

臺灣二〇〇七年國際科學展覽會

科 別：植物學

作品名稱：AtbZIPs 轉錄因子及其下游基因啓動子的
特定序列之研究

得獎獎項：第三名

學校 / 作者：臺北市立建國高級中學
臺北市立建國高級中學

傅澤威
丁柏舜

作者簡介



我是丁柏舜，臺北市立建國高級中學三年級學生。生命科學原先並不是我的興趣，直到了高中，在因緣際會下步入了生命科學的研究領域，並且與我的同夥一頭栽進去，再也不能自己。對於一個高中生來說，實驗中難免會遇到一些其實簡單卻因經驗不足而無法解決的問題，也有可能遇到困難與挫折，但這些並不是阻力，是推動力，是激發我們潛力的泉源。我並且感激所有曾經在我們實驗中幫助我們的人，沒有他們，就沒有今天的我們。



我是傅澤威，目前就讀於建國中學三年級，很高興能夠參與這次國際科學展覽的盛會。我的同伴與我花了許多心血經營這份研究，在實驗的過程中，即使我們帶有濃厚的興趣，卻也時常與挫折碰頭拚命，但在教授抽空指導討論，及學姐細心耐心的教導下，許多困難瓶頸也一一克服了，我想，這也是在科學研究這條路上的另一種刺激、成長與鼓舞吧！

最後，我想特別感謝在我們做這份報告時，曾經指導幫助我們的教授、老師與學長姐們，謝謝！

中文摘要

Arabidopsis thaliana bZIPs (AtbZIPs) 是一群影響層面相當廣泛的轉錄因子，一半以上的 *AtbZIPs* 基因表現受到光的調控，且近九成的分子機制尚未明瞭，因此探討 *AtbZIPs* 在植物光調控機制中所扮演的角色將是個有趣的課題。*AtbZIP16* 與 *AtbZIP17* 皆被推測會參與光的調控機制，然而迄今少有文獻針對這二個轉錄因子進行更多的研究。因此，我們想藉由細菌單雜合系統 (Bacterial one hybrid system) 的方法，找出能與 *AtbZIP16* 與 *AtbZIP17* 轉錄因子結合的 DNA 序列，以瞭解此二轉錄因子調節下游基因表現的分子機制，並探討其在光訊息傳導途徑中所扮演的角色。針對 *AtbZIP16* 與 *AtbZIP17*，本實驗分別找到了 7 與 10 種可能的結合序列。首先，經由資料庫比對分析，我們發現其序列上帶有的 motifs 功能，主要參與在光調控、環境逆境反應機制、組織發育、賀爾蒙調節、病原菌防禦、鈣離子訊息傳遞等方面，其中又以光調控佔最大的比例。再者，藉由將 motifs 的功能繪製成文氏圖，並與 HY5 (*AtbZIP56*) 做比較，結果顯示，這三個轉錄因子雖同屬於 *AtbZIP* family，據推測皆受到光的調控，可能參與某些相似的生理調節過程，但都各自具備不同的功能，影響植物體的發育。如此的差異，表示他們有實質上的不同，值得我們更深入的研究。整體而言，本實驗結果除了說明 *AtbZIPs* 的功能確實廣泛之外，也顯示 *AtbZIP16* 與 *AtbZIP17* 是執行光訊號傳導很重要的調控因子。

英文摘要

Arabidopsis thaliana bZIPs (AtbZIPs) is a group of transcription factors affecting a wide range of responses in *Arabidopsis*. The expression of more than half of the *AtbZIPs* is regulated by light, and the molecular mechanism for roughly 90% of these *AtbZIPs* remains unknown. Therefore, the roles *AtbZIPs* play in *Arabidopsis* light signal transduction is an interesting topic to pursue.

AtbZIP16 and *AtbZIP17* have been suggested to participate in the regulation mechanism mediated by light. However, only limited studies for these two transcription factors have been previously performed. For this reason, we intended to determine the DNA-binding sequences for *AtbZIP16* and *AtbZIP17* via the bacterial one hybrid system to reveal their target binding sites in the promoter region of their downstream genes and to speculate their possible biological function especially in light signal transduction pathway.

We have identified 7 and 10 possible recognition sequences for *AtbZIP16* and *AtbZIP17*, respectively. Using motif-finding programs analyses, we found the motifs identified are mainly involved in light and stress signaling, tissue development, hormone regulation, pathogen defense and Ca^{2+} signaling. Among these regulation pathways, sequences involved in light regulation owns the highest proportion. Furthermore, a Venn diagram was generated to compare functions of genes regulated by *AtbZIP16*, *AtbZIP17* and *HY5*. Results revealed that, although these three transcription factors all belong to the *AtbZIP* family and are predicted to be regulated by some similar physiological regulation process (e.g. light), they still possess distinct biological functions in plant development. Further studies are thus required to put these transcription factors into their shared and unique biological context. Taken together, the results of this experiment not only indicated light is a key regulation factor for *AtbZIP16* and *AtbZIP17*, but also showed the function of *AtbZIPs* could be diverse.

目錄

作者簡介.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
目錄.....	4
圖表目錄.....	7
縮寫對照表.....	8
前言.....	9
一、研究動機.....	9
二、AtbZIPs.....	10
三、研究目的.....	10
四、研究策略.....	11
材料與方法.....	14
一、大腸桿菌勝任細胞的製備.....	14
二、轉錄因子表現載體的製備.....	14
(一)、聚合酶連鎖反應.....	14
(二)、DNA 瓊脂膠體電泳.....	16
(三)、限制酶切割.....	17
(四)、DNA 片段的純化.....	17
(五)、黏接反應.....	18
(六)、大腸桿菌的轉形.....	18
(七)、少量質體 DNA 的抽取.....	19

三、菌種保存.....	20
四、隨機結合序列基因庫的建構.....	20
(一)、雙股隨機結合序列的製備.....	20
(二)、限制酶切割.....	22
(三)、黏接反應.....	23
(四)、細胞刮除與基因庫保存.....	23
(五)、中量質體 DNA 的抽取	23
五、基因庫的篩選.....	24
(一)、3-AT 的篩選.....	24
(二)、5-FOA 的篩選.....	26
研究結果與討論.....	27
一、轉錄因子 AtbZIP16, AtbZIP17 與 HY5 表現載體的建構.....	27
二、隨機結合序列基因庫的建構與基因庫變異度的確認.....	27
(一)、隨機結合序列基因庫的建構.....	27
(二)、基因庫變異度的確認.....	27
三、轉錄因子 AtbZIP16, AtbZIP17 與 HY5 結合序列的篩選.....	28
(一)、利用 <i>Zif268</i> 測試 B1H 系統的可行性.....	28
(二)、第一階段 3-AT / <i>HIS3</i> 篩選.....	30
1. HY5, AtbZIP16, AtbZIP17 的 3-AT 篩選濃度之測試.....	30
2. 利用適當的 3-AT 濃度進行轉錄因子結合序列篩選.....	31
(三)、第二階段 5-FOA / <i>URA3</i> 篩選.....	31
四、DNA 定序與結合序列之分析.....	32
(一)、DNA 定序之結果.....	32

(二)、結合序列與資料庫比對之結果與分析.....	32
結論與應用.....	50
未來展望.....	51
參考文獻.....	52
附錄.....	54
一、轉錄因子 HY5, AtbZIP16, AtbZIP17 基因示意圖.....	54
二、細菌單雜合系統之載體示意圖與其 MCS 序列.....	55
三、實驗材料配方.....	56

圖表目錄

圖一、實驗流程圖.....	13
圖二、概述細菌單雜合系統.....	34
圖三、電泳確認轉錄因子已建構至表現載體 pB1H1.....	35
圖四、以 <i>Zif268</i> 測試細菌單雜合系統.....	36
圖五、電泳確認 Bait 與 Prey 已確實分離.....	37
圖六、以 5-FOA / <i>URA3</i> 進行第二階段篩選的菌株生長情形.....	38
圖七、結合序列與資料庫 (PlantCare, PLACE) 的比對結果.....	39
圖八、結合序列與資料庫 (PlantCare, PLACE) 的比對結果分析.....	40
表一、隨機結合序列基因庫定序之結果.....	41
表二、計算結合序列基因庫的變異度之結果.....	43
表三、利用 <i>Zif268</i> 測試細菌單雜合系統.....	44
表四、第一階段 3-AT 篩選濃度初步測試之結果.....	45
表五、第一階段 3-AT 篩選濃度二次測試之結果.....	45
表六、第一階段 3-AT / <i>HIS3</i> 篩選結果.....	46
表七、第二階段 5-FOA / <i>URA3</i> 篩選結果.....	46
表八、結合序列定序後與資料庫 (PlantCare, PLACE) 比對結果.....	47

縮寫對照表

3-AT	3-amino-1,2,4-triazole
ddH ₂ O	Double deionized water
dATP	Deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	Deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	Deoxythymidine 5'-triphosphate
dNTP	Deoxyribonucleoside 5'-triphosphate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
EtBr	Ethidium bromide
kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani broth
mg	milligram
ml	milliliter
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Rounds per minute
TAE	Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer
Taq	<i>Thermos aquaticus</i> DNA polymerase
μg	microgram
μl	microliter

前言

一、研究動機

陽光，是維繫萬物生存的根源。

生物體具有各式各樣利用光的方式，絕大多數的生物必須妥善的利用光能，尤其是對於無法自行移動的植物而言，如何將光能「化爲己用」，更顯得極爲重要。目前已知種子自發芽、葉片發育、開花以致老化過程皆與光有關(Sullivan and Deng,2003)，光對植物而言可說是最重要的刺激因子。

由於植物沒有能夠快速對外界刺激做出適當反應的神經系統，無法立即而快速地對環境作出回應，爲了生存，植物需要依賴嚴密的調控機制以反應光的刺激。此機制主要是利用光受體接收光刺激後，透過適當的傳遞路徑將光訊息傳至細胞內，最終透過活化或抑制轉錄因子來控制其下游基因之表現，使植物體做出適當的反應。在此光訊息傳導途徑中，轉錄因子就如同是燈泡的開關一樣，藉由與下游基因的啓動子序列結合，進而控制基因的表現，其啓動與關閉皆影響了植物體很多的反應機制，因此研究這群受光調控的轉錄因子是個重要的目標。

模式植物—阿拉伯芥中共有兩萬六千個基因，大約 5% 到 6%，即約一千五百個基因爲轉錄因子，其中 75 個屬於 bZIP (basic region/leucine zipper motif) 轉錄因子家族。bZIP 轉錄因子普遍存在於各物種中，包括阿拉伯芥、線蟲、果蠅、酵母菌、人類等，而其在阿拉伯芥的基因數量更爲上述生物的四倍左右 (Riechmann et al., 2000)，可見這群轉錄因子對植物而言相當重要。目前已知 *Arabidopsis thaliana* bZIPs (AtbZIPs) 的功能包括病原菌的防禦、光及環境逆境的訊息傳遞、開花以及種子的發育等等 (Jakoby et al., 2002)，是一群影響層面相當廣泛的轉錄因子。

然而，大約有九成的 AtbZIPs 的功能與分子機制尙未確切明瞭，並且其中有超過一半的 AtbZIPs 基因表現受到光的調控，如此之高的比例，讓人不禁設想光是調控植物生理運作的主要因子之一，並且引起了我們極大的興趣，故我們決定設計實驗以探討 AtbZIPs 在植物調控機制可能的功能及扮演的角色。

二、AtbZIPs (*Arabidopsis thaliana* bZIPs)

bZIP 是一群主要由 basic leucine zipper 區域構成的轉錄因子家族。bZIP 基因中的鹼性區域 (basic region) 能與 DNA 結合，而 leucine zipper 則是形成二聚體 (dimer) 的位置。存在於模式植物阿拉伯芥中的 bZIP 轉錄因子特稱為 AtbZIPs。

Marc Jakoby 等人根據蛋白質胺基酸序列的相似性將 AtbZIPs 區分為十個群組。研究最為透徹的非 H 組中的 *HY5* (*AtbZIP56*; At5g11260) 莫屬，目前已知 *HY5* 能夠形成同型二聚體，與 G-box 序列結合，並且也已證實其在阿拉伯芥中受到光的調控。另外 B 組與 G 組分別包含三個和五個 *AtbZIPs* (Jakoby et al., 2002)，這八個 *AtbZIPs* 中共有五個基因的表現與光有關。

由於同時進行八個基因的研究，需要耗費大量的人力、時間以及資源，有其困難度。所以，本實驗計畫先著重在兩個分屬不同群組的 *AtbZIP16* (At2g35530; G 組) 與 *AtbZIP17* (At2g40950; B 組) 上，並且以 *AtbZIP56* 做為對照組，根據之前的資料，除了曾推測此二蛋白質均會以同型二聚體 (homodimer) 的方式與 DNA 結合外 (Deppmann et al., 2004)，迄今少有文獻針對這二個 *AtbZIPs* 做進一步的研究。而其所結合的啟動子序列及功能、以及對植物體的影響等各方面，皆值得我們進行深入的探討。

三、研究目的

- (一)、藉由細菌單雜合系統，尋找轉錄因子 *AtbZIP16* 與 *AtbZIP17* 的 DNA 結合序列。
- (二)、利用資料庫 plantCARE 和 PLACE 分析結合序列的結果，探討轉錄因子 *AtbZIP16* 與 *AtbZIP17* 可能參與調節的生理功能。

四、研究策略

(一)、實驗的正向控制組 (positive control)

在 *AtbZIP* family 中，目前對於 *AtbZIP56* (At5g11260, H 組) 的研究較多。*AtbZIP56* 亦名 *HY5* (意指 long hypocotyl 5)，其在光訊息傳遞過程中是一個相當重要的正向調節因子。推測 *HY5* 上游可能受到光敏素、隱花素及向光素等光受器的調控 (Ulm et al., 2004)，其下游則控制了植物體幼苗子葉的大小及下胚軸的長短 (Osterlund et al., 2000)。目前已知 *HY5* 會與含有 G-box (CACGTG) 的 DNA 序列結合 (Jakoby et al., 2002)，因此 *HY5* 與 G-box 序列間的結合關係將可作為本實驗的正向控制組。

(二)、細菌單雜合系統 (Bacterial one-hybrid system)

對於研究蛋白質與去氧核糖核酸間的交互作用 (Protein-DNA interaction)，細菌單雜合系統 (Meng et al., 2005; Meng and Wolfe, 2006) 是一個簡單而快速的方法。相較於酵母菌單雜合系統 (yeast one-hybrid system)，大腸桿菌具有高轉形效率 (transformation efficiency) 的優勢，能使細菌單雜合系統建構一個涵蓋更廣、變異度更大的基因庫 (library)。就本實驗而言，基因庫的變異度大，將足以提供更多的隨機結合序列給轉錄因子辨識結合，提高我們找到轉錄因子之 DNA 結合序列的機率。另外，由於大腸桿菌生長速度快，加上此系統操作技術簡易，並不需要耗費太多的人力及物力，因此相當適合我們藉以尋找轉錄因子 *HY5*, *AtbZIP16* 與 *AtbZIP17* 的 DNA 結合序列。

