

國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所

碩士論文

Institute of Molecular and Cellular Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master's Thesis

阿拉伯芥 NLP1/2 在硝酸鹽與銨鹽反應中的角色

The role of AtNLP1/2 in the nitrate and ammonium response

蘇宗柏

Tsung-Po Su

指導教授：蔡宜芳 博士

Advisor: Yi-Fang Tsay, Ph. D.

中華民國 114 年 8 月

August, 2025



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY



阿拉伯芥 NLP1/2 在硝酸鹽和銨鹽反應中的角色

The role of AtNLP1/2 in the nitrate and ammonium response

本論文係蘇宗柏 (R12B43002) 在國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國 114 年 7 月 30 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Institute of Molecular and Cellular Biology on 30, July, 2025 have examined a Master's thesis entitled above presented by Tsung-Po Su (R12B43002) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

(指導教授 Advisor)

系（所、學位學程）主管 Director: _____



致謝

非常感謝蔡宜芳教授給我一個機會，陪我走過碩士生的旅程。還記得第一次和老師見面的時候，老師告訴我「做研究不能只靠熱忱，專業知識和研究技術也要有」，經歷這 2 年研究時光的我瞭解了這句話的涵義。科學比我想像的更加豐富，不僅僅是做實驗而已，每一步都要非常謹慎、理性且客觀。我的研究能力就像 qPCR 的曲線，Cp 值是 18 個月。今年初出現了轉變，換了思考方式、調整了實驗的安排之後，獲得了意想不到的收穫。從過去的直覺，到現在學會比較不同次實驗的數據、透過比較不同組別來描述結果和下結論、找到實驗的問題並設法解決，原來自已真的進步了。在某次報告完被老師稱讚「你今天報的很不錯耶，進步很多哦」，我重拾希望，因為那代表著自己的努力終於有了回報，被肯定有一定的研究能力。謝謝老師提供很多資源與數不清的專業指導，並耐心地帶我成長。

此外，還要感謝實驗室每一位學長姐的熱心幫助，推進我的實驗，也使我在研究的路上不會感到任何一絲孤單。特別要感謝又瑄博士，花費了很多的時間與心力指導我，不僅帶我按部就班，從簡單的事情開始做起，還在困難的地方願意多用幾句淺顯易懂的話語讓我明白，又同時讓我學會兼顧研究和心理狀態的平衡。她為了幫助我的學習不遺餘力，是我心目中最棒的學姐。

最後，感謝我的家人，不論我發生什麼事情、遇到什麼困難，都給予精神上的最大支持，讓我跨越了障礙，成為撞牆期的自己所想像不到的模樣。

這段回憶，我會一直放在心上；這些收穫，我會永遠帶在身旁。

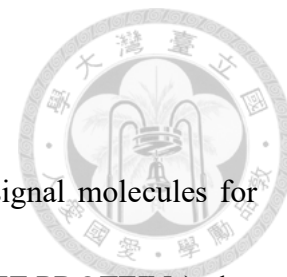
中文摘要



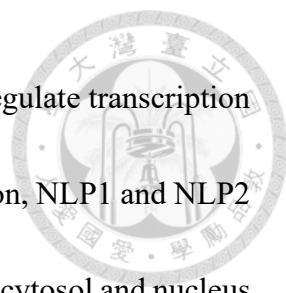
硝酸鹽和銨鹽是植物生長發育的氮源與訊息分子。在硝酸鹽和銨鹽所誘發的轉錄反應中，轉錄因子 NLP (NIN-LIKE PROTEIN) 扮演重要角色。最近研究發現序列相近的 NLP6 和 NLP7 在硝酸鹽反應是功能部分重疊的正調控因子，且在銨鹽反應是功能完全重疊的負調控因子。然而，其他 7 個 NLP 蛋白之間的關係尚待釐清。在序列相近的 *nlp* 雙突變株中，只有 *nlp1nlp2* 和 *nlp6nlp7* 在硝酸鹽有生長遲緩，而 *nlp4nlp5* 和 *nlp8nlp9* 的生長和野生型相近，顯示 NLP1 與 NLP2 的關係可能和 NLP6 與 NLP7 相似。因此，本研究的目的是探討 NLP1 和 NLP2 在硝酸鹽訊息傳遞和銨鹽訊息傳遞的功能。對於調控生長，NLP2 在低硝酸鹽時的功能比 NLP1 更重要，而 NLP1 和 NLP2 在高硝酸鹽時有些相加 (additive) 的關係；NLP2 和 NLP7 在低硝酸鹽和高硝酸鹽時都有相乘 (synergistic) 的關係，而 NLP2 和 NLP7 在銨鹽時的功能重疊。對於調控基因表現，NLP2 正向調控 *HYH*、*BEE2*、*ERF60*、*LBD38*、*MAPKKK14*、*ZAT1*、*UMAMIT36*、*Atlg22170* 和 *PRS2* 的高硝酸鹽誘導轉錄，而 NLP1 對這些基因的貢獻較少或是沒有貢獻。在銨鹽時，*nlp2nlp7* 的轉錄反應和 *nlp6nlp7* 雙基因剔除突變株 (double knockout mutant) 相似，顯示 NLP2/7 和 NLP6/7 負向調控一樣的銨鹽反應基因的轉錄。對於細胞內的分布，NLP1 和 NLP2 在硝酸鹽的條件下可能分布於細胞質，而 NLP1 和 NLP2 在銨鹽的條件下都分布於細胞質和細胞核。有趣的是，NLP2/7 和 NLP6/7 在高硝酸鹽負向調控地上部的硝酸鹽濃度，並正向調控地上部硝酸還原酶的活性。總結來說，NLP2 在硝酸鹽反應是正調控因子，而 NLP1 的貢獻比 NLP2 微弱。NLP2 和 NLP7 在銨鹽反應是功能可互相取代的負調控因子，而 NLP1 的功能並不明顯。

關鍵詞：NLP 蛋白家族、轉錄因子、功能重疊、初期硝酸鹽反應、基因調控。

Abstract



Nitrate and ammonium are two major nitrogen sources and signal molecules for plant growth and development. Transcription factors NLPs (NIN-LIKE PROTEINS) play important roles in the transcriptional response which is induced by nitrate and ammonium. Recent studies have showed that NLP6 and NLP7 in the same clade were partially functionally redundant activators in the nitrate response and completely functionally redundant repressors in the ammonium response. However, the relationship of other 7 NLPs remains to be elucidated. Among the *nlp* double mutants in the same clade, only *nlp1nlp2* and *nlp6nlp7* displayed growth retardation under nitrate, but the growth of *nlp4nlp5* and *nlp8nlp9* was similar to the wild type, indicating that the relationship between NLP1 and NLP2 may be similar to NLP6 and NLP7. Therefore, the function of NLP1 and NLP2 is investigated in the nitrate signaling and ammonium signaling in this study. For growth regulation, the function of NLP2 is more important than NLP1 under low nitrate. There are some additive effects between NLP1 and NLP2 under high nitrate. The relationship of NLP2 and NLP7 is synergistic under low nitrate and high nitrate conditions, but is functionally redundant under ammonium. For gene regulation, NLP2 positively regulates the high nitrate-induced transcription of *HYH*, *BEE2*, *ERF60*, *LBD38*, *MAPKKK14*, *ZAT1*, *UMAMIT36*, *Atlg22170* and *PRS2*, but NLP1 contributes little or no to these genes. Under ammonium, the transcriptional response of *nlp2nlp7* is similar to



nlp6nlp7 double knockout mutant. NLP2/7 and NLP6/7 negatively regulate transcription of the same ammonium-responsive genes. For intracellular localization, NLP1 and NLP2 may localize to the cytosol under nitrate condition, and localize to the cytosol and nucleus under ammonium condition. Interestingly, NLP2/7 and NLP6/7 negatively regulate shoot nitrate concentration and positively regulate shoot nitrate reductase activity under high nitrate. In summary, NLP2 is an activator in the nitrate response, but the contribution of NLP1 is weaker than NLP2. NLP2 and NLP7 are repressors which can functionally replace each other in the ammonium response, but the function of NLP1 is not clear.

Keywords: NLP protein family, transcription factor, functionally redundant, primary nitrate response, gene regulation.

目次



口試委員會審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要 (Abstract)	iv
目次	vi
圖次	ix
第一章 前言 (Introduction)	1
1.1 硝酸鹽和銨鹽是植物的氮源	1
1.2 硝酸鹽和銨鹽是植物的訊息	1
1.3 Nodule-inception like protein (NLP) 家族	2
1.4 研究目的	3
第二章 實驗材料與方法 (Materials and methods)	4
2.1 植物材料 (plant materials)	4
2.2 植物培養液與生長條件 (plant growth medium and growth conditions)	4
2.3 植物鮮重分析 (plant fresh weight assay)	6
2.4 硝酸鹽含量分析 (nitrate content assay)	6
2.5 硝酸還原酶活性分析 (nitrate reductase activity assay)	6
2.6 初期硝酸鹽反應 (primary nitrate response, PNR)	8
2.7 基因表現分析 (gene expression assay)	8
2.8 細胞內蛋白質位置分析 (protein localization assay)	11
2.9 統計分析 (statistical analysis)	13

第三章 結果 (Results).....	14
3.1 NLP1 和 NLP2 在硝酸鹽反應的角色	14
3.1.1 NLP1、NLP2、NLP6 和 NLP7 影響植物在硝酸鹽的生長	14
3.1.2 NLP1/2 在高硝酸鹽對生長有些相加的影響， 而 NLP2/7 在低和高硝酸鹽對生長有相乘的影響	14
3.1.3 NLP2/7 一起比 NLP6/7 一起更明顯負向調控地上部的 硝酸鹽濃度	15
3.1.4 NLP2/7 一起和 NLP6/7 一起正向調控地上部的 硝酸還原酶活性	16
3.1.5 NLP1 和 NLP2 參與低親和性的初期硝酸鹽反應	16
3.1.6 NLP1 和 NLP2 可能在有硝酸鹽時存在於細胞質	18
3.2 NLP1 和 NLP2 在銨鹽反應的角色	18
3.2.1 NLP2 和 NLP7 對銨鹽的生長有重疊的影響	18
3.2.2 NLP2/7 一起和 NLP6/7 一起負向調控一樣的銨鹽反應基因 的轉錄	19
3.2.3 NLP1 和 NLP2 在有銨鹽時存在於細胞質和細胞核	20
第四章 討論 (Discussion).....	21
4.1 NLP1 只影響低硝酸鹽時的生長，而 NLP2 影響低和高硝酸鹽時的 生長	21
4.2 NLP1/2 在高硝酸鹽有些相加的關係， 而 NLP2/7 在低和高硝酸鹽有相乘的關係	21
4.3 NLP2/7 和 NLP6/7 影響地上部的硝酸鹽利用	22

4.4 NLP2 和 NLP7 在硝酸鹽反應是正調控因子， 而 NLP1 可能也參與其中	22
4.5 NLP2 和 NLP7 在銨鹽反應是功能重疊的負調控因子	23
4.6 NLP2 和 NLP6 可能得互相結合或與 NLP7 形成異二聚體才能 調控銨鹽反應基因的表現	24
第五章 圖表 (Figures and tables)	26
第六章 參考文獻 (References).....	45
第七章 附錄 (Appendices).....	49

圖次



第五章 圖表 (Figures and tables)	26
圖一、 <i>nlp1nlp2</i> 和 <i>nlp6nlp7</i> 在硝酸鹽有生長遲緩	26
圖二、 <i>nlp1nlp2</i> 在高硝酸鹽有些相加的生長遲緩， 而 <i>nlp2nlp7</i> 在低和高硝酸鹽有相乘的生長遲緩	28
圖三、 <i>nlp2nlp7</i> 在高硝酸鹽的地上部硝酸鹽濃度增加比 <i>nlp6nlp7</i> 多	30
圖四、 <i>nlp2nlp7</i> 和 <i>nlp6nlp7</i> 在高硝酸鹽的地上部硝酸還原酶活性降低	31
圖五、NLP2 參與低親和性的初期硝酸鹽反應	32
圖六、NLP1 和 NLP2 在有硝酸鹽的環境中可能分布於細胞質	38
圖七、 <i>nlp2nlp7</i> 和 <i>nlp6nlp7</i> 在銨鹽有生長遲緩	39
圖八、NLP2/7 和 NLP6/7 負向調控一樣的銨鹽反應基因的轉錄	41
圖九、NLP1 和 NLP2 在有銨鹽的環境中分布於細胞質和細胞核	44
第七章 附錄 (Appendices)	49
附圖一、 <i>nlp</i> 突變株是剔除突變株	49
附圖二、NLP2 可透過二次轉錄因子調控 NLP2 下游的硝酸鹽誘導基因	55
附圖三、有些 NLP2 下游的硝酸鹽誘導基因不受 NLP7 調控	56
附圖四、NLP1 和 NLP2 不調控 <i>NIA1</i> 和 <i>NIA2</i> 的初期硝酸鹽反應	57
附圖五、NLP1 和 NLP2 互不調控彼此的初期硝酸鹽反應	59
附圖六、細胞內蛋白質位置分析所用的質體之圖譜	60
附圖七、NLP2 可以結合 NLP7 直接調控的銨鹽反應基因	62
附圖八、NLP2 和 NLP7 在銨鹽反應基因的啟動子有重疊的結合位	63

附圖九、阿拉伯芥 NLP 蛋白家族的演化樹.....64

附圖十、阿拉伯芥 NLP1 和 NLP2 的胺基酸序列比對65



第一章

前言



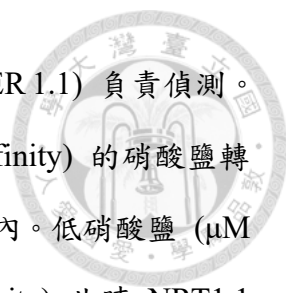
1.1 硝酸鹽和銨鹽是植物的氮源

氮 (nitrogen) 對植物來說很重要，氮是植物的必需大量元素 (macroelement)，是葉綠素 (chlorophyll)、胺基酸 (amino acid)、核酸 (nucleic acid) 和二次代謝物 (secondary metabolite) 的重要成分，影響植物的生長與發育 (O'Brien *et al.*, 2016)。植物的氮源包含硝酸鹽 (nitrate) 和銨鹽 (ammonium) (Krouk *et al.*, 2011)。硝酸鹽和銨鹽分別藉由硝酸鹽轉運蛋白 (nitrate transporter) 和銨鹽轉運蛋白 (ammonium transporter) 吸收進入根部細胞後，硝酸鹽可被硝酸還原酶 (nitrate reductase, NR)、亞硝酸還原酶 (nitrite reductase, NIR) 和麩醯胺酸合成酶/麩胺酸合成酶 (glutamine synthetase/glutamate-2-oxoglutarate aminotransferase, GS/GOGAT) 依序轉換成亞硝酸鹽 (nitrite)、銨鹽和胺基酸 (Krapp, 2015)。

硝酸鹽和銨鹽調控植物的生理反應，硝酸鹽影響種子萌發 (seed germination)、根部形態 (root morphology)、地上部生長 (shoot growth)、開花 (flowering) 與荷爾蒙生合成 (hormone biosynthesis)，銨鹽則影響根部形態、葉片黃化 (leaf chlorosis)、對病原的抗性 (pathogen resistance) 和耐旱性 (drought tolerance) (Lin and Tsay, 2017; Liu and von Wirén, 2017)。

1.2 硝酸鹽和銨鹽是植物的訊息

硝酸鹽是植物的訊息 (Vidal *et al.*, 2015)。硝酸鹽本身可以引發初期硝酸鹽反應 (primary nitrate response, PNR)，在短時間內 (大約 30 分鐘) 快速改變下游硝酸鹽反應基因 (nitrate-responsive gene) 的轉錄 (transcription)。初期硝酸鹽反應受硝酸鹽濃度影響。低硝酸鹽時，下游基因的表現較低；高硝酸鹽時，下游基因的表現較高 (Medici and Krouk, 2014)。硝酸鹽的訊息由細胞膜的硝酸鹽



轉運感知蛋白 (transceptor) NRT1.1 (NITRATE TRANSPORTER 1.1) 負責偵測。NRT1.1 是硝酸鹽的受體 (receptor)，也是雙親和性 (dual-affinity) 的硝酸鹽轉運蛋白，可感知細胞外的硝酸鹽濃度並將硝酸鹽運輸到細胞內。低硝酸鹽 (μM 範圍) 時，磷酸化的 NRT1.1 對硝酸鹽有高親和性 (high-affinity)，此時 NRT1.1 較容易結合硝酸鹽；高硝酸鹽 (mM 範圍) 時，去磷酸化的 NRT1.1 對硝酸鹽有低親和性 (low-affinity)，此時 NRT1.1 較不容易結合硝酸鹽 (Ho *et al.*, 2009; Tsay, 2014; Tsay *et al.*, 2007)。在硝酸鹽的訊息傳導中，轉錄因子 (transcription factor) NLP6/7 (NIN-LIKE PROTEIN 6/7) 的功能很重要，NLP6/7 調控下游硝酸鹽反應基因的表現，包含硝酸鹽轉運蛋白、氮同化酵素 (nitrogen assimilation enzyme) 和轉錄因子 (Wang *et al.*, 2018)。

銨鹽也是植物的訊息，銨鹽可以調控基因的表現 (Patterson *et al.*, 2010)。植物透過細胞膜的銨鹽轉運蛋白 AMT1;1 (AMMONIUM TRANSPORTER 1;1) 感知細胞外的銨鹽濃度並將銨鹽運輸到細胞內，再藉由激酶 CAP1 (CA²⁺-ASSOCIATED PROTEIN KINASE 1) 感知細胞質液的銨鹽濃度，進而影響銨鹽分配在液泡中的比例 (Liu and von Wirén, 2017)。

1.3 Nodule inception-like protein (NLP) 家族

由於 NLP6/7 在硝酸鹽誘導轉錄中有重要功能 (Wang *et al.*, 2018)，所以本研究著重探討 NLP 在氮訊息傳遞中的角色。NLP 蛋白屬於 RWP-RK 轉錄因子家族 (Chardin *et al.*, 2014)。RWP-RK 蛋白最早可以追溯到綠藻 (green algae)，MID (MINUS DOMINANCE) 參與萊茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 的配子發生 (gametogenesis) (Ferris, P. J. and Goodenough, U. W., 1997)。在豆科植物中，NIN (NODULE INCEPTION) 參與百脈根 (*Lotus japonicus*) 的根瘤形成 (nodulation) (Schauser *et al.*, 1999)。阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 有 9 個 NLP 蛋白，按照親緣關係分成 3 個演化分支 (clade)，演化分支 1 有 NLP1/2/3/4/5，演化分支 2 有 NLP6/7，演化分支 3 有

NLP8/9。其中 NLP1 和 NLP2、NLP4 和 NLP5 的親緣關係較近 (附圖 9；Schauser *et al.*, 2005)。

NLP 的蛋白質結構包含 N 端感知硝酸鹽訊息的 NRD (nitrate-responsive domain)、結合 DNA 的 RWP(Arg-Trp-Pro)-RK(Arg-Lys) domain 和 C 端負責蛋白質交互作用的 PB1 (Phox and Bem1) domain (Mu, X. and Luo, J., 2019)。NLP 蛋白可以結合下游硝酸鹽反應基因的 NRE (nitrate-responsive *cis*-element)，來調其轉錄 (Konishi and Yanagisawa, 2013)。此外，NLP 的轉錄受硝酸鹽調控，在植物接觸硝酸鹽的短時間內，NLP1/3 被硝酸鹽誘導，NLP2/4/5/9 被硝酸鹽抑制，而 NLP6/7/8 則無明顯變化 (Wu *et al.*, 2020)。

NLP 蛋白影響植物在硝酸鹽的生理功能，阿拉伯芥的 NLP4/5 在高硝酸鹽正向調控根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*) 誘導的根毛密度增加 (Hernández-Reyes *et al.*, 2022)，NLP8 藉由正向調控 ABA 羧化酶 (abscisic acid hydroxylase) CYP707A2 (CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 2) 的表現來促進硝酸鹽誘導的種子萌發 (Yan *et al.*, 2016)，NLP2 在高硝酸鹽負向調控糖解作用 (glycolysis) 並正向調控三羧酸循環 (tricarboxylic acid cycle)，NLP7 在高硝酸鹽正向調控糖解作用和三羧酸循環 (Durand *et al.*, 2023)，而 NLP6 在硝酸鹽的生長與基因調控與 NLP7 有重疊的功能 (Cheng *et al.*, 2023)。

1.4 研究目的

在阿拉伯芥的 9 個 NLP 蛋白中，NLP2 和 NLP7 對初期硝酸鹽反應的影響最大，且 NLP6 和 NLP7 在銨鹽訊息傳遞是可互相取代的抑制因子 (repressor) (Cheng *et al.*, 2023)。然而，NLP1/3/9 的功能未知，於是想探討分屬同一演化分支 NLP1/2 在硝酸鹽訊息傳遞和銨鹽訊息傳遞的關係。

第二章

實驗材料與方法



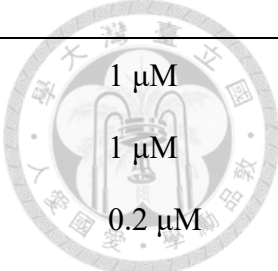
2.1 植物材料 (plant materials)

阿拉伯芥的生態型 (ecotype) 為 Columbia，除了 *nlp2-1* 和 *nlp2-2* (Konishi *et al.*, 2021) 的生態型分別為 Col-3 和 Col-4 之外，其他突變株的生態型均為 Col-0。T-DNA 插入單突變株 *nlp1* (SALK_084809; Konishi *et al.*, 2021)、*nlp2-1* (CS806725)、*nlp2-2* (SK19641)、*nlp3* (SALK_003418; Konishi *et al.*, 2021)、*nlp4* (SALK_139959; Konishi *et al.*, 2021)、*nlp5* (SALK_027488; Konishi *et al.*, 2021)、*nlp6* (SALK_036557; Cheng *et al.*, 2023)、*nlp7* (SALK_026134; Castaing *et al.*, 2009)、*nlp8* (SALK_140298; Yan *et al.*, 2016) 和 *nlp9* (SALK_025839; Yan *et al.*, 2016) 均取自阿拉伯芥生物資源中心 (Arabidopsis Biological Resource Center (<http://abrc.osu.edu/>))。雙突變株 *nlp1nlp2-1*、*nlp2-2nlp7*、*nlp4nlp5*、*nlp6nlp7* 和 *nlp8nlp9* 是透過 *nlp* 單突變株雜交獲得。所有的突變株都藉由 RT-PCR 或 RT-qPCR 確認為剔除突變株 (knockout mutant) (附圖 1)。

2.2 植物培養液與生長條件 (plant growth medium and growth conditions)

1. 植物培養液

培養液	水耕硝酸鹽	水耕銨鹽	PNR 銨鹽	PNR 硝酸鹽
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	1 mM	1 mM	10 mM	10 mM
MgSO ₄	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
CaCl ₂	0.5 mM	0.5 mM	1 mM	1 mM
FeSO ₄ -EDTA	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM
H ₃ BO ₃	50 μM	50 μM	50 μM	50 μM
MnSO ₄ ·H ₂ O	12 μM	12 μM	12 μM	12 μM



ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM
Na ₂ MnO ₄ ·2H ₂ O	0.2 μM	0.2 μM	0.2 μM	0.2 μM
MES	0.05%	0.05%	0.1%	0.1%
KNO ₃	0.1 or 2 mM	-	-	25 mM
NH ₄ Cl	-	2 mM	-	-
Dicyandiamide	-	5 ppm	-	-
(NH ₄) ₂ succinate	-	-	12.5 mM	-
Sucrose	-	-	0.5%	0.5%
pH	5.5	6.5	5.5 or 6.5	5.5

2. 生長條件

(1) 鮮重、硝酸還原酶活性和硝酸鹽含量分析之植物

種子加入無菌水，於 4°C 避光 4 天後，使用水耕盒 (Araponics) 進行水耕培養，以 RO 水培養 3 天，之後再分別換到 0.1 mM 硝酸鹽培養液、2 mM 硝酸鹽培養液和 2 mM 銨鹽培養液，每週更換 2 次培養液。植物生長於長日照 (16 小時光照/8 小時黑暗) 生長室，溫度 22°C，光度 110 μmol m⁻² s⁻¹。

(2) 基因表現分析之植物

種子加入 75% 酒精 1 mL，在旋轉震盪器 (rotator, Adams Nutator model 1105; BD Clay Adams) 上搖晃 2 分鐘，移除酒精後加入消毒液 (20% 漂白水 + 0.5% 十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS)) 後，在旋轉震盪器上搖晃 10 分鐘。接著在無菌操作台 (laminar flow) 中以無菌水 1 mL 清洗 6 次，最後加入無菌水 1 mL，於 4°C 避光 4 天後，使用含有 25 mM 銨鹽培養液 (pH=6.5) 57 mL 的 magenta box (GA-7 vessels, Magenta) 進行水耕培養，每個 box 種 8 叢種子 (每叢約 200 顆種子)，在搖床 (orbital shaker, S103, Firstek Scientific) 上搖晃。8 天後



把液體更換成 25 mM 銨鹽培養液 ($\text{pH} = 5.5$) 處理 16 小時，再用相同的培養液置換並處理 3 小時。植物生長於全日照 (24 小時光照) 生長箱，溫度 24°C ，光度 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

(3) 細胞內蛋白質位置分析之植物

種子加入無菌水，於 4°C 避光 4 天後，使用水耕盒進行水耕培養，以 RO 水培養 3 天，之後再分別換到 2 mM 硝酸鹽培養液和 2 mM 銨鹽培養液，每週更換 2 次培養液。植物生長於中性日照 (12 小時光照/12 小時黑暗) 生長箱，溫度 22°C ，光度 $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

2.3 植物鮮重分析 (plant fresh weight assay)

第 16 天收集植物樣品，剪下地上部，放入 1.5 mL 離心管後，用電子天秤秤重 (XPE105 DeltaRange, Mettler Toledo)。每個樣品取自 1 株植物的地上部，共 9 重複。

2.4 硝酸鹽含量分析 (nitrate content assay)

第 16 天收集植物樣品，剪下地上部，放入 2 mL 離心管後，再放入液態氮。接著將樣品用真空冷凍乾燥機 (FD24-5S freeze dryer, KESIN Scientific) 冷凍乾燥 2 天後，測量其乾重，以 1000 倍乾重的蒸餾水 (1 mg 乾重: 1000 μL 蒸餾水) 煮沸 30 分鐘以萃取植物的硝酸鹽，冷卻後以 0.22 μM 濾膜 (Jet Biofil) 過濾，取上清液。用高效液相層析儀 (1260 Infinity II LC System, Agilent Technologies) 檢測 OD200，並以 0、5、25、50、100、250、500 和 1000 μM 硝酸鉀作為標準曲線，回推樣本的硝酸鹽含量。流動相緩衝液用 50 mM 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4 , $\text{pH} = 3.5$)。每個樣品取自 3 株植物的地上部，共 3 重複。

2.5 硝酸還原酶活性分析 (nitrate reductase activity assay)

