

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：植物學科

作品名稱：感光基因新角色-cop8

學 校：臺北市立大直高級中學

作 者：潘奕彰

Abstract

COP8 is the second unit of COP9 signalsome. In the comparison of BLAST ,we found that LLPC14 cDNA and the protein sequence are quit similar to the COP8 of *Arabidopsis thaliana* Therefore, we are interested in the role that COP8 plays in the photomorphogenesis and try to find the length of the sequence. So far, no result is obtained about the 3'-RACE, but we're surprised to find that the sequence found in 5'-RACE is shorter than what we're know, which suggests the RNA length of the cDNA used in the RACE combination has decreased.

Although the final results of the COP8 5'and 3'-RACE haven't been achieved, it is sure the COP8 is highly-conserved in many species. Since the similarity between LLPC14 and the COP8 of *Arabidopsis thaliana* is as high as 90 percent, we used the COP8 of *Arabidopsis thaliana* to detect the COP8 protein in pollen.

壹、研究動機

在過去種綠豆芽的經驗中，不難發現它本身因為環境的不同，而有不同型態白化的現象，例如：黑暗下萌發的豆苗。但尚未深入去理解白化的原因；而在後來的種植經驗上，也發現有許多令自己覺得困惑的相同處。

在高二的生命科學第四章中，有提到光照與黑暗生長的植株，在構造比較上有明顯的不同；其中，提及植物的活性組織存在「光敏素」(phytochrome)，此色素蛋白的存在於光照後，會引發一連串反應，至此，也稍微了解植物的萌發反應的差別。

故藉由個人在中研院植物所的資優生培訓過程，便以此為前題,進一步探究植物基因組 COP 8 與白化現象的相關性

貳、研究目的

- 一、認識光敏素與 COP8 的關係。
- 二、COP8 基因的抽取。
- 三、談序列 COP8 基因碼。

參、文獻探討

搜索文獻時，發現原來世界上的多數植物學家對幼芽萌芽機制也有著濃厚的興趣，雖然現有的報告不多，但幸好中研院植物所的趙光裕教授之實驗室也有進行相關議題研究，所以我們便到趙老師的研究室，尋求幫忙。

目前已知光敏素可以吸收光子，促進葉綠素和葉綠體的形成，短時間內，便可使白化的幼苗開始變綠(見附錄一)。另外，光敏素也會影響莖的伸長、葉子的擴展以及莖的分枝等，因此，在黑暗中或光照不足的地方生長的植物，節間較長，葉子細小白化；在較強光照下生長的植物，則節間較短，葉子呈深綠色，發育良好(文獻 3)，而根據 Glickman, M.H. *et al.* (1998)文獻指出光敏素除了影響植物的開花外，還會影響植物的生長與發育等生理作用，進而影響植物體的型態，但中間傳遞訊息的機制不單只有光敏素調控，有許多不同的基因組分別傳遞不同的訊息；然而其中 *COP8* 是目前所知調節光反應的重要角色，因此找到了全球植物學家正在大力研究的 *COP8* 基因碼，當然這個基因碼的研究文獻很少，就連蛋白質的表達以及一些相關探討並不多，所以我們以少許的文獻介紹開始了解，也開始尋求鐵砲百合 (*Lilium longiflorum* Thunb. cv Avita) 這段基因碼的的序列，並與其他生物比較基因序列有無相關之相似度。

肆、研究藥品器材

一、材料：

鐵砲百合 (*Lilium longiflorum* Thunb. cv Avita)、pGEM-T easy 載體、
pET-30a 載體、*E. coli*, DH5 α

二、藥品：

first-stand buffer (dontech)、*EcoRI*、*NcoI*、DTT (dontech)、dNTP、MMLV reverse transcriptase、Tricin-EDTA buffer (dontech)、PCR-grade water、rapid ligation buffer (60 mM Tris-HCl, pH7.8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 20 mM ATP 及 10% polyethylene glycol)、LB (5 g/L yeast extracts, 10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl)、ampicillin、EtBr、advantage 2 PCR buffer、advantage polymerase、T4 ligase (Promega,USA)、ddH₂O、0.1 M CaCl₂、IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside)、X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)、solution I、solution II、solution III、Mini-M column、Ethidium bromide (EtBr)

三、儀器：

高速離心機、DNA 電泳槽、PCR 儀器、震盪回轉式恆溫箱、
pipetmen、無菌操作臺、聚合酵素鏈鎖反應儀 (Biometra T3 Thermocycler)、洋
菜瓊膠電泳

伍、研究方法

一、COP8 的製備：

(一) COP8 之抽取 5',3'-RACE-Ready cDNA 之合成

取適量的花粉 RNA(50 ng~1 µg)以 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)來合成 first-strand 的 cDNA。其方法如下：取 3 µl 之前定量過的 RNA 樣品 (14.4 µg/µl)，加入 1 µl 的去離子水、1 µl kit 所附的 5'或 3'-CDS 引子 (5'-RACE-ready cDNA 還需再加 1 µl 的 SMART II oligo 引子，3'-RACE-ready cDNA 則不用)。置於 70°C 反應 2 分鐘，再放入冰上 2 分鐘。簡單離心後，依序加入 2 µl 的 5X first-strand buffer、1 µl 的 20 mM DTT、1 µl 的 10 mM dNTP mix 及 1 µl 的 200 U/µl MMLV reverse transcriptase (GenHunter)，將其混合均勻，置於 42°C 反應 1.5 小時。之後，加入 100 µl 的 Tricine- EDTA buffer 於 72°C 反應 7 分鐘後置於 -20°C 儲存(見附錄三)。

(二) COP8 5',3'-RACE-Ready cDNA 之合成 — by PCR

以 Advantage 2 PCR Kit (Clontech) 進行 5',3'-RACE-PCR：取 34.5 µl 的 PCR-grade water、5 µl 的 10X advantage 2 PCR buffer、1 µl 的 10 mM dNTP mix 及 1 µl 的 50X advantage polymerase mix 混合均勻，再依序加入 2.5 µl 之前所合成的 first-strand cDNA、5 µl 的 10X universal primer mix (UPM) 引子及 1 µl 的 10 µM 基因專一引子 GSP (Gene specific primer)。以聚合酵素鏈鎖反應儀 (Biometra T3 Thermocycler) 進行 touchdown PCR。其進行條件為前 5 個循環：94°C 加熱 5 秒；72°C 加熱 3 分鐘。次 5 個循環：94°C 加熱 5 秒；70°C 加熱 10 秒；72°C 加熱 3 分鐘。最後 25 個循環：94°C 加熱 5 秒；68°C 加熱 10 秒；72°C 加熱 3 分鐘。

(三) COP8 與 pGEM-T easy 載體之 DNA 黏接反應 (Ligation)

以 PCR 產物直接黏接至 pGEM-T easy 載體 (Promega, Madison, WI, USA)。將適當濃度 PCR 片段與 1 µl 質體 DNA 混合，加入 5 µl 劇烈震盪過的 2X rapid ligation buffer 及 1 µl 的 3 U/µl T4 ligase，以二次蒸餾水補足至總體積 10 µl，混

合均勻後於 4°C 反應 14-16 小時。(見附錄四)(見附錄五)