細菌單雜合系統的簡略說明如下

1. 細菌單雜合系統的構成要素 (key components)

細菌單雜合系統主要包含三個要素：轉錄因子表現載體 pB1H1 (附圖一)、隨機序列表現載體 pH3U3 (附圖一) 與大腸桿菌的篩選菌株 $F' \Delta hisB \Delta pyrF$ 。這三個構成要素的特點是：一、轉錄因子表現載體 pB1H1 上的 MCS (multiple cloning site) 前帶有一個 RNA 聚合酶的 α 次單元，而 RNA 聚合酶需要兩個 α 次單元才能正常表現。因此，轉錄因子 *HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 可能形成同型二聚體 (homodimer) 的特性 (Deppmann et al., 2002)，恰可使菌株需要活化 RNA 聚合酶時，RNA 聚合酶能夠正

常表現；二、結合序列表現載體 pH3U3 則帶有兩個報告基因 (reporter gene) *HIS3* 與 *URA3*，此二基因分別可利用 3-AT 和 5-FOA 進行結合序列基因庫的篩選；三、篩選菌株—F'△*hisB*△*pyrF* 源自 XL1-blue 菌株，抗四環黴素 (Tet^R)，*hisB* 與 *pyrF* 基因則分別為大腸桿菌 *HIS3* 與 *URA3* 的同源基因。

2. 細菌單雜合系統的操作流程

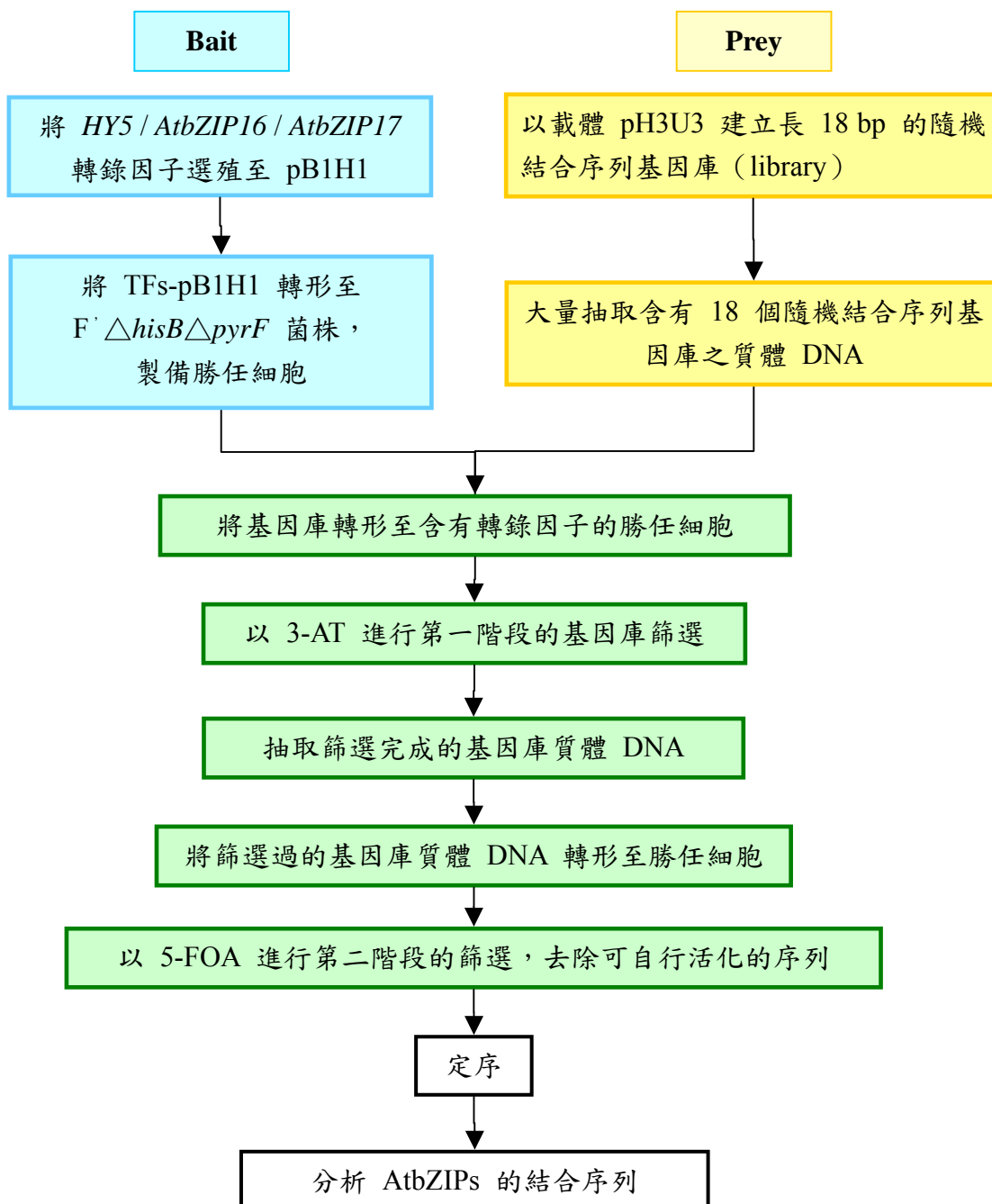
(1) 三個構成要素的製備 (圖二)

首先把轉錄因子選殖 (clone) 到載體 pB1H1，即為 Bait。接著，將隨機結合序列接合 (ligate) 至載體 pH3U3 上，製備成隨機結合序列基因庫，即為 Prey。

(2) 結合序列的篩選 (圖二)

將 Bait 與 Prey 送入篩選菌株 F'△*hisB*△*pyrF*，利用此菌株缺乏 *hisB* 與 *pyrF* 基因的特性，我們先以 3-AT 進行第一階段的篩選，篩除掉 *HIS3* 基因無法表現或表現量微弱的菌株，得到與 Bait 結合力較強的 Prey 之後，分離出 Prey。接著再以 5-FOA 進行第二階段的篩選，以避免篩選到不含有 Bait，卻可自行活化、表現 *URA3* 基因的 Prey，經由兩階段篩選後仍可存活之菌株即帶有 Bait 可辨識的結合序列。將這些結合序列進行定序後，可作進一步的分析。

(三)、實驗流程圖



圖一 | 本實驗的流程簡圖。藍色與黃色的部分分別為 Bait 與 Prey 的建構，綠色區塊為結合序列的兩階段篩選，黑框白底處則為結合序列的分析。

材料與方法

一、大腸桿菌勝任細胞 (competent cell) 的製備

方法係參照 The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. Coli*: "Ultra-Competent" Cells. Molecular Cloning 第三版。

1. 從已培養 16~20 小時的固態培養基上選取一顆直徑 2~3 mm 的單一菌落接種於 25 ml 的 LB 液態培養液中(附錄三)，在 37 °C 下震盪培養 (150 rpm) 8 小時。
2. 取 2 ml 的菌液至 250 ml 的 SOB 培養液中 (附錄三)，在 18 °C 下震盪 (150 rpm) 隔夜培養。
3. 當 OD₆₀₀ 值到達 0.55 時，將之置於冰浴 10 分鐘。
4. 將菌液倒入離心瓶，在 4 °C 下以 2,500 g 離心 10 分鐘。
5. 倒棄上清液，將離心瓶倒置於紙巾上 2 分鐘，並且儘量將殘存於瓶壁上的液體吸除。
6. 輕輕地將細胞溶回 80 ml 冰冷的 Inoue transformation buffer 中 (附錄三)。
7. 將菌液倒入離心瓶，在 4 °C 下以 2,500 g 離心 10 分鐘。
8. 倒棄上清液，將離心瓶倒置於紙巾上 2 分鐘，並且儘量將殘存於瓶壁上的液體吸除。
9. 輕輕地將細胞溶回 20 ml 冰冷的 Inoue transformation buffer 中。
10. 加入 1.5 ml DMSO 至其中，搖晃使菌液混合均勻，並置於冰浴 10 分鐘。
11. 將菌液迅速分裝至微量離心管中，並且使用液態氮急速冷凍，存於 -80 °C 下保存。

二、轉錄因子表現載體的製備

(一)、聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction)

利用含有限制酶切位的引子 (如下所示) 以聚合酶連鎖反應的方式將 *HY5*、*AtZIP16*、*AtZIP17* 的基因放大 (附圖一)。

引子序列如下：

S 表示 sense 引子，AS 表示 antisense 引子，底線區域表示限制酶切位。

HY5 :

At5g11260-HY5-KpnI-S

TAGGTACCATGCAGGAACAAGCGACT (26 mer)

At5g11260-HY5-AvrII-AS

ATCCTAGGTCAAAGGCTTGCATCAGC (26 mer)

AtZIP16 :

At2g35530-ZIP16-KpnI-S

TCGGTACCATGGCTAGCAATGAGATG (26 mer)

At2g35530-ZIP16-AvrII-AS

GTCCTAGGTCACGTTGAGTCTTTGTA (26 mer)

AtZIP17 :

At2g40950-ZIP17-KpnI-S

TAGGTACCATGGCTGAACCAATCACC (26 mer)

At2g40950-ZIP17-XbaI-AS

AGTCTAGATCAAGTGGTCACAAGATG (26 mer)

1. 聚合酶連鎖反應之混合液：

Stockreagent	Amount	
DNA (5 ng/μl)	1	μl
sense primer (10 pmole/μl)	2.5	μl
antisense primer (10 pmole/μl)	2.5	μl
10× buffer with MgSO ₄	5	μl
dNTP (10mM each)	1	μl
Pwo (5U/μl)	0.25	μl
ddH ₂ O	37.75	μl
Total	50	μl

2. 以 PTC-200 (MJ Research) 進行 PCR 反應：

- (1) 95 °C , 5 分鐘
- (2) 94 °C , 30 秒 → 56 °C , 30 秒 → 72 °C , 90 秒。 (35 次循環)
- (3) 72 °C , 10 分鐘
- (4) 4 °C , 保存

3. 取 2 µl PCR 產物進行 1 % TAE 瓊脂膠體電泳分析，確認 PCR 產物之正確性

(二)、DNA 瓊脂膠體電泳

1. 將 0.2 g agarose (Seakem LE agarose , cat.500004 , Maine , USA) 加入 20 ml 1× TAE buffer (0.04 M Tris base , 0.04 M acetate , 0.001 M EDTA) 製備 1% TAE 瓊脂膠液。
2. 以微波爐加熱溶解，再以 ddH₂O 補足蒸發的部分。
3. 加入 1.6 µl EtBr (10 mg/ml) 並混合均勻。
4. 倒入定型板中靜置凝固 30 分鐘。
5. 移入電泳槽中，並在電泳槽中加入 300 µl 1× TAE running buffer。
6. DNA 混合六分之一體積之 6× DNA loading dye 後，同 marker 皆注入不同的孔槽中。
7. 在 110 伏特下執行電泳 25 分鐘。
8. 於紫外光下觀察結果並取得照片。

(三)、限制酶切割 (Restriction enzyme digestion)

使用 *Kpn* I 及 *Avr* II 對 pB1H1 (附圖二)、AtZIP16、AtZIP17 和 HY5

執行限制酶切割，以進行黏接反應。

1. 準備限制酶切割之反應溶液：

Stock reagent	Amount
DNA	0.5 µg
10× buffer 1	5 µl
Restriction enzyme (20U/µl)	1 µl
補 ddH ₂ O 至	50 µl

2. 將上述溶液混合均勻，於 37 °C 下反應 2 小時。

(四) 、DNA 片段的純化

1. 瓊脂膠體中的 DNA 片段之純化：

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

- (1) DNA 電泳後，以波長 365 nm 或 254 nm 的紫外光觀察膠體並確認欲取得的 DNA 片段所在的位置，以乾淨的刀片將其切下。裝入微量離心管中並且秤重。
- (2) 於管中加入 3 倍體積的 Capture Buffer (每 100 mg 膠體需加 300 μ l Capture Buffer)。
- (3) 於 60 °C 之水浴下加熱 10 分鐘，每 2~3 分鐘震盪混合一次。
- (4) 準備 GFX column 置於 2 ml 微量離心管上，並將加熱溶解後的膠體注入 column 上。在室溫下靜置 1 分鐘。
- (5) 以 13,000 rpm 離心 30 秒。倒除濾液。
- (6) 加入 500 μ l 的 Wash Buffer，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒除濾液。
- (7) 再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒棄濾液。
- (8) 將 column 置於新的微量離心管，加入 0.5 \times Buffer EB，靜置 1 分鐘，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。
- (9) 取 1 μ l 的純化產物進行電泳分析，確定所得的產物之正確性。
- (10) 其餘的產物則置於 -20 °C 下保存。

2. 聚合酶連鎖反應產物之純化：

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

- (1) 將 GFX column 置於 Collection Tube 上並加入 5 倍體積 (500 μ l) Capture Buffer 。
- (2) 加入 PCR 反應產物 100 μ l，並以以微量吸管混合 4~6 次。在室溫下靜置 1 分鐘。
- (3) 以 13,000 rpm 離心 30 秒，倒除濾液。

- (4) 加入 500 μ l Wash Buffer，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒除濾液。
- (5) 再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將 GFX column 移至 1.5 ml 微量離心管上。
- (6) 直接在 GFX column 的濾膜上加入 50 μ l Elution Buffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 1 mM EDTA, pH 8.0) 或 autoclaved ddH₂O]。
- (7) 在室溫下靜置 1 分鐘。
- (8) 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。
- (9) 取 2 μ l 的純化產物進行電泳分析，確定所得的產物之正確性。
- (10) 其餘的產物則置於 -20 °C 下保存。

(五)、黏接反應 (DNA ligation)

將限制酶切割過的 vector DNA (pB1H1) 及 insert DNA (*AtZIP16*、*AtZIP17*、*HY5*) 進行黏接反應以轉形至大腸桿菌中。

此方法使用 TaKaRa DNA ligation kit (Cat.6022, Otsu-shiga, Japan)。

1. 準備以下三種反應溶液：

Stock reagent	Amount	
vector DNA (10 ng/ μ l)	1	μ l
insert DNA (10 ng/ μ l)	4	μ l
solution I	5	μ l
Total	10	μ l

2. 以微量吸量管使溶液混和均勻。
3. 於 16 °C 水浴反應 1 小時。

(六)、大腸桿菌的轉形

1. 取適量的質體 DNA 加入一管 100 μ l 之大腸桿菌勝任細胞。
2. 冰浴 30 分鐘。
3. 採用熱休克 (heat shock) 的方法：將試管置於 42 °C 的水浴 30 秒。
4. 再快速地將試管置於冰浴 90 秒。
5. 加入 400 μ l 之 LB 培養液於 37 °C 下震盪培養 45 分鐘。