1. 蛋白質萃取



第 16 天收集植物樣品，剪下地上部，放入 1.5 mL 離心管中，用電子天秤秤重 (AB54-S/FACT, Mettler Toledo) 後，加入液態氮，以研磨棒磨碎。接著加入 5 倍鮮重的萃取緩衝液 (1 mg 鮮重: 5 μ L 萃取緩衝液) (maximum form: 0.1 M HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 1 mM 二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT), 1X 蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor, Sigma) 和 1 mM 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA); active form: 0.1 M HEPES、1 mM 二硫蘇糖醇、1X 蛋白酶抑制劑和 1 mM 氯化鎂) 混勻，以 4°C, 14500 rcf 離心 15 分鐘後，取上清液 200 μ L 至 1.5 mL 離心管中。每個樣品取自數株地上部 (重量至少 40 mg)，共 3 重複。

2. 硝酸鹽還原反應與亞硝酸鹽呈色

在玻璃試管中加入 Q 水 400 μ L 和上清液 50 μ L，再加入分析緩衝液 (0.5 M HEPES、0.1 M 硝酸鉀和 1 mM β -還原型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)) 50 μ L (沒有 β -NADH 的分析緩衝液作為空白溶液) 開始反應。室溫靜置 15 分鐘後加入 0.5 M 醋酸鋅 (zinc acetate) 62.5 μ L 終止反應，接著加入 1% 磺胺 (sulfanilamide, 溶於 3M 鹽酸) 500 μ L。避光靜置 5 分鐘後再加入 0.02% NED (N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride) 500 μ L。避光靜置 15 分鐘後用分光光度計 (DU 800 spectrophotometer, Beckman Coulter) 檢測 OD₅₄₀，並以 0、50、100、200、400、600、800 和 1000 μ M 亞硝酸鈉作為標準曲線，回推樣本的亞硝酸鹽濃度。

3. 蛋白質定量

用 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) 進行蛋白質定量，最後用分光光度計 (iMark microplate reader, Bio-Rad) 檢測 OD₅₇₀，並以 0、1、2、3 和 4 μ g 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作為標準曲線，回推樣本的蛋白質重量。



2.6 初期硝酸鹽反應 (primary nitrate response, PNR)

第 8 天用 25 mM 銨鹽培養液 (pH=5.5) 先後處理 16 小時和 3 小時，第 9 天再用 25 mM 硝酸鹽培養液 (pH=5.5) 處理 0、30、45、60 和 100 分鐘，以鑷子收集根部組織，紙巾擦乾水分，放入鋁箔袋，再放入液態氮，最後於 -80°C 保存。每個樣品取自同一個 magenta box 的 2 叢根部組織 (約 400 株植物)，共 4 重複。

2.7 基因表現分析 (gene expression assay)

1. 核糖核酸萃取 (RNA extraction)

把初期硝酸鹽反應實驗收下來的根部組織放入研鉢中，加入液態氮，以研杵磨碎。接著加入 Trizol (Invitrogen) 1 mL 混勻後，液體轉移到 1.5 mL 離心管中。離心管放室溫 5 分鐘後，加入氯仿 (chloroform) 200 μ L 混勻。放室溫 3 分鐘後再混勻。以 4°C, 14000 rcf 離心 15 分鐘後，取上清液 300 μ L 和異丙醇 (isopropanol) 300 μ L 至新的 1.5 mL 離心管中混勻。 -80°C 處理 16 小時後，以 4°C, 14000 rcf 離心 15 分鐘，再去除上清液。沉澱物先後用 75% 和 100% 酒精清洗，靜置於室溫至少 30 分鐘讓殘餘的酒精揮發，再加入焦碳酸二乙酯處理水 (diethylpyrocarbonate-treated water) 15 μ L 回溶沉澱物。用分光光度計 (NanoDrop 2000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) 檢測 OD260/280、OD260/230 後，將 total RNA 稀釋至 500 ng/ μ L。

2. 反轉錄 (reverse transcription)

取 500 ng/ μ L RNA 2 μ L，加入 1 μ g/ μ L oligo dT 1 μ L (Genomics) 和焦碳酸二乙酯處理水 2 μ L。樣品放入聚合酶連鎖反應器 (Labcycler 96, Sensoquest)，70°C 處理 5 分鐘。接著加入 5X 反應緩衝液 (reaction buffer, Promega) 4 μ L、25 mM 氯化鎂 (Promega) 3 μ L、2.5 mM 去氧核苷三磷酸 (dNTP, Genomics) 4 μ L、反轉錄酶 (reverse transcriptase, Promega) 1 μ L、40

u/μL 核糖核酸酶抑制劑 (ImProm-II Reverse Transcription System, Promega) 0.5 μL 和焦碳酸二乙酯處理水 2.5 μL 後，樣品放入聚合酶連鎖反應器，25°C 處理 5 分鐘，42°C 處理 90 分鐘，70°C 處理 15 分鐘來合成 cDNA。

3. 即時定量聚合酶連鎖反應 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR)

cDNA 加入焦碳酸二乙酯處理水 180 μL (稀釋 10 倍) 後混勻，取 cDNA 5 μL，加入 2X SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics) 10 μL、10 μM 前置引子 (forward primer) 1 μL、10 μM 反置引子 (reverse primer) 1 μL 和焦碳酸二乙酯處理水 3 μL。最後用即時定量核酸分析系統 (LightCycler 480 II, Roche Diagnostics) 進行擴增與分析 cDNA 的量，*ACT2* (*ACTIN2*) 做為參考基因 (reference gene)。

4. 引子列表 (primer list)

基因	AGI number	引子	引子序列 (5'-3')
<i>ACT2</i>	<i>At3g18780</i>	forward	ATCAATTCGATCACTCAGAGC
<i>ACT2</i>	<i>At3g18780</i>	reverse	CTATGATGCACTTGTGTGTGA
<i>HYH</i>	<i>At3g17609</i>	forward	ACAATGACCAGCTCGAAGAGAAGA
<i>HYH</i>	<i>At3g17609</i>	reverse	ACACTGAACAATGGATTAAAGGGTAA
<i>BEE2</i>	<i>At4g36540</i>	forward	CCACCGACAGACATAGCTTA
<i>BEE2</i>	<i>At4g36540</i>	reverse	CTTGTTGTTGCAGAGATTGG
<i>ERF60</i>	<i>At4g39780</i>	forward	CAAGCTAAGAGGCGAGTT
<i>ERF60</i>	<i>At4g39780</i>	reverse	TACTCTGTTTTTGGCGGGAA
<i>LBD38</i>	<i>At3g49940</i>	forward	TAAACCTTGCCGTTTAAGGAAGAT
<i>LBD38</i>	<i>At3g49940</i>	reverse	CACCGGCGTTGTTGTTTTGAA
<i>ABF2</i>	<i>At1g45249</i>	forward	TTGGAAGTAGTGGAGTAGGG
<i>ABF2</i>	<i>At1g45249</i>	reverse	CATTACCAAAGTAACCGCC
<i>MAPKKK14</i>	<i>At2g30040</i>	forward	GAGAGTGACGTGTGGTCTTTA



<i>MAPKKK14</i>	<i>At2g30040</i>	reverse	TCTCTCCCGAGTTCCGATA
<i>ZAT1</i>	<i>At1g02030</i>	forward	CTCACATGCTCATTACC
<i>ZAT1</i>	<i>At1g02030</i>	reverse	TCCCTTCTTCGTTGGATTG
<i>UMAMIT36</i>	<i>At1g70260</i>	forward	CTATCTTCTCTTGGCCACT
<i>UMAMIT36</i>	<i>At1g70260</i>	reverse	ACGAGACTATTGTTCCCATC
<i>At1g22170</i>	<i>At1g22170</i>	forward	GCAGCTCAATGAAAGAATGTAT
<i>At1g22170</i>	<i>At1g22170</i>	reverse	CTACTGCTCTCTCAGCAC
<i>PRS2</i>	<i>At1g32380</i>	forward	GGATACGCAAGAGCTGATAG
<i>PRS2</i>	<i>At1g32380</i>	reverse	CTGGCAATAGACATGATCCAC
<i>NIA1</i>	<i>At1g77760</i>	forward	ACTAGGGCACATCGAG
<i>NIA1</i>	<i>At1g77760</i>	reverse	TGCTTACTAGCCCATCC
<i>NIA2</i>	<i>At1g37130</i>	forward	GGCTCATGTCTCAGTACC
<i>NIA2</i>	<i>At1g37130</i>	reverse	GGTATTGCTCTGCCCA
<i>NLP1</i>	<i>At2g17150</i>	forward	TCAAGGAGCCTCTTGTTCTTG
<i>NLP1</i>	<i>At2g17150</i>	reverse	ATGTCGCTTTCACCTTGATGG
<i>NLP2</i>	<i>At4g35270</i>	forward	TGGTACTGGCACTTCCTTCA
<i>NLP2</i>	<i>At4g35270</i>	reverse	TGATGGTGGTGACTTTGGAG
<i>SPL14</i>	<i>At1g20980</i>	forward	GAGCTGGAACACTCTTCG
<i>SPL14</i>	<i>At1g20980</i>	reverse	CGGTTTGGTCAACTACCTC
<i>At1g26940</i>	<i>At1g26940</i>	forward	GCAAAGGAAAGAAGCTGAG
<i>At1g26940</i>	<i>At1g26940</i>	reverse	AGCATACTGGCGATCAAG
<i>GGT1</i>	<i>At1g23310</i>	forward	TGAATGTGGACAGCGAG
<i>GGT1</i>	<i>At1g23310</i>	reverse	TCCAGGCTTTGGAGGATTA
<i>PMT6</i>	<i>At4g36670</i>	forward	TGCGGCAGTGGCGTGGA
<i>PMT6</i>	<i>At4g36670</i>	reverse	GCGTACTTTATCACCGTCTCTTTGAA



<i>UGT85A1</i>	<i>At1g22400</i>	forward	GCTGACCAGCAAATGAAT
<i>UGT85A1</i>	<i>At1g22400</i>	reverse	AAGTTTATGTTCCGTCGC
<i>GDH3</i>	<i>At3g03910</i>	forward	CTCAGGAGGAGTCACTGT
<i>GDH3</i>	<i>At3g03910</i>	reverse	TAATACCGAGGGTGAAAGC
<i>LPR1</i>	<i>At1g23010</i>	forward	GATAACCATCCGTTACACATTC
<i>LPR1</i>	<i>At1g23010</i>	reverse	TTTCCCACGAGCGTATT
<i>STP13</i>	<i>At5g26340</i>	forward	GTCATCGCCGTCGCTTTA
<i>STP13</i>	<i>At5g26340</i>	reverse	GTTGAGAGGACGTTGACT

2.8 細胞內蛋白質位置分析 (protein localization assay)

1. 製備帶有質體 (plasmid) 的大腸桿菌 (*Escherichia coli*)

用 pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen) 製備分別帶有質體 pro35S:NLP1-GFP、pro35S:NLP2-GFP 和 pro35S:NUC-L1-RFP 的大腸桿菌。

2. 質體萃取

將帶有質體的大腸桿菌接種至含 0.1 mg/mL ampicillin 的固態 LB 中 (含有 2.5% LB broth (Miller) 和 2% Difco agar)，於 37°C 培養 16 小時。接著挑選單一菌落 (single colony)，用含 0.1 mg/mL ampicillin 的液態 LB (含有 2.5% LB broth (Miller))。於 37°C 培養 8 小時後，以液態 LB 稀釋 500 倍。於 37°C 培養 16 小時後，用 Plasmid Midi kit (Qiagen) 萃取質體，最後用分光光度計 (NanoDrop 2000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) 檢測 OD_{260/280}、OD_{260/230}，於 4°C 保存。

3. 抽原生質體 (protoplast)

第 19 天收集植物樣品，剪下葉片，用砂紙輕磨下表皮，用鑷子把葉片放入 protoplast medium (含有 500 mM 山梨醇 (sorbitol)、1 mM 氯化鈣和 10 mM MES，pH = 5.7) 中。接著把 medium 置換成有 1% 纖維素酶



(cellulase) 和 0.5% 離析酶 (macerozyme) 的 protoplast medium，於 31°C 避光直到葉緣皺縮 (1.5 - 2 小時)。隨後用 100 μ M 濾膜 (Greiner Bio-One) 過濾，在濾液中加入 100% percoll (含有 500 mM 山梨醇、1 mM 氯化鈣和 20 mM MES, pH=6.0) 2 mL，以 4°C，400 rcf 離心 8 分鐘。去除上清液，混勻液體後，依序加入 1 倍體積的 30% percoll (含有 430 mM 山梨醇、21 mM 葡萄糖酸鉀 (potassium-D-gluconate)、20 mM HEPES 和 0.7 mM 二硫蘇糖醇) 和 0.7 倍體積的山梨醇緩衝液 (含有 400 mM 山梨醇、30 mM 葡萄糖酸鉀、20 mM HEPES 和 1 mM 二硫蘇糖醇)，以 4°C，250 rcf 離心 8 分鐘。去除上清液後混勻液體，加入 W5 溶液 (含有 2 mM MES、5 mM 氯化鉀、154 mM 氯化鈉、125 mM 氯化鈣和 5 mM 葡萄糖) 至總體積為 25 mL，以 4°C，100 rcf 離心 2 分鐘。去除上清液，混勻液體後，藉由複式顯微鏡 (Optiphot-2, Nikon) 和血球計數器 (hemocytometer, Kimble) 測量原生質體的濃度。

4. 轉染 (transfection)

原生質體在冰上靜置 30 分鐘後，以 4°C，100 rcf 離心 2 分鐘。去除上清液，混勻液體後，加入 MMG 溶液 (含有 400 mM 甘露醇 (mannitol)、15 mM 氯化鎂和 4 mM MES) 3 mL，再以 4°C，100 rcf 離心 2 分鐘。去除上清液，混勻液體後，加入適當體積的 MMG 溶液 (最終反應的原生質體至少 10^5 個)。在 6 mL 試管中加入原生質體 200 μ L 和質體 70 μ L (含有 NLP-GFP 30 μ g 和 NUC-L1-RFP 3 μ g)，混勻液體後再加入 PEG 溶液 (含有 40% 聚乙二醇 4000、200 mM 甘露醇和 100 mM 氯化鈣) 270 μ L 開始反應。室溫靜置 10 分鐘後加入 W5 溶液 3 mL 終止反應，以 4°C，100 rcf 離心 2 分鐘。去除上清液，混勻液體後，加入有 0.5 mM 硝酸鉀或 0.5 mM 氯化銨的 W5 溶液 3 mL。混勻液體後把液體轉移到 6 孔組織培養盤 (Jet Biofil) 中，於 24°C 照光 40 小時，光度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

5. 鏡檢 (microscopy)



藉由共軛焦顯微鏡 (confocal microscope, LSM780, Carl Zeiss) 和 ZEN 2010 B SP1 軟體拍攝原生質體的照片，以放大倍率 40X 的物鏡 (objective, Plan-Apochromat 40x/0.95 Korr Ph3 M27) 觀察，用波長 488、561 和 633 nm 的氬氣雷射 (argon laser) 分別讓綠螢光蛋白 (green fluorescent protein)、紅螢光蛋白 (red fluorescent protein) 和葉綠素 (chlorophyll) 激發後，收集 489 - 541、568 - 620 和 646 - 758 nm 的螢光。圖像以綠色表示綠螢光蛋白，橘色表示紅螢光蛋白，紅色表示葉綠素。每個樣品取自 1 個細胞，共 4 重複。

2.9 統計分析 (statistical analysis)

藉由 Microsoft excel 專業增強版 2019 搭配 Real Statistics Resource Pack (<http://real-statistics.com/free-download/real-statistics-resource-pack/>) 進行統計分析。如果比較的組別只有 2 個，則進行雙尾 Student's t-test 分析不同組別之間的統計顯著差異， $p < 0.05$ 。如果比較的組別超過 2 個，則進行變異數分析 (analysis of variance) 和 Levene's test 後，再透過 Tukey's Honestly Significant Difference (Levene's test 的 $p > 0.05$) 或 Games-Howell (Levene's test 的 $p < 0.05$) 事後檢定 (*post hoc*) 分析不同組別之間的統計顯著差異， $p < 0.05$ 。

第三章

結果



3.1 NLP1 和 NLP2 在硝酸鹽反應的角色

3.1.1 NLP1、NLP2、NLP6 和 NLP7 影響植物在硝酸鹽的生長

在所有的 *nlp* 單突變株中，只有 *nlp2* 和 *nlp7* 有生長遲緩 (Konishi *et al.*, 2021)。已知 NLP6 和 NLP7 在硝酸鹽反應的功能部分重疊 (Cheng *et al.*, 2023)，因此推測其他不同的 NLPs 可能也有功能重疊。為了驗證，挑選突變株 *nlp1nlp2*、*nlp3*、*nlp4nlp5*、*nlp6nlp7* 和 *nlp8nlp9*，在高硝酸鹽 (2 mM NO₃⁻) 條件下水耕培養植物 16 天，分析地上部的鮮重 (圖 1)，想知道分屬同一演化分支的 NLPs 是否功能重疊。結果顯示，和野生型相比，*nlp1nlp2* 和 *nlp6nlp7* 的鮮重分別下降 45% - 48% 和 78% - 79%，*nlp3*、*nlp4nlp5* 和 *nlp8nlp9* 則沒有明顯變化，代表 NLP1 和 NLP2 在硝酸鹽對生長的影響可能像 NLP6 和 NLP7，而 NLP3、NLP4、NLP5、NLP8 和 NLP9 則在硝酸鹽對生長的影響不明顯。因為實驗室的鄭又瑄學姐已詳細研究 NLP6 和 NLP7 的功能 (Cheng *et al.*, 2023)，本研究著重於探討 NLP1 和 NLP2 在氮訊息傳遞中的角色。

3.1.2 NLP1/2 在高硝酸鹽對生長有些相加的影響，而 NLP2/7 在低和高硝酸鹽對生長有相乘的影響

為了探討分屬同一演化分支的 NLP1/2 和不同演化分支的 NLP2/7 之間的關係，挑選突變株 *nlp1*、*nlp2*、*nlp7*、*nlp1nlp2*、*nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7*，在低硝酸鹽 (0.1 mM NO₃⁻) 和高硝酸鹽 (2 mM NO₃⁻) 條件下水耕培養植物 16 天，分析地上部的鮮重 (圖 2)。結果顯示，在低硝酸鹽時，和野生型相比，*nlp1* 的鮮重沒有統計上有意義的變化，*nlp2*、*nlp7*、*nlp1nlp2*、*nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 的鮮重分別降低 19% - 44%、28% - 41%、24% - 50%、79% - 86% 和 67% - 75%，代表 NLP1 在低硝酸鹽的功能不明顯，而 NLP2 和 NLP7 對低硝酸鹽的生長

有相乘 (synergistic) 的影響 ($nlp2 + nlp7 - Col-0 > nlp2nlp7$)。在高硝酸鹽時，和野生型相比， $nlp1$ 、 $nlp2$ 、 $nlp7$ 、 $nlp1nlp2$ 、 $nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ 降低 0% - 25%、16% - 29%、32% - 41%、28% - 49%、76% - 82% 和 73% - 76%，代表 NLP1 和 NLP2 在高硝酸鹽對生長有些相加 (additive) 的影響 ($nlp1 + nlp2 - Col-0 = nlp1nlp2$)，而 NLP2 和 NLP7 在高硝酸鹽對生長有相乘的影響 ($nlp2 + nlp7 - Col-0 > nlp2nlp7$)。

3.1.3 NLP2/7 一起比 NLP6/7 一起更明顯負向調控地上部的硝酸鹽濃度

為了瞭解 $nlp1nlp2$ 、 $nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ 在高硝酸鹽生長遲緩 (圖 2) 的原因，我測量了硝酸鹽含量。先前 (Durand *et al.*, 2023) 研究顯示 $nlp7$ 的地上部硝酸鹽濃度增加至野生型的 1.5 倍，於是想瞭解 NLP1/2/6/7 對植物利用硝酸鹽的情形有無差異，挑選突變株 $nlp1nlp2$ 、 $nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ ，在高硝酸鹽 (2 mM NO_3^-) 條件下水耕培養植物 16 天，分析地上部的硝酸鹽含量 (圖 3)。結果顯示，和野生型相比， $nlp1nlp2$ 、 $nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ 的乾重分別降低 35% - 49%、75% - 80% 和 72% - 76% (圖 3A)， $nlp1nlp2$ 、 $nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ 的硝酸鹽總量分別降低 32% - 46%、62% - 68% 和 64% - 70% (圖 3B)。 $nlp1nlp2$ 、 $nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ 的乾重 (圖 3A) 和硝酸鹽總量 (圖 3B) pattern 一致，代表 $nlp1nlp2$ 、 $nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ 在高硝酸鹽的生長遲緩 (圖 2) 和地上部的硝酸鹽總量有關。在硝酸鹽濃度上， $nlp1nlp2$ 沒有變化，而 $nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ 分別增加 54% - 66% 和 24% - 42% (圖 3C)。 $nlp2nlp7$ 的硝酸鹽濃度比 $nlp6nlp7$ 高，代表 NLP2/7 一起比 NLP6/7 一起更明顯在高硝酸鹽時負向調控地上部的硝酸鹽濃度。

3.1.4 NLP2/7 一起和 NLP6/7 一起正向調控地上部的硝酸還原酶活性

$nlp2nlp7$ 和 $nlp6nlp7$ 地上部硝酸鹽濃度較高 (圖 3C) 可能是因為植物對硝酸鹽的利用差，造成植物生長緩慢 (圖 2)。影響植物體內硝酸鹽含量的因

素有硝酸鹽的吸收、代謝與外送。為了瞭解硝酸鹽代謝的情形，先前 (Durand *et al.*, 2023; Cheng *et al.* 2023) 研究顯示 *nlp7* 地上部的硝酸還原酶活性降低至野生型的 55%，且 *NIA1* (*NITRATE REDUCTASE 1*) 的基因表現受硝酸鹽誘導增加的情形在 *nlp2nlp7* 的幼苗和 *nlp6nlp7* 的根部都不如野生型，因此推測 *nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 的地上部硝酸鹽濃度較高 (圖 3C) 有可能是因為植物的硝酸鹽代謝受損。為了進一步瞭解硝酸鹽代謝的情況，在高硝酸鹽 (2 mM NO_3^-) 條件下水耕培養植物 16 天，分析地上部的硝酸還原酶活性 (圖 4)。結果顯示，*nlp1nlp2* 的硝酸還原酶活性和野生型相近，*nlp2nlp7* 的 maximum form 和 active form 分別是野生型的 50% 和 40%，*nlp6nlp7* 的 maximum form 和 active form 分別是野生型的 60% 和 65%，代表 *nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 的地上部硝酸鹽濃度較高可能是因為硝酸還原酶活性降低。

3.1.5 NLP1 和 NLP2 參與低親和性的初期硝酸鹽反應

已知 NLP2 和 NLP6/7 分別正向調控 20% 和 50% 硝酸鹽誘導基因的轉錄，在受 NLP6/7 正向調控的硝酸鹽誘導基因中，有 31% (74/236) 的基因受 NLP6 和 NLP7 相乘/相加調控 (Durand *et al.*, 2023; Cheng *et al.*, 2023)，但 NLP1 對於調控硝酸鹽誘導基因的角色仍須釐清。為了探討 NLP1 和 NLP2 在調控初期硝酸鹽反應的關係，在 25 mM 銨鹽下水耕培養植物 9 天，隨後用高硝酸鹽 (25 mM NO_3^-) 處理，分析 *nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 根部硝酸鹽誘導基因的相對表現量和相對於零點之誘發倍數變化 (fold change) (圖 5、附圖 4 和附圖 5)，相對於零點之誘發倍數變化代表在接觸硝酸鹽後，基因被硝酸鹽誘導的倍數。

NLP2 可以透過其他轉錄因子來調控更下游基因的表現，首先觀察受 NLP2 調控的 5 個二次轉錄因子 (Durand *et al.*, 2023) 的轉錄量，想知道 NLP1 是否會調控 NLP2 的下游轉錄因子 (附圖 2)。此外，我想尋找更多 NLP1/2 專屬的下游基因，於是從已發表的資料試著尋找只受 NLP2 結合調

控，但不受 NLP7 調控的硝酸鹽誘導基因。再從這 59 個基因中挑選 5 個被硝酸鹽誘導明顯且被 NLP2 調控明顯的基因 (附圖 3; Durand *et al.*, 2023; Cheng *et al.*, 2023), 利用 RT-qPCR 進一步瞭解這些基因在 *nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 的表現情形。結果看到了 3 個 pattern。pattern 1 是 *nlp1nlp2* 的基因表現比 *nlp1* 和 *nlp2* 都低。pattern 2 是 *nlp1nlp2* 的基因表現像 *nlp2*, 而 *nlp1* 像野生型。pattern 3 是 *nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 的基因表現都和野生型相近。

HYH 的結果屬於 pattern 1, 當 *HYH* (*HY5-HOMOLOG*) 在野生型中的表現到達高峰時 (30 - 45 分鐘), 和野生型相比, *nlp1* 中的 *HYH* 表現些微降低 (0%; 15% - 22%), 但 *nlp2* 中的 *HYH* 表現降低 37% - 49%, *nlp1nlp2* 中的 *HYH* 表現降低 44% - 59%, 代表 NLP2 正向調控 *HYH* 的高硝酸鹽誘導轉錄, 而 NLP1 有些微的貢獻 (圖 5A)。 *BEE2* (*BR ENHANCED EXPRESSION 2*)、*ERF60* (*ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 60*)、*LBD38* (*LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 38*)、*MAPKKK14* (*MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 14*)、*ZAT1* (*C2H2-LIKE ZINC FINGER PROTEIN*)、*UMAMIT36* (*USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 36*)、*Atlg22170* (*PHOSPHOGLYCERATE MUTASE FAMILY PROTEIN*) 和 *PRS2* (*PHOSPHORIBOSYL PYROPHOSPHATE SYNTHASE 2*) 的結果屬於 pattern 2, 當這些基因在野生型中的表現到達高峰時, *nlp1nlp2* 的基因表現和 *nlp2* 降低的程度相近, 而 *nlp1* 並沒有明顯的變化, 顯示 *BEE2*、*ERF60*、*LBD38*、*MAPKKK14*、*ZAT1*、*UMAMIT36*、*Atlg22170* 和 *PRS2* 的高硝酸鹽誘導轉錄主要受 NLP2 正向調控, 而不是受 NLP1 調控 (圖 5B 到圖 5D; 圖 5F 到圖 5J)。 *ABF2* 的結果屬於 pattern 3, *ABF2* 在 *nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 中的表現都沒有明顯變化, 顯示 NLP1 和 NLP2 可能不調控 *ABF2* 的高硝酸鹽誘導轉錄。

接著, 我想知道硝酸還原酶的基因是否受 NLP1 和 NLP2 調控, 分析 *NIA1* (*NITRATE REDUCTASE 1*) 和 *NIA2* 在 *nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 中的硝酸

鹽誘導情形 (附圖 4)。結果顯示, *nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 中的 *NIA1* 和 *NIA2* 表現都和野生型相近, 代表 NLP1 和 NLP2 都不調控 *NIA1* 和 *NIA2* 的高硝酸鹽誘導轉錄。

