

# 中華民國第 55 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高中組 生物（生命科學）科

**第三名**

040708

**水稻抗逆境基因 SAPK9 功能性之研究**

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 蕭如秀 高二 蕭淇云	指導老師： 羅尹廷
-------------------------	--------------

關鍵詞：SAPK(stress-activated protein kinase)、  
離層酸(Absciscic acid；ABA)、  
吉貝素(Gibberellic acid；GA)

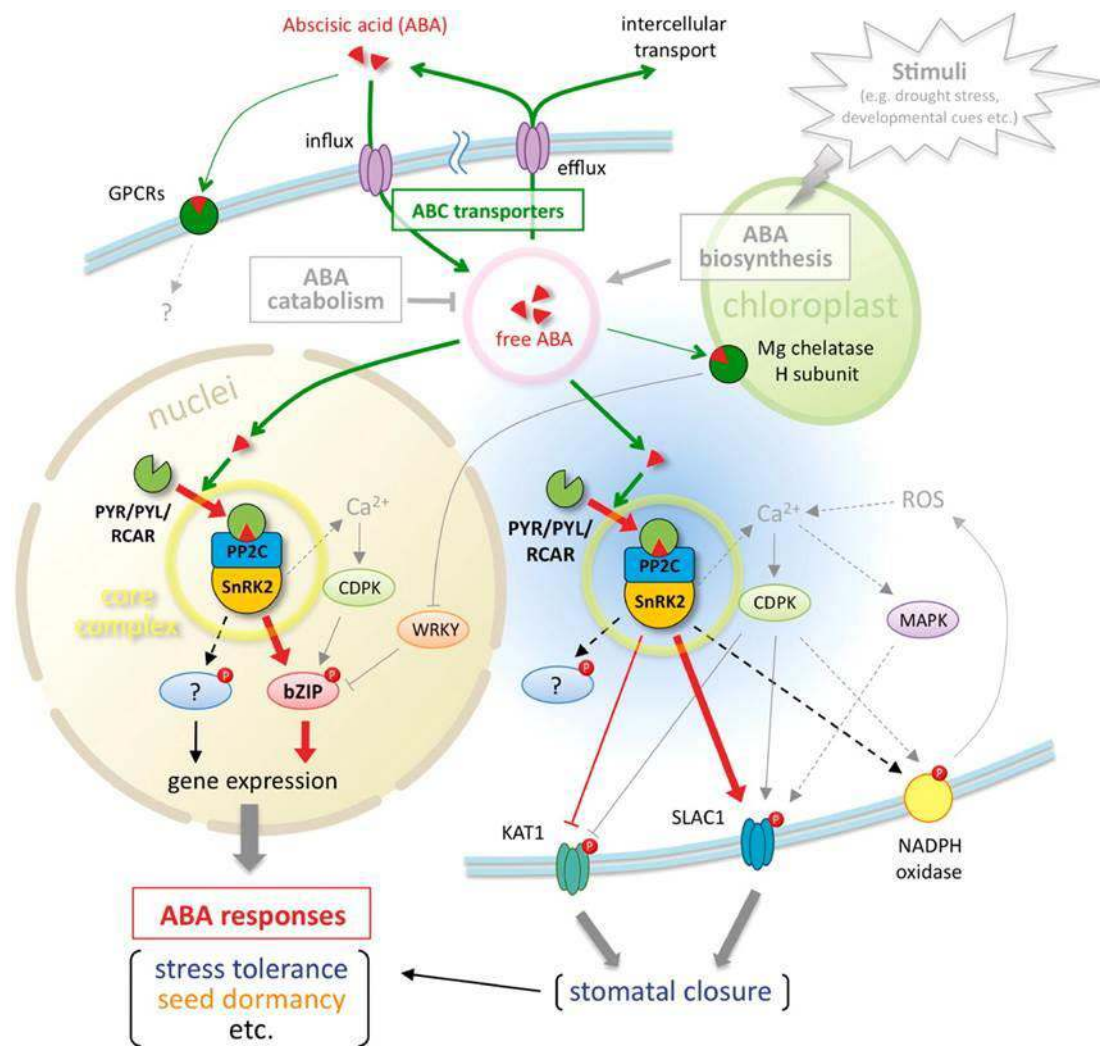
## 摘要

植物受到外界環境刺激後可以激素作為傳訊分子，調控植物體內的生化反應，以應付環境中的各種生存壓力。離層酸(ABA)能使種子及芽休眠、抑制種子發育、使氣孔關閉以減少水分蒸散、抑制植物的成長；吉貝素(GA)在種子發芽期間和 ABA 有拮抗作用。為了更瞭解 ABA 及 GA 訊息傳遞路徑，本研究針對抗逆境 SnRK2 蛋白質激酶家族中屬於 ABA 強烈活化的第三個子家族於水稻中發現的 SAPK9 基因進行探討。本研究經由一連串分子生物學技術，從水稻中選殖出 SAPK9、建構含有 SAPK9 的質體，並以基因槍技術分析，得知 SAPK9 在青稞糊粉層中雖然對 ABA 誘導的基因表現無明顯影響，卻能抑制被 GA 誘導的基因表現。

## 壹、研究動機

植物經常要面對環境中的各種生存壓力，近年來氣候變化日漸極端，無法移動的植物將面臨更多生物性和非生物性的環境壓力，其中水資源的分布日漸不均，使得糧食作物的供給可能因此受到巨大衝擊，研讀了選修生物(上)課本裡植物生殖、生長與發育章節中植物在逆境下的反應小節，我們得知在缺水逆境下植物葉肉細胞會累積離層酸（Abscisic acid；ABA）促使氣孔關閉，而 ABA 還有促使種子休眠等功能，這使得 ABA 能提高植物對缺水逆境的適應性，因此促使我們想要更進一步了解 ABA 的作用方式，以期未來能夠應用於農業等方面，造福人類。

ABA 有許多功能，像是使種子和芽休眠、抑制種子發育和植物成長等。ABA 調控植物對環境反應的方式之一，是經由影響基因的表現來達成，在植物對 ABA 反應的訊息傳遞路徑中，ABA 藉由和 PYR/PYL/PCAR 蛋白質及 PP2C 磷酸酶形成複合體使 PP2C 磷酸酶對 SnRK2 蛋白質激酶家族的抑制解除，進而使 SnRK2 蛋白質激酶家族活化，SnRK2 蛋白質激酶家族再藉由磷酸化其下游傳訊分子使抗逆境基因轉錄從而提高植物對逆境的適應性，ABA 在植物體內的訊息傳遞路徑總覽如圖一。

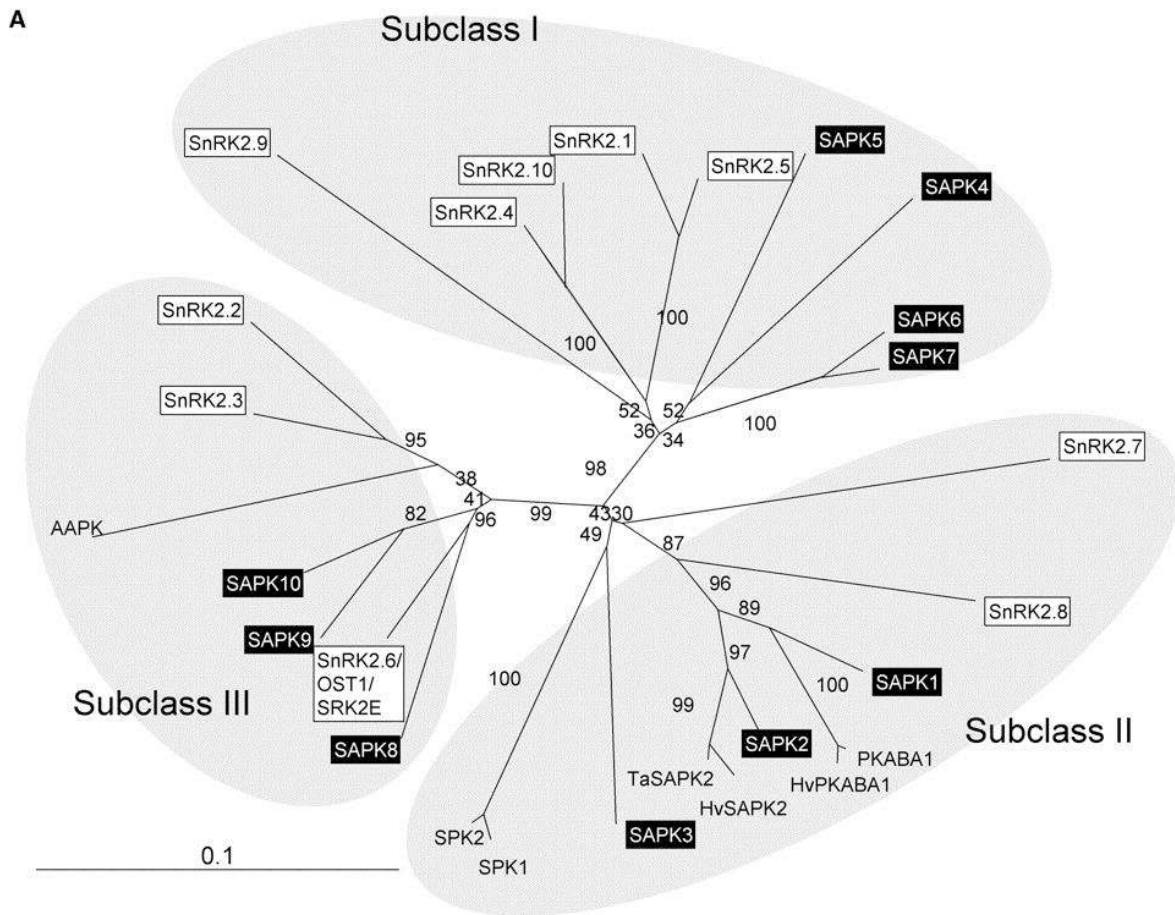


圖一、ABA 在植物體內的訊息傳遞路徑

引用自 Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses:

