

臺灣二〇〇七年國際科學展覽會

科 別：植物學

作 品 名 稱：阿拉伯芥 AtYAK1 基因 5'UTR 中的開放
讀序框(uORFs)對基因表現調控之探討

得 獎 獎 項：第二名
美國正選代表：美國第 58 屆國際科技展覽會

學 校 / 作 者：臺北市立建國高級中學 吳敏駿

作者簡介



我的名字叫吳敏駿，目前就讀於北市建國高級中學，是一位忙碌的高三建中人。由於家裡自小即是實行開明自由的管教方式，所以我從小便喜歡自由自在、無拘無束的感覺，也因此熱愛與「自由」屬等同意念的「大自然」。上了國中後，漸漸對生物情有獨鍾，基於喜愛之情，也逐漸開始嘗試追尋生命世界種種現象背後的「為什麼」，就這樣不知不覺地步入了實驗的國度。進入高中後，在因緣際會之下偶然闖進了科學上的盛宴——國際科學展覽會，這不僅是一次對我追尋生命真理的熱忱的肯定，也是一次重要的挑戰——挑戰我的體力，但更加挑戰我的耐力與毅力。在進行實驗的這一年裡，匆忙趕搭末班車的日子不計其數；來往奔波於學校與實驗室之間的壓力也曾逼近臨界；在實驗操作上遇到的挫折也不知有多少次了……。我想不論最後結果如何，這中間各種的酸甜苦辣絕不是一般高中生所能體會到的，相反的，這樣珍貴的經驗也不是金錢所能購得的。但這就是實驗人生，亦是人生試驗，我將甘之如飴，因為這是我選擇的道路！

中文摘要

在模式植物——阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中，AtYAK1 (*Arabidopsis thaliana* Yak1-related protein kinase) 是目前發現唯一屬於 DYRK (Dual specificity Yak1-Related protein Kinase) 的蛋白激酶。雖然之前研究已證明，不同物種之 DYRKs 和細胞的生長與發育過程有關。然而，其在植物中的生理功能卻尚未被明確地研究報導過。在先前的研究中，為瞭解 AtYAK1 在阿拉伯芥內作用之位置，前人選取 AtYAK1 基因 ATG 上游約 2.5 kb 的序列 (Upstream Element, 2.5KUSE) 建構至一含有 GUS (β -glucuronidase) 報告基因的質體中，並轉形至阿拉伯芥，進行 GUS 組織染色分析。但在初步結果中，並沒有在轉殖株觀察到明顯的 GUS 表現。進一步分析，我們發現在 2.5KUSE 序列末端約 0.5 kb 的 5'非轉譯區 (5'untranslated region, 5'UTR) 中，有四組開放讀序框 (Upstream Open Reading Frame, uORF)。有趣的是，許多研究也顯示，uORFs 會影響轉譯過程中的再起始 (re-initiation) 作用而調控該基因的表現。另一方面，前人亦透過構築好的 2KUSE 轉殖株 (即不含有 5'UTR) 進行上述 GUS 實驗。結果發現，此 2KUSE 轉殖株的 GUS 表現非常顯著。本實驗即要瞭解 AtYAK1 的 uORFs 是否也會影響其蛋白質的合成。首先，我們以點突變的方式將四組 uORFs 中之 ATG 換成 TTG，目的為構築不含有 uORFs 之 5'UTR (mutated uORFs, Δ uORFs)。在進行原生質體短暫表現分析法 (protoplast transient assay) 及 GUS 組織染色分析後，將結果與含有 uORFs 的結果作比較：當缺乏 uORFs 後，其 3'端報告基因的表現量確實比原來顯著。綜合以上，我們認為此 uORFs 對於 AtYAK1 蛋白質之表現佔有相當重要的影響地位。最後，我們對 5'非轉譯區是否存在開放讀序框進行阿拉伯芥全基因組分析，相關結果亦於本研究報告中分析討論。

Abstract

AtYAK1 (*Arabidopsis thaliana* Yak1-related protein kinase) is the first DYRK (Dual specificity Yak1-Related protein Kinase) family member identified in the model plant — *Arabidopsis thaliana* and exists as one copy gene in Arabidopsis. Previous studies showed that many eukaryotic DYRKs are involved in regulating the growth and development of cells. However, the study of AtYAK1 in Arabidopsis is lacking to date. In order to understand where *AtYAK1* expresses and functions in plants, a 2.5 kb fragment which is located upstream from the major ATG of AtYAK1 (termed Upstream Element, 2.5KUSE) was previously constructed to drive the expression of a reporter gene, GUS (β -glucuronidase), in transgenic Arabidopsis. Much to our surprise, no GUS expression signal could be detected in such transgenic plants. When further analyses were performed, we found that there are four upstream open reading frames (uORFs) in the 5' untranslated region (5'UTR) within the 2.5KUSE. Many studies indicating that the uORFs can regulate the translation of downstream ORF encoding the major gene product through the procedure of translation re-initiation. This action represents a mode of translational regulation for gene expression. Indeed, GUS activity could be readily detected in transgenic plants expression 2KUSE::GUS, a construct lacking the 5'UTR of *AtYAK1*. In this study, I have tried to elucidate whether the uORFs of *AtYAK1* can regulate the translation of the downstream major ORF. First, in order to construct a 5'UTR fragment of which uORFs have been mutated (Δ uORFs), we apply site-directed mutagenesis to substitute ATG with TTG for the four uORFs and examine the expression of GUS driven by this mutated 2.5KUSE. After analyzing the results in both Arabidopsis protoplast transient assay and transgenic Arabidopsis, stronger expression of reporter genes in both systems were observed when the four uORFs were mutated. We have also confirmed that, in transient expression system, the increase of reporter gene activity was not due to the excess accumulation of the corresponding mRNAs. Rather, it is the four uORFs which play an important role in negatively regulating the translation of AtYAK1, possibly via inhibiting the translation re-initiation of major ORF. A genome-wide examination of uORFs in all Arabidopsis genes was also performed to assess the possible contribution of uORF in regulating gene expression.

目錄

作者簡介	1
中文摘要	2
英文摘要	3
目錄	4
圖表目錄	6
英文縮寫對照表	7
壹、前言	8
一、文獻探討	8
二、研究動機	9
三、研究目的	9
四、研究策略	9
貳、材料與方法	10
一、實驗流程	10
二、實驗方法	11
(一)、突變之 uORFs 片段的製備：點突變 (site-direct mutagenesis)	11
(二)、阿拉伯芥原生質體短暫表現分析	13
1.) 質體建構	13
2.) 大腸桿菌之重組質體轉形	15
3.) 大量製備重組質體	15
4.) 葉肉細胞 (mesophyll) 及懸浮細胞 (suspension cell) 原生質體 (protoplast) 的抽取	16
5.) 原生質體之轉染 (transfection)	16
6.) 轉染原生質體之 RNA 抽取及分析	16
7.) 雙螢光素酶活性分析 (Dual-Luciferase Assay)	17
(三)、GUS (β -glucuronidase) 組織染色分析	18
1.) 質體建構	18
2.) 大腸桿菌之重組質體轉形	18
3.) 農桿菌之重組質體轉形	19
4.) 野生型阿拉伯芥之重組質體轉形	19
5.) 阿拉伯芥重組質體轉殖株之篩選	19

6.) 阿拉伯芥轉殖株 GUS 組織染色分析.....	20
參、研究結果與討論.....	21
一、AtYAK1 基因之 uORFs 對蛋白質合成之影響.....	21
二、AtYAK1 基因功能之推測.....	22
三、阿拉伯芥內生調控 AtYAK1 機制之推測.....	22
肆、未來展望.....	24
伍、參考文獻.....	25
陸、附錄.....	27
一、附圖.....	27
二、附表.....	37
三、實驗材料配方.....	40

圖表目錄

圖一、AtYAK1 5'UTR 與 uORFs 之詳細序列.....	27
圖二、 Δ uORFs 片段之建構步驟圖示.....	28
圖三、多次 DNA 聚合酶連鎖反應 (PCR) 之各階段電泳分析圖.....	29
圖四、比較 Δ uORFs 和 intact uORFs 對報告基因 LUC 蛋白質合成之影響.....	30
圖五、18 株 T1 轉殖株之基因體 DNA 經 PCR 反應後之電泳圖.....	31
圖六、T2 子代轉殖株四天大幼苗之同型合子篩選過程圖例.....	32
圖七、四天大幼苗轉殖株之 GUS 組織染色分析結果.....	33
圖八、阿拉伯芥基因體之 5'UTR 序列分析圖.....	34
圖九、原生質體短暫表現分析所用之 pJD301 質體.....	35
圖十、GUS 組織染色分析實驗所用之 pCAMBIA1381z 質體.....	36
表一、列表整理原生質體短暫表現分析中，各樣品結果的相對計算值.....	37
表二、18 株 Δ uORFs 轉殖株之 T2 子代抗生素篩選結果與其分離率.....	38
表三、阿拉伯芥基因體之 5'UTR 序列分析結果.....	39

英文縮寫對照表

β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	base pair
dATP	Deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	Deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	Deoxythymidine 5'-triphosphate
dNTP	Deoxyribonucleotide 5'-triphosphate
ddH ₂ O	Double deionized water
DEPC	Diethylpirocarbonate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetera 5'-triphosphate
EtBr	Ethidium bromide
GUS	β-glucuronidase
kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani broth
LUC	Luciferase
mg	milligram
ml	milliliter
MS	Murashige and Skoog
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PLB	Passive lysis buffer
rpm	Rounds per minute
RT-PCR	Reverse transtription PCR
TAE	Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer
Taq	<i>Thermos aquaticus</i> DNA polymerase
TE	Tris-EDTA buffer
Tris	Tris (hydroxymethyl) amminomethane
uORF	upstream Open Reading Frame
5'UTR	5'untranslated region
μg	microgram
μl	microliter
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide

壹、前言

一、文獻探討：

在模式植物——阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中，共含有約兩萬六千個基因。依據分子生物學的中心法則 (Central Dogma of Molecular Biology)，許多的基因在經轉錄 (transcription) 與轉譯 (translation) 作用後，將產生各種功能互異的不同類型蛋白質；而在這茫茫「基因海」中，AtYAK1 (*Arabidopsis thaliana* Yak1-related protein kinase) 是目前在阿拉伯芥中唯一發現屬於 DYRKs (Dual specificity Yak1-Related protein Kinase) 的蛋白激酶，儘管如此獨特，其在植物中的功能卻尚未被明確地研究報導過。

一般而言，蛋白質之磷酸化與去磷酸化的轉換過程，對於細胞的訊息傳遞機制有很重要的影響 (Kentrup et al.,1996)。而與一般蛋白激酶不同的是，DYRKs 具有特殊的結構以及酵素活性：本身會藉由在胺基酸序列上 serine/threonine 或 tyrosine 殘基的自動磷酸化 (autophosphorylation) 而活化，再進而催化其受質蛋白的磷酸化反應 (Kentrup et al.,1996; Himpel et al.,2001)。而 DYRKs 的同源蛋白 (homologs) 也分佈在各個不同物種間，其中包括酵母菌的 Yak1、果蠅的 Mnb (minibrain)、黏菌的 YakA 以及哺乳動物的 DYRK1A/B/C，DYRK2-3，DYRK4A/B 等 (Becker and Joost,1999; Campbell and Proud,2002)。

儘管我們已知 DYRKs 存在於各個不同物種之中，但其詳細的功能仍待進一步確認。人類的 DYRKs 一直以來不斷地被廣泛研究，目前發現共有七個同功異構物 (isoforms) (Campbell and Proud, 2002)。以 DYRK1A 來看，由於此基因位於第二十一條染色體上，剛好與唐氏症 (down syndrome) 患者第二十一條染色體發生異常之位置重疊，因此推測 DYRK1A 可能造成唐氏症患者腦部發育不完全或遲滯 (Lochhead et al.,2003)；另一方面，在大量表現 DYRK1A 的轉殖鼠也出現神經發育的遲緩及智力的缺乏，顯示 DYRK1A 與腦部發育有關 (Altafaj et al.,2001)。而相對於 DYRK1A 普遍表現於各種不同組織，DYRK1B 則只在某些特定細胞中才有較高的表現量，顯示在調控細胞的功能上，可能有未盡相同之處 (Leder et al., 2003)。除了調節細胞生長發育外，DYRK 也參與葡萄糖新生作用及肝醣合成的路徑 (von Groote-Bidlingmaier et al.,2003; Skurat and Dietrich,2004)。同時亦有研究指出，DYRK 會與一些轉錄因子進行交互作用，像是 CREB (cAMP-response element-binding protein) (Li et al.,2002) 及 Forkhead (von Groote-Bidlingmaier et al.,2003)。

相較於哺乳動物，果蠅若缺乏 Mnb 時，不但影響神經的發育而且腦容量也比一般野生型果蠅來得小，進而影響果蠅學習能力及造成行為上的缺陷 (Tejedor et al.,1995)。而黏菌中的 YakA 也被認為在營養缺乏的環境下，除了造成細胞生長停止外，還會誘導進入發育時期時黏菌所需基因之表現，故認為 YakA 具有調節黏菌生長及發育過渡時期的功能 (Souza et al.,1998)。至於調控基因功能表現方面，Yak1 也參與酵母菌的葡萄糖訊息傳遞路徑。根據之前實驗，在酵母菌生命週期中，Pop2 蛋白質的磷酸化和造成酵母菌生長遲滯有關，經進一步實驗，證實當葡萄糖缺乏時，Yak1 是催化 Pop2 蛋白質磷酸化反應之蛋白激酶，因此認為 Yak1 和黏菌之 YakA 相同，在環境中養份缺乏時對於細胞生長有抑制之作用 (Moriya et al.,2001)。

綜合以上之敘述，DYRKs 參與並調節了細胞的生長與發育，故可推測：AtYAK1 與阿拉伯芥生長發育的調控有關。因此，若能進一步瞭解 AtYAK1 在阿拉伯芥中的調控機制，將有

助於我們理解其在植物中所扮演的生理角色與生態意義。

二、研究動機：

在先前的實驗中，為瞭解阿拉伯芥內的 AtYAK1 作用表現之位置，前人首先選取並切割了一段位於 AtYAK1 基因 ATG 上游長約 2.5 kb 的序列，即 Upstream Element (2.5KUSE)，並將此片段序列建構至一含有特定報告基因 (β -Glucuronidase, GUS) 的載體 (vector) 中。並以農桿菌為媒介，將此段 2.5 kb 序列片段連同 GUS 基因，轉形 (transformation) 至野生型阿拉伯芥。藉由分析 GUS 基因在阿拉伯芥中表現的時期及位置後，再往下推測 AtYAK1 在這當中又是如何被調控表現，可望能幫助我們進一步釐清其在植物中所執行之功能與意義。然而令我們感到疑惑的是：分析 GUS 基因在轉植株中的表現結果中，不論是 4 天大幼苗或者是不同成熟時期植株的各個組織，發現其 GUS 表現量不但非常微弱，大多數植株甚至沒有表現。這不禁讓我們懷疑，是否 AtYAK1 基因的表現本身就受到嚴格的調控，可能僅於某一特定時期表現，以致於表現週期非常的短暫，因此無法在過去的實驗中被偵測到；然而其相關調控機制也仍待進一步實驗去證明。

此外，我們也發現另外一個有趣的現象，在 2.5KUSE 序列末端的 5' 非轉譯區 (5'-UnTranslated Region, 5'UTR) 中，有四組開放讀序框 (Open Reading Frame, ORF)，因位於基因上游 (upstream)，故名 uORF。經參考文獻後，發現上游啟動子調控基因表現的報導並不在少數，而 uORF 影響轉譯過程中的再起始 (re-initiation) 作用則是其中的一種 (Taisuke et al., 2005)。因此我們推測在 AtYAK1 5'UTR 中的 uORFs 也可能藉由相同的機制影響基因蛋白質的合成，也因此觀察報告基因於轉植株中的表現結果時，才沒有觀察到明顯的 GUS 基因表現。

另一方面，為了能初步驗證我們的推論是否正確，前人便將先前所選取的 2KUSE 片段(與 2.5KUSE 相異之處在於其不含有 5'UTR 序列)，接至相同的載體上，並於得到轉植株後，分析 GUS 活性的表現情形。而從結果得知，相對於 2.5KUSE，此 2KUSE 轉植株 GUS 基因的表現量非常顯著。綜合以上，我們假設：此 5'UTR 序列 (0.5 kb)，對於 AtYAK1 基因之表現可能佔有相當重要的影響地位，而這四組 uORFs 或許是關鍵！

以上的觀察，引起了極大的好奇。因此，接下來我希望能進一步以實驗去證明假設的真實性。亦即上游 5'UTR 中這四組 uORFs 是否真的會影響 AtYAK1 基因的表現。

三、研究目的：

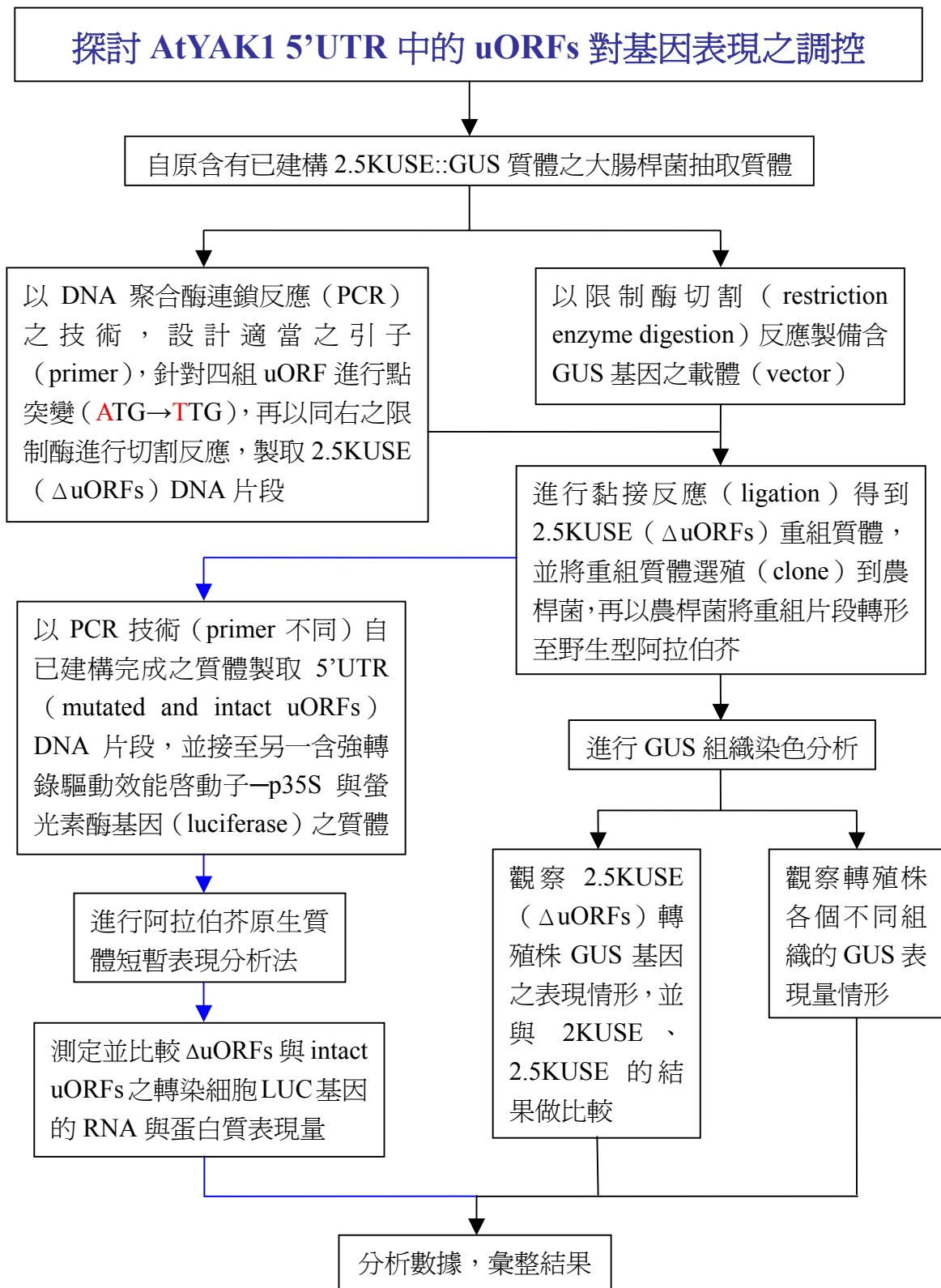
利用遺傳工程技術與基因轉殖植物分析，探討阿拉伯芥 AtYAK1 基因 5'UTR 中的四組 uORFs 是否會影響 AtYAK1 蛋白質的合成。