6. 將細菌細胞以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，並且倒棄 400 μ l 之上清液。
7. 再將細菌細胞溶回剩餘 100 μ l 的菌液，並均勻塗佈於含有抗生素 (Chloramphenicol, 30 μ g/ml) 的 LB 固體培養盤上 (附錄三)。
8. 置於 37 $^{\circ}$ C 下隔夜培養。

(七)、少量質體 DNA 的抽取 (Miniprep of plasmid DNA)

方法係依照 GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience, Cat.27-9602-01, Piscataway, NJ, USA)

1. 以微量吸管挑選單一菌落培養於 3 ml 含有抗生素 (Chloramphenicol, 30 μ g/ml) 的 LB 培養液中，在 37 $^{\circ}$ C 下震盪 (250 rpm) 隔夜培養。
2. 取 1.5 ml 的菌液置於微量離心管中，以 13,000 rpm 離心 30 秒，倒除上清液。
3. 加入 solution I 150 μ l，並將微量離心管劇烈震盪混合均勻 (溶液呈現混濁)。
4. 加入 Solution II 150 μ l，並將微量離心管輕微地上下搖晃，直到溶液澄清。
5. 加入 Solution III 300 μ l，並將微量離心管輕微地上下搖晃，直到溶液出現白色懸浮物為止。
6. 在室溫下以 13,000 rpm 離心 10 分鐘。同時，準備 GFX column 並置於 Collection Tube 上。
7. 將上清液加入 GFX column 中 (避免將任何細胞殘骸加入其中)，在室溫下靜置 1 分鐘。
8. 以 13,000 rpm 離心 30 秒。
9. 將濾液倒除從 Collection Tube 中倒除。
10. 加入 Solution III 300 μ l 至 GFX column 中，並以 13,000 rpm 離心 30 秒。
11. 加入 400 μ l Wash Buffer 於 GFX column 中，並以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。

12. 倒除濾液，再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。
13. 將 GFX column 移至新的微量離心管中，並直接在 GFX column 之濾膜上加入 TE Buffer 30 μ l。
14. 在室溫下靜置 1 分鐘。
15. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘以回收純化之 DNA。

三、菌種保存

取與菌液同體積的 40% (V/V) glycerol (最後濃度為 20%) 與菌液混合均勻，以液態氮急速冷凍後保存於 -70 $^{\circ}$ C。

四、隨機結合序列基因庫的建構

(一)、雙股隨機結合序列的製備

利用酵素 Klenow 將兩條單股的基因庫引子合成雙股 DNA。所使用的基因庫序列為：

bottom library:

5' ATACATAGATGCGGCCGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGATA
GGCGGCCATAC 3'

bottom primer:

5' GTATGGCGGCCTATCAG 3'

在第一條的 5' 端與 3' 端分別設計 *Not* I 及 *Asc* I 的切位 (底線區域)，中間 18 N 為隨機的寡核苷酸序列，做為基因庫使用。

第二條序列從 5' 端與 3' 端與第一條 3' 端互補，以酵素 Klenow (large fragment of DNA polymerase 2, Invitrogen, Cat.18012-039) 可將此二引子修補為完整的雙股互補 DNA。

1. Primer annealing

準備以下溶液：

Stock reagent	Amount
5 µg bottom library (511 ng/µl)	9.8 µl
1.25 µg bottom primer (587 ng/µl)	2.2 µl
Total	12 µl

- (1) 75 °C , 5 分鐘
- (2) 75 °C → 25 °C (每秒降 0.08 °C)
- (3) 25 °C 或 4 °C (直到要使用為止)

2. Klenow extension

準備以下反應溶液：

Stock reagent	Amount
10× REact 2 buffer	6 µl
0.5 mM dNTP each	2 µl
2 µg DNA (bottom library and bottom primer)	4 µl
large fragment of DNA polymerase 2 (3~9U/µl)	2 µl
ddH ₂ O	46 µl
Total	60 µl

分裝成兩管後，於 37 °C 作用 1 小時。

3. Linear acrylamide 酒精沉澱

將合成完成的雙股基因庫 DNA 進行酒精沉澱以純化 DNA。準備以下溶液：

Stock reagent	Final Concentration	Amount
library (Klenow)		60 µl
ddH ₂ O		40 µl
3M NaOAC	1 / 10 V	10 µl
linear acrylamide (5 mg/ml)	50 µg/ml	1 µl
ice-cold 100% 酒精	2.5 V	250 µl
Total		360 µl

- (1) 將溶液混合均勻，於 -20 °C 下 30 分鐘。
- (2) 在 4 °C 下以 13,000 rpm 離心 20 分鐘。
- (3) 以 500 µl 80% 酒精清洗。
- (4) 在 4 °C 下以 13,000 rpm 離心 5 分鐘。
- (5) 置於 speed vac 中，離心 5 分鐘。
- (6) 將產物溶於 30 µl ddH₂O 中。

(二)、限制酶切割 (Restriction enzyme digestion)

分別取 1 μg 的載體 pH3U3 (附圖二) 及插入子 library 進行第一次 *Not* I 限制酶切割。

Stock reagent	Amount (pH3U3/library)
1 μg DNA	5 / 30 μl
10 \times buffer 3	20 / 10 μl
<i>Not</i> I (10 U/ μl)	4 / 3 μl
ddH ₂ O	171 / 57 μl
Total	200 / 100 μl

1. 於 37 °C 下作用 2.5 小時，並且取 5 μl 進行電泳分析，確定所得的產物之正確性。
2. 使用 GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience , Cat.27-9602-01 , Piscataway , NJ , USA) 純化 vector DNA，並使用 linear acrylamide 酒精沉澱的方法純化 insert DNA，方法如前。
3. 將純化完成的產物進行第二次 *Asc* I 限制酶切割。

Stock reagent	Amount (pH3U3/library)
<i>Not</i> I cut DNA	50 / 50 μl
10 \times buffer 3	20 / 10 μl
<i>Asc</i> I (10 U/ μl)	4 / 2 μl
ddH ₂ O	126 / 38 μl
Total	200 / 100 μl

4. 於 37 °C 下作用 2.5 小時，取 200 μl vector DNA 進行電泳及瓊脂膠體中的 DNA 片段之純化，並且也取 100 μl insert DNA 以 linear acrylamide 酒精沉澱的方法純化 (方法如前述)。
5. 取 2 μl 進行電泳分析，確定所得的產物之正確性。
6. 保存於 -20°C。

(三)、黏接反應 (DNA ligation)

此方法使用 TaKaRa DNA ligation kit (Cat.6022, Otsu-shiga, Japan)。

Vector 與 insert 之莫耳數比為 1 : 250, 即 0.013 pmole : 0.003 pmole。

1. 準備以下反應溶液：

Stock reagent	Final Concentration	Amount
pH3U3 (25 ng/μl)	0.013 pmole	2 μl
library (65 ng/μl)	0.003 pmole	1 μl
ddH ₂ O		2 μl
Solution I		5 μl
Total		10 μl

2. 以微量吸量管使溶液混和均勻。

3. 於 16 °C 水浴反應 1 小時。

4. 大腸桿菌的轉形：如前述。

(四)、細胞刮除 (Cell scrapping) 與基因庫保存

1. 在欲進行細胞刮除的培養基上加入 5 ml 2×YT 培養液 (附錄三)。

2. 以細胞刮除器 (Cell scraper) 將菌落刮下, 將所得的菌液汲入離心管中。

3. 再加入 3 ml 2×YT 培養液。

4. 以細胞刮除器將菌落刮下, 將所得的菌液汲入離心管中。

5. 取對菌液同體積的 40% (V/V) glycerol (最後濃度為 20%) 加入離心管中, 以液態氮急速冷凍後保存於 -70 °C。

(五)、中量質體 DNA 的抽取 (Midiprep of very low-copy plasmid DNA)

1. 由 -70 °C 取出 20 μl 的隨機寡核苷酸基因庫 (約 1.2×10^5 單一菌落) 加入 1000 μl LB 培養液中, 於 37 °C 中培養 4~8 小時至飽和為止。

2. 將使用 LB 培養液培養的菌液倒入 250 ml 的離心瓶中。

3. 以 6,000 g 在 4 °C 下離心 15 分鐘。

4. 倒除上清液, 劇烈震盪使細菌沉澱完全地溶於 20 ml Buffer P1 中。

5. 加入 20 ml Buffer P2 並且輕微地上下搖晃 4~6 次。

6. 靜置於室溫下 5 分鐘。

7. 加入 20 ml Buffer P3 並且立即輕微地上下搖晃 4~6 次。

8. 置於冰浴 30 分鐘。

9. 再次混合均勻後，以 20,000 g 在 4 °C 下離心 30 分鐘，並且立即取出含有質體 DNA 之上清液。
10. 加入 4 ml Buffer QBT 至 QIAGEN-tip 100 中，並使其藉由重力自然地濾過。
11. 將上清液加入 QIAGEN-tip 100 中，並且使其藉由重力過濾至 250 ml 的燒杯。
12. 加入 20 ml Buffer QC 濾洗 QIAGEN-tip 100，並以 50 ml 之離心管承接濾洗液。
13. 加入 5 ml Buffer QF 沖提 DNA。以 50 ml 之離心管承接。
14. 加入室溫的 3.5 ml Isopropanol 使 DNA 沉澱，混合均勻後立即以 15,000 g 在 4 °C 下離心 30 分鐘。小心地將上清液倒除。
15. 以室溫 2 ml 的 70% 酒精清洗 DNA 沉澱。
16. 以 15,000 g 在 4 °C 下離心 10 分鐘。小心地將上清液倒除，避免影響到 DNA 沉澱。
17. 風乾沉澱物 5~10 分鐘，並且將 DNA 回溶於適當體積的 TE buffer 中。
18. 存於 -20 °C 待用。

五、基因庫的篩選

(一)、3-AT 的篩選

使用 3-AT 以篩除轉錄因子無法與隨機結合序列基因庫結合之菌落。

1. 取基因庫 DNA 10 μ l 加入一管 100 μ l 之大腸桿菌勝任細（有 *HY5-pB1H1*，*AtbZIP16-pB1H1*，*AtbZIP17-pB1H1* 之大腸桿菌突變種 $F' \Delta hisB \Delta pyrF$ ）。
2. 冰浴 30 分鐘。
3. 採用熱休克 (heat shock) 的方法：將試管置於 42 °C 的水浴 30 秒。
4. 快速地將試管置於冰浴 90 秒。

5. 加入 900 μ l 之 SOC 培養液 於 37 $^{\circ}$ C 下震盪培養 1 小時。
6. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將上清液倒棄。
7. 加入 1 ml NM medium (lacking histidine，附錄三)。於 37 $^{\circ}$ C 下震盪培養 2 小時。
8. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將上清液倒棄。
9. 加入 1ml ddH₂O 潤洗，並以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將上清液倒棄。共潤洗四次。
10. 加入 1 ml NM medium，並且以 10 μ l 之菌液加入 90 μ l NM medium 的方式執行 10 倍系列的稀釋 7 次 (10^2 至 10^8)。
11. 取稀釋成的七種不同濃度之菌液各 5 μ l 塗抹於下列各培養基中：
 - a、 NM medium + Kan (25 μ g/ml) + Cm (30 μ g/ml) + IPTG (10 μ M) + 0.1% histidine
 - b、 NM medium + Kan (25 μ g/ml) + Cm (30 μ g/ml) + IPTG (10 μ M)
 - c、 1 mM 3-AT selective (positive) NM plates + Kan (25 μ g/ml) + Cm (30 μ g/ml) + IPTG (10 μ M)
 - d、 3 mM 3-AT selective (positive) NM plates + Kan (25 μ g/ml) + Cm (30 μ g/ml) + IPTG (10 μ M)
 - e、 5 mM 3-AT selective (positive) NM plates + Kan (25 μ g/ml) + Cm (30 μ g/ml) + IPTG (10 μ M)
 - f、 10 mM 3-AT selective (positive) NM plates + Kan (25 μ g/ml) + Cm (30 μ g/ml) + IPTG (10 μ M)
 - g、 2 \times YT medium + Kan (25 μ g/ml) + Cm (30 μ g/ml)
12. 置於 37 $^{\circ}$ C 下培養 2 天。
13. 以細胞刮除器蒐集所得之菌落 (方法如前述)。
14. 菌種保存 (方法如前述)。

(二) 、5-FOA 的篩選

使用 5-FOA 以篩除會自體活化之菌落。

1. 取載體 DNA 10 μ l 加入一管 100 μ l 之大腸桿菌勝任細胞 (大腸桿菌突變種 $F' \Delta hisB \Delta pyrF$) 。
2. 冰浴 30 分鐘。
3. 採用熱休克 (heat shock) 的方法：將試管置於 42 $^{\circ}$ C 的水浴 30 秒。
4. 快速地將試管置於冰浴 90 秒。
5. 加入 900 μ l 之 SOC 培養液 (附錄三) 於 37 $^{\circ}$ C 下震盪培養 1 小時。
6. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將上清液倒棄。
7. 加入 1 ml YM medium (附錄三)，於 37 $^{\circ}$ C 下震盪培養 1 小時。
8. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將上清液倒棄。
9. 加入 1ml ddH₂O 潤洗，並以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將上清液倒棄。共潤洗三次。
10. 加入 1 ml YM medium 回溶，均勻塗佈於含有 2 mM 5-FOA 與 25 μ g/ml knamycin 的 YM 培養基上 (附錄三)。
11. 置於 37 $^{\circ}$ C 下培養 2 天。
12. 以細胞刮除器蒐集所得之菌落 (方法如前述) 。
13. 菌種保存 (方法如前述) 。

研究結果與討論

一、轉錄因子 *HY5*, *AtbZIP16* 與 *AtbZIP17* 表現載體的建構

我們先以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction) 的方式將轉錄因子 *HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 三個基因 (附圖一) 放大, 接著, 利用限制酶 *KpnI* 與 *AvrII* 對 *HY5*, *AtbZIP16* 進行切割; 由於 *AtbZIP17* 基因序列上帶有限制酶 *AvrII* 的切位, 因此我們以切位可和 *AvrII* 互補的限制酶 *XbaI* 取代, 與 *KpnI* 進行 *AtbZIP17* 的限制酶切割。最後, 再將這三個轉錄因子建構在已利用 *KpnI* 與 *AvrII* 切割過的載體 pB1H1 上, 即為 *HY5*-pB1H1, *AtbZIP16*-pB1H1 與 *AtbZIP17*-pB1H1。

根據圖三, *HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 已成功選殖 (clone) 到帶有 RNA 聚合酶 α 次單元以及抗 chloramphenicol 基因的表現載體 pB1H1 (附圖二)。

二、隨機結合序列基因庫的建構與基因庫變異度的確認

(一)、隨機結合序列基因庫的建構 (此基因庫由中研院植微所 402 實驗室提供)