Sensing, Signaling and Transport

在植物體內 SnRK2 (sucrose nonfermenting1-related protein kinase2) 蛋白質激酶家族為一個與植物在缺水逆境下適應、種子成熟、植物生長有關的蛋白質激酶家族，基因序列分析顯示所有高等植物，例如阿拉伯芥、水稻、高粱、玉米、菸草、小麥、黃豆、蠶豆和藻類等都具有 SnRK2 蛋白質激酶家族。該蛋白質激酶家族又可依據被 ABA 活化的程度、胺基酸序列相似度分為三個蛋白質激酶子家族，如圖二所示，第一個子家族 (Subclass I) 不會被 ABA 活化、第二個子家族 (Subclass II) 僅被 ABA 微弱地活化、第三個子家族 (Subclass III) 則被 ABA 強烈地活化。



圖二、SnRK2 蛋白質激酶家族關係圖

引用自 Differential Activation of the Rice Sucrose Nonfermenting1 - Related Protein Kinase2 Family by Hyperosmotic Stress and Abscisic Acid

在水稻中發現的 SnRK2 蛋白質激酶共有十個，依序編碼為 SAPK1 (ABA/stress-activated protein kinase1) 到 SAPK10，SAPK1 到 SAPK10 都會被高滲透壓活化，已知其中三個成員 SAPK8、SAPK9、SAPK10 除了被高滲透壓活化外，也會被 ABA 活化，被歸類為 SnRK2 的第三個子家族 (Subclass III)。

根據前人研究，在植物種子生長發育時期，ABA 被發現能夠抑制吉貝素 (Gibberellic acid; GA) 誘導的基因表現，GA 為調控植物生長的激素，能促進植物的莖的延長、生長開花、打破種子的休眠期，抑制植物的成熟與衰老。經由文獻探討，我們得知 ABA 在大麥 (*Hordeum vulgare L.*) 種子糊粉層中可透過活化屬於 SnRK2 蛋白質激酶家族的 PKABA1 (Abscisic Acid-Responsive Kinase) 抑制 GA 誘導的基因表現。

目前科學界已知 SnRK2 蛋白質激酶家族中一些激酶的功能，像是 PKABA1 能抑制 GA 誘導的基因表現，然而仍有需多激酶的功能是未知的，像是 SAPK9 雖然被發現會被 ABA 活化，但科學界對於其在 ABA 訊息傳遞路徑中扮演的角色仍未完全明瞭。

本研究希望針對 SAPK9 基因在 ABA 及 GA 訊息傳遞路徑中的功能進行研究，更進一步釐清 SnRK2 蛋白質激酶家族在 ABA 及 GA 訊息傳遞路線中扮演的角色，以期未來能應用於農業等方面提高植物對缺水逆境的適應性。

## 貳、 研究目的

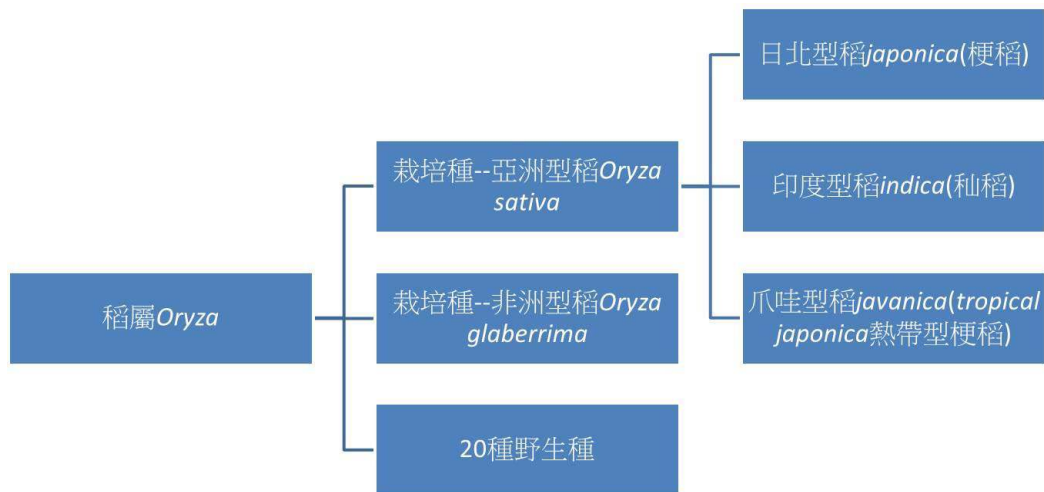
本研究最終目的為釐清 SAPK9 ( Stress-Activated Protein Kinase 9 )基因在 ABA 及 GA 訊息傳遞路徑中扮演的角色，將利用 RNA 萃取、反轉錄聚合酶鏈鎖反應( RT-PCR )、聚合酶鏈鎖反應( PCR )、基因槍( gene gun )、螢光素酶檢測法( Luciferase Assay )、 $\beta$  葡萄糖醛酸酶檢測法( GUS Assay )等方法，由水稻中選殖出 SAPK9 基因，並建構含有 SAPK9 基因的質體，接著以基因槍等技術探討 SAPK9 基因的功能。

## 參、 研究設備及器材

### 一、 植物材料：

#### (一)、 水稻：

水稻的分類屬被子植物門( Magnoliophyta )、單子葉植物綱( Liliopsida )、禾本目( Poales )、禾本科( Poaceae )、稻屬( Oryza )。本研究作為 mRNA 來源的台農 67 號水稻( *Oryza sativa japonica* TN67 )屬於亞洲型稻( *Oryza sativa* )中的日本型稻( japonica，又稱粳稻 keng )，水稻的分類如圖三<sup>(七)</sup>。



圖三、世界稻屬品系分類

(二)、 青稞：

本研究使用來自青藏高原的青稞（*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.）作為探討 SAPK9 基因功能的生物性材料。青稞為大麥的一個亞種，大麥（*Hordeum vulgare* L.）之分類屬被子植物門(Magnoliophyta)、單子葉植物綱(Liliopsida)、禾本目(Poales)、禾本科(Poaceae)、大麥屬(*Hordeum*)，青稞具有易去除糠、外形扁平、糊粉層面積廣大的特性，適合用來轉殖基因。

二、基本設備、器材及藥品

- (一)、 基本設備：離心機、本生燈、微量電子秤、無菌操作台、4°C 冰箱、- 20°C 冷凍櫃、- 80°C 冷凍櫃。
- (二)、 基本器材：微量吸管、定量分注器、微量離心管、鋁箔紙、1.5ml 離心管、50ml 離心管、冰桶、研鉢、勺子、鑷子、油性筆、濾紙、秤量紙、大培養皿、小培養皿、錐形瓶、量筒。
- (三)、 基本藥品：H<sub>2</sub>O、DNA 材料。

### 三、各步驟特殊設備、器材及藥品

#### (一)、 RNA 萃取

1. 設備：Sartorius 分光光度計
2. 藥品：液態氮、TRIzol<sup>®</sup> Reagent、chloroform (氯仿)、isopropanol (異丙醇)、75% ethanol (乙醇)、0.5% SDS solution ( Sodium dodecyl sulfate )、DEPC-Water

#### (二)、 cDNA 合成

1. 設備：PCR 熱循環儀
2. 藥品：SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase、Oligo dT ( 0.5mM )、dNTP Mix ( 10 Mm )、RNase-free Water、5X First-Strand Buffer、RNaseOUT Enzyme ( 40 units/ul )( optional )、0.1 M DTT

#### (三)、 引子設計

1. 電腦軟體：VectorNTI 設備

#### (四)、 PCR (使用 Power<sup>®</sup> taq Kit 或 Advantage<sup>®</sup>GC 2 PCR Kit )

1. 設備：PCR 熱循環儀
2. 藥品：
  - (1) Power<sup>®</sup> taq Kit：PCR grade H<sub>2</sub>O、10X Power Taq buffer、dNTP ( 10 mM )、primer-forward ( 10 mM )、primer-reverse ( 10 mM )、Power<sup>®</sup> Taq DNA polymerase
  - (2) Advantage<sup>®</sup>GC 2 PCR Kit：PCR grade H<sub>2</sub>O、5X GC 2 PCR buffer、GC Melt ( 5 M )、50X dNTP mix、primer-forward ( 10 mM )、primer-reverse ( 10 mM )、50X Advantage<sup>®</sup>GC 2 PCR Pol.Mix

#### (五)、 電泳

1. 設備：微波爐、電泳槽、UV 光膠體攝影機
2. 器材：石蠟紙、膠體模型
3. 藥品：Agarose、TBE Buffer ( Tris/Borate/EDTA )、Loading Dye、Marker