最後, 我想知道 NLP1 和 NLP2 是否互相調控彼此的表現, 觀察 *NLP1* 在 *nlp2* 中的轉錄量以及 *NLP2* 在 *nlp1* 中的轉錄量。結果顯示, *nlp1* 中的 *NLP2* 表現和野生型相近, *nlp2* 中的 *NLP1* 表現和野生型相近, 代表 NLP1 不調控 *NLP2* 的轉錄, NLP2 也不調控 *NLP1* 的轉錄 (附圖 5)。

3.1.6 NLP1 和 NLP2 可能在有硝酸鹽時存在於細胞質

NLP1 些微調控 *HYH* 的初期硝酸鹽反應 (圖 5)。已知 NLP2、NLP6 和 NLP7 參與初期硝酸鹽反應, 且 NLP2 和 NLP7 在有硝酸鹽時會留在細胞核累積 (Marchive *et al.*, 2013; Durand *et al.*, 2023; Cheng *et al.*, 2023), 因此推測 NLP1 可能也在有硝酸鹽時進入細胞核。為了驗證, 在高硝酸鹽 (2 mM NO₃⁻) 條件下水耕培養植物 19 天, 萃取葉片的原生質體, 並同時轉染質體 pro35S:NUC-L1-RFP 和 pro35S:NLP1-GFP 或 pro35S:NLP2-GFP (附圖 6) 到原生質體, 質體在 0.5 mM 硝酸鹽表現 40 小時後, 分析 NLP1 和 NLP2 在細胞內的位置 (圖 6)。NUC-L1 (NUCLEOLIN LIKE 1) 是一種核仁素 (nucleolin), 主要表現在核仁 (Pontvianne *et al.*, 2007), 因此用 NUC-L1-RFP 作為細胞核的 marker。結果顯示, 有觀察到 GFP 的分布位置呈圓弧狀, 代表 NLP1 和 NLP2 在有硝酸鹽時可能分布於細胞質。然而, GFP 在細胞核的訊號相對不明顯, NLP1 和 NLP2 在有硝酸鹽時是否分布於細胞核仍須確認。

3.2 NLP1 和 NLP2 在銨鹽反應的角色

3.2.1 NLP2 和 NLP7 對銨鹽的生長有重疊的影響

已知 *nlp2* 在有硝酸鹽和硝酸銨的環境中都有生長遲緩 (Konishi *et al.*, 2021), 為了瞭解 NLP2 在只有銨鹽時的功能, 挑選 *nlp1*、*nlp2*、*nlp7*、*nlp1nlp2*、



nlp2nlp7 和 *nlp6nlp7*，在 2 mM 銨鹽條件下水耕培養植物 16 天，分析地上部的鮮重 (圖 7)。結果顯示，和野生型相比，*nlp1*、*nlp2*、*nlp7* 和 *nlp1nlp2* 的鮮重沒有變化，但 *nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 的鮮重分別降低 49% - 53% 和 36% - 51%。在有銨鹽的環境中，*nlp2* 和 *nlp7* 沒有生長遲緩，然而 *nlp2nlp7* 有生長遲緩，代表 NLP2 和 NLP7 對銨鹽的生長有重疊的影響，也就是說 NLP2 和 NLP7 有至少一個就可以執行功能，但 NLP2 和 NLP7 都沒有就無法執行功能。此外，*nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 的鮮重都和野生型相近，可見 NLP1 在銨鹽訊息傳導上的功能並不明顯。*nlp* 突變株在 2 mM 硝酸鹽的生長 (圖 2) 和在 2 mM 銨鹽的生長之情形 (圖 7) 相比，*nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 突變株在硝酸鹽有生長遲緩，而在銨鹽的生長並沒有明顯變化，顯示 *nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 的生長遲緩是 nitrate-dependent。

3.2.2 NLP2/7 一起和 NLP6/7 一起負向調控一樣的銨鹽反應基因的轉錄

NLP2 和 NLP7 之間的關係 (圖 7) 和 NLP6 和 NLP7 一樣在銨鹽生長調控上功能重疊，且 NLP6 和 NLP7 功能重疊地負向調控銨鹽反應基因的表現 (Cheng *et al.*, 2023)，因此推測 NLP2 和 NLP7 可能也功能重疊地調控銨鹽反應基因的表現。為了驗證，在 25 mM 銨鹽下水耕培養植物 9 天，分析 *nlp1nlp2*、*nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 根部銨鹽反應基因的轉錄量 (圖 8)。

在 NLP7 直接調控的銨鹽反應基因中，有 5 個基因被 NLP2 結合 (附圖 7；Durand *et al.*, 2023; Cheng *et al.*, 2023; Marchive *et al.*, 2013)，於是想知道 NLP2 是否會調控這些受 NLP7 調控的銨鹽反應基因的表現。在這些被 NLP2 結合且受 NLP7 直接調控的銨鹽反應基因中 (附圖 7)，發現 *SPL14* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 14*)、*Atlg26940* (*CYCLOPHILIN-LIKE PEPTIDYL-PROPYL CIS-TRANS ISOMERASE*) 和 *GGT1* (*GLUTAMATE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE 1*) 在 *nlp1nlp2* 中的表現和野生型相近，但在 *nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 中的表現分別增加至野生型的 1.4 -

2.5 倍和 1.4 - 2.2 倍 (圖 8A 到 圖 8C)，代表 NLP2/7 和 NLP6/7 一樣在銨鹽負向調控 *SPL14*、*Atlg26940* 和 *GGT1* 的轉錄。而 NLP1/2/6/7 對 *PMT6* (*POLYOL MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 6*) 表現的影響仍須確認 (圖 8D)。

此外，我也分析了實驗室鄭又瑄學姐觀察的 4 個銨鹽反應基因 (附圖 7；Cheng *et al.*, 2023)，結果發現 *UGT85A1* (*UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 85A1*) 和 *GDH3* (*GLUTAMATE DEHYDROGENASE 3*) 在 *nlp1nlp2* 中的表現和野生型相近，但在 *nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 中的表現分別增加至野生型的 1.5 - 4.3 倍和 1.7 - 2.6 倍 (圖 8A 到圖 8C)，代表 NLP2/7 和 NLP6/7 一樣在銨鹽負向調控 *UGT85A1* 和 *GDH3* 的轉錄。而 NLP1/2/6/7 對 *LPRI* (*LOW PHOSPHATE ROOT 1*) 和 *STP13* (*SUGAR TRANSPORT PROTEIN 13*) 表現的影響仍須確認 (圖 8G 和圖 8H)。

3.2.3 NLP1 和 NLP2 在有銨鹽時存在於細胞質和細胞核

已知 NLP2/7 調控銨鹽反應基因的轉錄 (圖 8)，且 NLP7 在有銨鹽時進入細胞核 (Cheng *et al.*, 2023)，因此推測 NLP2 可能也在有銨鹽時進入細胞核。為了驗證，在 2 mM 銨鹽條件下水耕培養植物 19 天，萃取葉片的原生質體，並同時轉染質體 pro35S:NUC-L1-RFP 和 pro35S:NLP1-GFP 或 pro35S:NLP2-GFP (附圖 6) 到原生質體，質體在 0.5 mM 銨鹽表現 40 小時後，分析 NLP1 和 NLP2 在細胞內的位置 (圖 9)。結果顯示，GFP 的分布位置呈圓弧狀，而且比 NUC 再大一些，代表 NLP1 和 NLP2 在有銨鹽時分布於細胞質和細胞核中。

第四章

討論



4.1 NLP1 只影響高硝酸鹽時的生長，而 NLP2 影響低和高硝酸鹽時的生長

不同的 NLP 蛋白之間可能有重疊的功能。先前實驗室鄭又瑄學姐的研究顯示 NLP6 和 NLP7 對硝酸鹽的生長和基因調控有重疊的功能 (Cheng *et al.*, 2023)。為了瞭解其他 NLP 蛋白是否也和 NLP6 與 NLP7 有類似功能重疊的關係，我首先分析分屬同一演化分支的 *nlp* 雙突變株在硝酸鹽的生長狀況 (圖 1)。結果發現只有 *nlp1nlp2* 和 *nlp6nlp7* 有生長遲緩，*nlp4nlp5* 和 *nlp8nlp9* 並沒有生長差異。這結果顯示 NLP1 和 NLP2 可能對植物在硝酸鹽的生長也有重疊的功能，因此我的研究主題聚焦於 NLP1 和 NLP2 在氮訊息傳導上的功能分析。

已知 NLP7 在高硝酸鹽時對生長的影響比在低硝酸鹽時更明顯 (Cheng *et al.*, 2023)。為了瞭解 NLP1 和 NLP2 各自在高硝酸鹽和低硝酸鹽的功能是否也有差異，我在低硝酸鹽 (0.1 mM NO_3^-) 和高硝酸鹽 (2 mM NO_3^-) 的條件下分析 *nlp* 突變株的地上部鮮重 (圖 2)。結果發現 *nlp1* 在低硝酸鹽的生長沒有改變，卻在高硝酸鹽的生長有些微遲緩，顯示 NLP1 在高硝酸鹽的功能比在低硝酸鹽更為重要。而 *nlp2* 在低硝酸鹽和高硝酸鹽的生長都有遲緩，顯示 NLP2 可能在低硝酸鹽和高硝酸鹽都有重要的功能。

4.2 NLP1/2 在高硝酸鹽有些相加的關係，NLP2/7 在低和高硝酸鹽有相乘的關係

從 *nlp* 突變株在低硝酸鹽和高硝酸鹽的地上部生長的結果發現，NLP1 和 NLP2 在高硝酸鹽對生長的影響有些相加的關係，NLP2 和 NLP7 在低硝酸鹽和高硝酸鹽對生長的影響都有相乘的關係 (圖 2)。前人利用雙分子螢光互補 (bimolecular fluorescence complement) 看 NLP1/2 與 NLP2/7 之間是否存在交互作用，結果發現 NLP1 和 NLP2 在有硝酸鹽的環境中並不會互相結合，但 NLP2 和 NLP7 在有硝酸鹽的環境中在細胞質和細胞核可以互相結合 (Durand *et al.*,

2023)。此外，前人利用酵母菌雙雜合分析 (yeast two-hybrid)，發現 NLP2 的 PB1 domain 和 NLP1 的 PB1 domain 並不會互相結合，而 NLP2 的 PB1 domain 和 NLP7 的 PB1 domain 會互相結合 (Konishi *et al.*, 2019)。因此推測 NLP1/2/7 在調控硝酸鹽反應基因時，NLP1 和 NLP2 可能不會結合，各自執行功能；而 NLP2 和 NLP7 可能會結合，一起執行功能。

為了更深入瞭解 NLP1 和 NLP2 是否有功能差異，我比對 NLP1 和 NLP2 的胺基酸序列 (附圖 10)。結果發現兩者的一致性 (identity) 和相似性 (similarity) 分別是 69% 和 76%。NLP1 和 NLP2 在 RWP-RK domain 有兩個胺基酸不相似，而 NLP1 和 NLP2 在 PB1 domain 有 12 個位置胺基酸不相似，可推測 NLP1 和 NLP2 可能各自結合不同的蛋白質以調控下游基因表現。在我測試的 NLP2 下游初期硝酸鹽反應基因中，確實多數不受 NLP1 調控。

4.3 NLP2/7 和 NLP6/7 影響地上部的硝酸鹽利用

已知 NLP7 負向調控地上部的硝酸鹽濃度且正向調控地上部的硝酸還原酶活性 (Durand *et al.*, 2023)。為了瞭解 NLP1 和 NLP2 對植物利用硝酸鹽的影響，並與 NLP7 做比較，我在高硝酸鹽下分析 *nlp1nlp2*、*nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 雙突變株地上部的硝酸鹽含量 (圖 3) 與硝酸還原酶活性 (圖 4)。結果發現，雖然 *nlp1nlp2* 的地上部硝酸鹽濃度沒有改變，但 *nlp2nlp7* 地上部硝酸鹽濃度增加的程度比 *nlp6nlp7* 更多 (圖 3)，顯示 NLP2/7 一起比 NLP6/7 一起更能負向調控高硝酸鹽時的地上部硝酸鹽濃度。但是，*nlp2nlp7* 地上部的硝酸還原酶活性降低的程度和 *nlp6nlp7* 並沒有明顯的差異 (圖 4)，顯示 NLP2/7 一起和 NLP6/7 一起對高硝酸鹽時的地上部硝酸鹽還原酶活性正向調控的程度相近。從 *nlp* 雙突變株的硝酸鹽含量和硝酸還原酶活性來看 (圖 3 和圖 4)，硝酸還原酶活性不是影響硝酸鹽含量的唯一因素，NLP2/6/7 可能利用其他方式調控地上部的硝酸鹽濃度。

4.4 NLP2 和 NLP7 在硝酸鹽反應是正調控因子，而 NLP1 可能也參與其中



NLP2 可以透過 5 個二次轉錄因子 (HYH、BEE2、ERF60、LBD38 和 ABF2) 來調控 32% NLP2 下游硝酸鹽誘導基因的轉錄，而且有些 NLP2 的目標基因不受 NLP7 調控 (附圖 2；附圖 3；Durand *et al.*, 2023; Cheng *et al.*, 2023)。為了瞭解 NLP1 在硝酸鹽反應基因調控的角色，我分析 *nlp1*、*nlp2* 和 *nlp1nlp2* 中基因的硝酸鹽誘導轉錄 (圖 5)。結果發現，NLP1 對 HYH 的高硝酸鹽誘導轉錄有些正向的影響，但 NLP1 的貢獻不如 NLP2。而 BEE2、ERF60、LBD38、MAPKKK14、ZAT1、UMAMIT36、Atlg22170 和 PRS2 主要受 NLP2 調控。

為了進一步瞭解 NLP2 和 NLP7 的差異，我從發表的資料中，比對了會與 NLP2 結合的目標基因、NLP2 調控的基因、NLP7 結合的目標基因和 NLP7 調控的硝酸鹽誘導基因 (Durand *et al.*, 2023; Marchive *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2023)。前人研究顯示，HYH 和 LBD38 也被 NLP7 結合並調控，但 BEE2、UMAMIT36 和 Atlg22170 不受 NLP7 結合或調控，顯示 HYH 和 LBD38 是 NLP2 和 NLP7 共同的直接目標基因 (direct target)，BEE2、UMAMIT36 和 Atlg22170 則是 NLP2 專屬的直接目標基因。對於 ERF60、MAPKKK14、ZAT1 和 PRS2，ERF60、MAPKKK14、ZAT1 和 PRS2 會被 NLP2 與 NLP7 結合，但僅受 NLP2 調控，並不受 NLP7 調控，顯示 ERF60、MAPKKK14、ZAT1 和 PRS2 是 NLP2 的直接目標基因，而 NLP7 對這些基因的影響則需進一步瞭解。

目前的結果並沒有明確找到 NLP1 的目標基因，有可能是因為我挑選的基因不夠多，或是 NLP1 和 NLP2 共同調控的基因不多。如果要進一步瞭解 NLP1 有哪些目標基因，可以在硝酸鹽進行染色質免疫沉澱定序 (chromatin immunoprecipitation sequencing) 和 RNA 定序來尋找 NLP1 結合與調控的硝酸鹽反應基因，期望能在分子層次上進一步闡明 NLP1 的功能。

4.5 NLP2 和 NLP7 在銨鹽反應是功能重疊的負調控因子

NLP 蛋白可能在不同的氮源有不同的功能。NLP6 和 NLP7 在硝酸鹽所誘發的轉錄反應是正調控因子，卻在銨鹽所誘發的轉錄反應是負調控因子 (Cheng *et al.*,

2023)。為了瞭解 NLP1 和 NLP2 是否也有因應不同氮源的角色差異，我在鉍鹽的條件下分析 *nlp* 突變株的地上部鮮重 (圖 7)。結果發現單一突變株 *nlp1*、*nlp2*、*nlp7* 和雙突變株 *nlp1nlp2* 在鉍鹽的生長完全沒有改變，但 *nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 在鉍鹽有明顯的生長遲緩，顯示 NLP2 和 NLP7 在鉍鹽對生長的影響有重疊的功能。NLP6 和 NLP7 屬於同一演化分支，而 NLP2 和 NLP7 分屬不同演化分支。NLP6 與 NLP7 在鉍鹽反應上功能重疊較可理解，屬於不同演化分支的 NLP2 與 NLP7 功能重疊，就很有趣。

為了進一步瞭解 NLP2 和 NLP7 在分子層次上的關係，我分析 *nlp* 突變株中鉍鹽反應基因的表現 (圖 8)。因為 *nlp1*、*nlp2*、*nlp7* 單突變株在鉍鹽的生長都沒有改變，推測 *nlp* 單突變株在鉍鹽的基因表現可能也都沒有改變，所以直接挑選 *nlp1nlp2*、*nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 雙突變株進行實驗。試著尋找 NLP2 的直接目標基因，我從已發表的資料庫中，比對了 NLP2 結合的基因、NLP7 結合的基因和 NLP7 調控的鉍鹽反應基因。結果發現，有 5 個受 NLP7 結合並調控的基因同時會被 NLP2 結合，分別是 *SPL14*、*Atlg26940*、*GGT1*、*PMT6* 和 *NAC055*。*NAC055* 的 NLP2 結合位 (binding site) 在 3' 端，不在啟動子 (promoter) (Durand *et al.*, 2023)，因此並未分析 *NAC055* 的表現。結果發現 NLP2/7 和 NLP6/7 一樣都在鉍鹽負向調控 *SPL14*、*Atlg26940* 和 *GGT1* 的轉錄。

已知 NLP7 在有鉍鹽時存在於細胞核 (Cheng *et al.*, 2023)，而我的研究發現 NLP2 在有鉍鹽時也是存在於細胞核 (圖 9)，顯示 NLP2 可能和 NLP7 一樣，在有鉍鹽的環境下，會存在於細胞核來調控下游鉍鹽反應基因的表現。

4.6 NLP2 和 NLP6 可能得互相結合或與 NLP7 形成異二聚體才能調控鉍鹽反應基因的表現

已知 NLP2 的 PB1 domain 可以和 NLP2 的 PB1 domain 有交互作用 (interaction)，且 NLP6 和 NLP7 的全長 (full length) 和所有 NLP 蛋白的 PB1 domain 都有交互作用，顯示 NLP 蛋白之間可以形成同二聚體 (homodimer) 或異

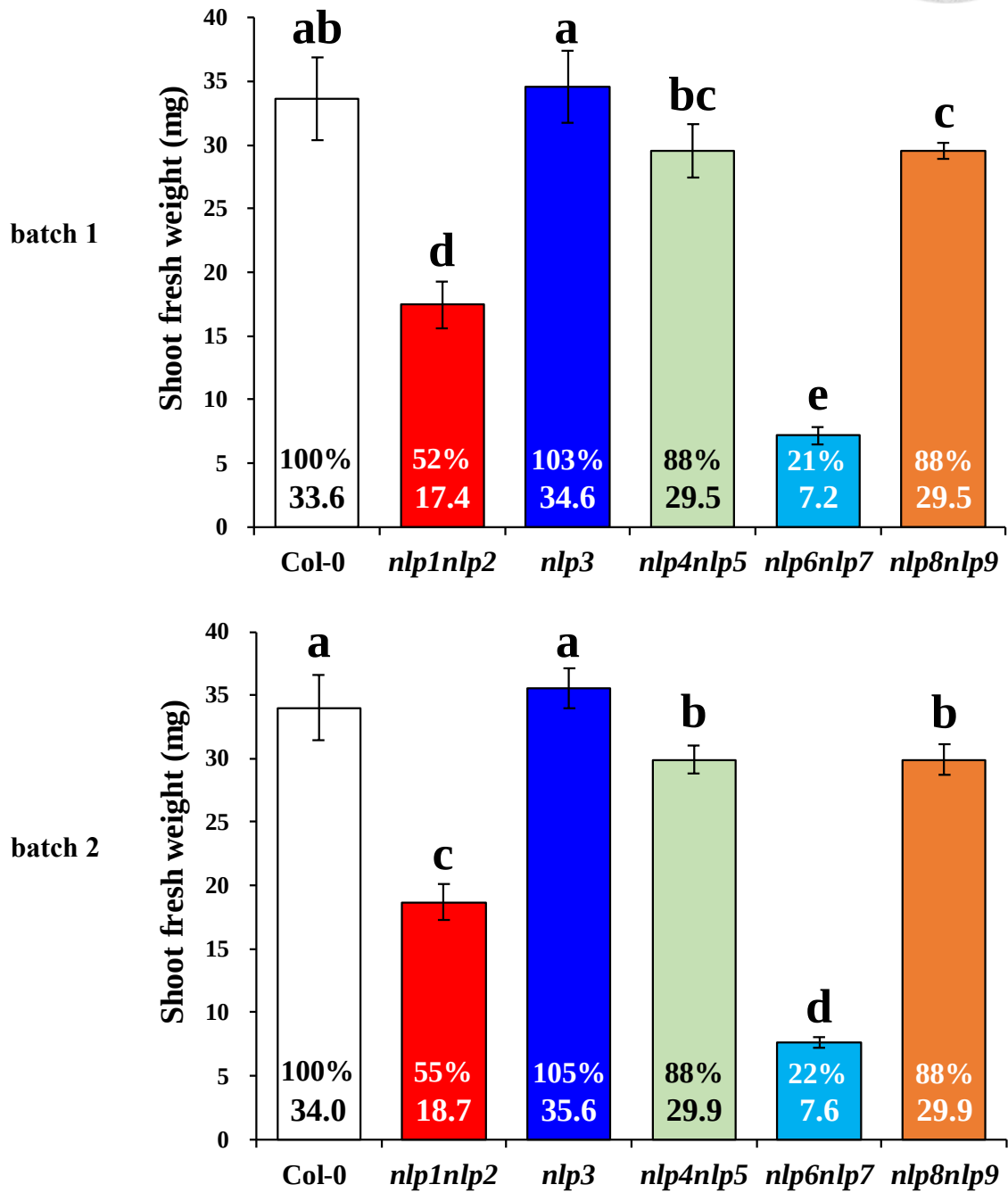


二聚體 (heterodimer) (Cheng *et al.*, 2023; Konishi *et al.*, 2019)。實驗室的鄭又瑄學姐用免疫沉澱 (immunoprecipitation) 分析可以和 NLP7 結合的蛋白質的實驗，發現在鉍鹽時，NLP7 會與 NLP2 結合，而硝酸鹽誘發 30 分鐘後，結合量顯著下降。所以，有可能在鉍鹽情況下，NLP2 和 NLP7 可以形成二聚體 (dimer) 共同作用，負向調控 *SPL14* 和 *GGT1* 等基因的表現 (unpublished data, Cheng *et al.*)。

為了進一步瞭解 NLP2 和 NLP7 調控鉍鹽反應基因轉錄的分子機制，我比對了 NLP2 和 NLP7 在鉍鹽反應基因的結合位 (附圖 8)。結果發現，NLP2 和 NLP7 在 *SPL14*、*Atlg26940* 和 *GGT1* 的啟動子有重疊的結合位，顯示 NLP2 和 NLP7 有可能在同一股 DNA 上互相結合。從基因調控來看 (圖 8)，在 *nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 中分別有正常的 NLP6 和 NLP2，卻失去了調控鉍鹽反應基因的能力，顯示只有 NLP6 或 NLP2 不能執行功能，NLP2 和 NLP6 必須與其他蛋白質形成異二聚體才能執行功能。如果要進一步瞭解 NLP2、NLP6 和 NLP7 三者參與鉍鹽訊息傳遞的關係，可以在鉍鹽分析 *nlp2nlp6* 的生長和基因表現，確認只有 NLP7 是否可以調控鉍鹽反應基因的轉錄。



A



B

Col-0

nlp1nlp2

nlp3

nlp4nlp5

nlp6nlp7

nlp8nlp9

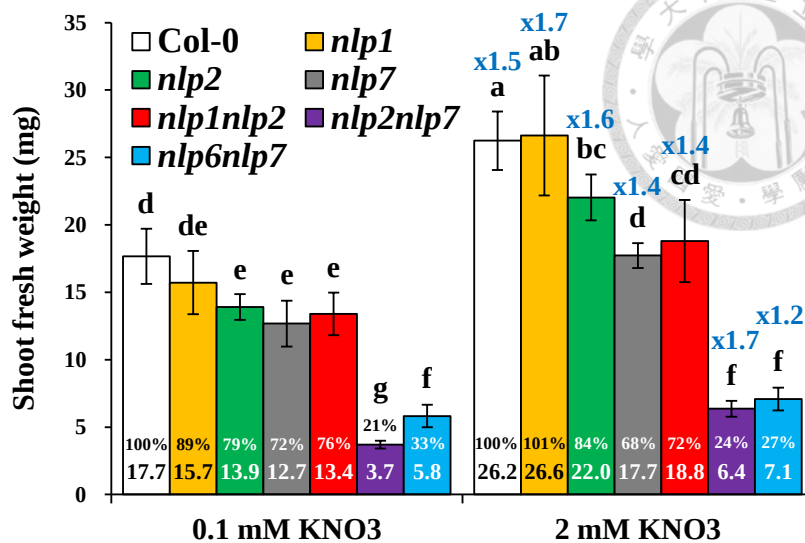


圖一、*nlp1nlp2* 和 *nlp6nlp7* 在硝酸鹽有生長遲緩。

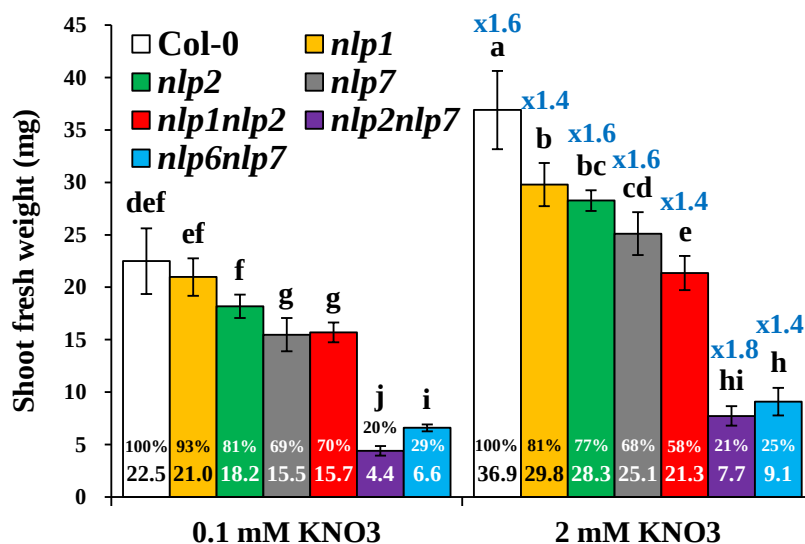
植物生長在有 2 mM 硝酸鹽的水耕液 16 天後，收集地上部並秤重。A 為鮮重，B 為 batch 1 的植物生長情形。每個樣品取自單一植株，共 9 重複。A 圖長條內的值分別為平均與相對於野生型的百分比，誤差線為標準差。長條上的字母為不同組別之間的顯著差異，藉由變異數分析搭配 Tukey's Honestly Significant Difference 或 Games-Howell 事後檢定來分析， $p < 0.05$ 。