首先, 利用酵素 klenow 將單股的 18 個隨機寡核苷酸序列合成雙股, 再以限制酶 *NotI* 與 *AscI* 進行切割。然後, 以 250 : 1 (nmole) 的比例構築至載體 pH3U3 上 (附圖二), 接著轉形至 DH5 α 菌株中。經過計算後, 估計共長出 1.2×10^6 個獨立菌株 (unique clone)。

(二)、基因庫變異度的確認

根據過去的研究, 轉錄因子一般會結合 (bind) 在長約 6-bp 的 DNA 片段, 例如 *HY5* 會與 G-box (CACGTG) 序列結合 (Jakoby et al., 2002)。為了確保我們的基因庫擁有足夠的隨機結合序列變異度 (隨機序列長度至少 > 6-bp), 以提供 *HY5*, *AtbZIP16* 與 *AtbZIP17* 結合, 我們做了以下的測試與計算:

1. 選取 96 個獨立菌株送定序

本實驗是由建構好的基因庫中, 隨機抽取了 96 個獨立菌株的 DNA

送定序，結果共得到 146 條結合序列（表一）。探討其原因，是因為隨機結合序列黏合（ligate）至基因庫表現載體 pH3U3（*NotI*-*AscI*）的過程中，隨機結合序列（insert）可能自行相互黏合，只要結合序列自行相互黏合的個數為奇數，則首尾的限制酶切位一樣是 *NotI* 與 *AscI*，因此仍可和載體 pH3U3 黏合，例如：*-NotI*-18N-*AscI* - *AscI*-18N-*NotI* - *NotI*-18N-*AscI*-，形成多重插入子（mutiple inserts），於是會有 146 條結合序列存在於 96 個獨立菌株裡的情形發生。

2. 計算隨機結合序列基因庫的變異度

以得到的 146 條結合序列做為樣本，我們撰寫了 php 程式計算四個核苷酸 A, T, C, G 在這些序列中各個位置（位置 1 到位置 18）出現的比率（表二）。由上述之結果得知，我們所建構的隨機結合序列基因庫共有 1.2×10^6 個獨立菌株，理論上應含有 10-bp ($4^{10} \approx 1.05 \times 10^6$) 的序列變異度。而根據實際計算結果顯示，當我們選擇 99% 的信賴區間下，各個核苷酸在各位置出現之最小比率的信賴下限為 16.7% 來計算，基因庫的結合序列仍帶有接近 8-bp 的隨機片段。因此我們相信此基因庫的結合序列，至少帶有 7 至 8-bp 的隨機片段。雖然無法達到預估的 10-bp 序列變異度，此基因庫亦已包含足夠的結合序列變異度 (> 6-bp) 提供轉錄因子之辨識結合。

三、轉錄因子 AtbZIP16, AtbZIP17 與 HY5 結合序列的篩選

(一)、利用 *Zif268* 測試細菌單雜合系統的可行性

我們利用果蠅 (*D. melanogaster*) 的 Cys₂His₂ zinc finger protein—*Zif268* 的 DNA binding domain 與其辨識的結合序列（由 Scot A Wolfe 提供），進行細菌單雜合系統的測試。首先，將 *Zif268*-pB1H1 與 *Zif268*-pH3U3（正向控制組）、*Zif268*-pB1H1 與 pH3U3（負向控制組）、*Zif268*-pB1H1（Bait only）各取 10 ng 的質體 DNA 轉形至篩選菌株 F' Δ *hisB* Δ *pyrF* 中，再分別以 10 \times 系列稀釋的方式，將其塗抹在 NM、NM + 0.1 % hitidine、NM 分別含有 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM 3-AT 的不同篩選性培養基（25 μ g/ml kanamycin、30 μ g/ml chloramphenicol 和 10 μ M

IPTG) 以及 2×YT 的非篩選性培養基 (具有 25 µg/ml kanamycin、30 µg/ml chloramphenicol) 上。

結果顯示 (圖四):

1. 在 NM + 0.1 % histidine 與 2×YT 的培養基上，不論正向控制組或負向控制組，菌株都可以存活。雖然負向控制組在載體 pH3U3 上未帶有能被 Zif268 辨識的結合序列，無法表現 *HIS3* 基因生成 histidine，但菌株仍可獲得培養基上補充的 histidine 而存活。另外，Zif268-pB1H1 (Bait only) 因缺乏 prey，無法抗 kanamycin，所以不論在何種培養基上都不能生存。
2. 在其它培養基的菌株生長情形則應證了兩個事實。第一，在不補充 histidine 的培養基 (NM) 中，可發現正向控制組的菌株仍可存活，但負向控制組的菌株卻無法生長。因為正向控制組帶有能被 Zif268 辨識的結合序列，可以啟動 *HIS3* 基因生成 histidine。而負向控制組則不帶有結合序列，所以無法產生 histidine，不能生長。第二，隨著 3-AT 濃度的增加—1 mM, 3 mM, 5 mM 到 10 mM，可以很明顯的看到正向控制組菌株的生長受到抑制：在加入 1 mM 3-AT 時菌株依然可以生存；提高至 3 mM 時生長情形已明顯受到壓抑，而 5 mM 與 10 mM 的環境下則完全不能生長。這代表藉由控制 3-AT 的濃度，我們的確可以篩除 Bait 所不辨識，或雖辨識但結合力較微弱的序列。
3. 在這六個培養基中，編號 1、2、3 由左至右，我們分別做了 10× 的濃度系列稀釋，依次為 2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 ，因此菌株生長數量會隨著稀釋倍數而減少，但其所代表的細菌轉形效率則會隨之增加。藉由觀察菌株的生長情形，我們可計算轉形效率 (transformation efficiency)，作為未來實驗的參考。結果顯示，10 ng DNA 的轉形效率約為 2×10^5 。

綜合以上三點，我們確定細菌單雜合系統具有再現性，確實可以使用。

(二)、第一階段 3-AT / *HIS3* 篩選之結果

1. *HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 的 3-AT 篩選濃度之測試

此階段的目的主要是以 3-AT 進行篩選，去除掉 *HIS3* 基因無法表現或表現量微弱的菌株。根據 Meng 與 Wolfe 的研究顯示，理想的 3-AT 濃度，是足以篩選出數十至數百顆菌落存活的濃度。而 Zif268 在 5 mM 的 3-AT 濃度下，約可存活 800 個菌落，視為最理想的狀況 (Meng et al., 2005)。因為選擇過低的 3-AT 濃度，會使得存活的菌株數量太多，將不能篩除被 Bait 辨識但結合力弱的 Prey。反之，若存活的菌株數量很少，則意味篩選濃度過高，很可能連帶有正確結合序列的 Prey 也一併篩除。因此選擇足以篩出約數十至數百顆菌落存活的 3-AT 濃度，應最為合理。

為了選擇適當的濃度，我們一共進行了二次實驗，分別說明如下：

i. 初步選擇 3-AT 篩選濃度 (表四)：

我們將建構完成的 18N 隨機結合序列基因庫，分別與 *HY5-pB1H1*, *AtbZIP16-pB1H1*, *AtbZIP17-pB1H1* 三種 Bait 共同轉形至 $F' \Delta hisB \Delta pyrF$ 中，並塗抹在 NM、NM + 0.1% hitidine、NM 分別含有 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM 的 3-AT 以及 2×YT 等不同的培養基上進行篩選 (表四)，結果顯示：*HY5-pB1H1* 以 1 至 10 mM 四種濃度的 3-AT 篩選皆可存活，存活菌落數依次為 8000, 800, 600 及 400 顆，轉形效率約為 2×10^5 。所以在 3 mM, 5 mM, 10 mM 的篩選環境，生長情形最符合我們希望得到約略數百顆存活菌落的期待。由於 10 mM 的 3-AT 濃度下菌落生長明顯受到壓抑，因此針對 *HY5-pB1H1*，我們決定暫時選擇 3 mM、5 mM 的 3-AT；而 *AtbZIP16-pB1H1* 只能在 1 mM 的 3-AT 濃度下生長，因此我們決定選擇 1 mM 與 3 mM 的 3-AT 做篩選；*AtbZIP17-pB1H1* 則在四種濃度的 3-AT 篩選下都可以生存，但在 5 mM 與 10 mM 的 3-AT 濃度中，菌落大小明顯受到抑制，顯示在此濃度的篩選下菌株的生長情況不佳，因此我們決定暫時選擇 1 mM 與 3 mM 的 3-AT。

ii. 篩選濃度的再次確認（表五）：

HY5-pB1H1 在 3 mM, 5 mM 的 3-AT 篩選下，長出超過我們預期的 2760 與 1560 顆菌落；另外，在 1 mM, 3 mM 3-AT 的篩選下，*AtbZIP16-pB1H1* 分別長出 2632, 1464 顆；而 *AtbZIP17-pB1H1* 則也長出了 1902, 1120 顆菌落，這些都超出我們原先的預期。經過這部分的實驗，我們發現實驗 3-2 所選擇的 3-AT 濃度並不是最佳條件。因此，我們再次提高 3-AT 的濃度至 7.5 mM 與 10 mM。

2. 以 7.5 mM 與 10 mM 的 3-AT 濃度進行篩選（表六）：

在 7.5 mM 與 10 mM 的 3-AT 濃度下，我們一共進行了兩次篩選實驗，而 *HY5-pB1H1*, *AtbZIP16-pB1H1*, *AtbZIP17-pB1H1* 在兩次篩選下皆剩餘約 230 至 630 顆菌落存活（表六），符合我們希望得到的菌落數量。因此我們大量抽取兩次實驗所得的菌株質體 DNA，進行第二階段的篩選。

(三)、第二階段 5-FOA / *URA3* 篩選之結果

此階段的篩選目的主要是篩除在不帶有 Bait 的情況下，會自行活化的菌株。但由於在第一階段實驗後所抽取的質體 DNA 同時含有 Bait 與 Prey 兩種質體，為避免 Bait 上的轉錄因子與 Prey 結合，因此針對此階段的篩選，我們必須先以限制酶 *XmnI* 切割 Bait (*HY5-pB1H1*, *AtbZIP16-pB1H1*, *AtbZIP17-pB1H1*) 的部分。由電泳圖的結果（圖五），可以看出 Bait 已確實切割乾淨。接著，我們純化經 *XmnI* 切割過的質體，並直接轉形至 $F' \Delta hisB \Delta pyrF$ 篩選菌株中。最後，再塗抹於 2 mM 5-FOA 與 25 $\mu\text{g/ml}$ knamycin 的 YM 培養基上，進行第二階段的篩選。經過 37°C、兩天的培養，*HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 在 2 mM 5-FOA 的 YM 培養基上分別存活了 89, 78, 118 顆獨立菌株（圖六、表七），這些存活的菌株即很可能帶有轉錄因子 *HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 的結合序列。

四、DNA 定序與結合序列之分析

(一)、DNA 定序之結果

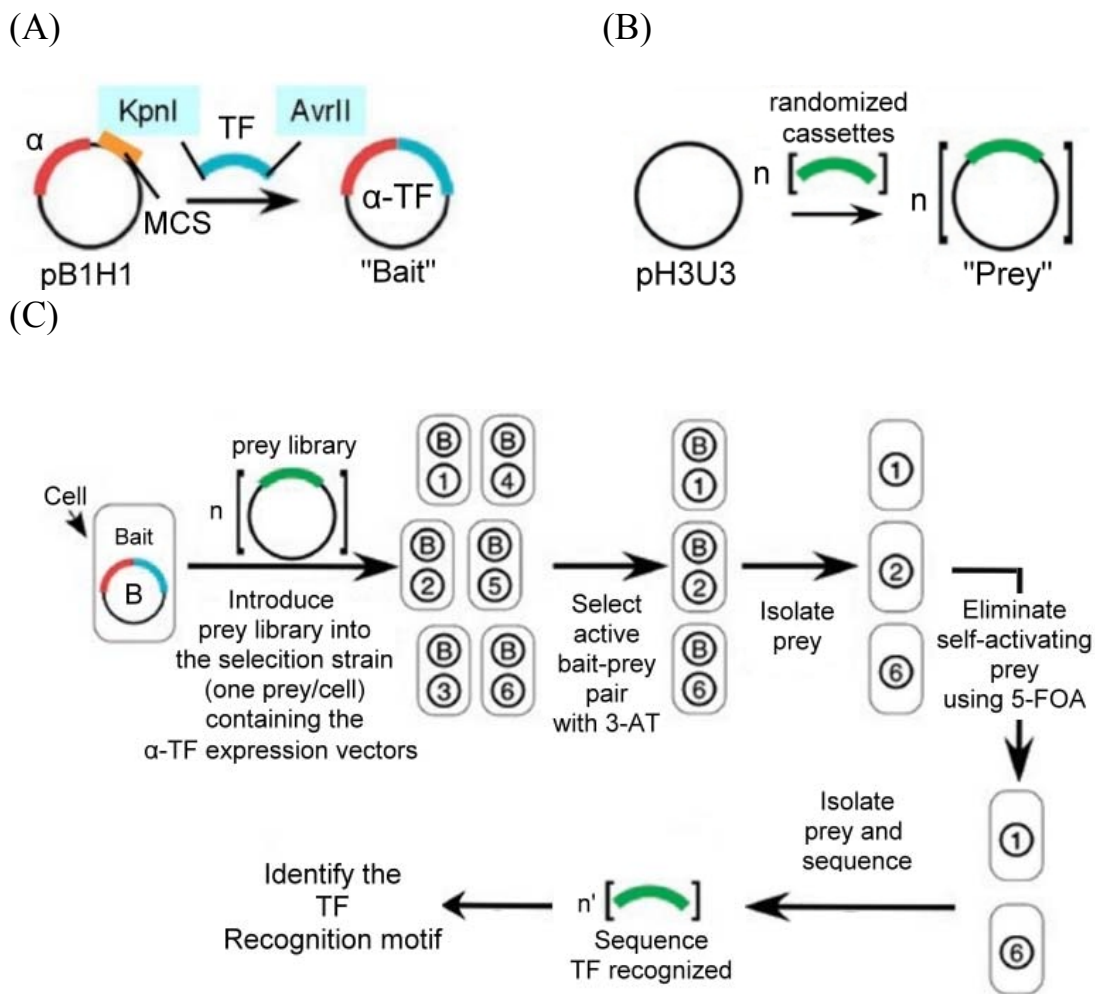
針對 *HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17*，我們分別從 89, 78, 118 個獨立菌株裡挑選了 42, 30, 31 個菌落，抽取質體 DNA 後送定序。結果顯示，*HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 一共找到了 9、7、10 種不同的可能結合序列（表八）。將上述找到的 *HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 結合序列各自進行比對，結果並未發現具有高保守性的片段（consensus sequence），推測可能是因為我們在第一階段篩選時選擇的 3-AT 濃度太高所導致；而高濃度的 3-AT 篩選，代表所篩選到的結合序列與轉錄因子結合能力較強，同時亦降低了 false positive 的機率。此外，在 *HY5* 的可能結合序列中，我們也確實找到 positive control：G-box，增加了實驗的可信度。

