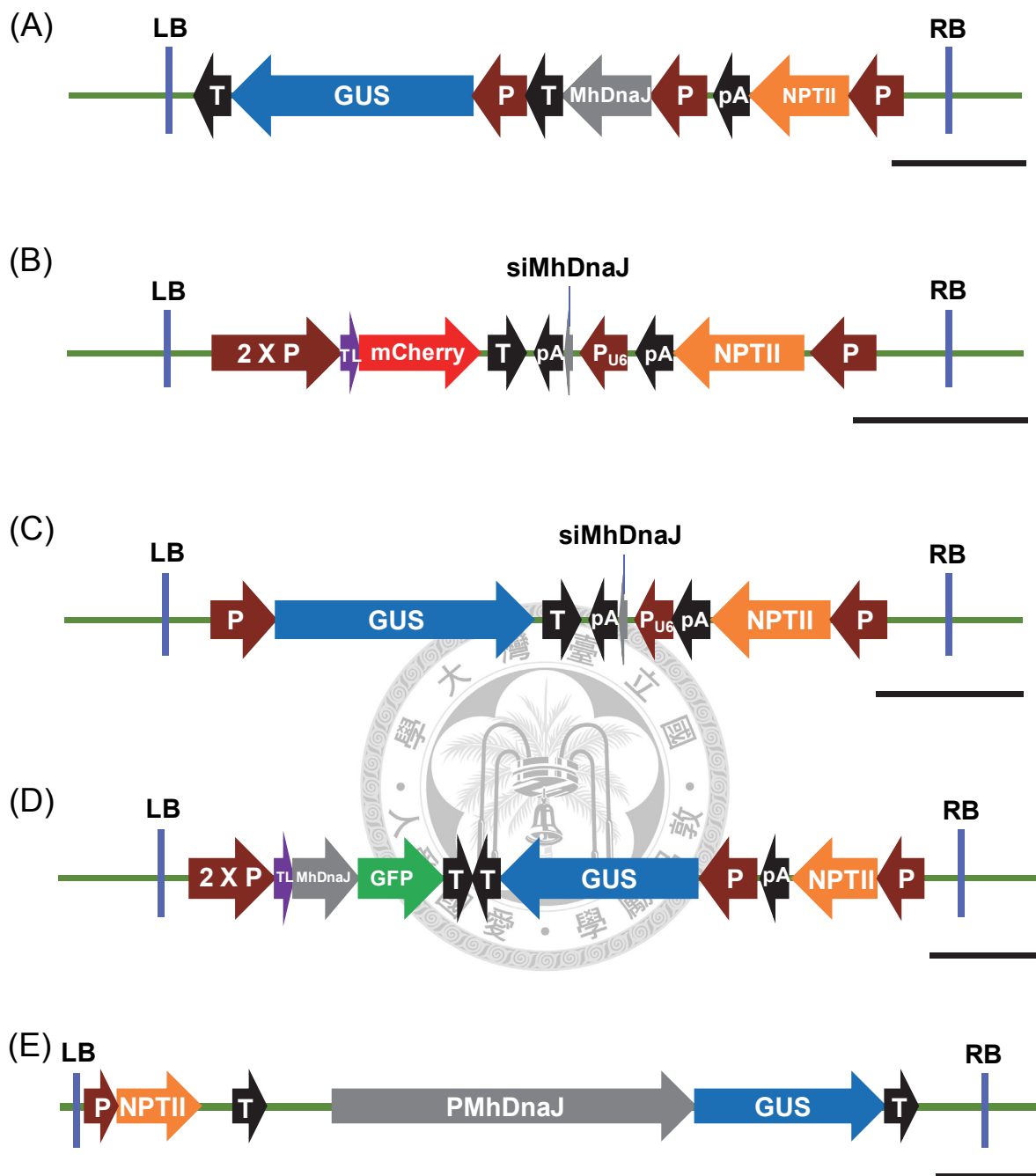
2. 胺基酸序列分析

將 MhDnaJ 胺基酸序列，以 predictprotein 網站資料庫 (<https://www.predictprotein.org/>) 預測二級結構。



圖三、蛋白質定位分析之質體pGKU35STJgfp構築流程

Fig. 3. The construction strategy of plasmid pGKU35STJgfp for protein localization analysis. GFP: Green fluorescence protein. GUS: β-glucuronidase protein. LB: Left border. NPTII: neomycin phosphotransferase II gene. P: CaMV 35S promoter. 2 X P: 2-times CaMV 35S promoter. RB: Right border. T: nopaline synthase terminator sequence. TL: tobacco etch virus translation enhancer.



圖四、香蕉 *MhDnaJ* 基因功能分析表現質體之構築示意圖

Fig. 4. Schematic diagram of the plasmids for *MhDnaJ* gene function analysis. (A) Overexpression. (B) and (C) Gene silencing. (D) Protein localization. (E) Promoter activity. GFP: Green fluorescence protein. GUS: β -glucuronidase protein. LB: Left border. mCherry: modify cherry fluorescence protein. NPTII: neomycin phosphotransferase II gene. P: CaMV 35S promoter. 2 X P: 2-times CaMV 35S promoter. pA: CaMV 35S polyA terminator. P_{U6}: At-C5-U6 snRNA gene promoter. RB: Right border. T: nopaline synthase terminator sequence. TL: tobacco etch virus translation enhancer. Bars = 1 Kb.

(二) 轉殖質體之構築

1. 質體 DNA 之小量製備

質體 DNA 之小量製備方法，係修改自 Sambrook (1989) 所提出之方法。挑取單一菌落接種於 5 mL 含抗生素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin or ampicillin) 之 LB [10 g/L bacto-tryptone, 5g/L bacto-yeast extract, 5 g/L NaCl (pH 7.5)] 液體培養基，於 37°C 以 120 rpm 旋轉培養 12-16 小時，取 1.5 mL 菌液倒入微量離心管，於室溫下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 1 分鐘，倒去上清液，再重複一次。加入 400 μL STET [8% sucrose, 50 mM Na_2EDTA , 5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)] 與 30 μL 10 mg/mL Lysozyme [in TEN: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM Na_2EDTA]，混合均勻後於室溫下反應 10 分鐘，以沸水處理 1 分鐘，立即置於冰上，於 4°C 以 13,200 rpm 離心 30 分鐘，以滅菌牙籤挑出沉澱物，加入 500 μL -20°C 之 isopropanol 混合均勻，置於 -80°C 5 分鐘，於 4°C 以 13,200 rpm 離心 10 分鐘，倒去上清液並倒置微量離心管風乾，加入 20-40 μL TE 7.5 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM Na_2EDTA] 回溶，於 4°C 貯藏備用。

2. DNA 片段回收

取 1 μg 質體 DNA 經限制酶切後，以瓊脂膠體 (agarose) 進行電泳分離，於 UV 365 nm 波段下照射膠體，並切下欲回收之 DNA 片段於微量離心管，秤所切下之膠體重量後，以 UltraClean™ 15 DNA Purification kit (MO BIO) 將膠體溶解使 DNA 釋出，並以 glass beads 回收，最後回溶 10 μL TE 7.5 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM Na_2EDTA]，於 4°C 貯藏備用。

3. 連接反應

將欲接合之基因片段 (insert) 與載體 (vector) 完全酶切，跑電泳回收

後，以適當之比例混合，加入 1/10 體積之緩衝液 (ligation buffer) 與 T4 DNA 連接酶 (ligase)，於 16°C 反應 16-24 小時。

4. 大腸桿菌勝任細胞之製備

大腸桿菌勝任細胞之製備方法，係修改自 Alexander (1987) 所提出之方法。將大腸桿菌 JM109 菌種接種於 M9 (10 g/L Na₂HPO₄ · 7H₂O, 3 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L NaCl, 1 g/L NH₄Cl, 0.5 M MgSO₄, 50mM CaCl₂, 0.2% glucose, 0.2% thiamine, 30 g/L agar) 固體培養基，於 37°C 以培養 24 小時，挑取單一菌落接種於 25 mL LB 液體培養基，於 37°C 水浴以 240 rpm 震盪培養 16-18 小時，取出 1 mL 菌液接種於 100 mL LB 液體培養基，於 37°C 水浴以 240 rpm 震盪培養至 O.D.₆₀₀ 介於 0.45-0.05 之間，置於冰水浴急速冷卻 30 分鐘，於 4°C 以 5,000 rpm (Beckman J2-MC, JA-18 rotor) 離心 10 分鐘，去上清液，加入與原菌液等體積之 Trituration buffer [100 mM CaCl₂, 70 mM MgCl₂, 40 mM NaOAc (pH 5.5)] 懸浮菌體後，於冰上靜置 15 分鐘，再於 4°C 以 4,500 rpm (Beckman J2-MC, JA-18 rotor) 離心 10 分鐘，去上清液，加入與原菌液 1/10 體積之 Trituration buffer 懸浮菌體，分裝 184 μL 菌液至微量離心管後加入 16 μL dimethyl sulfoxide (DMSO)，以液態氮急速冷凍後保存於 -80°C 貯藏備用。

5. 轉型反應

轉型反應之方法，係修改自 Hanahan (1983) 所提出之方法。將連接反應之產物與 200 μL 大腸桿菌勝任細胞混合，於冰上靜置 30 分鐘，於 42°C 水浴進行熱休克 (heat shock) 1 分鐘，置於冰上 1 分鐘後，加入 1 mL LB 液體培養基，於 37°C 水浴以 100 rpm 震盪培養 1 小時，取菌液塗抹於含有抗生素 (50 μg/mL kanamycin or ampicillin) 之固態培養基上，於 37°C 培養

12-16 小時。

6. 聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應之方法，係修改自 Jayaraman 等 (1991) 所提出之方法。取 50 ng 質體 DNA 當作模板，加入 0.25 μ M 引子、緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) gelatin]、dNTP (800 mM)、3 units DNA 聚合酶 (polymerase)，反應總體積為 50 μ L，反應條件為，98°C 2 分鐘一個循環，98°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 90 秒共 40 個循環，72°C 10 分鐘一個循環 (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer)，聚合酶連鎖反應之產物於 4°C 貯藏備用。

使用之引子：

DnaJF (5'-TAACCATGGGACCGGCGT-3')

M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3')

5GFP (5'-ATGGGTAAAGGAGAAGAAGT-3')

35S polyA ter (5'-CTACTCACACATTATTCTGG-3')

7. DNA 5' 末端突出補平反應

參照 Promega 產品說明，1-4 μ g 經酶切後之 DNA，加入 0.5 mM dNTP/ μ g DNA 與 1 Unit Klenow enzyme/ μ g DNA，於 30°C 反應 30 分鐘，加入 0.8 μ L 0.5 M EDTA 終止反應。

8. DNA 3' 末端突出切平反應

參照 Promega 產品說明，每 1-4 μ g 經酶切後之 DNA，加入 0.5 mM dNTP/ μ g DNA 與 1 Unit Klenow enzyme/ μ g DNA，於 30°C 反應 15 分鐘，加入 1 μ L 0.5 M EDTA 終止反應。

9. DNA 定序

使用核酸自動定序儀 ABI sequencer 377，進行 DNA 定序，以獲得基因默化與蛋白質定位轉殖質體之構築。

(三) 質體 DNA 之大量製備

質體 DNA 之大量製備之方法，係修改自 Sambrook 等 (1989) 所提出之方法。將大腸桿菌菌種接種於 LB 固體培養基，於 37°C 以培養 12-16 小時，挑取單一菌落接種於 10 mL 含有抗生素 (50 µg/mL kanamycin or ampicillin) 之 LB 液體培養基，於 37°C 以 120 rpm 旋轉培養 12-16 小時，將 10mL 菌液接種於 1 L 含有抗生素 (50 µg/mL kanamycin or ampicillin) 之 LB 液體培養基，於 37°C 水浴以 240 rpm 震盪培養 24-36 小時。菌液於 4°C 以 6,000 rpm (Beckman J2-MC, JA-10 rotor) 離心 15 分鐘，去上清液，加入 18 mL solution I [50 mM glucose, 10 mM Na₂EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)] 懸浮菌體，加入 2 mL lysozyme [10 mg/mL in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)] 與 40 mL solution II (0.2 N NaOH, 1% sodium dodecyl sulfate) 混合均勻，於室溫靜置 5 分鐘，再加入 20 mL 預冷之 solution III (3M KOAc, 115 mL/L acetic acid) 混合均勻，於冰上靜置 10 分鐘後，於 4°C 以 7,000 rpm (Beckman J2-MC, JA-10 rotor) 離心 15 分鐘，將上清液以尼龍網 (nylon mesh) 過濾，加入 0.6 倍體積之飽和異丙醇 (NaCl-saturated isopropanol) 混合均勻，於冰上靜置 5 分鐘後，於 4°C 以 6,000 rpm (Beckman J2-MC, JA-10 rotor) 離心 15 分鐘，去上清液，先後加入 2 mL 70%酒精與 100%酒精，於 4°C 以 5,000 rpm (Beckman J2-MC, JA-10 rotor) 離心 5 分鐘，去上清液，風乾後以 10 mL TE 8.0 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM Na₂EDTA] 回溶 DNA，加入氯化銫 (Cesium chloride, CsCl) 調整密度至 1.57-1.59 g/mL，再加入溴化乙錠 (Ethidium bromide, EtBr) 使總濃度為 38.6 µg/mL，將溶液加入超高速離心

管，於 20°C 以 50,000 rpm (Beckman L8-M, NVT65 rotor) 離心 16 小時後，以針頭將 DNA 抽出，加入等體積之飽和異丙醇混合均勻，於室溫下以 4,000 rpm (Beckman Allegra X-12R Centrifuge, SX4750) 離心 3 分鐘，去除上層 EtBr。將溶液裝入透析模內，於 4 L TE (pH 8.0) 中透析 16 小時，去除 CsCl 後，加入 1/10 體積之 3 M NaOAc (pH 5.2) 與 2.5 倍體積之 100%酒精混合均勻，於 4°C 以 7,000 rpm (Beckman J2-MC, JA-13.1 rotor) 離心 10 分鐘，去上清液，先後加入 2 mL 70%酒精與 100%酒精，於 4°C 以 5,000 rpm (Beckman J2-MC, JA-13.1 rotor) 離心 5 分鐘，去上清液，風乾後以 TE 7.5 回溶 DNA，定量後於 -20°C 貯藏備用。

(四) 阿拉伯芥原生質體轉殖

1. 原生質體之抽取

新鮮配製 10 mL 酵素溶液 (1% cellulose R10, 0.25% macerozyme R10, 0.4 M mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES)，於 55°C 水浴加熱 10 分鐘後，使溶液冷卻至室溫，加入 10 mM CaCl₂ 與 0.1% BSA。以無痕膠帶將阿拉伯芥葉片下表皮去除，置於酵素溶液，以 50 rpm 搖晃 1.5-2 小時，將原生質體吸到小試管，於室溫以 100 g 離心 3 分鐘，去除上清液，加入 2 mL W5 solution (3 M NaCl, 1M CaCl₂, 0.2M KCl, 0.1 M MES, 0.1 M glucose)，輕輕混勻，於室溫以 100 g 離心 1 分鐘，重複三次，去除上清液，加 2 mL W5，輕輕混勻，於冰上靜置 30 分鐘。加入 1% BSA 於 well 中進行 coating，30 分鐘後將其倒出。取原生質體懸浮液以血球計數器估算數量，進行轉殖前，加入 MMg solution [0.8 M mannitol, 1M MgCl₂, 0.1 M MES (pH5.7)]，使原生質體總數為 $2-5 \times 10^5$ /mL。

2. 原生質體之轉殖

阿拉伯芥原生質體 PEG 轉殖之方法，係修改自 Yoo (2007) 所提出之方

法。取 200 μL 原生質體加入 20 μg DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)，再加入 220 μL PEG [PEG 4000 (Fruka), 0.8 M mannitol, 1 M CaCl_2] 混合均勻，於室溫靜置 5 分鐘，加入 2 mL W5 solution 終止反應，於室溫以 100 g 離心 1 分鐘，吸去上清液，重複二次，加入 1 mL W5 solution 懸浮原生質體，於 25°C 光照培養 18-24 小時，加入細胞核染劑 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色 30 分鐘，加入 1 mL W5 solution，於室溫以 100 g 離心 1 分鐘，吸去上清液，重複二次，以共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5 Confocal) 觀察。

(五) 基因槍法暫時性表現

1. 微粒子製備與 DNA 包裹

微粒子製備方法，係修改自 Klein 等 (1987) 所提出之方法。秤取 60 mg 直徑 1 μm 之金粒子，加入 1 mL 70%酒精震盪 5 分鐘，靜置 15 分鐘，於室溫下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 5 分鐘，去上清液，加入 1 mL 無菌水震盪 1 分鐘，靜置 1 分鐘，於室溫下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 1 分鐘，重複三次，去上清液，加入 1 mL 50%甘油 (glycerol) 於 -20°C 貯藏備用。取出 50 μL ，依序加入 5 μg DNA、50 μL 2.5M CaCl_2 、20 μL 0.1 M spermidine，震盪 5 分鐘，靜置 1 分鐘，於室溫下以 13,200 rpm 離心 1 分鐘，去上清液，先後加入 140 μL 70%酒精與 100%酒精，於室溫下以 13,200 rpm 離心 1 分鐘，去上清液，最後加入 48 μL 100%酒精，貯藏備用，每次槍擊使用 6 μL 。

2. 洋蔥表皮細胞之基因轉殖

以洋蔥鱗莖第 2-4 層表皮組織為材料，使用 Bio-Rad 之氣壓式粒子槍 (PDS-1000/He partical gun)，槍擊條件為 gap 飛行距離 3/8 inch，microcarrier 飛行距離 8 mm，25 inches-Hg，1100 psi 壓力片，材料距離 stop screen 6 cm，

槍擊後於黑暗培養 18-24 小時，加入細胞核染劑 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色 30 分鐘，以共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5 Confocal) 觀察。