A

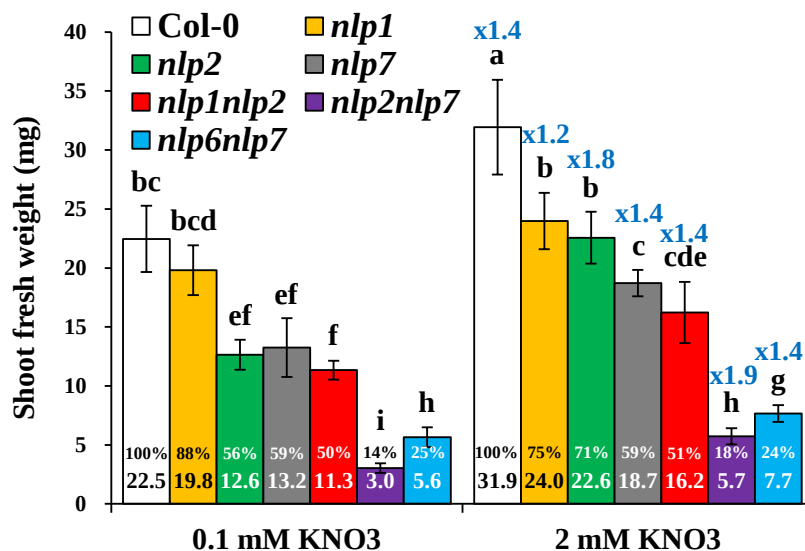
batch 1



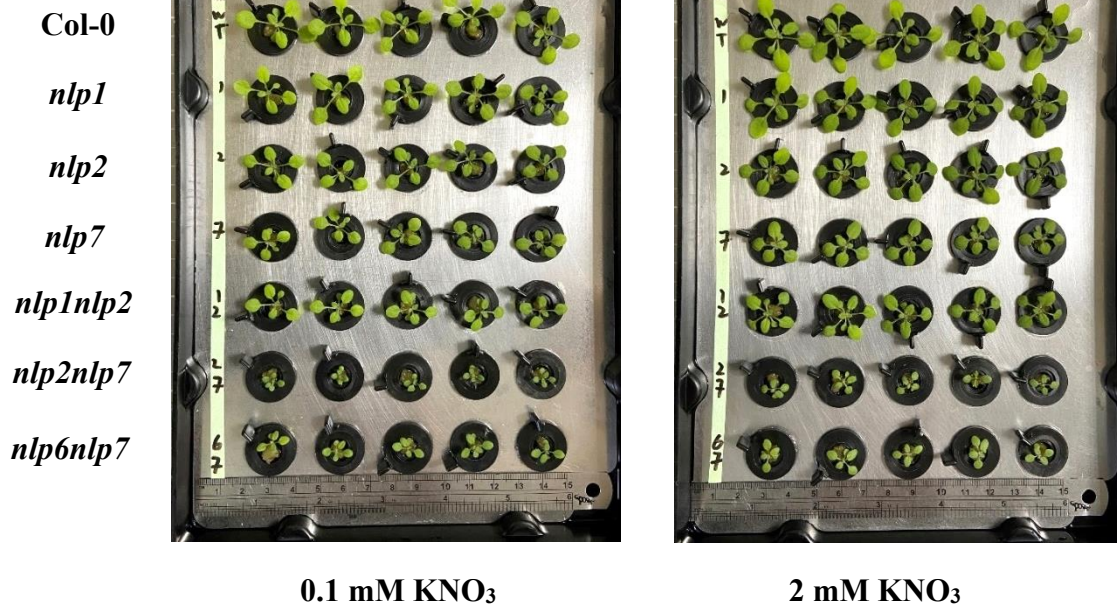
batch 2



batch 3



B

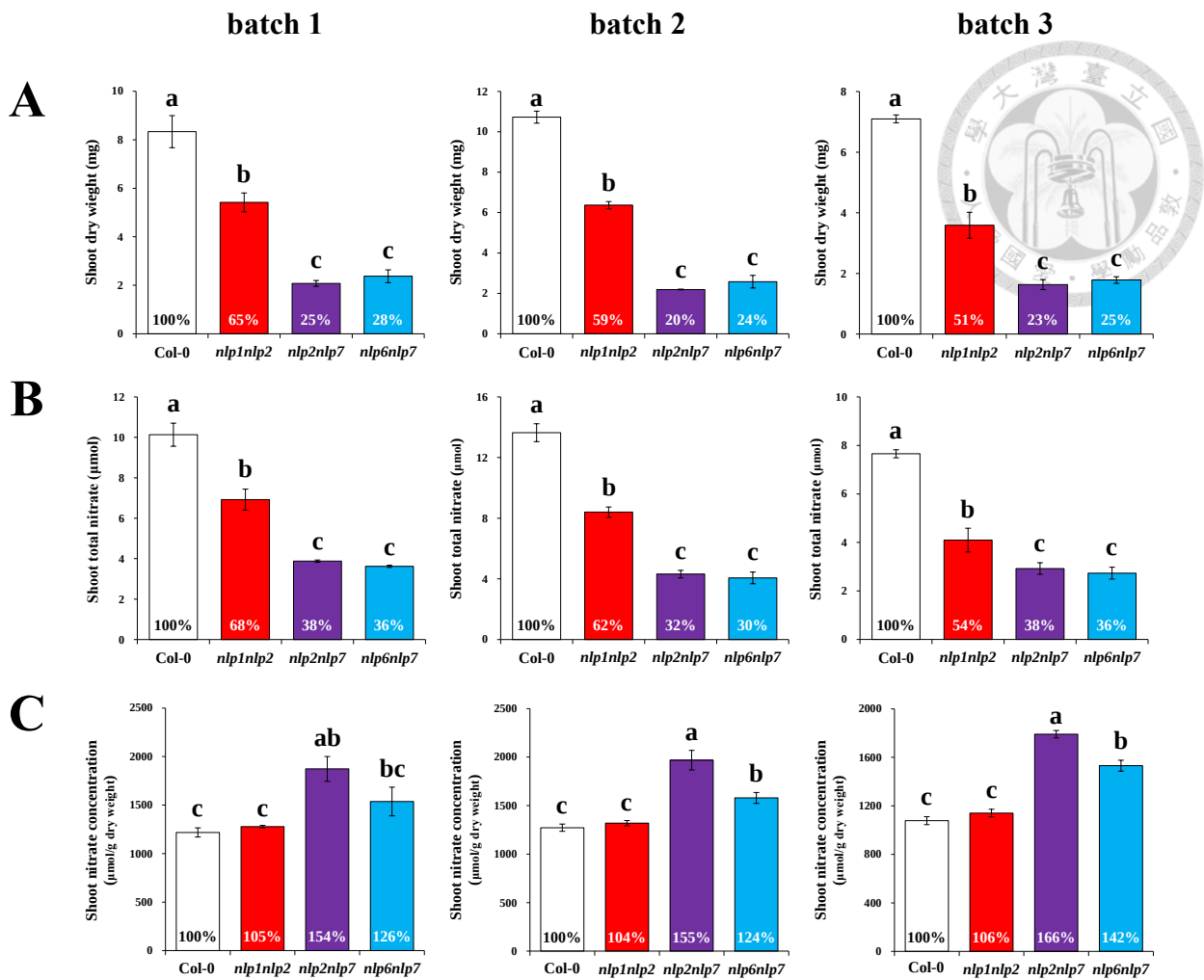


圖二、*nlp1nlp2* 在高硝酸鹽有些相加的生長遲緩，而 *nlp2nlp7* 在低和高硝酸鹽有相乘的生長遲緩。

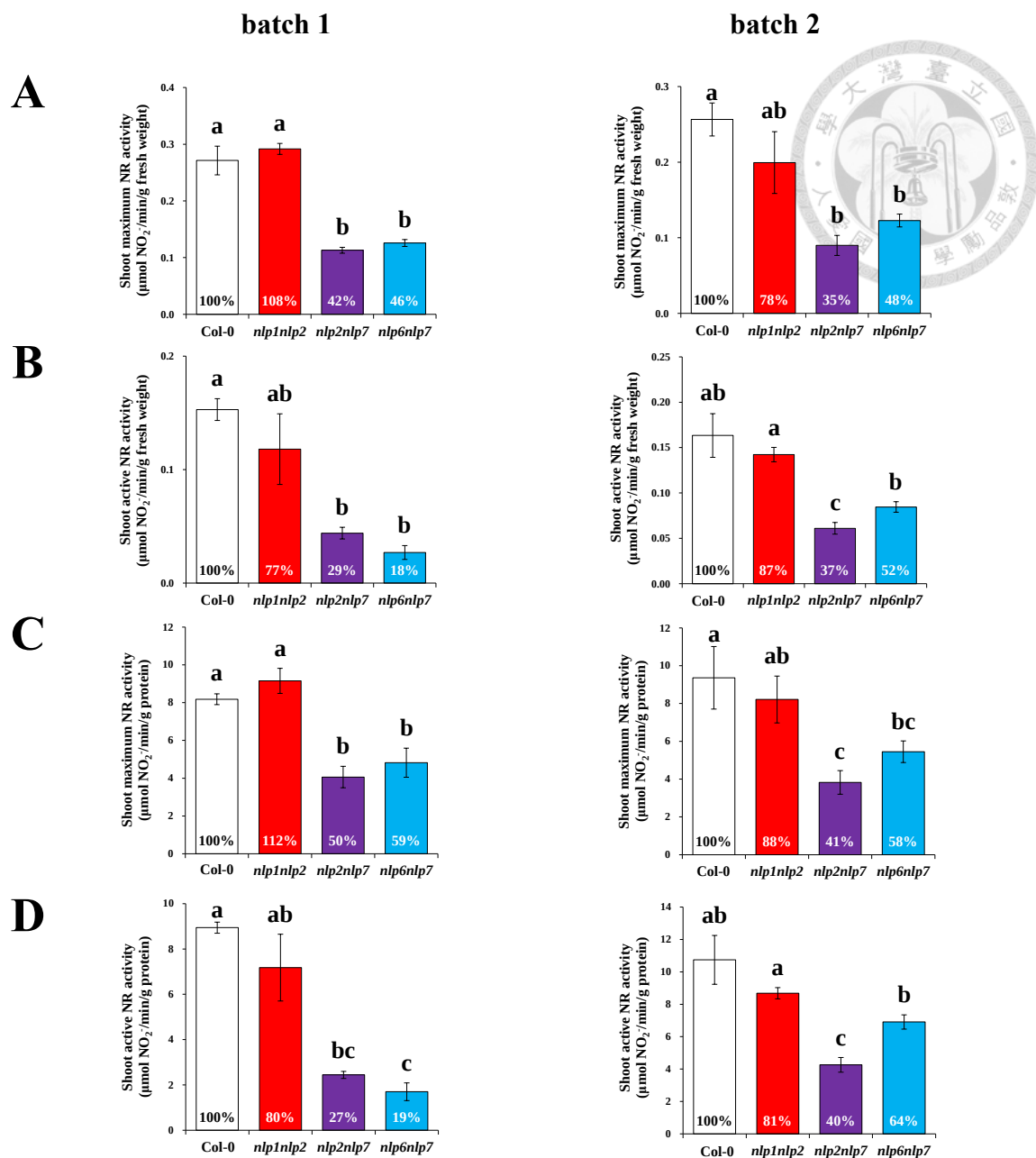
植物生長在有 0.1 mM 或 2 mM 硝酸鹽的水耕液 16 天後，收集地上部並秤重。

A 為鮮重，B 為 batch 2 的植物生長情形。每個樣品取自單一植株，共 9 重複。

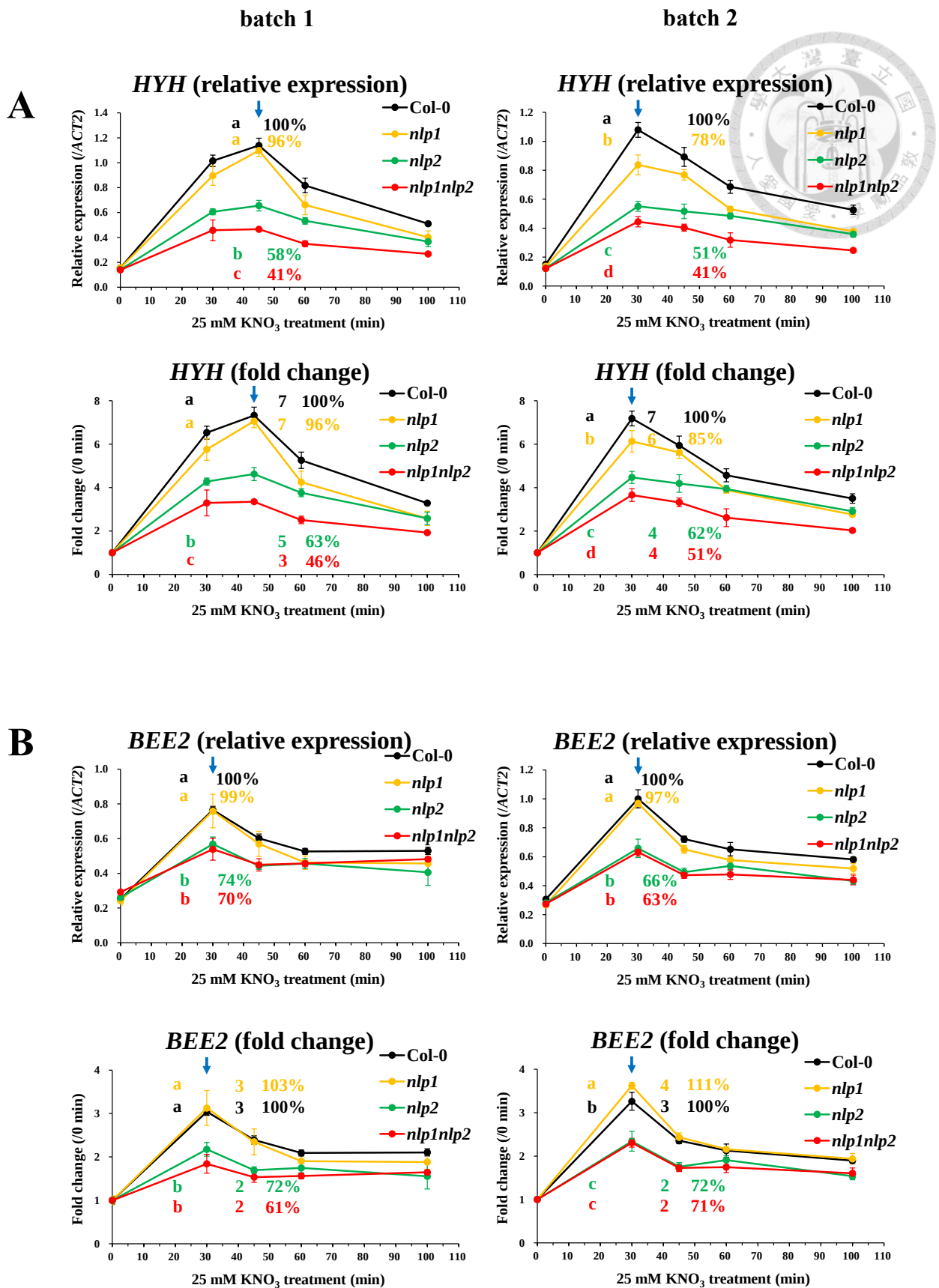
A 圖長條內的值分別為平均與相對於野生型的百分比，誤差線為標準差。長條上的藍色數字為低硝酸鹽到高硝酸鹽的倍數變化。長條上的字母為不同組別之間的顯著差異，藉由變異數分析搭配 Tukey's Honestly Significant Difference 或 Games-Howell 事後檢定來分析， $p < 0.05$ 。



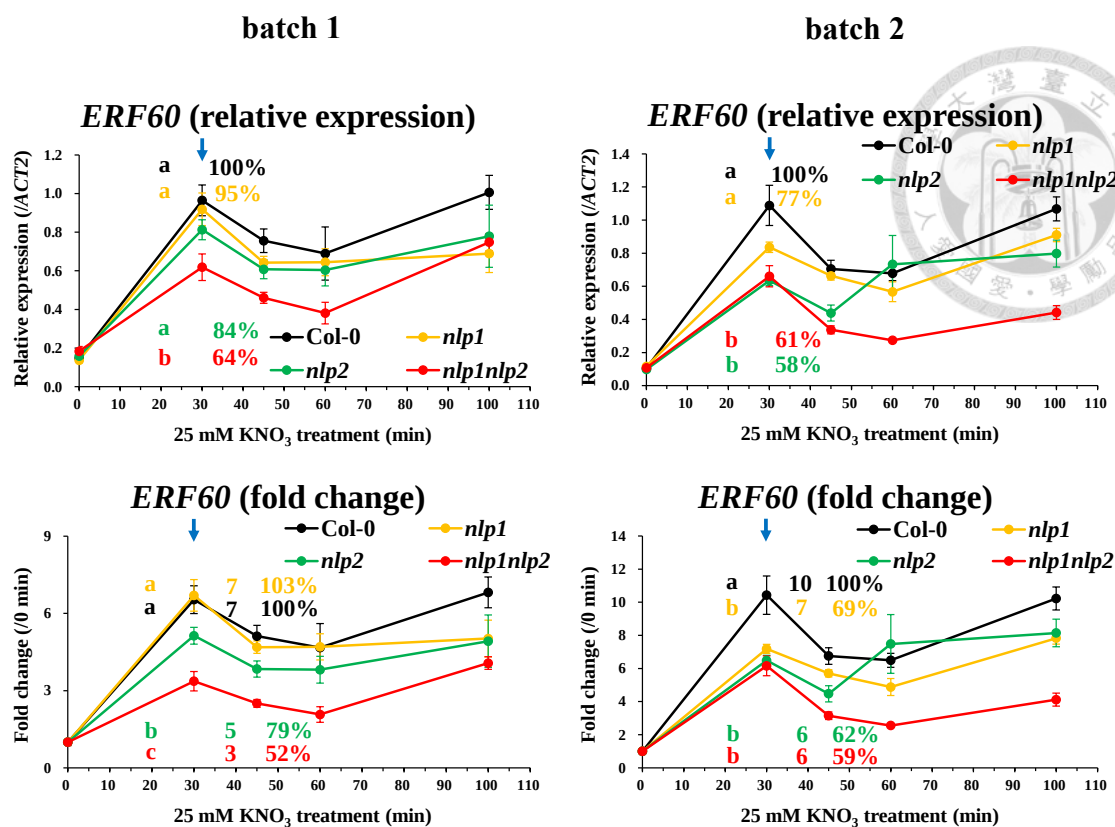
圖三、在高硝酸鹽環境中，*nlp2nlp7* 的地上部硝酸鹽濃度增加比 *nlp6nlp7* 多。植物生長在有 2 mM 硝酸鹽的水耕液 16 天後，收集地上部，萃取並分析硝酸鹽含量。A 為乾重，B 為硝酸鹽總量，C 為硝酸鹽濃度。每個樣品取自 3 株植物，共 3 重複。長條為平均，誤差線為標準差。長條內的值為相對於野生型的百分比。長條上的字母為不同組別之間的顯著差異，藉由變異數分析搭配 Tukey's Honestly Significant Difference 或 Games-Howell 事後檢定來分析， $p < 0.05$ 。



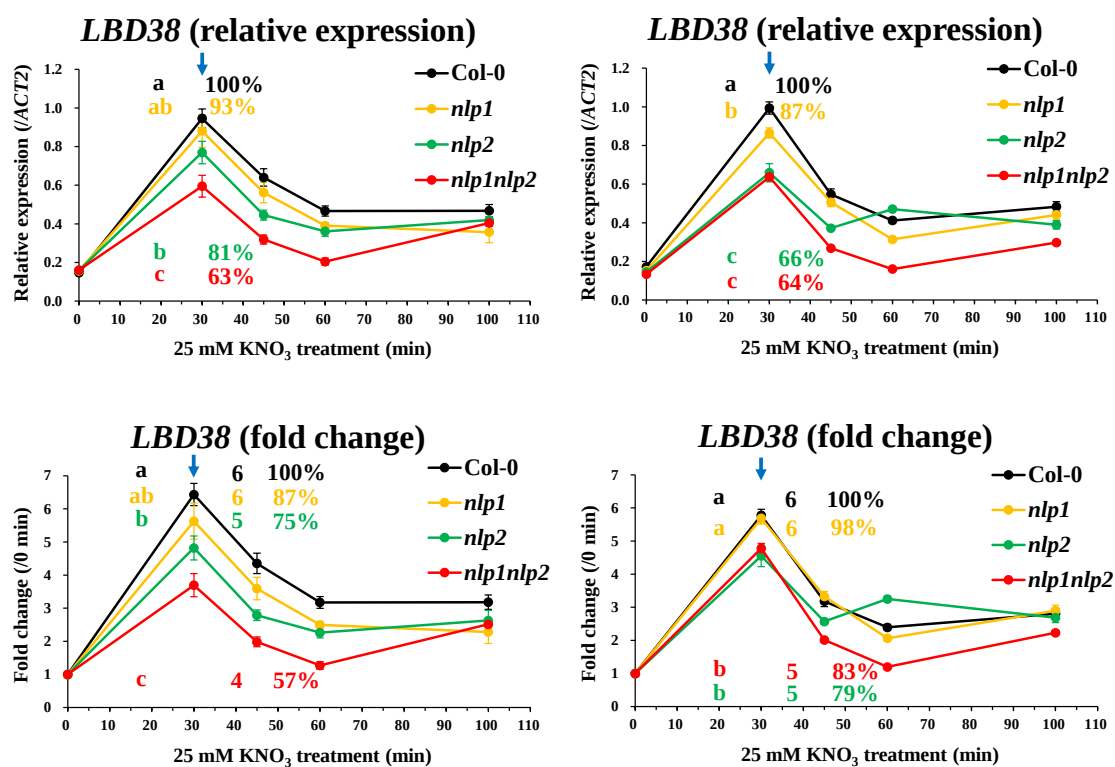
圖四、在高硝酸鹽環境中，*nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 的地上部硝酸還原酶活性降低。植物生長在有 2 mM 硝酸鹽的水耕液 16 天後，收集地上部，萃取並分析硝酸還原酶活性。A 為依鮮重計算的 maximum form，B 為依鮮重計算的 active form，C 為依蛋白質含量計算的 maximum form，D 為依蛋白質含量計算的 active form。每個樣品取自約 40 mg 植物，共 3 重複。長條為平均，誤差線為標準差。長條內的值為相對於野生型的百分比。長條上的字母為不同組別之間的顯著差異，藉由變異數分析搭配 Tukey's Honestly Significant Difference 或 Games-Howell 事後檢定來分析， $p < 0.05$ 。