(四) 切 pGEM-T easy 接到 pET-30a

以 pGEM-T easy 的 *COP8* DNA 直接黏接至 pET-30a 載體。將 20µg/10µl 片段、4 號 buffer 10X 5µL 及 NcoI enzyme (20U/µl) 1 µL 加入二次蒸餾水 34µl 混合 37°C 1-2 小時。再將適當濃度片段與 1 µl pET-30a 載體混合，加入 5 µl 劇烈震盪過的 2X rapid ligation buffer 及 1 µl 的 3 U/µl T4 ligase，以二次蒸餾水補足至總體積 10 µl，混合均勻後於 4°C 反應 14-16 小時。之後進行轉形作用而將載體送入大腸桿菌 (*E. coli*, DH5α) 內。

(五) 勝任細胞製備與質體之轉形作用 (Transformation)

挑選 *E. coli* (DH5α) 之單一菌落接種至 5 ml 的 LB，於 37°C 隔夜培養。取 500 µl 培養好的菌液加至 50 ml 的 LB，於 37°C 震盪培養至 OD₅₅₀=0.4~0.5，取出並置於冰上 10 分鐘。再以 4°C，1,500 xg 離心 10 分鐘後，輕倒出菌液，將沈積的菌體倒置 1 分鐘，以去除殘存的菌液。把菌體懸浮於 10 ml 預冷之 0.1 M CaCl₂ 溶液後置於冰上 15 分鐘。再以相同條件離心、去除菌液後，將菌體懸浮於 2 ml 預冷之 0.1 M CaCl₂ 溶液。置於 4°C 約 12~24 小時後勝任細胞即可使用，或加 1/10 倍的甘油 (glycerol) 置於 -70°C 保存。

取 100 µl 的勝任細胞與黏接完成的質體 DNA (勿超過 5 ng/µl) 混合均勻後，冰浴 30 分鐘；取出置於 42°C 反應 1.5 分鐘，立即置回冰浴 1~2 分鐘後加入 900 µl 的 LB 於 37°C 培養 1.5 小時。接著於室溫下以 1,500 xg 離心 5 分鐘。去除 800 µl 的上清液，使沈積的菌體與殘留的液體均勻混合後，迅速塗抹到含有 100 µg/ml 的 ampicillin、100 µl 的 100 mM isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) 及 20 µl 的 50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) 的培養基上，再將其置於 37°C 下培養隔夜後進行藍白篩選 (blue/white selection) (見附錄六)。

(六) 質體 DNA 萃取與純化

本實驗是參考 VIOGENE 公司的 Plasmid DNA Miniprep system (Mini-M; Cat#GF1002) 的說明方法進行。

將之前進行 suppression subtractive hybridization 後所得的菌體，選取白點菌體，將其加於有 ampicillin 之 5 ml LB 培養基中，在 37°C 下震盪培養 16 小時。經 1,500 xg 離心 5 分鐘去除上清液後，加入 250 µl solution I (使用前已加入 RNase A)，劇烈震盪使沈積菌體完全懸浮。隨後加入 250 µl solution II 溫和混勻，然後加入 350 µl solution III 溫和混勻，以 10,000 xg 離心 15 分鐘，吸取上清液至已組裝完成的 Mini-M column，以 10,000 xg 離心 1 分鐘，去除過濾液(flow through)，依序以 wash I buffer 與 wash II buffer 沖洗 Mini-M column。最後將 Mini-M column 轉移至新的 1.5 ml 離心管，加入 50 µl 滅菌去離子水，靜置 1 分鐘，以 10,000 xg 離心 1 分鐘，將 DNA 由 Mini-M column 純化出，俟測其濃度後放入 -20°C 冰箱保存。

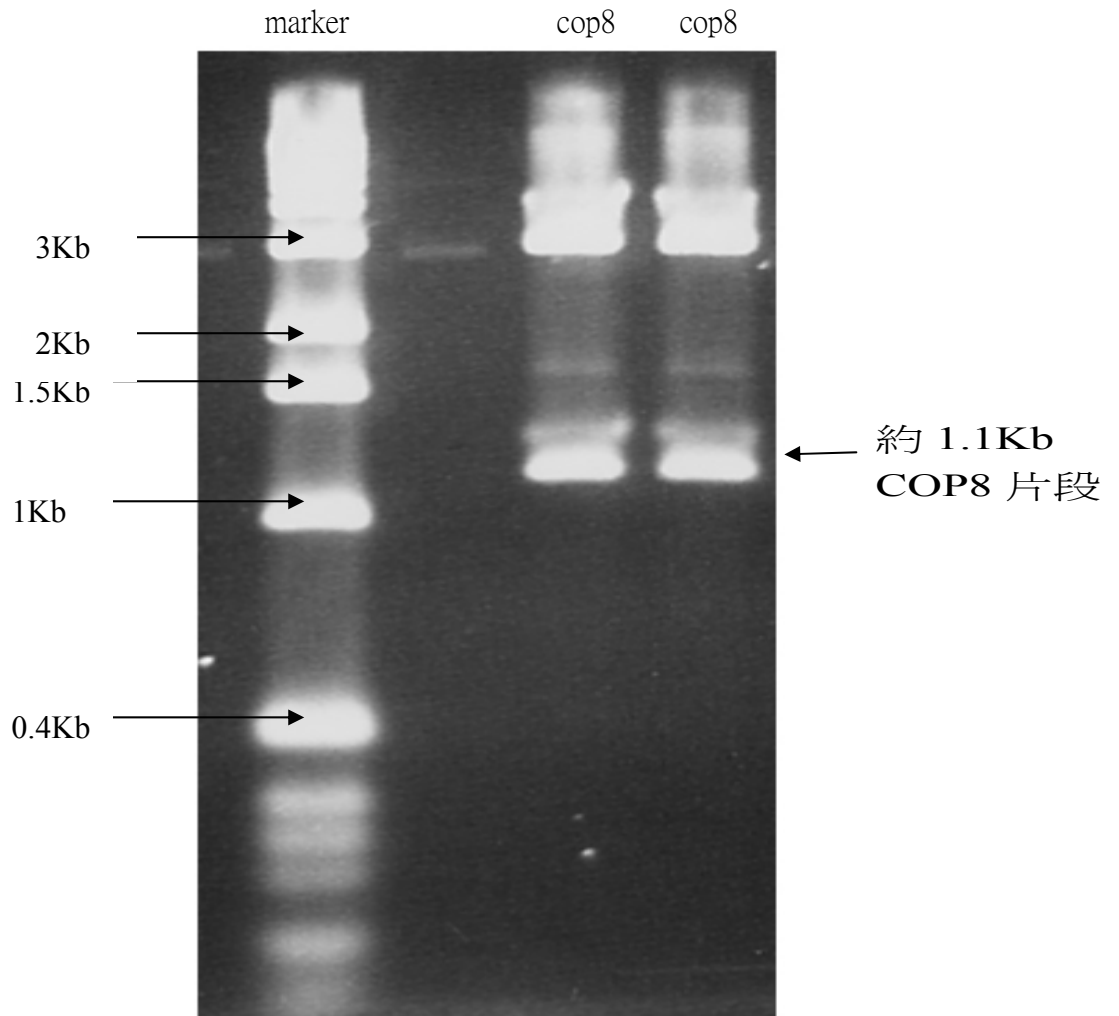
取一部分質體 DNA，以限制酵素 *EcoRI* 進行剪切，於 37°C 下反應 1 小時。將完全剪切之 DNA 樣品以 1% 之洋菜瓊膠電泳進行分離。電泳分析結束後以 (EtBr) 染色，膠體直接置於紫外光燈箱上照像。