(六) 農桿菌轉型

1. 農桿菌勝任細胞之製備

農桿菌勝任細胞之製備方法，係修改自 Hofgen 與 Willmiter (1988) 所提出之方法。將農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 與 EHA105 分別接種於 20 mL 含有 100 µg/mL Rifamycin 及 20 µg/mL Streptomycin 與 100 µg/mL Rifamycin 之 YEB 液體培養基 (5 g/L beef extract, 1 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 5 g/L mannitol, 0.5 g/L MgSO₄, adjusted with 1N NaOH to pH 7.5) 中，於 28°C 下以 240 rpm 震盪培養 24 小時。分別取出震盪培養 24 小時後之 5 mL 菌液加入 200 mL 含有 100 µg/mL Rifamycin 及 20 µg/mL Streptomycin 與 100 µg/mL Rifamycin 之 YEB 液體培養基中，於 28°C 下以 240 rpm 震盪培養至 OD₆₀₀ 為 0.5，將菌液倒入離心管，於 4°C 下以 4,200 rpm (Beckman J2-MC, JA-10 rotor) 離心 20 分鐘，倒去上清液，以 200 mL 預冷之無菌水回溶，於 4°C 下以 4,200 rpm (Beckman J2-MC, JA-10 rotor) 離心 20 分鐘，重複一次後以 100 mL 預冷之無菌水回溶，再重複一次後以 50 mL 預冷之無菌水回溶，最後菌體以 2 mL 之預冷的 10% 甘油回溶，並以 50 µL 為一轉型單位分裝至 1.5 mL 之微量離心管，以液態氮急速冷凍後保存於 -80°C 貯藏備用。

2. 電穿孔轉型反應

農桿菌電穿孔轉型方法，係修改自 Shen 與 Forde (1989) 及所提出之方法。將農桿菌勝任細胞由 -80°C 凍箱取出置於冰上解凍後，加入 100 ng 之質

體 DNA 於冰浴中混合均勻，全部移入 electroporation cuvette (sample volume 20-70 μL) 中，以 Eelectroporation Amplitude-1.44KV, Pulse Width-99 μsec , Number of pulses-10 進行電穿孔，電穿孔後立刻加入 500 μL 於 28 $^{\circ}\text{C}$ 預熱之 YEB 液體培養基進入 electroporation cuvette 中，吸放數次後全部移入玻璃小試管中，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 1 小時，取出菌液均勻塗抹於含有適當抗生素之 YEB 培養基，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 48 小時。

3. 農桿菌質體 DNA 之小量製備

農桿菌質體 DNA 之小量製備方法，係修改自 Sambrook (1989) 所提出之方法。接種單一菌落於 50 mL 含有適當抗生素之 YEB 液體培養基中，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 下以 240 rpm 震盪培養 48 小時，置於冰上 15 分鐘快速降溫後，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 3,700 rpm (Beckman J2-MC, JS13.1 rotor) 離心 20 分鐘，倒去上清液並加入 1 mL 冰冷之 TE (pH 8.0) 懸浮菌體，將菌液移至 1.5 mL 之微量離心管，於室溫下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 1 分鐘，倒去上清液後，加入 200 μL 之 Lysozyme [25 mg/mL in solution I (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM Na_2EDTA , 50 mM glucose)]，震盪 (vortex) 5 分鐘混合均勻，於冰上加入 400 μL 之 solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) 混合均勻後於冰上靜置 9-13 分鐘，再加入 300 μL 之 solution III (3 M KOAc) 混合均勻後於冰上靜置 13-16 分鐘，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 10 分鐘，吸取上清液至新的 1.5 mL 之微量離心管，加入 500 μL 冰冷的 isopropanol 混合均勻，於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置 5 分鐘，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 10 分鐘，倒去上清液，加入 135 μL 之 TE (pH 8.0) 回溶 DNA，加入 100 μL 之 PCI 進行萃取，震盪 1 分鐘混合均勻，於室溫下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 1 分鐘，吸取上層液至新的微量離心管，再加入 100 μL 之 CI (Chloroform/isoamyl

alcohol, 24:1) 進行萃取，震盪 1 分鐘混合均勻，於室溫下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 1 分鐘，吸取上層液至新的微量離心管，加入等體積之 4 M ammonia acetate 與 500 μ L 之 100%酒精混合均勻，於-80°C 下靜置 5 分鐘沉澱 DNA，於 4°C 下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 10 分鐘，倒去上清液，加入 200 μ L 之 70%酒精，於室溫下以 13,200 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 5 分鐘，倒去上清液，再加入 200 μ L 之 100%酒精，於室溫下以 13,200rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) 離心 5 分鐘，倒去上清液後將微量離心管倒置風乾，風乾後以 10-20 μ L 無菌水回溶，於 4°C 下貯藏備用。

(七) 阿拉伯芥基因轉殖及轉殖株篩選

1. 阿拉伯芥花序浸潤轉殖法

將阿拉伯芥種子播種於滅菌介質 (泥炭土：珍珠石：蛭石 = 8：1：1) 中，於 23°C、16 小時光照與溼度 75%之生長箱培養，當植株長出第二對子葉，開始每星期施用一次 1 mg/L 之花寶 2 號，並剪除提早抽出之花梗，3-4 週後開始摘心，摘心 2-3 次後花序長約 7-15 公分即可進行轉殖。阿拉伯芥之基因轉殖方法，係修改自 Bechtold (1993) 所提出之方法。將農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) 接種於含有 100 μ g/mL Rifamycin 及 50 μ g/mL Kanamycin 之 YEB 培養基，於 28°C 下培養 24 小時，挑取單一菌落接種於含有 100 μ g/mL Rifamycin 及 50 μ g/mL Kanamycin 之 YEB 液體培養基中，於 28°C 下以 240rpm 震盪培養 48 小時，再取出 5 mL 菌液加入 500 mL 含有，100 μ g/mL Rifamycin 及 50 μ g/mL Kanamycin 之 YEB 液體培養基中，於 28°C 下以 240 rpm 震盪培養至 OD₆₀₀ 為 0.8，將菌液於 4°C 下以 6,000 rpm (Beckman J2-MC, JA-10 rotor) 離心 10 分鐘，倒去上清液，加入 250 mL 之 infiltration 液體培養基 [1/2 MS basal medium (Murashige and Skoog,

1962), 5% sucrose, 2 mg/mL BA, 0.01% Silwet L-77, pH 5.7] 懸浮菌體，轉殖前先剪除已開的小花與果莢，將植株倒置使所有小花苞都浸泡於菌液中進行轉殖，將植株殘留的菌液滴乾，用塑膠袋套住植株保持溼度，於 23°C 低光照環境下處理 24 小時，即可拆除塑膠袋並置於生長箱內培養，待第一個果莢開始褐化即可套袋，約 3 週後即可收種子。

2. 轉植株之篩選

植株完全乾燥後即可收取轉殖阿拉伯芥種子，秤取適量種子置於 1.5 mL 之微量離心管中，以清水浸泡 30 分鐘，再以無菌水清洗種子 3 次，加入 1% 漂白水 (含 0.05% Tween-20)，震盪 20 分鐘後去除上清液，再以無菌水清洗種子 3 次，加入種子量 2 倍體積之無菌水懸浮後，將種子均勻灑佈於發芽培養基 (1/2 MS basal medium, 1% sucrose, 50 µg/mL Kanamycin, 50 mg/L Cefotaxime, 0.7% agar, pH 5.7)，1 週後即可區別未轉植株與有抗性之 T1 擬轉植株。

(八) 菸草基因轉殖及轉植株篩選

1. 菸草葉圓片轉殖法

菸草葉圓片轉殖方法，係修改自 Horsch 等 (1985) 所提出之方法。將農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404) 接種於含有 100 µg/mL Rifamycin、20 µg/mL Streptomycin 及 50 µg/mL Kanamycin 之 YEB 培養基，於 28°C 下培養 24 小時，挑取單一菌落接種於含有 100 µg/mL Rifamycin、20 µg/mL Streptomycin 及 50 µg/mL Kanamycin 之 YEB 液體培養基中，於 28°C 下以 240 rpm 震盪培養 48 小時，菌液調整 OD₆₀₀ 為 0.8，取 20 mL 菌液倒入玻璃培養皿，將菸草無菌苗葉片切成 1.5 x 1.5 cm² 的葉圓片，浸入農桿菌菌液中 3-5 分鐘進行轉殖，取出葉圓片於無菌吸水紙上瀝乾後，放置

於 N01B1 培養基 [MS (Murashige and Skoog, 1962), 0.1 mg/L 1-naphthyl acetic acid (NAA), 1 mg/L BA, 3% sucrose, pH 5.7, 0.7% agar] 上，於 25°C 以 16 小時光照環境下共培養 2 天。

2. 轉植株之篩選與再生

將共培養 2 天之菸草轉殖葉圓片取出，浸於含有 250 mg/L Cefotaxime 之 N01B1 液體培養基中 1 分鐘，取出葉圓片於無菌吸水紙上瀝乾後，放置於含有 250 mg/L Cefotaxime 與 100 µg/mL Kanamycin 之 N01B1 培養基上，於 25°C 以 16 小時光照環境篩選 3 週，將抽出芽體之葉圓片移至含有 250 mg/L Cefotaxime 與 200 µg/mL Kanamycin 之 N01B1 培養基上，於 25°C 以 16 小時光照環境下次篩選，切下約 1 公分長無白化之芽體，扦插於含有 250 mg/L Cefotaxime 與 200 µg/mL Kanamycin 之 MS 培養基上，於 25°C 以 16 小時光照環境下培養，使其發根。

(九) 擬轉植株之分析

1. 基因組 DNA 之抽取

基因組 DNA 之抽取方法，係修改自 Dellaporta 等 (1983) 所提出之方法。秤取 0.5-1.0 g 植物材料，以液態氮研磨至粉末狀，加入 15 mL extraction buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 500 mM NaCl、10 mM β-mercaptoethanol] 混合均勻，於冰上加入 1 mL 20% SDS，震盪後於 65°C 水浴反應 10 分鐘，加入 5 mL 5 M KAc 混合均勻，於冰上靜置 20 分鐘，於 4°C 以 10,800 rpm (Beckman J2-MC, JA-13.1) 離心 20 分鐘，將上清液以尼龍網過濾至新的離心管中，加入 10 mL -20°C 異丙醇，混合均勻，於 -20°C 靜置 30 分鐘，於 4°C 以 10,800 rpm (Beckman J2-MC, JA-13.1) 離心 15 分鐘，去上清液，風乾後加入 700 µL High-TE [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM Na₂EDTA] 回溶 DNA，將溶液移至微量離心管，於 4°C 以 13,200 rpm

(Eppendorf Centrifuge 5415D) 離心 10 分鐘，將上清液移至新的微量離心管，加入 75 μ L 3 M NaOAc (pH 5.2) 與 500 μ L -20 $^{\circ}$ C 異丙醇，混合均勻，於 4 $^{\circ}$ C 以 13,200 rpm 離心 10 分鐘，去上清液，先後加入 70%酒精與 100%酒精，於 4 $^{\circ}$ C 以 13,200 rpm 離心 5 分鐘，去上清液，風乾後加入 100 μ L 含有 10 mg/mL RNase A 之 TE (pH 8.0) 回溶 DNA，於-20 $^{\circ}$ C 貯藏備用。

2. 樣品製備

取 20 μ g 基因組 DNA 進行限制酶，於 75 $^{\circ}$ C 處理 10 分鐘終止反應，加入 1/10 倍體積之 4M NaCl 與 2.5 倍體積之 100% 酒精，於-80 $^{\circ}$ C 沉澱 30 分鐘，於 4 $^{\circ}$ C 以 13,200 rpm 離心 10 分鐘，去上清液，先後加入 70%酒精與 100%酒精，於 4 $^{\circ}$ C 以 13,200 rpm 離心 5 分鐘，去上清液，風乾後加入 25 μ L TE (pH 8.0) 回溶 DNA，再加入 10 X DNA loading dye，以 0.7%瓊指膠體進行電泳分離。膠體依序以 200 mL 0.25 N HCl、變性緩衝液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)、中和緩衝液 [1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M EDTA (pH 8.0)] 各浸泡處理 15 分鐘二次，以 200 mL 10 x SSC 緩衝液 (1.5 M NaCl、0.15 M trisodium citrate) 進行轉漬 16-18 小時，將 DNA 轉漬至 Hybond-N 膜上，以 120 mJ/cm² UV (Spectrolinker XL-1500) 進行 cross-linking 後，於 80 $^{\circ}$ C 真空烘箱乾燥 1 小時，於防潮箱貯藏備用。

3. 探針製備

探針之製備方法，參照 Feinberg 與 Vogelstein (1983) 所提出之 random primer labeling 方法。取 25-62.5 ng 變性之 DNA 當作模板，加入 10 X labeling buffer {50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.2 M N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-2-[ethanesul-fonic acid] (HEPES), 26 A₂₆₀ units/mL random hexadeoxyribonucleotides}、25 μ M dATP、25 μ M dTTP、25 μ M dGTP、400 μ g/ μ L bovine serum albumin (BSA)、50 μ Ci [α -³²P] dCTP (333

nM) 與 5 units Klenow polymerase，反應總體積為 50 μ L，於 37°C 反應 2 小時，加入 2 μ L 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) 終止反應，再加入 8 μ L 追蹤染劑 (50% glycerol, 0.25% bromophenol blue) 混合均勻後，將反應液加入 Sephadex-G50 層析管柱，以微量離心管接取通過之溶液，並使用液態閃爍計數器 (Beckman LS1801) 測量放射性同位素讀值，選取最高值做為探針。

4. 南方氏雜交分析

南方氏雜交方法，係修改自 Southern (1975) 所提出之方法。將 Hybond-N 轉漬膜放入預雜交溶液 [6 X SSPE (1 X SSPE: 0.15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM Na₂EDTA, pH 7.4), 5 X BFP (1 X BFP: 0.02% BSA, 0.02% Ficoll-400000, 0.02% PVP-360000), 1% SDS, 10% dextran sulfate, 50 μ g/mL salmon sperm DNA]，於 65°C 水浴以 20 rpm 震盪反應至少 2 小時，將預雜交溶液倒出，加入雜交溶液 [6 X SSPE, 5 X BFP, 0.5% SDS, 250 μ g/mL salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate, 3 x 10⁶ cpm/mL 之變性核酸探針]，於 65°C 水浴以 20 rpm 震盪反應 16-18 小時，將雜交溶液倒出，於室溫以 Wash buffer I 溶液 (2 X SSPE, 0.1% SDS) 20 rpm 震盪處理 15 分鐘，重複兩次，在於 65°C 水浴以 Wash buffer II 溶液 (1 X SSPE, 0.1% SDS) 20 rpm 震盪處理 15 分鐘，重複兩次，即可於 -80°C 進行 X 光片壓片 (Kodak XAR film)。

5. GUS 活性組織化學染色法

GUS 活性組織化學染色之方法，係修改自 Jefferson (1987) 所提出之方法。植物材料浸泡於含有 Triton X-100 之緩衝液 [50 mM NaPO₄ (pH 6.8), 1% Triton X-100]，37°C 下處理 2 小時，以緩衝液 (50 mM NaPO₄, pH 6.8) 沖洗三次，加入含 X-gluc 之緩衝液 [50 mM NaPO₄ (pH 6.8), 1 mM X-gluc]，以 25 inch-Hg 真空抽氣 5 分鐘二次，回壓後置於 37°C 下反應 24 小時，最後以

70%酒精終止酵素反應及褪去葉綠素，並於室溫下浸泡保存。

(十) 轉殖株之啟動子活性與誘導分析

1. 無菌播種

於無菌操作台，將阿拉伯芥或菸草種子放入微量離心管，加入 70%酒精震盪清洗 1 分鐘，再以 1%漂白水 (含 0.05% Tween-20) 震盪清洗 15 分鐘，以無菌水沖洗漂白水 3 次，每次 5 分鐘，加入等體積之無菌水懸浮種子，播種於含有抗生素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin) 之 1/2 MS (含 1% sucrose) 固體培養基，培養於 25°C、16 小時光照及 8 小時黑暗環境。

2. 不同發育階段之啟動子活性分析

取無菌播種後 5、10、15、20、25、30 天大與開花之菸草轉殖株，進行 GUS 活性組織化學染色。

3. 不同非生物性逆境誘導處理

取無菌播種後 21 天大菸草 T1 轉殖株，以下所列出之逆境進行處理，除了高溫、低溫與低溫黑暗處理，其他處理皆於 25°C、光照 16 小時、黑暗 8 小時之培養室進行，處理後以 GUS 活性組織化學染色，觀察啟動子表現情形。

(1) 高溫逆境處理

將菸草 T1 轉殖株含培養基，放入生長箱以 37、42、45°C 處理 24 小時。

(2) 乾旱逆境處理

將菸草 T1 轉殖株置於乾的濾紙上，處理 3 小時。

(3) 低溫處理

將菸草 T1 轉殖株含培養基，放入冰箱以 4°C 處理 24 小時。

(4) 黑暗處理

將菸草 T1 轉殖株含培養基，以鋁箔紙包覆避光處理 24 小時。

(5) 低溫與黑暗處理

將菸草 T1 轉殖株含培養基，以鋁箔紙包覆避光，放入冰箱以 4°C 處理 24 小時。

(6) 鹽分逆境處理

將菸草 T1 轉殖株置於以 300 mM NaCl 浸潤之濾紙上，處理 3 小時。

(7) 淹水逆境處理

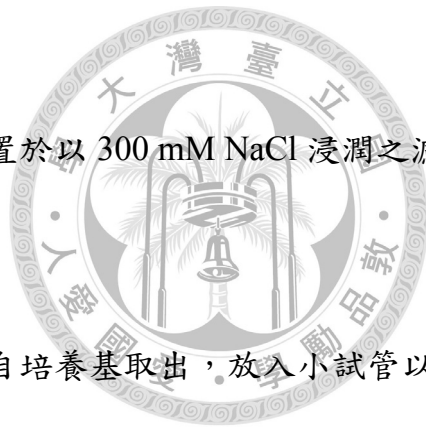
將菸草 T1 轉殖株自培養基取出，放入小試管以無菌水淹蓋處理 24 小時。

(8) 機械創傷處理

以解剖刀劃傷菸草 T1 轉殖株之葉片製造創傷，再置於以含 1% sucrose 之 1/2 MS 液態培養基浸潤之濾紙上，處理 0.5 或 1 小時。

4. 不同生長調節劑誘導處理

生長調節劑誘導處理試驗，係修改自 Tsuchisaka 與 Theologis (2004) 及 Wang (2005) 所提出之方法。取無菌播種後 21 天大菸草 T1 轉殖株，置於以含有以下不同濃度生長調節劑之 1/2 MS 液態培養基浸潤之濾紙上進行處