(六)、 基因片段和質體連接

1. 設備：水浴槽

2. 藥品：

(1) pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> Vector Kits：salt solution、pCR8<sup>®</sup> Vector (+enzyme)

(2) 基因片段由 pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> Vector 轉換入 Overexpression vector：

Overexpression vector、5X Gateway<sup>®</sup> LR clonase II enzyme mix、Ready to Load PCR Master Mix、DNA Fluorescent Staining Dye

3. 菌種：DH5  $\alpha$  大腸桿菌(勝任細胞)

4. 培養基：LB-Amp ( Overexpression vector )/ LB-SPECT ( pCR8<sup>®</sup> Vector )

(七)、 純化質體 (使用、QIAGEN<sup>®</sup> Mini / Midi Plasmid Kit 或 Presto Mini Plasmid Kit )

1. 器材：QIAGEN-tip、PD Column

2. 藥品：

(1) QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Mini /Midi Kit (大量抽取質體)：Buffer P1、Buffer P2、Buffer P3、Buffer QBT、Buffer QC、Buffer QF、isopropanol、70% ethanol、Elution Buffer

(2) Presto Mini Plasmid Kit (保存 SAPK9 基因)：PD1 Buffer、PD2 Buffer、PD3 Buffer、W1 Buffer、Wash Buffer、Elution Buffer

(八)、 以基因槍進行基因短暫性表現測試

1. 設備：基因槍、迴旋式震盪儀、超音波細胞粉碎器

2. 器材：濾紙、火藥子彈、塑膠子彈

3. 藥品：Shooting buffer (生長液)、Chloramphenicol (氯黴素)、GA、ABA、spermidine(亞精胺)、CaCl<sub>2</sub>

(九)、 Luciferase Assay

1. 設備：單管冷光儀

2. 器材：錫箔紙、專用測光管

3. 藥品：Grinding Buffer、Luciferin、2X Luciferase Assay Buffer、ATP



(十)、 GUS Assay

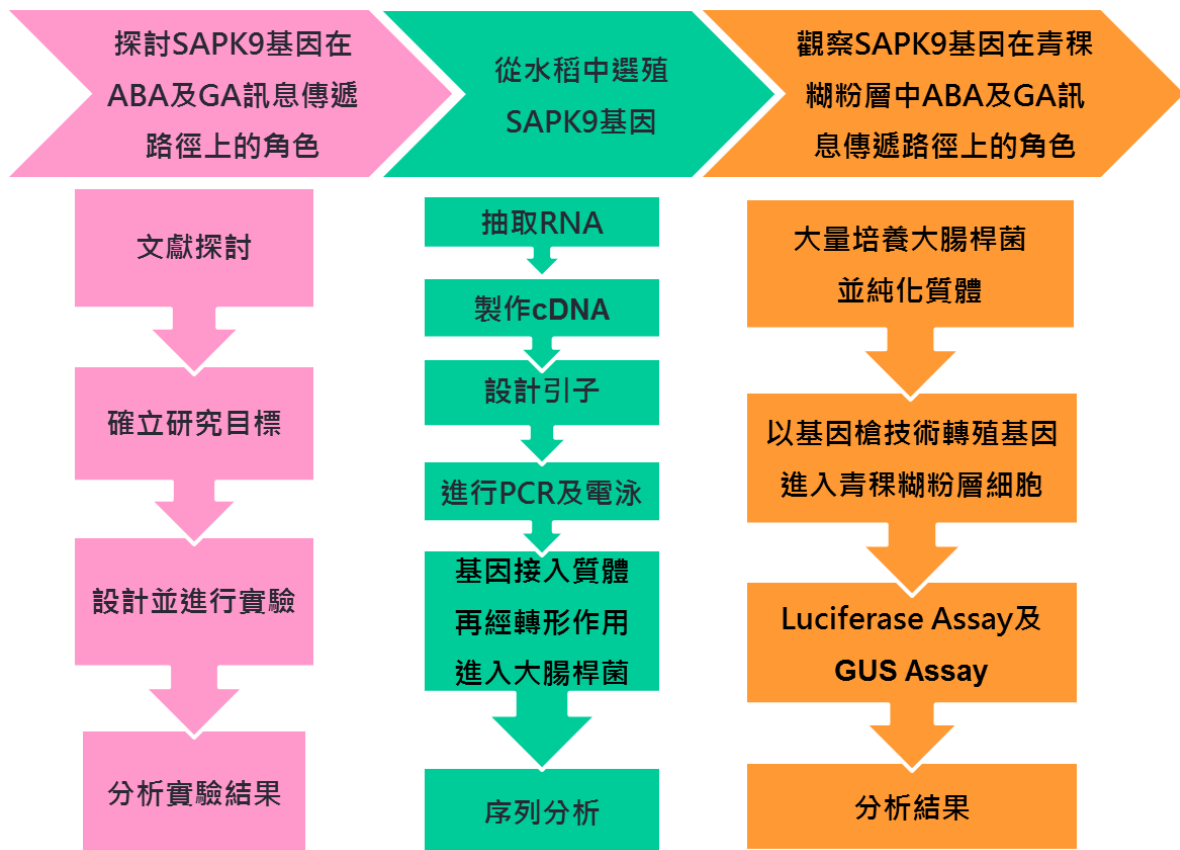
1. 設備：螢光檢測儀
2. 器材：專用測光管
3. 藥品：Gus assay buffer、0.2M NaCO<sub>3</sub>、MU standard (4-methyl umbelliferone 4-甲基傘形酮 )

## 肆、 研究過程或方法

### 一、 方法概述：

由水稻( *Oryza sativa japonica* TN67 台農 67 號 )中萃取出 RNA 並反轉錄成 cDNA，並藉此選殖出 SAPK9 基因、建構含有 SAPK9 的質體，再以基因槍技術轉殖入青稞 ( *Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook.f. 喜馬拉雅亞種 )種子的糊粉層，以探討其於單子葉植物糊粉層中在 ABA 和 GA 傳遞路徑中扮演的角色。

### 二、 實驗流程表 ( 圖四 )



圖四、實驗流程圖

### 三、SAPK9 基因選殖

為了解 SAPK9 基因在水稻何種組織中表現並選殖出 SAPK9 基因，本研究分別從水稻胚芽癒傷組織(embryo callus)、水稻糊粉層(分為以 ABA 處理、以 GA 處理及不處理三種)、水稻二星期的幼株、水稻葉部、矮化株等不同組織抽取 RNA (部分 RNA 由實驗室學長及學姊提供)，再經由 RT-PCR 反轉錄成 cDNA，接著設計 primer 進行 PCR，PCR 完成後先經由電泳確定產物大小和 SAPK9 基因的大小相近，再送往植微所核酸分析核心實驗室進行序列分析。

#### (一)、 RNA 萃取

##### 1. 目的：

為了解 SAPK9 基因在水稻中的表現部位，分別從水稻胚芽癒傷組織(embryo callus)、水稻糊粉層(分為以 ABA 處理、GA 處理及不處理三種)、矮化株、水稻葉部、水稻二星期的幼株中抽取 RNA，反轉錄成 cDNA 後從中複製出 SAPK9 基因。

##### 2. 步驟：

###### (1) 研磨水稻樣本

A. 取滅過菌的研鉢，放入-20°C 冰箱預冷。

B. 取適量液態氮，將裝有植物樣本的塑膠袋放入裝有液態氮的罐內 20 分鐘，使植物組織脆化。

C. 將植物樣本放入研鉢，在液態氮中將樣本磨至細粉狀後，以用液態氮預冷過的勺子將樣本分裝入離心管，並於液態氮中保存。

(以下在毒性物質操作台進行)

###### (2) 均勻化組織(Tissue Homogenization)

A. 在裝有植物粉末的離心管中加入 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (每 50~100 mg (800 µl)的樣本加入 1 ml，使樣本體積不大於十分之一的 TRIzol<sup>®</sup> Reagent)。

- B. 離心後將上清液移到到新離心管中  
(速度：12,000 x g；時間：10 分鐘；溫度：4°C)。
- (3) 分離不同相( Phase Separation )
- A. 使樣本維持 15~30°C 5 分鐘。
- B. 加入 chloroform ( 0.2 ml chloroform /1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent )後，蓋緊離心管並用力搖晃 15 秒，接著在 15~30 °C 靜置離心管 2~3 分鐘。
- C. 離心後將上清液移到新離心管  
(速度：10,000 x g；時間：10 分鐘；溫度：6 °C)。
- (4) RNA 沉澱( RNA Precipitation )
- A. 加入 isopropanol ( 0.5 ml isopropanol /1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent )。
- B. 在 15~30 °C 靜置離心管 10 分鐘後離心  
( 速度：10,000 x g；時間：10 分鐘；溫度：6 °C)。
- (5) 洗出 RNA( RNA Wash )
- A. 加入 75% ethanol( 1ml ethanol /1ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent )，沖洗集中在管底的 RNA。
- B. 漩渦式搖晃離心管，離心  
( 速度：7,000 x g；時間：5 分鐘；溫度：6 °C)。
- (6) 再溶解 RNA( Redissolving RNA )
- A. 以 pipetman 吸去上清液，將 RNA 置於操作台乾燥 10 分鐘。
- B. 加入 30  $\mu$ l DEPC-Water，並以 pipetman 使 pellet 和液體均勻混合後放入-80°C 冰箱保存。
- (7) 用 Sartorius 分光光度計分析 RNA 濃度
- A. 設定 RNA 模式：dilution factor：50；單位：ng/ $\mu$ l；factor：40。
- B. 將 DEPC-Water 作為背景值。
- C. 取 A260/A230 值較高的樣本做為反轉錄成 cDNA 的 RNA template。