四、研究策略：

為瞭解 AtYAK1 的 uORFs 是否也會影響其蛋白質的合成，首先，我們以點突變的方式將四組 uORFs 中之 ATG 換成 TTG，目的為構築不含有 uORFs 之 5'UTR (Δ uORFs) 片段。同時分頭進行原生質體短暫表現分析法 (protoplast transient assay) 及 GUS 組織染色分析，並比較在植物中突變與未突變 (intact uORFs) 之 uORFs 對其 3'端報告基因蛋白質表現結果。

貳、材料與方法

一、實驗流程：



二、實驗方法

(一)、突變之 uORFs 片段的製備：點突變 (site-direct mutagenesis)

A. 【抽取 2.5KUSE::GUS/pCAMBIA1381z 重組質體】

方法參照 GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience, Cat.27-9601-02, Piscataway, NJ, USA)。

B. 【DNA 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)】

註：因為這 5'UTR 中共有 4 組 uORFs，所以便設計了 4 組 (共 8 段) 專一性引子，並針對中間 6 組引子 (圖一箭頭標示處，範圍皆含有 uORF 的 ATG) 設計了 uORF 中起始密碼子的點突變 (即在 ATG 的位置上設計成 TTG)，再按多次 PCR 技術即可做出並取得 ΔuORF 的 5'UTR 片段，此即我們所要的插入序列 (參見附圖二)；另兩段引子分別設計於 2KUSE 及 GUS 基因的序列上。

針對多次 PCR 所設計之基因專一性引子對序列如下：

(1) AtYAK1-2KUSE-S1235

5'- AGTATTATGTTGCATCACCG -3'

(2) mutated 5'-uORF1-S283

5'- TTTTATAACATTTGTTGTTGATTTTATCGATAGTTTT -3'

(3) mutated 5'-uORF2&3-S362

5'- AGGGTTTGATTGGTTGAGAATAAGGGGTTTGGGACTTGAG -3'

(4) mutated 5'-uORF4-S488

5'- TGTGTTGTGTTGGTTGTTGAGAGAGTTGGGTTTGGTC -3'

(5) mutated 5'-uORF1-AS318

5'- AAACATCGATAAAATCAACAACAATGTATAAAAAA -3'

(6) mutated 5'-uORF2&3-AS401

5'- TCAAGTCCCAAAACCCCTTATTCTCAACCAATCAAACCCTC -3'

(7) mutated 5'-uORF4-AS523

5'- ACCAAACCCAACTCTCTCAACAACCAACACACAAA -3'

(8) At5g35980-USE-Seq-AS179

5'- CACGAAATAAAGTAATCAGA -3'

(1) ~ (4) 為正向股引子 (Forward)。

(5) ~ (8) 為反向股引子 (Reverse)；紅色字為點突變之位置。

1. 第一次 PCR 反應混合液 (1 次反應) 如下：

含 intact 5'UTR 片段之質體 DNA (1 ng/μl)	5 μl
10X Pwo Buffer	5 μl
Primer-Fw (10 pmol/μl)	2.5 μl
Primer-Rv (10 pmol/μl)	2.5 μl
dNTP (10 mM each)	1 μl
Pwo polymerase (5 U/μl)	0.25 μl
補 ddH ₂ O 至總體積	50 μl

引子：產物 I →AtYAK1-2KUSE-S1235 + mutated 5'-uORF1-AS318
 產物 II →mutated 5'-uORF1-S283 + mutated 5'-uORF2&3-AS401
 產物 III →mutated 5'-uORF2&3-S362 + mutated 5'-uORF4-AS523
 產物 IV →mutated 5'-uORF4-S488 + At5g35980-USE-Seq-AS179

2. 以 T3 Thermocycler (Biometra, Geottingen, Germany) 進行 PCR 反應，設定如下：
3. 步驟一：95°C，5 分鐘；1 次循環。
4. 步驟二：94°C，30 秒；反應 I—50°C，反應 II~IV—52°C，30 秒；72°C，反應 I—1 分鐘，反應 II~IV—30 秒；35 次循環。
5. 步驟三：72°C，5 分鐘；1 次循環。
6. (反應完成後，若不立即使用，則設定於 4°C 保存。)
7. 各反應皆取 50 µl 的 PCR 產物與六分之一總體積的 6X DNA loading dye 混合均勻後，以 1% TAE 瓊脂膠體進行 DNA 電泳分析。
8. 調整電壓至 100 伏特，開始電泳。
9. 待 DNA dye 分離至約 2/3 膠片距離後，即可關掉電源。
10. 取出膠片於 UV 光下觀察並拍照，確認 PCR 產物之 DNA 片段大小是否正確。
11. 取出膠片於 UV 光 (波長 254 nm 或 365 nm) 下觀察所需 PCR 產物片段之位置，並以乾淨之刀片切下該位置之膠塊，放入 1.5 ml 微量離心管以備純化之用。
12. 以瓊脂膠體 DNA 純化的方式將各 PCR 反應之產物純化。
 方法參照 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience, Cat.27-9602-01, Piscataway, NJ, USA)。
13. 將純化後之 PCR 產物各取 1 µl 進行 1% TAE 瓊脂膠體電泳分析，以確認各純化之產物片段大小無誤，並以分光光度儀精確獲得各產物之濃度後，稀釋各產物之濃度至 5 ng/µl。
14. 第二次 PCR 反應混合液 (1 次反應) 如下：

純化後之 I、II、III、IV 產物 (5 ng/µl)	1 µl/each
10X Pwo Buffer	5 µl
Primer-Fw (10 pmol/µl)	2.5 µl
Primer-Rv (10 pmol/µl)	2.5 µl
dNTP (10 mM each)	1 µl
Pwo polymerase (5 U/µl)	0.25 µl
補 ddH ₂ O 至總體積	50 µl

引子：產物 V →AtYAK1-2KUSE-S1235 + mutated 5'-uORF2&3-AS401
 產物 VI →mutated 5'-uORF2&3-S362 + At5g35980-USE-Seq-AS179
 模版：1 µl I 產物 + 1 µl II 產物 = V
 1 µl III 產物 + 1 µl IV 產物 = VI

15. 以 T3 Thermocycler (Biometra, Geottingen, Germany) 進行 PCR 反應，設定如下：
- 步驟一：95°C，5 分鐘；1 次循環。
- 步驟二：94°C，30 秒；50°C，30 秒；72°C，70 秒；35 次循環。
- 步驟三：72°C，5 分鐘；1 次循環。

16. 將V與VI之 PCR 產物參照上述步驟 6.~14.之方式處理。

17. 第三次 PCR 反應混合液如下：

純化後之 V 與 VI 產物 (5 ng/μl)	1 μl/each
10X Pwo Buffer	5 μl
Primer-Fw (10 pmol/μl)	2.5 μl
Primer-Rv (10 pmol/μl)	2.5 μl
dNTP (10 mM each)	1 μl
Pwo polymerase (5 U/μl)	0.25 μl
補 ddH ₂ O 至總體積	50 μl

引子：產物VII→AtYAK1-2KUSE-S1235 + At5g35980-USE-Seq-AS179

模版：1 μl V產物 + 1 μl VI產物 = VII

18. 以 T3 Thermocycler (Biometra, Geottingen, Germany) 進行 PCR 反應，設定如下：

步驟一：95°C，5 分鐘；1 次循環。

步驟二：94°C，30 秒；50°C，30 秒；72°C，90 秒；35 次循環。

步驟三：72°C，5 分鐘；1 次循環。

19. 取 1 μl 的 PCR 產物進行 1 % TAE 瓊脂膠體電泳分析，以確認產物之片段大小無誤。

20. PCR 反應產物之純化。

方法參照 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience, Cat.27-9602-01, Piscataway, NJ, USA)。

21. 取 1 μl 純化之 PCR 產物進行 1 % TAE 瓊脂膠體電泳分析，以確認產物之片段大小無誤，並以分光光度儀精確獲得產物的濃度。

(二)、阿拉伯芥原生質體短暫表現分析

1.) 質體建構——p35S-intact uORF::Firefly LUC 及 p35S-ΔuORF::Firefly LUC

A. 【限制酶切割載體】

1. 限制酶切割反應混合液如下：

p35S::firefly LUC 載體 DNA (300 ng/μl)	1 μl
10X NEB Buffer 2	4 μl
Enzyme <i>Bam</i> HI (20 U/μl)	0.5 μl
Enzyme <i>Nco</i> I (10 U/μl)	1 μl
補 ddH ₂ O 至總體積	40 μl

2. 將各反應物均勻混合後，靜置於 37°C 恆溫培養箱反應 1.5 小時。

p35S::firfly LUC 載體可參見附圖九；所使用之限制酶及 10X NEB Buffer 均來自 New England Biolab (NEB, Beverly, MA, USA)。

B. 【製備插入序列】

1. DNA 聚合酶連鎖反應 (PCR) 製備—

(1) 5'UTR (intact 或 ΔuORFs) 片段

針對 5'UTR 片段專一性引子對序列如下：

(1) **uORF-Sal I -Fw** 5'- ATAGTCGACGGGGAAGCAGAAGAAGAA -3'

(2) **uORF-Nco I -Rv** 5'- AGTGCCATGGATCAGAATCAAAACAGTA -3'

(2) p35S 部份片段

針對 p35S 部份片段專一性引子對序列如下：

(1) **M13-Fw** 5'- GTAAAACgACGGCCAGT -3'

(2) **Luciferase-Rv** 5'- CTCTAGAGGATAGAATGGCG -3'

使用之限制酶切點皆註明於各引子的命名上，切點位置之核苷酸序列則以下標線表示。Fw：正向股引子，Rv：反向股引子。

2. PCR 反應混合液（1 次反應）如下：

含 intact 或 Δ uORFs 片段質體 DNA (10 ng/ μ l)	1 μ l
10X Pwo Buffer	5 μ l
Primer-Fw (10 pmol/ μ l)	2.5 μ l
Primer-Rv (10 pmol/ μ l)	2.5 μ l
dNTP (10 mM each)	1 μ l
Pwo polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l
補 ddH ₂ O 至總體積	50 μ l

3. 以 T3 Thermocycler (Biometra, Geottingen, Germany) 進行 PCR 反應，設定如下：

步驟一：95°C，5 分鐘；1 次循環。

步驟二：94°C，30 秒；50°C，30 秒；72°C，45 秒；35 次循環。

步驟三：72°C，5 分鐘；1 次循環。

（反應完成後，若不立即使用，則設定於 4°C 保存。）

4. 取 2 μ l 的 PCR 產物進行 1% TAE 瓊脂膠體電泳分析，以確認產物之片段大小無誤。

5. PCR 反應產物之純化。

方法參照 GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience, Cat.27-9602-01, Piscataway, NJ, USA)。

6. 其餘步驟如前述。

C. 【插入序列限制酶切割反應】

1. 限制酶切割反應混合液如下：

(1) 5'UTR (intact/ Δ uORFs) 片段

5'UTR (intact 或 Δ uORFs) 純化後之 PCR 產物	250 μ g
10X NEB Buffer	4 μ l
Enzyme <i>Sal</i> I (20 U/ μ l)	0.5 μ l
Enzyme <i>Nco</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
補 ddH ₂ O 至總體積	40 μ l

(2) p35S 部份片段

純化後之 PCR 產物	500 μ g
10X NEB Buffer 3	4 μ l
Enzyme <i>Sal</i> I (20 U/ μ l)	0.5 μ l

Enzyme <i>Bam</i> HI (10 U/ μ l)	1 μ l
補 ddH ₂ O 至總體積	40 μ l

2. 將各反應物均勻混合後，靜置於 37°C 恆溫培養箱反應 3 小時。

D. 【載體及插入序列 DNA 純化】

方法參照 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience, Cat.27-9602-01, Piscataway, NJ, USA)。

E. 【載體與插入序列之黏接反應 (Ligation)】

1. 於一 0.2 ml 的微量離心管中加入：適量載體 DNA、插入序列片段 (含 intact uORFs 之 5'UTR 片段及 p35S 片段)。
2. 於另一 0.2 ml 的微量離心管中加入：適量載體 DNA、插入序列片段 (含 Δ uORFs 之 5'UTR 片段及 p35S 片段)。(載體 DNA 與插入序列片段莫耳數比為 1:5)
3. 兩管分別再加入 5 μ l 的 Solution I (Takara DNA Ligation Kit, Cat.6022, Otsu-shiga, Japan), 補 ddH₂O 至總體積為 10 μ l, 均勻混合後, 於 16°C 恆溫水浴反應 45 分鐘。

2.) 大腸桿菌之重組質體轉形

1. 將完成黏接反應之質體 DNA 混合液 (10 μ l) 加入 100 μ l 大腸桿菌 (*Escherichia coli*, 品種: DH5 α) 勝任細胞液中, 並均勻混合。
2. 將細胞混合液置於冰上 30 分鐘。
3. 以 42°C 熱休克 (heat shock) 30 秒。
4. 再快速置於冰上 90 秒。
5. 加入 1 ml 之 LB 培養液, 於 37°C 恆溫培養箱以轉速 250 rpm 振盪培養 45 分鐘。
6. 以全速 (13000 rpm) 離心 1 分鐘, 倒除上清液 (約 1 ml)。
7. 以微量吸管重新懸浮細胞, 並將所有細胞混合液均勻塗抹於含有 100 μ g/ml Ampicillin 之 LB 固體培養基上。
8. 於 37°C 恆溫培養箱培養至隔夜。
9. 自隔夜培養之固體培養基上隨機挑選 6 個單一菌落, 分別塗畫於另一含有 100 μ g/ml Ampicillin 之 LB 固體培養基上, 於 37°C 恆溫培養箱培養至隔夜。
10. 抽取質體。
方法參照 GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience, Cat.27-9601-02, Piscataway, NJ, USA)。
11. 以限制酶切割確認片段大小正確後, 取其質體 DNA 約 1 μ g 及適當之引子對, 交付於中研院植微所核心實驗室代為操作核苷酸序列分析。

3.) 大量製備 p35S-5'UTR (intact or Δ uORFs) ::firefly LUC 重組質體

A. 【大量抽取 p35S-5'UTR (intact or Δ uORFs) ::firefly LUC 重組質體】

方法參照 PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit (Invitrogen, Cat.K2100-16, Carlsbad, USA)。

B. 【限制酶切割確認重組質體之正確性】

各實驗步驟參照前述。

4.) 阿拉伯芥原生質體 (Protoplast) 之抽取

1. 配置含酵素 cellulase 及 macerozyme 的溶液 10 ml (配置過程參照附錄)。
2. 於玻璃培養皿中先倒入約 2 ml 的酵素溶液，剪碎約 40 片四週大 (長約 1~2 公分) 的阿拉伯芥葉子。
3. 待葉片均勻剪碎約至 $0.2 \times 0.2 \text{ mm}^2$ 大小後，再將剩餘之酵素溶液倒入，並與葉子碎片混合均勻，抽真空 15 分鐘。
(抽取懸浮細胞原生質體時可省略步驟 2.和 3.)
4. 室溫下溫和地搖晃 (轉速 30~35 rpm) 1.5 小時，以讓酵素作用。
5. 加速轉速 70 rpm，1 分鐘，目的使原生質體自葉片中釋出。
6. 於一 50 ml 離心管內，以孔徑 100 μm 之尼龍濾膜 (nylon mesh) 過濾出原生質體。
7. 以轉速 100 g 於 4°C 下離心 2 分鐘，離心後倒除上清液。
8. 以 10 ml 的 W5 溶液溫和清洗之，以轉速 100 g 於 4°C 下離心 2 分鐘，離心後倒除上清液，再重複一次此步驟。
9. 再以 5~10 ml 的 W5 溶液重新將沉澱之細胞懸浮，冰上靜置 30 分鐘。
10. 取 8 μl 的上述細胞液，利用血球計數器 (hemocytometer) 計算原生質體之密度，以獲得原生質體總數。
11. 將原生質體於 4°C 下以 100 g 離心 2 分鐘，再以適當體積之 MMg 溶液回溶，濃度要達到 $5 \times 10^5/\text{ml}$ (換算公式：總細胞數 $\div 5 \times 10^5 =$ 回溶體積 (ml))，以備後續之轉染實驗使用。

5.) 阿拉伯芥原生質體之轉染 (transfection)

1. 使用 15 ml 離心管，(注意加入先後順序)，先加入 20 μl 質體 DNA (含 p35S-5'UTR (intact or ΔuORFs)::firefly LUC 10 μg 及 p35S:: Renilla LUC 質體 1 μg)，再加入 200 μl 原生質體 (約含有 10^5 個細胞)，最後加入 220 μl 的 40 % PEG (Polyethylene Glycol 4000) 溶液；以手指輕彈管壁至混合均勻後，於室溫下放置 5~10 分鐘。
2. 加入 800 μl 的 W5 溶液，溫和地混合後於 4°C 下以 100 g 離心 2 分鐘；重複此步驟兩次，以洗去 PEG 溶液。
3. 最後將原生質體回溶於 500 μl 的 W5 溶液中。
4. 新鮮配製 5 % 小牛血清 (Calf serum)，潤濕四孔盤後去除之 (0.5 ml/well)。
5. 每一個 well 分別加入步驟 3.之混合液後，於室溫光照下靜置培養，詳細紀錄起始時間，並收取第 16、19 及 24 小時樣品，以進行後續之 Total RNA 萃取以及雙螢光素酶分析實驗。

6.) 轉染原生質體之 RNA 萃取與分析

A. 【轉染原生質體 Total RNA 之萃取】

1. 以 65°C 水浴槽預熱 Pine-tree 萃取溶液 15 分鐘。
2. 取 500 μl 預熱之 Pine-tree 萃取溶液至 7×10^4 細胞中，並混合均勻後置入 65°C 水浴槽反應 10 分鐘。
3. 加入 500 μl Chloroform : IAA (24 : 1) 溶液，振盪混合均勻後 4°C，13000 rpm 離心 20 分鐘。

4. 取出上層液至另一乾淨 1.5 ml 微量離心管中，並加入等量體積之 Chloroform : IAA (24 : 1) 溶液振盪混合均勻後 4°C，13000 rpm 離心 20 分鐘。
5. 重覆步驟 3。
6. 於最後一次離心後，取出上層液，加入 1/4 體積之 10 M LiCl，4°C 沈澱 RNA 至隔夜。
7. 於 4°C 下以 13000 rpm 離心 30 分鐘。
8. 去除上層液，倒置離心管於拭鏡紙上，以除去殘餘之 10 M LiCl。
9. 再以 10 µl 之 DEPC-H₂O 回溶 RNA 後，以分光光度儀定量 RNA 濃度。