理 24 小時，處理皆於 25°C、光照 16 小時、黑暗 8 小時之培養室進行，處理後以 GUS 活性組織化學染色，觀察啟動子表現情形。

(1) Auxin : 20 μ M indole-3-acetic acid (IAA)

(2) Benzyladenine : 20 μ M BA

(3) Gibberellin : 20 μ M GA₃

(4) Abscisic acid : 100 μ M ABA

(5) Methyl jasmonate : 50 μ M MeJA

(6) Salicylic acid : 1 mM SA

(7) Ethylene : 50 μ M 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)



肆、結果

一、香蕉 *MhDnaJ* 基因結構分析

(一) 香蕉 *MhDnaJ* 基因序列分析

將 λ MACS38 基因序列與 pMACS38 cDNA 序列比對，顯示香蕉 *MhDnaJ* 基因含 5 個顯子及 4 個隱子 (圖五)，轉譯起始密碼子於第一個顯子，轉譯終止密碼子於第五個顯子，而顯子與隱子連接處之胺基酸序列，均符合 GT-AG rule (表一)。基因組選殖系 λ MACS38 與 pMACS38 分別轉譯出 273 與 217 個胺基酸，比較基因序列與相對應之 cDNA 序列，有一個核苷酸差異，使第 190 個胺基酸由組胺酸變為精胺酸 (H134R)。比較香蕉 *MhDnaJ* 與其他物種如阿拉伯芥 (*AtDnaJ*, NP_565163)、水稻 (*OsDnaJ*, NP_001060336)、楊樹 (*PtDnaJ*, XP_002302268)、蓖麻 (*RcDnaJ*, XP_002513851)、葡萄 (*VvDnaJ*, XP_002285821) 和玉米 (*ZmDnaJ*, NP_001140575) *DnaJ* 胺基酸序列的相似性，介於 65.9% - 71.6% 之間，而與葡萄相似性最高，為 71.6% (表二)。胺基酸序列分析顯示，香蕉、阿拉伯芥、水稻、楊樹、蓖麻、葡萄和玉米都具有 J-protein 特有的 J-domain，另外還有 Nuclear localization signal (NLS) 與 Nuclear export signal (NES) (圖六)。親緣樹狀圖分析結果顯示，香蕉 *MhDnaJ* 在演化上和水稻與玉米的同源性較高 (圖七)。

(二) 香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子序列分析

分析已取得之香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子序列，以 PlantCARE 資料庫比對，預測 TATA box 位於於轉譯起始點上游 287-291 bp，序列為 TAATAA，CAAT box 則位於轉譯起始點上游 518-522 bp，序列為 CAAAT。根據比對

ggatccagtaaggacaaaacccgagcgcgaccgcccggagcccggaggtattatctccggattt -3261
HSE
 aacggactccctacgagcccagctactctttctttggcagcggctcgatgaactagagaa -3201
 ggagtttcgcaactcgaaggagagctcggggtgacacatatcgaggatctccggtcac -3141
 accagagatacagagatcacgcggttccccgaatttccagctcacttctatggacgata -3081
MBS
 cgacggctccattgacctagcggaccatgtcgccgctttccgtgcccactata -3021
AuxRR-core
 tggaacgtctgatgctttaacgtgtaggcggttcccacgacctgaggggtccagcctaca -2961
 catggtacggcggcctgaagaccggaacgatcagttcttcggccagctcgccaaggactt -2901
 cgagctccacttagtgcccatgcccggccaaagccctccgcggaactgctcctcggactc -2841
 aaacaaagagaggacgagcccctctcacatttctgtagatcgctttgccacgcaaactga -2781
 tgcttaccggacactcaccctctctgttagtgagcagcatttatgataggcttgccacct -2721
 tccacattcctctgggtccctcgcgagcgcacctcccacggtagtgccaaaaatgctccag -2661
MBS **HSE**
 cgggctaaactgatacatcatagcggaggcctgggcgcgccgagggagaaaggacgacct -2601
 ccgaccgtgggctccatgagagaggccaagcatccgcggtggctaccgatgtactcatg -2541
HSE
 aaaagaaatctaagccctgccttagtctcttctgagcgaaggttcagtatctgcctgacc -2481
 cccttttcggctcgcggttgccccagcttaaacccttctgaatctaaatgccttgcca -2421
 tggactgccgggtccacctcagcagggcctgcccggcctaagtgtgtccctcggcctg -2361
G-box
 agccacgtccctcggccatggactgcccgggtccacctcagcgcggcctgcccgatgag -2301
G-box
 ttgtgtccctcggcccagaccacgtccctcggccatgcaactgcccagtcacacctcagcg -2241
 cggcctaccgcctgagccatgtccctcggctcgcactctgcccgaagtcacacctcagcgcg -2181
 gactatccgcctgagccaaggggtccccgagtcacaccttacttggcttgetgaccgagt -2121
 tgcgctcctcgactacatggttgcccgggcccattgctcgcggcctagcccgcctgcgcgcg -2061
 tgctcctcggctgctggttgcccaagactacacctacggcgcctgcccgcctgcgtcgtg -2001
 ttcttagctccatggcctccgagacacacctgcccggcctgcccacctgctcgtcgtc -1941
 ctgcgccccatgaccgcgagacacaccttggcggccacccgctgtgtcgtgctcctcgg -1881
 ctacatggtgcccagaccacgcctgcccggcctgcccgtctgcgcgtgttccctcggtc -1821
 gcacgtgtgcccagggcccaaccttactcggcttcccacttagttgggctcctcagacc -1761
 ccatttcccagaccacacctgagcggccagcagcctacatcgtgctcctcggctccatg -1701
 ttgcccagagaccacacttgcgcggccagtcggcctgctgctgctcctcggttacacatt -1641
CGTCA-motif
 gcccagagaccacgcctgngcggcctgctgctgctgctcagtcactcctcgccttcggctcca -1581
 tgttcccttcggctccatggtccccgagacctcgtccgtgcccagcccgtctgaagada -1521
HSE
 gaapccatgcatcagactcctcttatacaacaaccgacgcatagctcctttcagggggg -1461
GATA-motif **CGTCA-motif**
 aatatgataagggtataaaaatggcagatgtgacacgcatgacgtcagccatgtctggacia -1401
 cacactgcccaggaagtcggcattaacacctaactcaggcttggttcttcacgccacgc -1341
 taaccccatgtcagacgctatcagcctgctcctgcaagcagccacatcaggtaacatca -1281
 aactcatctataaataccccagagttctaaacgaacaggggaggaagacaagcacaacgc -1221
 actcagaggcatcttttctccaaaaccctctccacattgctaacttgatcgtcggaggg -1161
 gtcgggcccagctcgggaacggattgggtgcaggtgtgagaggtgtgcctcttcccggac -1101
 gatgcggcagcttccctcctgaccgacctcccgaaccaccgctgctcggccg -1041
 ggagccccgagggagctcggccgagatccccgacatccggacccccgaaccgagcagca -981
 tcggccccgagggcctcggcttaaagggtttactaactaacaggatcgaaggcctgtaggag -921
 ggtccggcaggtggcgtcccaatcgacggcatggacgaagaccacgctctgtatatagcg -861
CGTCA-motif
 acgagcgcagcgtcaaacagcgtcgagttataagtagatctcaggacgcgggtggatcata -801
 tcaggggtggagatgactgaggaagagccgtcgtcgcggggccgctgctccgcccgca -741
CGTCA-motif
 agagggctaggtcgtcattggtcctgaatggcgtcgttaccagggggccgctgccgttget -681
 gctgctggttggcttgggctcgggctcagggccagctctgtgggaagcgaactactcga -621
HSE
 ctttctatacgcagaaatgatattcgattcctgagttgactcggacgagtttggtatgggag -561

(Continued)

CATA-box

gttggatttatctgaaccgtccggtttttcctcgggtaca **caaat** accctattccagcatac -501

ABRE

ccattcggttactgtctcggtgattgaaa **cacgtg** atggcccatcttaatcagtagaca -441

CGTCA-motif **G-box**

agtcggc **cgta** agtaacgcacaaaacgtcgactaaaagatgaag **cacgtc** ccgcttctgc -381

agctacggccaactcggacaccaactcatgaagtgttcttcataatcgtgtctttcgtacg -321

CGTCA-motif **TATA-box**

cagtcccca **cgta** gatcgaaatggttca **taataa** tactcgactctcagcacttttgag -261

gcggaacgagcaacaaagcacagcaccatacagcatttacatcgatcgaggaagcgccac -201

gtacgacgtacagacaccaaagtattcggctcctcctcgttctcctcgggagacattcctcggg -141

ggagacatttccggtcacgaatctcccaacctccgagccccgaaaaaactcctctcccg -81

ccatctatttcttcccccaaatcgaaccgtaacccttaattccaatttccccttctcct -21

ttcctcctactgctctcaggATGAGCAGTCTGAGAGTGATTTGCCGCCCGCACGTGGTGC +40

M S S L R V I C R P H V V

TCTCCTCTATCTACTGCTGCAGAGGCTACGGTCGCCTAAGGTTGCGGCCCTCCGCCCGGA +100

V S S I Y C C R G Y G R L R F A P S A R

ATCCTAATCTCCAATCTCGCACCCGTCGTATGCATCGTCTCCTTTTGTCTCGATGACT +160

N P N L P I S H P S Y A S S P F V L D D

CCCCGAGGATGGGACCGGCTCGCGCTAATTCGAGGAGGACGCTCACTAGGGTCTCCA +220

S P R M G P A S R A N S R R T L T R V S

ATTGGAAGTCCGAGAAGTTCGCCTTATGATACCTTGgtaatttctcaaatcagatcatact +280

N W N S E K S P Y D T L

ttggctcctgccccttggaaactcacttagatatagtatccaagatctgatttttctatactt +340

caagatccatttatttccagatgaatgagaaaaacagatagtaagtgaatattttcctt +400

caatcttcaagtttaaggcgatcaggttctctatcatgctttgtttatgtttatagca +460

ttttttgtgtgttcttgatcgttcacgatattaaacatgcagAACTGGAAAGGGATGCTG +520

E L E R D A

ATGATGAGAAGATTAAAGCTGCTTATAGAAGATTGGCCAAGTTTTACCACCCAGATGgtt +580

D D E K I K A A Y R R L A K F Y H P D

tctctttcaccttcaatatttatagttgaagtttttctactgattgtttttgatgcagtt +640

gttatgctgtcaaatgcttgtaaatttggtacttttcttatcacaagaccaagtatt +700

tccttttattgaatattaaagtttttactgaaactggaatgaattgatttccccttatac +760

agatgagctactttttcgtttttcatatagagcattttctcttaccttcttctgtctta +820

acttgatattttccagtaagttcatacttctagttcattttttgtgtttgtaatatagcc +880

caactgatataatgacataatttactaataatttacagtaaaatgattgctcagtgattgc +940

catgtgagtgaactagaatctttatctgaaagtaagctacctattcaactaaataaata +1000

aatacttagatactgtttcttaacataagatattttgatttgctaattgtccttctagggt +1060

caggcattttaaatgctctatcatgcatatagattttgtctgttctgattttgacctatc +1120

tgttctgattgctttattttgtccttggtatagctagtgctatagatttcttttattaat +1180

ttttgtgatactttatttctcaagtaaaaagactaactttctgtgtgtctcattaaaagg +1240

tatcttaatcttgtgttctcattgtggcatgcttgcatatgatctttgttagatgtatta +1300

ttttgttttagtgaataatgtataactttttggtttttgaattttcttgacacagatctcag +1360

tatcatataaataaactctttattgtctctttcattgtgtattgaactctagaatcattg +1420

ttcgagtttctcgacttgtctcaatctattctttttcagtatgaaacatgaggtattag +1480

ttttttctgttctttttctttctattttgcacttctaataaggttatattataaacaatcat +1540

tagcaattgctctaagtaccagctgatactttttgttcttcttcttaagTTTATGATG +1600

V Y D

GTAGAGGAAGTCTTGAGGAAGGAGAAACAGCTGAATCCCATTATCAAAATTCAGCTG +1660

G R G T L E E G E T A E S R F I K I Q A

CTTATGAGCTTCTAATAGATGATGAGCAGAGGCGACAATACGACAGAGATCACCATGTCA +1720

A Y E L L I D D E Q R R Q Y D R D H H V

ATCCTATGAAGgtacataattataattttgtatattcgtttacattcttaattctattatt +1780

N P M K

atgccatttttattgactacttttttaattaaccattccatgtcttgaatgagagggtat +1840

gaggttgtttntgctacctcaatcttgccaaaatttctttgtgattattgtttttgtgac +1900

caagatgtgtcaaaactgactcttttttatctcattcctcttacaatagaaatgttataga +1960

gatacttttaggaatttacaataacccttggtatattaaaagacttgagaaaataaagttg +2020

tgtattttaaaaggaaaataactaagaagttcatagtataagttttgaaatcaaatctaaa +2080

taaatattaaaataatataattttgtaatttttttgtttataaaaattgacgaaggattat +2140

(Continued)

ttttgacaataaattcataatgtattgtttacaattaattaataaacttagtttttaaaat	+2200
caatgaatgcaaaaaaattaataatttagtttctgaaaccaattgatattttcttaatac	+2260
cttatcaattgtaggagaatttctaatacagatcctaaagttgatggaacatcaactgat	+2320
gctctaaagtttaataaaaatattactatttactgtatagatagcctatagtttagtgtttc	+2380
agatggaagtataatattatagacattgtatagtgtaataataaaagtttggtgcacagggtt	+2440
gtaggttcttagttatatacctgttaaagtgcacgaaagtgacccatgaatttgcctaaag	+2500
taaaccttaataagagagaaatattgtggtacctaagtttgtaacttgaggagcttttctat	+2560
gcccttgagcaactgaacagggtccaaaagatatgctaaaaataacaatagtggaagcttc	+2620
aagtttagtcagttttaaagcagttttatttggcttctgttttatgaaattcctacactgtat	+2680
atgatctcaaaactataatttatcaggggctaaatataaaaaatataaattaatttgaagat	+2740
ccaacaatggagcgatagggacacttatattaacaccttctcaacacaattagaaagaa	+2800
aaagaataaacattgacatacacaataaaaacagctcagttaggttatataaaagtaacc	+2860
tgtgcatacagaattagcattttagttagtaaccttataaaagagtttatagataatatt	+2920
aaaagttttactgattttaaacttgagaaagcaatccaaatagcctgtctacaaaagt	+2980
gcctccctagagaaagaccgatgatttaacccatataagactttttgtgtaataaaagagg	+3040
aaggccatataatgtcagcctcacagttggctctgctggccttcaactcttgtaacaaag	+3100
tagtttactattatgatggtaaccgagagagagatgcagagatacgacacaaccttcaag	+3160
gtgcataaaaggaaagcgaggaggcgagagtgctcttggccccatttctctacacctga	+3220
tatagatacaggttttaaggacatttctcattgccaacactttgattcaactcttttggtg	+3280
ttattggaaaatttcaccataaaatttaattgtatggacatctttataattaatgctatac	+3340
caaaaatgtgaaatatttgtcatatacaggtgcattactatcagcctcttttattttaga	+3400
agtaaatggttttctttgtataaattccaacattctttgtggttgacacatcagGCTTC	+3460
A S	
CCAGGCATGGATGGAAATGGGTGATGAAAAAGCAAAAAGCATTGATCAGCGTGGTGATAT	+3520
Q A W M E W V M K K Q K A F D Q R G D M	
GGCAATTGCTGCTTGGGCTGAACAGCAGCAACATGAGATGAATCTCCGAGCACGTCGTCT	+3580
A I A A W A E Q Q Q H E M O N L R A R R L	
TTCTCGTTCAAAAGgtttataagtacattatattatatacaagaatttgtcttgggactgc	+3640
S R S K	
ttgaatgccagcaaatagctaactggcacctcatttaattcattactgaatgtgcattctt	+3700
gtgagttgattgaccocaaagcttttttcataccatttaataaaagacaatttttttgac	+3760
ataaggactaatgagtagatccatttttttaaaaaatgagtggttttaattgtttagttgac	+3820
ttactttcaatcctgtgtttctggtgcttttactgatgaacgacactccatttttattactt	+3880
tgtcatagcttttacctacttctttagtgatgagcagctctgtcatattaactccaagtagt	+3940
ataaatcatgatttttgaagtggtgaaaaccatgattactgagtcatttgggtctcacgtcg	+4000
tcggttcattttgttgaaacactatttctatttttgaatttttggttgaaatgcaattt	+4060
agatgtttcctaactagatacttttctgttttcttctgatttttcttttttctttttgtcg	+4120
tcactctgagatgctcccttcatatggctgacactcctgtggtcagggtttactctttta	+4180
ctgctctcctttcagtgcttatttcggcagcattacttttcttctcttaggttactagca	+4240
cttggtaaatgtcaccatatttcagATTGATCCTGAAGAAGAGAGGAAGATTTTGGCAAA	+4300
I D P E E E R K I L A K	
GGAGAAGAAAAGCATCCATGGAGTACTTCACCAATACCCCTGAGAAGACATACACTTGTCT	+4360
E K K A S M E Y F T N T L R R H T L V L	
GAAGAAGAGAGATTTAATGCGGAAAAAGGCAGAGGAAGACAAGAAAAGGGTCATTAGTCA	+4420
K K R D L M R K K A E E D K K R V I S Q	
GCTTTTAGCGGCGAAGGTCTCGAGCTTGATACAGACGATGATGATGAAGCTGTATGATG	+4480
L L A A E G L E L D T D D D D E A V *	
AATTGTTTCATCATATATGGGAAAATTTGTTGTACATACAGAGATCTCTTTATTTCTGGTCAT	+4540
GGAAAGCAGGTAATGAAATCTGTCTAATATTTTTCTCTTAACTGTATCCTATGATATATA	+4600
TCATTGTTTATCGGTATAATCTGAAATCAGTACATCTAAATAGAATGATCGAAAATTAG	+4660
CATGACCCAAccagtggtttgtcaagtacaaattgttctgattggtctcaatctttcgta	+4720
tgggtgaagattcaattactgaatgtaatatgaccgcactagca	+4764

圖五、香蕉*MhDnaJ*基因之核苷酸及演繹胺基酸序列

Fig. 5. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the *MhDnaJ* gene from banana. The first nucleotide of putative translation start site is denoted by

+1. The numbers for the nucleotide are shown on the right. Starting at the translation start site nucleotides in the structural gene sequence are indicated by positive numbers, whereas those in the 5'-flanking region are by negative numbers. Lowercase letters indicate introns and part of the flanking regions. ABRE: abscisic acid responsive element. AuxRR-core: auxin responsive element. CGTCA-motif: MeJA-responsive element. GATA-motif: part of a light responsive element. G-box: light responsive element. HSE: heat stress responsive element. MBS: MYB binding site involved in drought-inducibility. *: stop codon.