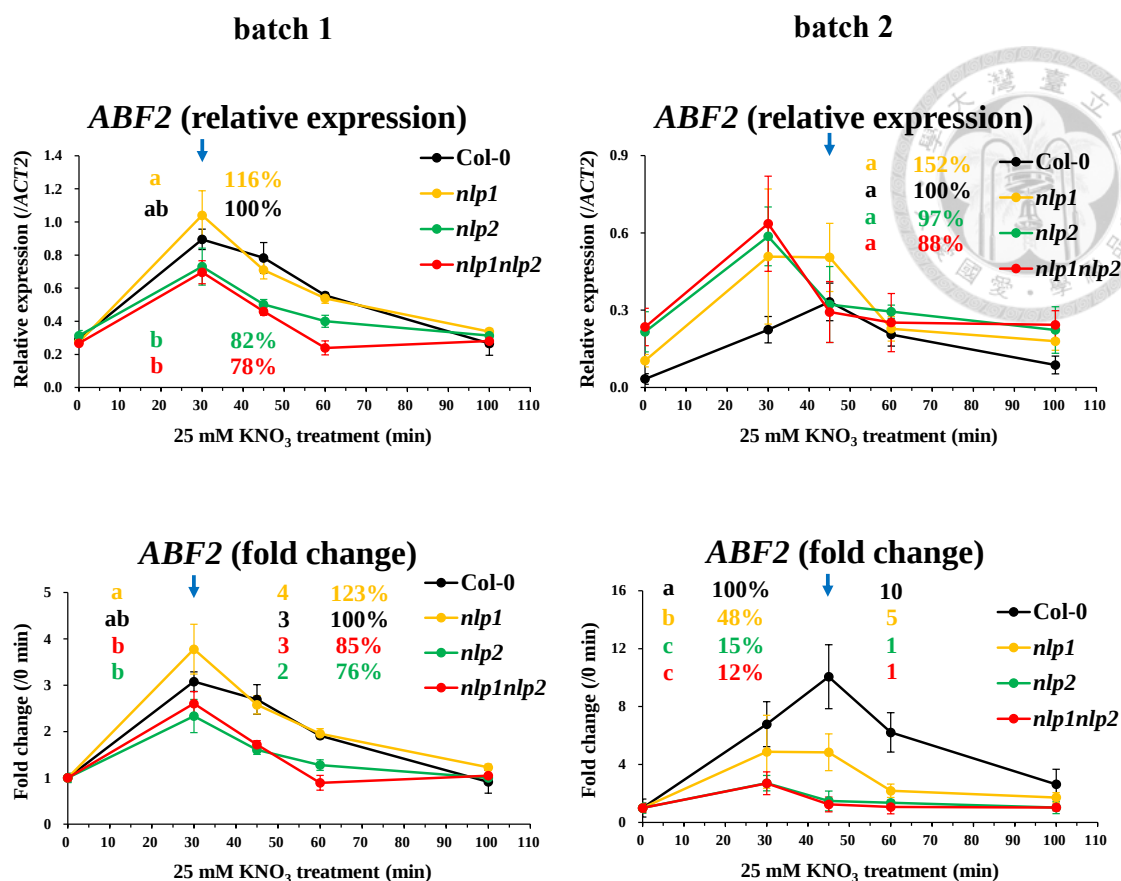
C



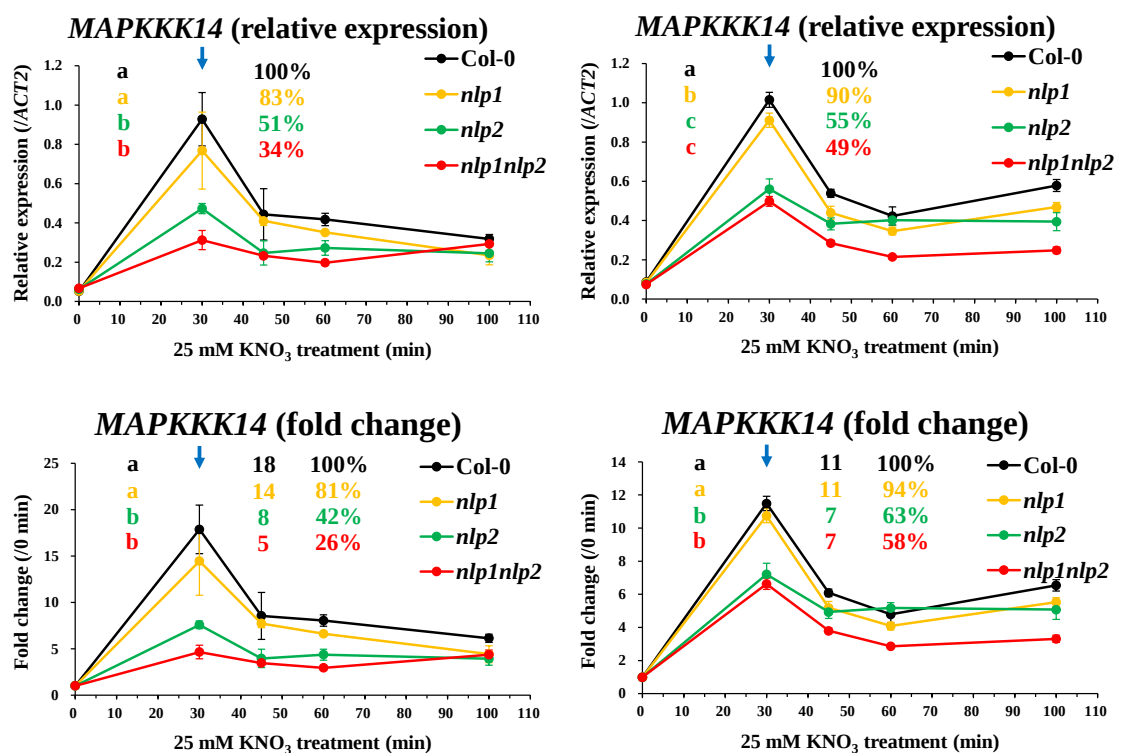
D



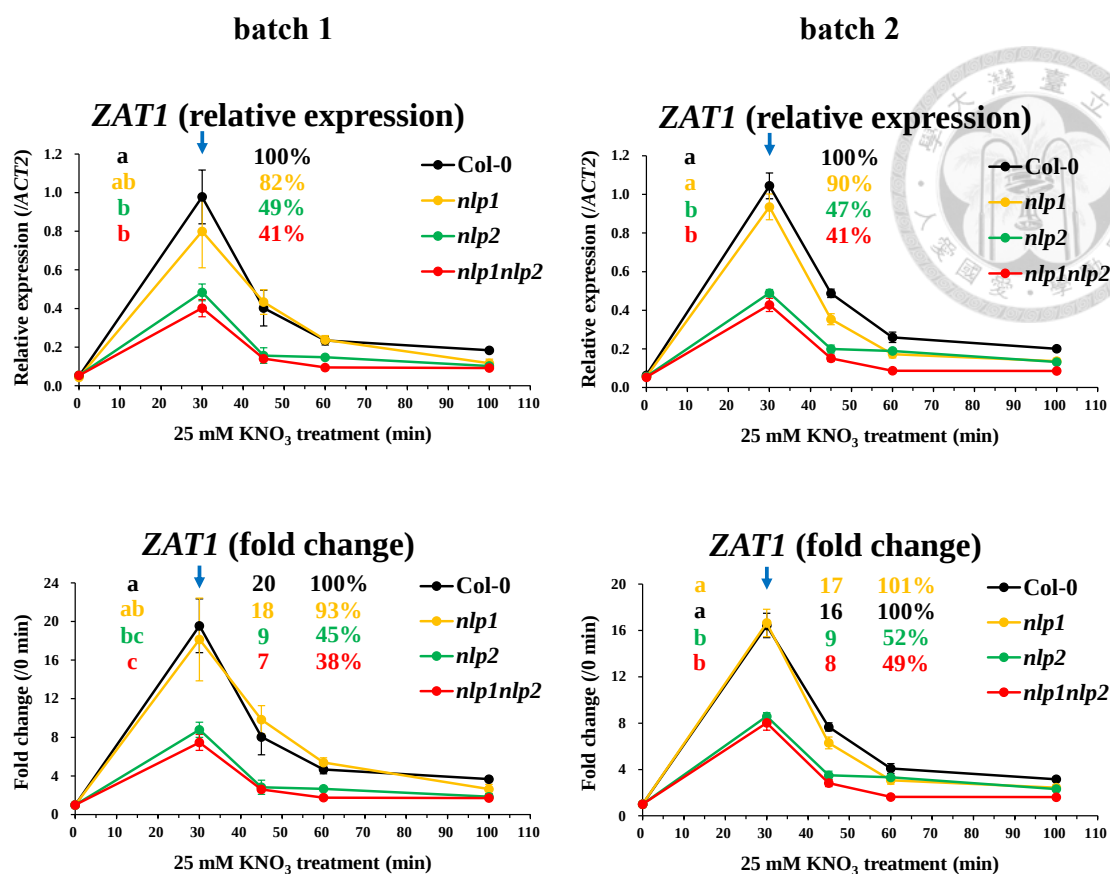
E



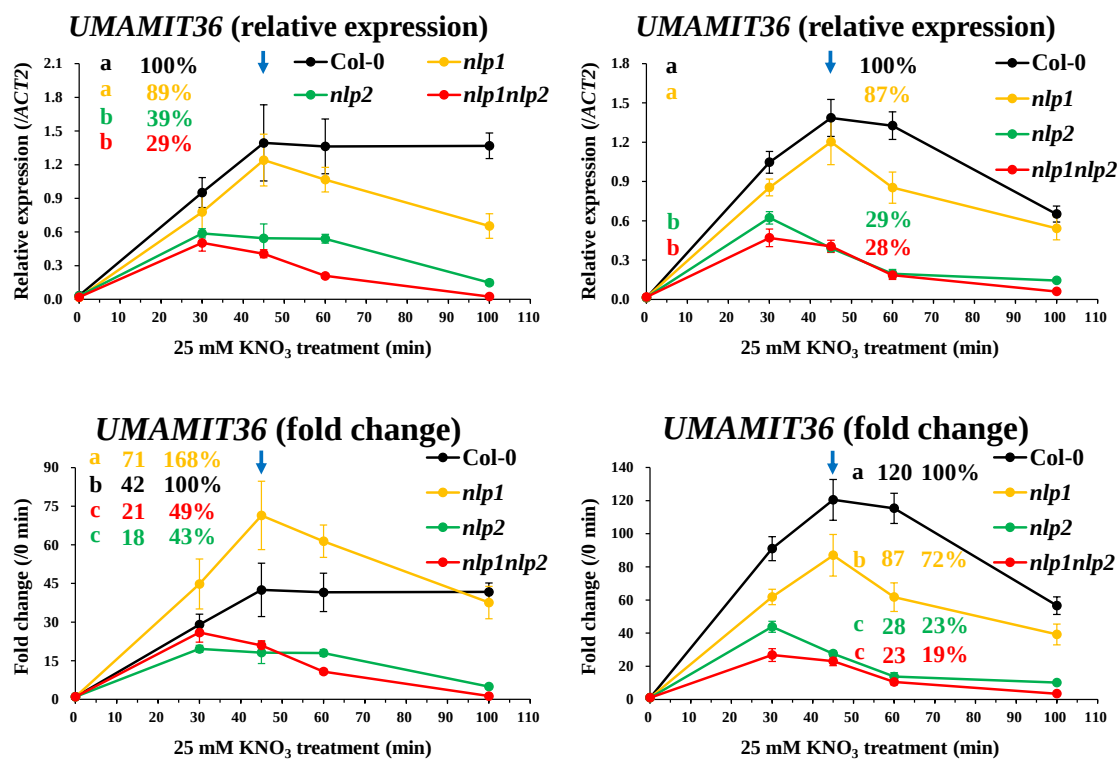
F



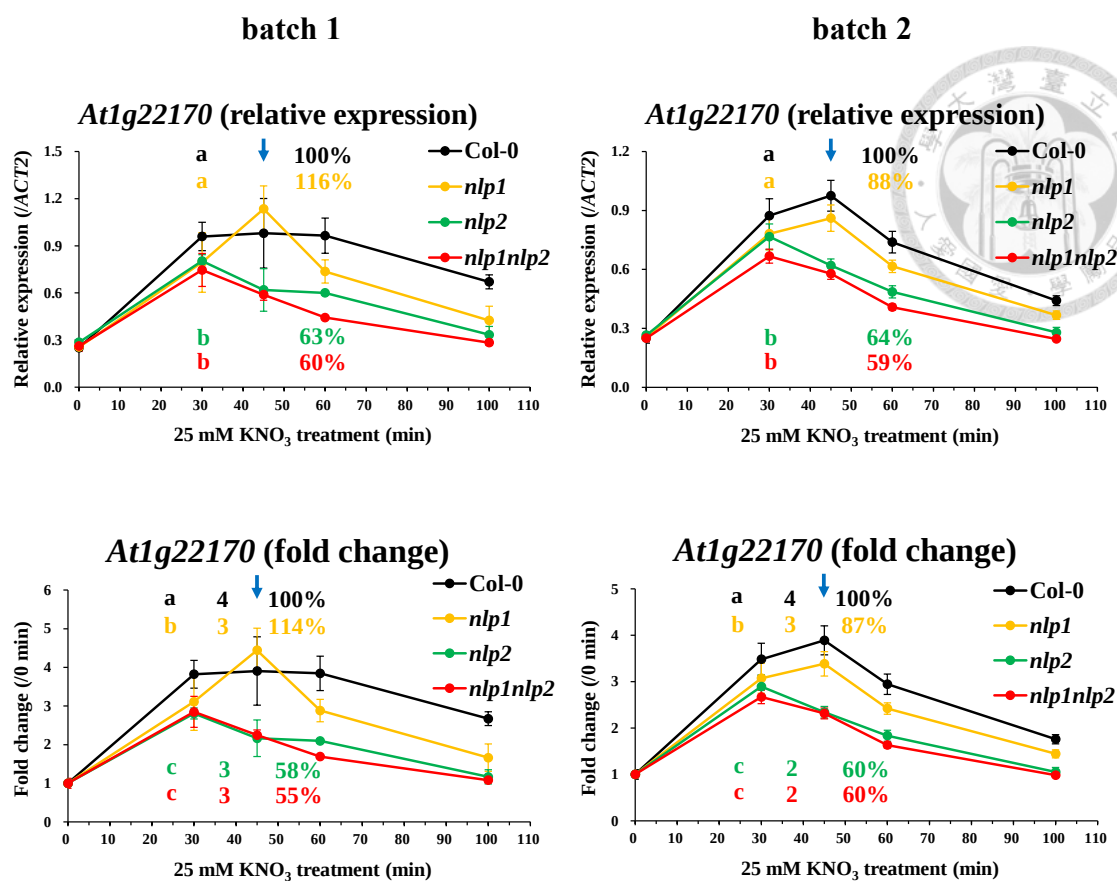
G



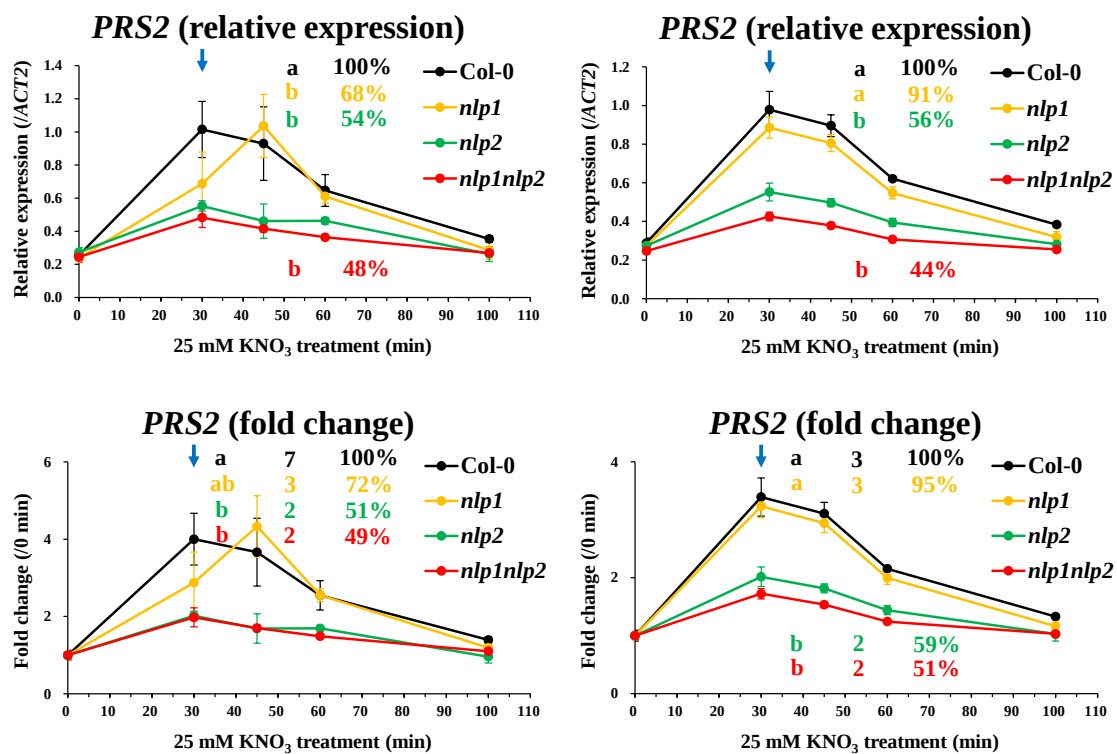
H



I

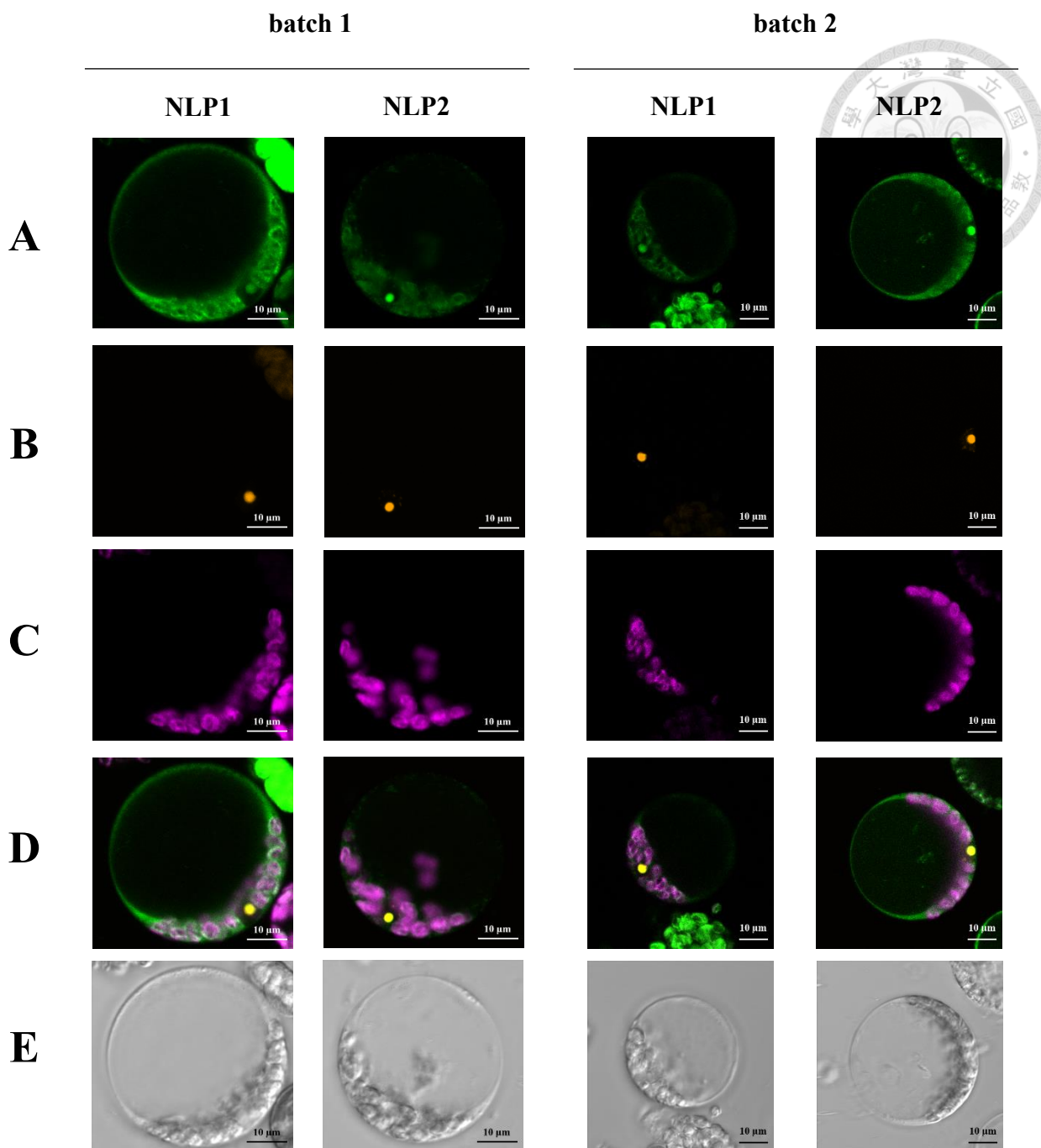


J



圖五、NLP2 參與低親和性的初期硝酸鹽反應。

植物生長在有 25 mM 銨鹽的水耕液 9 天後，用有 25 mM 硝酸鹽的水耕液處理 0、30、45、60 和 100 分鐘並收集根部，藉由 RT-qPCR 分析轉錄量。A 為 *HYH*，B 為 *BEE2*，C 為 *ERF60*，D 為 *LBD38*，E 為 *ABF2*，F 為 *MAPKKK14*，G 為 *ZAT1*，H 為 *UMAMIT36*，I 為 *Atlg22170*，J 為 *PRS2*。每個樣品取自約 400 株植物，共 4 重複。值為野生型到達表現高峰時（藍色箭頭所指的時間點）的相對表現量或相對於零點之誘發倍數變化的平均，以及相對於野生型的百分比，誤差線為標準差。字母為不同組別之間的顯著差異，藉由變異數分析搭配 Tukey's Honestly Significant Difference 或 Games-Howell 事後檢定來分析， $p < 0.05$ 。

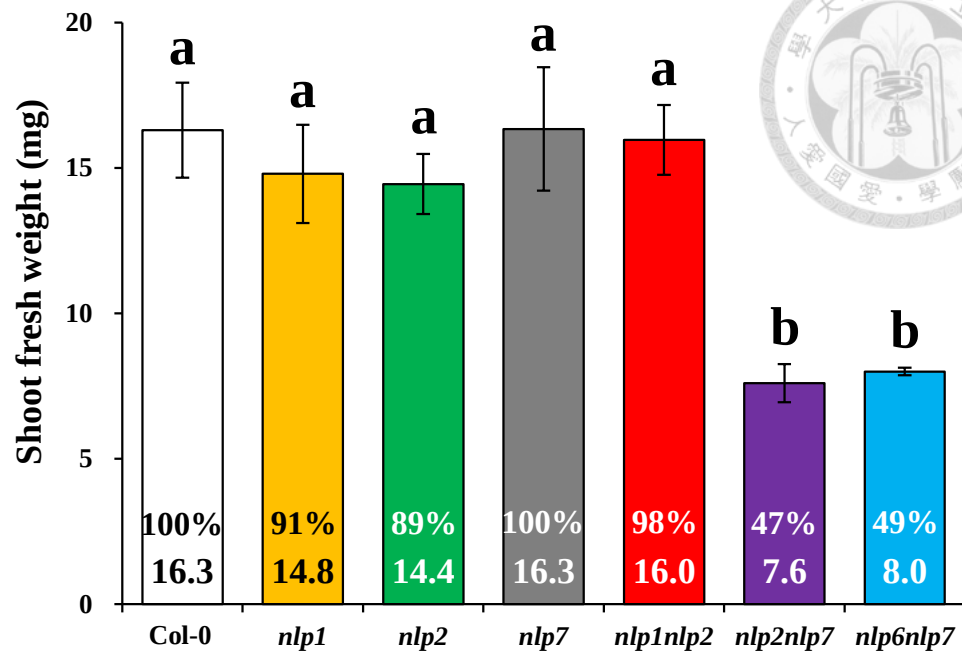


圖六、NLP1 和 NLP2 在有硝酸鹽的環境中可能分布於細胞質。

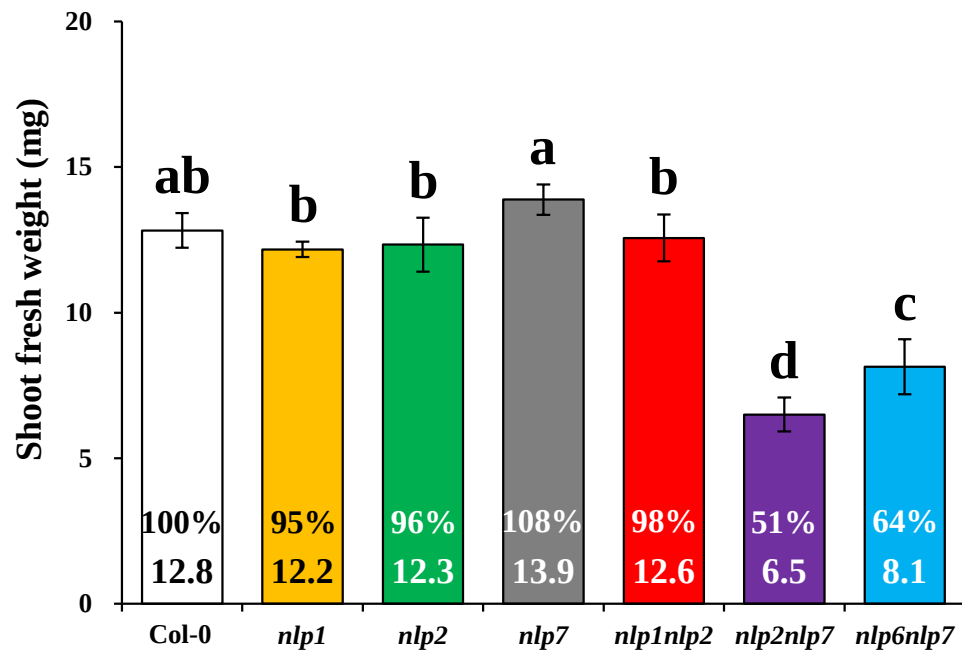
植物生長在有 2 mM 硝酸鹽的水耕液 19 天後，萃取葉片的原生質體，同時轉染 NUC-L1-RFP 和 pro35S:NLP1-GFP 或 pro35S:NLP2-GFP，藉由共軛焦顯微鏡分析蛋白質在細胞內的位置。A 為 GFP 的訊號，B 為 RFP 的訊號，C 為葉綠素的訊號，D 為 A、B 和 C 的疊圖，E 為亮視野。每張照片取自單一細胞。