(二)、結合序列與資料庫比對之結果與分析

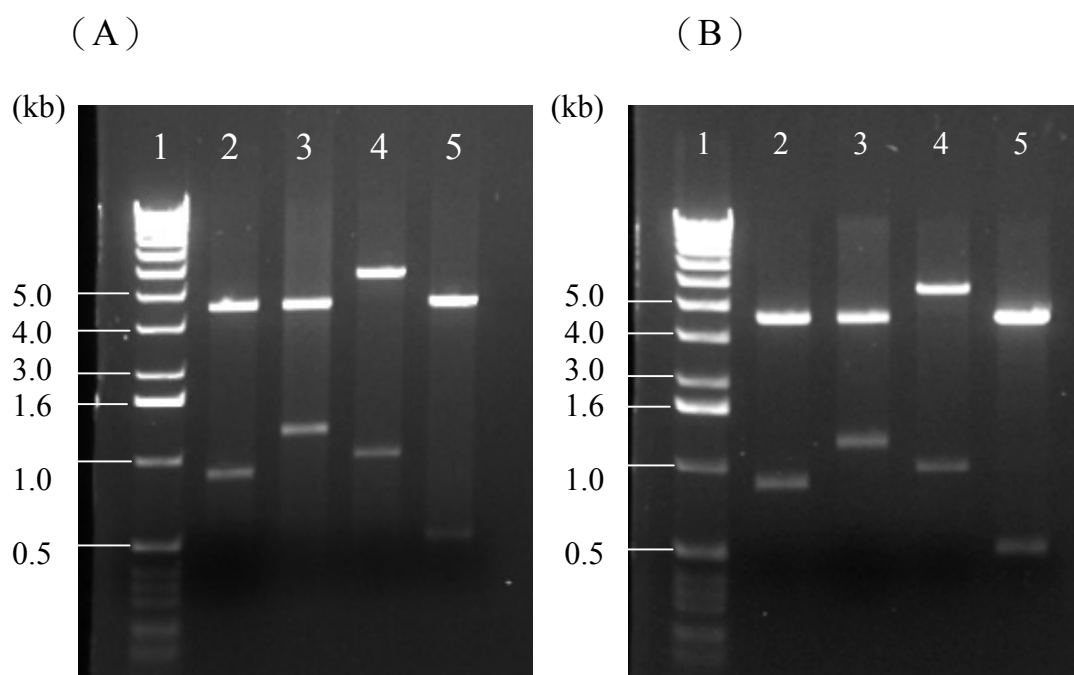
比對資料庫：plantCARE (bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) 與 PLACE (www.dna.affrc.g-o.jp/PLACE/) 並進行分析，我們發現這三個轉錄因子其結合序列上帶有的 motifs 功能，主要參與在光調控（28%）、組織發育（18%）、環境逆境反應機制（17%）、病原菌的防禦（14%）、賀爾蒙調節（12%）以及鈣離子的訊息傳遞（11%）等方面，其中又以光調控佔最大的比例（圖七），表示 *HY5*, *AtbZIP16*, *AtbZIP17* 在阿拉伯芥的功能與光調控有極大的關聯。已知 *HY5* 在光訊息傳遞過程中是一個相當重要的正向調節因子（Ulm et al., 2004），符合我們推測 *AtbZIPs* 以光調控為主要功能的事實。再者，藉由將 motifs 的功能繪製成文氏圖（圖八），由圖可明顯的看出，這三個轉錄因子雖同屬於 *AtbZIP family*，據推測也皆受到光的調控，並可能參與某些相似的生理調節過程，例如參與光的調控、病原菌的防禦等等，但彼此間亦各自具備獨特的功能，如 *HY5* 參與花、分生組織的發育；*AtbZIP16* 參與賀爾蒙 auxin 的調控；*AtbZIP17* 參與調控保衛細胞的相關功能等，在在影響著植物體的發育。如此的差異，表示這三個轉錄因子有實質上的不同，值得我們更深入的研究。

此外，我們將這些序列再以阿拉伯芥資料庫（Tair; www.arabidopsis.org）比

對阿拉伯芥所有基因上游 1000-bp 的啓動子序列，找出轉錄因子 HY5, AtbZIP16 與 AtbZIP17 可能調控的下游基因，並以 microarray 資料庫 (Genevestigator; www.genevestigator.ethz.ch) 進行分析。我們發現：含有這些結合序列的基因，在 light (white、red、far red、blue、UV light)；hormone (ABA、ethlene、salicylic acid)；stress (cold、drought、heat、salt、wounding) 等不同環境因子處理下會被活化。



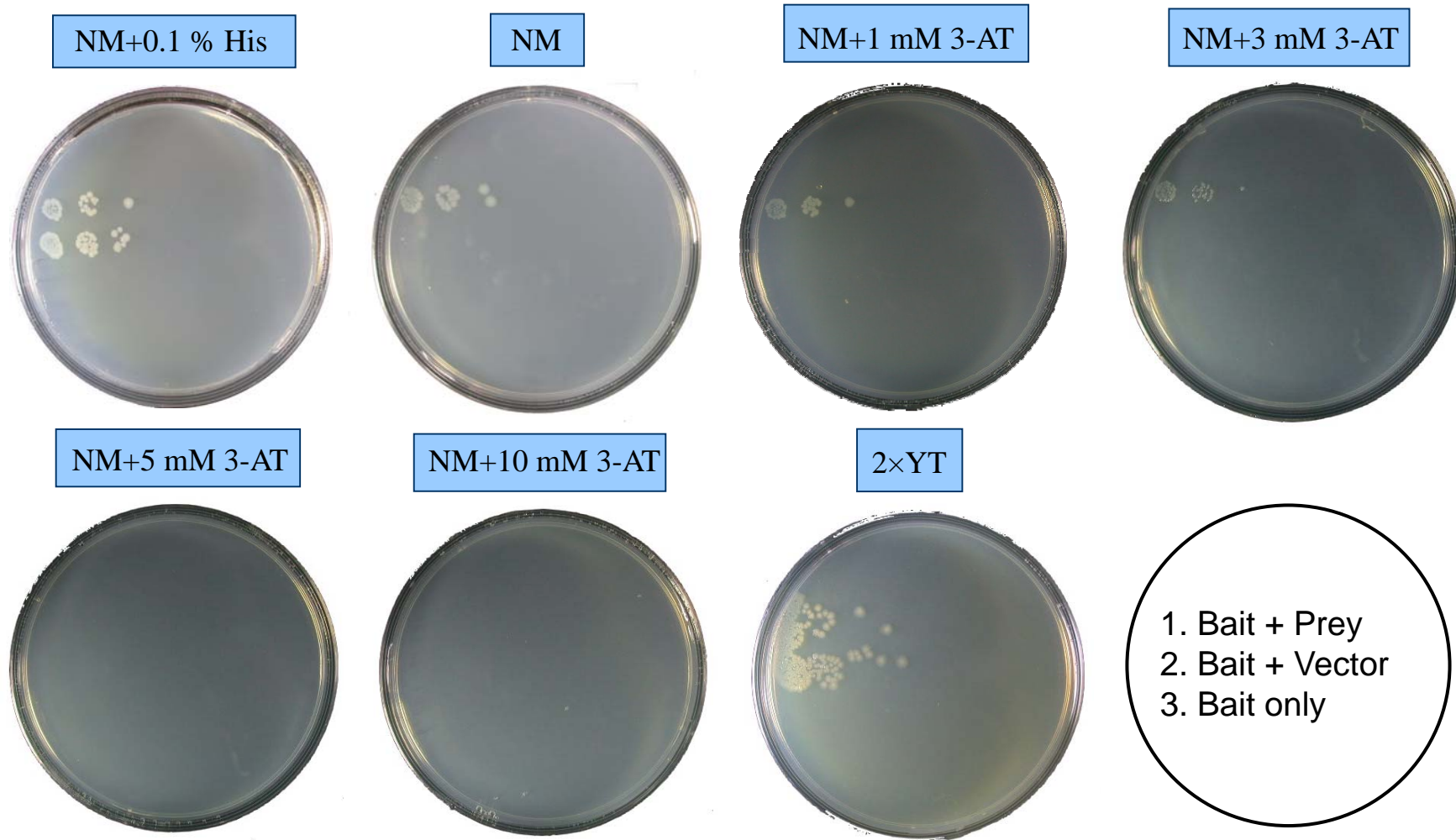
圖二 | 概述細菌單雜合系統。(A) Bait 的建構：將轉錄因子選殖至帶有 RNA 聚合酶 α 次單元的載體 pB1H1 以製成 Bait。(B) Prey 的建構：將帶有報告基因 *HIS3* 與 *URA3* 的載體 pH3U3 接入 18-bp 的隨機結合序列。(C) 結合序列基因庫的篩選過程：將 Prey 送入事先製備好而含有 Bait 的勝任細胞，並以 3-AT 篩除無法表現 *HIS3* 基因的菌株。然後分離出 Prey，再以 5-FOA 篩除可自行活化而表現 *URA3* 基因的 Prey，經兩階段篩選仍存活的菌株即帶有 Bait 可辨識的結合序列，經定序後，即可作進一步的分析。



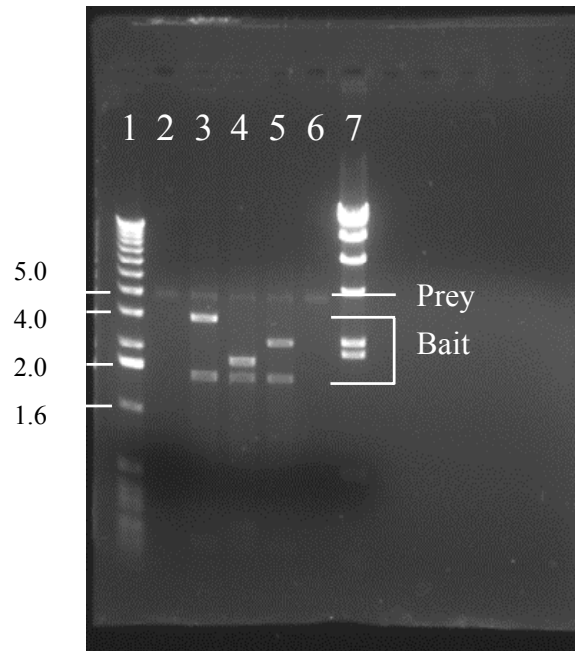
圖三 | Bait 之電泳圖。(A) 在 Bait 建構完成後，以限制酶 *KpnI* 及 *AvrII* 檢驗。Lane 1-5 為：1 kb maker、pB1H1 (3595 kb) + *Dorsal** (890 kb)、*AtbZIP16* (1230 kb) - pB1H1, *AtbZIP17* (1010 kb) - pB1H1, *HY5* (507 kb) - pB1H1。(B) 將 Bait 轉形至大腸桿菌篩選菌株 (strain : F'△*hisB*△*pyrF*) 後，抽出質體 DNA，同樣以限制酶 *KpnI* 及 *AvrII* 檢驗，lane 1 - 5 亦分別為 1 kb maker、pB1H1、*AtbZIP16* - pB1H1, *AtbZIP17* - pB1H1, *HY5* - pB1H1，DNA 片段大小同上。

* : *Dorsal* 基因來自果蠅，*D. melanogaster*，取得 B1H 實驗材料時即接合在載體 pB1H1。

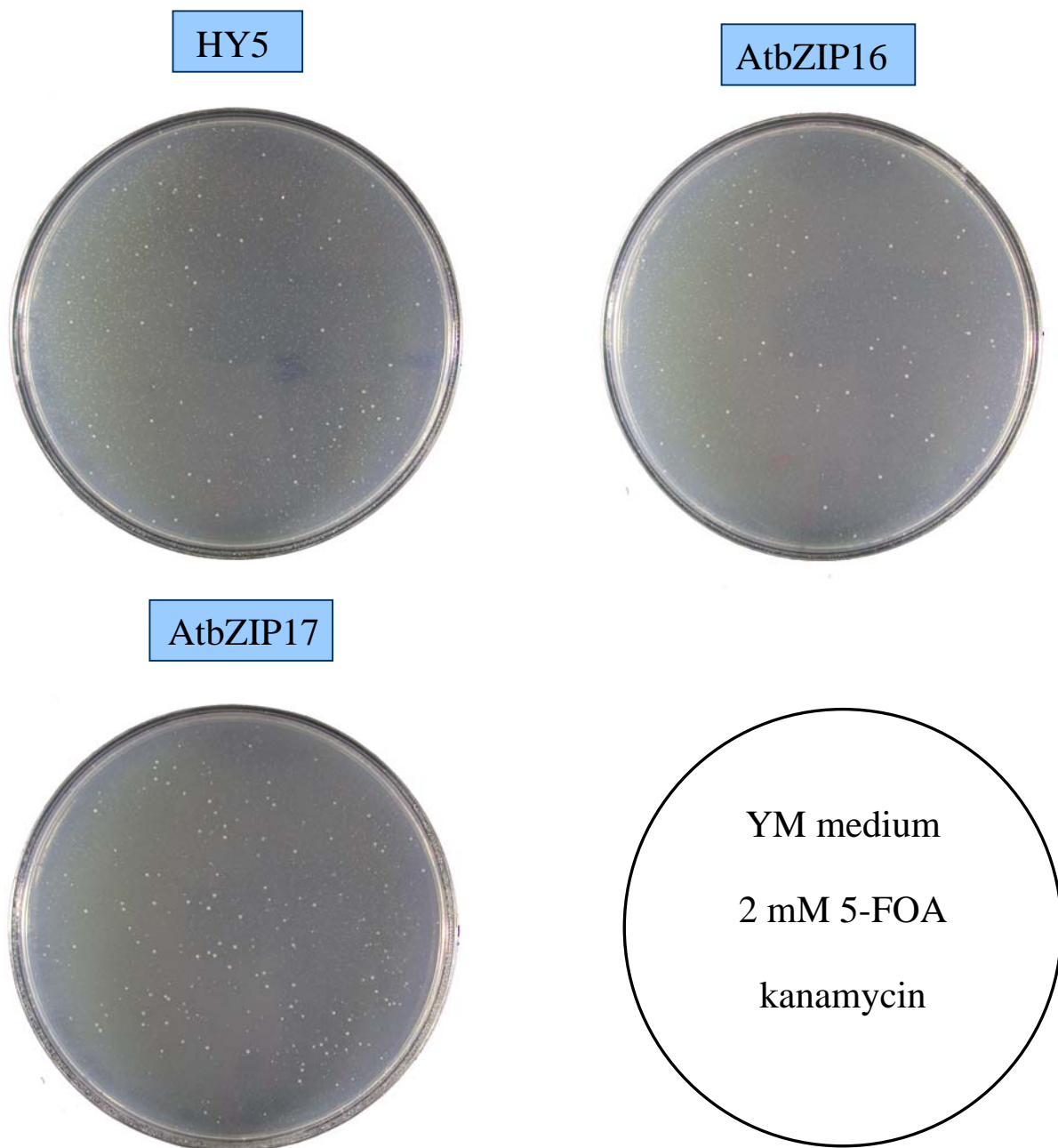
** : *AtbZIP17* 基因序列帶有限制酶 *KpnI* 的切位，因此在 lane5 的 pB1H1 上帶有部分 *AtbZIP17* 的片段，而使其分子量較其餘三者大。