表一、香蕉 *MhDnaJ* 基因之顯子與隱子連接部位核苷酸及胺基酸序列

Table 1. *MhDnaJ* splice-junction nucleotide sequences. The size of each exon and intron were determined from the exon-intron boundaries by comparing the nucleotide sequence of genomic DNA with the cDNA sequence and according to the GT/AG rule of splice junctions.

Exon No.	Exon size (bp)	3'Exon junction	5'Exon junction	Exon No.
1	370	CCCTTGgtaatt-- (intron 1, 246 bp) L	--atgcagAACTGG E L	2
2	75	CAGATGgtttct-- (intron 2, 1014 bp) P D	--ctaaagTTTATG V Y	3
3	140	ATGAAGgtacat-- (intron 3, 1724 bp) M K	--talcagGCTTCC A S	4
4	138	TCAAAGgtttat-- (intron 4, 672 bp) S K	--tttcagATTGAT I D	5
5	405			

*. Bases from exons are shown in capital letters and those from introns in small letters.

--. Indicates the remaining nucleotides in introns.

表二、香蕉、阿拉伯芥、水稻、楊樹、蓖麻、葡萄與玉米 DnaJ 胺基酸序列相似性

Table 2. Pairwise comparison (%) of the deduced amino acid sequences among DnaJ from *Musa* spp. Hsien Jin Chiao (MhDnaJ), *Arabidopsis thaliana* (AtDnaJ, accession number: NP_565163), *Oryza sativa* Japonica type (OsDnaJ, accession number: NP_001060336), *Populus trichocarpa* (PtDnaJ, accession number: XP_002302268), *Ricinus communis* (RcDnaJ, accession number: XP_002513851), *Vitis vinifera* (VvDnaJ, accession number: XP_002285821), and *Zea mays* (ZmDnaJ, accession number: NP_001140575). Amino acid sequence were aligned using the AlignX program of Vector NTI 10.0 software.

	MhDnaJ	AtDnaJ	OsDnaJ	PtDnaJ	RcDnaJ	VvDnaJ	ZmDnaJ
MhDnaJ	100						
AtDnaJ	68.8	100					
OsDnaJ	66.3	61.8	100				
PtDnaJ	66.9	67.5	58.0	100			
RcDnaJ	66.7	68.2	61.2	72.3	100		
VvDnaJ	72.0	70.3	62.5	71.4	70.8	100	
ZmDnaJ	68.7	62.9	84.2	59.7	62.9	63.5	100

MhDnaJ : -----MSSLRVICRPHV---VVSSIYCCRGYGRLLR-FAPSARNP-NLPISHPSYASSP : 48
 AtDnaJ : -----MSNLRAICRPYS---VFSSIVCCSRHQSRSLFRVSIKNVAFRNQSSN-----S : 45
 OsDnaJ : -----MSGLRAISTLLQ-----TCAAAAAGGSSR-RVALAPPLGRSFRVPWR-APS : 44
 PtDnaJ : MSSSSSSSLRTACRPHTVLTSTFTCSSSSSRHQPRSR-IRVSFRTPPDCNKRHS--SFFS : 55
 RcDnaJ : -----MSCRHHQPRSNQVVRVSRFNHPDDKPLSSPSLFS : 34
 VvDnaJ : -----MSNLRTICRPHIHIVFSSFCRQAAKS--RISFRNP-NSQSRVSLPCAFS : 50
 ZmDnaJ : -----MSSLRAISSLLH-----IYSTSAAARRGAGRLGFAPSPGGRFRVPSNSGPP : 46

Helix I **Helix II**

MhDnaJ : FVLDDSPRMGPASRANSRRTLTRVSNWNSHKSPYDTLELERDADDEKTKAAYRRLAKF : 106
 AtDnaJ : SWFRS-KNSNLWFRLNQRKTLVRASNWSQHKSPYDTLELDRNAEEEEQIKVAYRRLAKF : 102
 OsDnaJ : AFVDFEVARAAGGER--RRVSTRAASWDSEKSPYETLELDRDADEETIKTAYRRLAKF : 100
 PtDnaJ : PWLIHTNNNDPWFRVNHKRTIVRA--WTEPKSPYETLELERDADEEDIKVAAYRRLAKY : 111
 RcDnaJ : SWLHG--NNDSWFRVNQRRTAVRAANWTDQKSPYDTLELERDADEEQIKVAYRRLAKF : 90
 VvDnaJ : PWFDS-NRNEPWFRVSQRRTLVRASKWTDSEKSPYETLELDRDADEEKIKLAYRRLAKF : 107
 ZmDnaJ : AFVLDEVARAAGGVR--RRASTRAASWDSEKSPYETLELGRDADEETIKTAYRRLAKF : 102

HPD **J domain** **Helix III** **Helix IV**

MhDnaJ : YHPDVYDGRGTL EEGETAESRFIKIQAA YELLIDDEQRRQYDRDHHVNP MKASQAWME : 164
 AtDnaJ : YHPDVYDGKGTLEEGETAEARFIKIQAA YELLMDSEKKVQYDMNVRVNP MKASQAWME : 160
 OsDnaJ : YHPDVYDGKGTLEEGETAEARFIKIQAA YELLIDDQRRKSYDREHHVNP MKASQAWME : 158
 PtDnaJ : YHPDVYDGRGTL EEGETAEARFIKIQAA YELLMDDEKRRQYNM DNVRVNP MKASQAWME : 169
 RcDnaJ : YHPDVYDGRGTL EEGETAEARFIKIQAA YELLMDDDKHRQYDM DHRVNP MKASQAWME : 148
 VvDnaJ : YHPDVYDGRGTL AEGETAEARFIKIQAA YELLIDDKRRQYDN DNVRVNP MKASQAWME : 165
 ZmDnaJ : YHPDVYDGKGTLEEGETAEARFIKIQAA YELLIDGERRRAYDREHHVNP MKASQAWME : 160

NLS

MhDnaJ : WVMKKQKAFDQRGDMAIAAWAEQQQH EMLRARRLSRSKIDPEEERKILAKEKKASME : 222
 AtDnaJ : WLMKKRKAFDQRGDMAVAWAEQQQLD INLRARRLSRSKVDPEEERKILEKEKKASRE : 218
 OsDnaJ : WVMKKRKAFDQRGDMAVAWAEQQHREMT LRARRLSRSKIDPEEERKILFAKEKKASME : 216
 PtDnaJ : WLMKKRTAFDQRGDMAIMAWAEQQQRE MNLRVRRLSRTKTDPEEERRILAKEKKASME : 227
 RcDnaJ : WLIKRRKAFDQRGDMAIAAWAEQQQRE MNLRARRLSRSKVDPEEERRILAREKKASME : 206
 VvDnaJ : WLMKKRKAFDQRGDMAIAAWAEQQQRE LNLRARRLSRSKIDPEEERRILAKEKKASKE : 223
 ZmDnaJ : WVMKKRKAFDQRGDMAVAWAEQQQREMT LRARRLSRSKVDPEEERKILFAKEKKASME : 218

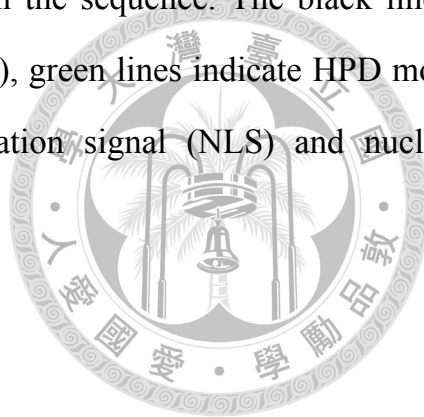
NES

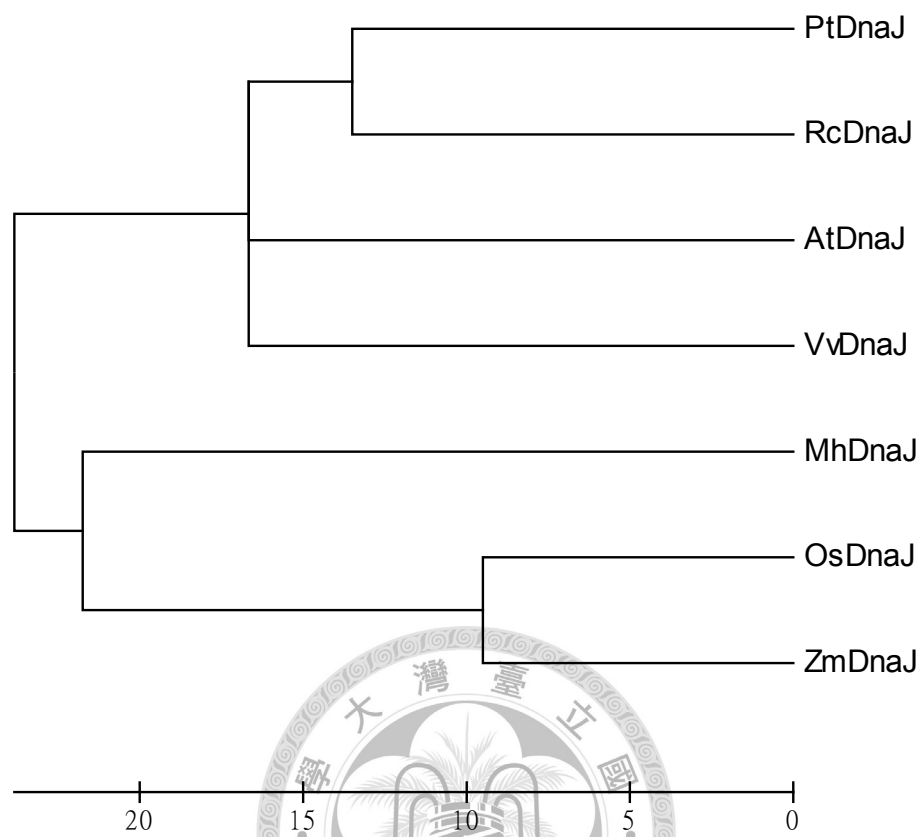
MhDnaJ : YFTNLTLLRHTLVLKKRDLMRKKA EEDKKRVISQLLAAEGLELDTDDDEAV--- : 273
 AtDnaJ : LFNSTLKRHTLVLKKRDLMRKKA EEDKKKLITQLLAAEGLELDTEAE EEEEEAAK- : 271
 OsDnaJ : FYSTTLKRHTLVLRKR DIMRKA EEDKKKEISRLLALEGLELDTDEDDNINFLK : 270
 PtDnaJ : YFSSTMKRHTLVLKKRDLMRKKA E E-KKRSTISQLLAAEGLELDTDADETL---- : 276
 RcDnaJ : YLNSTLRRHTLVLKKRDLMRKKA E EKKKAI SQLLAAEGLELDTDEDETL---- : 256
 VvDnaJ : YFSNTLKRHTLILKKRDLMRKKA E EEMKKSISQLLAAEGLELDTDDEAL----- : 272
 ZmDnaJ : FYSTTLKRHTLVLRKR DIMRKA E E EKKKEISRLLALEGLELDTDEDENKTFLG : 272

圖六、不同作物之DnaJ胺基酸序列比較

Fig. 6. Comparison of the amino acid sequences among DnaJ from *Musa* spp.

Hsien Jin Chiao (MhDnaJ), *Arabidopsis thaliana* (AtDnaJ, accession number: NP_565163), *Oryza sativa* Japonica type (OsDnaJ, accession number: NP_001060336), *Populus trichocarpa* (PtDnaJ, accession number: XP_002302268), *Ricinus communis* (RcDnaJ, accession number: XP_002513851), *Vitis vinifera* (VvDnaJ, accession number: XP_002285821), and *Zea mays* (ZmDnaJ, accession number: NP_001140575). Amino acid sequences were aligned using the AlignX program of Vector NTI 10.0 software. Shadings indicate the degree of homology at each position: black= 100%; dark gray= 80%; light gray= 60%. Number at the end of each sequence refers to the number of amino acid in the sequence. The black lines indicate J domain, red lines indicate helix (I-IV), green lines indicate HPD motif (HPD), and blue lines indicate nuclear localization signal (NLS) and nuclear export signal (NES) conserved amino acid.





圖七、不同作物之DnaJ胺基酸序列親緣性分析

Fig. 7. Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences (from No. 66-273 amino acid of MhDnaJ) among DnaJ from *Musa* spp. Hsien Jin Chiao (MhDnaJ), *Arabidopsis thaliana* (AtDnaJ, accession number: NP_565163), *Oryza sativa* Japonica type (OsDnaJ, accession number: NP_001060336), *Populus trichocarpa* (PtDnaJ, accession number: XP_002302268), *Ricinus communis* (RcDnaJ, accession number: XP_002513851), *Vitis vinifera* (VvDnaJ, accession number: XP_002285821), and *Zea mays* (ZmDnaJ, accession number: NP_001140575). Amino acid sequences were analyzed using the AlignX program of Vector NTI 10.0 and the Neighbor-joining program of MEGA4 software. Scale bar below shows the number of amino acid substitution per site.

結果顯示，香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子可能具有多種 cis-acting elements，如植物荷爾蒙調控因子：植物生長素調控因子 (auxin responsive element, AuxRR-core)、離層酸調控因子 (abscisic acid responsive element, ABRE) 與茉莉酸甲酯調控因子 (MeJA-responsive element, CGTCA-motif)，及非生物性調控因子：光調控因子 (light responsive element, GATA-motif; G-box)、高溫調控因子 (heat stress responsive element, HSE) 與乾旱調控因子 (MYB binding site involved in drought-inducibility, MBS) 等調控相關之保守序列 (表三)。

二、香蕉 *MhDnaJ* 基因功能分析

(一) 過量表達分析

完成以 CaMV 35S 啟動子驅動 *MhDnaJ* 基因之轉殖質體構築，電穿孔轉型至農桿菌，以農桿菌媒介轉殖法進行菸草葉圓片轉殖，經抗生素 (kanamycin) 篩選後取得 12 株菸草擬轉殖株，經抽取基因組 DNA，以 *PstI* 酶切，並以 *MhDnaJ* 基因片段為探針，進行南方氏雜交分析，雜交條帶為 1.4 Kb，確認轉殖系編號 1、4、6、9、10 與 14 號為轉殖株 (圖八)。

(二) 基因默化分析

經核苷酸序列比對，選取 *MhDnaJ* 與 *AtDnaJ* 相同區域，完成以 CaMV 35S 啟動子驅動 small interference RNA (siRNA) 構築之暫時性表現與轉殖質體之構築，以農桿菌媒介轉殖法進行阿拉伯芥花序轉殖，目前以抗生素篩選 T1 轉殖株。

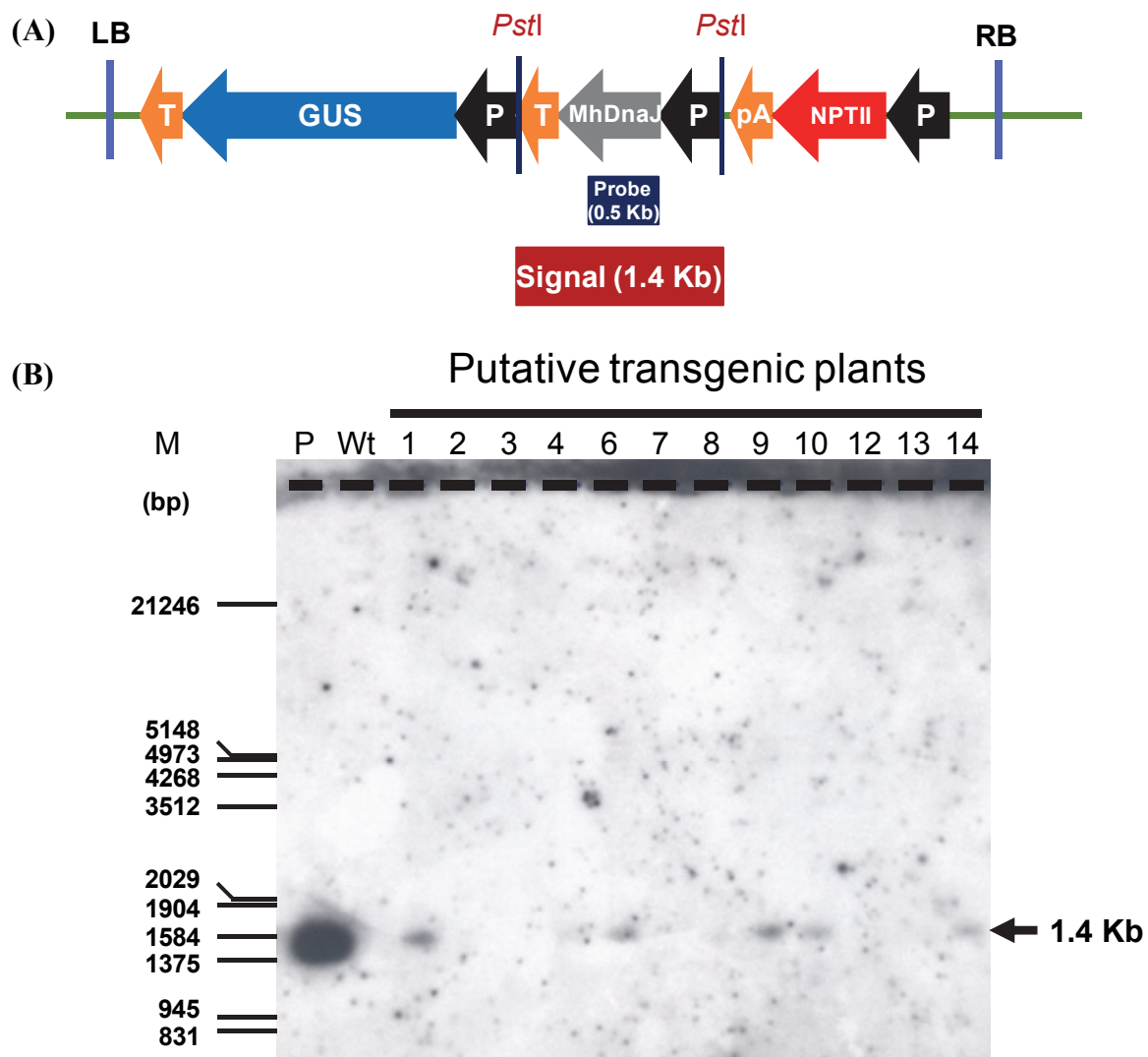
三、香蕉 *MhDnaJ* 蛋白質定位分析

表三、香蕉 *MhDnaJ* 基因之啟動子序列分析

Table 3. Analysis of responsive elements in the promoter region of *MhDnaJ* gene from banana.