二、COP8 之序列分析：

萃取出質體 DNA 以 T7 啓動子的序列為引子，經過自動核酸定序儀定序並利用 BLAST 進行同源性比對。

陸、研究結果

一、COP8 萃取與純化



圖一、COP8 之電泳圖

二、基因定序下的成果

1. 鐵炮百合花粉粒之 COP8 基因定序：

1 ACAAGCTGTC TAAATGTGTC CAAATTGCTC GTCTCTATCT TGAGGATGAT
51 GATGCCATCA ATGCAGAAGC TTTTATCAAC AAGGCATCAT TTTTAGTTAG
101 CAATAGTCAA CAAGAAGTCC TGAAGTTGCA ATACAAGGTT TGTTATGCAA
151 GGATATTAGA TCTGAAGAGG AAATTTTTGG AGGCTGCACT CCGTTATTAT
201 GACATTTCCC AGATTGAGAA ACGCCAAATC GGAGACGAGG AGATTGATGA
251 AGATGCACTG GAACAAGCTC TTAGCGCTGC TGTGACCTGC ACAATATTGG
301 CTGCTGCTGG TCCACAACGC TCTCGGGTTC TTGCTACCTT GTATAAGGAT
351 GAACGGTGCT CAAAGTTGAA AGTATACCCA ATCTTGCAGA AGGTGTATTT
401 GGAAAGGATT CTGAGAAAAC CCGAAATTGA TGCATTTGCT GAAGAACTAA
451 AAGCACACCA GAAAGCTCTT TTACCAGACA ACTCCACTGT ACTGGACCGT
501 GCAATGATCG AGCATAATCT TTTGAGTGCT AGCAAACCTT ATACGAACAT
551 TAGCTTCGAA GAACTGGGCA CTTTACTGGG CATTGCTCCT CAAAAGCCCG
601 AAAAGATAGC ACCAAGGATG TTCTTGAGAG ATAGAATGAA AGGTTCTATT
651 GATCAAGTTG AAGCCTTCAT CCATTTTGAG GATGACCCGG AGGAGCTCCA
701 ACAATGGGAT CACCAGATTA TGGGTCTCTG TCAATCACTG AATGAAATTC
751 TTGATAGCAT GACAAGGAAG GGTATATCAA TTCCAGTTTG AACTATTTGT
801 CCTGTTAGGG GGGTCACCTT TTATGGAGCT TTTCATATAT ATGGTAGATT
851 ATGGCCCTTT TGTAGATCTC TCAATAAGGA ACAAGTGAAA AGTACTATAC
901 ATTAGTGATT TTTTACCCC GCACCTCCGT CTATAGATCT TGTTAGCATC
951 GTTTTGATGC ATTTATGTTC CTTTTTAATT ATGCATCCCA TTGGATAAAT
1001 TGAATTTACT TGTTATATTA TTCATTTGGG AAGTCTGGTC TGATACTAAC
1051 AAAAGCTATA TAAAATTGTA TGCCGGAGCT ACAAAGCATG TGTTAATGTA
1101 AATGTACGCC CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA

2. 在 NCBI 網站與國際生物體比對下的成果

Lilium longiflorum Thunb (鐵砲百合)

(1)

-KLSKCVQIARLYLEDDDAINAEAFINKASFLVSNSQQEVLNLQYKVCYARILDLRKRFLEAA
LRYDYDISQIE

Ciona intestinalis (144)

YKLTLYLTARLYLEDEDVPQAEFYINRASLLQNETADEQLQIHYKVCYARVLDYRRKFLE
AAQRYNELSYKS

Emericella nidulans (144)

AKVKLWIRIVRLYLEEDDTSSAEAFLNRIKNLPSKIEDPELKLHFRLSQARIQDARRRFLDASQ
EYLAVSLAA

Arabidopsis thaliana (阿拉伯芥) (135)

FKLSKCIQIARLYLEDDDAVNAAEFINKASFLVSNSQNEVLNLQYKVCYARILDMKRKFLEA
ALRYYGISQIE

Drosophila melanogaster (果蠅) (150)

CKLGTYLKIAARLYLEDNDVSVQAEFLINRASLLQAETNSEELQVLYKVCYARVLDYRRKFIEA
AQRYNELSYRK

Homo sapiens (智人) (143)

YKLETYLKIAARLYLEDDDPVQAEAYINRASLLQNESTNEQLQIHYKVCYARVLDYRRKFIEA
AQRYNELSYKT

Consensus (151) KL TYL IARLYLEDDD VQAEAFINRASLLQSES E
LQLHYKVCYARVLDYRRKFLEAAQRYNELSY

Lilium longiflorum Thunb

(73)

KRQIGDEEIDEDALEQALSAAVTCTILAAAGPQRSRVLATLYKDERCSKLVYPILQKVYLER
ILRKPEIDAF

Ciona intestinalis (217)

-----AIHETEQTKALEKALNCAILAPAGQQRSRMLATLQKDERCQLLPSFGILEKMFLLDRIKS
DEMEEF

Emericella nidulans (217)

G-----VDES DRLQALAAAIRCAVLAAPAGPQRSRTLATLYKDDRATSVEEFGILEKMFLLDRLLT
PEEVSAF

Arabidopsis thaliana (208)

QRQIGDEEIDENALEQALSAAVTCTILAGAGPQRSRVLATLYKDERCSKLVYPILQKVYLERI
LRRPEIDAF

Drosophila melanogaster (223)

-----IVDQGERMTALKKALICTVLAASAGQQRSRMLATLQKDERCQHLPAYGILEKMYLERIIR
RSELQEF

Homo sapiens (216)
-----IVHESERLEALKHALHCTILASAGQQRSMLATLTKDERCQQLAAYGILEKMYLDRIR
GNQLQEF

Consensus (224) VDE ER QAL AAL CTILA
AGQQRSM LATLYKDERCQ L YGILEKMYLERILR E EF

Lilium longiflorum Thunb (146)
AEELKAHQKALLPDNSTVLDRA MIEHNLLSASKLYTNISFEELGTL LGIAPQ-----KPEKIAPR
MFLEDR

Ciona intestinalis (283)
ARQLMPHQKAITADGSNLHRAVTEHNLLSASKLYNNIRFTEL GALLEIPHQ-----MAEKVAS
QMICESR

Emericella nidulans (283)
AQRLAPHQLAQTADGTTVLDKAVVEHNLVASKLYENIKTDALGAILGLQASGDLTAGEKA
EAYAARMVEQGR

Arabidopsis thaliana (281)
SEELRPHQKASLPDKSTVLDRAVIEHNLLSASKLYTNIRFDELGTL LAIDPR-----KAEKIAAN
MIGQDR