A

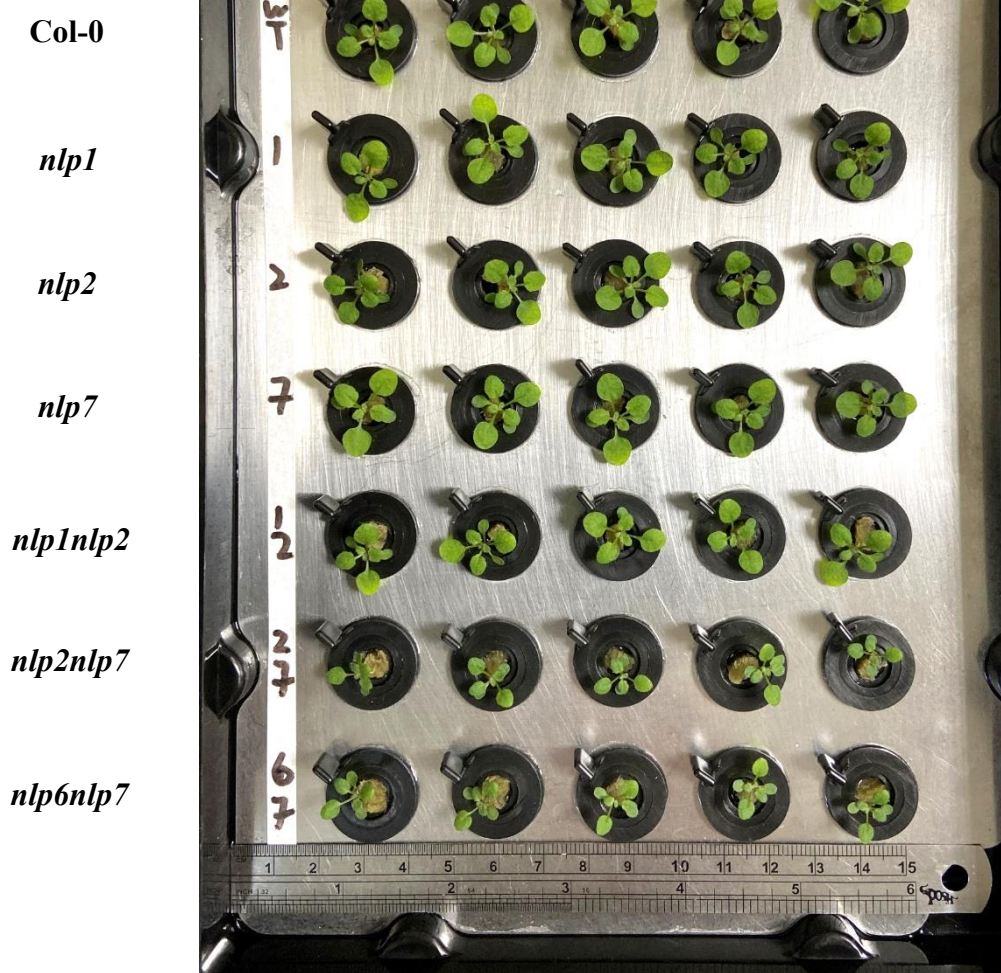
batch 1



batch 2

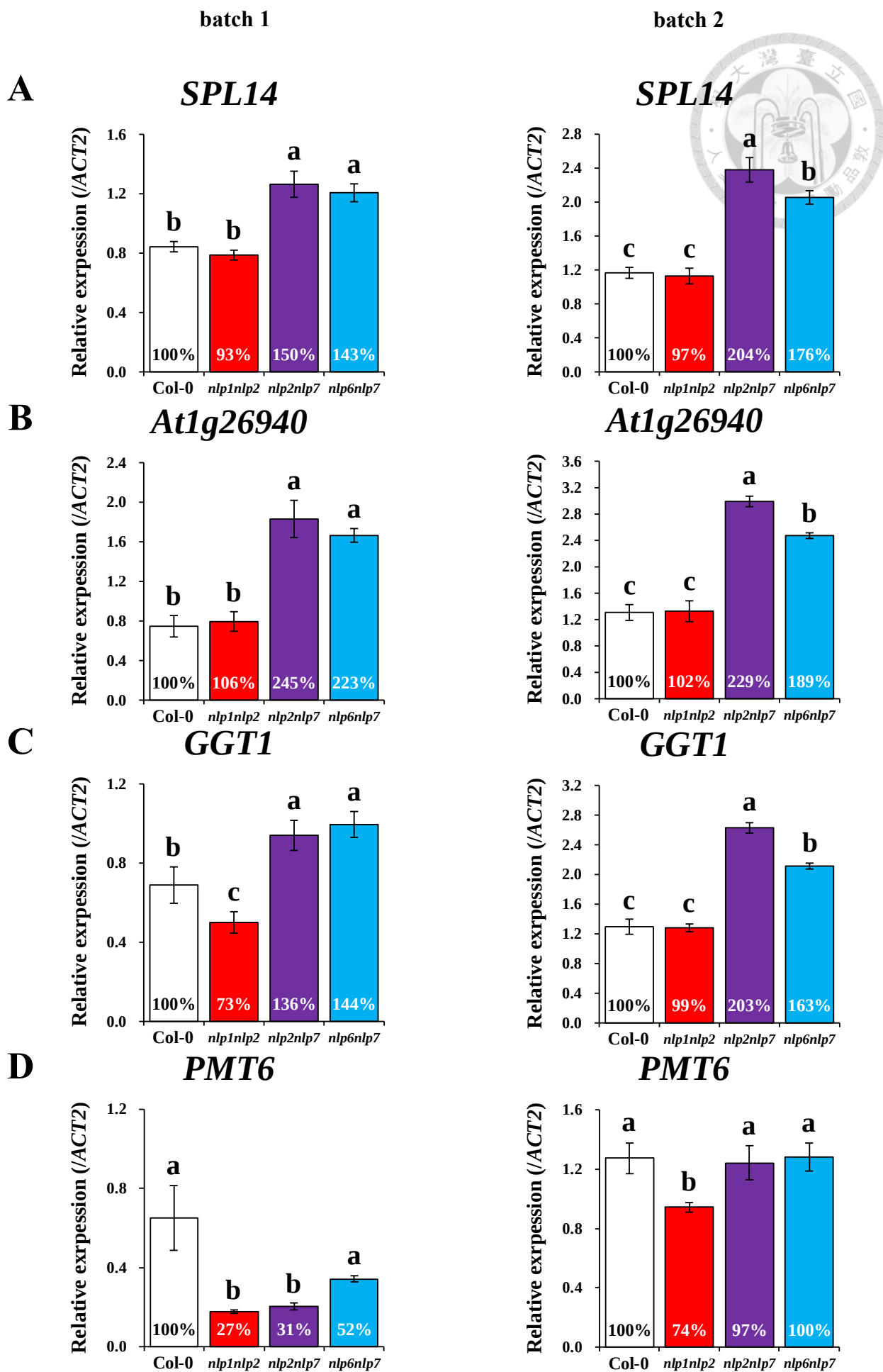


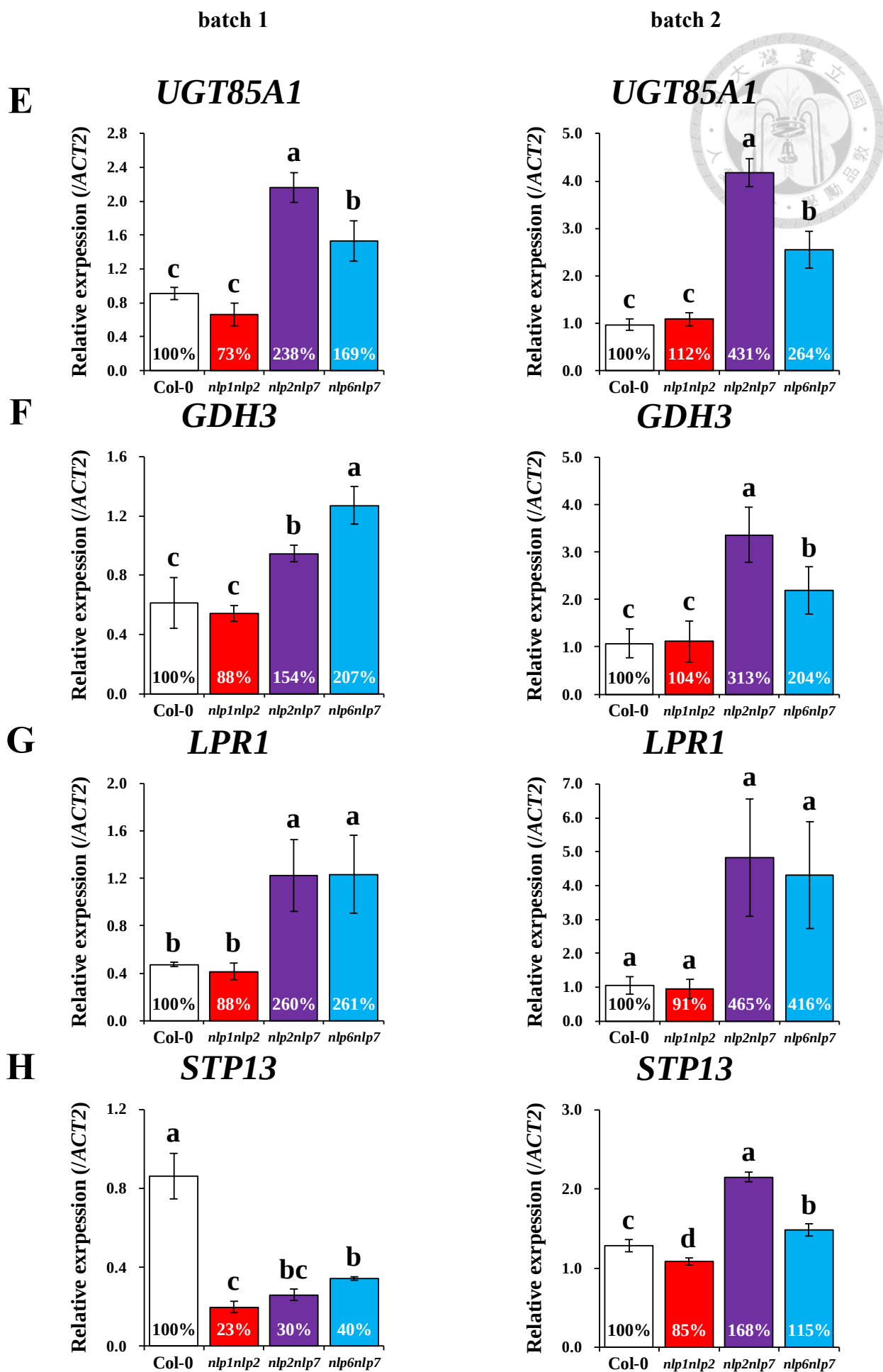
B



圖七、*nlp2nlp7* 和 *nlp6nlp7* 在銨鹽有生長遲緩。

植物生長在有 2 mM 銨鹽的水耕液 16 天後，收集地上部並秤重。A 為鮮重，B 為 batch 2 的地上部生長情形。每個樣品取自單一植株，共 9 重複。A 圖長條內的值分別為平均與相對於野生型的百分比，誤差線為標準差。長條上的字母為不同組別之間的顯著差異，藉由變異數分析搭配 Tukey's Honestly Significant Difference 或 Games-Howell 事後檢定來分析， $p < 0.05$ 。

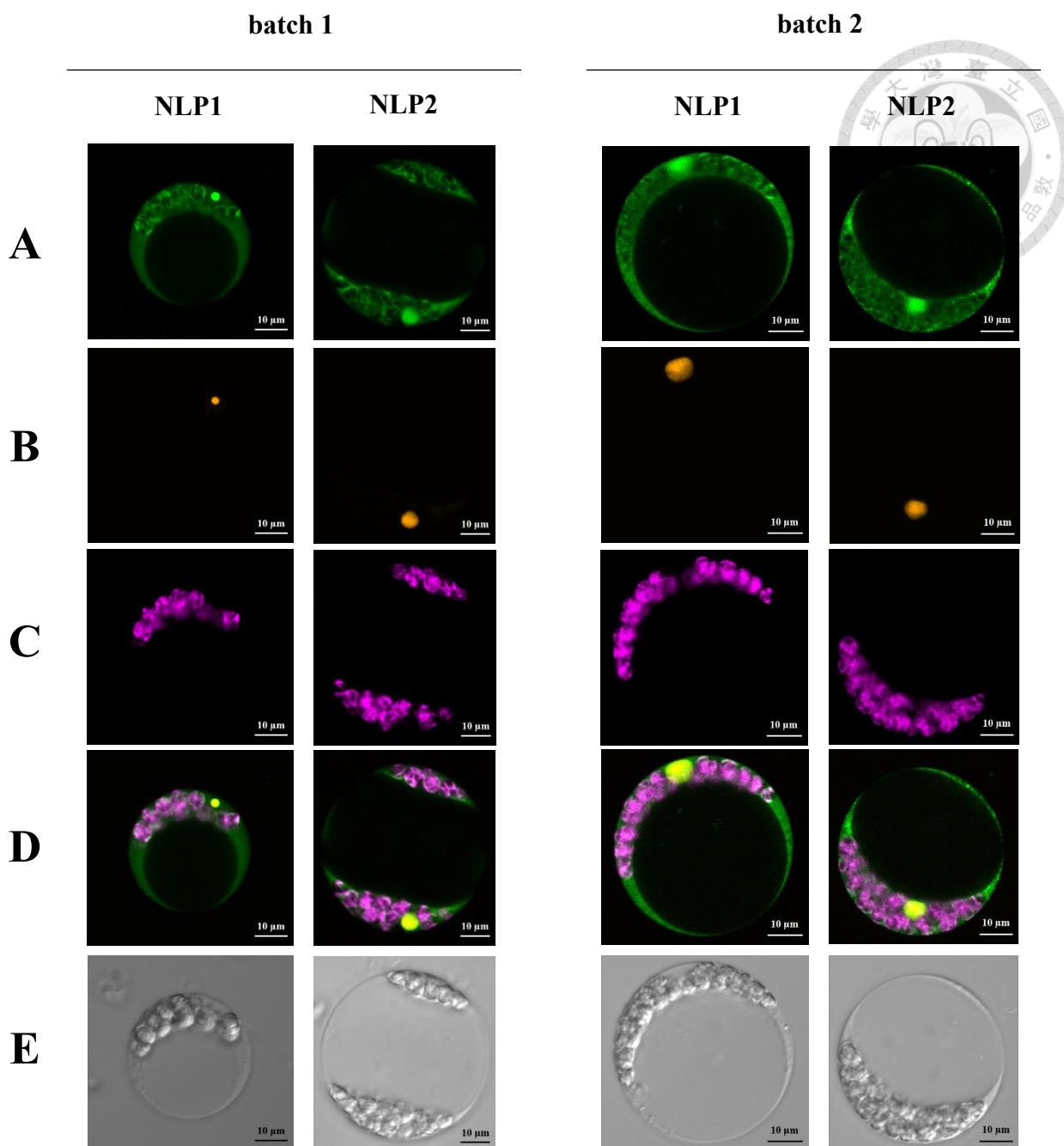




圖八、NLP2/7 和 NLP6/7 負向調控一樣的銨鹽反應基因之轉錄。

植物生長在有 25 mM 銨鹽的水耕液 9 天後，收集根部，藉由 RT-qPCR 分析轉錄量。A 為 *SPL14*，B 為 *Atlg26940*，C 為 *GGT1*，D 為 *PMT6*，E 為 *UGT85A1*，F 為 *GDH3*，G 為 *LPRI*，H 為 *STP13*。每個樣品取自約 400 株植物，共 4 重複。長條為平均，誤差線為標準差。長條內的值為相對於野生型的百分比。長條上的字母為不同組別之間的顯著差異，藉由變異數分析搭配 Tukey's Honestly Significant Difference 或 Games-Howell 事後檢定來分析， $p < 0.05$ 。





圖九、NLP1 和 NLP2 在有銨鹽的環境中分布於細胞質和細胞核。

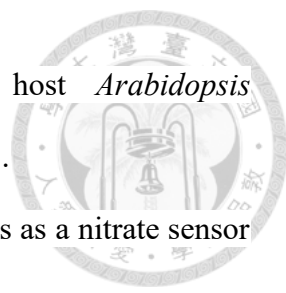
植物生長在有 2 mM 銨鹽的水耕液 19 天後，萃取葉片的原生質體，同時轉染 pro35S:NUC-L1-RFP 和 pro35S:NLP1-GFP 或 pro35S:NLP2-GFP，藉由共軛焦顯微鏡分析蛋白質在細胞內的位置。A 為 GFP 的訊號，B 為 RFP 的訊號，C 為葉綠素的訊號，D 為 A、B 和 C 的疊圖，E 為亮視野。每張照片取自單一細胞。

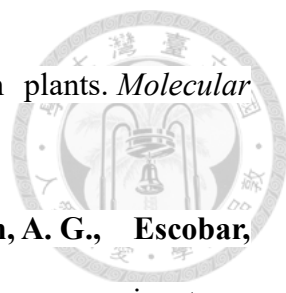
第六章

參考文獻



- Alvarez, J. M., Schinke, A. L., Brooks, M. D., Pasquino, A., Leonelli, L., Varala, K., Safi, A., Krouk, G., Krapp, A., Coruzzi, G. M. (2020).** Transient genome-wide interactions of the master transcription factor NLP7 initiate a rapid nitrogen-response cascade. *Nature Communications*, **11**(1), 1157.
- Castaings, L., Camargo, A., Pocholle, D., Gaudon, V., Texier, Y., Boutet-Mercey, S., Boutet-Mercey, S., Taconnat, L., Renou, J. P., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., Meyer, C., Krapp, A. (2009).** The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **57**(3), 426-435.
- Chardin, C., Girin, T., Roudier, F., Meyer, C., & Krapp, A. (2014).** The plant RWP-RK transcription factors: key regulators of nitrogen responses and of gametophyte development. *Journal of Experimental Botany*, **65**(19), 5577-5587.
- Cheng, Y. H., Durand, M., Brehaut, V., Hsu, F. C., Kelemen, Z., Texier, Y., Krapp, A., Tsay, Y. F. (2023).** Interplay between NIN-LIKE PROTEINs 6 and 7 in nitrate signaling. *Plant Physiology*, **192**(4), 3049-3068.
- Durand, M., Brehaut, V., Clement, G., Kelemen, Z., Macé, J., Feil, R., Duville, G., Launay-Avon, A., Paysant-Le-Roux, C., Lunn, J. E., Roudier, F., Krapp, A. (2023).** The *Arabidopsis* transcription factor NLP2 regulates early nitrate responses and integrates nitrate assimilation with energy and carbon skeleton supply. *The Plant Cell*, **35**(5), 1429-1454.
- Ferris, P. J., Goodenough, U. W. (1997).** Mating type in *Chlamydomonas* is specified by *mid*, the minus-dominance gene. *Genetics*, **146**(3), 859-869.
- Hernández-Reyes, C., Lichtenberg, E., Keller, J., Delaux, P. M., Ott, T., Schenk, S. T. (2022).** NIN-like proteins: interesting players in rhizobia-induced nitrate

- 
- signaling response during interaction with non-legume host *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **35**(3), 230-243.
- Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C., Tsay, Y. F.** (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, **138**(6), 1184-1194.
- Konishi, M., & Yanagisawa, S.** (2019). The role of protein-protein interactions mediated by the PB1 domain of NLP transcription factors in nitrate-inducible gene expression. *BMC Plant Biology*, **19**, 1-12.
- Konishi, M., Okitsu, T., Yanagisawa, S.** (2021). Nitrate-responsive NIN-like protein transcription factors perform unique and redundant roles in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **72**(15), 5735-5750.
- Krapp, A.** (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, **25**, 115-122.
- Krouk, G., Ruffel, S., Gutiérrez, R. A., Gojon, A., Crawford, N. M., Coruzzi, G. M., Lacombe, B.** (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends in Plant Science*, **16**(4), 178-182.
- Lin, Y. L., Tsay, Y. F.** (2017). Influence of differing nitrate and nitrogen availability on flowering control in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **68**(10), 2603-2609.
- Liu, Y., von Wirén, N.** (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, **68**(10), 2581-2592.
- Medici, A., Krouk, G.** (2014). The primary nitrate response: a multifaceted signaling pathway. *Journal of Experimental Botany*, **65**(19), 5567-5576.
- Mu, X., Luo, J.** (2019). Evolutionary analyses of NIN-like proteins in plants and their roles in nitrate signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **76**(19), 3753-3764.
- O'Brien, J. A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., Gutiérrez,**

- 
- R. A.** (2016). Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular Plant*, **9**(6), 837-856.
- Patterson, K., Cakmak, T., Cooper, A., Lager, I. D. A., Rasmusson, A. G., Escobar, M. A.** (2010). Distinct signaling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant, Cell & Environment*, **33**(9), 1486-1501.
- Sakuraba, Y., Zhuo, M., & Yanagisawa, S.** (2022). RWP-RK domain-containing transcription factors in the Viridiplantae: biology and phylogenetic relationships. *Journal of Experimental Botany*, **73**(13), 4323-4337.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, **402**(6758), 191-195.
- Schauser, L., Wieloch, W., Stougaard, J.** (2005). Evolution of NIN-like proteins in *Arabidopsis*, rice, and *Lotus japonicus*. *Journal of Molecular Evolution*, **60**, 229-237.
- Tsay, Y. F.** (2014). How to switch affinity. *Nature*, **507**(7490), 44-45.
- Tsay, Y. F., Chiu, C. C., Tsai, C. B., Ho, C. H., Hsu, P. K.** (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters*, **581**(12), 2290-2300.
- Vidal, E. A., Álvarez, J. M., Moyano, T. C., Gutiérrez, R. A.** (2015). Transcriptional networks in the nitrate response of *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, **27**, 125-132.
- Wang, Y. Y., Cheng, Y. H., Chen, K. E., Tsay, Y. F.** (2018). Nitrate transport, signaling, and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, **69**(1), 85-122.
- Wu, Z., Liu, H., Huang, W., Yi, L., Qin, E., Yang, T., Wang, J., Qin, R.** (2020). Genome-wide identification, characterization, and regulation of RWP-RK gene family in the nitrogen-fixing clade. *Plants*, **9**(9), 1178.
- Yan D, Easwaran V, Chau V, Okamoto M, Ierullo M, Kimura M, Endo A, Yano R, Pasha A, Gong Y, Bi YM, Provart N, Guttman D, Krapp A, Rothstein SJ,**

Nambara E. (2016). NIN-like protein 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 7(1), 13179.