Motif	Sequence in <i>MhDnaJ</i>	Position in <i>MhDnaJ</i>	Regulatory function	Reference
ABRE	CACGTG	-471~-466	<i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	Busk and Pagès, 1998
AuxRR-core	GGTCCAG	-2973~-2967	<i>cis</i> -acting element involved in auxin responsiveness	Ulmasov et al., 1995
CGTCA-motif	CGTCA	-1606~-1602	<i>cis</i> -acting element involved in MeJA-responsiveness	Rouster et al., 1997
		-1420~-1416		
		-849~-845		
		-681~-724		
		-433~-429		
GATA-motif	GATAAGG	-1455~-1449	part of a light responsive element	Arguello-Astorga et al., 1996
		-2357~-2352		
		-2280~-2275		
		-396~-391		
		-313~-308		
G-box	CACGTC	-3204~-3201	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	William and Cashore, 1995
		-2614~-2611		
		-2537~-2534		
		-1521~-1518		
		-608~-605		
HSE	AGAA	-3204~-3201	<i>cis</i> -acting element involved in the heat stress responsiveness	Amin et al., 1988
		-2614~-2611		
		-2537~-2534		
		-1521~-1518		
		-608~-605		
MBS	CAACTG	-3034~-3029	MYB binding site involved in drought-inducibility	Urao et al., 1993
	TAACTG	-2655~-2650		

- The first nucleotide of the putative translation start site is denoted by +1.



圖八、菸草35Spro::MhDnaJ擬轉殖株南方氏雜交分析

Fig. 8. Southern blot analysis of putative *Nicotiana tabacum* 35Spro::MhDnaJ transformants. (A) Schematic diagram of restriction map of pGKUMhDnaJ plasmid and expected hybridization patterns. NPTII: neomycin phosphotransferase II gene. P: nopaline synthase gene promoter. pA: CaMV 35S polyA terminator. T: nopaline synthase terminator sequence. GUS: β -glucuronidase gene. LB: Left border. RB: Right border. (B) Genomic DNA (20 μ g) digested with *Pst*I was separated by electrophoresis on a 0.7 % agarose gel. Wt: negative control, non-transformant. P: 200 pg plasmid DNA of pGKUMhDnaJ served as positive control.

為瞭解香蕉 *MhDnaJ* 蛋白質於細胞內表達位置，以 $35S_{pro}::MhDnaJ::GFP$ 融合螢光蛋白表達質體，進行阿拉伯芥原生質體與洋蔥表皮細胞之暫時性蛋白質定位分析，以共軛焦顯微鏡觀察，結果顯示 *MhDnaJ::GFP* 融合蛋白螢光訊號出現於阿拉伯芥原生質體 (圖九) 與洋蔥表皮細胞 (圖十) 的細胞核內，與細胞核染劑 DAPI 螢光訊號位置相同 (圖九、十)，顯示香蕉 *MhDnaJ* 蛋白質於細胞質表達後，胺基酸序列中的 NLS 能正常的將蛋白質標的至細胞核，使 *MhDnaJ* 蛋白質累積於細胞核中。

四、香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子活性分析

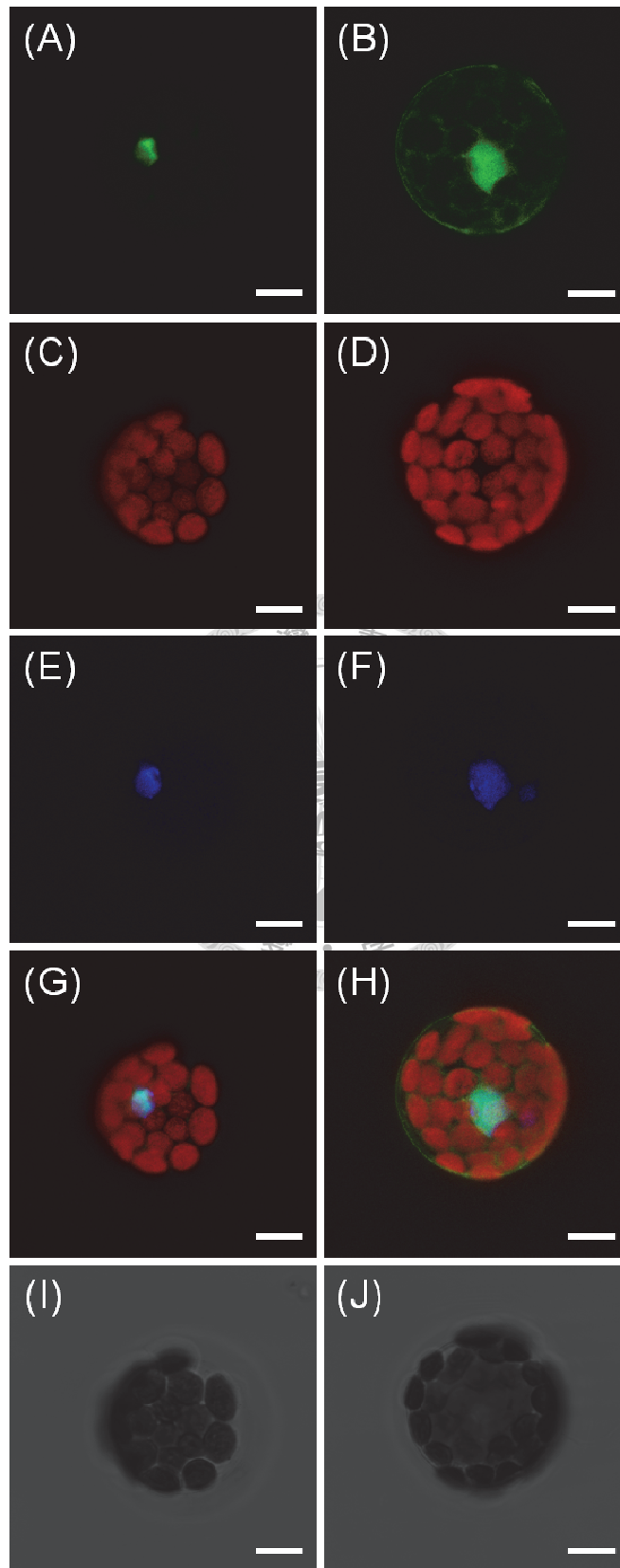
(一) 菸草轉殖株基因完整性與基因拷貝數之分子驗證

MhDnaJ 啟動子引導報導基因 *GUS* 之轉殖質體 pBI101-PMhDnaJ，以農桿菌進行菸草葉圓片轉殖與阿拉伯芥花序轉殖，取得 12 株菸草擬轉殖株與 2 株阿拉伯芥 T1 轉殖株。12 株菸草擬轉殖株，經抽取基因組 DNA，以 *HindIII* 與 *BamHI* 酶切，並以啟動子片段為探針，進行南方氏雜交分析，雜交條帶為 3.5 Kb，確認均為轉殖株 (圖十一)，拷貝數分析結果顯示，轉殖系編號 2、5、9、24 與 33 號之雜交條帶大小分別為 18.4 Kb、7.3 Kb、6.9 Kb、12 Kb 及 14.9 Kb，為具外源基因單一拷貝之轉殖株 (圖十二)。

(二) 菸草轉殖株不同發育階段之啟動子活性分析

選取單一拷貝之轉殖株 *Nt-MhDnaJpro::GUS-2* 之自交種子進行無菌播種，觀察菸草 T1 轉殖株不同發育天數 (5-30 天) 之啟動子活性，結果顯示啟動子於 5-30 天皆無表現 (圖十三)。

進一步進行菸草 R1 轉殖株花序與果實不同生長發育階段之啟動子活性分析，顯示 *MhDnaJ* 啟動子於柱頭發育早期 (stages 2-4) 與後期 (stage 8)；雄蕊發育後期 (stages 8-9) 與果實發育早期 (stages 10-11) 表現 (圖十四、十五)。

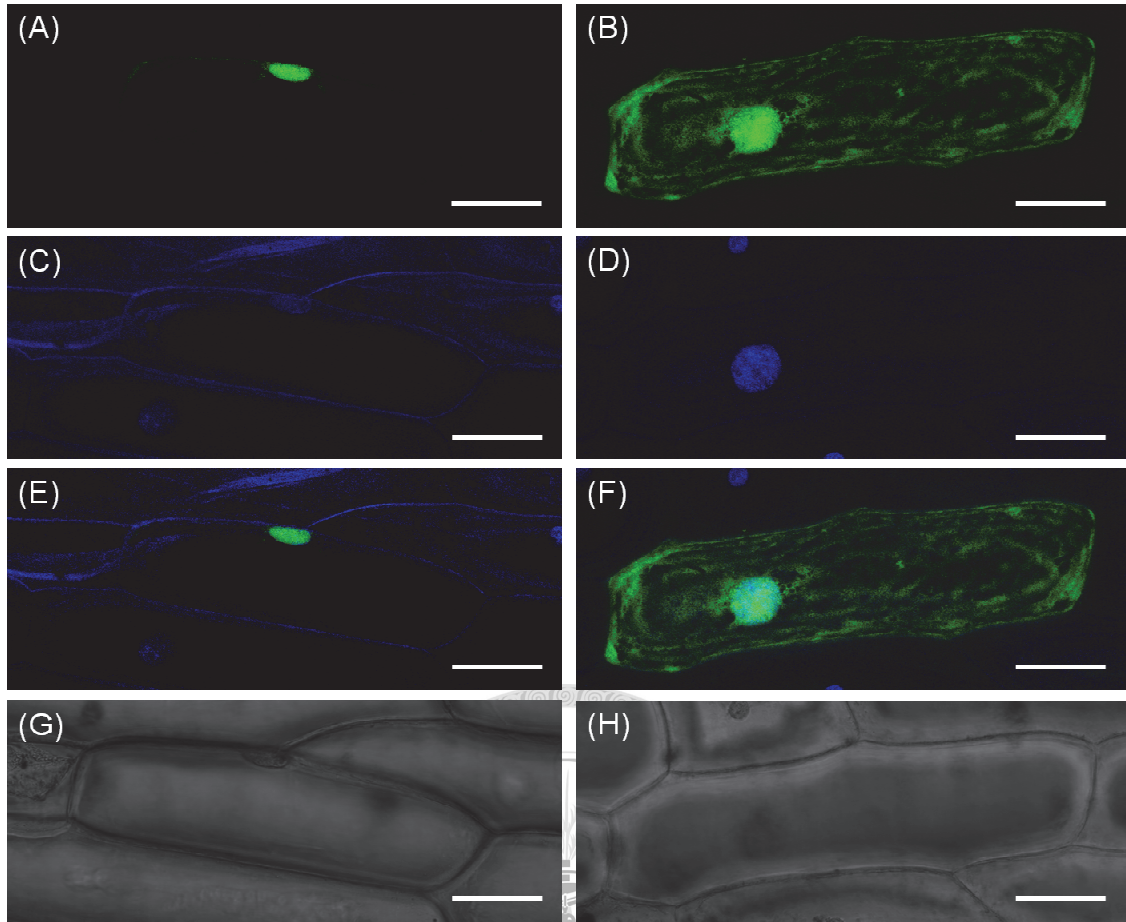


圖九、香蕉MhDnaJ蛋白質於阿拉伯芥原生質體之細胞內定位

Fig. 9. Subcellular localization of banana MhDnaJ localization in *Arabidopsis*

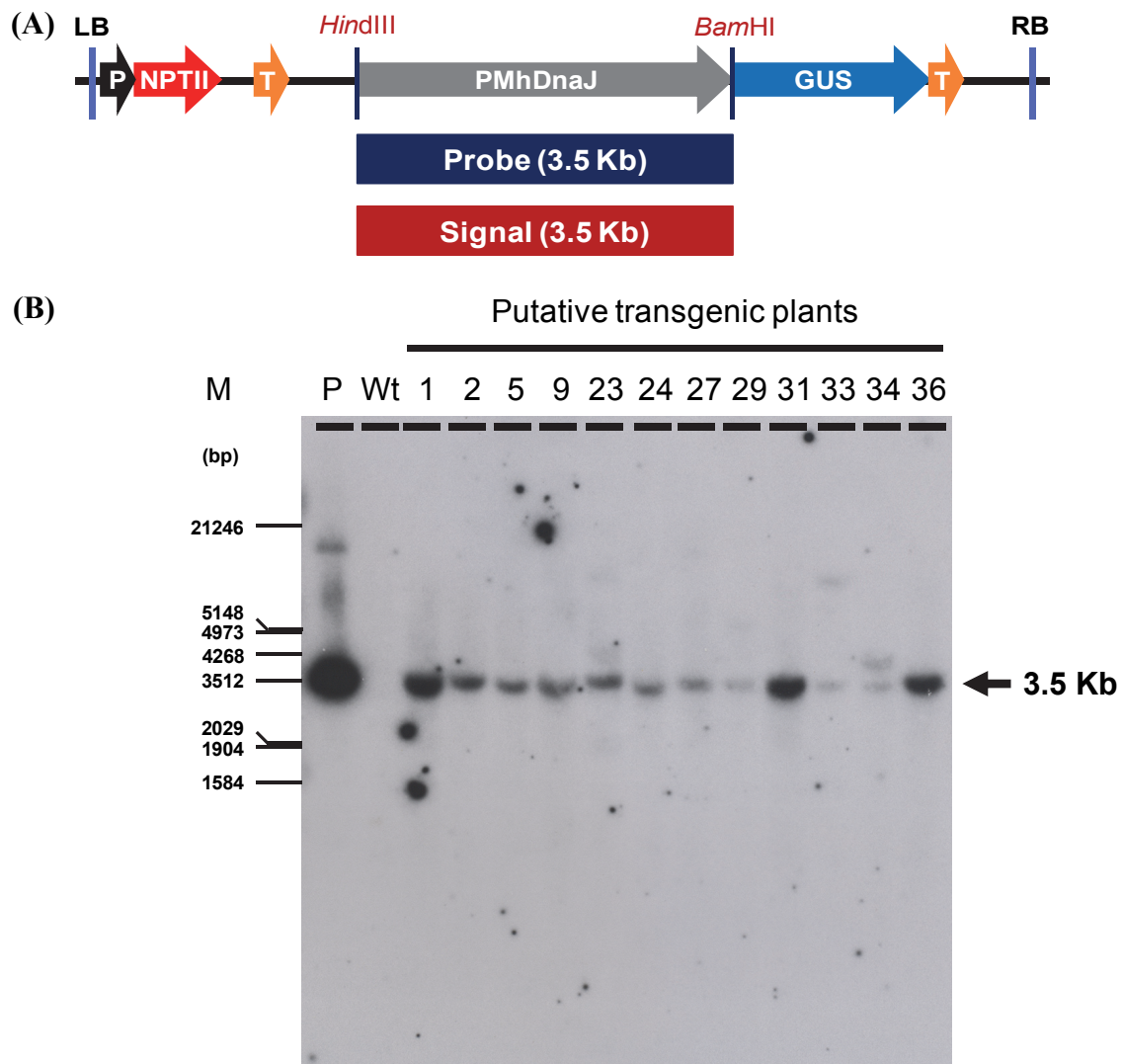
leaf mesophyll cell protoplasts. The *MhDnaJ::GFP* fusion gene inserted into vector and transformed into *Arabidopsis thaliana* (Col-0) protoplasts by PEG-method for transient expression. (A) *MhDnaJ::GFP* accumulation emitted green fluorescence. (B) 35S::GFP accumulation emitted green fluorescence. (C) (D) Chlorophyll auto-fluorescent emitted red fluorescence. (E) (F) Nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) emitted blue fluorescent. (G) Merged image of (A) (C) and (E). (H) Merged image of (B), (D) and (F). (I) (J) Bright field microscopic image. GFP signal were observed by laser scanning confocal microscope (Leica). Bars = 10 μ m.