Drosophila melanogaster (289)
EALLQD HQKAATS DGSSILDR AVFEHNLLSASKLYNNITFEELGALLDIPAV-----KAEKIASQ
MITEGR

Homo sapiens (282)
AAMLMPHQKATTADGSSILDR AVIEHNLLSASKLYNNITFEELGALLEIPAA-----KAEKIASQ
MITEGR

Consensus (297) A L PHQKA TADGSTVLDRAVIEHNLLSASKLYNNI
FEELGALL IPA KAEKIASQMI EGR

Lilium longiflorum Thunb (212)
MKGSIDQVEAFIH FEDDP----EELQQWDHQIMGLCQSLNEILDSMT RKGISIPV-----

Ciona intestinalis (349)
MKGHIDQIDGIVFFERR----ETLPTWDVQIQSLCLEVNSIVDKISAVHQDWVNRKMELLSNT
N

Emericella nidulans (356)
LSGSIDQIDGIYFESNTTATGRHIRQWDAGVQGLSEGVATNIAEGHLVR-----

Arabidopsis thaliana (347)

M R G S I D Q E E A V I H F E D D V --- E E L Q Q W D Q Q I S G L C Q A L N D I L D G M A K K G M S V P V -----

Drosophila melanogaster (355)

M N G H I D Q I S A I V H F E N R --- E L L P Q W D R Q I Q S L C Y Q V N S I I E K I S V A E P D W M D N L N -----

Homo sapiens (348)

M N G F I D Q I D G I V H F E T R --- E A L P T W D K Q I Q S L C F Q V N N L L E K I S Q T A P E W T A Q A M E A Q M A Q -

Consensus (370) M G S I D Q I D G I V H F E R E L P Q W D Q I Q S L C V N
I L D K I S W

Red: identical (完全相同)

Gray: conservative (保留)

Yellow: block of similar (相似)

柒、討論

一、光敏素 (phytochrome)：

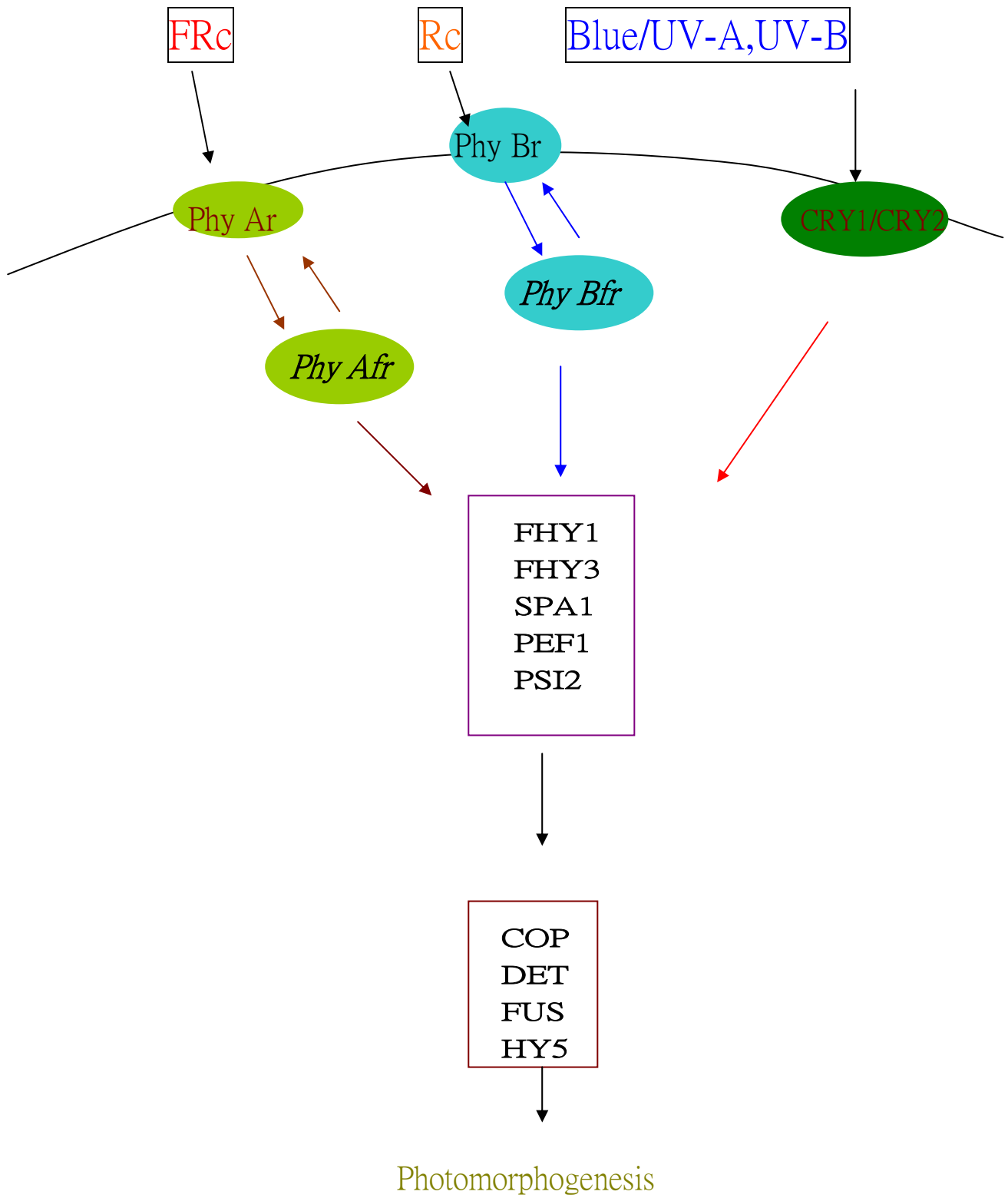
高二的生命科學 (文獻 10) 曾提到，光敏素是調控光照機制最普遍被人們了解的物質；光敏素是一種存在於植物細胞內的藍綠色素，以兩種形式存在，一種形式會吸收紅光，稱為 P_r ；另一種形式則會吸收遠紅光，稱為 P_{fr} 。 P_r 照紅光或陽光就但會轉變為 P_{fr} ， P_{fr} 照遠紅光或是經過一段時期的黑暗就會轉變為 P_r ， P_{fr} 是具有活性的光敏素，會影響植物的開花等生理作用。

二、*COP8* 基因：

COP8 全名為 *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 8*，其屬於 *COP9* signalsome (見附錄二) 中的一員，而 *COP8* 的產物是一個與光訊息傳導相關的蛋白。Freilich, S. *et al.* (1999) 以阿拉伯芥幼苗在光照環境下生長時，子葉展開並且擴大，胚軸短；而黑暗生長的幼苗則白化，子葉閉合且不發達，頂點鉤 (apical hook) 缺少，胚軸長。故本實驗以鐵砲百合為材料，抽取其 *COP8* 基因進行相關分析。

三、光敏素與 *COP8* 之相關性

經由一些文獻 (文獻 5、8) 的認知後，發現到控制植物光反應的調控並不僅限於光敏素，在植物體的生理中，尚有許多有關的基因在共同調節。例如 *COP8*、*DET*、*FUS*、*HY5* 等蛋白質複合體，都扮演著相似的生理調控角色 (如下圖)