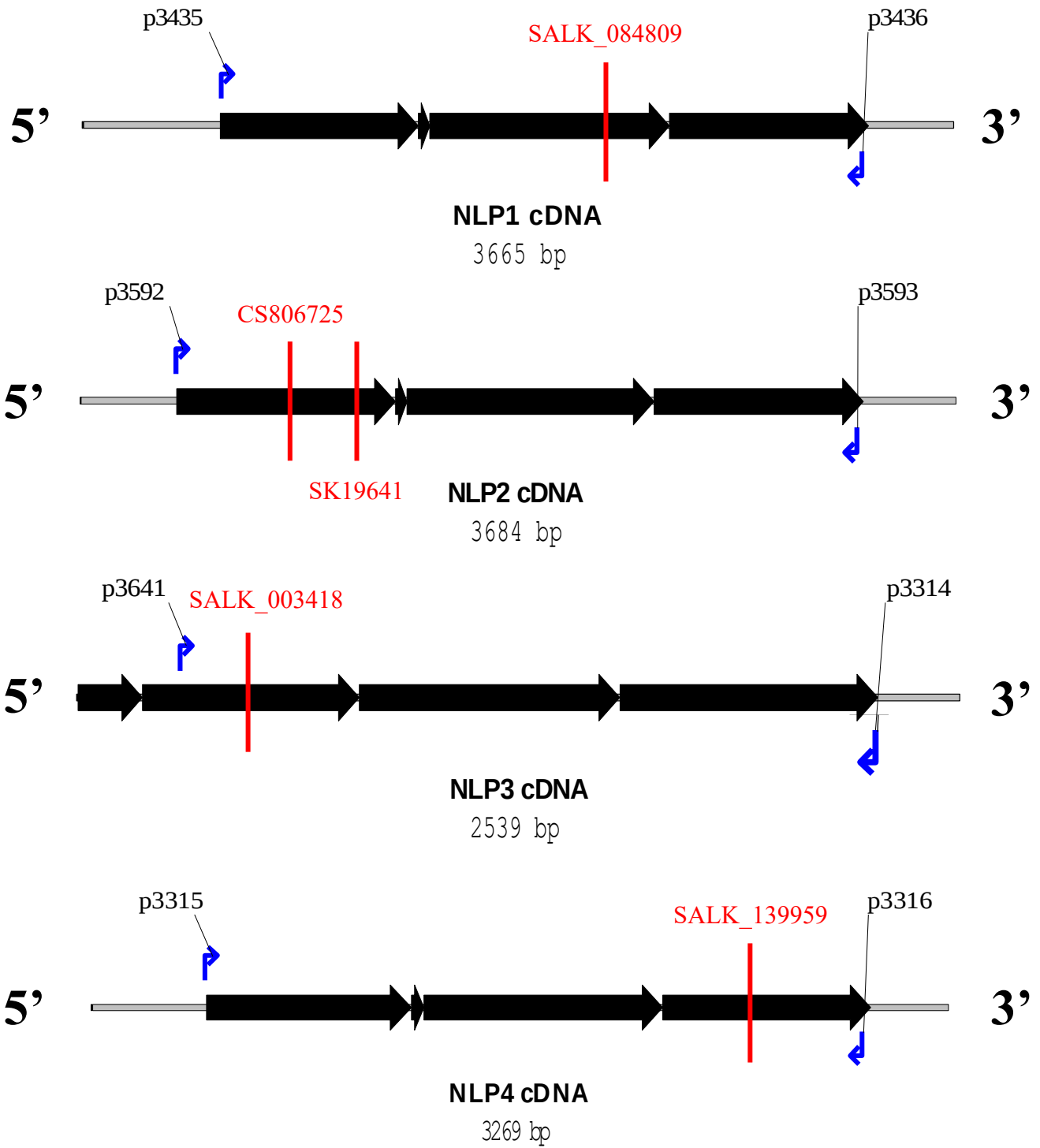


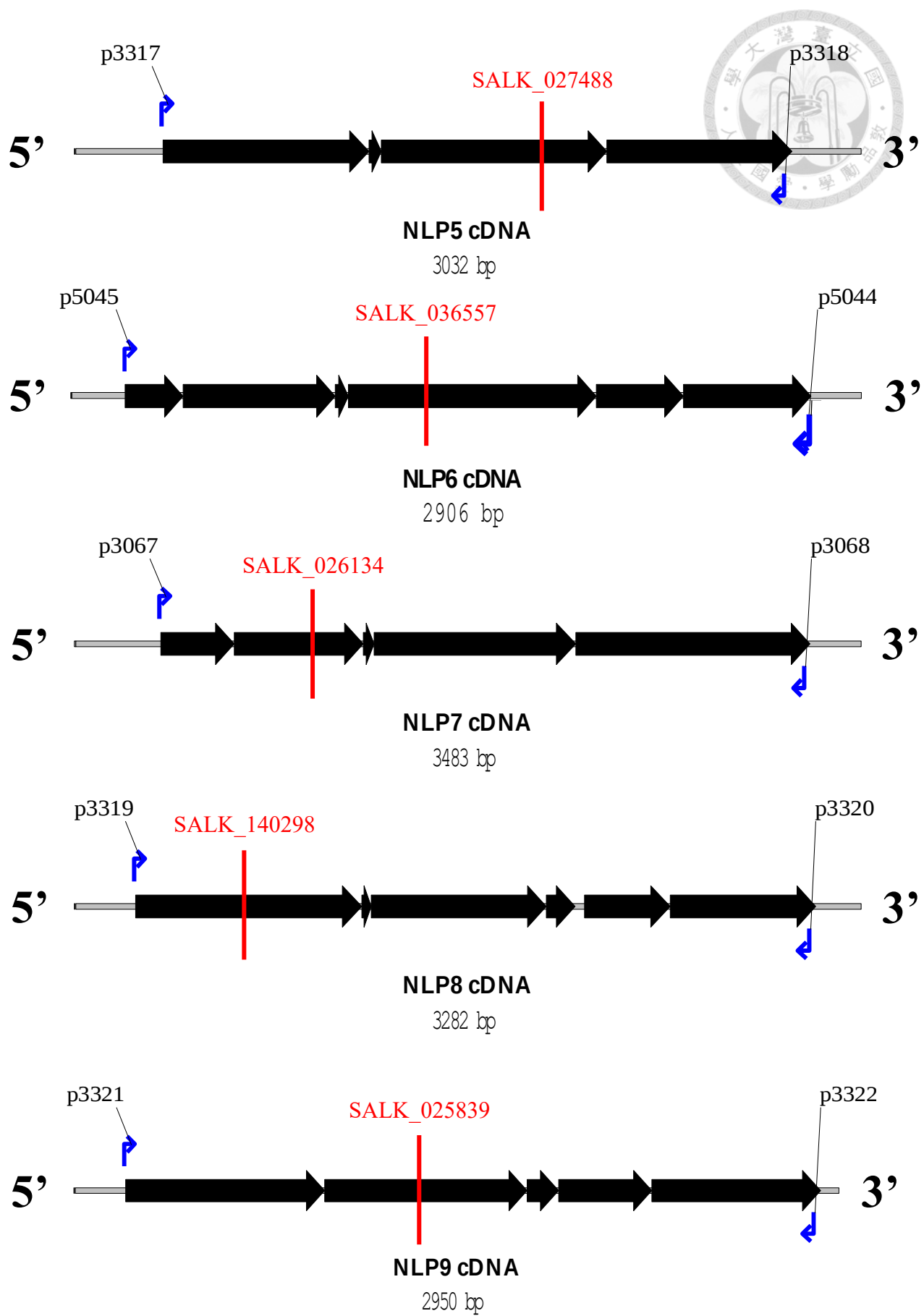
第七章

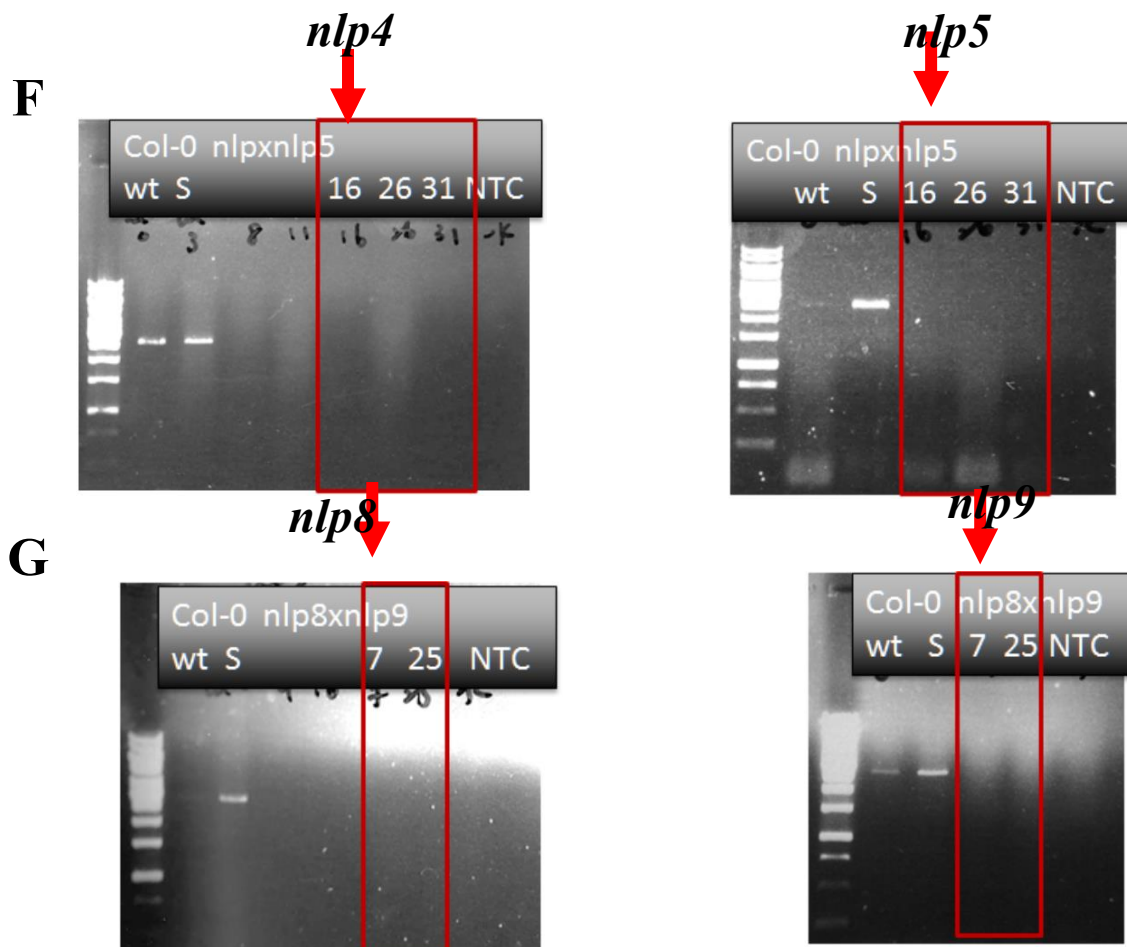
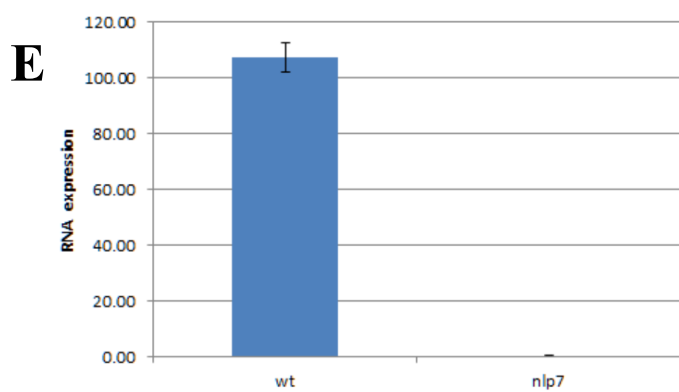
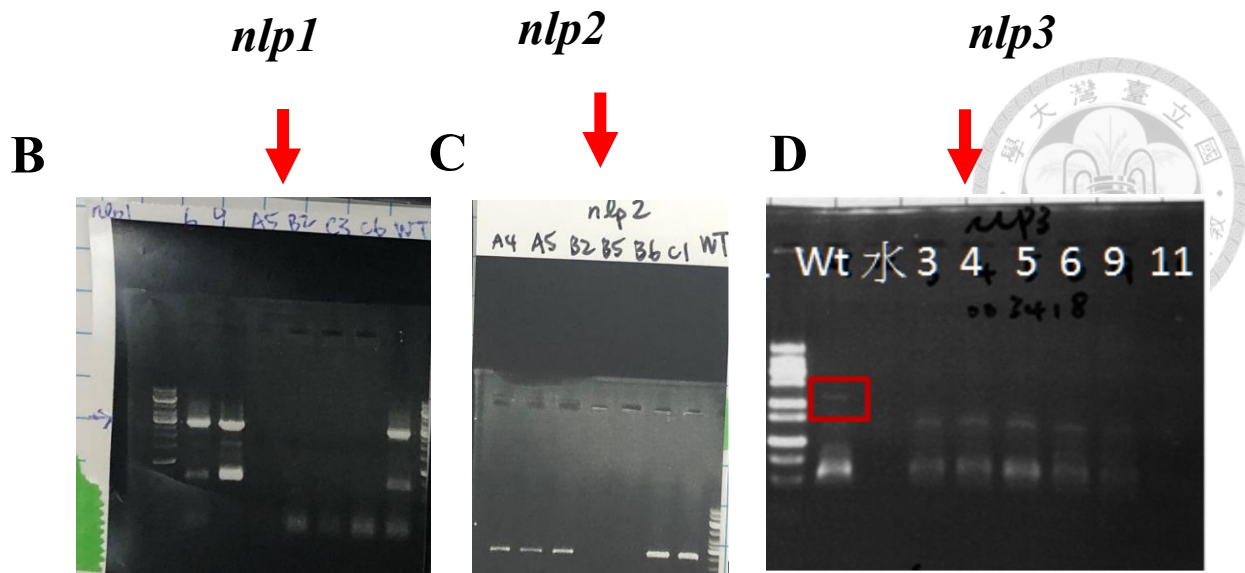
附錄



A

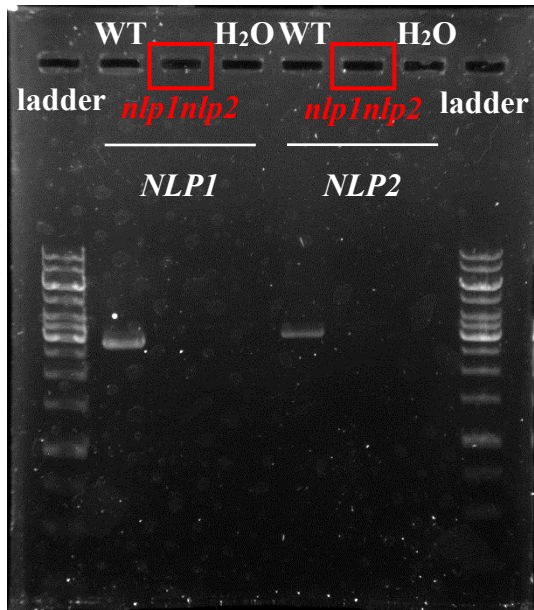




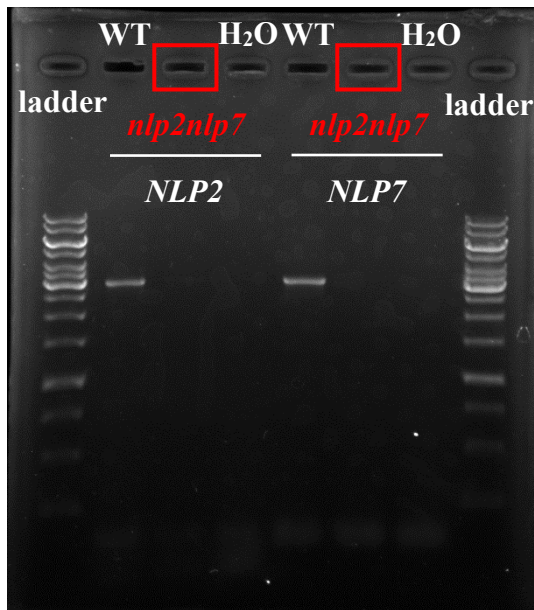




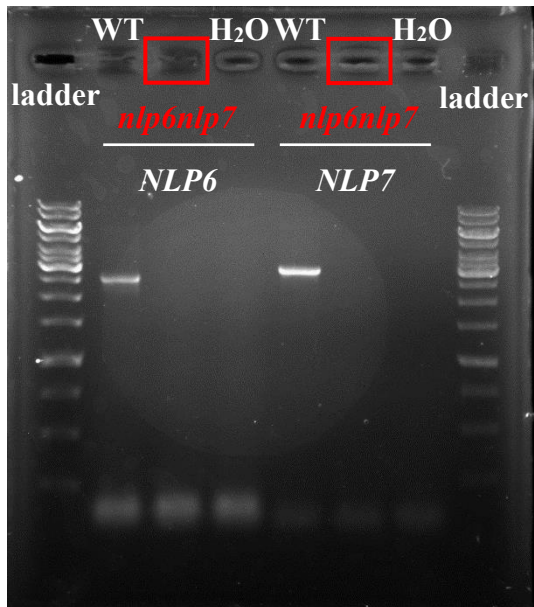
H



I



J



K

引子	引子序列 (5'-3')
p3067	ATGTGCGAGCCCGATGATAA
p3068	TCACAATTCTCCAGTGCTCT
p3221	CGAACCATCAGGCTCAGAA
p3222	CGTTCCTGCATCAACTTTCA
p3314	TTAAGAACCAGGAAGGACGAGAAAG
p3315	ATGGAAGATAGTTTCCTTCAATCTGAG
p3316	TCAGTGCCATAAACTGTATTCTAGC
p3317	ATGGAAAACAATTCTCTTCCTATG
p3318	TCATGAAAGACATCCACTGACAGA
p3319	ATGGAAAACCCTTTTGCTTCTAGA
p3320	TCATAAGCCTGTTCCAAGATAACC
p3321	ATGGAGAACCCATCAGCATCCAGA
p3322	TTAGGTGCCTGTTCCGAGGTAACC
p3435	ATGATGGTGGTAGTGATGGAGGCG
p3436	TCAGGAAAGACCAGTGTTGCCAAA
p3592	ATGGAAGGTGGTCGTGGTGGT
p3593	TTATAACGAGGGACCAAGACCGAT
p3641	GAAGAGGCAACGCAGCATGAC
p5044	CAAGCACATCATAGTTTCCTCTGAGC
p5045	ATGGAACCTTGACGACTTGGATCTC

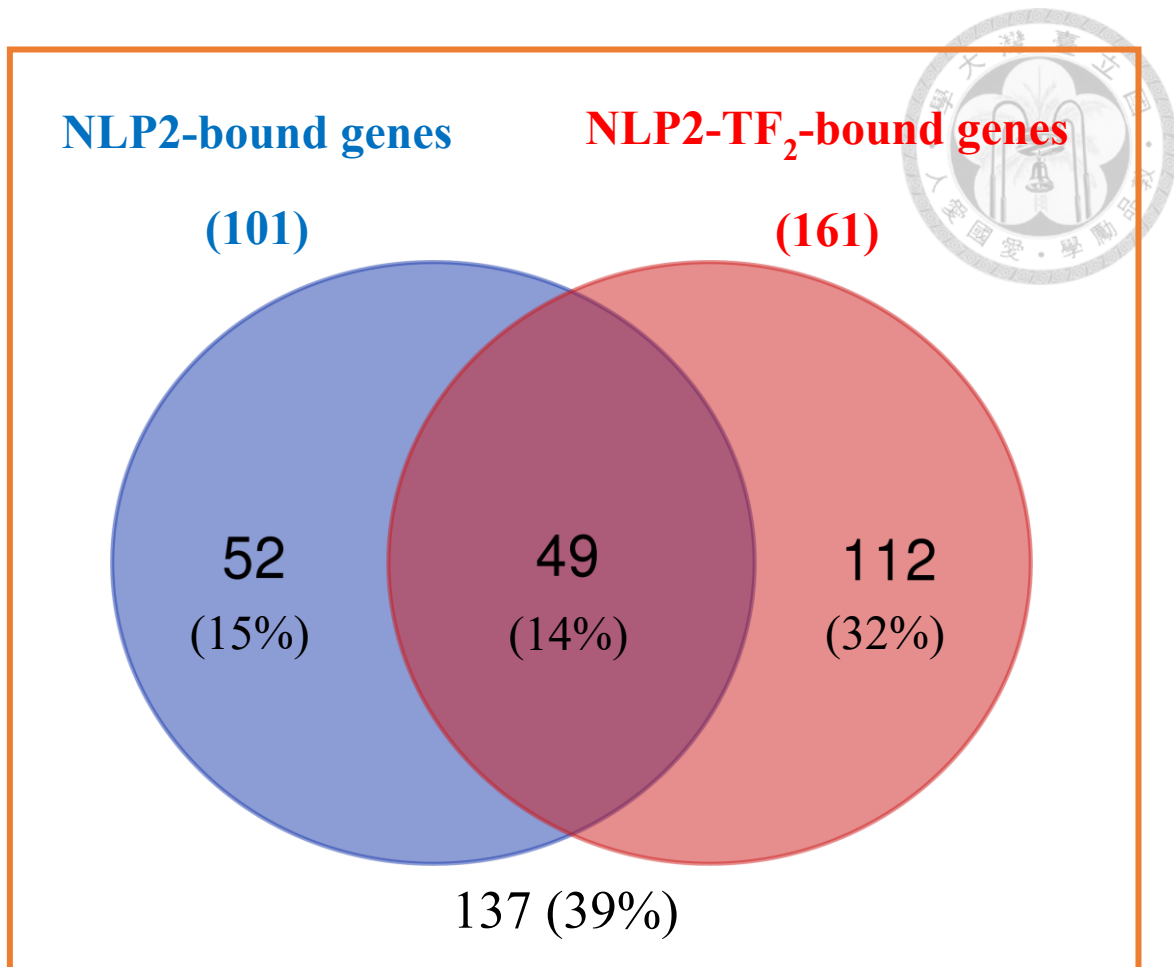


L

突變株	Stock No.	突變株的種類	參考文獻
<i>nlp1</i>	SALK_084809	knockout	(Konishi <i>et al.</i> , 2021)
<i>nlp2-1</i>	CS806725	knockout	(Konishi <i>et al.</i> , 2021)
<i>nlp3</i>	SALK_003418	knockout	(Konishi <i>et al.</i> , 2021)
<i>nlp7</i>	SALK_026134	knockout	(Castaings <i>et al.</i> , 2009)
<i>nlp1nlp2</i>	SALK_084809 (<i>nlp1</i>) x CS806725 (<i>nlp2-1</i>)	knockout	(Konishi <i>et al.</i> , 2021)
<i>nlp2nlp7</i>	SK19641 (<i>nlp2-2</i>) x SALK_026134 (<i>nlp7</i>)	knockout	(Konishi <i>et al.</i> , 2021)
<i>nlp4nlp5</i>	SALK_139959 (<i>nlp4</i>) x SALK_027488 (<i>nlp5</i>)	knockout	(Konishi <i>et al.</i> , 2021)
<i>nlp6nlp7</i>	SALK_036557 (<i>nlp6</i>) x SALK_026134 (<i>nlp7</i>)	knockout	(Cheng <i>et al.</i> , 2023)
<i>nlp8nlp9</i>	SALK_140298 (<i>nlp8</i>) x SALK_025839 (<i>nlp9</i>)	knockout	(Yan <i>et al.</i> , 2016)

附圖一、*nlp* 突變株是剔除突變株 (knockout mutant)。

A 為 9 個 *NLP* 的 cDNA 之結構，B 到 E 為 *nlp* 單突變株的 RT-PCR 和 RT-qPCR，F 到 J 為 *nlp* 雙突變株的 RT-PCR，K 為引子列表，L 為實驗用的所有 *nlp* 突變株之列表。黑色長方形為外顯子 (exon)，紅色線條為 T-DNA 插入的位置，藍色箭頭為引子，紅色箭頭指向的是實驗用的植物編號 (B 到 G 的 RT-PCR 與 RT-qPCR 由實驗室的鄭又瑄博士製作)。



NLP2-regulated nitrate-induced genes (350)

seedling, NO₃⁻, 30 min

附圖二、NLP2 可透過二次轉錄因子調控 NLP2 下游的硝酸鹽誘導基因。

NLP2 結合調控的硝酸鹽誘導基因和 NLP2 的二次轉錄因子結合調控的硝酸鹽誘導基因的文氏圖。NLP2 的二次轉錄因子包含 *HYH*、*BEE2*、*ERF60*、*LBD38* 和 *ABF2* (Durand *et al.*, 2023)。

NLP2-regulated nitrate-induced genes (350)

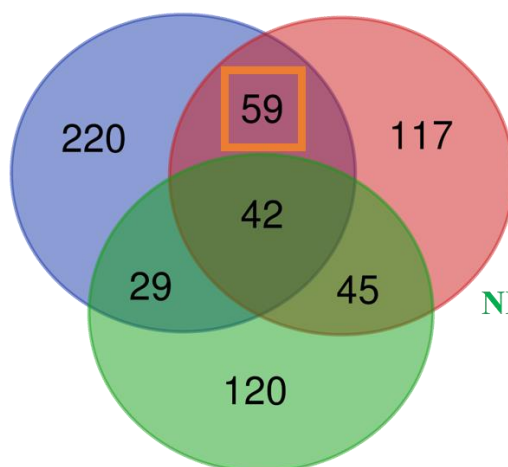
seedling,
NO₃⁻, 30 min
(Durand *et al.*, 2023)

NLP2-bound nitrate-induced genes (263)

seedling,
NO₃⁻, 30 min
(Durand *et al.*, 2023)

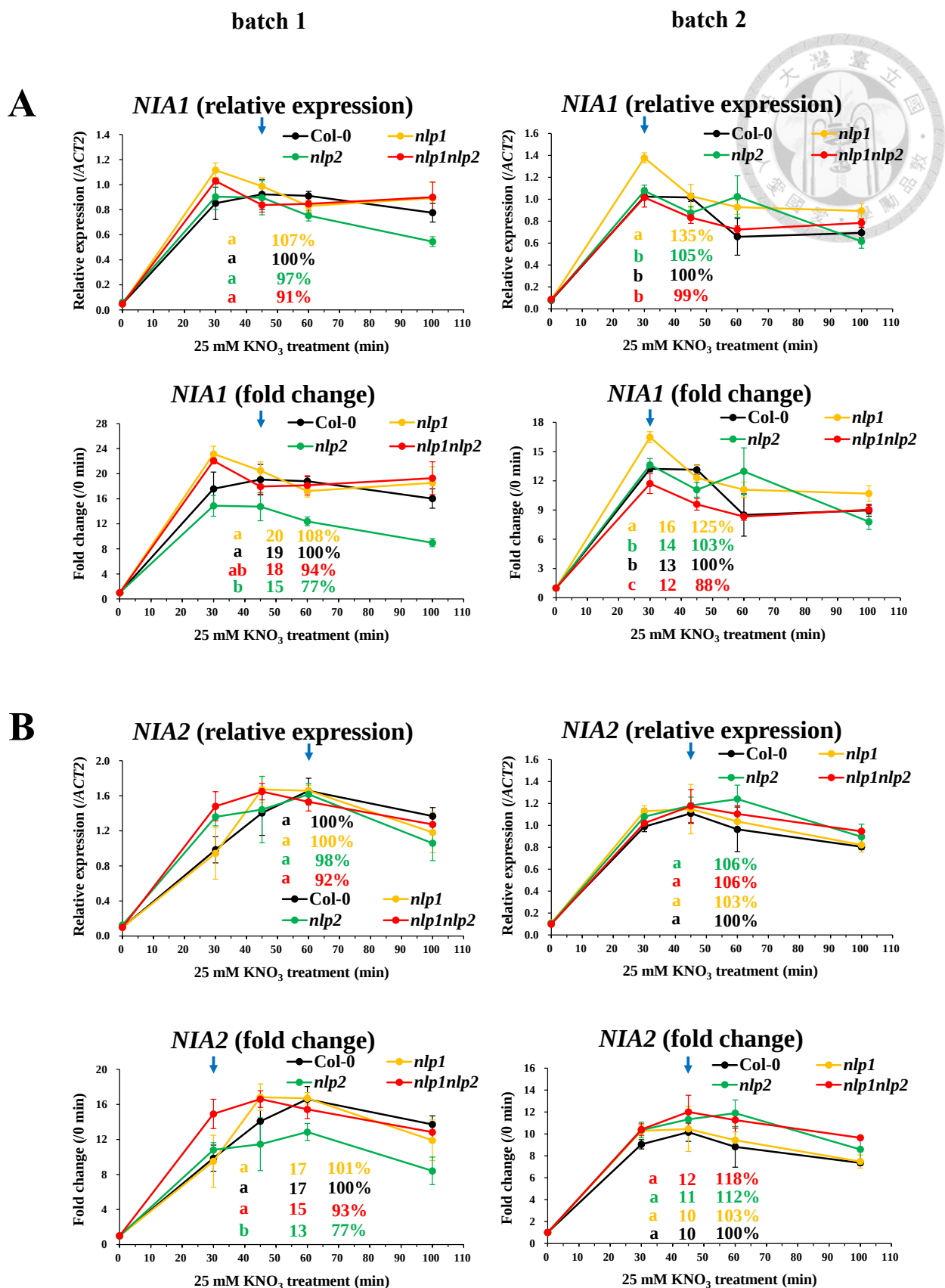
NLP7-regulated nitrate-induced genes (236)

root, NO₃⁻, 35 min
(Cheng *et al.*, 2023)



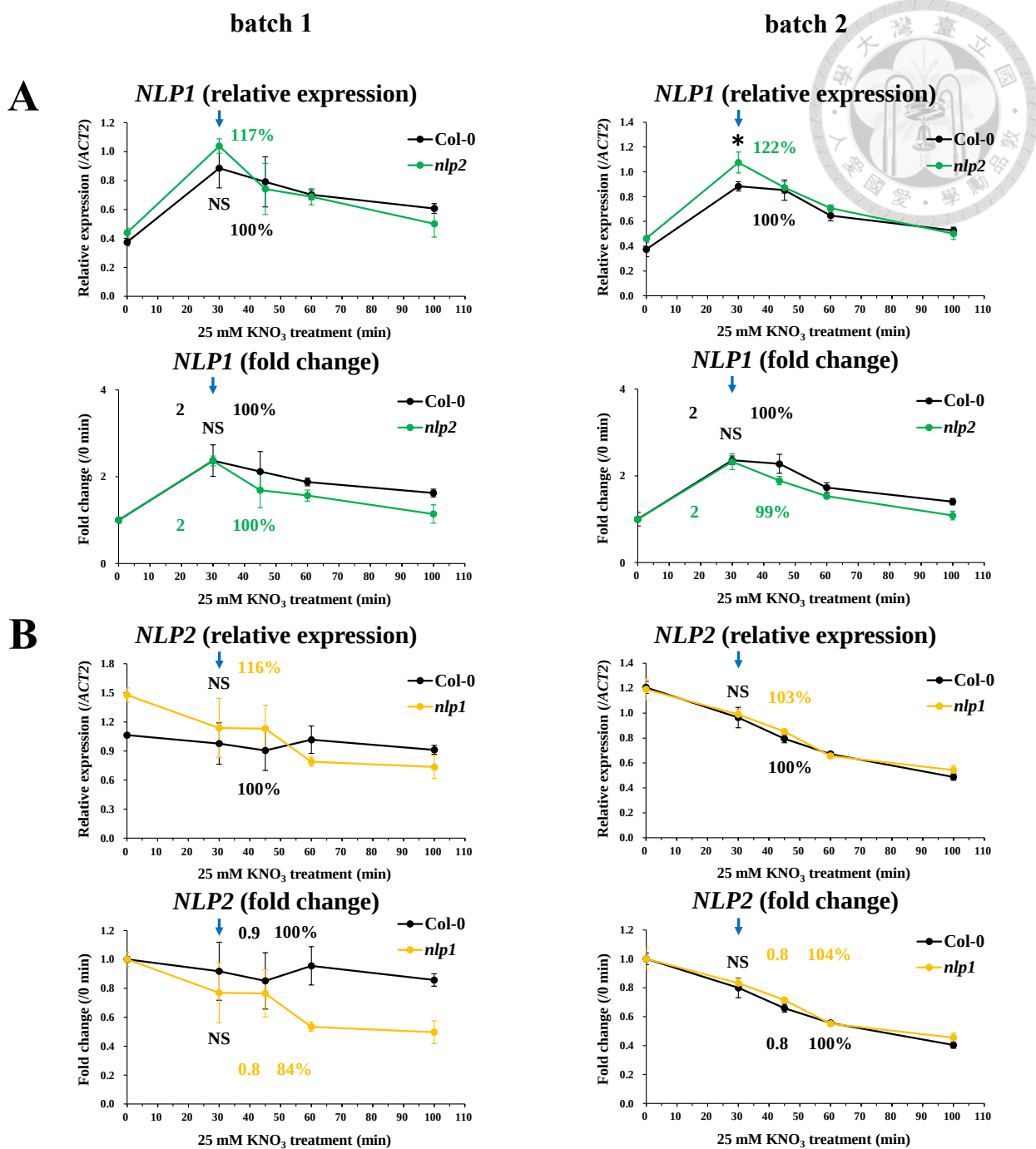
附圖三、有些 NLP2 的下游硝酸鹽誘導基因不受 NLP7 調控。

NLP2 調控的硝酸鹽誘導基因、NLP2 結合的硝酸鹽誘導基因和 NLP7 調控的硝酸鹽誘導基因三者之文氏圖。在 59 個 NLP2 專屬的下游基因中，被硝酸鹽調控明顯 (WT 的基因表現被硝酸鹽誘導的倍數 > 2) 且被 NLP2 調控明顯 (*nlp2* 的基因表現被硝酸鹽誘導的倍數 / WT 的基因表現被硝酸鹽誘導的倍數 < 0.65) 的基因有 5 個，分別是 *MAPKKK14*、*ZAT1*、*UMAMIT36*、*Atlg22170* 和 *PRS2*。





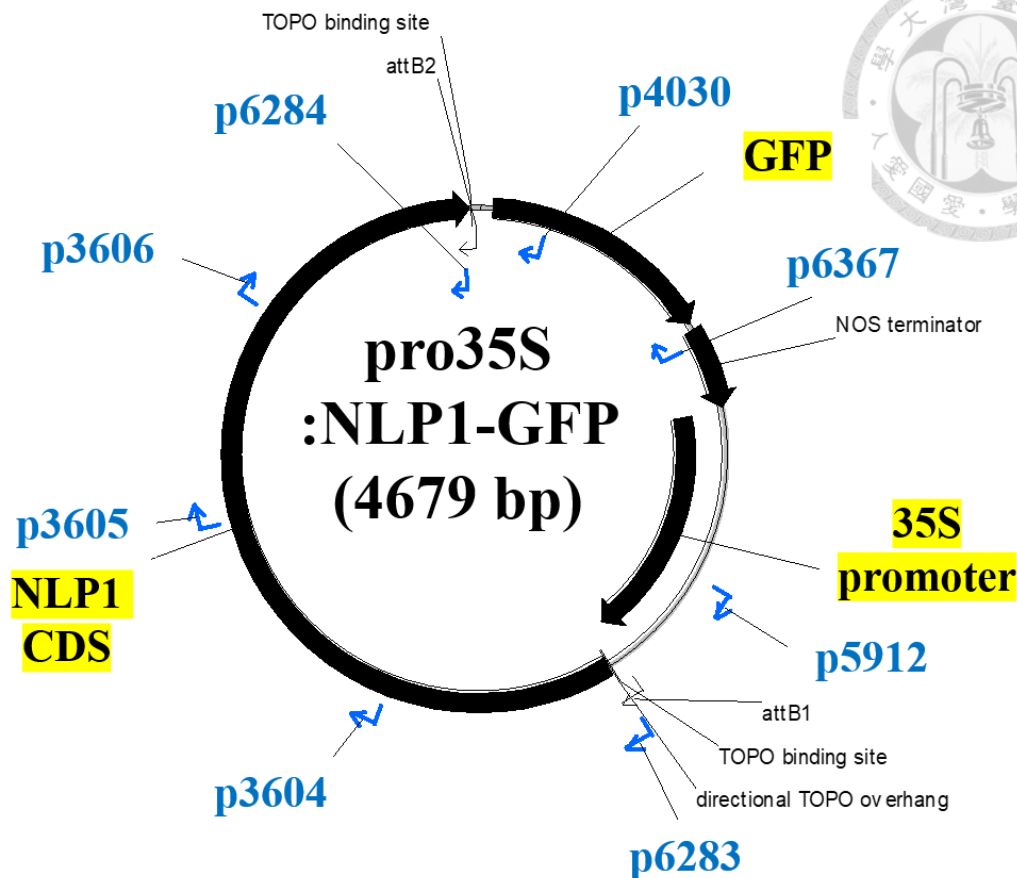
附圖四、NLP1 和 NLP2 不調控 *NIA1* 和 *NIA2* 的初期硝酸鹽反應。植物生長在有 25 mM 銨鹽的水耕液 9 天後，用有 25 mM 硝酸鹽的水耕液處理 0、30、45、60 和 100 分鐘並收集根部，藉由 RT-qPCR 分析轉錄量。A 為 *NIA1*，B 為 *NIA2*。每個樣品取自約 400 株植物，共 4 重複。值為野生型到達表現高峰時（藍色箭頭所指的時間點）的相對表現量或相對於零點之誘發倍數變化的平均，以及相對於野生型的百分比，誤差線為標準差。字母為不同組別之間的顯著差異，藉由變異數分析搭配 Tukey's Honestly Significant Difference 或 Games-Howell 事後檢定來分析， $p < 0.05$ 。