B. 【RT-PCR 分析製備】

1. cDNA 的合成

反轉錄反應混合液如下：

Total RNA	400 µg
oligo-dTV (A/C/G) (0.2 µg/µl)	0.125 µl
DEPC-H ₂ O	5 µl
70°C，反應10分鐘後，馬上置於冰上	
5X reverse transcriptase buffer	2 µl
0.1 M DTT	1 µl
10 mM dNTP	0.5 µl
200 U/µl reverse transcriptase II	0.375 µl
反應總體積	10 µl

42°C 反應 1 小時

2. PCR 反應混合液如下：(針對 Firefly LUC 及 Renilla LUC 基因設計專一性引子)

cDNA	1 ng
Fw- Primer (10 pmol/µl)	0.5µl
Rv- Primer (10 pmol/µl)	0.5µl
dNTP (10 mM each)	0.4µl
ST-Gold 10X Buffer	2µl
ST-Gold polymerase (5 U/µl)	0.1µl
補 ddH ₂ O 至總體積	25 µl

3. 以 T3 Thermocycler (Biometra, Geottingen, Germany) 進行 PCR 反應，設定如下：
 - 步驟一：95°C，10 分鐘；1 次循環。
 - 步驟二：94°C，45 秒；52°C，30 秒；72°C，2 分鐘；30 或 35 次循環。
 - 步驟三：72°C，10 分鐘；1 次循環。
4. 取 5 µl 體積以 1% TAE 瓊脂膠體進行 DNA 電泳分析。
5. 並以 Quantity ONE[®] quantitation 軟體 (Bio-Rad) 分析計算 Firefly LUC 與 Renilla LUC 相對量。

7.) 雙螢光素酶活性分析 (Dual-Luciferase Assay)

實驗方法參照 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay system (Promega, Madison, WI, USA)

1. 取出上述培養完之原生質體 50 µl，以 100 g 於 4°C 下離心 2 分鐘。
2. 倒除上清液，加入 100 µl 的 1X PLB 溶液 (詳見附錄)，在試管架上刮 2、3 次。
3. 放入液態氮急速冷凍後，置於室溫下回溫，再於試管架上刮 2、3 次。

4. 再放入液態氮急速冷凍後，置於室溫下回溫。
5. 於 4°C 下全速離心 30 秒，取出 20 μl 的上清液加入 100 μl 的 LAR II 試劑（螢火蟲螢光素酶的受質）。
6. 將步驟 5. 之混合液置入單管冷光分析儀（Lumat LB 9507，Berthold Techenologies，Calmbacher，Bad Widbad，Germany），偵測螢火蟲螢光素酶（firefly Luciferase）的表現值。
7. 再加入 100 μl 的 Stop & GLO 試劑。
8. 偵測水母螢光素酶（Renilla Luciferase）的表現值。
9. 分析螢火蟲螢光素酶對水母螢光素酶的比值。

（三）、GUS (β -glucuronidase) 組織染色分析

1.) 質體建構——2.5KUSE (ΔuORFs) ::GUS

A. 【限制酶切割載體】

1. 限制酶切割反應混合液如下：

2.5KUSE::GUS 質體 DNA	250 ng
10X NEB Buffer 2	5 μl
Enzyme <i>Spe</i> I (10 U/ μl)	1 μl
Enzyme <i>Bgl</i> II (10 U/ μl)	1 μl
補 ddH ₂ O 至總體積	40 μl

2. 將各反應物均勻混合後，靜置於 37°C 恆溫培養箱反應 1 小時。
2.5KUSE::GUS 質體可參見附圖十；所使用之限制酶及 10X NEB Buffer 均來自 New England Biolab (NEB, Beverly, MA, USA)。
3. 進行 1% TAE 瓊脂膠體電泳分析，步驟如前述。

B. 【限制酶切割插入序列】

1. 限制酶切割反應混合液如下：

純化之 5'UTR (ΔuORFs) 片段	250 ng
10X NEB Buffer 2	4 μl
Enzyme <i>Spe</i> I (10 U/ μl)	1 μl
Enzyme <i>Bgl</i> II (10 U/ μl)	1 μl
補 ddH ₂ O 至總體積	40 μl

2. 其餘步驟同前述。

C. 【載體與插入序列之黏接反應 (Ligation)】

於 0.2 ml 的微量離心管中加入：適量載體 DNA、插入序列片段（莫耳數比為 1:5），再加入 5 μl 的 Solution I (Takara DNA Ligation Kit, Cat.6022, Otsu-shiga, Japan)，補 ddH₂O 至總體積為 10 μl ，均勻混合後，於 16°C 恆溫水浴反應 45 分鐘。

- 2.) 大腸桿菌之重組質體轉形
實驗步驟同前述。

3.) 農桿菌之重組質體轉形

1. 於 1.5 ml 的微量離心管內，取 2.5KUSE (Δ uORFs) ::GUS 重組質體 1 μ g 加到 200 μ l 的農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*，品種：GV3101) 勝任細胞液中，並混合均勻。
2. 將細胞混合液置於冰上 30 分鐘。
3. 再置於液態氮中 1 分鐘急速冷凍。
4. 再將細胞置於 37°C 恆溫水浴中，直到細胞混合液融化 (約 1 分鐘)。
5. 加入 900 μ l 的 LB 培養液，於 28°C 恆溫培養箱內以轉速 200 rpm 振盪培養 2 小時。
6. 室溫下全速離心 30 秒，倒除上清液 (約 900 μ l)。
7. 以微量吸管重新懸浮細胞液，取此重新溶解之 100 μ l 細胞液均勻塗抹於含有 50 μ g/ml Kanamycin 及 50 μ g/ml Gentamycin 之 LB 固體培養基上。
8. 於 28°C 恆溫培養箱培養 2~3 天直至單一菌落出現。
9. 自隔夜培養之固體培養基上隨機挑選 6 個單一菌落，分別塗畫於另一含有 50 μ g/ml Kanamycin 及 50 μ g/ml Gentamycin 之 LB 固體培養基上，於 28°C 恆溫培養箱培養至隔夜。
10. 抽取質體。
方法參照 Wizard[®] PlusSV Minipreps Kit (Promega, Cat.A1340, Madison, WI, USA)。
11. 以限制酶切割反應確認重組質體之正確性。

4.) 野生型阿拉伯芥之重組質體轉形

將含有 2.5KUSE (Δ uORFs) ::GUS 重組質體之農桿菌以抽氣感染之方法送入阿拉伯芥野生株中 (此部分由中研院植微所轉殖實驗室代為操作)。

5.) 阿拉伯芥重組質體轉殖株之篩選

A. 【抗生素篩選】

1. 取適量轉殖株之 T1 種子於 1.5 ml 微量離心管中，並以 1 ml 70 % 酒精清洗 5 分鐘後，馬上將酒精去除。
2. 加入 0.5 ml 種子殺菌液，於室溫下振盪混合 15 分鐘。
3. 於無菌操作台內，以滅菌水清洗種子數次，即可播種於含 25 μ g/ml Hygromycin 的 1/2 MS 培養基上。
4. 於 4°C 黑暗預冷 4 天後，移至光照培養室生長 (L14/D10)。
5. 約經一週後，計算其抗性分離率並將存活之轉殖株移至土壤中繼續生長 (可先以保鮮膜覆蓋移出之植物二天以保濕) 以備後續之實驗。

B. 【阿拉伯芥轉殖株基因體 DNA 之萃取】

1. 將上述所得之轉殖株分別剪取一片約 14 天大之葉子置於 1.5 ml 的微量離心管中，並以液態氮急速冷凍之。
2. 以研磨杵研磨至均勻粉末。
3. 分別加入 250 μ l 的 Extraction Buffer 並均勻混合之。
4. 室溫下全速離心 10 分鐘。
5. 吸取出上清液 (越多越好) 至另一含有 250 μ l 異丙醇之 1.5 ml 微量離心管。
6. 溫和地混合均勻後，於 -20°C 靜置 30 分鐘。

7. 4°C 下全速離心 10 分鐘，倒除上清液後，於室溫下使 DNA 靜置風乾 20~30 分鐘。
8. 以 15 µl 之 0.5X TE buffer (pH 8.0) 回溶之，並靜置於冰上 15 分鐘。
9. 4°C 下全速離心 10 分鐘，再將上清液吸取至另一 1.5 ml 微量離心管，以備後續之 PCR 實驗。

C. 【DNA 聚合酶連鎖反應 (PCR)】

目的為檢測轉殖株基因體內是否含有重組質體片段。

1. PCR 反應混合液 (1 次反應) 如下：

基因體 DNA	150 ng
ST-GOLD 10X Buffer	2 µl
Primer-Fw (10 pmol/µl)	1 µl
Primer-Rv (10 pmol/µl)	1 µl
dNTP (10 mM each)	0.4 µl
ST-GOLD polymerase (5 U/µl)	0.04 µl
補 ddH ₂ O 至總體積	20 µl

所使用之基因專一性引子對如下：

- (1) **5'-T-USE-S1** 5'- ATAAATCCAATAAAAAATAATAAAATCCAgAATACA g -3'
- (2) **At5g35980-USE-Seq-AS179** 5'- CACGAAATAAAGTAATCAGA -3'

此 PCR 反應所使用之酵素及緩衝液為 SUPER-THERM GOLD DNA Polymerase、10X Reaction buffer (with 15 mM MgCl₂) (Roche, Cat.JAR-851, Mannheim, Germany)。

2. 以 T3 Thermocycler (Biometra, Geottingen, Germany) 進行 PCR 反應，設定如下：
 - 步驟一：95°C，10 分鐘；1 次循環。
 - 步驟二：94°C，45 秒；52°C，30 秒；72°C，45 秒；35 次循環。
 - 步驟三：72°C，5 分鐘；1 次循環。
 3. 取 10 µl 的 PCR 產物進行 1% TAE 瓊脂膠體電泳分析，以確定是否各轉殖株皆含有所轉形之重組質體片段。
- 6.) 阿拉伯芥轉殖株之四天大幼苗 GUS 組織染色分析
1. 現配固定液 (Fixation buffer) 及染液 (Staining buffer, 需避光)。
 2. 進行染色：
 - (1) 準備一乾淨四孔盤，每個 well 皆先加入 0.5~1 ml 固定液(以能蓋過植株為主)。
 - (2) 分別小心夾取各轉殖株 (2KUSE::GUS、2.5KUSE (intact uORFs) ::GUS 及 2.5KUSE (ΔuORFs) ::GUS) 四天大幼苗各 10 株，置入步驟 (1) 之四孔盤內。
 - (3) 抽真空 1 分鐘後，於室溫下靜置 5 分鐘。
 - (4) 移出固定液，並以 100 mM 之 Na₂HPO₄ 溶液 (pH = 7.0) 洗滌 2~3 次。
 - (5) 移出 100 mM 之 Na₂HPO₄ 溶液，加入 0.5~1 ml 染液 (需避光，以能蓋過植株為主)，室溫下抽真空 5 分鐘。
 - (6) 用鋁箔紙包覆以避光後，置於 37°C 恆溫培養箱靜置培養隔夜至 3 天。
 - (7) 移出染液，並以 50%、75%、95% 之酒精依序洗滌之，以退去染液與葉綠素。
 3. 於解剖顯微鏡下觀察並比較各轉殖株 (2KUSE::GUS、2.5KUSE (intact uORFs) ::GUS 及 2.5KUSE (ΔuORFs) ::GUS 轉殖株) 的染色結果。

參、研究結果與討論

一、AtYAK1 基因之 uORFs 對蛋白質合成之影響

(一)、阿拉伯芥原生質體短暫表現分析

為瞭解 AtYAK1 基因 5'UTR 片段中的 uORFs 是否影響其 3'端蛋白質之合成，我們參照前人做法 (Taisuke Nishimura et al., 2005)，把 AtYAK1 基因 5'UTR 片段(Δ uORFs 或 intact uORFs) 接於螢火蟲螢光酵素基因 (Luciferase, LUC) 之前，並將此兩種重組質體分別轉染至阿拉伯芥原生質體中，再藉由觀測兩者報告基因——LUC 的酵素活性 (在加入受質後，偵測螢光素酶於一定單位時間內所發出之冷光讀值) 差異，比較 intact uORFs 和 Δ uORFs 對基因表現的影響程度。另外，為確認 uORFs 對基因表現的影響在不同條件下仍有一致的趨勢，本實驗除了選定不同時間點 (第 16、19 與 24 小時) 的樣品收取外，也以阿拉伯芥葉肉細胞或懸浮細胞作為不同原生質體來源。在質體轉染並靜置培養後，我們採收培養第 16 小時光照葉肉細胞、第 19 小時及第 24 小時暗處理之懸浮細胞等不同條件之樣品，同時進行樣品中 LUC 酵素活性及 mRNA 的表現量分析。而由實驗結果 (圖四) 得知，在各個條件下， Δ uORFs 的 LUC 活性皆高於 intact uORFs (可達 4~7 倍之多)，且在 16~24 小時間，隨著培養時間的增加， Δ uORFs 和 intact uORFs LUC 酵素活性差異愈大。

此外，為瞭解造成此一趨勢並非因為 Δ uORFs 重組質體 mRNA 累積量較多所致，我們亦針對各條件樣品進行 total RNA 之抽取，並於定量後進行反轉錄作用，再以 LUC 基因上設計之專一性引子對進行 PCR 反應。在跑完瓊脂膠體電泳後，利用螢光偵測儀器進行偵測並定量以獲得各條件樣品 mRNA 的相對累積量。由實驗結果 (表一) 我們可以發現，在各個條件下， Δ uORFs 轉染細胞的 mRNA 累積量並沒有高於 intact uORFs 轉染細胞，顯示 Δ uORFs 轉染細胞的 LUC 酵素活性高於 intact uORFs 不在於基因轉錄的層級上。一合理的推測為：AtYAK1 uORFs 影響蛋白質合成可能是透過基因轉譯過程的再起始作用。

(二)、GUS 組織染色分析

同樣的，為瞭解在 AtYAK1 在植物體內被調控表現位置以及 uORFs 是否也參與在調控基因表現機制中，我們選取 AtYAK1 基因 ATG 上游 2.5K 片段 (包含 intact uORFs 或 Δ uORFs 之 5'UTR) 建構在含有 GUS (β -glucuronidase) 報告基因載體上。再以農桿菌為媒介，將 Δ uORFs 和 intact uORFs 兩重組質體轉形至野生型阿拉伯芥。以經篩選所得到之轉殖株，觀察 GUS 在植株所表現位置 (在加入受質後，給與一至三天的反應時間，若 GUS 基因有表現，我們便可自植株上以肉眼或顯微鏡觀察到有藍色的反應)，進一步推測 AtYAK1 可能具有的生理功能；另一方面，藉由 intact uORFs 和 Δ uORFs 轉殖株 GUS 表現差異情況，也可比較兩者之間對基因表現的影響程度。

本實驗是以轉殖株 T1 種子，經抗生素篩選以及基因體 DNA PCR 確認過程後，一共獲得了 18 株含重組質體的轉殖植株 (圖五)，為後續實驗進行之便，我們再針對這 18 株轉殖株進行抗生素篩選並計算其分離率 (segregation ratio, 表二及圖六)，以獲得同型合子 (homozygous) 轉殖株。而針對這些轉殖株的四天大幼苗進行了多次 GUS 染色試驗後，我們發現，相對於在 2.5KUSE (intact uORFs) 皆無法觀察到明顯的 GUS 表現，我們確實在 Δ uORFs 轉殖株觀察到 GUS 的活性，但其中只有 3 棵獨之植株 (#2、#5、#13) 的表現較為顯著，推測或許這與重

組質體的嵌入數目 (insertion number) 不同有關，但此因素並不影響 Δ uORFs 轉殖株的 GUS 表現大於 intact uORFs 轉殖株的趨勢。爲了更進一步比較，我們同時將 3 種 GUS 轉殖株 (2.5KUSE 含 intact uORFs 或 Δ uORFs、2KUSE，此轉殖株不含 5'UTR) 的四天大幼苗進行 GUS 染色分析。由實驗結果(圖七)得知 Δ uORFs 轉殖株皆有 GUS 表現，因此我們認爲 uORFs 確實是會影響其 3'端蛋白質的合成。而 2KUSE GUS 表現又比 intact uORFs 來得強，這或許也顯示在 5'UTR 片段中另外還存在除了 uORFs 外，可調控蛋白質表現之機制。

二、AtYAK1 基因功能之推測

AtYAK 是目前唯一在植物體內發現的 DYRK 蛋白激酶，但相較於其同源蛋白在其他真核生物之生化和生理功能已被廣泛研究，AtYAK1 在植物中的生理功能卻仍尚未被明確地報導過。但儘管如此，我們在參考許多文獻後發現，DYRK 皆參予並調節了細胞的生長與發育，因此，我們亦可推測：AtYAK1 與阿拉伯芥生長發育的調控有關。而從 GUS 組織染色分析實驗結果中(圖七)我們發現，在四天大幼苗中，GUS 活性主要表現在下胚軸、葉部與根部維管束，且在高倍顯微鏡下亦可在葉部保衛細胞觀察到 GUS 的表現，因此，或許 AtYAK1 與下胚軸的延長、維管束的生長發育有關，亦可能參與調控氣孔的開闔，而這些仍皆須進一步的實驗來證實。

三、阿拉伯芥內生調控 AtYAK1 機制之推測

在原生質體短暫表現分析結果顯示(圖四)，uORFs 的確會影響其下游基因轉譯過程的再起始作用；然而，在 mRNA 的累積量上，我們原先預期 intact uORFs 與 Δ uORFs 兩者應該差異不大，但我們卻意外的發現，在 mRNA 的累積量方面反而是 intact uORFs 較 Δ uORFs 還要來得多(表一)。對此我們推測：這當中或許還有其他不同的作用機制調控 uORFs，以致於當我們將這四組 uORFs 給突變掉之後，不僅影響了其轉譯過程的效率，可能也連帶影響了在植物細胞內對 AtYAK1 mRNA 累積量的調控「內建程式」，進而影響 AtYAK1 蛋白質的表現。這也表示植物體中是具有調節 AtYAK1 蛋白質表現量的多寡的內生機制。

而從 GUS 組織染色分析實驗結果中(圖七)，我們也發現 Δ uORFs 轉殖株的 GUS 表現量並沒有像 2KUSE 轉殖株一樣強，對此我們推測：除了因爲 2.5KUSE (Δ uORFs) 仍然比 2KUSE 多了一段長約 0.5 kb 的 5'UTR，以致影響其轉譯效率外，或許在 AtYAK1 的 5'UTR 中還有其他不同於 uORFs 的調控機制，因此少了 5'UTR 的 2KUSE 轉殖株才因此不受這些機制調控，因此 GUS 活性的表現才比 Δ uORFs 轉殖株還要來得強許多。而以上這些推論皆須進一步的實驗與分析才能加以證實。