## (二)、 cDNA 合成

### 1. 目的：

以抽取的 RNA 為模板做出互補的 cDNA，作為之後選殖 SAPK9 基因片段的模板。

### 2. 步驟：(表一)

表一、RT-PCR 流程

	1.於離心管中混合以下材料： Oligo (dT)0.5mM 1 $\mu$ l、Total RNA 2 $\mu$ l dNTP Mix (10 mM)1 $\mu$ l、RNase Water 8 $\mu$ l 2.移至 RT-PCR 機器上操作，設定溫度時間
65 °C/5 分鐘	RNA 延展、Oligo (dT)引子附著
42 °C/5 分鐘 ( 前後約 2 分鐘用來加入藥品 )	3.將 sample 快速移到冰上，加入以下藥品： 5X First-Strand Buffer 4 $\mu$ l、0.1 M DTT 2 $\mu$ l RNaseOUT (40 units/ $\mu$ l)( optional)1 $\mu$ l RNase 去除 4.加入 Super Script III RT 1 $\mu$ l
42 °C/50 分鐘	進行反轉錄
70 °C/ 15 分鐘	中止反應

## (三)、 引子設計

### 1. 目的：

設計出選殖 SAPK9 的 primer。

### 2. 步驟：

- (1) 利用 NCBI 網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)找出 SAPK9 基因的序列。
- (2) 以 VectorNTI 軟體分析找出 ORF( open reading frame )，並將最長的 ORF1 的開頭作為 primer 設計的開頭。
- (3) 取 ORF 的起始子、終止子前後共約 20 個 nucleobases 作為 primer，以軟體分析使得 GC 含量約 50%，primer  $T_m$  值介於 50~60 °C，以降低 primer 二級結構。

#### (四)、 PCR

##### 1. 目的：

- (1) 確認 cDNA 是否有反轉錄成功( Primer 目標序列：OsActin，一持續表現基因 )。
- (2) 選殖出 SAPK9 基因( Primer 目標序列：SAPK9 )。
- (3) 確認質體或大腸桿菌含有 SAPK9 基因。

##### 2. 步驟：

###### (1) 進行 PCR

A. 於微量離心管內混合下列藥品，如表二。

表二、依照不同 Kit 使用不同藥品

Power® taq	Advantage® GC 2 PCR Kit
PCR grade H <sub>2</sub> O 15.6 µl	PCR grade H <sub>2</sub> O 15 µl
50X dNTP mix ( 10mM )0.4 µl	50X dNTP mix ( 10mM )0.5 µl
primer- forward ( 10mM )0.4 µl	primer-forward ( 10mM )0.5 µl
primer-reverse ( 10mM )0.4 µl	primer- reverse ( 10mM )0.5 µl
DNA template 1 µl	DNA template 0.5 µl
10X Power® Taq buffer 2 µl	5X GC 2 PCR buffer 5 µl
20X Taq DNA polymerase 0.2 µl	GC Melt( 5M ) 2.5µl
	50X Advantage-GC 2 PCR Pol.Mix 0.5 µl

B. 將微量離心管放入 PCR 的機器中，設定溫度、時間，啟動 PCR。

#### (五)、 電泳

##### 1. 目的：

以物質在膠體中移動的距離判段分子大小，確認 PCR 產物是否為 SAPK9。

##### 2. 步驟：

- (1) 秤取適量 Agarose 和 TBE Buffer 調配 0.8%( g/L )溶液，加熱使 Agarose 溶解。

( TBE Buffer( 1 liter of 5X stock solution )：54 g of Tris base、

27.5 g of boric acid、20 ml of 0.5 M EDTA ( pH 8.0 ))

- (2) 溶液稍微降溫後，倒入膠體模型盤，等待凝固後放入電泳槽倒入適量 TBE Buffer。
- (3) 在蠟紙上配置數組 1 $\mu$ l Loading Dye + 5  $\mu$ l 待測產物 / Marker，放入膠體的填充孔中。
- (4) 開啟電泳裝置，以 Loading Dye 顏色分布區域判定是否結束電泳。
- (5) 以 UV 光膠體攝影機拍攝膠體的照片。

#### (六)、 基因接入質體

##### 1. 目的：

將 SAPK9 接入質體，在大腸桿菌中保存。

##### 2. 步驟：

- (1) 混合以下溶液 ( pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> Vector Kit )：

DNA + H<sub>2</sub>O ( 2  $\mu$ l + 2  $\mu$ l 視濃度調整 ) 4  $\mu$ l、 salt solution 1  $\mu$ l、

pCR8<sup>®</sup> vector( +enzyme ) 1  $\mu$ l

- (2) 將 2  $\mu$ l 質體與大腸桿菌混合，

並置於冰上 20 分鐘。

- (3) 放入 42 °C 水浴槽進行 heat

shock，45 秒後放回冰上。

- (4) 滴 1 ml 抗生素於 SOC medium 後放

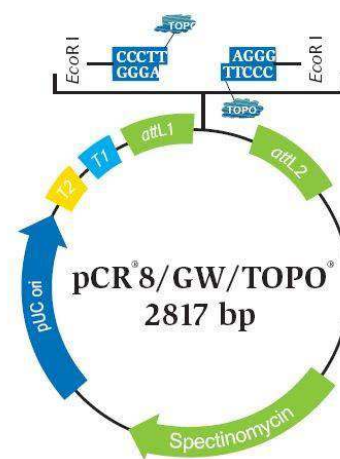
入 37 °C 培養箱 1 小時。

- (5) 取 200  $\mu$ l 菌種滴於 LB medium。

( PCR8<sup>®</sup> vector 適用 LB-SPECT )

- (6) 以已滅菌玻璃珠使大腸桿菌菌液均勻分布於培養皿上。

- (7) 將培養皿、菌種置於 37 °C 培養箱培養。



圖五、pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> Vector 結構

#### (七)、 colony PCR

##### 1. 目的：

確認大腸桿菌含有目標基因。

2. 步驟：

- (1) 在每管 eppendorf 中加入：Ready to Load PCR Master Mix 12.5  $\mu$ l、PCR grade H<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ l、SAPK9 primer-forward ( 10 mM )1 $\mu$ l、SAPK9 primer- reverse ( 10 mM )1  $\mu$ l。
- (2) 以牙籤沾附較大的菌落，洗入混合液。
- (3) PCR Program 設定：3m/30s/30s/1m30s/5m/pause、94 /94 /55 /72 /72 /4 °C。
- (4) 跑電泳(步驟同(五)，Loading Dye 改用 DNA Fluorescent Staining Dye )。

(八)、 純化質體

1. 目的：

從大腸桿菌中抽出 plasmid，保存 SAPK9 基因。

2. 步驟：( Kit：Presto Mini Plasmid Kit (保存 SAPK9 基因 ) )

- (1) 將 1.5 ml cultured bacterial cells 移到 1.5 ml 離心管中。
- (2) 離心後倒掉上清液( 速度：13,000 x g；時間：1 分鐘 )。
- (3) 加入 200  $\mu$ l PD1 Buffer，並利用震盪或 pipping up 使 pellet 重新懸浮。
- (4) 加入 200  $\mu$ l PD2 Buffer，上下搖動 10 次後，置於室溫 2 分鐘。
- (5) 加入 300  $\mu$ l PD3 Buffer 並上下搖動 10 次後離心  
( 速度：13,000 x g；時間：3 分鐘 )。
- (6) 將上清液移到放有 PD Column 的 2 ml Collection Tube 中。
- (7) 離心後倒掉液體( 速度：13,000 x g；時間：1 分鐘 )。
- (8) 加入 400  $\mu$ l W1 Buffer 後離心 ( 速度：13,000 x g；時間：1 分鐘 )。
- (9) 倒掉液體並加入 600  $\mu$ l Wash Buffer。
- (10) 離心後倒掉液體 ( 速度：13,000 x g；時間：1 分鐘 )。
- (11) 再離心並倒掉液體 ( 速度：13,000 x g；時間：3 分鐘 )。
- (12) 加入 50  $\mu$ l Elution Buffer，並離心 ( 速度：13,000 x g；時間：2 分鐘 )。

#### (九)、 DNA 片段定序

##### 1. 目的：

確認選殖到的 PCR 產物為 SAPK9。

##### 2. 方法：

- (1) 將樣本送至中研院核酸分析核心實驗室進行序列分析。
- (2) 將所得的序列以 NCBI 上的 BLAST 程式分析。

#### 四、觀察 SAPK9 的基因功能

為了觀察 SAPK9 基因的功能，必須使 SAPK9 基因片段進入生物體細胞中(青稞種子糊粉層)持續表現，首先選殖出 SAPK9 基因片段，接著將該基因藉由 ligation 轉殖入質體、heat shock 使質體進入大腸桿菌 (DH5  $\alpha$ )以建立含有 SAPK9 基因的載體，再藉由基因槍技術將含 SAPK9 基因的載體轉殖入青稞種子糊粉層，使 SAPK9 基因在青稞種子糊粉層細胞短暫持續表現，透過比對含目標基因和不含目標基因的糊粉層中被 ABA 或 GA 誘導的基因的表現量變化，可得知 SAPK9 基因在糊粉層中對 ABA 和 GA 訊息傳導途徑的影響。