如上所示它們之間角色的扮演似乎是一個非常重要的研究領域。

四、各物種 COP8 基因之比較

根據本實驗以 Lily 花粉粒萃取之 *COP8* 基因定序完成後與其他生物比對，顯示該基因與其他物種之 *COP8* 基因相似度大約 50%【見結果(二)之 2】，由於 *COP8* 蛋白質普遍存在於高等生物中，並對於調控其生長機制有著明顯的影響（見文獻 4），因此 *COP9* 基因及其功能研究是許多科學家所探討的主題。

五、COP8 基因的表現調控

至於其在一般植物之功能研究較著重於光反應時 *COP8* 所扮演的角色，最近研究顯示 *COP8* 所屬之 *COP9* 複合體可能參與許多蛋白質經由「宇元」(ubiquitin)/「26S 蛋白解體」(proteasome)系統所控制之蛋白分解降解作用，不過現今的許多研究人員也正在探討其可能之功用（文獻 5）。

而 Lily *COP8* 抽取與轉形過程中，需藉 2-3 種質體轉換，因此增加了其中的困難度，而難以生產大量 *COP8*，且在蛋白質表現過程不佳操作困難。故 *COP8* 的基因表現調控尚未能了解，更待進一步研究。

捌、結論

一、在我們現階段只把 Lily 的 COP8 基因定序出來，與好幾種生物比對，結果發現相似度非常高，也雖然發現到動物體也有其相關序列，不過其功能卻仍待研究考證。

二、COP8 基因的調控表現仍是一個很重要的研究領域，尚需一段時日才能徹底分析，然而因時間有限，本人尚未能進行。

玖、參考文獻

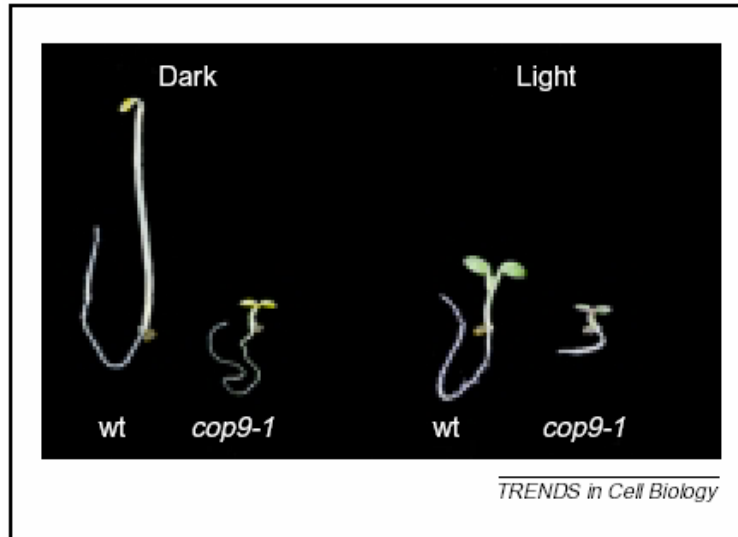
1. Aravind, L. and Ponting, C.P. (1998) Homologues of the 26S proteasome are regulators of transcription and translation. *Protein Sci.* 7, 1250–1254
2. Baumeister, W. *et al.* (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367–380
3. Chamovitz, D.A. *et al.* (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* 86, 115–121
4. Deng, X-W. *et al.* (2000) Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet.* 16, 202–203
5. Freilich, S. *et al.* (1999) The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 9, 1187–1190
6. Glickman, M.H. *et al.* (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615–623
7. Hofmann, K. and Bucher, P. (1998) The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem. Sci.* 23, 204–205
8. Karniol, B. *et al.* (1999) *Arabidopsis FUSCA5* encodes a novel phosphoprotein that is a component of the COP9 complex. *Plant Cell* 11, 839–848
9. Kim, T-H. *et al.* (2001) PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways. *Trends Plant Sci.* 6, 379–386
10. 施河、呂光洋 等 (2001) 第四章 高中生命科學 教師手冊上冊 南一書局 114-115

摘要

COP8 為 *COP9* signalosome 的一個次單位，而在 BLAST 進行同源性比對中，發現 LLPC14 cDNA 及蛋白質序列與阿拉伯芥的 *COP8* 有非常高的相似性。因對於 *COP8* 在植物光形態學 (photomorphogenesis) 上扮演的角色非常有興趣，故希望找出其全長，以進行更進一步的研究。但目前為止 3'-RACE 並無結果，而 5'-RACE 所找尋到的序列竟比已知的短，推測原先用以合成 RACE 反應中之 cDNA 的總 RNA 已發生降解的現象。

雖然 *COP8* 之 5' 與 3'-RACE 還未有結果，但是 *COP8* 在目前已知各物種中皆有高度的保留性，且 LLPC14 在與阿拉伯芥的 *COP8* 有高達的相似性 90% 以上的相似度(第 14 頁)。故我們用已有的阿拉伯芥 *COP8* 抗體 (Affiniti Research Products Ltd, Exeter, United Kingdom) 來偵測花粉中 *COP8* 蛋白。

(附錄一) (文獻 3)



(附錄二)COP9 的相關研究(文獻

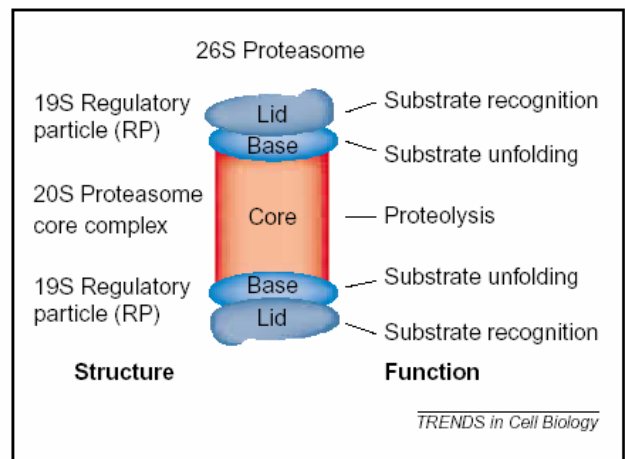
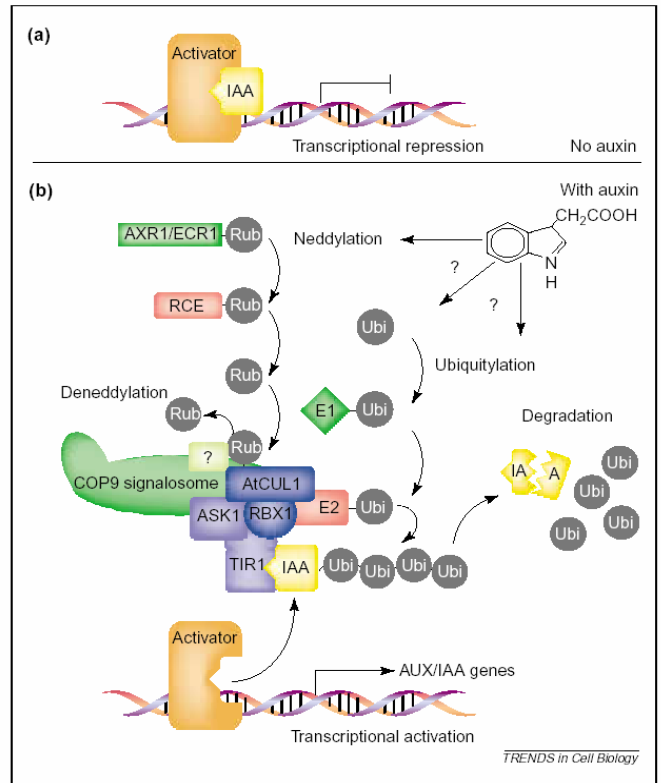
8)COP9 signalsome 首先在植物中找尋到 (Wei *et al.*, 1994)，之後亦在動物中被發現，而且 COP9 signalsome 各次單位的序列在植物與動物間有高度的保留性。COP9 signalsome 是一個大蛋白質複合物，由八組截然不同次單位所組成，因各次單位在不同的方法或不同生物系統中同時被發現，故一個次單位可能有許多名稱而造成混亂，例如 COP11 與 FUS6 其實是指同一個次單位，爲了澄清這個情況，近來已經採用統一的次單位