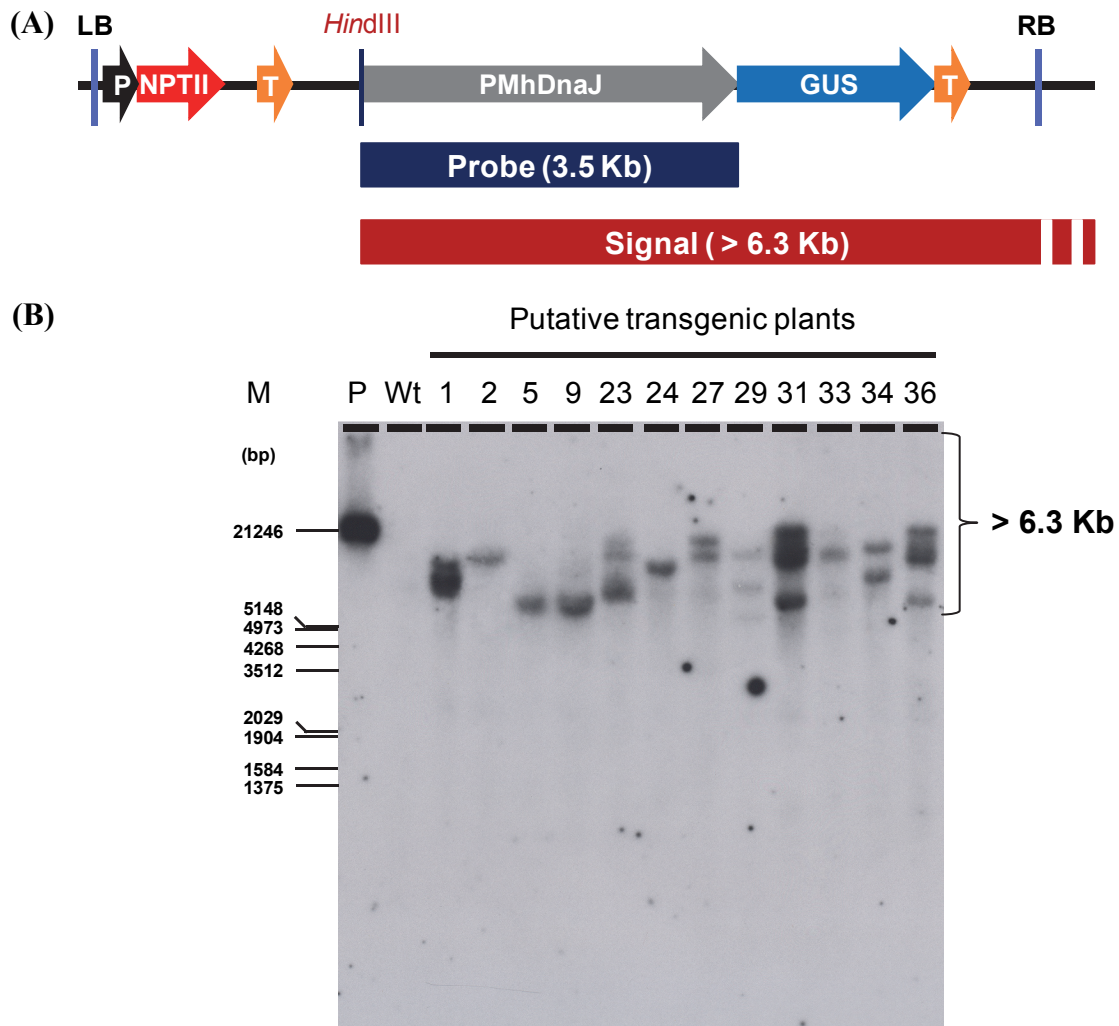
圖十、香蕉MhDnaJ蛋白質於洋蔥表皮細胞之細胞內定位

Fig. 10. Subcellular localization of banana MhDnaJ localization in onion epidermal cells. The *MhDnaJ::GFP* fusion gene inserted into vector and transformed into onion epidermal cells by particle bombardment for transient expression. (A) MhDnaJ::GFP accumulation emitted green fluorescence. (B) 35S::GFP accumulation emitted green fluorescence. (C) (D) Nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) emitted blue fluorescent. (E) Merged image of (A) and (C). (F) Merged image of (B) and (D). (G) (H) Bright field microscopic image. GFP signal were observed by laser scanning confocal microscope (Leica). Bars = 50 μ m.



圖十一、菸草 *MhDnaJ_{pro}::GUS* 擬轉殖株南方氏雜交分析

Fig. 11. Southern blot analysis of putative *Nicotiana tabacum* *MhDnaJ_{pro}::GUS* transformants. (A) Schematic diagram of restriction map of pBI101-PMhDnaJ plasmid and expected hybridization patterns. NPTII: neomycin phosphotransferase II gene. P: nopaline synthase gene promoter. T: nopaline synthase terminator sequence. PMhDnaJ: *MhDnaJ* promoter. GUS: β -glucuronidase gene. LB: Left border. RB: Right border. (B) Genomic DNA (20 μ g) digested with *Hind*III and *Bam*HI was separated by electrophoresis on a 0.7 % agarose gel. Wt: negative control, non-transformant. P: 200 pg plasmid DNA of pBI101-PMhDnaJ served as positive control.



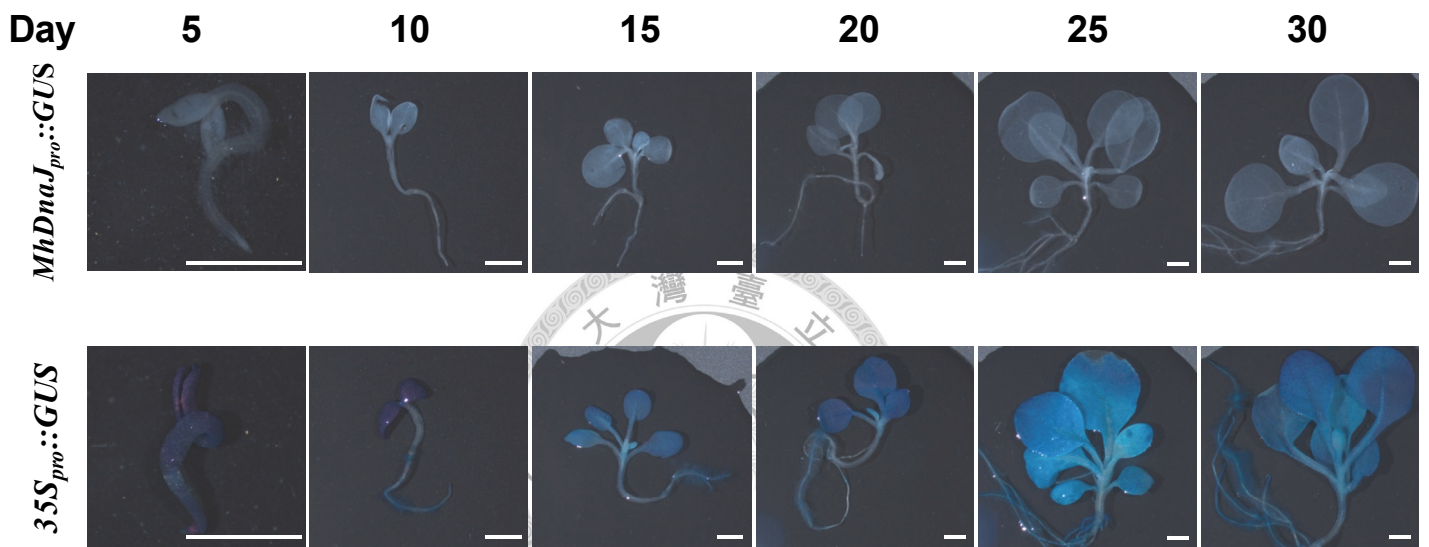
圖十二、菸草 *MhDnaJ*_{pro}::*GUS* 擬轉植株之基因拷貝數分析

Fig. 12. Southern blot analysis for gene copy number of putative *Nicotiana tabacum* *MhDnaJ*_{pro}::*GUS* transformants. (A) Schematic diagram of restriction map of pBI101-PMhDnaJ plasmid and expected hybridization patterns. NPTII: neomycin phosphotransferase II gene. P: nopaline synthase gene promoter. T: nopaline synthase terminator sequence. PMhDnaJ: *MhDnaJ* promoter. GUS: β -glucuronidase gene. LB: Left border. RB: Right border. (B) Genomic DNA (20 μ g) digested with *HindIII* and *Bam*HI was separated by electrophoresis on a 0.7 % agarose gel. Wt: negative control, non-transformant. P: 200 pg plasmid DNA of pBI101-PMhDnaJ served as positive control.

(三) 不同非生物性逆境與生長調節劑誘導之菸草轉殖株啟動子活性分析

選取無菌播種 21 天之 T1 轉殖株，進行不同非生物逆境與生長調節劑誘導處理分析，結果不論是非生物逆境之高溫 (42°C/24 hr)、低溫 (4°C/24 hr)、乾旱 (3 hr)、淹水 (24 hr)、黑暗 (24 hr)、低溫黑暗 (4°C/24 hr)、高鹽 (300 mM NaCl/3 hr) 與創傷 (0.5、1 hr) 處理或生長調節劑 IAA (20 µM)、BA (20 µM)、GA (20 µM)、ABA (100 µM)、MeJA (50 µM)、SA (1 mM)、ACC (50 µM) 處理 24 小時，都無 GUS 活性表現，顯示 21 天之 T1 轉殖株 *MhDnaJ* 啟動子皆不受上述因子誘導 (圖十六、十七)。

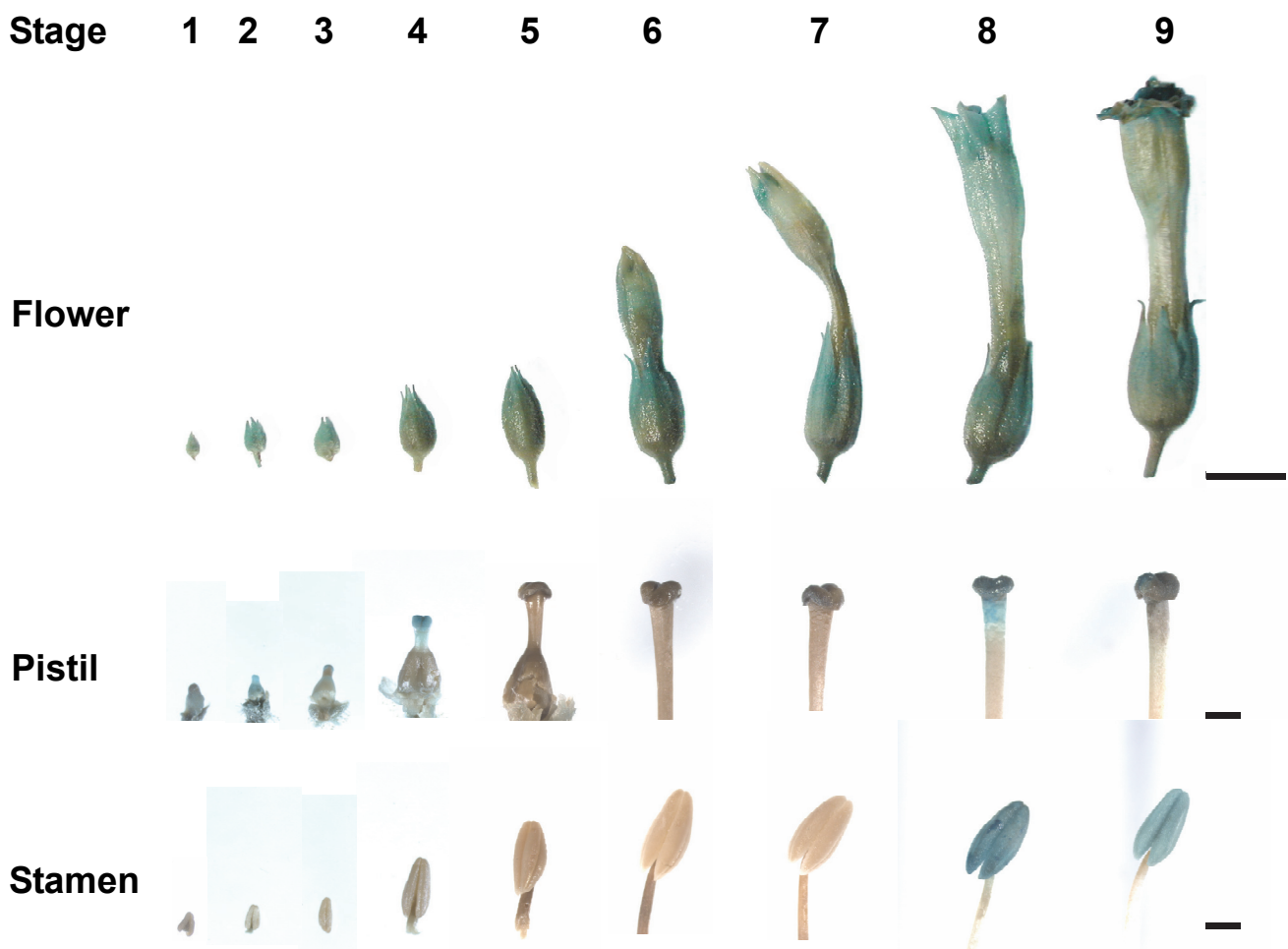




圖十三、菸草*MhDnaJ_{pro}::GUS*轉殖株不同發育天數之啟動子活性分析

Fig. 13. Histochemical analysis of GUS activity in *MhDnaJ_{pro}::GUS* transgenic tobacco.

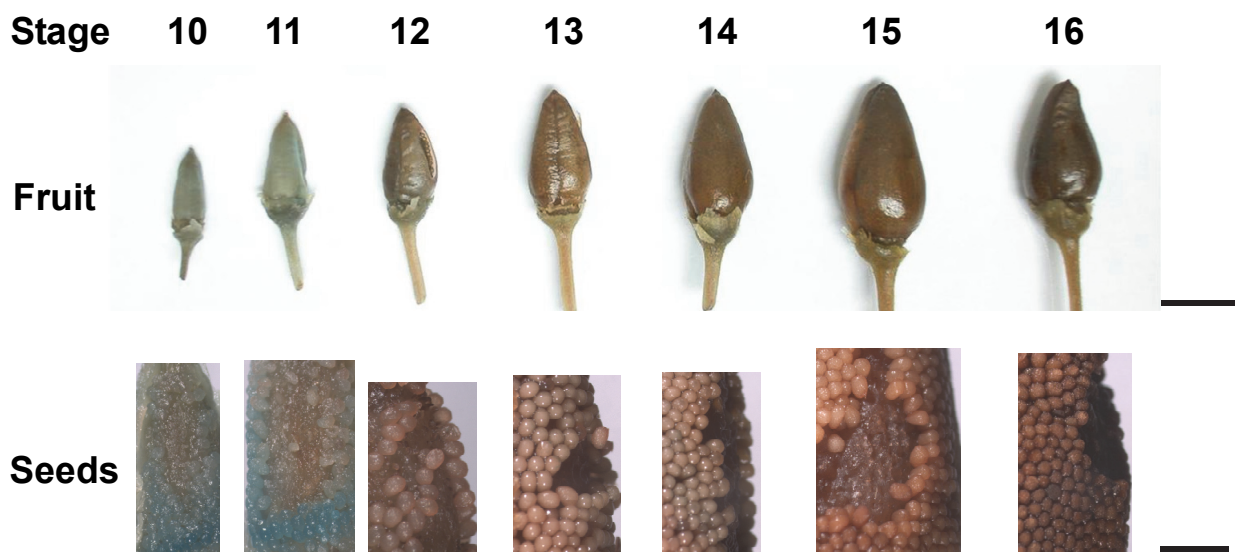
Transgenic seedlings different days after sowing were stained for GUS activity. Bars = 2 mm.



圖十四、菸草 $MhDnaJ_{pro}::GUS$ 轉殖株花朵發育階段之啟動子活性分析

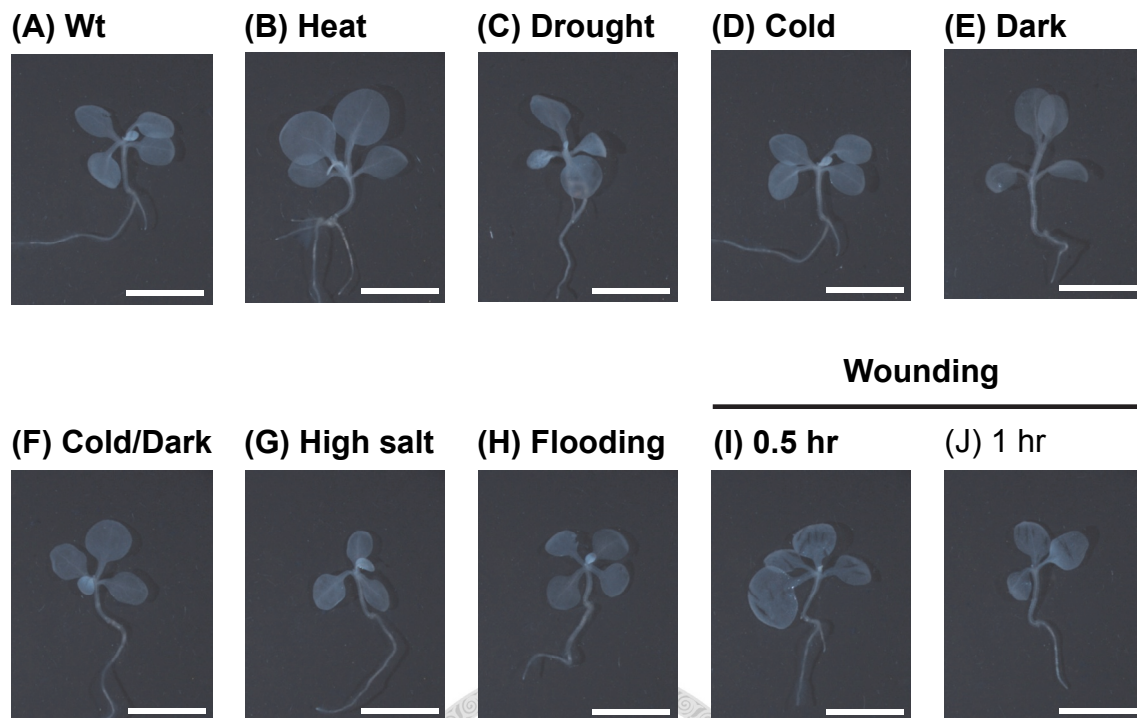
Fig. 14. Histochemical analysis of GUS activity in $MhDnaJ_{pro}::GUS$ transgenic tobacco plants at different developmental stages of flower, pistil, and stamen.