#### (一)、 基因接入質體

##### 1. 目的：

建構含 SAPK9 的 Overexpression Vector。

##### 2. 步驟：

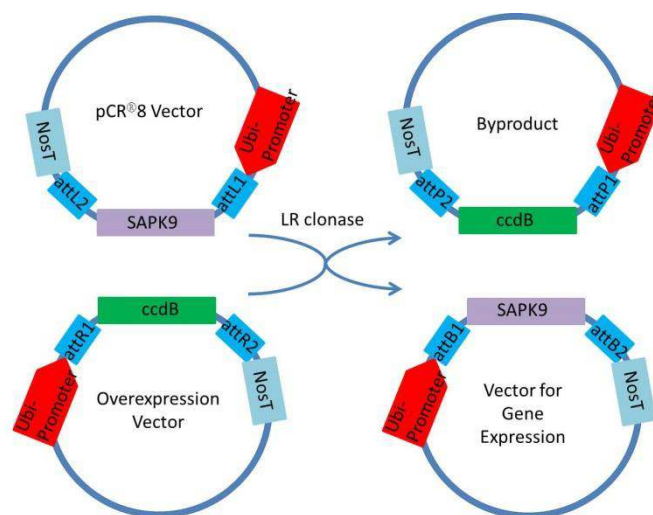
- (1) 同(六)基因接入質體步驟。

- (2) 混合的溶液改成如下：

pCR8<sup>®</sup> Vector (+SAPK9) 2  $\mu$ l、5X Gateway<sup>®</sup> LR clonase II enzyme mix  
2 $\mu$ l、H<sub>2</sub>O 5  $\mu$ l、destination vector 1  $\mu$ l

- (3) 使用的 LB medium 改成：LB-AMP。





圖六、Gene 轉換入 Destination Vector 建構 Overexpression vector 示意圖

經 LR clonase 作用，原質體上的基因與 Overexpression Vector 中的 ccdB(致死基因)交換，接受致死基因的大腸桿菌會死亡，只留下含所需基因片段之 Overexpression vector 的菌。

(二)、 colony PCR

1. 目的：

確認大腸桿菌含有目標基因。

2. 步驟：

(1) 同(七)colony PCR 步驟。

(2) 使用藍白篩選，故成功殖入 Overexpression Vector 的菌落為白色，因此選擇菌落進行 PRC 時，選擇白色的菌落。

(三)、 純化質體

1. 目的：

從大腸桿菌中抽出 plasmid 作為 SAPK9 在青稞中表現的載體。

2. 步驟：( QIAGEN Plasmid Mini and Midi Kit (大量抽取質體) )

(1) 從 LB 培養盤上挑選一個菌落置於液態培養基中在 37°C 培養箱中培養約 14 小時，將 Buffer P3 預冷至 4°C。

(2) 取 50 ml 液態培養基分裝至 1.5ml 離心管後離心

( 速度：6000 x g ；時間：15 分鐘；溫度：4 °C )。

- (3) 以 pipetman 移走上清液，加入 4 ml Buffer P1，並利用 pipetman 或震盪使 pellet 重新懸浮於 buffer 中。
- (4) 加入 4 ml Buffer P2，上下搖晃 4~6 次後，靜置 5 分鐘。
- (5) 加入 4 ml 已預冷的 Buffer P3，上下搖晃 4~6 次後，靜置於冰上 15 分鐘。
- (6) 離心後將上清液移至另一離心管  
( 速度 12,000xg；時間：30 分鐘；溫度：4°C )。
- (7) 再離心一次 ( 速度：12,000xg；時間：15 分鐘；溫度：4°C )。
- (8) 加 4 ml Buffer QBT 至 QIAGEN-tip 100，等 Buffer QBT 順重力自然流下。
- (9) 將步驟 8 所得的上清液移至 QIAGEN-tip 並等上清液順重力自然流下。
- (10) 將 2 x 10 ml Buffer QC 加入 QIAGEN-tip 並等 Buffer QC 順重力自然流下。
- (11) 加入 5 ml Buffer QF 使 DNA 被洗出，將流下的液體保存在 10 ml 離心管中。
- (12) 加入 3.5 ml 室溫的 isopropanol 到 DNA 中，離心後倒掉上清液  
( 速度：9,000 x g；時間：30 分鐘；溫度：4 °C )。
- (13) 以 2 ml 室溫 70% ethanol 清洗 DNA pellet 後，離心後倒掉上清液  
( 速度：13,000 x g；時間：10 分鐘；溫度：4°C )。
- (14) 使 pellet 在室溫中風乾 5~10 分鐘，並使 DNA 重新溶解於 Elution Buffer。

(四)、 以基因槍進行基因短暫性表現測試

1. 目的：

觀察 SAPK9 對 ABA induce 或 GA induce 基因的影響。

2. 步驟：

(1) 消毒種子

A. 以解剖刀切除青稞胚的部分。

- B. 泡二次水 20 分鐘 (置於迴旋式震盪器上)。
- C. 以 20%漂白水處理 20 分鐘 (置於迴旋式震盪器上)。
- D. 以二次水清洗 4 次 (或以上)，每次 30 秒並以手上下搖晃。
- E. 以 25mM HCl 處理 2 分鐘 (置於迴旋式震盪器上)。
- F. 以二次水清洗 4 次 (或以上)，每次 30 秒並以手上下搖晃。
- G. 用 1X shooting buffer 處理 30 分鐘 (置於迴旋式震盪器上)。
- H. 處理完後將種子鋪在 bed (滅菌過)上，以鑷子將種子要打基因槍的那面朝下，並加入 shooting buffer 至濾紙高度。

(2) 準備種子

- A. 將青稞種子以鑷子剝去最外層的皮 (在 Shooting buffer 中)。
- B. 配生長液 100ml：
  - a. 含激素：Shooting buffer 100 ml、Chloramphenicol 30  $\mu$ l、GA/ABA 1 $\mu$ M /20 $\mu$ M (ex：5  $\mu$ l 20 mM GA；20 $\mu$ l 100 mM ABA)
  - b. 不含激素：Shooting buffer 100 ml、Chloramphenicol 30 $\mu$ l (Shooting buffer：20 Mm Na-succinate pH5.0、20 mM CaCl<sub>2</sub>)
- C. 準備 16 個小培養皿分別加入含 GA/ABA 的生長液、不含 GA/ABA 的生長液 (各 8 個)
- D. 準備 8 個大培養皿，在培養皿中放入 1/4 濾紙，並在濾紙上點上一個點
- E. 在每片濾紙上加入 200  $\mu$ l 不含激素的生長液

(3) 準備質體混合液

- A. 準備 DNA mix 10  $\mu$ l (每種 plamid 10-3  $\mu$ g)。
- B. 依下列順序加入 1.5 ml 離心管中：
  - 25  $\mu$ l gold in water、10  $\mu$ l DNA mix、25  $\mu$ l 1M CaCl<sub>2</sub>、10  $\mu$ l 100 mM spermidine( 混合時保持 tube 在振盪器上，並使溶液不飛離管底 )
- C. 溶液沉澱後去除掉 35  $\mu$ l 上清液。

(4) Bombardment

- A. 以超音波細胞粉碎器使沉澱的金粉均勻分布於溶液。
- B. 將 8.5  $\mu\text{l}$  混合液滴於塑膠子彈中央。
- C. 將 stopping plate 放在最上層的凹槽。
- D. 將種子放在第二層，並使中間的點對齊彈孔中央。
- E. 將塑膠子彈和空包彈置於頂部的孔洞中。
- F. 蓋上鐵蓋，並放上發射器。
- G. 抽真空至低於一大氣壓 27~30 mmHg。
- H. 按下發射器。
- I. 將處理處過的青稞以 3 粒為一個樣本分裝於含生長液的小培養皿。

(5) 研磨種子

( 使種子在迴旋式震盪儀上以 70 rpm 旋轉，放置一天後再開始處理 )

- A. 將研鉢預冷至 4  $^{\circ}\text{C}$ 。
- B. 用紙巾吸乾青稞表面水分。
- C. 先加入一些海砂，再將青稞放入預冷研鉢中，再加入 800  $\mu\text{l}$  grinding buffer 研磨。
- D. 研磨至漿狀後，將 sample 移到 1.5 ml 離心管中。
- E. 離心後將上清液 ( 糊粉層細胞 ) 移到新的 1.5 ml 離心管中。  
( 速度：13,000 x g；時間：10 分鐘；溫度：4 $^{\circ}\text{C}$  )
- F. 配置 Luciferase Assay 溶液
  - a. 2X LAB + 2 mM ATP / sample ( 2X LAB 1960  $\mu\text{l}$  + 10mM ATP 40  $\mu\text{l}$  )
  - b. 1X LAB+1 mM Luciferin / sample ( 2X LAB 1000  $\mu\text{l}$  + 20mM Luciferin 100  $\mu\text{l}$  + H<sub>2</sub>O / 900  $\mu\text{l}$  )
- G. 在測光管中加入 100  $\mu\text{l}$  sample，移至單管冷光儀旁，加入 100  $\mu\text{l}$  溶液 a，再加入 100  $\mu\text{l}$  溶液 b，馬上測量。