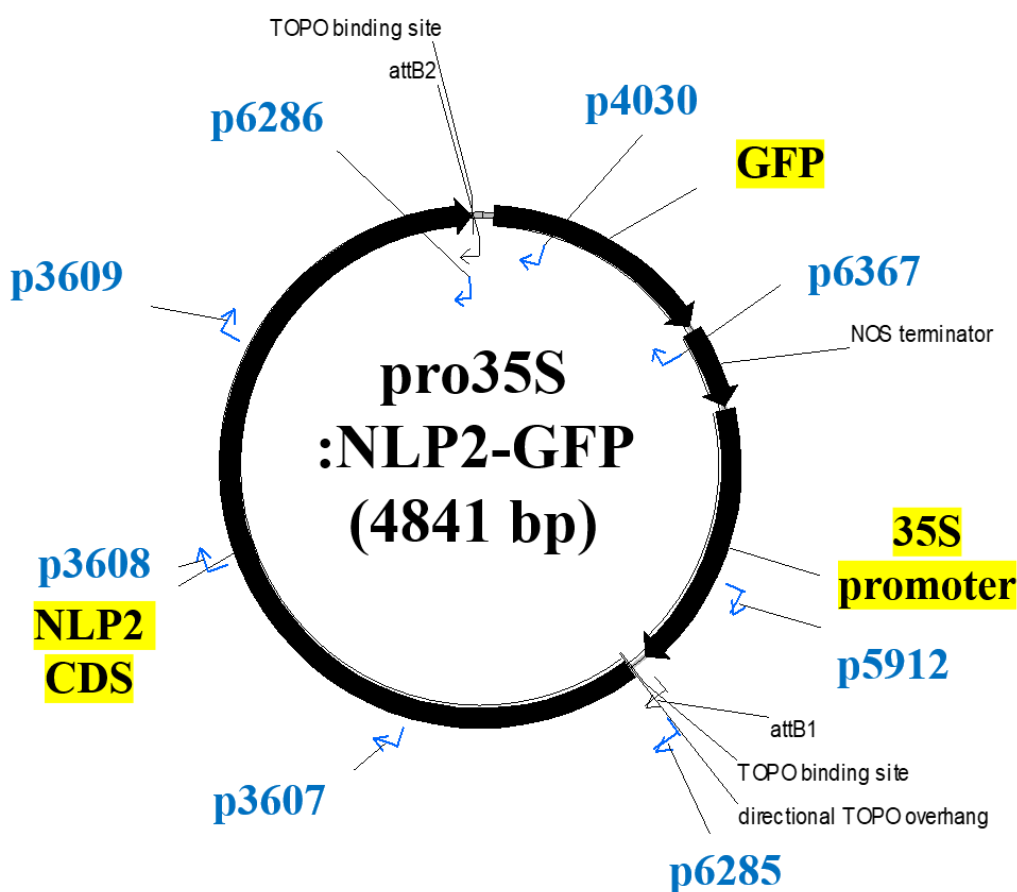
附圖五、NLP1 和 NLP2 互不調控彼此的初期硝酸鹽反應。

植物生長在有 25 mM 銨鹽的水耕液 9 天後，用有 25 mM 硝酸鹽的水耕液處理 0、30、45、60 和 100 分鐘並收集根部，藉由 RT-qPCR 分析轉錄量。A 為 *NLP1*，B 為 *NLP2*。每個樣品取自約 400 株植物，共 4 重複。值為 30 分鐘時（藍色箭頭所指的時間點）的相對表現量或相對於零點之倍數變化的平均，以及相對於野生型的百分比，誤差線為標準差。不同組別之間的顯著差異用 Student's t 檢定來分析，星號表示有統計顯著差異，NS 表示無統計顯著差異， $p < 0.05$ 。

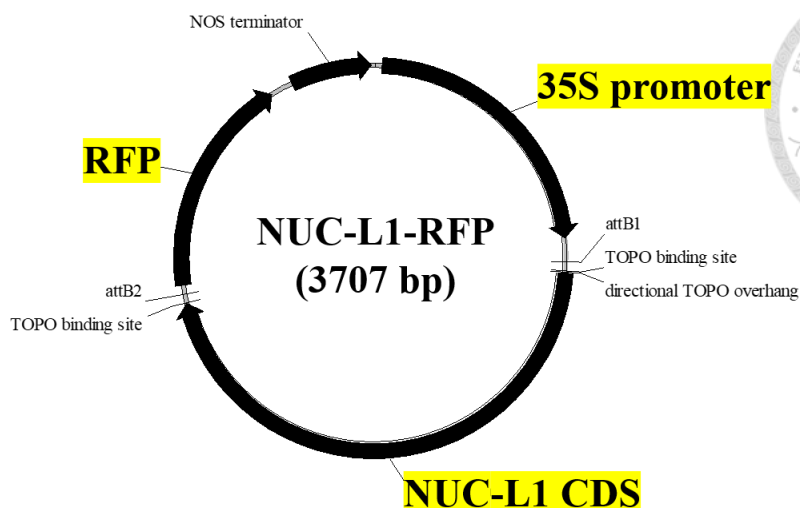
A



B



C



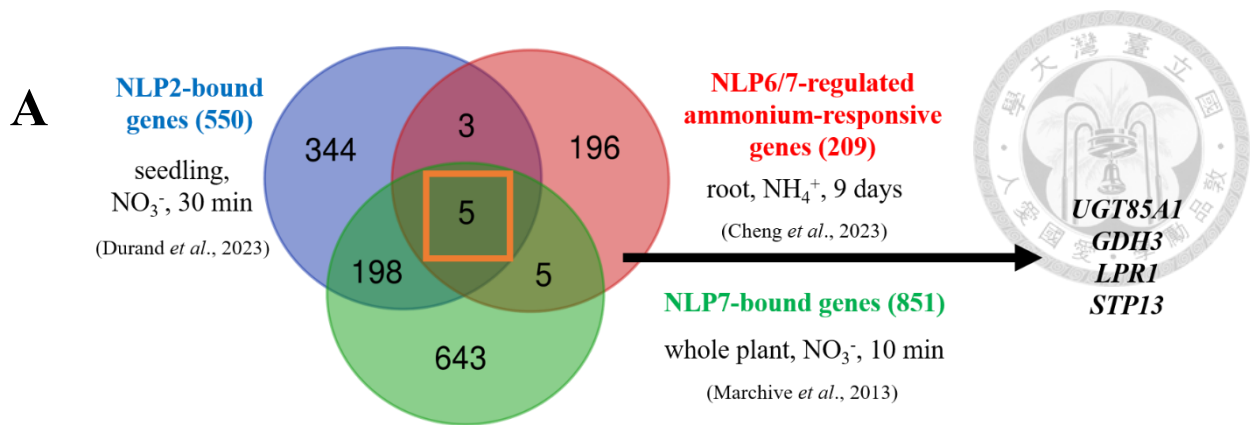
D

引子	引子序列 (5'-3')
p3604	GCACAAAAGTGTGATGTTTCGTGGT
p3605	GCAAGATTTCAGGAGTTCAAATCTT
p3606	GCCCTTCCTTGAAGAGTAATGAAC
p3607	CCTGAGTGGACACCTGATGTGCGG
p3608	GCTTGCCTTGACACCGAAGCA
p3609	GAAGATCAAGAAAGTGGGGCA
p4030	GAACACCATAAGAGAAAGTAGTGACAAGTG
p5912	AAACCTCCTCGGATTCCATTG
p6283	CACCATGGAAGATGATGGTGGTAGTG
p6284	GGAAAGACCAGTGTTGCCAAAAGA
p6285	CACCATGGAAGGTGGTCGTGGTGGT
p6286	TAACGAGGGACCAAGACCGATG
p6367	AATCATCGCAAGACCGGCAA

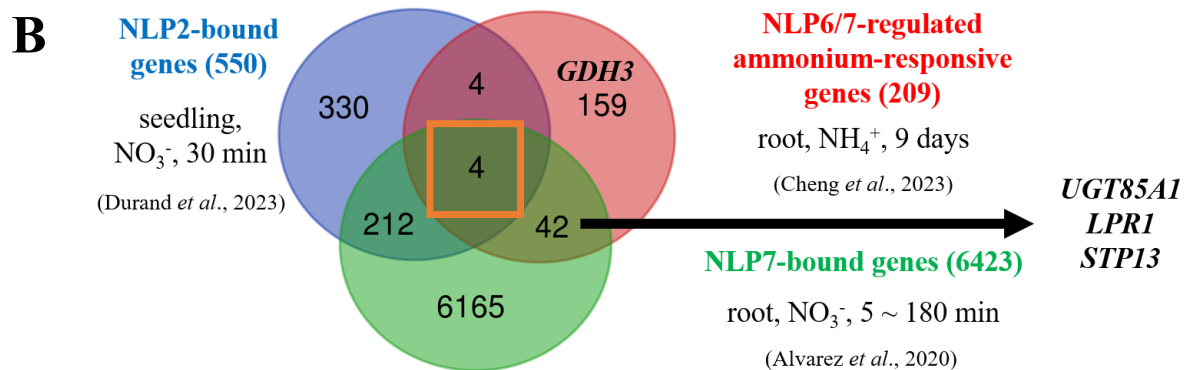
附圖六、細胞內蛋白質位置分析所用的質體之圖譜。

A 為 pro35S:NLP1-GFP ; B 為 pro35S:NLP2-GFP ; C 為 pro35S:NUC-L1-RFP , D

為定序的引子列表。藍色箭頭為引子，CDS 是編碼序列 (coding sequence)。



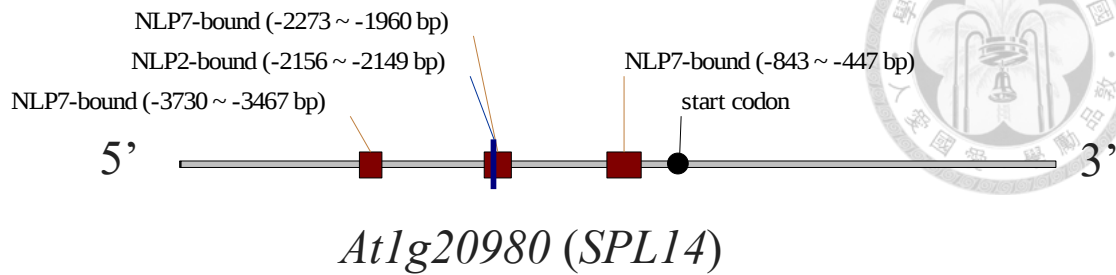
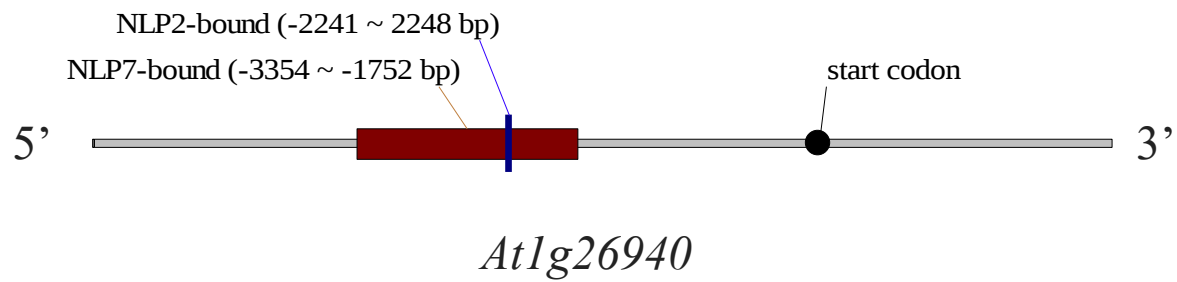
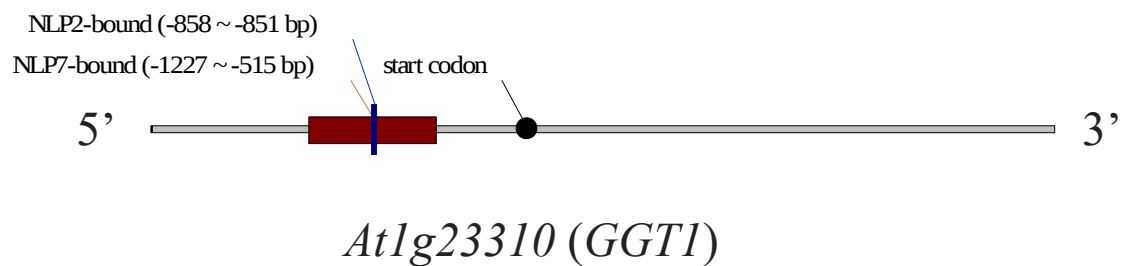
At1g20980 (*SPL14*): squamosa promoter binding protein-like 14
At1g26940: cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
At1g23310 (*GGT1*): glutamate:glyoxylate aminotransferase 1
At4g36670 (*PMT6*): polyol/monosaccharide transporter 6
At3g15500 (*NAC055*): NAC domain-containing protein 55



At1g20980 (*SPL14*), *At1g26940*, *At4g36670* (*PMT6*), *At3g15500* (*NAC055*)

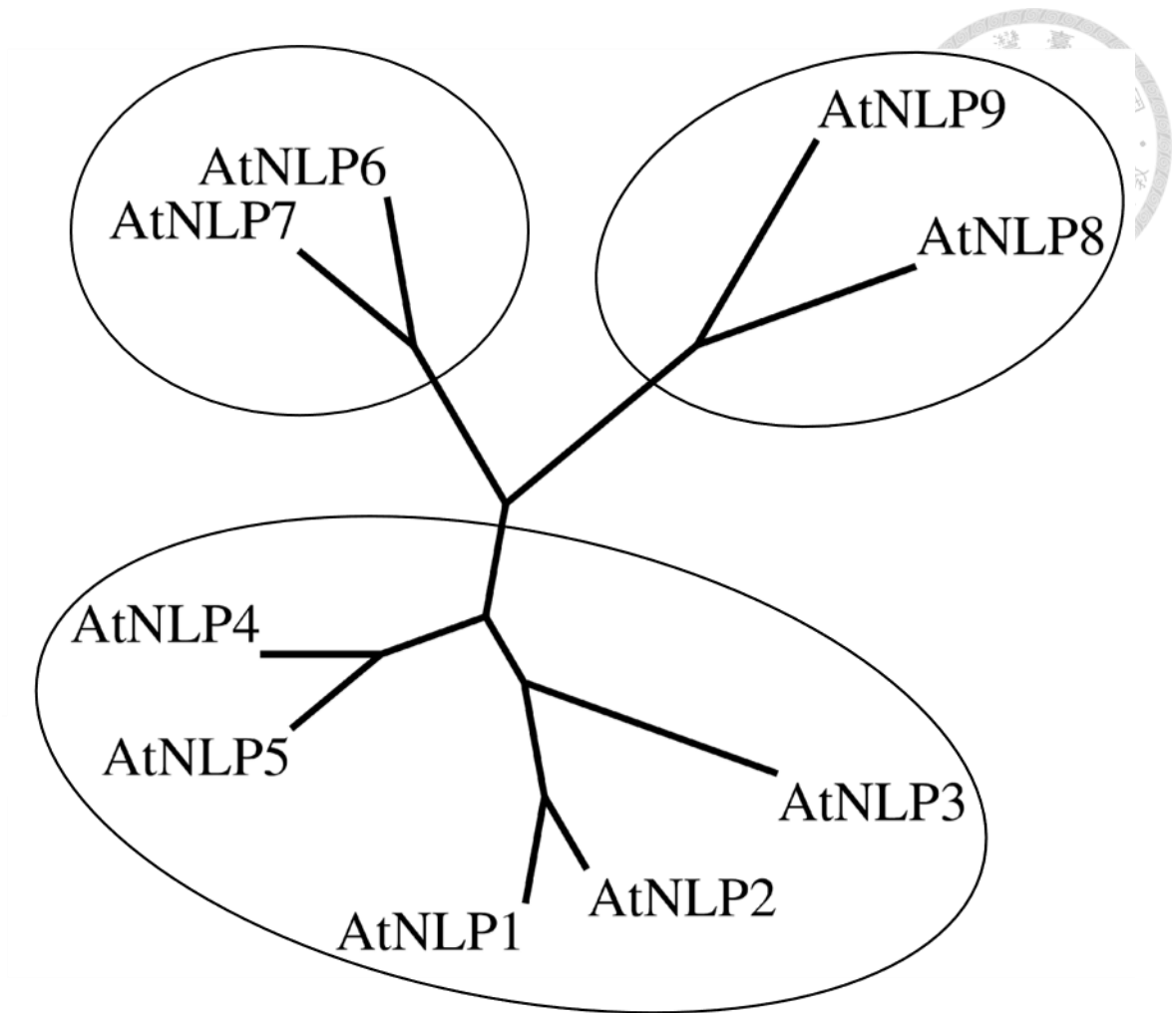
附圖七、NLP2 可以結合 NLP7 直接調控的銨鹽反應基因。

NLP2 結合的基因、NLP6/7 調控的銨鹽反應基因以及 NLP7 結合的基因三者之文氏圖。A 的 NLP7 結合的基因來自 (Marchive *et al.*, 2013)，B 的 NLP7 結合的基因來自 (Alvarez *et al.*, 2020)。

A**B****C**

附圖八、NLP2 和 NLP7 在鉍鹽反應基因的啟動子有重疊的結合位。

A 為 *SPL14*，B 為 *Atlg26940*，C 為 *GGT1*。黑色圓點為起始密碼子，藍色長方形為 NLP2 的結合位，棕色長方形為 NLP7 的結合位。括號內的數字為 NLP2 的結合位和 NLP7 的結合位到起始密碼子的距離。NLP2 的結合位來自 (Durand *et al.*, 2023)；NLP7 的結合位來自 (Marchive *et al.*, 2013)。



附圖九、阿拉伯芥 NLP 蛋白家族的演化樹。

阿拉伯芥的 NLP 蛋白有 9 個，按照演化分成三群，第一群有 NLP1 到 NLP5，第二群有 NLP6 和 NLP7，第三群有 NLP8 和 NLP9 (本圖由實驗室的鄭又瑄博士製作)。

ME GG GG GN F PNS FG F D3AMD6DFMDELLFDGCWLETTD KSLKQT Q S ST MNDN 5L 5

NLP1 : MEDIGGSIGGEGNGGSPNSFGARADTAMDLDLDFMDELLFDGCWLETTDSKSLKQTECSFASSTAMNDNS--FFLC---FG : 76
 NLP2 : ME--GGRGGGIGN--FLPNSNFGVHSDSAMDMDLDFMDELLFDGCWLETTDGKSLKQTMGQQVSDSTTMNDNNNNSYLYGYCYA : 78
 ME GG GG GN F PNS FG F D3AMD6DFMDELLFDGCWLETTD KSLKQT Q S ST MNDN 5L 5

NLP1 : ENFSQDNFSNEETFRFF-----CAEKFLLEE E V G K S W W I A S S E G P S S S V K E R L L Q A : 131
 NLP2 : ENFSQDNHSNEETGRFFPIPPGFLKIEDLSNQVPFDQSAVMSSA CAEKFLLEESGGRVYWIAERTSCGPSSSSVKERLVQA : 160
 EN SQD SNEET R FP CAEKFLLEE E G4 SWIAP S2GPSSSVKERL6QA

NLP1 : ISGLNEAVQDKDFLVQIIVVPIQOEGKSFLLTTWOPHIFNOHYSSIAEYRHVSETYNFPADEGMDKDFVGLPGRVFLCKPEWT : 213
 NLP2 : IEGLNEDVQDKDFLIQIWLPIQOEGKNFLTTSEOPHIFNERYSSI KRYRDLVSVAYNFLADEDSKESVGLPGRVFLKRIPEWT : 242
 I GLNE VQDKDFL6QIWL6PIQOEGK FLTT QPH FN YSSL YR VS YNF ADE K VGLPGRVFL K PEWT

NLP1 : PDVRFRRRIEYPRIKEAQCDDVRGSLALPVFERGSGTCLGVVEIVTTTQKMNYRCETERMCKALEAVDLRSSSNLNPSPSEF : 295
 NLP2 : PDVRFRRSEYPRIKEAECCDDVRGSLALPVFERGSGTCLGVVEIVTTTQKMNYRPEIDNICKALESVNRSSSNLNPSPSEF : 324
 PDVRFRR EYPRIKEA2 CDDVRGSLALPVFERGSGTCLGVVEIVTTTQKMNYR EL 6CKALE VILRSS LN PS EF

NLP1 : LQVYSLFYCAALPEIKFLATICTRSYDPLALSWAPCARQKVGSRHSDENFSECVSTIDSACSVPDEQSKSEWEACESEHHL : 377
 NLP2 : LQVYNEFYAALPEVSEFLLTVCRVYDPLALTWAPCARQKVGSRHSDENFSECVSTVDLACTVPDQSRRIEACESEHHL : 406
 LQVY FY AALPE6 FL 6CR YD PLAL3WAPCARQKVGSRHSDENFSECVST6D AC VPD QS4 F EACESEHHL

NLP1 : LQGEIVGKAFATKLVFVPEVATFSKTNYPALHAKISGLHAALAVPLKSKS-GVEFVLEFFFPKACLDTEAQQMLKSL : 458
 NLP2 : LQGEIVGKAFATKLVFVPEVATFSKTNYPALHAKISGLHAALAVPLKKNENSSVEFVLEFFFPKACLDTEAQQMLKSL : 488
 LQGEIVGKAF ATKLVFVPEV TFSKTNYPALHAKISGLHAALAVPLK K VEFVLEFFFPKACLDTEAQQ MLKSL

NLP1 : CVTLQODFRSSNLFI--RDELEVVPVRETMLESENULCGAETVBSIT-----EIQNCSSWIHMIKANEGKGVLSWEY : 534
 NLP2 : SATLQODFRSINLFI--RDELEVVPVRETVVRAENELINAGTGEDMKPLPLEEISCEISSWISHMIKANEGKGVLSWEY : 570
 TLQODFRS NLFI K LELEV VPVRE 66F EN L A T E 6 EI 2 SSWI HMIKANEGKGVLSWEY

NLP1 : QKEPKE---LSSGRENOLDPVFNNVPTAEACICQSTEGLRVDIGPSTESASTGCGN-MLSSRRPGEKRRKTEKTIGLE : 612
 NLP2 : QKEPKEEFMLTSGWNNQHGSGHNNFLSEAECEQKVNTSGLRIDMLPSESASEGVGQILLGSRRPGEKRRKTEKTIGLE : 652
 QKE PKE L3SG N Q6 NN EAEQ Q 3 GLR6D6 PS ESAS G G 6L SRRPGEK4R KTEKTIGLE

RWP-RK domain

NLP1 : VLRQYFAGSLKDAAKSIGVCPTTLKRICRQHGIWRWPSRKIKKVGHSLKKLQLVMDSVQCGQGSIQLDsfytsfpepLSPM : 694
 NLP2 : VLRQYFAGSLKDAAKSIGVCPTTLKRICRQHGIWRWPSRKIKKVGHSLKKLQLVMDSVQCGQGSIQLDsfytsfpepLSPM : 734
 VLRQYFAGSLKDAAKSIGVCPTTLKRICRQHGI WRWPSRKIKKVGHSLKKLQLV6DSVQG QGSIQLDsfytsfpepL SP M

NLP1 : SSNGHSLKSNEQPSHINAQTUNGIMAE---ENPRSE-SSSSCSKSSGSS-----NNNENTG-----NILVAEDALAVLKR : 759
 NLP2 : SGTTSFKNP-----NAQTEGVSAQGTAAAPKSEFSSSSCSHSSGSSGCCSTGANQSTNTGTTSTNTVTLMAENASAILKR : 810
 S G S K NAQT NG6 A2 P4SP SSSCS SSGSS N NTG L6AE1A A6LKR

NLP1 : AHSEACLVNVCETKCLARTCSHKTFKEPLVLDNSSLTSSNTSLRARGAKVKATFGGEARIRFTLLPSWGFELKCEIA : 841
 NLP2 : ARSEVRLHMTNQCETKSLSRTLSHKTFSEHPLTFENPERIPENSRRKLKAGGASKVKATFGGEAKVRFTLLPTWGFREICHEIA : 892
 A SE LH 6NQ ETK L RT SHKTF E 6 N L S L4A GA VKATFGGEA46RFTLLP3WGF EL EIA

PB1 domain

NLP1 : RRFNIDDIISWFDLKYLDLDDKEWVLLTCEADLVECIDIYRITOTETIKISINEASQVKLSGSFGNTGLS--- : 909
 NLP2 : RRFNIDNIAPFDLKYLDLDDKEWVLLTCEADLVECIDIYRSQSRTIKISINEASQVKLGSFGSITGLGPSL : 963
 RRFNIDI1I FDLKYLDLDDKEWVLLTCEADL ECIDIYR 3Q3 TIKIS6 EASQVKL GSFG GL

Results for NLP1 vs NLP2:

Alignment length: 973
 Identical residues: 674
 Similar residues: 67
 Percent identity: 69.27
 Percent similarity: 76.16

附圖十、阿拉伯芥 NLP1 和 NLP2 的胺基酸序列比對。

RWP-RK domain 的位置來自 (Sakuraba *et al.*, 2022)，PB1 domain 的位置來自 (Cheng *et al.*, 2023)。黃色箭頭和綠色箭頭指向的是 PB1 domain 的保守 (conserved) 的胺基酸，黃色箭頭指向帶正電的 lysine (K)，綠色箭頭指向帶負電的 glutamate (D) 和 aspartate (E)。