名詞彙編來表達這些蛋白質，新名稱爲 CSN 1 至 CSN 8。COP9 signalsome 中有六個次單位皆含 proteasome- COP9 complex-initiation factor 3 (PCI) domain，而另外兩個次單位則含有 Mpr1-Pad1-amino-terminal (MPN) domain

(Glickman *et al.*, 1998; Hofmann and Bucher, 1998)，不過這兩種 domains 的結構與功能還不是很清楚，只知道與蛋白質相互作用有關。這兩種 domains 亦在 26S proteasome 的蓋子 (Aravind and Ponting, 1998) 和真核生物的 translational regulatory complex eIF3 中發現，事實上 COP9 signalsome 與 26S proteasome

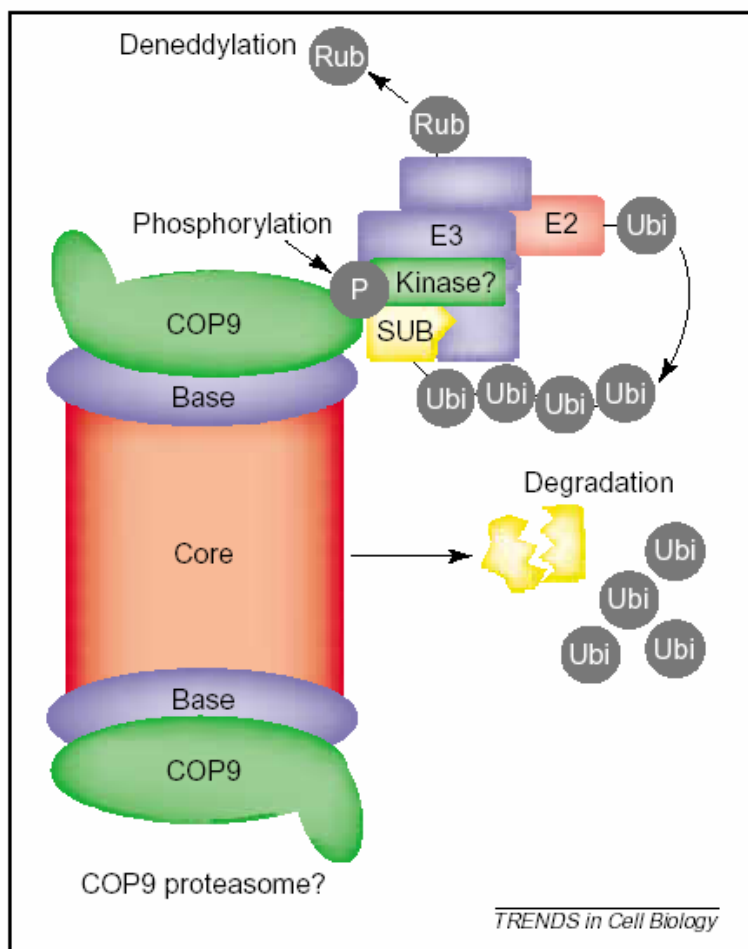
的蓋子和真核生物的 translational regulatory complex eIF3 在同源性比對上有相似性。

了解 COP9 signalsome 的架構是了解其功能的一個主要步驟。利用酵母菌 two-hybrid 方法知道了各個次單位之間的相互作用 (Kwok *et al.*, 1998; Serino *et al.*, 1999; Karniol *et al.*,



1999)。CSN1 與自己以及與 CSN5 和 CSN7 相互作用，CSN8 也與 CSN7 相互作用，而 CSN4 與自己和與上述四個已確定的次單位相互作用。這暗示了 COP9 signalsome 的中央位置可能為 CSN4。最近在果蠅 COP9 signalsome 的次單位研究中暗示 PCI domain 扮演次單位相互作用中的架構角色和在 COP9 signalsome 的巨大分子集合中充當支架 (Freilich *et al.*, 1999)。在阿拉伯芥中 CSN4 的 PCI domain 被刪除後，破壞了 COP9 signalsome 的形成 (Serino *et al.*, 1999)。

COP9 signalsome 組成分子在細胞質中合成，再送入細胞核中，對於調節其他光訊息傳導相關的蛋白很重要，例如：COP9 signalsome 對於調節 *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1* (*COP1*) 與 *HYPOCOTYL 5 (HY5)* 有著密切關係。COP1 與 HY5 為兩個光訊息傳導相關的蛋白，其之間的相互作用調節光訊息傳導。在光照環境下 COP1 從細胞核逐漸耗盡並且 HY5 開始累積，造成植物幼苗子葉展開並且擴大，胚軸短；在黑暗中 COP1 會在細胞核累積並與 HY5 結合進而抑制了 HY5 的功能，使植物幼苗白化，子葉關閉和不發達，頂點鉤缺少，胚軸長，但在 COP9 signalsome 發生突變的植株中，COP1 在黑暗中依然從細胞核耗盡並且 HY5 累積，這表明 COP9 signalsome 對於在暗處抑制 HY5 的功能必不可少 (Osterlund *et al.*, 2000)。由於與 26S proteasome 的蓋子相似，故推測其用來保護 COP1，使之在黑暗下不受 proteasome 所降解 (Deng and Quail, 1999)。