(6) GUS Assay

- A. 準備 GUS assay buffer 50 mL (保存在 - 20 °C)。
- B. 在 1.5 mL 離心管內加入 200  $\mu$ l GUS assay buffer。
- C. 加入 50  $\mu$ l 青稞糊粉層萃取物後放置在 37°C 培養箱 20 小時。
- D. 開啟螢光測定儀，熱機一段時間。
- E. 在測光管中加入 1  $\mu$ M MUG standard 作為標準值，在測光管中加入 0.2M NaCO<sub>3</sub> 2 ml 與 50  $\mu$ l 前面反應過的青稞糊粉層萃取物，進行測量。

(五)、 分析數據

1. 目的：

量化 SAPK9 對 ABA induce 或 GA induce 基因的影響。

2. 步驟：

- (1) Luciferin 的測光值除以 2,000,000 當分母，GUS 反應測光值減去背景值後當分子。
- (2) 計算每一組的値之標準差與誤差值並製成圖表。

## 伍、 研究結果

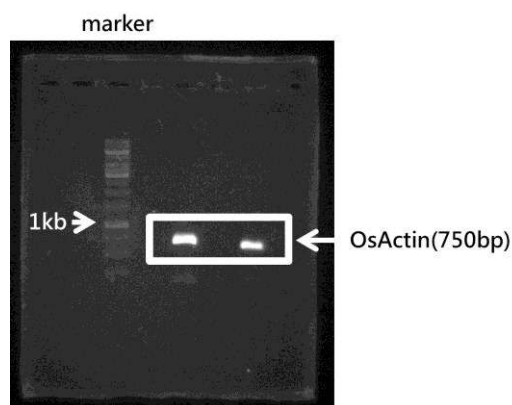
### 一、 水稻 SAPK9 基因選殖

(一)、 RNA 萃取以及 cDNA 合成

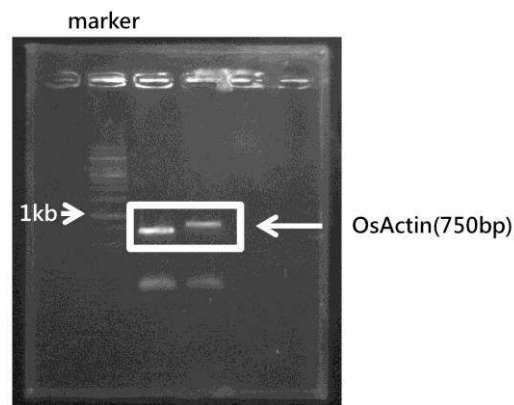
(本實驗中除了水稻葉片 cDNA 及經 ABA 處理一天的水稻種子糊粉層 cDNA 外，其他 cDNA 都由實驗室學長及學姊提供 )

1. 由水稻種子以 ABA 處理一天的糊粉層抽取的 RNA 反轉錄成的 cDNA，以 OsActin primer 進行 PCR 確認 cDNA 是否成功合成，OsActin primer 複製出的基因片段大小約 750bp，如圖七。

2. 水稻葉片 cDNA 合成後以 OsActin primer 進行 PCR 確認 cDNA 是否成功，合成的結果如圖八。



圖七、水稻種子糊粉層 cDNA 經 PCR 複製 OsActin 電泳圖



圖八、水稻葉片 cDNA 經 PCR 複製 OsActin 電泳圖

(二)、 引子設計、PCR 以及電泳

1. 原先設計的引子無法選殖出 SAPK9 基因，因此重新設計引子，使用後設計的引子成功選殖出 SAPK9 基因，前後兩次設計的引子序列如表三、位置如表四，綠色字為實驗室原先設計的引子，紅色字為我們新設計的引子，黃色底色為起始子及終止子。

表三、前後兩次設計的 SAPK9 primer 序列及黏合溫度

	Primer 位置	序列	溫度(°C)	選殖結果
實驗室原先設計的 SAPK9 primer	SAPK9_F	atggagagggcggcgg	56.5	失敗
	SAPK9_R	ttacatggcatatacgatctctccg	56.3	
本次設計的 SAPK9 primer	SAPK9_F	gtcggatcgaggtttgcgtt	56.3	成功
	SAPK9_R	ggagctctcacctgctctgaacaa	55.9	

表四、Primer 設計位置

	10	20	30	40	50
1~10	gtcggatcga	ggtttgcgtt	tgtgttcggt	tggtcgccgg	cggaagcgat
51~100	ggagagggcg	gcggcggggc	cgctggggat	ggagatg <sup>ccg</sup>	ataatgcacg
101~150	acggtgacag	gtacgagctg	gtgaaggaga	tgggtcggg	gaacttcggc
-----					
1051~1100	gacctcgacg	acgacatgga	ggatatggac	tgggacctg	accttgacat
1101~1150	tgagagcagc	ggagagatcg	tatatg <sup>ccat</sup>	g <sup>ta</sup> atcatct	caacatttgc
1151~1200	aatgaaactg	cactgaaaat	cagct <sup>gttt</sup>	cagagcaggt	agagctccag
1201~1250	aagagatctg	tggtcaggct	actaggaagc	aggctctgct	gcctattagt
1251~1300	tcttgagtct	gaatttctga	tgaaccatac	tgcagctgag	ttgcagcaga
1301~1350	ttgtgtagta	tgtaattatg	tatgtgtg <sup>c</sup>	caaaaattta	gcaccgatg
1351~1400	atatcatgca	agactgtt <sup>c</sup>	ttgggaacac	tgagaaatga	gaagcattgt
1401~1450	atggaaccta	gttctgtatt	gtattaaaca	gagagacaga	agagatgtat
1451~1500	tggttaatgt	atttgctatg	tgtatg <sup>taaa</sup>	tatgctttgt	gccaagaaga
1501~1519	aaaaatctct	attaattct			

2. 由水稻不同組織的 cDNA 選殖 SAPK9 基因

(1) cDNA 來源：二星期的幼株、水稻胚芽癒傷組織 (embryo callus)、葉部、矮化株、以 GA、ABA 處理和未經處理的糊粉層細胞。

(2) 成功選殖 SAPK9 的組織：二星期的幼株。

2. 不同 PCR Kit 選殖 SAPK9 基因

(1) 嘗試的 PCR Kit：Power<sup>®</sup> Taq、Advantage<sup>®</sup>GC 2 PCR Kit。

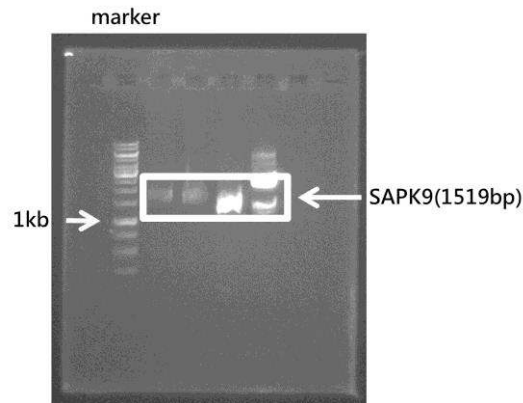
(2) 成功選殖 SAPK9 的 PCR Kit：Advantage<sup>®</sup>GC 2 PCR Kit。

2. 嘗試 (使用 Advantage<sup>®</sup>GC 2 PCR Kit) 選殖 SAPK9 的引子最佳黏合溫度

(1) 嘗試溫度範圍：49~57 °C。

(2) 成功溫度：54~56 °C。

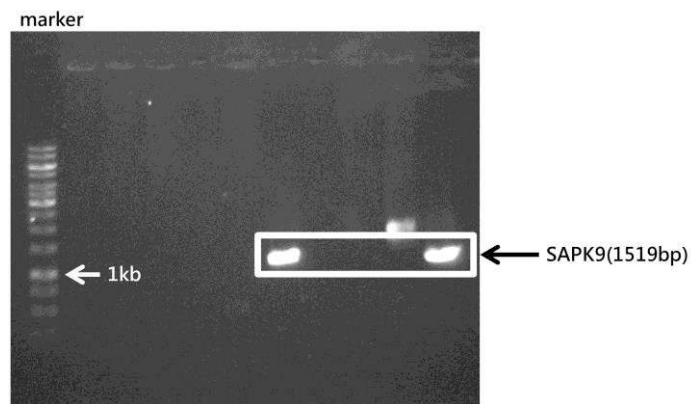
3. 成功選殖出 SAPK9 基因的條件：水稻二星期的幼株、新設計的 primer、Advantage<sup>®</sup> GC 2 PCR Kit，結果如圖九。