此外，爲瞭解阿拉伯芥中共有多少基因含有 uORFs，以及他們的功能是否具有共通性，首先我便利用電腦軟體「Perl」撰寫了一個簡單的程式，再利用此程式對阿拉伯芥的所有基因進行分析。結果發現，在 26000 多個基因中，共有 16840 個基因具有 5'UTR，而當中的 4770 個基因是具有 1 個至多個的 uORFs，由此可知 uORFs 在阿拉伯芥基因體中具有滿高的普遍性 ($4770 / 16840 = 28.3\%$)。接著我們利用網路資料庫 TAIR (The Arabidopsis Information Resource) 對這些基因進行分子功能性分析，即我們分別計算出在 16840 個基因與 4770 個基因中各分子功能類別所含的基因數後，將後者除以前者，可得各類別總基因中含有 uORFs 的比例，再以 $4770 / 16840 = 28.3\%$ 爲基準數，將各類別的比例除以基準數，即可得在各類別中含有 uORFs 的基因數的相對倍率。而由分析結果(表三及圖八)可發現，在分子功能爲磷酸

激酶活性 (kinase activity) 的類別中，含有 uORFs 的基因比例較其他類目還要來得高，而本實驗研究的 AtYAK1 即為其中一例；此外，在分子功能為結構性分子活性 (structural molecule activity) 的類別中，含有 uORFs 的基因比例則是最低的。我們認為，或許由於屬於 structural molecule activity 的基因是普遍在各細胞中皆有表現的，所以並不需要此一特別的調控機制來調節該類基因的表現，但相反的，磷酸激酶在植物體內參與了許多不同訊息的傳遞機制，因此必須藉由像是 uORFs 或其他因子來調控他們的表現。

肆、未來展望

在本報告中，我們提到 AtYAK1 基因 5'UTR 的 uORFs 確實會影響其 3'端蛋白質的表現。由於在 2.5KUSE (Δ uORFs) GUS 組織染色分析方面，我們只選取四天大的轉殖株幼苗進行染色比較，從結果知在下胚軸、維管束以及葉部保衛細胞皆有 GUS 活性的表現，顯示在正常環境中 AtYAK1 在這些部位中是被嚴格調控的。然而，在 2.5KUSE (intact uORFs) 轉殖株中，目前仍未觀察到 GUS 表現情形。因此，未來我們可以進一步針對 2.5KUSE (intact uORFs) 不同生長天數的轉殖株，或者是成熟植株的不同組織部位（如：花、果莢等）再進行 GUS 染色分析，並與 2.5KUSE (Δ uORFs) 比較結果，以瞭解在野生型植物中，AtYAK1 主要表現於何時，以及何處，是否在恰當生長環境（亦或者是逆境下）與植物週期中，會誘導某種幫助轉錄再起使作用的蛋白質活化，進而幫助 AtYAK1 蛋白質的表現。藉由此也進一步推測出 AtYAK1 在植物中所可能扮演的生理功能以及其生態角色。

另外，在對阿拉伯芥的基因體進行分析這方面，從初步結果我們得知，在分子功能為磷酸激酶活性（kinase activity）的類別中，含有 uORF 的基因比例較其他類目還要來得高，而本實驗的 AtYAK1 即為一磷酸激酶，因此接下來，我們不妨可將其中一些已知會被本身 5'UTR 中的 uORFs 調控基因表現的 5'UTR 序列與 AtYAK1 作比較，另一方面，也可將 AtYAK1 5'UTR 的序列與其同源基因（homologous）進行比較，尋找其中可能的普遍相似序列，而這一部分我們也已開始著手進行搜尋與分析，或許我們能藉此而發現調控此類基因的最終「幕後藏鏡人」呢！

伍、參考文獻

一、中文文獻：

1. Neil A. Campbell原著，李家維、徐歷鵬、崔文慧、張立雪、黃璧祈、葉開溫、鍾楊聰等人編譯。CAMPBELL 生物學（四版，上冊），第三單元—基因。台灣，台北：偉明圖書。2002年。
2. David P. Clark and Lonnie D. Russell原著，朱雲瑋、蔡淳淳、曾慶宗、胡虞國等人編譯。分子生物學—輕輕鬆鬆學分生(Molecular Biology—made simple and fun)（二版），第3章、第6~9章、第11章、第15~17章、第23章。台灣，台北：藝軒圖書。2003年。

二、英文文獻：

1. Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., Oset, M., Gonzalez, J.R., Florez, J., Fillat, C., and Estivill, X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1915-1923.
2. Becker, W., and Joost, H.G. (1999). Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 1-17.
3. Campbell, L.E., and Proud, C.G. (2002). Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS Lett* **510**, 31-36.
4. Himpel, S., Panzer, P., Eirnbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L.C., Blundell, T., Kentrup, H., Grotzinger, J., Joost, H.G., and Becker, W. (2001). Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem J* **359**, 497-505.
5. Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schürmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., and Joost, H.G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* **271**, 3488-3495.
6. Lochhead, P.A., Sibbet, G., Kinstrie, R., Cleghon, T., Rylatt, M., Morrison, D.K., and Cleghon, V. (2003). dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase in *Drosophila*. *Biochem J* **374**, 381-391.
7. Leder, S., Czajkowska, H., Maenz, B., De Graaf, K., Barthel, A., Joost, H.G., and Becker, W. (2003). Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties. *Biochem J* **372**, 881-888.
8. Li, K., Zhao, S., Karur, V., and Wojchowski, D.M. (2002). DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival. *J Biol Chem* **277**, 47052-47060.
9. Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M., and Sakai, A. (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev* **15**, 1217-1228.

10. **Skurat, A.V., and Dietrich, A.D.** (2004) . Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J Biol Chem* **279**, 2490-2498.
11. **Souza, G., Lu, S., and Kuspa, A.** (1998) . YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in Dictyostelium. *Development* **125**, 2291-2302.
12. **Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., and Pongs, O.** (1995) . minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron* **14**, 287-301.
13. **Taisuke, N., Takuji, W., Kotaro, T.Y., and Kiyotaka, O.** (2005) . The *Arabidopsis* STV1 protein, responsible for translation reinitiation, is required for auxin-mediated gynoecium patterning. *The Plant Cell* **17**, 2940-2953.
14. **von Groote-Bidlingmaier, F., Schmoll, D., Orth, H.M., Joost, H.G., Becker, W., and Barthel, A.** (2003) . DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a) -dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 764-769.

陸、附錄

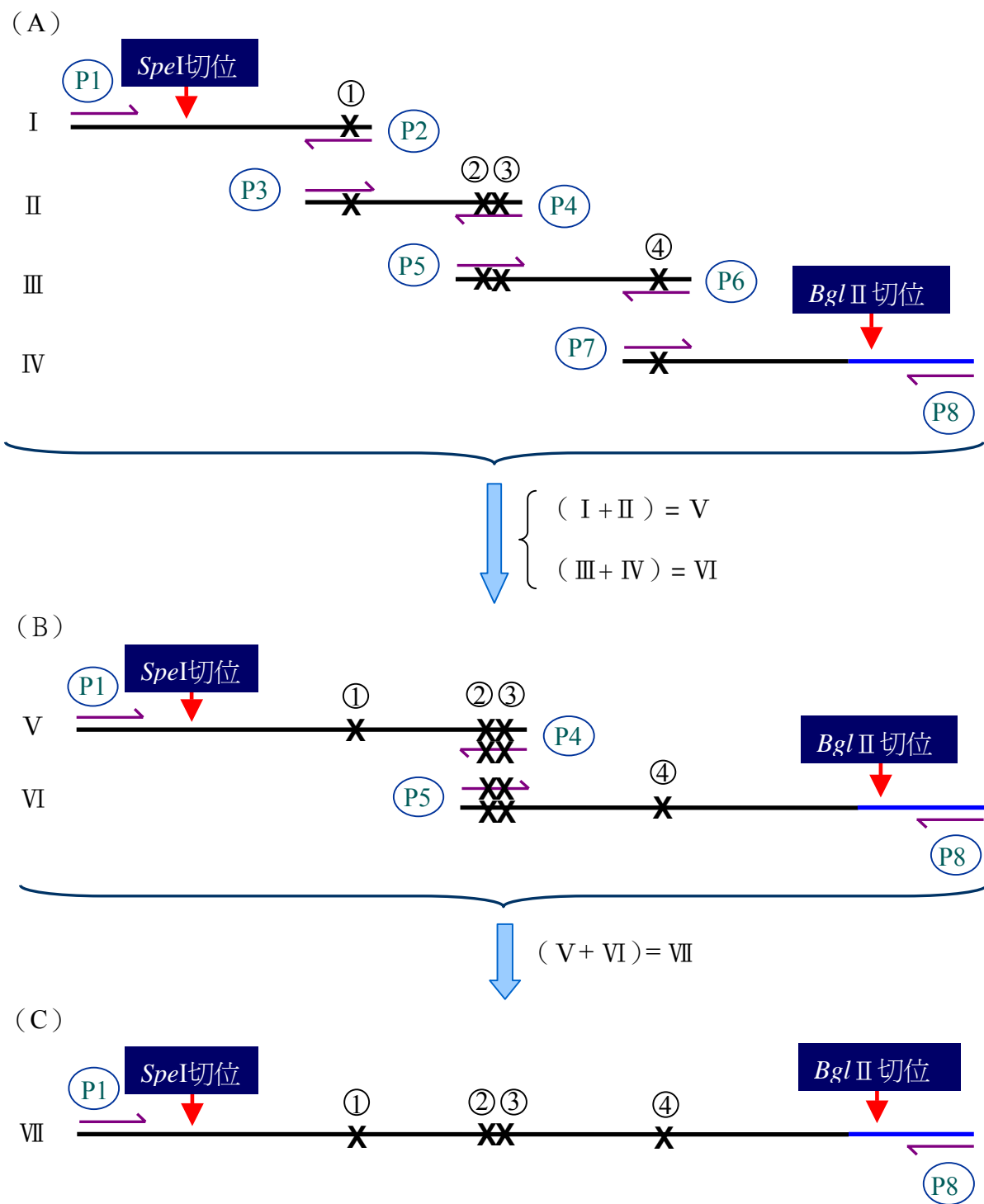
一、附圖

5'-

aaaaatagaagcaacatctgttttaaaaacacattgcttcaaataataggaaagtacaaaatattagatttaactaaagatattttaatta
atataaaaagatatttgattatatgataataaatccaataaaaaataataaaatccagaatacagaaaaaattgcaaga**ggggaagcag**
aagaagaaagaacaaaaatcaggagttggcattttgaagacgaaactcatcatcttcttctcagacaacaaaaaagcttttcattt
ctctccaccctctctctctctctctgaaagtctctctcttggcgtggttagccttctctacacttggggctgcgattctccaatcctcgatt
tcaatttcactctcaatcatagttgaaatcatcgagctttacggtgctgttggtgttgacgccgtaaaatcgatcctttttatacatatgt
tgtgattttatcgatagttttgagatcgatttttagggttcgagttggcgtgacttgagggttgattggatgagaataaggggttat
gggacttgagtcaattgggtttgtctccctaatcatcgcaaatcctgatttctcagctcttggaaaggaattaggattcgttgatttcgagttt
tgtgtgtgtgggtgatgagagagttgggtttggtcaattgaggggttaggtgtgtttactgtttgattctgacATGGATGAC
ATTGATTCAAGCGATGGTGCCTGCGGCTGCACGAGCTGGTGAGATTGGCTCTATTG
GGGTATCCACACCGTGGAAGCCAATTCAGCTGGTTTTTAAGCGTTATTTGCCACA
AAATGGGTCTGCTAGCAAAGTTCATGTTGCCGTGAAGAAGCCG -3'

圖一 | AtYAK1 5'UTR 與 uORFs 之詳細序列。

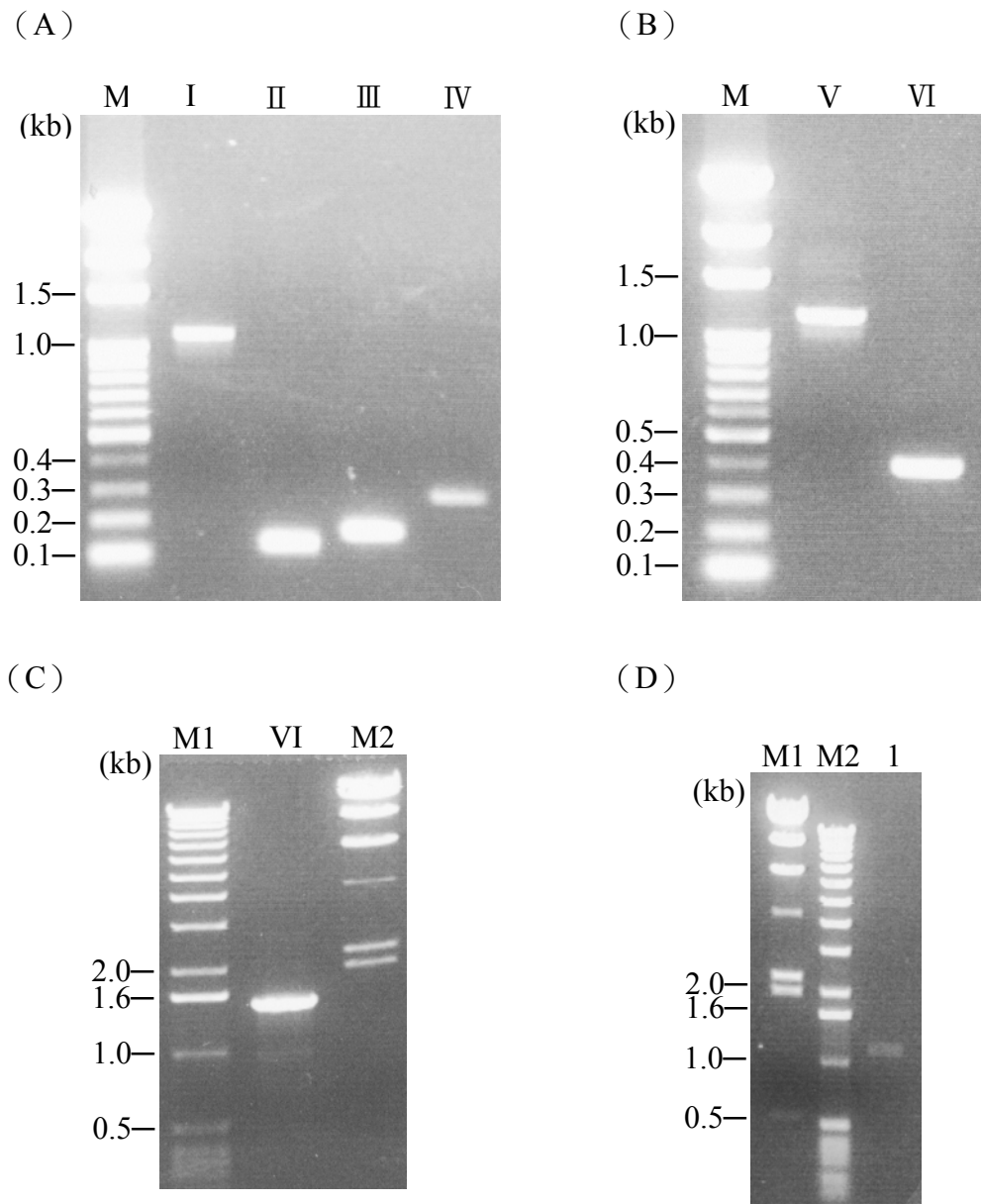
在此序列圖中，黑色：2KUSE 之末端部分序列；紅色灰底：5'UTR 之序列，其中畫底線處表 uORF 之部分，以 **atg** 為始共有 4 組，中間兩組有重疊；黃色：AtYAK1 之前端部份基因序列，以 **ATG** 為始。黑色箭頭標示為引子設計序列。



圖二 | Δ uORFs 片段之建構步驟圖示。

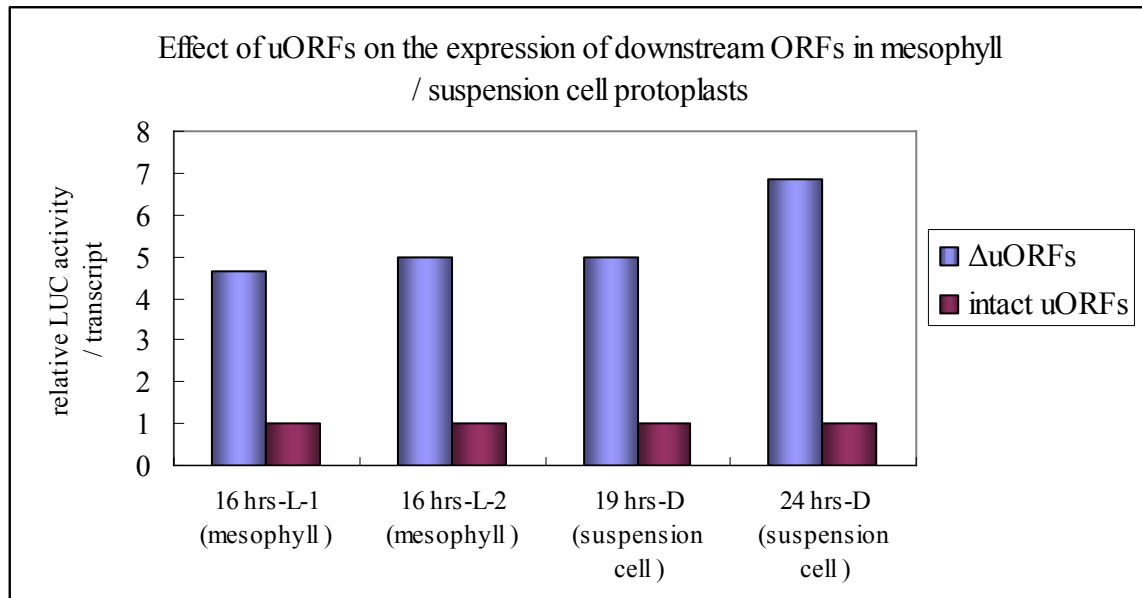
我們利用多次 DNA 聚合酶連鎖反應 (PCR) 之技術將 uORFs 以點突變的方式給除去。

①②③④ 與 X 表示點突變之位置 (ATG \rightarrow TTG); P \rightarrow 表示所設計之專一性引子; I ~ VII 表示各 PCR 步驟所放大出來的片段。黑線與藍線表示 DNA 模版股, 其中黑線為 2.5KUSE 之後段部分, 藍線為 *gusA* 基因之前段部份。(註: 本圖各片段大小並未依實際比例繪製)