圖四 | 以 *Zif268* 測試細菌單雜合系統。Bait : *Zif268* - pB1H1, Prey : *Zif268* - pH3U3, Vector : pH3U3。

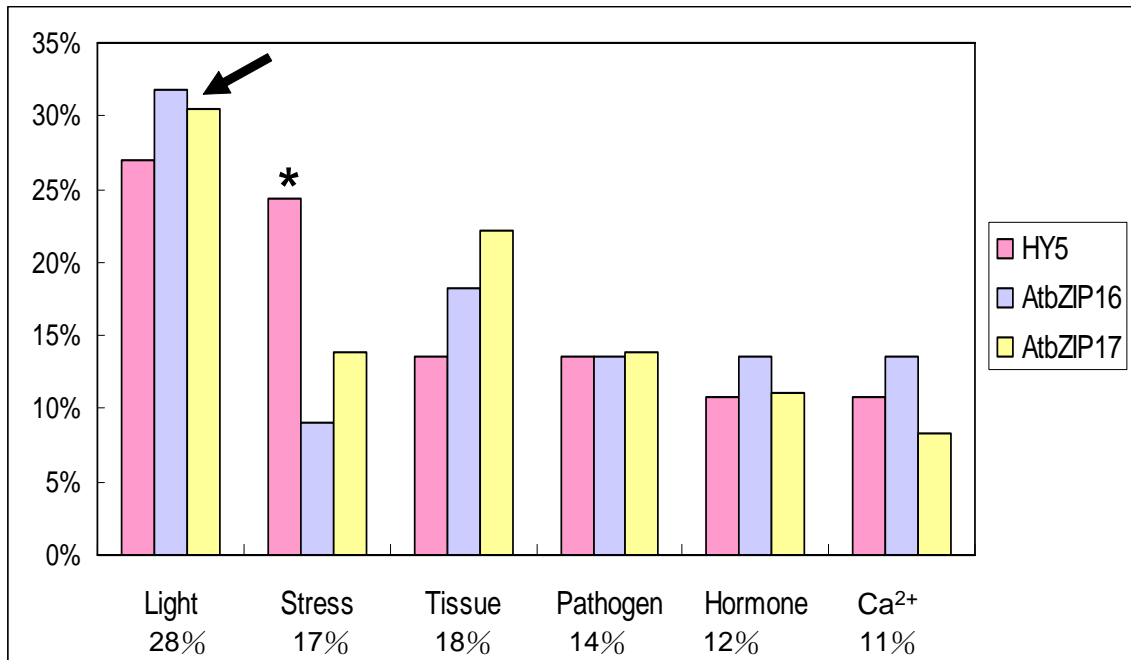


圖五 | 以限制酶 *XmnI* 分離 Bait 與 Prey。lane 1 – 7 分別為：1kb marker, Prey, *AtbZIP16* - pB1H1, *AtbZIP17* - pB1H1, *HY5* - pB1H1, Prey, λ HindIII。我們將經過第一階段 3-AT / *HIS3* 篩選仍存活的菌株抽取質體 DNA，然後以限制酶 *XmnI* 切割，分離出 Prey，並跑電泳檢驗。其中 lane 2 與 lane 6 的 Prey only，目的是為讓我們確認以 *XmnI* 切除 Bait 片段後，*AtbZIP16*, *AtbZIP17*, *HY5* 的 Prey 的位置。

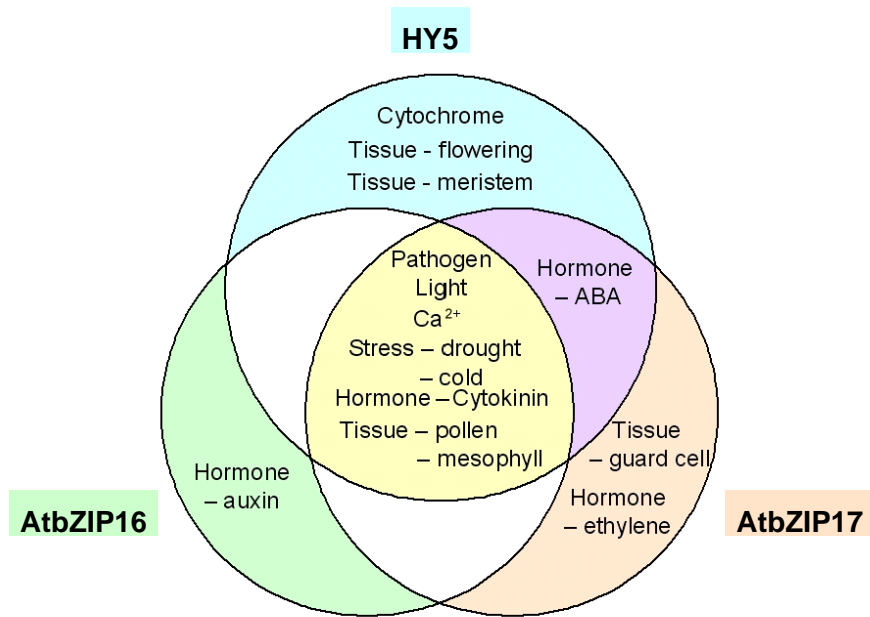


圖六 | 第二階段 5-FOA / *URA3* 的菌株生長情形

將限制酶 *XmnI* 分離出的 Prey 以 5-FOA / *URA3* 進行第二階段的篩選，培養基為 YM + 2 mM 5-FOA + kanamycin，明顯的可以看到大多數的菌株生長受到抑制，而生長情形較佳的即可能為帶有正確結合序列的 Prey 菌株。



圖七 | 序列資料庫分析— motifs 的功能分類結果：將 HY5、AtbZIP16、AtbZIP17 可能結合序列上帶有的 motifs 功能分成六類：light (28%)，stress (17%)，tissue (18%)，pathogen (14%)，hormone (12%)，Ca²⁺ signaling (11%)。由圖可明顯看出，不論是哪一種轉錄因子的 motifs 功能，皆以光調控方面佔最大比例 (箭號)。此外，HY5 對環境逆境的相關功能則佔有特別大的比例 (星號)。



圖八 | 序列資料庫分析—文氏圖：將 HY5、AtbZIP16、AtbZIP17 可能結合序列上帶有的 motifs 功能繪製成文氏圖，我們發現，三個轉錄因子可能共同參與調控某些類似的生理功能，亦各自具備不同的功能。

表一 | 隨機結合序列基因庫定序之結果。

1	GCAGAGTTTAAGCTATCT	36	AAGGGGAAATGTCTTTCA
2	ACGTCGGCATCGGCTCTA	37	AGGCCTAAGGTATTTTAG
3	GCGGTCACGCGTATACTT	38	ACTTCAGATATTTCTTG
4	GAAAAGCGTGTACTTTCT	39	GAACAGCTTTGTGGACTC
5	ATTAAAAAAGTGTAATTA	40	TAAAGGCTGTAGGGCATA
6	TCGGTAAATTAATAAGTG	41	GACATGTCGCTATGGTTT
7	CGCTCGGTTAAGCTGAGC	42	TCGCTATGGGGACGAGAA
8	AGCCGTGCATATTCGCAT	43	GGCCGTGTGGCTATGTGG
9	ATGAAGATTCGCCCCGGC	44	GTGTTGCTTTTGGGCGTA
10	GGTAAGAAGCTCCTTGGC	45	CTTGTTACGGTTCTTTTA
11	AGGCAAAAACCACCGAGT	46	ATATTATTGTTCTTGCTA
12	CACTACGTAAGAACTACT	47	GGGCAAGGTTTTTAGATG
13	AGTTCCGCTGTTAAGCGA	48	GGTAGTAAGGTTATGGAT
14	TTTCAGTGGTTAATCACG	49	CCGGTAAGGGTCCTGGAT
15	GTCCAGATTGGTCTACCA	50	CATATGTTTGGAGAAATT
16	GTAGTGGTTGGACTCACA	51	ATATGGTTTCCGTAGACT
17	AGCTCAGTGGAGGTTTGA	52	ATATGTTTACGGTACCTC
18	GATTAGCGGGGGGCCCCC	53	GATACTTAGGGCATT CAT
19	TCAGAACAGGTGGGTCAT	54	ACTCGATCTATGTATGAT
20	GAGAAATCATGTGGGTAA	55	ATACGCCGGCCACACTTT
21	ACCCAGAGCGGAAATTTT	56	AATGAACGGTTTGTCCGG
22	GCGCCAGGCCGGTAACAT	57	CTGCGTAATGCGCGGTTT
23	GTGAAGACGCAGGGAAAC	58	ACTTCGTATGGGGGCTTC
24	GAATAGAACGGACGGCAG	59	CGCTTGGCGCTGCGTCTG
25	GCTTGCATCCTCAGCCGC	60	CTGCACCGCGAACTGTCT
26	CATCCGATGCAACCTCAG	61	GCGGGGTTCTACCTATGT
27	AAGAATGGTAGTTCTCTG	62	CTACCGGGTCATCAGGCT
28	GGTAGCTGCTAGTTCTGG	63	CTGACGTGATTTAGATAT
29	ATGCAAGTGTTTCGGGAAG	64	AAATGCCGTGTATTAGGA
30	CTTATAGATGCGCGTTGT	65	GCAGCCGATCCTGTCCAT
31	ATGCTCATCGTGGGGAAG	66	CGGCGACTTCTGCAGGTT
32	AATAGTGTGATTTAGTTT	67	AAGGAAAGTCTAATGTGG
33	AAAGTGCGTTTTTCTTCTA	68	GTTAAATCCGAAGTTGGA
34	GAAGCATTTTTTATATTA	69	CTGTTTTTTGGTTTGGAA
35	GCTTGAGTAGTTTGTATC	70	GTTTATTTGAGTTTGTCT
71	TATAATTCAGTTAGGGA	109	CTCCATGACATCCCGGAT
72	GTAGTAGTTGAGTTGCAT	110	AGCAGTACCCAGTAAGTG
73	CTACGCGTTGTTTTGCAT	111	TGCTGGCTTGTCTCTCT

74	TGGCGTTCTTTCGTATTG	112	TTTCCCCTCGGGTGATT
75	TAAACTGCGGTTAATGTT	113	TAGACGGCTTTTCCCAAT
76	GTGTCGATTGCGATCATC	114	GTCTGAAATTTTTCGCTC
77	GACCAACTATGGTCTAAT	115	GTCTGAAATTTTTCGCTC
78	GGGCCAACTGCTATAGTG	116	GTCCTGTAATGTTCCCTC
79	CCTCGTCGGCCGGTGAAT	117	GGCCTGCCTGCCATATGT
80	ACGGCCTGATGAATGCTT	118	GTGGCCATTTTACATTGT
81	AGCGGGTTGGATCGGACT	119	TACCCCATCTAACAGAG
82	GTTCCGGAAATATTGGAC	120	GATTGCTCTCGTTTGCTA
83	TGGTGCGGATGTCTATTT	121	CTCGGGCCGATGTTGTGT
84	TGATGCAGAATTGTAGTG	122	ACCAATGACCCTACTTTC
85	AACGGGAGTATAGTAGAG	123	GCTATCCTTCTTTCGTTC
86	CTGTCTCCTCGCAGGGAG	124	TTCTAGGTGCAACATTAC
87	GTCTCCCTGCAGGTCTCG	125	GTATGTCTTGTTTCGATAG
88	GATGGTCTTCTTGATGGA	126	TCCTTGTTACTCCCTTCG
89	ATGACGGACTACGTGAAG	127	CGTTCGTACTIONGATTA
90	ATACTCTCGCAGCAAGCT	128	TACCTCATGGCCATTAT
91	AATAGTCTTGAGGCGATT	129	TTATGTTCCATCCACGTT
92	GATACTGGTTACAAAGTT	130	GGTTCAGTTTAACTTAAT
93	CCAGATTAGTGGCCACAG	131	TGGTCTTAGTATCTCACG
94	GTCTAGTGACCACAGAGA	132	GTCAAAGTGTCACCAGCT
95	GTCGATTATGCGTTCCGG	133	TCAACGTTCCCTGAAGCGG
96	GACTTTGGGTTGCGAAAT	134	TTTCGTCTAGTGCTTGAA
97	GGTTGTGGGAAGCGGTGG	135	GATCGTGATGTTCTTTAA
98	CATCGATTTTGGCAACAT	136	CCGAATAGTCTTCGTGTC
99	ATTTTGTGCTCTGCGCCC	137	CGAAATACTCATTCTGAT
100	TTGTGCTATCTGTGCGGT	138	CGTTCACCATAGTAACCG
101	TTCTCGGTAGTGTACTTA	139	TTATATAGAAACCGCTTC
102	TTTCTCGGATCTGTGACG	140	GGGCGGCCTAGATAATCT
103	AGTCTTATTACCCCGAAT	141	TTGATCCGCCTAGGTCAT
104	TTATGTATTCCCCGAATG	142	CCCTTAGATCACTGTAAT
105	TTTATTGTGATCCCCGGT	143	CCCGTTAGAACATCCTAA
106	TGGCGTCATACTGACGAT	144	AGTCAGTCAGATTGGAAC
107	TCGGCGCTTACTGGACAA	145	TCGATTTACGACCGCTAG
108	GGCCGCGCACTCGACCGA	146	TCCCACTAGATATCGAGG

表二 | 146 條序列定序結果。

核苷酸 A, T, C, G 在各個位置出現的比率				
位置	A	T	C	G
1	24.657%	21.917%	18.493%	34.931%
2	22.602%	35.616%	19.863%	21.917%
3	19.178%	28.767%	23.972%	28.082%
4	22.602%	30.821%	29.452%	17.123%
5	26.027%	21.232%	23.287%	29.452%
6	21.232%	28.082%	18.493%	32.191%
7	24.657%	27.397%	20.547%	27.397%
8	22.602%	35.616%	19.863%	21.917%
9	17.808%	41.78%	13.698%	26.721%
10	16.438%	26.712%	26.027%	30.821%
11	21.232%	40.41%	17.123%	21.232%
12	21.232%	32.876%	17.123%	28.767%
13	15.753%	28.082%	34.931%	21.232%
14	21.917%	36.986%	19.178%	21.917%
15	22.602%	23.972%	20.547%	32.876%
16	21.917%	30.136%	24.657%	23.287%
17	32.876%	32.191%	15.753%	19.178%
18	19.863%	39.726%	15.753%	24.657%