圖九、水稻二星期幼株 cDNA  
經 PCR 選殖 SAPK9 基因電泳圖

(三)、 Ligation 以及 Plasmid Purification

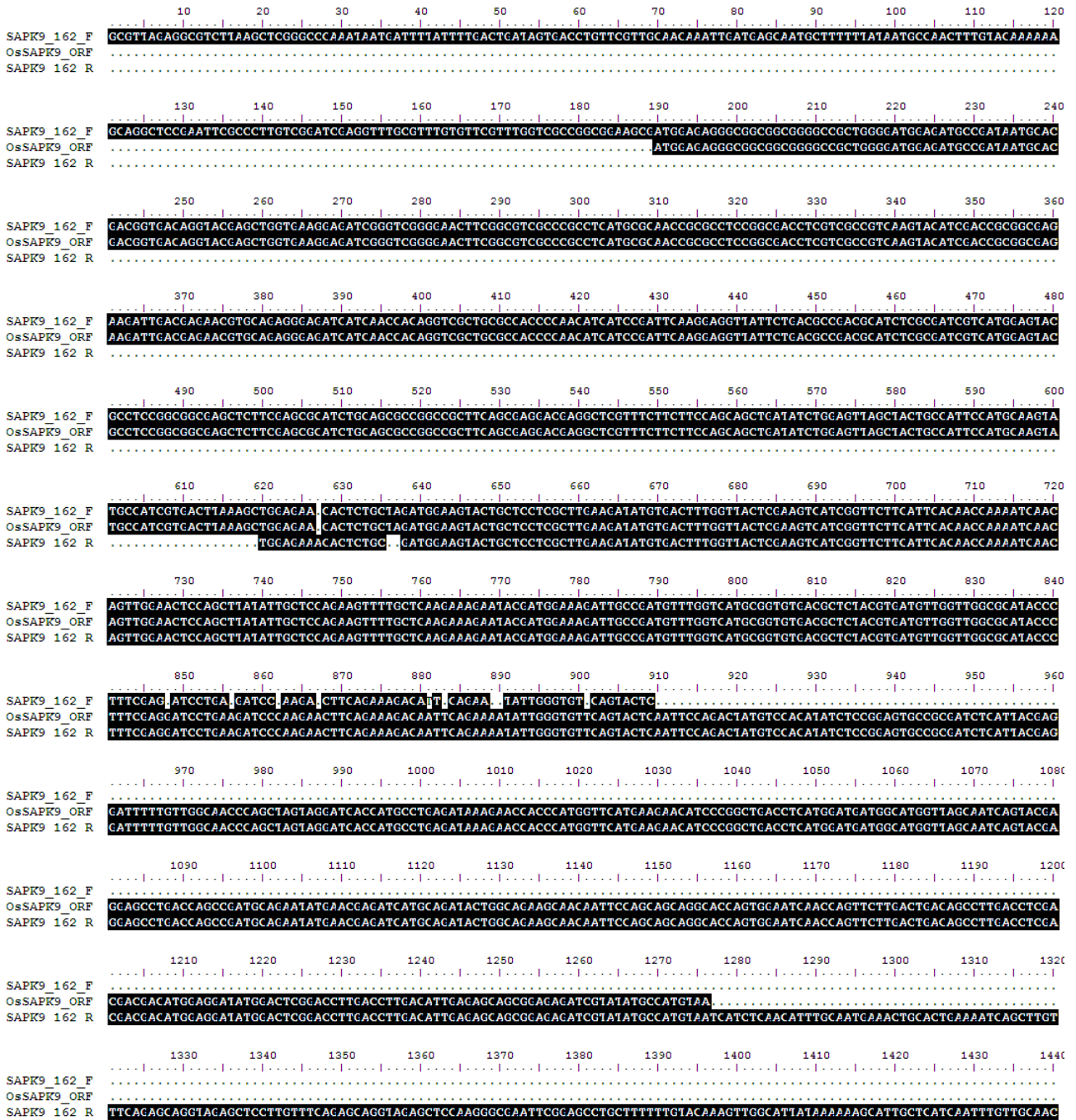
1. 將 SAPK9 基因經由 ligation 接進質體中、heat shock 使質體進入大腸桿菌 (DH5  $\alpha$  )，塗盤並隔夜培養後，進行 colony PCR 確認轉殖入的基因大小和 SAPK9 基因大小相近，結果如圖十。



圖十、大腸桿菌菌液經 colony PCR 選殖 SAPK9 基因電泳圖

2. 將質體送至植微所核酸分析核心實驗室進行序列分析，確認插入基因為 SAPK9 基因，比對結果吻合度高，如圖十一。



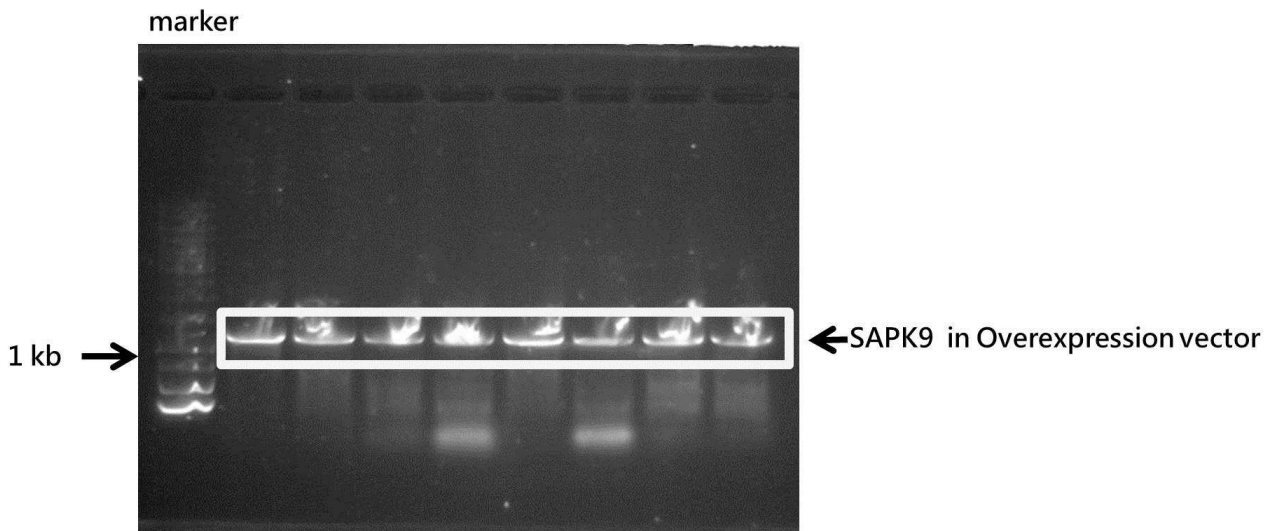


圖十一、SAPK9 sequence 所得結果和正確序列比較

## 二、觀察 SAPK9 的基因功能

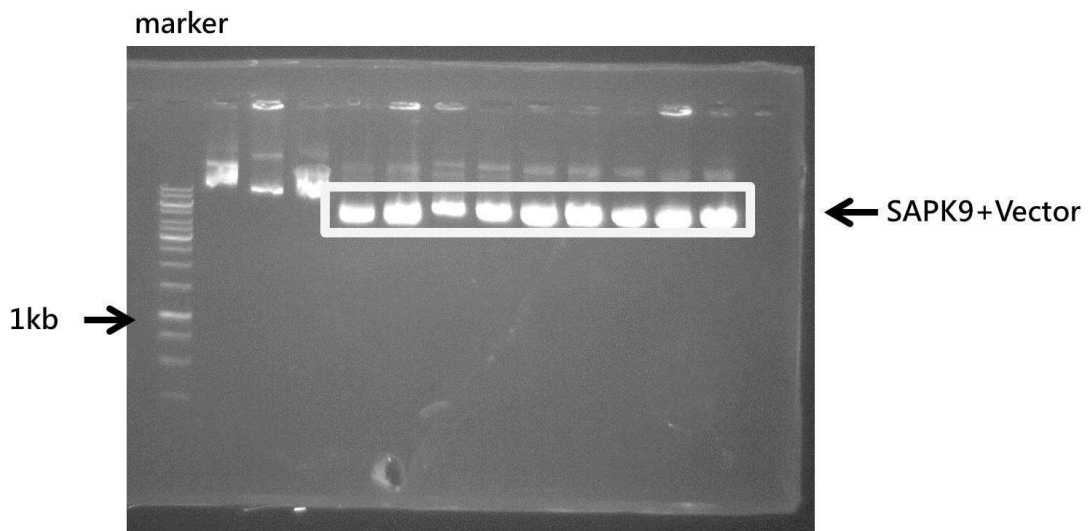
### (一)、 建構含有 SAPK9 的 Overexpression Vector

1. 利用 Gateway® cloning 技術將 SAPK9 基因轉殖入表現質體 (Overexpression Vector )，再進行一次 PCR 確認 Overexpression Vector 中所含基因為 SAPK9，結果如圖十二。



圖十二、Overexpression Vector 經 PCR 確認含有 SAPK9 基因電泳圖

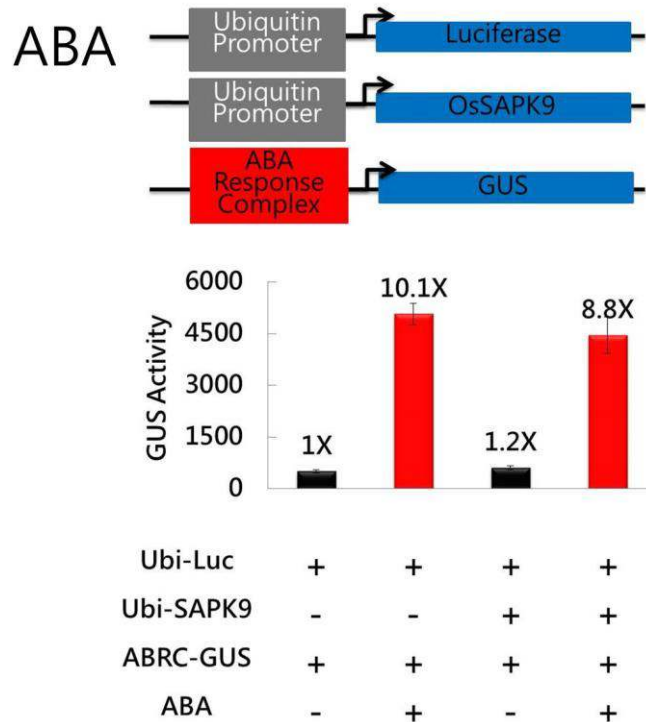
2. 在液態培養基大量培養含 SAPK9 基因的大腸桿菌，抽取質體再進行一次電泳，確認載體大小符合原本基因加上 SAPK9 基因的大小，結果如圖十三。