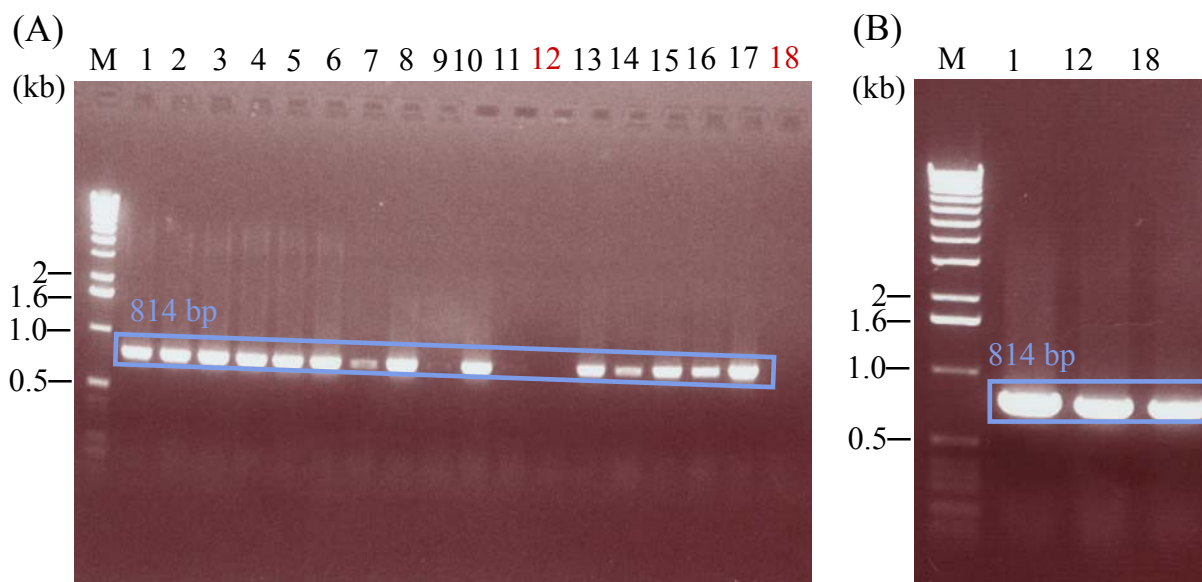
圖三 | 多次 DNA 聚合酶連鎖反應 (PCR) 各階段電泳分析圖。

(A) 第一次PCR反應產物經純化後之電泳分析圖，M表示100 bp marker，I、II、III、IV 片段大小依序為1083 bp、118 bp、161 bp、274 bp。(B) 第二次PCR反應產物經純化後之電泳分析圖，M表示100 bp marker，V、VI之片段大小依序為1164 bp、398 bp。(C) 第三次PCR反應產物經純化後之電泳分析圖，M1及M2分別表示1 kb及λHindIII marker，VII之片段大小為1521 bp。(D) 第三次PCR反應產物經限制酶切割後之電泳分析圖，M1及M2分別表示1 kb及λHindIII marker，條帶1之片段大小為1184 bp。由以上結果顯示各階段之片段大小皆正確無誤。



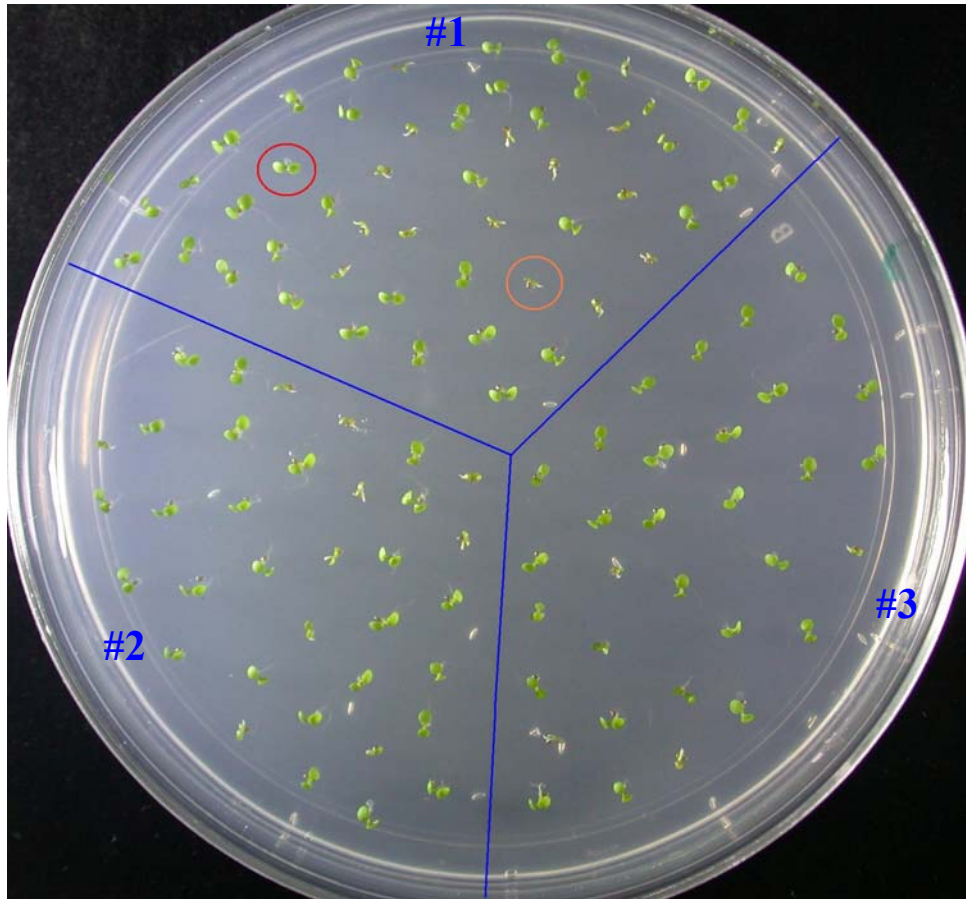
圖四 | 比較 Δ uORFs 和 intact uORFs 對報告基因 LUC 蛋白質合成之影響。

此為原生質體短暫表現分析實驗中，轉染 Δ uORFs 或 intact uORFs 重組質體 16~24 小時後，每單位轉錄本的相對冷光酵素活性分析之柱狀圖示。由此結果知， Δ uORFs 轉染細胞的螢光素酶活性在各條件下皆高於 intact uORFs 轉染細胞（可達 4~7 倍之多），且在 16~24 小時之間，每單位轉錄本的 LUC 活性和時間是呈現正相關的關係。所以 AtYAK1 5'UTR 的 uORFs 確實是會影響其 3'端蛋白質的合成。（此結果之數據詳見表一）



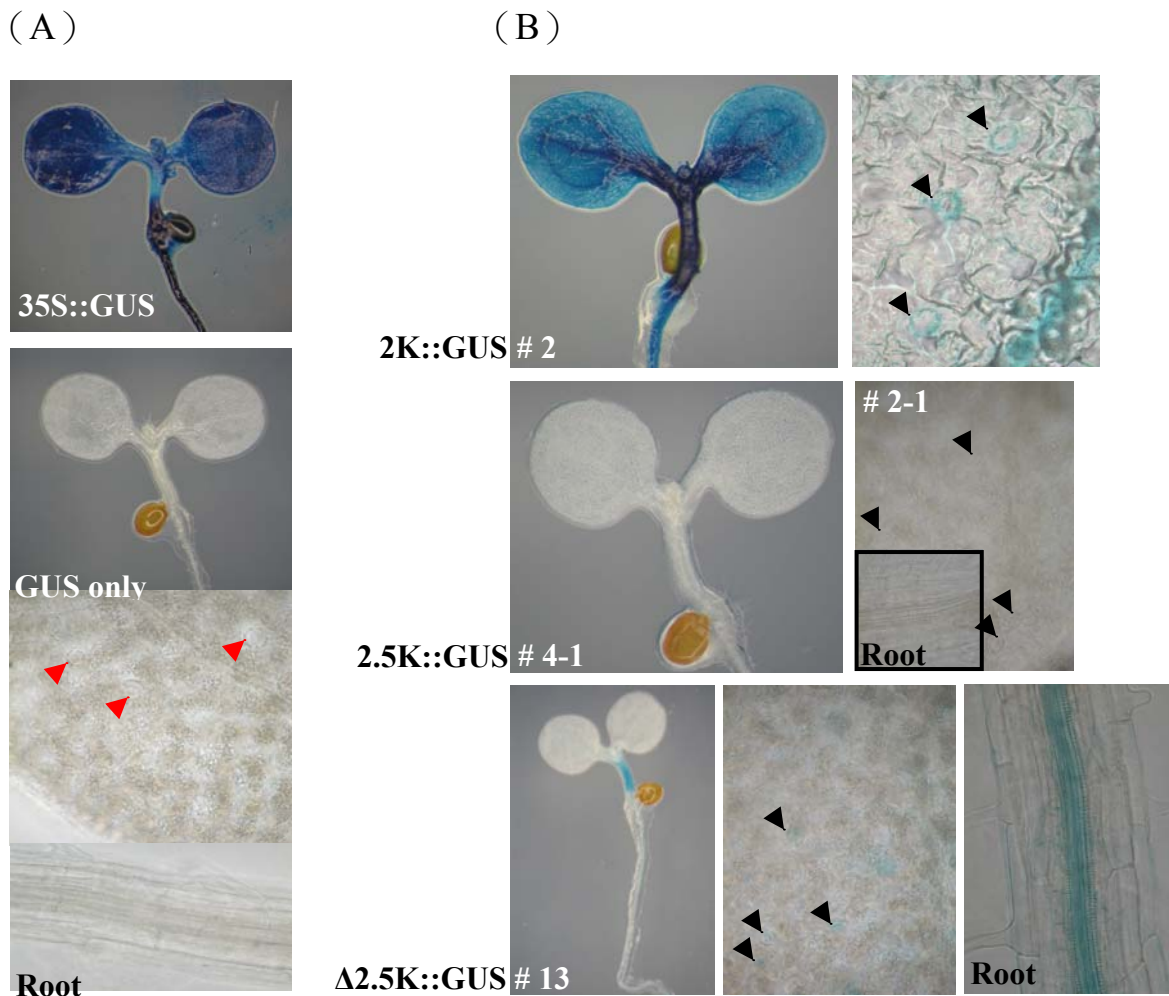
圖五 | 18 株 T1 轉殖株之基因體 DNA 經 PCR 反應後之電泳圖。

將自轉殖室所獲得的轉殖株 T1 種子經抗生素篩選後，抽取 18 株存活轉殖株之葉部基因體 DNA 並進行 PCR 反應，將產物進行電泳分析後，結果如圖。(A) M 表示 1 kb marker，1~18 表示編號#1 ~ #18 之 T1 獨立轉殖株。藍色框框所圈選之條帶表示經專一性引子對（見材料與方法）所放大之正確 DNA 片段，但其中編號#12 與#18 的 DNA 片段並沒有被成功放大。(B) 爲了再次確認#12 與#18 T1 轉殖株之基因體是否具有我們所建構的重组質體，便取#1 與#12 和#18 一起再一次進行 PCR 反應，由結果得知#12 與#18 的 DNA 片段確實會被放大。以上結果得知我們共獲得了 18 株獨立轉殖株。



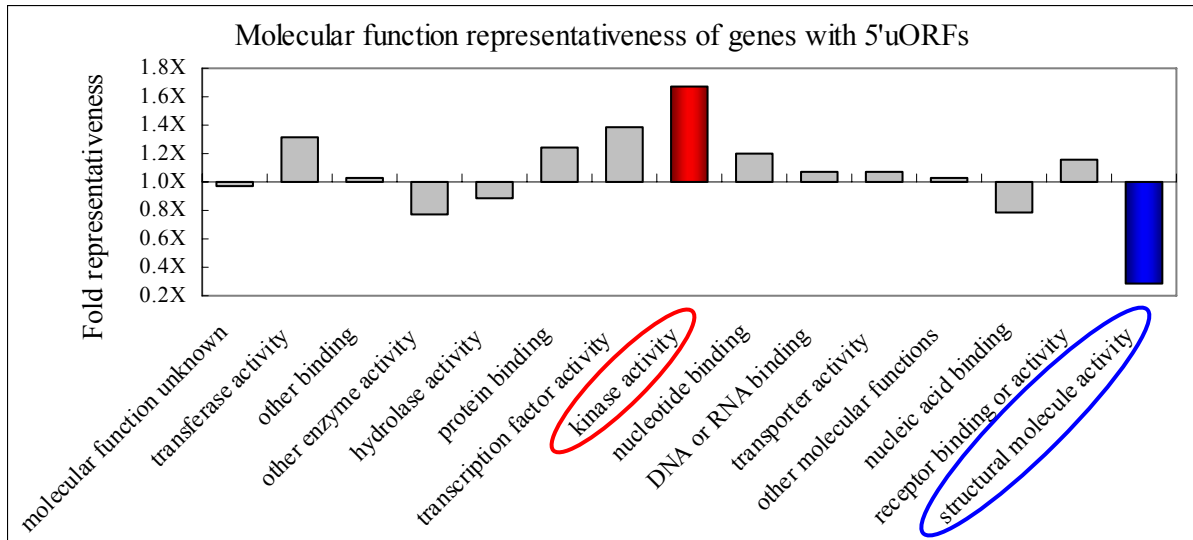
圖六 | 圖示 T2 子代轉殖株四天大幼苗之同型合子篩選過程。

為後續實驗之進行，我們對編號#1~ #18 獨立轉殖株之 T2 子代進行抗生素篩選，一方面將具有抗性之轉殖株進行 GUS 組織染色實驗，另一方面以期能從中獲得同型合子。此圖為#1、#2、#3 之 T2 子代於含有 25 µg/ml Hygromycin 1/2 MS 固體培養基上生長四天之情形。紅色圓圈所圈選的植株代表生長正常（可抗抗生素）的幼苗狀況，表示其帶有我們所轉形之重組質體 DNA；相對的，橙色圓圈所圈選的植株則代表無法正常生長的幼苗狀況，表示其不含有重組質體 DNA。



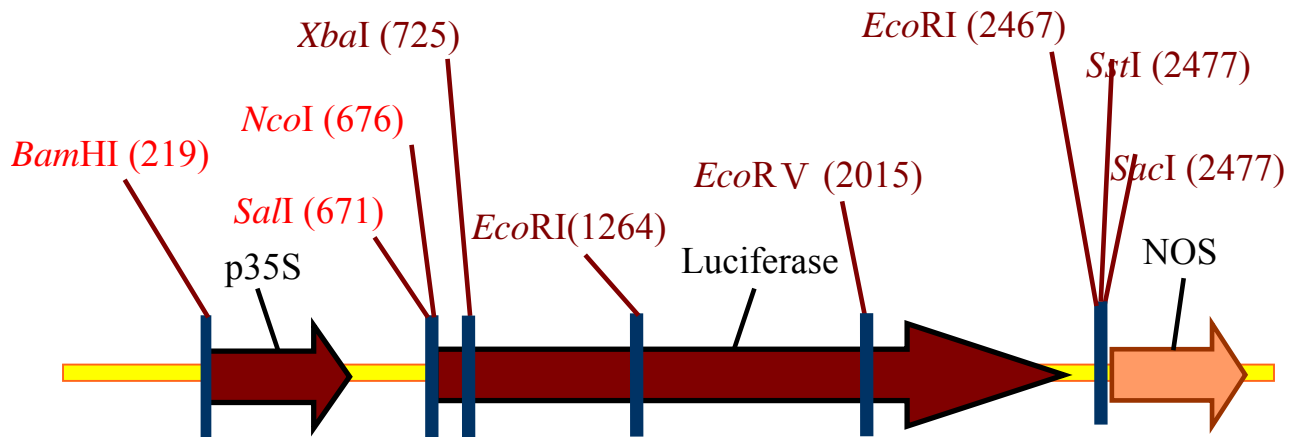
圖七 | 各轉殖株四天大幼苗之 GUS 組織染色分析結果。

(A) 上、下分別為正控制組和負控制組的四天大幼苗染色結果。(B) 為了進一步比較，我們同時將三種 GUS 轉殖株之四天大幼苗一起進行 GUS 染色實驗，上、中、下分別為 2KUSE 轉殖株（不含有 5'UTR 片段）、2.5KUSE (intact uORFs) 轉殖株及 2.5KUSE (Δ uORFs) 轉殖株。而由圖中可看出，2KUSE 以及 2.5KUSE (Δ uORFs) 轉殖株在葉脈、下胚軸及根部皆有 GUS 表現，且在下胚軸表現量較高；反之，2.5KUSE (intact uORFs) 轉殖株則無法觀察到任何 GUS 表現。此外，在高倍顯微鏡下，2KUSE 以及 2.5KUSE (Δ uORFs) 的保衛細胞（箭頭所指處）亦可觀察到有染色現象。由此結果我們再一次驗證了 AtYAK1 5'UTR 中的 uORFs 確實會影響其 3'端蛋白質的表現，且 AtYAK1 可能與下胚軸的延長、維管束的生長發育有關，亦可能參與調控氣孔的開闔。



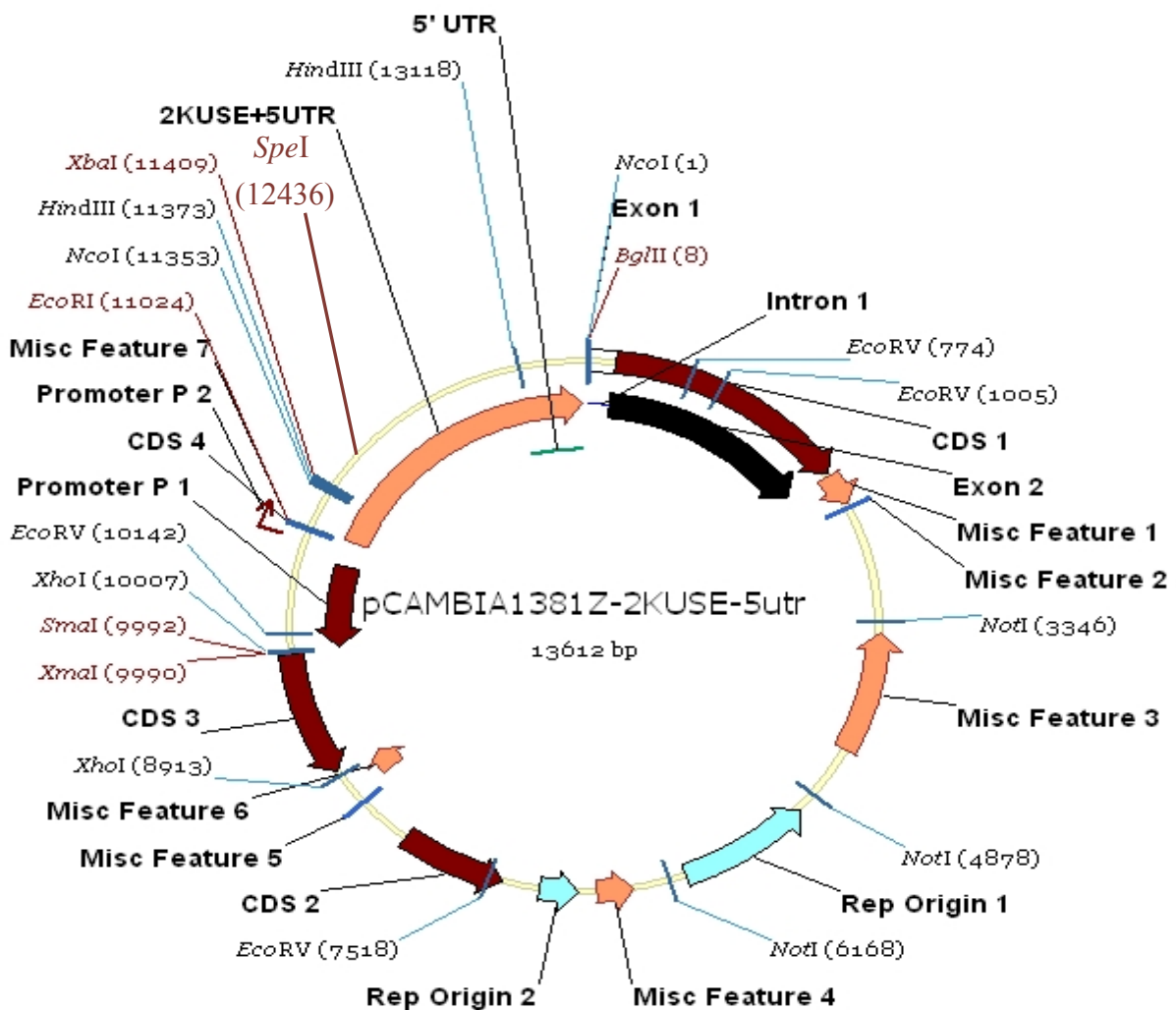
圖八 | 阿拉伯芥基因體之 5'UTR 序列分析圖。

我們以 $4770 / 16840 = 28.3\%$ 為基準數，再將表三第四行各類別之數值除此基準數後，即可得在各類別中含有 uORFs 的基因數比率對基準數的相對倍率。而由此圖我們可以發現，在分子功能是磷酸激酶活性的類別中（紅圈），含有 uORFs 的基因數的相對倍率較其他類目還要來得高；另外，在分子功能是結構性分子活性的類別中，含有 uORFs 的基因數的相對倍率則皆是最底的。對此我們認為，由於結構性分子的基因是普遍在各細胞中表現的，因此並不需要此種特別的調控機制來調節該類基因的表現，但相反的，磷酸激酶在植物體內可能因為參與了許多不同訊息的傳遞機制，因此必須藉由像是 uORFs 或其他因子來調控他們的表現。