註：以此結果做進一步的計算，在 99% 的信賴區間下，各個核苷酸在各位置出現之最小比率 (粗體) 的信賴下限為 16.7%，單一個位置而言，需重複約 $1 \div 0.167 \approx 5.99$ 次才能確定 A, T, C, G 在該位置皆出現。結合序列基因庫所含有的獨立菌株數量為 1.20×10^6 介於 $5.99^7 \approx 2.77 \times 10^5$ 與 $5.99^8 \approx 1.66 \times 10^6$ 之間，因此我們相信此基因庫的結合序列，至少帶有 7 至 8-bp 的隨機片段。

表三 | 利用 *Zif268* 測試細菌單雜合系統。

Medium	<i>Zif268</i> -pB1H1 + <i>Zif268</i> -pH3U3	<i>Zif268</i> -pB1H1 + pH3U3
NM + 0.1 % His	+	+
NM	+	+/-
NM + 1 mM 3-AT	+	-
NM + 3 mM 3-AT	+	-
NM + 5 mM 3-AT	-	-
NM + 10 mM 3-AT	-	-
2 × YT	+	+

- +號代表有菌株生長；-號代表沒有菌株生長；+/-代表雖有菌株，但生長情況不佳。

註：分別將 Bait (*Zif268*-pB1H1) 與 Prey (*Zif268*-pH3U3)；Bait 與 Vector (pH3U3) 送入七種不一樣的培養基 (皆加入 25 µg/ml kanamycin、30 µg/ml chloramphenicol 以避免雜菌生長)：

1. NM + 0.1 % Histidine + IPTG
2. NM + IPTG
3. NM + 1 mM 3-AT + IPTG
4. NM + 3 mM 3-AT + IPTG
5. NM + 5 mM 3-AT + IPTG
6. NM + 10 mM 3-AT + IPTG
7. 2×YT

菌株生長情形如圖四，統整結果則列於表三。

表四 | 轉錄因子 HY5, AtbZIP16, AtbZIP17 的 3-AT 濃度初步測試結果。

Medium	HY5 / Prey library	AtbZIP16 / Prey library	AtbZIP17 / Prey library
NM + 0.1 % His	++++	+++	++++
NM	+++	++	++++
NM + 1 mM 3-AT	++	++	++
NM + 3 mM 3-AT	+	-	+/-
NM + 5 mM 3-AT	+	-	+/-
NM + 10 mM 3-AT	+	-	+/-
2 × YT	++++	+++	+++

註：以不同濃度（1 mM, 3 mM, 5 mM, 10mM）的 3-AT 篩選結果。菌株生長數量以 + 表示：+ 代表 10^2 , ++ 代表 10^3 , +++ 代表 10^4 , ++++ 代表 10^5 。-號代表沒有菌株生長；+/-代表雖有菌株，但生長情況不佳。

表五 | 3-AT 篩選濃度的再次確認。

Medium	HY5 / Prey library	AtbZIP16 / Prey library	AtbZIP17 / Prey library	
NM +1 mM 3-AT		2632	728	1902
NM +3 mM 3-AT	2760	1464	628	1120
NM +5 mM 3-AT	1560			

註：以 3 mM, 5mM 的 3-AT 篩選 HY5 / Prey library；另外以 1 mM, 3 mM 的 3-AT 篩選 AtbZIP16 / Prey 與 AtbZIP17 / Prey，數字代表經篩選後存活的菌株數量。

表六 | 第一階段 3-AT / *HIS3* 篩選的結果。

Medium	HY5 / Prey library	AtbZIP16 / Prey library		AtbZIP17 / Prey library	
NM + 7.5 mM 3-AT	563	454	313	522	583
NM + 10 mM 3-AT	633	456	232	419	517

註：以 7.5 mM, 10mM 的 3-AT 篩選 HY5 / Prey library, AtbZIP16 / Prey, AtbZIP17 / Prey，數字代表經篩選後存活的菌株數量。

表七 | 第二階段 5-FOA / *URA3* 的篩選結果

	[5-FOA]	Approx number of surviving clones
HY5-Prey		89
AtbZIP16-Prey	2 mM	78
AtbZIP17-Prey		118

註：轉錄因子 HY5, AtbZIP16, AtbZIP17 的 Prey 經第二階段 2 mM 5-FOA / *URA3* 篩選的結果。

表八 | 結合序列定序後與資料庫 (PlantCare, PLACE) 的比對結果

(A) 42 unique clones for Prey of HY5

Identify number	Identify clones	Unique sequence (ggccgc-18N-atgata) 30 mer	Site name
1	19	ggccgcCGAAGAGCCTAGGTGTGTctgata	GCCCORE / NODCON2GM
2	14	ggccgcATCGATTCAATTGCTGTAActgata	CAAT-box / MBS / ARR1AT
3	7	ggccgcCCTTATCATAGAGTTTAActgata	I-box / Sp1 / MBS / GCCCORE
4	1	ggccgcGTGGTAACATAACCTAGTctgata	G-box / ABRE / CGCGBOXAT SORLIP2AT / SITEIIATCYTC / GC-
5	1	tatcagATTCACCTTGGCCAGCgcgcc	motif / ARR1AT / CGCGBOXAT / GTGANTG10
6	1	ggccgcTGACCGCAAGTTGACAActgata	MBS / E-box / BIHD1OS / W-box AE-box / CAAT-box /
7	1	ggccgcGCTATAATAAGATTGTTctgata	CCA1ATLHCBI / ARR1AT / CGCGBOXAT / CARGCW8GAT / POLLEN1LELAT52
8	1	tatcagGGGATCGACAGCTGGTgcgcc	CBFHV / MBS / E-box
9	1	ggccgcGCTGGCTGCATCATGCCActgata	SORLIP1AT / CGCGBOXAT / CAT- box / CACTFTPPCA1

(B) 30 unique clones for Prey of AtbZIP16

Identify numbers	Identify clones	Unique sequence	Site name
1	12	ggccgcGGCCGGCGAAGCTGTGCctgata	CGCGBOXAT
2	13	ggccgcGTCGTTTGCCAGGGTGGCctgata	Sp1 / SORLIP1AT / TGA-element / CGACGOSAMY3 / CGCGBOXAT
3	13	tatcagGACATACATAGCCTCAAGgcgcc	GCCCORE
4	13	ggccgcTTTCGATTTTCAATGATGctgata	CAAT-box / circadian / DOFCOREZM / LTR / ARR1AT DOFCOREZM / GCCCORE /
5	5	ggccgcCTGCGTGCGCTTACTTTctgata	CACTFTPPCA1 / POLLEN1LELAT52 GC-motif / W-box / CGCGBOXAT /
6	5	tatcagGCTGACTCTCACCCAGCgcgcc	GTGANTG10 / QELEMENTZM13
7	5	ggccgcTACGACCTTCATTTAAATctgata	ARR1AT







(C) 31 unique clones for Prey of AtbZIP17

number	Identify clones	Unique sequence (ggccgc-18N-atgata) 30 mer	Site name
1	23	ggccgcAGGCCCTGCCTTTATTCTctgata	-10PEHVPSBD / DOFCOREZM / SORLIP2AT / TAAAGSTKST1
2	23	tatcagAAAGACTTATAAACCTCCgcgcc	DOFCOREZM / CGCGBBOXAT / POLLEN1LELAT52
3	23	ggccgcGTGCGTGCAGTTCTGACActgata	ABRE / BIHD1OS / W-box / CGCGBBOXAT / CACTFTPPCA1
4	23	tatcagCCCGTGTAAAGTAATACGGgcgcc	Sp1 / DPBFCORED3 / GCCCORE / CACTFTPPCA1
5	7	ggccgcAAGTAA TTTCAA AATAACctgata	Box I / ERE / CACTFTPPCA1
6	7	tatcagCGGTGACTTCAACCAAGCgcgcc	REALPHALGLHCB21 / GC-motif / W- box / CGCGBBOXAT / GTGANTG10
7	7	ggccgcAGACATCCAAGGCTGATActgata	CACTFTPPCA1
8	7	tatcagGATTATCAACCCGACACGgcgcc	GTICONSENSUS / IBOXCORE / ARR1AT / GCCCORE / LTRECOREATCOR15
9	7	ggccgcTTTCATGAGATGCAGTTActgata	DOFCOREZM / MBS / CACTFTPPCA1
10	1	ggccgcATGCTATTCTAATGAGTTctgata	-10PEHVPSBD / PREATPRODH

(D) Site name / Motif sequence 對照表

Light		Stress	
Site name	Motif sequence	Site name	Motif sequence
-10PEHVPSBD	TATTCT	BIHD1OS	TGTCA
AE-box	AGAAACAA	CBFHV	RYCGAC
Box I	TTTCAA	E-box	CANNTG
CAAT-box	CAAT	GC-motif	AGCGCGGCC
CGACGOSAMY3	CGACG	LTR	CCGAAA
circadian	CAANNNNATC	LTRECOREATCOR15	CCGAC
DOFCOREZM	AAAG	MBS	TAACTG
G-box	GCCACGTGGTA	PREATPRODH	ACTCAT
GTICONSENSUS	GRWAAW		
I-box	atGATAAGGTC		
IBOXCORE	GATAA		

REALPHALGLHCB21	AACCAA		
SORLIP1AT	GCCAC		
SORLIP2AT	GGGCC		
Sp1	GGG(C/T)GG		
CCA1ATLHCB1	AAMAATCT		
SITEIIATCYTC	TGGGCY		
Tissue		Pathogen	
Site name	Motif sequence	Site name	Motif sequence
CACTFTPPCA1	YACT	GCCCORE	GCCGCC
CARGCW8GAT	CWWWWWWWW	NODCON2GM	CTCTT
CAT-box	GCCACT	W-box	TTGAC/ TGACY/
GTGANTG10	GTGA		
POLLEN1LELAT52	AGAAA		
QELEMENTZMZM13	AGGTCA		
TAAAGSTKST1	TAAAG		
Hormone		Ca ²⁺ signaling	
Site name	Motif sequence	Site name	Motif sequence
ABRE	GCCGCGTGCC	CGCGBOXAT	VCGCGB
ARR1AT	NGATT		
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG		
ERE	ATTTCAAA		
TGA-element	AACGAC		

註：對於 HY5, AtbZIP16, AtbZIP17，我們分別挑選了 42, 30, 31 個獨立的菌株，抽出質體 DNA 後送定序並與資料庫 (PlantCare, Place) 比對。我們將找到的 motifs 功能分為六組：light, ；stress, ；tissue, ；pathogen, ；hormone, ；Ca²⁺ signaling, ，其中 HY5 的已知結合序列 G-box 特別以紅框標明。(A) 轉錄因子 HY5 的可能結合序列與資料庫比對結果。(B) 轉錄因子 AtbZIP16 的可能結合序列與資料庫比對結果。(C) 轉錄因子 AtbZIP17 的可能結合序列與資料庫比對結果。(D) Site name / Motif sequence 對照表。

結論與應用

本實驗藉由細菌單雜合系統，輔以轉錄因子 AtbZIP56 (HY5) 為正向控制組，尋找 AtbZIP16 與 AtbZIP17 的 DNA 啟動子結合序列，並對這些序列作進一步的分析。實驗結果顯示：

- 一、針對正向控制組 HY5，我們找到了 9 種可能的 DNA 結合序列，序列中含有的 motifs 包括已知會與 HY5 結合的 G-box。
- 二、對於 AtbZIP16 與 AtbZIP17，我們分別找到了 7, 10 種可能的 DNA 結合序列。
- 三、這些可能的結合序列經資料庫分析，共找到 38 種 motifs，功能與 light、hormone、pathogen、stress、tissue、Ca²⁺ signaling 相關。其中，又以與光調控相關的 motifs 佔了最大的比例。
- 四、含有這些結合序列出現在上游 1000-bp 啟動子序列的基因，在 light, hormone, stress 等不同環境因子的處理下皆會被活化。

就應用部分而言，受光調控的轉錄因子對於植物是否能適當的反應光的刺激佔有很重要的地位，而根據我們的實驗結果顯示，光對 AtbZIP16 與 AtbZIP17 是一個主要的調控因子，但目前尚未有較深入的研究。接下來若能證實此二轉錄因子找到的 DNA 啟動子結合序列，進而搜尋其所調控的下游基因，藉由了解這些下游基因的特性後，將有助於釐清 AtbZIP16 與 AtbZIP17 的在植物體中所扮演的角色。另外，對於 AtbZIPs 如何參與調控植物體生長與發育亦有正面的幫助。

未來展望

針對 HY5, AtbZIP16, AtbZIP17，我們目前分別找到了 9, 7, 10 種可能的結合序列。一般而言，轉錄因子會與長度約 6-bp 的 DNA 片段結合，由於我們目前所得到的序列較少，尚未能分析出這些序列中具高保守性的片段（consensus sequence）。未來可以在進行第一階段 3-AT 篩選時，選擇較低的篩選濃度（1-5 mM 3-AT），相信實驗結果將可取得更多的可能結合序列。經由相互比對，可找到具有高保守性的片段，再作進一步的分析。

再者，由於阿拉伯芥與大腸桿菌的種類不同，未來可以藉由阿拉伯芥原生質體短暫表現啓動子活性之分析（*Arabidopsis protoplast transient promoter activation assay*），將可能的結合序列做進一步確認。即在 AtbZIP16 和 AtbZIP17 可能的 DNA 結合序列後面接上一個報告基因（Reporter gene），與 *AtbZIP16* 或 *AtbZIP17* 同時轉入原生質體中，若 AtbZIP16 和 AtbZIP17 與此序列確實能夠結合，將可在原生質體中觀察到報導基因的表現受到影響。利用此實驗確定蛋白質與 DNA 的結合關係在阿拉伯芥植物體內依然存在。