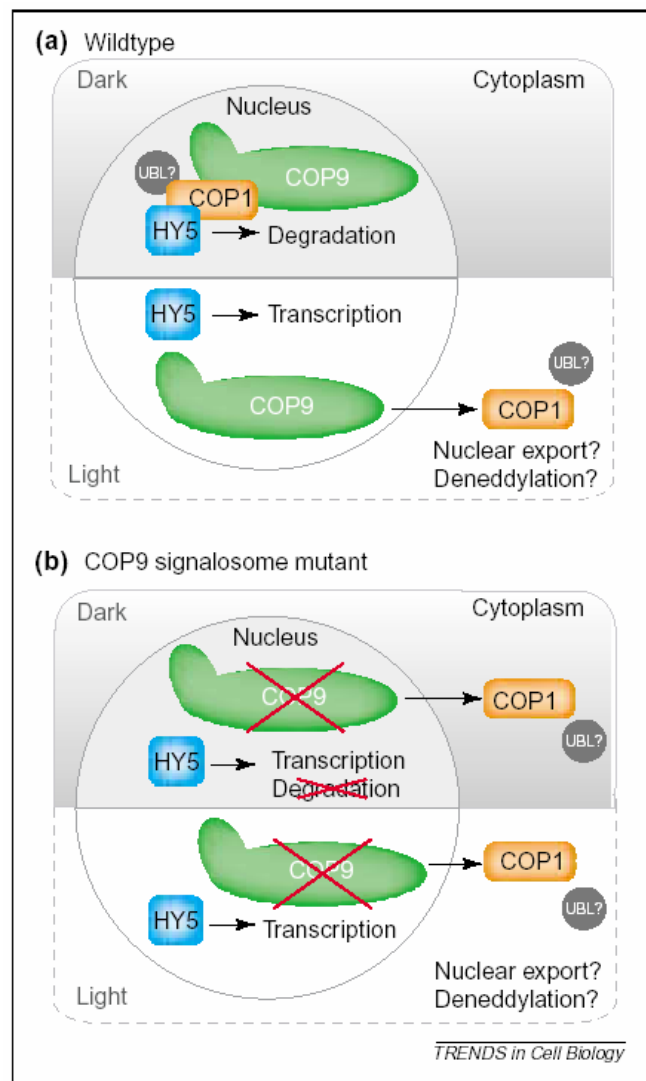
COP9 signalsome 有 8 個 subunits，在 *Arabidopsis* 中 COP9 signalsome 為 photomorphogenic development 的 repressor。

Arabidopsis 的幼苗在光下 (photomorphogenic) 發育具有下列的型態 a.短胚軸 b.子葉膨大 c.伸直的頂端；而在暗中 (skotomorphogenic) 的發育其型態呈 d.胚軸延長 e.子葉關閉 f.頂端成鉤狀。

從 *Arabidopsis* 在暗中卻持續表現出光生長的型態之突變株中找出 11 個基因座，它們為 COP/DET/FUS 基因，這些基因具有基因多效性 (pleiotropic) 會造成植株胚軸縮短、子葉膨大、花青素累積和受光調控的其因持續表現。此 11 個基因座中有 8 個是組成 COP9 signalosome 所必要的，此 8 個基因座中若有一個發生突變會導致幼苗生長的延緩甚至死亡。

目前至少有 4 個基因 COP9、FUS6/COP11、FUS5 和 COP8 /FUS4 被發現，分別可轉譯出 COP9 signalosome 之不同 subunits。COP9 signalosome 的 8 個 subunit 分別命名為 CSN1~ CSN8，在不同的物種間此 8 個 subunit 的氨基酸序列皆很保守，且 signalosome 有在核內聚集的情形；CSN1 和 CSN8 只以複合體的形式存於 COP9 signalosome 中，CSN5 和 CSN7 則以 monomer 和複合體的形式存在，CSN5 由於有兩個重複的基因存在於整體基因組中，

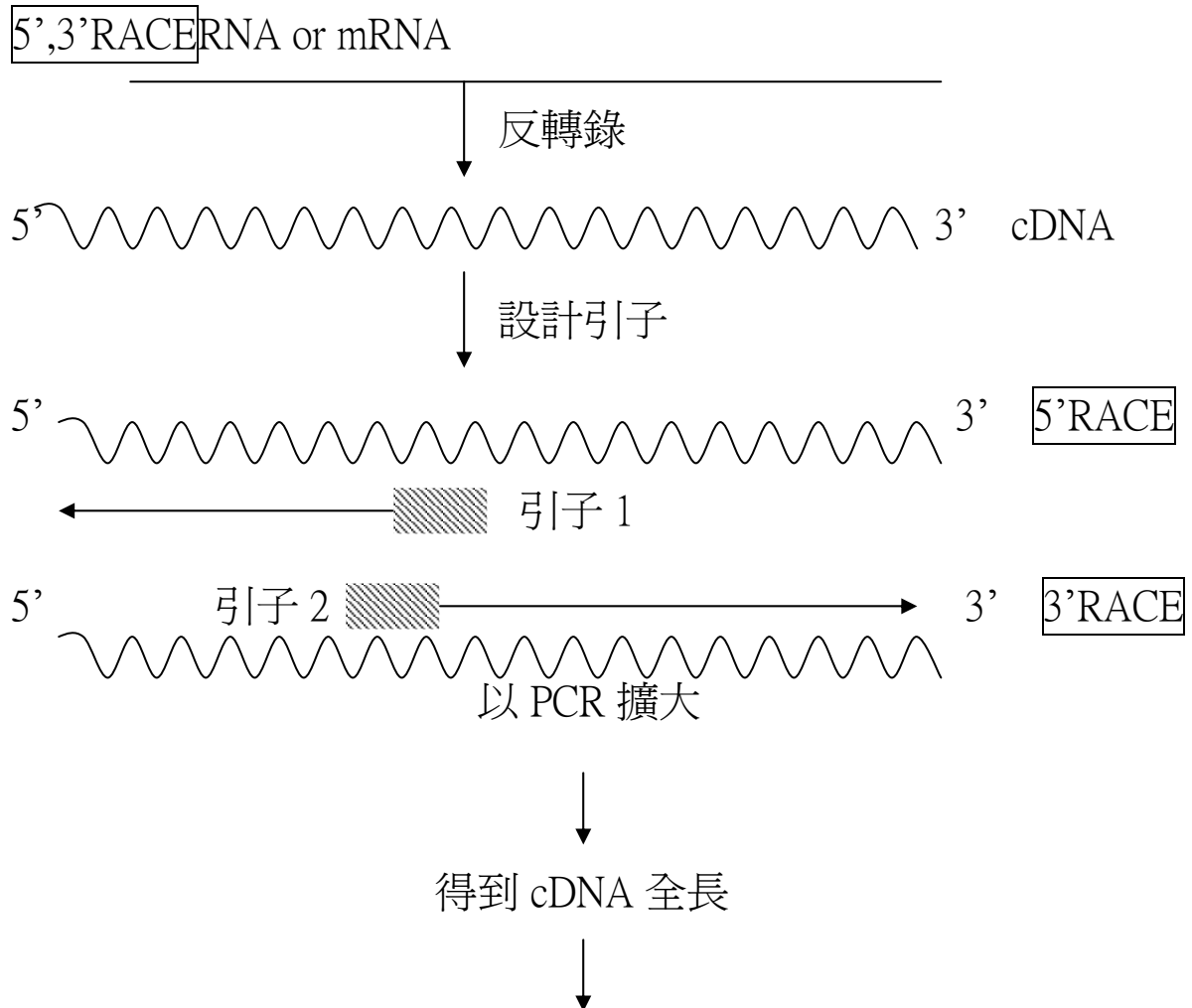
所以到目前為止尚未有突變被發現。COP9 signalosome 或其 subunit 在 mammals 中有不同的功能，但在植物中卻只限於幼苗的時期，因為 COP9 signalosome subunit 的突變在幼苗發芽以後就會死亡；果蠅的 COP9 signalosome subunit 若突變，則在幼蟲或蛹的晚期也會致命，這可能是因為 COP9 signalosome 是晚期發育所需，以 co-suppression 或 antisense 的方