Bar in flower is 1 cm, in pistil and stamen are 1 mm.



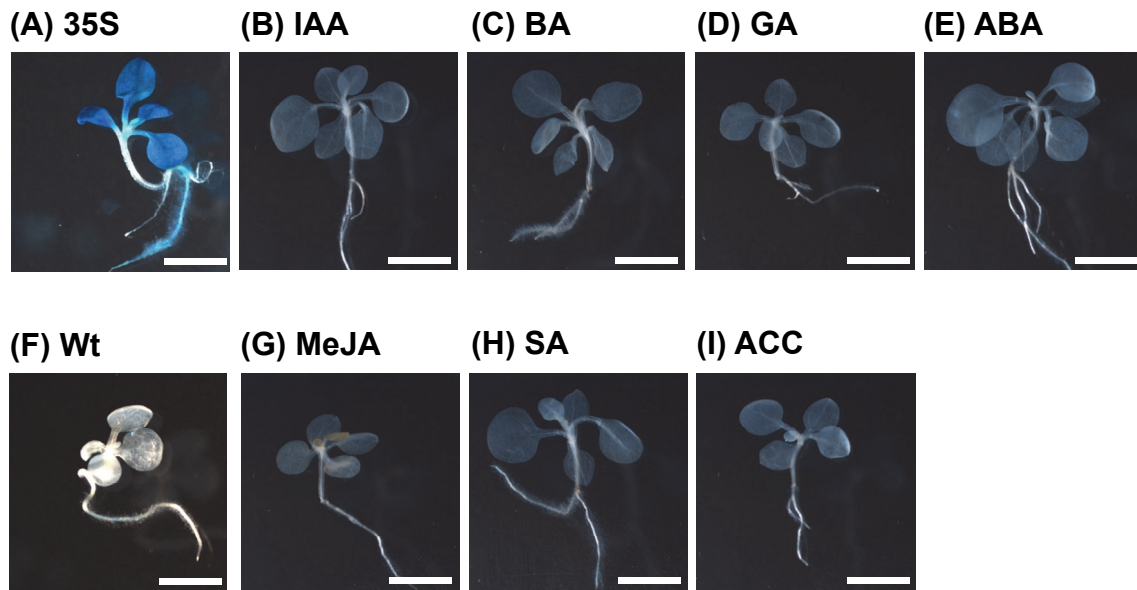
圖十五、菸草 *MhDnaJ_{pro}::GUS* 轉植株果實與種子發育階段之啟動子活性分析

Fig. 15. Histochemical analysis of GUS activity in *MhDnaJ_{pro}::GUS* transgenic tobacco plants at different developmental stages fruit and seeds with internal dissection of capsule. Bar in fruit is 1 cm, and in seeds is 2 mm.



圖十六、菸草 *MhDnaJ_{pro}::GUS* 轉殖株逆境誘導之啟動子活性分析

Fig. 16. Histochemical analysis of GUS activity in *MhDnaJ_{pro}::GUS* transgenic tobacco seedlings after different abiotic stresses treatment. GUS expression was analyzed for twenty-one-day-old seedlings. (A) Untreated plants as negative control. (B) 37°C, for 24 hours, light/dark for 16/8 hours. (C) Drought for 3 hours. (D) 4°C for 24 hours, light/dark for 16/8 hours. (E) darkness for 24 hours. (F) 4°C in darkness for 24 hours. (G) High salt 300 mM NaCl for 3 hours. (H) Flooding in water for 24 hours. (I) Wound on the leaf for 0.5 hours. (J) Wound on the leaf for 1 hours. Bars = 5 mm.



圖十七、菸草 *MhDnaJ_{pro}::GUS* 轉殖株以植物生長調節劑誘導之啟動子活性分析

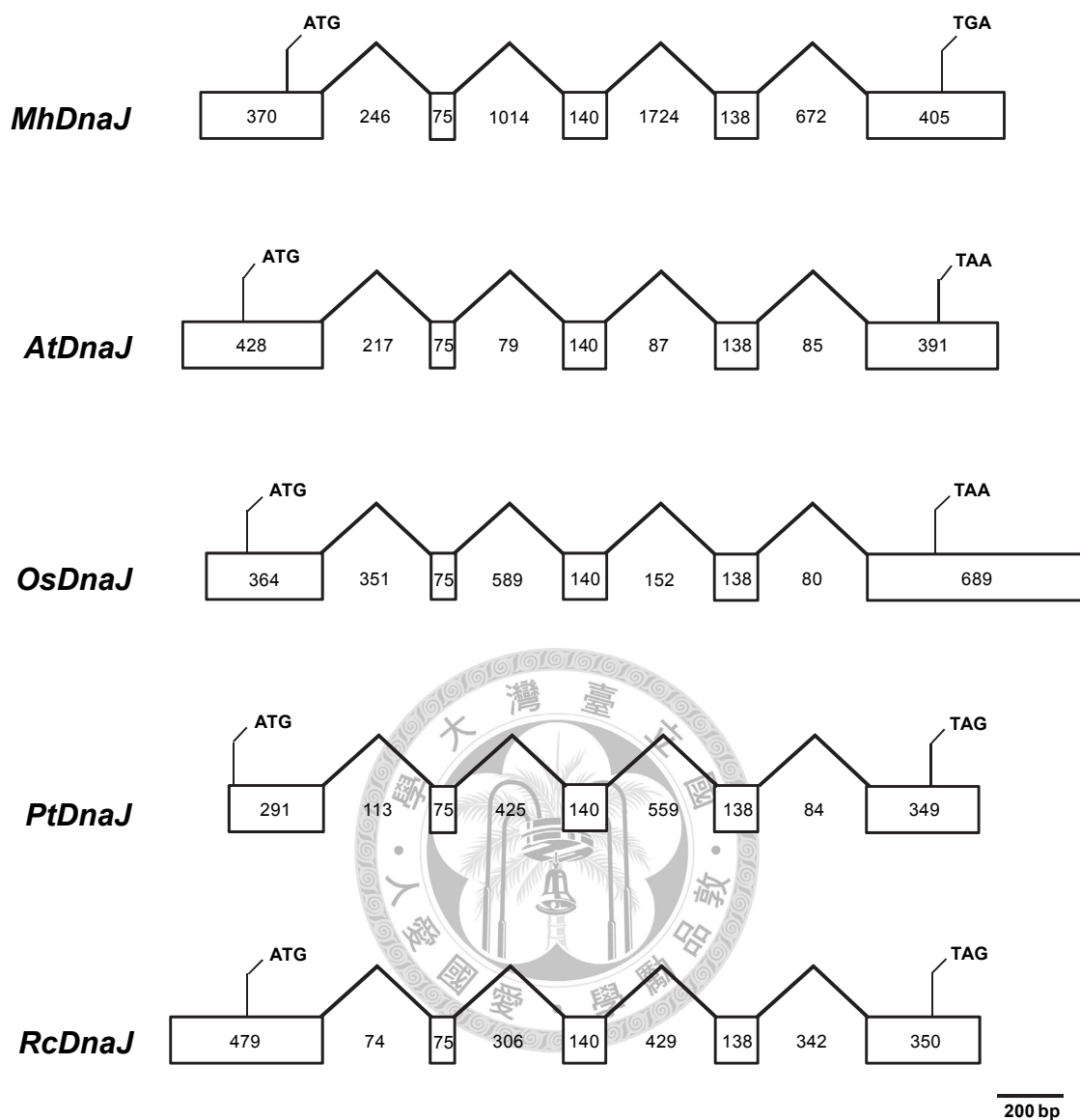
Fig. 17. Histochemical analysis of GUS activity in *MhDnaJ_{pro}::GUS* transgenic tobacco seedlings after different plant growth regulators treatment for 24 hours, light/dark for 16/8 hours. GUS expression was analyzed for twenty-one-day-old seedlings. (A) *Nt35S_{pro}::GUS* as positive control. (B) 20 μ M IAA. (C) 20 μ M BA. (D) 20 μ M GA. (E) 100 μ M ABA. (F) Untreated plant as negative control. (G) 50 μ M MeJA. (H) 1 mM SA. (I) 50 μ M ACC. Bars = 5 mm.

伍、討論

一、香蕉 *MhDnaJ* 基因結構分析

(一) 香蕉 *MhDnaJ* 基因序列分析

香蕉 *MhDnaJ* 基因結構與阿拉伯芥 (AT1G77930) (Theologis et al., 2000)、水稻 (Os07g0626400) (Tanaka et al., 2008)、楊樹 (POPTRDRAFT_816316) (Tuskan et al., 2006) 與蓖麻 (RCOM_1033260) (Chan et al., 2010) 皆相同，第二、三及四個顯子核苷酸數目完全相同 (圖十七)。香蕉 *MhDnaJ* 基因演繹之胺基酸序列，與葡萄 (XP_002285821) 之胺基酸相似度最高，為 71.6% (表三)。J-protein 根據胺基酸序列的差異被分為四類 (type I-IV)，type I 具有 J-domain, G/F region, zinc-finger domain, C-terminal domain；type II 缺少 zinc-finger domain；type III 只具有 J-domain；而 type IV 為 J-like proteins (JLPs) (Rajan and D'Silva, 2009)。進一步將香蕉 *MhDnaJ*、阿拉伯芥 (NP_565163)、水稻 (NP_001060336)、楊樹 (XP_002302268)、蓖麻 (XP_002513851)、葡萄 (XP_002285821) 與玉米 (NP_001140575) 之胺基酸序列進行比對分析，都具有高度保守性的 J-domain，此外，再以 predictprotein 網站資料庫預測，尚具有四區形成 helix 之胺基酸序列，而在 helix II 之後也有關鍵性的 HPD motif，此皆為 J-domain 重要的結構特徵 (Cheetham and Caplan, 1998)，但都不具有 G/F region、zinc-finger domain 與 C-terminal domain，判斷香蕉 *MhDnaJ*、阿拉伯芥 (NP_565163)、菸草 (DQ437539)、水稻 (NP_001060336)、楊樹 (XP_002302268)、蓖麻 (XP_002513851)、葡萄 (XP_002285821) 與玉米 (NP_001140575) 應為 type III 之 J-protein (Rajan and D'Silva, 2009)。根據親緣樹狀圖分析結果可分為兩群，楊樹 (XP_002302268)、蓖麻 (XP_002513851)



圖十八、不同作物*DnaJ*基因結構比較

Fig. 18. Comparison of the gene structure among *DnaJ* from *Musa* spp. Hsien Jin Chiao (*MhDnaJ*), *Arabidopsis thaliana* (*AtDnaJ*, Gene symbol: AT1G77930), *Oryza sativa* Japonica Group (*OsDnaJ*, Gene symbol: Os07g0626400), *Populus trichocarpa* (*PtDnaJ*, Gene symbol: POPTRDRAFT_816316), *Ricinus communis* (*RcDnaJ*, Gene symbol: RCOM_1033260). The black squares indicate exons, the v-shaped lines indicate introns. ATG: translation start codon. TGA, TAA and TAG: translation stop codon. Bars= 200 bp.

、阿拉伯芥 (NP_565163) 與葡萄 (XP_002285821) 為一群，屬於雙子葉植物，香蕉 (MhDnaJ)、水稻 (NP_001060336) 與玉米 (NP_001140575) 則為單子葉植物，香蕉 MhDnaJ 和水稻與玉米的同源性較高 (圖七)。

(二) 香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子序列分析

根據啟動子區域之序列分析，可以預測基因之調控因子與基因特性。以 PlantCARE 資料庫分析已取得之香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子序列，根據分析比對結果顯示，香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子可能具有多種植物荷爾蒙調控因子如：植物生長素調控因子 (auxin responsive element, AuxRR-core)，碗豆 *PsPIN1* 也具有 AuxRR-core 保守性序列 (Bai and DeMason, 2006)，但不同於另一個植物生長素調控因子 AuxRE，Auxin response factor (ARF) 轉錄因子會與結合 AuxRE，進一步調控 auxin 相關基因表現 (Liscum and Reed, 2002)，但到目前為止 AuxRR-core 參與調控 auxin 相關基因表現之機制不明 (Bai and DeMason, 2006)。香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子也具有離層酸調控因子 (abscisic acid responsive element, ABRE)，能與 ABRE binding factors (ABFs) 轉錄因子結合 (Choi et al., 2000)，調控與逆境相關及生長發育相關基因，如阿拉伯芥 ABF3 與 ABF4 具有調控鹽類逆境與乾旱逆境相關基因表現；而 ABF2 具有調控 *rbcS* 基因之能力，過量表達 ABF2 會抑制 *rbcS* 基因表現，*rbcS* 是決定光合作用速率的關鍵酵素，因此於過量表達 ABF2 之轉殖株光合作用能力較低 (Kim et al., 2004)；棉花熱休克蛋白質 *GHSP26* 啟動子亦具有二個離層酸調控因子 (ABRE-like, ACGTG)，以 500 μ M ABA 誘導處理 6 小時後，*GHSP26_{pro}::GUS* 菸草轉殖株之 GUS 活性較未處理高出 2 倍 (Zahur et al., 2009)。香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子還具有六個茉莉酸甲酯調控因子 (MeJA responsive element, CGTCA-motif)，能與具有 AP2/ERF DNA-binding domain 之 ORCA1 及 ORCA2 (Octadecanoid-Responsive Catharanthus) 轉錄

因子結合 (Menke et al., 1999)，開啟與 JA 訊息傳導相關之防禦機制，如累積 fungal elicitors 二級代謝物 (Ellard-Ivey and Douglas, 1996)。

於非生物性調控因子方面，具有光調控因子 (light responsive element, GATA-motif; G-box)，G-box element 廣泛存在單子葉及雙子葉與光相關之基因啟動子，能與 G-Box-Binding Factors (GBFs) 轉錄因子之 bZIP motif 結合 (William and Cashore, 1995)。此外還具有由 MYB 基因調控之乾旱調控因子 (MYB binding site involved in drought-inducibility, MBS)，能與阿拉伯芥 *Atmyb2* 轉錄因子結合，影響乾旱相關基因之調控 (Urao et al., 1993)，棉花小分子熱休克蛋白質 *GHSP26* 與月季 (*Rosa chinensis*) 小分子熱休克蛋白質 *RcHSP17.8* 啟動子亦都具有 MYB 基因調控之乾旱調控因子，於乾旱逆境下啟動子能被誘導表現 (Zahur et al., 2009; Zhang et al., 2011)。香蕉 *MhDnaJ* 基因啟動子還具有五個高溫調控因子 (heat stress responsive element, HSE)，在所有熱休克基因啟動子區域內，都具有一個或多個高溫調控因子 (Xiao and Lis, 1988)。阿拉伯芥熱休克蛋白質 *HSP81-1* 啟動子亦具有一個高溫調控因子，於 22°C 時啟動子只在側根表現，但以 35°C 誘導處理 2 小時後，*HSP81-1_{pro}::GUS* 阿拉伯芥轉殖株全株都有 GUS 活性表現 (Yabe et al., 1994)。植物有超過二十種熱休克轉錄因子 (heat shock transcription factors, Hsfs)，當熱休克轉錄因子於細胞質，為單體屬於不活化狀態，當進入細胞核內，形成有活性之三聚體，便能與高溫調控因子上保守序列結合，開啟轉錄作用 (Baniwal et al., 2004)。基因默化番茄熱逆境轉錄因子 *HsfA1a*，基因默化之轉殖株以 1 小時 45°C 高溫處理後，轉殖株死亡；當處理溫度提高到 1 小時 51°C 時，過量表達之轉殖株仍可正常生長，結果顯示番茄 *HsfA1a* 具有在高溫逆境下調控熱休克蛋白質基因的表現 (Baniwal et al., 2004)。植物熱逆境轉錄因子除了能調控熱逆境相關基因表現之外，還具有調控其他逆境相關之基因，過量表達小麥 *TaHsfA4a* 之水稻轉

植株，能在 200 μ M CdCl₂ 金屬逆境下，調控 *MT-I-1a* 基因增加表現量，促進植株內合成金屬硫蛋白 (metallothionein)，使轉植株有較高之重金屬離子耐受性 (Shim et al., 2009)。

比較香蕉 MhDnaJ、楊樹 (POPTRDRAFT_816316) (Tuskan et al., 2006) 與蓖麻 (RCOM_1033260) (Chan et al., 2010) 啟動子序列上之 cis-acting element，顯示三者都具有多個熱逆境轉錄因子，且香蕉 MhDnaJ 與楊樹還具有一個離層酸調控因子 (ABRE) 與四個光調控因子 (G-box) (表四)。

二、香蕉 *MhDnaJ* 蛋白質定位分析

分析香蕉 MhDnaJ 胺基酸序列，具有 Nuclear localization signal (NLS) (Makkerh et al., 1996) 與 Nuclear export signal (NES) 胺基酸序列 (Cour et al., 2003) (圖六)，故推測香蕉 MhDnaJ 應有進出細胞核之能力。將香蕉 MhDnaJ 與 GFP 融合，進行阿拉伯芥原生質體轉殖與基因槍法轉殖於洋蔥表皮細胞，蛋白質定位分析結果顯示，MhDnaJ:GFP 融合蛋白螢光訊號確實出現於細胞核內 (圖九、十)。與香蕉 MhDnaJ 同為 type III 之 J protein 的阿拉伯芥 OWL1 (At2g35720)，經以 35S 啟動子驅動 OWL1-GFP，以基因槍法槍擊洋蔥表皮細胞，進行暫時性定位分析，亦顯示 OWL1-GFP 於細胞質表達，但會大量累積於細胞核內 (Kneissl et al., 2009)。此外，阿拉伯芥 DNAJ HOMOLOG 3 (J3, At3g44110) 為典型 type I 的 J protein 亦具有進入細胞核的能力 (Shen et al., 2011)；而菸草 Tsip1 亦為 type I 的 J protein，以 35S 啟動子驅動 Tsip1-GFP，進行阿拉伯芥原生質體轉殖，顯示 Tsip1-GFP 表達於葉綠體表面，但於 1 mM SA 處理後，Tsip1-GFP 會離開葉綠體表面並移動至細胞質 (Ham et al., 2006)。然而目前只確認香蕉 MhDnaJ 能進入細胞核內，至於是否具有出細胞核或移動至其他胞器，還需要作進一步試驗分析。

表四、不同作物 *DnaJ* 啟動子區域反應序列之比較

Table 4. Comparison of responsive elements in the promoter region among *DnaJ* from *Musa* spp. Hsien Jin Chiao (MhDnaJ), *Populus trichocarpa* (PtDnaJ, Gene symbol: POPTRDRAFT_816316), and *Ricinus communis* (RcDnaJ, Gene symbol: RCOM_1033260).