圖十三、含 Overexpression Vector 的大腸桿菌菌液  
經 colony PCR 確認含有 SAPK9 基因電泳圖

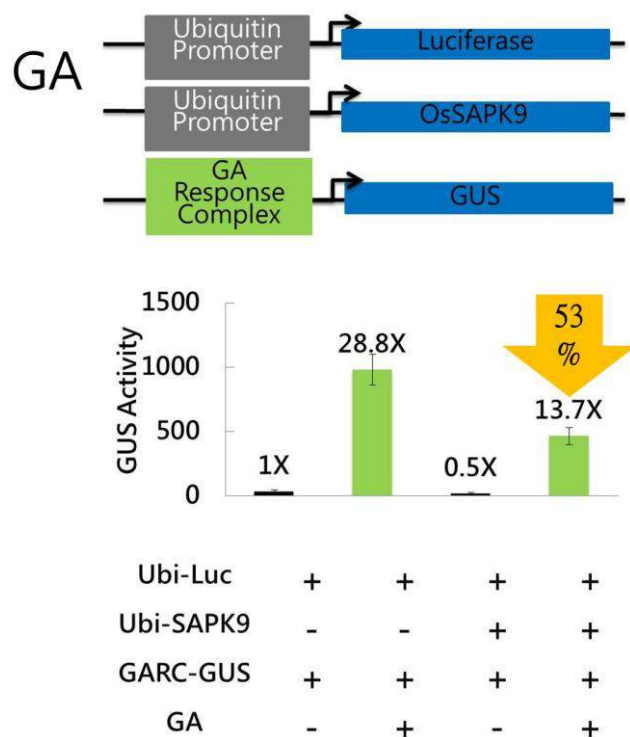
(二)、以基因槍進行短暫性表現測試

1. 將含 SAPK9 基因的載體藉由基因槍技術轉殖入青稞種子糊粉層，並根據 GUS 基因的啟動子是 ABA 誘導以 ABA 處理，在以 ABA 處理的青稞種子糊粉層中，含有 SAPK9 基因的青稞種子 GUS 基因表現量相較不含 SAPK9 基因的青稞種子沒有明顯差異，顯示 SAPK9 對種子中 ABA 信息傳導影響不甚明顯，如圖十四。



圖十四、以 ABA 處理的青稞種子糊粉層 GUS 基因表現量比較

2. 將含 SAPK9 基因的載體藉由基因槍技術轉殖入青稞種子糊粉層，並根據 GUS 基因的啟動子是 GA 誘導以 GA 處理，實驗結果如圖十五，在以 GA 處理的青稞種子糊粉層中，含有 SAPK9 基因的青稞種子 GUS 基因表現量相較於不含 SAPK9 基因的青稞種子下降大約 53%，顯示 SAPK9 可抑制種子中 GA 信息傳導。



圖十五、以 GA 處理的青稞種子糊粉層 GUS 基因表現量比較

## 陸、 討論

- 一、根據不同 primer 選殖 SAPK9 基因的結果並搭配軟體分析 DNA 可能結構，發現原先由實驗室學長於 SAPK9 基因序列啟動子及終止子向內延伸設計的引子可能因為設計的序列剛好位在 DNA 產生二級結構的地方，所以無法選殖 SAPK9 基因。針對這個問題，我們在 SAPK9 基因序列啟動子及終止子序列分別向外延伸約 20 個含氮鹼基的位置，以軟體分析設計出 GC 含量較低、二級結構較少的引子，可能因此避開 DNA 二級結構，而選殖出 SAPK9 基因。
- 二、根據由水稻不同組織 cDNA 選殖 SAPK9 基因的結果，只有水稻二星期的幼株能選殖到 SAPK9 基因，可以推測 SAPK9 基因與植物發芽時期的生理調控較為相關。

- 三、根據不同 PCR Kit 選殖 SAPK9 基因的結果，使用 Advantage<sup>®</sup>GC 2 PCR Kit 才能成功選殖 SAPK9 基因。可推測 SAPK9 基因除了在啟動子及終止子附近具有二級結構外，其 DNA 序列可能包含一些 GC 含量較高的片段，使得二級結構較一般序列難破壞，故需使用 Advantage<sup>®</sup>GC 2 Kit 消除這些使 PCR 無法順利進行的結構。
- 四、根據實驗結果圖十四及圖十五，以 ABA 處理的青稞種子糊粉層中，含有 SAPK9 基因的青稞種子 GUS 基因表現量與不含 SAPK9 基因的青稞種子差別不明顯；用 GA 處理的實驗則下降約 53%，得知 SAPK9 基因在青稞種子糊粉層中扮演抑制 GA-inducible promoter 的角色，對於 ABA-induced 的基因的影響較不明顯。
- 五、在 ABA 訊息傳導下游的是許多轉錄因子，其中有些轉錄因子已被發現能夠抑制 GA 誘導的基因表現，例如：OsWRKY51、OsWRKY71，SAPK9 可能就是活化了類似的下游轉錄因子以抑制 GA 誘導基因的表現。
- 六、在已發表的研究結果<sup>(4)</sup>，小麥及大麥中同屬 SnRK2 蛋白質激酶家族的 PKABA1 也具有相似的功能，可以作為 SAPK9 在水稻中訊息傳遞路徑的參考。

## 柒、 結論

- 一、SAPK9 基因可從水稻二星期的幼株中以 Advantage<sup>®</sup>GC 2 PCR Kit 搭配我們設計的 primer 在引子黏合溫度 55°C 上下 1°C 選殖出。
- 二、SAPK9 基因在青稞種子糊粉層中會抑制 GA 誘導的基因表現，對 ABA 訊息傳導途徑則無明顯影響。
- 三、未來若取得 SAPK9 的基因突變水稻株作為實驗材料，將能更加確定 SAPK9 基因的功能。

## 捌、參考資料及其他

- 一、Gang Li, Fang Lin, Hong-Wei Xue(2007 ). *Genome-wide analysis of the phospholipase D family in Oryza sativa and functional characterization of PLD $\beta$ 1 in seed germination.*  
National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences
- 二、Umezawa T1, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport.* Plant Cell Physiol. 2010 Nov;51(11 ):1821-39. doi: 10.1093/pcp/pcq156. Epub 2010 Oct 26.
- 三、Anna Kulik, Izabela Wawer, Ewa Krzywińska, Maria Bucholc, and Grazyna Dobrowolska ; *SnRK2 Protein Kinases—Key Regulators of Plant Response to Abiotic Stresses* ; OMICS A Journal of Integrative Biology Volume 15, Number 12, 2011
- 四、Vijaya Shukla and Autar K. Mattoo ; SucROSE Non-fermenting 1-related Protein Kinase 2 (SnRK2) : *A Family of Protein Kinases Involved in Hyperosmotic Stress Signaling* ; Physiol. Mol. Biol. Plants, Volume 14(1) – January, 2008
- 五、Yuhko Kobayashi, Shuhei Yamamoto, Hideyuki Minami, Yasuaki Kagaya, and Tsukahara Hattoria ; *Differential Activation of the Rice Sucrose Nonfermenting1 – Related Protein Kinase2 Family by Hyperosmotic Stress and Abscisic Acid* ; The Plant Cell, Vol. 16, 1163 – 1177, May 2004
- 六、Qingxi Shen, Aurelio Gomez-Cadenas, Pengnian Zhang, Mary Kay Walker-Simmons, Jen Sheen and Tuan-Hua David Ho ; *Dissection of abscisic acid signal transduction pathways in barley aleurone layers* ; Plant Molecular Biology 47 : 437 – 448, 2001
- 七、呂坤泉、許志聖、楊嘉凌 • 世界水稻的分類 • 行政院農委會台中區農業改良場  
[http : //tdares.coa.gov.tw/show\\_monthly.php?id=tdares\\_tdares\\_subadmin\\_20080520172856](http://tdares.coa.gov.tw/show_monthly.php?id=tdares_tdares_subadmin_20080520172856)
- 八、陳婉蘭 • 稻米面面觀 • 行政院農委會  
<http://theme.coa.gov.tw/100/view.php?issue=24032&id=24060>

九、 The Rice Annotation Project Database

<http://rapdblegacy.dna.affrc.go.jp/>

十、 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?dosa04075+Os12t0586100-01](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?dosa04075+Os12t0586100-01)

十一、 The National Center for Biotechnology Information :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3241737/>

## 【評語】 040708

1. 非常有趣的實驗結果，實驗分析及結果的呈現很有專業的水準。
2. 實驗紀錄的完整性、背景相關資料的了解有加強的空間。
3. 如果引用已發表或別人的圖表及實驗結果應確實註明。