圖九 | 原生質體短暫表現分析所用之 pJD301 質體。

此質體含有一強轉錄驅動效能啓動子—p35S，以及螢光素酶基因 Luciferase（來源有螢火蟲或水母兩種）作為報告基因。其中 *Bam*HI、*Sal*II 以及 *Nco*I 為本實驗所使用之切位。



圖十 | GUS 組織染色分析實驗所用之 pCAMBIA1381z 質體。

此質體圖尾端已接上我們的 2.5KUSE (intact uORFs) 序列圖示。此質體具有 *gusA* 基因作為組織染色之報告基因，且若在植物體中可表現抗 hygromycin 的基因 (*hpt II*)；若在細菌中則可表現抗 kanamycin 的基因，供操作者進行篩選之用。此質體亦具有多種不同的限制酶切割供操作者選擇使用，而其中的 *Spe I* 及 *Bgl II* 切位為本實驗使用之切位。

二、附表

表一 | 原生質體短暫表現分析中，各樣品結果的相對計算值。

		LUC activity	mRNA accumulation	LUC activity / transcript
16 th hrs-1	ΔuORFs	2.623979	0.564253	4.650357
	intact uORFs	1	1	1
16 th hrs-2	ΔuORFs	3.471949	0.696695	4.983457
	intact uORFs	1	1	1
19 th hrs-D	ΔuORFs	3.106617	0.624292	4.976227
	intact uORFs	1	1	1
24 th hrs-D	ΔuORFs	4.240068	0.620244	6.836129
	intact uORFs	1	1	1

註：第三行為各條件下，ΔuORFs 與 intact uORFs 轉染細胞的螢光素酶相對活性大小比值；第四行則為各條件下，兩種轉染細胞的報告基因 mRNA 相對累積量的比值；第五行則是將第三行的相對值除以第四行的相對值後，所得之各條件下，兩種轉染細胞每單位轉錄本的相對螢光素酶活性大小比值。

表二 | 18 株 Δ uORFs 獨立轉殖株之 T2 子代抗生素篩選結果與其分離率。

	Total (T)	Not germ. (NG)	Not Resis. (NR)	Seedling rate	Resistant rate (R)
mutated uORFs #1	51	0	18	100 %	64.7 %
mutated uORFs #2	35	0	10	100 %	71.4 %
mutated uORFs #3	33	0	7	100 %	78.8 %
mutated uORFs #4	35	0	2	100 %	94.3 %
mutated uORFs #5	40	1	4	97.5 %	89.7 %
mutated uORFs #6	30	0	12	100 %	60.0 %
mutated uORFs #7	58	1	19	98.3 %	66.7 %
mutated uORFs #8	31	0	8	100 %	74.2 %
mutated uORFs #9	61	1	20	98.4 %	66.7 %
mutated uORFs #10	49	0	44	100 %	10.2 %
mutated uORFs #11	44	0	37	100 %	15.9 %
mutated uORFs #12	60	0	40	100 %	33.3 %
mutated uORFs #13	56	0	19	100 %	66.1 %
mutated uORFs #14	38	2	10	94.7 %	72.2 %
mutated uORFs #15	58	0	8	100 %	86.2 %
mutated uORFs #16	64	0	19	100 %	70.3 %
mutated uORFs #17	42	0	6	100 %	85.7 %
mutated uORFs #18	44	0	9	100 %	79.5 %

註：為後續實驗之進行，我們對編號#1~ #18 獨立轉殖株之 T2 子代進行抗生素篩選，表第二行分別為 18 株 T1 轉殖成株 1 個果莢內所含之 T2 種子播種數 (T)；第三行為未發芽的種子數 (NG)；第四行為發芽後無法正常生長的幼苗數 (即無法抗抗生素；NR)；第五行為 T2 種子的發芽率；第六行是依照 $[(T) - (NG) - (NR)] / (T) \times 100\%$ 的算法所得之可抗抗生素的幼苗比率 (若簡單的以重組質體之嵌入數目為 1 來計算，T2 子代的分離率若為 100 %，則代表其 T1 代為同型合子)，而由此結果可知，大部分 T2 的分離率皆可達 65 % 以上，(#10、#11、#12 可能是因為嵌入數目不一所以分離率較低，而 #4 分離率接近 100 %，顯示我們在 T3 子代時得到同型合子的機率非常高)，所以對各編號我們便再自培養皿中移出 5 株可正常生長之幼苗至土壤中，使其繼續成長，並再一次針對這些 T2 轉殖株的 T3 種子進行抗生素的篩選，以期能獲得為同型合子的轉殖株。

表三 | 阿拉伯芥基因體之 5'UTR 序列分析結果。

Molecular Function	含有 5'UTR 的 基因數	含有 uORFs 的 基因數	含有 uORFs 的基 因數比率
molecular function unknown	5239	1439	27.47 %
transferase activity	1696	631	37.21 %
other binding	1649	480	29.11 %
other enzyme activity	2173	475	21.86 %
hydrolase activity	1731	432	24.96 %
protein binding	1219	431	35.36 %
transcription factor activity	1103	431	39.08 %
kinase activity	863	407	47.16 %
nucleotide binding	1170	400	34.19 %
DNA or RNA binding	1222	371	30.36 %
transporter activity	870	263	30.23 %
other molecular functions	778	227	29.18 %
nucleic acid binding	549	123	22.40 %
receptor binding or activity	113	37	32.74 %
structural molecule activity	398	33	8.29 %

註：為瞭解阿拉伯芥基因體中，有多少基因具有 5'UTR，以及其中又有多少基因具有 uORFs，我便利用電腦軟體「Perl」撰寫一簡單程式，對阿拉伯芥所有基因進行分析。結果共有 16840 個基因具有 5'UTR，而這些基因之中又有 4770 個基因具有一個至多個的 uORFs。接著我們利用網路資料庫 tair 對這些基因進行分子功能性分析。本表第一行為阿拉伯芥基因之分子功能類目；第二行為 16840 個基因中，分別具有各類目所對應之分子功能的基因數；第三行為 4770 個基因中，分別具有各類目所對應之分子功能的基因數；第四行之值為第三行的基因數除以第二行的基因數後的百分比，即各類目所有具有 5'UTR 的基因中，是含有 uORFs 的基因的比率。其中我們可以發現，在分子功能是磷酸激酶活性的類別中（紅色處），含有 uORFs 的基因的比率較其他類目還要來得高；另外，在分子功能是結構性分子活性的類別中（藍色處），含有 uORFs 的基因數及比率則皆是最低的。

三、實驗材料配方

【質體建構】

1X TAE buffer (1 L)

Stock reagent	Amount
50X TAE buffer	20 ml
補 ddH ₂ O 至總體積	1 L

50X TAE buffer (BDH, Cat.444152D, 默克, 台北, 台灣)

1 % TAE 瓊脂膠體 (20 ml)

Stock reagent	Amount
Agarose	0.2 g
1X TAE buffer	20 ml

將秤取好的 agarose 粉末 (Seakem LE agarose, cat.500004, Maine, USA), 倒入 20 ml 1X TAE buffer, 以微波爐加熱至 agarose 完全溶解。待降溫後, 再加入 0.8 μ l 10 mg/ml EtBr, 倒入鑄模槽 (short mini horizontal gel electrophoresis system, MAJOR SCIENCE Inc., 紫外光, 台北, 台灣) 至其完全凝結。

LB 培養液/固體培養基 (250 ml)

Stock reagent	Amount
LB broth mixture	5 g
Agar	5 g
補 ddH ₂ O 至總體積	250 ml

LB broth mixture (Amersham Life Science, USB, Cat.140058, Cleveland, Ohio, USA)。
若為 LB 培養液, 則不需添加 agar。

【阿拉伯芥原生質體之萃取】

Enzyme buffer (10 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
Cellulase R10	1 %	0.1 g
Mecerozyme R10	0.25 %	250 mg
0.8 M Mannitol	400 mM	5 ml
0.2 M KCl	20 mM	1 ml
0.1 M MES, pH5.7	20 mM	2 ml
55°C 水浴加熱 10 分鐘後, 放置室溫冷卻, 再加入:		
1 M CaCl ₂	10 mM	100 μ l
β -ME	5 mM	3.8 μ l

1 % BSA	0.1 %	1 ml
補 ddH ₂ O 至總體積		10 ml

W5 Solution (200 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
3 M KCl	154 mM	10.3 ml
1 M CaCl ₂	125 mM	25 ml
0.2 M KCl	5 mM	5 ml
0.1 M MES , pH7.5	2 mM	4 ml
0.1 M glucose	5 mM	10 ml
補 ddH ₂ O 至總體積		200 ml

MMg Solution (200 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
0.8 M KCl	400 mM	100 ml
1 M MgCl ₂	15 mM	3 ml
0.1 M MES , pH7.5	4 mM	8 ml
補 ddH ₂ O 至總體積		200 ml

40 % PEG Solution (g/v) (10 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
PEG 4000	40 %	4 g
0.8 M Mannitol	0.2 M	2.5 ml
1 M Ca(NO ₃) ₂ or CaCl ₂	0.1 M	1 ml
補 ddH ₂ O 至總體積		10 ml

【原生質體 total RNA 之萃取】

DEPC-H₂O (500 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
ddH ₂ O		500 ml
DEPC	0.1 %	500 μl
混合均勻後，靜置 37°C 下至隔夜 高溫高壓滅菌		

Pine tree extraction buffer (400 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
CTAB	2 %	8 g
PVP	2 %	8 g
0.5 M EDTA , pH8.0	25 mM	20 ml

NaCl	2 M	46.75 g
Spermidine	0.5 g/l	0.4 ml
補 ddH ₂ O 至總體積		352 ml
DEPC	0.1 %	352 μl
混合均勻後，靜置 37°C 下至隔夜		
高溫高壓滅菌		
1 M Tris-HCl, pH8.0	100 mM	40 ml
使用前再加 β-ME 至最後濃度為 2 %		

【雙螢光素酶活性分析】

1X PLB (Passive Lysis Buffer) solution (100 μl)

Stock reagent	Amount
5X PLB buffer	20 μl
補 ddH ₂ O 至總體積	100 μl

1X LAR II buffer (1 ml/each tube)

Stock 為已分裝且加入螢火蟲螢光素酶受質之 1X LAR II buffer。

1X Stop & GLO buffer (1 ml/each tube)

Stock reagent	Amount
50X 水母螢光素酶受質	20 μl
Stop & GLO buffer	~1 ml

【阿拉伯芥種子與生長】

種子殺菌液 (10 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
100 % bleach	25 %	2.5 ml
10 % SDS	0.025 %	25 μl
補 ddH ₂ O 至總體積		10 ml

1/2 MS 固體培養基 (2 L)

MS salt and vitamin mixture 一包 (Invitrogen Corporation, New York, USA), 以 KOH 調整至 pH5.7 後，補水至 2 L。若需以抗生素 Hygromycin 篩選 AtYAK1 重組質體轉殖株，則於高溫高壓下滅菌後，待冷卻至不燙手後，再加入 Hygromycin 至最後濃度為 25 μg/ml。

【阿拉伯芥 AtYAK1 重組質體嵌入突變株之篩選】

Genomic DNA extration buffer (100 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
1 M Tris-HCl , pH9.0	0.2 M	20 ml
2 M LiCl	0.4 M	20 ml
0.5 M EDTA	25 mM	5 ml
10 % SDS	1 %	10 ml
補 ddH ₂ O 至總體積		100 ml

【GUS 組織染色分析】

固定液 (Fixation buffer) (4 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
0.5 M Na ₂ HPO ₄ , pH7.0	0.1 M	0.8 ml
37 % formaldehyde	0.1 %	10.8 μl
100 % Triton X-100	0.1 %	4 μl
100 % β-ME	0.1 %	4 μl
補 ddH ₂ O 至總體積		4 ml

染液 (Staining buffer) (4 ml)

Stock reagent	Final concentration	Amount
0.5 M Na ₂ HPO ₄ , pH7.0	0.1 M	0.8 ml
0.5 M EDTA , pH8.0	10 mM	80 μl
100 mM K ₃ Fe(CN) ₆	0.5 mM	20 μl
100 mM K ₄ Fe(CN) ₆	0.5 mM	20 μl
20 mg/ml DMF 之 X-Gluc	1 mg/ml	200 μl
100 % Triton X-100	0.1 %	4 μl
補 ddH ₂ O 至總體積		4 ml

在加入 K₃Fe(CN)₆、K₄Fe(CN)₆、及 X-Gluc 時必須避光。

**Bioinformatic and Experimental Assessment
of the Translational Control *via* uORF**

Min-Chun Wu

Abstract

Protein kinases play pivotal roles in the growth and development of eukaryotic cells. Yak1-related protein kinase is a kinase family present in plants and is conserved through evolution. Defect of this kinase causes the minibrain syndrome in fruit fly and the Down syndrome in human. Interestingly, bioinformatic search indicates that upstream open reading frames (uORFs) in genes encoding Yak1-related protein kinase are evolutionarily conserved. Since uORF functions in the regulation of translational control, I studied whether the uORFs of *Arabidopsis thaliana* Yak1-related protein kinase, *AtYAK1*, can regulate its translation. My results showed that mutation of the four uORFs increased translation of downstream main ORF. To further evaluate the possible impact of uORFs in translational control, I performed bioinformatic search of uORFs in the whole genomes of *Arabidopsis* and yeast. The results showed the existence of uORFs predominates in genes encoding protein kinases, indicating a general translational control for regulating the expression of kinases. Possible molecular mechanisms for uORFs-mediated translational control will be discussed.

Table of Contents

Abstracts.....	1
I. Introduction.....	4
1. Background Synopsis.....	4
2. Motive and Theory.....	4
3. Project Goal.....	5
II. Materials and Methods.....	6
1. Organisms.....	6
2. Arabidopsis Reporter Assays.....	6
2.1 Promoter GUS assay in transgenic plants.....	6
2.2 Transient LUC assay in protoplasts.....	6
3. Bioinformatic Survey of uORFs.....	7
3.1 Investigation of Yak1 homologous genes.....	7
3.2 Genome-wide analyses of Arabidopsis and yeast.....	7
4. Research Flow.....	8
III. Results.....	9
1. Promoter GUS Assay in Transgenic Plants.....	9
2. Transient LUC Assay in Protoplasts.....	11
3. Investigation of Yak1 Homologous Genes.....	12
4. Genome-wide Analyses of Arabidopsis and Yeast.....	12

IV. Discussion.....	13
V. Conclusions.....	14
VI. References.....	15
VII. Appendix.....	16
VIII. Acknowledgement.....	18

I. Introduction

1. Background Synopsis

There are approximately 26,000 genes in the model plant, *Arabidopsis thaliana*. According to the central dogma of molecular biology, through the process of transcription and translation, a variety of proteins that differ in functions will be made from different genes. In an ocean of genes, *Arabidopsis thaliana* Yak1-related protein kinase, or AtYAK1, is the first DYRK (Dual specificity Yak1-Related protein Kinase) family member identified in *Arabidopsis* and exists as single copy gene in its genome. Although it is such an unique gene, the function of this gene in plants still has not been thoroughly studied and reported before.

The homologous genes of DYRKs are distributed among different species, including the *Yak1* in yeast, *mnb* (minibrain) in fruit fly, *YakA* in *C. elegans* and the *DYRK1A/B/C*, *DYRK2-3*, *DYRK4A/B* etc. in mammals (Becker and Joost, 1999; Campbell and Proud, 2002).

The DYRKs in human beings have been widely studied; there are seven isoforms been discovered to date (Campbell and Proud, 2002). Since the gene *DYRK1A* is located on the 21st chromosome, overlapping with the abnormal location in Down Syndrome patients, it is possible that *DYRK1A* may be responsible for incomplete development or retardation of the brain in Down Syndrome patients (Lochhead et al., 2003). Compared with mammals, fruit flies lacking *mnb* not only are affected in nerve development but also have a smaller brain than average wild types, thus further affects the fruit fly's learning abilities and causes behavioral deflection (Tejedor et al., 1995).

2. Motive and Theory

Since the bioinformatic analysis showed that most of the 5'untranslated region (5'UTR) of *Arabidopsis* mRNAs are shorter than 500 bp, whether the 567 bp long 5'UTR of *AtYAK1* has any specific impacts on gene expression is investigated. Interestingly, four upstream open reading frames (uORFs) within the 5'UTR of *AtYAK1* have been identified. If uORFs are recognized by a ribosome scanning the mRNA, translation will be terminated at the stop codon of the uORF(s), and translation of the downstream main ORF will require translation re-initiation. Translation efficiency of the downstream main ORF can be regulated by several mechanisms, including modulation of the efficiency of re-initiation, stalling of ribosomes due to inhibition of elongation or termination of uORF translation, and exposure of an internal ribosome entry site (IRES) by ribosome progression along the uORF.

Since an uORF may regulate the translation of downstream main ORF (**Fig. 1**), this study focuses on the involvement of the uORFs in the translational control from a single gene to the genome-wide analyses.

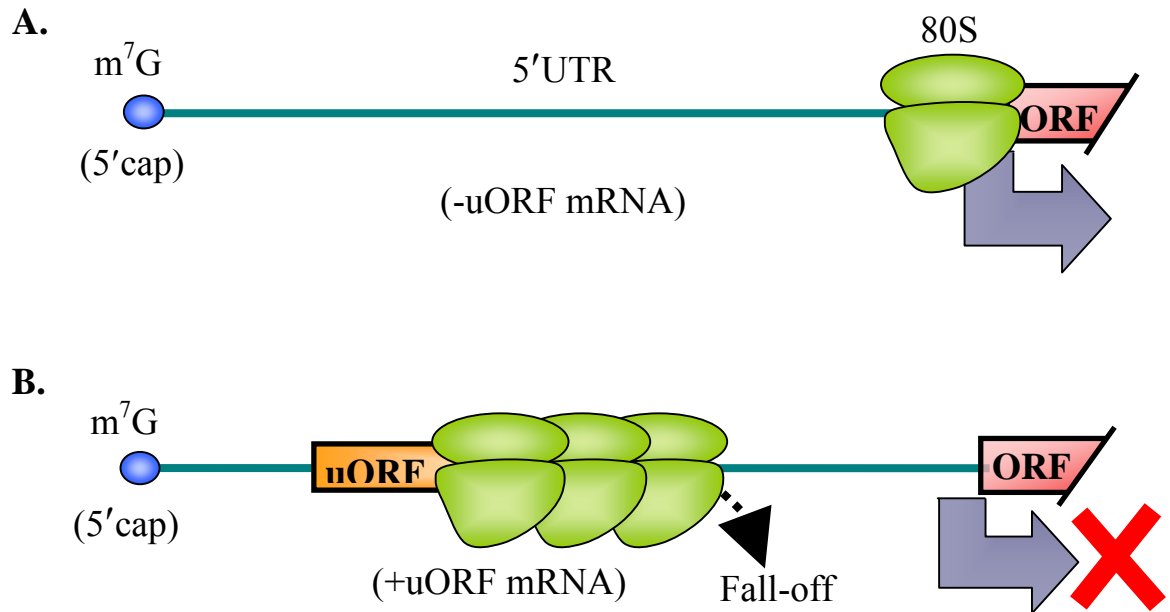


Fig. 1 Current model for cap-dependent translation initiation with (B) or without (A) uORF. The main ORF (red) and 5' m^7G cap (blue oval) are indicated.