Motif	Sequence	Regulatory function	<i>MhDnaJ</i>	<i>PtDnaJ</i>	<i>RcDnaJ</i>
ABRE	CACGTG	<i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	1	1	-
ARE	TGGTTT	<i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction	-	3	-
AuxRR-core	GGTCCAG	<i>cis</i> -acting element involved in auxin responsiveness	1	-	-
AT1-motif	AATTATTTTTTATT	part of a light responsive module	-	1	-
CGTCA-motif	CGTCA	<i>cis</i> -acting element involved in MeJA- responsiveness	6	-	-
G-box	CACGTC	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	4	4	-
GARE-motif	TCTGTTG	gibberellin-responsive element	-	2	-
GATA-motif	GATAAGG	part of a light responsive element	1	1	-
HD-Zip 1	CAAT(A/T)ATTG	element involved in differentiation of the palisade mesophyll cells	-	1	-
HD-Zip 2	CAAT(G/C)ATTG	element involved in the control of leaf morphology development	-	1	-
HSE	AGAA	<i>cis</i> -acting element involved in the heat stress responsiveness	5	7	6
MBS	CAACTG TAACTG	MYB binding site involved in drought-inducibility	1	-	-
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	<i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness	-	2	2

-: Indicates motif lack in promoter region.

三、香蕉 *MhDnaJ* 啟動子活性分析

為瞭解香蕉 *MhDnaJ* 啟動子，於不同生長發育階段啟動子表現情形，選取單一拷貝之菸草轉殖株 *Nt-MhDnaJ_{pro}::GUS-2* 之 T1 種子，無菌播種後觀察 5、10、15、20、25 與 30 天數之啟動子活性，結果啟動子皆無表現 (圖十三)，但菸草 R1 轉殖株啟動子於柱頭發育早期 (stages 2-4) 與後期 (stage 8)、雄蕊發育後期 (stages 8-9) (圖十四) 與果實發育早期 (stages 10-11) 表現 (圖十五)，顯示香蕉 *MhDnaJ* 啟動子於花器表現，與此基因由香蕉後熟果實 cDNA 庫分離得到結果相符。然而阿拉伯芥 type I *DnaJ* (NP-565533.1) 於根、莖、葉、花及果莢都有 mRNA 表現 (Zhao et al., 2010); 阿拉伯芥 type I *DNAJ* HOMOLOG 3 (*J3*, At3g44110) 與 type III *OWL1* (At2g35720) mRNA 亦是於全株皆有表現 (Kneissl et al., 2009; Shen et al., 2011)，此結果與香蕉 *MhDnaJ* 啟動子於菸草中的表現相異，顯示 *MhDnaJ* 基因特性與 type I *DnaJ* (NP-565533.1) 及 *J3* (At3g44110) 或同為 type III *OWL1* (At2g35720) 不同，可另就阿拉伯芥進行分析較易比較。另外，本實驗室前人以北方雜交分析 *MhDnaJ* 之表現情形，未獲得雜交結果，顯示此基因表現量低，可另進行 Quantitative real-time PCR，分析香蕉 *MhDnaJ* 基因於全株之表現情形做為對照。

陸、結語

本研究已完成香蕉 *MhDnaJ* 基因結構與啟動子序列分析，並將香蕉 *MhDnaJ* 啟動子引導 GUS 報導基因之表達質體，轉殖於菸草進行分析，顯示啟動子活性表現於花器。另外，以 2 X 3S5 啟動子驅動香蕉 *MhDnaJ::GFP* 融合螢光蛋白，進行暫時性表現分析，確認香蕉 *MhDnaJ* 蛋白質表達於細胞核。

未來將分析香蕉 *MhDnaJ* 啟動子引導 GUS 報導基因之阿拉伯芥轉殖株，以及進行香蕉 *MhDnaJ* 蛋白質穩定性表達分析，並進一步分析過量表達與基因默化之菸草與阿拉伯芥轉殖株，確認香蕉 *MhDnaJ* 基因功能。



柒、參考文獻

- 邱輝龍、許圳塗. 2005. 香蕉作物栽培種之起源. 臺灣園藝 51: 1-12.
- Alexander, D. C. 1987. An efficient vector-primer cDNA cloning system. Meth. Enzymol. 154: 41-64.
- Amin, J., J. Ananthan, and R. Voellmy. 1988. Key features of heat shock regulatory elements. Mol. Cell. Biol. 8: 3761-3769.
- Argüello-Astorga, C. R. and L. R. Herrera-Estrella. 1996. Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. Plant Physiol. 112: 1151-1166.
- Bai, F. and D. A. DeMason. 2006. Hormone interactions and regulation of unifoliata, *PsPK2*, *PsPIN1* and *LE* gene expression in pea (*Pisum sativum*) shoot tips. Plant Cell Physiol. 47: 935-948.
- Baniwal, S. K., K. Bharti, K. Y. Chan, M. Fauth, A. Ganguli, S. Kotak, S. K. Mishar, L. Nover, M. Port, K.-D. Scharf, J. Tripp, C. Weber, D. Zielinski, and P. von Koskull-Döring. 2004. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. J. Biosci. 29: 471-487.
- Barnett, T., M. Altschuler, C. N. McDaniel, and J. P. Mascarenhas. 1980. Heat shock induced proteins in plant cells. Dev. Gen. 1: 331-340.
- Bechtold, N., J. Ellis, and G. Pelletier. 1993. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci. 316: 1194-1199.
- Bösl, B., V. Grimminger, and S. Walter. 2006. The molecular chaperone Hsp104—a molecular machine for protein disaggregation. J. Structural Biol. 156: 139-148.
- Bukau, B. and A. L. Horwich. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92: 351-366.

- Busk, P. K. and M. Pagès. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* 37: 425-435.
- Chan, A. P., J. Crabtree, Q. Zhao, H. Lorenzi, J. Orvis, D. Puiu, A. Melake-Berhan, K. M. Jones, J. Redman, G. Chen, E. B. Cahoon, M. Gedil, M. Stanke, B. J. Haas, J. R. Wortman, C. M. Fraser-Liggett, J. Ravel, and P. D. Rabinowicz. 2010. Draft genome sequence of the ricin-producing oilseed castor bean. *Nat Biotechnol.* 28: 951-956.
- Cheetham, M. E. and A. J. Caplan. 1998. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* 3: 28-36.
- Choi, H. I., J.-H. Hong, J.-O. Ha, J.-Y. Kang, and S. Y. Kim. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275: 1723-1730.
- Cour, T. L., R. Gupta, K. Rapacki, K. Skriver, F. M. Poulsen, and S. Brunak. 2003. NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res.* 31: 393-396.
- Craig, E. A., P. Huang, R. Aron, and A. Andrew. 2006. The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 156: 1-21.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Doyle, S. M. and S. Wickner. 2008. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem. Sci.* 34: 40-48.
- Ellard-Ivey, M. and C. J. Douglas. 1996. Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 112: 183-192.
- Elizabeth, E. H., G. L. Helmer, R. T. Fraley, and M.-D. Chilton. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168: 1291-1301.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA

- restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Fink, A. L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* 79: 424-449.
- Ham, B.-K., J. M. Park, S.-B. Lee, M. J. Kim, I.-J. Lee, K.-J. Kim, C. S. Kwon, and K.-H. Paek. 2006. Tobacco Tsip1, a DnaJ-type Zn finger protein, is recruited to and potentiates Tsi1-mediated transcriptional activation. *Plant Cell* 18: 2005-2020.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Haslbeck, M. 2002. sHsps and their role in the chaperone network. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1649-1657.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, and R. A. Schilperoort. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- Hofagen, R. and L. Willmitzer. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 15: 9877.
- Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Erichholtz, S. G. Rogers, and R. T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Hu, W.-W., S.-M. Wong, C.-S. Loh, and C.-J. Goh. 1998. Synergism in replication of cymbidium mosaic potexvirus (CymMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) RNA in orchid protoplasts. *Arch. Virol.* 143: 1265-1275.
- Jayaraman, K., S. A. Fingar, J. Shah, and J. Fyles. 1991. Polymerase chain reaction-mediated gene synthesis: synthesis of a gene coding for isozyme c of horseradish peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4084-4088.
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.

- Key, J. L., C. Y. Lin, and Y. M. Chen. 1981. Heat shock proteins of higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3526-3530.
- Kim, S., J.-Y. Kang, D.-I. Cho, J. H. Park, and S. Y. Kim. 2004. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. Plant J. 40: 75-87.
- Klein, M., E. D. Wolf, R. Wu, and J. C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70-73.
- Kneissl, J., V. Wachtler, N.-H. Chua, and C. Bollea. 2009. OWL1: an *Arabidopsis* J-domain protein involved in perception of very low light fluences. Plant Cell 21: 3212-3225.
- Kobayashi, M., H. Katoh, T. Takayanagi, and S. Suzuki. 2010. Characterization of thermotolerance-related genes in grapevine (*Vitis vinifera*). J. Plant Physiol. 167: 812-819.
- Kotak, S., J. Larkindale, U. Lee, P. von Koskull-Döring, E. Vierling, and K. -D. Scharf. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 10: 310-316.
- Kusmierczyk, A. R. and J. Martin. 2001. Chaperonins - keeping a lid on folding proteins. FEBS Lett. 505: 343-347.
- Lee, S., M. E. Sowa, Y.-H. Watanabe, P. B. Sigler, W. Chiu, M. Yoshida, and F. T.F. Tsai. 2003. The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. Cell 115: 229-240.
- Li, J., X. Qian, and B. Sha. 2003. The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate. Structure 11: 1475-1483.
- Li, J., X. Qian, and B. Sha. 2009. Heat shock protein 40: structural studies and their functional implications. Protein Pept. Lett. 16: 606-612.
- Liscum, E. and J. W. Reed. 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. Plant Mol. Biol. 49: 387-400.
- Lu, Z. and D. M. Cyr. 1998. The conserved carboxyl terminus and zinc

- finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273: 5970-5978.
- Makkerh, J. P. S., C. Dingwall and R. A. Laskey. 1996. Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* 6:1025-1027.
- Martin, J. and F. U. Hartl. 1993. Protein folding in the cell: molecular chaperones pave the way. *Structure* 1: 161-164.
- Martinez-Yamout, M., G. B. Legge, O. Zhang, P. E. Wright, and H. J. Dyson. 2000. Solution structure of the cysteine-rich domain of the *Escherichia coli* chaperone protein DnaJ. *J. Mol. Biol.* 300: 805-818.
- Menke, F. L. H., A. Champion, J. W. Kijne, and J. Memelink. 1999. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J.* 18: 4455-4463.
- Morimoto, R. 1993. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-1410.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Planta.* 15: 473-497.
- Perez, D. E., J. S. Hoyer, A. I. Johnson, Z. R. Moody, J. Lopez, and N. J. Kaplinsky. 2009. BOBBER1 is a noncanonical arabidopsis small heat shock protein required for both development and thermotolerance. *Plant Physiol.* 151: 241-252.
- Picard, D. 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1640-1648.
- Prodromou, C., S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, and L. H. Pearl. 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP binding site in the hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90: 65-75.
- Queitsch, C., S. -W. Hong, E. Vierling, and S. Lindquist. 2000. Heat shock

- protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479-492.
- Rajan, V.B.V. and P. D'Silva. 2009. *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. *Funct. Integr. Genomics* 9: 433-446.
- Ritossa, F. 1962. A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
- Rouster, J., R. Leah, J. Mundy, and V. Cameron-Mills. 1997. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J.* 11: 513-523.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sato, Y. and S. Yokoya. 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.* 27: 329-334.
- Shen, L., Y. G. G. Kang, L. Liu, and H. Yu. 2011. The J-domain protein J3 mediates the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 499-514.
- Shen, W. J. and B. G. Forde. 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 17: 8385.
- Shim, D., J.-U. Hwang, J. Lee, S. Lee, Y. Choi, G. An, E. Martinoia, and Y. Lee. 2009. Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell* 21: 4031-4043.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sun, W., C. Bernard, B. van de Cotte, M. V. Montagu, and N. Verbruggen. 2001. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 27: 407-415.
- Takabe, T., A. Uchida, F. Shinagawa, Y. Terada, H. Kajita, Y. Tanaka, T. Takabe, T. Hayashi, T. Kawai, and T. Takabe et al. 2008. Overexpression of

- DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* enhances growth rate as well as abiotic stress tolerance of poplar plants. *Plant Growth Regul.* 56:265-273.
- Tanaka, T., B. A. Antonio, S. Kikuchi, T. Matsumoto, Y. Nagamura, H. Numa, H. Sakai, J. Wu, T. Itoh, T. Sasaki. 2008. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): 2008 update. *Nucleic Acids Res.* 36: 1028-1033.
- Theologis, A., J. R. Ecker, C. J. Palmk, N. A. Federspiel, S. Kaul, O. White, J. Alonso, H. Altafi, R. Araujok, C. L. Bowman et al. 2000. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 816-820.
- Tissieres, A., H. K. Mitchell, and U. M. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84: 389-398.
- Tsai, J. and M. G. Douglas. 1996. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J. Biol. Chem.* 271: 9347-9354.
- Tsuchisak, A. and A. Theologis. 2004. Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol.* 136: 2982-3000.
- Tuskan, G. A., S. DiFazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S. Ralph, S. Rombauts, A. Salamov et al. 2006. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596-1604.
- Ulmasov, T., Z.-B. Liu, G. Hagen, and T. J. Guilfoyle. 1995. Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7: 1611-1623.
- Urao, T., K. Yamaguchi-Shinozaki, S. Urao, and K. Shinozaki. 1993. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5: 1529-1539.
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Physiol.*

- Plant Mol. Biol. 42: 579-620.
- Vinocur, B. and A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 123-132.
- Wang, H., B. Jones, Z. Li., P. Frasse, C. Delalande, F. Regad, S. Chaabouni, A. Latché, J.-C. Pech, and M. Bouzayena. 2005. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17: 2676-2692.
- Wang, W., B. Vinocur, O. Shoseyov, and A. Altman. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244-252.
- William B. T. and A. R. Cashmore. 1995. Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 445-74.
- Xiao, H. and J. T. Lis. 1988. Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Sci.* 239: 1139-1142.
- Xu, X., H. Song, Z. Zhou, N. Shi, Q. Ying, and H. Wang. 2010. Functional characterization of AtHsp90.3 in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Biotechnol. Lett.* 32: 979-987.
- Yamada, K. and M. Nishimura. 2008. Cytosolic heat shock protein 90 regulates heat shock transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling Behavior* 3: 660-662.
- Yabe, N., T. Takahashi, and Y. Komeda. 1994. Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene *HSP81*. *Plant Cell Physiol.* 35: 1207-1219.
- Yang, J.-Y., Y. Sun, and A.-Q. Sun. 2006. The involvement of chloroplast HSP/ClpB in the acquired thermotolerance in tomato. *Plant Mol. Biol.* 62: 385-395.
- Yoo, S.-D., Y.-H. Cho, and J. Sheen. 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 2: 1565-1572.

- Zahur, M., A. Maqbool, M.Irfan, M. Y. K. Barozai, U. Qaiser, B. Rashid, T. Husnain, and S. Riazuddin. 2009. Functional analysis of cotton small heat shock protein promoter region in response to abiotic stresses in tobacco using *Agrobacterium*-mediated transient assay. *Mol. Biol. Rep.* 36: 1915-1921.
- Zhang, X., Y. H. Hu, C. H. Jiang, W. Z. Zhang, Z. Li, and F. Ming. 2011. Isolation of the Chinese rose sHSP gene promoter and its differential regulation analysis in transgenic *Arabidopsis* plants. *Mol. Biol. Rep.* DOI 10.1007/s11033-011-0843-x.
- Zhao, Z., W. Zhang, J. Yan, J. Zhang, Z. Liu, X. Li and Y. Yi. 2010. Over-expression of *Arabidopsis* DnaJ (Hsp40) contributes to NaCl-stress tolerance. *African J. Biotechnol.* 9: 972-978.