參考文獻

一、中文參考文獻

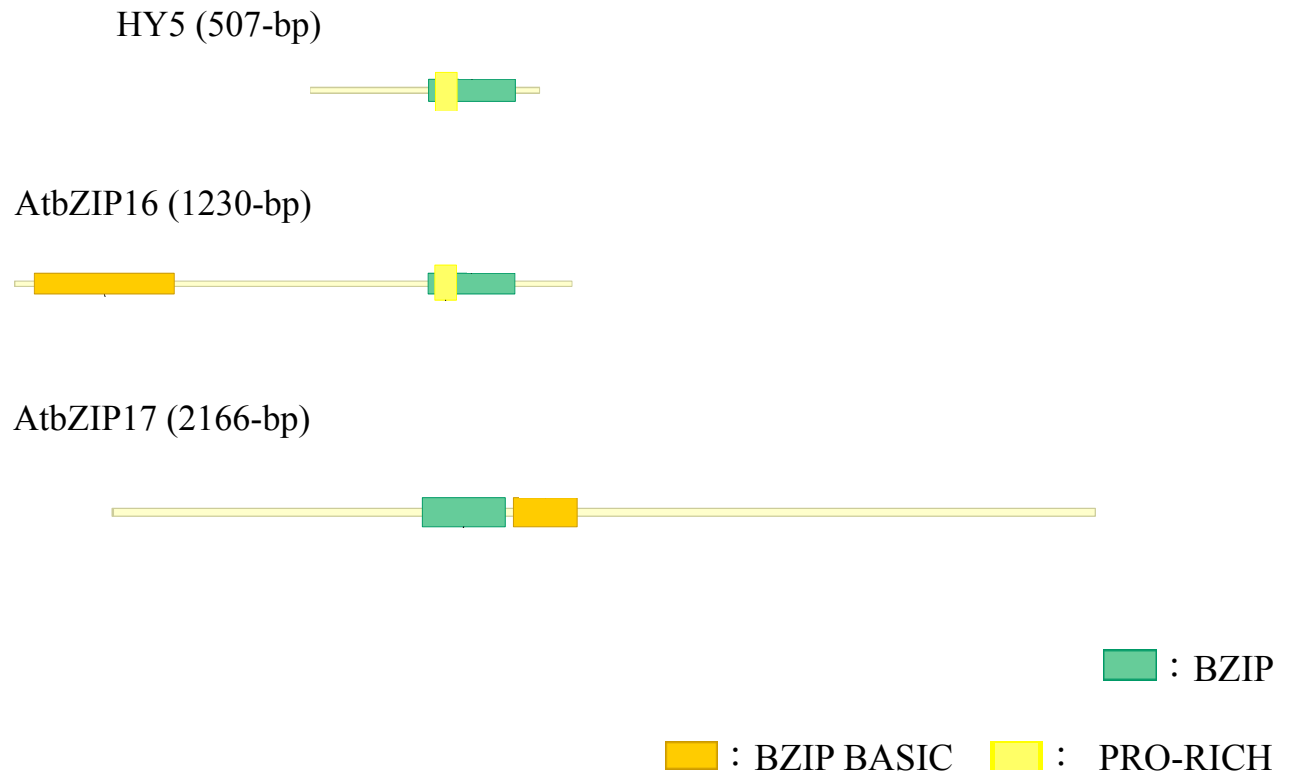
1. **Neil A. Campbell and Jane B. Reece** 原著，鍾楊聰、張立雪、徐歷鵬、黃璧祈編譯 (2005)。CAMPBELL 生物學(六版，上冊)，第三單元—基因。台北：偉明圖書。
2. **David P. Clark and Lonnie D. Russell**原著，朱雲瑋、蔡淳淳、曾慶宗、胡虞國編譯 (2003)。分子生物學—輕輕鬆鬆學分生(Molecular Biology—made simple and fun) (二版)，第三章—基礎遺傳學。台北：藝軒圖書。

二、英文參考文獻

1. **Deppmann, C.D., Acharya, A., Rishi, V., Wobbes, B., Smeekens, S., Taparowsky, E.J., and Vinson, C.** (2004). Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to Homo sapiens B-ZIP motifs. *Nucleic Acids Res* **32**, 3435-3445.
2. **Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F.** (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **7**, 106-111.
3. **Meng, X., Brodsky, M.H., and Wolfe, S.A.** (2005). A bacterial one-hybrid system for determining the DNA-binding specificity of transcription factors. *Nat Biotechnol* **23**, 988-994.
4. **Meng, X., and Wolfe, S.A.** (2006). Identifying DNA sequences recognized by a transcription factor using a bacterial one-hybrid system. *Nat Protocols* **1**, 30-45.
5. **Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W.** (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* **405**, 462-466.
6. **Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P.,**

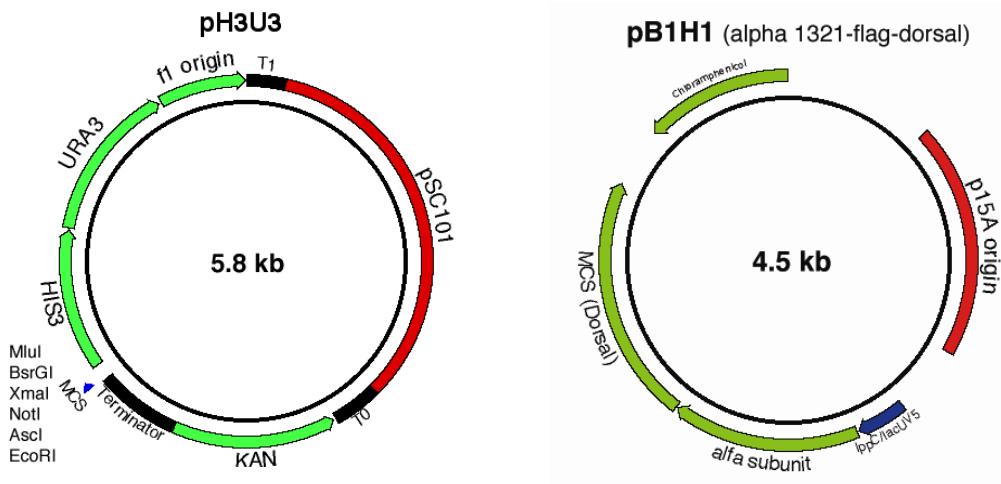
- Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., and Yu, G.** (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.
7. **Sambrook, J., Russell, D.W.** (2001). *Molecular cloning*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 8. **Sullivan, J.A., and Deng, X.W.** (2003). From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Dev Biol* **260**, 289-297.
 9. **Ulm, R., Baumann, A., Oravecz, A., Mate, Z., Adam, E., Oakeley, E.J., Schafer, E., and Nagy, F.** (2004). Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1397-1402

附錄

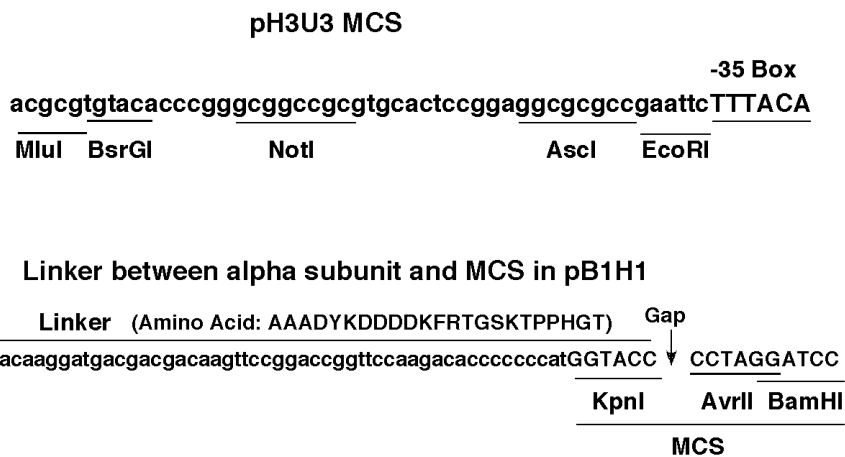


附圖一 | 轉錄因子 HY5, AtbZIP16, AtbZIP17 基因示意圖。

(A)



(B)



附圖二 | 細菌單雜合系統之載體示意圖與其 MCS 序列。(A) 隨機結合序列基因庫表現載體 pH3U3 帶有報告基因 *HIS3* 與 *URA3*；轉錄因子表現載體 pB1H1 帶有 RNA 聚合酶的 α 次單元。(B) 我們選擇限制酶 *NotI* 與 *AscI* 將結合序列基因庫與 pH3U3 接合；對於 HY5, AtbZIP16，我們選擇 *KpnI* 與 *AvrII*，AtbZIP17 則選擇 *KpnI* 與 *XbaI*。

實驗材料配方

一、LB medium/agar plate

1、準備以下藥品：

Stock reagent	Amount
LB broth mixture	20 g
bacto-agar (for agar plate)	20 g
ddH ₂ O	1 L

2、混合均勻後以鋁箔紙封住錐形瓶口。

3、送至 Autoclave 中，在相對大氣壓 1.2 atm，121 °C 下加熱 20 分鐘。

4、若為 agar plate 則待溶液降至約 55 °C 時加入抗生素分裝成盤。

註：LB broth mixture (Amersham Life Science，USB，Cat.140058，Cleveland，Ohio，USA)。

二、2× YT medium

1、準備以下藥品：

Stock reagent	Amount
tryptone	16 g
yeast extract	10 g
NaCl	5 g
補 ddH ₂ O 至	1 L

2、送至 autoclave 中，在相對大氣壓 1.2 atm，121 °C 下加熱 20 分鐘。

三、SOB medium

Stock reagent	Final Concentration	Amount
tryptone	2 %	20 g
yeast extract	0.5 %	5 g
NaCl	10 mM	0.58 g
KCl	2.5 mM	0.186 g
補 ddH ₂ O 至		1 L

1、以 2N HCl 調 pH 值至 7.0。

2、並於使用前加

Stock reagent	Final Concentration	Amount
1 M MgCl ₂	1 mM	10 ml
1 M MgSO ₄	1 mM	10 ml

四、SOC medium

Stock reagent	Final Concentration	Amount
tryptone	2 %	20 g
yeast extract	0.5 %	5 g
NaCl	10 mM	0.58 g
KCl	mM	0.186 g
補 ddH ₂ O 至		1 L

1、並於使用前加入：

Stock reagent	Final Concentration	Amount
1 M glucose		20 ml
1 M MgCl ₂	1 mM	10 ml
1 M MgSO ₄	1 mM	10 ml

五、NM medium (minimal glucose medium lacking histidine)

500 ml 的溶液

Stock reagent	Final Concentration	Amount
10× M9 salts	1 ×	50 ml
20% glucose	0.4 %	10 ml
20 mM adenine HCl	200 μM	5 ml
amino acid mixture	1 ×	15 ml
1M MgSO ₄	1 mM	0.5 ml
10 mg/ml thiamine	10 μg/ml	0.5 ml
10 mM ZnSO ₄	10 μM	0.5 ml
100 mM CaCl ₂	100 μM	0.5 ml
20 mM uracil	200 μM	5 ml
Autoclaved ddH ₂ O		418 ml
Total		500 ml

以 0.22 μm filter 過濾後存於 4 °C。

六、500 ml 的 agar

取 418 ml ddH₂O 及 bacto-agar 7.5 g 混合均勻後送至 Autoclave 中，在相對大氣壓 1.2 atm，121 °C 下滅菌 20 分鐘。待溶液冷卻至約 55 °C 時加入 NM medium (用於配製 agar plate 的 NM medium 不含 ddH₂O)，混合均勻，並配置成盤。

七、3-AT selective (positive) NM plates

取 418 ml ddH₂O 及 bacto-agar 7.5 g 混合均勻後送至 Autoclave 中，在相對大氣壓 1.2 atm，121 °C 下滅菌 20 分鐘。待溶液冷卻至約 65 °C 時加入 NM medium (用於配製 3-AT selective (positive) NM plates 的 NM medium 不含 ddH₂O)、250 µl Kan (50 mg/ml)、500 µl Cm (30 mg/ml)、500 µl IPTG (10 mM) 和所需要濃度的 3-AT，混合均勻，並配置成盤。

註：3-AT stock 的配法：

取 4.024 g 3-AT 加入 50 ml ddH₂O 製成 1 M stock，並以 0.22 µm filter 過濾後存於 4 °C。

八、YM medium

Stock reagent	Final Concentration	Amount
10× M9 salts	1 ×	50 ml
20% glucose	0.4 %	10 ml
1M MgSO ₄	1.5 mM	0.5 ml
10 mg/ml thiamine	10 µg/ml	0.5 ml
10 mM ZnSO ₄	10 µM	0.5 ml
100 mM CaCl ₂	100 µM	0.5 ml
20 mM uracil	200 µM	5 ml
histidine	5 mg/ml	2.5 g
yeast extract	100 µg/ml	50 mg
補 ddH ₂ O 至 Total		500 ml

九、5-FOA selective (negative) YM plates

1、取 250 ml ddH₂O 及 bacto-agar 9 g 混合均勻後送至 Autoclave 中，在相對大氣壓 1.2 atm，121 °C 下加熱 20 分鐘。

2、準備 buffer mixture：如上述之 YM medium 67 ml (不含 histidine 與 yeast extract)。

3、取 150 ml ddH₂O 加入 0.174 g 5-FOA 並微波 90 秒。再加入 2.5 g histidine (最終濃度 5 mg/ml)、50 mg yeast extract (最終濃度 100 µg/ml)、67 ml buffer mixture 以及 33 ml ddH₂O，並以 0.22 µm filter 過濾。

4、將步驟 8.1 之溶液加入步驟 8.3 之濾液中，待放涼至 55 °C 後再加入 250 μ l Kan (50 mg/ml) 分裝成盤。

十、Amino acid mixture (含有 20 種胺基酸中的 17 種，即不含 Histidine、Methionine、Cysteine)

1、配置以下 solution I ~ VI 溶液。

2、Solution I (200 \times) :

Stock reagent	Amount
Phenylalanine	0.99 g
Lysine	1.1 g
Arginine	2.5 g
ddH ₂ O	100 ml

3、Solution II (200 \times) :

Stock reagent	Amount
Glycine	0.2 g
Valine	0.7 g
Alanine	0.82 g
Tryptophan	0.41 g
ddH ₂ O	100 ml

4、Solution III (200 \times) :

Stock reagent	Amount
Threonine	0.71 g
Serine	8.4 g
Proline	4.6 g
Asparagine	0.96 g
ddH ₂ O	100 ml

5、Solution IV (200 \times) 依序加入 :

Stock reagent	Amount
HCl	9 g
ddH ₂ O	80 ml
Aspartic acid (free acid)	1.04 g
Glutamine	14.6 g
ddH ₂ O	100 ml

6、Solution V (200×) 依序加入：

Stock reagent	Amount
Glutamic acid 溶解均勻	18.7 g
Tyrosine	0.36 g
NaOH pellet	4 g
ddH ₂ O	100 ml

7、Solution VI (200×)

Stock reagent	Amount
Isoleucine	0.79 g
Leucine	0.77 g
ddH ₂ O	100 ml

8、以上 solution I~VI 各取相等的體積混合得到 100/3× 之 Amino acid mixture。

9、存於 4 °C。

十一、Inoue Transformation Buffer

1. 依序準備下列藥品：

Stock reagent	Final Concentration	Amount
HEPES	10 mM	2.4 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	15 mM	2.20 g
KCl	250 mM	18.65 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	55 mM	10.88 g
ddH ₂ O		1 L

註：HEPES 以 KOH 將 pH 值調到 6.7

2. 以 0.45 mm filter 過濾後於 -20 °C 保存。

3.

十二、M9 Salts：

1. 依序準備下列藥品：

Stock reagent	Amount
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2.5 g
NH ₄ Cl	5 g
ddH ₂ O	500 ml

評語

研究工作紮實深入，可以加強的是最後的生物資訊分析，如果能加以改善，會使研究更完整。