式來降低 COP9 signalosome 的 level 會使此轉基因植株對 auxin 的反應缺失，就如同失去 SCF^{TIR1} 的功能一般，COP9 signalosome 會直接和 SCF^{TIR1} 反應 (in vivo)，為 PSIAA6 的分解所需 (PSIAA6 為 SCF^{TIR1} 的 substrate)；COP9 signalosome 和 SCF complex 反應是發生在 CUL1 和 RBX1 上，因此 COP9 signalosome 有可能會和多種 SCF 的 E3 反應進而調控不同的生長過程。

(附錄三)

一、COP8 之 5'與 3'-RACE (5',3'-rapid amplification of cDNA ends)



做 Cloning 1.接 pGEM T easy 至載體

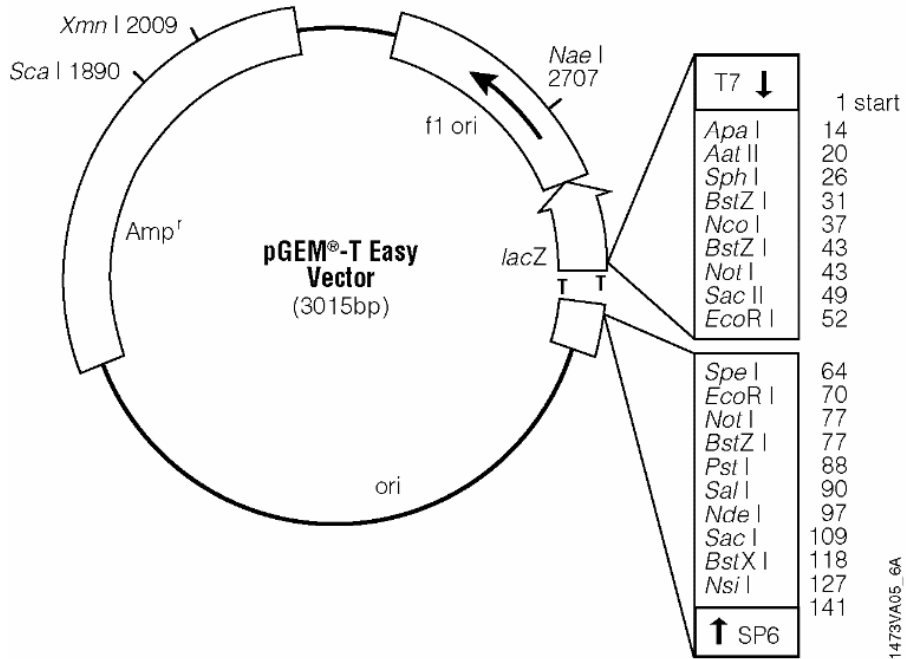
2.送至 E.coli 中進行藍白篩 (Transformation)

3.挑白點養菌,抽 DNA (miniprep)

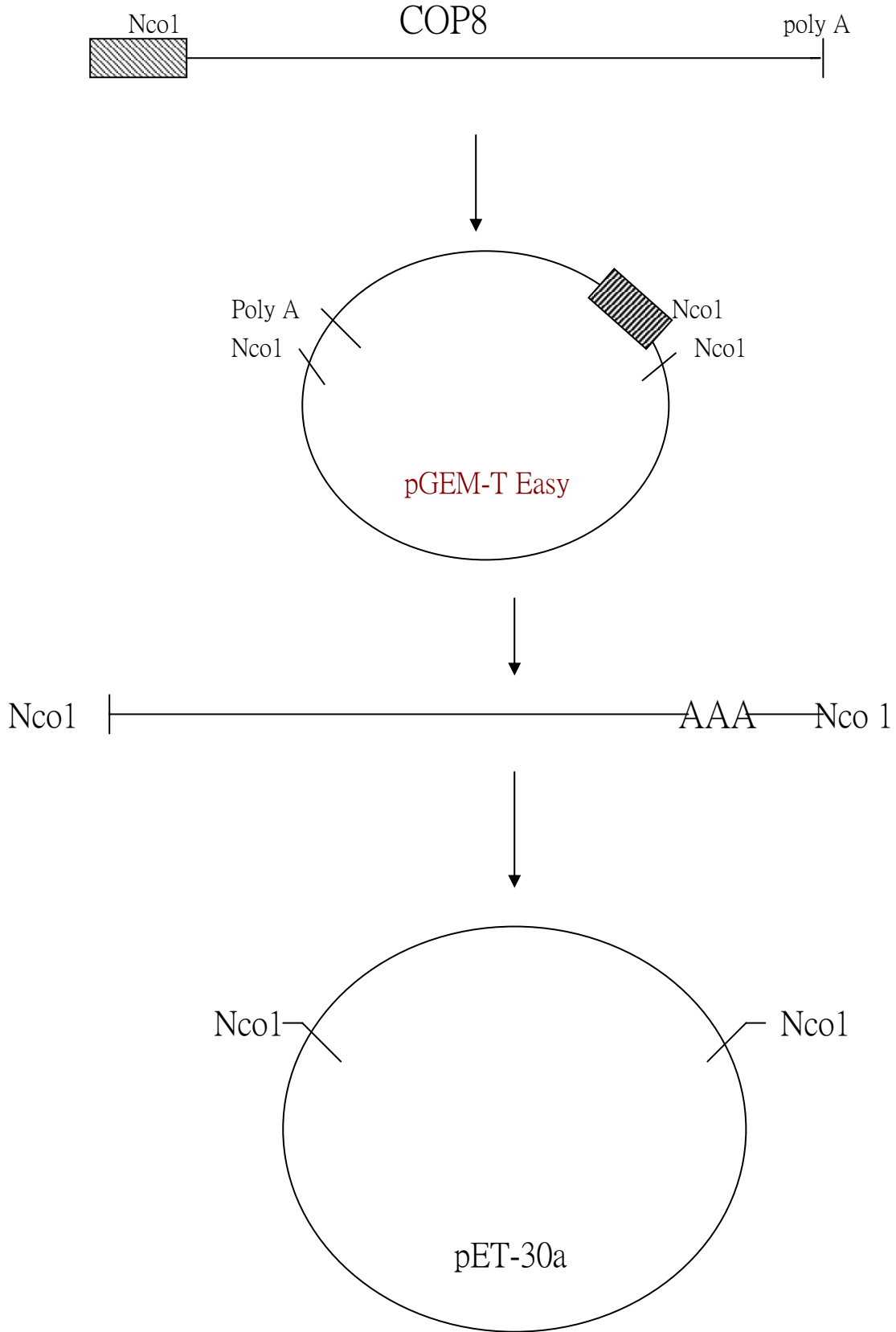
4.以 EcoR 1 切出 insert 觀察 (digestion)

5.定序 (sequencing)

(附錄四)



(附錄五)



(附錄六)