3. Project Goal

To investigate the functional role of *AtYAK1* uORFs and the generality of uORFs in the translational control.

II. Materials and Methods

1. Organisms

- (1) *Arabidopsis thaliana*
- (2) *Escherichia coli* (strain: DH5 α)
- (3) *Agrobacterium tumefaciens* (strain: GV3101)

2. Arabidopsis Reporter Assays

2.1 Promoter GUS assay in transgenic plants

Three variants of *AtYAK1* promoter region, 2.5 kb (with wild type 5'UTR), 2 kb (without 5'UTR) and 2.5 kb (with mutated 5'UTR), were fused to *GUS* for promoter GUS assay, respectively (**Fig. 2**). *GUS* only and 35S::*GUS* plasmids were used as negative and positive control, respectively.

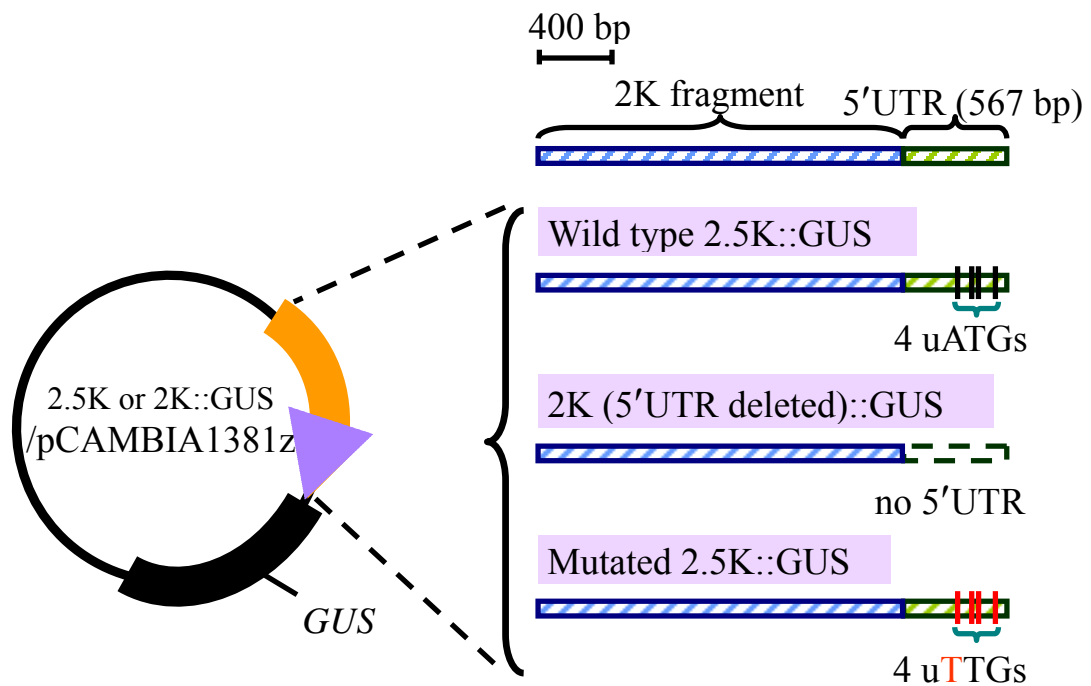


Fig. 2 Constructs and plasmid used in promoter GUS assay. The mutated 5'UTR of *AtYAK1* was constructed by PCR-based site-directed mutagenesis.

2.2 Transient LUC assay in protoplasts

Wild type and mutated 5'UTR of *AtYAK1* were fused in between a 35S promoter and *LUC* (firefly) for transient LUC assay, respectively (**Fig. 3**). 35S::*LUC* (firefly) and 35S::*LUC* (Renilla) plasmids were used as positive control and internal control, respectively.

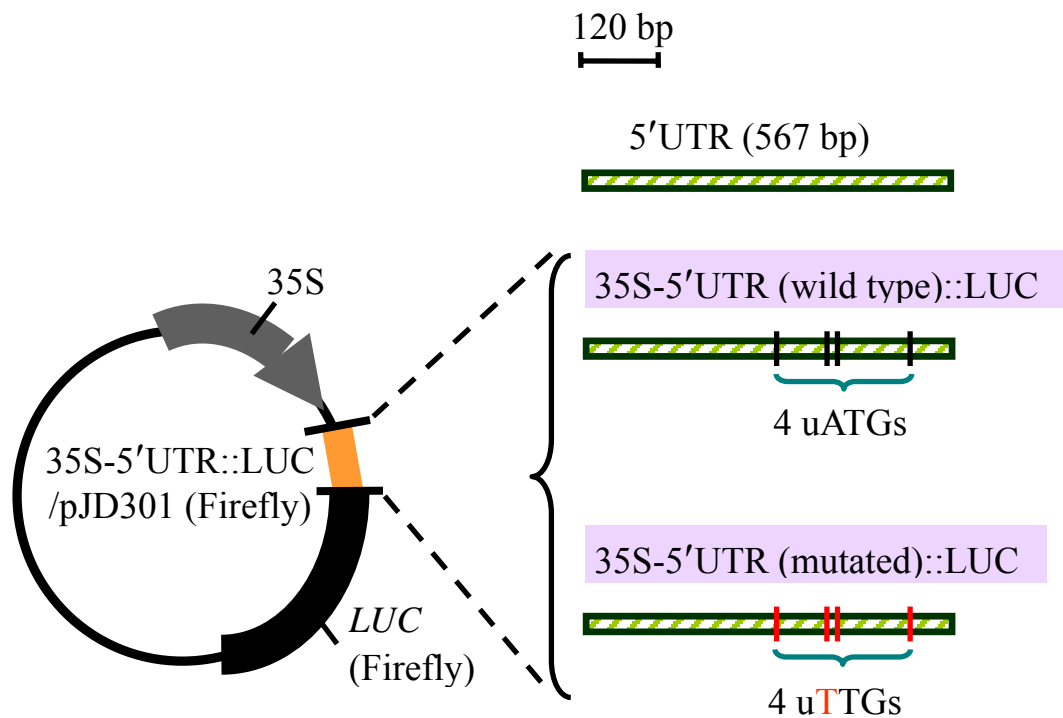


Fig. 3 Constructs and plasmid used in transient LUC assay. The mutated 5'UTR of *AtYAK1* was constructed by PCR-based site-directed mutagenesis.

3. Bioinformatic survey of uORFs

ActivePerl was adopted for scripts in performing the investigation on uORFs in the transcripts of *Yak1* homologous genes in multiple organisms, and the genome-wide analyses of 5'UTR sequences of Arabidopsis and yeast.

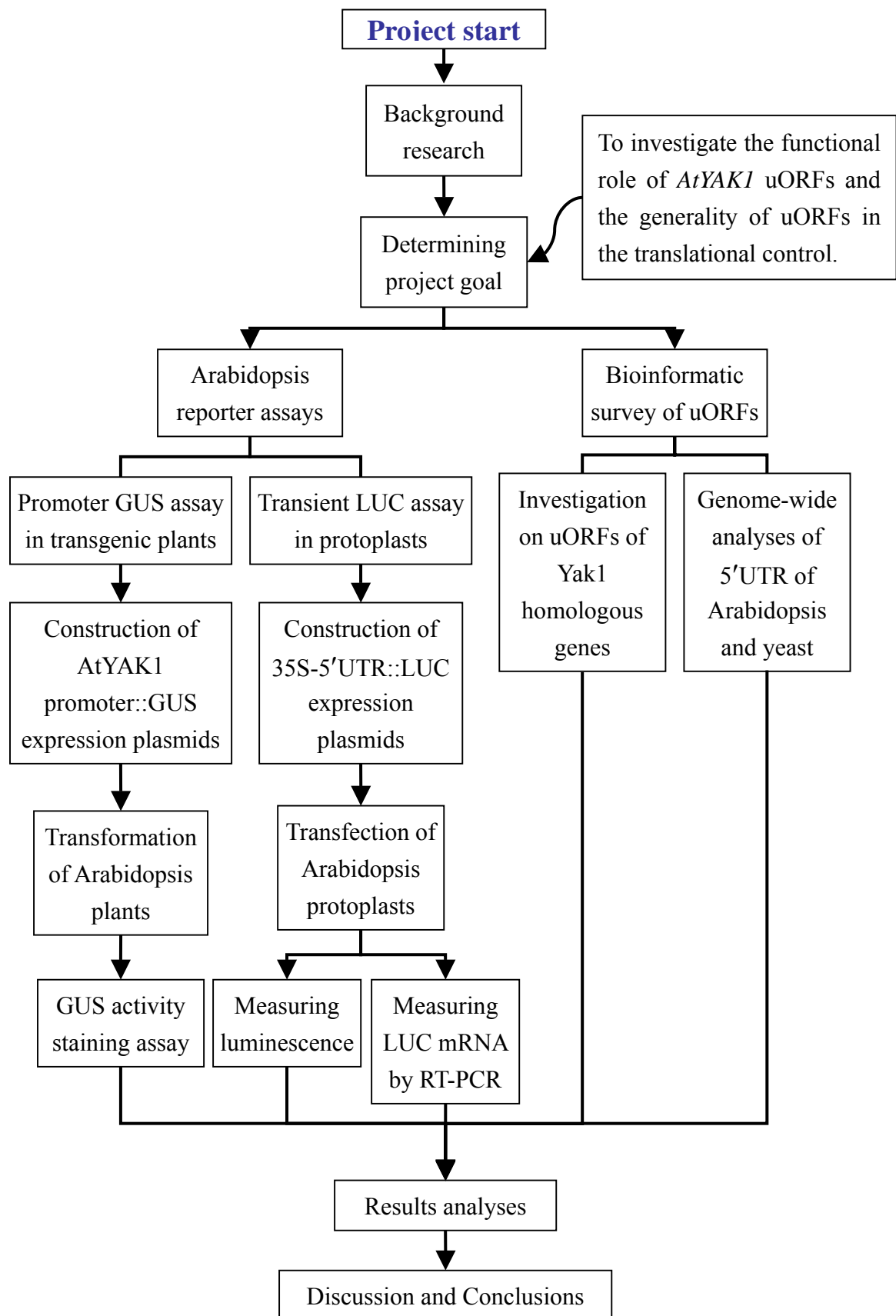
3.1 Investigation of *Yak1* homologous genes

The original 5'UTR sequences of *Yak1* homologous genes were downloaded from National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

3.2 Genome-wide analyses of Arabidopsis and yeast

The original 5'UTR sequences of the genomes of Arabidopsis and yeast were downloaded from The Arabidopsis Information Resource (TAIR) and *Saccharomyces* Genome Database (SGD), respectively.

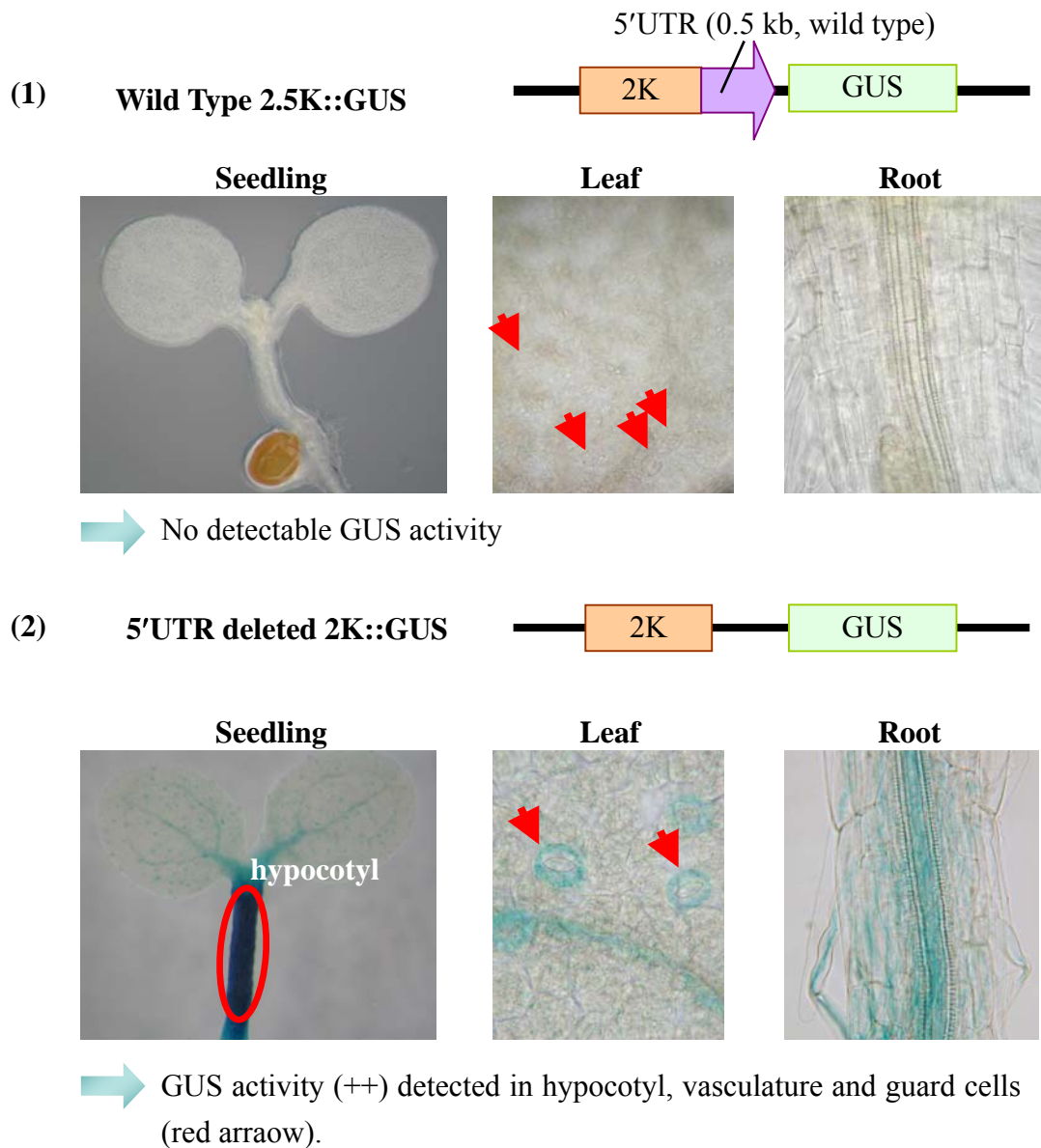
4. Research Flow



III. Results

1. Promoter GUS assay in transgenic plants

The results were shown as below in **Fig. 4**. The photos of leaves and roots were taken from the seedlings under a high resolution microscope. In the results, it is clear that when the 5'UTR is deleted, we can see strong GUS activity in the 2K construct, especially at hypocotyl, vasculature and guard cells, while I can not detect any GUS activity in the wild type 2.5K construct. However, when the uORFs are mutated, we can see blue color again in mutated 2.5K construct in the same tissues as in 2K construct. This indicated that mutated uORFs can restore the expression of reporter gene and *AtYAK1* might be predominantly expressed in hypocotyls, vascular tissues and stomata.



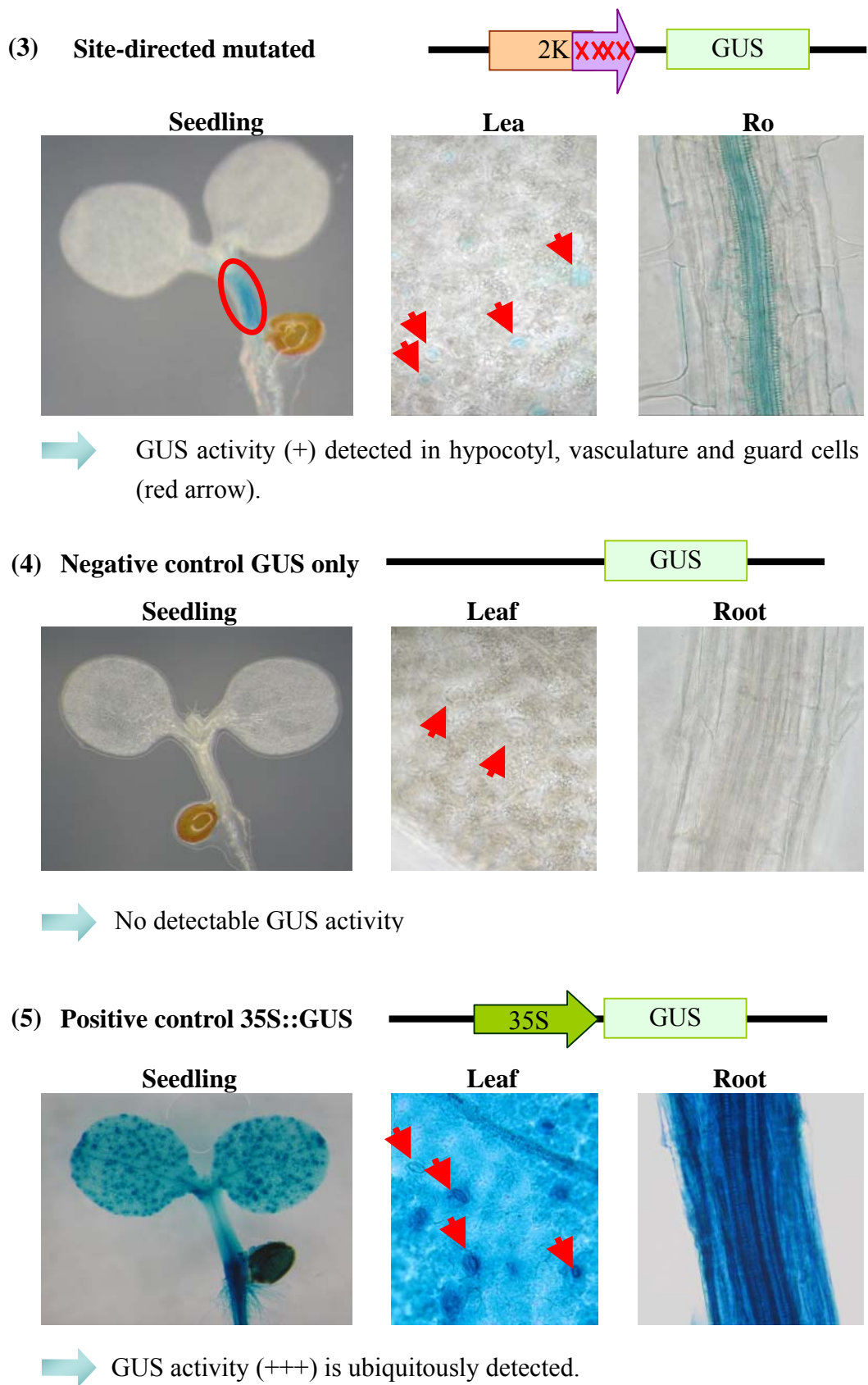
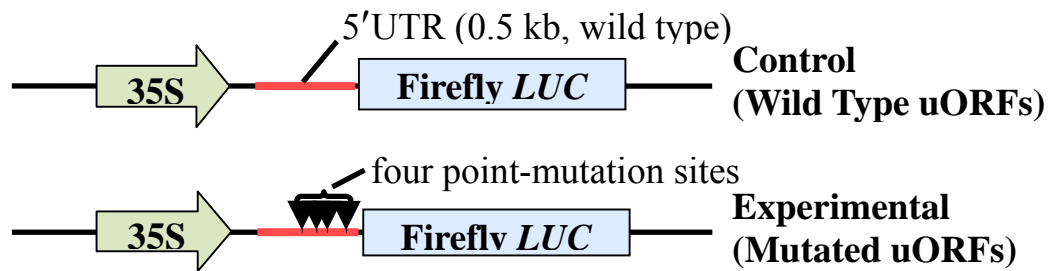


Fig. 4 The uORFs in the 5'UTR of *AtYAK1* abolish the expression of *GUS* in transgenic Arabidopsis.

2. Transient LUC assay in protoplasts

As we can see in **Fig. 5**, The LUC activity of mutated uORFs construct is about 4-fold higher than that of the wild type uORFs construct. Moreover, The steady-state *LUC* mRNA abundance derived from both constructs is comparable, indicating that the increased LUC activity in mutated uORFs constructs is regulated neither at transcription level nor by mRNA stability, but more likely at the translational level.

A.



B.

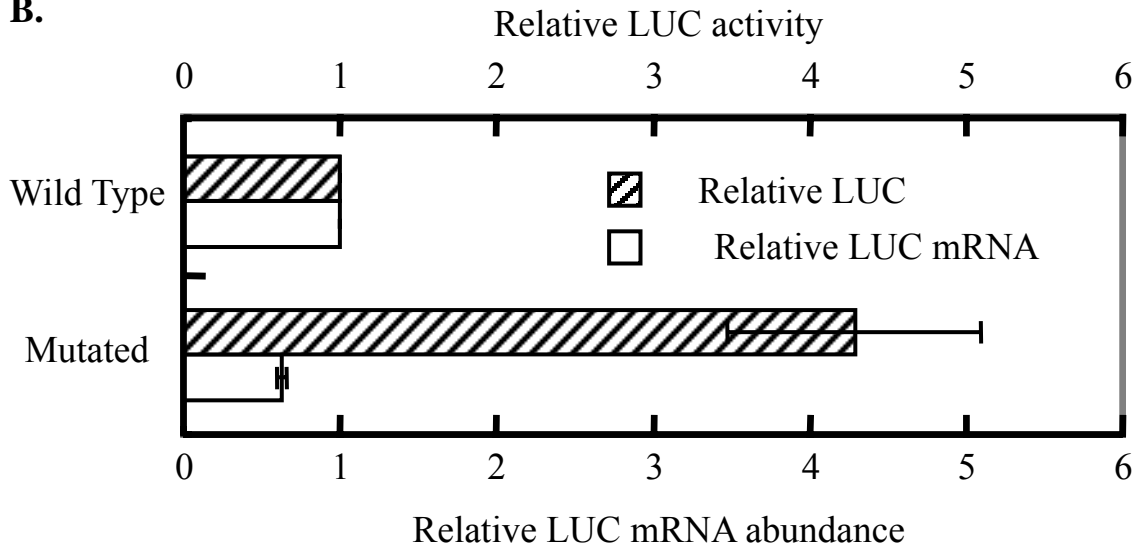


Fig. 5 Effects of uORFs on the expression of downstream ORF in Arabidopsis protoplasts. (A) Constructs used in transient LUC assay in protoplasts. (B) The LUC activity and mRNA abundance, respectively, normalized to those of the co-introduced Renilla *LUC* gene, at 24 hrs in dark post-transfection.

3. Investigation of Yak1 homologous genes

Fig. 6 shows that uORFs are prevalently present in the 5'UTR of *Yak1* homologous genes in multiple organisms, implying the existence of an evolutionarily conserved translational control for this group of genes.

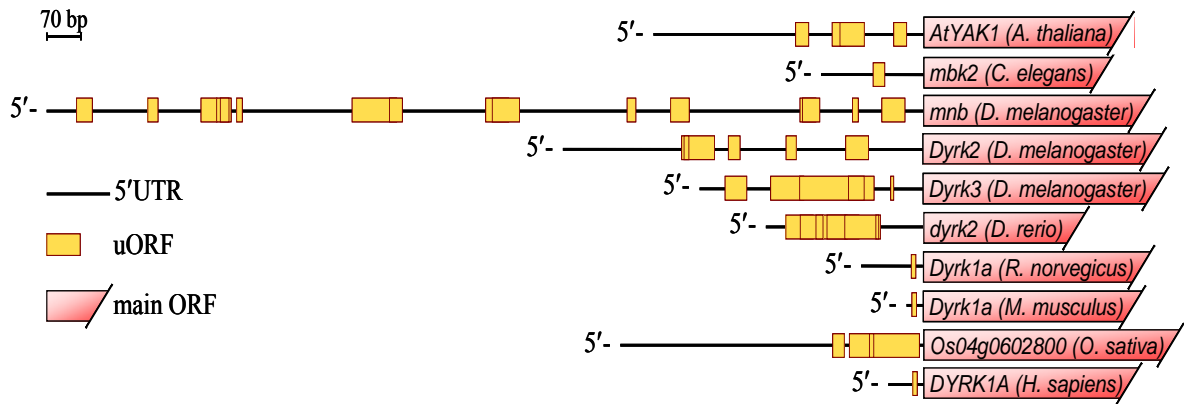


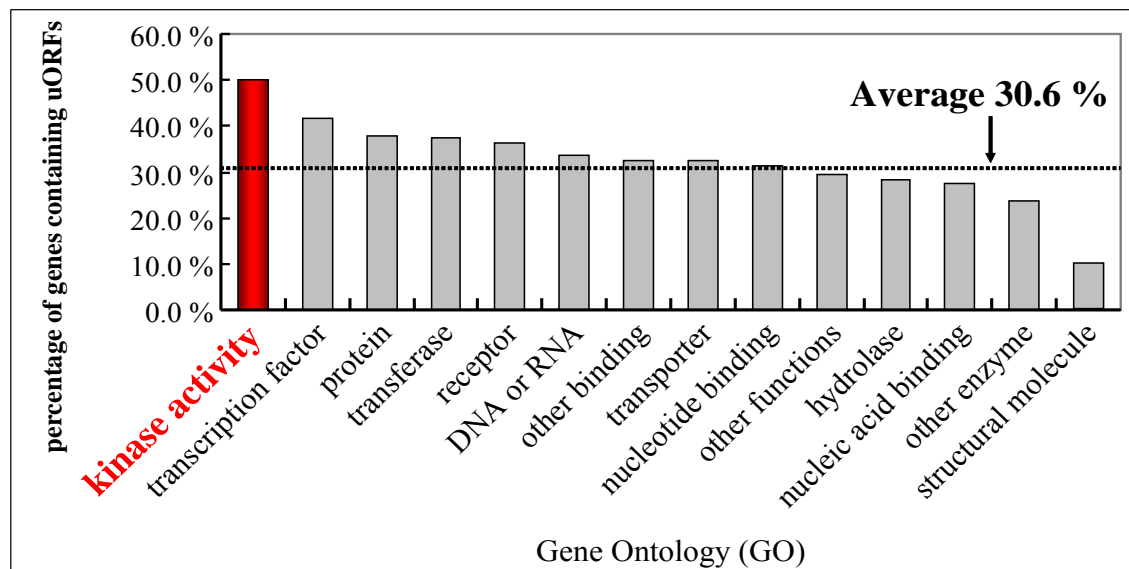
Fig. 6 The spatial arrangement of uORFs of *Yak1* homologous genes in eight eukaryotic organisms. Gene name and corresponding organism are indicated.

4. Genome-wide analyses of Arabidopsis and yeast

Our analyses showed that 5,152 out of 16,840 genes in Arabidopsis, and 885 out of 3,266 genes in yeast have one or more uORFs in the 5'UTR regions. Such result indicated that uORF is commonly present in both model organisms (30.6 % in Arabidopsis and 27.1 % in yeast).

When Gene Ontology (GO) was assigned to genes containing uORFs in both organisms, the frequency of the uORFs was apparently higher in kinase genes than in others (**Fig. 7**).

(A) *Arabidopsis*



(B) *Saccharomyces cerevisiae* (yeast)

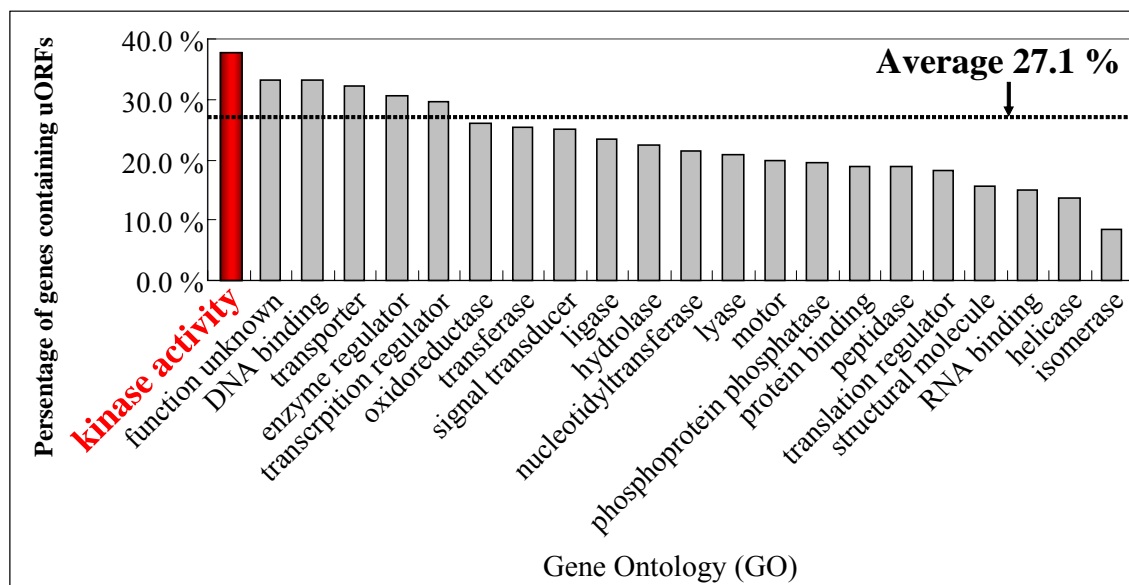


Fig. 7 Putative functions of genes containing uORFs in Arabidopsis (A) and yeast (B).

IV. Discussion

1. Higher promoter activity was observed in the 2K construct than that of the mutated 2.5K construct in promoter GUS assay. Two possibilities are:
 - (1) The region covering -567/-1 (relative to the translation start site) in 5'UTR of *AtYAK1* may mediate translational repression.
 - (2) In addition to uORFs, other regulatory elements may be present in the 5'UTR of *AtYAK1* mRNA.
2. Through the bioinformatic analyses in Arabidopsis and yeast, the highest frequency of uORFs is present in the group of protein kinase genes. One possibility is that protein kinases are signaling molecules which require a more sophisticated regulatory mechanism in order to act more precisely in response to the environmental or developmental cues.
3. Mechanistic models which might account for the uORFs-mediated translational control of gene expression are shown below (**Fig. 8**).

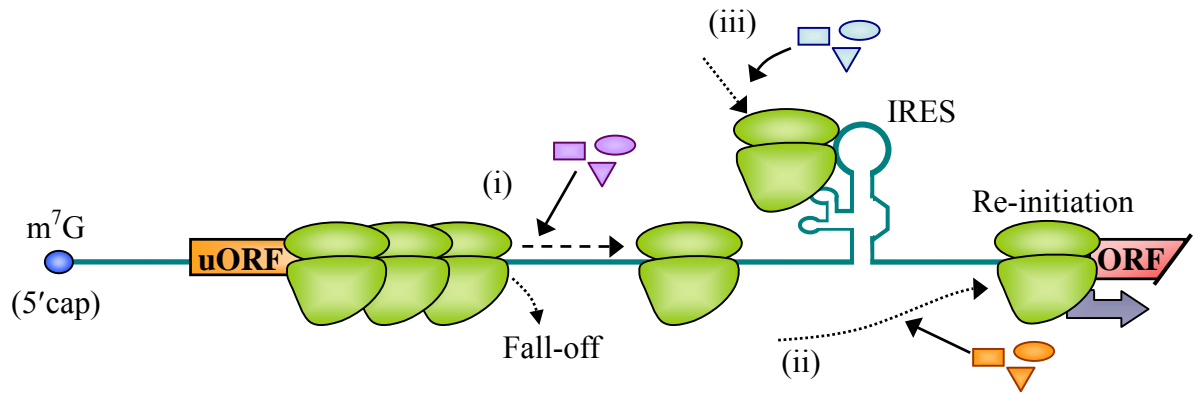


Fig. 8 Possible mechanisms for the translation of main ORF on mRNAs containing uORFs.

- (i) Specific regulatory proteins are needed for ribosomes to scan through uORF
- (ii) Specific regulatory proteins are needed for disassembled ribosomes to re-initiate at AUG of the main ORF.
- (iii) The presence of internal ribosome entry sites (IRES) might promote cap-independent initiation of translation.

V. Conclusions

1. uORFs in the 5'UTR of *AtYAK1* negatively regulate the translation of downstream main ORF.
2. Genome-wide bioinformatic analyses imply that the uORF might generally mediate translational control for regulatory expression of genes such as protein kinases.

VI. References

1. Literatures

- (1) **Becker, W., and Joost, H.G.** (1999) Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 1-17.
- (2) **Campbell, L.E., and Proud, C.G.** (2002) Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS Lett* **510**, 31-36.
- (3) **Lochhead, P.A., Sibbet, G., Kinstrie, R., Cleghon, T, Rylatt, M., Morrison, D.K., and Cleghon, V.** (2003) dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase in *Drosophila*. *Biochem J* **374**, 381-391.
- (4) **Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., and Pongs, O.** (1995) minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* **14**, 287-301.

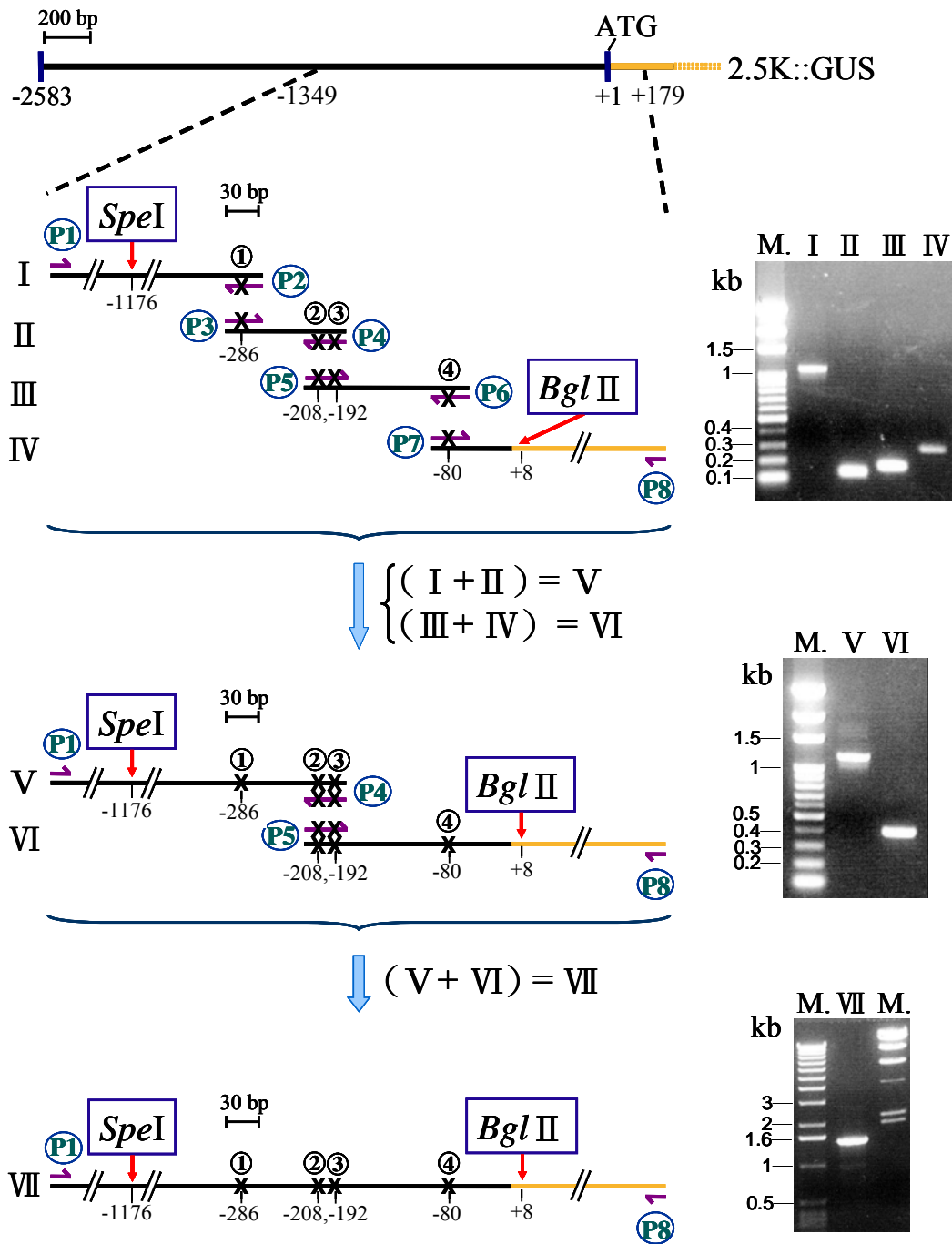
2. General readings

- (1) **Baird, S.D., Turcotte, M., Korneluk, R.G., and Holcik, M.** (2006) Searching for IRES. *RNA* **12**, 1755-1785.
- (2) **Gavin, S.W., Kirsten, S.D., and Nicola, K.G.** (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *TRENDS in Biochemical Sciences* **28**, 182-188.
- (3) **Taisuke, N., Takuji, W., Kotaro, T.Y., and Kiyotaka, O.** (2005) The *Arabidopsis* STV1 protein, responsible for translation reinitiation, is required for auxin-mediated gynoecium patterning. *The Plant Cell* **17**, 2940-2953.

3. Websites

- (1) NCBI database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (2) TAIR database: <http://www.arabidopsis.org/>
- (3) SGD database: <http://www.yeastgenome.org/>

2. Procedure of site-directed mutagenesis via PCR to construct the mutated 5'UTR fragments.



①②③④ and X stand for the point-mutation sites.

Ⓟ stands for the specific primers.

I ~ VII represent the PCR products for each of the consecutive experimental steps.

The black and orange lines indicate the DNA templates. The black line is the expected fragment of 2.5K; the orange line represents fragment of *gusA*. All gel electrophoresis figures on the right panel showed the size of PCR product obtained in each corresponding PCR reaction.

Restriction sites used for subsequent cloning were also shown. Size bars in bp are as marked.

VIII. Acknowledgement

1. Laboratory of Dr. Shu-Hsing Wu in the Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan:

PI: Dr. Shu-Hsing Wu

Research Technician: Yi-Chen Wu

2. Taipei Municipal Chien Kuo High School:

Biology Teacher: Tsui-Hua Liu

3. All other seniors and friends who had generously helped me in any aspects.

評語

發現 AtYAK1 基因的 5' UTR 中的 ORF 對基因表現的影響，工作內容完整，是有趣的發現，作者更進一步對整個基因體調查 5' ORF 存在的情況，發現激素酶的 5' ORF 存在的比例偏高，如能拿另一個激素酶做同樣的研究，會增加整個研究的份量。